

醒脑静中环烯醚萜苷类有效成分鼻腔吸收研究

陆 洋¹, 翟永松², 姚宗玲¹, 陈晓兰¹, 杜守颖^{1*}, 吴 清¹

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069

摘 要: **目的** 研究醒脑静中环烯醚萜苷类有效成分栀子苷和京尼平龙胆双糖苷大鼠鼻腔吸收特性及其相关性。**方法** 以体积分校正法, 采用改良的大鼠在体鼻循环模型研究栀子提取物单用、与醒脑静中冰片、麝香分别配伍及醒脑静全方配伍后栀子苷及京尼平龙胆双糖苷在大鼠鼻腔的吸收。**结果** 栀子提取物中环烯醚萜苷类代表成分栀子苷和京尼平龙胆双糖苷的大鼠鼻腔吸收符合一级速率过程, 为被动吸收。艾片、合成冰片及醒脑静全方配伍可促进栀子苷及京尼平龙胆双糖苷大鼠鼻腔吸收, 人工麝香无显著促进作用。在不同配伍条件下两种成分的鼻腔吸收系数相关性良好, 线性回归方程为 $K_{\text{京尼平龙胆双糖苷}} = 0.792 \pm 0.236 K_{\text{栀子苷}} + 0.236$ ($r = 0.976$)。**结论** 醒脑静组方配伍可显著提高栀子苷及京尼平龙胆双糖苷的鼻腔吸收, 方中环烯醚萜苷类成分具有相似的鼻腔吸收特性。

关键词: 醒脑静; 栀子苷; 京尼平龙胆双糖苷; 大鼠在体鼻循环; 鼻腔吸收特性

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)03-0471-05

Nasal absorption of iridoids in Xingnaojing

LU Yang¹, ZHAI Yong-song², YAO Zong-ling¹, CHEN Xiao-lan¹, DU Shou-ying¹, WU Qing¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. School of Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: **Objective** To study the characteristic and correlation in rat nasal absorption of active components in Xingnaojing, geniposide (GE) and genipin-1- β -gentiobioside (GB). **Methods** By modified volume correction method, an *in situ* rat nasal perfusion model was used to study the nasal absorption of GE and GB in single gardenia extract or combined with other different components, such as compatibility of borneol and musk respectively in Xingnaojing, and Xingnaojing prescription as well. **Results** The nasal absorption of GE and GB in gardenia extract fitted the first-order process and could be considered as passive absorption based on concentration gradient. When gardenia extract combined with borneol (nature or synthesis) and in whole formula of Xingnaojing, the nasal absorption of GE and GB was increased, while synthetic musk had no significant effect. The correlation of nasal absorption coefficients between two components in different compatibility was good and the equation of linear regression was $K_{\text{GB}} = 0.792 \pm 0.236 K_{\text{GE}} + 0.236$ ($r = 0.976$). **Conclusion** The nasal absorption of GE and GB in Xingnaojing formula could be remarkably increased and the nasal absorption characteristic of iridoid in prescription is similar.

Key words: Xingnaojing; geniposide (GE); genipin-1- β -gentiobioside (GB); *in situ* rat nasal perfusion; nasal absorption

醒脑静由安宫牛黄方精简而来, 临床主要用于治疗气血逆乱, 脑脉瘀阻所致的中风昏迷, 偏瘫口喎等脑栓塞、脑出血见上述症状者。方中四味药物分别为人工麝香、栀子、郁金、冰片。人工麝香、艾片芳香走窜, 其有效成分麝香酮^[1-2]、龙脑^[3]易透过血脑屏障, 并具有增强其他物质通过血脑屏障的

作用。栀子苷为栀子中的主要有效成分, 本课题组以蛙皮模型模拟鼻黏膜研究了栀子提取物体外黏膜渗透情况, 栀子提取物中栀子苷体外黏膜渗透为被动扩散, 符合一级速率过程, 合成冰片和艾片均能明显提高栀子提取物栀子苷体外黏膜渗透, 且合成冰片的作用更强^[4-5]。在此基础上, 本实验进一步用

收稿日期: 2011-08-04

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09502-008); 教育部博士点基金资助项目 (20090013110007); 国家自然科学基金资助项目 (81073057, 81102816); 北京中医药大学自主选题项目 (JYBZZ-JS021); 北京中医药大学创新团队发展计划资助项目 (2011-CXTD-13)

作者简介: 陆 洋, 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药黏膜及经皮给药系统。E-mail: Landocean28@163.com

*通讯作者 杜守颖 Tel: (010)84738615 E-mail: dushouying@263.net

改良的大鼠在体鼻灌流模型考察栀子提取物与合成冰片、艾片、人工麝香配伍及合方使用后的鼻腔吸收变化,探讨复方用药与单味用药的鼻腔吸收差异,并与体外黏膜渗透结果进行相关性分析,为醒脑静鼻腔给药制剂的开发奠定基础。

1 仪器与材料

DDB—300 电子蠕动泵(上海之信仪器有限公司); Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(四元泵,紫外检测器)。

栀子提取物(实验室自制,含总环烯醚萜苷类成分>60%,含栀子苷约为 36.8%,含京尼平龙胆双糖苷约为 6.2%); 人工麝香(符合卫生部人工麝香标准 WS-210(Z-32)-93,北京联馨药业有限公司生产,批号 0906113); 郁金(安徽亳州千草药材公司)经北京中医药大学中药生药系刘春生教授鉴定为姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥块根; 艾片(贵州金色制药有限公司)经刘春生教授鉴定为菊科植物艾纳

香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. 的新鲜叶经提取加工制成的结晶; 合成冰片(北京同仁堂药店)经刘春生教授鉴定为冰片(合成龙脑); 栀子苷对照品(批号 110749-200410,中国药品生物制品检定所); 京尼平龙胆双糖苷对照品(批号 081041,质量分数>98%,芜湖贰尔塔医药科技有限公司); 乙腈(色谱纯,Merck 公司); 其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠,雄性,体质量 250~300 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物批准号 0118910。

2 方法与结果

2.1 栀子提取物分析方法的确定^[6]

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(14:86),检测波长 238 nm,体积流量 1.0 mL/min,进样量 10 μL,柱温为室温。京尼平龙胆双糖苷出峰时间 7.16 min,栀子苷出峰时间 11.64 min,鼻灌流液无相关物质干扰(图 1)。

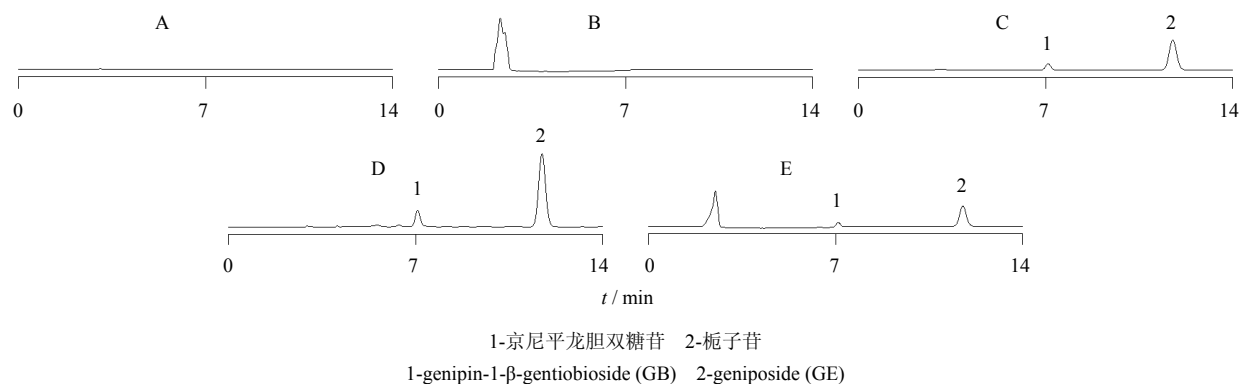


图 1 甲醇(A)、空白灌流液(B)、栀子苷与京尼平龙胆双糖苷混合对照品(C)、栀子提取物甲醇溶液(D)和栀子提取物大鼠鼻腔灌流液(E)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of methanol (A), blank nasal perfusion fluid (B), mixed reference substances of GE and GB (C), gardenia extract in methanol solution (D), and gardenia extract in nasal perfusion fluid (E)

2.1.2 线性关系考察 精密称取栀子苷对照品 5.70 mg 置 10 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度;精密称取京尼平龙胆双糖苷对照品 2.75 mg 置 10 mL 量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度;精密吸取上述栀子对照品溶液 5 mL 及京尼平龙胆双糖苷对照品溶液 2.5 mL 置同一 25 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,即得含栀子苷 114.0 μg/mL、京尼平龙胆双糖苷 27.5 μg/mL 的混合对照品溶液。分别精密吸取此混合对照品溶液 4.0、3.0、2.0、1.0、0.4、0.2 mL 置 10 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,即得栀子苷、京尼平龙胆双糖苷质量浓度分别为(114.0、27.5)、(45.6、

11.0)、(34.2、8.25)、(22.8、5.50)、(11.4、2.75)、(4.56、1.10)、(2.28、0.55) μg/mL 的混合对照品溶液,各进样 10 μL,记录峰面积,以峰面积对质量浓度进行线性回归,得栀子苷在 2.28~114.0 μg/mL 与峰面积线性关系良好,回归方程为 $Y=16.310X+3.995$, $r=0.99998$; 京尼平龙胆双糖苷在 0.55~27.5 μg/mL 与峰面积线性关系良好,回归方程为 $Y=12.643X-1.395$, $r=0.9997$ 。

2.2 大鼠鼻腔循环灌流

2.2.1 动物模型的准备 取体质量 250 g 左右的 SD 雄性大鼠,饲养 1~3 d,待其充分适应环境后,正

常饮水, 禁食 12 h。按文献方法^[6]将大鼠麻醉后, 手术插管并与蠕动泵连接, 使药液循环。

2.2.2 鼻腔灌流循环试验 循环液体积流量设为 2.5 mL/min。首先以生理盐水 10 mL 循环 10 min, 测定循环前后的生理盐水体积, 若体积变化小于 0.1 mL, 则整个环路密封性良好, 无漏液情况。排尽生理盐水后, 取 5 mL 药液置量筒中, 37 °C 水浴恒温, 将蠕动泵进液管插入量筒底部, 启动蠕动泵, 待大鼠鼻中药液滴出时开始计时, 设为 0 时, 于 0、10、20、30、45、60、90、120 min 读取量筒中剩余药液体积 V_n 后取样 0.25 mL, 补加循环药液 0.25 mL, 以 HPLC 法测定各时间点剩余药物质量浓度 C_n 。其中循环死体积为 $V_D = (5 - V_0)$

剩余药量 (Q_n) 的计算方法 (体积法)

$$Q_n = (V_n + V_D)C_n + \left[\sum_{i=1}^{n-1} C_i - (n-1)C_x \right] \times 0.25$$

Q_n 为第 n 个时间点的剩余药量 (μg); ($V_n + V_D$) 为第 n 个时间点循环液的实际体积 (mL); C_n 为第 n 个取样点测得的药物质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$); C_x 为补加的循环药液 (母液) 的质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$); 0.25 代表取样 0.25 mL。

通过不同时间点的 Q_n 计算各时间点剩余药量百分率 (X), 取对数后与相应时间 t 进行回归, 回归直线的斜率即为吸收速率常数 (K), K 的大小可反映药物的鼻腔吸收情况。

$$X = Q_n / Q_0$$

$$\ln X = -Kt$$

文献报道鼻循环灌流过程中鼻腔对水分的分泌和重吸收可忽略不计^[7]。但根据试验中的实际情况, 大鼠在 2 h 左右一般会吸收 1 mL 左右的吸收液, 溶液体积的变化对药物吸收量的计算影响极大, 经过多次预试验确定以体积法计算各时间点的 Q_n 值。

2.2.3 栀子提取物中栀子苷和京尼平龙胆双糖苷在大鼠鼻灌流液中稳定性研究 按照“2.2.2”项方法, 以生理盐水为循环液, 将蠕动泵进液口接一根聚乙烯管, 插入盛有 10 mL 生理盐水的容器中, 蠕动泵出液口连接进入大鼠鼻腔的聚乙烯管, 开启蠕动泵使生理盐水通过鼻腔, 循环 2 h 后, 转移后定容到 10 mL, 即得大鼠鼻腔分泌液。

以所得的鼻腔分泌液配制质量浓度为 50、250、500 $\mu\text{g/mL}$ 的栀子提取物溶液, 并置于 37 °C 水浴中孵育震荡, 分别于 0、1、2、4 h 取样, 进样 10 μL , 测定栀子苷和京尼平龙胆双糖苷的量, 计算不同时间的 RSD。低、中、高 (50、250、500 $\mu\text{g/mL}$) 质

量浓度栀子提取物中栀子苷在大鼠鼻腔分泌液质量浓度变化的 RSD 分别为 0.88%、1.04%、0.51%, 京尼平龙胆双糖苷的 RSD 为 0.43%、1.27%、0.46%, 说明两种成分在大鼠鼻腔分泌液中 4 h 内稳定性良好。

2.2.4 蠕动泵管路的物理吸附情况考察 本课题组已有研究报道表明 3 h 内栀子苷在循环管路中基本不吸附^[8]。

2.3 栀子提取物质量浓度对栀子苷和京尼平龙胆双糖苷鼻腔吸收的影响^[6]

精密称取栀子提取物适量, 配制成质量浓度为 100、250、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的栀子提取物生理盐水溶液, pH 为 6.8。

按“2.2.2”项进行各质量浓度栀子提取物大鼠鼻腔灌流试验, 结果见图 2 和表 1。对低、中、高 (100、250、1 000 $\mu\text{g/mL}$) 3 组数据进行方差分析, 无显著差异。采用 t 检验进行差异检验, 发现不同质量浓度的栀子提取物中栀子苷大鼠鼻腔 K 无显著差异。京尼平龙胆双糖苷与栀子苷的结果相同, 在质量浓度为 100~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的栀子提取物中, 栀子苷和京尼平龙胆双糖苷的吸收均符合一级吸收模型, 推测水溶性环烯醚萜苷类成分鼻腔吸收为基于浓度梯度的被动扩散, 且没有饱和现象。

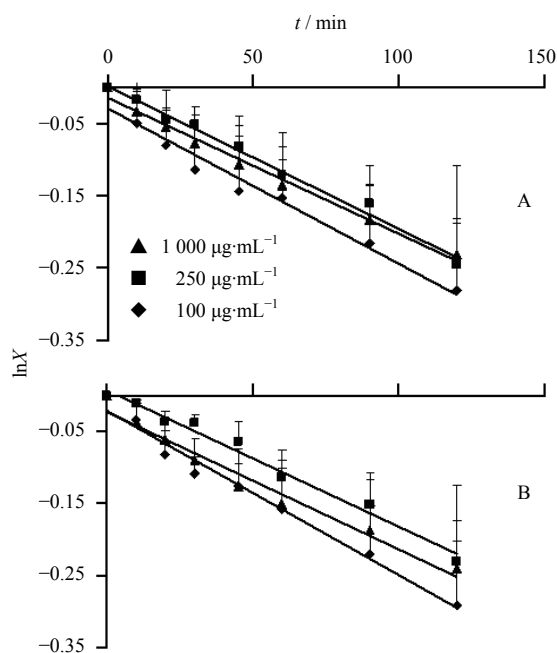


图 2 不同质量浓度栀子提取物中栀子苷 (A) 和京尼平龙胆双糖苷 (B) 大鼠鼻腔吸收 ($n=6$)

Fig. 2 Nasal absorption of GE (A) and GB (B) at different concentrations of gardenia extract ($n=6$)

表 1 不同质量浓度栀子提取物中栀子苷和京尼平龙胆双糖苷鼻腔吸收的 K 值 ($n=6$)

Table 1 Nasal absorption K values of GE and GB of gardenia extract at different concentrations ($n=6$)

质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$K / (\times 10^{-3}\cdot\text{min}^{-1})$	
	栀子苷	京尼平龙胆双糖苷
100	2.15 ± 0.70	2.28 ± 0.76
250	1.97 ± 0.48	1.90 ± 0.50
1 000	1.87 ± 0.81	1.91 ± 0.85

2.4 不同来源冰片对栀子提取物中栀子苷和京尼平龙胆双糖苷鼻腔吸收的影响

前期体外黏膜渗透结果表明^[5], 合成冰片较艾片对栀子提取物有更强的促渗效果, 本部分以在体吸收模型对两种冰片的促吸收效果进行进一步研究。

对照组: 称取栀子提取物 15 mg 置 50 mL 量瓶中, 加入 2 mL 乙醇及 1 mL 10% 聚山梨酯 80 溶液, 超声 1 min, 分次补加生理盐水至刻度, 混匀备用。

合成冰片组: 称取合成冰片 10 mg 及栀子提取物 15 mg 置 50 mL 量瓶中, 加入 2 mL 乙醇及 1 mL 10% 聚山梨酯 80 溶液, 超声 1 min, 分次补加生理盐水至刻度, 混匀备用。

艾片组: 称取艾片 10 mg 及栀子提取物 15 mg 置 50 mL 量瓶中, 加入 2 mL 乙醇及 1 mL 10% 聚山梨酯 80 溶液, 超声 1 min, 分次补加生理盐水至刻度, 混匀备用。

各组按“2.2.2”项进行大鼠鼻腔灌流实验, 结果见图 3 和表 2。从表中数据可以看出, 合成冰片及艾片均对栀子提取物中栀子苷和京尼平龙胆双糖苷的鼻腔吸收有显著的促进作用, 合成冰片效果要略高于艾片, 这与体外黏膜渗透结果一致。

2.5 人工麝香及合方对栀子提取物中栀子苷和京尼平龙胆双糖苷鼻腔吸收的影响

人工麝香组: 称取人工麝香 75 mg 及栀子提取物 15 mg 置 50 mL 量瓶中, 加入 2 mL 乙醇及 1 mL 10% 聚山梨酯 80 溶液, 超声 1 min, 分次补加生理盐水至刻度, 混匀备用, 用前以 0.22 μm 滤头滤过后使用。

合方组: 按醒脑静的组方配比分别称取艾片、人工麝香、郁金挥发油及栀子提取物置 50 mL 量瓶中, 加入 2 mL 乙醇及 1 mL 10% 聚山梨酯 80 溶液, 超声 1 min, 分次补加生理盐水至刻度, 混匀备用, 使样液最终质量浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (按栀子提取物

计算), 用前以 0.22 μm 滤头滤过后使用。

各组按“2.2.2”项进行大鼠鼻腔灌流试验, 结果见图 4 和表 2。从表中数据可以看出, 人工麝香对栀子提取物中栀子苷和京尼平龙胆双糖苷的鼻腔吸收均无显著促进作用。而合方后栀子苷的吸收有显著的提高 ($P<0.05$), 合方后京尼平龙胆双糖苷的吸收有一定的提高, 但没有显著性。推测醒脑静中主要是冰片促进了环烯醚萜苷类成分的鼻腔吸收。

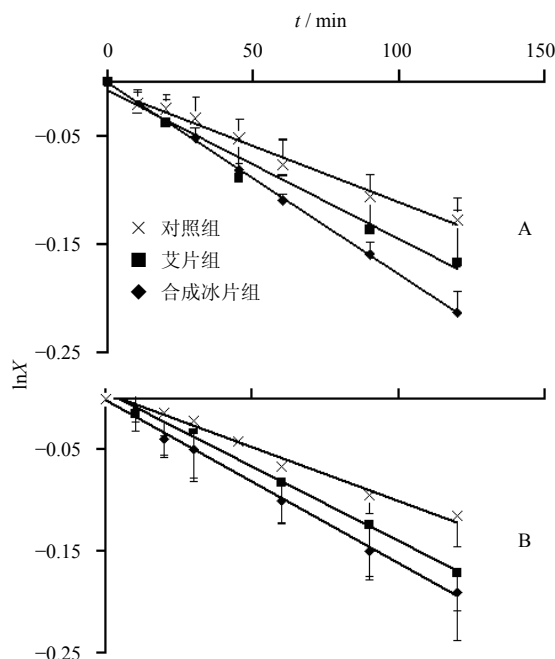


图 3 不同来源冰片对栀子提取物中栀子苷 (A) 和京尼平龙胆双糖苷 (B) 鼻腔吸收的影响 ($n=4$)

Fig. 3 Influence of borneol (nature or synthesis) on nasal absorption of GE (A) and GB (B) in gardenia extract ($n=4$)

表 2 不同来源冰片、人工麝香配伍栀子提取物及合方中栀子苷和京尼平龙胆双糖苷鼻腔吸收的 K 值 ($n=4$)

Table 2 Nasal absorption K values of GE and GB in gardenia extract combined with borneol (nature or synthesis), synthetic musk, and in whole formula of Xingnaojing ($n=4$)

组别	$K / (\times 10^{-3}\cdot\text{min}^{-1})$	
	栀子苷	京尼平龙胆双糖苷
对照组	1.01 ± 0.18	1.06 ± 0.14
合成冰片组	$1.77 \pm 0.11^{**}$	$1.60 \pm 0.29^{**}$
艾片组	$1.43 \pm 0.25^{*}$	$1.45 \pm 0.24^{*}$
人工麝香组	1.11 ± 0.42	1.07 ± 0.27
合方组	$1.29 \pm 0.08^{*}$	1.25 ± 0.19

与对照组比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$

$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs control group

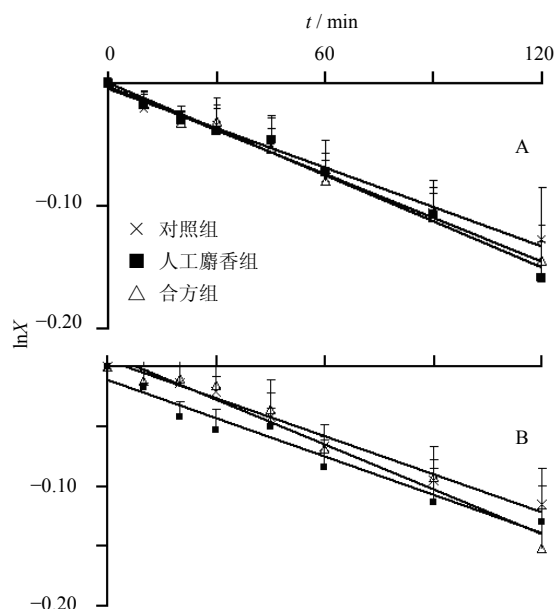


图 4 人工麝香及合方对栀子提取物中栀子苷 (A) 和京尼平龙胆双糖苷 (B) 鼻腔吸收的影响 ($n=4$)

Fig. 4 Influence of GE (A) and GB (B) in gardenia extract combined with synthetic musk and in whole formula of Xingnaojing on nasal absorption ($n=4$)

2.6 栀子提取物中环烯醚萜苷类成分在体鼻腔吸收相关性研究

将对照组、配伍艾片组、配伍合成冰片组、配伍人工麝香组及合方组所得栀子苷和京尼平龙胆双糖苷的 K 值进行相关性分析, 各组栀子苷及京尼平龙胆双糖苷的鼻腔吸收呈很好的相关性。以栀子苷各组的 $K/10^{-3}$ 值为横坐标 (X), 京尼平龙胆双糖苷相应各组的 $K/10^{-3}$ 值作为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归曲线方程为 $Y=0.7921X+0.2367$, $r=0.9760$ 。

3 讨论

本研究基于文献报道及实验室前期的研究基础^[9-10], 以体积校正-大鼠鼻灌流实验模型进行了栀子提取物中环烯醚萜苷类成分栀子苷和京尼平龙胆双糖苷的鼻腔吸收研究, 并进一步探讨了醒脑静中其他药物对两种成分吸收的影响。实验结果说明冰片可以显著促进环烯醚萜苷类成分的鼻腔吸收, 且合成冰片较艾片有更高的促吸收效果, 麝香提取物则无显著性影响, 郁金挥发油因其量极低, 故未分组研究。醒脑静全方配伍后两种成分的鼻腔吸收系

数要小于仅与艾片配伍, 提示醒脑静中其他成分在一定程度上可能对抗艾片的促吸收作用, 这与体外黏膜渗透的结果一致^[5]。此外, 由于本实验间隔较长, “2.3”项下 (同一批动物) 所得的栀子提取物中栀子苷和京尼平龙胆双糖苷的 K 值与后面配伍实验 (另一批动物) 中对照组 (同样也为栀子提取物) 所得 K 值差异较大, 提示在进行在体吸收试验时, 环境因素和动物因素对实验结果影响显著。

栀子苷及京尼平龙胆双糖苷是栀子中环烯醚萜苷类化学成分的代表, 也是醒脑静中栀子提取物的主要有效成分。基于本研究建立的相关性方程, 通过主要药效成分 (栀子苷) 的系统研究, 即可推测京尼平龙胆双糖苷的吸收, 乃至栀子提取物的吸收, 对醒脑静鼻腔给药制剂的开发提供了可靠而简便的生物药剂学研究方法。

参考文献

- [1] 陈文垲, 黄玉芳, 王海东. 麝香“归经入脑”的实验研究 [J]. 中西医结合学报, 2004, 2(4): 288-289.
- [2] 吴建伟, 魏晓舒. 醒脑静注射液中麝香酮的含量测定 [J]. 中草药, 1999, 30(4): 272-272.
- [3] 苏玉生. 冰片的药理研究及临床应用 [J]. 山东中医杂志, 2003, 22(9): 571-573.
- [4] 陆洋, 杜守颖, 姚宗玲, 等. 栀子提取物黏膜渗透影响因素研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(3): 272-274.
- [5] 陆洋, 杜守颖, 姚宗玲, 等. 天然冰片、合成冰片对栀子提取物黏膜促渗作用研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(9): 13-17.
- [6] Lu Y, Chen X L, Du S Y, et al. The *in situ* and *in vivo* study on enhancing effect of borneol in nasal absorption of geniposide in rats [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(5): 691-696.
- [7] Olivier J C, Djilani M, Fahmy S, et al. *In situ* nasal absorption of midazolam in rats [J]. Int J Pharm, 2001, 213(1/2): 187-192.
- [8] 张倩怡, 杜守颖, 陆洋, 等. 栀子提取物中栀子苷油水分分配系数及大鼠肠吸收动力学研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14): 1840-1844.
- [9] 刘广利, 唐星. 甲磺酸二氢麦角毒碱溶液鼻黏膜吸收的研究 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(8): 612-616.
- [10] 黄惠锋. 安宫牛黄鼻用脑靶向制剂的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.