

基于单向灌流法的葛根素羧甲基壳聚糖微球肠吸收特性研究

刘诗雨, 柏希慧, 董林娟, 王昌利*, 宋 逍*

陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046

摘要: **目的** 考察葛根素羧甲基壳聚糖微球的在体肠吸收特性。**方法** 采用大鼠在体单向灌流法, 以 HPLC 法测定葛根素的量, 分别考察不同灌流体积流量、药物质量浓度、肠段对药物吸收的影响, 并对比了葛根素原料药及载药微球的吸收特性。**结果** 灌流体积流量对葛根素的吸收速率常数 (K_a) 和表观渗透系数 (P_{app}) 有显著性影响 ($P < 0.05$); 葛根素的质量浓度对 K_a 和 P_{app} 无显著性影响 ($P > 0.05$); 葛根素在空肠和回肠的 K_a 和 P_{app} 无显著性差异, 但均显著大于在十二指肠处的值 ($P < 0.05$); 载药微球在空肠的 K_a 和 P_{app} 值显著高于葛根素原料药 ($P < 0.05$)。**结论** 葛根素羧甲基壳聚糖微球中葛根素的吸收机制为被动扩散, 其在空肠和回肠段吸收较好, 羧甲基壳聚糖作为载体能显著提高葛根素的吸收。

关键词: 葛根素羧甲基壳聚糖微球; 葛根素; 单向肠灌流; 重量法; 吸收速率常数; 表观渗透系数

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)14-2488-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.016

Study on rat small intestinal absorption features of puerarin loaded *O*-carboxymethyl chitosan microspheres based on single pass perfusion method

LIU Shi-yu, BAI Xi-hui, DONG lin-juan, WANG Chang-li, SONG Xiao

Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: **Objective** To study the rat intestinal absorption characteristic of puerarin loaded *O*-carboxymethyl chitosan (CMCS) microspheres *in situ*. **Methods** Single-pass intestinal perfusion (SPIP) model was used for rat *in situ* and HPLC to determine the concentration of puerarin. The effects of different perfusion rate, drug concentration, and intestinal segments on intestinal absorption were investigated, and the absorption characteristics of the puerarin and puerarin loaded *O*-CMCS microspheres were compared. **Results** Perfusion rate had significant effect on the absorption rate constants (K_a) and the apparent absorption coefficient (P_{app}) ($P < 0.05$); The concentration of puerarin in perfusate had no significant effect on K_a and P_{app} ($P > 0.05$); K_a and P_{app} of drug loaded microspheres in jejunum and ileum showed no significant difference, but they were significantly higher than that in duodenum ($P < 0.05$); The drug loaded microspheres and puerarin had the significant difference in K_a and P_{app} in jejunum ($P < 0.05$). **Conclusion** The absorption mechanism of puerarin in the microspheres is passive diffusion, puerarin is absorbed well in jejunum and ileum, and puerarin loaded *O*-CMCS microspheres can significantly improve the absorption of puerarin.

Key words: puerarin loaded *O*-carboxymethyl chitosan microspheres; single-pass intestine perfusion; gravimetric method; absorption rate constants; apparent absorption coefficient

葛根 *Puerariae Lobatae Radix* 为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 具有解肌退热、透疹、生津止渴、升阳止泻之功效^[1]。葛根所含成分复杂, 其中葛根素 (puerarin) 为主要有效成分, 具有增加冠脉血流量、降低血压、降低心肌耗氧量等药理活性, 临床上常用来治疗心脑血管疾

病^[2-4]。但是葛根素存在水溶性和脂溶性均较差、体内生物半衰期短、口服生物利用度较低等缺陷, 严重限制了其临床应用。为了提高葛根素口服生物利用度, 前期研究中以羧甲基壳聚糖为载体成功制备葛根素羧甲基壳聚糖微球^[5]。本实验在此基础上, 采用大鼠在体小肠单向灌流模型对葛根素羧甲基

收稿日期: 2016-01-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373944); 陕西省科技统筹创新工程计划项目 (2012KTCQ03-13)

作者简介: 刘诗雨 (1992—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: 18710881673 E-mail: 1048575653@qq.com

*通信作者 王昌利 (1958—), 男, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: 13239103433 E-mail: wcl3433@163.com

宋 逍 (1979—), 男, 博士, 副教授, 主要从事天然药物纯化及新剂型的研究。Tel: 15319015083 E-mail: songxiao1999@sohu.com

壳聚糖微球的小肠吸收特性进行考察, 以期为葛根素口服制剂的研究提供必要生物药剂学依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

葛根素对照品 (中国食品药品检定研究院, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 110752-201506); 葛根素原料药 (陕西昂煦生物科技有限公司, 质量分数为 98%, 批号 20150215); 葛根素羧甲基壳聚糖微球 (实验室自制); 乌拉坦 (上海山浦化工有限公司); Krebs-ringer's 营养液 (K-R 液, pH 6.8, 每毫升含 NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、NaHCO₃ 1.37 g、NaH₂PO₄ 0.32 g、MgCl₂ 0.02 g、葡萄糖 1.40 g); 甲醇 (色谱纯, 上海阿达玛斯试剂有限公司); 水为蒸馏水。

1.2 仪器

UltiMate3000 液相色谱仪 (Thermo Fisher Scientific); BT100-1F 型蠕动泵 (保定兰格恒流泵有限公司); KH-400-KDE 型高功率数控超声波清洗器 (昆山禾创超声仪器有限公司); AR1140 万分之一天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); BT125D 万分之一天平 (德国赛多利斯集团); HH-2 型电热恒温水浴锅 (北京科伟永兴仪器有限公司); X1 型高速离心机 (Gene Company Limited)。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠, 体质量 (250 $\pm$ 20) g, 由第四军医大学实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK (军) 2011024。

2 方法与结果

2.1 葛根素微球的制备^[5]

称取 0.5 g 羧甲基壳聚糖加至水 20 mL 中, 制成 2.5% 的羧甲基壳聚糖溶液。称取等量的葛根素, 加至上述溶液中, 搅拌至溶解, 得水相。量取 120 mL 液体石蜡, 搅拌下加入 7.2 mL Span-80, 得油相。将水相缓慢滴加到油相中, 室温下乳化 30 min 后, 缓慢滴加 1 mL 25% 戊二醛并搅拌使微球完全固化。固化结束后将乳液 1 788 $\times$ g 离心 10 min, 弃去上层液体, 所得葛根素羧甲基壳聚糖微球 (以下简称葛根素微球) 用石油醚多次洗涤后于 60 $^{\circ}$ C 减压干燥 12 h。所得微球载药量、包封率和平均粒径分别为 (25.73 $\pm$ 0.15) %、(51.47 $\pm$ 0.31) % 和 (78.80 $\pm$ 0.71) μ m ($n=3$)。

2.2 葛根素的定量测定

2.2.1 色谱条件^[6] Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-水 (25:75); 检测波长 250 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱

温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取葛根素对照品 10.24 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用 K-R 液溶解稀释至刻度, 制成质量浓度为 102.4 mg/L 的葛根素对照品储备液。

2.2.3 含药肠灌流液的配制 精密称取葛根素微球适量于 K-R 液中, 超声溶解, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.4 专属性试验 取空白肠灌流液、对照品溶液、含药肠灌流液分别按照“2.2.1”项下条件测定, 记录色谱图。如图 1 所示, 葛根素保留时间约为 8.8 min, 空白肠灌流液在此保留时间处无吸收峰, 表明杂质对测定无干扰, 分析方法的专属性良好。

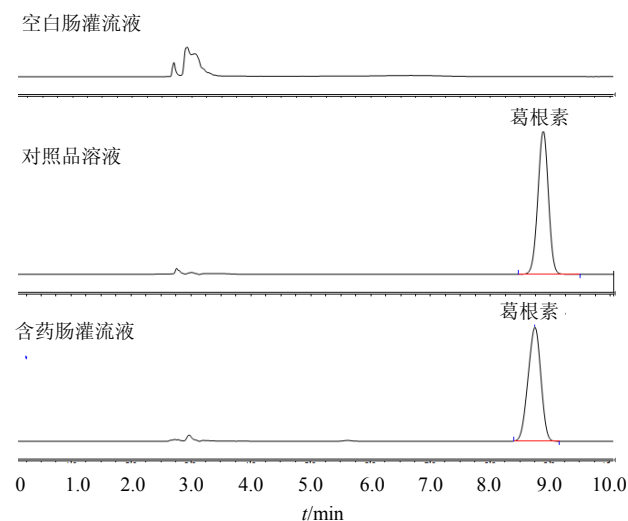


图 1 专属性考察色谱图

Fig. 1 HPLC of specificity investigation

2.2.5 线性关系考察 精密量取对照品储备液 1、2、4、6、8、10 mL 置 10 mL 量瓶中, K-R 液稀释至刻度, 配制成质量浓度分别为 10.24、20.48、40.96、61.44、81.92、102.40 mg/L 的系列对照品溶液, 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液 10 μ L 进样, 记录峰面积, 以质量浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $A=0.754 C+0.725$ ($r=0.998\ 9$), 表明葛根素在 10.24~102.4 mg/L 线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 取质量浓度为 40.96、61.44、81.92 mg/L 的葛根素对照品溶液, 于 1 日内连续测定 5 次, 连续测定 5 d, 考察日内精密度和日间精密度。结果日内精密度 RSD 分别为 3.29%、1.69%、1.34%; 日间精密度 RSD 分别为 2.34%、1.49%、0.99%, 结果表明该方法的精密度良好。

2.2.7 重复性试验 按“2.2.5”项下方法制备葛根素质量浓度分别为 40.96、61.44、81.92 mg/L 的对照品溶液各 3 份, 分别进样, 记录峰面积并计算 RSD。结果 RSD 分别为 1.73%、1.35%、1.18%, 结果表明该方法的重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 用空白肠灌流液配制 40.96 mg/L 的葛根素对照品溶液各 3 份, 37 °C 水浴锅中孵育 4 h, 每隔 1 h 取样检测, 计算葛根素峰面积的 RSD 分别为 0.53%、0.40%、0.66%, 表明葛根素在肠灌流液中 4 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 精密移取对照品储备液, 用空白肠灌流液稀释得高、中、低 (20.48、40.96、61.44 mg/L) 3 个质量浓度的对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件检测, 记录峰面积, 计算平均回收率。结果表明, 葛根素在高、中、低 3 个质量浓度下的回收率分别为 99.85%、98.13%、98.08%, 结果表明该方法的回收率良好。

2.3 大鼠在体肠灌流实验

2.3.1 实验步骤 实验前用含药肠灌流液将管道饱和一段时间, 直至出液口药液中与含药肠灌流液中葛根素质量浓度相等, 以消除实验过程中管路对药物的吸附作用。选取实验前禁食过夜 (自由饮水) 的大鼠, ip 20% 乌拉坦溶液 (1.0 g/kg) 麻醉并固定。沿腹中线剪 3~4 cm 的开口, 打开腹腔, 分离出待考察肠段, 取约 10 cm 于两端切口, 用预热至 37 °C 的生理盐水缓慢地将肠内容物冲洗干净, 于切口处插管, 结扎。将伤口用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿, 红外灯下保温。进液口用已知质量的装有含药灌流液的小瓶灌流, 出液口处用另一已知质量的小瓶收集流出液, 每隔 15 min 迅速更换 1 次灌流液小瓶和收集液小瓶, 称质量, 计算灌入和收集的灌流液质量, 持续时间为 90 min (15 min×6)。实验结束后, 剪下被考察肠段, 测量其长度 (L) 和横截面半径 (r)。

2.3.2 数据分析 本实验采用重量法对肠灌流液流入和流出的体积进行校正, 并计算药物吸收速率常数 (K_a) 和表观渗透系数 (P_{app})。

$$K_a = (1 - C_{out}Q_{out}/C_{in}Q_{in})Q/\pi r^2 L$$

$$P_{app} = [-Q \times \ln(C_{out}Q_{out}/C_{in}Q_{in})]/2\pi r L$$

Q_{in} 和 Q_{out} 分别为肠段灌入的灌流液和收集液的体积 (mL, 假定灌流液和收集液的质量浓度为 1.0 g/mL), L 和 r 分别为灌流肠段的长度 (cm) 和横截面半径 (cm), Q 为灌流体积流量, C_{in} 和 C_{out} 分别为灌流液和收集液的葛根素质量浓度 (mg/L)

2.3.3 统计学分析 采用 SPSS 15.0 软件对数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 t 检验。

2.3.4 不同灌流体积流量下药物的肠吸收 将 15 只大鼠随机分成 3 组, 每组 5 只。精密称取葛根素微球适量, 用 K-R 液配制成葛根素质量浓度为 40 mg/L 的肠灌流液, 方法同“2.3.1”项下, 以回肠为灌流部位, 比较不同灌流体积流量 (0.1、0.2、0.3 mL/min) 下葛根素的 K_a 和 P_{app} 值。随着体积流量的增大, 葛根素微球中的葛根素在回肠的 K_a 和 P_{app} 均显著增加 ($P < 0.05$)。可能由于灌流体积流量的增加, 造成肠壁细胞一定程度的脱落, 使肠壁变薄, 药物被动扩散阻力变小, 故药物吸收量增加。结果见表 1。

2.3.5 药物最佳吸收部位的考察 将 15 只大鼠随机分成 3 组, 每组 5 只。分别取以下肠段^[7]: 十二指肠段自幽门 1 cm 处开始, 空肠段自幽门 15 cm 处开始, 回肠段自盲肠上行 20 cm 处开始, 各段均取 10 cm。方法同“2.3.1”项下, 精密称取葛根素微球适量, 用 K-R 液配制成葛根素质量浓度为 40 mg/L 的肠灌流液, 灌流体积流量为 0.2 mL/min, 比较葛根素在各肠段的 K_a 和 P_{app} 值。结果表明, 葛根素微球中葛根素在空肠和回肠段的 K_a 和 P_{app} 无显著性差异, 但均显著大于十二指肠的 K_a 和 P_{app} 值 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

2.3.6 不同质量浓度条件下药物的肠吸收 将 15

表 1 不同体积流量下葛根素回肠吸收参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Absorption parameters of puerarin in ileum at different flow rates ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

体积流量/(mL·min ⁻¹)	K_a /min ⁻¹	P_{app} /(×10 ⁻³ cm·min ⁻¹)
0.1	0.019 8±0.002 4	1.58±0.19
0.2	0.029 7±0.001 9 [*]	2.39±0.16 [*]
0.3	0.038 1±0.000 8 ^{*#}	3.05±0.07 ^{*#}

与 0.1 mL·min⁻¹ 比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 0.2 mL·min⁻¹ 比较: [#] $P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs 0.1 mL·min⁻¹; [#] $P < 0.05$ vs 0.2 mL·min⁻¹

表 2 葛根素在不同肠段的吸收参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 2 Absorption parameters of puerarin in various intestinal segments on ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

肠段	K_a /min ⁻¹	P_{app} /(×10 ⁻³ cm·min ⁻¹)
十二指肠	0.019 9±0.000 5	1.60±0.04
空肠	0.029 1±0.002 1 ^{&}	2.33±0.17 ^{&}
回肠	0.029 7±0.001 9 ^{&}	2.39±0.16 ^{&}

与十二指肠比较: [&] $P < 0.05$

[&] $P < 0.05$ vs duodenum

只大鼠随机分成 3 组, 每组 5 只。精密称取葛根素微球适量, 用 K-R 液配制成葛根素质量浓度为 20、40、80 mg/L 的肠灌流液, 以空肠为灌流部位, 灌流体积流量为 0.2 mL/min, 比较不同质量浓度的葛根素在空肠吸收的 K_a 和 P_{app} 值。结果表明高、中、低 3 个质量浓度的肠灌流液中葛根素在空肠的 K_a 和 P_{app} 均无显著性差异 ($P>0.05$), 表明葛根素在空肠中的吸收无自身浓度抑制作用, 主要以被动扩散机制进入体循环。结果见表 3。

2.3.7 葛根素原料药与葛根素微球肠吸收的比较 将 10 只大鼠随机分成 2 组, 每组 5 只。精密称取葛根素原料药和葛根素微球适量, 用 K-R 液分别配制质量浓度为 40 mg/L 的含药灌流液, 以空肠为灌流部位, 灌流体积流量为 0.2 mL/min, 比较葛根素原料药和葛根素微球在空肠的 K_a 和 P_{app} 值。结果表明葛根素原料药和葛根素微球在空肠的 K_a 和 P_{app} 有显著性差异 ($P<0.05$), 葛根素微球的 K_a 和 P_{app} 值较葛根素原料药显著增加, 表明羧甲基壳聚糖作为载体能显著提高葛根素的肠吸收。结果见表 4。

表 3 不同质量浓度葛根素在空肠中的吸收参数 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 3 Absorption parameters of puerarin at different concentration in jejunum ($\bar{x} \pm s, n=5$)

$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	K_a/min^{-1}	$P_{app}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
20	0.0276 ± 0.0020	2.21 ± 0.16
40	0.0291 ± 0.0021	2.33 ± 0.17
80	0.0307 ± 0.0017	2.45 ± 0.13

表 4 葛根素和葛根素微球在空肠中的吸收参数 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 4 Absorption parameters of puerarin and puerarin loaded O-CMCS microspheres in jejunum ($\bar{x} \pm s, n=5$)

药物	K_a/min^{-1}	$P_{app}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
葛根素原料药	0.0145 ± 0.0016	1.16 ± 0.13
葛根素微球	$0.0291 \pm 0.0021^\Delta$	$2.33 \pm 0.17^\Delta$

与葛根素原料药比较: $^\Delta P<0.05$

$^\Delta P<0.05$ vs puerarin

3 讨论

评价药物在肠道吸收的方法主要有在体法、离体法和体内法。与离体法和体内法相比, 在体法的优势是保证了血液和淋巴液的供应。在体法又包括在体循环法和单向灌流法, 前者因长时间以较高体积流量回流灌流液, 对肠黏膜损伤较大, 导致药物吸收增加, 使实测值与真实值之间存在较大偏差; 而后者以较低体积流量对某一肠段进行单向灌流,

实验条件接近体内肠道环境, 与人体有良好的相关性, 故本实验采用单向灌流法^[8-9]考察葛根素羧甲基壳聚糖微球的小肠吸收特性。

药物吸收过程中, 肠道不仅吸收药物, 还吸收或分泌水分, 导致收集液体积发生变化, 因此实验必须对体积变化进行校正。目前, 常用的体积校正方法有酚红法和重量法。但在长时间的灌流过程中, 肠道对酚红存在一定程度的吸收, 导致所测吸收参数较真实值偏低, 且酚红本身还可能干扰某些化合物在肠道的转运和分析测定。而重量法通过灌流前后的质量差和密度对灌流液体积进行校正, 真实反映肠道水分吸收情况, 提高 K_a 和 P_{app} 的准确度^[10-11]。因此, 本实验采用重量法对吸收前后灌流液体积的变化进行校正。

实验结果表明, 葛根素羧甲基壳聚糖微球在回肠和空肠中吸收较好; 微球中葛根素的吸收不受质量浓度影响, 主要以被动扩散机制进入体循环; 以羧甲基壳聚糖为载体制备的微球能显著提高葛根素的吸收。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 杨荣兵, 周惠芬, 张宇燕, 等. 葛根素与阿魏酸单用及联合应用在局灶性脑缺血模型大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2759-2763.
- [3] Yi Y N, Tu L X, Hu K L, *et al.* The construction of puerarin nanocrystals and its pharmacokinetic and *in vivo-in vitro* correlation (IVIVC) studies on beagle dog [J]. *Coll Surf B: Biointerfaces*, 2015, 133: 164-170.
- [4] 张环宇, 李大伟, 史彩虹. 葛根素的临床应用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 75-78.
- [5] 刘诗雨, 柏希慧, 董林娟. 葛根素羧甲基壳聚糖微球的工艺优化及其体外释放 [J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(3): 299-304.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [7] Xie Y S, Ren X L, Pan G X, *et al.* The assessment of absorption of periplocin *in situ* via intestinal perfusion of rats by HPLC [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22: 196-201.
- [8] 张晓雷, 周明眉, 贾伟, 等. 在体肠灌流模型及其在中药研究中的应用 [J]. 上海中医药大学学报, 2010, 24(3): 87-92.
- [9] 谭晓斌, 贾晓斌, 陈彦, 等. 在体肠灌流模型及其在中药研究中的应用 [J]. 中成药, 2007, 29(11): 1665-1668.
- [10] 饶小勇, 龚明, 尹娜, 等. 白头翁皂苷 D 在大鼠肠道的吸收行为研究 [J]. 中草药, 2013, 44(24): 3515-3520.
- [11] 夏佩英. 酚红法不适用于研究葛根素肠吸收的机制探讨 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2014, 17(9): 1492-1494.