

葛根素与磷脂复合后对葛根素微乳经淋巴转运的影响

吴军勇^{1,2,3}, 李泳江^{1,2,3}, 胡雄彬^{1,2,3}, 刘新义^{1,2,3}, 向大雄^{1,2,3}

1. 中南大学湘雅二医院 药学部, 湖南 长沙 410011

2. 湖南省转化医学与创新药物工程技术研究中心, 湖南 长沙 410011

3. 中南大学临床药学研究所, 湖南 长沙 410011

摘要: **目的** 以实验室前期制备的葛根素磷脂复合物微乳及普通常规微乳, 采用乳糜微粒阻断法研究葛根素与磷脂形成复合物后对葛根素微乳经淋巴转运的影响。 **方法** 以乳糜微粒阻滞技术阻断药物经淋巴转运, HPLC 法测定大鼠血浆中葛根素浓度, 通过比较阻断组与未阻断组生物利用度来计算淋巴转运的比例。 **结果** 葛根素磷脂复合物微乳的淋巴转运高于普通常规微乳, 其淋巴转运比例分别为 51.3%、40.6%, 葛根素磷脂复合物微乳未阻断组和阻断组的 AUC_{0-12} 分别为 (5.489 ± 1.599) 、 (2.673 ± 1.153) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$, 葛根素普通常规微乳的未阻断组和阻断组的 AUC_{0-12} 分别为 (4.158 ± 1.160) 、 (2.478 ± 1.352) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 。 **结论** 葛根素与磷脂复合后能够提高葛根素淋巴转运效率, 且 12 h 的生物利用度要高于普通常规微乳。

关键词: 葛根素; 微乳; 磷脂复合物; 淋巴转运; 乳糜微粒阻滞技术; HPLC

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)12-2914-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.027

Effects of puerarin-phospholipid complex on lymphatic transport absorption of puerarin microemulsion

WU Jun-yong^{1,2,3}, LI Yong-jiang^{1,2,3}, HU Xiong-bin^{1,2,3}, LIU Xin-yi^{1,2,3}, XIANG Da-xiong^{1,2,3}

1. Department of Pharmacy, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

2. Hunan Translational Medicine and Innovative Drug Engineering Technology Research Center, Changsha 410011, China

3. Institute of Clinical Pharmacy, Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: **Objective** To study the effects of puerarin-phospholipid complex on lymphatic transport absorption of puerarin microemulsion based on the puerarin-phospholipid complex microemulsion and conventional microemulsion prepared before. **Methods** The chylomicron flow blocking approach was used to block lymphatic transport of the microemulsion, and the concentration of puerarin in plasma was determined by HPLC. Bioavailability of puerarin in blocking groups and non-blocking groups were compared to calculate the proportion of puerarin absorbed by lymphatic transport. **Results** The lymphatic transport of puerarin-phospholipid complex microemulsion was higher than that of conventional microemulsion, and the lymphatic translocation ratio was 51.3% and 40.6%, respectively. The AUC_{0-12} of puerarin-phospholipid complex microemulsion non-blocking and blocking groups were (5.489 ± 1.599) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ and (2.673 ± 1.153) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$, respectively; And AUC_{0-12} of puerarin routine microemulsion non-blocking and blocking groups were (4.158 ± 1.160) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ and (2.478 ± 1.352) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$, respectively. **Conclusion** The lymphatic transport of puerarin-phospholipid complex microemulsion can increase lymphatic transport efficiency, and AUC_{0-12} of which were higher than those of conventional microemulsion group.

Key words: puerarin; microemulsion; phospholipid complex; lymphatic transport; chylomicron flow blocking approach; HPLC

药物进行磷脂化后形成磷脂复合物, 能够显著改善药物的物理化学性质, 并通过改善脂溶性和油水分分配系数来增加药物的口服生物利用度^[1-4]。研究

表明药物制成磷脂复合物后能够提高难溶性药物的溶解度, 增加药物对小肠上皮细胞的跨膜能力, 从而有效地提高其口服生物利用度^[5-8]。

收稿日期: 2018-04-19

基金项目: 湖南省科技计划项目 (2016TP2002)

作者简介: 吴军勇, 男, 博士研究生, 研究方向为药物制剂与新剂型的研究。Tel: 14789800041 E-mail: wujunyong@csu.edu.cn

*通信作者 向大雄, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新型给药系统及中药新资源研究。

Tel: (0731)85292093 E-mail: xiangdaxiong@csu.edu.cn

课题组前期制备了葛根素磷脂复合物并将其制成微乳,结果表明葛根素的脂溶性和载药量均显著提高,其口服生物利用度是葛根素混悬液的3.16倍^[9]。课题组前期研究了处方中油相的类型对葛根素微乳经淋巴转运的影响,结果表明长链油微乳的淋巴转运比例明显高于中短链微乳,处方中含有长链油相能够提高淋巴转运,增加葛根素的口服生物利用度^[10]。研究显示,药物经淋巴转运受药物的脂溶性影响^[11-12],因此本实验采用乳糜微粒阻断法研究了葛根素与磷脂复合增加脂溶性后对葛根素微乳淋巴转运及生物利用度的影响,结果显示葛根素与磷脂形成复合物后提高了药物的脂溶性,能够增加药物的淋巴转运速率,一定程度提高了药物的生物利用度。此研究为改变药物的脂溶性来提高药物的淋巴转运效率提供了参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Thermo BR4i 多功能离心机(赛特湘仪离心机仪器有限公司); 78 HW-1 型恒温磁力搅拌器(江苏金坛医疗仪器厂); AG285 电子分析天平(瑞士 Metter-Toledo 公司); 真空挥干仪(美国 Thermo Electron corporation 公司)。

1.2 药品与试剂

葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 1502-200101,质量分数>99.9%); 葛根素原料药(南京泽朗医药科技有限公司,批号 ZL20110110,质量分数>99.2%); 鸢尾苷(上海诗丹德生物技术有限公司,批号 611-40-5,质量分数>98%); 环己酰亚胺(cycloheximide,美国 Sigma 公司); 甲醇及乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司); 肝素钠(上海蓝季科技发展有限公司); 葛根素常规 W/O 微乳,自制,批号为 20161114; 葛根素磷脂复合物 W/O 微乳,自制,批号为 20161114。环己酰亚胺溶液:用生理盐水配成质量浓度为 3 mg/mL,临用前配制。

1.3 动物

健康 SD 雄性大鼠,24 只,体质量 220~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号 SCXK(湘)20011-0003;实验动物合格证号 43006700003912。

2 方法与结果

2.1 微乳制备

以实验室前期研究方法^[9-10]制备葛根素常规

W/O 微乳,载药量为 28.61 mg/mL,以及葛根素磷脂复合物 W/O 微乳,载药量为 30.48 mg/mL。

2.2 动物实验

2.2.1 葛根素常规微乳组 12 只 SD 雄性大鼠随机分成 2 组,每组 6 只,实验前 12 h 禁食,自由饮水,给药前 1 h 一组 ip 3 mg/kg 环己酰亚胺溶液,另一组 ip 同体积的生理盐水,常规葛根素微乳 ig 给药,给药剂量为 100 mg/kg;于给药后 5、15、30、45 min 及 1、1.5、2、3、4、6、8、12 h 不同时间点眼眶采血,用含肝素钠的离心管收集血样,并于 13 000 r/min 下离心 10 min,取上清液,将其于-20 ℃下保存,待测。

2.2.2 葛根素磷脂复合物微乳组 12 只 SD 雄性大鼠随机分成 2 组,每组 6 只,实验前 12 h 禁食,自由饮水,给药前 1 h 一组 ip 3 mg/kg 环己酰亚胺溶液,另一组 ip 同体积的生理盐水,葛根素磷脂复合物微乳 ig 给药,给药剂量为 100 mg/kg;于给药后 5、15、30、45 min 及 1、1.5、2、3、4、6、8、12 h 不同时间点眼眶采血,用含肝素钠的离心管收集血样,并于 13 000 r/min 下离心 10 min,取上清液,将其于-20 ℃下保存,待测。

2.2.3 血浆样品前处理 取血浆样品室温解冻后,精密吸取 100 μL 于 1.5 mL 塑料离心管中,加入内标鸢尾苷溶液 50 μL,再加 250 μL 甲醇,涡旋 2 min 后,13 000 r/min 离心 10 min,取上清 280 μL,浓缩挥干,残渣用 70 μL 甲醇溶解后,漩涡 2 min,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液进样分析。

2.3 体内分析方法建立

体内分析方法参照实验室前期研究^[10]进行。

2.4 数据处理

运用 WinNonlin6.1 软件进行药物动力学参数的拟合分析,主要药动学参数达峰时间($t_{\max}$)、峰浓度($C_{\max}$)为实测值,药时曲线下面积(AUC)用梯形面积法按公式计算。

$$AUC_{0-t} = \sum (C_i + C_{i-1}) (t_i - t_{i-1}) / 2$$

将葛根素磷脂复合物微乳及常规微乳淋巴阻断组和淋巴未阻断组的药动学参数采用 SPSS 16.0 软件分析,方差齐性数据采用对单因素方差分析(ANOVA),方差不齐性数据进行非参数检验,考察各组间有无统计学意义,并对这两种微乳淋巴阻断和未阻断组之间的主要药动学参数进行配对 t 检验。

2.5 血药浓度测定结果

各组大鼠 ig 给药后各时间点所测得的峰面积

代入标准曲线计算血药浓度并绘制药-时曲线,结果见图1和2。

2.6 药动学参数测定

磷脂复合物微乳及常规微乳的主要药动学参数 AUC_{0-12} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 、 t_{max} 、半衰期 ($t_{1/2}$)、平均滞留时间 (MRT_{0-12}) 测定结果见表1。分别在淋巴未阻断组间及阻断组间进行统计分析,结果表明

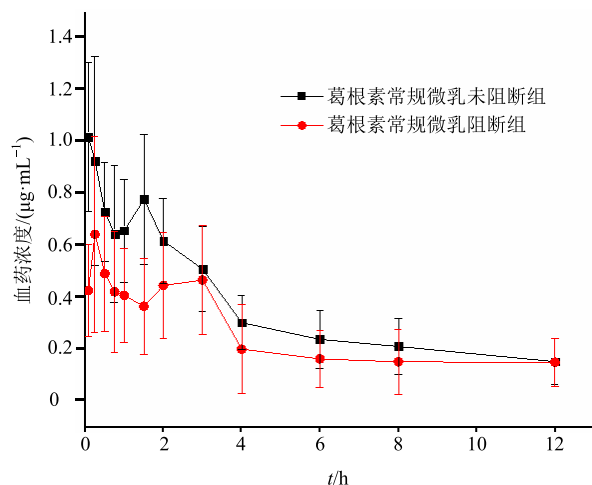


图1 大鼠 ig 给予葛根素常规微乳后淋巴未阻断、阻断组的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Plasma concentration-time curves of puerarin in unblocking and blocking treated rats after ig administration of puerarin normal microemulsion ($\bar{x} \pm s, n=6$)

在淋巴未阻断及阻断组间各微乳组的药动学参数均无统计学差异,结果见表2。

对磷脂复合物微乳及常规微乳淋巴阻断和淋巴未阻断组的主要药动学参数进行淋巴阻断与否间差异的检验,检测方法为配对样本 t 检验,结果表明,

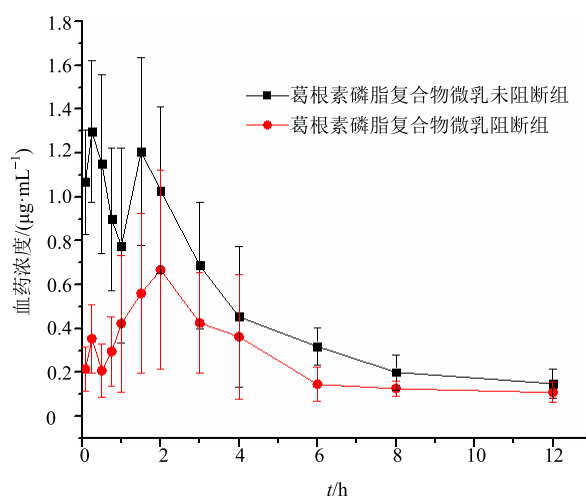


图2 大鼠 ig 给予葛根素磷脂复合物微乳后淋巴未阻断、阻断组的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Plasma concentration-time curves of puerarin in unblocking and blocking treated rats after ig administration of puerarin-phospholipid complex microemulsion ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表1 大鼠 ig 给予葛根素磷脂复合物微乳及常规微乳后淋巴途径未阻断和阻断后的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of puerarin in unblocking and blocking rats after ig administration of puerarin phospholipid complex and conventional microemulsion ($\bar{x} \pm s, n=6$)

统计矩参数	单位	葛根素常规微乳		葛根素磷脂复合物微乳	
		未阻断组	阻断组	未阻断组	阻断组
t_{max}	h	0.375 ± 0.557	1.139 ± 1.443	0.542 ± 0.485	2.250 ± 1.084
C_{max}	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.131 ± 0.324	0.730 ± 0.333	1.500 ± 0.296	0.873 ± 0.343
AUC_{0-12}	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	4.158 ± 1.160	2.478 ± 1.352	5.489 ± 1.599	2.673 ± 1.153
$AUC_{0-\infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	5.538 ± 2.204	6.235 ± 6.604	6.998 ± 3.222	4.109 ± 1.726
$t_{1/2}$	h	5.523 ± 2.334	4.664 ± 2.788	3.362 ± 0.328	3.427 ± 1.887
MRT_{0-12}	h	4.059 ± 0.472	3.402 ± 1.418	3.651 ± 0.216	3.521 ± 1.175

表2 葛根素磷脂复合物微乳及常规微乳的淋巴阻断组与未阻断组间主要药动学参数 t 检验结果

Table 2 T-test results of main pharmacokinetic parameters of puerarin among blocking and unblocking rats after ig administration of puerarin phospholipid complex and conventional microemulsion

组别	P					
	C_{max}	AUC_{0-12}	$AUC_{0-\infty}$	$t_{1/2}$	t_{max}	MRT_{0-12}
淋巴阻断	0.478	0.794	0.554	0.433	0.162	0.877
淋巴未阻断	0.066	0.130	0.381	0.072	0.592	0.083

葛根素常规微乳淋巴阻断组与未阻断组的 $C_{\max}$ 与 AUC_{0-12} 的差异有统计学意义；葛根素磷脂复合物微乳处理的淋巴阻断组与未阻断组的 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-12} 、 $t_{\max}$ 的差异有统计学意义 ($P \leq 0.05$)，其他药动学参数的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，结果见表 3。

2.7 相对生物利用度及淋巴途径转运比例

从表 1 可知，对于淋巴未阻断组大鼠单次 ig 葛根素磷脂复合物微乳及常规微乳，其相对生物利用度 (F) 根据公式 $F = \text{葛根素磷脂复合物微乳未阻断}$

组的 AUC_{0-12} /葛根素普通微乳未阻断组的 AUC_{0-12} 计算，结果为 132.0%，表明葛根素磷脂复合物微乳在大鼠淋巴未阻断组的口服生物利用度得到较大提高。

通过公式计算通过淋巴转运和非淋巴途径转运的葛根素比例，结果见表 4。

淋巴转运比例 = (淋巴未阻断 AUC - 淋巴阻断 AUC) / 淋巴未阻断 AUC

非淋巴转运比例 = 1 - 淋巴转运比例

表 3 葛根素磷脂复合物微乳及常规微乳淋巴未阻断和阻断后的主要药动学参数 t 检验结果

Table 3 T-test results of main pharmacokinetic parameters in cycloheximide unblocking and blocking rats of puerarin phospholipid complex and conventional microemulsion

组别	P					
	$C_{\max}$	AUC_{0-12}	$AUC_{0-\infty}$	$t_{1/2}$	$t_{\max}$	MRT_{0-12}
葛根素常规微乳	0.022	0.036	0.853	0.496	0.371	0.243
葛根素磷脂复合物微乳	0.050	0.032	0.432	0.852	0.017	0.785

表 4 大鼠 ig 给予葛根素磷脂复合物及常规微乳后经淋巴途径和非淋巴途径转运的比例

Table 4 Proportion of lymphatic pathway transportation and non-lymphatic pathway transportation of puerarin in rats after ig administration of puerarin phospholipid complex and conventional microemulsion

组别	淋巴途径转运	非淋巴途径转运
	比例/%	比例/%
葛根素常规微乳	40.6	59.4
葛根素磷脂复合物微乳	51.3	48.7

3 讨论

经淋巴转运分析，葛根素磷脂复合物微乳的淋巴转运高于常规微乳，其淋巴转运比例分别为 51.3%、40.6%，说明将葛根素与磷脂复合后有利于淋巴转运。研究显示葛根素经磷脂复合后其脂溶性增大，通常脂溶性大的药物更容易通过淋巴转运，因此葛根素磷脂化后脂溶性增加从而促进淋巴转运。也有文献报道^[13]卵磷脂也能促进药物淋巴转运，2 种处方中，磷脂复合物微乳中磷脂的含量高于常规微乳组，这也有可能是促进葛根素磷脂复合物淋巴转运的原因之一。Dahan 等^[14]将药物与磷脂连接后研究其淋巴转运表明，药物做成磷脂复合物后，60%吸收量经淋巴转运，这就说明药物做成磷脂复合物利于促进药物的淋巴转运，然而在该研究中药物与磷脂的连接是通过化学键，而本实验中制备的磷脂复合物是靠分子间的相互作用力来连接

的，这种连接不稳定，可能在胃肠道中发生分离，造成葛根素脂溶性下降，这可能是造成本实验中磷脂复合物淋巴转运提高不大的原因。

淋巴未阻断组大鼠体内药动学研究结果显示葛根素磷脂复合物的 AUC_{0-12} 高于常规微乳组，但差异不具有统计学意义，表明葛根素磷脂复合后对葛根素微乳生物利用度的提高没有显著的意义，但是前期研究结果表明相对于葛根素混悬液，葛根素磷脂复合物微乳的口服生物利用度显著增加。这种结果可能是葛根素在普通微乳和磷脂复合物微乳中的溶解度得到足够的提高，吸收的限制可能是由于生物膜透过的影响。

参考文献

- [1] Gopi M, Vanisree A J. Attenuated levels of phospholipids in the striatum of rats infused with rotenone causing hemiparkinsonism as detected by simple dye-lipid complex [J]. *IBRO Reports*, 2017, 3(1): 1-8.
- [2] Zhang K, Zhang M, Liu Z, et al. Development of quercetin-phospholipid complex to improve the bioavailability and protection effects against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in SD rats [J]. *Fitoterapia*, 2016, 113(1): 102-109.
- [3] Jena S K, Singh C, Dora C P, et al. Development of tamoxifen-phospholipid complex: Novel approach for improving solubility and bioavailability [J]. *Int J Pharm*, 2014, 473(1/2): 1-9.
- [4] Djekic L, Krajišnik D, Mićić Z, et al. Formulation and

- physicochemical characterization of hydrogels with 18 β -glycyrrhetic acid/phospholipid complex phytosomes [J]. *J Drug Del Sci Technol* 2016, 35(1): 81-90.
- [5] Dora C P, Kushwah V, Katiyar S S, *et al.* Improved oral bioavailability and therapeutic efficacy of erlotinib through molecular complexation with phospholipid [J]. *Int J Pharm*, 2017, 534(1/2): 1-13.
- [6] Kassem A A, El-Alim S H A, Basha M, *et al.* Phospholipid complex enriched micelles: A novel drug delivery approach for promoting the antidiabetic effect of repaglinide [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 99(1): 75-84.
- [7] Yang X, Jiang Q, Du P, *et al.* Preparation and characterization of solidified oleanolic acid-phospholipid complex aiming to improve the dissolution of oleanolic acid [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2016, 11(2): 241-247.
- [8] Zhang K, Gu L, Chen J, *et al.* Preparation and evaluation of kaempferol-phospholipid complex for pharmacokinetics and bioavailability in SD rats [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 114(1): 168-175.
- [9] Wu J Y, Li Y J, Han M, *et al.* A microemulsion of puerarin-phospholipid complex for improving bioavailability: preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluations [J]. *Drug Dev Industr Pharm*, 2018, 44(8): 1336-1341.
- [10] 吴军勇, 杨苏芳, 杨 乐, 等. 不同链长油相对葛根素微乳经淋巴转运吸收的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(15): 1426-1430.
- [11] Nankervis R, Davis S S, Day N H, *et al.* Intestinal lymphatic transport of three retinoids in the rat after oral administration: Effect of lipophilicity and lipid vehicle [J]. *Int J Pharm*, 1996, 130(1): 57-64.
- [12] Charman W, Stella V J. Estimating the maximal potential for intestinal lymphatic transport of lipophilic drug molecules [J]. *Int J Pharm*, 1986, 34(1): 175-178.
- [13] O'Driscoll C M. Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2002, 15(5): 405-415.
- [14] Dahan A, Duvdevani R, Shapiro I, *et al.* The oral absorption of phospholipid prodrugs: *In vivo* and *in vitro* mechanistic investigation of trafficking of a lecithin-valproic acid conjugate following oral administration [J]. *J Controlled Rel*, 2008, 126(1): 1-9.