

食物中脂质对葛根素微乳经淋巴转运的影响

李泳江^{1,2,3}, 吴军勇^{1,2,3}, 杨苏芳^{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微乳为基础, 采用乳糜微粒阻断法研究食物中脂质对葛根素微乳经淋巴转运的影响。**方法** 以环己酰亚胺为乳糜微粒阻滞剂阻断药物经淋巴转运, HPLC法测定大鼠血浆中葛根素浓度, 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** 葛根素微乳在脂质处理组的淋巴转运比例与水处理组不存在显著性差异, 但证实了微乳对促进葛根素淋巴转运及提高其生物利用度的重要贡献。ig给予脂质不能进一步促进葛根素微乳的经淋巴转运, 但证实了葛根素以微乳为载体能降低食物中脂质对其口服生物利用度的影响。**结论** 食物中的脂质并未进一步促进葛根素微乳淋巴转运, 且对生物利用度影响不大。

关键词: 食物; 脂质; 淋巴转运; 葛根素; 微乳; 生物利用度

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)12-2925-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.029

Effects of lipid-rich food on lymphatic transport of puerarin microemulsion

LI Yong-jiang^{1,2,3}, WU Jun-yong^{1,2,3}, YANG Su-fang^{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, 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 lipid-rich food on lymphatic transport absorption of puerarin microemulsion based on the puerarin microemulsion prepared before. **Methods** Cycloheximide was used to block lymphatic transport of the microemulsion, and the concentration of puerarin in plasma was determined by HPLC. Bioavailability of blocking group and unblocking group were compared to calculate the proportion of puerarin absorbed by lymphatic transport. **Results** Administration of lipid did not enhance the proportion of puerarin absorbed by lymphatic transport, compared to administration of water as controls, but microemulsion formulation contribute to the improved lymphatic transport and bioavailability of puerarin. Besides, administration of lipid failed to further increase the lymphatic transport of puerarin microemulsion, but it was evidenced that microemulsion formulation could decrease the effects of lipid-rich food on bioavailability of oral drugs. **Conclusion** Lipid in food could not enhance the lymphatic transport of puerarin microemulsion and show no significant effects on the bioavailability.

Key words: food; lipid; lymphatic transport; puerarin; microemulsion; bioavailability

脂溶性药物口服后, 可在肠道与上皮细胞的脂蛋白结合, 从而促进该药物经淋巴转运, 而药物入血后也可与血浆脂蛋白结合改变其药动学参数^[1-3]。研究发现高脂饮食会增加肠道和血液中乳糜微粒及

低密度脂蛋白等含有三酰甘油的脂蛋白的浓度^[4-9]。于是, 高脂饮食增加脂溶性药物经淋巴转运的作用在于饮食中的脂质能够促进乳糜微粒的分泌, 进而影响药物与乳糜微粒的结合程度并对其药动学性质

收稿日期: 2018-04-30

基金项目: 湖南省科技计划项目 (2016TP2002)

作者简介: 李泳江, 男, 硕士研究生, 研究方向为药物制剂与新剂型的研究。Tel: 15200857233 E-mail: liyongjiang@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

产生影响。

药物淋巴转运与淋巴脂质转运密切相关。高脂饮食后,淋巴脂质流增大,药物淋巴转运也会相应增加,即使少量外源性脂质也能促进药物经淋巴转运,因此,提供适当的脂质流能促进淋巴药物转运^[10-11]。而对于目前报道的一些脂质递药系统,如微乳、脂质体等,高脂饮食是否会通过促进淋巴转运提高其所载药物的生物利用度还少见报道。

本课题组前期制备的葛根素微乳能够经淋巴转运^[12],且发现淋巴转运对提高葛根素的生物利用度贡献很大。然而食物中脂质是否能进一步提高其淋巴转运,葛根素微乳的口服生物利用度是否受食物中脂质的影响也未见研究,因此本研究拟通过动物实验,观察饮食中添加脂质或阻断脂质后葛根素微乳的淋巴转运和生物利用度。结果表明饮食中额外添加脂质不能进一步促进葛根素微乳的淋巴转运,但微乳载体降低了食物中脂质对葛根素口服生物利用度的影响。

1 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); AG285 电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); 真空挥干仪(美国 Thermo Electron corporation 公司)。

1.2 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>99%); 环己酰亚胺(cycloheximide,美国 Sigma 公司); 油酸乙酯(EO,上海飞祥化工厂); 肉豆蔻酸异丙酯(IPM,国药集团化学试剂有限公司); 正丁酸乙酯(国药集团化学试剂有限公司); 葛根素 W/O 微乳,自制,批号为 20161230; 生理盐水(中南大学湘雅二医院)。

1.3 动物

健康 SD 雄性大鼠,体质量 220~250 g,购自长沙市天勤生物科技有限公司,生产许可证号 SCXK(湘)2009-0012; 实验动物合格证号 43006700002378。

2 方法与结果

2.1 试药制备

葛根素 W/O 型微乳:自制,质量浓度为 18.85

mg/mL,批号为 20161230。

环己酰亚胺(淋巴转运阻断剂)溶液:用生理盐水配成质量浓度为 3 mg/mL,临用前配制。

2.2 分组与给药

24 只 SD 雄性大鼠随机分成 4 组,每组 6 只,实验前 12 h 禁食,自由饮水。脂质处理阻断组:给药前 1 h ip 3 mg/kg 环己酰亚胺溶液,给药前 30 min ig 1 mL 橄榄油;脂质处理对照组:给药前 1 h ip 3 mg/kg 的生理盐水,给药前 30 min ig 1 mL 橄榄油;水处理阻断组:给药前 1 h ip 3 mg/kg 环己酰亚胺溶液,给药前 30 min ig 1 mL 水;水处理对照组:给药前 1 h ip 3 mg/kg 水,给药前 30 min ig 1 mL 水。处理后各组分别 ig 给予葛根素 W/O 微乳,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 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,-20 ℃保存。

2.3 血药浓度测定

2.3.1 血浆样品预处理 精密吸取 100 μ L 室温解冻的血浆样品置于 1.5 mL 离心管中,依次加入 50 μ L 内标鸢尾苷溶液、250 μ L 甲醇。涡旋 2 min 后,13 000 r/min 离心 10 min。上清 280 μ L 浓缩挥干后用 70 μ L 甲醇重溶残渣沉淀,涡旋 2 min 后,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行高效液相色谱分析。

2.3.2 高效液相分析方法 采用课题组已建立的方法^[13]:色谱柱 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);保护柱 EasyGuard Kit C₁₈(10 mm×4.0 mm, 5 μ m);流动相为水(A)-乙腈(B)。体积流量 1.0 mL/min;洗脱程序:0~8 min,14%~25% A;8~15 min,25%~14% A;15~20 min,14% A;柱温 30 ℃;检测波长为 250 nm;进样体积为 20 μ L。

2.4 数据处理与统计方法

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。

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

将水及脂质处理的葛根素 W/O 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,方差齐的数据采用对单因素方差分析(ANOVA),对方差不齐的数据进行非参数检验,对各处理组的淋巴阻断和未阻断组之间的主要药动学

参数采用配对 t 检验。

2.5 实验结果

2.5.1 血药浓度与药时曲线 各组大鼠给药后经时血药浓度取平均值后绘制葛根素血药浓度-时间曲线, 结果见图 1~4。

2.5.2 药动学参数 主要药动学参数 $AUC_{0\sim12}$ 、 $AUC_{0\sim\infty}$ 、 C_{max} 、 t_{max} 、半衰期 ($t_{1/2}$)、平均滞留时间 ($MRT_{0\sim12}$) 归纳结果见表 1。对脂质处理组及水处

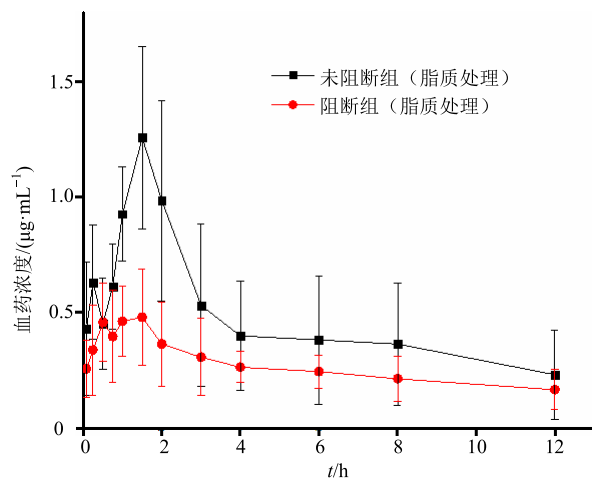


图 1 大鼠 ig 给予葛根素微乳及脂质后淋巴未阻断、阻断组的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Plasma concentration-time curves of puerarin in control and cycloheximide treated rats after ig administration of puerarin W/O microemulsion and lipid ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

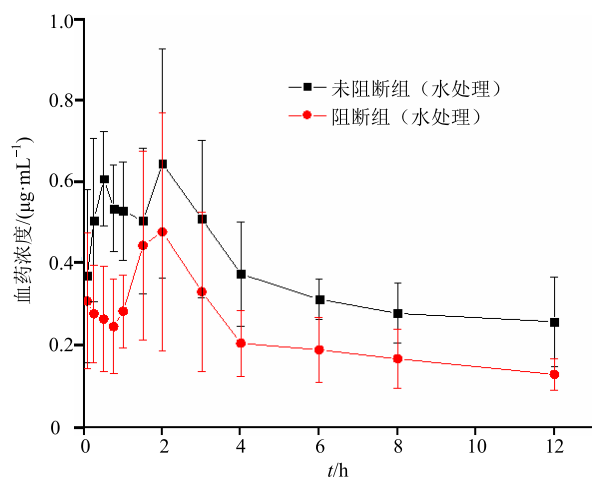


图 2 大鼠 ig 给予葛根素微乳及水后淋巴未阻断、阻断组的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Plasma concentration-time curves of puerarin in control and cycloheximide treated rats after ig administration of puerarin W/O microemulsion and water ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

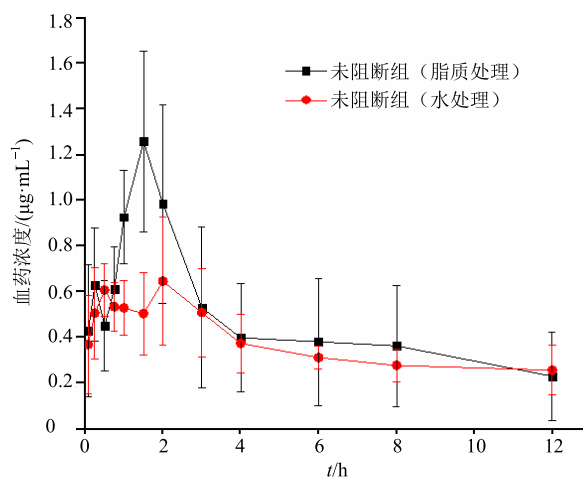


图 3 大鼠 ig 给予葛根素微乳、水或脂质后淋巴未阻断组的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Plasma concentration-time curves of puerarin in control rats after ig administration of puerarin W/O microemulsion and lipid or water ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

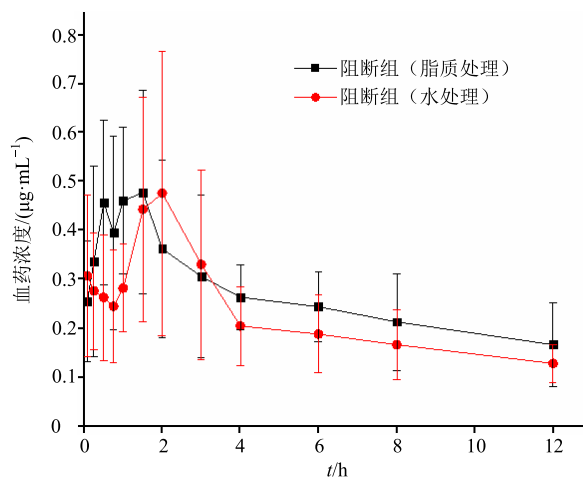


图 4 大鼠 ig 给予葛根素微乳、水或脂质后淋巴阻断组的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Plasma concentration-time curves of puerarin in cycloheximide treated rats after ig administration of puerarin W/O microemulsion, lipid, or water ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

理组的药动学参数分别在淋巴未阻断组间及阻断组间进行统计分析, 结果表明水处理与脂质处理的药动学参数在淋巴未阻断组间及淋巴阻断组间均无统计学差异 ($P > 0.05$), 结果见表 2。

对水与脂质处理的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。结果表明脂质处理组的 C_{max} 和 $AUC_{0\sim12}$ 在大鼠淋巴阻断与否间的差异有统计学意义, 水处理组的 $AUC_{0\sim12}$ 在大鼠淋巴阻断与否间

表 1 大鼠 ig 给予葛根素 W/O、脂质或水的淋巴阻断组和未阻断组的主要药动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Main pharmacokinetic parameters of puerarin in cycloheximide treated and control rats after ig administration of puerarin W/O microemulsion, lipid or water ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

统计矩参数	单位	脂质		水	
		未阻断组	阻断组	未阻断组	阻断组
$t_{\max}$	h	1.417±0.204	0.958±0.510	1.250±0.837	1.306±0.905
$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.272±0.384	0.576±0.171	0.790±0.139	0.567±0.242
$\text{AUC}_{0 \sim 12}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	5.520±2.625	2.619±0.930	4.433±0.722	1.944±1.113
$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	7.425±4.588	3.843±1.459	9.463±4.057	6.433±2.070
$t_{1/2}$	h	5.042±2.838	4.941±1.535	8.972±4.396	10.836±8.994
$\text{MRT}_{0 \sim 12}$	h	4.096±1.045	4.085±1.608	5.048±0.371	3.327±1.883

表 2 大鼠 ig 给予葛根素微乳、脂质或水的淋巴阻断组间和未阻断之间主要药动力学参数 t 检验结果

Table 2 T-test results of main pharmacokinetic parameters of puerarin among cycloheximide treated rats and among control rats after ig administration of puerarin W/O microemulsion, lipid, or water

组别	P					
	$C_{\max}$	$\text{AUC}_{0 \sim 12}$	$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$t_{1/2}$	$t_{\max}$	$\text{MRT}_{0 \sim 12}$
淋巴未阻断	0.160	0.631	0.460	0.120	1.000	0.062
淋巴阻断	0.749	0.337	0.086	0.242	0.370	0.423

的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其他药动力学参数的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 3。

2.5.3 相对生物利用度 (F) 及淋巴途径转运比例
从表 1 可知, 对于淋巴未阻断组大鼠 ig 脂质或水, 脂质处理组葛根素生物利用度高些, 但与水处理组的 F 无统计学差异, 根据公式 $F = \text{脂质处理未阻断组 } \text{AUC}_{0 \sim 12} / \text{水处理未阻断组 } \text{AUC}_{0 \sim 12}$, 计算其 F 为

124.5%, 表明 ig 给予脂质不能显著提高葛根素 W/O 微乳的口服生物利用度。根据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

结果表明, 脂质处理的淋巴转运比例为 52.6%,

表 3 大鼠 ig 给予葛根素微乳、脂质或水的水处理组和脂质处理组之间的主要药动力学参数 t 检验结果

Table 3 Test results of main pharmacokinetic parameters of puerarin between water administrated rats and lipid administrated rats after ig administration of puerarin W/O microemulsion, lipid or water

组别	P					
	$C_{\max}$	$\text{AUC}_{0 \sim 12}$	$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$t_{1/2}$	$t_{\max}$	$\text{MRT}_{0 \sim 12}$
水处理	0.168	0.016	0.449	0.743	0.862	0.055
脂质处理	0.019	0.029	0.245	0.916	0.140	0.990

表 4 大鼠 ig 给予葛根素微乳、脂质或水后经淋巴和非淋巴转运的比例

Table 4 Proportion of lymphatic pathway transportation and non-lymphatic pathway transportation of puerarin in rats after ig administration of puerarin W/O microemulsion, lipid, or water

组别	淋巴转运比例/%	非淋巴转运比例/%
脂质	52.6	47.4
水	56.1	43.9

水处理的淋巴转运比例为 56.1%, 说明脂质不能进一步提高葛根素微乳的淋巴转运。

3 讨论

通过计算淋巴转运比例表明, 脂质处理组与水处理组的淋巴转运没有显著性差异, 脂质也不能进一步促进其淋巴转运。而且给药前 ig 给予脂质对其淋巴转运并没有显著性的提高, 可能的原因有 2 方面: 一方面是葛根素是难溶于水和油的药物, 通过将其制成微乳给药系统而提高其口服生物利用度,

但胃肠道环境,微乳会发生转相等现象,药物的溶解度降低,非溶解的药物由于脂溶性低不能经淋巴转运,即使增加的脂质能够促进乳糜微粒的合成与分泌,也不能促进非溶解药物的淋巴转运,因此给予的脂质不能进一步促进药物的淋巴转运。另一方面,在肠上皮细胞中药物与胶体脂蛋白连接会促进药物经淋巴转运,因为这种大分子结合物扩散进毛细血管的能力有限,而往往更易通过毛细淋巴管,口服给予的脂质能够促进乳糜微乳脂蛋白的合成与分泌,但不能改变葛根素与乳糜微粒的结合能力^[14],因此给予的脂质不能进一步促进药物的淋巴转运。此外,药物与乳糜微粒结合能力可预测其经淋巴转运的程度,而葛根素与乳糜微粒的结合能力有待进一步研究。

淋巴未阻断组大鼠体内药动学研究结果显示脂质处理组的葛根素 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-12} 高于水处理组,但差异没有统计学意义,其生物利用度为 124.5%,表明脂质提高葛根素微乳生物利用度的能力有限。脂质提高葛根素微乳的生物利用度可能的原因是给药前 ig 给予脂质,改变肠道环境,而油包水微乳在油中不易转相,因此起到保护作用,但是相对于胃容量,体外 ig 给予的脂质非常少,因此这种保护作用是有限的,所以对于生物利用度的提高能力也是有限的。另外有研究表明^[15]高脂饮食会抑制药物转运体,包括吸收及外排转运体,所以高脂饮食后葛根素生物利用度提高不明显,其实从另外的角度来说葛根素以微乳为脂质载体降低了食物中脂质对葛根素口服生物利用度的影响,这样的结论在 Grove 等^[16]的研究中也得到了证实,同时 Nielsen 等^[17]的研究发现服用处方中含脂质及表面活性剂的制剂,其生物利用度在饭前及饭后没有显著性变化。

4 小结

本研究初步探讨了食物中脂质对葛根素 W/O 型微乳淋巴转运的影响,通过环乙酰亚胺阻断大鼠的淋巴转运途径,并与未阻断组比较,计算其淋巴转运的比例,结果进一步证明 W/O 型微乳能显著提高葛根素经淋巴转运途径的转运,但食物中脂质不能进一步促进其淋巴转运,其原因可能与葛根素微乳在胃肠道中转相,降低葛根素的溶解度及葛根素与乳糜微粒的结合能力有关。

参考文献

[1] Yáñez J A, Wang S W J, Knemeyer I W, *et al.* Intestinal

lymphatic transport for drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(10/11): 923-942.

[2] Custodio J M, Wu C Y, Benet L Z. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(6): 717-733.

[3] Khan A A, Mudassir J, Mohtar N, *et al.* Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipid-based nanoformulations [J]. *Int J Nanomed*, 2013, 8(1): 2733-2744.

[4] Mueller E A, Kovarik J M, van Bree J B, *et al.* Influence of a fat-rich meal on the pharmacokinetics of a new oral formulation of cyclosporine in a crossover comparison with the market formulation [J]. *Pharm Res*, 1994, 11(1): 151-155.

[5] Zimmerman J J, Ferron G M, Lim H K, *et al.* The effect of a high-fat meal on the oral bioavailability of the immunosuppressant sirolimus (Rapamycin) [J]. *J Clin Pharmacol*, 1999, 39(11): 1155-1161.

[6] Gershkovich P, Hoffman A. Effect of a high-fat meal on absorption and disposition of lipophilic compounds: the importance of degree of association with triglyceride-rich lipoproteins [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 32(1): 24-32.

[7] Gershkovich P, Hoffman A. Uptake of lipophilic drugs by plasma derived isolated chylomicrons: Linear correlation with intestinal lymphatic bioavailability [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2005, 26(5): 394-404.

[8] Shono Y, Jantratid E, Janssen N, *et al.* Prediction of food effects on the absorption of celecoxib based on biorelevant dissolution testing coupled with physiologically based pharmacokinetic modeling [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009, 73(1): 107-114.

[9] Jones H M, Parrott N, Ohlenbusch G, *et al.* Predicting pharmacokinetic food effects using biorelevant solubility media and physiologically based modelling [J]. *Clin Pharmacol*, 2006, 45(12): 1213-1226.

[10] Trevaskis N L, Porter C J H, Charman W N. The lymph lipid precursor pool is a key determinant of intestinal lymphatic drug transport [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(2): 881-891.

[11] White K L, Nguyen G, Charman W N, *et al.* Lymphatic transport of methylnoretestosteroneundecanoate (MU) and the bioavailability of methylnoretestosterone are highly sensitive to the mass of coadministered lipid after oral administration of MU [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009,

- 331(2): 700-709.
- [12] Tang T T, Hu X B, Liao D H, *et al.* Mechanisms of microemulsion enhancing the oral bioavailability of puerarin: Comparison between oil-in-water and water-in-oil microemulsions using the single-pass intestinal perfusion method and a chylomicron flow blocking approach [J]. *Int J Nanomed*, 2013, 8(1): 4415-4426.
- [13] 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.
- [14] Trevaskis N L, Charman W N, Porter C J H. Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: a mechanistic update [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60(6): 702-716.
- [15] Wu C Y, Benet L Z. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system [J]. *Pharm Res*, 2005, 22(1): 11-23.
- [16] Grove M, Müllertz A, Pedersen G P, *et al.* Bioavailability of seocalcitol: III. Administration of lipid-based formulations to minipigs in the fasted and fed state. [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2007, 31(1): 8-15.
- [17] Nielsen F S, Petersen K B, Mullertz A. Bioavailability of probucol from lipid and surfactant based formulations in minipigs: Influence of droplet size and dietary stat [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 69(2): 553-562.