

复方丹酚滴丸中冰片对丹酚酸大鼠在体肠吸收特性的影响

梁诗婷¹, 邢丹丹¹, 梁红萍¹, 石心红^{1*}, 邢为藩²

(1. 中国药科大学, 南京 211198; 2. 南京艾利珂药业有限公司, 南京 211122)

[摘要] **目的:**研究复方丹酚滴丸中不同质量浓度冰片配伍丹酚酸后对丹酚酸 B, 紫草酸, 迷迭香酸 3 个成分在小肠的吸收速率常数(K_a)和表观吸收系数(P_{app})的影响。**方法:**采用大鼠在体单向肠灌注试验考察吸收过程, 以 HPLC 测定丹酚酸 B, 紫草酸和迷迭香酸的含量, 流动相 1% 冰乙酸水溶液(A)-1% 冰乙酸甲醇溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 10%~20% B; 10~40 min, 20%~47% B; 40~50 min, 47%~70% B), 检测波长 286 nm, 流速 0.8 mL·min⁻¹。**结果:**高、中、低质量浓度冰片配伍丹酚酸后, K_a 和 P_{app} 大多有所增加, 其中以 100 mg·L⁻¹ 冰片组的促吸收效果最优, 该组丹酚酸 B, 紫草酸, 迷迭香酸的全肠段 K_a 分别为不加冰片的 2.31, 2.33, 3.38 倍。**结论:**不同浓度冰片配伍丹酚酸后, 对丹酚酸 B, 紫草酸和迷迭香酸在大鼠各肠段的吸收具有一定促进作用, 浓度对促吸收效果有一定影响; 增加冰片的浓度, 促吸收作用有所提高, 但当冰片到一定浓度后, 促吸收作用有所减弱。

[关键词] 丹酚酸; 冰片; 在体肠吸收; 单向肠灌注; 丹酚酸 B; 紫草酸; 迷迭香酸

[中图分类号] R283.6; R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)12-0098-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016120098

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160426.1006.004.html>

[网络出版时间] 2016-04-26 10:06

Effects of Borneolum Syntheticum on Intestinal Absorption of Salvianolic Acids in Compound Danfen Dropping Pills

LIANG Shi-ting¹, XING Dan-dan¹, LIANG Hong-ping¹, SHI Xin-hong^{1*}, XING Wei-fan²

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

2. Nanjing Ailike Pharmaceuticals Industry Co. Ltd., Nanjing 211122, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effects of salvianolic acids compatible with borneol at different concentration on absorption rate constant (K_a) and apparent absorption coefficient (P_{app}) of salvianolic acid B, lithospermic acid and rosmarinic acid in rat small intestine. **Method:** An *in situ* intestinal perfusion model was employed to investigate absorption of salvianolic acids in rat small intestine. HPLC was used to determine contents of salvianolic acid B, lithospermic acid and rosmarinic acid, mobile phase was 1% glacial acetic acid water solution-1% glacial acetic acid methanol solution, detection wavelength was 286 nm, flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. **Result:** Compatibility of salvianolic acids with different concentration of borneol, both K_a and P_{app} were increased, enhancing effect of borneol with the concentration of 100 mg·L⁻¹ was optimum. K_a of salvianolic acid B, lithospermic acid and rosmarinic acid in borneol with the concentration of 100 mg·L⁻¹ was 2.31, 2.33, 3.38 times as long as the blank group. **Conclusion:** After compatibility of salvianolic acids with different concentrations of borneol, there is significant promoting effect of salvianolic acid B, lithospermic acid and rosmarinic acid in absorption of all segments of intestine. The capacity of enhancing effect is influenced by the concentration of borneol. When the concentration of borneol increases, the enhancing effect of salvianolic acids in intestinal absorption increases, but it significantly decreases after the concentration of borneol increases to some degree.

[收稿日期] 20150915(010)

[第一作者] 梁诗婷, 在读硕士, 从事中药新技术与新剂型研究, Tel: 15195859851, E-mail: lst901125@foxmail.com

[通讯作者] * 石心红, 博士, 副教授, 从事中药新技术与新剂型研究, Tel: 13509619198, E-mail: shixinhong@cpcu.edu.cn

[Key words] salvanolic acid; borneol; *in situ* intestinal absorption; single pass intestinal perfusion; salvanolic acid B; lithospermic acid; rosmarinic acid

复方丹参方来源于上海中药二厂 1975 年研制并投产的复方丹参片,是临床上治疗心脑血管疾病的常用方剂,由君药丹参、臣药三七、使药冰片组成,具有活血化瘀、理气止痛的功效。丹参有活血化瘀的作用,其发挥药效的有效部位为水溶性的丹酚酸类。据文献报道,丹酚酸类口服吸收生物利用度较低,这与丹酚酸类在胃肠道的稳定性和膜透过性差有关^[1]。因此,选用安全有效的口服吸收促进剂来提高丹酚酸类的口服吸收生物利用度具有重要意义。

冰片有开窍醒神、清热止痛的作用。《本草衍义》总结其作用特点“独行则势弱,佐使则有功”,冰片作为中医方剂配伍的佐使药,引经直达病所^[2],可促进一些药物的胃肠道吸收并使药物穿透血脑屏障。赖玲等^[3]研究了三七总皂苷的小肠吸收动力学及吸收促进剂对其在小肠吸收的影响,发现冰片能提高三七总皂苷在小肠的吸收水平。陈卓等^[4]研究发现冰片可有效促进豆腐果苷在大鼠小肠的吸收,0.04%冰片可达 1.3 倍的促吸收效果。冰片佐丹参、三七活血之功效,可引经直达病所,并起到开窍止痛的作用^[5]。本实验采用大鼠单向肠灌注模型,研究不同浓度冰片对丹参水提取物中紫草酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 肠吸收的影响,为后续复方滴丸制剂处方中冰片与丹酚酸提取物的比例优化提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪和 1200 型 DAD 检测器(美国 Agilent 公司),BT100-1J 型蠕动泵(重庆科耐普蠕动泵有限公司),BT125D 型 1/10 万电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。丹酚酸提取物(南京艾利珂药业有限公司,批号 140615),天然冰片(江西吉安绿源公司,批号 14082309),丹酚酸 B 和迷迭香酸对照品(南京康惟盛生物技术有限公司,批号分别为 150301,150415,纯度均 > 98%),紫草酸对照品(南京泽朗科技有限公司,批号 ZL20150801ZC,纯度 > 98%),水为纯化水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(250 ± 30) g,由南京青龙山动物中心提供,合格证号 SCXK(沪)2013-0006。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 K-R 缓冲液 称取氯化钠 7.8 g,氯化钾

0.35 g,氯化钙 0.37 g,碳酸氢钠 1.37 g,磷酸二氢钠 0.22 g,氯化镁 0.22 g 和葡萄糖 1.4 g 溶于水中,加水定容至 1 L,用 1 mol·L⁻¹ HCl 调节 pH 6.0。

2.1.2 丹酚酸提取物灌流液 精密称取丹酚酸提取物 80 mg 置 100 mL 量瓶,加 K-R 缓冲液后置于 37 °C 水浴超声 5 min 使其溶解,加 K-R 缓冲液定容至 100 mL,得 0.80 g·L⁻¹ 丹酚酸提取物灌流液。

2.1.3 含冰片的丹酚酸提取物灌流液 称取冰片 5,10,20 mg,分别溶解于 5 mL 无水乙醇中,转移至 100 mL 量瓶中,各加入丹酚酸提取物 80 mg,加入适量 K-R 缓冲液,置于 37 °C 水浴超声 5 min 使溶解,定容至 100 mL,得质量浓度分别为 0.05,0.10,0.20 g·L⁻¹ 含冰片的丹酚酸提取物灌流液。

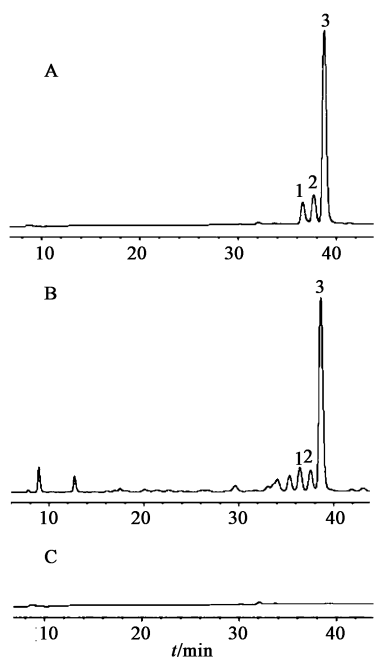
2.1.4 阴性丹酚酸提取物灌流液 精密称取冰片 10 mg 溶解于 5 mL 无水乙醇后转移至 100 mL 量瓶中,加 K-R 缓冲液定容至刻度,于 37 °C 水浴超声 5 min 使溶解,即得。

2.2 方法学考察

2.2.1 色谱条件 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相 1% 冰乙酸水溶液(A)-1% 冰乙酸甲醇溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min,10% ~ 20% B;10 ~ 40 min,20% ~ 47% B;40 ~ 50 min,47% ~ 70% B),柱温 35 °C,检测波长 286 nm,流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 10 μL。

2.2.2 专属性试验 称取适量紫草酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 对照品至 2 mL 量瓶,加入 K-R 缓冲液,于 37 °C 水浴超声 5 min 后放至室温,定容,得混合对照品溶液。取混合对照品溶液、丹酚酸提取物的 K-R 缓冲液及丹酚酸提取物阴性灌流液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,按 2.2.1 项下条件测定,结果三者的保留时间分别为 36.745,37.920,38.680 min,各色谱峰理论塔板数均 > 6 000,分离度均 > 1.5,且峰形较好,3 个成分彼此互不干扰测定。见图 1。

2.2.3 标准曲线的制备 精密称取丹酚酸 B,紫草酸和迷迭香酸对照品适量,加 K-R 溶液定容至 10 mL,摇匀,得系列对照品溶液,按 2.2.1 项下条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得标准曲线分别为 $Y = 30\ 330X - 497.24$ ($R^2 = 0.999\ 8$), $Y = 131\ 806X - 2.540$ ($R^2 = 0.999\ 9$), $Y = 49\ 965X - 0.145$ ($R^2 = 0.998\ 8$),线性范围依次为 0.102 ~ 1.637,0.002 ~ 0.040,0.010 ~ 0.160 g·L⁻¹。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性样品; 1. 紫草酸; 2. 迷迭香酸; 3. 丹酚酸 B

图 1 丹参提取物灌流液 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of perfusate of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract

2.2.4 精密度试验 取同一供试品溶液,按 2.2.1 项下条件连续进样 6 次,计算丹酚酸 B,紫草酸和迷迭香酸峰面积的 RSD 分别为 0.1%, 0.9% 和 0.7%。

2.2.5 稳定性试验 分别用 HCl 和 NaOH 溶液调节丹酚酸提取物 K-R 缓冲液,得 pH 分别为 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 的丹酚酸提取物 K-R 缓冲液,37 °C 恒温水浴下放置,分别于 0, 2, 4 h 取样按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算峰面积的 RSD,结果丹酚酸 B 依次为 0.2%, 0.3%, 1.8%, 2.8%, 紫草酸分别为 0.7%, 0.6%, 0.4%, 0.6%, 迷迭香酸依次为 0.2%, 0.4%, 1.5%, 2.3%。说明三者者在 pH 5.0 ~ 6.0 的 K-R 缓冲液中较为稳定,考虑到肠环境 pH 偏弱碱性,因此大鼠肠吸收灌流液调整为 pH 6.0。

2.3 大鼠肠吸收样品采集与分析 取禁食 12 h 的 SD 大鼠(禁食期间可自由饮水),称重后按 5 mL·kg⁻¹腹腔注射 20% 乌拉坦,麻醉后将大鼠固定于手术台上。沿大鼠腹中线剪开长约 3 ~ 4 cm 的开口,分离出待考察的肠段(十二指肠、空肠、回肠),量取 10 cm 并于两端切口,以 37 °C 生理盐水缓慢清洗肠道,直到流出液澄清无可见物为止,用空气排空肠道中的生理盐水,于切口两端插管、结扎。取预热至 37 °C 的供试液以 1 mL·min⁻¹ 的流速灌流 10 min,再

将流速调至 0.2 mL·min⁻¹ 平衡 30 min 后开始计时,进口处用已知质量的装有供试液的具塞小瓶灌流,出口处用另一已知质量的具塞小瓶收集,每隔 15 min 迅速更换供试小瓶和收集小瓶,分别称重,计算灌入和收集的供试液质量,分别于计时后 15, 30, 45, 60, 75 min 的灌流液中取样 1.0 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,用于丹酚酸 B,紫草酸和迷迭香酸的含量测定。试验结束后,将大鼠处死,剪下灌流的肠段,测量并记录其长度与内径。大鼠小肠段分为 3 段(自幽门以下 1 cm 处向下取 10 cm 为十二指肠段;幽门以下 15 cm 向下取 10 cm 为空肠段;盲肠上端 20 cm 向下取 10 cm 为回肠段),计算药物的吸收速率常数(K_a)和表观吸收系数(P_{app})。

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{Q_{out}}{Q_{in}}\right) \cdot \frac{Q}{V}$$

$$P_{app} = \frac{-Q \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{Q_{out}}{Q_{in}}\right)}{2\pi rL}$$

式中 Q_{in} 和 Q_{out} 分别为肠道进出口灌流液的体积(假定液体密度 1 g·mL⁻¹), C_{in} 和 C_{out} 分别为肠道进出口灌流液的浓度, L 为灌流肠段的长度, r 为灌流肠段的横截面半径, Q 为灌流速度(0.2 mL·min⁻¹), V 为灌流肠段的体积($\pi r^2 L$)。按 2.1.3 项下配制含不同浓度冰片的丹酚酸提取物灌流液,灌流液含 800 mg·L⁻¹ 丹酚酸提取物,冰片质量浓度分别为 50, 100, 200 mg·L⁻¹。考察不同浓度冰片对丹酚酸 B,紫草酸和迷迭香酸在大鼠不同肠段吸收的影响,以不含冰片的丹酚酸提取物灌流液为阴性对照。利用 SPSS 19.0 软件处理肠吸收数据,组间数据使用 t 检验分析,结果见表 1。

丹酚酸提取物质量浓度 800 mg·L⁻¹ 时,丹酚酸 B,紫草酸和迷迭香酸的原位吸收较差。丹酚酸 B 各肠段的原位吸收情况为回肠 > 空肠 > 十二指肠,紫草酸为空肠 > 十二指肠 ≈ 回肠,迷迭香酸为空肠 > 十二指肠 > 回肠,且均无显著性差异($P > 0.05$)。配伍低、中、高质量浓度冰片后,丹酚酸 B 全肠段 K_a 分别为不加冰片的 1.88, 2.31, 1.21 倍;紫草酸全肠段的 K_a 分别为不加冰片的 1.94, 2.33, 1.16 倍;迷迭香酸全肠段的 K_a 分别为不加冰片的 2.37, 3.38, 1.69 倍,说明冰片对迷迭香酸的肠吸收促进效果最好。其中冰片质量浓度 100 mg·L⁻¹ 时促进肠吸收的效果最优。

3 讨论

研究药物口服吸收的模型主要包括体外法、在体法、体内法等,在体肠循环模型灌流流速大,易对

表 1 不同质量浓度冰片对丹酚酸提取物中丹酚酸 B, 紫草酸和迷迭香酸大鼠肠吸收参数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effects of borneol with different concentration on absorption parameters of salvianolic acid B, lithospermic acid and rosmarinic acid in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

成分	冰片质量 浓度/mg·L ⁻¹	$K_a \times 10^{-2}/\text{min}^{-1}$			$P_{app} \times 10^{-3}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$		
		十二指肠	空肠	回肠	十二指肠	空肠	回肠
丹酚酸 B	0	0.79 ± 0.14	0.81 ± 0.09	1.08 ± 0.21	0.78 ± 0.11	0.87 ± 0.20	1.09 ± 0.23
	50	1.96 ± 0.24 ²⁾	1.48 ± 0.22 ¹⁾	1.59 ± 0.17 ¹⁾	2.05 ± 0.43 ²⁾	1.49 ± 0.15 ¹⁾	1.62 ± 0.37 ¹⁾
	100	2.26 ± 0.27 ²⁾	2.21 ± 0.34 ²⁾	1.72 ± 0.06 ¹⁾	2.37 ± 0.44 ²⁾	2.37 ± 0.08 ²⁾	1.82 ± 0.19 ¹⁾
	200	0.94 ± 0.09 ¹⁾	1.27 ± 0.32 ²⁾	1.02 ± 0.25	0.93 ± 0.27	1.28 ± 0.20 ²⁾	0.85 ± 0.14
紫草酸	0	0.91 ± 0.04	1.19 ± 0.17	0.90 ± 0.25	1.01 ± 0.18	0.88 ± 0.06	0.90 ± 0.14
	50	1.89 ± 0.28 ¹⁾	2.18 ± 0.33 ²⁾	1.75 ± 0.21 ²⁾	1.99 ± 0.22 ¹⁾	2.24 ± 0.41 ¹⁾	1.48 ± 0.23 ¹⁾
	100	2.24 ± 0.14 ²⁾	2.57 ± 0.18 ²⁾	2.17 ± 0.13 ²⁾	2.38 ± 0.12 ²⁾	2.71 ± 0.05 ²⁾	2.93 ± 0.24 ²⁾
	200	0.93 ± 0.23	1.32 ± 0.09 ¹⁾	1.23 ± 0.26 ¹⁾	0.93 ± 0.28	1.31 ± 0.12	1.30 ± 0.07 ¹⁾
迷迭香酸	0	0.47 ± 0.03	1.19 ± 0.28	0.42 ± 0.19	0.46 ± 0.19	0.61 ± 0.31	0.41 ± 0.15
	50	1.86 ± 0.14 ²⁾	1.64 ± 0.35 ¹⁾	1.40 ± 0.15 ¹⁾	1.95 ± 0.15 ²⁾	1.65 ± 0.36 ¹⁾	1.41 ± 0.14 ¹⁾
	100	2.25 ± 0.36 ²⁾	3.14 ± 0.18 ²⁾	1.64 ± 0.40 ²⁾	2.36 ± 0.31 ²⁾	3.08 ± 0.10 ²⁾	1.74 ± 0.37 ²⁾
	200	0.95 ± 0.28 ¹⁾	1.33 ± 0.16 ¹⁾	1.23 ± 0.24 ¹⁾	0.94 ± 0.33 ¹⁾	1.34 ± 0.29 ¹⁾	1.02 ± 0.27 ¹⁾

注:与未加入冰片比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

肠黏膜造成损伤,每次取样和体积补偿时易出现误差,而在体单向肠灌注法流速较低,吸收速率稳定,该法既可从肠腔取样,又可从血液和胆汁中取样,操作便捷灵活,便于控制实验中药液的流速、浓度等因素,并且可对不同肠段进行考察^[6],是目前常用的研究药物口服吸收的模型,故本文采用在体单向肠灌注法研究冰片对丹酚酸肠吸收的影响。

当 K-R 缓冲液 pH 6.5 时,丹酚酸 B, 紫草酸和迷迭香酸 4 h 峰面积的 RSD 分别为 2.8%, 0.6% 和 2.3%; K-R 缓冲液 pH 5 ~ 6 时,各成分峰面积的 RSD 均 < 2.0%, 表明丹酚酸在弱酸性条件下比较稳定。丹酚酸为弱酸,由丹酚酸在不同 pH 的 K-R 缓冲液中稳定性考察结果可知,丹酚酸在中碱性的溶液中会很快降解,因此实验过程中需要迅速进样检测。丹酚酸在肠环境中不稳定,这是导致丹酚酸口服吸收生物利用度低的原因之一。

配伍高、中、低质量浓度冰片后丹酚酸 B, 紫草酸和迷迭香酸肠吸收的 K_a , P_{app} 大多有所增加,说明冰片具有显著促吸收作用^[7],其中对迷迭香酸的肠吸收促进效果最好。100 mg·L⁻¹ 冰片组促进肠吸收的效果最优,随着冰片质量浓度的增加,促吸收作用有所增强,但到一定质量浓度时,冰片的促吸收作用有所减弱。文献报道,冰片具有抑制 P-糖蛋白活性的作用^[8],可逆地影响细胞间紧密连接和细胞内囊泡状态^[9],使细胞膜上的磷脂双分子层运动更加有序^[10],从而增加细胞膜通透性,使药物更易透过。

冰片作为佐使药,可引经直达病所,促进君药丹参水提物中丹酚酸的肠吸收。这和中医传统认为冰片“独行则势弱,佐使则有功”和“芳香走窜,引药上

行”相一致。本文研究可为后续复方丹酚滴丸处方中冰片用量的选择提供参考。

[参考文献]

[1] 潘素静,龙晓英,林婉婷,等. 复方丹参制剂口服吸收研究新进展[J]. 中成药, 2013, 35(7): 1526-1530.

[2] 李东晓,邓文龙. 冰片促透作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 87-88.

[3] 赖玲,刘华钢,秦艳娥,等. 吸收促进剂对三七总皂苷小肠吸收的影响[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(10): 909-913.

[4] 陈卓,蒋学华,任静,等. 豆腐果苷在大鼠小肠吸收动力学研究[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1851-1853.

[5] 恽菲,狄留庆,李俊松,等. 复方丹参制剂多组分口服吸收及其相互影响研究的思考[J]. 中草药, 2011, 42(10): 2135-2138.

[6] 张海燕,邹伟魁,芦乾,等. 冰片促进口服药物吸收的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 294-297.

[7] 程漩格,王素军,曾洁,等. 大鼠在体单向肠灌注模型研究异绿原酸 A 的肠吸收特性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 108-112.

[8] 陈艳明,王宁生. 冰片对 P-糖蛋白的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(2): 96-99.

[9] 陈艳明,王宁生. 冰片对血脑屏障体外模型细胞间紧密连接和细胞吞饮囊泡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(7): 632-634.

[10] 樊岚岚,唐由之,陆丽珠,等. 冰片促秦皮甲素透过兔角膜上皮细胞实验研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 81-82.

[责任编辑 刘德文]