

吸收促进剂对水飞蓟宾及其磷脂复合物肠吸收的影响

卫世杰^{1*}, 霍务贞², 王立宝¹

(1. 广东药学院药科学院, 广州 510006; 2. 广东药学院中药开发研究所, 广州 510006)

[摘要] 目的: 考察吸收促进剂对水飞蓟宾及其磷脂复合物肠道吸收的影响。方法: 采用大鼠在体单向肠灌注法研究药物在大鼠的十二指肠、空肠、回肠及结肠的吸收情况。结果: 水飞蓟宾及其磷脂复合物在各肠段均有吸收, 以空肠和回肠段吸收较好, 且其磷脂复合物在各肠段吸收均高于药物本身。聚山梨醇酯对水飞蓟宾及其磷脂复合物无明显促进吸收作用, 甘胆酸钠和卡波姆有较弱的吸收促进作用, 十二烷基硫酸钠对水飞蓟宾具有较强的促进吸收作用, 而对其磷脂复合物作用较弱; 聚氧乙烯化蓖麻油对水飞蓟宾和磷脂复合物均有较强的促进作用。结论: 合理改善药物结构及选择适宜吸收促进剂能改善药物的吸收。

[关键词] 水飞蓟宾; 在体单向肠灌注模型; 吸收促进剂

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0043-04

Effect of Absorption Enhancers on Intestinal Absorption of Silybin and its Phospholipid Complex

WEI Shi-jie^{1*}, HUO Wu-zhen², WANG Li-bao¹

(1. Department of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Research & Development Institute of Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of absorption enhancers on intestinal absorption of silybin and silybin phospholipid complex (SPC). **Method:** *In situ* rats single pass perfusion model was used to investigate absorption of silybin and SPC in duodenum, jejunum, ileum and colon. **Result:** Silybin and SPC were absorbed in each intestinal segment, especially in jejunum and ileum, and absorption of SPC in each intestinal segments were higher than drug itself. Tween-80 had no significantly absorption enhancement effect on silybin and SPC, glycocholic acid sodium and carbomer only had slightly promotion absorption, sodium dodecyl sulfate could greatly promote absorption of silybin while weakly affected SPC; Cremophor® RH40 had a strong role in promoting absorption of silybin and SPC. **Conclusion:** It could improve drug absorption by reasonable modification of drug structure and selection of suitable absorption enhancers.

[Key words] silybin; *in situ* rats single pass perfusion model; absorption enhancer

水飞蓟宾(silybin)是从菊科植物水飞蓟种子中提取出的黄酮类天然产物, 具有治疗高血脂症、消除自由基、抗肝脂质过氧化等作用, 是疗效确切的肝损伤修复药。但由于水飞蓟宾的水溶性差, 其口服

吸收仅 20% ~ 50%^[1], 生物利用度低, 限制了水飞蓟宾的临床应用。目前已有文献对该药物在肠内的吸收过程进行考察, 但未见有考察吸收促进剂对该药肠道吸收影响的报道。药物在肠道内的吸收是决定口服药物生物利用度的重要因素, 大鼠单向肠灌注法能很好地模拟人体体内环境, 试验结果与在人体中相关性良好^[2-3]。本文应用在体大鼠单向肠灌注法从渗透性方面考察吸收促进剂对水飞蓟宾肠道吸收的影响, 为提高水飞蓟宾肠吸收和设计合理剂型提供试验依据。

[收稿日期] 20120212(011)

[基金项目] 广东省中医药管理局课题(20112149)

[通讯作者] * 卫世杰, 博士, 讲师, Tel: 020-39352117, E-mail: vshijie@163.com

1 材料

AE240 型电子天平 (瑞士 METTLER), ShimadzuLC-10AT 型高效液相色谱仪 [SPD-10A 紫外检测器, hy VP-ODS 柱 (150 mm × 4.6 mm), 日本岛津], HL-2 型恒流泵 (上海华岩仪器设备有限公司), GM-0.33A 型抽滤器 (津腾仪器有限公司), 微量进样器 (上海高鸽工贸有限公司), AUY 型 1/万分析天平 (日本岛津)。

水飞蓟宾对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110856-200604, 纯度 > 99.0%), 水飞蓟宾 (西安天一生物科技有限公司, 纯度 90%), Krebs-Ringer 缓冲液 (K-R 缓冲液, 每 1000 mL 溶液中含 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.37 g, MgCl 20.22 g, NaH₂PO₄ 0.22 g, 葡萄糖 1.4 g, NaHCO₃ 1.37 g), 聚山梨醇酯-80 (Tween-80, 中国医药集团上海化学试剂公司), 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (德国 BASF 公司), 十二烷基硫酸钠、卵磷脂 (广东环凯微生物科技公司分装), 其他试剂和试药均为分析纯。

SD 大鼠, 体重约 200 g, 雌雄各半, 广州中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证号 0060030。

2 方法与结果

2.1 酚红的含量测定^[4] 取含酚红、水飞蓟宾对照品及各种吸收附加剂的 K-R 试液及不含酚红的上述灌流液中及各 1.0 mL, 加入 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 1 mL, K-R 试液 3.5 mL, 摇匀, 于 200 ~ 700 nm 进行扫描, 结果于 552 nm 波长处有最大吸收, 各种吸收促进剂及水飞蓟宾对测定没有干扰。另用 K-R 缓冲液配制含酚红 10, 20, 40, 60, 80, 120 mg·L⁻¹ 的系列对照液, 分别吸取 1.0 mL, 加入 NaOH 溶液 1 mL, K-R 试液 3.5 mL, 摇匀, 测定吸收度 (A), 以 C 对吸收度 A 进行线性回归, 得标准曲线方程 $A = 0.1082C - 0.016$ ($R^2 = 0.9996$), 酚红在 10 ~ 120 mg·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。进行回收率和精密度试验, 结果平均回收率为 101.25%, 方法日内精密度 RSD < 1.3%, 日间精密度 RSD < 1.1%。说明该方法稳定, 可行。

2.2 灌流液中水飞蓟宾含量测定

2.2.1 色谱条件^[5] Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水-冰醋酸 (30:40:30, pH 4), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。

2.2.2 标准曲线绘制 精密称取 10 mg 水飞蓟宾置于 100 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 配成 0.1 g·L⁻¹ 的母液避光保存。精密量取 1, 2, 4, 6, 8,

10 mL 分别置于 50 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释并定容, 摇匀, 进样, 以峰面积对药物质量浓度回归得线性范围, 得水飞蓟宾标准曲线为 $Y = 46257.4X + 26821.5$ ($R^2 = 0.9997$), 线性范围 10 ~ 80 mg·L⁻¹。辅料对药物测定无干扰, 方法专属性良好。进行回收率、精密度及稳定性试验, 结果测定方法的回收率、准确度均符合要求, 日内精密度 RSD < 0.7%, 日间精密度 RSD < 1.3%, 样品溶液在 12 h 内保持稳定, 表明该方法准确、可行。

2.3 肠灌流液的配制

2.3.1 水飞蓟宾肠灌流液的配制^[6] 精密称取水飞蓟宾原料药适量, 用含酚红 20 g·L⁻¹ 的 K-R 试液稀释并定容至 200 mL, 配制成 20, 60, 100, 200 mg·L⁻¹ 的供试液。

2.3.2 含吸收促进剂的肠灌流液的配制 精密配制水飞蓟宾质量浓度为 60 mg·L⁻¹, 酚红质量浓度为 20 g·L⁻¹ 的供试液, 分别称取吸收促进剂吐温 80、十二烷基硫酸钠、甘胆酸钠、乳化剂 RH40 及卡波姆 934, 制成吸收促进剂质量分数分别成 0.5%, 0.5%, 5%, 0.5%, 0.5% 的待灌流液。

2.4 大鼠在体单向肠灌流试验 手术前大鼠禁食 12 h, 自由饮水, 腹腔注射 7% 水合氯醛溶液 (给药剂量 0.5 mL·kg⁻¹), 麻醉并固定, 用棉布保持体温。在大鼠腹部正中切开约 3 cm, 对考察部位两端切口后插管, 用预热 37 °C 的生理盐水将肠道内容物冲洗干净, 然后用预热的 37 °C 的 K-B 缓冲液以 5 mL·min⁻¹ 的速度恒定流速平衡 10 min, 排净空气, 将伤口用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿。

取预热至 37 °C 的供试液 200 mL, 分别以 1.0 mL·min⁻¹ 的流速灌流 10 min, 再以 0.2 mL·min⁻¹ 的流速预平衡 30 min, 于 30 ~ 60, 60 ~ 90, 90 ~ 120, 120 ~ 150 min 各收集 5 mL 灌流液样品^[7-8]。其中 1 mL 为酚红测试样品, 4 mL 为水飞蓟宾样品, 经微孔滤膜过滤后, 取续滤液进样, 采用 HPLC 测定峰面积, 计算各个时间段灌流液样品中水飞蓟宾的含量, 考察肠段及吸收促进剂对肠道吸收的影响。

2.5 数据分析^[9] 采用酚红法对灌流液的流入和流出的体积进行校正, 消除其体积变化的影响。

$$C_{SR} = \frac{C'_p C'_s}{C_p} \quad (1)$$

$$P_E = \frac{Q \ln(C_s / C_{SR})}{2\pi r l} \quad (2)$$

$$K_a = (1 - \frac{C_{SR}}{C_s}) Q / \pi r^2 l$$

其中 C_{SR} 为校正后的药物浓度; C'_p 为酚红的流

出浓度; C_p 为酚红的流入浓度; C'_s 为流出的灌流液中药物浓度; P_e 为有效渗透系数; C_s 为流入的灌流液中药物浓度; K_a 为吸收速率常数; r 为肠段半径; l 为肠段长度。

2.5.1 水飞蓟宾及其磷脂复合物在不同肠段的吸收情况 选用水飞蓟宾和水飞蓟宾磷脂复合物质量浓度均为 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的灌流液对大鼠各肠段的吸收特性进行考察(表1)。

表1 水飞蓟宾及其磷脂复合物在不同肠段的吸收参数($\bar{x} \pm s$)
 $\times 10^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

药物	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	十二指肠	空肠	回肠	结肠
水飞蓟宾	20	3.9 ± 0.7	5.4 ± 0.8	4.8 ± 0.7	3.8 ± 1.0
	60	4.1 ± 1.2	5.8 ± 1.1	5.0 ± 0.4	3.8 ± 0.9
	100	4.1 ± 0.6	5.9 ± 1.3	5.0 ± 1.1	3.7 ± 1.1
	200	4.0 ± 0.9	5.8 ± 1.0	5.1 ± 0.2	3.6 ± 1.2
水飞蓟宾 复合物	20	4.3 ± 0.6	$8.4 \pm 0.9^{1)}$	$8.1 \pm 1.1^{1)}$	4.3 ± 0.5
	60	5.1 ± 1.3	$9.3 \pm 1.7^{1)}$	$8.9 \pm 1.4^{1)}$	4.2 ± 1.6
	100	5.2 ± 0.9	$9.1 \pm 0.7^{1)}$	$8.3 \pm 1.4^{1)}$	4.4 ± 0.7
	200	4.9 ± 1.1	$9.2 \pm 1.2^{1)}$	$8.5 \pm 0.8^{1)}$	4.2 ± 1.1

注: ¹⁾表示与水飞蓟宾组对比 $P < 0.01$ 。

由表1结果可知,从吸收部位上看,水飞蓟宾及其磷脂复合物在空肠、回肠段吸收较好,且其磷脂复合物吸收在各肠段均明显好于药物本身。不同药物浓度对水飞蓟宾和水飞蓟宾磷脂复合物的吸收影响较少,吸收系数无显著性差异。

2.5.2 不同吸收促进剂对水飞蓟宾及其磷脂复合物的吸收的影响 选择空肠段,以质量浓度为 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水飞蓟宾和水飞蓟宾磷脂复合物的灌流液进行灌注,考察吸收促进剂的影响(表2)。

表2 吸收促进剂对水飞蓟宾及其磷脂复合物吸收的影响($\bar{x} \pm s$)

吸收促进剂	参数	水飞蓟宾	水飞蓟宾 磷脂复合物
Tween 80	$PE / \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	8.5 ± 2.2	12.5 ± 2.6
	$Ka / \times 10^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	5.7 ± 1.3	9.5 ± 1.8
十二烷基硫酸钠	$PE / \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	$13.8 \pm 2.7^{2)}$	13.6 ± 1.3
	$Ka / \times 10^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	$9.4 \pm 2.2^{2)}$	10.4 ± 0.7
甘胆酸钠	$PE / \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	9.2 ± 1.5	13.1 ± 1.6
	$Ka / \times 10^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	6.3 ± 0.9	10.2 ± 2.1
乳化剂 RH40	$PE / \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	9.6 ± 1.8	$21.6 \pm 2.4^{2)}$
	$Ka / \times 10^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	6.6 ± 1.2	$15.8 \pm 1.7^{2)}$
卡波姆 934	$PE / \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	9.7 ± 1.9	14.7 ± 1.3
	$Ka / \times 10^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	6.8 ± 1.3	11.2 ± 2.5

注:与 Tween 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

由表2结果可知,甘胆酸钠和卡波姆分别做胆

酸盐类和高分子类吸收促进剂,对水飞蓟宾和水飞蓟宾磷脂复合物有一定吸收促进作用,Tween 80、十二烷基硫酸钠和 RH40 是3种表面活性剂类促进剂,其中 Tween 80 对药物的促进作用较弱,十二烷基硫酸钠对水飞蓟宾的吸收促进作用较强,对水飞蓟宾复合物的促进作用较弱,乳化剂 RH40 对水飞蓟宾和磷脂复合物均有较强的吸收促进作用。

3 讨论

水飞蓟宾难溶于水及一般有机溶剂,生物利用度低,故提高药物的肠道吸收是提高生物利用度的关键。由本试验结果可知,适当改变药物性质或者添加一些吸收促进剂可有效改善药物吸收偏低的缺陷,为水飞蓟宾剂型的设计和开发提供了实验依据,可减少剂型设计的盲目性,对制剂处方有一定指导意义。但吸收促进剂本身比如一些表面活性剂类存在的安全性问题也应予以考虑。

由于在灌流过程中小肠会吸收水分,循环液体积改变,药物浓度升高,影响测定结果。目前多在灌流液中加入不被肠道吸收的酚红作为体积的标示物。有文献报道,酚红少量会被小肠吸收,平均吸收速率为6%。 Ca^{2+} 离子能抑制酚红的吸收。故本试验采用含有一定浓度 Ca^{2+} 的 K-B 缓冲液配制循环液,以减小试验误差^[10]。本研究采用低灌流速度和较短的灌流时间,同时对灌流液体积进行校正,使酚红可很好地起到标示体积的作用。

[参考文献]

[1] Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S, et al. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1993, 18(3): 289.

[2] Schurgers N, Bijdendijk J, Tukker J J, et al. Comparison of four experimental techniques for studying drug absorption kinetics in anesthetized rat *in situ* [J]. J Pharm Sci, 1986(75): 117.

[3] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. Pharm Res, 1996(13): 336.

[4] 杜秋,狄留庆,单进军,等.在体单向肠灌流模型研究瑞香素的大鼠肠吸收特性[J].药学报,2009,44(8): 922.

[5] 卫世杰,霍贞贞,李晓芳,等.水飞蓟宾磷脂复合物自乳化片的制备及体外溶出度考察[J].中成药,2010,32(10): 41.

[6] 汤继辉,胡容峰,常宫.丹皮酚在体小肠吸收动力学研究[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(7): 35.

多指标综合评价法优选湖北海棠叶中总黄酮提取工艺

王幸, 师延琼, 覃鸿恩, 郭东艳*
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的: 优选湖北海棠中总黄酮的提取工艺。方法: 以总黄酮及根皮苷含量为指标, 采用单因素试验法筛选提取方法和提取次数; 以浸膏得率, 总黄酮及根皮苷含量为综合评价指标, 对主要影响因素乙醇体积分数、溶剂用量、提取时间进行正交试验优选。结果: 最佳提取工艺为8倍量70%乙醇回流提取3次, 每次1h。结论: 优选工艺稳定可行, 可作为湖北海棠中总黄酮的提取工艺。

[关键词] 湖北海棠; 正交设计; 总黄酮; 综合评价; 根皮苷

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0046-04

Optimization of Extraction Technology for Total Flavonoids from *Malus hupehensis* by Multi-index Comprehensive Evaluation Method

WANG Xing, SHI Yan-qiong, QIN Hong-en, GUO Dong-yan*
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xiayang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction technology of total flavonoids from *Malus hupehensis*. **Method:** Single factor test was made to select extraction method and extraction times with the content of total flavonoids and phloridzin as indexes; With the content of extract yield, total flavonoids and phloridzin as comprehensive evaluation index, main factors were optimized by orthogonal test which including the concentration of ethanol, the amount of solvent and extraction time. **Result:** Optimum extraction technology was: refluxing extracted 3 times with 8 folds the amount of 70% ethanol, 1 h each time. **Conclusion:** Optimized process was stable and feasible, and it could be extraction process of total flavonoids from *M. hupehensis*.

[Key words] *Malus hupehensis*; orthogonal design; total flavonoids; comprehensive evaluation; phloridzin

湖北海棠又叫野海棠、茶海棠、野花红, 树姿优美, 花蕾深粉红, 开放后近白色, 有芳香。湖北海棠

含有茶多酚、黄酮、Zn、Cr、Mn等多种矿物质, 具有抗菌消炎、耐缺氧、抗疲劳、降血糖等药理作用^[1-3],

[收稿日期] 20120221(002)

[基金项目] 陕西省教育厅重点实验室项目(11JS036); 陕西省重点学科专项资金项目

[第一作者] 王幸, 在读硕士研究生, 从事中药制剂研究, Tel: 029-38185180

[通讯作者] * 郭东艳, 博士, 教授, 从事中药新制剂与新剂型研究, Tel: 029-38185180, E-mail: winter180@163.com

[7] 苏红, 黄川生, 陈文, 等. 单向灌流法研究紫草素的大鼠在体肠吸收[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 190.

[8] 张英丰, 李玉洁, 杨庆, 等. 大鼠在体单向肠灌流法进行丹参素、丹酚酸B的肠吸收研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 96.

[9] Gao Q, Shan J J, Di L Q, et al. Therapeutic effects of daphnetin on adjuvant-induced arthritic rats [J]. J Ethnopharmacol, 2008(120): 259.

[10] 许蕾, 杨中林. 大鼠在体单向灌流法研究橙皮苷肠道吸收性质[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(8): 594.

[责任编辑 全燕]