

# 葛根素口服油基纳米乳大鼠体内吸收转运通路研究

王 蕾, 吴鸿飞, 鲁传华\*, 范燕妮

(安徽中医学院, 安徽省现代中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230038)

**摘要:** 考察葛根素油基微乳在大鼠小肠的吸收动力学特征和最佳吸收部位, 研究微乳的吸收转运通路。大鼠在体肠回流实验考察小肠吸收行为, 通过阻断和未阻断淋巴液及药物浓度的变化确定吸收转运通路。葛根素油基微乳在各肠段均有吸收, 各肠段的  $K_a$ 、 $P_{app}$  大小顺序是回肠 > 十二指肠 > 空肠 > 结肠, 且回肠的  $K_a$ 、 $P_{app}$  值显著大于其他肠段, 不同浓度的药物吸收速率差异不显著 ( $P > 0.05$ )。经胃肠道生物转运的葛根素中约有 36.8% 经淋巴途径进入体循环, 63.2% 经非淋巴途径吸收。葛根素微乳在回肠吸收最好, 属被动转运; 转运通路是淋巴和非淋巴转运。

**关键词:** 葛根素; 油基纳米乳; 在体肠吸收; 转运通路

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 07-0798-05

## The pathway of absorption and conveying of puerarin microemulsion-in-oil

WANG Lei, WU Hong-fei, LU Chuan-hua\*, FAN Yan-ni

(Anhui Province Key Laboratory of R&D of Chinese Medicine, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

**Abstract:** The best absorption location of puerarin microemulsion-in-oil in intestina parva of rat and pharmacokinetic characteristics, and the pathway of absorption and conveying of puerarin microemulsion were studied. *In situ* rat perfusion method was used to investigate the intestinal absorption of puerarin. Through the changes of drug concentration in blocked and unblocked lymphs, to determine the pathway of absorption and conveying. Puerarin microemulsion-in-oil can be absorbed in any part of intestine, and the  $K_a$ ,  $P_{app}$  of every part is ileum > duodenum > jejunum > colon, and the  $K_a$ ,  $P_{app}$  of ileum is significantly larger than that of others. The absorption rate of different concentrations is not significantly different ( $P > 0.05$ ). The puerarin transited by gastrointestinal tract, about 36.8% is absorbed by the lymphatic channels to enter the systemic circulation and 63.2% is absorbed by the non-lymphatic channels. The best part of intestine to absorb puerarin microemulsion is ileum, and it is passive transport. The pathway of conveying is lymphoid and non-lymphoid transit.

**Key words:** puerarin; microemulsion-in-oil; intestinal absorption *in situ*; conveying pathway

微乳 (microemulsion, ME) 作为新型的纳米给药体系, 能显著提高药物的溶解度和生物利用度, 如尼莫地平微乳的生物利用度是片剂的 4.86 倍<sup>[1]</sup>。研究结果表明产生这一现象的原因可能是纳米粒的巨大

比表面增加了药物与肠壁的接触面, 派伊尔淋巴集结 (Peyer's patch, PP) 吸收经淋巴系统转运至全身, 所以增大了口服生物利用度<sup>[2]</sup>, 但未见此方面的定量研究报道。Khoo 等<sup>[3]</sup>对卤泛曲林的自微乳体系处方中长链和短链脂经犬口服后淋巴转运情况进行了研究, 发现长链脂比短链脂更能刺激淋巴转运, 但未反映纳米液滴特有的吸收现象。

葛根素 (puerarin, Pue) 为异黄酮苷类, 是从豆

收稿日期: 2009-01-21.

基金项目: 安徽省“十一·五”科技计划 (08020303080).

\*通讯作者 Tel: 86-551-5169146, Fax: 86-551-5169222,

E-mail: lch@ahtcm.edu.cn

科植物野葛或甘葛藤的干燥根提取而成。葛根素为水不溶性, 口服后难以被吸收, 绝对生物利用度只有 3.75% 左右<sup>[4]</sup>。以大豆油为外相, 乳酸乙酯和丙二醇为内相的葛根素油包油 (O/O) 型微乳, 其口服生物利用度高达 40%<sup>[5]</sup>, 极大的提高了生物利用度。为了阐明此现象的吸收转运机制, 本文对该葛根素油基微乳的大鼠小肠吸收动力学及最佳吸收部位进行考察, 确定油基微乳的吸收转运通路, 并且对淋巴和非淋巴吸收转运进行定量研究。

## 材料与方法

**仪器** LC-20ABHPLC 色谱仪 (日本岛津公司); LDB-M 电子恒流泵 (浙江定山仪器厂); LSM-510 激光共聚焦显微镜 (德国 ZEISS); LEICA CM1900 冷冻切片机 (德国 LEICA)。

**药品与试剂** 葛根素对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 99.5%, 批号 0752-200509); 葛根素原料药 (批号 060422, 含量 98%, 南京苏朗医药科技开发有限公司); O/O 型葛根素微乳 (自制<sup>[5]</sup>)。

**实验动物** 健康 SD 大鼠, 体重 (250 ± 5) g, 雌雄不限 (安徽医科大学动物饲养中心提供)。

**肠循环液中药物浓度的测定** 采用 HPLC 法, 色谱条件: Shim-pack VP-ODS column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.1% 枸橼酸水溶液 (25 : 75), 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 250 nm, 柱温 40 °C, 进样量 20 μL。在色谱条件下, 空白肠回流液对葛根素的含量测定无干扰, 见图 1。

以流动相溶解葛根素对照品配制系列浓度的对照品溶液, 作标准曲线。在 5.29~132.25 μg·mL<sup>-1</sup> 内, 葛根素的峰面积 (*A*) 与浓度 (*C*) 之间线性关系良好, 标准曲线方程为:  $A = 1.17E + 0.8C - 54\ 362$  ( $r = 0.999\ 5$ )。低、中、高 (5.29、52.9、132.25 μg·mL<sup>-1</sup>) 3 种不同浓度溶液的平均回收率分别为 104.8%, 102.1%, 99.3%, RSD% 分别为 2.3%、0.8%、0.4%。日内 RSD% 分别为 0.8%、0.5%、0.3%。日间 RSD% 分别为 1.2%、0.9%、0.3%。

**药物分段肠吸收** 精密称取高、中、低浓度的 O/O 型葛根素微乳适量, 加入 Lock's 缓冲液 60 g 和胆酸钠 0.9 g, 充分搅拌使其乳化后成为 19.2、12.8 和 4.1 mg·g<sup>-1</sup> 的供试液, 各取 30 g (临用前配制)。采用大鼠在体肠回流实验方法, 取自然饮水条件下禁食 12 h 的健康 SD 大鼠, 腹腔注射乌拉坦 1.2 g·kg<sup>-1</sup> 麻醉, 固定于恒温板上, 保持体温 (37 ± 1) °C, 沿腹中线打

开腹腔结扎胆管。按文献[6]方法取各小肠段进行插管接蠕动泵。用 37 °C 生理盐水冲洗肠内容物, 再用空气将生理盐水排净。取预热至 (37 ± 0.5) °C 的供试液快速注入肠段直至充满。以 1 mL·min<sup>-1</sup> 的流速灌流平衡 30 min 后, 收集流出液并开始计时, 每隔 30 min 收集 1 次流出液并称重, 总共收集约 6 h。实验结束后, 先用空气排空肠段, 再测量肠段的长度 (*L*) 与内径 (*R*), 以计算灌流肠段的体积 (*V*) 与灌流肠段的表面积 (*A*)。取各时间点的肠循环液 0.2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入流动相适量, 超声 30 min, 冷至室温, 加入流动相稀释至刻度, 摇匀, 静置 10 min, 过滤, 取滤液用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 即得供试品溶液。供试品溶液按 HPLC 法测定葛根素的含量, 按重量法计算葛根素吸收速率常数 (*K<sub>a</sub>*) 与肠段有效渗透系数 (*P<sub>app</sub>*)<sup>[7]</sup>。

**药物在肠循环液中稳定性考察** 取一定量的 Lock's 缓冲液, 经大鼠全小肠插管回流 4 h, 用回流液配制 3 份药液 (0.1、0.25、0.4 mg·mL<sup>-1</sup>), 置于 (37 ± 0.5) °C 水浴中孵育 2 h, 测定孵育前后药物浓度。葛根素在循环液中的浓度没有明显变化, 浓度为 0 时的 (99.85 ± 0.23) % ( $n = 4$ )。可以认为葛根素在空白肠循环液中很稳定。

**血样中药物浓度的测定** 采用 HPLC 法, 色谱条件: Shim-pack VP-ODS column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-0.1% 枸橼酸水溶液 (30 : 70), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 250 nm, 柱温 40 °C, 进样量 30 μL。

精密量取大鼠空白血浆 100 μL, 加入系列浓度的葛根素标准品溶液 100 μL, 于漩涡混合器上混合 3 min, 加入 5% 高氯酸甲醇溶液 100 μL, 于漩涡混合器上混合 3 min 沉淀蛋白, 然后 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液 30 μL, 按 HPLC 法测定葛根素的峰面积。在此色谱条件下, 空白血浆对葛根素的含量测定无干扰 (图 2)。以葛根素的浓度 (*C*) 对峰面积 (*A*) 进行回归, 得回归方程:  $C = 0.008\ 3A - 0.191\ 8$  ( $r = 0.999\ 7$ ) 在 0.052 1~66.666 7 μg·mL<sup>-1</sup> 内线性关系良好。低、中、高 (0.052 1、6.666 7、66.666 7 μg·mL<sup>-1</sup>) 3 种不同浓度溶液的平均回收率分别为 96.5%、95.0%、98.1%。RSD% 分别为 5.28%、4.88%、3.61%。日内 RSD% 分别为 4.52%、4.12%、5.31%。日间 RSD% 分别为 4.97%、4.04%、6.18%。

**药物转运通路实验** 哺乳动物含两条总淋巴管, 分别为胸导管和右淋巴导管。其中由胃肠道肠淋巴吸

收转运的组分, 主要由乳糜池再经胸导管汇入左侧锁骨下静脉而进入血液循环。因此, 可以采用结扎胸导管并使淋巴液外流, 阻断淋巴液在体内的循环, 考察大鼠灌胃葛根素微乳后经淋巴转运情况及体内药物的浓度经时变化, 初步阐明 O/O 型微乳经胃肠道的生物转运效率、主要转运途径和体内浓度经时变化规律, 为微乳的进一步设计和改进提供理论依据。

SD 大鼠 12 只, 实验前禁食 12 h。实验组随机分成两组, 一组为淋巴阻断组: 手术前 20 min 皮下注射阿托品  $0.03 \sim 0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、肝素  $700 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 使其全身肝素化。腹腔注射氯胺酮  $4 \sim 6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  浅麻, 将大鼠固定于解剖台上, 按文献 [8] 方法进行手术, 分离出胸导管, 并用 4~0 号手术线近心端结扎胸导管 (尽量靠近隔脚), 然后用针头刺破乳糜池, 阻断淋巴液在体内的循环并使淋巴液外流; 另一组为淋巴未阻断组: 手术同上, 但不结扎胸导管, 使淋巴液经过体循环。

按照葛根素  $0.6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  的剂量对两组大鼠灌胃葛根素微乳, 于给药后 1、2、3、4、5、6、8 h 眼眶取血, 置于肝素化 EP 管中, 静置后  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 精密量取血浆  $100 \mu\text{L}$  置 EP 管中, 加入 5% 高氯酸甲醇溶液  $100 \mu\text{L}$ , 涡旋混合 3 min 沉淀蛋白后  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清液  $30 \mu\text{L}$  按 HPLC 法测定葛根素的峰面积。以葛根素的大豆油混悬液为对照组。

**数据处理** 根据标准曲线计算出不同时间的血药浓度, 得出数据以 Excel 作出散点图。采用中国药理学学会数学药理学专业委员会编写的药物动力学计算程序 3P97 对血药浓度-时间数据进行处理。求出给药组平均血药浓度, 以 AIC 法选择房室模型和权重, 在以 3P97 软件对血药浓度-时间数据进行处理, 得出药动学参数。

#### 大鼠小肠 PP 与非 PP 荧光切片实验 大鼠空腹

24 h, 灌胃给予荧光标记的葛根素微乳后, 于 6 h 后处死, 分别取出含 PP 回肠段和非 PP 回肠段约 1 cm, 迅速用冰生理盐水冲洗肠段表面, 冷冻切片机切片且制片, 于激光共聚焦显微镜下观察不同肠段的吸收差异。

**统计学方法** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间以  $t$  检验比较差异显著性。

## 结果

### 1 大鼠在体肠实验

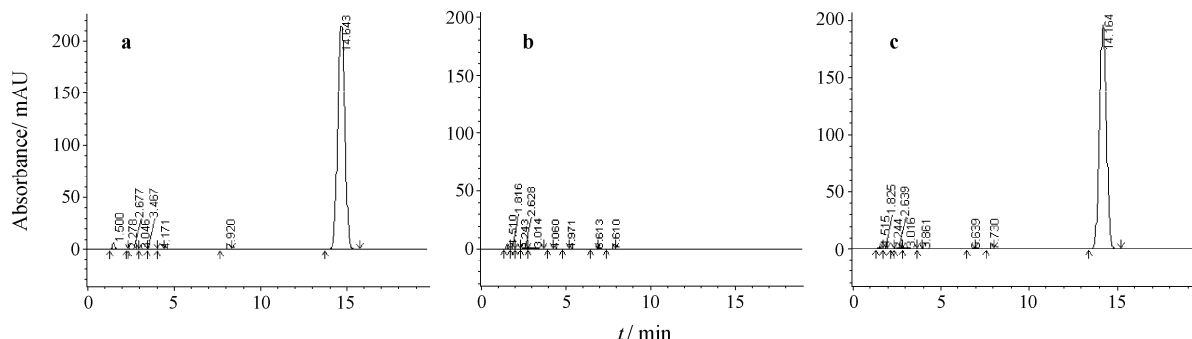
**1.1 肠灌流液中药物浓度的测定** 由图 1 可见, 葛根素峰分离良好, 空白肠灌流液中的物质对药物的测定无干扰。

**1.2 不同药物浓度在大鼠各肠段的吸收情况** 葛根素微乳在整个肠段都有吸收, 在结肠的吸收最慢, 显著低于十二指肠 ( $P < 0.05$ )、回肠 ( $P < 0.05$ ) 和空肠 ( $P < 0.05$ ); 在回肠的吸收最快, 与其他肠段均有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。不同浓度的吸收参数差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 说明吸收机制为被动扩散。吸收参数见表 1。

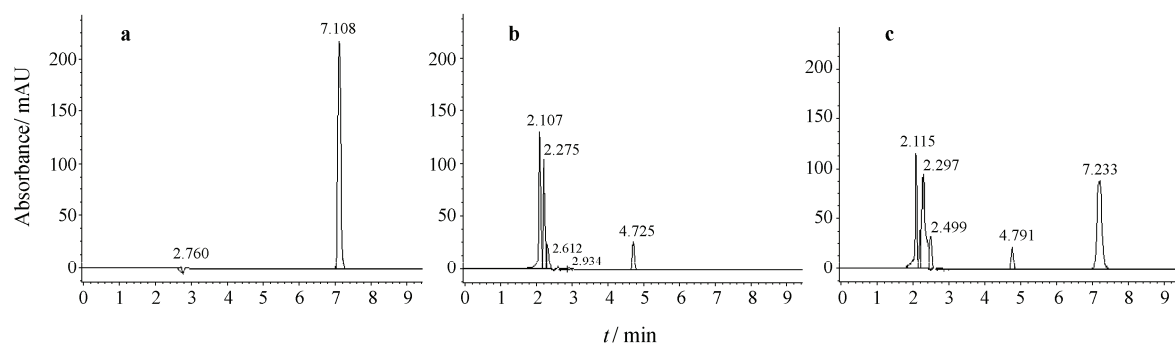
### 2 药物转运通路

**2.1 血样中药物浓度的测定** 由图 2 可见, 葛根素色谱峰约在 7.2 min 处出现, 结果显示空白血浆中的成分对葛根素色谱峰无干扰。

**2.2 淋巴转运与非淋巴转运结果** 一方面药物的转运主要经肠上皮细胞转运入门静脉经肝脏代谢后进入体循环; 另一方面脂肪类和乳剂等物质可通过肠系膜上的淋巴集结摄取进入毛细淋巴管并汇入胸导管, 经颈内静脉进入体循环。一旦将胸导管结扎并使淋巴液外流, 意味着淋巴循环被阻断, 经淋巴转运吸收的物质无法再进入。图 3 为淋巴循环阻断和未阻断条件下, 大鼠灌胃葛根素微乳后葛根素在血液中浓度经时变化曲线。由图可见, 在灌胃后 1~6 h, 淋巴循环



**Figure 1** HPLC chromatograms of puerarin in rat intestinal perfusions of puerarin microemulsion. a: Puerarin solution; b: Blank intestine juice; c: Perfusion sample of puerarin microemulsion



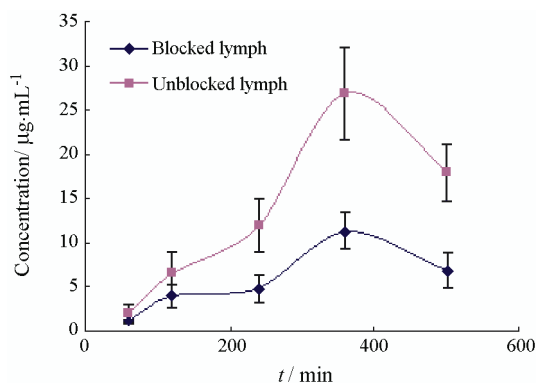
**Figure 2** HPLC chromatograms of puerarin solution. a: Puerarin solution; b: Blank plasma; c: Plasma sample with puerarin

**Table 1** The  $K_a$  and  $P_{app}$  of different concentrations puerarin microemulsion at various intestinal segments in rats ( $n=5$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

| Intestine | Concentration | $K_a/h^{-1}$        | $P_{app}/cm \cdot h^{-1}$ |
|-----------|---------------|---------------------|---------------------------|
| Duodenum  | High          | $0.0412 \pm 0.0153$ | $0.826 \pm 0.258$         |
|           | Middle        | $0.0408 \pm 0.0073$ | $0.809 \pm 0.196$         |
|           | Low           | $0.0389 \pm 0.0059$ | $0.779 \pm 0.159$         |
| Jejunum   | High          | $0.0214 \pm 0.0095$ | $0.431 \pm 0.186$         |
|           | Middle        | $0.0201 \pm 0.0082$ | $0.409 \pm 0.201$         |
|           | Low           | $0.0193 \pm 0.0052$ | $0.393 \pm 0.134$         |
| Ileum     | High          | $0.0512 \pm 0.0105$ | $1.318 \pm 0.397$         |
|           | Middle        | $0.0501 \pm 0.0059$ | $1.277 \pm 0.377$         |
|           | Low           | $0.0498 \pm 0.0092$ | $1.063 \pm 0.154$         |
| Colon     | High          | $0.0042 \pm 0.0012$ | $0.093 \pm 0.029$         |
|           | Middle        | $0.0034 \pm 0.0025$ | $0.074 \pm 0.035$         |
|           | Low           | $0.0031 \pm 0.0009$ | $0.072 \pm 0.016$         |

**Table 2** AUC in blood after administration blocked and unblocked lymph

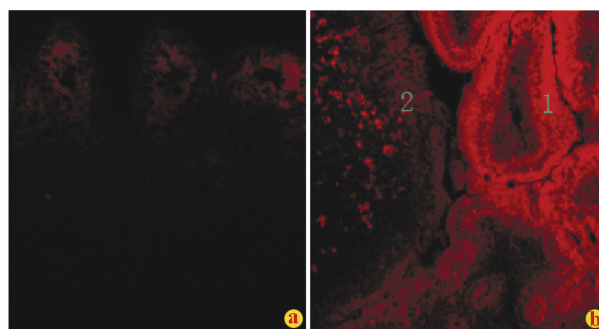
| Group      | AUC/ $\mu g \cdot mL^{-1} \cdot h$ |                 |
|------------|------------------------------------|-----------------|
|            | Blocked lymph                      | Unblocked lymph |
| Control    | 34.01                              | 43.32           |
| Experiment | 46.21                              | 73.07           |



**Figure 3** Concentration of puerarin in blood after administration blocked and unblocked lymph

阻断组大鼠的血药浓度明显低于未阻断组大鼠的血药浓度。淋巴阻断组与淋巴未阻断组葛根素在大鼠血液中浓度变化曲线的 AUC 计算结果见表 2。

AUC 比值可以计算通过淋巴转运和非淋巴途径吸收的葛根素的比例。灌胃给予葛根素微乳的大鼠, 在经胃肠道生物转运的葛根素中约有 36.8% 经淋巴途径进入体循环, 而 63.2% 经非淋巴途径吸收。灌胃给予葛根素大豆油混悬剂的大鼠, 在经胃肠道生物转运的葛根素中约有 21.5% 经淋巴途径进入体循环, 而



**Figure 4** Inverted fluorescent microscope photographs of different samples from SD rats. a: Blank intestine cryostat section; b: Intestine cryostat section after administration microemulsion with fluorescence labeling (1: Glandular organ, 2: Peyer's patch)

78.5% 经非淋巴途径吸收。

**2.3 大鼠小肠 PP 与非 PP 荧光切片结果** 回肠内有大量的 PP, 荧光标记的葛根素油基微乳给予大鼠灌胃, 显微观察小肠的 PP 与正常组织, 发现 PP 与正常组织均有荧光, 说明油基微乳在小肠的正常组织和 PP 均有吸收 (图 4)。

## 讨论

实验中直接用 O/O 型葛根素微乳进行大鼠肠灌流, 4 h 内其药物浓度变化较小, 但将 O/O 型葛根素微乳中加入胆酸盐和 Lock's 缓冲液模拟胆汁, 搅拌使其充分乳化, 再进行大鼠肠灌流实验。结果表明, 葛根素微乳的乳化后小肠吸收较好。提示这种新型的 O/O 型微乳的体内吸收情况不同于传统微乳剂型, 其由胃肠道吸收必须经过胃肠蠕动及胆汁

乳化的过程, 该类型微乳可能是先乳化乳滴, 再经胆酸盐的介导, 这也是微乳具有缓释作用的原因之一。

本文采用单向灌流对葛根素的肠吸收进行了研究, 由于肠道吸收水分会导致灌流液体积随时间变化, 因此大多用酚红标示灌流液体积的变化<sup>[9]</sup>。本实验亦用酚红标记水分的变化, 结果表明酚红被肠吸收, 与文献报道一致 (平均吸收率为  $6\% \cdot h^{-1}$ )<sup>[10]</sup>。因此本文采用重量分析法。用预先称重的具塞塑料管收集一段时间的灌流液, 实验结束后称重, 通过计算重量差对灌流液的浓度进行校正, 计算  $K_a$  和  $P_{app}$ , 代替酚红法以减小实验误差。

文献<sup>[11, 12]</sup>报道的有关葛根素微乳的在体肠吸收实验均是 O/W 型, 最佳吸收部位为结肠<sup>[11]</sup>。而有关 W/O 型葛根素微乳的在体肠吸收尚未见报道, W/O 型其他药物的微乳在体肠吸收实验<sup>[13]</sup>结果表明在回肠吸收最好, 这与本实验结果相似。

O/O 型葛根素微乳可能通过毛细血管扩散、细胞间隙扩散或其他方式进入体内。O/O 型葛根素微乳相对于葛根素大豆油混悬剂的吸收高 68.7%, 原因是微乳较之油混悬剂大大增加了经淋巴途径的吸收。这提示 O/O 型微乳可以提高难溶性药物生物利用度的原因, 可能与该微乳提高了药物经淋巴途径的吸收量有关。

## References

- [1] Huang CY, Zhou JP, Yao J, et al. Studies on the oral bioavailability of the microemulsion and self-microemulsion of nimodipine in rabbits [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2004, 35: 409–412.
- [2] Yuan Q, Li XR, Wang HJ, et al. The absorption kinetics of silymarin microemulsion in rat intestine [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2004, 39: 631–634.
- [3] Khoo SM, Shackelford DM, Porter CJH, et al. Intestinal lymphatic transport of halofantrine occurs after oral administration of a unit-dose lipid-based formulation to fasted dogs [J]. Pharm Res, 2003, 20: 1460–1465.
- [4] Li Y, Pan WS, Chen SL, et al. Comparison of pharmacokinetics between puerarin and its phospholipid complex in Beagle dogs *in vivo* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2006, 37: 695–697.
- [5] Wu HF, Lu CH, Zhou A, et al. Enhanced oral bioavailability of puerarin using microemulsion vehicle [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2008, 35: 138–142.
- [6] Wu YN, Luan LB. *In situ* single pass perfusion intestinal absorption of the effective components in Radix Angelicae Pubescentis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 102–107.
- [7] Nie SF, Pan WS, Li W, et al. Study on *in situ* intestinal absorption of vinpocetine in rats [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2005, 36: 625–628.
- [8] Feng YQ, Wang DC, Wang K, et al. Establishment of a lymphatic fistula model in the rat [J]. Chin J Anat (解剖学杂志), 2007, 30: 378–380.
- [9] Koizumi T, Arita T, Kakeml K. Absorption and excretion of drugs: some pharmacokinetic aspects of absorption and excretion from rat small intestine [J]. Chem Pharm Bull, 1964, 12: 421–427.
- [10] Hu YQ, Zheng LY. Absorption of phenol red from rat intestine [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 1996, 27: 355–359.
- [11] Yu AH, Zhai GX, Gao FL, et al. Studies on absorption kinetics of puerarin microemulsion in rat intestine [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2007, 42: 692–695.
- [12] Yi HS, Yang J. Preparation and intestinal absorption effect of puerarin microemulsion in rats [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2007, 9: 1822–1824.
- [13] Li WH, He Y. Preparation and intestinal absorption effect of 5-fluorouracil microemulsion in rats [J]. J China Pharm (中国药房), 2008, 19: 501–503.