

· 工艺与制剂 ·

卡波姆对淫羊藿总黄酮酶解效果的影响

王莹^{1,2}, 高霞², 陈彦^{2*}, 周静²

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏省中医药研究院中药
新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 南京 210028)

[摘要] 目的: 考察生物黏附剂卡波姆对淫羊藿总黄酮酶解效果的影响。方法: 将淫羊藿总黄酮与卡波姆混合, 加入蜗牛酶酶解, 采用 HPLC 测定酶解液中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷等主要黄酮成分及箭藿苷 A、箭藿苷 B、鼠李糖基淫羊藿次苷 II、宝藿苷 I 和淫羊藿苷元等主要酶解产物的含量变化, 并与未加入卡波姆时淫羊藿总黄酮的酶解过程比较。结果: 在 37 ℃, 含 1% 卡波姆的缓冲溶液中, 淫羊藿总黄酮中朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 和淫羊藿苷的酶解速率变慢, 约需 4 h 才能完全酶解转化成次级苷, 所需时间为无卡波姆时的 2 倍; 酶解液中宝藿苷 I 质量浓度始终高于未加卡波姆时的, 最高量 48.43 mg·L⁻¹, 6 h 时趋于稳定时 12.99 mg·L⁻¹, 最高量和稳定量分别为未加卡波姆酶解时的 2.2、7.2 倍; 2~6 h 内箭藿苷 A 和鼠李糖基淫羊藿次苷 II 质量浓度都略高于未加卡波姆时的; 之后次级苷被继续水解生成苷元, 且苷元生成速率基本相同, 约 7.60 mg·L⁻¹·h⁻¹。结论: 卡波姆会减缓淫羊藿总黄酮的酶解速率, 促进次级苷的生成, 对苷元的生成基本无影响。

[关键词] 淫羊藿总黄酮; 蜗牛酶; 酶解过程; 卡波姆; 生物黏附剂
[中图分类号] R283.6; R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0001-05
[doi] 10.13422/j.cnki.syfix.2014090001
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfix.000043.html>
[网络出版时间] 2014-02-25 11:21

Effect of Carbomer on Enzymolysis of Total Flavonoids from Epimedii Folium

WANG Ying^{1,2}, GAO Xia², CHEN Yan^{2*}, ZHOU Jing²

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;
2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Provincial Academy of
Chinese Medicine, Key Laboratory of Drug Release System of Chinese Meteria Medica, State Adiministration of
Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of carbomer on enzymolysis of total flavonoids from Epimedii Folium. **Method:** Total flavonoids from Epimedii Folium and carbomer was mixed, then hydrolyzed by snailase, HPLC was adopted to observe content change of main flavonoids (including epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin and so on) and main hydrolysates (sagittatoside A, sagittatoside B, 2"-O-rhamnosylcariside II, baohuoside I and icaritin in enzymolysis liquid, and compared with enzymatic process (no carbomer) of total flavonoids from Epimedii Folium. **Result:** In a buffer solution (containing 1% carbomer, 37 ℃), hydrolysis rates of epimedin A, epimedin B, epimedin C and icariin were slower, it need about 4 h to completely transformed to secondary glycosides, which was twice in comparison with absense of carbomer; The content of baohuoside I was always higher and contents of sagittatoside A and 2"-O-rhamnosylcariside II was also higher

[收稿日期] 20130819(008)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173557); 江苏省中医药领军人才项目(LJ200913); 江苏省“333 人才培养工程”项目(BRA2011219)
[第一作者] 王莹, 在读硕士, 从事药剂学研究, Tel:18013966856, E-mail:wangying9021@163.com
[通讯作者] * 陈彦, 研究员, 硕士生导师, 从事中药新型给药系统及生物药剂学研究, Tel:025-85608672, E-mail:ychen202@hotmail.com

during 2-6 h than absense of carbomer. The highest content of baohuoside I was $48.43\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and the final stable content was $12.99\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, which were 2.2 and 7.2 times as many as absense of carbomer, respectively. Afterwards, secondary glycosides could continue to be hydrolyzed to aglycone, their production rates were almost the same, which were about $7.60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. **Conclusion:** Carbomer could slow down enzymolysis rates of total flavonoids from *Epimedii Folium*, promote production of secondary glycosides, but had no effect on production of aglycone.

[**Key words**] total flavonoids from *Epimedii Folium*; snailase; enzymatic process; carbomer; bioadhesive agent

淫羊藿功能补肾阳、强筋骨、祛风湿等^[1],具有很好的抗骨质疏松活性^[2-3]。淫羊藿含有多种黄酮类成分,其中 8-异戊烯基取代黄酮苷为主要代表活性黄酮,包括朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷和宝藿苷等^[4]。淫羊藿总黄酮虽具有较好的抗骨质疏松作用^[5],但口服后需要经肠道内水解酶(肠道黏膜酶和肠道菌酶)转化为淫羊藿次级苷或苷元才能被很好地吸收并发挥药效^[6-7];但由于人体肠道内水解酶会因年龄、人种、药物和饮食等因素的影响而不同^[8-10],故很难确保口服淫羊藿总黄酮后,能够稳定快速地被水解吸收并保持良好的抗骨质疏松作用。拟构建外加水解酶、药物和功能辅料三位一体的适合于淫羊藿总黄酮在肠道内“实时酶解”和“实时吸收”的仿生酶解给药系统,在该口服系统中将应用肠道生物黏附材料等功能辅料以促进淫羊藿总黄酮的肠道黏附与吸收。

卡波姆为常用生物黏附剂,是一种由丙烯酸与烯丙基蔗糖共聚并轻度交联的药用高分子辅料,能在较宽的 pH 范围内保持稳定,且自身宏观黏度较高,具有很强的黏滞作用,可延长药物在肠道吸收位点的滞留时间,提高难溶性药物的口服生物利用度。本实验将探讨卡波姆对淫羊藿总黄酮水解可能产生的影响,为淫羊藿总黄酮仿生酶解给药系统的构建积累数据。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),AL204 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司),THZ-82AHS 型数显气浴恒温振荡器(金坛市双捷实验仪器厂),TG16W 型离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)。

淫羊藿(购自吉林敦化,经南京中医药大学吴德康教授鉴定为小檗科植物朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 的干燥叶),淫羊藿苷元对照品(南京泽朗医药有限公司,纯度 > 99%,批号 ZL130506),朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿

苷和宝藿苷 I 对照品(上海源叶生物科技有限公司,纯度均 > 98%,批号分别为 20120401,20120131,20120118,20110206,20120222),蜗牛酶(上海源叶生物科技有限公司),卡波姆(北京宝世迪科技有限公司),水为高纯水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄酮类成分及其相应酶解产物的含量测定

2.1.1 色谱条件 Zorbax SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0 ~ 15 min, 10% ~ 25% A; 15 ~ 38 min, 25% A; 38 ~ 61 min, 25% ~ 71% A; 61 ~ 75 min, 71% ~ 100% A),检测波长 270 nm,柱温 30 ℃,流速 1 mL·min⁻¹。

2.1.2 对照品溶液的制备 依次精密称取朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、淫羊藿苷元及宝藿苷 I 对照品 8.42, 9.05, 8.26, 5.33, 7.50, 5.26 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中,加无水乙醇溶解稀释至刻度,作为储备液。

2.1.3 标准曲线的绘制 精密量取朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷、淫羊藿苷元和宝藿苷 I 储备液适量,加无水乙醇稀释成不同质量浓度的对照品溶液,精密吸取各对照品溶液 10 μL 进样,以质量浓度为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,得 6 种成分的回归方程依次为 $Y = 17.443X + 23.584$ ($r = 0.9996$), $Y = 27.196X + 21.610$ ($r = 0.9997$), $Y = 18.415X + 19.589$ ($r = 1.0000$), $Y = 30.459X + 24.061$ ($r = 0.9998$), $Y = 6.895X - 37.550$ ($r = 0.9992$), $Y = 24.718X + 23.400$ ($r = 0.9999$),线性范围依次为 0.026 ~ 1.684, 0.014 ~ 1.810, 0.026 ~ 1.652, 0.017 ~ 1.066, 0.047 ~ 1.500, 0.033 ~ 1.052 μg。

2.2 淫羊藿总黄酮的制备 称取淫羊藿 300 g,加 15 倍量 50% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,过滤,合并滤液^[11],减压浓缩至 1 L,即得 $0.3\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的淫羊藿总黄酮提取液。

2.3 卡波姆对淫羊藿总黄酮酶解效果的影响 精

密度取 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 淫羊藿总黄酮提取液 $400 \mu\text{L}$, 加入 pH 6.0 的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 10 mL 使溶解, 加入卡波姆 200 mg , 加 4% 氢氧化钠溶液调节 pH 6.0, 放入 37°C 恒温振荡器中保温溶胀; 精密称取蜗牛酶 10 mg , 加 HBSS (pH 6.0) 10 mL 使溶解; 将蜗牛酶溶液加至等量的淫羊藿总黄酮提取液中, 置于 37°C 恒温振荡器中反应。另取 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 淫羊藿总黄酮提取液 $400 \mu\text{L}$, 加入 HBSS (pH 6.0) 10 mL 使溶解, 放入 37°C 恒温振荡器中保温; 精密称取蜗牛酶 10 mg , 加 HBSS (pH 6.0) 10 mL 使溶解; 将蜗牛酶溶液加至等量的淫羊藿总黄酮提取液中, 于 37°C 恒温振荡器中反应。分别于 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6 h 时取上述 2 种酶解液各 $150 \mu\text{L}$, 立即无水乙醇加入 $300 \mu\text{L}$ 终止反应, 涡旋 3 min, 离心 ($13\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 按 2.1.1 项下色谱条件测定 ($n=3$), 比较朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、淫羊藿苷及酶解产物箭藿苷 A、箭藿苷 B、鼠李糖基淫羊藿次苷 II、宝藿苷 I 和淫羊藿苷元的含量变化, 结果见图 1~3。

由图 1 可知, 淫羊藿总黄酮与蜗牛酶不加卡波姆反应时, 淫羊藿苷和朝藿定 B 在 1 h 左右基本酶解完全, 朝藿定 A 和朝藿定 C 在 2 h 左右基本酶解完全; 加入卡波姆后, 淫羊藿苷、朝藿定 A 和朝藿定 B 在 4 h 时基本酶解完全, 朝藿定 C 在 3 h 基本酶解完全, 且四者的初始质量浓度均略低。结果表明加入 1% 卡波姆可使淫羊藿总黄酮酶解的速率明显变慢, 因为卡波姆自身宏观黏度较高, 具有很强的黏滞作用; 另外卡波姆可延长药物与肠壁接触时间, 所以在肠道排空时间 ($3 \sim 6 \text{ h}$) 内, 加或不加卡波姆, 蜗牛酶均能将淫羊藿总黄酮酶解完全。说明卡波姆会减缓淫羊藿总黄酮中原型黄酮苷的酶解速率, 但在肠道排空时间内对淫羊藿总黄酮酶解的影响不大。

由图 2 可知, 酶解液中宝藿苷 I 含量主要由两方面决定: 一是淫羊藿苷水解生成宝藿苷 I, 二是宝藿苷 I 酶解生成淫羊藿苷元。未加卡波姆时, 宝藿苷 I 质量浓度在 1 h 时达到最高值 $21.87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 之后逐渐下降, 6 h 时仅 $1.81 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 转化了 92%, 说明 $0 \sim 1 \text{ h}$ 时宝藿苷 I 的生成速率大于酶解速率, 综合生成速率 $12.16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $1 \sim 4 \text{ h}$ 时宝藿苷 I 的生成速率小于酶解速率, 综合酶解速率 $5.84 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。加入 1% 卡波姆时, 宝藿苷 I 质量浓度在 2 h 时达到最高值 $48.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 之后逐渐下降, 6 h 时趋于稳定 ($12.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 转化了 72%, $0 \sim 2 \text{ h}$ 时宝藿苷

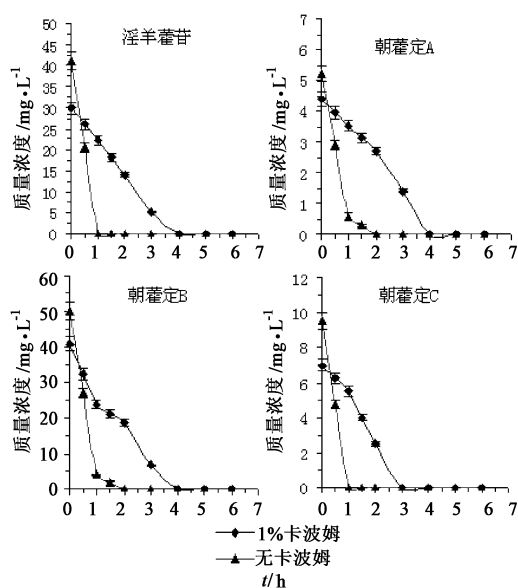


图1 生物黏附剂卡波姆对淫羊藿苷与朝藿定 A、B、C 酶解效果的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

I 的综合生成速率 $18.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $2 \sim 5 \text{ h}$ 时宝藿苷 I 的综合酶解速率 $10.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结果表明加入 1% 卡波姆后宝藿苷 I 的综合生成速率和水解速率均变快, 分别为未加卡波姆酶解时的 1.5, 1.8 倍, 酶解液中宝藿苷 I 的最高量和 6 h 时宝藿苷 I 的趋于稳定量分别为未加卡波姆酶解时的 2.2, 7.2 倍, 故加入卡波姆有利于提高酶解液中次级苷宝藿苷 I 的含量。

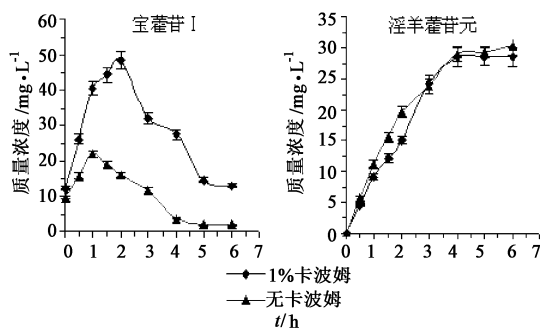


图2 生物黏附剂卡波姆对酶解产物宝藿苷 I 和淫羊藿苷元含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

淫羊藿苷元为淫羊藿总黄酮水解掉所有的糖基得到的终产物。加入 1% 卡波姆与未加卡波姆时酶解比较, 淫羊藿苷元质量浓度都随酶解时间不断增加, $0 \sim 4 \text{ h}$ 基本均成线性增加, 且生成速率基本相同, 约 $7.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 最终趋于稳定的质量浓度也相差不大, 说明生物黏附剂对淫羊藿苷元的生成影响不大。

由图 3 可知,箭藿苷 A、箭藿苷 B 和鼠李糖基淫羊藿次苷 II 分别为朝藿定 A、朝藿定 B 和朝藿定 C 水解掉 C-7 位上的葡萄糖生成的次级苷^[12]。因为箭藿苷 A、箭藿苷 B 和鼠李糖基淫羊藿次苷 II 的单体成分较难获得,故采用峰面积的大小来比较它们在酶解过程中的含量变化。不加卡波姆时,三者在酶解液中质量浓度在 1 h 左右达最大值,之后逐渐下降,说明它们会继续水解为其他物质,于 6 h 时箭藿苷 A 转化了 21%,鼠李糖基淫羊藿次苷 II 转化了

20%,而箭藿苷 B 基本不再水解。加入 1% 卡波姆时,箭藿苷 B、鼠李糖基淫羊藿次苷 II 质量浓度在 3 h 左右达最高值,箭藿苷 A 在 4 h 左右达最高值。结果表明加入 1% 卡波姆后箭藿苷 A、箭藿苷 B 和鼠李糖基淫羊藿次苷 II 的生成速率略微变慢,2~6 h 内箭藿苷 A 和鼠李糖基淫羊藿次苷 II 质量浓度都略高于未加卡波姆时的,箭藿苷 B 含量相差不大,说明卡波姆有利于次级苷的生成,但会降低箭藿苷 A、箭藿苷 B 和鼠李糖基淫羊藿次苷 II 的生成速率。

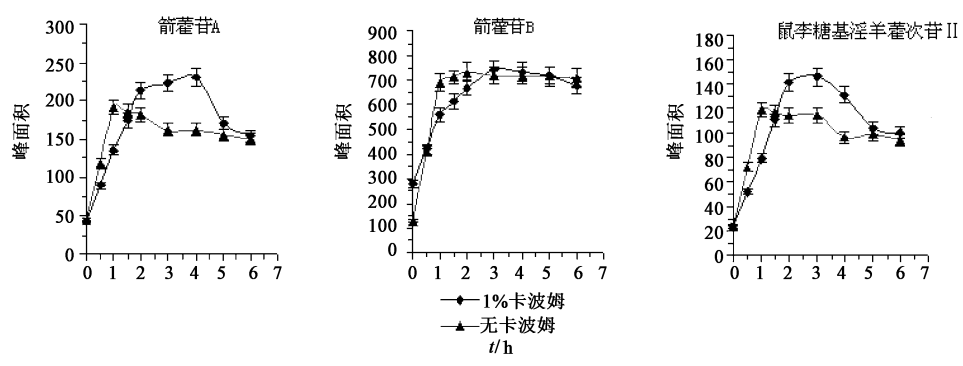


图 3 生物黏附剂卡波姆对酶解产物箭藿苷 A、箭藿苷 B、鼠李糖基淫羊藿次苷 II 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

本实验提出了构建外加水解酶、药物、功能辅料三位一体的适宜于淫羊藿总黄酮肠道内实时酶解、实时吸收的口服给药系统,以外源性酶仿生模拟淫羊藿总黄酮体内水解过程,使其在肠道中酶解迅速完全,并在小肠规则吸收,克服个体差异,进而提高其抗骨质疏松疗效。为提高淫羊藿总黄酮生物利用度,可添加生物黏附剂辅料,增加其与肠道接触时间,但建议考虑生物黏附剂对淫羊藿总黄酮酶解的影响,为淫羊藿总黄酮仿生酶解口服给药系统构建的可行性积累实验数据。

加入 1% 卡波姆时,淫羊藿总黄酮中主要原型黄酮类成分在 4 h 内都能完全被酶解,酶解速率变慢,但在肠道排空时间内对淫羊藿总黄酮影响不大;2~6 h 间,箭藿苷 A、鼠李糖基淫羊藿次苷 II 质量浓度均略高,但生成速率略微变慢;酶解产物宝藿苷 I 的生成速率变快,且酶解液中质量浓度始终高于未加卡波姆时的,说明生物黏附剂会减缓淫羊藿总黄酮的酶解速率,但有利于次级苷的生成,同时对苷元基本无影响。

常用的生物黏附材料包括有卡波姆、壳聚糖及其衍生物、脂肪酸及其盐等,虽然黏附机制不尽相同,但均具有打开小肠上皮的紧密连接,促进药物的肠道渗透等作用^[13]。采用生物黏附技术,选择适宜的具有黏附功能的辅料,可使淫羊藿黄酮苷与酶体系黏附于肠黏膜表面,有利于促进淫羊藿黄酮次级苷及苷元的实时吸收。

[参考文献]

[1] 于俊林,姜启娟,孙仁爽,等. 朝鲜淫羊藿不同部位不同采收期有效成分的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):92.

[2] 翟远坤,葛宝丰,马慧萍,等. 淫羊藿苷促进体外培养大鼠骨髓间充质干细胞的成骨性分化[J]. 中国中药杂志,2010,35(23):3219.

[3] 刘波,张睿,徐彭,等. 淫羊藿对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):178.

[4] 孙娥,贾晓斌,金晓勇,等. 淫羊藿饮片中 5 种主要黄酮类成分的比较[J]. 中国医院药学杂志,2010,30(6):449.

[5] 贾晓斌,兰雪莲,陈彦,等. 淫羊藿黄酮类成分抗骨质疏松作用及其机制研究进展[J]. 中国药房,2010,21(3):269.

[6] 贾晓斌,钱浅,孙娥,等. 淫羊藿黄酮药代动力学研究进展[J]. 中成药,2012,34(11):2193.

[7] 杨乾栩,刘艳秋,王莉,等. 基于模型群体分析的淫羊藿抗骨质疏松活性成分筛选研究[J]. 药学学报,2012,47(9):1205.

天然水蛭素水凝胶的皮肤渗透性能及毒理学考察

韦淑怡,殷国前*,韩志强,潘新元,林博杰
(广西医科大学第一附属医院整形美容外科,南宁 530021)

[摘要] 目的:探讨天然水蛭素凝胶经皮渗透给药的可行性及其对动物皮肤的毒性作用。方法:制备天然水蛭素凝胶,采用改良的 Franz 扩散池进行经皮渗透试验,使用 Markwardt 法检测水蛭素活性。选择健康 Wistar 大鼠进行急性皮肤毒性试验、单次及多次给药皮肤刺激性试验,健康豚鼠进行皮肤致敏性试验。结果:试验组的纤维蛋白原凝结时间均有延迟($P < 0.05$),于 3 h 时达最大值(85.4 ± 1.454)s,而对照组纤维蛋白原凝结时间则无明显延迟;短期内大剂量使用天然水蛭素凝胶对皮肤无毒性,对 Wistar 大鼠完整皮肤和破损皮肤均无刺激性,对豚鼠完整皮肤无致敏性。结论:天然水蛭素可渗透进入完整皮肤组织,其凝胶剂皮肤局部用药对试验动物较为安全。

[关键词] 天然水蛭素;皮肤渗透试验;皮肤刺激性试验;皮肤致敏性试验

[中图分类号] R283.6;R945 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)09-0005-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014090005

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000066.html>

[网络出版时间] 2014-02-25 13:48

Research of Skin Penetration Properties and Toxicology
of Natural Hirudin Hydrogels

WEI Shu-yi, YIN Guo-qian*, HAN Zhi-qiang, PAN Xin-yuan, LIN Bo-jie
(The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss feasibility of permeation percutaneous administration of natural hirudin hydrogels and its toxic action on animal skin. **Method:** Natural hirudin hydrogels was prepared, improved Franz diffusion cells was adopted to make a permeability test, activity of natural hirudin was determined by Markwardt. Health Wistar rats were adopted to take an acute position skin test and single or multiple dose skin irritation test,

[收稿日期] 20130829(010)

[基金项目] 广西壮族自治区卫生厅重点科研项目(2011101)

[第一作者] 韦淑怡,在读硕士,从事天然水蛭素研究,Tel:18277187785,E-mail:pp99.student@qq.com

[通讯作者] *殷国前,博士生导师,主任医师,Tel:13807817282,E-mail:yingq61@163.com

[8] Yatsunenko T,Rey F E,Manary M J,et al. Human gut microbiome viewed across age and geography [J]. Nature,2012,486(7402):222.

[9] Wang Y X,Harvey C B,Hollox E J,et al. The genetically programmed down-regulation of lactase in children[J]. Gastroenterology,1998,114(6):1230.

[10] Bacsi K,Kosa J P,Balla B,et al. The decreased activity of lactase phlorizin hydrolase and bone mineral density in postmenopausal women[C]. J Bone Miner Res,2007, 22(S1):S186.

[11] 蒋艳荣,张振海,孙娥,等. 淫羊藿黄酮类成分抗骨质疏松作用及其机制研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(4):260.

[12] 陈彦,贾晓斌,谭晓斌,等. 大鼠在体肠灌流模型研究淫羊藿不同黄酮苷的吸收代谢[J]. 中国中药杂志, 2009,34(22):2928.

[13] 金朝晖,徐珽,马音,等. 口服吸收促进剂研究进展概述[J]. 华西医学,2008,23(4):940.

[责任编辑 刘德文]