

天山花楸叶黄酮类化合物在大鼠小肠的吸收特性

刘怡娟¹, 郁长治², 唐辉^{1*}, 王建成¹

(1. 石河子大学 药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆 石河子 832000;
2. 新疆医科大学 第一附属医院, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的:研究天山花楸叶总黄酮提取物在大鼠肠道的吸收部位及吸收机制。方法:运用在体单向肠灌注模型,采用 HPLC 测定灌流液中 6 种黄酮类成分的含量,检测波长 360 nm,流动相乙腈-0.4% 磷酸梯度洗脱,利用药物吸收速率常数(K_a)和药物表观吸收系数(P_{app})分析天山花楸叶总黄酮提取物的吸收动力学特征。结果:天山花楸叶中 6 种黄酮类化合物在各肠段均有吸收,不同化合物在整个肠段的吸收程度存在差异,同一化合物在整个肠段的吸收无显著性差异。6 种黄酮类化合物质量浓度 20~80 mg·L⁻¹时, K_a 和 P_{app} 无显著性差异,药物吸收不受质量浓度的影响。结论:天山花楸叶黄酮类化合物在大鼠小肠的吸收机制为被动扩散,6 种黄酮类化合物均不易于吸收。

[关键词] 天山花楸; 总黄酮; 肠吸收; 单向肠灌注
[中图分类号] R945;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0016-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110016
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150414.1125.009.html>
[网络出版时间] 2015-04-14 11:25

Intestinal Absorption Characteristic of Flavonoids from *Sorbus tianschanica* Leaves in Rats LIU Yi-juan¹, YU Chang-zhi², TANG Hui^{1*}, WANG Jian-cheng¹ (1. Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resources and Modernization of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. The First Teaching Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate intestinal absorption segments and mechanism of total flavonoids from *Sorbus tianschanica* leaves in rats. **Method:** Single-pass intestinal perfusion model was established in rats. The content of total flavonoids in perfusate was determined by HPLC with detection wavelength at 360 nm and mobile phase of acetonitrile and 0.4% phosphoric acid solution in gradient elution. Absorption rate constant (K_a) and apparent absorption coefficient (P_{app}) were evaluated absorption kinetics of total flavonoids. **Result:** Six kinds of flavonoids from *S. tianschanica* leaves could be absorbed in whole intestinal, extent of absorption existed differences in the entire intestinal among different compounds, no difference in absorption was observed in the same compound. K_a and P_{app} had no significant difference when concentrantions of six kinds of flavonoids was 20-80 mg·L⁻¹. The concentration of flavonoids had no effect on absorption kinetics. **Conclusion:** Absorption mechanism of six kinds of flavonoids from *S. tianschanica* leaves is passive diffusion, they are not easily absorbed in the intestine.

[Key words] *Sorbus tianschanica*; total flavonoids; intestinal absorption; single-pass intestinal perfusion

天山花楸在新疆具有悠久的民间用药历史,其果实和枝叶为药用部位,枝叶中黄酮类化合物的质量分数达 6%~8%^[1-2]。天山花楸具有改善心脏、大脑血液循环,降低外周血管阻力的作用,还能依赖性地抑制心肌收缩和保护心肌缺血等^[3],在机体抗自由基、抗氧化、镇咳平喘方面效果显著^[4-5]。研究表明天山花楸中主要化学成分有黄酮类、甾醇类、三萜类等化合物^[6],其中黄酮类化合物主要为黄酮醇类。小肠是大多数药物的主要吸收部位,预测药物小肠吸收的方法有离体法和在体法,在体法不会损

[收稿日期] 20140905(006)
[基金项目] 国家科技援疆计划项目(2008ZJ14)
[第一作者] 刘怡娟,在读硕士,从事天然药物分析研究,Tel:18040833069,E-mail:1505125715@qq.com
[通讯作者] *唐辉,教授,从事药物分析及新药研究,Tel:0993-2057878,E-mail:th_pha@shzu.edu.cn

坏研究部位的血液循环系及淋巴系统,且能够与人体的小肠药物吸收建立较好的相关性^[7-10],应用广泛。本实验运用大鼠在体肠吸收模型,考察天山花楸叶黄酮类化合物的大鼠小肠吸收情况,探究其吸收机制,为该部位的新剂型设计和口服给药提供理论依据。

1 材料

20AT 型高效液相色谱(日本岛津公司),BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),TGL-16G 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),T01-100 型蠕动泵驱动器(保定兰格恒流泵有限公司)。天山花楸叶采自新疆玛纳斯林场,经石河子大学药学院李鹏副教授鉴定为蔷薇科天山花楸 *Sorbus tianschanica* 的叶子。天山花楸总黄酮提取物(自制,批号 20100524,质量分数 >65%),芦丁、金丝桃苷、紫云英苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 100080-200707,111521-200505,110756-200110),异槲皮苷对照品(上海博蕴生物科技有限公司,批号 21637-25-3),槲皮素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷(1 号化合物)、山柰素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷(2 号化合物)对照品(自制,经 MS,¹H-NMR 和¹³C-NMR 确定结构,HPLC 检测纯度均 >95%),水合氯醛(上海行知化工厂),AB-8 型大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠,雌雄各半,体重(220 ± 50) g,清洁Ⅱ级,由新疆地方病研究所动物中心提供,合格证号 SCXK(新)2011-0001。

2 方法与结果

2.1 黄酮类化合物的制备^[11] 称取一定量天山花楸叶粉末(过 20 目筛),加 60% 乙醇超声循环提取 2 次,每次 0.5 h,浓缩得总黄酮提取液。加入澄清剂沉淀,过滤,过 AB-8 型大孔树脂柱,分别加水和 60% 乙醇洗脱,收集 60% 醇洗液,浓缩,冷冻干燥,得天山花楸叶总黄酮提取物。

2.2 溶液的配制

2.2.1 Krebs-Ringer 试液(K-R 缓冲液)^[12] 称取 NaCl 7.8 g,KCl 0.35 g,CaCl₂ 0.37 g,NaHCO₃ 1.37 g,NaH₂PO₄ 0.32 g,MgCl₂ 0.02 g,葡萄糖 1.4 g,加适量水至 1 L,即得(pH 7.4)。

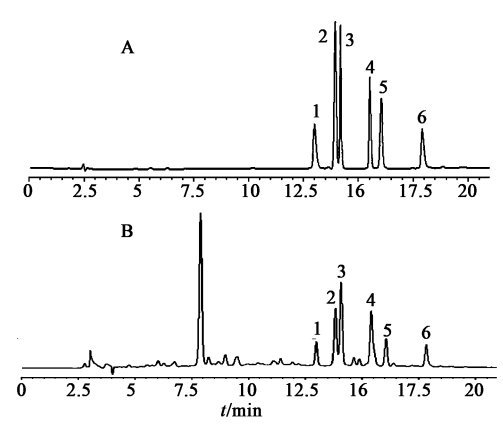
2.2.2 灌流液 精密称取 2.1 项下天山花楸叶总黄酮提取物粉末(过 120 目筛),加 K-R 缓冲液配制总黄酮质量浓度分别为 20,40,80 mg·L⁻¹ 的供试

液,抽滤,取滤液,即得。

2.2.3 供试品溶液 精密称取 2.1 项下天山花楸叶总黄酮提取物 24.8 mg,加甲醇定容至 10 mL,精密量取 3 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容,即得。

2.3 总黄酮的 HPLC 分析^[13]

2.3.1 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),检测波长 360 nm,柱温 25 ℃,流动相乙腈(A)-0.4% 磷酸(B)梯度洗脱(0 ~ 20 min,15% ~ 22% A;20 ~ 30 min,22% ~ 30% A),进样量 20 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹。见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 芦丁;2. 金丝桃苷;3. 异槲皮苷;4. 槲皮素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷;5. 紫云英苷;6. 山柰素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷

图 1 天山花楸叶总黄酮提取物 HPLC
Fig. 1 HPLC chromatogram of total flavonoids extract from *Sorbus tianschanica*

2.3.2 标准曲线的绘制 精密称取经减压干燥至恒重的芦丁、金丝桃苷、异槲皮素苷、紫云英苷和 1 号化合物,2 号化合物适量,加甲醇配成质量浓度分别为 65.9,123.5,245.8,150.7,285.3,312.5 mg·L⁻¹ 的混合对照品储备液。精密吸取不同体积的对照品储备液,用甲醇稀释成系列混合对照品溶液,按 2.3.1 项下条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程依次为 $Y = 150.0X + 69.53$ ($r = 0.9998$), $Y = 208.7X + 46.99$ ($r = 0.9999$), $Y = 155.6X - 53.56$ ($r = 0.9998$), $Y = 111.8X - 43.16$ ($r = 0.9999$), $Y = 112.2X + 58.84$ ($r = 0.9980$), $Y = 61.64X - 16.41$ ($r = 0.9997$),线性范围依次为 3.3 ~ 39.5,6.2 ~ 74.1,12.3 ~ 147.5,7.5 ~ 90.42,14.3 ~ 171.2,15.6 ~ 187.5 mg·L⁻¹。

2.3.3 精密度考察 将同一混合对照品溶液,依 2.3.1 项下条件连续测定 6 次,结果 6 种成分峰面积的日内精密度 RSD 均 <1.2%,日间精密度 RSD 均 <2.0%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 1,2,4,8,16,24 h 按 **2.3.1** 项下色谱条件测定,结果 6 种成分峰面积的 RSD 均 <2.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 精密称取 **2.1** 项下天山花楸叶总黄酮提取物 24.8 mg,共 6 份,按 **2.2.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.3.1** 项下色谱条件测定,结果 6 种成分峰面积的 RSD 均 <2.0%。

2.3.6 加样回收率试验 精密量取各对照品溶液(芦丁、金丝桃苷、异槲皮素苷、紫云英苷和 1 号化合物,2 号化合物质量浓度分别为 73.8,153.6,297.0,199.8,317.3,256.0 mg·L⁻¹)1 mL,加甲醇定容于 10 mL 量瓶中,作为混合对照品溶液。精密称取 **2.1** 项下已知总黄酮含量的天山花楸叶总黄酮提取物粉末 6 份,每份 6.12 mg,各加入混合对照品溶液 1 mL,按 **2.2.3** 项下方法制备供试品溶液,按 **2.3.1** 项下条件测定,计算各化合物的平均回收率均在 94.5%~102.2%,RSD 均 <2.5%。

2.4 大鼠在体肠道单向灌流试验

2.4.1 手术^[14-15] 取禁食过夜(自由饮水)的大鼠,按 40 mg·kg⁻¹ 腹腔注射水合氯醛将其麻醉,固定于手术台上,用红外灯维持体温。沿腹中线打开腹腔,分离待考察肠段(十二指肠、空肠、回肠、结肠),于两端切口插管,结扎,用等渗生理盐水浸渍的纱布覆盖于肠组织表面以保湿,用预热至 37℃ 的生理盐水将各肠段中内容物冲洗干净,取预热至 37℃ 的供试液以 0.5 mL·min⁻¹ 的流速泵入肠段,肠段内充满药液后,调节流速至 0.25 mL·min⁻¹,同时开始记时,30 min 后吸收达稳定状态。此时每隔 15 min 收集 1 份,至 105 min 时结束试验。将灌流的肠段剪下,测量其长度和内径。收集的灌流液置于

1.5 mL 离心管中,以 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液按 **2.3.1** 项下方法测定,计算药物吸收速率常数(*K_a*)和药物表观吸收系数(*P_{app}*)^[9-10],考察药物浓度对小肠吸收的影响。

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out} Q_{out}}{C_{in} Q_{in}}\right) \frac{Q}{V} - Q \ln \left(\frac{C_{out} C_{out}}{C_{in} C_{in}}\right)$$
$$P_{app} = \frac{2 \pi r l}{2 \pi r l}$$

式中 *Q_{in}* 和 *Q_{out}* 分别为肠道流进和流出灌流液的体积,*C_{in}* 和 *C_{out}* 分别为肠道流进和流出灌流液的质量浓度,*l* 和 *r* 分别为被灌流肠段的长度和横截面半径,*Q* 为灌流流速(0.25 mL·min⁻¹),*V* 为灌流肠段的体积,*K_a* 和 *P_{app}* 为最后 5 个时间段(45~105 min)样品的平均值。

2.4.2 不同肠道对药物吸收的影响 用 K-R 缓冲液配制 40 mg·L⁻¹ 天山花楸叶总黄酮供试液,按 **2.4.1** 项下方法进行灌流试验,分别考察天山花楸总黄酮中 6 种主要成分在十二指肠、空肠、回肠、结肠各区段的吸收情况,见表 1。结果表明不同化合物在同肠段的吸收程度存在差异;同一化合物在整个肠断的吸收无显著性差异。6 种化合物均无特异性吸收部位,4 个肠段间的 *K_a* 和 *P_{app}* 无显著性差异。

2.4.3 不同质量浓度药物的吸收情况 用 K-R 缓冲液配制天山花楸叶总黄酮质量浓度分别为 20,40,80 mg·L⁻¹ 的供试液,按 **2.4.1** 项下方法进行试验,以空肠段为灌流部位,考察药物质量浓度对肠吸收的影响,见表 2。结果显示天山花楸叶中 6 种黄酮类成分在 3 个质量浓度下的吸收参数差异不显著,表明质量浓度对 6 种黄酮类化合物在小肠的吸收动力学无显著影响,提示 6 种黄酮类成分在大鼠小肠的吸收主要以被动转运为主。

表 1 天山花楸叶总黄酮中 6 种主要成分在大鼠不同肠段的吸收情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Absorption conditions of 6 kinds of flavonoids from *Sorbus tianschanica* in different intestinal segments of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

成分	参数/单位	十二指肠	空肠	回肠	结肠
芦丁	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	4.293 ± 0.303 9	3.981 ± 0.407 9	4.344 ± 0.289 9	4.013 ± 0.335 8
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	2.696 ± 0.002 7	2.544 ± 0.042 3	2.760 ± 0.026 1	2.657 ± 0.042 2
金丝桃苷	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	2.601 ± 0.334 9	2.497 ± 0.411 0	2.523 ± 0.354 5	2.553 ± 0.407 0
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	1.391 ± 0.036 7	1.337 ± 0.056 4	1.360 ± 0.034 4	1.366 ± 0.037 2
异槲皮素苷	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	2.753 ± 0.247 0	2.701 ± 0.274 4	2.698 ± 0.334 9	2.722 ± 0.201 5
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	1.341 ± 0.024 0	1.321 ± 0.034 7	1.297 ± 0.064 4	1.330 ± 0.030 2
1 号化合物	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	3.379 ± 0.186 4	3.102 ± 0.173 3	3.064 ± 0.178 2	3.227 ± 0.182 8
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	1.445 ± 0.030 1	1.409 ± 0.041 0	1.397 ± 0.046 8	1.427 ± 0.038 2
紫云英苷	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	1.447 ± 0.201 0	1.421 ± 0.243 0	1.389 ± 0.251 0	1.393 ± 0.309 0
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	1.107 ± 0.053 3	1.094 ± 0.049 4	1.080 ± 0.037 7	1.089 ± 0.049 7
2 号化合物	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	1.849 ± 0.421 0	1.796 ± 0.446 0	1.788 ± 0.439 0	1.803 ± 0.308 0
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	1.949 ± 0.050 3	1.885 ± 0.051 2	1.796 ± 0.060 8	1.937 ± 0.057 4

表 2 不同质量浓度天山花楸叶总黄酮对 6 种成分肠吸收的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of different concentrations of total flavonoids from *Sorbus tianschanica* on intestinal absorption of six ingredients ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

成分	参数/单位	C/mg·L ⁻¹		
		20	40	80
芦丁	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	4. 021 ± 0. 541	4. 013 ± 0. 335	4. 032 ± 0. 454
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	2. 689 ± 0. 274	2. 657 ± 0. 242	2. 701 ± 0. 269
金丝桃苷	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	2. 467 ± 0. 305	2. 497 ± 0. 311	2. 502 ± 0. 403
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	1. 297 ± 0. 186	1. 329 ± 0. 196	1. 337 ± 0. 151
异槲皮素苷	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	2. 633 ± 0. 476	2. 701 ± 0. 474	2. 670 ± 0. 388
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	1. 292 ± 0. 204	1. 321 ± 0. 234	1. 305 ± 0. 172
1 号化合物	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	3. 080 ± 0. 522	3. 089 ± 0. 473	3. 102 ± 0. 506
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	1. 393 ± 0. 202	1. 409 ± 0. 241	1. 411 ± 0. 163
紫云英苷	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	1. 450 ± 0. 343	1. 421 ± 0. 543	1. 438 ± 0. 421
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	1. 094 ± 0. 189	1. 073 ± 0. 144	1. 082 ± 0. 191
2 号化合物	$P_{app} \times 10^{-2}/\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$	1. 815 ± 0. 470	1. 796 ± 0. 446	1. 808 ± 0. 396
	$K_a \times 10^{-1}/\text{min}^{-1}$	1. 901 ± 0. 267	1. 877 ± 0. 151	1. 885 ± 0. 201

3 讨论

本文选取在体单向肠灌流模型,主要考虑到其给药环境与口服给药后药物正常的肠道生理环境一致,同时其操作简单,不易损坏研究部位的淋巴和血液循环系统,不切断血管和神经,还能避免胃内容物排出及消化道固有运动等不利的生理影响。采用重量法计算 K_a 和 P_{app} , 主要是因为 在体肠吸收试验中,肠道吸收水分会导致灌流液体积随时间变化,重量法较酚红法可减小实验误差^[16]。实验开始前取供试液反复冲洗管道,直至出液口药物浓度与供试液浓度相等,是为了消除实验过程中管路对药物的吸附作用。结果表明天山花楸叶中 6 种黄酮类成分在大鼠小肠的吸收机制为被动扩散,并且在整个肠段均有吸收,无特异性吸收的部位。这可能是因为天山花楸叶黄酮类化合物的结构主要以黄酮醇类为主,脂溶性较差,不易透过生物膜。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 4 册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999;292.

[2] 新疆维吾尔自治区卫生厅革命委员会. 新疆中草药[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社,1973;62.

[3] 付伟,刘婷,杨彩玉,等. 天山花楸叶总黄酮对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2010,26(2):251-254.

[4] Termentzi A, Kefalas P, Kokkalou E. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages [J]. Food Chem,2006,98(4):599-608.

[5] Na M K, Bae K, Kim Y H, et al. Antioxidant compounds from the stem bark of *Sorbus commixta* [J]. Nat Prod Sci, 2002, 8(1):26-29.

[6] Li L, Tang H, Wu T, et al. Chemical composition of

Sorbus tianschanica Leaves[J]. Chem Nat Compd,2010, 46(5):811-812.

[7] Zhao Y H, Abraham M H, Le J, et al. Evaluation of rat intestinal absorption data and correlation with human intestinal absorption [J]. Eur J Med Chem, 2003, 38(3):233-243.

[8] Stewart B H, Chan O H, Lu R H, et al. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple *in vitro* and *in situ* models; relationship to absorption in humans [J]. Pharm Res,1995,12(5):693-699.

[9] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum[J]. Pharm Res,1996,13(9):1336-1342.

[10] Lennernas H, Fagerholm U, Raab Y, et al. Reginal rectal perfusion, a new *in vivo* approach to study rectal drug absorption in man [J]. Pharm Res, 1995, 12(3):426-432.

[11] 芮鸣,唐辉,王鲁石,等. 天山花楸叶中总黄酮超声提取工艺研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(15):3038-3040.

[12] 李沉纹,罗明和,李卓恒,等. 牛蒡子苷大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中草药,2013,44(6):727-730.

[13] 王幻,唐辉,王国军,等. HPLC 测定天山花楸叶提取物中 6 种黄酮成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(15):58-61.

[14] 杨本坤,王素军,曾洁,等. 大鼠在体单向肠灌流模型研究肉桂酸肠道吸收特性[J]. 广东药学院学报,2013,29(1):69-72.

[15] 王婷婷,李伟,袁勇,等. 大鼠单向灌流模型研究田蓟苷的在体肠吸收[J]. 中国中药杂志,2013,38(7):1079-1082.

[16] 高芸,栾立标. 白芷中 2 种有效成分在大鼠小肠的吸收特性[J]. 中国新药杂志,2007,16(14):1094-1098.

[责任编辑 刘德文]