

· 药物代谢 ·

罗布麻总黄酮主要成分在大鼠胃肠吸收的初步探讨

郝旭亮^{1*}, 张素琼², 刘聪¹, 李青山², 倪艳¹

(1. 山西省中医药研究院, 太原 030012; 2. 山西医科大学药学院, 太原 030001)

[摘要] **目的:** 考察罗布麻总黄酮主要成分在大鼠胃、肠的吸收情况。**方法:** 采用大鼠在体灌注模型, 考察罗布麻总黄酮主要成分在大鼠胃、肠内的吸收情况, 以金丝桃苷、异槲皮苷为评价指标, 采用 HPLC 测定灌注罗布麻总黄酮前后指标成分的含量变化, 计算二者在胃、肠中吸收率, 流动相乙腈-0.05% 磷酸水 (18.5:81.5), 流速 0.90 mL·min⁻¹, 检测波长 360 nm。**结果:** 金丝桃苷、异槲皮苷在大鼠胃中 2 h 的平均吸收率分别为 36.92%, 36.49%; 在大鼠肠中依次为 47.70%, 48.25%。**结论:** 金丝桃苷和异槲皮苷在大鼠胃、肠部均有吸收, 但两成分在肠部的吸收较胃部好, 为罗布麻总黄酮的剂型设计和临床合理用药提供参考。

[关键词] 胃肠吸收情况; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 罗布麻总黄酮; 在体灌注模型

[中图分类号] R282.4; R283.6; R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0121-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170121

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1342.017.html>

[网络出版时间] 2014-07-15 13:42

Preliminary Investigation of Gastrointestinal Absorption of Total Flavonoids from Apocyni Veneti Folium in Rats

HAO Xu-liang^{1*}, ZHANG Su-qiong², LIU Cong¹, LI Qing-shan², NI Yan¹

(1. Shanxi Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China;

2. School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate gastrointestinal absorption of total flavonoids from Apocyni Veneti Folium in rats. **Method:** Taking rats *in situ* perfusion model, absorptivity of hyperin and isoquercitrin in gastrointestinal was counted through detecting contents of index components before and after perfused total flavonoids from Apocyni Veneti Folium by HPLC, mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid (18.5:81.5) at a flow rate of 0.90 mL·min⁻¹ and detection wavelength at 360 nm. **Result:** A verage absorptivity in stomach of hyperin and isoquercitrin were 36.92% and 36.49%, while in intestines were 47.7% and 48.25%, respectively. **Conclusion:** This study indicated that hyperin and isoquercitrin had good absorptivity in gastrinintestinal department, but absorption of the two ingredients in intestines was better than these in stomach, it could provide scientific basis for dosage form design and clinical rational drug of total flavonoids from Apocyni Veneti Folium.

[Key words] gastrointestinal absorption; hyperin; isoquercitrin; total flavonoids from Apocyni Veneti Folium; *in situ* perfusion model

[收稿日期] 20140101(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274132)

[通讯作者] * 郝旭亮, 博士, 副主任药师, 硕士生导师, 从事中药作用物质基础及作用机制研究, Tel:0351-4668236, E-mail: hxliang-01@163.com

中药在动物体内的药理作用主要建立在有效成分基础上,探讨中药有效成分口服时吸收部位是提高中药口服给药生物利用度的基础。预测口服药物吸收的方法较多,在体法因其不损伤研究部位的淋巴和循环系统而明显优于离体法;其中单向灌注由于使用简单、可避免药物在吸收过程中溶出等限速因素而被广泛采用^[1]。胃肠道是药物吸收的主要部位,研究药物的胃肠道吸收特性可指导剂型的选择、控制药物的溶出释放部位及其在体内的滞留时间,从而提高药物生物利用度^[2]。本实验以罗布麻总黄酮的主要有效成分金丝桃苷、异槲皮苷为考察指标,通过大鼠在体胃肠试验探讨 2 种有效成分的最佳吸收部位及吸收机制,为罗布麻总黄酮剂型的设计提供生物药剂学依据。

1 材料

LC10A-VP 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),TDL80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),BP-121S 型精密电子天平(德国 Sartorius 公司)。金丝桃苷对照品(批号 1521-200202,中国食品药品检定研究院),异槲皮苷对照品(自制,纯度 > 98%),罗布麻总黄酮(批号 2007604,以芦丁计质量分数 68%,自制),20% 乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯、水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠,雌雄各半,体重 250 ~ 400 g,由山西医科大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(晋)2009-0004,实验前在自由饮水条件下禁食 24 h。

2 方法与结果

2.1 金丝桃苷与异槲皮苷的含量测定

2.1.1 色谱条件 Krocasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.05% 磷酸水(18.5:81.5),流速 0.90 mL · min⁻¹,检测波长 360 nm,进样量 20 μL,柱温 25 °C。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取经五氧化二磷减压干燥至恒重的金丝桃苷和异槲皮苷对照品适量,加 80% 甲醇溶解,分别配成 0.216,0.165 g · L⁻¹ 的对照品储备液。

2.1.3 溶液的制备 取稀盐酸 16.4 mL(pH 1.2),加入水约 800 mL 与胃蛋白酶 10 g,摇匀,加水稀释至 1 L,得人工胃液。分别称取 NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃, NaH₂PO₄, MgCl₂ 及葡萄糖 7.8, 0.35, 0.37, 1.37, 0.32, 0.02, 1.4 g,加水定容至 1 L,得 Krebs-Ringer 缓冲液(pH 7.4, K-R 缓冲液)。精密称取罗布麻总黄酮 250 mg,加水溶解,超声处理

10 min,加水定容至 100 mL,得罗布麻总黄酮溶液。精密吸取罗布麻总黄酮溶液 10 mL,用人工胃液稀释并定容至 25 mL,得罗布麻总黄酮胃灌注液。精密吸取罗布麻总黄酮溶液 20 mL,加 K-R 缓冲液稀释并定容至 50 mL,得罗布麻总黄酮肠灌注液。

2.2 胃循环液中药物浓度测定方法的建立

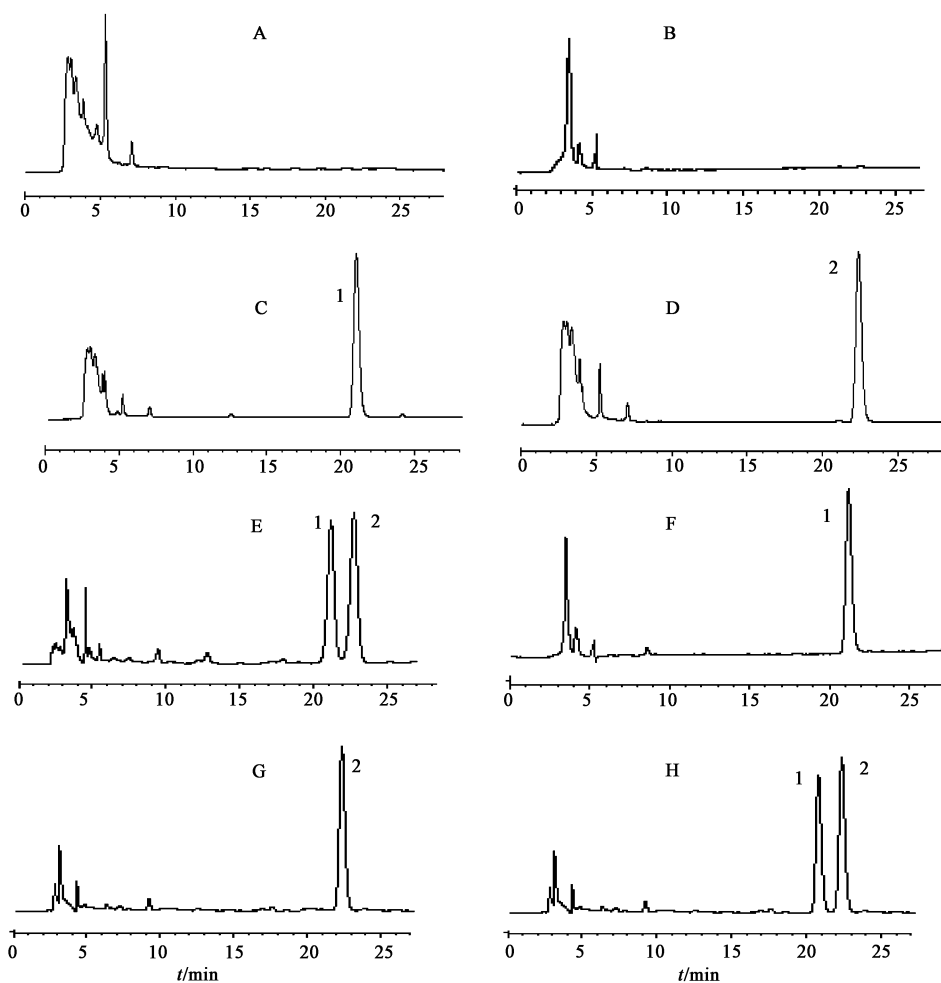
2.2.1 方法专属性试验 精密吸取金丝桃苷、异槲皮苷对照品储备液 1.5, 2.0 mL,分别用人工胃液稀释至 10 mL,得对照品溶液。分别精密吸取 2 个对照品溶液和 0.2 g · L⁻¹ 胃灌注液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,结果见图 1,表明样品中金丝桃苷峰与异槲皮苷峰的分度 > 1.77,而且空白液在此条件下无干扰。

2.2.2 稳定性考察 量取 0.2 g · L⁻¹ 罗布麻总黄酮胃灌注液 25 mL 于适当容器内,置 37 °C 水浴中,分别于 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 h 取样,按 2.1.1 项下色谱条件测定金丝桃苷和异槲皮苷含量,计算 RSD 分别为 1.40%, 1.70%,表明胃灌注液在 24 h 内稳定。

2.2.3 标准曲线及线性范围考察 精密吸取金丝桃苷对照品储备液 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL,分别用人工胃液稀释至 10 mL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 3.421 \times 10^6 X - 6.527 \times 10^5$ ($r = 0.9996$),线性范围 0.216 ~ 1.08 μg,最低定量限 0.108 μg。精密吸取异槲皮苷对照品储备液 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL,按上述方法处理,得回归方程 $Y = 3.766 \times 10^6 X - 1.135 \times 10^6$ ($r = 0.9993$),线性范围 0.33 ~ 0.99 μg,最低定量限 0.165 μg。

2.2.4 精密度试验 取人工胃液适量,加入一定质量浓度的金丝桃苷、异槲皮苷对照品溶液,配成低、中、高质量浓度的混合溶液($n = 6$),重复测定 3 d,随行作对照,计算金丝桃苷日内精密度 RSD 分别为 2.5%, 2.9%, 1.8%, 日间精密度 RSD 分别为 3.5%, 3.7%, 2.4%;异槲皮苷日内精密度 RSD 分别为 2.7%, 2.2%, 1.7%, 日间精密度 RSD 分别为 3.5%, 4.7%, 2.6%。

2.2.5 提取回收率试验 取人工胃液适量,加入一定质量浓度的金丝桃苷、异槲皮苷对照品溶液,配成低、中、高质量浓度的混合溶液($n = 6$),以金丝桃苷和异槲皮苷峰面积与相应质量浓度的对照品溶液直接进样的峰面积之比计算回收率,结果表明 3 种质量浓度下金丝桃苷的平均回收率分别为 80.1%, 84.1%, 81.4%, RSD 依次为 1.3%, 2.1%, 1.8%;



A. 空白胃液;B. 空白肠液;C,D. 胃液对照品;E. 胃灌注液供试品;F,G. 肠液对照品;H. 肠灌注液供试品;1. 金丝桃苷;2. 异槲皮苷

图1 罗布麻总黄酮胃、肠灌注液专属性试验 HPLC

异槲皮苷的平均回收率分别为 80.1% , 84.1% , 81.4% , RSD 分别为 1.3% , 2.5% , 2.9% 。

2.3 肠循环中药物浓度测定方法的建立

2.3.1 方法专属性试验 精密吸取金丝桃苷、异槲皮苷对照品储备液 1.5、2.0 mL, 分别用 K-R 缓冲液稀释至 10 mL, 得对照品溶液。分别精密吸取 2 个对照品溶液和 0.2 g·L⁻¹ 罗布麻总黄酮肠灌注液各 20 μL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 见图 1, 结果显示样品中金丝桃苷峰与异槲皮苷峰的分离度 > 1.95, 空白液在此条件下无干扰。

2.3.2 稳定性考察 取 0.01 g·L⁻¹ 罗布麻总黄酮肠灌注液 25 mL 于适当容器内, 置于 37 °C 水浴中, 分别于 0、3、6、9、12、15、18、21、24 h 取样, 按 2.1.1 项下色谱条件测定金丝桃苷和异槲皮苷含量, 结果两成分的 RSD 分别为 1.5% , 1.9% , 表明金丝桃苷和异槲皮苷在空白肠液中 24 h 内稳定性良好。

2.3.3 标准曲线及线性范围的考察 精密吸取

16.2 mg·L⁻¹ 金丝桃苷对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL, 分别用 K-R 缓冲液稀释至 10 mL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程 $Y = 2\ 857.604X + 2\ 991\ 940$ ($r = 0.999\ 2$), 线性范围 16.2 ~ 81 ng, 最低定量限 16.2 ng。精密吸取 6.6 mg·L⁻¹ 异槲皮苷对照品溶液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL, 分别用 K-R 缓冲液稀释至 10 mL, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标, 得回归方程 $Y = 5\ 208.7X + 2\ 661\ 682$ ($r = 0.999\ 7$), 线性范围 6.6 ~ 33 ng, 最低定量限 6.6 ng。

2.3.4 提取回收率试验 取 K-R 缓冲液适量, 加入一定质量浓度的金丝桃苷、异槲皮苷对照品溶液, 配成低、中、高质量浓度的混合溶液 ($n = 6$), 按 2.2.5 项下方法处理, 计算金丝桃苷的平均回收率分别为 78.1% , 84.1% , 81.4% , RSD 依次为 2.3% , 2.1% , 1.8% ; 异槲皮苷平均回收率分别为 80.1% ,

83.4%, 86.4%, RSD 依次为 2.8%, 2.2%, 1.6%。

2.3.5 精密度试验 取 K-R 缓冲液适量, 分别加入一定质量浓度的金丝桃苷、异槲皮苷对照品溶液, 按 2.2.4 项下方法处理, 计算金丝桃苷日内精密度 RSD 分别为 2.4%, 2.7%, 1.3%, 日间精密度 RSD 分别为 3.6%, 3.1%, 2.3%; 异槲皮苷日内精密度 RSD 分别为 2.9%, 2.4%, 1.9%, 日间精密度 RSD 分别为 3.7%, 4.9%, 2.8%。

2.4 原位胃吸收试验^[3-5] 取禁食 SD 大鼠 5 只, 按 $6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射 20% 乌拉坦, 麻醉后固定。打开腹腔暴露胃, 结扎贲门, 在幽门处插入塑料导管并结扎。用 37 °C 生理盐水将胃灌洗数次, 直至抽出的灌注液干净, 吸取 37 °C 的 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 罗布麻总黄酮胃灌注液 3 mL, 从导管处注入胃内, 结扎幽门。将胃放回腹腔, 用湿棉花盖住切口, 保持温度约 25 °C。2 h 后取出胃, 将胃内溶液导出, 并用少量人工胃液多次冲洗胃内部, 合并药液和洗液, 离心 ($3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min, 下同), 取上清液, 转移置 10 mL 量瓶中并用人工胃液定容, 摇匀。以罗布麻总黄酮胃灌注液质量浓度为初浓度, 量瓶中的质量浓度为终浓度, 经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 计算大鼠胃中 2 h 的平均吸收率 ($n=5$), 结果金丝桃苷 36.92%, 异槲皮苷 36.49%。

2.5 原位肠吸收试验^[6-7] 取禁食 18 h (自由饮水) SD 大鼠 5 只, 按 $6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉后固定在手术台上, 用红外灯使体温维持 37 °C, 沿腹中线打开腹部约 3 cm, 暴露全肠, 小心分离出需要考察的肠段, 两端切口插管并结扎, 用 37 °C 生理盐水冲洗净肠内容物。取 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 罗布麻总黄酮肠灌注液 5 mL, 快速注入肠段直至充满, 2 h 后取出肠, 并用少量 K-R 缓冲液多次冲洗肠内部, 合并药液和洗液, 离心, 取上清液, 转移置 25 mL 量瓶中并用 K-R 缓冲液定容, 摇匀, 计算金丝桃苷和异槲皮苷的每小时吸收率 ($n=5$), 结果二者在大鼠肠中 2 h 的平均吸收率分别为 47.70%, 48.25%。

3 讨论

研究药物胃肠道吸收的方法包括体外试验法、在体试验法^[8]和体内试验法等^[9]。目前, 动物与人的吸收相关性已被证实^[10], 其中离体试验破坏了胃肠道的真实生存环境, 结果与实际吸收可能存在较大差异; 而在体试验较接近正常生理条件, 对于不同性质的药物均可通过不同方法进行研究。本实验采

用原位攀吸收法大鼠在体灌流模型, 以金丝桃苷、异槲皮苷为评价指标, 通过测定灌流前后两成分的含量, 计算二者在胃肠中的吸收率, 结果表明金丝桃苷和异槲皮苷在大鼠胃肠部均有吸收, 但两成分在肠部的吸收较胃部好, 药物在胃肠循环液中的减少可能是一部分降解, 另一部分被吸收入血, 计算的吸收率偏大, 故测定结果仅为表观吸收率。在口服制剂设计前, 应了解药物在胃肠道的吸收情况, 一般在整段胃肠道或较长部分均能吸收的药物是制备缓控释制剂的良好候选药物, 而有特定吸收部位的药物通常制成定位释药, 说明药物吸收试验是制剂处方设计的必要环节。

[参考文献]

- [1] 秦瑄. 岩白菜素大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 华西药理学杂志, 2007, 38(6): 1013.
- [2] 刘太明, 蒋学华. HPLC 同时测定肠循环液中黄芩苷、黄芩素和酚红的浓度[J]. 华西药理学杂志, 2005, 20(5): 390.
- [3] 杜红, 牛欣, 李海燕, 等. 穿心莲内酯微乳在大鼠体内的吸收行为研究[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(12): 817.
- [4] 吕鹏, 黄晓舞, 吕秋军. 黄酮类化合物吸收、分布和代谢的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 1961.
- [5] Zou F, Zhou Z M, Ye W H, et al. The gastrointestinal absorption and transformation of Huangqin-Tang decoction in rats[J]. Asian J Drug Metab Pharm, 2002, 2(2): 171.
- [6] 林文慧, 朱春燕, 陈卫, 等. 葛根黄酮在大鼠肠道的吸收动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 164.
- [7] 郭歆, 曹伟, 程泽能, 等. 齐墩果酸大鼠肠吸收动力学[J]. 中南药学, 2007, 5(3): 216.
- [8] 何承华, 张振海, 王舒, 等. 芹菜素大鼠在体肠吸收动力学的研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1416.
- [9] Yu L X, Lipka E, Crison J R, et al. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption[J]. Adv Drug Del Rev, 1996, 19(3): 359.
- [10] Schurgers N, Bijdendijk J, Tukker J J, et al. Comparison of four experimental techniques for studying drug absorption kinetics in the anesthetized rat *in situ*[J]. J Pharm Sci, 1986, 75(2): 117.

[责任编辑 刘德文]