

· 药物代谢 ·

## 菝葜抗炎有效部位群在大鼠肠外翻试验中的吸收特性考察

黄慧辉, 张小燕, 沈娟, 罗丹, 叶晓川\*, 刘焱文  
(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

**[摘要]** **目的:**考察菝葜抗炎有效部位群中6种成分的体外肠吸收特征,为该部位的制剂开发及药代动力学研究提供参考。**方法:**采用大鼠肠外翻模型,通过HPLC测定不同取样时间肠内液中白藜芦醇苷、落新妇苷、氧化白藜芦醇、槲皮苷、黄杞苷、白藜芦醇的含量,流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~18 min,12%~18% A;18~33 min,18% A;33~45 min,18%~21% A;45~50 min,21% A),流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,检测波长290 nm,计算吸收动力学参数,考察6个成分在不同肠段(十二指肠、空肠和回肠)的吸收情况。**结果:**白藜芦醇苷在各肠段吸收无明显差异,而其他5种成分在各肠段的吸收差异较大;6种成分在同一肠段的吸收有较大差异,在十二指肠、空肠和回肠中的吸收率分别为0.85%~2.79%,0.70%~2.73%和0.90%~1.77%。槲皮苷在十二指肠和空肠的吸收率最高,白藜芦醇苷在回肠的吸收率最高;氧化白藜芦醇吸收速度明显比其他5种成分慢,在十二指肠中于90 min后才表现出较明显的吸收。**结论:**白藜芦醇苷、落新妇苷、槲皮苷、黄杞苷、白藜芦醇在大鼠离体小肠的吸收为一级动力学过程,选择外翻肠囊法可评价菝葜提取物中多成分的肠吸收特性。

**[关键词]** 菝葜;有效部位群;肠外翻模型;落新妇苷;氧化白藜芦醇;槲皮苷

**[中图分类号]** R969.1;R945;R285.5;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0096-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2016080096

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160311.1034.006.html>

**[网络出版时间]** 2016-03-11 10:34

## Investigation of Absorption Characteristics of Anti-inflammatory Effective Parts from Smilacis Chinae Rhizoma in Rat Intestinal Valgus Test

HUANG Hui-hui, ZHANG Xiao-yan, SHEN Juan, LUO Dan, YE Xiao-chuan\*, LIU Yan-wen  
(Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate absorption characteristics of six components from anti-inflammatory effective parts of Smilacis Chinae Rhizoma. **Method:** Taking rat everted gut sac model, intestinal sac contents were collected at different time and absorption concentration of polydatin, astilbin, oxyresveratrol, quercitrin, engeletin and resveratrol was determined by HPLC, absorption kinetics parameters were calculated for describing their absorption characters in different intestinal segments (duodenum, jejunum and ileum). **Result:** Absorption of polydatin in duodenum, jejunum and ileum was no significant difference, while the other five components showed large differences. Absorption of six ingredients showed significant differences in the same intestinal site, their absorptivity at duodenum, jejunum and ileum were 0.85%-2.79%, 0.70%-2.73% and 0.90%-1.77%, respectively. Quercitrin showed the highest absorption rate in duodenum and jejunum, polydatin showed the highest absorption rate in ileum. Absorption rate of oxyresveratrol was significantly slower than the other five ingredients, it just showed obvious absorption after 90 min in duodenum. **Conclusion:** Absorption of polydatin,

**[收稿日期]** 20150801(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(31370378)

**[第一作者]** 黄慧辉,在读硕士,从事中药药效物质基础及质量评价研究,Tel:15902723565,E-mail:378645615@qq.com

**[通讯作者]** \*叶晓川,博士,研究员,从事中药药效物质基础及质量评价研究,Tel:13871277719,E-mail:yxxcc1965@163.com

astilbin, quercitrin, engeletin and resveratrol conforms the first order kinetics, everted gut sac method can evaluate intestinal absorption characteristics of multi-component in Smilacis Chinae Rhizoma extracts.

[Key words] Smilacis Chinae Rhizoma; effective parts; everted gut sac model; astilbin; oxyreverstroal; quercitrin

菝葜功能祛风除湿、解毒散瘀,临床常用于治疗筋骨酸痛、疔疮痛肿等症,尤多用于妇科炎症如附件炎及附件炎性包块等的治疗<sup>[1]</sup>。本课题组前期采用大孔树脂制备得主要含有黄酮类、二苯乙烯类和甾体皂苷类成分的菝葜提取物,通过药理实验确定其为菝葜发挥抗炎作用的有效部位群<sup>[2-4]</sup>。目前,针对菝葜的化学成分及药理作用研究的报道较多<sup>[5-8]</sup>,但关于菝葜提取物的肠道吸收特征尚未见报道。外翻肠囊法是目前研究体外肠道吸收的常用生物模型,已被广泛应用于中药单体化合物及复方的肠吸收研究<sup>[9-12]</sup>。本实验利用体外肠外翻模型对菝葜抗炎有效部位群中白藜芦醇苷、落新妇苷、氧化白藜芦醇、槲皮苷、黄杞苷和白藜芦醇在大鼠离体小肠的吸收特征进行研究,为该部位群主要成分的药代动力学及其制剂研究提供参考。

## 1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂), BP211D 型 1/10 万电子天平(德国赛多利斯公司)。菝葜抗炎有效部位群提取物(自制),白藜芦醇苷、氧化白藜芦醇对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号分别为 131121,131021),落新妇苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号 PJ0709SA14),槲皮苷、黄杞苷、白藜芦醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111538-200504,111906-201102,111535-200502)。Tyrode 液(自制,pH 7.4,含氯化钠 8.0 g,氯化钾 0.2 g,氯化镁 0.1 g,氯化钙 0.2 g,碳酸氢钠 1.0 g,磷酸二氢钠 0.05 g,葡萄糖 1.0 g,加水至 1 L),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,雌性,体重(200 ± 20) g,购于湖北省实验动物研究中心,动物合格证号 SCXK(鄂)2008-0005。

## 2 方法与结果

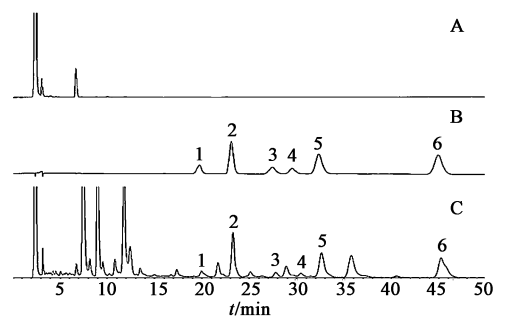
**2.1 菝葜提取物溶液的配制** 精密称取菝葜提取物适量,加 70% 乙醇 10 mL 使溶解,加 Tyrode 液定容至 500 mL,得 6.017 g·L<sup>-1</sup> 药液,备用。

**2.2 大鼠肠外翻试验** 大鼠实验前禁食 12 h,自由饮水,颈椎脱臼处死,剖开腹腔迅速取出十二指肠

(距幽门 1 cm 处取 8 cm),空肠(距幽门 15 cm 处取 8 cm)和回肠(盲肠上 20 cm 处取 8 cm)。用冰 Tyrode 液冲洗,直至无内容物流出,小心剥离肠段表面的肠系膜和脂肪,用棉线将肠段一端结扎,小心翻转肠管,形成管状肠囊,将肠囊开口端结扎与玻璃管套上。向肠囊内注入 37 °C 的 Tyrode 液 1.5 mL,置于装有 Tyrode 液 25 mL 的麦氏浴槽中,整个试验过程保持 37 °C 恒温,浴槽中通入 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>。肠囊平衡 5 min 后,放掉麦氏浴槽中 Tyrode 液,注入事先配好的药液 25 mL,分别在给药后 15,30,45,60,75,90,120 min 从肠囊内取样 200 μL,同时补足等温等体积的空白 Tyrode 液。

## 2.3 肠内液中化学成分的含量测定

**2.3.1 色谱条件** Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 18 min,12% ~ 18% A;18 ~ 33 min,18% A;33 ~ 45 min,18% ~ 21% A;45 ~ 50 min,21% A),流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 290 nm,柱温 25 °C,进样量 20 μL。见图 1。



A. 空白肠内液;B. 对照品;C. 供试品;1. 白藜芦醇苷;2. 落新妇苷;3. 氧化白藜芦醇;4. 槲皮苷;5. 黄杞苷;6. 白藜芦醇

图 1 菝葜提取物专属性 HPLC

Fig.1 HPLC chromatograms of Smilacis Chinae Rhizoma extract

**2.3.2 供试液制备** 取肠内液于 4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min,取上清液,即得。

**2.3.3 对照品储备液的制备** 分别精密称取白藜芦醇苷、落新妇苷、氧化白藜芦醇、槲皮苷、黄杞苷、白藜芦醇 1.26,1.56,1.05,2.12,1.09,1.07 mg,分别置于不同 10 mL 量瓶中,用甲醇超声溶解并定容,即得。

**2.3.4 混合对照品储备液的制备** 分别精密吸取 2.3.3 项下白藜芦醇苷、落新妇苷、氧化白藜芦醇、槲皮苷、黄杞苷、白藜芦醇对照品储备液 1, 4, 2, 4, 6, 3 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得各成分质量浓度分别为 5.04, 24.96, 8.40, 33.92, 26.16, 12.84 mg·L<sup>-1</sup> 的混合对照品储备液。

**2.3.5 标准曲线的绘制** 精密吸取 2.3.4 项下混合对照品储备液 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得白藜芦醇苷、落新妇苷、氧化白藜芦醇、槲皮苷、黄杞苷和白藜芦醇回归方程分别为  $Y = 3\ 068.5X - 7.051$  ( $r = 0.999\ 6$ ),  $Y = 2\ 030.1X - 21.059$  ( $r = 0.999\ 5$ ),  $Y = 2\ 144.8X - 13.096$  ( $r = 0.999\ 5$ ),  $Y = 405.41X - 22.401$  ( $r = 0.999\ 5$ ),  $Y = 1\ 884.1X - 9.356$  ( $r = 0.999\ 6$ ),  $Y = 4\ 630.6X - 27.259$  ( $r = 0.999\ 9$ ), 线性范围依次为 0.252 ~ 5.040, 1.248 ~ 24.960, 0.420 ~ 8.400, 1.696 ~ 33.920, 1.308 ~ 26.160, 0.642 ~ 12.840 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.6 精密度试验** 取 2.3.4 项下混合对照品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件连续进样 5 次, 计算白藜芦醇苷、落新妇苷、氧化白藜芦醇、槲皮苷、黄杞苷、白藜芦醇峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.0%, 1.7%, 1.0%, 1.9%, 1.7%, 表明仪器精密度良好。

**2.3.7 稳定性试验** 取空肠于 120 min 时样品, 分别于 0, 4, 8, 10, 12, 24 h 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 结果白藜芦醇苷、落新妇苷、氧化白藜芦醇、槲皮苷、黄杞苷、白藜芦醇峰面积的 RSD 分别 2.6%, 1.3%, 4.9%, 3.9%, 1.3%, 1.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.3.8 样品测定** 取各供试品溶液适量, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算药物累积吸收量 ( $Q$ )。

$$Q = 1.5C_n + 0.2 \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

式中  $C_n$  为各时间点取样的实测浓度,  $C_i$  为第  $n-1$  个时间点取样的实测浓度。以  $Q$  对时间进行零级、一级和 Higuchi 方程拟合, 以相关系数 ( $r$ ) 为拟合优劣的判断标准, 结果显示一级方程拟合较好。以  $Q$  平均值对时间作线性回归,  $r$  均  $> 0.95$ , 说明符合一级吸收; 相关回归分析得斜率 ( $L$ ) 与吸收表面积 ( $A$ ), 计算吸收速率常数 ( $K_a$ ), 即  $K_a = L/A$ ; 按  $V = Q_{120\ min} / 1.5C_0 \times 100\%$  计算药物吸收率 ( $V$ ), 式中  $Q_{120\ min}$  为 120 min 时药物累积吸收量,  $C_0$  为药物初始质量浓度。氧化白藜芦醇在空肠和回肠段 90 min

可检测到, 在十二指肠段 120 min 才可检测到, 故未对其进行回归分析。结果显示各成分的累积吸收量-时间曲线均呈现上升趋势, 未呈现饱和趋势, 说明 6 种成分在 120 min 内吸收未达到饱和状态。结果见表 1~4 和图 2。

表 1 菝葜抗炎有效部位群中 6 种成分在十二指肠的回归方程和吸收率 ( $n=3$ )

Table 1 Linear regressions and absorption rates of six ingredients from anti-inflammatory effective parts of Smilacis Chinae Rhizoma in duodenum ( $n=3$ )

化合物	回归方程	$r$	吸收率/%
白藜芦醇苷	$Q = 0.027t - 0.595$	0.991	1.82
落新妇苷	$Q = 0.137t - 2.470$	0.975	0.88
氧化白藜芦醇	-	-	1.59
槲皮苷	$Q = 0.286t - 7.994$	0.952	2.79
黄杞苷	$Q = 0.129t - 3.535$	0.971	0.85
白藜芦醇	$Q = 0.060t - 1.524$	0.953	0.89

表 2 菝葜抗炎有效部位群中 6 种成分在空肠的回归方程和吸收率 ( $n=3$ )

Table 2 Linear regressions and absorption rates of six ingredients from anti-inflammatory effective parts of Smilacis Chinae Rhizoma in jejunum ( $n=3$ )

化合物	回归方程	$r$	吸收率/%
白藜芦醇苷	$Q = 0.026t - 0.426$	0.999	1.69
落新妇苷	$Q = 0.250t - 4.591$	0.984	1.37
氧化白藜芦醇	-	-	0.70
槲皮苷	$Q = 0.141t - 3.230$	0.990	2.73
黄杞苷	$Q = 0.239t - 5.777$	0.982	1.35
白藜芦醇	$Q = 0.110t - 3.068$	0.968	1.20

表 3 菝葜抗炎有效部位群中 6 种成分在回肠的回归方程和吸收率 ( $n=3$ )

Table 3 Linear regressions and absorption rates of six ingredients from anti-inflammatory effective parts of Smilacis Chinae Rhizoma in ileum ( $n=3$ )

化合物	回归方程	$r$	吸收率/%
白藜芦醇苷	$Q = 0.027t - 0.498$	0.985	1.77
落新妇苷	$Q = 0.220t - 3.903$	0.984	1.57
氧化白藜芦醇	-	-	0.90
槲皮苷	$Q = 0.306t - 7.656$	0.988	1.27
黄杞苷	$Q = 0.206t - 4.664$	0.989	1.58
白藜芦醇	$Q = 0.087t - 2.413$	0.974	1.54

### 3 讨论

菝葜抗炎有效部位群中含有多种黄酮类及二苯乙烯类成分, 其中白藜芦醇苷、落新妇苷、氧化白藜芦醇、槲皮苷、黄杞苷和白藜芦醇是其发挥抗炎作用的主要活性成分<sup>[13-14]</sup>。因此, 本文选择这 6 种成分为指标成分, 能大致反映菝葜抗炎有效部位群提取物的吸收情况。通过对不同肠段的大鼠离体小肠吸

表 4 菝葜抗炎有效部位群中 6 种成分在各肠段的  $K_a$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Absorption rate of six ingredients from anti-inflammatory effective parts of *Smilacis Chinae Rhizoma* in different intestinal segments ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

肠段	白藜芦醇苷	落新妇苷	槲皮苷	黄杞苷	白藜芦醇
十二指肠	0.021 ± 0.002	0.109 ± 0.021	0.165 ± 0.100	0.103 ± 0.008	0.116 ± 0.105
空肠	0.021 ± 0.002	0.183 ± 0.014	0.199 ± 0.076	0.173 ± 0.016	0.076 ± 0.014
回肠	0.020 ± 0.001	0.191 ± 0.020	0.156 ± 0.077	0.181 ± 0.019	0.081 ± 0.011

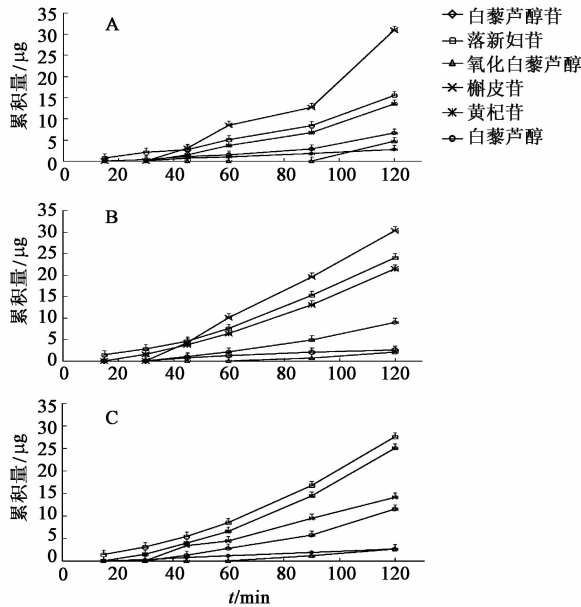


图 2 菝葜抗炎有效部位群中 6 种成分在十二指肠 (A), 空肠 (B), 回肠 (C) 累积量-时间曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Accumulation-time curves of six ingredients from anti-inflammatory effective parts of *Smilacis Chinae Rhizoma* in duodenum (A), jejunum (B) and ileum (C) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

收试验发现, 6 种成分在十二指肠、空肠、回肠 3 个肠段均有吸收, 但各成分吸收状况差异较大。

实验中发现, 氧化白藜芦醇在 90 min 后才在肠内有少量的累积, 推测可能是氧化白藜芦醇结构母核中含有酚羟基和烯键, 使得其稳定性差, 容易转化为其他物质, 导致其在前面几个时间点未被检出, 因此得到的线性回归方程的相关系数较低 (0.75 ~ 0.91)。落新妇苷在小肠中吸收最快, 15 min 时便可在各肠段肠液中检测出。文献显示槲皮苷与落新妇苷的结构极其相似, 槲皮苷在 30 min 后样品液中才检测出, 最后累积吸收率也与落新妇苷有较大差异, 可能是物质的绝对构型等影响了药物的吸收<sup>[15]</sup>。白藜芦醇苷在各肠段的吸收未显示出明显差异, 相对于其他成分具有较好的吸收, 其与白藜芦醇及氧化白藜芦醇相比均显示出较大差异, 可能是由于成苷后使其稳定性和水溶性均有所增加。

菝葜提取物水溶性较差, 所以先用少量 70% 乙醇将其溶解, 再用 Tyrode 液稀释, 但是放置一段时

间后仍会有少量沉淀产生。实验结果显示菝葜抗炎有效部位群提取物整体的肠吸收率偏低, 可能是其水溶性差, 在肠液中溶解度低, 导致其吸收障碍, 提示制剂研究中应考虑采用适当方法改善原料溶解性以提高其生物利用度。

[参考文献]

[1] 万定荣. 湖北药材志. 第 1 卷[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002: 325-328.

[2] 孙进. 菝葜活性部位群提取纯化工艺及其血清药化学研究[D]. 武汉: 湖北中医学院, 2009.

[3] 邱千. 菝葜抗肺癌活性部位的筛选及其作用机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2014.

[4] 晏绿金, 文莉, 干国平, 等. 菝葜抗炎活性物质筛选研究[J]. 中药材, 2008, 31(7): 1054-1056.

[5] 吕永宁, 陈东生, 付磊, 等. 菝葜三种提取物活血化瘀药理作用研究[J]. 中国药科大学报, 2001, 32(6): 448-450.

[6] 吕永宁, 陈东生, 熊先智. 菝葜不同提取物对小鼠佐剂性关节炎的作用[J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(9): 517-519.

[7] 华小黎, 陈东生. 菝葜有效部位对特发性血小板减少性紫癜动物模型的实验研究[J]. 世界临床药物, 2006, 27(2): 123-125.

[8] 陈东生, 吕永宁, 王杰. 菝葜的抗炎作用[J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(9): 544-545.

[9] 张英丰, 李玉洁, 杨庆, 等. 采用离体外翻肠囊模型进行穿心莲内酯的肠吸收特性研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 107-110.

[10] 张宜凡, 王跃, 肖娟, 等. 外翻肠囊法研究黄芩清肺汤吸收成分[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(15): 730-736.

[11] 王伟. 金铃子散不同配伍的肠吸收特征研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2011.

[12] 畅静, 田莉, 张慧慧, 等. 离体外翻肠囊法研究安石榴苷的大鼠肠吸收特性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 122-126.

[13] 阮金兰, 邹建, 蔡亚玲. 菝葜的抗炎活性成分的研究[J]. 医药导报, 2005, 24(8): 670-672.

[14] 谢长, 沈婵娟, 陈树和, 等. 菝葜抗炎活性部位的血清药物化学研究[J]. 中草药, 2012, 31(3): 288-291.

[15] 范银洲. 菝葜抗慢性盆腔炎有效部位及其化学成分研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2014.

[责任编辑 刘德文]