

· 药剂与炮制 ·

# 基于在体循环肠灌注模型分析羊耳菊提取物的肠吸收特性

伍萍, 李梅, 巩仔鹏, 侯靖宇, 吴林霖, 陈亭亭, 李月婷, 陈思颖,  
王爱民, 李勇军, 王永林, 兰燕宇\*

(贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 民族药与中药开发应用教育部工程  
研究中心, 药学院, 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的:考察羊耳菊提取物在大鼠肠内的吸收特征。方法:采用大鼠在体循环肠灌注模型,选择羊耳菊提取物中东莨菪苷等9种代表性成分为考察对象,建立其UPLC-MS/MS并测量各成分的累计吸收量,探究药物质量浓度,胆汁,P-糖蛋白(P-gp)抑制剂及不同肠段对羊耳菊提取物中东莨菪苷等成分肠吸收的影响,阐明各成分在不同肠段的吸收特征。结果:东莨菪苷在高质量浓度条件下存在饱和现象,提示可能的吸收方式为主动转运,而1,3-O-二咖啡酰基奎宁酸等其余8种成分则无明显高浓度饱和现象,提示这8种成分可能的吸收方式均为被动扩散。木犀草苷,1,3-O-二咖啡酰基奎宁酸,3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸和4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸的主要吸收部位在空肠,东莨菪苷和3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸的主要吸收部位在回肠,绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的主要吸收部位在十二指肠。羊耳菊提取物中东莨菪苷等9种成分的肠吸收均受到pH和胆汁的影响。结论:羊耳菊提取物中9种成分在小肠均有吸收,但各成分的吸收速率、最佳吸收部位及吸收机制不尽相同。

**[关键词]** 羊耳菊; 提取物; 咖啡酰基奎宁酸; 肠吸收; 木犀草苷; 在体循环肠灌注模型; 绿原酸

**[中图分类号]** R283.6;R945;R285.5;R284;R917 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)02-0001-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018020001

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171102.1937.086.html>

**[网络出版时间]** 2017-11-02 19:37

## Analysis of Intestinal Absorption Characteristics of *Inula cappa* Extract by *in situ* Intestinal Circulating Perfusion Model

WU Ping, LI Mei, GONG Zi-peng, HOU Jing-yu, WU Lin-lin, CHEN Ting-ting, LI Yue-ting, CHEN Si-ying,  
WANG Ai-min, LI Yong-jun, WANG Yong-lin, LAN Yan-yu\*

(National Engineering Research Center of Miao's Medicines, School of Pharmacy, Engineering Research  
Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of  
Education, Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province,  
Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study on the absorptive characteristics of *Inula cappa* extract in rats by *in situ* intestinal circulating perfusion model. **Method:** Nine representative ingredients in *I. cappa* extract were selected as objects of this study. An UPLC-MS/MS was established to determine their cumulative absorption amount and investigate the absorptive amount of the nine components at different intestinal segments, influence of extract concentration, pH value, P-glycoprotein inhibitor, bile and different intestinal segments on intestinal absorption of

**[收稿日期]** 20170820(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81360680);贵州省优秀青年科技人才培养项目(黔科合人字[2015]11号);贵州省民族药药效物质基础研究科技创新人才团队项目(黔科合平台人才[2016]5613);贵州省高层次创新型人才培养项目(百层次黔科合平台人才[2016]5677);贵州省科技合作计划项目(黔科合LH字[2015]7362)

**[第一作者]** 伍萍,在读硕士,从事中药药代动力学研究,E-mail:735636205@qq.com

**[通信作者]** \*兰燕宇,教授,从事中药药效物质基础及新药开发研究,Tel:0851-6908899,E-mail:yanyu626@126.com

the nine components for expounding the absorptive characteristics of ingredients in different intestinal sections. **Result:** Scopolin in high concentration existed saturation phenomenon, it indicated the transport mechanism of scopolin was active transport in the intestine and the other 8 compounds were passive diffusion. The best absorption sites of luteolin-7-glucoside, 1, 3-*O*-dicaffeoylquinic acid, 4, 5-*O*-dicaffeoylquinic acid and 3, 4-*O*-dicaffeoylquinic acid were jejunum. The best absorption sites of scopolin and 3, 5-*O*-dicaffeoylquinic acid were ileum. The best absorption sites of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid and neochlorogenic acid were duodenum. The absorption of all the compounds were affected by pH and bile. **Conclusion:** All of the nine ingredients in *I. cappa* extract can be absorbed in small intestine, but their absorption rate, the best absorptive site and mechanism are not the same.

[**Key words**] *Inula cappa*; extract; caffeoylquinic acids; intestinal absorption; luteolin-7-glucoside; *in situ* intestinal circulating perfusion model; chlorogenic acid

羊耳菊又名山白芷、白牛胆等,具有散寒解表、祛风消肿、行气止痛作用,主要用于治疗咽喉肿痛、感冒发热等。羊耳菊为贵州省少数民族常用药物,以全草或根茎入药,其具有良好的抗菌、消炎等药用价值,已有多中中成药把羊耳菊作为主要的原料药,如莲菊感冒胶囊、菊黄上清含片等;此外,羊耳菊还作为主药入药于双羊喉痹通颗粒中,该产品已上市且取得良好的销量纪录<sup>[1-4]</sup>。课题组前期对羊耳菊进行了大量研究,确定羊耳菊药材活性部位的获得方式为用60%乙醇提取,经D101型大孔树脂吸附,加60%乙醇洗脱;采用相似度评价系统确定了多批羊耳菊提取物色谱图中9个峰面积较大的共有峰,并鉴定为东莨菪苷,绿原酸,新绿原酸,隐绿原酸,1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,木犀草苷,3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸和4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸。但羊耳菊的吸收机制及药效物质基础一直未能明确,导致产品工艺和质量控制水平低,很难保证羊耳菊及其相关产品的质量和疗效<sup>[5]</sup>,这已成为制约羊耳菊相关制剂升级换代和产业链做大做强的瓶颈。

本实验采用大鼠在体循环肠灌流模型<sup>[6-8]</sup>对羊耳菊提取物中东莨菪苷等9种成分的体内吸收情况进行分析,探究药物浓度,胆汁,P-糖蛋白(P-gp)抑制剂及不同肠段等因素对羊耳菊提取物中9种化学成分吸收的影响,以期获得各成分在肠道的吸收机制,为羊耳菊提取物的口服剂型研究提供理论依据与基础。

## 1 材料

ACQUITY UPLC型超高压液相-三重四级杆质谱联用仪(美国沃特世公司,含MassLynx 4.1质谱工作站),Allegra 64R型低温高速离心机(Beckman Coulter公司),MTN-2800D型氮吹仪(天津奥特塞恩

斯仪器有限公司),HL-2S型蠕动泵(上海青浦沪西仪器厂)。

羊耳菊药材购自贵州龙里县,经贵州医科大学药学院生药学教研室龙庆德副教授鉴定为菊科植物羊耳菊 *Inula cappa* 的干燥全草;新绿原酸,隐绿原酸,1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸和4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,批号分别为X20-20141012, Y58-20141012, 1384-101215, 1384-101215, S34-110121, 1384-101215,纯度均 $\geq 98\%$ );葛根素、木犀草苷、绿原酸对照品(批号分别为110752-201514, 111720-201408, 110753-201415,纯度均 $\geq 98\%$ )及盐酸维拉帕米(批号100223-200102)均购自中国食品药品检定研究院,东莨菪苷对照品(上海同田生物技术有限公司,批号14061442,纯度 $\geq 98\%$ ),水为屈臣氏蒸馏水,甲酸、乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

健康SD大鼠,雌雄兼用,体重(250 $\pm$ 20)g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,合格证号SCXK(渝)2015-0001。本文所涉及的动物实验经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准,批准号1602003。

## 2 方法与结果

**2.1 K-R液的制备** 称取NaCl 7.8g, KCl 0.35g, NaHCO<sub>3</sub> 1.37g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.32g, MgCl<sub>2</sub> 0.02g, CaCl<sub>2</sub> 0.37g和葡萄糖1.40g,用少量水溶解,其中CaCl<sub>2</sub>单独溶解后逐滴加入,葡萄糖临用加入,溶解后用水定容至1L,即得。

**2.2 羊耳菊提取物及其供试液的制备<sup>[9]</sup>** 取羊耳菊药材12kg,充分混匀,加10倍量60%乙醇提取3次,每次1h,合并3次滤液,减压浓缩,回收乙醇,得浓缩液12L。上述浓缩液经D101型大孔树脂吸附

(径高比 1:4),加水洗脱至流出液无颜色后,用 60% 乙醇洗脱,收集洗脱液,水浴蒸干,得浸膏,微波真空干燥,即得。计算得膏率 7%, -4 °C 条件干燥保存,备用。取适量提取物,加入适量 K-R 液,超声 10 min, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液备用, 获得质量浓度分别为 2.5, 5.0, 10.0 g·L<sup>-1</sup> 的供试液, 分别相当于生药质量浓度 35.7, 71.4, 142.8 g·L<sup>-1</sup>。

**2.3 UPLC 色谱条件** ACQUITY® BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), Waters VanGuard BEH C<sub>18</sub> 保护柱 (2.1 mm × 5 mm, 1.7 μm), 柱温 45 °C, 进样量 2 μL, 流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 1.0 min, 5% ~ 15% A; 1.0 ~ 3.8 min, 15% ~ 18% A; 3.8 ~ 4.0 min, 18% ~ 90% A; 4.0 ~ 5.0 min, 90% ~ 5% A)。

**2.4 质谱条件** 电喷雾离子源, 多反应离子监测, 毛细管电离电压 3 kV, 离子源温度 120 °C, 去溶剂 N<sub>2</sub> 温度 350 °C, 流速 650 L·h<sup>-1</sup>, 反吹气 N<sub>2</sub> 流速 50 L·h<sup>-1</sup>, 碰撞气 Ar 流速 0.16 mL·min<sup>-1</sup>, 数据分析为 MassLynx 4.1 工作站。离子对为东莨菪苷 *m/z* (+) 355 ~ 193, 1,3-二咖啡酰基奎宁酸 *m/z* (-) 515.1 ~ 353.1, 木犀草苷 *m/z* (+) 449.2 ~ 287.1, 3,4-二咖啡酰基奎宁酸 *m/z* (-) 515.1 ~ 353.1, 3,5-二咖啡酰基奎宁酸 *m/z* (-) 515.1 ~ 353.1, 4,5-二咖啡酰基奎宁酸 *m/z* (-) 515.1 ~ 353.1, 新绿原酸 *m/z* (-) 353.2 ~ 191.0, 绿原酸 *m/z* (-) 353.1 ~ 191.0, 隐绿原酸 *m/z* (-) 353.2 ~ 172.9, 葛根素 (内标) *m/z* (-) 417.0 ~ 267.0; 锥孔电压分别为 25, 45, 35, 45, 45, 45, 35, 35, 35, 30 eV; 碰撞电压分别为 15, 20, 30, 20, 20, 20, 20, 15, 15, 15 eV。

**2.5 样品的处理** 取样品 200 μL, 置 1.5 mL 塑料离心管中, 加 20 mg·L<sup>-1</sup> 葛根素溶液 (内标) 50 μL, 1% 甲酸水溶液 100 μL, 加入甲醇 400 μL, 涡旋混合 3 min, 15 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 取上清液进样分析。

## 2.6 方法学考察

**2.6.1 专属性** 比较空白肠灌液、含混合对照品的肠灌液及实测样品的色谱行为, 判断 9 种成分是否存在内源性干扰, 见图 1。结果发现空白肠液对指标成分的检测无干扰。

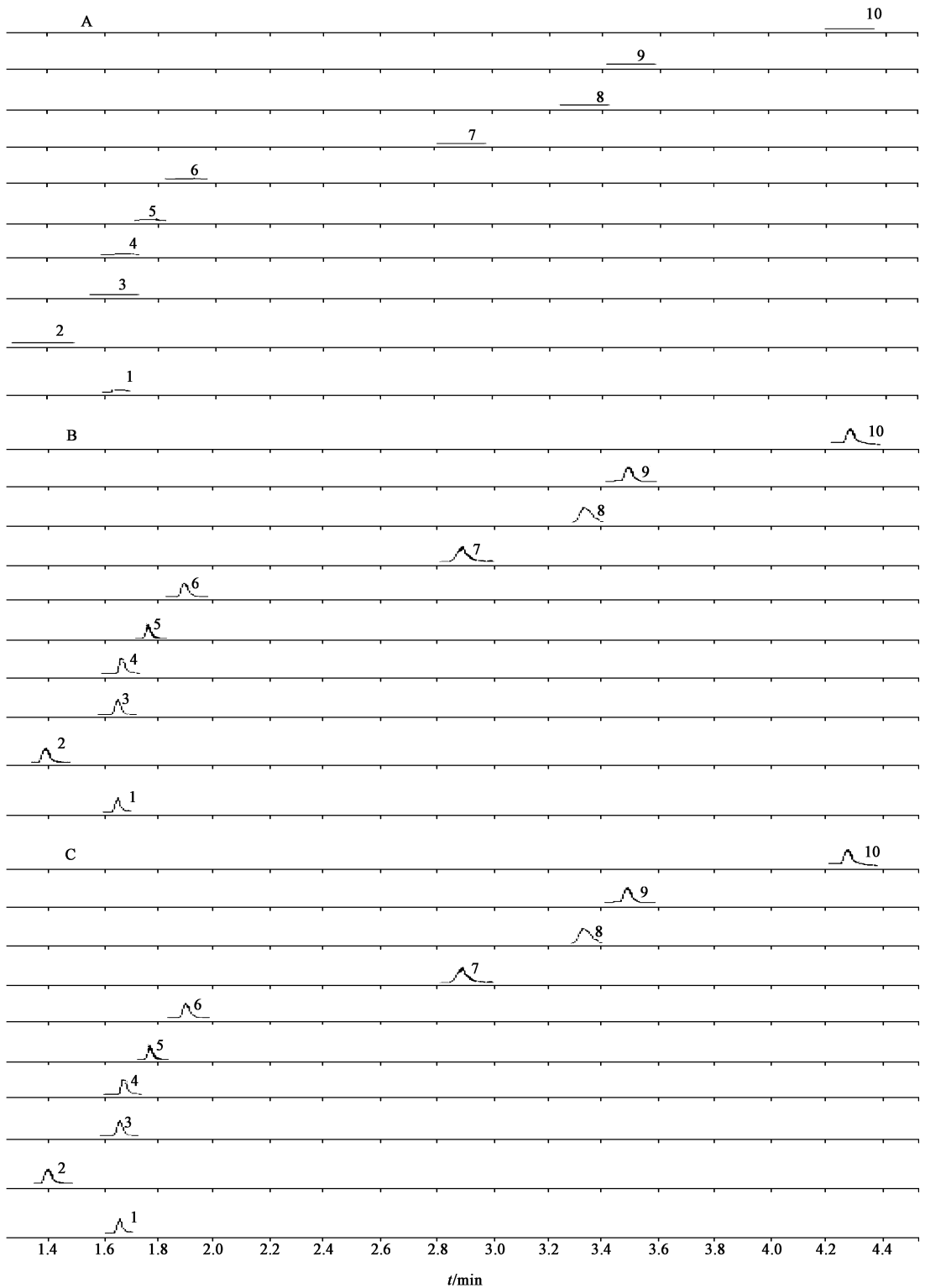
**2.6.2 标准曲线的制备** 分别精密称取东莨菪苷等 9 种对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容。得东莨菪苷 (1.032 g·L<sup>-1</sup>), 绿原酸 (0.740 g·L<sup>-1</sup>), 新绿原酸 (1.032 g·L<sup>-1</sup>), 隐绿原酸 (1.026 g·L<sup>-1</sup>), 1, 3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸

(1.064 g·L<sup>-1</sup>), 木犀草苷 (1.014 g·L<sup>-1</sup>), 3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 (1.032 g·L<sup>-1</sup>), 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 (1.194 g·L<sup>-1</sup>), 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 (1.204 g·L<sup>-1</sup>) 的储备液。精密量取东莨菪苷等 9 种对照品储备液适量, 45 °C 下氮气吹干, 用稀释后的空白 K-R 液溶解, 按梯度稀释成所需质量浓度, 得系列混合对照品溶液。取系列混合对照品溶液各 200 μL, 按 2.5 项下方法操作, 取 1 μL 进样分析, 以待测物峰面积与内标峰面积之比为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得东莨菪苷, 绿原酸, 新绿原酸, 隐绿原酸, 1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸, 木犀草苷, 3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸, 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸, 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的标准曲线分别为  $Y = 1.109X + 0.390$ ,  $Y = 0.265X + 0.330$ ,  $Y = 0.240X + 0.138$ ,  $Y = 0.135X + 0.286$ ,  $Y = 0.078X + 0.225$ ,  $Y = 0.063X + 0.229$ ,  $Y = 0.252X + 0.261$ ,  $Y = 0.210X + 0.468$ ,  $Y = 0.249X + 0.334$ ,  $R^2$  均为 0.998, 线性范围均为 0.02 ~ 98.70 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.6.3 精密度和回收率** 分别配制低、中、高 3 个质量浓度的东莨菪苷等 9 种成分的混合对照品溶液, 每个质量浓度平行配制 5 份, 按 2.5 项下方法操作, 以测得量与加入量之比计算方法回收率。同法分别配制低、中、高 3 个质量浓度的 9 种成分混合对照品溶液, 每个质量浓度平行配制 5 份, 按 2.5 项下方法操作, 计算日内精密度; 3 种质量浓度连续测定 5 d, 计算日间精密度。结果东莨菪苷等 9 种成分的回收率在 89.70% ~ 106.09%, 日内和日间精密度的 RSD 均 < 10%。

**2.6.4 稳定性试验** 按 2.5 项下方法处理同一肠吸收液样品, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 取样分析, 以各指标成分峰面积计算该样品的稳定性。东莨菪苷等 9 种成分峰面积的 RSD 均 < 10%, 说明肠吸收液样品至少在 12 h 内稳定。

**2.6.5 基质效应** 取低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液, 置于离心管中 45 °C 氮气流下吹干, 加入空白 K-R 液 200 μL 使溶解, 按 2.5 项下方法操作, 每个质量浓度进样 5 次, 获得相应峰面积; 另取上述低、中、高 3 个质量浓度的混合对照品溶液, 45 °C 氮气流下吹干, 残留物以初始流动相 200 μL 溶解, 按 2.5 项下方法操作, 每个质量浓度进样 5 次, 获得相应峰面积; 按上述两者的比值计算基质效应。结果东莨菪苷等 9 种待测成分峰面积和内标峰面积的比值均在 106.09% ~ 89.70%, 表明均不存在基质效应。



A. 空白肠灌液; B. 空白肠灌液 + 对照品; C. 样品; 1. 新绿原酸; 2. 东莨菪苷; 3. 绿原酸; 4. 隐绿原酸; 5. 葛根素; 6. 1,3-O-二咖啡酰基奎宁酸; 7. 木犀草苷; 8. 3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸; 9. 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸; 10. 4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸

图 1 羊耳菊肠灌液样品中各成分的 UPLC-MS/MS 色谱

Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of all compounds from *Inula cappa* extract in intestinal perfusate

2.7 羊耳菊提取物在蠕动泵管路中的物理吸附考察 以 K-R 液制备  $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  羊耳菊提取物溶液 50 mL,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温水浴于体外在蠕动泵的管路中循

环 3 h, 分别在 0, 3 h 取样测定 ( $n = 3$ ), 考察羊耳菊提取物中活性成分在蠕动泵管路的吸附情况, 见表 1。结果表明管路对羊耳菊提取物中活性成分无明

显物理吸附作用。

表 1 羊耳菊提取物在循环管路吸附及空白肠循环液中的稳定性考察( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Stability of nine components from *Inula cappa* extract in circuit pipe and blank intestinal perfusate( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

成分	循环管路通过率	空白肠循环液中药物剩余率
东莨菪苷	99.48 ± 3.33	95.15 ± 3.12
1,3- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	98.11 ± 5.57	102.25 ± 6.70
木犀草苷	106.20 ± 5.42	97.29 ± 8.72
3,4- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	96.35 ± 1.69	98.75 ± 6.74
3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	100.60 ± 2.20	102.17 ± 6.54
4,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	106.24 ± 1.60	102.05 ± 2.24
绿原酸	92.13 ± 5.68	95.42 ± 2.59
新绿原酸	93.06 ± 3.25	98.84 ± 3.18
隐绿原酸	93.71 ± 1.33	92.76 ± 8.73

**2.8 羊耳菊提取物在空白肠循环液中的稳定性考察** 取空白 K-R 液 50 mL 于大鼠肠中循环 3 h, 制成空白肠液。以空白肠液制备 5.0 g·L<sup>-1</sup> 羊耳菊提取物溶液, 37 °C 水浴恒温, 分别于 0, 3 h 取样测定, 考察羊耳菊提取物在空白肠液中的稳定性, 见表 1。结果表明羊耳菊提取物在空白肠液中 3 h 稳定。

**2.9 大鼠在体循环灌流模型分析** 给药前大鼠禁食 24 h, 自由饮水。手术前按 1.4 g·kg<sup>-1</sup> 腹腔注射 30% 乌拉坦麻醉, 固定于恒温手术台, 37 °C 保温, 剃毛。沿腹中线腹腔开口 3~4 cm, 小心分离十二指肠, 并结扎总胆管, 再分离出实验肠段, 上端切口插入小硅胶管, 缝合固定, 连接恒流泵, 下端切口插入硅胶管, 固定, 与恒流泵形成回路。十二指肠段自幽门 1 cm 处开始往下 10 cm 止; 空肠段自幽门 15 cm 起往下 10 cm 止; 回肠段自盲肠上行 20 cm 开始往上 10 cm 止; 结肠段从盲肠下端开始往下 10 cm 止。全肠段考察自十二指肠上端起至回肠下端起。灌流前, 用 37 °C 的生理盐水以 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 的流速冲洗肠道至净, 排空水分。取 37 °C 羊耳菊提取物溶液 50 mL, 以 5 mL·min<sup>-1</sup> 流速循环平衡 15 min, 将流速调至 2.5 mL·min<sup>-1</sup>, 立即读出循环液体积并从循环液量筒中取样 1 mL, 作为零时间药物浓度的样品, 另向量筒中补加 K-R 液 1 mL, 分别于 30, 60, 90, 120, 150, 180 min 时同法取样, 循环 3 h 结束实验。根据量筒读数的变化计算大鼠吸水量, 进而计算各时间点药物量, 即剩余药量( $P_m$ )。在循环回路中用

50 mL 量筒盛装含药肠循环液, 每到取样时间点读取液体体积, 待循环完毕, 用空气排净肠内和管路内液体, 即为肠道和管路的死体积。死体积加上每一时间点的量筒读数即为该时间点循环液体积。以此方法进行肠循环液的体积校正。

$$P_m = C_m \times V_m + 1.0 \times \sum_{i=1}^{n-1} C_{i1}$$

$$A = (P_0 - P_{i3}) / P_0 \times 100\%$$

式中  $P_m$  为  $t_n$  时刻循环液中药物量,  $C_{i1}$  为循环液药物初始质量浓度,  $V_{i1}$  为循环液初始体积,  $C_m$  为  $t_n$  时刻循环液药物质量浓度,  $V_m$  为  $t_n$  时刻循环液体积,  $t_n$  为循环液灌注时间,  $P_{i1}$  为循环液中初始药物量,  $A$  为 3 h 累计吸收转化率,  $P_0$  为 0 h 剩余药量;  $P_{i3}$  为 3 h 剩余药量。以小肠内剩余药量的自然对数与取样时间  $t$  作图, 所得直线斜率即为吸收速率常数( $K_a$ )。

**2.9.1 羊耳菊提取物的 pH 对有效成分肠吸收的影响** 取禁食后的大鼠, 随机分成 4 组, 每组 4 只, 分别考察质量浓度为 5.0 g·L<sup>-1</sup> 的不同 pH (5.0, 6.0, 6.86, 7.4) 羊耳菊活性部位供试液中东莨菪苷等 9 种成分的  $K_a$  和 3 h 累计吸收率 ( $A$ ), 结果表明各成分的吸收均受 pH 的影响, pH 为 6.0 时各成分的 3 h 累计吸收率较大, 故选择 pH 6.0 进行后续实验。见表 2。

**2.9.2 羊耳菊提取物的质量浓度对肠吸收的影响** 取禁食后的大鼠, 随机分成 3 组, 每组 4 只, 考察质量浓度为 2.5, 5.0, 10.0 g·L<sup>-1</sup> (pH 6.0) 的羊耳菊提取物供试液中东莨菪苷等 9 种成分的  $K_a$  和  $A$ , 见表 3。结果发现东莨菪苷在高质量浓度条件下存在饱和现象, 提示其体内吸收过程可能为主动转运, 其余成分基本呈随质量浓度的增加累计吸收率逐渐增加的趋势, 符合一级线性吸收动力学特征, 表明其余 8 个成分的吸收机制可能为被动扩散。

**2.9.3 胆汁对羊耳菊提取物肠吸收的影响** 取禁食后的大鼠, 随机分成 2 组, 每组 4 只, 按 2.9 项下方法操作, 不结扎胆管 (对照组结扎胆管), 提取物质量浓度选择 5.0 g·L<sup>-1</sup> 羊耳菊提取物溶液 (pH 6.0) 50 mL 作为肠灌流液, 通过整肠段循环试验比较  $A$ 。通过方差分析比较 3 h 结扎和不结扎胆管的羊耳菊提取物供试液中各成分的  $A$ , 结果表明胆汁对东莨菪苷、木犀草苷、新绿原酸和隐绿原酸的吸收均具有明显抑制作用, 对 3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的吸收有显著的促进作用。故实验之前需进行胆管结扎, 以排除胆汁对各成分吸收的影响, 保证实验数据可靠。见表 4。

表 2 羊耳菊提取物供试液的 pH 对有效成分肠吸收的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 2 Absorption percentages and  $K_a$  of nine components in *Inula cappa* extract under different pH ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

化合物	pH 7.4		pH 6.86		pH 6.0		pH 5.0	
	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$
东莨菪苷	79.2 ± 2.0	0.516 ± 0.082	76.8 ± 1.8	0.504 ± 0.038	80.6 ± 3.0	0.549 ± 0.004	67.2 ± 4.7 <sup>1)</sup>	0.379 ± 0.007 <sup>2)</sup>
1,3- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	21.5 ± 7.9 <sup>1)</sup>	0.067 ± 0.027 <sup>1)</sup>	23.2 ± 4.5 <sup>1)</sup>	0.080 ± 0.009 <sup>1)</sup>	63.3 ± 3.3	0.279 ± 0.007	52.7 ± 2.3 <sup>1)</sup>	0.275 ± 0.022
木犀草苷	85.2 ± 7.3 <sup>1)</sup>	0.320 ± 0.087 <sup>1)</sup>	95.0 ± 2.1	1.142 ± 0.097 <sup>1)</sup>	97.2 ± 4.0	1.468 ± 0.030	87.1 ± 4.0 <sup>1)</sup>	0.668 ± 0.059 <sup>2)</sup>
3,4- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	25.6 ± 5.4 <sup>1)</sup>	0.110 ± 0.008 <sup>1)</sup>	24.3 ± 2.6 <sup>1)</sup>	0.101 ± 0.010 <sup>1)</sup>	55.8 ± 1.1	0.276 ± 0.027	55.6 ± 2.7	0.286 ± 0.029
3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	38.1 ± 2.6 <sup>1)</sup>	0.158 ± 0.020 <sup>1)</sup>	32.6 ± 4.1 <sup>1)</sup>	0.167 ± 0.041 <sup>1)</sup>	56.9 ± 3.8	0.245 ± 0.033	38.3 ± 5.2 <sup>1)</sup>	0.183 ± 0.010 <sup>1)</sup>
4,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	49.9 ± 2.9 <sup>1)</sup>	0.271 ± 0.070	59.4 ± 7.1	0.277 ± 0.054	58.6 ± 1.8	0.286 ± 0.016	49.2 ± 8.3 <sup>1)</sup>	0.219 ± 0.009 <sup>1)</sup>
绿原酸	36.3 ± 1.1 <sup>1)</sup>	0.131 ± 0.019 <sup>1)</sup>	46.3 ± 3.8 <sup>1)</sup>	0.270 ± 0.027 <sup>1)</sup>	54.2 ± 6.1	0.231 ± 0.030	48.9 ± 6.7	0.074 ± 0.023 <sup>1)</sup>
新绿原酸	30.5 ± 2.2 <sup>1)</sup>	0.238 ± 0.014	38.7 ± 6.5 <sup>1)</sup>	0.158 ± 0.010 <sup>1)</sup>	60.5 ± 6.5	0.242 ± 0.025	45.9 ± 1.5 <sup>1)</sup>	0.157 ± 0.022 <sup>1)</sup>
隐绿原酸	35.3 ± 3.8 <sup>1)</sup>	0.249 ± 0.023	43.8 ± 3.6 <sup>1)</sup>	0.249 ± 0.006	60.4 ± 2.9	0.258 ± 0.038	51.9 ± 6.6 <sup>1)</sup>	0.251 ± 0.022

注:与 pH 6.0 组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

表 3 羊耳菊提取物供试液的质量浓度对肠吸收的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 3 Absorption percentages and  $K_a$  of nine components in *Inula cappa* extract under different concentration ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

化合物	2.5 g·L <sup>-1</sup>		5.0 g·L <sup>-1</sup>		10 g·L <sup>-1</sup>	
	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$
东莨菪苷	83.7 ± 9.4	0.534 ± 0.062	78.1 ± 5.6	0.530 ± 0.024	76.3 ± 5.8	0.511 ± 0.082
1,3- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	23.9 ± 4.0	0.064 ± 0.009	27.8 ± 1.9	0.100 ± 0.007	30.7 ± 3.9	0.100 ± 0.009
木犀草苷	80.6 ± 1.4	0.418 ± 0.010	79.2 ± 1.0	0.543 ± 0.011	81.7 ± 1.7	0.620 ± 0.035
3,4- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	32.0 ± 4.1	0.111 ± 0.005	36.5 ± 3.2	0.157 ± 0.006	38.1 ± 1.0	0.138 ± 0.003
3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	30.0 ± 1.4	0.053 ± 0.008	38.8 ± 2.1	0.130 ± 0.003	43.8 ± 4.5	0.223 ± 0.009
4,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	29.8 ± 3.6	0.134 ± 0.004	34.3 ± 3.9	0.135 ± 0.012	39.0 ± 5.3	0.140 ± 0.006
绿原酸	33.6 ± 2.0	0.100 ± 0.007	35.5 ± 2.4	0.142 ± 0.003	53.7 ± 4.8	0.307 ± 0.019
新绿原酸	23.6 ± 4.5	0.063 ± 0.005	24.8 ± 6.9	0.076 ± 0.007	25.4 ± 4.3	0.062 ± 0.005
隐绿原酸	28.9 ± 4.2	0.081 ± 0.010	33.9 ± 5.7	0.193 ± 0.047	35.2 ± 1.4	0.138 ± 0.002

表 4 胆汁及 P-gp 抑制剂对羊耳菊提取物肠吸收的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Table 4 Effect of bile and verapamil on intestinal absorption of nine components in *Inula cappa* extract ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

化合物	对照组 (结扎胆管)		不结扎胆管		P-gp 抑制剂	
	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$
东莨菪苷	88.9 ± 0.6	0.755 ± 0.062	77.2 ± 5.8 <sup>2)</sup>	0.470 ± 0.099 <sup>1)</sup>	94.3 ± 0.6 <sup>1)</sup>	0.969 ± 0.089 <sup>1)</sup>
1,3- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	53.3 ± 5.1	0.258 ± 0.051	55.9 ± 5.8	0.372 ± 0.092 <sup>1)</sup>	30.5 ± 5.0 <sup>2)</sup>	0.122 ± 0.032 <sup>1)</sup>
木犀草苷	94.9 ± 1.4	1.091 ± 0.097	81.4 ± 6.3 <sup>2)</sup>	0.621 ± 0.098 <sup>1)</sup>	82.8 ± 1.1 <sup>2)</sup>	1.054 ± 0.007
3,4- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	41.9 ± 8.2	0.200 ± 0.065	53.6 ± 9.5 <sup>1)</sup>	0.231 ± 0.071	26.8 ± 8.2 <sup>1)</sup>	0.090 ± 0.024 <sup>1)</sup>
3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	42.9 ± 7.2	0.207 ± 0.074	52.5 ± 7.2 <sup>1)</sup>	0.251 ± 0.062	31.1 ± 3.3 <sup>2)</sup>	0.126 ± 0.031
4,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	33.6 ± 8.1	0.179 ± 0.079	39.9 ± 2.1	0.170 ± 0.074	23.6 ± 9.9	0.101 ± 0.028
绿原酸	35.5 ± 2.4	0.142 ± 0.013	30.0 ± 1.4	0.113 ± 0.010	31.6 ± 6.9	0.110 ± 0.008
新绿原酸	35.4 ± 4.3	0.062 ± 0.005	18.0 ± 2.1 <sup>1)</sup>	0.040 ± 0.006 <sup>1)</sup>	35.4 ± 5.7	0.069 ± 0.018
隐绿原酸	35.2 ± 1.4	0.138 ± 0.002	15.3 ± 3.8 <sup>1)</sup>	0.006 ± 0.002 <sup>1)</sup>	34.8 ± 4.4	0.088 ± 0.005 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**2.9.4 P-gp 抑制剂对羊耳菊提取物肠吸收的影响**  
取禁食后的大鼠,随机分成 2 组,每组 4 只,按 2.9 项下方法操作,选择  $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  羊耳菊提取物溶液 (pH 6.0) 50 mL 作为肠灌流液,进行全肠段试验,考察加入 P-gp 抑制剂维拉帕米后这 9 种成分的吸收情况,比较 A,见表 4。通过比较 A,方差分析结果表明加入含  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  P-gp 抑制剂盐酸维拉帕米后东莨菪苷吸收增加,且具有显著性差异;1,3-O-二咖啡酰基奎宁酸,木犀草苷,3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸和 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸的吸收显著降低。说明东莨菪苷可能是 P-gp 的底物,其余成分可能并不是药物转运蛋白 P-gp 的底物。

**2.9.5 羊耳菊提取物在不同肠段的吸收特点分析**  
比较不同肠段各成分的 A,东莨菪苷在回肠的吸

收显著大于十二指肠,结肠的吸收显著小于十二指肠;木犀草苷在空肠的吸收大于十二指肠,在结肠的吸收显著小于十二指肠;1,3-O-二咖啡酰基奎宁酸,3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸和 4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸在空肠的吸收显著大于十二指肠;3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸在回肠的吸收显著大于十二指肠;绿原酸在空肠的吸收显著小于十二指肠,新绿原酸和隐绿原酸在空肠、回肠和结肠的吸收均显著小于十二指肠。综合表明,木犀草苷,1,3-O-二咖啡酰基奎宁酸,3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸和 4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸的主要吸收部位在空肠,东莨菪苷和 3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸的主要吸收部位在回肠,绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的主要吸收部位在十二指肠。见表 5。

表 5 羊耳菊提取物在各肠段的吸收特点分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 5 Absorption percentages and  $K_a$  of nine components in *Inula cappa* extract at different intestinal segments ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

化合物	十二指肠		空肠		回肠		结肠	
	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$	A/%	$K_a/\text{min}^{-1}$
东莨菪苷	26.6 ± 2.4	0.063 ± 0.008	25.6 ± 3.6	0.074 ± 0.008	36.6 ± 1.5 <sup>1)</sup>	0.145 ± 0.007 <sup>1)</sup>	14.7 ± 0.6 <sup>1)</sup>	0.071 ± 0.006
1,3-O-二咖啡酰基奎宁酸	22.9 ± 6.3	0.064 ± 0.025	28.4 ± 4.1 <sup>1)</sup>	0.074 ± 0.010	20.5 ± 3.3	0.083 ± 0.007	5.2 ± 2.7 <sup>1)</sup>	0.016 ± 0.005 <sup>1)</sup>
木犀草苷	26.0 ± 8.5	0.110 ± 0.003	25.9 ± 6.3	0.113 ± 0.004	23.1 ± 4.4 <sup>1)</sup>	0.107 ± 0.008	15.8 ± 3.9 <sup>1)</sup>	0.049 ± 0.003 <sup>1)</sup>
3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸	21.5 ± 8.7	0.033 ± 0.009	31.3 ± 4.0 <sup>1)</sup>	0.103 ± 0.004 <sup>1)</sup>	22.5 ± 6.0	0.101 ± 0.002 <sup>1)</sup>	16.5 ± 3.4 <sup>1)</sup>	0.034 ± 0.009
3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸	30.5 ± 4.1	0.107 ± 0.010	21.8 ± 4.5 <sup>1)</sup>	0.173 ± 0.007 <sup>1)</sup>	42.2 ± 5.8 <sup>1)</sup>	0.204 ± 0.013 <sup>1)</sup>	22.4 ± 5.8 <sup>1)</sup>	0.080 ± 0.023 <sup>1)</sup>
4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸	21.6 ± 7.5	0.021 ± 0.009	38.9 ± 2.5 <sup>1)</sup>	0.195 ± 0.007 <sup>1)</sup>	22.8 ± 3.1 <sup>1)</sup>	0.072 ± 0.010 <sup>1)</sup>	14.5 ± 6.0 <sup>1)</sup>	0.047 ± 0.007 <sup>1)</sup>
绿原酸	18.8 ± 7.1	0.075 ± 0.018	15.2 ± 4.0 <sup>1)</sup>	0.035 ± 0.007 <sup>1)</sup>	16.5 ± 5.5	0.063 ± 0.008	16.8 ± 0.4	0.064 ± 0.009
新绿原酸	14.7 ± 3.3	0.036 ± 0.018	5.7 ± 2.9 <sup>1)</sup>	0.014 ± 0.003 <sup>1)</sup>	7.8 ± 4.7 <sup>1)</sup>	0.042 ± 0.005	10.3 ± 2.5 <sup>1)</sup>	0.033 ± 0.006
隐绿原酸	19.9 ± 7.6	0.051 ± 0.033	11.9 ± 5.9 <sup>1)</sup>	0.055 ± 0.006	10.6 ± 5.6 <sup>1)</sup>	0.042 ± 0.010	5.3 ± 0.7 <sup>1)</sup>	0.023 ± 0.006 <sup>1)</sup>

注:与十二指肠比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

研究药物的肠道吸收能够了解药物在肠道的吸收行为,有利于剂型的选择和辅料的筛选,从而提高药物的生物利用度,指导临床合理用药。药物肠吸收研究主要采用在体肠灌流模型等,在体法不切断血管及神经,可保持胃肠道神经和内分泌输入的完好无损以及胃肠道内容物中酶的活性,也保证了血液及淋巴液供应不变,生物活性有所提高,测得的吸收速率等指标与体内法相近,且能消除胃肠内容物的排出和消化管固有运动性等生理因素的影响。

预试验使用了常用的单向灌流法<sup>[10]</sup>,此法为选取一段在体肠段,用生理盐水将肠内容物冲洗干净后,上下两端插管,灌流液从上端开始灌流,从下端

收集流出液,测定其变化,确定药物的吸收情况。但其实验结果不稳定,易出现负值。分析原因可能为①羊耳菊活性部位中的成分本身含量较小,计算误差导致了负值的出现;②单向灌流法多采用 15 min 取样 1 次,而循环法为 30 min 取样 1 次,累计循环 3 h,通过循环药液使吸收量累加,可能更适合于本身在肠道的吸收量小的化合物,从而获得较为稳定的数据。故最终选择循环灌流法进行实验。

羊耳菊提取物中 9 种活性成分在肠道的吸收结果表明,东莨菪苷在肠道的吸收转运机制可能为主动转运过程,绿原酸等其余 8 个成分在肠道的吸收机制可能不是单纯的被动扩散过程,可能存在一个复杂的动力学过程。各成分的吸收均受 pH 和胆汁

的影响,木犀草苷,1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸,3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸和4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的主要吸收部位在空肠,东莨菪苷和3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的主要吸收部位在回肠,绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的主要吸收部位在十二指肠,此外,本研究发现东莨菪苷可能是P-gp的底物,其余8个成分可能并不是P-gp的底物。但本文也存在一定的局限性,由于在体循环肠灌注试验是根据药液循环灌注后从药液中消失的成分含量来推算最终的药物吸收量,此方法可能存在假阳性,即成分未被吸收而只是被肠壁,如一些微绒毛吸附,因此应当考察一下肠管对药液中成分的吸附情况,以排除可能存在干扰实验的假阳性结果。

[参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 苗药卷[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:273-274.  
[2] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:176.  
[3] Bohlmann F, Ahmed M, Jakupovic J. Inositol angelates from *Inula cappa*[J]. Phytochemistry,1982,21(3):780-782.

[4] 《中国民族药志》编委会. 中国民族药志[M]. 成都:四川民族出版社,2007:257-258.  
[5] 姚波,杨树德,梁晓原. 羊耳菊的生药学研究[J]. 云南中医中药杂志,2010,31(9):39-41.  
[6] 陈束叶,李铜铃,张洁,等. 盐酸帕罗西汀大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中国药学杂志,2007,42(8):617-620.  
[7] 胡熙曦,金桂兰,陈进兵,等. 三七总皂苷中人参皂苷Rg<sub>1</sub>大鼠在体肠吸收特征[J]. 中国医院药学杂志,2014,34(12):998-1023.  
[8] Bowles S L, Ntamo Y, Malherbe C J, et al. Intestinal transport and absorption of bioactive phenolic compounds from a chemically characterized aqueous extract of *Athrixia phylicoides* [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 200(3):45-50.  
[9] 陈祖云,迟明艳,兰燕宇. 贵州民族药羊耳菊活性成分提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(8):7-10.  
[10] 许永崧,韩晓凤,龚慕辛,等. 单向在体肠灌注在中药研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(1):211-218.

[责任编辑 刘德文]