

# 沙棘总黄酮的大鼠肠吸收特性考察

申雪丽<sup>1</sup>, 袁勇<sup>2</sup>, 黄川生<sup>2</sup>, 王新春<sup>1,2\*</sup>, 尹俊涛<sup>3</sup>

(1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002; 2. 石河子大学医学院一附院, 新疆 石河子 832008;  
3. 石河子开发区神内食品有限公司, 新疆 石河子 832000)

**[摘要]** 目的: 考察沙棘总黄酮在大鼠小肠的吸收特性。方法: 运用大鼠在体单向灌流和离体外翻肠囊模型, 采用 HPLC 测定槲皮素、山奈酚、异鼠李素含量, 计算沙棘总黄酮在大鼠小肠的吸收参数。结果: 沙棘总黄酮中槲皮素、山奈酚、异鼠李素的吸收部位分别为回肠、回肠、十二指肠, 吸收速率常数 ( $K_a$ ) 分别为  $3.405 \times 10^{-2}$ ,  $3.649 \times 10^{-2}$ ,  $5.671 \times 10^{-2}$ , 沙棘总黄酮质量浓度在  $50 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,  $K_a$  和表观吸收系数无显著性差异。累积吸收量随药物质量浓度升高呈线性增加。结论: 沙棘提取物中 3 种黄酮类成分均呈现一级动力学特征, 吸收机制均为被动扩散, 且在小肠有特定吸收部位。

**[关键词]** 沙棘总黄酮; 槲皮素; 山奈酚; 异鼠李素; 吸收机制

**[中图分类号]** R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0061-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013180061

## Investigation of Rat Intestinal Absorption Properties of Total Flavonoids from Hippophae Fructus

SHEN Xue-li<sup>1</sup>, YUAN Yong<sup>2</sup>, HUANG Chuan-sheng<sup>2</sup>, WANG Xin-chun<sup>1,2\*</sup>, YIN Jun-tao<sup>3</sup>

(1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

2. First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi 832008, China;

3. Shihezi Development Zone Shennei Food Co. Ltd, Shihezi 832000, China)

**[收稿日期]** 20130218(008)

**[基金项目]** 新疆建设兵团火炬计划项目(2011BD021); 国家自然科学基金-新疆联合基金重点项目(U1203204)

**[第一作者]** 申雪丽, 在读硕士, 从事中药民族药新制剂及新剂型研究, Tel: 0993-2855827, E-mail: 393852090@qq.com

**[通讯作者]** \*王新春, 博士, 主任药师, 从事中药民族药新制剂与新剂型的研究, Tel: 0993-2855827, E-mail: cwjwxc@163.com

- [7] 贺丰, 罗佳波. 麻黄汤中臣、佐、使药对君药中麻黄碱的人体内过程的影响[J]. 中草药, 2005, 36(9): 1313.
- [8] 葛斌, 罗燕梅, 许爱霞, 等. HPLC 测定麻黄药材中麻黄碱与伪麻黄碱的含量[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(3): 173.
- [9] 刘睿, 王宁, 刘志辉. RP-HPLC 同时测定宣肺止咳口服液中含麻黄碱、伪麻黄碱及苦杏仁苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 91.
- [10] 查道成, 冯冬兰, 李林晓, 等. HPLC 法测定冯了性风湿跌打药酒中盐酸麻黄碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 139.
- [11] 王瑞明, 张玲, 倪艳, 等. HPLC 测定苏杏胶囊中盐酸麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 中成药, 2005, 27(6): 651.
- [12] 金阳. HPLC 测定小儿咳喘灵颗粒中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱的含量[J]. 安徽医药, 2007, 11(11): 992.
- [13] 付应华, 杜静. RP-HPLC 测定清肺饮口服液中盐酸麻黄碱和伪麻黄碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(8): 1148.
- [14] 韩桂茹, 赵志军, 黄占群, 等. 药材、制剂、半成品中麻黄碱、伪麻黄碱和苦杏仁苷的同时定量研究[J]. 中成药, 2005, 27(4): 419.
- [15] 唐俞芳. 浅谈麻黄中麻黄碱的提取、分离与检识[J]. 中国中医药现代远程教育, 2011, 9(20): 147.
- [16] 李峰, 吴军正, 刘斌, 等. 动物实验用脱毛剂配方的改进[J]. 实用口腔医学杂志, 1998, 14(4): 298.
- [17] 梁秉文. 中药经皮给药制剂技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 38.

[责任编辑 全燕]

**[ Abstract ] Objective:** To investigate rat intestinal absorption characteristics of total flavonoids from Hippophae Fructus. **Method:** *In vitro* everted gut sac model and *in situ* rat single-pass perfusion model were adopted, the contents of quercetin, kaempferol and isorhamnetin were determined by HPLC, rat intestinal absorption parameters of total flavonoids from Hippophae Fructus were calculated. **Result:** The best absorption parts of quercetin, kaempferol, isorhamnetin was ileum, ileum and duodenum, respectively. Absorption rate constant ( $K_a$ ) of these three ingredients were  $3.405 \times 10^{-2}$ ,  $3.649 \times 10^{-2}$ ,  $5.671 \times 10^{-2}$ , respectively.  $K_a$  and apparent absorption coefficient had no significant difference when the concentration of total flavonoids from Hippophae Fructus was  $50-200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . A positive correlation was found between drug concentration and accumulated absorption amount. **Conclusion:** Absorption characteristics of these three main flavonoids components were consistent, all complied with the first order absorption kinetics, absorption mechanisms of them were passive diffusion, and they had specific absorption site in small intestine.

**[ Key words ]** total flavonoids from Hippophae Fructus; quercetin; kaempferol; isorhamnetin; absorption mechanism

沙棘总黄酮为黄色或棕黄色粉末,主要包括槲皮素、山柰酚、异鼠李素 3 种成分,3 种成分结构相似,均具有抗心肌缺血缺氧、抗心率失常、提高耐缺氧能力等药理作用<sup>[1-2]</sup>。目前,已有初步探讨沙棘总黄酮中单体成分吸收机制的研究,但同时对沙棘总黄酮提取物中多组分吸收特性的研究未见报道<sup>[3]</sup>。本实验采用大鼠在体单向灌流模型和离体的外翻肠囊模型,考察沙棘总黄酮中槲皮素、山柰酚、异鼠李素在大鼠小肠的吸收特性,为真实体现沙棘总黄酮的肠吸收特点提供参考,为沙棘总黄酮口服新剂型设计和临床合理给药提供依据。

## 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),HH-S11-Z 型电热恒温水浴锅(北京长安科学仪器厂),TG-16B 型台式高速离心机(中国湖南长沙凯达科学仪器有限公司),BT01-100 型蠕动泵驱动器(保定兰格恒流泵有限公司),CP64 型电子分析天平(奥豪斯国际贸易有限公司)。

沙棘总黄酮提取物(西安诚缘生物工程有限公司,质量分数 41.3%,槲皮素,山柰酚和异鼠李素质量分数依次为 9.6%,3.3%,28.4%),槲皮素、山柰酚及异鼠李素对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 100081-200907,110861-200808,110860-200608),磷酸盐缓冲溶液(取  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾溶液 250 mL,加  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 118 mL,用水稀释至 1 L,摇匀,即得 PBS 缓冲液),乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

健康 Wistar 大鼠(雌雄各半),体重( $200 \pm 20$ ) g,清洁 II 级,由新疆医科大学实验动物中心提供,合格证号新医动字第 2003-0001 号。

## 2 方法与结果

### 2.1 沙棘总黄酮 HPLC 分析<sup>[4]</sup>

**2.1.1 色谱条件** Diamonsil- $C_{18}$  色谱柱( $4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ ),流动相乙腈(A)-0.6% 磷酸(B)梯度洗脱(0~10 min,34%~33% A;10~20 min,33%~32% A;20~30 min,32%~31% A;30~40 min,31%~34% A),流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 370 nm,柱温  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量  $20 \mu\text{L}$ 。

**2.1.2 方法学验证** 精密称取槲皮素、山柰酚和异鼠李素对照品适量至量瓶中,加甲醇制成质量浓度分别为 210,190,220  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合对照品储备液。分别精密吸取不同体积的对照品储备液,用 PBS 缓冲液稀释成系列混合对照品溶液,按上述色谱条件分别进样,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y_{\text{槲皮素}} = 92118X - 17266 (r = 0.9993)$ ,  $Y_{\text{山柰酚}} = 77732X - 75270 (r = 0.9992)$ ,  $Y_{\text{异鼠李素}} = 97160X - 62155 (r = 0.9998)$ ,线性范围依次为 1.68~26.88,1.52~24.32,1.76~28.16  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。精密称取槲皮素、山柰素、异鼠李素的混合对照品适量,用空白肠循环液(PBS 缓冲液于大鼠小肠中循环 2 h,制成空白肠液)溶解并定容,按 2.1.1 项下条件分析,结果槲皮素、山柰素、异鼠李素的平均回收率均在 100.3%~102.1%,RSD 均 < 4%,符合含量测定要求。以空白肠液制备  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的沙棘总黄酮供试品溶液,置 ( $37 \pm 0.5$ )  $^\circ\text{C}$  恒温水浴中保温 2.5 h,分别于 0,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 h 取样,测定 3 种黄酮类成分含量,结果槲皮素、山柰酚、异鼠李素含量的 RSD 分别为 2.37%,3.07%,2.85%,说明沙棘总黄酮在空白肠液中稳定性良好。

**2.2 大鼠在体单向灌流试验** 试验前将大鼠禁食

过夜(自由饮水),按  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,固定,沿腹部正中中线打开腹腔,分离十二指肠、空肠、回肠、结肠 4 个待考察肠段,分别在肠段两端插管,用等渗生理盐水浸渍的纱布覆盖于肠组织表面以保湿,用等渗生理盐水冲洗肠内容物后,取预热至  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  的沙棘总黄酮供试品溶液用一恒速泵灌流肠腔,流速  $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,约 0.5 h 后开始接收灌流流出液,随后每隔 15 min 收集 1 份,共收集 5 份。采用质量法对灌流液的流入、流出体积进行校正,消除水分变化对结果的影响<sup>[5-6]</sup>,测定各肠段长度、灌流液质量及药物质量浓度。分别对大鼠十二指肠、空肠、回肠及结肠连续灌流 105 min,比较沙棘总黄酮提取物中 3 种成分的吸收速率常数(Ka)和表观吸收系数( $P_{\text{app}}$ ),见表 1。

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{\text{out}} Q_{\text{out}}}{C_{\text{in}} Q_{\text{in}}}\right) \frac{Q}{V}$$

表 1 沙棘总黄酮在大鼠不同肠段和不同质量浓度沙棘总黄酮的 Ka 和  $P_{\text{app}}$  ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

灌流液	剂量 /mg·L <sup>-1</sup>	Ka × 10 <sup>-2</sup> /min <sup>-1</sup>			$P_{\text{app}} \times 10^{-3}$ /cm·min <sup>-1</sup>		
		槲皮素	山奈酚	异鼠李素	槲皮素	山奈酚	异鼠李素
十二指肠	-	2.08 ± 0.82	2.76 ± 0.93	5.67 ± 1.80	1.74 ± 6.29	2.35 ± 0.76	4.94 ± 0.72
空肠	-	0.48 ± 0.78	2.09 ± 1.02	2.17 ± 0.99	0.47 ± 1.09	1.78 ± 0.85	1.84 ± 1.34
回肠	-	3.40 ± 0.64	3.65 ± 0.94	4.13 ± 0.59	3.60 ± 0.97	3.96 ± 0.76	4.55 ± 1.13
结肠	-	1.72 ± 1.18	0.82 ± 1.21	1.82 ± 1.13	1.44 ± 0.89	0.69 ± 0.78	1.50 ± 0.89
单向	50	4.90 ± 1.21	3.08 ± 1.14	5.84 ± 0.74	4.19 ± 1.11	4.38 ± 0.79	5.31 ± 0.69
	100	3.90 ± 0.63	3.15 ± 0.94	2.83 ± 1.29	3.70 ± 0.97	3.96 ± 0.76	4.94 ± 1.26
	200	4.39 ± 1.34	5.67 ± 0.84	6.13 ± 0.63	4.19 ± 1.04	3.58 ± 1.04	4.84 ± 0.92

oneway ANOVA 两两比较分析,结果发现槲皮素、山奈酚、异鼠李素 3 种成分 Ka 和  $P_{\text{app}}$  均无显著性差异,说明 3 种成分在  $50 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,吸收不存在自身质量浓度抑制作用,符合 Ficks 扩散原理,提示槲皮素、山奈酚、异鼠李素的小肠吸收均表现为被动扩散吸收机制。

**2.3 大鼠外翻肠囊法试验** 大鼠禁食过夜(自由饮水),腹腔注射戊巴比妥钠麻醉( $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),固定,沿腹部正中中线打开腹腔,分离待考察肠段,用冰冷的 PBS 液洗净内容物,去除肠系膜,一端用细线扎紧,用细玻璃棒轻柔地将肠管翻转使黏膜面朝外,另一端固定于取样管上,用注射器从取样口向肠内注入空白 PBS 液 2 mL,作为受药体系。迅速将此肠段置入一通有 95% O<sub>2</sub> 及 5% CO<sub>2</sub> 的混合气体( $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ )的 25 mL 预热至  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  的沙棘黄酮供试液的烧杯中,置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温水浴中,分别于 15, 45, 75 min 从肠囊内取样 0.2 mL,同时补充等温等体积

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

式中  $Q_{\text{in}}$  和  $Q_{\text{out}}$  分别为肠道进出口灌流液的体积,  $C_{\text{in}}$  和  $C_{\text{out}}$  分别为肠道进出口灌流液的质量浓度,  $l$  和  $r$  分别为被灌流肠段的长度和横截面半径,  $Q$  为灌流速度,  $V$  为灌流肠段的体积。结果发现槲皮素在大鼠不同肠段的吸收情况为回肠 > 空肠 > 十二指肠 > 结肠,回肠与十二指肠、空肠、结肠的 Ka 和  $P_{\text{app}}$  均具有显著性差异;山奈酚在大鼠不同肠段中吸收情况为回肠 > 十二指肠 > 空肠 > 结肠,回肠与其他肠段的 Ka 和  $P_{\text{app}}$  具有显著性差异;异鼠李素的吸收情况为十二指肠 > 回肠 > 空肠 > 结肠,可见,沙棘总黄酮中 3 种成分在小肠的最佳吸收部位稍有差异。

分别取 3 个不同质量浓度的供试品溶液进行单向灌流,计算 Ka 和  $P_{\text{app}}$ ,见表 1,采用 SPSS 17.0 中

的 PBS 缓冲液<sup>[7]</sup>。样品用 PBS 缓冲液稀释至标准曲线范围内,采用 HPLC 测定,以肠囊内药物质量浓度的对数  $\ln C_i$  对  $t$  进行回归,得 3 种黄酮类成分的吸收回归方程,计算药物累积吸收量( $Q$ )和 Ka<sup>[8-9]</sup>,见表 2。

表 2 不同质量浓度沙棘黄酮中 3 种成分的 Ka ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

沙棘黄酮 /mg·L <sup>-1</sup>	槲皮素	山奈酚	异鼠李素
50	3.54 ± 0.89	4.04 ± 0.67	4.29 ± 1.06
100	3.91 ± 0.78	4.13 ± 0.54	4.12 ± 0.85
200	3.63 ± 1.32	3.80 ± 0.67	3.98 ± 0.98

$$Q = 2C_n + 0.2 \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

式中  $C_n$  是第  $n$  个取样点测得的药物质量浓度,  $C_i$  第  $i$  个取样点测得的药物质量浓度。结果表明 3 种黄酮类成分的  $Q$  随药物质量浓度的增加而

增加,符合 Fick 扩散原理,且无高质量浓度饱和现象。3 种成分在不同质量浓度的  $K_a$  基本不变,说明供试液在此质量浓度范围内的大鼠小肠吸收为一级动力学过程,即沙棘总黄酮的肠吸收机制为被动扩散。

### 3 讨论

沙棘总黄酮为脂溶性成分,在水中溶解度较小,故采用二甲基亚砜(DMSO)及聚山梨酯-80(吐温-80)助溶,但 DMSO 和吐温-80 对人体安全的有一定影响<sup>[8]</sup>。黄酮类化合物在碱性条件下不稳定,但在酸性条件下相对稳定,人工肠液的 pH 6.8,故选用 pH 6.8 的 PBS 为肠灌流液基质。

3 种黄酮类成分在大鼠全肠均有吸收。其中槲皮素、山奈酚在回肠吸收最佳,结肠吸收最差,且二者在回肠的  $P_{app}$  接近,可能是因为二者的结构极其相似;异鼠李素在十二指肠的吸收最好,结肠吸收最差,最佳吸收部位的  $P_{app}$  是槲皮素、山奈酚的 1.3 倍,与槲皮素和山奈酚吸收情况稍有差异。研究发现甲基化黄酮类化合物的  $P_{app}$  是非甲基类化合物的 5~8 倍<sup>[10]</sup>。推测造成异鼠李素吸收差异的原因可能是异鼠李素的结构中 C-4' 位的甲氧基;亦有可能是沙棘黄酮中其他组分与异鼠李素体内过程存在不同程度的相互作用造成的<sup>[4]</sup>。大鼠外翻肠囊模型结果显示  $Q$  随总黄酮质量浓度成正比增加,以小肠内剩余药量的对数对取样时间进行线性回归,所得直线的  $r$  均  $>0.9$ ,因此判断 3 种沙棘黄酮类成分的吸收属于一级动力学过程,吸收机制为被动扩散。

Fagerholm U 等<sup>[11]</sup>报道当化合物的大鼠  $P_{app}$  平均值  $<0.03 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  和  $>0.2 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  时,可预测化合物在人体内分别吸收差和吸收完全<sup>[12]</sup>。因此槲皮素、山奈酚、异鼠李素在小肠均易于吸收,为沙棘总黄酮的口服药物新剂型设计和生物利用度提高提供参考。

### [参考文献]

- [1] Amidon G L, Lennernas H, Shah V P, et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification; the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability[J]. *Pharm Res*, 1995, 12(3):413.
- [2] 刘亚蓉. HPLC 法同时测定沙棘膏中槲皮素、山奈素、异鼠李素的含量[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(5):759.
- [3] 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.
- [4] 樊鑫梅, 申雪丽, 闫丽丽, 等. 高效液相色谱法同时测定沙棘果中槲皮素、山奈酚和异鼠李素的含量[J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(17):1344.
- [5] 王新春, 侯世祥, 李文, 等. 白藜芦醇纳米脂质体体外释药和大鼠小肠吸收特性的研究[J]. *中国中药杂志*, 2007, 20(5):1084.
- [6] 赖筱娟, 刘汉清, 李俊松, 等. 丹酚酸提取物中 3 种成分的大鼠肠吸收特性及冰片对其吸收的影响[J]. *药学学报*, 2010, 45(12):1576.
- [7] 黄娟, 罗辉, 龚耘, 等. 天麻苷元肠吸收特性的研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(6):858.
- [8] 薛彩福, 郭建明, 钱大玮, 等. 黄葵醇提取物中黄酮类成分在体肠吸收研究[J]. *药学学报*, 2011, 46(4):454.
- [9] 龚慕辛, 王雅琦, 宋亚芳, 等. 外翻肠囊法快速发现吴茱萸汤吸收成分群的研究[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(11):1399.
- [10] WEN X, Walle T. Methylated flavonoidshave greatly improved intestinal absorption andmetabolic stability[J]. *J Drug Metab Dispos*, 2006, 34(10):1786.
- [11] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum[J]. *Pharm Res*, 1996, 13(9):1336.
- [12] 李珂佳, 蒋学. 大鼠原位灌注模型研究靛玉红吸收机制[J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(17):1307.

[责任编辑 仝燕]