

[制 剂]

葶草花提取物中5种成分在大鼠体内的肠吸收动力学

谢玉敏¹, 杨武¹, 陆苑^{1,2}, 郑林^{1,2}, 陈思颖^{1,2}, 黄勇^{1,2*}

(1. 贵州医科大学, 贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004)

摘要: **目的** 研究葶草花 *Polygonum orientale* L. 提取物中原儿茶酸、花旗松素、山柰素-葡萄糖苷、槲皮苷、山柰素-鼠李糖苷在大鼠体内的肠吸收动力学特征。**方法** 采用在体肠灌注模型, 超高效液相色谱-电喷雾-串联质谱 (UPLC-ESI-MS/MS) 法测定这5种成分质量浓度。**结果** 这些成分对 pH 值均不敏感, 可能不是药物转运蛋白 P-gp 的底物; 原儿茶酸、山柰素-葡萄糖苷、槲皮苷和山柰素-鼠李糖苷在高质量浓度下存在饱和现象; 胆汁对原儿茶酸的吸收具有抑制作用, 而对山柰素-葡萄糖苷的吸收具有促进作用。**结论** 葶草花提取物中这5种成分在整个肠段都有吸收, 而且小肠优于结肠, 符合一级动力学特征。

关键词: 葶草花提取物; 原儿茶酸; 花旗松素; 山柰素-葡萄糖苷; 槲皮苷; 山柰素-鼠李糖苷; 肠吸收动力学; UPLC-MS/MS

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)04-0770-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.011

Intestine absorption kinetics for five constituents in *Polygonum orientale* flower extract in rats

XIE Yu-min¹, YANG Wu¹, LU Yuan^{1,2}, ZHENG Lin^{1,2}, CHEN Si-ying^{1,2}, HUANG Yong^{1,2*}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT: AIM To study the intestinal absorption kinetic characteristics of protocatechuic acid, taxifolin, kaempferol-3-*O*- β -*D*-glucosid, quercitrin and kaempferol-3-*O*- α -*L*-rhamnosid in *Polygonum orientale* flower extract in rats. **METHODS** Based on the *in situ* intestinal perfusion model, the concentrations of these five constituents were determined by ultra-performance liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass (UPLC-MS/MS). **RESULTS** Being insensitive to pH, these constituents might not be the P-gp substrates. Saturation phenomenon occurred in protocatechuic acid, kaempferol-3-*O*- β -*D*-glucosid, quercitrin and kaempferol-3-*O*- α -*L*-rhamnosid at high concentration. The bile inhibited the absorption of protocatechuic acid and promoted that of kaempferol-3-*O*- β -*D*-glucosid. **CONCLUSION** These five constituents in *Polygonum orientale* flower extract can be absorbed in the whole intestinal segments and they are absorbed more in small intestine than those in the colon, which accords with first-order absorption kinetics.

KEY WORDS: *Polygonum orientale* flower extract; protocatechuic acid; taxifolin; kaempferol-3-*O*- β -*D*-glucosid; quercitrin; kaempferol-3-*O*- α -*L*-rhamnosid; intestinal absorption kinetics; UPLC-MS/MS

收稿日期: 2015-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81360664); 国家科技支撑计划课题 (2013BAI11B01); 贵州省中药现代化科技产业专项基金项目 (黔科合重 G 字 [2013] 4001)

作者简介: 谢玉敏 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中药药代动力学、活性物质基础与药物新剂型。Tel: (0851) 6908468, E-mail: xym-999@foxmail.com

* 通信作者: 黄勇 (1976—), 男, 教授, 研究方向为中药活性物质基础、药动学与药物新剂型、新技术。Tel: (0851) 6908468, E-mail: mailofhy@126.com

荳蔻为蓼科植物荳蔻 *Polygonum orientale* L. 的干燥全草,在贵州省广泛分布,为当地地产药材,具有祛风利湿、活血、消积、止痛功能,民间常用于胸痛、胸闷、气短、中风偏瘫(嘴角歪斜)、风湿疼痛等疾病的治疗^[1-3]。本课题组前期在筛选荳蔻各部位药理活性时发现,花比全草有着更明显的抗心肌缺血作用,是该植物的主要药用部位^[4],但其吸收影响因素并不明确,有待作进一步研究。在体肠灌流模型是一种根据灌流液中药物的剩余量来评价其吸收速率和吸收量,广泛用于研究药物的吸收,在整个实验过程中,灌流的肠段都有血供,更接近生物体的实际情况^[5-7],可分为单向灌流、循环灌流和振动灌流等类型。本实验利用超高效液相色谱-电喷雾-串联质谱(UPLC-ESI-MS/MS)法,同时测定肠灌流液中原儿茶酸、花旗松素、山柰素-葡萄糖苷、槲皮苷、山柰素-鼠李糖苷,结合在体肠灌流模型,考察质量浓度、pH值、P-糖蛋白抑制剂、肠段等因素对荳蔻花提取物中这5种成分吸收的影响。

1 仪器与材料

1.1 仪器 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪(美国 Waters 公司);HL-2S 蠕动泵(上海青浦沪西仪器厂);EL204 电子天平(万分之一,梅特勒-托利多仪器上海有限公司);ZH-2 涡旋混合器(天津药典标准仪器厂);Allegra64R 低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司);MTN-2800D 氮吹浓缩装置(奥特塞恩斯仪器公司);CQ250A-TS 超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂);超纯水机(四川沃特尔科技发展有限公司);DK-98-II A 恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.2 材料 盐酸维拉帕米(批号 29940,阿拉丁试剂上海有限公司);葛根素(批号 0752-9605)、原儿茶酸(批号 809-200102)对照品(中国食品药品检定研究院);花旗松素、山柰素-葡萄糖苷、槲皮苷、山柰素-鼠李糖苷对照品(自制,纯度均 $\geq 98\%$)。荳蔻花提取物(批号 20140815,自制)。乙腈为色谱纯(德国 Merck 公司);水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.3 试验动物 健康 SD 大鼠,雄性,体质量为(250 \pm 20)g,由贵阳医学院动物中心提供,批号 SCXK(黔)2012-0001。

2 方法

2.1 标准溶液的配制

2.1.1 5种物质标准溶液的配制 精密称取原儿茶酸、花旗松素、山柰素-葡萄糖苷、槲皮苷和山柰素-鼠李糖苷适量,甲醇定容至 10 mL,得到原儿茶酸(1.202 mg/mL)、花旗松素(1.208 mg/mL)、山柰素-葡萄糖(1.216 mg/mL)、槲皮苷(1.200 mg/mL)和山柰素-鼠李糖苷(1.210 mg/mL)的贮备液。

2.1.2 内标溶液的配制 精密称取葛根素 10.33 mg,甲醇定容至 25 mL,得到葛根素(0.413 2 mg/mL)的贮备液。取适量置于 10 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,配制成 9.999 4 $\mu\text{g/mL}$ 的内标溶液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用,即得。

2.1.3 Krebs-Ringer's (K-R) 营养液的配制 称取 CaCl_2 0.37 g、葡萄糖 1.4 g,分别加少量蒸馏水溶解。再称取 NaCl 7.8 g、 KCl 0.35 g、 NaHCO_3 1.37 g、 NaH_2PO_4 0.32 g、 MgCl_2 0.02 g,蒸馏水溶解后与 CaCl_2 和葡萄糖混匀,蒸馏水定容至 1 L,即得。

2.1.4 荳蔻花提取物的制备 取荳蔻花 15 kg,加 10 倍量水煎煮 3 次,滤液合并浓缩,加乙醇至醇体积分数达 65%,静置过滤,回收乙醇,残留物用 1/2 倍量水饱和正丁醇萃取 4 次,回收溶剂,残留物用乙醇溶解,上聚酰胺柱,80% 乙醇洗脱,收集洗脱液,回收溶剂,即得。

2.1.5 供试液的制备 取“2.1.4”项下提取物及 K-R 营养液适量,超声 10 min,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用,得到 2.5、5.0、10.0 mg/mL 的供试液。

2.2 色谱条件 Waters BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm); Waters Van Guard BEH C_{18} 保护柱(2.1 mm \times 5 mm, 1.7 μm);柱温 45 $^{\circ}\text{C}$;流动相为 0.1% 甲酸乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B);体积流量 0.35 mL/min;进样体积 1 μL ;梯度洗脱(0~0.5 min, 12% A; 0.5~0.8 min, 12%~20% A; 0.8~3.0 min, 20%~25% A; 3.0~4.0 min, 25%~90% A; 4.0~5.0 min, 12% A)。

2.3 质谱条件 电喷雾电离源(ESI);毛细管电离电压 3 kV;离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$;去溶剂气 N_2 , 体积流量 650 L/h, 温度 350 $^{\circ}\text{C}$;反吹气 N_2 , 体积流量 50 L/h;碰撞气氩气, 体积流量 0.16 mL/min;质谱数据采集及处理软件为 Mass-Lynx V4.1 工作站,扫描方式为多反应离子监测(MRM)。离子对条件见表 1。

表1 质谱条件
Tab.1 Mass spectrometric conditions

成分	质谱条件				
	ESI	Parent(<i>m/z</i>)	Daughter(<i>m/z</i>)	Cone(V)	collision(V)
原儿茶酸	-	153.0	109.0	30	15
花旗松素	-	303.1	284.9	35	10
山柰素-葡萄糖苷	+	449.2	287.1	20	15
槲皮苷	+	449.2	303.1	20	10
山柰素-鼠李糖苷	+	433.2	287.1	20	10
葛根素(内标)	+	417.0	267.0	40	30

2.4 样品处理方法 取肠循环供试液适量，初始流动相稀释3倍后冷藏备用。取100 μL置于1.5 mL塑料离心管中，加10 μg/mL内标溶液20 μL，加入400 μL初始流动相，涡旋混合1 min，15 000 r/min离心5 min，取上清液，采用UPLC-MS/MS法进样分析。

2.5 大鼠在体循环灌流实验 参照文献[8-11]，手术前大鼠禁食12 h(自由饮水)，腹腔注射30%乌拉坦溶液(1.4 g/kg)麻醉，固定动物。沿腹中线切口，打开腹腔，于肠段两端切小口，分别插入硅胶管后绑紧。实验时，先用等渗生理盐水洗去肠管内容物，装好循环装置，量筒法校正循环液体积，量取50 mL肠循环液，5 mL/min速率平衡10 min后立即读出体积，从中取出1 mL，补加1 mL K-R缓冲液，记为0时。调节流量，再以2.5 mL/min体积流量继续循环，分别于30、60、90、120、150、180 min同法读数，取样，补加K-R缓冲液，循环180 min终止。根据量筒读数的变化来计算大鼠吸水量，进而计算各时间点药物量，即剩余药量(P_{t_n})，以其自然对数 $\ln(P_{t_n})$ 对取样时间 t 作图，求出吸收转化速率常数 K_a 、3 h百分吸收转化率 A 等参数。按照同样方法，分别考察十二指肠段、空肠段、回肠段、结肠段。

2.6 数据分析^[12-13]

2.6.1 荜草花提取物在体肠吸收肠剩余药量的计算

$$P_{t_n} = C_{t_n} \times V_{t_n} + 1.0 \times \sum_{i=1}^{n-1} C_{t_i}$$

注： P_{t_n} 为剩余药量； C_{t_n} 为药物质量浓度； V_{t_n} 为肠循环液体积； t_n 为循环液灌注时间

2.6.2 吸收动力学参数的计算 以小肠内剩余药量的对数 $\ln(X)$ 对取样时间 t 作图，由直线斜率计算吸收转化速率常数 K_a (h^{-1})。计算公式为3 h累计吸收转化率 $A = \frac{0\text{ h 剩余药量} - 3\text{ h 剩余药量}}{0\text{ h 剩余药量}} \times 100\%$

3 结果

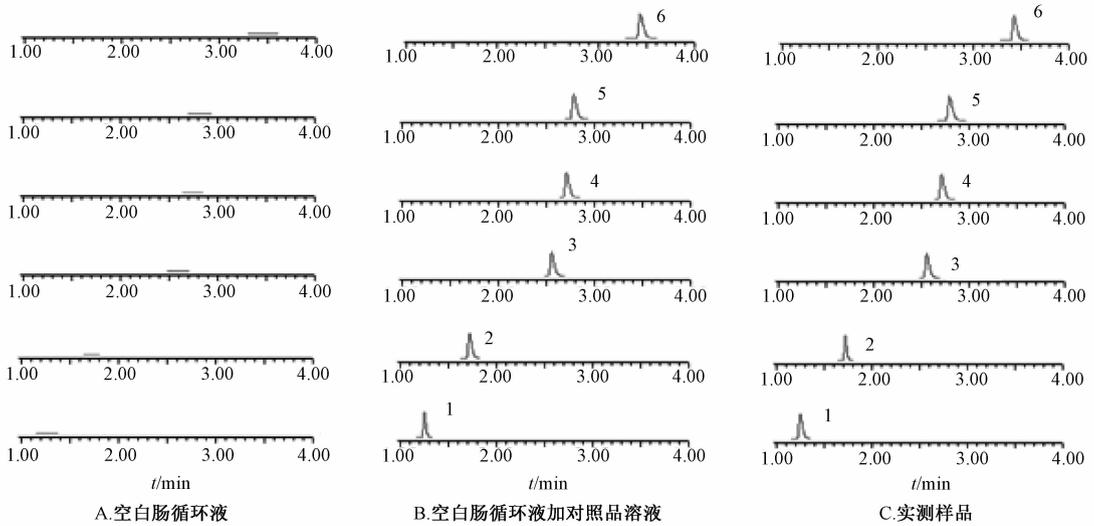
3.1 方法学研究

3.1.1 专属性试验 比较空白肠循环液、混合对照品溶液和荜草花循环灌流样品溶液的色谱行为，在“2.2”项色谱条件下考察其专属性。结果，5种成分及内标的保留时间分别为1.26、1.72、2.55、2.71、2.79和3.44 min，空白肠液无干扰，见图1。

3.1.2 标准曲线的制备 分别精密量取5种对照品贮备液适量，用3倍稀释后的空白肠循环液溶解，梯度稀释，得到混合系列标准溶液，按“2.4”项下方法处理，进样测定。以待测物的峰面积与内标峰面积之比(A/A_i)为纵坐标(Y)，成分的质量浓度(C)为横坐标(X)进行回归，得到原儿茶酸($Y = 0.086X + 0.058$, $r = 0.9962$, 2.13 ~ 136.2 μg/mL)、花旗松素($Y = 0.061X + 0.008$, $r = 0.9995$, 1.57 ~ 100.7 μg/mL)、山柰素-葡萄糖苷($Y = 0.148X - 0.047$, $r = 0.9951$, 1.58 ~ 101.3 μg/mL)、槲皮苷($Y = 0.183X + 0.028$, $r = 0.9990$, 6.25 ~ 399.9 μg/mL)、山柰素-鼠李糖苷($Y = 0.313X + 0.328$, $r = 0.9993$, 6.30 ~ 403.2 μg/mL)的回归方程，表明这5个成分的线性关系良好。

3.1.3 回收率和精密度试验 按“3.1.2”项下方法，分别配制高、中、低3个质量浓度的溶液，平行5份，所测5个成分的 A/A_i 代入标准曲线方程，以测得量与加入量之比计算方法回收率，结果均大于90%。同法计算日内精密度，再连续测定5天来计算日间精密度，结果5种成分的日内精密度RSD为2.2%~6.7%，日间精密度RSD为2.5%~6.7%，均符合要求。

3.1.4 稳定性试验 按“2.4”项下方法处理肠灌流液样品，分别于0、1、2、4、6、8、12 h取样分析。结果，5种成分的RSD值均小于5%，表明样品溶液至少在12 h内稳定。



1. 原儿茶酸 2. 葛根素 3. 花旗松素 4. 山柰素-葡萄糖苷 5. 槲皮苷 6. 山柰素-鼠李糖苷

1. protocatechuic acid 2. puerarin 3. taxifolin 4. kaempferol-3-O-β-D-glucosid 5. quercitrin 6. kaempferol-3-O-α-L-rhamnosid

图1 专属性试验结果

Fig. 1 Results of specificity tests

3.1.5 基质效应 取低、中、高3个质量浓度的对照溶液，加入空白肠溶液 100 μL 溶解，按“2.4”项下方法操作，平行5次，得到相应峰面积。另取3个质量浓度的对照溶液，45℃氮气流下吹干，残留物以100 μL 初始流动相溶解，按“2.4”项下方法操作，平行5次，得到相应峰面积，取两个峰面积的比值来计算基质效应，然后同法考察内标。结果，5种待测成分和内标的比值均在85%~115%之间，内标基质效应为101.1%，均不存在基质效应。

3.2 荳草花提取物的肠道吸收特性研究

3.2.1 荳草花提取物在37℃ K-R液中的稳定性试验 以K-R液制备质量浓度为5.0 mg/mL的荳草花提取物溶液50 mL，37℃下水浴，分别于0、3 h取样 (n=3)，测定5种成分的含有量变化，考察其在K-R液(不同pH值)中的稳定性。结果表明，这5种成分在37℃ K-R液中稳定性较好，其百分剩余量为95.2%~104.0%，见表2。

表2 K-R液中稳定性试验结果(%, $\bar{x} \pm s$, n=3)

Tab. 2 Results of stability tests in K-R solution (% , $\bar{x} \pm s$, n=3)

成分	pH=7.4	pH=6.86	pH=6.0	pH=5.0
原儿茶酸	101.3 ± 4.7	100.1 ± 4.5	104.0 ± 5.6	101.6 ± 6.3
花旗松素	100.9 ± 5.8	99.7 ± 3.6	99.4 ± 5.6	96.7 ± 3.7
山柰素-葡萄糖苷	95.2 ± 4.1	97.2 ± 4.3	96.1 ± 4.4	99.4 ± 5.7
槲皮苷	98.2 ± 1.8	98.7 ± 2.9	97.8 ± 5.0	97.3 ± 6.3
山柰素-鼠李糖苷	97.6 ± 3.6	98.6 ± 1.7	102.0 ± 1.0	96.7 ± 4.8

3.2.2 荳草花提取物在蠕动泵管路中的物理吸附考察 以K-R液制备质量浓度为5.0 mg/mL的荳草花提取物溶液50 mL，37℃下水浴，于体外空循环3 h，分别在0、3 h取样测定 (n=3)，考察其在管路的吸附情况。结果表明，管路无明显物理吸附作用，其百分剩余量为95.4%~102.3%，见表3。

表3 循环管路及空白肠灌流液中的稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Tab. 3 Results of stability tests in circuit pipe and blank intestinal perfusate ($\bar{x} \pm s$, n=3)

成分	管路吸附作用/%	空白肠循环液中稳定性/%
原儿茶酸	95.4 ± 3.3	102.6 ± 3.3
花旗松素	102.1 ± 2.3	102.2 ± 5.2
山柰素-葡萄糖苷	100.3 ± 5.3	98.5 ± 2.0
槲皮苷	102.1 ± 4.6	99.8 ± 3.9
山柰素-鼠李糖苷	102.3 ± 1.1	100.1 ± 3.8

3.2.3 荳草花提取物在空白肠灌流液中的稳定性考察 取空白K-R液50 mL，于大鼠肠中循环3 h，制成空白肠液。再以其制备质量浓度为5.0 mg/mL的荳草花提取物溶液，37℃下水浴恒温，分别在0、3 h取样测定 (n=3)，考察其在空白肠液中的稳定性。结果表明，这5种成分稳定性良好，其百分剩余量为98.5%~102.6%，见表3。

3.2.4 荳草花提取物的pH值对吸收的影响 由于药物吸收可能受到循环液pH的影响，故进行全肠段实验，考察5.0 mg/mL 荳草花提取物在不同

pH (7.4、6.86、6.0、5.0) 下5种成分的吸收, 比较3 h 累计吸收转化率 A 。结果表明, 花旗松素在 pH 6.86 时的吸收明显高于 pH 7.4, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。经方差分析, 这5种成分在

各 pH 值下没有显著性差异 ($P > 0.05$), 说明对 pH 值不敏感, 而当 pH 6.0 时, 其3 h 累计吸收量相对较高。因此, 以 pH 6.0 的荳草花提取物溶液进行实验, 结果见表4。

表4 pH 值对吸收的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Tab. 4 Effect of pH values on absorption ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

成分	pH 7.4		pH 6.86		pH 6.0		pH 5.0	
	A/%	K_a	A/%	K_a	A/%	K_a	A/%	K_a
原儿茶酸	23.9 ± 9.3	0.103 ± 0.041	26.7 ± 3.9	0.097 ± 0.054	26.8 ± 7.6	0.112 ± 0.018	22.3 ± 7.9	0.104 ± 0.032
花旗松素	58.3 ± 5.4	0.303 ± 0.047	69.2 ± 4.0**	0.385 ± 0.050*	65.8 ± 8.2	0.360 ± 0.069	65.3 ± 2.2	0.359 ± 0.018
山柰素-葡萄糖苷	66.8 ± 9.8	0.369 ± 0.085	64.3 ± 11.0	0.295 ± 0.097	68.9 ± 11.7	0.394 ± 0.107	49.1 ± 23.2	0.259 ± 0.175
槲皮苷	19.0 ± 4.3	0.065 ± 0.020	17.7 ± 4.6	0.053 ± 0.033	21.4 ± 6.8	0.074 ± 0.023	17.6 ± 7.5	0.072 ± 0.016
山柰素-鼠李糖苷	19.1 ± 4.8	0.068 ± 0.016	18.8 ± 2.4	0.062 ± 0.023	22.7 ± 5.3	0.079 ± 0.019	20.3 ± 7.3	0.080 ± 0.016

注: 与 pH 7.4 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2.5 荳草花提取物的质量浓度对吸收的影响
取禁食后的大鼠随机分组, 每组4只, 进行全肠段实验, 分别考察不同质量浓度 (pH 6.0) 荳草花提取物中这5种成分的 K_a 和3 h 累计吸收转化率 A 。结果, 原儿茶酸在低质量浓度时的3 h 累计吸收转化率明显高于中、高质量浓度 ($P < 0.05$); 中质量浓度山柰素-葡萄糖苷明显高于高质量浓度 ($P < 0.05$); 低、中质量浓度槲皮苷、山柰素-鼠

李糖苷明显高于高质量浓度 ($P < 0.05$)。由此表明, 原儿茶酸、山柰素-葡萄糖苷、槲皮苷和山柰素-鼠李糖苷在高质量浓度下可能存在饱和现象, 其在体内的吸收机制不仅是单纯的被动吸收过程, 还存在主动转运和易化扩散; 花旗松素3 h 累计吸收转化率 A 与吸收转化速率常数 K_a 无显著性差异 ($P > 0.05$), 提示其在体内的吸收机制可能是被动吸收过程, 见表5。

表5 质量浓度对吸收的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Tab. 5 Effect of concentration on absorption ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

成分	2.5 mg/mL		5.0 mg/mL		10 mg/mL	
	A/%	K_a	A/%	K_a	A/%	K_a
原儿茶酸	53.0 ± 21.0	0.311 ± 0.224*	26.8 ± 7.6##	0.112 ± 0.018	20.3 ± 2.4##	0.077 ± 0.015
花旗松素	64.4 ± 4.7	0.351 ± 0.057	65.8 ± 8.2	0.360 ± 0.069	62.8 ± 1.8	0.322 ± 0.025
山柰素-葡萄糖苷	54.8 ± 17.9	0.284 ± 0.143	68.9 ± 11.7**	0.394 ± 0.107*	32.6 ± 12.4	0.130 ± 0.085
槲皮苷	22.2 ± 1.5**	0.088 ± 0.023	21.4 ± 6.8**	0.074 ± 0.023*	11.0 ± 1.5	0.039 ± 0.015
山柰素-鼠李糖苷	21.8 ± 1.8**	0.094 ± 0.024*	22.7 ± 5.3**	0.079 ± 0.019	14.2 ± 3.7	0.050 ± 0.015

注: 与高质量浓度比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与低质量浓度比较, ## $P < 0.01$

3.2.6 胆汁对荳草花提取物吸收的影响
取4只大鼠, 按“2.5”项下方法操作, 结扎胆管, 选择5.0 mg/mL 荳草花提取物溶液 (pH 6.0) 50 mL 作为肠灌液, 进行整肠段循环实验, 比较3 h 累计

吸收转化率 A 。结果表明, 胆汁对原儿茶酸、山柰素-葡萄糖苷在小肠内的吸收具有显著影响 ($P < 0.05$), 对原儿茶酸的吸收具有抑制作用, 见表6。

表6 胆汁及 P-gp 抑制剂对吸收的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Tab. 6 Effects of bile and P-gp inhibitor on absorption ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

成分	不结扎		结扎		P-gp 抑制剂	
	A/%	K_a	A/%	K_a	A/%	K_a
原儿茶酸	26.8 ± 7.6	0.112 ± 0.018	54.3 ± 20.7**	0.296 ± 0.174*	41.4 ± 15.2	0.179 ± 0.077
花旗松素	65.8 ± 8.2	0.360 ± 0.069	65.8 ± 2.1	0.364 ± 0.020	62.2 ± 5.6	0.325 ± 0.037
山柰素-葡萄糖苷	68.9 ± 11.7	0.394 ± 0.107	34.2 ± 10.0**	0.144 ± 0.049*	31.9 ± 5.5**	0.121 ± 0.014*
槲皮苷	21.4 ± 6.8	0.074 ± 0.023	19.4 ± 3.0	0.076 ± 0.006	21.3 ± 4.8	0.077 ± 0.011
山柰素-鼠李糖苷	22.7 ± 5.3	0.079 ± 0.019	20.7 ± 2.7	0.079 ± 0.011	21.5 ± 4.4	0.082 ± 0.006

注: 与不结扎组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2.7 P-gp 抑制剂荳草花提取物吸收的影响
取禁食后的大鼠随机分组, 每组4只。选择

5.0 mg/mL 荳草花提取物溶液 (pH 6.0) 50 mL 作为肠灌液, 进行全肠段实验, 考察加入 P-gp 抑

制剂维拉帕米后这5种成分的吸收情况,验证其是否受到抑制剂外泵作用的影响,比较3h累计吸收转化率A。结果表明,加入P-gp抑制剂后,原儿茶酸的吸收增加,但无显著性差异($P > 0.05$);山柰素-葡萄糖苷在小肠内的吸收降低,具有显著性差异($P < 0.05$),可能与其他相互作用有关,有待作进一步考察;花旗松素等其它成分的吸收无明显差异($P > 0.05$),显示荳蔻花提取物中成分可能并不是药物转运蛋白P-gp的底物。

3.2.8 荳蔻花提取物在不同肠段的吸收特点 取禁食后的大鼠随机分组,每组4只,对各肠段进行结扎,分别为十二指肠段(自幽门1.0cm处开始往下10cm处)、空肠段(自幽门15cm起往下10cm处);回肠段(离盲肠上行20cm处开始往下10cm处);结肠段(从盲肠后端开始往下取10cm处)。选择5.0mg/mL荳蔻花提取物溶液

表7 各成分在不同肠段的吸收($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab. 7 Absorptions of various constituents in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n=4$)

成分	十二指肠		空肠		回肠		结肠	
	A/%	K_a	A/%	K_a	A/%	K_a	A/%	K_a
原儿茶酸	7.6 ± 5.5	0.018 ± 0.015	11.4 ± 9.6	0.027 ± 0.025	8.5 ± 2.3	0.021 ± 0.010	5.8 ± 2.7	0.014 ± 0.008
花旗松素	24.6 ± 3.2 * ^{##}	0.081 ± 0.016 *	21.9 ± 6.9 **	0.079 ± 0.032 *	15.5 ± 2.1 **	0.059 ± 0.008 *	8.9 ± 2.8	0.030 ± 0.006
山柰素-葡萄糖苷	10.7 ± 1.3 * ^{###}	0.024 ± 0.005	9.4 ± 6.0 * ^{###}	0.028 ± 0.022	4.0 ± 1.9	0.010 ± 0.004	3.8 ± 1.9	0.013 ± 0.004
槲皮苷	10.7 ± 4.5 **	0.028 ± 0.016	6.6 ± 3.9	0.020 ± 0.017	5.6 ± 4.4	0.017 ± 0.013	4.0 ± 1.3	0.013 ± 0.003
山柰素-鼠李糖苷	10.4 ± 3.3	0.024 ± 0.011	8.1 ± 6.1	0.023 ± 0.022	5.6 ± 2.2	0.021 ± 0.005	5.5 ± 3.1	0.018 ± 0.005

注:与结肠比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与回肠比较,^{##} $P < 0.01$

4 讨论

在预实验期间,曾采用相对简便的单向灌流法,但实验结果不稳定,易出现负值。分析原因,可能为荳蔻花提取物中成分在肠道的吸收量小,其误差导致了负值的出现。而选择循环灌流法时,各成分的吸收趋势较明显,相关系数较好,得到了较为稳定的数据。因此,正式实验采用在体肠循环灌流模型进行研究。

正常肠道会吸收水分,从而使药物质量浓度升高,故必须对水分进行校正。通过查阅文献发现,循环灌流法使用酚红法或量筒法^[12]进行校正,但酚红本身存在一定的吸收^[14-15],会对实验造成误差,尤其是本身吸收量小的化合物。通过预实验发现,量筒法所得结果的稳定性更好,因此选择该方法进行水分校正。

本实验结果表明,原儿茶酸、山柰素-葡萄糖苷、槲皮苷和山柰素-鼠李糖苷在体内的吸收机制不仅是单纯的被动吸收过程,还可能存在主动转运和易化扩散因素;花旗松素在体内仅属被动吸收过程。

(pH 6.0) 50 mL 作为肠灌流液,不同肠段分别用供试液进行回流,考察大鼠肠道各区段的吸收情况,比较不同肠段各成分的3h累计吸收转化率A。结果表明,花旗松素在十二指肠、空肠、回肠的吸收较结肠快,同时十二指肠的吸收较回肠快,有显著性差异($P < 0.05$);山柰素-葡萄糖苷在十二指肠、空肠的吸收较结肠、回肠快,统计学有显著性差异($P < 0.05$);槲皮苷在十二指肠的吸收较结肠快,统计学有显著性差异($P < 0.05$);其余成分在各肠段的吸收没有显著性差异($P > 0.05$)。

各成分在不同肠段的吸收趋势为原儿茶酸,空肠 > 回肠 > 十二指肠 > 结肠;花旗松素,十二指肠 > 空肠 > 回肠 > 结肠;山柰素-葡萄糖苷,十二指肠 > 空肠 > 回肠 > 结肠;槲皮苷,十二指肠 > 空肠 > 回肠 > 结肠;山柰素-鼠李糖苷,十二指肠 > 空肠 > 回肠 > 结肠。结果见表7。

参考文献:

- [1] 郑林,陈慧,王爱民,等.超高效液相色谱测定大鼠口服荳蔻花后入血成分[J].中国医院药学杂志,2012,32(2):91-93.
- [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[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:267.
- [3] 黄勇,郑林,王爱民,等.贵州产荳蔻药材指纹图谱的模式识别研究[J].中成药,2008,30(7):945-949.
- [4] 王爱民,鄢艳,郑林,等.UPLC同时测定荳蔻花中7种指标成分的含量[J].中国中药杂志,2011,36(22):3141-3145.
- [5] 谭晓斌,贾晓斌,陈彦,等.在体肠灌流模型及其在中药研究中的应用[J].中成药,2007,29(11):1665-1668.
- [6] 张晓雷,周明眉,贾伟,等.在体肠灌流模型及其在中药研究中的应用[J].上海中医药大学学报,2010,24(3):87-92.
- [7] 周伟,狄留庆,毕肖林,等.在体肠循环法研究连翘酯苷A的肠吸收机制[J].药学学报,2010,45(11):1373-1378.
- [8] 黄勇,唐丽,刘跃,等.野黄芩素在体肠吸收动力学研究[J].中国新药杂志,2014,23(4):457-461.
- [9] 高宏伟,匡海学,阎雪.胡黄连苷I大鼠在体肠吸收动力学研究[J].中医药信息,2011,28(4):7-9.

- [10] 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.
- [11] 刘太明, 蒋学华. 黄芩苷和黄芩素大鼠在体胃、肠的吸收动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(12): 999-1001.
- [12] 翟永松, 杜守颖, 徐 冰, 等. 三七总皂苷油水分分配系数及大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8): 984-988.
- [13] 李文兰, 南莉莉, 季宇彬, 等. 人参中人参皂苷 Rg, Rb 在体肠吸收影响因素的研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(20): 2627-2632.
- [14] 薛彩福, 郭建明, 钱大玮, 等. 黄葵醇提物中黄酮类成分在体肠吸收研究[J]. 药学学报, 2011, 46(4): 454-459.
- [15] 聂淑芳, 潘卫三, 杨星钢, 等. 对大鼠在体肠单向灌注技术中重量法的评价[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(10): 1177-1179.

独一味胶囊中 2 种成分的同时测定及在大鼠血浆中的药动学特征

雷旭伟¹, 王双虎², 周云芳^{2*}

(1. 丽水市第二人民医院药剂科, 浙江 丽水 323000; 2. 丽水市人民医院临床药学实验室, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 建立超高效液相串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法同时测定独一味胶囊 (独一味) 中胡麻属苷和类叶升麻苷, 并研究其在大鼠血浆中的药代动力学特征。方法 蛋白沉淀法处理血浆后, 采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 分析; 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水, 梯度洗脱; 体积流量为 0.4 mL/min。结果 类叶升麻苷的线性范围为 1 ~ 250 ng/mL ($r=0.9989$), 最低定量限为 0.2 ng/mL; 胡麻属苷的线性范围为 0.5 ~ 100 ng/mL ($r=0.9986$), 最低定量限为 0.1 ng/mL; 低、中、高质量浓度的日内、日间精密度 RSD 均 < 8.84%, 类叶升麻苷的相对回收率分别为 (105.33 ± 8.64)%、(101.55 ± 1.22)% 和 (96.89 ± 5.42)%, 而胡麻属苷分别为 (103.89 ± 9.18)%、(99.34 ± 6.63)% 和 (95.88 ± 3.69)%。大鼠静脉注射胡麻属苷和类叶升麻苷后, 两者的 $t_{1/2}$ 分别为 (1.45 ± 0.28) h 和 (0.7 ± 0.25) h, AUC_(0-t) 分别为 (128.79 ± 30.52) ng/(h · mL) 和 (98.39 ± 16.52) ng/(h · mL)。结论 该方法简便、快捷, 灵敏, 适用于这两种成分的药代动力学研究。

关键词: 独一味胶囊; 胡麻属苷; 类叶升麻苷; 药代动力学; UPLC-MS/MS

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)04-0776-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.012

Simultaneous determination of two constituents in Duiyiwei Capsules and their pharmacokinetic characters in rat plasma

LEI Xu-wei¹, WANG Shuang-hu², ZHOU Yun-fang^{2*}

(1. Department of Pharmacy, The Second People's Hospital of Lishui City, Lishui 323000, China; 2. The Laboratory of Clinical Pharmacy, People's Hospital of Lishui City, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: AIM To develop an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of sesamoside and verbascoside in Duiyiwei Capsules (*Lamio-phlomis rotata*) and to study their pharmacokinetic characters in rat plasma. **METHODS** After the plasma was treated with protein precipitation method, the analysis was performed on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution with gradient elution, and flow rate was 0.4 mL/min. **RESULTS** The linear range of verbascoside was 1 - 250 ng/mL ($r =$

收稿日期: 2015-09-25

基金项目: 2015 年浙江省医药卫生一般研究计划 (2015KYB457)

作者简介: 雷旭伟 (1972—), 女, 副主任药师, 研究方向为医院药学。Tel: (0578) 2780158, E-mail: leixuwei1972@163.com

* 通信作者: 周云芳, 男, 硕士, 主任药师, 研究方向为临床药理学和药代动力学。Tel: (0578) 2780158, E-mail: zyf2808@126.com