

## 【药动学研究】

## 外翻肠囊法研究金莲花总黄酮的吸收特征

师朵芝<sup>1</sup>, 李德利<sup>1</sup>, 方明月<sup>1</sup>, 刘双月<sup>1</sup>, 王青青<sup>1</sup>, 赧迪<sup>1</sup>, 马超<sup>2\*</sup>, 王如峰<sup>1\*</sup>

1. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488

2. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083

**摘要:** **目的** 研究金莲花总黄酮的吸收特征, 为确定金莲花的主要药效物质和进一步开发利用提供依据。 **方法** 建立外翻肠囊模型, 浴槽中给予 Tyrode 液配置的质量浓度分别为 2、6、10 mg/mL 的金莲花总黄酮溶液, 分别在给药后 15、30、45、60、90、120、150、180 min 从肠囊内取样 100  $\mu$ L, 补以相同体积的空白 Tyrode 液, 样品经处理后作为供试品溶液; 以荜苳素为对照品, 应用酶标仪测定供试品在 341 nm 下的吸光度 ( $A$ ) 值, 计算总黄酮含量、单位面积累积吸收量 ( $Q_s$ ) 和药物吸收率 ( $V$ )。 **结果** 浴槽中给予低、中、高浓度的总黄酮溶液后, 随着时间的延长, 肠囊内  $V$  逐渐增加, 但均较小, 最大吸收率分别为 8.74%、8.15%、8.77%, 组间无统计学差异; 在 0~180 min 内, 低、中、高浓度  $Q_s$  持续增加, 最大值分别为 32.00、63.49、115.29  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, 45~180 min 高浓度组显著大于低浓度组 ( $P < 0.01$ )。 **结论** 金莲花中的总黄酮不易被机体吸收, 其吸收特征与其单体化合物一致。

**关键词:** 金莲花; 总黄酮; 吸收; 外翻肠囊法; 荜苳素**中图分类号:** R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)01-0083-05**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.014**Absorption properties of total flavonoids from flowers of *Trollius chinensis* in rat everted gut sacs**SHI Duozi<sup>1</sup>, LI Deli<sup>1</sup>, FANG Mingyue<sup>1</sup>, LIU Shuangyue<sup>1</sup>, WANG Qingqing<sup>1</sup>, GENG Di<sup>1</sup>, MA Chao<sup>2</sup>, WANG Rufeng<sup>1</sup>

1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract: Objective** To investigate the absorption properties of the total flavonoids from the flowers of *Trollius chinensis* for the purpose of the evaluation of the main effective components of these flowers and their further development and utilization. **Methods** The everted gut sac model was established, and the total flavonoids in Tyrode solution of 2, 6, and 10 mg/mL were given in the bath. Sample of 100  $\mu$ L were taken from the intestinal sac 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, and 180 min after receiving, and the same volume blank Tyrode solution was added. The sample was processed as a test solution. Using orientin as control sample, the content of total flavonoids in the samples was determined by using microplate reader at 341 nm, and cumulative absorption quantities of the total flavonoids per unit area ( $Q_s$ ) and the drug absorption rate ( $V$ ) were calculated. **Results** Given the total flavone solution of low, middle and high concentration in the bath,  $V$  of intestinal sac increased gradually with the extension of time, and the maximum absorption rate were 8.74%, 8.15%, 8.77%, respectively, but there were no significant differences among groups. During the period of 0 to 180 min,  $Q_s$  of low, medium and high concentration increased sustainably with the maximum values of 32.00, 63.49, and 115.29  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>, respectively. During the period of 45 to 180 min,  $Q_s$  of high concentration group was significantly higher than that in the low concentration group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The total flavonoids from the flowers of *T. chinensis* are not easily absorbed by the organism, and their absorption

收稿日期: 2017-09-20

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目 (7172129)

第一作者: 师朵芝 (1991-), 女, 汉族, 山东省菏泽市人, 硕士研究生, 研究方向为中药化学成分生物转化。E-mail: changleshishi@163.com

\*通信作者: 王如峰, 男, 山东省无棣县人, 教授, 博导。Tel: (010)84738646 E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

马超, 男, 山东省泰安市人, 副教授。E-mail: machao@bjfu.edu.cn

properties are consistent with those of the monomeric compounds.

**Key words:** *Trollius chinensis* Bunge; total flavonoids; absorption; everted gut sacs; orientin

金莲花为毛茛科金莲花属植物金莲花 *Trollius chinensis* Bunge 的干燥花<sup>[1]</sup>, 具有清热解毒、消肿明目的功效, 临床用于治疗上呼吸道感染、咽炎、扁桃体炎等症<sup>[2-3]</sup>。金莲花化学成分明确, 主要含黄酮、酚酸和生物碱等<sup>[4-5]</sup>, 其中黄酮类含量最多, 被认为是金莲花的重要活性成分, 具有抗病毒、抗菌、抗炎、抗氧化等生物活性<sup>[6-8]</sup>。金莲花中的黄酮类多为黄酮碳苷, 例如荭草素、牡荆素、金莲花碳苷 I、II 和 III, 异当药黄素以及日本异当药素等<sup>[4-5, 9]</sup>。这些化合物在金莲花的疗效中发挥作用的大小取决于其生物利用度, 而化合物能否被机体吸收是生物利用度的关键影响因素。在前期研究中, 本课题组报道了金莲花中部分单体黄酮类化合物的吸收情况<sup>[10]</sup>, 发现这些黄酮类成分很难被机体吸收, 并且, 多种黄酮类化合物同时给药时, 存在相互影响吸收的现象。为了表征金莲花中黄酮类化合物的整体吸收特点, 考察其生物利用度, 本研究采用经典的外翻肠囊模型<sup>[11]</sup>对金莲花总黄酮的吸收率进行了测定。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠, 8 周龄, 体质量 (200±10) g, 由斯贝福 (北京) 实验动物科技有限公司提供, 动物合格证号 SCXK (京) 2016-0002, 常规饲养于北京中医药大学生物制药实验室动物房。

### 1.2 仪器

Epoch 全自动酶标仪 (美国 BioTek 公司); BP 211D 型 1/10 万电子天平、Sartorius1-14 型高速离心机 (德国赛多利斯公司); KQ-500 型数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司); TU-1901 紫外-可见分光光度计 (北京普析通用仪器有限责任公司); 96 孔细胞培养板, 美国 Corning 公司产品。

### 1.3 药物及主要试剂

金莲花总黄酮和荭草素对照品, 均为本实验室从金莲花中自制<sup>[8, 12]</sup>, 按照面积归一化法测得荭草素质量分数不低于 98%; 氯化钠、氯化钾、氯化钙、碳酸氢钠、磷酸二氢钠、氯化镁、葡萄糖、分析纯甲醇, 均购自北京高华伟业食品添加剂有限公司; 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, 购自北京氧利来有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液制备

**2.1.1 Tyrode 液的制备** 精密称取 8.0 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾、0.2 g 氯化钙、1.0 g 碳酸氢钠、0.05 g 磷酸二氢钠、0.1 g 氯化镁、1.0 g 葡萄糖, 溶于 1 L 超纯水中, 调节 pH 值至 7.2~7.4 即得 Tyrode 液<sup>[13]</sup>。

**2.1.2 对照品储备液的制备** 精密称取干燥至恒重的荭草素对照品 4 mg, 置于 10 mL 量瓶中。加入 200 μL DMSO 超声溶解, 甲醇定容至 10 mL, 即得 400 μg/mL 的荭草素对照品储备液。

**2.1.3 总黄酮溶液的制备** 分别精密称取干燥至恒重的金莲花总黄酮 20、60、100 mg, 置于 10 mL 量瓶中。加入适量 Tyrode 液超声溶解, 定容至 10 mL, 即得质量浓度为 2、6、10 mg/mL 的总黄酮溶液。

### 2.2 大鼠肠外翻吸收试验

取 SD 大鼠, 实验前 12 h 禁食, 自由饮水。脱颈处死后, 将大鼠肠管同肠系膜和脂肪剥离, 迅速取出十二指肠 (10 cm), 用冰冷的 Tyrode 液冲洗肠管, 直到无内容物流出。小心翻转肠管, 将其一端结扎于塑料管, Tyrode 液冲洗后再用细线将另一端结扎, 使之形成囊状肠管。向肠囊内注入 37 °C Tyrode 液 2 mL, 将其放入已装有 Tyrode 液的浴槽中, 实验过程中保持 37 °C 恒温, 并向浴槽中通入 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>。平衡 5 min 后, 将浴槽中的 Tyrode 液换成 Tyrode 液配制的金莲花总黄酮溶液 (质量浓度分别为 2、6、10 mg/mL), 然后分别在给药后 15、30、45、60、90、120、150、180 min 从肠囊内取样 100 μL, 同时补足相同体积的空白 Tyrode 液。

### 2.3 样品处理

取上述样品 100 μL, 以 15 000 r/min 离心 2 次, 每次 15 min, 吸取上清液, 即得供试品溶液。将肠管纵向剖开, 自然摊于滤纸上测量长度和宽度, 计算吸收面积 *S*。

### 2.4 测定方法及条件的选择

取供试品及荭草素溶液, 用 TU-1901 型紫外-可见分光光度计在 200~900 nm 波长范围内扫描。如图 1 所示, 荭草素在 214、267、338 nm 处有吸收峰, 吸光度 (*A*) 值分别为 4.88、0.65、0.75; 供试品在 206、270、341 nm 处有吸收峰, *A* 值分别为 4.45、1.36、0.92。

从图1看出, 供试品与荜草素均出现3个吸收峰, 供试品在341 nm(荜草素为338 nm)和270 nm(荜草素为267 nm)附近的吸收峰分别为黄酮类化

合物的特征性吸收峰带I和带II。通过综合比较, 二者在带I处的吸收更为一致和稳定, 故确定341 nm作为检测波长。由于酶标仪具有样本、试剂用

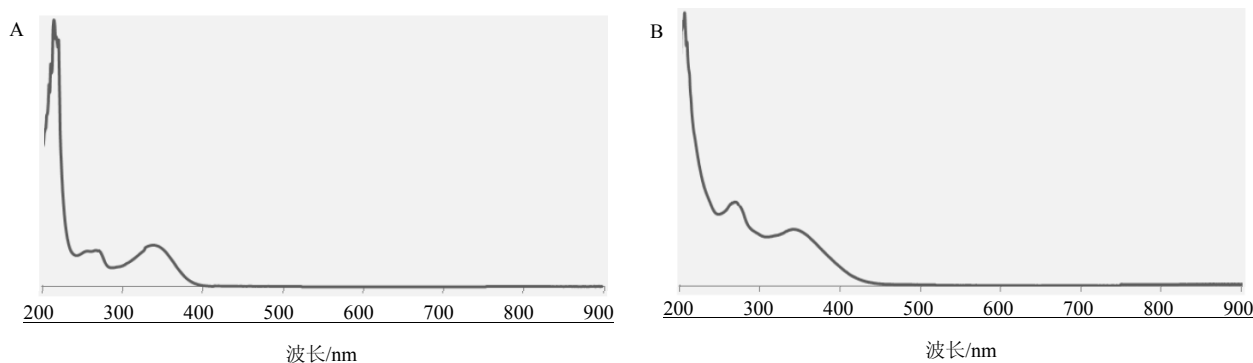


图1 荜草素对照品(A)和供试品(B)的紫外光谱

Fig. 1 UV spectra of orientin (A) and sample (B)

量少, 测定速度快, 效率高等优点, 且与紫外-可见分光光度计测定原理一致, 因此, 决定以荜草素对照品为对照, 应用酶标仪测定供试品在341 nm下的 $A$ 值, 计算供试品中总黄酮含量。

### 2.5 对照品标准曲线的制备

精密量取对照品储备液6.25 mL于25 mL量瓶中, 加Tyrode液稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为100  $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。再分别量取该对照品溶液0、0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、5.00 mL置于7个10 mL量瓶中, 加Tyrode液稀释至刻度, 摇匀备用。将上述系列浓度及浓度为100  $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液分别加入96孔板中, 每孔100  $\mu\text{L}$ , 每个浓度设4个复孔, 341 nm处测定 $A$ 值。以对照品浓度为横坐标,  $A$ 值为纵坐标绘制标准曲线, 得线性回归方程 $Y=0.0097X+0.1593$  ( $r=0.9996$ )。

### 2.6 方法学考察

**2.6.1 精密度试验** 精密吸取同一对照品溶液, 连续测定6次在341 nm处的 $A$ 值, 计算RSD, RSD为1.10%, 表明该方法精密度良好。

**2.6.2 稳定性试验** 精密吸取同一供试品和3个浓度对照品溶液各100  $\mu\text{L}$ 于96孔板中, 在0、30、60、90、120 min后于341 nm处测定 $A$ 值, 根据 $A$ 值计算含量和各组的RSD。样品组RSD为1.93%, 3个对照品RSD分别为2.51%、2.46%、0.29%, 说明该方法稳定性良好。

**2.6.3 回收率试验** 取某已知质量浓度供试品(42.8  $\mu\text{g/mL}$ )于6个EP管中(编号1~6), 每管

500  $\mu\text{L}$ , 再依次向编号1~6的管中加入500  $\mu\text{L}$ 质量浓度为5、10、20、30、40、50  $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 混匀。将6个管中的混合溶液分别加到96孔板中, 每孔100  $\mu\text{L}$ , 4个复孔。于341 nm处测定 $A$ 值, 根据测定的6组 $A$ 值, 计算各组的含量, 进一步计算各组的回收率, 6组的平均回收率为98.67%, RSD为3.13%, 说明该方法回收率较好。

### 2.7 供试品测定

将不同时间点的供试品进行相应的稀释, 在341 nm处测定 $A$ 值, 每个样品设置3个复孔。计算累积吸收量( $Q$ ,  $\mu\text{g}$ )、单位面积累积吸收量( $Q_s$ ,  $\mu\text{g/cm}^2$ ),  $Q_s=Q/S$ <sup>[14]</sup>及药物吸收率( $V$ , %),  $V=(Q_t/2\text{ mL})/C_0$ , 其中 $Q_t$ ( $\mu\text{g}$ )为给药 $t$ (min)后药物累积吸收量,  $C_0$ ( $\mu\text{g/mL}$ )为浴槽中金莲花总黄酮溶液初始浓度, “2 mL”指肠囊内液体体积为2 mL<sup>[15]</sup>。 $V$ 为肠囊吸收药物一定时间后肠囊内药物浓度与给药浓度的比值, 可用于表示肠囊对药物的吸收能力。如图2所示, 给予3个浓度的总黄酮溶液后, 随着时间的延长, 肠囊内 $V$ 逐渐增加, 但 $V$ 值均较小, 最大吸收率分别为8.74%、8.15%、8.77%, 均小于9%, 且各浓度间无统计学差异。

用SAS 9.3软件对数据进行分析, 各组间数据采用单因素方差分析(ANOVA)。

以总黄酮的 $Q_s$ 对 $t$ 绘制图表, 结果如图3。由图可知, 药物 $Q_s$ 在180 min内持续增长, 45 min后增长幅度明显变大; 高剂量组增幅明显大于低剂量组。各剂量组最大 $Q_s$ 值分别为32.00、63.49、115.29

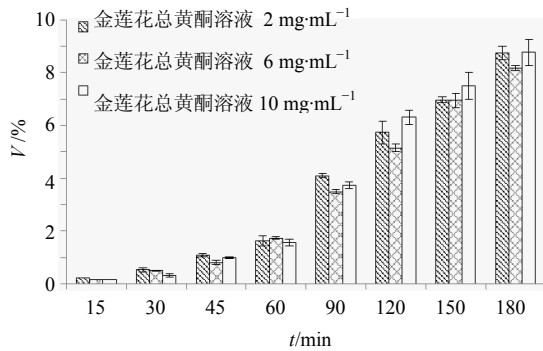


图2 不同浓度金莲花总黄酮的 $V$  ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig.2  $V$  of different concentrations of flavonoids from flowers of *T. chinensis* in intestinal tract ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

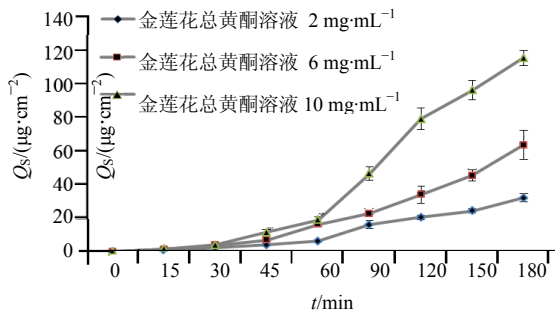


图3 不同浓度金莲花总黄酮肠道 $Q_s-t$ 曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig.3  $Q_s-t$  curves of different concentrations of flavonoids from flowers of *T. chinensis* in intestinal tract ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。0~30 min 内 3 个剂量组  $Q_s$  值无显著性差异；45~180 min 高剂量组显著大于低剂量组 ( $P < 0.01$ )，差异具有统计学意义。

### 3 讨论

外翻肠囊吸收模型操作简单、快捷、经济、重复性好，模型保持了完整的组织和粘膜特性，可以在体外模拟体内生理状态下药物在肠道的吸收情况。另外，囊内液体较少，药物累积速率较快，所需药物量少<sup>[16-18]</sup>，因此目前常用于药物吸收机制的研究。本研究通过建立外翻肠囊模型，分析了金莲花中总黄酮的吸收特征。结果表明，金莲花中的总黄酮的吸收率均小于 9%，不易被机体吸收，而且吸收率不受给药浓度的影响。

黄酮类是金莲花中含量最多的成分，生物活性较高，通常被认为是金莲花的主要药效物质，但是这类成分的生物利用度较低，使其药效的发挥受到限制。而吸收率低，不能被大量吸收入血，是导致黄酮类成分生物利用度低的重要原因。本

课题组之前的研究也证明，黄酮类单体化合物的机体吸收较弱，主要单体成分的吸收率均低于 6%，被吸收入血后，其含量反而低于金莲花中的酚酸类化合物<sup>[10, 19-20]</sup>。另有研究从药动学角度说明，金莲花的黄酮类单体成分溶解性差，极性大，难于被吸收且体内消除迅速，故生物利用度低<sup>[21]</sup>。虽然通常认为中药复杂成分间存在相互促进或者限制吸收的现象，但是本研究的结果证明，金莲花总黄酮与其单体化合物的吸收特征一致。因此，金莲花中黄酮类化合物的吸收确实较差，其对金莲花疗效的贡献度也应该被重新考虑。如何提高金莲花中黄酮类成分吸收率，进而提高其生物利用度是进一步开发利用金莲花的关键问题。

### 参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 1398.
- [2] 范新田, 傅强, 李凤丽, 等. 金莲花研究现状与展望 [J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2006, 7(2): 131-134.
- [3] 北京制药厂. 金莲花的药理实验和临床观察报告 [J]. 新医药学杂志, 1973, (5): 31-34.
- [4] Cai S Q, Wang R F, Yang X W, et al. Antiviral flavonoid-type C-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. Chem Biodiver, 2006, 3(3): 343-348.
- [5] Li Z L, Li D Y, Hua H M, et al. Three new acylated flavone C-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2009, 11(5): 426-432.
- [6] 涂华, 陈碧琼, 张燕军, 等. 天然类黄酮物质的提取工艺研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 277-279.
- [7] 叶锦霞, 梁日欣, 王岚, 等. 氧化应激与心血管疾病的关系研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008(10): 68-70.
- [8] 赵灿, 杜娜娜, 郭丽娜, 等. 金莲花总黄酮和总酚酸的抗炎活性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2015(11): 2634-2638.
- [9] 严力群, 朱殿龙, 丁万隆. 金莲花牡荆苷含量的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(5): 628-629.
- [10] Liu L J, Guo L N, Zhao C, et al. Characterization of the intestinal absorption of seven flavonoids from the flowers of *Trollius chinensis* using the Caco-2 cell monolayer model [J]. Plos One, 2015, 10(3): e0119263.
- [11] Wilson T H, Wiseman G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface [J]. J Physiol, 1954, 123(1): 116-125.
- [12] Wang R F, Yang X W, Ma C M, et al. Trollioside, a new

- compound from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2004, 6(2): 139-144.
- [13] 张 华, 安 骛, 徐冉驰, 等. UPLC 快速测定葛根芩连汤肠外翻囊样品中 6 个黄酮类成分含量 [J]. 药物分析杂志, 2012(1): 15-19.
- [14] 张英丰, 杨 庆, 李玉洁, 等. 离体外翻肠囊法研究丹参水溶性提取物丹酚酸 B 的大鼠肠吸收特性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 187-191.
- [15] 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.
- [16] 董 宇, 张英丰, 杨 庆, 等. 黄连提取物在大鼠肠外翻实验中的吸收研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(9): 1056-1060.
- [17] Barthe L, Woodley J, Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies [J]. Fundam Clin Pharmacol, 1999, 13(2): 154-168.
- [18] Kilic F S, Batu O, Sirmagul B, et al. Intestinal absorption of digoxin and interaction with nimodipine in rats [J]. Polish J Pharmacol, 2004, 56(1): 137-141.
- [19] Guo L N, Qiao S S, Hu J H, et al. Investigation of the effective components of the flowers of *Trollius chinensis* from the perspectives of intestinal bacterial transformation and intestinal absorption [J]. Pharm Biol, 2017, 55(1): 1747-1758.
- [20] Wu X W, Wang R F, Liu L J, et al. Absorbability, mechanism and structure-property relationship of three phenolic acids from the flowers of *Trollius chinensis* [J]. Molecules, 2014, 19(11): 18129-18138.
- [21] 童成亮, 刘晓东. 牡荆素在大鼠体内的药代动力学 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(1): 65-68.