

玳玳果黄酮降脂提取物在体肠吸收过程和转运机制研究

曾华平^{1,2}, 陈丹^{1*}, 陈红^{2*}, 熊朝栋¹, 洪丽婷¹, 刘秀棉¹, 余文静¹(1.福建中医药大学药学院, 福州 350122; 2.福建省立医院干部特诊科, 福州 350001)

摘要: 目的 探究玳玳果黄酮降脂提取物肠吸收部位、过程及转运机制。方法 采用大鼠在体单向肠灌注模型, 以提取物效应组分新橙皮苷及柚皮苷为指标, 芦丁为内标, 运用 UPLC-MS/MS 技术, 建立玳玳果黄酮降脂提取物肠灌注液定量分析法; 考察提取物在各肠段的吸收过程及特性; 加入外排转运蛋白 P-gp 抑制剂维拉帕米(verapamil, VP), 评价 P-gp 对提取物吸收的影响及肠道吸收参数(表观吸收系数 P_{app} 、吸收速率常数 K_a 和药物累计吸收百分比 $P\%$ 值)的变化; 并以不同质量浓度提取物探究效应组分的吸收转运过程。**结果** 玳玳果黄酮降脂提取物在不同肠段吸收量顺序为十二指肠>结肠>空肠≈回肠; 与十二指肠比较, 其他肠段的新橙皮苷及柚皮苷的肠道吸收参数 P_{app} 、 K_a 及 $P\%$ 均有显著性差异($P<0.05$), 十二指肠的新橙皮苷和柚皮苷的 $P\%$ 约是其余肠段的 5~7 倍; 加入 VP 后, 效应组分新橙皮苷及柚皮苷的 P_{app} 、 K_a 、 $P\%$ 均有显著提高, 且在十二指肠的吸收量明显增加, $P\%$ 约是 VP 空白组的 4 倍; 提取物高、中、低浓度组柚皮苷的 P_{app} 、 K_a 无显著变化; 中、低浓度组的新橙皮苷 P_{app} 、 K_a 随浓度增加略有上升; 中浓度组的新橙皮苷 P_{app} 、 K_a 比高浓度组增大, P_{app} 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 玳玳果黄酮降脂提取物的主要吸收部位是十二指肠; 其效应组分在肠道的吸收受 P-gp 影响显著, 各组分吸收参数变化趋势相同, 不存在竞争性或非竞争性抑制作用; 低浓度下表观吸收均属一级动力学过程; 柚皮苷的吸收机制可能为被动转运, 新橙皮苷的吸收机制可能为载体介导的促进扩散。

关键词: 在体单向肠灌注模型; 肠吸收特性; 玳玳果黄酮降脂提取物; 新橙皮苷; 柚皮苷; UPLC-MS/MS

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)03-0286-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.03.006

引用本文: 曾华平, 陈丹, 陈红, 等. 玳玳果黄酮降脂提取物在体肠吸收过程和转运机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(3): 286-293.

Research on Intestinal Absorption Process and Transfer Mechanism *in Vivo* of the Flavonoid Lipid-lowering Extract from Daidai Fruit

ZENG Huaping^{1,2}, CHEN Dan^{1*}, CHEN Hong^{2*}, XIONG Chaodong¹, HONG Liting¹, LIU Xiumian¹, YU Wenjing¹(1.Department of Pharmacy, Fujian University of TCM, Fuzhou 350122, China; 2.Cadre Special Department, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the intestinal absorption site, process and transport mechanism of the flavonoid lipid-lowering extract from Daidai fruit. **METHODS** Rat *in situ* single-pass intestinal perfusion model was used, with active parts neohesperidin and naringin as index, rutin as internal standard. Quantitative analysis method of the flavonoid lipid-lowering extract from Daidai fruit intestinal perfusate was established by UPLC-MS/MS. The extract absorption process and characteristics of different intestine segments were observed. P-gp efflux pumps inhibitor verapamil(VP) was added. The effect of P-gp on the absorption of the extract, and the changes in intestinal absorption parameters(apparent absorption coefficient P_{app} , absorption rate constant K_a , and percentage of accumulative absorption $P\%$) were evaluated. The absorption and transfer process of the active parts were explored using extract samples at different concentration levels. **RESULTS** The flavonoid lipid-lowering extract from Daidai fruit was absorbed in the following order: duodenum>colon>jejunum≈ileum. Compared with duodenum, the absorption parameters(P_{app} , K_a , and $P\%$) of neohesperidin and naringin at all the other intestine segments had significant difference($P<0.05$). The $P\%$ values of neohesperidin and naringin at duodenum was about 5–7 times of those at the other intestine segments. After adding VP, the P_{app} , K_a , and $P\%$ values of the active parts of the extract(neohesperidin and naringin) significantly increased. The amount absorbed at duodenum also showed a significant improvement, with $P\%$ value being 4 times of VP blank group. For extracts at all three concentration levels(high, middle, and low), there was no significant changes in the P_{app} and K_a values of naringin. For extracts at middle and low concentration levels, the P_{app} and K_a values of neohesperidin increased slowly as the concentration level of the samples increases. For extracts at middle concentration level, the P_{app} and K_a values of neohesperidin was larger than those for the extracts at high concentration level. The difference in P_{app}

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2018J01253); 福建省医学创新项目(2016-CX-45); 福建省科技计划项目(2010Y2004)

作者简介: 曾华平, 男, 硕士 Tel: 18650188675 E-mail: v_hugo1989@outlook.com *通信作者: 陈丹, 女, 博士, 教授 Tel: 13515026709 E-mail: 2536282060@qq.com 陈红, 女, 主任医师 Tel: 18950339443 E-mail: chyed@sina.com

values had statistical significance($P<0.05$). **CONCLUSION** The main absorption site of the flavonoid lipid-lowering extract from Daidai fruit is duodenum. P-gp have significant effects on the intestinal absorption of the active parts of the extract. Both active parts show similar changes for their absorption parameters, which implies that on P-gp efflux pathway, neohesperidin and naringin do not have competitive or non-competitive inhibitory effect on each other. Under low concentration, their apparent absorption at intestine follows the first order kinetics. The absorption mechanism of naringin is probably passive transport, and the neohesperidin is probably facilitated diffusion by vector-mediation.

KEYWORDS: *in situ* single-pass intestinal perfusion model; intestinal absorption characteristics; flavonoid lipid-lowering extract from Daidai fruit; neohesperidin; naringin; UPLC-MS/MS

玳玳(*Citrus aurantium* L. var *daidai* Tanaka)又称代代, 属芸香科柑橘亚属植物, 为酸橙的变种, 药食同源^[1]。玳玳果黄酮降脂提取物是从玳玳果中分离制备的总黄酮药效部位^[2-3], 具有良好的降血脂、抗氧化、清除自由基等作用^[4-5]。药效物质基础研究表明, 玳玳果黄酮降脂提取物的特征效应组分是新橙皮苷和柚皮苷^[6-10]。现代研究认为肠道吸收是影响口服药物进入体内及生物利用度的重要因素之一, 考察药物通过肠道进入体内的特性及转运机制, 对阐明中药作用机制、获取有代表意义的吸收动力学参数及剂型设计等均具有指导意义。在体单向肠灌注试验是目前被广泛认可的研究药物吸收的有效模型, 试验过程保留了肠段附着的神经、血管、消化腺体及共生菌群, 也是 FDA 认可的生物药剂分类学中研究药物与候选药物吸收特性的模型之一^[11]。故本实验选用大鼠在体肠灌注模型, 采用 UPLC-MS/MS 技术, 建立玳玳果黄酮降脂提取物效应组分肠灌注液定量分析法, 考察提取物在大鼠十二指肠、空肠、回肠、结肠等不同肠段的吸收过程和转运机制, 研究加入外排转运蛋白 P-gp 抑制剂维拉帕米(verapamil, VP)后, P-gp 对提取物吸收过程的影响, 吸收参数[表观吸收系数(P_{app})、吸收速率常数(K_a)、药物累计吸收百分比($P\%$)]的变化, 考察玳玳果黄酮降脂提取物在不同质量浓度水平时在机体内的吸收转运过程, 探究提取物最佳肠吸收部位、吸收过程以及肠吸收转运机制, 进一步明确外排转运蛋白对提取物的体内转运作用的影响。

1 材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY UPLC TQD 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪(美国 Waters 公司, 配四元高压泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、TQD 检测器、Masslynx 4.1 工作站控制系统); XS 205 十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司); SK-1 快速混匀器(常州国华电器有限公司);

pH 计(德国赛多利斯); TGL-18G-C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); Milli-Q 纯水器(美国 Millipore); 移液枪(美国 Thermo); DKZ-1 型恒温震荡水槽(上海一恒科学仪器有限公司); BT100-1F 恒流泵(保定兰格, 配 DG15 泵头)。

1.2 试药

玳玳果黄酮降脂提取物(自制, 批号: 20140422; 总黄酮含量: $954.90 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 新橙皮苷含量 $364.64 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 柚皮苷含量 $340.96 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$); 新橙皮苷对照品(批号: 111857-201201; 纯度 $\geq 98\%$)、柚皮苷对照品(批号: 110722-201209; 纯度 $\geq 98\%$)、芦丁对照品(批号: 100080-201206; 纯度 $\geq 98\%$)、盐酸维拉帕米(批号: 100223-200102)均购自中国食品药品检定研究院; 注射用生理盐水; 甲醇、乙腈均为色谱纯; 水为超纯水; 其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD 大鼠, ♂, 8~10 周龄, 体质量(320 ± 20)g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 生产许可证号: SCXK(沪)2012-0002。大鼠 25 °C, 光照/黑暗各 12 h 下饲养, 自由饮食、饮水, 适应性饲养 1 周后开始实验。实验前禁食不禁水 12 h。医学实验动物环境设施由福建中医药大学动物实验中心提供, 使用许可证号: SYXK(闽)2014-0005。实验动物处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱($2.1 \text{ mm}\times 100 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$), 流动相为乙腈-0.1%甲酸水(25 : 75), 流速 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 35 °C, 进样量 2 μL 。

2.1.2 质谱条件 扫描方式为负离子扫描(ESI⁻), 毛细管电压 3.0 kV, 锥孔电压(新橙皮苷 45 V、柚皮苷 40 V、芦丁 45 V), 离子源温度 110 °C, 脱溶剂气体温度 350 °C, 脱溶剂气体体积流量 $600 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$,

锥孔气体体积流量 $45 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$, 质量分析采用选择离子监测模式(SIR), 新橙皮苷 m/z 609.44, 柚皮苷 m/z 579.46, 内标芦丁 m/z 609.33。

2.2 溶液的制备

2.2.1 **Kreb-Ringer's(K-R)缓冲液的配制** 称取 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, NaH_2PO_4 0.32 g, NaHCO_3 1.37 g, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g, CaCl_2 0.37 g, 葡萄糖 1.4 g, 加水定容至 1 000 mL($5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 或 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_3PO_4 调节 pH 至 6.8)。

2.2.2 **混合对照品溶液的制备** 分别精密称取减压干燥至恒重的新橙皮苷、柚皮苷对照品适量, 加甲醇溶解并稀释, 制成含新橙皮苷 $100.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 柚皮苷 $99.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 即得。溶液置 4°C 冰箱保存。

2.2.3 **内标溶液的制备** 精密称取减压干燥至恒重的芦丁对照品适量, 加甲醇溶解并定容制成含芦丁 $99.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液, 即得内标储备液, 置于 4°C 冰箱保存。临用前精密量取内标储备液适量, 加甲醇稀释, 即得含芦丁 $4.98 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标溶液。

2.2.4 **高、中、低浓度含药肠灌流液的制备** 取玳玳果黄酮降脂提取物粉末约 625 mg, 精密称定, 加甲醇适量, 超声(500 W, 40 kHz)溶解后, 放至室温, 定量转移至 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得含药储备液, 于 4°C 冰箱保存备用。临用前, 分别精密吸取含药储备液, 用空白 K-R 试液逐级稀释, 制得其中含新橙皮苷浓度为 84.11, 42.06, 21.03 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和柚皮苷浓度为 81.80, 40.90, 20.45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高、中、低浓度含药肠灌流液。

2.2.5 **含 VP 肠灌流液的制备** 精密称取盐酸维拉帕米适量, 加中浓度含药肠灌流液适量制成每 1 mL 含 VP 0.1 mg 的肠灌流液, 即得。

2.2.6 **空白肠灌流液的制备** 37°C 等渗生理盐水冲洗肠段至无食物残渣后, 取空白 K-R 试液预热至 37°C , 以 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速对大鼠全肠道灌流 2 h, 收集流出液, 即得。

2.2.7 **质控样品溶液的制备与处理** 分别精密量取混合对照品溶液, 加甲醇稀释, 配制高、中、低 3 种浓度水平的混合对照品溶液(分别含新橙皮苷 50.3, 10.06, 2.012 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 柚皮苷 49.6, 9.92, 1.984 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 即得质控样品溶液。

精密吸取各质控样品溶液 100 μL , 氮气流下吹干, 残渣加等体积空白肠灌流液, 涡旋混合

3 min, 再精密加入内标溶液 200 μL , 涡旋混合 1 min, $14\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 待测。

2.3 样品处理方法

精密吸取肠灌流液 100 μL , 置洁净 EP 管, 精密加入内标溶液 200 μL , 涡旋混合 1 min, $14\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 移取上清液, 待测。

2.4 大鼠在体肠单向灌流模型的建立

2.4.1 **大鼠在体肠插管术** 大鼠实验前禁食不禁水 12 h, 实验时用 20%乌拉坦($5.0 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉。大鼠固定, 以暖水袋或台灯照射维持体温 37°C 。切开大鼠腹部皮肤, 沿腹中线做一约 3~4 cm 的切口, 打开腹腔, 在腹上部找到幽门, 小心将小肠从腹部拉出; 在需要考察的肠段(以分散面为单位)两端各做一切口(尽量找没有血管的地方切口和结扎), 将硅胶管沿肠内壁向内插入约 2~3 cm, 两端结扎, 用预热至 37°C 的等渗生理盐水($0.9\% \text{ NaCl}$)以 $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速灌注, 清洗肠段, 至无内容物; 再用空气排尽肠道内生理盐水; 再以较快流速使肠道及管路中充满含药肠灌流液, 调节流速, 使预热的含药肠灌流液以 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 灌注平衡肠段 45 min。肠段平衡后, 进口处更换预热至 37°C 内有含药肠灌流液的小瓶(进口处小瓶, 事先在室温下称量), 同时在出口处放置已知质量的接收小瓶; 每隔 15 min 收集一次灌流液, 已收集灌流液的进口处小瓶及接收液小瓶放冷至室温后称重, 同时迅速更换下一组进口处小瓶及接收液小瓶, 反复收集 5 次灌流液。实验毕, 大鼠腹腔放血处死, 沿硅胶管口剪下肠道, 摊平于生理盐水湿润的玻璃板上测量肠道内径及长度。实验过程中, 应用 37°C 生理盐水湿润后的棉花覆盖全肠段, 并及时补加生理盐水保持肠段湿润。

2.4.2 **实验肠段的选取** 十二指肠: 以幽门下十二指肠乳头上方 2~3 cm 开始, 下行取约 10 cm; 空肠: 以幽门下 15~18 cm 处开始, 下行取约 10 cm; 回肠: 以回盲肠交接处上行 15~20 cm 处开始向下取约 10 cm; 结肠: 以紧邻盲肠开始, 下行取约 10 cm。

2.4.3 **重量法矫正肠道水分分泌及吸收** 采用重量法矫正由于肠道自身对水分的重吸收等引起的灌流液体积误差。精密称取灌流前药液质量(W_{in})、灌流后药液质量(W_{out}), 再用微量移液器精密吸取灌流出口处药液, 计算每 1 mL 药液质量, 即得出口处药液密度(ρ)。按照式(1)、式(2)计算出口处药液体积, 同法计算进口处药液体积。

$$\text{密度计算: } \rho = \frac{W}{V} \quad (1)$$

$$\text{体积计算: } Q_{out} = \frac{W_{out}}{\rho_{out}} \quad (2)$$

式中, Q_{out} 、 W_{out} 、 ρ_{out} 分别为灌流后药液体积、质量及密度。

2.5 吸收参数计算

2.5.1 吸收速率常数 K_a 和表观吸收系数 P_{app} 采用重量法对实验中灌流液体积进行校正, 按照式(3)、式(4)计算吸收速率常数 K_a 及表观吸收系数 P_{app} 。

$$K_a = \left(1 - \frac{\rho_{out} \times Q_{out}}{\rho_{in} \times Q_{in}}\right) \frac{Q}{V} \quad (3)$$

$$P_{app} = \frac{-Q \times \ln\left(\frac{\rho_{out} \times Q_{out}}{\rho_{in} \times Q_{in}}\right)}{2\pi r l} \quad (4)$$

式中, ρ_{in} 和 ρ_{out} 分别为肠道进出口灌流液的质量浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); Q 为灌流液流速($0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$); Q_{in} 为进入肠道的药液体积, Q_{out} 为肠道出口处灌流液的体积(mL, 经重量法校正); V 为灌流液肠段的体积(cm^3); r 和 l 分别为灌流肠段横截面半径(cm)和长度(cm)。

2.5.2 药物吸收量及累计吸收百分比 $P\%$ 按照式(5)、式(6)计算药物累计吸收百分比 $P\%$ 。

$$m = m_i - n_i \quad (5)$$

$$P\% = \frac{\sum_{i=1}^s (m_i - n_i)}{2\pi r l \times \sum_{i=1}^s m_i} \times 100\% \quad (6)$$

式中, m 为每时段药物吸收总量(μg); m_i 为各时段进入肠段的药物量(以进入肠段体积乘供试液浓度计算, μg); n_i 为出口处药物量(以出口处药物浓度乘校正后体积计算, μg); r 和 l 分别为灌流肠段横截面半径(cm)和长度(cm)。

2.6 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件统计分析, 用舍弃商法(Q 检验)去除可疑值, 再对数据进行正态检验, 其中两样本均数的比较采用 t 检验; 多样本均数比较先采用方差分析(ANOVA of completely randomized design), 若有差异则进一步采用多重比较。其中, 若各组方差齐($P > 0.05$)则组间两两比较采用 S-N-K 法(Student-Newman-Keuls 法, 即 q 检验); 对照组与各处理组间的比较采用最小有意义差异 LSD 法; 若方差不齐($P < 0.05$)则采用 Games-Howell 法比较组间差异。不服从正态分布的数据, 使用非

参数检验比较组间差异。所有统计分析的检验水准均为 0.05, 当 $P < 0.05$ 时, 判定差异有统计学意义, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

采用 Q 检验法对每只动物所获得的 5 个 K_a 、 P_{app} 和 $P\%$ 进行偶然误差值的取舍, 取舍后保留的 K_a 、 P_{app} 和 $P\%$ 值经独立样本 t 检验无显著性差异($P > 0.05$), 最终获得的 K_a 、 P_{app} 和 $P\%$ 等参数分别为这几个相近值的平均值。

2.7 方法学验证

2.7.1 专属性试验 分别取空白肠灌流液、收集的待测肠灌流液样品, 按“2.3”项下同法处理, 另取已处理的质控样品溶液, 分别注入 UPLC-MS/MS 联用仪, 分析。结果表明, 供试样品中效应组分新橙皮苷、柚皮苷、内标芦丁均分离良好, 无其他物质干扰。结果见图 1。

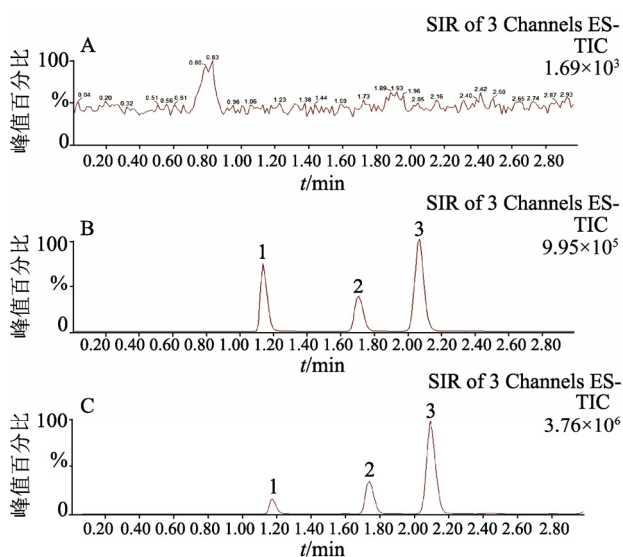


图 1 质谱总离子流图

A-空白肠灌流液; B-已处理的质控样品溶液; C-肠灌流液; 1-芦丁(内标); 2-柚皮苷; 3-新橙皮苷。

Fig. 1 Mass spectrometric total ion chromatogram

A-blank intestinal perfusion fluid; B-processed QC sample solution; C-intestinal perfusion fluid; 1-rutin(internal standard); 2-naringin; 3-neohesperidin.

2.7.2 标准曲线制备及线性关系考察 分别精密量取混合对照品溶液适量, 用甲醇稀释配制系列混合对照品溶液(含新橙皮苷 100.6, 50.3, 20.12, 10.06, 4.024, 2.012, 0.804 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 柚皮苷 99.2, 49.6, 19.84, 9.92, 3.968, 1.984, 0.793 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。分别精密吸取混合对照品溶液各 100 μL , 置 1.5 mL EP 管中, 氮气流下吹干, 再精密加入空白肠灌流液 100 μL 涡旋混合 1 min。按照“2.3”项下自“精密加入内标溶液 200 μL ”开始同法处理, 上清液

分别注入 UPLC-MS/MS 联用仪。分别以新橙皮苷、柚皮苷质量浓度为横坐标, 峰面积(A_s)与内标峰面积(A_i)的比值(A_s/A_i)为纵坐标, 线性回归, 加权最小二乘法计算回归方程(权重因子为 $1/\chi^2$), 记录线性范围。结果表明, 新橙皮苷在 $0.804\ 8\sim 100.6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好, 校正标样回算的浓度均在标示值的 $\pm 10\%$ 以内, 相关系数 r 均 > 0.990 , 每个浓度 3 个分析批 $\text{RSD} \leq 6\%$ 。柚皮苷在 $0.793\ 6\sim 99.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好, 校正标样回算的浓度均在标示值的 $\pm 8\%$ 以内, 回归方程相关系数 r 均 > 0.998 , 每个浓度 3 个分析批 $\text{RSD} \leq 5\%$ 。结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果

Tab. 1 Results of regression equation test

效应组分	分析批次	回归方程($n=7$)	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
新橙皮苷	分析批 1	$y=1.668\times 10^{-1}x-1.628\times 10^{-2}$	0.998 8	0.804 8~100.6
	分析批 2	$y=1.624\times 10^{-1}x-0.718\times 10^{-2}$	0.999 2	0.804 8~100.6
	分析批 3	$y=1.816\times 10^{-1}x-3.188\times 10^{-2}$	0.998 7	0.804 8~100.6
柚皮苷	分析批 1	$y=1.313\times 10^{-1}x-3.608\times 10^{-2}$	0.999 1	0.793 6~99.2
	分析批 2	$y=1.341\times 10^{-1}x-0.58\times 10^{-2}$	0.999 2	0.793 6~99.2
	分析批 3	$y=1.436\times 10^{-1}x-1.648\times 10^{-2}$	0.998 6	0.793 6~99.2

2.7.3 定量限考察 取混合对照品溶液, 反复稀释至低浓度, 按“2.3”项下方法操作, 取上清液分别注入 UPLC-MS/MS 联用仪分析, 信噪比法($S/N=10$)确定最低定量浓度; 同法平行制备该最低定量浓度 5 份分析。结果表明, 测量值在理论值的 $100\%\sim 110\%$, $\text{RSD} \leq 5\%$ ($n=5$)。故确定新橙皮苷及柚皮苷定量下限分别为 $0.804\ 8$, $0.793\ 6\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7.4 精密度试验 按“2.2.7”项下处理制备高、中、低 3 种浓度水平的质控样品溶液各 5 份, 取上清液日内连续注入 UPLC-MS/MS 联用仪, 计算批内精密度。连续 3 d, 每日同法制备高、中、低 3 种浓度水平的质控样品溶液各 5 份, 取上清液注入 UPLC-MS/MS 联用仪, 计算批间精密度。结果表明, 测量值 RSD 在 $1.62\%\sim 4.65\%$ ($n=5$), 方法精密度良好。

2.7.5 方法回收率试验 按“2.2.7”项下处理制备高、中、低 3 种浓度水平的质控样品溶液各 5 份, 取上清液分别注入 UPLC-MS/MS 联用仪, 分析测定, 测量值与理论值相比计算方法回收率。结果表明, 平均回收率为 $95.36\%\sim 104.3\%$, RSD 为 $1.62\%\sim 4.65\%$ ($n=5$), 方法回收率良好。

2.7.6 灌流液孵育稳定性考察 取新鲜配制 K-R

试液, 按“2.2.4”项下制备高、中、低 3 个浓度水平的含药肠灌流液, 置 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴中温孵, 分别于 0, 2, 4, 6, 8 h 取样, 按“2.3”项下自“精密吸取肠灌流液 $100\ \mu\text{L}$ ”开始并以纯甲醇代替内标同法操作, 上清液分别注入 UPLC-MS/MS 联用仪, 考察药物在灌流液中的稳定性。结果表明, 不同时间点各组分峰面积值相对 0 h 时供试品溶液中各组分峰面积的均值偏差为 $0.27\%\sim 3.31\%$ ($n=5$), RSD 为 $0.94\%\sim 2.96\%$ ($n=5$), 孵育过程新橙皮苷及柚皮苷在 8 h 内基本稳定。

2.7.7 样品室温放置稳定性考察 按“2.2.7”项下方法处理制备高、中、低 3 种浓度水平的质控样品溶液, 室温放置 0, 1, 2, 4, 8 h 后, 取上清液分别注入 UPLC-MS/MS 联用仪, 考察样品室温放置的稳定性。结果表明, 不同时间点各组分峰面积与 0 h 时各组分峰面积的均值偏差为 $-2.12\%\sim 3.80\%$ ($n=5$), RSD 为 $0.86\%\sim 3.51\%$ ($n=5$), 供试品溶液在室温放置 8 h 基本稳定。

2.7.8 基质效应考察 按“2.2.7”项下方法处理制备高、中、低 3 种浓度水平的质控样品溶液各 5 份, 另取同体积相同高、中、低 3 个浓度水平的混合对照品溶液各 5 份, 按“2.3”项下“精密加入内标溶液 $200\ \mu\text{L}$ ”开始同法操作, 取上清液分别注入液-质联用仪, 分析, 记录各组分峰面积。质控样品溶液峰面积值记为 A_1 ; 混合对照品溶液峰面积值记为 A_2 。依据公式基质因子($\%$)= $(A_1/A_2)\times 100\%$, 分别计算新橙皮苷、柚皮苷及内标芦丁的基质因子。以分析物的基质因子除以内标的基质因子计算内标归一化的基质因子评价基质效应(matrix effect, ME)。结果表明, 平均 ME 为 $108.9\%\sim 99.90\%$ ($n=5$), RSD 为 $1.67\%\sim 4.70\%$ ($n=5$), 提示肠灌流液对新橙皮苷、柚皮苷均无明显的离子抑制或离子增强作用, 肠灌流液内其他物质不干扰定量测定。

2.8 玳玳果黄酮降脂提取物效应组分肠吸收部位与特性考察

取健康 SD 大鼠 3 只, 用中浓度含药肠灌流液(新橙皮苷浓度为 $42.06\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 柚皮苷浓度为 $40.90\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 采用大鼠在体肠单向灌流模型, 按“2.4”项下同法操作, 考察十二指肠、空肠、回肠、结肠各段对药物吸收的影响。结果表明, 玳玳果黄酮降脂提取物效应组分新橙皮苷及柚皮苷在十二指肠、空肠、回肠、结肠各段均有吸收,

但吸收较差(P_{app} 均 $<0.2 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$); 同一肠段中新橙皮苷及柚皮苷的 P_{app} 、 K_a 和 $P\%$ 均无显著性差异, 其吸收顺序为十二指肠>结肠>空肠~回肠; 与十二指肠比较, 其他肠段中新橙皮苷及柚皮苷的 P_{app} 、 K_a 和 $P\%$ 值均有显著性差异($P<0.05$), 十二指肠中新橙皮苷和柚皮苷的百分吸收率 $P\%$ 约是其余肠段的 5~7 倍。提示十二指肠为提取物主要吸收部位, 效应组分新橙皮苷和柚皮苷在其余各个肠段中的吸收无差异。结果见表 2~4。

表 2 新橙皮苷、柚皮苷在不同肠段的 $P_{app}(\bar{x} \pm s, n=3)$
Tab. 2 P_{app} of neohesperidin and naringin in different regional intestine($\bar{x} \pm s, n=3$)

效应组分	$P_{app} \times 10^{-4} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$			
	十二指肠	空肠	回肠	结肠
新橙皮苷	0.175±0.013	0.021±0.003 ¹⁾	0.024±0.002 ¹⁾	0.031±0.005 ¹⁾
柚皮苷	0.170±0.015	0.029±0.005 ¹⁾	0.026±0.003 ¹⁾	0.032±0.003 ¹⁾

注: 与十二指肠相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。
 Note: Compared with duodenum, ¹⁾ $P<0.05$.

表 3 新橙皮苷、柚皮苷在不同肠段的 $K_a(\bar{x} \pm s, n=3)$
Tab. 3 K_a of neohesperidin and naringin in different regional intestine($\bar{x} \pm s, n=3$)

效应组分	$K_a \times 10^{-3} / \text{s}^{-1}$			
	十二指肠	空肠	回肠	结肠
新橙皮苷	0.241±0.034	0.020±0.004 ¹⁾	0.022±0.003 ¹⁾	0.028±0.004 ¹⁾
柚皮苷	0.234±0.050	0.028±0.007 ¹⁾	0.025±0.003 ¹⁾	0.031±0.002 ¹⁾

注: 与十二指肠相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。
 Note: Compared with duodenum, ¹⁾ $P<0.05$.

表 4 新橙皮苷、柚皮苷在不同肠段的 $P\%(\bar{x} \pm s, n=3)$
Tab. 4 $P\%$ of neohesperidin and naringin in different regional intestine($\bar{x} \pm s, n=3$)

效应组分	$P\%$			
	十二指肠	空肠	回肠	结肠
新橙皮苷	0.473±0.071	0.071±0.010 ¹⁾	0.080±0.024 ¹⁾	0.106±0.030 ¹⁾
柚皮苷	0.509±0.030	0.087±0.014 ¹⁾	0.077±0.008 ¹⁾	0.095±0.008 ¹⁾

注: 与十二指肠相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。
 Note: Compared with duodenum, ¹⁾ $P<0.05$.

2.9 P-gp 外排转运蛋白对玳玳果黄酮降脂提取物吸收的影响

取健康 SD 大鼠 6 只, 分为 VP 实验组、VP

空白组, 采用大鼠在体肠单向灌流模型, 按“2.4”项下同法操作, 于胃幽门下十二指肠乳头上 2~3 cm 开始, 下行取约 10 cm, 在待测肠段两侧插入硅胶管; VP 实验组用含 VP 肠灌流液进行肠灌流实验; VP 空白组以中浓度的含药肠灌流液进行肠灌流实验。考察比较 P-gp 外排转运蛋白对提取物肠道吸收的影响。结果表明, VP 实验组肠灌流液加入 VP 后, 玳玳果黄酮降脂提取物中新橙皮苷及柚皮苷的 P_{app} 、 K_a 、 $P\%$ 均有显著提高, 差异有统计学意义($P<0.01$), 新橙皮苷及柚皮苷的百分吸收系数($P\%$)约是 VP 空白组的 4 倍, 但新橙皮苷及柚皮苷组间各吸收参数均无统计学差异。提示 P-gp 外排转运蛋白被抑制后, 效应组分在十二指肠的吸收量都有明显增加, 玳玳果黄酮降脂提取物效应组分均是 P-gp 外排蛋白的底物, 其在肠道吸收受外排转运蛋白 P-gp 影响显著; 由于 P-gp 被抑制后, 二者吸收参数变化趋势相同, 故推测 P-gp 外排通路上新橙皮苷及柚皮苷之间可能不存在竞争性或非竞争性抑制作用。结果见表 5。

2.10 玳玳果黄酮降脂提取物十二指肠的吸收参数及其效应组分吸收转运机制

取健康 SD 大鼠 9 只, 分为玳玳果黄酮降脂提取物高、中、低浓度组, 每组 3 只, 分别用高、中、低浓度含药肠灌流液, 采用大鼠在体单向肠灌流模型, 按“2.4”项下同法操作进行肠灌流, 于胃幽门下十二指肠乳头上 2~3 cm 开始, 下行取约 10 cm, 在待测肠段两侧插入硅胶管, 考察效应组分吸收参数的变化。结果表明, 玳玳果黄酮降脂提取物高、中、低浓度组中柚皮苷的吸收速率参数 P_{app} 、 K_a 无显著性变化, 提示其吸收机制可能为被动转运; 玳玳果黄酮降脂提取物中、低浓度组中新橙皮苷吸收速率常数 P_{app} 、 K_a 随供试品浓度的增加而略有上升。与中浓度组比较, 高浓度组新橙皮苷吸收参数 P_{app} 、 K_a 减小, 差异有统计学意义($P<0.05$), 提示高浓度下新橙皮苷的吸收受到抑制, 其吸收机制可能为载体介导的促进扩散。结果见表 6。

表 5 维拉帕米对新橙皮苷、柚皮苷在十二指肠中的吸收参数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab. 5 Effect of verapamil on the absorption parameters of neohesperidin and naringin in duodenum($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$P_{app} \times 10^{-4} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$		$K_a \times 10^{-3} / \text{s}^{-1}$		$P\%$	
	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷
VP 实验组	0.692±0.082	0.695±0.055	0.996±0.155	1.041±0.157	1.771±0.445	1.904±0.233
VP 空白组	0.175±0.013 ¹⁾	0.170±0.015 ¹⁾	0.241±0.034 ¹⁾	0.234±0.050 ¹⁾	0.473±0.071 ¹⁾	0.509±0.030 ²⁾

注: 与 VP 空白组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。
 Note: Compared with VP blank group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

表 6 玳玳果黄酮降脂提取物不同浓度下效应组分的吸收参数($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 6 Absorption parameters of neohesperidin and naringin of different concentration of the flavonoid lipid-lowering extract from Daidai fruit ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	$P_{app} \times 10^{-4} / \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$		$K_a \times 10^{-3} / \text{s}^{-1}$		P/%	
	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	新橙皮苷	柚皮苷
玳玳果黄酮降脂提取物高浓度组	0.142±0.010 ¹⁾	0.169±0.013 ²⁾	0.158±0.032 ¹⁾	0.210±0.065	0.463±0.085	0.438±0.067
玳玳果黄酮降脂提取物中浓度组	0.175±0.013	0.170±0.015	0.241±0.034	0.234±0.050	0.509±0.030	0.473±0.071
玳玳果黄酮降脂提取物低浓度组	0.165±0.017	0.163±0.011	0.184±0.018	0.182±0.029	0.474±0.024	0.482±0.043

注: 与玳玳果黄酮降脂提取物中浓度组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与新橙皮苷相比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the flavonoid lipid-lowering extract from Daidai fruit at middle concentration group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with neohesperidin group, ²⁾ $P < 0.05$.

3 讨论

大鼠在体肠吸收模型包括在体肠循环灌流及在体单向灌流,前者实验时间较长(4~6 h),所用的灌流流速高(2~5 mL·min⁻¹),极易造成肠道黏膜损伤,导致药物吸收增大,使测定结果与真实情况出现较大偏差;而后者以较低流速(0.2~0.3 mL·min⁻¹)对某一肠段进行单向灌流,以进出口灌流液中的药物浓度差考察药物的吸收特性,吸收速率稳定。故实验采用在体单向肠灌流模型,先以 3 mL·min⁻¹的流速在短时间内灌流清洗肠道后,再将流速调节至 0.2 mL·min⁻¹进行肠段的平衡及灌流实验,肠道不易阻塞,吸收速率稳定。选择肠灌流液 pH 值 6.8,以接近肠道微环境下 pH 值。

药物通过肠道黏膜时,易受到肠道内共生菌群及小肠上皮细胞内多种代谢酶的代谢作用,在体肠模型的实验结果实际上反映的是药物在肠道内的表观吸收过程,故相比其他文献报道的有效吸收参数 P_{app} ,课题组认为在此使用表观吸收系数 P_{app} 及表观吸收速率常数 K_a 对药物的吸收特性进行评价更为合适。 $P\%$ 反映进入肠道后药物消除的百分率^[11],传统的计算方法仅考虑药物进入肠道的药量及消除量间的关系,但药物的吸收分数还与其肠道面积存在一定的联系,因而在公式(3~6)中以药物消除百分数除以实验肠道的表面积,评价单位肠道面积下药物消除的百分数。

肠道吸收药物的同时,也在分泌和吸收水分,肠腔内水分的变化会直接影响药物浓度,故需对实验过程中水分的变化进行校正^[11]。目前,常用的水分校正方法多为酚红法和重量法。重量法若以灌流液密度变化校正水分的吸收和分泌,由于实际灌流过程中因肠道黏膜脱落或药物吸收等原因,常导致出口灌流液密度并不相等,以理论值进行测算难免造成误差。因此,实验采用较为简

便的重量法校正水分的同时,抽取每次灌流的流出液测算流出液密度,以更好地校正水分变化,避免误差。

通常 P_{app} 值 $> 0.2 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,表明药物在体内吸收完全;当 P_{app} 值 $< 0.03 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 时,则认为药物吸收差^[12]。实验结果表明,玳玳果黄酮降脂提取物中新橙皮苷及柚皮苷在十二指肠、空肠、回肠、结肠段的 P_{app} 值均 $< 0.2 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,其中空肠、回肠、结肠 P_{app} 值小于或接近于 $0.03 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 属吸收较差的肠段,而新橙皮苷和柚皮苷在十二指肠中 P_{app} 值、 K_a 值显著高于其他肠段且百分吸收率 $P\%$ 约为其他肠道的 5~7 倍。提示十二指肠可能为玳玳果黄酮降脂提取物中效应组分新橙皮苷及柚皮苷的吸收窗,其 P_{app} 值、 K_a 、 $P\%$ 较高的原因可能与实验时未结扎十二指肠上段胆管并分离附着胰腺,而使胰液连同胆汁中胆酸盐和其他一些促吸收物质一同流入十二指肠,调节肠道微环境 pH、改善药物溶解度或增加膜通透性有关。而结肠吸收虽较十二指肠弱,但 P_{app} 值和 K_a 值却高于回肠和空肠,推测结肠部位表观吸收参数较高与较强的肠菌代谢有关。

VP 为典型的 P-gp 抑制剂,实验选择 VP 作为 P-gp 抑制剂考察玳玳果黄酮降脂提取物在肠道吸收受 P-gp 的影响。结果表明,P-gp 蛋白对药效组分的外排作用明显,加入 VP 后效应组分新橙皮苷及柚皮苷吸收量增加约 4 倍,提示提取物效应组分新橙皮苷及柚皮苷均是 P-gp 底物,P-gp 是影响提取物肠道吸收的重要因素之一;可通过筛选合适的可抑制 P-gp 外排作用的药用辅料,构建新型给药系统,改善药效组分吸收障碍,提高口服制剂的生物利用度。

十二指肠应为玳玳果黄酮降脂提取物效应组分在肠道的主要吸收窗,提取物的柚皮苷在肠道

的吸收机制主要为被动扩散，新橙皮苷的转运则可能有载体介导的促进扩散参与；在低浓度范围内，新橙皮苷及柚皮苷在肠道的表观吸收均属一级动力学过程；流出的肠灌流液中效应组分含量均下降，也进一步提示，提取物效应组分可能以原型形式进入体循环而不需经肠菌或肠道代谢转化为苷元后吸收，以原型形式发挥药效，由此进一步明确了玳玳果黄酮降脂提取物在肠道的吸收机制和转运形式。

REFERENCES

- [1] 王一仁. 饮片新参[M]. 上海: 上海千顷堂书局出版社, 1936: 28.
- [2] LIU Y J, CHEN D, HUANG Q D, et al. Study on extraction techniques of flavonoids in *Citrus aurantium*[J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2009, 29(21): 1826-1828.
- [3] 陈丹, 刘永静. 一种玳玳果总黄酮有效部位的制备方法: 中国, CN102058701A[P]. 2011-05-18.
- [4] 刘永静, 陈丹, 邱红鑫, 等. 玳玳黄酮有效部位提取物降血脂作用的研究[J]. *中国中医药科技*, 2013, 20(6): 622-623.
- [5] QIU H X, CHEN D, LIU Y J, et al. Study on antiatherosclerosis effects of Daidai flavones dropping pills on hyperlipidemia rats[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2011, 28(7): 597-601.
- [6] ZENG L J, CHEN D, HUANG Q D, et al. Isolation of a new flavanone from Daidai fruit and hypolipidemic activity of total flavonoids extracts[J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(16): 1521-1528.
- [7] ZENG L J, CHEN D, ZHENG L, et al. Studies on pharmacokinetics features of characteristic active ingredients of Daidai flavone extract in different physiological status[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2014, 39(2): 309-315.
- [8] WU X Q, ZENG L J, CHEN D, et al. Study on the characteristic fingerprints *in vitro* and *in vivo* of total flavonoids extracts of Daidai by UPLC-MS[J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2014, 34(20): 1734-1740.
- [9] ZENG H P, CHEN H, CHEN D, et al. Metabolic characteristics of active parts of lipid-lowering flavonoid extract of Daidai in liver and intestinal microsomes of rats[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44(4): 819-826.
- [10] ZENG H P, CHEN H, CHEN D, et al. Binding characteristics of plasma protein in active parts of Daidai lipid-lowering flavonoid extract[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2019, 44(9): 1911-1920.
- [11] YANG X D, WANG C, ZHOU P, et al. Absorption characteristic of paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate (CP-25) in *in situ* single-pass intestinal perfusion in rats[J]. *Xenobiotica*, 2016, 46(9): 775-783.
- [12] MOURAD F H. Animal and human models for studying effects of drugs on intestinal fluid transport *in vivo*[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2004, 50(1): 3-12.

收稿日期: 2019-11-11
(本文责编: 李艳芳)