

黄芩汤中黄芩苷的大鼠在体肠吸收特性研究

苟 缙, 田乙岚, 杨丁雨, 钟 蓉, 郑勇凤*, 袁 星*

成都中医药大学, 四川 成都 611137

摘要:目的 通过大鼠在体单向肠灌注实验研究黄芩汤中黄芩苷在体肠吸收特性。方法 建立大鼠在体单向肠灌注模型, 采用质量法计算黄芩苷吸收速率常数(K_a)和有效渗透系数(P_{eff})。结果 黄芩汤中黄芩苷在十二指肠、空肠、回肠的吸收速率和程度都存在一定差异。其中黄芩苷在十二指肠的吸收速率显著高于空肠段, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 略高于回肠段但差异无统计学意义; 黄芩苷在十二指肠的吸收程度明显高于空肠段且差异具有统计学意义($P < 0.05$), 略高于回肠段但差异无统计学意义。结论 黄芩汤中黄芩苷在十二指肠的吸收速度和吸收程度较好, 表明黄芩汤中黄芩苷在体吸收具有肠道部位依赖特性。

关键词: 黄芩汤; 黄芩苷; 在体肠吸收

中图分类号: R966

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)03-0438-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.03.009

Intestinal absorption characteristics of baicalin in Huangqin Decoction in rats

GOU Jin, TIAN Yi-lan, YANG Ding-yu, ZHONG Rong, ZHENG Yong-feng, YUAN Xing

Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To study the intestinal absorption characteristics of baicalin in Huangqin decoction by *in vivo* single intestinal perfusion test. **Methods** Rat model of *in vivo* single intestinal perfusion model was established, and the absorption rate constant (K_a) and effective osmotic coefficient (P_{eff}) of baicalin were calculated. **Results** The absorption rate and degree of baicalin in duodenum, jejunum and ileum were significantly different. The absorption rate of baicalin in duodenum was significantly higher than that in jejunum, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and it slightly higher than that in ileum, and the difference was not statistically significant. The absorption degree of baicalin in duodenum was significantly higher than that in jejunum, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), but it slightly higher than that in ileum, and the difference was not statistically significant. **Conclusion** The absorption rate and degree of baicalin in the duodenum of Huangqin Decoction are good, so it indicates that the absorption of baicalin in Huangqin Decoction has intestinal site-dependent characteristics.

Key words: Huangqin Decoction; baicalin; intestinal absorption

黄芩汤出自张仲景《伤寒论》, 由黄芩、白芍、炙甘草、大枣组成, 是清热止痢、和中止痛的经典方剂^[1]。此方效专力宏、药味精简, 历代医家常在其上进行加减化裁, 用以治疗细菌性痢疾、急性肠炎、溃疡性结肠炎、泄泻等肠道感染性疾病, 被誉为治热性痢疾的祖方^[2]。口服是中药复方的重要给药途径, 有效成分的吸收是复方发挥作用的前提, 因此研究复方中主要有效成分的吸收特征有利于阐释复方作用机制。本研究通过建立大鼠在体单向肠

灌注模型, 分析黄芩汤中主要有效成分黄芩苷在大鼠不同肠段的吸收特征, 为阐述黄芩汤的作用机制提供参考。

1 仪器与材料

CPA225D 型电子天平 (德国赛多利斯公司); KH5002DE 型数控超声波机 (昆山禾创超声仪器有限公司); WH-3 型涡旋混合仪 (上海沪西分析仪器有限公司); 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); 流量型智能蠕动泵 (保定雷弗流体科技有限公司);

收稿日期: 2019-12-14

基金项目: 成都中医药大学青年教师创新基金 (ZRQN1706); 成都中医药大学校基金医院专项 (2017EL20)

作者简介: 苟 缙, 男, 四川巴中人, 本科, 研究方向为药物新制剂及药物相互作用。E-mail: 2572518268@qq.com

*通信作者 郑勇凤, 女, 四川成都人, 讲师, 硕士, 主要从事中药新制剂、新剂型及药物作用机制相关研究。E-mail: zyf730@126.com

袁 星, 男, 四川成都人, 讲师, 硕士, 主要从事中药炮制学及药物作用机制相关研究。E-mail: 916395277@qq.com

Allegra X-30R 型多功能台式离心机(美国 Beckman Coulter 公司)。

黄芩、芍药、炙甘草、大枣均购自成都市荷花池公司,由成都中医药大学中药标本中心刘晓芬鉴定,储存于本实验室。芦丁对照品(质量分数 $\geq 98\%$,成都好校友生物科技有限公司,批号 140225),黄芩苷对照品(质量分数 $\geq 98\%$,成都好校友生物科技有限公司,批号 D0321AS),乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

SD 大鼠,雄性,体质量(200 ± 20) g,购自成都市达硕实验动物中心,动物使用许可证号 SCXK(川)2013-19,在成都中医药大学动物房内饲养,温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度(50 ± 10)%,适应性喂养 3 d 后进行实验。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3]

迪马 C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(含 0.1%甲酸),梯度洗脱:0~5 min, 10%乙腈;5~15 min, 30%乙腈;15~20 min, 60%乙腈;20~22.2 min, 80%乙腈;22.2 min 以后, 10%乙腈;检测波长 280 nm;体积流量 1 mL/min;柱温 33 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL 。

2.2 样品、溶液的制备

2.2.1 黄芩汤冻干粉的制备 黄芩、白芍、炙甘草、大枣分别按照质量比 24:16:16:16 g 称定质量后,用 12 倍饮片质量的水常温下泡 40 min,再大火煎煮 10 min,小火煎煮 30 min,滤过,药渣同上法复煎 1 次,滤过,滤液合并后用旋转蒸发器挥去水分,定容至 100 mL, -20°C 冷冻后冷冻干燥,称定质量,碾压成粉末,即得黄芩汤冻干粉样品。HPLC-MS 法测定黄芩汤冻干粉中黄芩苷的质量分数为 15.99%。

2.2.2 Vit C-K-R 试液的配制^[4] 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、Vit C 2.0 g 和 MgCl_2 0.02 g,加蒸馏水溶解后与 CaCl_2 溶液、葡萄糖混匀,定容至 1 L,即得 Vit C-K-R 试液,备用。

2.2.3 黄芩汤溶液的配制 精密称取黄芩汤冻干粉 1 g,置于 100 mL 量瓶中,所得质量浓度为 10 mg/mL,少量多次加入 Vit C-K-R 试液约 95 mL, 40 kHz 超声处理 10 min,取出放至室温后定容,用于大鼠在试液中加入黄芩汤样液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,于 1、2 h 取液,

加入 1 mL 甲醇涡旋 1 min, 12 000 r/min 离心 15 min,按照上述色谱条件测定,考察药物在 K-R 试液中的体单向肠灌流。

2.2.4 空白大鼠肠灌流液 取 Vit C-K-R 试液适量,按实验方案中方法灌流,收集流出液,即得。

2.2.5 黄芩苷对照品溶液的配制 精密称取黄芩苷对照品适量,甲醇溶解,定容,得质量浓度为 1 mg/mL 对照品母液,冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 单向肠灌流和样品采集

取雄性 SD 大鼠,禁食 24 h 不禁水, ip 20%乌拉坦 5 mL/kg 进行麻醉,沿腹中线剪开长 4~5 cm 的切口,小心分离十二指肠(距幽门 1 cm 处开始)、空肠(距幽门 15 cm 处开始)、回肠(自盲肠上行 20 cm 处开始),约取 10 cm,两端切口,插管并结扎,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 0.9%氯化钠溶液将肠内容物冲净,再用 Vit C-K-R 试液饱和肠道 10 min。进口处用已知质量的装有灌流药液(37 $^{\circ}\text{C}$)的供试小瓶进行灌流,体积流量 0.2 mL/min,出口处以一已知质量的收集液小瓶收集灌流液。待供试小瓶内液体全部灌流完毕,称定质量,计算灌入和收集的药液的质量。

2.4 药物灌流

取预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的黄芩汤供试液,先以 1.0 mL/min 平衡 5 min,再调整体积流量为 0.2 mL/min,最后剪取各灌流的肠段,测量肠内径、长度,计算灌流肠段的体积、灌流肠段的表面积。

2.5 肠灌流液样品处理

取上述肠灌流供试液 2 mL, 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液经 0.45 μm 滤膜滤过,取上清液 10 μL 进样。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性试验 取空白肠灌流液、对照品溶液和大鼠黄芩汤灌流液处理样品,加入 1 mL 甲醇涡旋 1 min, 12 000 r/min,离心 15 min,按上述色谱条件测定,结果见图 1。可见肠灌流样品、Vit C-K-R 液中其他成分对黄芩苷无干扰。

2.6.2 线性关系考察 配制质量浓度分别为 0.781、1.563、3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、1 000.00 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芩苷对照品溶液,每个质量浓度平行 3 份,加入 1 mL 甲醇涡旋 1 min, 12 000 r/min 离心 15 min,按上述色谱条件测定。以黄芩苷峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。以黄芩苷峰面积与质量浓度进行线性回归,得到回归方程 $Y=23\,310\,302.460\,0\,X-303\,539.959\,8$ ($r^2=$

0.999 7), 结果表明黄芩苷在 7.813~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.6.3 稳定性试验 于 Vit C-K-R 试液、空白 K-R

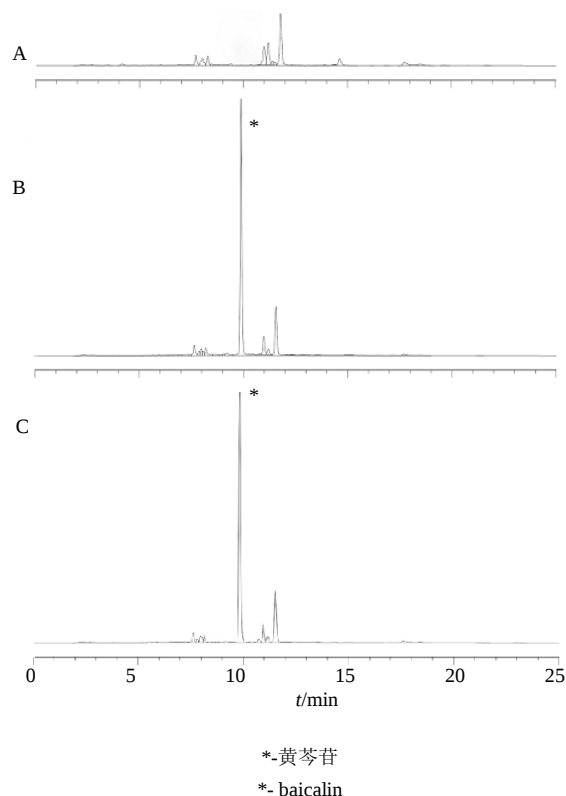


图1 空白肠灌流液(A)、空白肠灌流液+对照品(B)和灌流样品液(C)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank (A), blank + reference substance (B), and sample (C)

稳定性。于空白肠灌流液中加入适量黄芩苷对照品溶液, 室温下存放, 于 1、2、4、8、10 h 取样, 加入 1 mL 甲醇涡旋 1 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 按上述色谱条件测定, 考察黄芩苷在空白肠灌流液中的稳定性。结果显示黄芩苷在空白 K-R 溶液中极不稳定, 加入 Vit C 可明显提高其稳定性; 黄芩苷在 Vit C-K-R 液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h, 质量分数无明显变化; 黄芩苷在空白肠循环液中室温条件存放 10h, 质量分数无明显变化, 见表 1。

2.6.4 精密度试验 配制 100、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩苷对照品溶液, 每 1 个质量浓度平行 3 份, 加入 1 mL 甲醇涡旋 1 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 按照上述色谱条件测定, 于 1 d 内测定, 同 1 个质量浓度每 2 小时测定 1 次, 计算日内精密度; 同上操作, 于 3 d 内测定, 每 1 个质量浓度每隔 1 天测定 1 次, 结果见表 2。

表1 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Results of stability test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/h	黄芩苷质量分数/%		
	K-R	Vit C-K-R	空白灌流液
1	12.58 $\pm$ 1.87	100.85 $\pm$ 2.33	99.89 $\pm$ 1.63
2	13.07 $\pm$ 1.69	101.32 $\pm$ 2.74	98.79 $\pm$ 1.85
4			99.69 $\pm$ 2.33
8			100.25 $\pm$ 1.01
10			99.92 $\pm$ 2.32

表2 精密度试验结果 ($n = 3$)

Table 2 Results of precision test ($n = 3$)

质量浓度/ $(\mu\text{g mL}^{-1})$	日内精密度		日间精密度	
	测定值/ $(\mu\text{g mL}^{-1})$	RSD/%	测定值/ $(\mu\text{g mL}^{-1})$	RSD/%
100	99.87 $\pm$ 0.32	0.24	99.85 $\pm$ 0.47	0.65
500	498.63 $\pm$ 1.59	0.13	499.06 $\pm$ 1.07	0.28
1 000	1001.17 $\pm$ 2.63	0.18	999.85 $\pm$ 3.01	0.35

2.6.5 回收率试验 吸取空白肠灌流液, 分别依次加入不同质量浓度的黄芩苷对照品溶液, 使得肠灌流液中黄芩苷质量浓度分别为 100、500、1 000 $\mu\text{g/mL}$, 每 1 个质量浓度平行 3 份, 加入 1 mL 甲醇涡旋 1 min, 12 000 r/min, 离心 15 min, 按照上述色谱条件测定, 记录峰面积, 以测得量与加入量之比计算回收率, 结果见表 3。

表3 回收率试验结果 ($n = 3$)

Table 3 Results of recovery test ($n = 3$)

质量浓度/ $(\mu\text{g mL}^{-1})$	回收率/%	RSD/%
100	102.23 $\pm$ 2.10	2.05
500	95.16 $\pm$ 2.06	2.16
1 000	98.01 $\pm$ 2.18	2.22

2.7 在体单向肠灌流各肠段吸收特性

所得灌流液样本处理后进样分析, 采用质量法计算吸收速率常数 (K_a) 和有效渗透系数 (P_{eff})^[5], 进行黄芩汤在 SD 大鼠十二指肠、空肠、回肠的肠吸收特性考察。采用 SPSS 15.0 对数据进行分析, 各数据比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 见表 4。

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{Q_{out}}{Q_{in}} \right) Q / \pi r^2 l \quad P_{eff} = \frac{-Q \ln \left(\frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{Q_{out}}{Q_{in}} \right)}{2\pi l}$$

其中 C_{out} 为稳态肠管药物浓度, 即肠道出口药物浓度; C_{in} 为药物进入肠管开始灌流前浓度; Q 为灌流速度 (0.2 mL/min); r 为灌流肠管的半径; l 为灌流肠管的长度; Q_{in} 和 Q_{out} 分别为肠道进出口灌流液的体积 (mL, 假定进出口灌流液流速为 1 g/mL)。

表 4 各肠段黄芩苷吸收速率常数和有效渗透系数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 4 K_a and K_{eff} of baicalin in each intestinal segment ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

吸收肠段	$K_a / (\times 10^{-3} \text{ min}^{-1})$	$P_{eff} / (\times 10^{-4} \text{ cm min}^{-1})$
空肠	12.66 $\pm$ 3.64	29.2 $\pm$ 3.2
回肠	15.61 $\pm$ 4.98	45.1 $\pm$ 3.8
十二指肠	16.39 $\pm$ 1.38*	52.9 $\pm$ 1.6*

与空肠段比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs jejunum segment

结果显示, 黄芩汤中黄芩苷在十二指肠、空肠、回肠的吸收速率和程度都存在一定差异。其中黄芩苷在十二指肠的吸收速率显著高于空肠段, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 略高于回肠段但差异无统计学意义; 黄芩苷在十二指肠的吸收程度明显高于空肠段且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 略高于回肠段但差异无统计学意义。

3 讨论

黄芩是黄芩汤的君药, 黄芩苷为其中主要有效

成分, 行清热解毒、泻火燥湿之功效。本研究通过大鼠在体单向肠灌流的研究, 以阐释黄芩汤中主要活性成分黄芩苷的体内吸收特征。从实验结果来看, 黄芩汤中黄芩苷在十二指肠的吸收速度和吸收程度较其他肠段好, 表明黄芩汤中黄芩苷在体吸收具有十二指肠部位依赖特性。此外, 黄芩苷首先在十二指肠中快速吸收, 空肠段吸收速率、吸收程度降至最低, 至回肠段又有一定程度升高, 结合相关文献报道^[6]结果, 部分吸收入血的黄芩素可以再以黄芩苷的形式分泌回小肠, 推测可能是造成回肠段吸收程度升高的原因之一。

口服是中药复方最常用的给药途径, 具有服用方便、安全性高、快捷有效的优势, 有效成分的主要吸收部位在小肠, 对药物有效成分的肠道吸收特性进行研究可为深入挖掘复方作用机制提供参考。本实验发现了黄芩汤中主要有效成分黄芩苷的肠道吸收特性, 但复方中成分复杂, 单一成分的吸收影响因素复杂, 同时单一成分也难以关联整方药效, 因此对其相关机制的研究还需深入挖掘。

参考文献

- [1] 孙思邈. 备急千金要方 [M]. 焦振廉校注. 北京: 中国医药科技出版社, 2013: 144.
- [2] 王旭瑞. 黄芩汤现代药效学研究及临床运用 [J]. 医药前沿, 2014(29): 300-301.
- [3] 李 涛, 王怡薇, 王彦礼, 等. 黄芩汤血浆中多成分 LC-MS 法测定及其药代动力学特征研究 [J]. 药学报, 2013, 48(06): 917-924.
- [4] 刘太明. 黄芩苷与黄芩素的吸收机理研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006: 31-32.
- [5] 郑勇凤. 痰热清方药物配伍对黄芩苷体内过程的影响 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [6] 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.