

金莲花汤中葛根素、牡荆素、迷迭香酸和咖啡酸的肠吸收研究

李丹¹, 方明月², 王莎², 陶嘉悦², 汪静², 刘斯琪², 侯金才^{1*}, 王如峰^{2*}

1. 京津冀联创药物研究(北京)有限公司, 北京 100025

2. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 102488

摘要: 目的 考察金莲花汤中葛根素、牡荆素、迷迭香酸和咖啡酸的肠吸收特性, 确定金莲花汤中活性成分。方法 采用 HPLC 法测定肠吸收样品中咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸, 以大鼠肠外翻吸收实验和 Caco-2 细胞模型转运实验计算各成分的累积吸收量、吸收速率常数和表观渗透系数。结果 随着金莲花汤的质量浓度增加, 咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的吸收速率常数呈线性关系增加, 符合零级吸收速率, 且吸收率均小于 1.4%, 在肠道中吸收效果普遍较差, 其中咖啡酸的吸收较为明显。各成分的表观渗透系数数值大小为迷迭香酸>咖啡酸>葛根素>牡荆素。结论 金莲花汤中葛根素、牡荆素、迷迭香酸和咖啡酸均可在肠道中被吸收, 吸收方式为被动扩散, 咖啡酸和迷迭香酸可能是金莲花汤中发挥药效的活性物质, 葛根素和牡荆素可能是前药。

关键词: 金莲花汤; 咖啡酸; 葛根素; 牡荆素; 迷迭香酸; 累积吸收量; 吸收速率常数; 表观渗透系数

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)05-1102-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.05.010

Intestinal absorption of puerarin, vitexin, rosmarinic acid, and caffeic acid in Jinlianhua Decoction

LI Dan¹, FANG Ming-yue², WANG Sha², TAO Jia-yue², WANG Jing², LIU Si-qi², HOU Jin-cai¹, WANG Ru-feng²

1. Jingjinji United Innovation Pharmaceutical Research Company, Beijing 100025, China

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

Abstract: Objective To investigate intestinal absorption of puerarin, vitexin, rosmarinic acid, and caffeic acid in Jinlianhua Decoction, and to determine the active components. **Methods** The contents of puerarin, vitexin, rosmarinic acid, and caffeic acid were detected by HPLC method. Cumulative absorption amount, absorption rate constant, and permeability coefficient (P_{app}) of each component were calculated using everted intestinal sac model and Caco-2 cell monolayer model. **Results** As the concentration of Jinlianhua Decoction increases, the absorption rate constants of caffeic acid, puerarin, vitexin, and rosmarinic acid increase linearly with a zero-order reaction. Their absorption rates were below 1.4%, the absorption effect in the intestine was generally poor, and the caffeic acid was the highest. The P_{app} values were rosmarinic acid > caffeic acid > puerarin > vitexin. **Conclusion** Puerarin, vitexin, rosmarinic acid, and caffeic acid in Jinlianhua Decoction can be absorbed in the intestine with passive diffusion. Caffeic acid and rosmarinic acid may be active substances in Jinlianhua Decoction, while puerarin and vitexin may be prodrugs.

Key words: Jinlianhua Decoction; caffeic acid; puerarin; vitexin; rosmarinic acid; cumulative absorption amount; absorption rate constant; permeability coefficient

金莲花汤是 2003 年非典型肺炎流行期间国家中医药管理局公布的防治处方之一, 由金莲花、蒲公英、大青叶、葛根、苏叶组成, 水煎服^[1], 全方可清热解毒、散风透邪, 对风温病疗效显著^[2]。研究

发现金莲花汤水煎液具有明显的抗流感病毒活性^[3], 通过体外抗病毒实验证明金莲花汤提取物对小鼠 H1N1 流感病毒有抑制作用^[4]。赓迪等^[5]通过分子对接技术研究表明金莲花汤表现出 Mpro 蛋白结

收稿日期: 2022-11-05

基金项目: 中央引导地方科技发展资金项目(206Z2502G)

作者简介: 李丹(1984—), 女, 陕西汉中, 高级工程师, 博士, 主要从事新药研发工作。E-mail: ldyeah@yeah.net

*通信作者: 王如峰(1970—), 男, 山东无棣人, 教授, 博导, 主要从事中药化学成分研究工作。E-mail: wangrufeng@tsinghua.org.cn

侯金才(1969—), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 研究员, 博士, 主要从事新药研发工作。E-mail: jincai@126.com

合活性, 具有抗新型冠状病毒感染的潜力^[5]。目前对金莲花汤中化学成分研究较多, 但对其活性成分的研究很少。王腾宇等^[6]测定了不同批次金莲花汤水煎液中绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素和迷迭香酸, 结果显示葛根素的含量最高, 咖啡酸含量最低, 其余 3 种成分在不同批次间差异较大。Fang 等^[7]通过 UPLC-MS/MS 技术定性定量测定了金莲花汤中 24 种化学成分, 包括荭草素、荭草素-2-O- β -L-半乳糖苷等, 其中咖啡酸、葛根素、牡荆素和迷迭香酸是该方中含量较多的成分。大部分药物进入消化道后需经小肠黏膜吸收入血, 再随着血液循环系统分布到各组织器官中发挥药效, 因此肠吸收研究与药物疗效研究关系密切。外翻肠囊模型常用于胃肠段的药物吸收、代谢、外排转运等研究, 在药物吸收转运研究中可直观地反映药物的吸收转运量^[8]。该模型保留了完整的在体组织和肠上皮黏膜, 吸收表面积较大, 存在黏液层, 保证了与体内的高度一致性。Caco-2 细胞是人源结肠腺癌细胞, 适用于吸收特性和机制研究, 其在培养条件下可自发进行上皮样分化, 并可形成紧密联结, 形成肠腔侧和肠壁侧, 其标志酶的功能表达、渗透特征与小肠类似。本研究通过 Caco-2 细胞模型法和外翻肠囊法研究了金莲花汤中 4 种成分葛根素、牡荆素、迷迭香酸和咖啡酸的肠吸收特性及其吸收机制, 并推测了金莲花汤中活性成分, 以期为金莲花汤的开发和临床应用提供依据。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪, 包括 Waters 1525 二元溶剂输液泵、Waters 2489 紫外检测器、Waters breeze 2 色谱工作站 (美国 Waters 公司); Sartorius BS323S 万分之一天平、BT125D 十万分之一天平 (德国 Sartorius 公司); XMTD-6000 电热恒温水浴锅 (上海比朗仪器有限公司); O₂-CO₂ (95:5) 混合气 (氧利来化工气体有限公司); 电子调温电热套 [泰斯特 (天津) 仪器有限公司]; Millicell®-ERS 细胞电阻仪 (美国 Millipore 公司); Nikon TE2000S 型倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司); SpectraMax 190 酶联免疫检测仪 (美国 Molecular Devices 公司)。

DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 Gibco 公司); 青-链霉素双抗、非必需氨基酸 (美国 Corning 公司); 胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司); Hank's 缓冲溶液 (HBSS)、二甲基亚砜 (美国 Sigma 公司); 色谱纯甲醇、色谱纯乙腈 (美国 Thermo Fisher Scientific 公

司); 冰醋酸 (北京化工厂)。咖啡酸 (批号 Y25O8C46530)、葛根素 (批号 S02M9B54875) 均购自上海源叶生物科技有限公司, 牡荆素 (批号 MUST-20091710)、迷迭香酸 (批号 MUST-20113007) 均购自成都曼思特生物科技有限公司, 普萘洛尔 (批号 BCBB9359V)、阿替洛尔 (批号 BCB5759V) 均购自美国 Sigma 公司; 所有对照品的质量分数均大于 98%。

金莲花、蒲公英、大青叶、葛根和苏叶药材均购自河北省安国药材市场, 由北京中医药大学生命科学院王如峰教授鉴定, 金莲花为毛茛科植物金莲花 *Trollius chinensis* Bge. 的干燥花, 蒲公英为菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. - Mazz. 的干燥全草, 大青叶为十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 的干燥叶, 葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi. 的干燥根, 苏叶为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶。

雄性 SD 大鼠体质量 (250±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) 2020-0033。Caco-2 细胞株购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心, 实验所用细胞代数低于 50 代。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 Tyrode 缓冲液制备 精密称取 NaCl 8.00 g, KCl 0.28 g, NaHCO₃ 1.00 g, NaH₂PO₄ 0.05 g, MgCl₂ 0.10 g, 溶于 500 mL 蒸馏水中, 密闭冷藏; 另称取 CaCl₂ 0.20 g, 溶于 500 mL 蒸馏水中, 密闭冷藏。使用前将 2 种溶液混合后加入葡萄糖 1.00 g, 搅拌均匀, pH 7.2~7.4, 即得。

2.1.2 MTT 溶液配制 精密称取 MTT 粉末 0.25 g, 溶解于 50 mL PBS 中, 超声溶解, 0.22 μ m 无菌滤膜滤过除菌, 分装后置于 -20 °C 避光保存, 备用。

2.1.3 金莲花汤水提物溶液的制备 按处方中金莲花、葛根、大青叶、苏叶、蒲公英比例 6:10:10:6:15 取适量, 加入 8 倍量水煎煮 2 次, 每次 30 min, 滤过, 合并滤液, 浓缩为水煎剂 (1 mL 相当于生药 1.00 g)。实验时用 Tyrode 液配制成含生药分别为 0.025、0.050、0.100 g/mL 的金莲花汤水提物溶液。

2.1.4 混合对照品储备液的制备 分别精密称取咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸对照品适量于 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 然后精密移取各对照

品溶液适量,用甲醇配制成含咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸均为 0.75 mg/mL 的混合对照品储备液,备用。

2.1.5 肠吸收样品溶液的制备 取肠吸收样品 200 μ L,加入甲醇 600 μ L 混匀,15 000 r/min 离心 30 min,取上清,0.22 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 HPLC 法测定咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸

2.2.1 色谱条件 Phenomenex Synergi Polar-RP 80A 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 4 μ m);流动相为 1%乙酸水 (A) - 乙腈 (B),梯度洗脱 (0~35 min, 5%~14% B; 35~50 min, 14%~20% B; 50~60 min, 20%~25% B; 60~75 min, 25% B; 75~77 min, 25%~5% B; 77~78 min, 5% B);检测波长

为 354 nm;体积流量为 1 mL/min;柱温为 35 $^{\circ}$ C;进样体积为 10 μ L。

2.2.2 专属性试验 取混合对照品 100 μ L,加入空 Tyrode 液 100 μ L,同时取空 Tyrode 液 200 μ L、肠吸收样品溶液进样检测,得色谱图,见图 1。可见待测成分峰形、分离效果较好,Tyrode 液中物质和金莲花汤中其他成分不干扰待测成分的检出。

2.2.3 线性关系和定量限 取空 Tyrode 液 200 μ L,加入混合对照品系列溶液适量,配制成质量浓度分别为 4 200.00、2 100.00、1 050.00、525.00、262.50、131.25、65.60 ng/mL 的模拟生物样品,样品处理后进样检测。以质量浓度与峰面积作线性回归,计算回归方程,并根据 $S/N=10$ 计算各成分的最低定量限,见表 1。

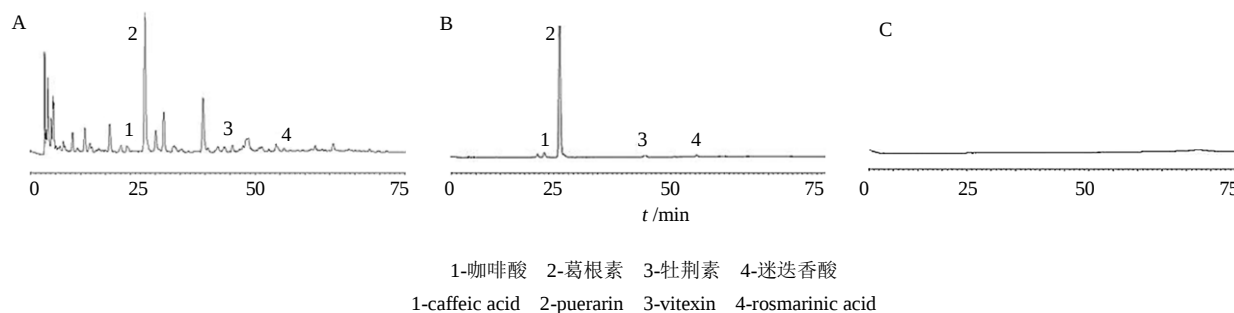


图 1 肠吸收样品 (A)、空白 Tyrode 液加入混合对照品 (B) 和空白 Tyrode 液 (C) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of intestinal absorption sample (A), blank Tyrode solution with mixed reference substances (B), and blank Tyrode solution (C)

表 1 不同成分的回归方程和定量限

Table 1 Regression equation and quantitative limit of different components

成分	回归方程	r	线性范围/(ng mL ⁻¹)	最低定量限/(ng mL ⁻¹)
咖啡酸	$Y=23\ 033\ X-1\ 151.80$	0.999 5	65.6~4 200	1.28
葛根素	$Y=628\ 896\ X-28\ 753.00$	0.999 5	65.6~4 200	0.47
牡荆素	$Y=14\ 329\ X-437.84$	0.999 8	65.6~4 200	1.52
迷迭香酸	$Y=7\ 573.1\ X-676.69$	0.999 6	65.6~4 200	3.30

2.2.4 稳定性试验 取肠吸收样品,制备溶液,分别于 0、2、4、6、8、12 h 进样测定,结果咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸峰面积的 RSD 值均 $<9.1\%$,说明样品至少在 12 h 内稳定。

2.2.5 提取回收率试验 取咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的质量浓度均分别为 131.25、262.50、525.00 ng/mL 质控样品,每个质量浓度配制 5 份,处理后进样测定,得到各成分峰面积 A_1 ;另取空 Tyrode 液样品,上清液加入与上述相应等质量浓度

的混合对照品溶液,同法操作,得到色谱峰面积 A_2 。 A_1/A_2 即为提取回收率,结果见表 2。各成分 3 个质量浓度的提取回收率均在 73.9%~96.2%。

2.2.6 精密度试验 取咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的质量浓度均分别为 131.25、262.50、525.00 ng/mL 质控样品,每个质量浓度配制 5 份,1 d 内测定 5 次,考察日内精密度;连续测定 5 d,考察日间精密度,结果见表 3。结果表明,各成分 3 个质量浓度精密度 RSD 值均在 15.0%以内。

表 2 提取回收率试验 ($n=5$)Table 2 Extraction recovery test ($n=5$)

成分	质量浓度/(ng mL ⁻¹)	提取回收率/%	RSD/%
咖啡酸	525.00	82.9±7.3	9.9
	262.50	92.1±5.0	6.0
	131.25	80.8±16.0	22.1
葛根素	525.00	95.2±8.8	10.3
	262.50	82.3±5.2	4.4
	131.25	90.2±1.9	2.3
牡荆素	525.00	96.2±7.9	9.2
	262.50	74.2±6.3	9.4
	131.25	86.7±4.7	6.0
迷迭香酸	525.00	74.9±4.8	7.1
	262.50	85.2±10.1	13.3
	131.25	73.9±6.2	9.4

表 3 日内和日间精密度试验 ($n=3$)Table 3 Intraday and inter day precision test ($n=3$)

成分	质量浓度/ (ng mL ⁻¹)	日内精密 度/%	日间精密 度/%
咖啡酸	525.00	1.94	0.47
	262.50	4.04	10.56
	131.25	1.44	5.14
葛根素	525.00	1.78	1.05
	262.50	2.78	5.74
	131.25	4.95	8.12
牡荆素	525.00	4.20	4.24
	262.50	3.14	1.82
	131.25	1.43	10.21
迷迭香酸	525.00	2.96	5.54
	262.50	8.31	3.50
	131.25	9.04	12.86

2.3 大鼠肠外翻吸收实验

取 SD 大鼠 16 只, 随机分为 4 组, 实验前 12 h 禁食, 自由饮水。脱颈椎处死, 沿腹中线剪开, 将大鼠肠管与肠系膜剥离, 快速取肠管 10 cm, 置于 0 °C Tyrode 液中冲洗, 至无内容物, 在不损伤肠管的情况下, 剥离肠表面的脂肪和血管。将肠腔面向外翻出, 用 Tyrode 液冲洗后, 将一端结扎, 另一端结扎于自制圆管, 使之形成囊状肠管。向肠囊内注入 37 °C Tyrode 液 2 mL, 将其放入已有 Tyrode 液的浴槽中, 保持 37 °C 恒温, 并向浴槽中通入 O₂-CO₂ (95:5) 混合气, 平衡 5 min 后, 将浴槽中的 Tyrode

液倒出, 待用。分别向各浴槽中加入提前恒温水浴过 (37 °C) 的 0.025、0.050、0.100 g/mL 金莲花汤药液各 10 mL, 对照组加入 10 mL Tyrode 液, 同时开始计时。分别于 15、30、45、60、90、120、150、180 min 从肠管内取样 200 μL, 同时补足相同体积的空白 Tyrode 液, 制备肠吸收样品溶液。试验结束后, 剪开肠管, 测量被考察肠段的长度和宽度。计算金莲花汤水煎液的不同质量浓度下各个时间点咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的单位肠管面积累积吸收量 (Q_C)。

$$Q_C = 1.5 \times C_n + 0.2 \times \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

C_n 表示第 n 个取样点测得的药物质量浓度, C_i 表示第 i 个取样点测得的药物质量浓度; Q_C 表示药物各时间点单位面积累积吸收量

以药物的累积吸收量对时间进行相关回归分析, 斜率 (K) 除以吸收表面积 (A) 即为吸收速率常数 (K_a)。以单位面积累积吸收量 (Q_C) 对时间 (t) 进行零级、一级、Higuchi 方程拟合, 以决定系数为拟合优劣的判断标准。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 对数据进行分析, 各组数据比较采用单因素方差分析。

V 是给药一段时间后肠囊内药物质量浓度和给药质量浓度的比值, 可以用于表征小肠对药物的吸收率。

$$V = (Q/V_0) / C_0$$

Q 为 t 时间内的药物累积吸收量, V_0 为初始加入空白 Tyrode 液的体积, C_0 为浴槽中各成分的初始质量浓度

结果表明咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸在金莲花汤的不同质量浓度时均可进入肠囊, 且质量浓度在检测的线性范围内。金莲花汤的不同质量浓度时各组分肠吸收均为线性吸收, 其回归相关系数 (r) 均达到 0.90 以上, 符合零级吸收速率, 见图 2、表 4。随着金莲花汤的质量浓度增加, 咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸的吸收速率常数呈线性关系增加, 表明咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸在肠道内的吸收形式为被动扩散, 见表 5。

0.025、0.050、0.100 g/mL 金莲花汤水煎液中咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸吸收率均小于 1.4%, 在肠道中吸收效果普遍较差。葛根素的吸收率随质量浓度增加呈现增加趋势, 咖啡酸和迷迭香酸的吸收率在 0.050 g/mL 时达到最大值, 牡荆素的吸收率在 0.100 g/mL 时达到最大值, 其中咖啡酸的吸收较为明显, 见图 3。

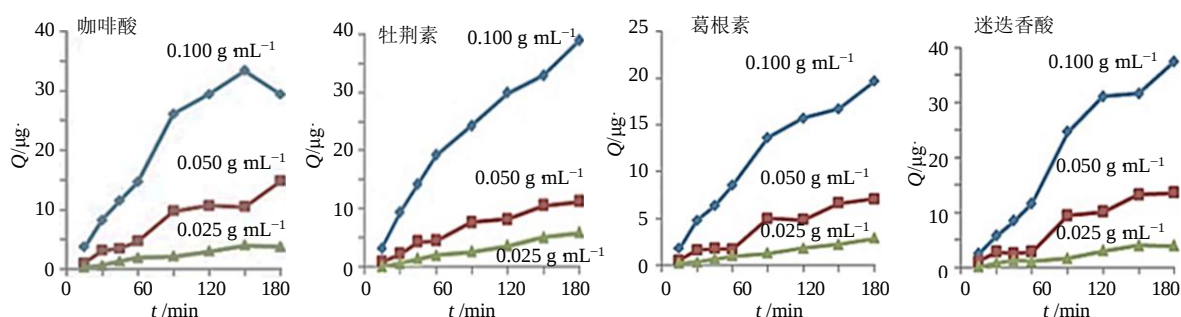


图 2 不同质量浓度金莲花汤中咖啡酸、牡荆素、葛根素、迷迭香酸在肠道的累积吸收量-时间曲线

Fig. 2 Cumulative absorption-time curves of caffeic acid, vtexin, puerarin, and rosmarinic acid in different concentrations of Jinlianhua Decoction

表 4 金莲花汤不同质量浓度下各成分肠道的累积吸收量-时间线性回归

Table 4 Cumulative intestinal absorption - time linear regression at different concentrations of Jinlianhua Decoction

成分	金莲花汤 0.100 g mL ⁻¹		金莲花汤 0.050 g mL ⁻¹		金莲花汤 0.025 g mL ⁻¹	
	回归方程	r	回归方程	r	回归方程	r
咖啡酸	$Q=0.178\ 0\ t+4.207\ 6$	0.934\ 0	$Q=0.078\ 4\ t+0.500\ 9$	0.969\ 7	$Q=0.022\ 6\ t+0.200\ 1$	0.975\ 4
葛根素	$Q=0.105\ 7\ t+1.782\ 9$	0.979\ 1	$Q=0.041\ 5\ t+0.077\ 7$	0.970\ 3	$Q=0.015\ 7\ t-0.044\ 0$	0.997\ 0
牡荆素	$Q=0.203\ 4\ t+3.958\ 8$	0.982\ 3	$Q=0.062\ 9\ t+0.716\ 5$	0.981\ 3	$Q=0.034\ 7\ t-0.389\ 6$	0.995\ 6
迷迭香酸	$Q=0.224\ 2\ t-0.201\ 1$	0.977\ 7	$Q=0.084\ 3\ t-0.324\ 9$	0.966\ 0	$Q=0.024\ 2\ t-0.127\ 5$	0.974\ 6

表 5 金莲花汤不同质量浓度下各成分的吸收速率常数

Table 5 Absorption rate constant K_a of each component at different concentrations of Jinlianhua Decoction

成分	$K_a/(\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\text{cm}^{-1})$			r
	金莲花汤 0.100 g mL ⁻¹	金莲花汤 0.050 g mL ⁻¹	金莲花汤 0.025 g mL ⁻¹	
咖啡酸	0.001 283±0.000 200	0.000 744±0.000 100	0.000 218±0.000 100	0.983 3
葛根素	0.000 840±0.000 100	0.000 451±0.000 100	0.000 143±0.000 100	0.992 4
牡荆素	0.001 556±0.000 200	0.000 935±0.000 100	0.000 307±0.000 100	0.981 4
迷迭香酸	0.001 604±0.000 200	0.000 867±0.000 100	0.000 218±0.000 100	0.988 2

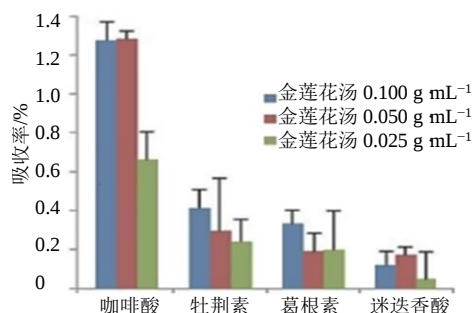


图 3 金莲花汤不同质量浓度下各成分吸收率

Fig. 3 Absorption rate of each component with different concentrations of Jinlianhua Decoction

2.4 Caco-2 细胞模型转运实验

2.4.1 Caco-2 细胞培养 从超低温中取出 Caco-2 细胞 (41 代), 37 ℃ 水浴快速融化, 转至 15 mL 离

心管中, 再加入完全 DMEM 培养基 6 mL, 吹打混匀, 离心弃上清, 加入培养基吹打散至单细胞, 接种于细胞培养瓶中培养, 按时换液、传代。

2.4.2 无毒剂量考察 将金莲花汤梯度稀释成各以生药计的质量浓度, 分别为 100.0、80.0、60.0、40.0、30.0、20.0、10.0、5.0、1.0、0.5 mg/mL。取对数生长期 Caco-2 细胞于 96 孔板中培养 12 h, 之后将各质量浓度梯度的金莲花汤加入 96 孔板中, 每个质量浓度设置 5 个复孔, 每孔加入 100 μL, 对照组加入等体积的 PBS 缓冲液。培养 5 h 后, 分别在每孔中均加入 MTT 溶液, 培养 4 h 之后加入 DMSO 适量, 酶标仪检测, 计算细胞存活率 (细胞存活率 = $A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}$)。不同质量浓度金莲花汤作用于 Caco-2 细胞之后的存活率见图 4。0.5~20 mg/mL

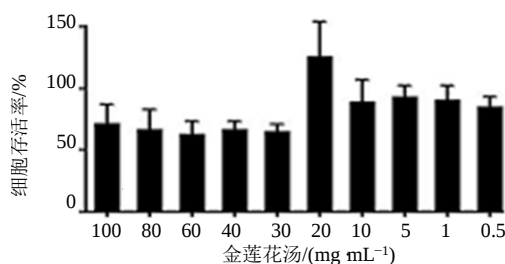


图4 金莲花汤无毒剂量考察

Fig. 4 Non-toxic dose of Jinlianhua Decoction

金莲花汤作用之后的细胞存活率 $\geq 85.0\%$,在5h内对细胞几乎无影响。

2.4.3 Caco-2 细胞模型转运试验 取对数生长期 Caco-2 细胞,加入完全 DMEM 培养基配制成细胞悬液,于12孔 transwell 小室顶端培养,底端加入1.5 mL 培养基,37℃恒温培养,并持续测定 Caco-2 细胞单层的电阻值。Caco-2 细胞培养21 d,其细胞电阻值大于 $500 \Omega/\text{cm}^2$,显示可用于药物转运试验。根据 MTT 细胞毒性实验结果,选用金莲花汤的质量浓度分别为20.0、10.0、5.0、1.0 mg/mL;阳性药物阿替洛尔 1 mmol/L,阳性药普萘洛尔 0.1 mmol/L;对照组只加入 PBS;均设置3个复孔,由底端向顶端转运。除去 transwell 板中培养基,使用 HBSS 清洗至无培养基残留,测量电阻值,放入摇床 50 r/min,37℃振荡30 min。吸干 HBSS,加入相应质量浓度的金莲花汤,在不加药的一端加入 HBSS (顶端加入 0.5 mL,底端加入 1.5 mL),放入摇床,在0.5、1、1.5、2、2.5、3、4 h 分别从加药反面端吸取液体 200 μL ,并每次补足相应体积。置于 -20°C 保存,0.22 μm 滤膜滤过,进样测定,计算各成分在 Caco-2 细胞单层模型中的表观渗透系数(P_{app}),见表6。

$$P_{\text{app}} = (dQ/dt)/(AC_0)$$

Q 为累积转运量,代表分析物在接收室出现的总量; dQ/dt 表示速率; C_0 为分析物在给药室的初始浓度; A 为聚酯膜的表面积

可见以吸收性良好的普萘洛尔和吸收不良的阿替洛尔作为阳性对照药物,0.1 mmol/L 普萘洛尔 P_{app} 为 $2.48 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$,1 mmol/L 阿替洛尔的 P_{app} 为 $1.59 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$,均符合阳性药物的转运特征。葛根素和牡荆素的 P_{app} 与吸收不良的阿替洛尔水平相当,因此这2种化合物被认为吸收不良;咖啡酸和迷迭香酸的 P_{app} 介于普萘洛尔和阿替洛尔,因此这2种化合物被认为吸收性中等。 P_{app} 值大小为迷

表6 各成分的表现渗透系数

Table 6 P_{app} of active components

成分	$P_{\text{app}}/(\times 10^{-5} \text{ cm s}^{-1})$
普萘洛尔	2.480
阿替洛尔	0.016
咖啡酸	0.127
葛根素	0.062
牡荆素	0.050
迷迭香酸	0.209

迭香酸>咖啡酸>葛根素>牡荆素。

3 讨论

金莲花汤以清热解毒药为主,其组成的各味药含有多种抗病毒成分^[9],这可能是金莲花汤有效治疗流感的关键因素。葛根素、牡荆素、迷迭香酸和咖啡酸是该方中的含量较多的成分,外翻肠囊实验表明4种成分均能在肠道中被吸收,其中咖啡酸的吸收率最高,随着质量浓度的增加,药物的吸收速率常数呈线性增加,推测4种成分以被动扩散的形式被吸收,在通过肠上皮黏膜时不需要蛋白质的介导。通过 Caco-2 细胞模型转运得到 P_{app} 值,迷迭香酸和咖啡酸在体内吸收性中等,而葛根素和牡荆素属于难吸收化合物。酚酸类化合物的吸收性高于黄酮类化合物,其中前者易溶于水,而黄酮类化合物极性大,难溶于水,在体内不易被吸收。葛根素和牡荆素是金莲花汤中含量较高的化学成分,且葛根素几乎是含量最高的化合物^[6],葛根素和牡荆素在肠道菌的作用下可代谢为苷元进一步发挥活性^[10],由此推测葛根素和牡荆素可能是前药。

葛根素、牡荆素、迷迭香酸和咖啡酸在肠道中的吸收率存在差异,其中咖啡酸的吸收率最高,并且吸收程度中等。咖啡酸在该方中归属于蒲公英,有研究表明咖啡酸是蒲公英药材中的功能性成分之一,且含量较高,并且蒲公英具有抗多种病毒的活性^[11-12]。咖啡酸具有较强的抗病毒活性,如抗人乳头瘤病毒^[13]、抗呼吸道合胞病毒^[14]、抗流感病毒、抑制丙肝病毒感染^[15]。迷迭香酸的吸收性在4种化合物中是最好的,但吸收率最低,可能是因为迷迭香酸是在肠道中被吸收和代谢,被吸收的迷迭香酸被降解成咖啡酸^[16],这导致了吸收过程中咖啡酸的产生积累,加强了金莲花汤整体的抗病毒作用;同时印证了中药药效物质的显效形式^[17],不同化学成分可产生相同代谢产物,有些化学成分之间可相互

转化,共同作用于起效靶点。这提示咖啡酸和迷迭香酸可能是金莲花汤中发挥药效的活性物质。总而言之,对金莲花汤肠吸收特征的研究可指导金莲花汤活性物质以及体内代谢过程的明确,对金莲花汤的进一步应用具有理论指导意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张玉亮,钟先阳. 传染性非典型肺炎的中医药防治体会 [J]. 海军医学杂志, 2003, 24(3): 223-225.
- [2] 崔力争. 非典型肺炎(SARS)防治研究论述 [J]. 医学动物防制, 2003, 19(6): 325-329.
- [3] 王腾宇,刘斯琪,丁鹏敏,等. 金莲花汤抗流感病毒活性研究 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(2): 202-206.
- [4] 梁羽茜,刘晓丽,张琳婧,等. 金莲花汤不同提取物对细胞增殖的影响及体外抗病毒活性研究 [J]. 医学研究杂志, 2018, 47(4): 100-106.
- [5] 赧迪,庞月笙,陶志,等. 基于分子对接技术探讨金莲花汤抗新型冠状病毒(2019-nCoV)的潜力 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(4): 522-532.
- [6] 王腾宇,李德利,方明月,等. HPLC 法测定金莲花汤中绿原酸、咖啡酸、葛根素、牡荆素、迷迭香酸 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(6): 1053-1056.
- [7] Fang M Y, Liu S Y, Wang Q Q, et al. Qualitative and quantitative analysis of 24 components in Jinlianhua Decoction by UPLC-MS/MS [J]. *Chromatographia*, 2019, 82(12): 1801-1825.
- [8] 王莎,刘斯琪,丁鹏敏,等. 体外模型在中药代谢研究

中的应用 [J]. 药学进展, 2020, 44(2): 119-132.

- [9] 顾文丽. 中药金莲花的临床应用 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(89): 38-39.
- [10] Wei B, Wang Y K, Qiu W H, et al. Discovery and mechanism of intestinal bacteria in enzymatic cleavage of C-C glycosidic bonds [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(5): 1883-1890.
- [11] 张晓东,孙立亚,孟然,等. 22 份蒲公英资源酚酸类成分提取及体外功能活性分析 [J]. 江苏农业科学, 2021, 49(19): 190-196.
- [12] 聂文佳,徐帅师,张咏梅. 蒲公英有效成分及其药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(7): 140-145.
- [13] 丁永桢,温嘉泳,赖宝龙,等. 咖啡酸抗人乳头瘤病毒感染的研究 [J]. 病毒学报, 2018, 34(3): 287-295.
- [14] 唐维,梁宁,李满妹,等. 咖啡酸衍生物抗呼吸道合胞病毒活性研究 [A] // 中国化学会第十届全国天然有机化学学术会议论文集—天然产物合成生物学、化学生物学及新技术 [C]. 广州: 中国化学会, 2014: 18.
- [15] 包伊凡,沈新春,汪芳. 咖啡酸及其主要衍生物的研究进展及开发前景 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(10): 1825-1833.
- [16] 孙士丰. 丹参中活性成分迷迭香酸的代谢研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2008.
- [17] 徐风,杨东辉,尚明英,等. 中药药效物质的“显效形式”、“叠加作用”和“毒性分散效应”-由中药体内代谢研究引发的思考 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(4): 688-703.

[责任编辑 解学星]