

【药效学评价】

柴胡疏肝散水提取物的肠吸收特性研究

刘洋^{1,2}, 赵洋^{1,2}, 于猛², 贾红梅², 马丽焱², 邹忠梅^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

摘要: **目的** 建立同时测定芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草酸含量的超高效液相色谱 (UPLC) 法, 研究柴胡疏肝散水提取物的肠吸收特性。**方法** 采用大鼠在体单向肠灌流和外翻肠囊实验模型, 应用 UPLC 法测定柴胡疏肝散水提取物中指标性成分 (芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷和甘草酸) 在不同时间点、不同部位肠道吸收量, 计算吸收动力学参数, 考察其肠吸收特征。**结果** 在体单向肠灌流模型结果表明, 芍药苷、芸香柚皮苷、新橙皮苷、柚皮苷和甘草酸均为中等程度吸收的化学成分, 而阿魏酸为完全吸收; 外翻肠囊模型结果表明, 芍药苷在空肠部位, 阿魏酸、柚皮苷和新橙皮苷在十二指肠部位, 芸香柚皮苷在十二指肠和空肠部位的吸收最佳, 而甘草酸在各肠段的吸收无显著性差异。**结论** 肠道对柴胡疏肝散中 6 种指标性成分均有吸收, 阿魏酸较其他 5 种指标性成分更易透过肠壁进入血液循环; 不同肠段对 6 种指标性成分的吸收具有选择性。

关键词: 柴胡疏肝散; 超高效液相色谱 (UPLC); 水提取物; 肠吸收; 芍药苷; 阿魏酸; 芸香柚皮苷; 柚皮苷; 新橙皮苷; 甘草酸; 单向肠灌流; 外翻肠囊

中图分类号: R917.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)08-1059-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.08.004

Study on intestinal absorption of aqueous extract from Chaihu Shugan San

LIU Yang^{1,2}, ZHAO Yang^{1,2}, YU Meng², JIA Hong-mei², MA Li-yan², ZOU Zhong-mei²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: Objective To evaluate the intestinal absorption of main components (paeoniflorin, ferulic acid, narirutin, naringin, neohesperidin, and glycyrrhizic acid) in aqueous extract of Chaihu Shugan San (CSS). **Methods** UPLC method was established to simultaneously determine the concentrations of the six components in the test samples of everted gut sacs and in situ single pass intestinal perfusion (SPIP) models. Absorption kinetics parameters were calculated for describing their absorption characteristics. **Results** In SPIP model, the results indicated that ferulic acid was the well-absorbed ingredient in whole small intestine, while other ingredients presented moderate or poor absorption. In everted gut sacs model, paeoniflorin in jejunum, ferulic acid, naringin, and neohesperidin in duodenum, narirutin in duodenum and jejunum, had the best absorption, while there was no significant difference in absorption of glycyrrhizic acid in the intestine. **Conclusion** *In vivo* model indicated that the main constituents in CSS could be absorbed in intestinal wall of rat, ferulic acid could be much more easily penetrated intestinal wall into the blood circulation than the other five components. *Ex vivo* model could further articulate that six index components could be absorbed selectively in different intestinal segments.

Key words: Chaihu Shugan San; Ultra performance liquid chromatography (UPLC); aqueous extract; intestinal absorption; paeoniflorin; ferulic acid; narirutin; naringin; neohesperidin; glycyrrhizic acid; everted gut sacs; in situ single pass intestinal perfusion

收稿日期: 2017-03-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (NO.81673584)

作者简介: 刘洋 (1991-), 女, 硕士, 研究方向为中药成分分析。Tel: (010)57833281 E-mail: 15002258334@163.com

*通信作者 邹忠梅 Tel: (010)57833290 E-mail: zzmou@implad.ac.cn

传统中药最普遍最直接的给药方式是口服用药,肠道是口服药物吸收的主要部位,研究传统中药的肠道吸收机制,对于探讨中药复方吸收机制及其影响因素、指导临床用药及中药复方的二次开发具有重要意义^[1]。目前,大鼠在体单向肠灌注法和外翻肠囊法是研究药物口服吸收的常用实验方法^[2]。在体单向肠灌注模型具有操作简单、准确性较高、测得的指标接近体内的真实吸收情况等优点;大鼠外翻肠囊实验模型具有操作简单、容易定量,囊内液体较少、药物累积速度较快、药物用量较少等特点^[2],在体和离体肠吸收模型相结合是研究传统中药肠吸收的常用和重要的手段。

柴胡疏肝散最早记载于明代医家张景岳的《景岳全书》,由柴胡、陈皮、川芎、香附、枳壳、芍药、甘草 7 味中药组成,具有活血止痛、疏肝行气的功效,是治疗肝郁气滞症具有代表性的经典方剂,临床广泛用于抑郁症、胃肠疾病、消化性溃疡等疾病^[3],疗效确切。苏志恒等^[4]应用液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)对柴胡疏肝散进行快速鉴定,发现其含有芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草酸等 33 个化学成分。Jia 等^[5-6]采用核磁共振(¹H NMR)和超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)代谢组学方法,通过分析全方对慢性应激模型大鼠尿液、血浆和肝组织代谢通路紊乱的调控作用差异,发现该复方通过多成分多途径发挥抗抑郁作用,但其药效成分在体内的吸收尚不明确。

本研究应用超高效液相色谱(UPLC)建立了同时测定柴胡疏肝散肠吸收溶液中芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草酸等 6 种指标性成分含量的方法。采用大鼠在体单向肠灌注实验模型,考察了柴胡疏肝散中 6 种指标性成分的肠吸收情况,并采用外翻肠囊法研究指标性成分在肠段具体的吸收部位,从在体和离体两种途径研究了柴胡疏肝散 6 种指标性成分的肠吸收特征,为柴胡疏肝散体内药物吸收与代谢研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity™ Ultra Performance LC 液相色谱仪,美国 Waters 公司; AB135-S 电子分析天平,瑞士 METTLER 公司; KQ-118B 超声振荡仪,昆山超声仪器有限公司; CU420 型电热恒温水槽,上海一恒科学仪器有限公司; Sorvall Legend Micro 17 高

速离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 麦氏浴槽,北京玻璃仪器厂; BT-100-1L-A 恒流蠕动泵,保定兰格恒流泵有限公司。

1.2 药品与主要试剂

HPLC 级乙腈和甲醇,购自德国 Merck 公司; HPLC 级甲酸,购自美国 Tedia 公司; 实验用纯净水, Milli-Q 超纯水系统(法国 Millipore 公司)制得。

Tyrode 液的配制: NaCl 8.00 g/L、KCl 0.20 g/L、CaCl₂ 0.20 g/L、NaHCO₃ 1.00 g/L、NaH₂PO₄ 0.05 g/L、MgCl₂ 0.10 g/L、葡萄糖 1.00 g/L, pH 7.20~7.40。

Krebs-Ringer 溶液(K-R 溶液, pH 6.8)的配制: NaCl 7.80 g/L、KCl 0.35 g/L、NaHCO₃ 1.37 g/L、NaH₂PO₄•2H₂O 0.32 g/L、MgCl₂ 0.02 g/L、CaCl₂ 0.37 g/L 和葡萄糖 1.40 g/L(临用前添加),用 1 mol/L 磷酸调 pH 值为 6.8。

芍药苷(批号 110736-201136)、阿魏酸(批号 110773-201313)、柚皮苷(批号 110722-201111)、新橙皮苷(批号 11857-201102)和甘草酸(批号 110731-201104)对照品,均购自中国食品药品检定研究院;芸香柚皮苷(批号 11101011)对照品为实验室自制,经 UPLC 测定纯度大于 98%。

实验用药材柴胡、白芍、陈皮、川芎、香附、枳壳以及甘草,均购自北京同仁堂药店,经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员鉴定,样品保存于中国医学科学院药用植物研究所国家中药化合物库。

1.3 实验动物

Wistar 雄性大鼠,体质量(250±20) g,北京维通利华实验动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2014-0004。

2 方法

2.1 柴胡疏肝散水提物的制备及供试液的配制

柴胡、陈皮、白芍、川芎、香附、枳壳和甘草以 4:4:3:3:3:3:1 比例混合,粉碎成粗粉,加 12 倍量水浸泡 30 min,煎煮 2 次,每次煎煮 1 h,趁热过滤,合并滤液,减压浓缩至 100 mL,冷冻干燥,得到柴胡疏肝散水提物粉末,提取率为 28.66%。称取柴胡疏肝散水提取物药粉,分别用 Tyrode 液和 K-R 液溶解配制成 8.46 mg/mL 的供试液,用于外翻肠囊和在体单向肠灌注实验。

2.2 混和对照品溶液的配制

分别精密称取各对照品(芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷和甘草酸)适量,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得

216.02 μg/mL (芍药苷)、26.24 μg/mL (阿魏酸)、118.23 μg/mL (芸香柚皮苷)、232.87 μg/mL (柚皮苷)、200.88 μg/mL (新橙皮苷)、47.40 μg/mL (甘草酸) 混合对照品溶液。

2.3 UPLC 色谱条件

色谱分离采用 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱, 体积流量为 0.40 mL/min, 柱温 35 °C; 样品室温度为 4 °C, 进样量为 5 μL, 检测波长 UV 230 nm (芍药苷)、321 nm (阿魏酸)、283 nm (芸香柚皮苷、柚皮苷和新橙皮苷)、250 nm (甘草酸)。流动相为 0.1% 甲酸-水 (A) 和 0.1% 甲酸-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~6 min, 99%~90% A; 6~8 min, 99%~88% A; 8~15 min, 88%~82% A; 15~20 min, 82%~80% A; 20~25 min, 80%~65% A; 25~27 min, 65%~55% A; 27~30 min, 55%~0% A)。

2.4 大鼠肠吸收研究

2.4.1 大鼠在体单向肠灌注实验 为了考察柴胡疏肝散指标性成分的物理吸附, 剪取大鼠小肠, 剖开洗净, 置于 37 °C 柴胡疏肝散供试液中孵育 4 h, 采用“2.3”项下的色谱条件测定孵育前后柴胡疏肝散中指标性成分的浓度, 计算孵育后的剩余百分率, 考察其是否存在物理吸附情况。

按照文献报道^[7], 复制大鼠在体单向肠灌注实验模型。实验前将大鼠禁食 12 h, 自由饮水。大鼠 ip 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉固定, 用白炽灯加热保持体温。沿腹中线打开腹腔约 4 cm, 在待分析肠段两端插入聚乙烯管 (距十二指肠下部 4 cm 处插入灌注液入口导管, 低于入口导管 10 cm 插入出口管), 用灭菌的手术线固定, 并结扎。实验时用等渗生理盐水浸渍的纱布覆盖于肠组织表面以保湿。用 37 °C 等渗生理盐水冲洗肠内容物后, 换预热至 37 °C 的、“2.1”项中 K-R 液配制的柴胡疏肝散水提物供试液, 用蠕动泵以 0.2 mL/min 灌注肠腔, 平衡 30 min。然后开始计时, 收集每 15 min 出口管中灌注药液 (即收集 0~15、15~30、30~45、45~60、

60~75、75~90、90~105、105~120 min 各时间点的药液), 共收集 2 h 的肠灌注溶液。肠灌注溶液于 4 °C 保存。灌注结束后测量灌注肠段的长度 (*l*) 和内径 (*r*)。

2.4.2 大鼠外翻肠囊实验 按照文献报道^[8], 复制大鼠肠外翻实验模型。雄性 Wistar 大鼠, 实验前 12 h 禁食, 自由饮水。脱颈处死, 沿腹白线剖开, 将大鼠肠管同肠系膜剥离, 分别取十二指肠、空肠、回肠各 14 cm, 放入 37 °C Tyrode 液中, 用生理盐水冲洗, 并小心剥离肠段表面的脂肪和肠系膜。将肠段的一端结扎在塑料套管, 并小心将肠管翻转, 用 Tyrode 液冲洗后将另一端结扎, 形成囊状肠管。向肠囊内注入 2 mL 空白 Tyrode 液, 将其放入已有 Tyrode 液的麦氏浴槽中, 实验过程中保持 37 °C 恒温, 并向浴槽中通入 95% O₂ 和 5% CO₂。平衡 5 min 后, 将麦氏浴槽中的 Tyrode 液倒出, 待用。分别向各麦氏浴槽中注入“2.1”项中配制好的 37 °C 恒温的 Tyrode 柴胡疏肝散供试液 40 mL, 在给药 15、30、45、60、90、120 min 后从肠囊内取样 200 μL, 同时补足相同体积的空白 Tyrode 液。

2.4.3 样品溶液制备 取上述两种方法所得的样品溶液各 200 μL, 加入甲醇 200 μL, 涡旋混匀, 13 000 r/min 离心 15 min, 2 次, 取上清液进行分析。

2.5 数据处理

应用 SPSS 17.0 进行数据处理分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经方差分析判定是否具有显著性差异。

3 结果

3.1 UPLC 法同时测定肠吸收样品中 6 种指标性成分含量的方法建立

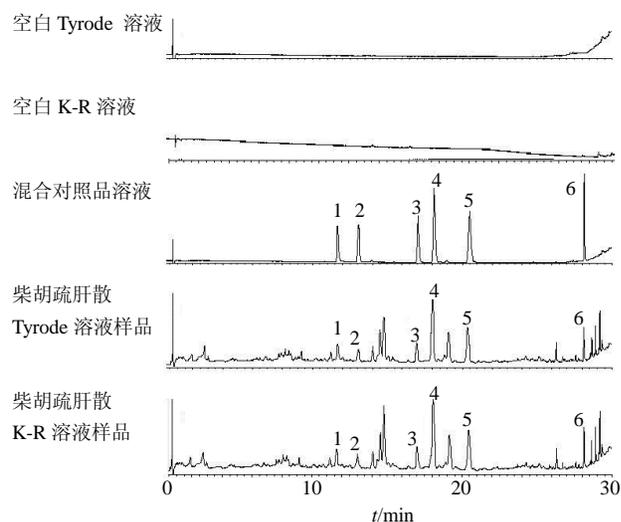
3.1.1 标准曲线的建立 分别精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液 2.00、1.00、0.40、0.10、0.04、0.02 mL 于 2 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度。按照“2.3”项下色谱条件进行测定。以峰面积为纵坐标, 进样浓度为横坐标, 进行线性回归分析, 得到标准曲线方程及相关系数, 见表 1。

表 1 柴胡疏肝散中 6 种指标性成分的线性方程

Table 1 Results of linearity correlations of six ingredients of aqueous extract of CSS

指标性成分	回归方程	r^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
芍药苷	$Y=14\ 923X-1\ 640.0$	0.999 9	2.16~216.02
阿魏酸	$Y=68\ 665X-6\ 330.0$	0.999 9	2.62~26.24
芸香柚皮苷	$Y=20\ 760X+54.8$	0.999 9	1.18~118.23
柚皮苷	$Y=21\ 112X+1\ 553.4$	0.999 8	2.33~232.87
新橙皮苷	$Y=17\ 287X+565.4$	0.999 8	2.00~200.88
甘草酸	$Y=10\ 661X-1\ 204.0$	0.999 9	0.47~47.40

3.1.2 专属性考察 采用建立的 UPLC 色谱条件, 比较空白 Tyrode 液、混合对照品溶液、柴胡疏肝散 Tyrode 溶液、空白 K-R 溶液、柴胡疏肝散 K-R 溶液的色谱行为, 结果如图 1 所示, 空白 Tyrode 溶液及空白 K-R 溶液中对芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷和甘草酸 6 种指标性成分的测定无干扰, 专属性良好。



1-芍药苷 2-阿魏酸 3-芸香柚皮苷 4-柚皮苷 5-新橙皮苷 6-甘草酸
1-paeoniflorin 2-ferulic acid 3-narirutin 4-naringin 5-neohesperidin
6-glycyrrhizic acid

图 1 柴胡疏肝散肠吸收样品 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of aqueous extract of CSS

3.1.3 精密度考察 取混合对照品溶液, 每天进样 6 次, 连续测定 6 d, 结果显示, 芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草酸各成份相对峰面积的日内精密度 RSD 范围为 0.62%~1.64%; 日间精密度 RSD 范围为 0.92%~2.02%。RSD ($n=6$) 均小于 3%, 表明仪器精密度良好。

3.1.4 稳定性考察 吸取同一供试品, 按“2.4.3 项”

方法制备供试品溶液, 分别于处理后 0、4、8、12、16 和 24 h 进样, 按照“2.3 项”下的色谱条件进行检测, 记录各指标性成分的峰面积, 计算芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草酸各成份的 RSD ($n=6$) 分别是 0.31%、1.01%、0.29%、0.61%、1.74%、1.68%, 结果表明, 样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.1.5 加样回收率考察 分别取线性范围内已知含量的同一供试品溶液, 平行 9 份, 每份 250 μ L。分别按样品中芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草酸含量的 80%、100%、120% 精密加入标准品溶液适量 (芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷、甘草酸), 按“2.4.3 项”下的方法制备供试品溶液, 按照“2.3 项”下的色谱方法进样测定, 测定各指标性成分的峰面积, 计算平均加样回收率。结果显示, 芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷和甘草酸的平均回收率均在 95%~105%, 表明本检测方法回收率良好。

3.2 柴胡疏肝散在在体单向肠灌流实验模型中的吸收特征

3.2.1 实验结果的预测 根据 Lipinski 规则^[9], 如果一个药物具有好的吸收和穿透特性, 应符合下面的规则: (1) H 键给体 (连接在 N 和 O 上的 H 原子数) 数目小于 5; (2) H 键受体 (N 和 O 的数目) 数目小于 10; (3) 相对分子质量小于 500; (4) 脂水分配系数小于 5。如表 2 所示, 阿魏酸的 H 键给体数目为 4, H 键受体数目为 6, 相对分子质量为 194.18, 脂水分配系数为 0.96 ± 0.28 , 阿魏酸属于完全吸收, 而芍药苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、新皮苷和甘草酸氢键给体数目均大于 5, 则属于难/中等吸收药物。

表 2 柴胡疏肝散 6 种指标性成分 Lipinski 性质

Table 2 Lipinski properties of six ingredients of aqueous extract of CSS

指标性成分	自由旋转键数	H 受体数	H 给体数	H 受体/给体总数	logP (25 $^{\circ}$ C)	相对分子质量	拓扑极地表面积
芍药苷	12	11	5	16	0.25 ± 0.63	480.46	164 A2
阿魏酸	4	4	2	6	0.96 ± 0.28	194.18	66.8A2
芸香柚皮苷	14	14	8	22	-0.52 ± 0.78	580.53	225 A2
柚皮苷	14	14	8	22	-0.19 ± 0.79	580.53	225 A2
新橙皮苷	15	15	8	23	-0.89 ± 0.84	610.56	234 A2
甘草酸	12	16	8	24	4.64 ± 0.86	822.93	267 A2

3.2.2 肠壁对柴胡疏肝散指标性成分物理吸附作用
将大鼠小肠置于柴胡疏肝散 K-R 溶液中, 比较放置前后柴胡疏肝散中指标性成分浓度的变化, 结果如表 3 所示, 指标性成分剩余百分数均大于 96.15%, 表明大鼠肠壁对柴胡疏肝散指标性成分没有显著的物理吸附。

表 3 肠壁对柴胡疏肝散中指标性成分物理吸附作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Physical absorption of six ingredients of CSS aqueous extract in intestine ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

指标性成分	指标性成分剩余率/%
芍药苷	96.60±5.82
阿魏酸	104.90±3.38
芸香柚皮苷	99.64±4.81
柚皮苷	99.43±5.61
新橙皮苷	98.61±5.82
甘草酸	96.15±4.87

3.2.3 柴胡疏肝散在在体单向肠灌流的吸收效率
采用大鼠在体单向肠灌流实验模型, 应用建立的 UPLC 定量分析方法对柴胡疏肝散的肠灌流液指标性成分进行测定, 按照公式 (1)、(2) 计算柴胡疏肝散肠灌流溶液中芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、

柚皮苷, 新橙皮苷和甘草酸的吸收速率常数 (K_a) 和有效渗透系数 (P_{eff}), 结果见图 2。芍药苷、阿魏酸、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷和甘草酸的 K_a 分别为 0.33×10^{-2} 、 1.35×10^{-2} 、 0.29×10^{-2} 、 0.27×10^{-2} 、 0.26×10^{-2} 和 $0.73 \times 10^{-2}/\text{min}$, P_{eff} 分别为 0.03×10^{-2} 、 0.24×10^{-2} 、 0.03×10^{-2} 、 0.06×10^{-2} 、 0.03×10^{-2} 和 $0.09 \times 10^{-2} \text{ cm/min}$ 。当 $P_{eff} < 0.018 \times 10^{-2} \text{ cm/min}$, 表明吸收差; $P_{eff} > 0.12 \times 10^{-2} \text{ cm/min}$, 表明吸收完全; 介于两者之间的为中等吸收^[10-11]。芍药苷、芸香柚皮苷、新橙皮苷、柚皮苷和甘草酸均为中等程度吸收的化学成分, 而阿魏酸为完全吸收, 结果与 Lipinski 规则相似, 表明阿魏酸较芍药苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、新橙皮苷和甘草酸更易透过肠壁进入血液循环。

吸收速率常数 (K_a)、有效渗透系数 (P_{eff}), 计算公式如下:

$$K_a = Q (1 - C_{out}Q_{out}/C_{in}Q_{in}) / \pi r^2 l \quad (1)$$

$$P_{eff} = -Q \ln (C_{out}Q_{out}/C_{in}Q_{in}) / 2r l \pi \quad (2)$$

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)。

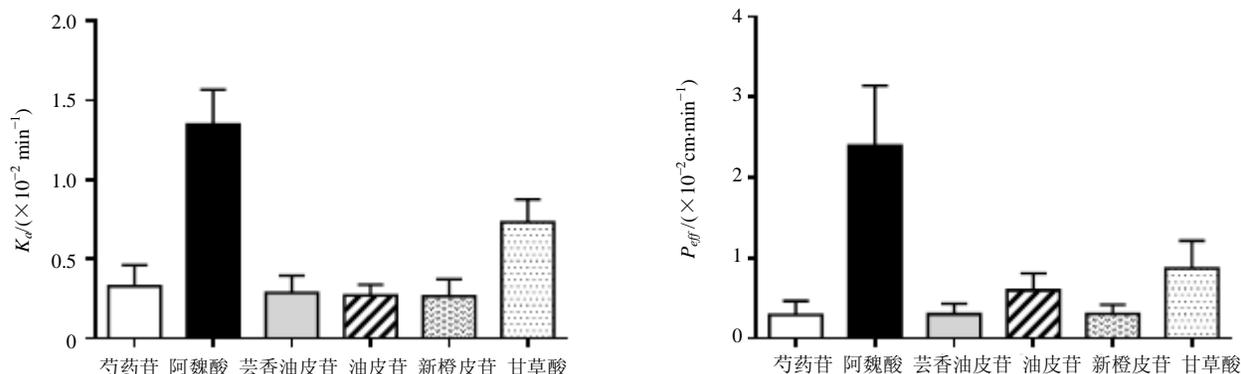


图 2 柴胡疏肝散中 6 种指标性成分在大鼠肠道吸收效率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Absorption parameters of six ingredients of aqueous extract of CSS in intestine ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 柴胡疏肝散在外翻肠囊实验模型的吸收效率

3.3.1 柴胡疏肝散在外翻肠囊实验模型的吸收量
采用大鼠外翻肠囊模型, 应用建立的 UPLC 定量分析方法对柴胡疏肝散在不同肠段 (十二指肠、空肠、回肠) 的外翻肠囊样品溶液进行了测定, 按照公式 (3)、(4) 计算柴胡疏肝散中 6 种指标性成分的经时累积吸收量 (Q) 及 K_a 。 Q 、 K_a 计算公式如下:

$$Q = 2 \times C_n + 0.2 \times \sum C_i \quad (3)$$

$$K_a = L/A \quad (4)$$

C_n 各时间点取样实测得到的浓度, C_i 为 $n-1$ 的时间点取样的实测浓度。以 Q 对时间进行零级、一级、Higuchi 方程、米-曼氏方程拟合, 以相关系数 R 为拟合优劣的判断标准。 Q 对时间作相关回归分析得出的斜率 (L) 除吸收表面积 (A) 求得 K_a ($\mu\text{g}/\text{min}/\text{cm}$)。

如图 3 所示, 十二指肠、空肠和回肠对上述 6

种指标性成分的 Q 均随时间的增加而增加, 并没有呈现饱和趋势, 说明在 120 min 内上述 6 种指标性成分的肠段吸收量没有达到饱和状态。并且在 120 min 时除甘草酸外, 其他 5 种指标性成分在各肠段

的 $Q_{120\text{ min}}$ 均具有明显的差异 (表 5)。以 Q 对时间作相关回归分析发现, 柴胡疏肝散中的 6 种指标性成分在不同肠段的吸收均为线性吸收, 其 R^2 均达到 0.9 以上, 符合零级吸收速率^[12]。

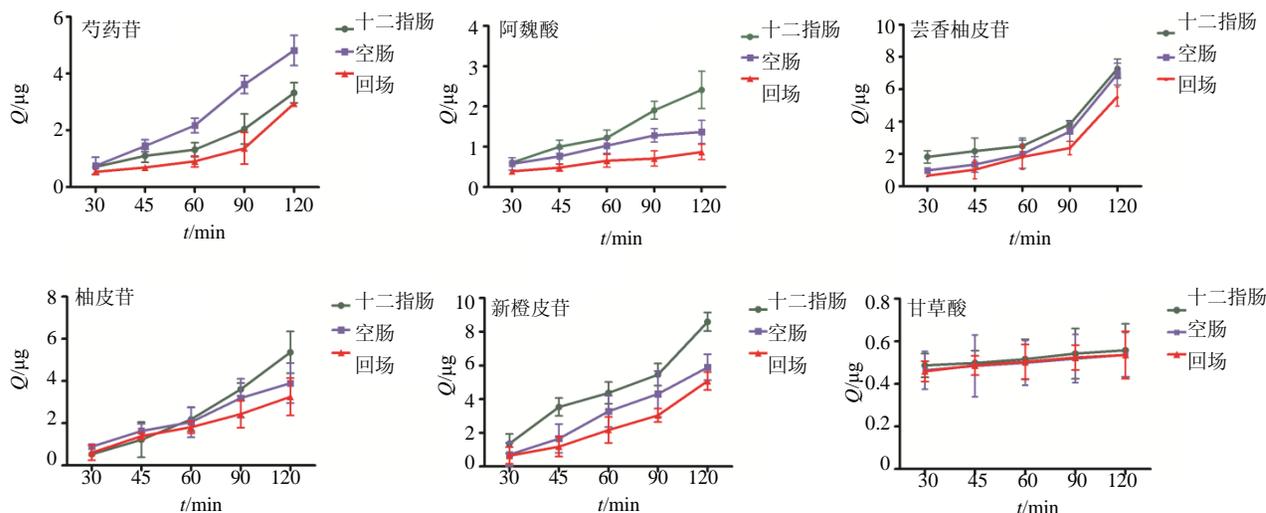


图 3 柴胡疏肝散中 6 种指标性成分在不同肠段 (十二指肠、空肠、回肠) 的经时吸收曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Cumulative absorption profiles of six ingredients of CSS aqueous extract at different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 5 柴胡舒肝散中 6 种指标性成分不同肠段的 $Q_{120\text{ min}}$ ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Q of six ingredients of CSS aqueous extract at different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

指标性成分	$Q_{120\text{ min}}/\mu\text{g}$		
	十二指肠	空肠	回肠
芍药苷	3.33 ± 0.36	$4.82 \pm 0.53^*$	$2.95 \pm 0.11^\#$
阿魏酸	2.41 ± 0.46	$1.36 \pm 0.29^*$	$0.87 \pm 0.19^\#$
芸香柚皮苷	7.27 ± 0.60	6.94 ± 0.67	$5.55 \pm 0.60^{*\#}$
柚皮苷	5.36 ± 0.99	$3.90 \pm 0.95^*$	$3.26 \pm 0.89^*$
新橙皮苷	8.60 ± 0.55	$5.89 \pm 0.77^*$	$5.08 \pm 0.53^*$
甘草酸	0.56 ± 0.12	0.54 ± 0.10	0.54 ± 0.11

与同成分十二指肠吸收比较: * $P < 0.05$; 与同成分空肠吸收比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs same component absorbed in duodenum; # $P < 0.05$ vs same component absorbed in jejunum

3.3.2 在不同肠段的 K_a 差异 为了更好说明柴胡疏肝散中 6 种指标性成分在十二指肠、空肠、回肠的吸收情况, 进一步比较了各指标性成分在各肠段的 K_a (图 4)。芍药苷在小肠的 K_a : 空肠 > 十二指肠 > 回肠; 阿魏酸、芸香柚皮苷和新橙皮苷在小肠的 K_a : 十二指肠 > 空肠 > 回肠; 柚皮苷在小肠的 K_a : 空肠 > 回肠 > 十二指肠; 甘草酸在空肠的 K_a 高于十二指肠和回肠, 但在各肠段的吸收速率没有明显的差异。

4 讨论

本研究首先通过在体单向肠灌注模型研究了柴

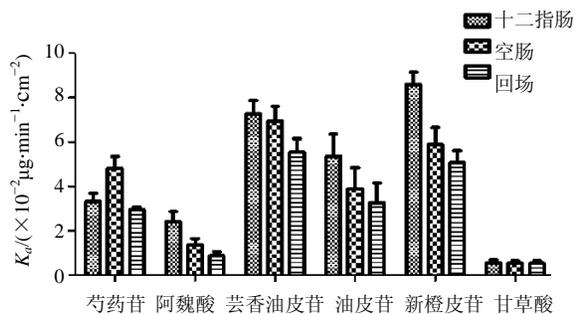


图 4 柴胡疏肝散 6 种指标性成分在各肠段的 K_a ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 K_a of six ingredients of CSS aqueous extract at different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

胡疏肝散的肠道吸收情况,结果表明,肠道对柴胡疏肝散中的指标性成分具有一定的吸收,芍药苷、芸香柚皮苷、新橙皮苷、柚皮苷和甘草酸均为中等程度吸收的化学成分,而阿魏酸为完全吸收,阿魏酸较其他5种指标性成分更易透过肠壁进入血液循环。本研究结果与Lipinski规则所预测的结果一致。

随后采用外翻肠囊模型考察了指标性成分在小肠的最佳吸收部位,各肠段(十二指肠、空肠、回肠)对上述6种指标性成分的累积吸收量均随时间的增加而增加,且在各肠道中均为线性吸收,符合零级吸收速率。结果显示,芍药苷在空肠部位,阿魏酸、柚皮苷和新橙皮苷在十二指肠部位,芸香柚皮苷在十二指肠和空肠部位的吸收最佳,而甘草酸在各肠段的吸收无显著性差异。研究表明^[13-16]芍药苷、阿魏酸、柚皮苷和甘草酸在各肠段的吸收没有显著性的差异,本研究中芍药苷在空肠部位吸收最佳,阿魏酸和柚皮苷在十二指肠吸收最佳,与文献报道不一致,推测可能是柴胡疏肝散中的其他指标性成分对上述成分的吸收产生影响,而本研究中甘草酸无特定吸收部位,与文献报道相一致。此外,本研究发现芸香柚皮苷和新橙皮苷均在十二指肠吸收最佳,提示这2种指标性成分在肠道内可能存在着相同的转运方式。

通过对上述两种肠吸收实验模型的吸收速率常数作比较,发现其在两种实验模型中有很大的不同,这可能与两种实验模型的性质有关,在体单向肠灌注实验模型的实验条件与口服给药后药物接触的肠道正常生理环境较接近,但是主要分析肠灌流出口处药物减少量,而忽略了药物在肠道中的代谢^[17-20]。而肠外翻实验模型保持了完整的组织和黏膜特性,目前常用外翻肠囊模型研究药物的吸收机制,寻找肠道对药物的最佳吸收部位,但是其主要分析的是药物透过肠壁的量,肠管离体后缺乏血液循环、神经控制及淋巴液的供应,只能反映各成分在肠黏膜的吸收情况,且随着离体时间延长,肠黏膜与肠壁组织的结构发生改变,活性降低^[21]。因此,外翻肠囊模型和在体单向肠灌注模型均可从不同的方面提供药物肠吸收参数,从而评价药物的肠吸收特性,单一的肠吸收模型并不能从总体考察药物在体内的吸收,并且在体、离体肠吸收相结合的方法是研究复方药物吸收常用和重要的手段^[21]。

中药配伍是中医用药的一大特色和优势,药物之间的相互作用、相互转化或分解代谢,对药物效

应的改变具有重要作用。药物在肠道中的吸收过程也是药物组分之间相互作用的过程^[22],研究中药复方不同配伍在肠道吸收过程中的动态变化规律,可以揭示中药复方的配伍原理以及作用机制。本研究仅采用在体和离体相结合的两种肠吸收模型,对柴胡疏肝散中6种指标性成分在体内的吸收进行了初步研究,但药物吸收是指药物从给药部位进入血液循环的过程,采用上述两种方法不能够从全方位的表征药物在体内的吸收,其在整体动物上的吸收特征及药代动力学规律值得进一步探索。本研究建立了同时测定柴胡疏肝散肠吸收溶液中6种指标性成分含量的超高效液相分析方法,该方法快速简便、灵敏度高、精密度和稳定性良好、且回收率高,可用于柴胡疏肝散的质量标准评价及其药动力学研究。

参考文献

- [1] 张华,安 毅,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, 01: 15-19.
- [2] 郭梦鸿,孙玉琦,刘 影,等. 外翻肠囊法研究姜黄素促进葫芦素 B 肠段吸收作用[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 04: 281-285.
- [3] 张宏武,邹忠梅. 柴胡疏肝散的临床应用及现代研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 05: 1234-1236.
- [4] Su Z H, Zou G A, Preiss A, et al. Online identification of the antioxidant constituents of traditional Chinese medicine formula Chaihu-Shu-Gan-San by LC - LTQ-Orbitrap mass spectrometry and microplate spectrophotometer[J]. JPB A, 2010, 53(3): 454.
- [5] Jia H M, Feng Y F, Liu Y T, et al. Integration of ¹H NMR and UPLC-Q-TOF/MS for a comprehensive urinary metabolomics study on a rat model of depression induced by chronic unpredictable mild stress[J]. PloS one, 2013, 8(5): e63624.
- [6] Jia H, Su Z, Long W, et al. Metabolomics Combined with UPLC-MS chemical profile for discovery of antidepressant ingredients of a traditional Chinese medicines formula, Chaihu-Shu-Gan-San[J]. Evid-Based Compl Al: eCAM, 2013, 2013(4): 487158.
- [7] 邓少东,张 鹏,林 励,等. 单向灌注法研究巴戟天低聚糖的大鼠肠吸收特性[J]. 中国中药杂志, 2015, (01): 134-140.
- [8] 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.

- [9] Christopher L, Franco L, Beryl D, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. *Adv Drug Deliver*, 2001, 46: 23-26.
- [10] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(9): 1336-1342.
- [11] Zakeri-Milani P, Barzegar-Jalali M, Tajerzadeh H, et al. Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation [J]. *JPBA*, 2005, 39(34): 624-30.
- [12] 陈 泣, 龚飞鹏, 刘兆华, 等. 柳穿鱼叶苷和柳穿鱼黄素的大鼠肠外翻吸收研究 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2014, 02: 352-357.
- [13] 杨星钢, 张立波, 潘卫三, 等. 芍药苷大鼠在体肠吸收动力学的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2006, (11): 854-857.
- [14] 杨星钢, 李 丁, 郭 宏, 等. 川芎提取物中阿魏酸大鼠在体肠吸收动力学的研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(01): 61-64.
- [15] 颜廷旭, 张国华, 杨星钢, 等. 枳实提取物柚皮苷大鼠在体肠吸收动力学 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2009, (10): 753-756.
- [16] 吴青青, 陈 彦, 辛 然, 等. 甘草主成分及其提取物肠吸收差异的多元化分析 [J]. *药学学报*, 2012, (05): 657-663.
- [17] Liao Z, Liang X, Zhu J, et al. Transport properties of puerarin and effect of *Radix Angelicae dahuricae* on puerarin intestinal absorption using in situ and in vitro models [J]. *Phytother Res.*, 2014, 28: 1288-1294.
- [18] Li H, Dong L, Liu Y, et al. Comparison of two approaches of intestinal absorption by puerarin [J]. *J Pharmacol Toxicol*, 2014, 70: 6-11.
- [19] Balimane P, Chong S, Morrison R. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption [J]. *J Pharmacol Toxicol*, 2000, 44: 301-312.
- [20] Luo Z, Liu Y, Zhao B, et al. *Ex vivo* and *in situ* approaches used to study intestinal absorption [J]. *J Pharmacol Toxicol*, 2013, 68: 208-216.
- [21] 马婷婷, 贺 蕊, 龚慕辛, 等. 不同配伍比例芍药甘草汤成分的肠吸收研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, (21): 4268-4274.
- [22] 陈晓鹏, 李 昂, 褚 扬, 等. 养血清脑颗粒中有效成分的肠外翻吸收研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 04: 159-162.