

基于在体单向肠灌注法探究滑膜炎颗粒的肠吸收特性

彭紫薇, 黄嘉怡, 李花花, 宋 扬, 杜雅雯, 窦敏航, 杜守颖*, 白 洁*

北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

摘要: 目的 研究滑膜炎颗粒中丹参素、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸B在小肠不同部位(十二指肠、空肠、回肠)的吸收差异,探究滑膜炎颗粒主要成分的肠吸收特性。方法 建立在体单向肠灌注模型,采用高效液相色谱(HPLC)法检测以上8个指标性成分的浓度;考察不同肠段对8个指标性成分的吸收情况,计算肠吸收参数。结果 8个指标性成分的表现渗透系数(P_{app})均大于 $1.2 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$,说明各成分在不同肠段中的吸收情况均良好;各成分在空肠的吸收情况最好,其次是回肠和十二指肠。结论 滑膜炎颗粒各指标性成分在小肠中的吸收情况良好,符合口服制剂的要求,为探讨滑膜炎制剂的主要药效成分及其作用特点的研究提供参考。

关键词: 滑膜炎颗粒; 在体单向肠灌注法; 肠吸收; 丹参素; 新绿原酸; 原儿茶醛; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 迷迭香酸; 丹酚酸B

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)10-2343-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.10.014

Investigation of intestinal absorption characteristics of Huamoyan Granules by *in situ* single-pass intestinal perfusion method

PENG Ziwei, HUANG Jiayi, LI Huahua, SONG Yang, DU Yawen, Dou Minhang, DU Shouying, BAI Jie

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To study the absorption differences of danshensu, neochlorogenic acid, protocatechualdehyde, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, rosmarinic acid, and salvanolic acid B in Huamoyan Granules in different parts of the small intestine (duodenum, jejunum and ileum), and to investigate the intestinal absorption characteristics of the main components of Huamoyan granules. **Methods** An *in situ* single-pass intestinal perfusion method was established, and the concentrations of the above eight index components were detected by high performance liquid chromatography (HPLC); the absorption of the eight index components in different intestinal segments was investigated, and the intestinal absorption parameters were calculated. **Results** The apparent permeability coefficients (P_{app}) of the eight index ingredients were all greater than $1.2 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$, indicating that the absorption of each ingredient was good in different intestinal segments; the absorption of each ingredient was best in the jejunum, followed by the ileum and duodenum. **Conclusion** The absorption of each index ingredient in Huamoyan preparation in the small intestine was good, which was in line with the requirements of oral preparation, and also provided an objective basis for exploring the study of the main pharmacodynamic components of Huamoyan preparation and their action characteristics.

Key words: Huamoyan Granules; *in situ* single-pass intestinal perfusion method; intestinal absorption; danshensu; neochlorogenic acid; protocatechualdehyde; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; rosmarinic acid; salvanolic acid B

滑膜炎颗粒是国内首个以滑膜为治疗靶点的骨关节病创新药物,是由夏枯草、薏苡仁、丝瓜络等13味药组成。作为口服给药制剂,药物口服后经胃肠道吸收入血是发挥药效的必要前提,而小肠是口

服药物的主要吸收部位^[1]。因此,研究口服制剂中相关药物成分在小肠的吸收特性,对制剂药效成分的确定、指导临床合理用药等方面具有重要参考意义。

收稿日期: 2024-01-09

基金项目: 国家中医药管理局高水平建设学科(zyzdxk-2023272)

第一作者: 彭紫薇(1998—),女,硕士研究生,主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: pengziwei0205@163.com

*共同通信作者: 杜守颖,教授,博士生导师,主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: Dushouying@263.net

白 洁(1981—),女,教授,博士研究生导师,主要从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: baijie22811@163.com

目前,在体肠灌流法是研究口服药物经肠吸收的最常用方法,而单向在体肠灌流模型可以最大程度地模拟药物在动物体内的真实吸收情况,且该模型是美国食品药品监督管理局(FDA)认可的研究药物吸收代谢的经典模型之一^[2]。因此,本研究采用大鼠在体单向肠灌流模型法研究滑膜炎颗粒经不同肠段(十二指肠、空肠、回肠)被吸收的成分,初步探讨滑膜炎颗粒中指标性成分的肠吸收特性,为探讨滑膜炎制剂的主要药效成分及其作用特点的研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

BSA 224S 电子分析天平、SQP 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);FiveEasy Plus pH 计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];HW SY21-KP6 智能恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);BT100-1F 蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司);SB25-12DTD 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司);BY-400C-1 型医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司);Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 高效液相色谱仪[DAD 检测器,CM7.2 色谱工作站,赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

1.2 样品与试剂

滑膜炎颗粒中间体(1 g 浸膏含 6.82 g 生药,批号 20121401,神威药业集团有限公司提供);氯化钾(批号 20210604)、氯化钠(批号 20210715)、碳酸氢钠(批号 20210913)、磷酸二氢钠(批号 20210904)、氯化镁(批号 20210427)、葡萄糖一水(批号 20201127),均为分析纯,购买于天津市光复科技发展有限公司;无水氯化钙(批号 20210901,天津市大茂化学试剂厂);盐酸溶液(批号 202112,质量分数 5%,国家化学试剂质检中心);氨基甲酸乙酯(批号 C11424000,质量分数 99%,上海麦克林生化科技有限公司)。

对照品:丹参素钠(批号 110855-201925,质量分数 97.8%)、原儿茶醛(批号 110810-201909,质量分数 99.6%)、绿原酸(批号 110753-202018,质量分数 96.1%)、咖啡酸(批号 110885-201703,质量分数 99.7%)、迷迭香酸(批号 111871-202007,质量分数 98.1%)、丹酚酸 B(批号 111562-201917,质量分数 96.6%),均购于中国食品药品检定研究院;新绿原酸(批号 P20A11L121936,质量分数 $\geq 98\%$)、隐绿原酸(批号 P16A10U95423,质量分数 $\geq 98\%$),均购于上海源叶生物科技有限公司。

甲醇(色谱级)、乙腈(色谱级)、磷酸(色谱级),均购买于美国 Fisher 公司;水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,10 周龄,体质量(490 ± 30)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0010。已获得北京中医药大学学术委员会实验动物伦理委员会批准,伦理编号:北京中医药大学-4-2021120801-4101。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 Krebs-Ringer(K-R)缓冲溶液的配制 称取 NaCl 7.80 g、NaHCO₃ 1.37 g、KCl 0.35 g、NaH₂PO₄ 0.32 g、MgCl₂ 0.02 g 至烧杯 1 中,加入 500 mL 水,搅拌至充分溶解;另称取 CaCl₂ 0.37 g 至烧杯 2 中,加入 500 mL 水,搅拌至充分溶解;将烧杯 2 中溶液缓慢倒入烧杯 1 中,混匀,用 5% 稀盐酸调节 pH 至 6.8,临用前加入葡萄糖 1.4 g,即得。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取丹参素钠、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B 对照品适量,分别加 75% 甲醇制成含丹参素钠 $2.069\ 4\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、新绿原酸 $2.204\ 8\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、原儿茶醛 $1.989\ 0\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、绿原酸 $1.879\ 7\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、隐绿原酸 $1.930\ 6\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、咖啡酸 $2.052\ 8\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、迷迭香酸 $2.227\ 9\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、丹酚酸 B $1.953\ 3\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品母液。吸取各对照品母液,以 75% 甲醇定容,配制一系列浓度的混合对照品溶液。

2.1.3 空白肠循环液的制备 取 SD 雄性大鼠,实验前禁食(不禁水)18 h。ip $0.2\ \text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 乌拉坦水溶液($5\ \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),麻醉后将其固定在手术台上,沿腹腔中线打开腹腔约 4 cm,于十二指肠上部和回肠下部两端切口,插入聚乙二醇(PEG)医用硅胶管,结扎两端并固定,与恒流泵相连接。手术完成后用浸有 0.9% 氯化钠溶液的脱脂棉覆盖伤口保湿,红外灯照射大鼠腹部保温。以 $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的体积流量用 0.9% 氯化钠溶液($37\ ^\circ\text{C}$)将小肠内容物清洗干净,再用空白 K-R 溶液保持蠕动泵的体积流量为 $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 平衡 10 min,后调整体积流量为 $0.2\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,平衡 20 min,灌流平衡结束时,开始接收流出液,收集 10~60 min 内的流出液, $4\ ^\circ\text{C}$ 、 $10\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜,作为空白肠循环液。

2.1.4 含药灌流液的制备 精密称定滑膜炎颗粒

中间体5 g,置具塞锥形瓶中,加入K-R液50 mL,密塞,超声处理(功率250 W、频率40 kHz)20 min,取出,放冷后转移至离心管中,10 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,即得。

2.1.5 样品流出液的处理 取各取样时间点样品流出液1 mL至离心管中,加入甲醇1 mL,超声处理(功率250 W、频率40 kHz)20 min,取出,放冷后10 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液过0.45 μm滤膜,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱为Waters Xselect® HSS T3(250 mm×4.6 nm,5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液,梯度洗脱条件见表1,体积流量1.0 mL·min⁻¹,柱温为30 ℃,进样体积10 μL,检测波长为287 nm。

表1 梯度方法
Table 1 Gradient method

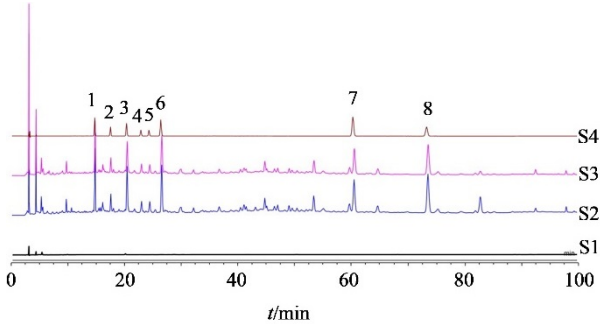
t/min	乙腈/%	0.1%磷酸溶液/%
0	2	98
3	2	98
12	10	90
19	12	88
28	14	86
36	17	83
42	19	81
72	23	77
82	25	75
100	35	65

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 分别取空白肠循环液、含药灌流液、样品流出液进样分析,结合混合对照品检验色谱方法的专属性,观察空白肠灌流液和样品中其他成分对主要成分有无干扰。结果如图1所示,表明该方法的专属性良好。

2.3.2 线性关系考察 取对照品母液,配制一系列不同质量浓度的丹参素钠、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸B的对照品溶液,并按“2.2”项色谱条件进样,以成分峰面积对进样浓度进行线性回归,结果如表2所示,线性关系良好。

2.3.3 精密度考察 取混合对照品溶液,按“2.2”项色谱条件连续进样6次,以各成分峰面积计算RSD,8个指标性成分的峰面积RSD值均小于3%,表明仪器精密度良好。



1-丹参素;2-新绿原酸;3-原儿茶醛;4-绿原酸;5-隐绿原酸;6-咖啡酸;7-迷迭香酸;8-丹酚酸B。

1-danshensu; 2-neochlorogenic acid; 3-protocatechualdehyde; 4-chlorogenic acid; 5-cryptochlorogenic acid; 6-caffeic acid; 7-rosmarinic acid; 8-salvianolic acid B.

图1 287 nm下空白肠灌流液(S1)、含药灌流液(S2)、样品流出液(S3)及混合对照品溶液(S4)的色图谱

Fig. 1 Comparison of profiles of blank intestinal perfusate (S1), drug-containing perfusate (S2), sample effluent (S3) and mixed control solution (S4) at 287 nm

表2 线性关系考察结果
Table 2 Investigation of linear relationship

成分	回归方程	r	线性范围/ (mg·mL ⁻¹)
丹参素	$Y=126.37 X+0.0842$	0.999 7	0.000 8~0.413 9
新绿原酸	$Y=543.64 X-0.0298$	0.999 8	0.000 9~0.055 1
原儿茶醛	$Y=796.62 X-0.1993$	0.999 6	0.000 8~0.049 7
绿原酸	$Y=561.43 X-0.0289$	0.999 9	0.000 8~0.047 0
隐绿原酸	$Y=349.27 X-0.0064$	0.999 6	0.000 8~0.077 2
咖啡酸	$Y=931.50 X+0.0106$	0.999 8	0.000 8~0.082 1
迷迭香酸	$Y=514.22 X+0.1746$	0.999 9	0.000 9~0.455 6
丹酚酸B	$Y=225.25 X+0.1326$	0.999 8	0.000 8~0.390 7

2.3.4 重复性考察 取同一批次滑膜炎颗粒中间体6份,按“2.1.4”项下制备含药灌流液,按照“2.1.5”项制备流出液,并按“2.2”项色谱条件进样,以成分含量计算RSD,指标性成分的含量RSD值均小于3%,表明方法的重复性良好。

2.3.5 加样回收率考察 取同一批次滑膜炎颗粒中间体6份,精密加入质量浓度相近的对照品溶液,按“2.1.4”项下制备含药灌流液,按照“2.1.5”项制备流出液,测定样品中各指标性成分含量,计算加样回收率并计算RSD,各成分回收率在97.05%~102.14%,RSD均小于3%。

2.3.6 药物在蠕动泵管路中的物理吸附性考察 取含药灌流液于37 ℃恒温水浴,用蠕动泵体外空循环3 h,分别在0、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00 h取样,按“2.1.5”项流出液处理方法处理后进样分析,以成

分峰面积计算RSD。RSD值均小于3%，表明蠕动泵管路对药物成分无明显吸附。

2.3.7 药物在空白肠灌流液中的稳定性考察 以空白肠灌流液为溶剂，按“2.1.4”项方法制备药液，置37℃水浴孵育2 h，分别于0、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00 h取样，按“2.1.5”项下方法对样品进行处理后进样分析，以成分峰面积计算RSD。RSD值均小于3%，表明各成分在空白肠灌流液中稳定性良好。

2.4 大鼠在体肠灌流分析

2.4.1 单向在体肠灌流法 大鼠术前禁食18 h，期间自由饮水。实验时大鼠ip 0.2 g·mL⁻¹乌拉坦水溶液(5 mL·kg⁻¹)，麻醉后仰卧置于手术台上，并用红外灯照射保持体温。沿腹中线打开大鼠腹腔，切口约3 cm，翻找十二指肠(自幽门1~2 cm起向下10 cm止)、空肠段(自幽门15 cm起向下10 cm止)、回肠段(自盲肠上行20 cm起向下10 cm止)。在考察的肠段于两端避开血管各切口，入口处将蠕动泵的软管插入并用手术线结扎，出口处插入硅胶软管并用手术线结扎，以接收流出液。用预热至37℃的K-R液冲洗肠道，并用K-R液浸湿的纱布覆盖腹腔保湿。待肠道内容物排净后调节蠕动泵的体积流量为1 mL·min⁻¹进行平衡，10 min后调整蠕动泵的体积流量为0.2 mL·min⁻¹，继续平衡20 min，灌流平衡结束时开始正式灌流实验并计时。具体实验操作为：计时开始时蠕动泵进液端立即切换为已称质量的供液瓶进行灌流，肠道出口处用已称质量的接液管接收流出液，并与入口端供液瓶编号对应；每隔15 min迅速更换1次供液瓶与接收管，并记录灌流后供液瓶和接液管的质量，直至60 min结束灌流实验。灌流结束时，麻醉处死大鼠，取出考察的相应肠段，测量肠段的长度和肠管的周长^[3-6]。示意图见图2。

2.4.2 肠吸收参数计算 按以下公式^[7]计算各成分经肠吸收的吸收速率常数(K_a)、表观渗透系数(P_{app})。

$$K_a = \left(1 - \frac{c_{out}}{c_{in}} \cdot \frac{V_{out}}{V_{in}}\right) \cdot \frac{v}{\pi r^2 l}$$

$$P_{app} = \frac{-v \cdot \ln\left(\frac{c_{out}}{c_{in}} \cdot \frac{V_{out}}{V_{in}}\right)}{2\pi r l}$$

l 为实验肠段的长度(cm)； c_{in} 和 c_{out} 分别为药物进口、出口的质量浓度(g·mL⁻¹)； V_{in} 与 V_{out} 分别为每个时间间隔(15 min)下供液和出液体积(mL)； v 为灌流体积流量(mL·min⁻¹)； r 为肠管的内半径(cm)

丹参素、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸B在不同肠段中的吸

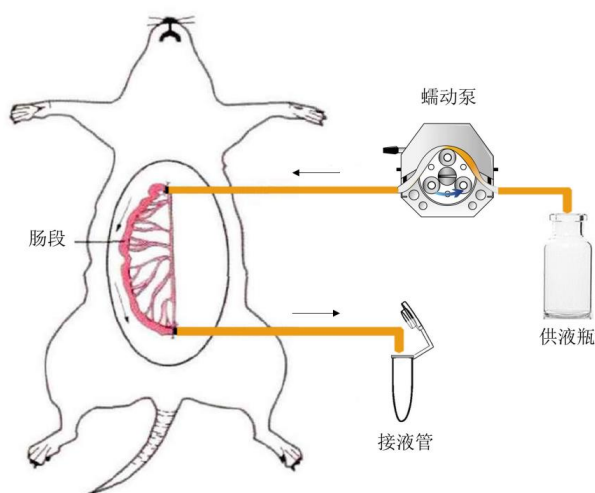


图2 大鼠单向在体肠灌流实验示意图

Fig. 2 Schematic diagram of *in-situ* single pass perfusion models in rats

收情况见表3、4。

2.5 结果分析

2.5.1 综合吸收情况 据相关文献报道，大鼠在体肠灌流实验中，药物在肠段吸收量的多少可以用 P_{app} 表示^[8]。当药物的 $P_{app} > 1.2 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 时，可认为经肠吸收情况良好；当 $P_{app} < 0.18 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 时，可认为经肠吸收情况较差，当 $0.18 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1} < P_{app} < 1.2 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 时，可认为经肠吸收情况适中^[5-6, 8-10]。结合上述标准，由表4可知，丹参素、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、迷迭香酸和丹酚酸B在各肠段的平均 P_{app} 值均大于 $1.2 \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ ，则说明这几种成分在不同肠段中的吸收情况均良好。

2.5.2 同一成分在不同肠段吸收情况 由表3和4可知，各成分在小肠不同部位的 P_{app} 和 K_a 值由大到小综合排序为：空肠>回肠≈十二指肠，不同部位存在吸收差异，在空肠的吸收情况最好，其次是回肠和十二指肠。此外，以上成分在空肠的 P_{app} 和 K_a 值的离散程度较大，但2个参数的各时段均值仍高于其他肠段，提示药物在空肠的吸收情况不太稳定，推测原因可能与动物个体差异相关。

2.5.3 不同时间各肠段对药物吸收特征 由图3、4可知，各成分整体上，在60 min内随着时间的增加，药物的吸收速度和吸收量表现出逐渐降低的趋势，其吸收趋势基本一致，可能因为8种成分均为酚酸类化合物，其性质相近。在不同肠段各成分吸收趋势有一定的差异，前45 min各成分在空肠的 P_{app} 和 K_a 曲线较为平缓，45 min后急剧下降；而在回肠各成分的 P_{app} 和 K_a 曲线在15 min时下降明

表3 各指标性成分的 K_a 值($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 K_a value of each index component ($\bar{x}\pm s, n=3$)

肠段	t/min	$K_a/(\times 10^{-3}\cdot\text{min}^{-1})$							
		丹参素	新绿原酸	原儿茶醛	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	迷迭香酸	丹酚酸B
十二指肠	15	22.49±1.06	14.77±1.96	34.80±1.29	15.69±1.41	14.95±1.75	18.17±0.45	18.64±0.93	20.95±1.76
	30	21.39±0.97	11.26±1.91	26.53±4.45	14.65±1.40	13.28±2.12	16.78±2.23	18.4±1.06	18.34±2.53
	45	12.08±2.07	9.95±2.93	23.50±1.53	9.63±0.42	11.41±2.04	12.92±2.26	11.16±2.66	12.47±1.65
	60	11.82±0.65	8.81±2.79	21.28±0.61	11.00±4.05	13.25±3.29	11.37±2.34	10.13±2.46	11.21±1.93
空肠	15	55.03±1.82	52.61±1.82	62.12±6.71	55.38±4.60	47.15±10.59	55.33±2.46	56.15±3.81	50.61±4.07
	30	52.37±5.66	49.46±6.96	61.90±11.21	50.46±4.82	50.20±7.26	52.26±7.95	52.08±6.34	45.28±5.79
	45	48.51±11.95	47.55±13.60	61.02±16.75	50.02±14.25	50.70±14.03	51.26±13.11	51.21±13.43	38.61±15.79
	60	17.04±4.64	16.48±10.54	45.33±13.39	20.08±6.94	27.85±13.74	32.79±12.10	23.95±5.92	21.61±4.94
回肠	15	25.38±1.69	21.78±0.32	38.04±2.16	23.07±3.49	23.40±0.19	22.09±2.04	24.85±1.77	23.03±2.98
	30	13.42±1.92	11.68±3.83	25.35±2.36	14.22±1.46	10.91±1.84	12.12±2.23	14.54±3.09	12.41±2.73
	45	9.72±1.10	11.79±4.16	23.36±2.43	13.08±2.58	10.80±3.35	11.12±1.68	13.02±1.79	11.47±0.71
	60	13.25±2.89	11.35±2.81	22.22±3.15	13.38±2.57	11.49±1.88	11.65±2.30	11.63±1.39	10.98±2.50

表4 各指标性成分的 P_{app} 值($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 P_{app} value of each index component ($\bar{x}\pm s, n=3$)

肠段	t/min	$P_{app}/(\times 10^{-3}\cdot\text{cm}\cdot\text{min}^{-1})$							
		丹参素	新绿原酸	原儿茶醛	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	迷迭香酸	丹酚酸B
十二指肠	15	2.52±0.20	1.60±0.12	4.10±0.45	2.05±0.31	2.07±0.49	2.40±0.51	2.18±0.37	2.72±0.49
	30	2.05±0.16	1.44±0.38	3.78±0.64	1.82±0.20	1.55±0.23	1.92±0.31	1.95±0.17	2.12±0.08
	45	1.57±0.38	1.49±0.59	3.04±0.43	1.41±0.63	1.75±0.67	1.77±0.48	1.70±0.68	1.78±0.52
	60	1.51±0.09	1.37±0.23	3.05±0.32	1.90±0.12	1.58±0.11	1.43±0.17	1.46±0.42	1.59±0.50
空肠	15	6.09±0.10	5.78±0.12	7.67±0.30	6.15±0.62	5.25±1.10	6.14±0.28	6.25±0.51	6.04±0.35
	30	5.02±0.63	5.71±1.35	6.07±0.65	6.78±1.31	4.73±0.46	6.11±1.58	6.06±1.34	6.04±1.26
	45	5.55±1.55	5.45±1.82	5.58±2.61	7.31±0.75	4.18±2.40	5.95±1.83	5.94±1.83	5.81±1.79
	60	3.05±1.83	1.75±1.03	4.91±1.58	3.27±1.57	1.86±0.54	3.17±1.60	2.12±0.51	2.74±0.25
回肠	15	2.68±0.06	2.36±0.15	4.37±0.19	2.22±0.24	2.55±0.18	2.40±0.32	2.73±0.31	2.78±0.38
	30	1.41±0.21	1.23±0.45	4.17±0.92	1.49±0.16	1.43±0.40	1.27±0.28	1.57±0.36	2.76±0.98
	45	1.37±0.57	0.96±0.06	3.46±0.60	1.37±0.24	1.54±0.58	1.39±0.36	1.52±0.29	2.27±0.66
	60	1.39±0.29	1.16±0.27	2.56±0.18	1.40±0.29	1.40±0.21	1.22±0.27	1.21±0.10	1.37±0.23

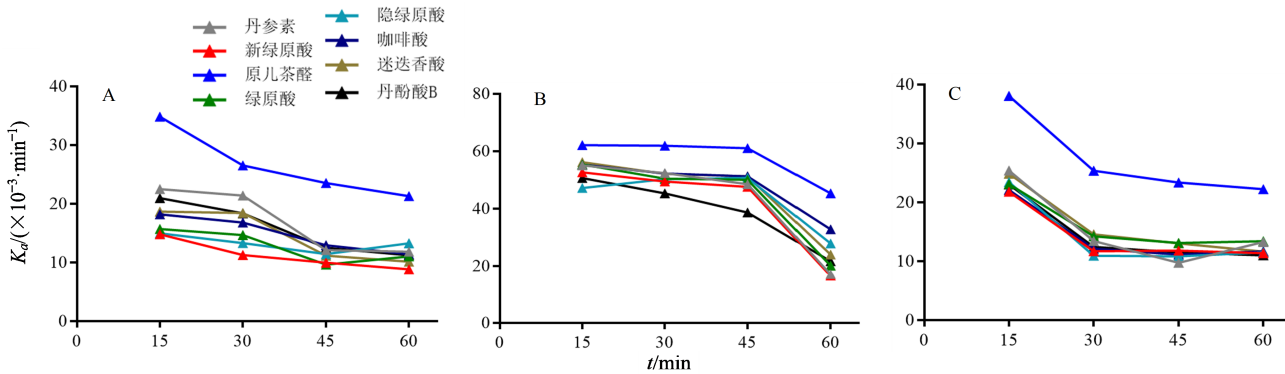


图3 各成分在十二指肠(A)、空肠(B)、回肠(C)的 K_a 折线图
Fig. 3 Line graphs of K_a for each component in duodenum (A), jejunum(B), and ileum (C)

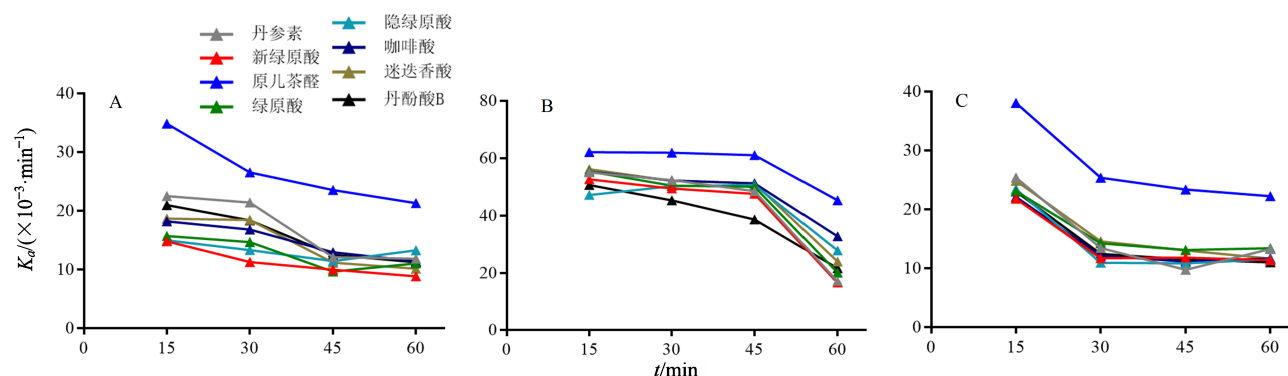


图4 各成分在十二指肠(A)、空肠(B)、回肠(C)的 P_{app} 折线图
Fig. 4 Line graphs of P_{app} for each component in duodenum (A), jejunum(B), and ileum (C)

显, 30 min后趋于平缓, 推测药物成分在肠道中的吸收可能逐渐趋于饱和, 在不同肠段中吸收达到饱和的时间不同。且麻醉药对实验动物的影响导致肠道活性下降, 各肠段对麻醉药物的刺激的反应时间不同, 也可能导致各成分在不同肠段吸收趋势具有一定的差异。

3 讨论

3.1 肠吸收模型选择

研究口服药物肠道吸收的模型主要包括在体法、体内法、体外法等^[9, 11-12]。在体肠灌流模型是在体法的一种, 可以用来测定药物在肠道的吸收程度、药物的转运机制等方面的研究, 是肠道吸收模型中最接近体内真实吸收状态的模型。在体肠灌流模型有“单向在体肠灌流法”和“在体循环灌流法”2种。在体肠循环模型灌流体积流量大, 易对肠黏膜造成损伤, 每次取样和体积补偿时易出现误差^[13]。而单向灌流法通常灌流体积流量低($0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)、时间短(2 h内), 对肠黏膜的损伤较小, 并且单向灌流法实验条件与口服给药后药物接触的肠道环境更接近^[14], 故本研究采用大鼠在体单向肠灌流模型。

3.2 排除肠道分泌物影响

肠道在吸收药物的同时, 也会分泌和吸收水分。故大鼠在体单向灌流模型常采用不被肠道吸收的标示物法和质量法对接收液浓度进行校正, 研究其吸收特性。常用标示物为酚红和 ^{14}C 标记的PEG^[15]。但依据近期相关研究, 酚红在肠道中有少量吸收且本身可能会干扰肠道的吸收运作机制^[16], 而PEG本身具有放射性, 研究使用受限。研究表明质量法与其他2种方法相比能显著降低实验误差, 能够更加真实地反映药物的吸收情况^[17], 因此, 本研究运用质量法来校正

灌流液体积。

3.3 指标性成分的选择及吸收差异

本课题组前期建立了滑膜炎颗粒的HPLC指纹图谱, 其中共指认20个特征峰, 经对照品比对共明确17个特征成分。通过系统聚类分析(HCA)法、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等化学模式识别方法^[18-21], 筛选出丹参素、新绿原酸、原儿茶醛、绿原酸等8个差异标志物。故将以上8种成分作为指标成分来探究滑膜炎颗粒的肠吸收特性。

各成分在小肠的 P_{app} 和 K_a 值不同, 相较于其他成分, 原儿茶醛的 P_{app} 和 K_a 值较大。这8种成分在小肠的吸收机制基本为被动扩散^[22-24], 分子大小是影响小肠对分子吸收的因素之一, 8种指标性成分相对分子质量分别为: 丹参素 198.17、新绿原酸 354.31、原儿茶醛 138.12、绿原酸 354.31、隐绿原酸 354.31、咖啡酸 180.16、迷迭香酸 360.31、丹酚酸B 718.61。其中原儿茶醛相对分子质量最小, 所以猜测原儿茶醛的 P_{app} 和 K_a 值较大的原因与其相对分子质量较小有关。

本实验建立了滑膜炎颗粒中8种成分在肠灌流液中HPLC分析方法, 通过方法学考察, 表明此方法快速、稳定、准确可靠。在体肠灌流实验表明, 各成分在不同肠段中的吸收情况均良好, 符合口服制剂的要求, 这也为探讨滑膜炎制剂的主要药效成分及其作用特点的研究提供客观依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu Y, Yang L. Early metabolism evaluation making traditional Chinese medicine effective and safe therapeutics [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2006, 7(2):

- 99-106.
- [2] Lozoya-Agullo I, Zur M, Fine-Shamir N, et al. Investigating drug absorption from the colon: Single-pass vs. doluisio approaches to *in situ* rat large-intestinal perfusion [J]. Int J Pharm, 2017, 527(1/2): 135-141.
 - [3] 何帅, 蔺明煊, 姜亦南, 等. 中药成分肠吸收模型研究进展与思考 [J]. 中医药学报, 2018, 46(3): 121-124.
He S, Lin M X, Jiang Y N, et al. Intestinal absorption model of component of Chinese medicinal: Its research progress and reflection [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2018, 46(3): 121-124.
 - [4] Kuang G J, Yi H, Zhu M J, et al. Study of absorption characteristics of the total saponins from *Radix ilicis pubescentis* in an *in situ* single-pass intestinal perfusion (SPIP) rat model by using ultra performance liquid chromatography (UPLC) [J]. Molecules, 2017, 22(11): 1867.
 - [5] Yao Y B, Mi W J, Cao G Z, et al. The absorption characteristics of nonvolatile components in a water extraction from *Amomi fructus* as determined by *In situ* single-pass intestinal perfusion and high-performance liquid chromatography [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 711.
 - [6] 吴干斌, 褚延乐. 大鼠在体单向肠灌注模型研究冬凌草乙素的吸收动力学 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(15): 3192-3197.
Wu G B, Chu Y L. Intestinal absorption properties of ponidicin by single pass perfusion model in rats [J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(15): 3192-3197.
 - [7] 周国梁, 汤琦琦, 俞浩, 等. 在体单向灌注法研究 Rho-123 大鼠肠吸收特性 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(3): 347-352.
Zhou G L, Tang Q Q, Yu H, et al. Intestinal absorption features of Rho-123 using *in situ* single-pass perfusion in rats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2018, 29(3): 347-352.
 - [8] 张晓雷, 周明眉, 贾伟, 等. 在体肠灌注模型及其在中药研究中的应用 [J]. 上海中医药大学学报, 2010, 24(3): 87-92.
Zhang X L, Zhou M M, Jia W, et al. Intestinal perfusion model *in vivo* and its application in research of traditional Chinese medicine [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2010, 24(3): 87-92.
 - [9] Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. Pharm Res, 1996, 13(9): 1336-1342.
 - [10] Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, et al. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2015, 116(5): 398-413.
 - [11] 刘璐, 崔景斌, 方洪壮. 替硝唑大鼠小肠吸收的研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(1): 4-6.
Liu L, Cui J B, Fang H Z. The study on tinidazole absorption in rat small intestine [J]. Chin J Hosp Pharm, 2003, 23(1): 4-6.
 - [12] 张向荣, 潘卫三. 丹参酚酸 A 在大鼠小肠的吸收动力学研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(1): 14-17.
Zhang X R, Pan W S. Studies on the absorptive kinetics of salvianolic acid A in rats' small intestines *in vivo* [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2002, 19(1): 14-17.
 - [13] 张宇城, 李新霞, 李琳琳. 动物肠吸收模型在药物研发中的应用 [J]. 医学综述, 2015, 21(5): 775-778.
Zhang Z C, Li X X, Li L L. Application of animal intestinal absorption model in drug development [J]. Med Recapitul, 2015, 21(5): 775-778.
 - [14] 陈浩, 王昌权, 夏涛, 等. 基于大鼠在体肠灌注模型研究白及有效部位在肠道的可吸收及代谢成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(5): 772-778.
Chen H, Wang C Q, Xia T, et al. Study on the absorbable components and metabolism of *Bletilla striata* effective parts in the intestine based on rat intestinal perfusion model [J]. Nat Prod Res Dev, 2019, 31(5): 772-778.
 - [15] 罗轶凡, 任利翔, 李晓红, 等. 药物肠道吸收研究方法概述 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(5): 706-710.
Luo Y F, Ren L X, Li X H, et al. Summary of research methods for drug intestinal absorption [J]. Drug Eval Res, 2017, 40(5): 706-710.
 - [16] 黄嗣航, 龙晓英, 袁飞, 等. 酚红法和改良重量法分别研究葛根素的大鼠在体肠吸收机制 [J]. 广东药学院学报, 2012, 28(6): 603-607.
Huang S H, Long X Y, Yuan F, et al. Transport of puerarin in rat intestine *in situ* by modified gravimetry and phenol red assay [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2012, 28(6): 603-607.
 - [17] 杨阳, 樊春梅, 张金坤, 等. 新型小分子靶向药物 NCE 大鼠在体肠吸收特性及药动学研究 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(21): 2542-2546.
Yang Y, Fan C M, Zhang J K, et al. Intestinal absorption characteristics and pharmacokinetics of the novel targeted small-molecular NCE in rats [J]. Chin J New Drugs, 2013, 22(21): 2542-2546.
 - [18] 吴喆, 张霁, 左智天, 等. 红外光谱结合化学计量学快速鉴别云南重楼不同炮制品 [J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(4): 1101-1106.
Wu Z, Zhang J, Zuo Z T, et al. Rapid discrimination of the different processed *Polyphylla* var. *Yunnanensis* with infrared spectroscopy combined with chemometrics

- [J]. Spectrosc Spectr Anal, 2018, 38(4): 1101-1106.
- [19] Jiang C, Zhang XH, Zou XL, et al. Identification of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* by Near-infrared Spectroscopy and PCA [J]. Environ Res, 2019, 10(04): 77-80.
- [20] 周昱杉, 梁洁, 黄光强, 等. 基于化学模式识别方法分析止咳颗粒的抗炎谱效关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 156-163.
- Zhou Y S, Liang J, Huang G Q, et al. Analysis on spectrum-effect relationship of anti-inflammatory effect of zhideke granules based on chemical pattern recognition [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(22): 156-163.
- [21] 李妍, 何文媛, 王康宇, 等. 基于HPLC多指标成分测定及指纹图谱多模式识别方法的北细辛质量分析 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 238-243.
- Li Y, He W Y, Wang K Y, et al. Quality assessment of *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* based on HPLC multi-component determination and multiple pattern recognition method of fingerprint [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(1): 238-243.
- [22] 江敏, 张恩娟. 原儿茶醛大鼠小肠吸收机理的研究 [J]. 中国药房, 2003, 14(9): 528-530.
- Jiang M, Zhang E J. Study on mechanism of intestinal absorption of protocatechualdehyde in rats [J]. China Pharm, 2003, 14(9): 528-530.
- [23] 潘德城, 孙婷婷, 孙勇兵, 等. 单向灌注法研究丹参提取物中丹参素和原儿茶醛大鼠肠吸收特性 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 944-950.
- Pan D C, Sun T T, Sun Y B, et al. Rat intestinal absorption trait of danshensu and protocatechuic aldehyde in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* extract by single pass perfusion [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2011, 42(5): 944-950.
- [24] 王曦悦, 李春燕, 董馨, 等. 离体外翻肠囊法研究蒙药塔布森-2中8个苯丙素类成分的肠吸收特性 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(22): 2278-2284.
- Wang X Y, Li C Y, Dong X, et al. Absorption and characteristics of eight phenylpropanoids in Mongolian medicine tabson-2 decoction by everted intestinal sac method [J]. Chin J Hosp Pharm, 2021, 41(22): 2278-2284.

[责任编辑 兰新新]