

## 基于外翻肠囊模型的黄芪-附子配伍对附子 6 种生物碱肠吸收的影响研究

孔小强<sup>1</sup>, 蒋且英<sup>2</sup>, 罗云<sup>1</sup>, 梁新丽<sup>1</sup>, 黄国勇<sup>1</sup>, 季苗苗<sup>1</sup>, 廖正根<sup>1\*</sup>, 黄香梅<sup>3</sup>

1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

2. 江西中医药大学 实验动物科技中心, 江西 南昌 330004

3. 江西省新余市中医院, 江西 新余 338000

**摘要:** 目的 研究黄芪-附子药对配伍对附子 3 种单酯型生物碱(苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱)和 3 种双酯型生物碱(次乌头碱、新乌头碱、乌头碱)肠吸收的影响。方法 运用大鼠外翻肠囊模型, 选择十二指肠、空肠、回肠为研究肠段, 以表观渗透系数( $P_{app}$ )为评价指标, 考察黄芪对附子 6 种生物碱  $P_{app}$  的影响。结果 当附子-黄芪 3:1 时, 黄芪在十二指肠和回肠能显著降低双酯型生物碱的  $P_{app}$ , 在 3 种肠段均能降低单酯型生物碱的  $P_{app}$ ; 当附子-黄芪 1:1 时, 除次乌头碱在回肠外, 黄芪能显著降低双酯型生物碱的  $P_{app}$ ; 当附子-黄芪 1:3 时, 黄芪能显著降低单酯型生物碱(除回肠外)的  $P_{app}$ , 在各肠段均能显著降低 3 种双酯型生物碱的  $P_{app}$ 。结论 黄芪可抑制附子生物碱的吸收, 且其抑制作用因配伍比例、生物碱的种类和肠段不同而不同。

**关键词:** 黄芪; 附子; 外翻肠囊模型; 肠吸收; 配伍; 苯甲酰次乌头原碱; 苯甲酰新乌头原碱; 苯甲酰乌头原碱; 次乌头碱; 新乌头碱; 乌头碱

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)23-4928-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.017

## Effect of *Radix Astragali* and *Aconiti Lateralis Radix Preparata* on intestinal absorption of six kinds of alkaloids in *Aconiti Lateralis Radix Preparata*

KONG Xiao-qiang<sup>1</sup>, JIANG Qie-ying<sup>2</sup>, LUO Yun<sup>1</sup>, LIANG Xin-li<sup>1</sup>, HUANG Guo-yong<sup>1</sup>, JI Miao-miao<sup>1</sup>, LIAO Zheng-gen<sup>1</sup>, HUANG Xiang-mei<sup>3</sup>

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Meteria Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Experimental Animal Science and Technology Center, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. Xinyu Municipal Hospital of Jiangxi Province, Xinyu 338000, China

**Abstract: Objective** To study the effect of *Radix Astragali* and *Aconiti Lateralis Radix Preparata* on the intestinal absorption of the three kinds of monoester-type alkaloids (benzoylthioate, benzoyl neostearine, and benzoyl aconitine) and three kinds of diester-type alkaloids (hypoconitine, neaconitine, and aconitine) in *Aconiti Lateralis Radix Preparata*. **Methods** The rat duodenum, the jejunum, and the ileum were selected to study the intestinal segment. The apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) was used to evaluate the effect of *Radix Astragali* on the  $P_{app}$  of six kinds of alkaloids in *Aconiti Lateralis Radix Preparata*. **Results** When *Aconiti Lateralis Radix Preparata* and *Radix Astragali* was 3:1, *Radix Astragali* can significantly reduce the dipeptide alkaloid  $P_{app}$  in the duodenum and ileum and reduce the monoester-type alkaloid  $P_{app}$  in three kinds of intestinal segments; When *Aconiti Lateralis Radix Preparata* and *Radix Astragali* was 1:1, except in the ileum, *Radix Astragali* can significantly reduce the  $P_{app}$  of the diester-type alkaloid; When *Aconiti Lateralis Radix Preparata* and *Radix Astragali* was 1:3, *Radix Astragali* can significantly reduce the  $P_{app}$  of the monoester-type alkaloid (except the parenteral) and significantly reduced the  $P_{app}$  of the three diester-type alkaloids. **Conclusion** *Radix Astragali* can inhibit the absorption of aconite alkaloids, and its inhibition effect is different due to different compatibility ratios, types of alkaloids and intestinal segments.

**Key words:** *Radix Astragali*; *Aconiti Lateralis Radix Preparata*; valgus capsule model; intestinal absorption; compatibility; benzoylthioate; benzoyl neostearine; benzoyl aconitine; hypoconitine; mesaconine; aconitine

收稿日期: 2017-05-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81660757); 江西省卫生计生委中医药科研课题(2016A021)

作者简介: 孔小强, 在读硕士, 从事生物药剂学研究。Tel: 15079007991 E-mail: kxq2015@yeah.net

\*通信作者 廖正根, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事药物新剂型新技术研究。Tel: (0791)7119011 E-mail: lyzlyg@163.com

配伍减毒是传统中药减毒方法中最常用的方法之一。附子是临床广泛应用的温里药,有回阳救逆、补阳助火的功效。但该药具有较强的心脏毒性和神经毒性,治疗窗较为狭窄,毒性大<sup>[1]</sup>。在中医的临床应用中,为了发挥其疗效的同时降低其毒副作用,常配伍其他中药使用。现代药理学研究表明抑制吸收可使易于吸收的药物的血药浓度维持在治疗窗范围内,从而降低毒性。黄芪-附子为常用药对,两者组成芪附汤,研究表明黄芪可以显著降低附子的毒性<sup>[2]</sup>。附子有效成分主要是生物碱,包括单酯型生物碱苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱和双酯型生物碱次乌头碱、新乌头碱、乌头碱,这些生物碱也是附子的主要毒性成分<sup>[3-4]</sup>,故本研究选择这6种生物碱为观察对象,考察黄芪-附子共存条件下各成分在外翻肠囊模型中肠吸收程度的变化。目前关于附子中乌头类生物碱吸收和调控转运蛋白的研究表明,附子中乌头类生物碱以被动转运为主,且外排蛋白[如P-糖蛋白(P-gp)、乳腺癌耐药蛋白(BCRP)、多药耐药蛋白(MRP2)等]、细胞色素P450酶(CYP450)等也会影响其肠吸收<sup>[3-10]</sup>:一方面,附子生物碱能显著地增加P-gp、BCRP、MRP2外排蛋白的表达和P-gp蛋白的活性<sup>[5]</sup>;另一方面,附子生物碱又是外排转运体(如P-gp、BCRP、MRP2等)和胞内CYP450的底物,可因外排转运体的外排和CYP450的代谢而减少吸收<sup>[6-10]</sup>。在与其他中药配伍研究方面,已有研究表明甘草能降低附子肠道吸收速率从而降低附子毒性<sup>[11]</sup>;桂枝、人参、甘草能抑制附子双酯型生物碱在小肠的吸收达到减毒的效果<sup>[3,9]</sup>,但至今关于黄芪对附子肠吸收影响的研究未见报道。为阐明黄芪是否通过抑制附子中主要成分的吸收而减毒,本研究考察黄芪对附子中6种主要成分肠吸收的影响,为两者配伍减毒机制的研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Sigma3-18K型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);BS124S型电子分析天平(Sartorius公司);恒温水浴锅(品相科仪上海有限公司);SZ-97自动三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);干式氮吹仪(上海比朗制造仪器有限公司);Agilent 1290-AB QTRAP4500三重四级杆-线性离子阱液质联用仪,配二元泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、ESI离子源、三重四级杆-离子阱质谱分析器和检测器。

### 1.2 试药

附子饮片(批号20150601)、黄芪饮片(批号161213)均购自江西江中中药饮片有限公司,并由江西中医药大学张寿文教授鉴定,附子为毛茛科乌头属植物乌头 *Aconitum carmichaeli* Debx. 的子根及其加工品,黄芪为豆科黄芪属植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 的根及其加工品。对照品苯甲酰次乌头原碱(批号B-016)、苯甲酰新乌头原碱(批号B-009)、苯甲酰乌头原碱(批号B-010)、次乌头碱(批号C-023)、新乌头碱(批号X-011)和乌头碱(批号W-006)均购于成都彼思特生物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$ ;内标氢溴酸高乌甲素(中药固体制剂制造技术国家工程中心,批号BCTG-0912);乙腈(色谱纯,德国Merck公司);水为双蒸水;其他试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

SD大鼠,雄性,体质量(200 $\pm$ 20)g,江西中医药大学实验动物科技中心提供,合格证号SYXK(赣)2014-0008。

## 2 方法

### 2.1 附子、黄芪提取物的制备

分别称取一定量附子与黄芪饮片,浸泡30min后,分别用10倍量水加热回流提取2次,每次加热1h,合并2次滤液,浓缩,冷冻干燥,分别得到附子提取物和黄芪提取物。HPLC法测得附子提取物含单酯型生物碱4.56%、双酯型生物碱0.40%;黄芪提取物含毛蕊异黄酮0.098%、黄芪甲苷0.431%。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 Krebs液的制备** 称取CaCl<sub>2</sub> 0.28g,分别加少量蒸馏水溶解;再称取NaCl 6.9g、KCl 0.35g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.29g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.16g和NaHCO<sub>3</sub> 2.1g,加蒸馏水溶解后与溶解的CaCl<sub>2</sub>和葡萄糖(2g)混匀,蒸馏水定容至1L,备用。

**2.2.2 附子、黄芪供试液的配制** 附子组:称取附子提取物0.33g,加Krebs液配制成500mL溶液;附子+黄芪1:1、1:3、3:1组:分别按比例称取相应附子与黄芪提取物,加Krebs液配制成500mL溶液,各组附子生药质量浓度相同。

### 2.3 外翻肠囊模型制备

大鼠禁食过夜(自由饮水),10%水合氯醛(3.4mL/kg)ip麻醉,沿腹中线切开腹部,分别剪下十二指肠(距胃幽门1cm处开始量取10cm)、空肠(距胃幽门15cm处开始量取10cm)、回肠(距盲

端 20 cm 处开始量取 10 cm), 用冰冷的 Krebs 液洗净内容物, 去除肠系膜, 一端用细线扎紧, 用细玻璃棒轻柔地将肠管翻转使黏膜面朝外, 另一端绑扎于取样口, 用注射器从取样口向肠内注满空白 Krebs 营养液 2 mL, 作为受药体系。然后将肠囊垂直放入 10 mL 含药 Krebs 液的试管中, 受药体系液面低于供药体系液面。将整个装置放入 37 °C 水浴锅中进行实验 1 h。实验结束后, 将肠囊取出, 放入冰冷的 Krebs 液中清洗 2 次, 洗去肠黏膜上吸附的药液, 收集肠囊内液, 并测量肠内径及长度。

2.4 肠囊内液样品中 6 种生物碱的定量分析

2.4.1 对照品溶液和内标溶液的制备 精密称取苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加异丙醇-二氯甲烷 (1 : 1) 稀释至刻度, 制成质量浓度分别为 302、354、300、307、313、326 μg/mL 对照品溶液; 分别量取适量对照品溶液于同一支 10 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 制成质量浓度分别 21.14、53.10、24.00、21.49、1.25、1.63 μg/mL 混合对照品溶液。再量取适量混合对照品溶液分别置于 10 mL 量瓶中, 用乙腈稀释成系列储备液。精密称取氢溴酸高乌甲素对照品适量于 25 mL 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度, 制成质量浓度为 136.8 μg/ml 氢溴酸高乌甲素母液, 再取适量氢溴酸高乌甲素母液置于 100 mL 量瓶中, 乙腈稀释至刻度, 制成 27.36 ng/mL 内标氢溴酸高乌甲素溶液。

2.4.2 样品处理 取各组肠囊内液样品 100 μL 加

入内标溶液 20 μL, 涡旋 1 min, 依次加入 0.1 mL 氨水涡旋 1 min, 1 mL 醋酸乙酯涡旋 3 min, 取上清液, 重复 2 次, 合并 2 次上清液混匀, 取上清液氮气吹干, 40%乙腈水溶液 200 μL 复溶, 12 000 r/min 离心 3 min, 取 20 μL 上清液进样。

2.4.3 色谱及质谱条件 (1) 色谱条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> 柱 (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm), 流动相水 (A) -含 0.1%甲酸的乙腈溶液 (B), 梯度洗脱: 0~4 min, 5%~40% B; 4~5 min, 40% B; 5~5.1 min, 40%~5% B; 5.1~7 min, 5% B; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 30 °C, 进样量 5 μL。(2) 质谱条件: 采用电喷雾离子化源 (ESI) 进行正离子检测, 检测模式为多反应监测 (MRM), 离子化电压 (IS) 5.5 kV; 离子源温度 (TEM) 为 550 °C; 气帘气 (CUR) 为 241.352 kPa (35 psi); 喷雾气 (GS1) 为 344.75 kPa (50 psi); 辅助加热气 (GS2) 为 310.275 kPa (45 psi), 扫描方式为多离子反应监控 (MRM), 用于定量分析的监控离子为苯甲酰新乌头原碱 *m/z* 540.3~590.3、苯甲酰乌头原碱 *m/z* 554.4~604.4、苯甲酰次乌头原碱 *m/z* 542.4~574.4、新乌头碱 *m/z* 572.4~632.0、乌头原碱 *m/z* 586.2~646.0、次乌头碱 *m/z* 556.4~616.0。

2.4.4 分析方法专属性考察 分别取空白肠囊液、含内标的空白肠囊液、含 6 种酯型生物碱混合对照品和内标的空白肠囊液、6 种酯型生物碱混合对照品、肠囊液样品进行分析, 考察空白肠囊液和内标对出峰时间是否有干扰。检测结果见图 1, 苯甲酰次乌头原碱出峰时间为 4.40 min, 苯甲酰新乌

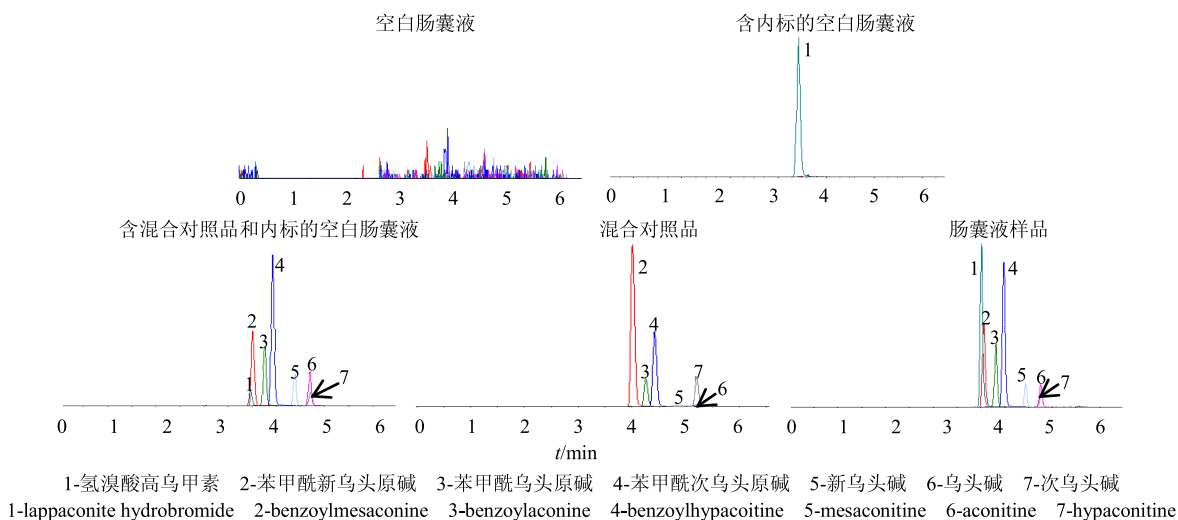


图 1 液质联用色谱图

Fig. 1 LC/MS chromatography

头原碱出峰时间为 3.99 min, 苯甲酰乌头原碱出峰时间为 4.245 min, 次乌头碱出峰时间为 5.18 min, 新乌头碱出峰时间为 4.86 min, 乌头碱出峰时间为 5.17 min。空白肠囊液、含内标的空白肠囊液、含 6 种酯型生物碱混合对照品和内标的空白肠囊液、6 种酯型生物碱混合对照品、肠囊液样品特征峰的出现时间一致, 空白肠囊液和内标对出峰时间无干扰, 此方法可行。

#### 2.4.5 标准曲线的制备 分别量取系列质量浓度

的混合对照品储备液 20  $\mu\text{L}$ , 加入至 100  $\mu\text{L}$  Krebs 液中, 按“2.4.2”项肠囊液内液样品的处理方法操作, 进样测定, 记录苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱的峰面积。以被测物的质量浓度为横坐标 ( $X$ ), 峰面积为纵坐标 ( $Y$ ), 绘制标准曲线。用加权最小二乘法 ( $W=1/x^2$ ) 进行一元线性回归得标准曲线方程。见表 1。根据信噪比  $S/N \geq 10$ , 得最低定量限分别为 0.880、2.210、1.000、0.896、0.052、0.068 ng/mL。

表 1 6 种生物碱的回归方程和线性范围

Table 1 Standard curve regression equation and linear range of six kinds of alkaloids

生物碱	回归方程	$r^2$	线性范围/(ng·mL <sup>-1</sup> )
苯甲酰次乌头原碱	$Y=0.626 X+0.055 7$	0.999 5	0.880~94.680
苯甲酰新乌头原碱	$Y=0.361 X+0.226$	0.999 7	2.214~254.880
苯甲酰乌头原碱	$Y=0.287 X+0.016 4$	0.999 7	1.000~108.000
次乌头碱	$Y=0.681 X+0.001 29$	0.999 3	0.895~96.714
新乌头碱	$Y=0.852 X+0.023 2$	0.999 2	0.052~5.616
乌头碱	$Y=1.75 X+0.010 5$	0.999 8	0.065~7.824

2.4.6 提取回收率试验 取 100  $\mu\text{L}$  Krebs 液, 按“2.4.5”项下方法分别配制苯甲酰次乌头碱、苯甲酰新乌头碱、苯甲酰乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱低质量浓度分别为 (1.760、4.420、2.000、1.791、0.104、0.136 ng/mL)、中质量浓度分别为 (26.400、66.300、30.000、26.865、1.560、2.04 ng/mL)、高质量浓度分别为 (78.900、198.900、90.000、80.595、4.680、6.120 ng/mL) 的质控样品, 按照“2.4.2”项下的方法处理样品, 每个质量浓度 5 个样本, 进样测定, 获得待测物的峰面积; 取 100  $\mu\text{L}$  Krebs 液, 按照“2.4.2”项下的方法处理后, 加相应质量浓度的混合对照品储备液溶液, 每个质量浓度进行 5 个样本分析, 获得待测物的峰面积; 根据每种质量浓度的 2 种处理方法分析得到的峰面积的比值计算提取回收率。计算得到低、中、高质量浓度苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱和乌头碱的平均提取回收率分别为 81.24%~94.08% (RSD 4.88%~8.87%)、83.20%~95.07% (RSD 4.28%~8.29%)、86.66%~98.10% (RSD 5.64%~12.53%)、76.09%~97.79% (RSD 4.77%~12.77%)、81.35%~94.67% (RSD 4.937%~8.04%)、76.91%~94.08% (RSD 9.44%~7.38%)。

2.4.7 精密度试验 取 100  $\mu\text{L}$  Krebs 液, 按“2.4.6”项下方法分别配制苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱、乌头碱低、中、高质量浓度的质控样品, 每个质量

浓度 5 个样本, 连续测定 3 d, 测得日间精密性; 1 d 内连续进样 3 次, 测得日内精密性, 苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱和乌头碱测得日内精密性的 RSD 分别为 6.92%、6.16%、6.13%、9.74%、6.79%、8.38%; 日间精密性的 RSD 分别为 7.82%、8.31%、7.42%、7.56%、8.89%、7.98%。

2.4.8 基质效应 取 100  $\mu\text{L}$  Krebs 液, 按“2.4.2”项下方法进行预处理后, 分别加入相应混合对照品储备液 20  $\mu\text{L}$ 、内标 20  $\mu\text{L}$  和 40%乙腈水 160  $\mu\text{L}$ , 配制成低、中、高 3 个质量浓度的样品溶液, 每种质量浓度平行 5 个样本进行分析。另取相应质量浓度的混合对照品储备液, 每种质量浓度平行 5 个样本进行分析。以每种质量浓度的 2 种不同处理方法分析得到的峰面积的比值计算基质效应。结果苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱和乌头碱的基质效应值为 98.63%~103.65% (RSD 3.47%~7.27%)、96.66%~99.46% (RSD 1.10%~4.23%)、99.87%~101.23% (RSD 3.70%~8.42%)、89.33%~98.34% (RSD 8.10%~5.49%)、94.89%~102.69% (RSD 4.36%~4.82%)、9.56%~104.52% (RSD 4.41%~6.12%)。

#### 2.5 数据处理

本实验均采用表观渗透系数 ( $P_{\text{app}}$ , cm/s) 评价各成分的肠吸收程度, 对各组间的显著性比较采用统计学软件 SPSS 21.0 进行比较, 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/A \times 1/C_0$$

$dQ/dt$  为单位时间内药物转运量,  $C_0$  为供试液体系中化合物的初始质量浓度,  $A$  为肠面积

### 3 结果

#### 3.1 黄芪对附子中苯甲酰次乌头原碱在不同肠段吸收的影响

黄芪对附子中苯甲酰次乌头原碱在不同肠段吸收的影响结果见表 2, 可知, 与附子组比较, 配伍黄芪后, 苯甲酰次乌头原碱在 3 个肠段的吸收均有下降, 其中当附子-黄芪 3:1 时, 苯甲酰次乌头

原碱在 3 个肠段吸收显著减少 ( $P < 0.01$ ); 当附子-黄芪 1:3 时, 苯甲酰次乌头原碱在十二指肠和空肠的吸收显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

#### 3.2 黄芪对苯甲酰新乌头原碱在不同肠段吸收的影响

黄芪对苯甲酰新乌头原碱在不同肠段吸收的影响结果见表 2, 与附子组比较, 配伍黄芪后, 苯甲酰新乌头原碱在 3 个肠段的吸收均有下降。当附子-黄芪 3:1 时, 苯甲酰新乌头原碱在 3 个肠段的吸收显著减少 ( $P < 0.05$ 、0.01); 当附子-黄芪 1:3 时, 苯甲酰新乌头原碱在十二指肠和空肠的吸收显著减少 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

表 2 黄芪对苯甲酰次乌头原碱和苯甲酰新乌头原碱在不同肠段表观渗透系数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of *Radix Astragali* on apparent osmotic coefficient of benzoylthioate aconitine and benzoyl neostearine in different intestinal segments ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	$\rho_l$ ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	苯甲酰次乌头原碱 $P_{app}/(\times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$			苯甲酰新乌头原碱 $P_{app}/(\times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		
		十二指肠	空肠	回肠	十二指肠	空肠	回肠
附子	18	1.15 ± 0.35	1.02 ± 0.18	0.78 ± 0.20	1.23 ± 0.35	1.06 ± 0.15	0.76 ± 0.21
附子+黄芪	18+6	0.56 ± 0.17**	0.70 ± 0.13**	0.40 ± 0.14**	0.62 ± 0.17**	0.74 ± 0.15**	0.41 ± 0.13*
	18+18	0.76 ± 0.10	0.82 ± 0.18	0.66 ± 0.11	0.90 ± 0.13	0.93 ± 0.17	0.73 ± 0.13
	18+54	0.67 ± 0.07*	0.64 ± 0.10**	0.60 ± 0.07	0.78 ± 0.08*	0.76 ± 0.14*	0.66 ± 0.09

与附子组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下表同

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs aconite group, same as following table

#### 3.3 黄芪对苯甲酰乌头原碱在不同肠段吸收的影响

黄芪对苯甲酰乌头原碱在不同肠段吸收的影响结果见表 3, 可知, 与附子组比较, 配伍黄芪后, 苯甲酰乌头原碱在 3 个肠段的吸收均有下降, 其中当附子-黄芪 3:1 时, 苯甲酰乌头原碱在 3 个肠段吸收显著减少 ( $P < 0.01$ ); 当附子-黄芪 1:3 时, 苯甲酰乌头原碱在十二指肠和空肠吸收显著减少 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

#### 3.4 黄芪对次乌头碱在不同肠段吸收的影响

黄芪对次乌头碱在不同肠段吸收的影响结果见表 3, 可知, 与附子组比较, 配伍黄芪后次乌头碱在 3 个肠段的吸收均有下降, 其中当附子-黄芪 3:1 时和 1:3 时, 次乌头碱在 3 个肠段肠吸收均显著性减少 ( $P < 0.05$ 、0.01); 当附子-黄芪 1:1 时, 次乌头碱在十二指肠和空肠吸收显著减少 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

#### 3.5 黄芪对新乌头碱在不同肠段吸收的影响

黄芪对新乌头碱在不同肠段吸收的影响结果见表 4, 可知, 与附子组比较, 加入黄芪后新乌头碱在 3 段肠段的吸收均有下降, 其中当附子-黄芪 3:1 时, 新乌头碱在十二指肠和回肠吸收显著减少 ( $P < 0.05$ ); 当附子-黄芪 1:3 和 1:1 时, 新乌头碱在 3 个肠段中均显著减少 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

#### 3.6 黄芪对乌头碱在不同肠段吸收的影响

黄芪对乌头碱在不同肠段吸收的影响结果见表 4, 可知, 与附子组比较, 配伍黄芪后, 乌头碱在 3 段肠段的吸收均有下降, 其中当附子-黄芪 3:1 时, 乌头碱在十二指肠和回肠的吸收明显减少 ( $P < 0.05$ 、0.01); 当附子-黄芪 1:3 和 1:1 时, 乌头碱在 3 个肠段的吸收均显著减少 ( $P < 0.05$ 、0.01)。

表 3 黄芪对苯甲酰乌头原碱和次乌头碱在不同肠段表观渗透系数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 Effect of *Radix Astragali* on apparent osmotic coefficient of benzoyl aconitine and hyaconitine in different intestinal segments ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	$\rho_l$ ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	苯甲酰乌头原碱 $P_{app}/(\times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$			次乌头碱 $P_{app}/(\times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$		
		十二指肠	空肠	回肠	十二指肠	空肠	回肠
附子	18	1.15 ± 0.35	1.03 ± 0.20	0.78 ± 0.21	1.74 ± 0.31	1.88 ± 0.45	1.95 ± 0.53
附子+黄芪	18+6	0.55 ± 0.17**	0.62 ± 0.09**	0.40 ± 0.13**	1.13 ± 0.24**	1.23 ± 0.15*	1.04 ± 0.34*
	18+18	0.76 ± 0.10	0.81 ± 0.17	0.67 ± 0.10	1.04 ± 0.32*	1.05 ± 0.43*	1.32 ± 0.37
	18+54	0.65 ± 0.08*	0.66 ± 0.11**	0.60 ± 0.07	1.18 ± 0.18**	1.02 ± 0.20**	1.28 ± 0.21*

表 4 黄芪对新乌头碱和乌头碱在不同肠段表现渗透系数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Effect of *Radix Astragali* on apparent permeability coefficient of neaconitine and aconitine in different intestinal segments ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	$\rho/$ (mg·mL <sup>-1</sup> )	新乌头碱 $P_{app}/(\times 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$			乌头碱 $P_{app}/(\times 10^{-5} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$		
		十二指肠	空肠	回肠	十二指肠	空肠	回肠
附子	18	1.74±0.62	1.55±0.38	1.55±0.63	2.19±0.54	1.54±0.47	1.37±0.41
附子+黄芪	18+6	0.85±0.23*	1.13±0.30	0.81±0.14*	0.96±0.24**	1.30±0.43	0.78±0.22*
	18+18	0.53±0.18**	0.65±0.14**	0.56±0.17**	0.74±0.26**	0.82±0.11**	0.77±0.30*
	18+54	0.77±0.16**	0.79±0.17**	0.77±0.14*	0.67±0.11**	0.61±0.09**	0.55±0.11**

#### 4 讨论

药物的口服吸收与药物的脂溶性相关, 一定范围内, 脂溶性越强, 越易吸收, 吸收的难易与  $P_{app}$  有关。研究表明, 当  $P_{app}$  大于  $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  时, 药物口服易于吸收<sup>[12]</sup>。附子中的 6 种生物碱均为脂溶性生物碱, 本实验结果显示 6 种生物碱的  $P_{app}$  均大于  $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ , 说明附子中的 6 种生物碱口服均易吸收, 与 6 种生物碱的脂溶性大有关, 且与文献报道一致<sup>[3]</sup>。由于这 6 种成分均为毒性成分且易吸收, 因而容易超过治疗窗范围, 而黄芪可降低 6 种成分的  $P_{app}$ , 从而通过起到类似缓释的作用降低体内生物碱的浓度水平, 在一定程度上可解释附子易于中毒, 而黄芪可降低附子毒性的原因。

黄芪低剂量时, 在 3 种肠段均能降低单酯型生物碱的吸收; 中剂量时, 在各肠段对单酯型生物碱的吸收均无影响; 高剂量时, 仅在空肠段对单酯型生物碱的吸收有显著影响。黄芪除在低剂量时, 在空肠对双酯型生物碱及中剂量时在回肠对次乌头碱的吸收影响无统计学差异外, 在本研究中使用的剂量及肠段, 均能显著降低双酯型生物碱的吸收。上述实验结果显示黄芪对双酯型生物碱的吸收抑制作用强于单酯型生物碱。已有研究表明 CYP450 酶和 P-gp、BCRP、MRP2 等外排药物转运体共同调控乌头生物碱体内过程, 限制其吸收进入血液循环, 且毒性越强的生物碱, 受到外排作用越强<sup>[5-9]</sup>, 表明毒性强的双酯型生物碱受到 CYP450 酶和外排药物转运体的影响越大, 而黄芪对双酯型生物碱的吸收抑制作用强于单酯型生物碱, 表明黄芪可能通过调控 CYP450 酶和外排药物转运体而抑制附子生物碱的吸收。

黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素为黄芪主要活性成分, 研究表明, 黄芪甲苷能增加 P-gp, MRP1 和 MRP3 的蛋白表达水平; 毛蕊异黄酮能显著增加 CYP3A4、P-gp、MRP2、MRP3 的蛋白表达

水平; 芒柄花黄素能够诱导 CYP3A4、CYP2B6、P-gp、MRP1、MRP2 和 MRP3 蛋白的表达<sup>[13]</sup>。而附子生物碱又为 CYP450 酶和 P-gp、BCRP、MRP2 等药物外排转运体的共同底物, 因此黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素可能为黄芪抑制附子生物碱吸收的物质基础, 其抑制附子生物吸收的机制可能为黄芪促进了 CYP450 酶和外排药物转运体的表达。

高通透性药物的吸收行为不受药物转运体的影响, 但可能参与转运体介导的药物相互作用<sup>[14]</sup>, 附子 6 种生物碱  $P_{app}$  均大于  $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ , 表明它们均为高通透性药物, 黄芪可能通过调控 CYP450 酶和外排药物转运体而抑制附子生物碱的吸收, 也表明高通透性药物可参与转运体介导的药物相互作用。

实验结果还显示黄芪对附子 6 种生物碱的吸收抑制作用因肠段、黄芪剂量和生物碱种类不同而不同, 但未显示出明显的规律性变化, 显示黄芪对附子生物碱吸收的影响机制复杂, 有待进一步研究。

#### 参考文献

- 丁涛. 附子的现代药理研究与临床新用 [J]. 中医学报, 2012, 27(175): 1630-1631.
- 张广平, 解素花, 朱晓光, 等. 附子相杀、相畏配伍减毒实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(15): 2215-2217.
- 韩天娇, 宋凤瑞, 刘忠英, 等. 附子配伍过程中二萜类生物碱在 Caco-2 小肠吸收细胞模型中吸收转运的 UPLC/MS 研究 [J]. 化学学报, 2011, 69(15): 1795-1802.
- 雷崎方, 孙桂波, 沈寿茂, 等. 附子的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(6): 655-659.
- 乌头类生物碱调控外排转运蛋白的作用及机制 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- Ding R, Jian Y, Kan H, et al. Studies on the intestinal absorption of the alkaloids in the Gancaofuzi decoction in a Caco-2 cell culture system by UPLC-MS/MS analysis

- [J]. *Chin Chem Lett*, 2016, 27: 915-919.
- [7] 缪萍, 裘福荣, 曾金, 等. 甘草诱导 CYP3A 促进附子代谢的减毒配伍机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(9): 2813-2817.
- [8] 张广平, 朱丽君, 周娟, 等. 附子配伍甘草对 CYP3A4 体内活性的影响研究 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(15): 2206-2209.
- [9] Kan H, Jiang W Y, Ding R, *et al.* Study of the intestinal absorption of the alkaloids in the Wu-tou Decoction combined with different incompatible medicinal herbs in a Caco-2 cell culture system using UPLC-MS/MS [J]. *Chin Chem Lett*, 2015, 26(5): 590-594.
- [10] You Q, Ma Z C, Wang Y G, *et al.* *Panax ginseng* inhibits intestinal absorption of toxic aconitum carmichaeli alkaloids *in vitro* [J]. *Chin J Integr Med*, 2015, doi: 10.1007/s11655-015-2282-3.
- [11] 蓝娟, 阿依夏木·夏依提, 何雷秋, 等. 炙甘草配伍对附子水煎液中乌头类生物碱的含量和离体肠吸收的影响 [J]. *中国药科大学学报*, 2012, 43(5): 430-434.
- [12] Per A, Katrin P, Kristina L. Caco-2 monolayers in experimental and theo-retical predictions of drug transport [J]. *Adv Drug Del Rev*, 2012, 64(Suppl): 280-289.
- [13] Zhang G Y, Ou R L, Li F Y, *et al.* Regulation of drug-metabolizing enzymes and efflux transporters by Astragaliradix decoction and its main bioactive compounds: Implication for clinical drug-drug interactions [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 13: 104-113.
- [14] 朱家壁. 现代生物药剂学-肠道药物转运器 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.