

· 药物动力学研究 ·

防风提取物影响芍药苷肠道吸收的效应研究

麦钰仪¹, 林宇建¹, 时军^{1,2,3}, 罗玺¹, 刘锐萍¹, 詹燕珊¹(1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东省局部精准递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006; 3. 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

摘要: **目的** 考察防风提取物对芍药苷肠吸收的影响。**方法** 采用大鼠外翻肠囊模型, 以表观吸收系数(P_{app})为评价指标, 研究防风提取物对芍药苷在十二指肠、空肠、回肠和结肠的吸收情况; 在吸收最佳的肠段, 采用大鼠在体单向肠灌注模型考察不同质量浓度的芍药苷对肠吸收的影响, 以及防风提取物、P-糖蛋白(P-gp)抑制剂(盐酸维拉帕米)、多药耐药相关蛋白 2(MRP2)抑制剂(丙磺舒)和抗生素(诺氟沙星)对芍药苷肠吸收的影响。**结果** 防风提取物对各肠段芍药苷吸收均有一定促进作用, 以回肠最为显著($P < 0.01$); 在回肠段, 芍药苷的吸收速率常数(K_a)和有效渗透系数(P_{eff})在实验质量浓度范围内($20 \sim 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)无显著性差异($P > 0.05$); 与芍药苷中浓度组比较, 防风提取物、盐酸维拉帕米、丙磺舒和诺氟沙星对芍药苷的 K_a 和 P_{eff} 具有明显影响($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 防风提取物对芍药苷肠道吸收有显著的促进作用, 芍药苷可能是 P-gp 和 MRP2 的底物, 其吸收机制可能是被动转运。防风提取物促进芍药苷肠道吸收的作用机制可能与其抑制 P-gp、MRP2 活性及调节肠道菌群有关。

关键词: 防风; 芍药苷; 肠吸收; 大鼠外翻肠囊法; 在体单向肠灌注法

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1338-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.09.014

Study on the Effect of *Saposhnikovia divaricata* Extract on Intestinal Absorption of Paeoniflorin

MAI Yuyi¹, LIN Yujian¹, SHI Jun^{1,2,3}, LUO Xi¹, LIU Ruiping¹, ZHAN Yanshan¹(School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Guangdong Engineering & Technology Research Center of Precise Drug Delivery System, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 3. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei 230012 Anhui, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of *Saposhnikovia divaricata* extract on intestinal absorption of paeoniflorin. **Methods** *In situ* single pass perfusion method was used to investigate the absorption characteristics of paeoniflorin in rats. The apparent absorption coefficient (P_{app}) of paeoniflorin was used as the evaluation index to study the optimum absorption site among duodenum, jejunum, ileum and colon. In the optimal absorption intestinal site, the effects of *Saposhnikovia divaricata* extract, P-glycoprotein (P-gp) inhibitor (verapamil hydrochloride), multi-drug resistant protein 2 (MRP2) inhibitor (probenecid) and antibiotic (norfloxacin) on the absorption of paeoniflorin were also studied, as well as the effects of different concentration of each drug. **Results** *Saposhnikovia divaricata* extract had a certain promotion effect on the absorption of paeoniflorin in all intestinal segments, with the most significant effect in ileum ($P < 0.01$). There was no significant difference between K_a and P_{eff} of paeoniflorin within the range of experimental contents ($20 \sim 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) in ileum ($P > 0.05$). Compared with paeoniflorin medium group, *Saposhnikovia divaricata* extract ($P < 0.05$), verapamil hydrochloride, probenecid and norfloxacin had

收稿日期: 2021-04-14

作者简介: 麦钰仪, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药及复方制剂研究与开发。Email: 619958064@qq.com。通信作者: 时军, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药经皮给药及增生性瘢痕防治。Email: shijun8008@163.com。

基金项目: 中药复方安徽省重点实验室开放基金资助项目(2019AKLCMF01); 广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目(YQ2015099)。

significant effects on K_a and P_{eff} of paeoniflorin ($P < 0.01$). **Conclusion** *Saposhnikovia divaricata* extract can significantly promote the intestinal absorption of paeoniflorin. Paeoniflorin may be the substrate of P-gp and MRP2 and the absorption mechanism of paeoniflorin may be passive transport. The mechanism of *Saposhnikovia divaricata* extract promoting intestinal absorption of paeoniflorin may be related to inhibition of P-gp and MRP2 activities, and regulation of intestinal flora.

Keywords: Saposhnikoviae radix; paeoniflorin; intestinal absorption; everted intestinal sac method in rats; *in situ* single pass perfusion method

痛泻要方出自《丹溪心法》，由炒白芍、炒白术、陈皮、防风 4 味中药组成，具有补脾柔肝、祛湿止泻之功效，主治脾虚肝旺之痛泻，是临床上治疗溃疡性结肠炎(Ulcerative Colitis, UC)的常用有效方剂。药理研究^[1-2]表明，痛泻要方具有抗炎、抑制免疫反应、修复病变肠黏膜、改善肠道内环境等多种药理作用，对肝郁脾虚型的 UC 有良好的临床疗效。芍药苷作为痛泻要方的主要药效成分之一，生物活性显著，具有广泛的药理活性，能促进抗炎因子和抑炎因子的平衡，调节肠道异常免疫反应，减轻肠道炎症反应，从而减轻溃疡性结肠炎的症状^[3-9]。但芍药苷加热和碱性条件下不稳定，在肠道中易被菌群代谢，口服生物利用度较低，仅为 3%~4%，大大限制了其剂型开发和临床应用^[10-11]。对于口服药物，胃肠吸收是发挥药效的前提，中药复方可通过配伍使药(如冰片、石菖蒲等)提高难吸收药物的胃肠吸收和生物利用度，而防风作为痛泻要方的使药，是否可以促进方中其他药物吸收，有待验证。本研究拟从离体和在体实验模型考察防风提取物对芍药苷肠吸收的影响，探究防风作为使药作用的机制，为含防风中药制剂临床应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器 UltiMate 3000 高效液相色谱仪系统，赛默飞世尔科技公司；UV-6100S 型紫外-可见分光光度计，上海美普达仪器有限公司；BSA124S 电子天平(万分之一)，北京赛多利斯仪器系统有限公司；PHS-25 型电子数显雷磁 pH 计，上海仪电科学仪器股份有限公司；TGL-16 台式高速冷冻离心机，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；BT100-2J 蠕动泵，保定兰格恒流泵有限公司；HH-S8 数显恒温水浴锅，江苏金怡仪器科技有限公司。

1.2 药物与试剂 芍药苷(批号：PS000825)、5-O-

甲基维斯阿米醇苷(批号：PS000062)对照品，成都普思生物科技股份有限公司；芍药苷原料药，上海源叶生物科技有限公司，批号：S31585；乌拉坦，国药集团化学试剂有限公司，批号：20131206；盐酸维拉帕米(批号：Y05J6C2)、丙磺舒(批号：Y2106C4572)、诺氟沙星(批号：Y21J7C8647)，上海源叶生物科技有限公司；Krebs-Ringer 试液、防风提取物(自制)；水为双蒸水；乙腈为色谱纯，德国 MERK 公司；其他试剂均为分析纯。防风药材购自广东和翔制药有限公司(批号：HX20G01，产地：河北)，经广东药科大学中药学院马鸿雁副教授鉴定，来源于伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricate*(Turcz.) Schischk. 的干燥根，为 2020 年版《中国药典》正品。

1.3 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 180~220 g，由南方医科大学实验动物中心提供，动物许可证号：SCXK(粤)2016-0041。

2 方法和结果

2.1 试药的配制

2.1.1 防风提取物的制备 防风粉碎成粗粉，称取 200 g 加入 10 倍量 70%乙醇，加热回流提取 3 次，每次约 2 h，合并提取液，抽滤，滤液减压浓缩(45 °C，60 r·min⁻¹)至稠浸膏，即得。每 1 g 提取物相当于原药材 2 g。紫外可见分光光度法测定，得总色原酮平均含量($n=3$)为(19.80±0.56)%。

2.1.2 Krebs-Ringer 试液(K-R 试液)的配制

2.1.2.1 空白的 K-R 试液 称取葡萄糖 1.4 g，加少量蒸馏水溶解，NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、NaHCO₃ 1.37 g、Na₂PO₄ 0.32 g、MgCl₂ 0.02 g，加适量蒸馏水溶解后与葡萄糖溶液混匀并定容至 1 L，再用磷酸调节 K-R 试液的 pH 至 6.5，现配现用。另配制 pH 为 5.5、7.4 的 K-R 试液，操作同上，H₃PO₄调至所需 pH 值即可。

2.1.2.2 含酚红的 K-R 试液 精密称取酚红 20 mg 置

于 500 mL 容量瓶中, 加 pH 6.5 的 K-R 试液溶解并定容至刻度线, 摇匀即得。

2.1.3 肠灌流液的制备^[12]

2.1.3.1 芍药苷组 精密称取芍药苷适量, 加含酚红的 K-R 试液溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得。分别配制成低($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)浓度的肠灌流液。

2.1.3.2 芍药苷-防风组 精密称取芍药苷和防风提取物适量, 加含酚红的 K-R 试液溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得(芍药苷 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、防风提取物 $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.1.3.3 芍药苷-盐酸维拉帕米组 精密称取芍药苷和维拉帕米适量, 加含酚红的 K-R 试液溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得(芍药苷 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、盐酸维拉帕米 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.1.3.4 芍药苷-丙磺舒组 精密称取芍药苷和丙磺舒适量, 加含酚红的 K-R 试液溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得(芍药苷 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、丙磺舒 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.1.3.5 芍药苷-诺氟沙星组 精密称取芍药苷适量, 加含酚红的 K-R 试液溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得(芍药苷 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。诺氟沙星按 $300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量配制混悬液, 实验前连续灌胃给药 5 d。

2.1.4 空白灌流液的制备 按大鼠在体单向肠灌流的实验方法, 以空白 K-R 试液为供试液灌流 120 min, 收集流出液, 即得空白肠灌流液。

2.1.5 酚红对照品溶液的制备 精密称取酚红 10 mg 置于 100 mL 容量瓶, 加 K-R 试液溶解定容, 制成 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的酚红对照品母液。

2.1.6 芍药苷对照品溶液的制备 精密称取芍药苷对照品 8.3 mg, 加 K-R 试液溶解, 定容于 25 mL 容量瓶中, 制成质量浓度为 $325.36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芍药苷对照品储备液。

2.2 芍药苷和酚红的测定方法

2.2.1 样品处理方法 取 1 mL 供试液样品置于 1.5 mL EP 离心管中, 于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min ($10\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心半径为 6.2 cm), 上清液用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 续滤液用 HPLC 法测定芍药苷含量; 另取上清液 0.5 mL 置于 10 mL 具塞试管中, 加入 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液 4.5 mL, 摇匀, 采用紫外可见分光光度法测定酚红吸光度, 校正水分变化产生的浓度差异。

2.2.2 检测条件

2.2.2.1 酚红最佳测定波长的确定 取酚红对照品溶液和肠灌流液(芍药苷浓度为 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)各 0.5 mL,

经处理后于 400~700 nm 进行扫描光谱图。供试品和对照品均在 558 nm 处呈现出最大吸收峰, 故确定 558 nm 为酚红的测定波长。

2.2.2.2 芍药苷测定的色谱条件 色谱柱: Cosmosil C₁₈-MS-II (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-质量分数 0.1% 磷酸水溶液 (14 : 86); 流速: $1.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 230 nm; 柱温: $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

2.2.3 线性关系考察 精密移取酚红对照品母液适量, 加 K-R 试液稀释成 5、10、20、30、40、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列质量浓度的酚红标准溶液。以试剂空白做参比, 在波长 558 nm 处检测吸光度, 以酚红质量浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标进行曲线拟合回归, 得标准曲线方程为: $A=0.017\ 3C+0.0039$, $r=0.999\ 1$, 表明在 5~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内酚红浓度与吸光度的线性关系良好。

精密吸取芍药苷对照品储备液适量, 加 K-R 试液配置成浓度分别为 8.13、16.27、32.54、65.07、81.34、162.68 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 按“2.2.2.2”项下色谱条件进样检测, 以芍药苷质量浓度(C)对峰面积(A)进行线性回归, 得标准曲线方程为 $A=0.404\ 6C+0.106\ 8$, $r=0.999\ 9$, 表明芍药苷在 8.13~162.68 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度内与峰面积的线性关系良好。

2.2.4 专属性 分别取芍药苷对照品溶液、大鼠空白肠灌流液及肠灌流液进样分析, 比较其色谱行为。结果见图 1。芍药苷出峰时间稳定, 无内源性物质干扰, 表明该方法专属性较强。

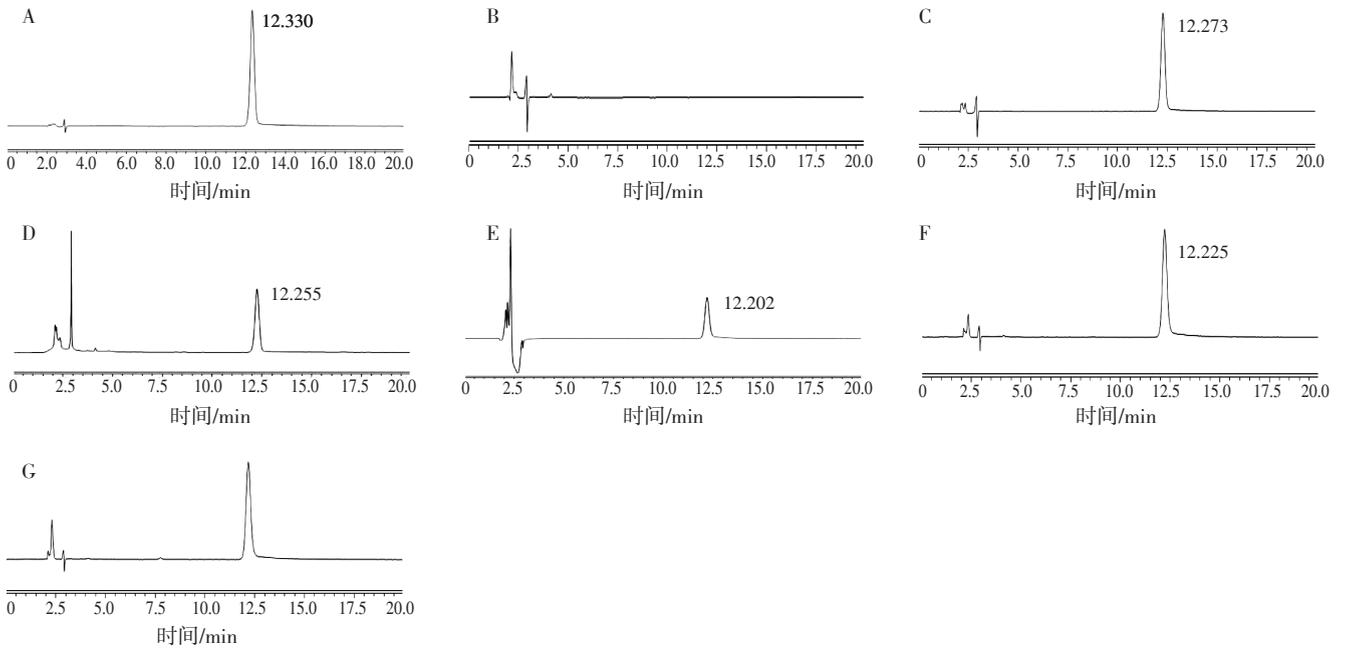
2.2.5 定量限与检测限 取芍药苷对照品溶液适量, 逐级稀释, 按“2.2.2.2”项下色谱条件进样测定, 测得芍药苷定量限为 $0.302\ 0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (S/N=10 : 1); 检测限为 $0.019\ 0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (S/N=3 : 1)。

2.2.6 精密度 取浓度为 16.27、81.34、130.14 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芍药苷对照品溶液, 按“2.2.2.2”项下色谱条件连续进样 6 次, 测得日内 RSD 均小于 2%, 表明仪器精密度较好。

2.2.7 加样回收率 取浓度分别为 65.3、81.6、97.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的芍药苷对照品溶液各 1 mL, 加入 81.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的含药肠灌流液 1 mL, 混匀, 加 K-R 试液定容于 5 mL 容量瓶中, 按“2.2.2.2”项下色谱条件测定, 计算加样回收率及 RSD。结果见表 1。回收率的 RSD 均小于 2%, 表明该方法回收率良好。

2.2.8 稳定性考察

2.2.8.1 芍药苷在不同 pH 值的 K-R 试液中的稳定性



注: A. 芍药苷对照品; B. 空白肠灌流液; C. 芍药苷中浓度组; D. 芍药苷-防风组; E. 芍药苷-盐酸维拉帕米组; F. 芍药苷-丙磺舒组; G. 芍药苷-诺氟沙星组

图 1 芍药苷的高效液相色谱图

Figure 1 High performance liquid chromatography charts of paeoniflorin

表 1 芍药苷加样回收率考察结果(n=3)

Table 1 The results of recovery ratio of paeoniflorin(n=3)

样品含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
81.6	65.3	146.7	99.69	99.80	0.47
81.6	65.3	147.1	100.31		
81.6	65.3	146.5	99.39		
81.6	81.6	163.3	100.12	99.64	0.65
81.6	81.6	163.1	99.88		
81.6	81.6	162.3	98.90		
81.6	97.9	179.0	99.49	100.61	1.12
81.6	97.9	181.2	101.74		
81.6	97.9	180.1	100.61		

考察 取不同 pH 值的芍药苷供试液(40 μg·mL⁻¹, 37 ℃), 通入混合气体(CO₂: O₂=5: 95), 分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 进样测定芍药苷的峰面积, 以峰面积计算降解残存百分率, 结果见表 2。降解残存百分率的 RSD 均小于 3%, 说明芍药苷在 pH 5.5~7.4 范围内稳定性较好, 综合肠道 pH, 选用 pH 6.5 的 K-R 试液作为肠道营养液进行试验。

2.2.8.2 芍药苷在空白肠灌流液中的稳定性考察

取空白肠灌流液配制的供试液(芍药苷 40 μg·mL⁻¹, 37 ℃)分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 测定灌流液中芍药苷的峰面积, 以峰面积计算降解残存百分率, 结果见表 3。药物在 24 h 内基本无变化, RSD

表 2 芍药苷在不同 pH 值 K-R 试液中稳定性考察结果($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 2 Results of stability of paeoniflorin in different pH K-R liquid($\bar{x} \pm s$, n=3)

考察时间/h	降解残存百分率/%		
	pH 5.5	pH 6.5	pH 7.4
0	100	100	100
1	99.65 ± 1.03	98.36 ± 0.51	96.47 ± 0.42
2	99.16 ± 0.35	98.18 ± 0.57	94.80 ± 0.98
4	99.11 ± 0.41	98.37 ± 0.23	94.79 ± 0.41
8	99.03 ± 0.29	98.18 ± 0.36	94.09 ± 0.49
12	98.90 ± 0.30	98.39 ± 0.15	93.21 ± 0.41
24	98.98 ± 0.05	98.27 ± 0.08	91.40 ± 0.36
RSD/%	0.57	0.77	2.75

均小于 2%, 说明芍药苷在空白灌流液中的稳定性较好。

2.2.9 吸附性考察

2.2.9.1 灌流管路吸附 用肠灌流液以 0.2 mL·min⁻¹ 的流速通入干燥硅胶管, 分别于 0、0.5、1、2、3、4 h 取样测定, 计算药物浓度的剩余百分比。芍药苷与酚红浓度测定值 RSD 均小于 2%, 结果表明药物在灌流管路中无明显的物理吸附作用, 见表 4。

2.2.9.2 大鼠肠壁物理吸附 剪取 SD 大鼠回肠段约 10 cm, 去除肠系膜, 翻出黏膜层, 以生理盐水冲洗干净后置于肠灌流液中 37 ℃ 孵育, 分别于 0、1、

2、3 h 测定孵育液中芍药苷与酚红的含量，计算孵育后药物浓度的剩余百分比，结果见表 5。肠段孵育 3 h 后，药液浓度无明显变化，RSD 小于 2%，可认为大鼠肠壁对芍药苷和酚红基本无物理吸附作用。

2.3 防风提取物对芍药苷肠吸收的研究

2.3.1 大鼠外翻肠囊实验 大鼠禁食不禁水过夜，称定质量，按 5.0 mL·kg⁻¹腹腔注射 20%乌拉坦麻醉。沿腹中线切开腹腔，迅速取出全肠段并分离考察肠段(十二指肠、空肠、回肠、结肠，每段长约 10 cm)，去除肠段表面的肠系膜和脂肪，用 K-R 试液[37℃，通混合气体(O₂:CO₂=95:5)]将肠段冲洗干净。先结扎肠囊的一端，用钝头玻璃棒小心将肠管翻转，使黏膜层朝外，浆膜层在内，再置于 K-R 试液中清洗干净，滤纸吸干黏膜表面水分，然后将肠囊另一端固定于取样口，从取样口向浆膜腔内注入 37℃的空白 K-R 试液 1 mL 作为药物接受体系。将各段肠囊分别放入 100 mL 供试液中，持续通入混合气

体(O₂:CO₂=95:5)，在 37℃恒温下培养 1 h 后取出肠囊，收集肠囊液，经处理后 HPLC 法测定，计算肠囊液中芍药苷含量。

2.3.2 大鼠在体单向肠灌注实验 SD 大鼠禁食不禁水过夜，称定质量，20%乌拉坦溶液(5.0 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉。固定大鼠，沿腹中线切开腹腔(开口约 4 cm)，小心分离出回肠段，取出约 10 cm，两端剪开呈“V”字口，上端插入蠕动泵的出口并结扎，以 3.0 mL·min⁻¹的流速用生理盐水(37℃)将肠段内容物冲洗干净后，泵入空气将肠段内的生理盐水排空，插入短管，绑扎于肠段下端。插管完成后将肠段小心地放回腹腔，避免和减少肠段的扭结和卷曲，伤口处用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿，红外灯下保温。考察芍药苷高、中、低浓度，防风提取物，盐酸维拉帕米，丙磺舒，诺氟沙星对芍药苷吸收的影响，分别通入各组供试液，先以 1.0 mL·min⁻¹的体积流量灌注 10 min 后，再以 0.2 mL·min⁻¹的体积流量持续灌注 2.5 h。每隔 25 min 收集灌流液。收集的灌流液经处理后，分别在波长 558 nm 处及“2.2.2.2”项色谱条件下进样分析，分别计算收集液中酚红和芍药苷的质量浓度。实验结束后，断头处死大鼠，剪下灌流肠段，平铺于干净的滤纸上，测量长度(L, cm)和横截面半径(r, cm)。

2.3.3 数据处理 大鼠外翻肠囊实验中芍药苷表观吸收系数(P_{app})按式(1)计算。

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{A \times C_0} \quad (1)$$

大鼠在体单向肠灌注实验采用酚红法对灌流液流入和流出的体积进行校正，消除肠道对水分吸收或分泌而引起的体积变化，出口处的芍药苷浓度用公式(2)校正。

$$C_{out(corrected)} = \frac{C_{out} PR_{in}}{PR_{out}} \quad (2)$$

芍药苷的有效渗透系数(P_{eff})用公式(3)计算，吸收速率常数(K_a)用公式(4)计算。

$$P_{eff} = \frac{Q \ln(C_{in}/C_{out(corrected)})}{2\pi rL} \quad (3)$$

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out(corrected)}}{C_{in}}\right) Q/\pi r^2 L \quad (4)$$

其中，dQ/dt 为单位时间内的药物转运量(肠囊中药物浓度变化值)，C₀ 为供液体系中药液质量浓度(μg·mL⁻¹)，A 为参与转运或扩散的肠面积(cm²)；C_{out(corrected)} 为出口处经校正后的药物的质量浓度(μg·mL⁻¹)；C_{out} 为实际测得的药物质量浓度(μg·mL⁻¹)；PR_{in} 为进

表 3 芍药苷在空白灌流液中稳定性考察结果(n=3)

Table 3 Result of stability of paeoniflorin in blank perfusate (n=3)

药物	考察时间/h							RSD /%
	0	1	2	4	8	12	24	
降解残存百分率/%	100	99.92	99.23	99.06	97.85	100.23	99.94	1.42

表 4 灌流管路对药物的吸附考察($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 4 Drugs absorption in the pipeline($\bar{x} \pm s$, n=3)

灌流时间/h	剩余百分比/%	
	芍药苷	酚红
0	100	100
0.5	99.18 ± 0.26	99.76 ± 0.08
1	99.86 ± 0.32	99.84 ± 0.12
2	100.02 ± 0.62	100.11 ± 0.14
3	99.95 ± 0.31	100.06 ± 0.18
4	100.08 ± 0.42	100.07 ± 0.13
RSD/%	0.82	0.47

表 5 大鼠肠壁对药物的吸附考察($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 5 Drugs physical absorption of drugs in intestinal wall of rats($\bar{x} \pm s$, n=3)

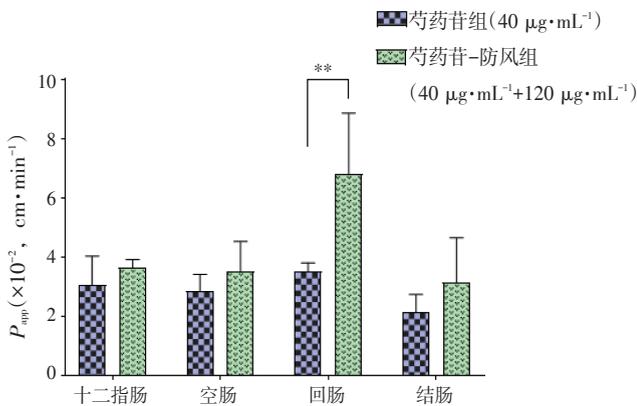
孵育时间/h	剩余百分比/%	
	芍药苷	酚红
0	100	100
1	99.62 ± 0.33	99.65 ± 0.17
2	99.17 ± 0.36	99.83 ± 0.13
3	98.97 ± 0.40	100.03 ± 0.12
RSD/%	0.85	0.58

口处酚红的质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); PR_{out} 为出口处酚红的质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C_{in} 为进口处肠灌液中的药物质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); Q 为肠流速($0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)。

采用 GraphPad prism 8 统计分析软件处理数据, 各组间数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 然后用独立样本 t 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 表示组间差异具有统计学意义。

2.3.4 结果

2.3.4.1 外翻肠囊法试验 结果见图 2。芍药苷在大鼠全肠段均有吸收, 且防风提取物对芍药苷的吸收均有一定的促进作用, 其中以回肠段最为显著($P < 0.01$)。



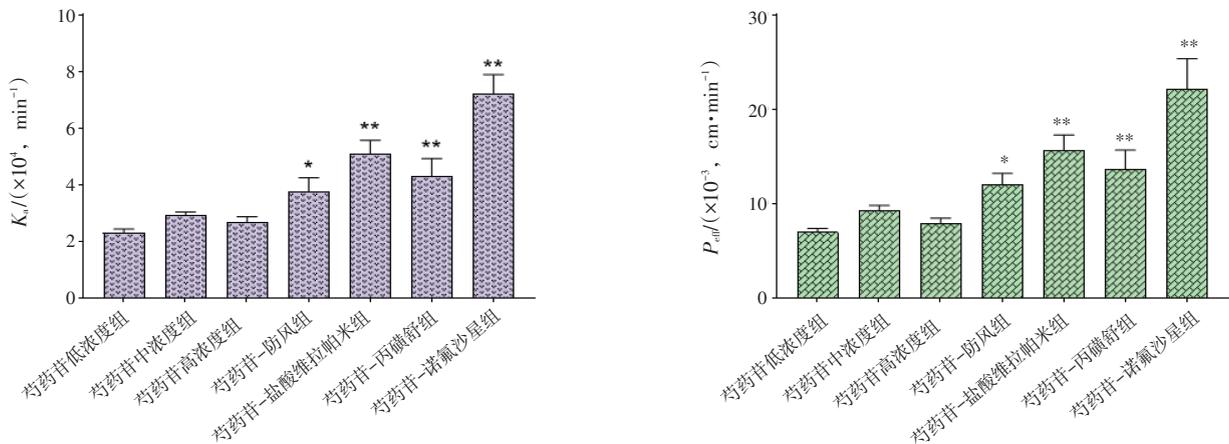
注: 与芍药苷组($40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)比较, $**P < 0.01$

图 2 防风提取物对不同肠段的芍药苷 P_{app} 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 2 Effect of *S. divaricata* extract on P_{app} of paeoniflorin in different intestinal segments($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

2.3.4.2 在体单向肠灌注法试验

(1)不同质量浓度的芍药苷在回肠的吸收情况: 结果见图 3。在实验浓度考察范围内, 随着芍药苷质



注: 与芍药苷中浓度组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

图 3 在体单向肠灌注法试验结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 3 Results of *in situ* single pass perfusion method($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

量浓度逐渐增加, 其 K_a 和 P_{eff} 无明显变化($P > 0.05$), 表明芍药苷进入体循环的主要转运方式可能为被动转运。

(2)不同因素对芍药苷在回肠吸收的影响: 结果见图 3。P-gp 抑制剂、MRP2 抑制剂和抗生素对芍药苷的肠道吸收都有促进作用, 表明芍药苷可能是 P-gp 与 MRP2 的底物, 调节肠道菌群会促进其肠道吸收; 防风促进芍药苷肠道吸收机制可能与抑制 P-gp 与 MRP2 活性及调节肠道菌群有关。

3 讨论

外翻肠囊模型是研究药物肠吸收的常用模型, 通过测定囊内外药物浓度随时间的变化来考察药物的吸收情况, 因其操作简便、条件易控、重复性好, 能够详细观察药物在肠道内的透膜吸收情况, 现已广泛用于药物的吸收研究^[13]。但外翻肠囊法对肠道黏膜有损伤, 并且在离体条件下肠道酶活力会降低, 影响药物的渗透性, 取样点也有限。在体单向肠灌注模型通过测定药物灌液前后的质量浓度变化来计算药物的肠吸收参数, 其不切断肠道血管和神经, 保证了转运蛋白和内分泌输入系统的完整性、血液及淋巴系统的稳定性, 更接近药物机体的真实吸收, 比体外模型更能准确地预测药物在体内的吸收体征, 已成为美国食品药品监督管理局(FDA)认可的研究药物吸收的模型之一^[14-15]。但该方法所需的动物数量较多, 成本较高, 且动物之间还可能存在个体差异。在体单向肠灌注实验, 由于肠道不仅吸收药物也吸收或分泌水分, 使灌液体积发生变化, 最终影响实验结果, 故需进行水分校正。目前常用的水分校正法有重量法与酚红法。重量法的基本假设前

提是灌流肠段进出口的灌流液密度相等,但由于肠道的分泌、黏膜脱落及药物被吸收等引起密度改变或其他肠道内容物引起肠段局部堵塞等情况均会引起灌流进出口的液体体积变化,满足不了假设前提,从而会引起较大的偏差^[16]。酚红法长期被用来校正灌流液水分变化,无需考虑肠道堵塞带来的误差,操作简单快捷。但有报道,酚红存在一定程度的肠吸收,从而会带来另一种误差^[16]。本研究对酚红在灌流管道和SD大鼠肠壁进行了吸附性考察,结果表明管道和肠壁对酚红基本无吸收作用,测定误差也符合试验要求,因此本研究采用酚红法进行水分校正。

本研究显示芍药苷在全肠段均有吸收,防风提取物在全肠段对芍药苷吸收均有一定的促进作用,其中以回肠最为显著($P < 0.05$)。在防风提取物促芍药苷吸收最佳肠段加入P-gp、MRP2抑制剂和抗生素,考察其对芍药苷 K_a 和 P_{eff} 的影响。结果发现加入抑制剂后,芍药苷的 K_a 和 P_{eff} 值均有不同程度的增加,提示芍药苷可能是P-gp和MRP2的底物,表明芍药苷的肠道吸收过程可能有P-gp和MRP参与。加入抗生素后,芍药苷的 K_a 和 P_{eff} 均有显著提升,分别是芍药苷中浓度组的2.46和2.38倍,表明抗生素对芍药苷的肠道吸收有促进作用。芍药苷主要在肠道中被菌群代谢,而防风对多种细菌,如金黄色葡萄球菌、痢疾杆菌及枯草芽孢杆菌等有不同程度的抑制作用^[17],推测其可在一定程度上降低肠道菌群对芍药苷的水解,从而提高吸收效率。

防风的主要活性成分是色原酮类,如5-O-甲基维斯阿米醇苷、升麻素苷等,故本实验将总色原酮列为防风的质量指标。历代医家解析痛泻要方均认为防风辛能疏散肝风,香可舒脾,可作为理脾引经之药,达到补脾土而泻肝木的“抑木扶土”作用,为该方使药,可引导方中诸药到达病变部位^[18]。现有研究^[19]表明防风可显著提高芍药苷的血药浓度,增强方中其他药物的止痛止泻效应,在方中的引经作用,与本研究结果一致。综上,推测防风提取物中可能存在抑制P-gp、MRP活性和抑菌的成分,其促进芍药苷肠道吸收的机制可能与其抑制P-gp和MRP2活性以及调节肠道菌群有关。

参考文献:

- [1] 薛晔,曹志群,王晓妍,等.四君子汤合痛泻要方加减治疗溃疡性结肠炎肝郁脾虚证的疗效观察[J].辽宁中医杂志,2018,45(11):2352-2355.
- [2] 江山.四君子汤合痛泻要方加减治疗溃疡性结肠炎(脾虚肝郁)临床观察[J].实用中医内科杂志,2020,34(3):83-86.
- [3] ZHENG K, JIA J, YAN S H, et al. Paeoniflorin ameliorates ulcerative colitis by modulating the dendritic cell-mediated TH 17/Treg balance[J]. Inflammopharmacology, 2020, 28(6): 1705-1716.
- [4] ZHAI A L, ZHANG Z, KONG X J. Paeoniflorin alleviates H2O2-induced oxidative injury through down-regulation of microRNA-135a in HT-22 cells [J]. Neurochem Res, 2019, 44(12): 2821-2831.
- [5] CHO E, KIM H Y, LEE A Y. Paeoniflorin ameliorates A β -stimulated neuroinflammation via regulation of NF- κ B signaling pathway and A β degradation in C6 glial cells[J]. Nutr Res Pract, 2020, 14(6): 593-605.
- [6] WU F B, YE B H, WU X D, et al. Paeoniflorin on rat myocardial ischemia reperfusion injury of protection and mechanism research[J]. Pharmacology, 2020, 105(5/6): 281-288.
- [7] LI Y C, ZHENG X X, XIA S Z, et al. Paeoniflorin ameliorates depressive-like behavior in prenatally stressed offspring by restoring the HPA axis- and glucocorticoid receptor-associated dysfunction[J]. J Affect Disord, 2020, 274: 471-481.
- [8] LIU B H, PIAO X H, NIU W, et al. Kuijieyuan decoction improved intestinal barrier injury of ulcerative colitis by affecting TLR4-dependent PI3K/AKT/NF- κ B oxidative and inflammatory signaling and gut microbiota[J]. Front Pharmacol, 2020, 29(11): 1036-1036.
- [9] 王小静,罗霞,赵忠正,等.芍药苷通过抑制TLR5表达及T细胞活化减轻葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠溃疡性结肠炎[J].细胞与分子免疫学杂志,2020,36(8):673-679.
- [10] 韩嘉艺,高飞,陈立江,等.单剂量口服芍药苷微乳在大鼠体内的药动学研究[J].中国药理学杂志,2019,17(3):44-49.
- [11] SHEN C Y, SHEN B D, ZHU J J, et al. Glycyrrhizic acid-based self-assembled micelles for improving oral bioavailability of paeoniflorin[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2020, 16: 1-16.
- [12] 党学良,邢建国,王新春,等.芪天复方中主要活性成分芍药苷在大鼠肠吸收动力学特征[J].中国医院药学杂志,2010,30(22):1886-1888.
- [13] MA A, FI A J, AM A M. Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications[J]. J Pharm Pharmacol, 2012, 64: 326-336.
- [14] 沈青青,江振洲,张陆勇,等.药物肠道渗透性预测模型研究进展[J].药学学报,2018,53(5):727-734.
- [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.
- [16] 黄传利.非脂解纳米乳雷洛昔芬口服吸收的体内外研究[D].广州:广东药科大学,2019.
- [17] 刘双利,姜程曦,赵岩,等.防风化学成分及其药理作用研究进展[J].中草药,2017,48(10):2146-2152.
- [18] 时军,李昕,张小灵,等.痛泻要方加减防风对实验性UC大鼠结肠黏膜的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(4):161-165.
- [19] 梁瑞峰,葛文静,魏征,等.防风对痛泻要方活性成分在正常大鼠体内的药动学和组织分布的影响[J].中国中药杂志,2017,42(19):3802-3808.

(编辑:梁进权)