

茵陈黄连汤大鼠离体肠道渗透机制研究[△]

林丹*, 郑萍#, 李国锋(南方医科大学南方医院药学部, 广州 510515)

中图分类号 R285;R969 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)39-3656-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.39.03

摘要 目的:研究茵陈黄连汤离体肠道渗透机制。方法:采用Ussing chamber技术,应用高效液相色谱-串联质谱法检测茵陈黄连汤大鼠离体肠道渗透后有效成分阿魏酸的质量浓度,研究不同肠段阿魏酸的吸收参数。结果:阿魏酸在空肠转运的累积透过量(Q_m)、透过百分率与表观渗透系数(P_{app})均显著大于在回肠与结肠中的数据($P<0.05$),在回肠与结肠之间的 Q_m 、透过百分率、 P_{app} 比较差异无统计学意义;阿魏酸在各段小肠的吸收高峰均出现在80 min左右。结论:茵陈黄连汤经肠道透析后的阿魏酸成分在大鼠体外空肠、回肠、结肠中均有吸收,主要吸收部位为空肠段。

关键词 茵陈黄连汤;阿魏酸;药动学;高效液相色谱-串联质谱法;Ussing chamber技术

Study on *in vitro* Intestinal Permeability Mechanism of Yinchen Huanglian Decoction

LIN Dan, ZHENG Ping, LI Guo-feng (Dept. of Pharmacy, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the *in vitro* intestinal permeability mechanism of Yinchen huanglian decoction. METHODS: Ussing chamber and HPLC-MS/MS method was used to detect the concentration of ferulaic acid in Yinchen huanglian decoction after penetrating through isolated intestinal tract; the absorption parameters of ferulaic acid in different intestinal segments were studied. RESULTS: The accumulated absorption amount (Q), absorption percentage and P_{app} of ferulic acid in jejunum were significantly higher than in ileum and colon ($P<0.05$), but there was no significant difference between ileum and colon. The maximal absorption of ferulic acid in small intestines all appeared at about 80 min. CONCLUSIONS: Ferulic acid in Yinchen huanglian decoction could be absorbed by jejunum, ileum and colon of rats *in vitro*, and mainly absorbed by jejunum.

KEY WORDS Yinchen huanglian decoction; Ferulic acid; Pharmacokinetics; HPLC-MS/MS; Ussing chamber method

茵陈黄连汤是源自张仲景《伤寒论》的组方,由茵陈蒿汤加黄连汤组合而成,根据《伤寒论》论述内容,两方所有药味可以互相配伍,合并使用。茵陈蒿汤包括茵陈、大黄、栀子;黄连汤包括黄芩、黄柏、黄连、栀子。两方合并成茵陈黄连汤后共由6味药物组成。其功效为清热利湿退黄、疏肝利胆和胃,主治肝胆湿热证,临床用于治疗各种急、慢性肝炎和胆囊炎等。许重远等^[1]采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法鉴定了茵陈黄连汤中9个活性成分,分别为咖啡酸、阿魏酸、大黄酸、芦荟苷、乙酰紫草素、木兰花碱、原儿茶碱、岩白菜素、异栀子苷。笔者应用Ussing chamber技术并采用HPLC-MS/MS法考察了茵陈黄连汤活性成分阿魏酸是否被吸收,并对阿魏酸的肠道药动学进行研究。Ussing chamber技术^[2-4]具有模拟胃肠道环境的特点,操作简单,成本较低,易于推广,作为生物药剂学研究的新方法,近年在国外应用较多。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC-G6460型三级串联四极杆MS联用仪(LC/

[△] 基金项目:广东省医学科研基金立项课题(No.A2010361);广东省医学科学技术研究基金资助项目(No.WSTJJ2009121544011197303218823)

* 主管药师,硕士研究生。研究方向:生物药剂学。电话:020-62787246。E-mail:lld.82@163.com

通信作者:主管药师,硕士。研究方向:生物药剂学和临床药理学。电话:020-62787235。E-mail:zpm321@126.com

QQQ),包括Mass Hunter B.03.03 sp2工作站软件(美国Agilent公司);XW-80A型涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);Ussing chamber装置(美国Harvard公司,规格:7 ml);一次性无菌注射器(山东威高集团医用高分子制品股份有限公司,规格:1、10 ml);针筒式油膜(大连依利特分析仪器有限公司,规格:13 mm/0.20 μ m)。

1.2 中药饮片

茵陈(安徽广印堂制药有限公司,产地:安徽,批号:110401);栀子(广州置信中药饮片有限公司,产地:江西,批号:111001);大黄(广东省药材公司中药饮片厂,产地:甘肃,批号:1261101);黄连(广东三信药业有限公司,产地:四川,批号:111101);黄芩(广州置信中药饮片有限公司,产地:河北,批号:1511010);黄柏(安徽广印堂制药有限公司,产地:四川,批号:110401)。

1.3 试剂

阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110773-201012);Tris(gydroxyethyl aminomethane)、Hepes{2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid}均购自美国Sigma-Aldrich公司;甲酸胺、甲醇、乙腈为色谱纯。

1.4 动物

清洁级SD大鼠6只,♂,体质量(250 \pm 20)g,由南方医科大学实验动物中心提供[动物使用合格证号:SCXK(粤)2011-0015]。动物实验的方法符合南方医科大学实验动物伦理委员会的有关要求和规定。

2 方法与结果

2.1 茵陈黄连汤的制备

茵陈蒿 12 g, 栀子 18 g, 大黄 9 g, 黄连 9 g, 黄芩 6 g, 黄柏 6 g, 加水 1.2 L, 浸泡 30 min 后煮沸, 保持微沸状态约 1 h 至煎剂剩余 400 ml, 放凉至约 40 °C, 用布氏漏斗滤过, 弃去药渣, 置烘箱于 80 °C 恒温烘干至粉末状, 置干燥箱中, 备用。使用时用 Hepes-Tris 缓冲液按原比例复溶制得。

2.2 Hepes-Tris 缓冲液的制备

取 Hepes 6 g, 溶于 800 ml 蒸馏水中, 使之完全溶解。通入混合气体(95% O₂, 5% CO₂) 10 min 后, 加入 1.8 ml KCl(3 mol/L)、1.8 ml CaCl₂(1 mol/L)、0.8 ml MgSO₄(1 mol/L)、8.18 g NaCl 使之完全溶解, 再用 Tris 溶液(1 mol/L)调节 pH=7.4, 然后加入 5 ml 葡萄糖溶液(1 mol/L), 用蒸馏水稀释至 1 000 ml, 混匀, 即得^[4]。

2.3 Ussing chamber 试验

SD 大鼠 6 只, 禁食 16~18 h 后, ip 水合氯醛(4 ml/kg)麻醉, 沿腹中线打开腹腔, 将幽门下 5 cm 肠段去除, 接着的 10 cm 小肠作为空肠, 回盲部前 10 cm 小肠作为回肠, 盲肠下 2 cm 肠段去除, 接着的 6 cm 小肠作为结肠。用 Hepes-Tris 缓冲液清洗各肠段, 并迅速置入 Hepes-Tris 缓冲液中冰浴培养 5 min, 每部分肠段分别剪取 3~4 cm 长的部分, 迅速剥离并去除浆膜侧的浆膜层, 将肠黏膜固定在扩散室中, 扩散室的有效面积为 1.78 cm²。黏膜侧为给药侧, 加入 7 ml 茵陈黄连汤供试液; 浆膜侧为接收侧, 加入 7 ml Hepes-Tris 缓冲液。扩散池的两边均通入混合气体(95% O₂, 5% CO₂), 并于 37.5 °C 恒温维持肠黏膜的生物活性。分别在 20、40、60、80、100、120 min 时, 取出全部 7 ml 接收液, 同时立即补充同温度同体积的 Hepes-Tris 缓冲液。样品中阿魏酸的质量浓度采用 HPLC-MS/MS 法测定。

2.4 测试条件

2.4.1 HPLC 条件 色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm); 流动相: 乙腈-0.05% 甲酸胺(35:65, V/V); 检测波长: 320 nm; 流速: 0.2 ml/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 2 μl。

2.4.2 MS 条件 母离子: 193.1 m/z; 子离子: 134.0 m/z; 采用多重反应监测系统(MRM)进行扫描。离子源: 电喷雾电离(ESI)源; 驻留时间: 150 ms; 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流速: 10 L/min; 雾化器压力: 30 psi, 毛细管电压: 4 000 V; 碎裂电压: 80 V; 碰撞能: 12 kV。采用负离子模式检测。

2.5 标准质控样品的制备

精密称取 10.45 mg 阿魏酸对照品, 用甲醇定容至 10 ml, 得 1.045 mg/ml 的母液。采用倍半稀释的原则以甲醇制备成质量浓度为 51.0、102.0、204.1、408.2、816.4、1 632.8、3 265.6 ng/ml 的系列对照品溶液, 于 4 °C 贮藏, 备用。

将系列对照品溶液取出, 降至室温。分别吸取一定量, 置于 Hepes-Tris 缓冲液中, 得 75.1、225.3、375.5、1 126.5、1 877.5 ng/ml 的系列 Hepes-Tris 缓冲液标准质控样品。

2.6 样品处理

取接收液 7 ml 置于 60 °C 烘箱中烘干(约 20 h), 加入 200 μl 蒸馏水震荡溶解结晶, 再加入 1 ml 乙酸乙酯萃取, 置涡旋液体混合器上振荡 2 min, 分离有机相, 重复 4 次。合并 4 份有机相, 置于通风橱中以 N₂ 吹干, 然后加入 0.5 ml 甲醇复溶, 0.2 μm 滤膜滤过, 取 2 μl 直接进样。

2.7 计算与统计学方法

用公式 $Q_m = \sum 7\rho_i(n-1) + 7\rho_n n$ 计算累积透过量(Q_m)。式中, 7 表示取样体积和加入药液量, 均为 7 ml; ρ_i 为药物质量浓度。根据给药剂量 D , 计算累积透过百分率($Q_m/D \times 100\%$)。

表观渗透系数(P_{app})是表示药物经黏膜透过能力的重要指标, 其计算公式为: $P_{app} = (dQ/dt) \times (1/A\rho_0)$, 单位: cm/s。式中, dQ/dt 表示稳态时间-累积透过量线性回归所得的斜率; A 为有效渗透面积(1.78 cm²); ρ_0 为加入药液侧初始药物质量浓度。

试验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有数据均采用 SPSS13.0 统计软件进行显著性检验(双样本 t 检验)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.8 方法学考察

2.8.1 专属性试验 分别取一定量的大鼠肠道空白接收液、阿魏酸对照品溶液、空白接收液+阿魏酸对照品溶液、茵陈黄连汤肠道接收液, 按“2.4”项下条件进样测定。结果, 阿魏酸分子质量为 194.18, 保留时间为 2.79 min, 表明肠道内源性物质在此条件下无干扰。阿魏酸离子碎片见图 1; 阿魏酸 MRM 扫描图见图 2。

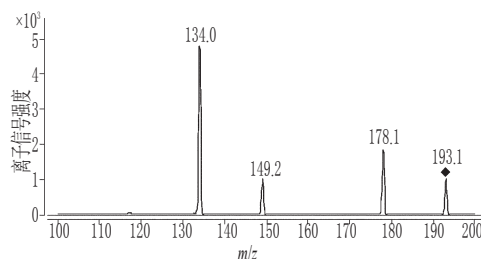


图 1 阿魏酸离子碎片

Fig 1 Ion fragment of ferulic acid

2.8.2 标准曲线的制备 按“2.5”项下方法制备系列对照品溶液, 分别加入 7 ml 空白接收液, 按“2.6”项下方法处理, 按“2.4”项下条件进样测定。以阿魏酸质量浓度(x)为横坐标, 阿魏酸和内标峰面积比值(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $y = 4.8571x - 174.8725$ ($r = 0.9997$, $n = 7$)。结果表明, 阿魏酸质量浓度在 51.0~3 265.6 ng/ml 范围内与阿魏酸和内标峰面积比值呈良好线性关系。

2.8.3 精密度试验 按“2.5”项下方法制备高、中、低质量浓度(1 877.5、375.5、75.1 ng/ml)标准质控样品各 5 份, 按“2.6”项下方法处理, 按“2.4”项下条件进样测定, 计算日内精密度(每隔 2 h 测定 1 次, 共测定 6 次)、日间精密度(每隔 24 h 测定 1 次, 共测定 5 次)。结果, 三种质量浓度的质控样品日内、日间精密度 RSD < 3%, 表明该试验方法符合目前生物样品分析方法指导原则中的相关规定。日内、日间精密度试验结果分别见表 1、表 2。

2.8.4 回收率试验 (1) 方法回收率试验: 按“2.5”项下方法制备高、中、低质量浓度(1 877.5、375.5、75.1 ng/ml)的标准质控样品溶液, 分别测定峰面积, 按“2.8.2”项下标准曲线方程求得药物质量浓度, 以测得质量浓度与实际质量浓度之比求算阿魏酸回收率。(2) 提取回收率试验: 按“2.5”项下方法制备高、中、低质量浓度(1 877.5、375.5、75.1 ng/ml)的标准质控样品溶液 7 ml, 按“2.6”项下方法处理样品; 将相同量的阿魏酸对照品直接加入乙酸乙酯中, N₂ 吹干后用相同方法复溶、滤过后进样。以两样品中阿魏酸峰面积之比求算提取回收率。方法回收率试验结果见表 3; 提取回收率试验结果见表 4。

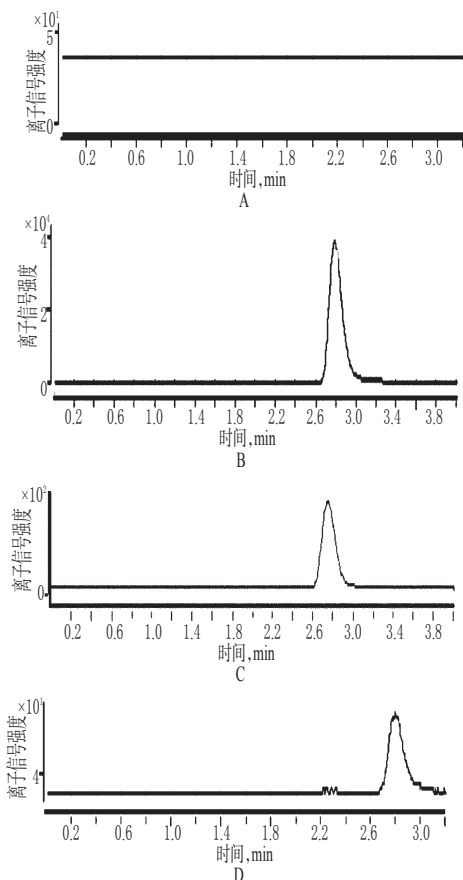


图2 阿魏酸MRM扫描图

A. 肠道空白接收液; B. 阿魏酸对照品溶液; C. 空白接收液+阿魏酸对照品溶液; D. 茵陈黄连汤肠道接收液

Fig 2 MRM scanning image of ferulic acid

A. blank permeation solution of rat's intestine; B. ferulic acid control solution; C. blank permeation solution added into ferulic acid control solution; D. intestinal permeation solution of Yinchen huanglian decoction

表1 日内精密性试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

质量浓度, ng/ml	测定值, ng/ml	RSD, %
75.1	80.30 ± 2.22	2.76
375.5	373.14 ± 4.36	1.17
1 877.5	1 861.59 ± 20.57	1.11

表2 日间精密性试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

质量浓度, ng/ml	测定值, ng/ml	RSD, %
75.1	79.71 ± 1.94	2.44
375.5	378.31 ± 6.97	1.84
1 877.5	1 888.98 ± 16.27	0.86

2.9 阿魏酸经不同肠黏膜的透过特性比较

称取茵陈黄连汤干粉, 用与煎剂相同比例(1/1)的甲醇溶解, 滤过后进样计算所得阿魏酸量作为给药剂量, 结果为423.49 ng/ml。阿魏酸在空肠转运的 Q_m 、透过百分率与 P_{app} 均显著大于在回肠与结肠中的数据($P < 0.05$), 而在回肠与结肠之间的累积透过量、透过百分率、表观渗透系数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。阿魏酸在小肠不同部位的吸收参数见表5; 阿魏酸体外Ussing chamber试验透过图见图3; 阿魏酸体外Ussing chamber试验累积透过曲线见图4。

表3 方法回收率试验结果($n=3$)

质量浓度, ng/ml	测定值, ng/ml	方法回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
75.1	78.42	104.4	107.40	2.59
	82.53	109.9		
	81.09	108.0		
375.5	376.94	100.39	99.47	1.15
	374.89	99.83		
	368.71	98.19		
1 877.5	1 873.12	99.77	99.87	0.89
	1 859.32	99.03		
	1 892.68	100.81		

表4 提取回收率试验结果($n=3$)

质量浓度, ng/ml	提取回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
75.1	72.94	72.25	1.16
	71.32		
	72.48		
375.5	75.65	75.92	0.32
	76.13		
	75.97		
1 877.5	77.27	77.06	0.26
	77.03		
	76.87		

表5 阿魏酸在小肠不同部位的吸收参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 5 Absorption parameters of ferulic acid in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n=6$)

肠段	Q_m , ng/ml	透过百分率, %	P_{app} , $\times 10^{-4}$ cm/s
空肠	59.84 ± 4.44*	14.13 ± 1.05*	2.72 ± 0.20*
回肠	42.81 ± 6.27	10.11 ± 1.48	2.01 ± 0.49
结肠	38.43 ± 6.76	9.07 ± 1.60	1.64 ± 0.38

与回肠或结肠比较: * $P < 0.05$

vs. ileum or colon: * $P < 0.05$

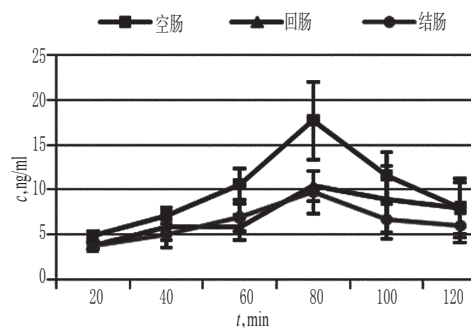


图3 阿魏酸体外Ussing chamber试验透过图

Fig 3 Ussing chamber permeation profiles of ferulic acid in vitro

由图3、图4可知, 阿魏酸在各段小肠的吸收高峰均出现在80 min左右。

3 讨论

当前, Ussing chamber技术应用研究的热点主要包括肠道吸收与代谢^[5-6]、药物对肠电生理参数的影响^[7]、内毒素与细菌移位的途径和机制^[8]以及肠道屏障功能的机制^[9]。Ussing chamber技术是目前研究药物在体外胃肠道吸收较常用的方法之一。近几年来, Ussing chamber技术不断发展, 应用愈来愈广泛。国外有学者将Ussing chamber技术誉为肠道功能研

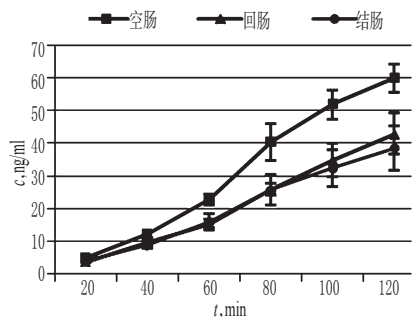


图4 阿魏酸体外Ussing chamber试验累积透过曲线

Fig 4 Ussing chamber cumulative penetration profiles of ferulic acid in vitro

究的金标准。其装置主要由两个部分组成,即灌流室和水浴恒温装置,并在每个释放池和接收池之间搭配气体通道。通过水浴锅恒温装置保持灌流室温度并通过混合气体(95% O₂、5% CO₂)可以最大程度地保持灌流室中离体组织的活性和完整性,从而弥补了人克隆结肠腺癌细胞(Caco-2)单层细胞模型法缺乏作为主要吸收屏障之一的黏膜层的缺点以及外翻肠囊法在囊翻转后较易造成细胞形态发生改变而影响通透性的不足。

本研究为了提高提取回收率,样品的处理方法经过多种尝试。有报道用乙酸乙酯提取血浆样品中的阿魏酸得到的回收率较高^[10],故本研究采用乙酸乙酯作为有机相。由于吸收液样品7 ml体积较大不利于萃取,遂采用烘干的方式浓缩吸收液,并分别于烘干温度100、80、60、40℃进行回收率考察,发现60、40℃时回收率较高,但考虑到40℃烘干时间过长,故选用60℃作为烘干温度。另外,本研究通过增加萃取次数(共4次)来提高萃取率。通过以上对有机相、烘干温度以及萃取次数的优化,可有效地提高样品处理的提取回收率。

阿魏酸在光照条件下不稳定^[11],故在处理样品时应该尽量选用棕色瓶等避光措施,处理好的样品应置冰箱内冷藏,并尽快测定分析。

目前,中药在体外肠道渗透成分和肠道动力学研究方面,多以中药中单一成分的对照品作为研究对象^[12-13],较少直接采用中药煎剂进行研究^[14]。阿魏酸单体和含阿魏酸的中药煎剂在大鼠体内的吸收存在显著差异^[15],原因主要为研究所用单体的剂量与中药煎剂中单体实际含量有较大差别。另外,单成分的研究未考虑其他成分对其吸收的影响。故不应简单地用单体对照品的药动学研究来推测服用中药煎剂后其有效成分的体内过程。

本研究阐明了茵陈黄连汤中阿魏酸的体外吸收特征,确定了茵陈黄连汤中阿魏酸特定的吸收部位,为下一步研究多成分同时吸收的特征提供了依据,也为将来进一步开展茵陈黄连汤体内成分药动学和药效学研究打下了基础。应用Ussing chamber技术,通过体外吸收模型研究可成为探讨中药复方药效物质基础和吸收代谢规律的新模式。

参考文献

[1] 许重远,陈振德,张焜,等. HPLC-MS-MS分析复方茵陈黄连汤中抗HBV活性部位主要成分[J]. 中药材,2008,31(12):1839.

[2] Wallon C, Braaf Y, Wolving M, et al. Endoscopic biop-

sies in Ussing chambers evaluated for studies of macromolecular permeability in the human colon [J]. *Scand J Gastroenterol*,2005,40(5):586.

[3] Yang H, Finaly R, Daniel H. Alteration in epithelial permeability and ion transport in a mouse model of total parenteral nutrition[J]. *Crit Care Med*,2003,31(4):1118.

[4] 孙亚彬,李国锋,刘思佳,等.应用Ussing chamber技术评价甘草与海藻的配伍对大鼠肠黏膜P-gp的影响[J]. 中国药理学杂志,2010,45(8):585.

[5] Araya H, Tomita M, Hayashi M. The novel formulation design of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) type O/W microemulsion III: the permeation mechanism of a poorly water soluble drug entrapped O/W microemulsion in rat isolated intestinal membrane by the Ussing chamber method[J]. *Drug Metab Pharmacokin*,2006,21(1):45.

[6] van de Kerkhof, Esther G, de Graaf, et al. In vitro methods to study intestinal drug metabolism [J]. *Curr Drug Metab*,2007,8(7):658.

[7] Tsai JC, Tsai S, Chang WC. Effect of ethanol extracts of three Chinese medicinal plants with anti-diarrheal properties on ion transport of the rat intestinal epithelia[J]. *J Pharmacol Sci*,2004,94(1):60.

[8] Seehofer D, Rayes N, Schiller R, et al. Probiotics partly reverse increased bacterial translocation after simultaneous liver resection and colonic anastomosis in rats[J]. *J Surg Res*,2004,117(2):262.

[9] Kozar RA, Schultz SG, Bick RJ, et al. Enteral glutamine but not alanine maintains small bowel barrier function after ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Shock*,2004,21(5):433.

[10] 杨翠平,曹俊岭,韩群英. HPLC法对参蛇偏瘫胶囊中阿魏酸的药代动力学研究[J]. 中医研究,2006,19(9):22.

[11] 桂卉,颜红,邹龙,等. LC-MS/MS法研究超微归脾丸与普通归脾丸中阿魏酸在兔体内的药动学[J]. 中国药房,2010,21(23):2119.

[12] 宋洪涛,郭涛,张跃新,等.阿魏酸在大鼠体内肠吸收动力学的研究[J]. 中草药,2005,36(10):1514.

[13] 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.

[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(1):61.

[15] 刘晓峰,武新安,魏玉辉,等.阿魏酸和川芎汤剂中阿魏酸在大鼠体内的吸收动力学研究[J]. 中药材,2007,30(7):831.

(收稿日期:2012-10-27 修回日期:2013-02-16)