

# 白及醇提物中5种主要活性成分的在体肠吸收特征研究<sup>Δ</sup>

孙慧园<sup>1,2\*</sup>, 陈浩<sup>2</sup>, 梅朝叶<sup>2</sup>, 郑林<sup>1</sup>, 巩仔鹏<sup>1</sup>, 李月婷<sup>1</sup>, 李勇军<sup>3</sup>, 黄勇<sup>1#</sup> (1. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室/药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0757-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.08

**摘要** 目的: 考察白及醇提物中主要活性成分4-(葡萄糖氧基)-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯(A1)、2-异丁基苹果酸(A2)、1,4-二[4-(葡萄糖氧基)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(A3)、二氢菲1(A4)、1,4-二[4-(葡萄糖氧基)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-(4-O-肉桂酰基-6-O-乙酰基)葡萄糖苷(A5)在大鼠肠道中的吸收动力学特征。方法: 以葛根素为内标, 采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)检测肠循环液中A1~A5的质量浓度。色谱柱为Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈(含0.1%甲酸)-水(含0.1%甲酸)(梯度洗脱), 流速为0.35 mL/min, 柱温为45 ℃, 进样量为3 μL; 采用电喷雾离子源, 以多反应监测模式进行正、负离子扫描, 用于定量分析的离子对分别为m/z 593.2→431.1(A1)、m/z 189.0→129.0(A2)、m/z 725.3→457.2(A3)、m/z 347.1→332.1(A4)、m/z 1 059.3→793.1(A5)、m/z 417.0→267.0(内标)。采用大鼠在体肠循环灌流模型, 以累计吸收转化率(A)和吸收速率常数(K<sub>a</sub>)为指标, 考察不同剂量白及醇提物(低、中、高剂量分别为166、333、667 μg/mL)、胆汁、P-糖蛋白(P-gp)抑制剂(维拉帕米)、不同肠段对上述5种成分肠吸收的影响。结果: A1、A2、A3、A4、A5检测质量浓度的线性范围分别为0.22~14.00、0.34~21.75、1.99~127.16、0.15~9.75、0.16~10.00 μg/mL (r>0.99), 定量下限分别为0.22、0.34、1.99、0.15、0.16 μg/mL, 最低检测限分别为0.028、0.085、0.251、0.035、0.010 μg/mL, 日内、日间RSD均小于10%, 方法回收率为83.60%~106.91%, 基质效应不影响待测物的测定。白及醇提物低、中剂量组A1的A、K<sub>a</sub>值均显著高于高剂量组, 低剂量组A3的A值显著高于中、高剂量组(P<0.05或P<0.01)。不结扎组A1、A3的A、K<sub>a</sub>值均显著低于对照组, 而A4的A、K<sub>a</sub>值均显著高于对照组(P<0.05或P<0.01); P-gp抑制剂组A1、A3的A、K<sub>a</sub>值均显著低于对照组(P<0.05或P<0.01)。空肠组、回肠组、结肠组A1的A值以及结肠组A1的K<sub>a</sub>值, 结肠组A2的A、K<sub>a</sub>值, 回肠组A3的A值, 回肠组、结肠组A4的A、K<sub>a</sub>值, 空肠组、回肠组A5的A值以及空肠组A5的K<sub>a</sub>值均显著低于十二指肠组; 而空肠组、回肠组、结肠组A3的K<sub>a</sub>值均显著高于十二指肠组(P<0.05或P<0.01)。结论: 本研究建立的UPLC-MS/MS法专属性强、灵敏度高、操作简便, 可用于A1~A5的定量分析及药动学研究。白及醇提物中5种活性成分均为全肠道吸收, 且吸收肠段各有不同; A1、A3在肠道中的吸收较多, 可能已达饱和; 胆汁可抑制A1、A2的肠吸收, 但可促进A4的肠吸收; A1~A5可能均不是P-gp的底物。

**关键词** 白及醇提物; 活性化合物; 在体肠循环灌流模型; 超高效液相色谱-串联质谱法; 肠吸收特征

## Study on Intestinal Absorption Characteristics of 5 Active Components in Ethanol Extract from *Bletilla striata*

SUN Huiyuan<sup>1,2</sup>, CHEN Hao<sup>2</sup>, MEI Chaoye<sup>2</sup>, ZHENG Lin<sup>1</sup>, GONG Zipeng<sup>1</sup>, LI Yueting<sup>1</sup>, LI Yongjun<sup>3</sup>, HUANG Yong<sup>1</sup> [1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics/State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China]

tral nervous system ischemia[J]. *Stroke*, 2000, 31 (7) :

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81460630、U1812403); 贵州省科技计划项目(No.黔科合平台人才[2017]5601、[2016]5677)、[2016]5613; 贵州省普通高等学校科技拔尖人才支持计划(No.黔教发KY字[2018]050); 贵阳市科技计划项目(No.筑科合同[2017]30-29号)

\* 硕士研究生。研究方向: 药动学。电话: 0851-86908468。E-mail: 644265205@qq.com

# 通信作者: 教授, 博士。研究方向: 中药活性成分及新药开发。电话: 0851-86908468。E-mail: mailofhy@126.com

1715-1720.

[19] 李霖, 李霞, 房绍宽, 等. 白介素8在局灶性脑缺血大鼠脑组织及血清中的表达及地塞米松对其的影响[J]. 临床神经病学杂志, 2009, 22(4): 275-277.

[20] CLARKE CJ, HALES A, HUNT A, et al. IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity[J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(5): 1719-1726.

(收稿日期: 2018-09-03 修回日期: 2019-01-10)

(编辑: 张元媛)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate absorption kinetic characteristics of main active components as 4-(glucoseoxy)-glucoseoxybenzyl cinnamate (A1), 2-isobutyl malic acid (A2), 1,4-bis [4-(glucoseoxy) benzyl]-2-isobutyl malic acid ester (A3), dihydrophenanthrenes 1 (A4) and 1,4-bis [4-(glucoseoxy) benzyl]-2-isobutyl malic acid ester-2-(4-*O*-cinnamoyl-6-*O*-acetyl) glucoside (A5) from ethanol extract of *Bletilla striata* in the intestines of rats. METHODS: Using puerarin as internal standard, UPLC-MS/MS was used to determined the concentration of A1-A5 in intestinal circulation fluid. The determination was performed on Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile (containing 0.1% formic acid)-water (containing 0.1% formic acid) (gradient elution) at the flow rate of 0.35 mL/min. The column temperature was 45 °C, and sample size was 3 μL. The positive ion and negative ion scanning were carried out in the multiple reaction monitoring mode by electrospray ion source. The ion pairs for quantitative analysis were *m/z* 593.2→431.1 (A1), *m/z* 189.0→129.0 (A2), *m/z* 725.3→457.2 (A3), *m/z* 347.1→332.1 (A4), *m/z* 1 059.3→793.1 (A5), *m/z* 417.0→267.0 (internal standard). In the *in vivo* intestinal circulation perfusion model, using accumulative absorption transfer rate (*A*) and absorption and transformation rate constant (*K<sub>a</sub>*) as indexes, the effects of different doses of ethanol extract from *B. striata* (low-, medium-, high-dose were 166, 333, 667 μg/mL, respectively), bile, P-glycoprotein (P-gp) inhibitors (verapamil) and different intestinal segments on the absorption of above 5 components were investigated. RESULTS: The linear range of A1, A2, A3, A4 and A5 were 0.22-14.00, 0.34-21.75, 1.99-127.16, 0.15-9.75, 0.16-10.00 μg/mL (*r*>0.99). The limits of quantitation were 0.22, 0.34, 1.99, 0.15, 0.16 μg/mL, respectively. The lowest detection limits were 0.028, 0.085, 0.251, 0.035 and 0.010 μg/mL. RSDs of inter-day and intra-day were all lower than 10%. The recoveries ranged 83.60%-106.91%. Matrix effect did not affect the determination of the substance to be measured. *A* and *K<sub>a</sub>* values of A1 in *B. striata* ethanol extract low-dose and medium-dose groups were significantly higher than high-dose group; *A* value of A3 in low-dose group was significantly higher than medium-dose and high-dose groups (*P*<0.05 or *P*<0.01). *A* and *K<sub>a</sub>* values of A1 and A3 in non-ligation group were significantly lower than control group, while *A* and *K<sub>a</sub>* values of A4 were significantly higher than control group (*P*<0.05 or *P*<0.01). *A* and *K<sub>a</sub>* values of A1 and A3 in P-gp inhibitor group were significantly lower than control group (*P*<0.05 or *P*<0.01). *A* values of A1 in jejunum group, ileum group and colon group, *K<sub>a</sub>* value of A1 in colon group, *A* and *K<sub>a</sub>* values of A2 in colon group, *A* value of A3 in ileum group, *A* and *K<sub>a</sub>* values of A4 in ileum group and colon group, *A* values of A5 in jejunum group and ileum group as well as *K<sub>a</sub>* value of A5 in jejunum group were all significantly lower than duodenum group. *K<sub>a</sub>* values of A3 in jejunum group, ileum group and colon group were significantly higher than duodenum group (*P*<0.05 or *P*<0.01). CONCLUSIONS: Established UPLC-MS/MS method is specific, sensitive and simple, and it can be used for quantitative analysis and pharmacokinetic study of A1-A5. The 5 active components in *B. striata* ethanol extract are absorbed by the whole intestine, and the intestinal segments are different. A1 and A3 are absorbed more in intestinal tract and may be saturated. Bile can inhibit intestinal absorption of A1 and A2, but promoted intestinal absorption of A4. A1-A5 may not be the substrate of P-gp.

**KEYWORDS** *Bletilla striata* ethanol extract; Active compound; *in vivo* intestinal circulation perfusion model; UPLC-MS/MS; Intestinal absorption characteristics

白及为兰科植物白及 [*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.] 的干燥块茎,是《中国药典》(一部)收录的常用药材,其味苦、甘、涩,性微寒,归肺、肝、胃经,具有收敛止血、消肿生肌等作用,常用于咯血、外伤出血等病症的治疗<sup>[1-2]</sup>。白及的化学成分主要包括联苜类、二氢菲类、联苜葡萄糖苷类、联菲类、菲类等非多糖类物质<sup>[3-4]</sup>。现代药理研究表明,白及药用功能广泛、药用价值高,具有止血、抗菌、抗肿瘤及促进血管内皮细胞生长等多种药理活性<sup>[3,5]</sup>,且有研究指出白及已逐渐成为我国现代医药工业的重要原材料<sup>[6]</sup>。但目前有关白及的文献仍集中在化学成分的分离、鉴定以及对各种粗提物疗效物质的初步探索阶段<sup>[7-11]</sup>,尚未见白及体内吸收及其影响因素分析的相关报道。本课题组前期对白及进行了大量研究,确定了其醇提物中含量较高且具凝血活性的5种成分{4-(葡萄糖氧基)-肉桂酸葡萄糖氧基苜酯(A1)、2-异

丁基苹果酸(A2)、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苜基]-2-异丁基苹果酸酯(A3)、二氢菲1(A4)、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苜基]-2-异丁基苹果酸酯-2-(4-*O*-肉桂酰基-6-*O*-乙酰基)葡萄糖苷(A5)}。在此基础上,本研究采用大鼠在体肠循环灌注模型,在保证其内分泌输入以及肠道神经完整的前提下,借助超高效液相色谱-串联质谱技术(UPLC-MS/MS),从在体角度分析白及醇提物中上述5种主要活性成分的肠吸收行为,并考察不同因素[醇提物剂量、胆汁、P-糖蛋白(P-gp)抑制剂和不同肠段<sup>[12-13]</sup>]对其肠吸收的影响,初步探讨白及醇提物在大鼠肠道中的吸收动力学特征,以期后续白及醇提物口服给药研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Acquity UPLC型超高压液相-三重四级杆质谱联用

仪,配备 Acquity™ UPLC-TQD 系统(自动进样器、二元梯高压梯度泵、柱温箱、真空脱气机等)、Masslynx 4.1 质谱工作站(美国 Waters 公司);HL-2S 型蠕动泵(上海青浦沪西仪器厂);ZH-2 型涡旋混合器(天津药典标准仪器厂);DK-98-II A 型恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司);Allegra 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman Coulter 公司);CQ 250A-TS 型超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂);EL204 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];MTN-2800D 型氮吹仪(天津奥特塞恩斯仪器有限公司)。

## 1.2 药材与试剂

白及药材(批号:20160510)采摘自贵州省正安县,由贵州医科大学药学院生药学与药用植物学教研室龙庆德副教授鉴定为兰科植物白及 [*B. striata* (Thunb.) Reichb. f.] 的干燥块茎。

A1、A2、A3、A4、A5 对照品均为本实验室自制(纯度:≥95%);盐酸维拉帕米对照品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:29940,纯度:99%);葛根素对照品(内标,中国食品药品检定研究院,批号:110752-201512,纯度:≥98%);D101 大孔吸附树脂(30~60 目,上海源叶生物科技有限公司,批号:H13J8L39806);乌来糖(上海伊卡生物技术有限公司,批号:20130609,纯度:≥99%);葡萄糖(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20100110,纯度:杂质含量≤0.005%);甲酸、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 1.3 动物

SPF 级健康 SD 大鼠,雌雄各半,2~3 月龄,体质量(250±20)g,由陆军军医大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(渝)2017-0002]。

## 2 方法与结果

### 2.1 白及醇提物的制备

参照文献[14]方法,称取白及药材 10 kg,用 4 倍量(kg/L)95%乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,滤过,合并滤液,浓缩至浸膏,浸膏用水溶解,经 D101 大孔吸附树脂柱色谱,分别以水、80%乙醇洗脱,收集 80%乙醇洗脱液,减压浓缩并真空干燥,得白及醇提物 680 g,提取率为 6.8%(每 1 g 醇提物相当于 14.7 g 白及药材)。经 UPLC-MS/MS 法测定,醇提物中 A1、A2、A3、A4、A5 的含量分别为 2.64%、2.36%、26.37%、0.86%、2.09%。

### 2.2 溶液的配制

2.2.1 Krebs-Ringer's (K-R) 营养液<sup>[21]</sup> 精密称取葡萄糖 1.4 g、氯化钙 0.37 g、氯化镁 0.02 g、氯化钠 7.8 g、氯化钾 0.35 g、碳酸氢钠 1.37 g、磷酸二氢钠 0.32 g,用水溶解并定容至 1 L,即得。

2.2.2 标准溶液 精密称取 A1、A2、A3、A4、A5 对照品各适量,分别用甲醇溶解,摇匀,得质量浓度分别为 1.4、2.9、1.5、1.3、2.0 mg/mL 的单一成分贮备液;取上述贮备液各适量,混合,于 37 °C 下以氮气流吹干,用“2.2.1”项下 K-R 营养液溶解并逐级稀释至所需质量浓度,即得系列混合标准溶液,置-20 °C 冰箱中保存,备用。

2.2.3 内标溶液 精密称取内标对照品 10.12 mg,用甲醇溶解并定容至 25 mL,得质量浓度为 0.405 mg/mL 的内标贮备液;取上述内标贮备液适量,用甲醇稀释,得质量浓度为 20 μg/mL 的内标溶液,置-20 °C 冰箱中保存,备用。

2.2.4 空白肠循环液 取 37 °C K-R 营养液 60 mL,置于量筒中,进行在体肠灌注实验,循环 3 h,即得。

2.2.5 白及醇提取物供试液 精密称定“2.1”项下白及醇提取物 0.25、0.5、1 g,分别用无水乙醇 15 mL 溶解,取上述溶液各 1 mL 逐滴加入到 10% 聚山梨酯 80 溶液 5 mL 中,混匀,用 K-R 营养液稀释并定容至 100 mL,超声(功率:240 W,频率:40 kHz)10 min,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,得质量浓度分别为 167、333、667 μg/mL (按醇提物质量计,下同)的白及醇提取物供试液。

## 2.3 色谱与质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:乙腈(含 0.1 甲酸, A)-水(含 0.1% 甲酸, B),梯度洗脱(0~1.0 min, 10% A→30% A;1.1~2.0 min, 30% A→35% A;2.1~3.0 min, 35% A→38% A;3.1~4.0 min, 38% A→90% A;4.1~5.0 min, 90% A→10% A);流速:0.35 mL/min;柱温:45 °C;进样量:3 μL。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),多反应监测(MRM)模式进行正、负离子同时扫描。离子源温度:120 °C;毛细管电压:3 kV;去溶剂气温度:350 °C;去溶剂气(氮气)流速:650 L/h;碰撞气(氩气)流速:0.18 mL/min;用于定量分析的离子对分别为  $m/z$  593.2→431.1 (A1)、 $m/z$  189.0→129.0 (A2)、 $m/z$  725.3→457.2 (A3)、 $m/z$  347.1→332.1 (A4)、 $m/z$  1 059.3→793.1 (A5)、 $m/z$  417.0→267.0(内标);碰撞能量分别为 15、15、20、25、25、30 eV;锥孔电压分别为 35、30、40、50、45、40 V。

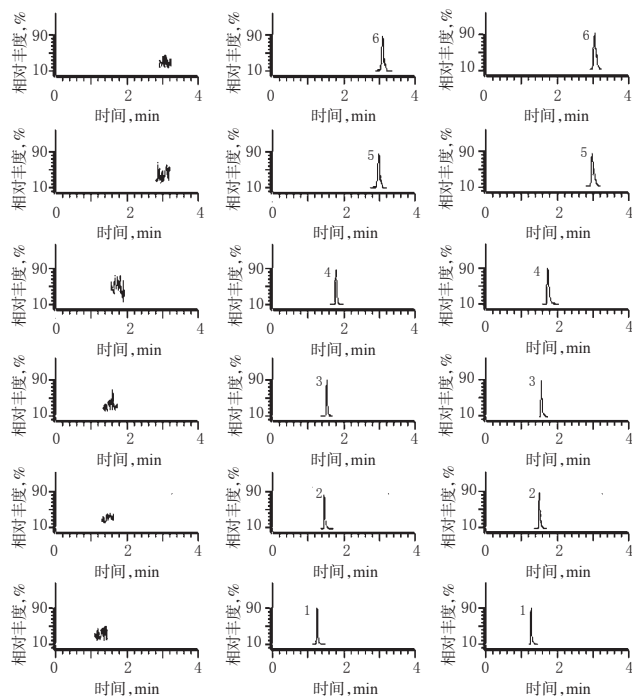
## 2.4 样品处理方法

取待测样品 100 μL,置于 1.5 mL 离心管中,加入 1% 甲酸溶液 100 μL,混匀后,用正丁醇萃取 3 次,每次 200 μL,合并正丁醇萃取液,于 37 °C 下以氮气流吹干,残渣加入 20 μg/mL 内标溶液 40 μL 后,用 50% 甲醇 260 μL 溶解并稀释,涡旋振荡 1 min,15 000 r/min 离心 5 min,取上清液,进行 UPLC-MS/MS 分析。

## 2.5 方法学考察

2.5.1 专属性 取空白肠循环液、空白肠循环液+待测

物以及大鼠灌流白及醇提取物供试液(质量浓度为333 μg/mL)后60 min时的回肠灌流液样品各适量,按“2.4”项下方法处理(空白肠循环液不加内标)后,再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,记录色谱图,详见图1。由图1可见,内标及A1等6种待测物的保留时间(RT)分别为1.30、1.49、1.56、1.81、2.98、3.11 min,各待测成分的分度度良好,且空白肠循环液中的内源性物质对各成分无干扰,表明本方法的专属性强。



A. 空白肠循环液 B. 空白肠灌流液加对照品 C. 回肠灌流液  
注:1. 内标;2. A1;3. A2;4. A3;5. A4;6. A5  
Note: 1. internal standard; 2. A1; 3. A2; 4. A3; 5. A4; 6. A5

图1 典型MRM图

Fig 1 Typical MRM chromatograms

2.5.2 标准曲线的绘制与定量下限(LLOQ)、最低检测限(LLoD)的考察 取“2.2.2”项下系列混合标准溶液(A1质量浓度分别为0.22、0.88、1.75、3.50、7.00、14.00 μg/mL, A2质量浓度分别为0.34、1.36、2.72、5.44、10.88、21.75 μg/mL, A3质量浓度分别为1.99、7.95、15.89、31.79、63.58、127.16 μg/mL, A4质量浓度分别为0.15、0.61、1.22、2.44、4.88、9.75 μg/mL, A5质量浓度分别为0.16、0.63、1.25、2.50、5.00、10.00 μg/mL)各适量,按“2.4”项下方法处理后,再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,记录峰面积。以待测物与内标峰面积的比值(y)为纵坐标、各待测物质量浓度(x, μg/mL)为横坐标进行线性回归,并考察LLOQ(信噪比为10:1)和LLOD(信噪比为3:1),结果见表1。由表1可见,5种待测物的质量浓度在其线性范围内与峰面积的线性关系良好(*r*均大于0.99),LLOQ分别为0.22、0.34、1.99、0.15、0.16 μg/mL, LLOD分别为0.028、0.085、0.251、0.035、0.010 μg/mL。

表1 各待测物的回归方程、LLOQ和LLOD

Tab 1 The regression equation, LLOQ and LLOD of each analyte

| 待测物 | 回归方程               | <i>r</i> | 线性范围, μg/mL | LLOQ, μg/mL | LLOD, μg/mL |
|-----|--------------------|----------|-------------|-------------|-------------|
| A1  | $y=0.1387x+0.0148$ | 0.9996   | 0.22~14.00  | 0.22        | 0.028       |
| A2  | $y=0.4933x-0.0229$ | 0.9991   | 0.34~21.75  | 0.34        | 0.085       |
| A3  | $y=0.1651x+2.4225$ | 0.9968   | 1.99~127.16 | 1.99        | 0.251       |
| A4  | $y=0.1254x-0.0604$ | 0.9946   | 0.15~9.75   | 0.15        | 0.035       |
| A5  | $y=0.0773x-0.0153$ | 0.9999   | 0.16~10.00  | 0.16        | 0.010       |

2.5.3 精密性与准确度试验 按“2.5.2”项下方法配制各待测物低、中、高质量浓度(A1:0.44、1.75、7.00 μg/mL; A2:0.68、2.72、10.88 μg/mL; A3:3.98、15.89、63.58 μg/mL; A4:0.30、1.22、4.88 μg/mL; A5:0.32、1.25、5.00 μg/mL, 下同)的混合质控(QC)样品,每质量浓度平行配制5份,按“2.4”项下方法处理后,再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,考察日内精密性;连续测定5 d,考察日间精密性。将实测质量浓度与理论质量浓度进行比较,以方法回收率考察准确度,结果见表2。由表2可见,各QC样品的日内、日间RSD均小于10%,方法回收率为83.60%~106.91%(RSD<7%,*n*=5),符合生物样品定量分析的相关要求<sup>[15]</sup>。

表2 精密性、准确度与基质效应试验结果

Tab 2 Results of accuracy, precision and matrix effect tests

| 待测物 | 理论质量浓度, μg/mL | 精密性试验          |                 | 准确度试验                             |        | 基质效应试验                           |        |
|-----|---------------|----------------|-----------------|-----------------------------------|--------|----------------------------------|--------|
|     |               | 日内RSD (n=5), % | 日间RSD (n=15), % | 方法回收率 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ ), % | RSD, % | 基质效应 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ ), % | RSD, % |
| A1  | 0.44          | 4.19           | 9.20            | 94.15±5.26                        | 5.58   | 88.11±2.46                       | 3.12   |
|     | 1.75          | 3.40           | 1.46            | 96.41±0.94                        | 2.13   | 96.13±1.98                       | 3.06   |
|     | 7.00          | 5.94           | 3.28            | 91.37±6.08                        | 5.02   | 93.31±1.56                       | 2.85   |
| A2  | 0.68          | 1.48           | 5.52            | 91.05±7.45                        | 5.19   | 94.47±0.70                       | 1.11   |
|     | 2.72          | 2.82           | 2.27            | 97.85±0.54                        | 1.13   | 94.15±2.70                       | 2.39   |
|     | 10.88         | 0.88           | 1.33            | 99.78±3.78                        | 4.32   | 101.59±0.71                      | 1.27   |
| A3  | 3.98          | 0.22           | 1.21            | 90.40±5.65                        | 6.25   | 96.52±0.96                       | 1.59   |
|     | 15.89         | 1.24           | 1.80            | 103.31±1.21                       | 2.63   | 103.39±2.29                      | 3.04   |
|     | 63.58         | 3.26           | 1.29            | 105.03±1.88                       | 1.89   | 98.13±2.81                       | 3.47   |
| A4  | 0.30          | 7.54           | 6.98            | 95.64±8.64                        | 4.03   | 89.76±5.52                       | 6.24   |
|     | 1.22          | 6.95           | 9.67            | 100.25±1.61                       | 1.25   | 93.36±1.91                       | 2.77   |
|     | 4.88          | 1.74           | 1.86            | 98.91±1.37                        | 1.76   | 91.00±1.94                       | 2.85   |
| A5  | 0.32          | 8.37           | 8.33            | 95.44±6.68                        | 6.99   | 86.86±5.08                       | 5.96   |
|     | 1.25          | 3.30           | 1.95            | 94.34±0.23                        | 0.57   | 95.23±0.69                       | 0.76   |
|     | 5.00          | 3.57           | 2.70            | 95.59±5.50                        | 5.76   | 86.60±0.95                       | 1.53   |

2.5.4 基质效应 取“2.2.4”项下空白肠循环液100 μL,按“2.4”项下方法处理后,加入按“2.2.2”项下方法配制的混合对照品溶液适量,配制成相应低、中、高质量浓度的样品,按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,记录峰面积( $B_1$ );另取对应质量浓度的混合对照品溶液适量,于37℃下以氮气流吹干,残渣以50%甲醇溶解,按“2.4”项下方法处理后,再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,记录峰面积( $B_2$ )。基质效应= $B_1/B_2 \times 100\%$ ,结果见表2。由表2可见,各待测物的基质效应为81.78%~

105.68% (RSD<7%, n=6), 内标的基质效应为84.62%~106.50% (RSD<8%, n=5), 表明基质效应不影响待测物的测定<sup>[15]</sup>。

2.5.5 稳定性 按“2.5.2”项下方法配制各待测物低、中、高质量浓度混合QC样品, 按“2.4”项下方法处理, 分别于处理后的0、2、4、6、8、12 h(室温)取样, 按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析, 记录峰面积。结果, 各待测物峰面积的RSD均小于10% (n=6), 提示各样品在12 h内稳定性良好。

## 2.6 醇提物中活性成分的在体肠吸收特征研究

2.6.1 大鼠在体循环灌流实验 采用在体肠循环灌流法, 具体步骤参照文献[16]。所有均大鼠禁食、不禁水12 h, 腹腔注射30% 乌来糖(1.4 g/kg)进行麻醉后, 固定于37 °C恒温手术台上, 剃去其腹部的毛发, 沿腹部中线打开腹腔(切口约3~4 cm), 结扎总胆管; 在十二指肠前端剪一个小口并插入硅胶管, 扎紧; 然后通过盲肠找到回肠底端, 在回肠底端同样剪一个小口并插入硅胶管, 扎紧; 使两者与蠕动泵形成一个回路。在灌流前, 用37 °C生理盐水以1.0 mL/min的流速冲洗肠道, 排空水分。随后取“2.2.5”项下37 °C、不同质量浓度的白及醇提物供试液各60 mL, 以5.0 mL/min的流速循环平衡15 min后, 将蠕动泵的流速调至2.5 mL/min, 立刻读出循环液的体积。在装有循环液的量筒中取样1 mL(作为白及醇提物灌流0 h时的样品), 随后补充K-R营养液1 mL; 于不同时间点(0.5、1、1.5、2、2.5、3 h)取样, 并同法补充K-R营养液。将上述各时间点的样品按“2.4”项下方法处理后, 再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析, 计算样品中各待测物的质量浓度。蠕动泵循环3 h后中止, 待循环结束之后, 用空气排净肠道内和管路内的液体, 并量取其体积, 即得肠道和管路的死体积。死体积加上各时间点的量筒读数即为该时间点循环液体积, 以此方法进行肠循环的体积校正, 进而计算出各时间点的药量, 即剩余药量( $P_m$ , 见公式①); 以剩余药量计算出3 h时的累计吸收转化率( $A$ , 见公式②)。采用GraphPad Prism 5.01软件以剩余药量的自然对数和取样时间作图, 求出吸收转化速率常数( $K_a$ , 即上述曲线的斜率)。采用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。P<0.05为差异有统计学意义。

$$P_m = c_m \times V_m + 1.0 \times \sum_{i=1}^{n-1} c_i \dots\dots\dots \textcircled{1}$$

式中,  $t_n$ 为循环液灌注时间,  $c_n (i=1)$ 为循环液中药物(即待测物)的初始质量浓度,  $c_m (i=n)$ 为 $t_n$ 时刻循环液中药物的质量浓度,  $V_m$ 为 $t_n$ 时刻循环液体积,  $P_m$ 为 $t_n$ 时

刻循环液中的剩余药量。

$$A = \frac{P_0 - P_{t_3}}{P_0} \times 100\% \dots\dots\dots \textcircled{2}$$

式中,  $P_0$ 为0 h时的剩余药量,  $P_{t_3}$ 为3 h时的剩余药量。

## 2.6.2 白及醇提物在37 °C K-R营养液中的稳定性考察

按“2.2.5”项下方法配制质量浓度为333 μg/mL白及醇提物供试液60 mL, 置于37 °C恒温水浴中, 分别于0、3 h取样, 按“2.4”项下方法处理后, 再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析, 分别记录0、3 h时各待测物的峰面积(分别为 $C_1$ 、 $C_2$ )。以 $C_1$ 与 $C_2$ 的比值来考察白及醇提物在K-R营养液中的稳定性。上述试验重复操作4次。结果, 两者比值为94.90%~109.34%, 表明A1等5种待测物在37 °C K-R营养液中放置3 h内稳定性良好, 详见表3。

表3 白及醇提物在37 °C K-R营养液中的稳定性、蠕动泵管路中的物理吸附作用及空白肠循环液中的稳定性考察结果( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Tab 3 Results of stability of *B. striata* ethanol extract in 37 °C K-R nutrient solution, physical adsorption of it in circuit pipe and stability of it in blank intestinal perfusate ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

| 待测物 | 37 °C K-R营养液中稳定性, % | 在蠕动泵管路中的物理吸附作用, % | 空白肠循环液中稳定性, % |
|-----|---------------------|-------------------|---------------|
| A1  | 98.76 ± 1.67        | 98.45 ± 1.27      | 102.23 ± 2.54 |
| A2  | 101.05 ± 3.94       | 100.24 ± 3.06     | 101.36 ± 2.42 |
| A3  | 96.37 ± 1.36        | 100.99 ± 2.38     | 99.43 ± 0.68  |
| A4  | 102.12 ± 7.22       | 101.57 ± 7.33     | 99.77 ± 0.55  |
| A5  | 100.55 ± 1.95       | 99.43 ± 9.35      | 98.79 ± 2.64  |

## 2.6.3 白及醇提物在蠕动泵管路中的物理吸附作用考察

按“2.2.5”项下方法配制质量浓度为333 μg/mL白及醇提物供试液60 mL, 置于37 °C恒温水浴中, 按“2.6.1”项下方法操作, 于体外空循环(即不连接大鼠肠道)3 h, 分别于0、3 h取样, 按“2.4”项下方法处理后, 再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析, 分别记录0、3 h时各待测物的峰面积(分别为 $C_3$ 、 $C_4$ )。以 $C_3$ 与 $C_4$ 的比值来考察白及醇提物在管路中的吸附情况。上述试验重复操作4次。结果, 两者比值为90.08%~108.90%, 表明A1等5种待测物在蠕动泵管路中无明显的物理吸附作用, 详见表3。

## 2.6.4 白及醇提物在空白肠循环液中的稳定性考察

以空白肠循环液为基质, 配制白及醇提物溶液(质量浓度为333 μg/mL)适量, 置于37 °C恒温水浴中, 分别于0、3 h取样, 按“2.4”项下方法处理后, 再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析, 分别记录0、3 h时各待测物的峰面积(分别为 $C_5$ 、 $C_6$ )。以 $C_5$ 、 $C_6$ 的比值来考察白及醇提物在空白肠循环液中的稳定性。上述试验重复操作4

次。结果,两者比值为96.15%~104.77%,表明A1等5种待测物在空白肠循环液中放置3 h内的稳定性良好,肠道中的酶对各待测物的稳定性影响较小或无影响,详见表3。

2.6.5 白及醇提取物剂量对活性成分肠吸收的影响 取禁食不禁水的SD大鼠12只,随机分为3组,即白及醇提取物低、中、高剂量组,每组4只。按“2.2.5”项下方法配制

表4 白及醇提取物剂量对各活性成分肠吸收的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Tab 4 Effects of dosage of *B. striata* ethanol extract on intestinal absorption of its active components( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

| 组别         | A1         |                        | A2       |                        | A3          |                        | A4       |                        | A5       |                        |
|------------|------------|------------------------|----------|------------------------|-------------|------------------------|----------|------------------------|----------|------------------------|
|            | A, %       | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %     | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %        | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %     | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %     | $K_a, \text{min}^{-1}$ |
| 白及醇提取物低剂量组 | 74.2±6.3** | 0.361±0.053*           | 90.2±3.6 | 0.764±0.102            | 42.3±7.7*** | 0.123±0.036            | 47.8±7.9 | 0.181±0.035            | 78.8±9.4 | 0.486±0.187            |
| 白及醇提取物中剂量组 | 63.7±3.9** | 0.332±0.035*           | 92.3±1.8 | 0.900±0.062            | 29.2±2.4    | 0.116±0.033            | 47.3±4.2 | 0.203±0.036            | 87.9±6.2 | 0.773±0.243            |
| 白及醇提取物高剂量组 | 32.1±5.9   | 0.146±0.050            | 88.2±8.9 | 0.798±0.217            | 30.7±3.7    | 0.109±0.020            | 45.7±6.6 | 0.202±0.018            | 86.4±9.9 | 0.744±0.264            |

注:与白及醇提取物高剂量组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与白及醇提取物中剂量组比较,\* $P<0.05$

Note: vs. *B. striata* ethanol extract high-dose group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; vs. *B. striata* ethanol extract medium-dose group, \* $P<0.05$

由表4可见,白及醇提取物低、中剂量组活性成分A1的 $A$ 、 $K_a$ 值显著高于高剂量组,白及醇提取物低剂量组A3的 $A$ 值显著高于中、高剂量组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。

2.6.6 胆汁和P-gp抑制剂对活性成分肠吸收的影响

取禁食不禁水的SD大鼠12只,随机分为3组,即对照组(结扎总胆管,不加P-gp抑制剂)、不结扎组(不结扎总胆管,不加P-gp抑制剂);P-gp抑制剂组(结扎总胆管,加

表5 胆汁及P-gp抑制剂对各活性成分肠吸收的影响( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

Tab 5 Effects of bile and P-gp inhibitors on the intestinal absorption of its active components( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

| 组别       | A1         |                        | A2       |                        | A3         |                        | A4         |                        | A5       |                        |
|----------|------------|------------------------|----------|------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|----------|------------------------|
|          | A, %       | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %     | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %       | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %       | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %     | $K_a, \text{min}^{-1}$ |
| 对照组      | 63.7±3.9   | 0.330±0.035            | 92.3±1.8 | 0.900±0.062            | 29.2±2.4   | 0.116±0.033            | 47.3±4.2   | 0.230±0.036            | 87.9±6.2 | 0.773±0.243            |
| 不结扎组     | 51.9±7.8*  | 0.220±0.031**          | 88.1±6.9 | 0.774±0.214            | 16.7±3.4** | 0.052±0.028*           | 67.9±6.4** | 0.364±0.065**          | 90.1±3.7 | 0.761±0.144            |
| P-gp抑制剂组 | 28.8±6.6** | 0.089±0.023**          | 95.7±1.3 | 1.084±0.151            | 16.5±3.8** | 0.057±0.006*           | 40.7±4.9   | 0.185±0.051            | 84.5±5.7 | 0.712±0.139            |

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$

Note: vs. control group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

及A3的 $A$ 、 $K_a$ 值均显著降低,A4的 $A$ 、 $K_a$ 值均显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与对照组比较,P-gp抑制剂组活性成分A1及A3的 $A$ 、 $K_a$ 值均显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。活性成分A2、A5的 $A$ 、 $K_a$ 值组间比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

2.6.7 白及醇提取物在不同肠段的吸收特征 取禁食不禁水的SD大鼠16只,随机分为4组,即十二指肠组、空肠组、回肠组、结肠组,每组4只。分别对大鼠十二指肠、空肠、回肠、结肠进行结扎后,以白及醇提取物溶液(质量浓度为333  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )60 mL作为肠循环液,其余按“2.6.1”项下方法操作,进行在体循环,并于0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 h时取样,按“2.4”项下方法处理后,再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,计算样品中各待测物的质量浓度,并计算 $A$ 和 $K_a$ 值,考察白及醇提取物活性成分在不同

质量浓度分别为167、333、667  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 白及醇提取物供试液,各取60 mL置于37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中,按“2.6.1”项下方法操作,进行体外循环,并于0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 h时取样,按“2.4”项下方法处理后,再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,计算样品中各待测物的质量浓度,并计算 $A$ 和 $K_a$ 值,考察白及醇提取物剂量对活性成分肠吸收的影响,结果见表4。

P-gp抑制剂盐酸维拉帕米108  $\mu\text{g}/\text{L}$ ),每组4只。以白及醇提取物溶液(质量浓度为333  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )60 mL作为肠循环液,其余按“2.6.1”项下方法操作,进行在体循环,并于0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 h时取样,按“2.4”项下方法处理后,再按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,计算样品中各待测物的质量浓度,并计算 $A$ 和 $K_a$ 值,考察胆汁和P-gp抑制剂对活性成分肠吸收的影响,结果见表5。

由表5可见,与对照组比较,不结扎组活性成分A1

肠段的吸收特征,结果见表6。

由表6可见,空肠组、回肠组、结肠组活性成分A1的 $A$ 值以及结肠组A1的 $K_a$ 值,结肠组A2的 $A$ 、 $K_a$ 值,回肠组A3的 $A$ 值,回肠组、结肠组A4的 $A$ 、 $K_a$ 值,空肠组、回肠组A5的 $A$ 值以及空肠组A5的 $K_a$ 值均显著低于十二指肠组;而空肠组、回肠组、结肠组A3的 $K_a$ 值均显著高于十二指肠组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。

### 3 讨论

中药化学成分复杂,口服是最常见的给药方式,肠道是口服药物的主要吸收场所。因此,研究药物在肠道中的吸收情况、考察药物肠吸收的影响因素可有助于药物剂型的开发,改善其在生物体内的吸收,提高其生物利用度。目前关于药物肠吸收研究的模型较多,如单向肠灌注法、外翻肠囊法、肠循环灌注法等。在体肠循环

表6 白及醇提物各活性成分在不同肠段的吸收特征( $\bar{x} \pm s, n=4$ )Tab 6 Absorption characteristics of active components from *B. striata* ethanol extract in different intestinal segments( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

| 组别    | A1         |                        | A2        |                        | A3       |                        | A4         |                        | A5         |                        |
|-------|------------|------------------------|-----------|------------------------|----------|------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|
|       | A, %       | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %      | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %     | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %       | $K_a, \text{min}^{-1}$ | A, %       | $K_a, \text{min}^{-1}$ |
| 十二指肠组 | 39.3±6.2   | 0.146±0.023            | 26.6±5.3  | 0.089±0.023            | 11.4±1.6 | 0.018±0.009            | 23.5±2.4   | 0.111±0.019            | 25.3±6.1   | 0.100±0.027            |
| 空肠组   | 25.6±3.1*  | 0.114±0.026            | 21.0±6.7  | 0.091±0.029            | 15.7±3.2 | 0.036±0.005*           | 23.3±4.2   | 0.106±0.039            | 11.7±2.3** | 0.046±0.011*           |
| 回肠组   | 28.1±8.3*  | 0.116±0.024            | 25.4±7.8  | 0.116±0.038            | 5.6±1.9* | 0.042±0.009*           | 14.6±2.9** | 0.072±0.015*           | 16.3±2.7*  | 0.062±0.018            |
| 结肠组   | 12.3±3.2** | 0.016±0.006**          | 13.1±1.5* | 0.023±0.003*           | 18.3±5.9 | 0.052±0.003**          | 6.3±2.4**  | 0.059±0.009*           | 18.7±3.3   | 0.073±0.024            |

注:与十二指肠组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

Note: vs. duodenum group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

灌流法不切断血管及神经,对动物的伤害较小,可保持胃肠道神经和内分泌输入的完整性以及胃肠道内容物中酶的活性,也保证了血液及淋巴液的稳定供应,实验条件接近动物体内的真实情况,能较为真实地反映药物在肠道中的吸收情况<sup>[17-18]</sup>。因此,本研究采用在体肠循环灌流模型初步探讨了白及醇提物主要活性成分(A1~A5)在肠道内的吸收行为与吸收动力学特征。

由于生物样品中存在大量的蛋白质等内源性物质,会对其定量分析造成一定程度的干扰,因此需要通过高效、灵敏的检测手段来保证样品检测结果的准确、可靠。本研究建立了同时测定白及醇提物中5个活性成分的UPLC-MS/MS法。方法学考察结果表明,该方法具有专属性强、灵敏度高、分析效率高、操作简便快速等特点,可用于大量样本的检测分析。

白及临床上的用量为每次6~15 g<sup>[1]</sup>,根据醇提物的提取率(6.8%)换算得成人(60 kg)单次使用醇提物的剂量为0.4~1.0 g,换算得大鼠等效剂量<sup>[19]</sup>为41.1~102.8 mg/kg(按醇提物质量计)。本研究选择所选大鼠体质量为(250±20)g,若每只大鼠灌流体积为60 mL,其用药剂量范围应为171.3~428.3 μg/mL。结合前期预试验结果,本研究最终选择333 μg/mL为中剂量,并将低剂量设为其1/2,高剂量设为其2倍;同时,以333 μg/mL白及醇提物供试液作对象,进行相关稳定性和物理吸附性考察,并探讨醇提物剂量、胆汁、P-gp抑制剂对活性成分吸收的影响以及活性成分的肠吸收特征。

在进行在体肠循环灌流实验中,笔者发现小肠在吸收药物的同时也吸收水分,导致循环液总体积减少,因此需要对循环体积进行校正,以减少药物浓度检测的误差。笔者通过查阅文献发现,目前主要的体积校正方法包括<sup>14</sup>C标记法、酚红标记法和重量法<sup>[20]</sup>。其中,由于<sup>14</sup>C的放射性,<sup>14</sup>C标记法可能存在一定的安全性问题;酚红会被肠道吸收,且容易对一些药物的吸收和转运产生干扰;重量法较前两种方法简单,但不能称量肠段内液体的重量,可能会造成一定的检测误差。鉴于此,本研究采用了更为简便的量筒法来校正循环体积,该法在灌流实验中应用广泛,具有操作简单、可行性高的优点<sup>[12-13,16,21]</sup>。

采用量筒法校正循环体积的关键是保证死体积维持不变。笔者经研究对比发现,当大鼠的体位始终高于量筒时,其死体积基本无变化;此外,在实验前将大鼠肠道内的内容物充分冲洗干净,避免肠道堵塞,也是保持死体积不变的方法之一。在上述条件下,本研究通过将各时间点量筒读数与死体积相加来校正肠循环液体积。

为明确白及醇提物的吸收转运机制和主要吸收部位,本研究首先考察了白及醇提物剂量对活性成分肠吸收的影响。结果显示,白及醇提物低、中剂量组活性成分A1的 $A$ 、 $K_a$ 值显著高于高剂量组,白及醇提物低剂量组A3的 $A$ 值显著高于中、高剂量组,差异均有统计学意义。这表明当给予大鼠中、高剂量的白及醇提物后,活性成分A1、A3的肠吸收明显降低,其吸收可能已达饱和状态,提示两者在生物体内的吸收机制不仅是单纯的被动吸收过程,可能还存在主动转运<sup>[23]</sup>。由于胆汁可能会影响药物的吸收<sup>[12,16,22]</sup>,故本研究考察了胆汁对白及醇提物活性成分吸收的影响。结果显示,不结扎组活性成分A1及A3的 $A$ 、 $K_a$ 值均较对照组显著降低,A4的 $A$ 、 $K_a$ 值均较对照组显著升高,差异均有统计学意义。这提示胆汁会影响白及醇提物的吸收,可抑制活性成分A1、A3的肠吸收,促进A4的肠吸收。P-gp介导的外排作用可影响诸多药物的吸收和生物利用度<sup>[23]</sup>,因此本研究考察了P-gp抑制剂对白及醇提物活性成分吸收的影响。结果显示,P-gp抑制剂组活性成分A1及A3的 $A$ 、 $K_a$ 值均较对照组显著降低,差异均有统计学意义;而其余成分A、 $K_a$ 值与对照组比较,差异均无统计学意义。P-gp是一种能量依耐性的药物外排泵,可与多种亲脂性或两性化合物结合,并促进其外排,降低其药物浓度。P-gp抑制剂可抑制P-gp的外排功能,从而促进药物的吸收<sup>[24-25]</sup>。而本研究结果显示,加入P-gp抑制剂维拉帕米后,白及醇提物活性成分A1、A3的吸收并未增强,而其他成分的吸收亦无明显改变,提示各活性成分可能均不是P-gp的底物,其吸收可能存在其他非特异性现象,有待后续研究予以验证。白及醇提物在不同肠段的吸收研究特征表明,A1、A5的主要吸收部位为十二指肠,A2的主要吸收部位为十二指肠、回肠,A3的主要吸收部位为空肠、结

肠,A4的主要吸收部位为十二指肠、空肠。这提示白及醇提取物中5种活性成分在十二指肠、空肠、回肠及结肠中均有吸收,为全肠道吸收,且吸收趋势均为小肠大于结肠(A1~A5在十二指肠、空肠、回肠的A值之和高于结肠)。

综上所述,白及醇提取物中5种成分为全肠道吸收,吸收趋势均为小肠大于结肠;A1、A3在肠道中的吸收可能已达饱和状态,为主动运转;胆汁可影响各成分的吸收(抑制A1、A3的肠吸收,促进A4的肠吸收);5种成分均不是P-gp的底物。本研究初步阐明了白及醇提取物中5种活性成分在肠道的吸收特征,可为白及的临床应用及其新剂型的研发提供一定的实验参考。但本研究也具有一定的局限性:(1)在体肠循环灌流模型虽然操作较简单,但其灌流时间较长,可能对肠黏膜造成损伤,从而导致肠吸收值与实际偏离;(2)在探讨白及醇提取物在各肠段吸收特征的过程中,分别结扎各肠段形成灌流通路,以等浓度的药物灌流液进行灌流实验。但在实际情况中,药物经口服后,依次经过十二指肠、空肠、回肠和结肠,经过各肠段的药物浓度可能是不相等的,因此可能会使研究结果发生偏倚。因此,本课题组后续将会运用其他研究方法和模型(如离体外翻肠囊法、Caco-2细胞等)对本研究结论进行验证,进一步探讨白及醇提取物在肠道中的吸收特征。

## 参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:103.

[2] 杨铠银.白及药理作用研究进展[J].科技展望,2016,26(24):312.

[3] HE X, WANG X, FANG J, et al. Bletilla striata: medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017. DOI:10.1016/j.jep.2016.11.026.

[4] 孙爱静,庞素秋,王国权.白及化学成分与抗肿瘤活性研究[J].中国药学杂志,2016,51(2):101-104.

[5] 仰莲,彭成,李小红,等.白及的化学成分及生物活性研究进展[J].中药与临床,2014,5(6):59-64.

[6] 李伟平,何良艳,丁志山,等.白及的应用及资源现状[J].中华中医药刊,2012,30(1):158-160.

[7] 戴鸥,仰莲,周勤梅,等.白及化学成分分离鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(14):43-47.

[8] 马先杰,崔保松,韩少伟,等.中药白及的化学成分研究[J].中国中药杂志,2017,42(8):1578-1584.

[9] 饶瑞瑛,任元雪,李欣瑜,等.白及提取物抗变异链球菌致龋效果的研究[J].中国微生态学杂志,2018,30(3):

291-295、299.

[10] 张兵,史亚,周芳美,等.白及提取物体外抗流感病毒药效及其机理研究[J].中药材,2017,40(12):2930-2935.

[11] 刘珈羽,郭换,肖佳雯,等.不同粒径白及粉的粉体学性质及体外溶出度比较[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(3):25-29.

[12] 陈鹏程,侯靖宇,胡杰,等.杜仲提取物中4个主要成分的大鼠在体肠吸收[J].中国医药工业杂志,2015,46(7):730-735.

[13] 伍萍,李梅,巩仔鹏,等.基于在体循环肠灌流模型分析羊耳菊提取物的肠吸收特性[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(2):1-8.

[14] 赵菲菲,杨馨,徐丹,等.白及非多糖组分的止血作用及其机制的初步研究[J].中国药理学通报,2016,32(8):1121-1126.

[15] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:363-368.

[16] 杨武,侯佳,陆苑,等.头花蓼提取物的大鼠在体肠吸收研究[J].中国中药杂志,2015,40(21):4281-4287.

[17] 刘跃.头花蓼的口服吸收机制及其药代动力学研究[D].贵阳:贵州医科大学药学院,2015.

[18] 刘亚丽,孙振,张文秀,等.白头翁皂苷B3的溶解度及油水分配系数与大鼠在体肠吸收研究[J].药物评价研究,2016,39(1):87-91.

[19] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等.药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J].中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.

[20] 陈慧慧,姚银辉,鲁澄宇.在体肠灌流法用于中药有效成分吸收的研究进展[J].中国药师,2011,14(11):1677-1679.

[21] 翟永松,杜守颖,徐冰,等.三七总皂苷油水分分配系数及大鼠在体肠吸收动力学研究[J].中国中药杂志,2010,35(8):984-988.

[22] 苗燕飞,陈国广,任丽莉,等.盐酸齐拉西酮大鼠在体肠吸收动力学[J].南京工业大学学报(自然科学版),2017,39(1):133-136.

[23] 徐术,刘忠良,胡晋红.药物肠吸收的实验研究方法概述[J].中国药房,2009,20(16):1266-1268.

[24] 雷燕,张建华,张明,等.P-糖蛋白抑制剂研究进展[J].广州化工,2016,44(6):27-30.

[25] 高秀蓉,蒋学华,杜青青,等.P-糖蛋白抑制剂对蝙蝠葛碱跨膜转运的影响[J].华西药学杂志,2013,28(2):135-139.

(收稿日期:2018-07-07 修回日期:2019-01-15)

(编辑:张元媛)