

· 药物代谢 ·

戊己丸中活性成分在正常大鼠和肠易激综合征大鼠体内药代动力学行为的差异性分析

张红^{1,2}, 陈颖², 巩仔鹏^{2,3}, 董宇⁴, 杨紫玉², 杨庆², 李玉洁², 蔡维艳², 翁小刚²,
王娅杰², 李琦², 臧远龙^{1,2}, 朱晓新^{1,2*}

(1. 安徽中医药大学, 合肥 230038; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室, 省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室,
民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 药学院, 贵阳 550004;
4. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

【摘要】 目的:建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定戊己丸中10个活性成分口服给药后不同时间点的血药浓度,比较其在正常大鼠和慢性内脏高敏感肠易激综合征(CVH-IBS)大鼠体内药代动力学特征的差异。方法:采用乳鼠结肠经皮冠状动脉腔内血管成形术(PTCA)球囊刺激法制备CVH-IBS大鼠模型,灌胃给予戊己丸(给药剂量 $0.245\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)后于不同时间点从颈静脉采血,采用UPLC-MS/MS同时检测血浆中10个戊己丸活性成分(盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、表小檗碱、二氢小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸内酯、芍药苷、芍药内酯苷)的血药浓度,计算各成分在正常大鼠和CVH-IBS大鼠体内药代动力学参数的差异。结果:建立的UPLC-MS/MS能够灵敏、准确地检测10个戊己丸活性成分在大鼠体内的血药浓度。与正常组比较,CVH-IBS大鼠体内10个戊己丸活性成分的吸收速率均有一定程度的降低,达峰时间(t_{\max})延长,其中盐酸小檗碱和盐酸药根碱的 t_{\max} 分别从54 min和39 min均显著延长至90 min($P<0.05$, $P<0.01$);各成分的药-时曲线下面积(AUC_{0-t})均增加,其中吴茱萸碱和芍药苷差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$);10个活性成分的清除率(CL/F)均降低,其中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和吴茱萸碱差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:戊己丸中活性成分在正常大鼠和CVH-IBS大鼠体内的药代动力学行为存在明显差异,这可能与IBS病理状态下肠道上皮细胞的微结构被破坏和肝脏酶的活性改变有关。

【关键词】 戊己丸; 肠易激综合征(IBS); 超高效液相色谱-质谱法(UPLC-MS/MS); 乳鼠结肠球囊刺激法; 药代动力学; 慢性内脏高敏感性; 生物碱

[中图分类号] R22;R969.1;R28;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)17-0124-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211048 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210226.1442.002.html>

[网络出版日期] 2021-02-26 16:26

Difference Analysis of Pharmacokinetic Behavior of Active Ingredients in Wujiwan Between Normal Rats and Rats with Irritable Bowel Syndrome

ZHANG Hong^{1,2}, CHEN Ying², GONG Zi-peng^{2,3}, DONG Yu⁴, YANG Zi-yu², YANG Qing², LI Yu-jie²,
CAI Wei-yan², WENG Xiao-gang², WANG Ya-jie², LI Qi², ZANG Yuan-long^{1,2}, ZHU Xiao-xin^{1,2*}

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province,

[收稿日期] 20201225(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074103);国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09101002-002-008,2017ZX09101002-002-002,2017ZX09101002-001-001-3);国家“载人航天工程航天医学实验领域项目”(HYZHXM05003)

[第一作者] 张红,在读硕士,从事中药药理研究,E-mail:1530648940@qq.com

[通信作者] *朱晓新,研究员,博士生导师,从事中药药理学和药代动力学研究,Tel:010-64015008,E-mail:zhuxx@icmm.ac.cn

State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Engineering Research Center for Development and Application of Ethnic Medicine and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;
4. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for determining the plasma concentrations of 10 active ingredients in Wujiwan at different time points after oral administration, and to compare the pharmacokinetic characteristics between normal rats and rats with chronic visceral hypersensitive irritable bowel syndrome (CVH-IBS). **Method:** CVH-IBS rat model was prepared by the neonatal rat colon percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) balloon stimulation method. After intragastric administration of Wujiwan ($0.245 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), blood was collected from the jugular vein at different time points, and the plasma concentrations of 10 active ingredients (berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, coptisine hydrochloride, jatrorrhizine hydrochloride, epiberberine, dihydroberberine, evodiamine, evodine, paeoniflorin, albiflorin) in Wujiwan was detected simultaneously by UPLC-MS/MS, the pharmacokinetic parameters of each component in normal rats and CVH-IBS rats were calculated. **Result:** The established UPLC-MS/MS could sensitively and accurately detect the plasma concentrations of 10 active ingredients of Wujiwan in rats. Compared with the normal group, the absorption rates of these 10 active ingredients of Wujiwan in the blood of CVH-IBS rats all decreased to a certain extent, and the peak time (t_{\max}) was prolonged. Among them, the t_{\max} of berberine hydrochloride and jatrorrhizine hydrochloride were significantly prolonged from 54 minute and 39 minute to 90 minute, respectively ($P<0.05$, $P<0.01$). Area under the plasma concentration-time curve (AUC_{0-t}) of each component increased, and evodiamine and paeoniflorin were significantly different ($P<0.05$, $P<0.01$). The clearance rates (CL/F) of these 10 active ingredients were all decreased, among which berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and evodiamine had significant differences ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** There are significant differences in the pharmacokinetic behavior of the active ingredients in Wujiwan between normal rats and CVH-IBS rats, which may be related to the destruction of microstructure of intestinal epithelial cells and the change of activity of liver enzymes under the pathological state of IBS.

[Keywords] Wujiwan; irritable bowel syndrome (IBS); ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); neonatal rat colon balloon stimulation method; pharmacokinetics; chronic visceral hypersensitivity; alkaloids

肠易激综合征 (IBS) 是以腹痛、腹部不适和大便习惯改变为主要临床表现的慢性功能性肠病^[1], 其病程渐进、迁延难愈、易复发。IBS 全球发病率为 15%~20%, 我国患病率在 20% 左右, 且以腹泻型为主。目前, IBS 发病机制尚未明确, 可能与胃肠道运动功能改变、内脏敏感性增高、神经免疫功能紊乱、肠道菌群失调、精神心理障碍等因素相关, 结肠运动障碍和内脏高敏感是最主要临床病理特征^[2-3]。近年来, 以脑-肠交互观点为基础的生物-心理-社会医学模式参与 IBS 发病的观念被广泛接受。IBS 的治疗除了饮食干预、心理疗法外, 还采用改善胃肠动力、解痉、导泻、干预肠道微生态等综合方法, 但存在复发高、疗效不显著的缺点^[4-5]。寻找疗效好、

安全性高的 IBS 治疗药物一直是研究的热点。

经典名方戊己丸始载于《太平惠民和剂局方》, 由黄连、吴茱萸、白芍各五两组成, 主治脾受湿气, 泻痢不止, 米谷迟化, 脐腹刺痛^[6]。此方历代化裁有据, 《医方考》中上述三药比例为 5:1:1, 主用于“脾胃热泻不止者”。宫海民等^[7]比较了戊己丸不同配伍方的药效作用, 发现三药等量时镇痛作用较强, 而黄连-吴茱萸-白芍 (5:1:1) 时抗炎作用更显著。戊己丸自 1977 年版开始被《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》) 收载, 由黄连-制吴茱萸-炒白芍 (6:1:6) 组成, 用于脾胃不和、泛酸嘈杂、呕吐、腹痛泻痢等; 2005 年版《中国药典》将其功能与主治改为泻肝和胃, 降逆止呕^[8]。戊己丸中 3 味药的配比和

剂量上的变化,对于药效、适应证的影响较大,甚至可以改变其主要功效。本课题组前期以小肠推进实验为依据,发现黄连-制吴茱萸-炒白芍(12:2:3)配伍方体外可显著抑制乙酰胆碱所致的结肠运动亢进,对慢性内脏高敏感IBS(CVH-IBS)大鼠也有显著的治疗作用^[9-10]。

目前,病理状态下的药代动力学研究更贴近临床实际已成为广泛的共识。肠道是食物消化吸收的主要场所,其结构破坏或功能障碍均会显著影响药物在体内的吸收、分布、代谢和排泄过程;肠道菌群也是影响药物代谢的关键因素之一。例如,乙酸灌肠加束缚应激诱导的IBS大鼠口服枳实芍药散后,柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的吸收率均显著高于正常组,而芍药苷在IBS组与正常组间则无明显差异^[11]。小檗碱在腹泻型IBS小鼠模型中,可通过上调锌指蛋白A20的表达,抑制肿瘤坏死因子- α /核转录因子- κ B/肌球蛋白轻链激酶(TNF- α /NF- κ B/MLCK)通路的异常激活,从而保护肠上皮紧密连接,修复腹泻型IBS对肠上皮屏障的损伤^[12]。可见IBS病理状态会显著影响机体内的药物代谢酶、转运蛋白、细胞膜的通透性及微生物菌群,从而改变药物在机体内的吸收、分布、代谢和排泄过程^[11];但戊己丸活性成分在CVH-IBS大鼠体内的变化规律尚不清楚。因此,本研究拟采用乳鼠结肠经皮冠状动脉腔内血管成形术(PTCA)球囊刺激法建立CVH-IBS大鼠模型,利用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定戊己丸中10个活性成分在正常和CVH-IBS大鼠体内的血药浓度,比较其药代动力学行为的差异,为戊己丸治疗IBS的临床合理用药提供参考。

1 材料

VX-III型多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司),NA-5L型氮气/空气一体机(北京中兴汇利科技发展有限公司),Centrifuge 5424R型低温高速离心机(德国Eppendorf公司),Xevo TQ型超高效液相色谱-质谱联用仪(美国Waters公司),PTCA扩张导管(美国Boston Scientific公司,2.0 mm \times 15 mm)。盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、芍药苷、吴茱萸碱和盐酸苯海拉明(内标)对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为10006-200807,110713-201212,110732-201108,110736-201136,110802-200606,纯度分别为99.90%,86.70%,86.70%,96.50%,99.90%),盐酸药根碱、盐酸黄连碱、二氢小檗碱、表小檗碱、吴茱萸内酯、芍药内酯苷对照品(成都曼思

特生物科技有限公司,批号分别为MUST-14022411, MUST-13032301, MUST-13070212, MUST-13092410, MUST-13092412, MUST-13112803,纯度分别为99.50%,99.50%,99.50%,99.50%,99.50%,91.37%),水为自制高纯水,乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。黄连、制吴茱萸、炒白芍饮片均购自北京卫仁中药饮片厂,经中国中医科学院中药研究所何希荣主管药师鉴定,均符合2020年版《中国药典》的相关要求;3味药在中日友好医院药剂室分别用10倍量溶剂回流提取后真空干燥制备得到固体粉末,黄连用50%乙醇提取,浸膏得率19.33%,吴茱萸用85%乙醇提取,浸膏得率17.7%,白芍用水提取,浸膏得率9.37%;按黄连-制吴茱萸-炒白芍(12:2:3)生药量比例称取提取物,加水使溶解,配制成24.46 g \cdot L⁻¹(以提取物质量计)戊己丸混悬液(混悬液中黄连提取物、制吴茱萸提取物和炒白芍提取物质量浓度分别为19.20, 2.93, 2.33 g \cdot L⁻¹)。

雌性SPF级SD大鼠乳鼠,5 d龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2014-0001。本文涉及的动物实验经中国中医科学院基础理论研究所动物伦理委员会批准,批准号2014-010。每10只大鼠与母鼠一起喂养,食水自取,自然光照,饲养至第25天后脱离母乳,每5只为1笼饲养。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制 分别精密称取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、表小檗碱、二氢小檗碱、吴茱萸碱、吴茱萸内酯、芍药苷、芍药内酯苷对照品5 mg,置于5 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,作为储备液;精密量取上述各对照品储备液适量,加50%乙腈配制质量浓度均为1 mg \cdot L⁻¹的混合对照品溶液。精密称取盐酸苯海拉明对照品5 mg,加甲醇稀释并定容,配制成1 g \cdot L⁻¹内标储备液;取内标储备液适量,加入50%乙腈,涡旋混合均匀,配成5 mg \cdot L⁻¹内标溶液,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

2.2 检测条件 ACQUITY UPLC[®] BEH Shield RP18色谱柱(2.1 mm \times 50 mm,1.7 μ m),流动相乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~2 min,98%~60%B; 2~2.5 min,60%~20%B; 2.5~3 min,20%~10%B; 3~3.5 min,10%~20%B; 3.5~4 min,20%~60%B; 4~4.1 min,60%~98%B; 4.1~5 min,98%B),流速0.4 mL \cdot min⁻¹,柱温35 $^{\circ}$ C,进样室温度4 $^{\circ}$ C,进

样量设定为5 μL。采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式检测,选择多反应监测(MRM)模式进行二级质谱分析,检测条件见表1。毛细管电压1.0 kV,离子源温度150 °C,脱溶剂温度500 °C,脱溶剂气体流速设定800 L·h⁻¹,锥孔气体流速50 L·h⁻¹。各分析物的锥孔电压和碰撞能量见表1。

表1 戊己丸中10个活性成分及内标的MRM检测参数

Table 1 MRM detection parameters of 10 active ingredients in Wujiwan and internal standard

成分	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
盐酸小檗碱	336.15	320.22	44	28
盐酸巴马汀	352.24	337.02	44	20
盐酸黄连碱	320.12	262.04	66	38
盐酸药根碱	338.16	279.32	44	42
表小檗碱	336.15	320.22	44	28
二氢小檗碱	338.16	279.32	44	42
吴茱萸碱	304.11	216.97	84	42
吴茱萸内酯	352.16	294.50	42	40
芍药苷	481.26	105.02	16	20
芍药内酯苷	481.26	104.96	18	20
盐酸苯海拉明	256.07	166.96	50	20

2.3 血浆样品前处理 取血浆100 μL,加入质量浓度5 mg·L⁻¹内标溶液20 μL,涡旋,加入乙腈360 μL

表2 戊己丸中10个活性成分在大鼠血浆中含量测定的回归方程、线性范围和定量限

Table 2 Regression equation, linear range and limit of quantification for determination of 10 active ingredients of Wujiwan in rat plasma

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg·L ⁻¹	最低定量限/μg·L ⁻¹
盐酸小檗碱	$Y=0.008\ 6X-0.000\ 15$	0.999 2	0.312 5~200	0.312 5
盐酸巴马汀	$Y=0.005\ 9X-0.009\ 7$	0.997 6	0.312 5~200	0.156 25
盐酸黄连碱	$Y=0.007\ 0X-0.003\ 3$	0.995 8	0.312 5~200	0.312 5
盐酸药根碱	$Y=0.004\ 8X-0.005\ 2$	0.997 5	0.312 5~200	0.312 5
表小檗碱	$Y=0.006\ 0X-0.002\ 1$	0.993 1	0.312 5~200	0.312 5
二氢小檗碱	$Y=0.006\ 4X-0.001\ 0$	0.995 6	0.312 5~200	0.312 5
吴茱萸碱	$Y=0.007\ 7X-0.000\ 7$	0.991 8	0.312 5~100	0.312 5
吴茱萸内酯	$Y=0.008\ 1X-0.000\ 1$	0.999 7	0.312 5~100	0.312 5
芍药苷	$Y=0.005\ 9X-0.001\ 4$	0.999 9	0.625 0~200	0.625 0
芍药内酯苷	$Y=0.007\ 8X-0.006\ 1$	0.997 0	0.625 0~200	0.625 0

2.4.3 精密度、准确度和回收率考察 选择空白血浆样品,根据线性范围不同,取低、中、高质量浓度混合对照品溶液(1.25, 10, 100 μg·L⁻¹,下同),按2.3项下方法制备成低、中、高3个质量浓度的质控样品(*n*=5),连续检测3 d,根据随行标准曲线计算日内、日间精密度和准确度;结果低、中、高质量浓度质控

沉淀蛋白,涡旋5 min,离心(转速13 000 r·min⁻¹,时间15 min,离心半径10 cm,下同),取上清液350 μL在氮吹仪上吹干,残渣用50%乙腈200 μL复溶,涡旋混匀5 min,4 °C离心,取上清5 μL进行UPLC-MS/MS分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 方法的专属性 分别取大鼠空白血浆、混合对照品溶液+空白血浆及灌胃戊己丸后的血浆各100 μL,按2.3项下方法对血浆样品进行处理,采用UPLC-MS/MS进行检测。结果表明10个活性成分及内标峰形良好,血浆中内源性物质对检测无干扰,方法专属性好,图谱见网络附件材料。

2.4.2 标准曲线绘制 取戊己丸中10个活性成分的混合对照品溶液适量,加50%乙腈稀释,得系列混合对照品溶液(0.156 25, 0.312 5, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 μg·L⁻¹)。取空白血浆90 μL,分别加入上述10个活性成分混合对照品溶液10 μL,按2.3项下方法对血浆样品进行处理,采用UPLC-MS/MS进行检测,以成分质量浓度为横坐标(*X*),以成分峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标(*Y*),进行线性回归(权重1/*X*²),得回归方程。结果表明戊己丸中10个成分在以上质量浓度范围内线性良好,相关系数(*r*)均>0.99,满足生物样品的分析要求,见表2。

样品的日内准确度89.94%~113.82%,精密度相对标准偏差(RSD)0.8%~9.2%;日间准确度92.37%~114.11%,其精密度RSD 0.04~19.8%,均符合生物样品分析方法的要求。取空白血浆或水90 μL,加入稀释后的混合对照品储备液10 μL,配制成低、中、高3个质量浓度的样品,按2.3项下方法操作,按2.2

项下条件测定,记录空白血浆+混合对照品溶液样品中各成分的峰面积与混合对照品溶液样品中各成分的峰面积,计算提取回收率。结果各活性成分的提取回收率在98.45%~102.13%,符合生物样品分析的要求。

2.4.4 稳定性考察 按照2.4.3项下制备低、中、高质量浓度质控血浆样品($n=5$),置于4℃冰箱24 h,按2.3项下方法操作,根据随行标准曲线计算质控血浆样品的短期稳定性。配制同样低、中、高质量浓度质控血浆样品($n=5$),置于-80℃冻存3 h后于室温融化,反复冻融3个循环后按2.3项下操作,根据随行标准曲线计算质控血浆样品的冻融稳定性。结果发现质控血浆样品在4℃条件下放置24 h或反复冻融3次后均保持稳定,RSD均<15%,符合生物样品分析的要求。

2.5 CVH-IBS大鼠造模、评价及采血 采用乳鼠结肠PTCA球囊刺激法造模。取5 d龄大鼠乳鼠,适应性喂养3 d,然后先用(37±0.5)℃生理盐水擦拭肛周,取PTCA球囊通过三通管分别与压力表和注射器相连,将PTCA球囊涂上液体石蜡后自肛门插入,然后向球囊中注入空气,压力60 mmHg(1 mmHg≈0.133 kPa),每次持续1 min,每天2次,2次间隔时间30 min,每次刺激后需用生理盐水擦拭PTCA球囊,刺激共持续2周。正常组则每天轻柔抓取,抚摸会阴部位1 min,每天2次,2次间隔30 min。为排除生理节律产生的影响,实验从每天早晨8:00开始。每天实验结束,将乳鼠放回母鼠笼中一起饲养,25 d后与母鼠分开,每笼5只,单独饲养。每周记录1次体质量。饲养至第8周末,各组动物禁食24 h,将成年大鼠固定于大鼠固定器中,连接球囊的导尿管表面涂上液体石蜡,插入大鼠肛门,使球囊末端到肛门的距离为2 cm,在大鼠尾巴根部固定导尿管,球囊另一端与充有(37±0.5)℃生理盐水的注射器相连,待大鼠适应30 min后,用注射器向导尿管中注入生理盐水,观察大鼠腹部的抬起情况(腹部距水平面0.2 cm)及弓背抬高(腹部距水平面1 cm)阈值。每只大鼠测量3次,每次持续10 s,每次间隔30 min,结果取平均值。造模成功后,将正常和模型大鼠麻醉,进行颈静脉插管手术。取手术后并恢复12 h以上的大鼠,单次灌胃戊己丸(给药体积10 mL·kg⁻¹,相当于盐酸小檗碱44 mg·kg⁻¹,盐酸巴马汀10.6 mg·kg⁻¹,盐酸黄连碱11 mg·kg⁻¹,盐酸药根碱2.54 mg·kg⁻¹,表小檗碱2.57 mg·kg⁻¹,二氢小檗碱3 mg·kg⁻¹,吴茱萸碱0.11 mg·kg⁻¹,吴茱萸内酯

0.4 mg·kg⁻¹,芍药苷3.13 mg·kg⁻¹,芍药内酯苷0.62 mg·kg⁻¹),于给药前,以及给药后5,15,30 min和1,1.5,2,3,4,6,8,10,12 h从颈静脉插管处采血200 μL放入肝素化的离心管中,同时,补充肝素溶液(50 IU·mL⁻¹)200 μL;将离心管于3 500 r·min⁻¹离心10 min(离心半径10 cm),取血浆100 μL进行UPLC-MS/MS测定。

2.6 药代动力学参数的计算 测定各时间点血样中待测物的浓度,绘制药-时曲线。采用DAS 2.0绘制平均血药浓度-时间曲线,计算药代动力学参数,包括达峰时间(t_{max}),药峰浓度(C_{max}),消除半衰期($t_{1/2}$),药-时曲线下面积(AUC_{0-t}),表观分布容积(V_d)和清除率(CL/F)。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,见表3和图1。采用SPSS 11.5软件进行 t 检验,比较两组间差异, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。结果显示,戊己丸灌胃给药后,与正常组相比,黄连活性成分盐酸小檗碱在模型组大鼠中 t_{max} 明显延长($P<0.05$), $t_{1/2}$ 明显升高($P<0.05$), CL/F 明显降低($P<0.05$);盐酸巴马汀在模型大鼠体内的 CL/F 显著降低($P<0.01$);盐酸药根碱在模型组大鼠中的 t_{max} 显著延长($P<0.01$);盐酸黄连碱、表小檗碱、二氢小檗碱在模型组大鼠中各药代动力学参数均有不同程度变化,但差异无统计学意义。与正常组比较,吴茱萸活性成分吴茱萸碱在模型组大鼠中的 C_{max} , CL/F 和 V_d 明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), AUC_{0-t} 显著升高($P<0.01$);吴茱萸内酯在模型组大鼠体内 $t_{1/2}$ 和 C_{max} 明显升高($P<0.05$)。与正常组比较,白芍活性成分芍药苷在模型大鼠体内 AUC_{0-t} 明显升高($P<0.05$);芍药内酯苷在模型组大鼠体内 $t_{1/2}$ 和 C_{max} 明显升高($P<0.05$)。

3 讨论

中药活性成分的药代动力学行为与机体的状态密切相关,因为机体的病理状态可能会导致转运蛋白、代谢酶、肠道菌群、膜通透性等发生改变。肠道作为药物消化吸收的主要场所,肠上皮细胞是首道屏障,肠道菌群则是药物代谢的主要“器官”,肠功能障碍、菌群失调等因素均会对方剂中活性成分的吸收、分布、代谢和排泄过程产生不同程度的影响,继而影响到方剂的疗效。

IBS以腹痛、腹胀、排便习惯和(或)大便性状改变为主要临床表现,但是临床诊断一直缺乏特异的胃肠道形态学和生化指标^[13]。内脏高敏感性作为IBS的特征性病理生理机制已经得到了广泛认可。心理精神异常、免疫功能紊乱、胃肠分泌异常等最

表 3 正常大鼠和 CVH-IBS 大鼠灌胃给予戊己丸后 10 个活性成分的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Pharmacokinetic parameters of ten ingredients in normal rats and CVH-IBS rats after oral administration of Wujiwan ($\bar{x} \pm s, n=5$)

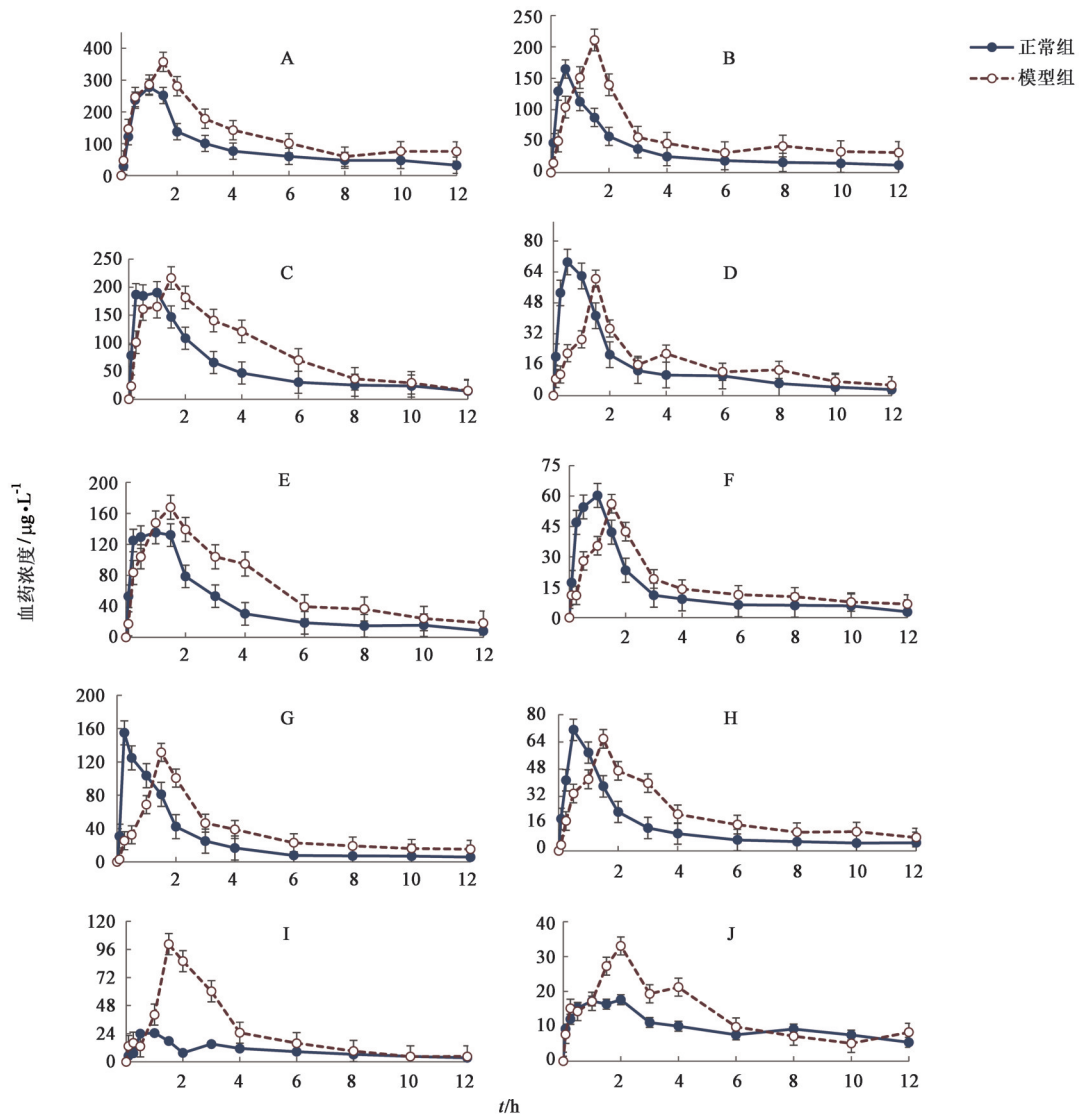
成分	组别	t_{max}/min	$C_{max}/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{AUC}_{0-t}/\text{min} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$t_{1/2}/\text{min}$	$V_d/\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\text{CL}/\text{F}/\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$
盐酸小檗碱	正常	54.00±25.10	305.49±63.54	62 591.47±21 446.37	271.54±91.29	234.41±65.26	646.29±232.74
	模型	90.00±0.00 ¹⁾	357.54±89.60	96 197.63±18 796.40	310.88±135.59 ¹⁾	146.65±46.08	339.41±64.95 ¹⁾
盐酸巴马汀	正常	27.00±6.71	175.16±47.23	25 594.06±9 036.45	229.62±55.27	130.43±48.30	413.67±190.10
	模型	90.00±24.49	215.98±62.31	42 634.72±5 994.39	444.58±115.00	112.31±37.64	172.46±21.57 ²⁾
盐酸黄连碱	正常	36.00±22.75	225.33±39.78	40 617.00±12 306.23	230.61±76.12	84.32±31.50	265.08±100.68
	模型	97.50±15.00	237.84±38.97	61 183.01±12 761.58	154.21±45.61	39.57±16.65	173.78±30.82
盐酸药根碱	正常	39.00±20.12	79.41±29.63	10 861.89±3 466.39	217.51±90.94	72.09±34.75	236.69±100.58
	模型	90.00±0.00 ²⁾	60.55±24.63	12 151.07±2 107.41	211.88±161.25	49.84±22.64	189.38±53.36
表小檗碱	正常	63.00±37.35	157.86±36.87	28 790.09±9 268.94	195.14±57.40	25.38±10.72	92.12±40.75
	模型	90.00±24.49	197.19±46.24	47 183.92±14 844.86	246.82±70.07	18.29±8.02	51.50±15.58
二氢小檗碱	正常	51.00±29.24	67.31±16.63	9 902.35±3 915.47	263.54±136.90	105.55±33.75	317.51±157.90
	模型	97.50±15.00	64.75±20.03	11 818.70±2 303.43	256.48±72.93	78.51±21.20	217.29±51.27
吴茱萸碱	正常	30.00±18.37	189.17±67.30	18 409.45±6 513.82	236.11±172.74	1.97±1.25	6.25±2.94
	模型	105.00±17.32	142.91±34.07 ¹⁾	25 834.36±1 838.53 ²⁾	288.77±40.11	1.42±0.10 ²⁾	3.44±0.31 ¹⁾
吴茱萸内酯	正常	39.00±20.12	76.54±28.68	10 140.81±3679.16	249.27±70.11	13.58±8.58	37.27±12.92
	模型	112.50±51.23	78.70±4.97 ¹⁾	15 674.34±1 011.58	575.84±449.81 ¹⁾	12.85±6.60	18.10±4.57
芍药苷	正常	54.00±25.10	26.82±12.06	6 791.32±1 625.64	220.29±103.46	121.32±32.13	418.86±112.21
	模型	97.50±15.00	107.39±25.93	18 375.85±3 800.60 ¹⁾	138.04±22.66	33.13±7.99	166.81±33.34
芍药内酯苷	正常	75.00±45.00	20.63±3.74	7 170.80±2 881.33	340.84±144.84	34.15±19.87	72.77±29.61
	模型	86.25±49.56	34.33±14.61 ¹⁾	9 606.51±2 943.09	543.73±653.35 ¹⁾	21.62±13.21	41.54±17.61

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

终都能导致内脏高敏感性,其已成为研究 IBS 发生、发展及治疗的一个重要切入点^[14]。因此,本研究采用乳鼠结肠 PTCA 球囊刺激加束缚法诱导 CVH-IBS 大鼠模型。近年来,较多临床与基础研究发现 IBS 与肠黏膜上皮细胞紧密连接结构破坏相关;如闭合蛋白(occludin),紧密连接蛋白 1(claudin-1)和闭锁小带蛋白 1(ZO-1)等跨膜蛋白表达降低^[15],导致肠屏障功能破坏,细胞旁路通透性显著增加,继而肠腔内脂多糖(LPS)等细菌有害代谢物大量渗透,肠免疫系统活化,持续导致 TNF- α , 白细胞介素(IL)-6, IL-8 等炎性因子释放增加^[16]。本课题组研究发现 CVH-IBS 大鼠的肠道在电子显微镜下观察表现出肠上皮紧密连接和黏附连接的微结构均有不同程度的破坏^[17]。肠道黏膜屏障的破坏必将影响通过细胞旁路转运的物质进入血液循环的速率或程度,故而表现为多种黄连生物碱在 CVH-IBS 模型大鼠体内的暴露量显著增加,这也为小檗碱不仅在肠腔局部,还可以通过进入血液循环在全身发挥抗炎作用提供证据。综上分析,说明基于 CVH-IBS 大鼠的活性成分药代动力学研究能够为戊己丸临

床用药提供较为精确的指导。

生物碱是黄连的主要活性成分,质量分数最高可达 10%^[18]。本研究比较了正常大鼠和 CVH-IBS 大鼠灌胃给予戊己丸后 6 种黄连生物碱(盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、表小檗碱、二氢小檗碱)的体内暴露情况,结果发现黄连生物碱表现出大致类似的变化趋势,即吸收速度减慢, t_{max} 均有一定程度的延后,其中盐酸小檗碱和盐酸药根碱表现出显著性变化;这 6 种黄连生物碱吸收总量增加, AUC_{0-t} 均表现出明显增加的趋势,这主要与 CVH-IBS 大鼠肠道上皮细胞的紧密连接结构破坏,继而黄连生物碱等小分子化合物从细胞旁路途径的通透性增加有关。MA 等^[19]在肠外翻模型中发现 LPS 预处理能通过增加吸收、减少外排显著提高黄连生物碱在小肠的通透性。因此, CVH-IBS 大鼠肠道的慢性炎症状态也可能会影响黄连生物碱的吸收过程。与正常组比较,黄连生物碱在模型大鼠体内的 CL/F 均减少,其中盐酸小檗碱和盐酸巴马汀表现出显著性差异,推测可能与疾病状态影响肝药酶或药物的肾脏排泄有关。吴茱萸主要含吴茱



A. 盐酸小檗碱; B. 盐酸巴马汀; C. 盐酸黄连碱; D. 盐酸药根碱; E. 表小檗碱; F. 二氢小檗碱; G. 吴茱萸碱; H. 吴茱萸内酯; I. 芍药苷; J. 芍药内酯苷

图1 戊己丸中10个活性成分在大鼠体内的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Plasma concentration-time curves of 10 active ingredients of Wujiwan in rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

萸碱、吴茱萸次碱、吴茱萸内酯等成分,在临床上多用于消化不良、胃肠功能紊乱所致的疾病,包括胃肠生长痛、小儿腹胀等^[20]。本文研究发现与正常组比较,吴茱萸碱和吴茱萸内酯在 CVH-IBS 大鼠体内特征趋势基本与黄连生物碱类似,表现为吸收速率减缓, t_{max} 延迟;吸收总量增多, AUC_{0-t} 增加;代谢速率减慢, V_d 和 CL/F 均减少。但是与黄连生物碱不同,吴茱萸碱虽然吸收总量增加,但 C_{max} 呈现显著降低的趋势;这可能与肠道细胞旁途径对转运影响较小有关^[21]。白芍主要含芍药苷、芍药内酯苷等,白芍总苷有抑制胃酸的作用^[22]。本文研究发现与正常大鼠比较,芍药苷在 CVH-IBS 大鼠体内暴露总量约显著增加了3倍,且并未表现出正常大鼠体内

的双峰现象; $t_{1/2}$ 减少,吸收速率减缓, t_{max} 延迟;代谢速率减慢, V_d 和 CL/F 均减少。芍药内酯苷也基本表现出了与芍药苷类似的趋势。盐酸药根碱和芍药内酯苷则均在模型大鼠体内产生双峰现象,这与文献报道基本一致,推测可能与体内肝肠循环有关^[23]。

综上所述, CVH-IBS 的病理状态对戊己丸中活性成分药代动力学特征产生了显著影响,但动物病变程度的不同会影响其活性成分药代动力学改变的强弱。针对 IBS 大鼠不同病程(如治疗初期和治疗后期)的药代动力学变化及其与药效的相关性值得下一步深入研究,以助于更为全面地了解复方中活性成分的体内过程及其对疾病的影响,为中药复

方的临床应用提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 李夏,王风云,吴皓萌,等. 基于脑-肠互动功能探讨痛泻要方治疗腹泻性肠易激综合征机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(20):229-234.
- [2] UDAY C G, Marshall and Warren Lecture 2019: a paradigm shift in pathophysiological basis of irritable bowel syndrome and its implication on treatment[J]. J Gastroen Hepatol,2020,35(5):712-721.
- [3] 赵艳钧,杨勤. 肠易激综合征内脏高敏感的调控机制研究进展[J]. 现代消化及介入诊疗,2020,25(3):407-410.
- [4] MOAYYEDI P, SIMREN M, BERCIK P. Evidence-based and mechanistic insights into exclusion diets for IBS[J]. Nat Rev Gastro Hepat,2020,17(7):406-413.
- [5] 郑和平,张智彬,魏先鹏,等. 逍遥散合四磨汤加减对便秘型肠易激综合征肝郁气滞证脑-肠轴的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(22):53-58.
- [6] 韦宇,张莉莉,顾成娟. 黄连、吴茱萸、白芍治疗腹泻型肠易激综合征经验——全小林三味小方撮萃[J]. 吉林中医药,2020,40(10):1270-1272.
- [7] 宫海民,王兆淦,段文卓. 戊己丸镇痛、抗炎作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,1998,5(3):147-148.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005:416-417.
- [9] 巩仔鹏. 基于肠易激综合征模型的戊己丸药代动力学研究[D]. 北京:中国中医科学院,2014.
- [10] 王娅杰,董宇,朱晓新. 戊己丸提取物不同配伍方对豚鼠离体结肠运动影响的实验研究[J]. 中国中药杂志,2007,32(20):2161-2165.
- [11] CHEN J Y, CHEN Z, MA L, et al. Development of determination of four analytes of Zhi-Shao-San decoction using LC-MS/MS and its application to comparative pharmacokinetics in normal and irritable bowel syndrome rat plasma[J]. Biomed Chromatogr, 2014,28(10):1384-1392.
- [12] HOU Q K, ZHU S L, ZHANG C R, et al. Berberine improves intestinal epithelial tight junctions by upregulating A20 expression in IBS-D mice [J]. Biomed Pharmacother,2019,118:109206.
- [13] ZHANG C R, HUANG Y Q, LI P W, et al. Ginger relieves intestinal hypersensitivity of diarrhea predominant irritable bowel syndrome by inhibiting proinflammatory reaction [J]. BMC Complem Altern M,2020,20(1):279.
- [14] 何力,杨力,凌志维,等. 基于脑肠交互机制探讨肠道微生物调节IBS-D内脏高敏的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(11):224-229.
- [15] SCALDAFERRI F, PIZZOFERRATO M, GERARDI V, et al. The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches[J]. J Clin Gastroenterol,2012,46(Suppl):S12-S17.
- [16] DARKOH C, COMER L, ZEWDIE G, et al. Chemotactic chemokines are important in the pathogenesis of irritable bowel syndrome [J]. PLoS One,2014,9(3):e93144.
- [17] GONG Z P, CHEN Y, ZHANG R J, et al. Pharmacokinetic difference of berberine between normal and chronic visceral hypersensitivity irritable bowel syndrome rats and its mechanism [J]. Arch Pharm Res,2015,38(10):1888-1896.
- [18] 李备,刘华蓉,潘永全,等. 黄连总生物碱对乙醇致大鼠胃黏膜损伤的保护作用及其机制探讨[J]. 中国中药杂志,2006,31(1):51-54.
- [19] MA B L, YAO M K, ZHONG J, et al. Increased systemic exposure to rhizoma coptidis alkaloids in lipopolysaccharide-pretreated rats attributable to enhanced intestinal absorption[J]. Drug Metab Dispos, 2012,40(2):381-388.
- [20] 蔡扬. 黄连吴茱萸配伍对实验性功能消化不良大鼠胃排空及胃肠激素的影响[D]. 成都:成都中医药大学,2013.
- [21] 严子玲,于洋,何金莲,等. 五味子配伍对吴茱萸主成分肠吸收的影响及可能机制研究[J]. 江西中医药, 2013,44(9):59-62.
- [22] 蔡翠珠,黄少君,刘海涛. 治胃汤治疗胆汁反流性胃炎(肝胃不和型)的临床疗效及对血浆胃动素的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2020,15(10):1765-1768, 1818.
- [23] YUAN J, WANG Y, AN R, et al. Simultaneous determination of six alkaloids and one monoterpene in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and pharmacokinetic study after oral administration of a Chinese medicine Wuji pill [J]. J Chromatogr B,2012,895/896:154-161.

[责任编辑 刘德文]