



戊己丸不同配伍对小檗碱、巴马汀吸收的影响

王怡薇¹, 李玉洁¹, 王彦礼¹, 杨伟鹏¹, 陈颖¹, 张东¹, 杨庆¹,
张英丰², 李涛¹, 朱晓新^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;
2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

[摘要] 目的:应用大鼠原位循环肠肝灌流模型,考察戊己丸不同配伍对戊己丸中黄连代表成分小檗碱、巴马汀的吸收的影响。方法:采用 $L_9(3^4)$ 正交设计得到戊己丸12个配伍方(3个单味药和9个配伍方),经十二指肠给药,于不同时间(0, 1, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 min)采集灌流液,LC-MS检测小檗碱、巴马汀的含量,计算其吸收分数,吸收速率常数(K_a)。结果:吴茱萸与小檗碱、巴马汀的吸收分数,吸收速率常数(K_a)之间呈负相关,并得到了促进小檗碱、巴马汀吸收的最优配伍比例黄连-吴茱萸-白芍3:1:3。结论:吴茱萸抑制黄连代表成分的吸收,而且黄连、吴茱萸、白芍配伍比例不同,小檗碱、巴马汀的吸收量、吸收速度也有较大差异。

[关键词] 肠肝灌流;戊己丸;盐酸小檗碱;盐酸巴马汀;吸收分数;吸收速率常数

复方是中医用药的主要形式,配伍是中医用药的灵魂,科学解释复方的配伍原理是目前中医药研究所面临的最急迫的问题。戊己丸最早见于宋代刘昉《幼幼新书》卷26,由黄连、吴茱萸、白芍3味药组成;《中国药典》2010年版^[1]中按照6:1:6的配伍比例组成。具有泻肝和胃,降逆止呕功效,主要用于肝火犯胃、肝脾不和所致的腹痛、泄泻、呕吐吞酸、胃脘灼热疼痛、口苦嘈杂等证,临床上常用于治疗肠易激综合征、消化性溃疡等消化系统疾病。本实验以戊己丸为受试药,以小檗碱、巴马汀作为君药黄连的代表成分,采用大鼠原位肠肝灌流模型,研究不同配伍对戊己丸中黄连的代表成分的吸收的影响,从吸收的角度探索戊己丸的组方原理。

1 材料与方法

1.1 药品 黄连、吴茱萸、白芍提取物(中日友好医院按优选工艺提取)以1%羧甲基纤维素钠溶液助溶,配制成相应浓度混悬液。

1.2 试剂 甲醇(色谱纯),美国Dikma公司;乙腈

(色谱纯),美国Fisher公司;甲酸(分析纯),北京化学试剂公司;娃哈哈纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司;盐酸小檗碱(批号110713-200910,纯度98%以上),盐酸巴马汀(批号110732-200906,纯度98%以上),购自中国药品生物制品检定所。

1.3 仪器 Agilent 1100 LC-MSD液相质谱联用仪,美国安捷伦公司;Agilent Chem Station色谱工作站,美国安捷伦公司;BP211D 1/1万精密天平, Sartorius公司;TDX-1涡旋混合器,北京方通达科技有限公司;ST-21台式高速冷冻离心机,德国索福公司;恒温水浴锅HH-1,国华电器有限公司;兰格恒流泵BT00-300T,保定兰格恒流泵有限公司。

1.4 动物 健康Wistar大鼠,雄性,体重(250±20)g,军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号SCXK(军)2007-004。

1.5 分组 采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表,将戊己丸组方中的黄连、吴茱萸、白芍作为3因素,再根据戊己丸及其类方、历代临床用药、2010年版《中国药典》规定剂量以及比例,确定各因素的3水平,从而得到9个配伍方,再加上黄连单味药,戊己丸各个配伍组的比例和药量见表1。

1.6 灌流液的配制 K-H缓冲液^[2](每1L内含NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.37 g, MgCl₂ 0.22 g, NaH₂PO₄ 0.22 g, 葡萄糖 3.0 g, NaHCO₃ 1.37 g, pH 7.4),内含0.3%葡萄糖,10%洗过的大鼠红细胞、

[稿件编号] 20110607010

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30930114);国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09301-005-009);中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ2006114, ZZ20090211)

[通信作者] *朱晓新,博士生导师,研究员, Tel: (010)64056154



表1 戊己丸 $L_9(3^4)$ 试验安排

Table 1 $L_9(3^4)$ test schedule of Wuji pill

组别	配比			药量/ $g \cdot kg^{-1}$		
	黄连	吴茱萸	白芍	黄连	吴茱萸	白芍
黄连低剂量	-	-	-	1.2	-	-
黄连中剂量	-	-	-	2.4	-	-
黄连高剂量	-	-	-	4.8	-	-
1号方	3	1	3	1.2	0.4	0.2
2号方	3	2	6	1.2	0.8	0.4
3号方	3	6	12	1.2	2.4	0.8
4号方	6	1	6	2.4	0.4	0.4
5号方	6	2	12	2.4	0.8	0.8
6号方	6	6	3	2.4	2.4	0.2
7号方	12	1	12	4.8	0.4	0.8
8号方	12	2	3	4.8	0.8	0.2
9号方	12	6	6	4.8	2.4	0.4

1%牛血清白蛋白、3%右旋糖酐 T-40。试验前每100 mL灌流液中加入 $5 g \cdot L^{-1}$ 地塞米松和 $2 g \cdot L^{-1}$ 去甲肾上腺素各40, 20 $mL \cdot L^{-1}$ 。

1.7 模型制备 参照Pang^[3]的方法,大鼠用20%乌拉坦($5 \mu L \cdot g^{-1}$ 体重)腹腔注射麻醉后,腹部切口,结扎腹腔动脉与肝动脉。用硬膜外麻醉用管对幽门静脉插管,作为门静脉取样用。用内径0.5 mm的塑料管行胆管插管以引流胆汁。游离上肠系膜动脉、右肾动脉和腹主动脉,用手术线围绕主动脉与右肾动脉和上肠系膜动脉分支处上下松结扎,在靠近肾门处结扎右肾动脉,然后用动脉夹夹住右肾动脉恰好进入腹主动脉处,在动脉夹与结扎点之间作一切口并插管,进入上肠系膜动脉,插管固定后立即开通灌流。流速 $5 mL \cdot min^{-1}$,同时通气(95% O_2 , 5% CO_2 , 气体流速 $1 L \cdot min^{-1}$)。随即快速打开胸腔,在右心房上作切口,用内径1.5 mm的塑料管插入右心房,其尖端顺下腔静脉进入肝静脉,固定插管后将流速提高到 $7.5 mL \cdot min^{-1}$ 。维持大鼠周围温度在 $37^\circ C$ 左右。用不含右旋糖酐和红血球的灌流液冲洗残血,待肝脏转为浅黄色时换用完整灌流液。模型在试验前先用空白灌流液平衡5 min,灌流液的体积为300 mL。

1.8 样品采集与处理 于十二指肠给药后1, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120 min采集灌流液。吸取300 μL 灌流液,加3倍体积的乙腈,涡旋混匀60 s, $12\ 000 r \cdot min^{-1}$,离心10 min,取上清5 μL 进样

分析。

1.9 LC-MS 色谱条件 Agilent 1100 LC/MSD VL系统, Agilent SB C_{18} 柱(2.1 mm \times 150 mm, 5 μm), 流动相-乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯变洗脱, 0~5 min, 15%~45% A; 5~15 min, 45%~50% A。流速 $0.2 mL \cdot min^{-1}$; 柱温 $25^\circ C$; 质谱条件, 模式SIM; 正离子模式; 小檗碱 SIM ion(+)336; 巴马汀 SIM ion(+)352; 吴茱萸碱 SIM ion(+)304; 吴茱萸次碱 SIM ion(+)288; 芍药苷 SIM ion(+)503; 裂解电压130 V; 离子源为电喷雾离子源; 干燥气流速 $8 L \cdot min^{-1}$; 雾化压力278.5 Pa; 干燥气温度 $350^\circ C$; 毛细管电压4 000 V。

1.10 统计学处理 依据所测浓度计算灌流液中代表成分的累计吸收量(μg), 吸收分数(%), K_a (% $\cdot min^{-1}$)。用药物的吸收分数对时间作相关回归分析, 得出的斜率即为吸收速率常数(K_a)。对所得的吸收分数、 K_a 进行显著性检验、极差分析、方差分析, 确定各因素在组方中贡献度大小, 判断最优组合。

$$\text{累计吸收量} = 250C_n + 12 \sum_{j=1}^{n-1} C_j \quad (1)$$

$$\text{吸收分数} = \frac{\text{循环灌流液中检测成分累计吸收量}}{\text{检测成分十二指肠给药量}} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果

2.1 方法学考察 标准曲线见表2。

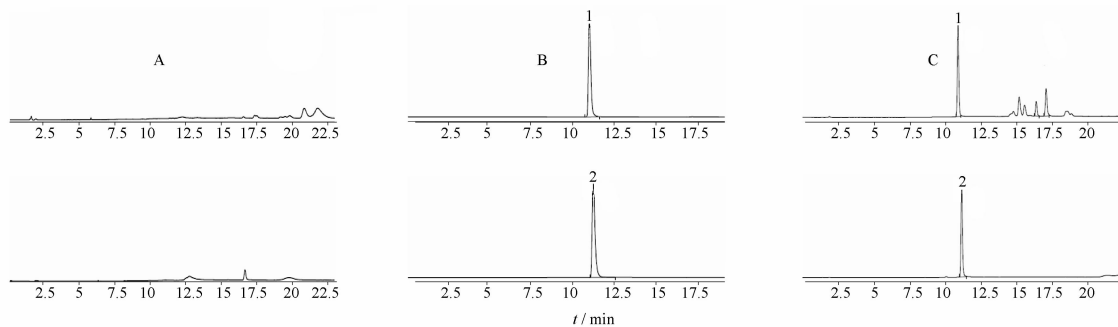
表2 线性回归方程、相关系数及线性范围

Table 2 Linear regression equation, correlation coefficient and linear range

化合物	线性回归方程	R^2	线性范围/ $mg \cdot L^{-1}$
小檗碱	$Y = 187\ 897X + 131\ 951$	0.997 1	0.01~25
巴马汀	$Y = 90\ 925X + 633\ 28$	0.997 1	0.01~25

专属性结果:在上述LC-MS条件下,小檗碱、巴马汀峰型良好,且完全分离,保留时间 t_R 分别为11.18, 10.93 min。空白灌流液和戊己丸中成分对其无干扰,表明此方法专属性较好,见图1。

2.2 配伍对吸收分数的影响 小檗碱、巴马汀吸收分数结果显示,①循环肠肝灌流模型的吸收分数随着时间的延续不断升高,均在120 min达到峰值。这是由于模型本身存在浓度蓄积效应的原因为。②单味药之间相比,小檗碱、巴马汀吸收分数黄连中剂



A. 空白灌流液; B. 对照品(溶剂甲醇); C. 空白灌流液 + 对照品; 1. 盐酸巴马汀; 2. 盐酸小檗碱。

图1 小檗碱、巴马汀专属性 LC-MS 图

Fig. 1 LC-MS chromatograms of berberine, palmatine specificity

量 > 黄连低剂量 > 黄连高剂量。③120 min 时, 除 7 号方(黄连-吴茱萸-白芍 12:1:12)的小檗碱、巴马汀吸收分数高于同剂量单味药以外, 其余复方均低于同剂量单味药。提示与吴茱萸、白芍配伍影响小檗碱、巴马汀的吸收。④1~15 min 小檗碱、巴马汀吸收分数 1 号方 > 2 号方 > 3 号方 > 单味药, 提示这 3 种配伍方式促进小檗碱、巴马汀迅速吸收。⑤黄连低剂量组复方的的小檗碱、巴马汀吸收分数 1 号

方 > 2 号方 > 3 号方, 吴茱萸给药量 1 号方 < 2 号方 < 3 号方; 黄连中剂量组复方的的小檗碱、巴马汀吸收分数 4 号方 > 5 号方 > 6 号方, 吴茱萸给药量 4 号方 < 5 号方 < 6 号方; 黄连高剂量组复方的的小檗碱、巴马汀吸收分数 7 号方 > 8 号方 > 9 号方, 吴茱萸给药量 7 号方 < 8 号方 < 9 号方; 提示吴茱萸与黄连之间为负相关, 吴茱萸影响黄连代表成分小檗碱、巴马汀的吸收, 见表 3, 4。

表3 小檗碱在不同配伍、不同时间点的吸收分数($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Absorption fraction of berberine in different compatibilities and time points($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	%
黄连低剂量	0.001 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.011 ± 0.002	0.068 ± 0.044	0.338 ± 0.194	0.564 ± 0.043	0.731 ± 0.052	
黄连中剂量	0.069 ± 0.057	0.083 ± 0.058	0.100 ± 0.066	0.140 ± 0.084	0.240 ± 0.105	0.645 ± 0.087	0.851 ± 0.060	0.984 ± 0.064	
黄连高剂量	0.015 ± 0.013	0.017 ± 0.012	0.025 ± 0.007	0.032 ± 0.003	0.052 ± 0.004	0.116 ± 0.019	0.161 ± 0.033	0.192 ± 0.036	
1 号方	0.079 ± 0.077 ¹⁾	0.104 ± 0.096 ¹⁾	0.116 ± 0.098 ¹⁾	0.136 ± 0.103 ¹⁾	0.165 ± 0.089	0.235 ± 0.058	0.296 ± 0.067 ²⁾	0.436 ± 0.040 ²⁾	
2 号方	0.011 ± 0.001	0.022 ± 0.022	0.028 ± 0.026	0.039 ± 0.034	0.055 ± 0.038	0.109 ± 0.061 ¹⁾	0.152 ± 0.049 ²⁾	0.252 ± 0.026 ²⁾	
3 号方	0.005 ± 0.004	0.008 ± 0.007	0.015 ± 0.015	0.021 ± 0.021	0.038 ± 0.032	0.072 ± 0.031 ¹⁾	0.099 ± 0.032 ²⁾	0.124 ± 0.035 ²⁾	
4 号方	0.002 ± 0.000 ¹⁾	0.003 ± 0.003 ²⁾	0.006 ± 0.006 ²⁾	0.012 ± 0.013 ²⁾	0.027 ± 0.026 ²⁾	0.048 ± 0.043 ²⁾	0.101 ± 0.067 ²⁾	0.175 ± 0.101 ²⁾	
5 号方	0.003 ± 0.001 ¹⁾	0.004 ± 0.002 ¹⁾	0.005 ± 0.002 ²⁾	0.007 ± 0.004 ²⁾	0.013 ± 0.005 ²⁾	0.067 ± 0.039 ²⁾	0.096 ± 0.041 ²⁾	0.117 ± 0.046 ²⁾	
6 号方	0.012 ± 0.004 ¹⁾	0.018 ± 0.005 ¹⁾	0.025 ± 0.007 ¹⁾	0.031 ± 0.010 ¹⁾	0.038 ± 0.011 ²⁾	0.062 ± 0.013 ²⁾	0.090 ± 0.020 ²⁾	0.107 ± 0.019 ²⁾	
7 号方	0.010 ± 0.003	0.046 ± 0.036	0.059 ± 0.045	0.082 ± 0.064	0.107 ± 0.077	0.194 ± 0.118	0.233 ± 0.130	0.278 ± 0.139	
8 号方	0.008 ± 0.003	0.010 ± 0.002	0.011 ± 0.002	0.014 ± 0.002	0.026 ± 0.006	0.054 ± 0.010	0.080 ± 0.007	0.103 ± 0.025	
9 号方	0.006 ± 0.003	0.006 ± 0.003	0.006 ± 0.004	0.104 ± 0.003	0.021 ± 0.002	0.054 ± 0.014	0.070 ± 0.015	0.088 ± 0.016	

注:与同剂量单味药相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 4, 7 同)。

2.3 小檗碱吸收分数极差分析、方差分析 根据极差的大小, 判断各因素对小檗碱吸收分数的影响程度为 $B > A > C$ 。根据均数的大小, 确定各因素的最优水平为 $A_1 > A_3 > A_2$, $B_1 > B_2 > B_3$, $C_1 > C_3 > C_2$, 最优水平组合为 $A_1 B_1 C_1$ 。方差分析结果, 黄连、吴茱萸不同水平间有显著的统计学差

异($P < 0.01$), F 代表了对应因素在整体效应中贡献度的大小, 可以看出对小檗碱的吸收分数, 3 个因素的贡献度依次为 $B > A > C$ 。依据极差分析和方差分析结果, 优选出循环灌流中对小檗碱吸收最优的配伍比例为黄连-制吴茱萸-炒白芍 3:1:3, 见表 5。



表4 巴马汀在不同配伍、不同时间点的吸收分数($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Palmatine absorption fraction in different compatibilities and different time points($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	1 min	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	%
黄连低剂量	0.000 ± 0.012	0.000 ± 0.011	0.001 ± 0.001	0.004 ± 0.004	0.050 ± 0.001	0.419 ± 0.025	0.633 ± 0.035	0.828 ± 0.036	
黄连中剂量	0.072 ± 0.004	0.088 ± 0.004	0.103 ± 0.005	0.153 ± 0.006	0.271 ± 0.007	0.649 ± 0.018	0.978 ± 0.207	1.150 ± 0.025	
黄连高剂量	0.014 ± 0.012	0.017 ± 0.011	0.025 ± 0.005	0.033 ± 0.003	0.056 ± 0.007	0.128 ± 0.010	0.185 ± 0.035	0.221 ± 0.036	
1号方	0.075 ± 0.078 ¹⁾	0.102 ± 0.101 ¹⁾	0.117 ± 0.104 ¹⁾	0.141 ± 0.101 ¹⁾	0.177 ± 0.082 ¹⁾	0.270 ± 0.061	0.338 ± 0.076 ²⁾	0.502 ± 0.039 ²⁾	
2号方	0.008 ± 0.010	0.022 ± 0.024	0.029 ± 0.030	0.038 ± 0.039	0.063 ± 0.046	0.133 ± 0.079 ¹⁾	0.187 ± 0.072 ²⁾	0.315 ± 0.026 ²⁾	
3号方	0.003 ± 0.004	0.007 ± 0.008	0.015 ± 0.016	0.024 ± 0.021	0.046 ± 0.040	0.098 ± 0.054 ¹⁾	0.138 ± 0.052 ²⁾	0.171 ± 0.059 ²⁾	
4号方	0.001 ± 0.001 ¹⁾	0.003 ± 0.003 ¹⁾	0.006 ± 0.006 ¹⁾	0.011 ± 0.013 ¹⁾	0.026 ± 0.026 ²⁾	0.052 ± 0.049 ²⁾	0.117 ± 0.084 ²⁾	0.207 ± 0.060 ²⁾	
5号方	0.002 ± 0.001 ¹⁾	0.003 ± 0.002 ¹⁾	0.006 ± 0.005 ¹⁾	0.007 ± 0.005 ²⁾	0.011 ± 0.004 ²⁾	0.073 ± 0.050 ²⁾	0.105 ± 0.054 ²⁾	0.132 ± 0.063 ²⁾	
6号方	0.010 ± 0.003 ¹⁾	0.015 ± 0.003 ¹⁾	0.022 ± 0.010 ¹⁾	0.030 ± 0.017 ¹⁾	0.036 ± 0.018 ²⁾	0.068 ± 0.011 ²⁾	0.117 ± 0.025 ²⁾	0.136 ± 0.027 ²⁾	
7号方	0.008 ± 0.002	0.049 ± 0.040	0.065 ± 0.051	0.096 ± 0.078	0.125 ± 0.010	0.232 ± 0.154	0.278 ± 0.171	0.329 ± 0.178	
8号方	0.007 ± 0.003	0.009 ± 0.004	0.011 ± 0.002	0.014 ± 0.003	0.030 ± 0.006	0.063 ± 0.010	0.095 ± 0.007	0.126 ± 0.030	
9号方	0.005 ± 0.004	0.006 ± 0.004	0.007 ± 0.005	0.010 ± 0.003	0.023 ± 0.007	0.071 ± 0.010	0.092 ± 0.008	0.116 ± 0.025	

表5 小檗碱方差分析

Table 5 Analysis of variance of berberine

变异来源	平方和	均方	F	P
黄连(A)	0.097	0.049	12.098	0.000
吴茱萸(B)	0.174	0.087	1.602	0.000
白芍(C)	0.011	0.006	1.368	0.280
空白列	0.037	0.019	4.653	0.024
误差	0.072	0.004		

注: $f=2$, 表6, 8, 9同。

2.4 巴马汀吸收分数极差分析、方差分析 根据极差的大小,判断各因素对巴马汀吸收分数的影响程度为 $B > A > C$ 。根据均数的大小,确定各因素的最优水平为 $A_1 > A_3 > A_2, B_1 > B_2 > B_3, C_1 > C_2 > C_3$,最优水平组合为 $A_1 B_1 C_1$ 。方差分析结果,黄连、吴茱萸不同水平间有显著的统计学差异 ($P < 0.01$), F 代表了对应因素在整体效应中贡献度的大小,可以看出对巴马汀的吸收分数,3个因素的贡献度依次为 $B > A > C$ 。依据极差分析和方差分析结果,优选出循环灌流中对巴马汀吸收最优的配伍比例为黄连-制吴茱萸-炒白芍 3:1:3,见表6。

表6 巴马汀方差分析

Table 6 Analysis of variance of palmatine

变异来源	平方和	均方	F	P
黄连(A)	0.149	0.074	11.088	0.001
吴茱萸(B)	0.206	0.103	15.361	0.000
白芍(C)	0.011	0.006	0.827	0.453
空白列	0.046	0.023	3.424	0.055
误差	0.121	0.007		

2.5 配伍对小檗碱、巴马汀 K_a 的影响 结果显示,

①单味药之间相比,小檗碱、巴马汀 K_a 均为黄连中剂量 $>$ 黄连低剂量 $>$ 黄连高剂量。②除7号方小檗碱、巴马汀 K_a 高于同剂量单味药之外,其余复方的 K_a 均低于同剂量单味药,提示与吴茱萸、白芍配伍降低了黄连代表成分小檗碱、巴马汀的吸收速度。③黄连低剂量组复方的的小檗碱、巴马汀 K_a 均为1号方 $>$ 2号方 $>$ 3号方,吴茱萸给药量1号方 $<$ 2号方 $<$ 3号方;黄连中剂量组复方的的小檗碱、巴马汀 K_a 均为4号方 $>$ 5号方 $>$ 6号方,吴茱萸给药量4号方 $<$ 5号方 $<$ 6号方;黄连高剂量组复方的的小檗碱、巴马汀 K_a 均为7号方 $>$ 8号方 $>$ 9号方,吴茱萸给药量7号方 $<$ 8号方 $<$ 9号方;提示吴茱萸与小檗碱、巴马汀 K_a 之间为负相关,吴茱萸降低了黄连代表成分小檗碱、巴马汀的吸收速率。见表7。

2.6 循环灌流中小檗碱 K_a 极差分析、方差分析结果 根据极差的大小,判断各因素对小檗碱 K_a 的影响程度为 $B > A > C$ 。根据均数的大小,确定各因素的最优水平为 $A_1 > A_3 > A_2, B_1 > B_2 > B_3, C_1 > C_2 > C_3$,最优水平组合为 $A_1 B_1 C_1$ 。方差分析结果,黄连、吴茱萸不同水平间有显著的统计学差异 ($P < 0.05, P < 0.01$), F 代表了对应因素在整体效应中贡献度的大小,可以看出对小檗碱的 K_a , 3个因素的贡献度依次为 $B > A > C$ 。依据极差分析和方差分析结果,优选出循环灌流中对促进小檗碱吸收的最优配伍比例为黄连-制吴茱萸-炒白芍 3:1:3,见表8。

2.7 循环灌流中巴马汀 K_a 极差分析、方差分析结果 根据极差的大小,判断各因素对巴马汀 K_a 的影响程度为 $B > A > C$ 。根据均数的大小,确定各因素



表7 配伍对中剂量小檗碱、巴马汀 K_a 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Berberine, palmatine value of K_a in different compatibilities ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	小檗碱	巴马汀
黄连低剂量	0.006 7 ± 0.000 3	0.007 8 ± 0.000 3
黄连中剂量	0.008 6 ± 0.000 9	0.009 9 ± 0.000 6
黄连高剂量	0.001 6 ± 0.000 3	0.001 9 ± 0.000 3
1号方	0.002 7 ± 0.000 5 ²⁾	0.003 3 ± 0.000 5 ²⁾
2号方	0.001 9 ± 0.000 2 ²⁾	0.002 4 ± 0.000 2 ²⁾
3号方	0.001 0 ± 0.000 3 ²⁾	0.001 4 ± 0.000 4 ²⁾
4号方	0.001 3 ± 0.000 8 ²⁾	0.001 6 ± 0.001 0 ²⁾
5号方	0.001 1 ± 0.000 5 ²⁾	0.001 2 ± 0.000 6 ²⁾
6号方	0.000 8 ± 0.000 2 ²⁾	0.001 1 ± 0.000 3 ²⁾
7号方	0.002 2 ± 0.001 0	0.002 6 ± 0.001 4
8号方	0.000 8 ± 0.000 2	0.001 0 ± 0.000 2
9号方	0.000 8 ± 0.000 1	0.001 0 ± 0.000 2

表8 小檗碱方差分析

Table 8 Analysis of variance of berberine

变异来源	F	P
黄连(A)	5.890	0.011
吴茱萸(B)	13.361	0.000
白芍(C)	0.124	0.884
空白列	3.093	0.070
误差		

注:平方和均为0,均方均为0,表9同。

的最优水平为 $A_1 > A_3 > A_2, B_1 > B_2 > B_3, C_1 > C_3 > C_2$, 最优水平组合为 $A_1 B_1 C_1$ 。方差分析结果, 黄连、吴茱萸不同水平间有显著的统计学差异 ($P < 0.01$), F 代表了对应因素在整体效应中贡献度的大小, 可以看出对巴马汀 K_a , 3 个因素的贡献度依次为 $B > A > C$ 。依据极差分析和方差分析结果, 优选出循环灌流中对促进巴马汀吸收的最优配伍比例为黄连-制吴茱萸-炒白芍 3:1:3, 见表9。

表9 巴马汀方差分析

Table 9 Analysis of variance of palmatine

变异来源	F	P
黄连(A)	6.498	0.008
吴茱萸(B)	9.205	0.002
白芍(C)	0.109	0.898
空白列	2.552	0.106
误差		

2.8 单味药对小檗碱、巴马汀吸收的影响 综合以

上结果, 得出戊己丸单味药对于小檗碱、巴马汀吸收的影响, 见表10。

表10 单味药对小檗碱、巴马汀吸收的影响

Table 10 Effect of single herb for uptaking of berberine, palmatine

组分	贡献形式			贡献度	最优配伍比例
	A	B	C		
小檗碱	-	负	-	$B > A > C$	A-B-C 3:1:3
巴马汀	-	负	-	$B > A > C$	A-B-C 3:1:3

注:A代表黄连;B代表吴茱萸;C代表白芍。

3 结论

通过对大鼠原位肠肝灌流液中小檗碱、巴马汀检测, 及其吸收分数、吸收速率的分析, 单味药之间相比, 小檗碱、巴马汀吸收分数黄连中剂量 > 黄连低剂量 > 黄连高剂量。极差分析表明, 在戊己丸方剂中黄连(A)、吴茱萸(B)、白芍(C)对小檗碱、巴马汀吸收分数和吸收速率的影响程度为吴茱萸 > 黄连 > 白芍; 从各味药剂量看, 其最优水平为 $A_1 > A_3 > A_2, B_1 > B_2 > B_3, C_1 > C_2 > C_3$; 最优水平组合为 $A_1 B_1 C_1$ 。方差分析结果, 黄连、吴茱萸不同水平间有显著的统计学差异 ($P < 0.01$), 3 个单味药对小檗碱、巴马汀吸收的贡献度依次为 $B > A > C$ 。循环灌流中对小檗碱、巴马汀吸收最优的配伍比例为黄连-制吴茱萸-炒白芍 3:1:3。

4 讨论

自1985年Pang等建立了大鼠原位肠肝灌流模型以来, 许多学者成功的应用该模型研究了药物的吸收、代谢^[4-7]。大鼠原位肠肝灌流模型在药代动力学、药效动力学研究方面具有其独特的优势。①一个动物个体对应一组动态的数据。既减少了动物数; 又减少了实验的系统误差, 提高了实验结果可信度; 还克服了以往监测血药浓度时大鼠血量不足的困难。②较好地保留了肠、肝的完整性, 实验结果具有更高的仿真性。③有助于判断药物是否存在肝肠循环。④目标化合物及其代谢产物保持相对较高的浓度, 有利于药物尤其是活性成分含量较低的中药复方的研究。⑤此模型可以选择不同途径(十二指肠给药或者直接加在灌流液中)给药, 不同部位(门静脉、胆汁、下腔静脉)采样, 可考察肠道菌群和肠黏膜对药物的作用, 也可评价肝脏代谢以及肠、肝的



共同作用,对于探索中药活性成分的代谢部位及整体代谢情况,揭开中药体内“黑箱之谜”具有重要价值。

小檗碱、巴马汀是黄连的主要药效物质,在本实验中,黄连中剂量的吸收分数最高,说明并非剂量越大吸收越好,单味药的吸收存在最佳剂量问题,也可能存在主动转运机制。戊己丸中3味药配伍存在相互作用,吴茱萸影响黄连代表成分小檗碱、巴马汀的吸收,黄连小剂量时,在一定时间内(本试验为1~15 min)促进小檗碱、巴马汀的吸收,在更长的时间内(本试验为30~120 min)抑制小檗碱、巴马汀的吸收,且与吴茱萸的剂量呈负相关。黄连中、高剂量时,则灌流液中小檗碱、巴马汀的量一直处于稳定状态。说明黄连配伍吴茱萸既可在体内迅速达到有效浓度,又可防止其浓度过高而出现毒副作用。

王娅杰等^[8]在研究戊己丸对离体肠管的运动的实验中发现,组成戊己丸的3味药的不同配伍组合,在作用强度或起效时间上明显不同。可与本研究结果相互印证。本试验结果显示吴茱萸配比最小时,黄连中小檗碱、巴马汀的吸收分数最高,与之吻合。

吸收仅仅是机体对药物处置过程的第1步,还应继续追踪在代谢、分布、排泄、药物-药物相互作用中配伍到底起了哪些作用,才能够更加科学的解释

中药配伍,更加全面的评价配伍的理论精髓。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010:637.
- [2] 王素军,张志伟,赵艳红. 建立大鼠原位肠-肝灌流模型评价绿原酸的代谢[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(12):1340.
- [3] Pang K S, Cherry W F, Ulm E H. Disposition of enalapril in the perfused rat intestine-liverpreparation: absorption, metabolism and first-pass effect [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1985, 233: 788.
- [4] Hiroki H, Pang K S. First-pass metabolism of gentisamide: influence of intestinal metabolism on hepatic formation of conjugates [J]. Drug Metab Dispos, 1990, 18(5):580.
- [5] Zimmerman C L, Ratna S, Leboeuf E. High-performance liquid chromatographic method for the direct determination of 4-methylumbelliferone and its glucuronide and sulfate conjugates [J]. J Chromatogr B, 1991, 563(1):83.
- [6] Jeffrey P, Tucker G T, Bye A, et al. The site of inversion of R(-)-ibuprofen: studies using rat *in-situ* isolated perfused intestine/liver preparations [J]. J Pharm Pharmacol, 1991, 43(10): 715.
- [7] 李桦,阮金秀,杨进生. T2毒素在灌流大鼠肠肝中的首过效应和代谢动力学[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1992, 6(2):137.
- [8] 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.

Impact on absorption of berberine and palmatine in different compatibilities of Wuji pill

WANG Yiwei¹, LI Yujie¹, WANG Yanli¹, YANG Weipeng¹, CHEN Ying¹, Zhang Dong¹,
YANG Qing¹, ZHANG Yingfeng², LI Tao¹, ZHU Xiaoxin^{1*}

(1. China Academy of Chinese Medical Sciences, Institute of Chinese Materia Medica, Beijing 100700, China;
2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the impact on absorption of berberine and palmatine in different compatibilities of Wuji pill by the perfused rat intestine-liver preparation. **Method:** Use $L_9(3^4)$ orthogonal design table, establish the perfused rat intestine-liver preparation, the twelve Wuji pill compatibilities duodenal administrated, collect the perfusate at different times points for LC-MS detection, calculate the absorbed score, K_a . **Result:** Evodiae Fructus and the absorption score, K_a of berberine and palmatine are inverse correlated. The most superior portion which promote the absorption is Coptidis Rhizoma-Evodiae Fructus-Paeoniae Radix Alba 3:1:3. **Conclusion:** Evodiae Fructus suppressed the absorption of berberine and palmatine. With the different portion the absorption also have big different.

[Key words] perfused rat intestine-liver preparation; Wuji pill; berberine; palmatine; absorption fraction; bioavailability; K_a

doi:10.4268/cjcmm20120725

[责任编辑 陈玲]