

豆浆对豆科中药吸收特性的影响及相关机制研究

凌霄^{1,2,3}, 张辉^{1,2,3}, 李伟霞^{1,2,3}, 唐进法^{1,2,3}, 李春晓^{1,2,3}, 王晓艳^{1,2,3}, 李学林^{1,2,3} (1.河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000; 2.中药临床评价技术河南省工程实验室, 郑州 450001; 3.呼吸疾病中医药防治部共建协同创新中心, 郑州 450001)

摘要: 目的 探讨中国特色饮食豆浆对豆科中药吸收的影响, 指导临床用药期间合理饮食。方法 采用药动学研究豆浆对豆科中药葛根、黄芪、甘草和槐花中代表性功效成分(黄酮类)体内吸收的影响; 在体肠灌注考察豆浆对功效成分肠吸收的影响及其随时间的变化规律; 外翻肠囊法和酶抑制剂法考察 P-gp 和 MRP2 蛋白在此过程中的作用; UHPLC-QQQ-MS/MS 检测血浆和肠液中葛根素、芦丁、甘草苷和刺芒柄花素的含量, 计算各成分在大鼠药动学参数、各肠段的累计吸收量和吸收速率常数。结果 豆浆显著降低各功效成分在大鼠体内的 AUC_{0-t} , C_{max} , 豆浆和药液同时灌注可显著抑制 4 个功效成分在各肠段的吸收, 预灌注豆浆 2 h 也显著抑制葛根素、刺芒柄花素、甘草苷的吸收, 预灌注 0.5 h 和 1 h 再灌注药液对各功效成分吸收无显著影响。维拉帕米和丙磺舒对这 4 种成分的累计吸收量、吸收速率常数和表观渗透率无显著影响。结论 豆浆显著抑制了葛根、黄芪、甘草、槐花中黄酮类成分在大鼠体内的吸收转运, 此作用可能和 P-gp、MRP2 无关, 具体的作用机制仍需进一步研究。服用含豆科中药的药物时应避免同时服用大豆类食物。

关键词: 豆浆; 食物药物相互作用; 豆科中药; 在体肠灌注; 外翻肠囊法; UHPLC-MS/MS

中图分类号: R285.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)15-1826-11

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.15.006

引用本文: 凌霄, 张辉, 李伟霞, 等. 豆浆对豆科中药吸收特性的影响及相关机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(15): 1826-1836.

Study on the Effect of Soybean Milk on the Intestinal Absorption Characteristics of Legumes Traditional Chinese Medicine and Relevant Mechanism

LING Xiao^{1,2,3}, ZHANG Hui^{1,2,3}, LI Weixia^{1,2,3}, TANG Jinfa^{1,2,3}, LI Chunxiao^{1,2,3}, WANG Xiaoyan^{1,2,3}, LI Xuelin^{1,2,3} (1.The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 2.Henan Province Engineering Laboratory for Clinical Evaluation Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450001, China; 3.Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Respiratory Diseases, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the effect of Chinese dietary soybean milk on intestinal absorption of legume traditional Chinese medicine, and to guide the rational diet during clinical medication. **METHODS** Pharmacokinetics was used to study the effect of soybean milk on the absorption *in vivo* of the representative flavonoids of Puerariae Lobatae Radix, Astragali Radix, Glycyrrhiza Radix et Rhizoma and Sophorae Flos. *In vivo* intestinal perfusion was used to study the effect of soybean milk on the absorption of the effective ingredients and its change rule with time. Eversion intestinal sac method and enzyme inhibitor method were used to study the effect of P-gp and MRP2 protein in this process. UHPLC-QQQ-MS/MS method was used to detect the contents of puerarin, rutin, glycyrrhizin and anthocyanin in plasma and intestinal fluid and the pharmacokinetic parameters, cumulative absorption capacity and absorption rate constant of each component in rats were calculated. **RESULTS** Soybean milk significantly reduced the AUC_{0-t} , C_{max} of the functional components in rats. The simultaneous perfusion of soybean milk and liquid medicine could significantly inhibit the absorption of the four functional components in each intestinal segment. The pre-perfusion of soybean milk for 2 h also significantly inhibited the absorption of puerarin, anthocyanin and glycyrrhizin. The pre-perfusion of 0.5 h and 1 h had no significant effect on the absorption of the functional components. Verapamil and probenecid had no significant effect on the cumulative absorption, absorption rate constant and apparent permeability of the four components. **CONCLUSION** Soybean milk significantly inhibit the absorption and transport of flavonoids from Puerariae Lobatae Radix, Astragali Radix, Glycyrrhiza Radix et Rhizoma and Sophorae Flos in rats *in vivo*, which may not be related to P-gp and MRP2. The specific mechanism of action needs further study. When taking drugs containing legumes, it is avoided to taking soybean milk at the same time.

KEYWORDS: soybean milk; food-drug interaction; legume traditional Chinese medicine; intestinal perfusion *in vivo*; everted gut sac; UHPLC-MS/MS

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(19A360004); 中国博士后科学基金项目(2019M652549); 河南省中医药科学研究专项课题(2017JDZX039)

作者简介: 凌霄, 女, 博士, 主管药师 Tel: (0371)66245274 E-mail: tanglima@126.com

食物-药物相互作用(food-drug interaction, FDI)是美国食品与药品管理局规定的新药申报资料中的重要内容^[1],已有大量研究表明食物可以和药物产生相互作用,影响药效甚至造成安全隐患^[2-6]。但目前 FDI 研究主要集中在西方常见饮食如酒、咖啡、高动物蛋白饮食、乳制品,关于中国居民特色饮食对药物影响的研究较少。豆浆是中国人常用早餐饮品,含有大量黄酮类化合物,与许多豆科来源的中药饮片在成分上有高度的相似性。如甘草中已发现了 10 大类 60 多种甘草黄酮类化合物^[7-9],黄芪中含有芒柄花素、毛蕊异黄酮等多种黄酮类成分^[10-11],葛根中的主要成分葛根素、大豆苷、染料木苷、染料木素^[12-13]等均为异黄酮类成分,槐花的标志性成分芦丁也是广泛存在于植物中的黄酮类化合物。现代研究发现,有相似构型的化合物在酶代谢转运中可能互相影响^[14],但关于豆浆对上述药食同源豆科中药的作用鲜有报道。因此,本研究采用药动学、在体肠灌注和外翻肠囊法,探寻豆浆对豆科中药吸收的影响及机制,以期能够为服用豆科中药人群的合理饮食提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

TSQ Endura & Quantiva 热质谱仪、Vanquish Horizon UHPLC 色谱仪均购自赛默飞;KQ-500E 超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);BT125D 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司);DE12G13 型豆浆机(美的集团)。

1.2 药品与试剂

葛根素(批号:110752-201816;纯度:95.4%)、甘草苷(批号:111610-201908;纯度:95.0%)、芦丁(批号:100080-201811;纯度:92.2%)、黄芩苷(批号:110715-202122;纯度:94.2%)、盐酸维拉帕米(批号:100223-200102;纯度:99.5%)、丙磺舒(批号:101113-201101;纯度:99.5%)均购自中国食品药品检定研究院;刺芒柄花素(成都普菲德生物技术有限公司,批号:17071203;纯度>99%)。Tyrode 液(分别精确称取 NaCl 8.0 g, KCl 0.28 g, MgCl₂ 0.1 g, NaHCO₃ 1.0 g, NaH₂PO₄ 0.05 g, 溶于 500 mL 的水中,密闭冷藏;精确称取 CaCl₂ 0.2 g 溶于 500 mL 水中密闭冷藏;临用前将二者均匀混合,加入葡萄糖 1.0 g 即得)。甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯),均购自美国 J.T.Baker 公司;纯净水(屈臣氏饮用水,广州屈臣氏食品饮料有限公司);甲酸、

磷酸试剂均为分析纯。所用中药饮片经河南中医药大学第一附属医院药学部药检室施钧瀚副主任药师鉴定,葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobate* (Willd) Ohwi 的干燥根,槐花为豆科植物槐 *Sophora japonica* L. 的干燥花及花蕾,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch 的干燥根和根茎。

1.3 动物

SD 大鼠,65 只,♂,体质量(240±10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0011,所有程序均按照动物使用和护理的伦理原则进行。

1.4 方法

1.4.1 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相为 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min, 20%→100%B; 5~6 min, 100%B; 6~6.1 min, 100%→20%B; 6.1~9 min, 20%B),进样量 1 μL,流速 0.2 mL·min⁻¹。

质谱检测条件:ESI 离子源;毛细管电压:3 500 V;雾化器压力:25 psi;干燥气流温度:325 °C;干燥气流速度:7.0 L·min⁻¹,碰撞气微高纯氮气,采集模式:多反应监测(MRM)模式。分别采用全扫描、选择性离子扫描和子离子扫描模式,确定各化合物的母离子和子离子。通过优化各化合物的毛细管出口电压和碰撞能的优化确定定量离子对(母离子→子离子)。分析成分和内标的最优 MRM 参数见表 1,化合物结构、二级质谱图见图 1。

表 1 分析物及内标的 MS 参数

Tab. 1 MS parameters of analyte and internal standard

化合物	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	驻留时间/ ms	碎裂电压/ V	碰撞能/ eV	采集 模式
葛根素	417.0	297.0	200	66.0	26.0	+
刺芒柄花素	269.0	237.0	200	80.0	21.0	+
甘草苷	417.0	255.0	200	69.0	21.0	-
黄芩苷(内标)	447.0	271.0	200	60.0	21.0	+
芦丁	609.0	271.0	200	120.0	21.0	-

1.4.2 溶液的制备

1.4.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷对照品适量,加甲醇溶液制成每 1 mL 含葛根素 2.5 mg、刺芒柄花素 2.82 mg、芦丁 2.58 mg 和甘草苷 2.83 mg 的混合对照品母液。精密吸取混合对照品母液,按不同比例加入甲醇溶液稀释,制成一系列浓度的对照品溶液,用于方法学考察和质控样品的制备。

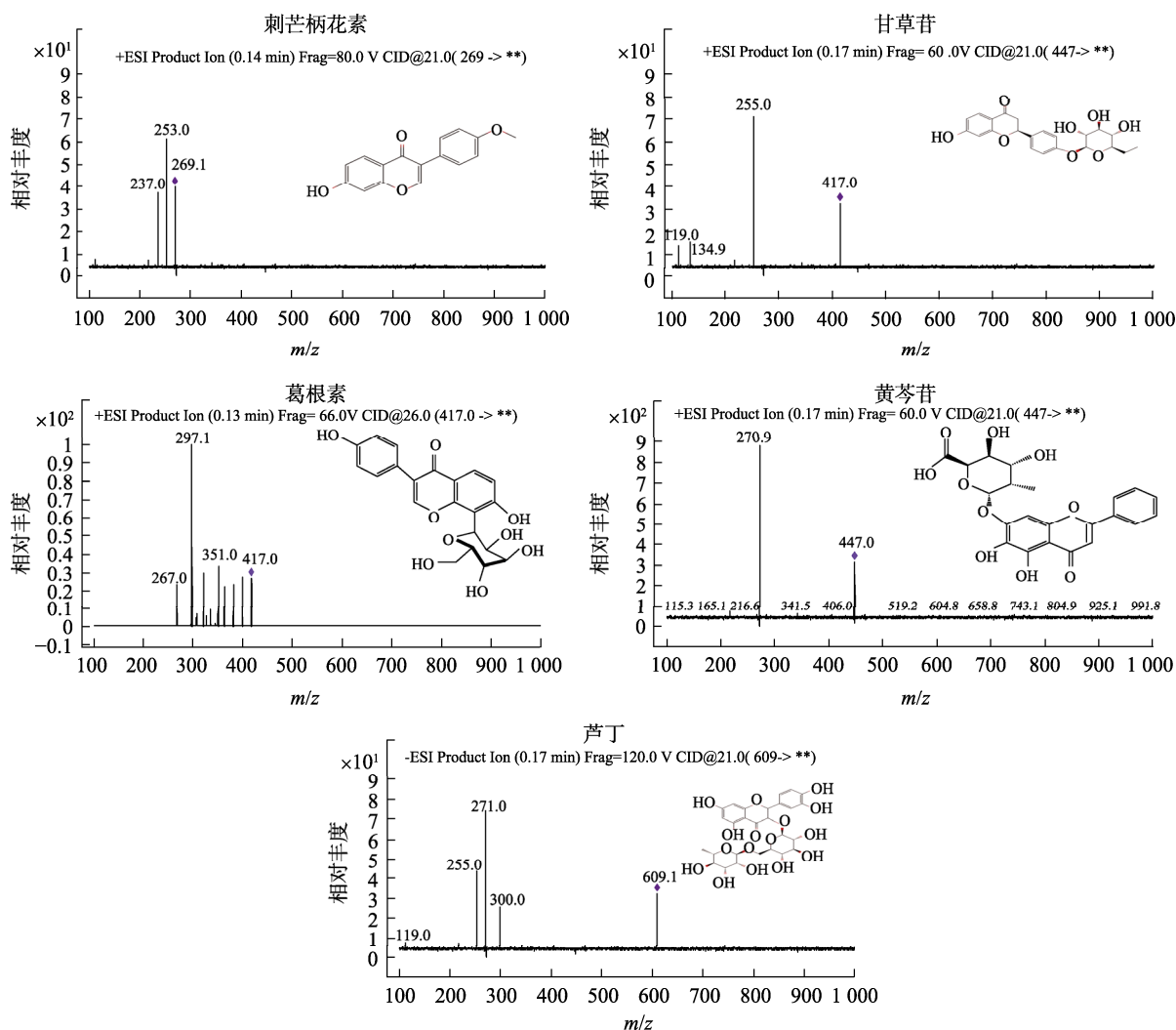


图1 分析物(葛根素、刺芒柄花素、甘草苷、芦丁)和内标(黄芩苷)的结构式和二级质谱图

Fig. 1 Structural formula and secondary mass spectrum of analytes(puerarin, anthocyanin, glycyrrhizin, rutin) and internal standard(baicalin)

1.4.2.2 豆浆和药液制备 称取葛根、黄芪、槐花、甘草各 10 g, 加 5 倍水浸泡 0.5 h 后, 煎煮 2 次, 每次 1 h, 合并滤液, 冷冻干燥得提取物。采用本研究中建立的肠液样本 UHPLC-MS/MS 检测方法对药液冻干粉中的葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷进行含量测定, 待测样品制备方法同肠液质控样品的制备。经含量测定, 提取物中各化学成分的含量分别为葛根素 $31.20 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、刺芒柄花素 $1.03 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、芦丁 $5.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、甘草苷 $4.21 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

豆浆用市售家用豆浆机制备, 在豆浆机中加入 100 g 大豆和 1 000 mL 水, 采用自动程序制备豆浆。

1.4.3 血浆和肠液样品预处理 2 mL EP 管中加入血浆/肠液样品 100 μL , 精密移取内标(黄芩苷)工作溶液(20 μL , $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)加入血浆/肠液样品, 涡流 30 s, 加入 500 μL 甲醇溶液, 涡流 3 min, $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层溶液, 在氮气

流下吹干。残留物用 200 μL 甲醇复溶, 涡流 2 min, $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清进行 UHPLC-MS/MS 检测分析。

1.4.4 药动力学试验 12 只 SD 大鼠, δ , 试验前 12 h 禁食不禁水, 随机分为 2 组, 单独服用豆科中药水煎液组和同时服用豆浆和豆科中药水煎液组。2 组均口服豆科中药水煎液冻干粉悬液(相当于 $3.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 葛根素, $0.51 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甘草苷, $0.98 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 刺芒柄花素, $6.80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 芦丁)。给药后分别于 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 眼眶静脉丛采血约 0.5 mL 于加有肝素钠的抗凝管中, 于 4°C 下离心($5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 取上层血浆, -20°C 保存待测。

1.4.5 大鼠在体肠灌注流试验^[15-16] 给药前 12 h 大鼠禁食不禁水, 用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉($0.38 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)后打开腹腔, 小心分离十二指肠、

回肠、空肠和结肠,各肠段取 10 cm,两端切口插管,结扎。将各肠段与蠕动泵形成回路。先将恒流泵调至 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速并用 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的生理盐水冲洗肠道至无内容物为止,排空肠道内的水分,取 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 不同浓度灌流液,将恒流泵调至 $0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速平衡 15 min,之后在不同时间段(30~45, 45~75, 75~120, 120~150 min)收集灌流液 1 mL。然后将灌流肠段剪下,测量长度和内径。所取的灌流液样品按“1.4.3”项下方法处理分析。

1.4.5.1 不同质量浓度药液对葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷肠吸收的影响 取“1.4.2.2”项下制备的水煎液冻干粉,用 Tyrode 液溶解,制成高、中、低 3 个浓度的灌流液。按“1.4.5”项下方法进行在体单向肠灌流试验,计算不同质量浓度下功效成分的肠吸收动力学参数。

1.4.5.2 豆浆对葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷肠吸收的影响 按“1.4.5”项下方法,分别研究单独豆科中药水煎液,豆科中药水煎液+豆浆同时灌流,预先灌流豆浆 0.5, 1, 2 h 后,再单独灌流豆科中药水煎液(相当于 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 葛根素, $0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 刺芒柄花素, $0.57\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芦丁, $0.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甘草苷),考察豆浆对葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷肠吸收的影响及其随时间变化的规律。其中预先灌流豆浆 0.5, 1, 2 h,方法为先用豆浆进行灌流后,用生理盐水冲洗肠道,再进行药液灌流。

1.4.6 豆浆对豆科水煎液吸收影响的机制研究 采用大鼠外翻肠囊法^[17-18]和 P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)、多药耐药相关蛋白-2(multidrug resistance associated protein-2, MRP2)抑制剂法,研究豆浆对豆科中药肠吸收影响的机制。将 SD 大鼠随机分为单独给药组、豆浆+中药组、维拉帕米+中药组和丙磺舒+中药组。每组 SD 大鼠试验前 12 h 禁食不禁水,脱颈处死,取空肠 10 cm,放入 Tyrode 液中冲洗,直到没有内容物流出,将肠管一端结扎于塑料套管,小心将肠管翻转,用 Tyrode 液冲洗后将另一端结扎,使之形成囊状肠管。向肠囊内注入 2 mL 空白 Tyrode 液,将其放入已有 Tyrode 液的麦氏浴槽中,试验过程中保持 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温,并向浴槽中通入 $95\%\text{O}_2$ 和 $5\%\text{CO}_2$ 的混合气体,平衡 5 min 后,将麦氏浴槽中的 Tyrode 液倒出,待用。

参照“1.4.2.2”项下方法制备供试药液 20 mL,注入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 麦氏浴槽中,用 Tyrode 液调整药液浓度

相当于 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 葛根素, $0.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 刺芒柄花素, $0.57\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芦丁, $0.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甘草苷,分别于 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 从肠囊内取样 200 μL ,同时补充等体积的 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Tyrode 液。样品放入干净的离心管中,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封保存,待用。

1.4.7 方法学考察

1.4.7.1 药效学实验质控样品制备 将空白血液按“1.4.3”项下方法处理后分别加入高、中、低浓度的对照品溶液复溶,以获得质控样品。葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷的校准对照品的最终浓度分别为 $1\ 000, 100, 5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $500, 100, 5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $1\ 000, 100, 5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $200, 100, 5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。所有溶液在使用前均在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存。质控样品储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。

1.4.7.2 肠吸收试验质控样品的制备 将空白肠液经“1.4.6”项下方法处理后分别加入高、中、低浓度的对照品溶液复溶,以获得质控样品。葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷的校准标准样品的最终浓度分别为 $1\ 250, 150, 30\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $2\ 800, 250, 30\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $2\ 500, 300, 50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $2\ 500, 45, 15\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。所有溶液在使用前均在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存,质控样品储存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。

1.4.7.3 血浆和肠液样本检测方法学考察 按照《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》^[19]对本研究建立的定量检测法进行专属性、线性、基质效应、回收率、准确度、精密度和稳定性考察。专属性及线性考察:取 SD 大鼠空白血浆/肠液(来自 6 只不同来源的 SD 大鼠)进行分析,评价各待测功效成分、内标出峰时间是否存在干扰。通过在血浆/肠液中制备 8 种不同浓度的样品来评价线性关系,使用上述标准肠液样品制备校准曲线,并使用 $1/x^2$ 加权线性最小二乘回归模型,根据葛根素、刺芒柄花素、甘草苷和芦丁与内标的峰面积比与浓度的关系构建校准曲线。

基质效应和回收率试验:将空白血浆/肠液按照“1.4.3”项下方法处理后,用高、中、低浓度对照品溶液复溶进样后所得峰面积为分子;对应浓度的对照品溶液直接进样后所得峰面积为分母进行计算基质效应,平行 6 份,考察该方法是否有明显离子增强或抑制效应。取高、中、低浓度质控样品,按“1.4.3”项下方法处理后,所得峰面积与空白血浆/肠液处理后加相应对照品进样所得峰面积相比,计算该方法的提取回收率。

准确度、精密度试验：制备高、中、低 3 个质控浓度的模拟含药血浆/肠液样本(平行处理 6 份)，以各分析批内随行标曲计算日间和日内准确度和精密度，结果分别以相对误差(relative error, RE)和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示。

稳定性试验：取高、中、低浓度质控样品，平行 6 份，按“1.4.3”项下方法处理，考察在上述条件下，各功效成分的稳定性。方法为将制备好的待测液室温放置 12 h；血浆/肠液样本经反复冻融 3 次；血浆/肠液样本在-20℃中放置 28 d，血浆/肠液样本在室温放置 10 h。

1.4.8 数据处理

1.4.8.1 药动学参数计算 血浆药物浓度时间数据应用 PKsolver2.0 软件^[20]，采用非房室模型计算 AUC_{0-t} 、 MRT_{0-t} 、 $t_{1/2z}$ 、 C_{max} 和 T_{max} 等药动学参数。多组之间主要药动学参数的均数比较采用 SPSS 软件，进行独立样本的 t 检验， $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.4.8.2 肠吸收参数计算 在体单向肠灌注模型采用重量分析法对灌注液的流入和流出体积进行校正^[21-22]，消除体积变化的影响，进而计算吸收速率常数(K_a)，和表观渗透率 P_{app} 。

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{Q_{out}}{Q_{in}} \right) \frac{Q}{V}$$

$$P_{app} = Q \ln \left(\frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{Q_{out}}{Q_{in}} \right) \cdot \frac{1}{2\pi r l}$$

其中 Q_{in} 、 Q_{out} 为灌注液进入肠段和流出肠段的体积； C_{in} 、 C_{out} 为豆科中药水煎液各个成分进入肠段时和流出肠段时的浓度； l 为肠段的长度； r 为肠道半径； Q 为灌注速度，即 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ； V 为肠段的体积。

外翻肠囊法根据以下公式计算单位面积药物累计吸收量(Q ， $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)、药物吸收速率常数(K_a ， $\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$)和表观渗透系数(P_{app} ， $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$)^[17-18]。

$$Q = \left(C_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i \right) \cdot \frac{1}{V} \quad K_a = \frac{dQ}{dt}$$

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{C_0}$$

其中， C_0 为肠囊供试液的初始浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)； C_n 为 n 时间点的实际检测浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)； C_i 为样品浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)； V 为肠道中灌入模拟肠液(K-R Solution)的体积(mL)，即为 10 mL； A 为肠段总面

积(cm^2)。

各个时间点浓度数据运用 IBM SPSS Statistics 20.0 软件，对不同组别之间 P_{app} 和 K_a 的差异对比采用单因素方差分析(One-way ANOVA)， $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。2 组两两之间的比较则采用独立样本 t 检验， $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 豆浆对豆科中药药动学参数的影响

葛根素、芦丁、甘草苷和刺芒柄花素在 2 组大鼠体内的药时曲线比较相似，结果见图 2。葛根素血药浓度在给药后 1 h 内迅速上升，给药后 0.25 h 就达到血药浓度峰值，在 0.25~2 h 内血药浓度保持一个较高水平，4~24 h 间葛根素浓度快速下降。但从药动参数分析，豆浆显著降低了葛根素在大鼠体内的 AUC_{0-t} [(428.41±93.01) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ vs (197.08±23.57) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$]， MRT_{0-t} [(5.74±1.51)h vs (4.12±0.21)h] 和 C_{max} [(79.42±9.42) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs (41.77±6.94) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$]，结果见表 2。

芦丁血药浓度在给药后上升较快，在 1 h 达到血药浓度峰值，随后从 2~24 h 内，芦丁血药浓度快速下降，而同时服用豆浆后，芦丁在大鼠体内的 AUC_{0-t} [(424.53±119.44) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ vs (253.42±74.12) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$] 和 C_{max} [(98.33±5.59) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs (59.59±7.84) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$] 均显著降低，而 V_z/F [(0.11±0.05) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ vs (0.18±0.06) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$] 和 Cl/F [(0.015 1±0.004 2) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ vs (0.024 8±0.006 9) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] 显著增加。提示服用豆浆抑制芦丁体内吸收，加速了其体内清除过程，结果见表 2。

刺芒柄花素血药浓度在给药后缓慢上升，在给药后 2 h 到达血药浓度峰值，随后血药浓度快速下降，刺芒柄花素的 AUC_{0-t} [(457.96±117.85) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ vs (260.41±68.74) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$]， C_{max} [(69.08±7.71) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs (46.06±7.45) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$] 和 $t_{1/2}$ [(7.02±3.35)h vs (4.42±3.45)h] 在同时服用豆浆组显著低于单独服用豆科中药水煎液组，结果见表 2。

甘草苷血药浓度在给药后迅速上升，给药后 0.5 h 到达血药浓度峰值，随后血药浓度快速下降，给药 6 h 后血药浓度已经基本检测不到。根据药动参数分析，服用豆浆后也显著抑制了甘草苷的吸收，甘草苷在大鼠体内的 AUC_{0-t} [(179.03±37.88) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ vs 88.43±20.92) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$]， C_{max} [(74.45±13.78) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs (41.19±7.03) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$] 和 MRT_{0-t} [(2.25±0.26)h vs (1.83±0.33)h] 在服用豆浆后均显著降低，结果见表 2。

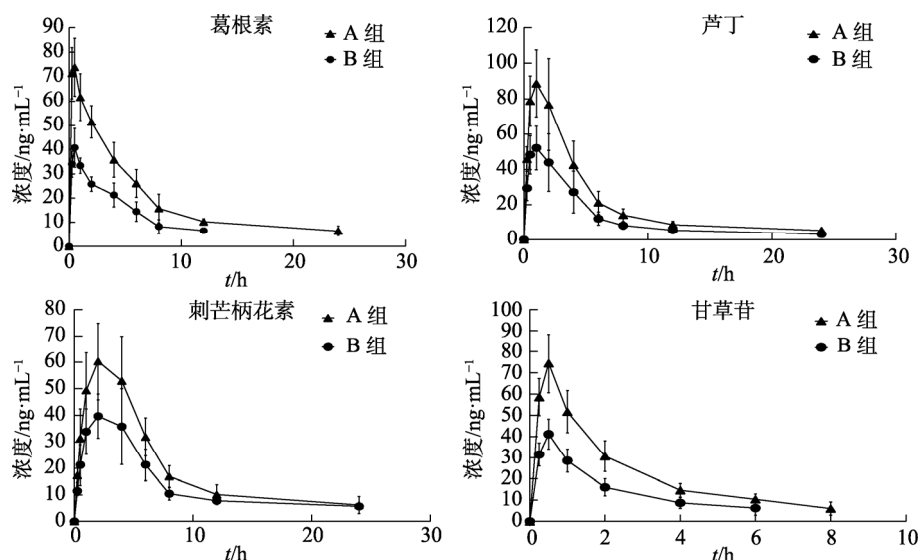


图2 灌胃给予豆科中药水煎液后大鼠体内葛根素、芦丁、刺芒柄花素和甘草苷的药时曲线图($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A组-单独给药组; B组-豆浆+中药组。

Fig. 2 Time curves of puerarin, rutin, anthocyanin and glycyrrhizin in rats after oral administration of decoction of legume($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group A-single drug group; group B-soybean milk + traditional Chinese medicine group.

表2 葛根素、刺芒柄花素、芦丁、甘草苷口服给药后大鼠体内药动学参数($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 2 Pharmacokinetic parameters of puerarin, anthocyanin, rutin and glycyrrhizin in rats after oral administration($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分析物	分组	AUC _{0-∞} /ng·mL ⁻¹ ·h	MRT _{0-∞} /h	t _{1/2} /h	T _{max} /h	C _{max} /ng·mL ⁻¹	Vz/F/mg·kg ⁻¹	Cl/F/mg·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
葛根素	A	428.41±93.01 ¹⁾	5.74±1.51 ¹⁾	8.64±4.33 ¹⁾	0.33±0.13	79.42±9.42 ¹⁾	0.07±0.03	0.006 0±0.001 3 ¹⁾
	B	197.08±23.57	4.12±0.21	4.91±1.83	0.42±0.13	41.77±6.94	0.08±0.03	0.012 4±0.001 3
刺芒柄花素	A	457.96±117.85 ¹⁾	5.93±1.54	7.02±3.35 ¹⁾	2.50±1.22	69.08±7.71 ¹⁾	0.02±0.01	0.002 0±0.000 7
	B	260.41±68.74	4.54±1.65	4.42±3.45	2.50±1.22	46.06±7.45	0.02±0.01	0.003 5±0.001 1
芦丁	A	424.53±119.44 ¹⁾	3.85±0.93	4.98±1.84	1.17±0.68	98.33±5.59 ¹⁾	0.11±0.05 ¹⁾	0.015 1±0.004 2 ¹⁾
	B	253.42±74.12	3.87±0.92	5.60±2.08	1.17±0.68	59.59±7.84	0.18±0.06	0.024 8±0.006 9
甘草苷	A	179.03±37.88 ¹⁾	2.25±0.26 ¹⁾	2.56±0.62	0.50±0.11	74.45±13.78 ¹⁾	0.01±0.003 0	0.002 6±0.000 5 ¹⁾
	B	88.43±20.92	1.83±0.33	2.30±0.83	0.50±0.11	41.19±7.03	0.02±0.003 2	0.004 9±0.001 5

注: A-单独给药豆科中药水煎液组; B-同时服用豆浆和豆科中药水煎液组; 与B组相比, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Note: A-treated with traditional Chinese medicine decoction alone; B-treated with soybean milk and traditional Chinese medicine decoction at the same time; compared with group B, ¹⁾ $P<0.05$.

2.2 不同质量浓度对葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷肠吸收的影响

各功效成分在十二指肠和空肠的吸收较好,回肠和结肠的吸收较差。其中葛根素、甘草苷的 K_a 和 P_{app} 随着浓度增加而增加,但存在高浓度饱和现象,提示葛根素和甘草苷除被动扩散外,在各肠段还存在主动转运。芦丁的 K_a 和 P_{app} 随着浓度增加而增加,且不存在高浓度饱和现象,提示芦丁在肠道吸收以被动扩散为主。刺芒柄花素的 K_a 和 P_{app} 与浓度无明显相关,提示刺芒柄花素在肠道吸收以主动转运为主。结果见表3。

2.3 豆浆对葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷肠吸收的影响及其随时间变化的规律

豆浆和药液同时灌流显著抑制葛根素、刺芒柄花素、芦丁、甘草苷在各肠段的吸收,预灌流豆浆2 h也显著抑制葛根素、刺芒柄花素、甘草苷

在各肠段的吸收,但各功效成分肠吸收优于和豆浆同时灌流。预灌流0.5 h和1 h再灌流药液对各功效成分吸收无显著影响。结果见表4~5。

2.4 不同给药组主要功效成分空肠累计吸收量比较

4种功效成分在单独给药组、维拉帕米+中药组、丙磺舒+中药组各时间点的 Q_{tn} 无统计学差异,但豆浆+中药组的 Q_{tn} 相比其他3组显著降低($P<0.01$)。结果见图3。

2.5 各成分在不同给药组的肠吸收速率

4个化学成分 Q_{tn} 与时间的相关系数(R^2)均 >0.9 ,表明这4个成分在各给药组的肠吸收均为线性吸收,符合零级吸收速率。葛根素、刺芒柄花素、芦丁、甘草苷在单独给药组,维拉帕米+中药组,丙磺舒+中药组的空肠中, K_a 和 P_{app} 不具有显著性差异,而在豆浆+中药组中,4种功效成分的 K_a 和 P_{app} 与其他3组比显著降低。结果见表6。

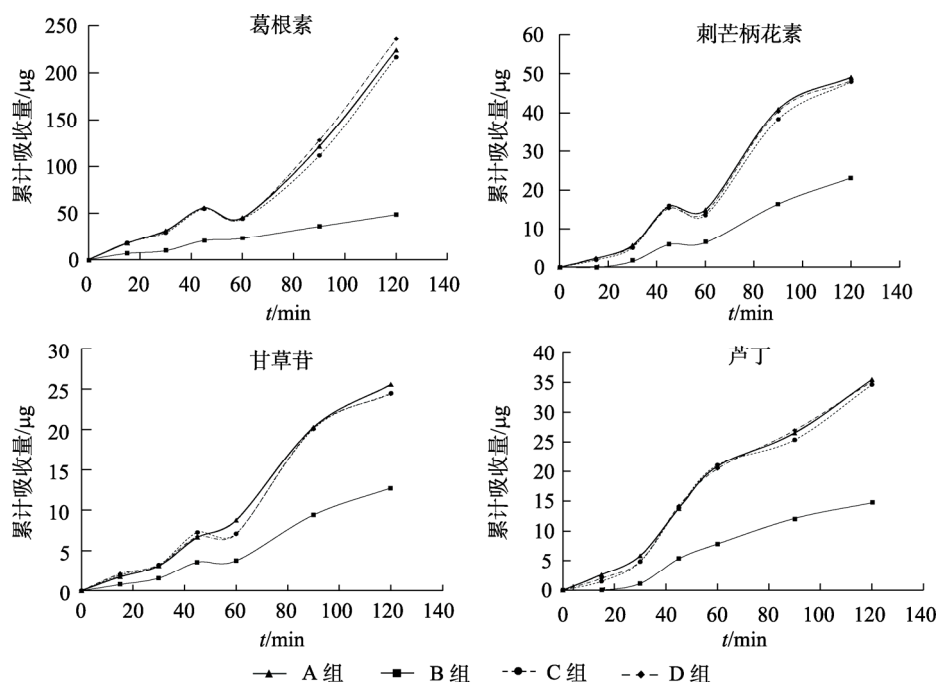


图3 葛根素、刺芒柄花素、甘草苷、芦丁在不同给药组大鼠空肠段的累计吸收量

A组-单独给药组; B组-豆浆+中药组; C组-维拉帕米+中药组; D组-丙磺舒+中药组。

Fig. 3 Accumulative absorption of puerarin, anthocyanin, glycyrrhizin and rutin in jejunum of rats in different administration groups

Group A-single drug; group B-soybean milk + traditional Chinese medicine; group C-verapamil + traditional Chinese medicine; group D-probenecid+ traditional Chinese medicine.

表3 不同质量浓度的豆科植物水煎液在大鼠各肠段吸收参数($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 3 Absorption parameters of different concentrations of aqueous extracts of legumes in different intestinal segments of rats($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

功效成分	质量浓度/ mg·mL ⁻¹	肠段	$K_a/\times 10^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$	$P_{app}/\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$	功效成分	质量浓度/ mg·mL ⁻¹	肠段	$K_a/\times 10^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$	$P_{app}/\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$
葛根素	0.05	十二指肠	1.127 1±0.088 8 ¹⁾	0.148 4±0.069 9 ¹⁾	芦丁	0.25	十二指肠	0.277 9±0.077 8 ¹⁾	0.060 6±0.071 0 ¹⁾
		回肠	0.874 4±0.120 6 ¹⁾	0.122 2±0.077 8 ¹⁾			回肠	0.272 5±0.034 4 ¹⁾	0.060 0±0.070 5 ¹⁾
		空肠	1.594 3±0.109 9 ¹⁾	0.196 6±0.072 8 ¹⁾			空肠	0.460 6±0.037 8 ¹⁾	0.079 3±0.070 8 ¹⁾
		结肠	0.573 3±0.120 1 ¹⁾	0.058 9±0.012 3 ¹⁾			结肠	0.180 4±0.024 8 ¹⁾	0.018 6±0.031 0 ¹⁾
	0.10	十二指肠	2.016 0±0.160 2	0.210 8±0.025 2		0.57	十二指肠	0.488 0±0.141 8 ¹⁾	0.050 7±0.017 4 ¹⁾
		回肠	1.584 9±0.208 4	0.167 1±0.023 5			回肠	0.505 7±0.061 8 ¹⁾	0.053 0±0.006 3 ¹⁾
		空肠	3.040 0±0.197 5	0.302 2±0.029 9			空肠	0.694 1±0.040 5 ¹⁾	0.068 9±0.010 6 ¹⁾
		结肠	1.291 5±0.086 6	0.136 1±0.029 7			结肠	0.385 6±0.029 1 ¹⁾	0.050 4±0.071 7 ¹⁾
	0.30	十二指肠	2.140 1±0.179 9	0.212 5±0.028 4		0.80	十二指肠	0.844 8±0.260 0	0.064 9±0.046 2
		回肠	1.645 4±0.220 2	0.162 7±0.023 4			回肠	0.737 5±0.090 1	0.054 1±0.039 5
		空肠	3.072 4±0.138 6	0.305 9±0.029 5			空肠	0.830 5±0.035 5	0.082 4±0.032 6
		结肠	1.101 0±0.088 9	0.119 4±0.013 4			结肠	0.403 0±0.020 5	0.042 3±0.044 9
刺芒柄花素	0.025	十二指肠	1.828 4±0.088 5	0.221 0±0.072 8	甘草苷	0.1	十二指肠	0.849 4±0.102 6 ¹⁾	0.119 4±0.079 0 ¹⁾
		回肠	1.086 8±0.067 0	0.144 2±0.074 8			回肠	0.676 7±0.067 4 ¹⁾	0.101 8±0.074 3 ¹⁾
		空肠	3.022 2±0.152 5	0.285 6±0.084 2			空肠	1.474 2±0.021 8 ¹⁾	0.137 6±0.076 4 ¹⁾
		结肠	1.067 3±0.072 4	0.110 2±0.010 3			结肠	0.401 7±0.141 1 ¹⁾	0.041 8±0.059 4 ¹⁾
	0.05	十二指肠	1.676 0±0.079 2	0.174 4±0.004 4		0.25	十二指肠	1.612 0±0.114 5	0.179 6±0.037 8
		回肠	1.090 2±0.061 1	0.114 7±0.008 0			回肠	1.289 6±0.091 5	0.135 7±0.010 9
		空肠	2.748 1±0.081 7	0.274 1±0.030 5			空肠	0.849 4±0.102 6	0.145 2±0.014 6
		结肠	1.237 2±0.239 1	0.132 1±0.034 4			结肠	0.742 9±0.128 4	0.084 1±0.026 5
	0.10	十二指肠	1.700 2±0.082 0	0.169 0±0.020 5		0.50	十二指肠	1.634 5±0.144 7	0.148 8±0.043 5
		回肠	1.120 4±0.062 5	0.110 2±0.012 5			回肠	1.373 3±0.095 4	0.122 8±0.033 9
		空肠	2.757 9±0.041 5	0.275 0±0.032 6			空肠	1.475 7±0.015 3	0.145 4±0.014 1
		结肠	1.193 3±0.103 0	0.108 1±0.015 1			结肠	0.815 7±0.043 8	0.079 9±0.067 8

注: 与高浓度相比, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with high concentration, ¹⁾ $P<0.01$.

表4 葛根素、刺芒柄花素、甘草苷、芦丁在不同给药组大鼠各肠段的吸收速率常数(K_a) ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 4 Absorption rate constants(K_a) of puerarin, anthocyanin, glycyrrhizin and rutin in different intestinal segments of rats($\bar{x} \pm s$, $n=5$) $\times 10^3 \cdot \text{min}^{-1}$

功效成分	分组	十二指肠	空肠	回肠	结肠
葛根素	1	2.016 0±0.160 2	1.584 9±0.208 4	3.040 0±0.197 0	1.291 5±0.086 6
	2	1.056 9±0.813 9 ¹⁾	0.837 3±0.169 0 ¹⁾	1.502 8±0.072 1 ¹⁾	0.648 3±0.215 2 ¹⁾
	3	1.988 0±0.182 2	1.593 6±0.206 2	2.782 0±0.063 8	1.099 9±0.098 4
	4	1.952 6±0.133 3	1.532 3±0.193 1	2.885 3±0.080 8	1.091 4±0.078 5
	5	1.365 4±0.113 1 ¹⁾	1.069 0±0.142 3 ¹⁾	1.985 2±0.081 8 ¹⁾	0.779 4±0.057 5 ¹⁾
刺芒柄花素	1	1.676 0±0.079 2	1.090 2±0.061 1	2.748 1±0.081 7	1.237 2±0.239 1
	2	0.854 9±0.539 5 ¹⁾	0.512 0±0.144 6 ¹⁾	1.414 9±0.052 4 ¹⁾	0.402 7±0.035 9 ¹⁾
	3	1.671 0±0.072 8	1.086 8±0.067 0	2.580 8±0.121 9	1.113 2±0.077 3
	4	1.633 5±0.066 2	1.069 1±0.073 0	2.689 9±0.083 9	0.973 0±0.010 4
	5	1.138 4±0.048 9 ¹⁾	0.742 9±0.040 2 ¹⁾	1.714 7±0.244 0 ¹⁾	0.580 8±0.068 9 ¹⁾
芦丁	1	0.488 0±0.141 8	0.505 7±0.061 8	0.694 1±0.040 5	0.385 6±0.029 1
	2	0.258 5±0.072 9 ¹⁾	0.272 5±0.034 4 ¹⁾	0.359 6±0.020 6 ¹⁾	0.148 9±0.023 9 ¹⁾
	3	0.485 4±0.150 4	0.504 7±0.053 5	0.682 2±0.047 5	0.325 2±0.045 5
	4	0.477 0±0.118 3	0.594 0±0.261 5	0.679 5±0.034 8	0.306 8±0.019 3
	5	0.431 9±0.099 9	0.541 1±0.044 6	0.650 7±0.072 7	0.389 6±0.024 1 ¹⁾
甘草苷	1	1.612 0±0.114 5	1.289 6±0.091 5	1.474 2±0.021 8	0.742 9±0.128 4
	2	0.821 9±0.094 4 ¹⁾	0.676 7±0.067 4 ¹⁾	0.939 4±0.340 0 ¹⁾	0.315 2±0.136 8 ¹⁾
	3	1.619 6±0.113 0	1.235 8±0.131 9	1.426 8±0.047 2	0.807 3±0.010 8
	4	1.572 9±0.111 8	1.246 1±0.093 8	1.442 2±0.026 5	0.085 4±0.049 9
	5	1.097 2±0.080 5 ¹⁾	0.881 4±0.071 0 ¹⁾	1.008 7±0.022 8 ¹⁾	0.442 8±0.075 7 ¹⁾

注: 1组-单独豆科中药灌流组; 2组-豆浆+豆科中药组; 3组-预灌流豆浆 0.5 h 组; 4组-预灌流豆浆 1 h 组; 5组-预灌流豆浆 2 h 组。灌流液浓度: 葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷浓度分别为 0.10, 0.05, 0.57, 0.25 mg·mL⁻¹。与 1 组相比, $P<0.01$ 。

Note: Group 1-perfused with legume traditional Chinese medicine alone group; group 2-soybean milk + legume traditional Chinese medicine group; group 3-pre-perfusion soybean milk 0.5 h group; group 4-pre-perfusion soybean milk 1 h group; group 5-pre-perfusion soybean milk 2 h group. The concentrations of puerarin, formononetin, rutin and liquiritin were 0.10, 0.05, 0.57 and 0.25 mg·mL⁻¹, respectively; Compared with group 1, ¹⁾ $P<0.01$.

表5 葛根素、刺芒柄花素、甘草苷、芦丁在不同给药组大鼠各肠段的表观渗透率(P_{app}) ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 5 Apparent permeability(P_{app}) of puerarin, anthocyanin, glycyrrhizin and rutin in different intestinal segments of rats($\bar{x} \pm s$, $n=5$) $\times 10^3 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$

功效成分	分组	十二指肠	空肠	回肠	结肠
葛根素	1	0.210 8±0.025 2	0.167 1±0.023 5	0.302 2±0.029 9	0.136 1±0.029 7
	2	0.107 4±0.009 4 ¹⁾	0.087 0±0.009 2 ¹⁾	0.155 1±0.007 9 ¹⁾	0.065 8±0.007 9 ¹⁾
	3	0.203 9±0.023 8	0.165 1±0.020 8	0.289 9±0.011 9	0.110 7±0.016 9
	4	0.204 1±0.022 2	0.161 6±0.022 4	0.302 0±0.011 6	0.112 8±0.014 2
	5	0.138 8±0.012 6 ¹⁾	0.112 4±0.012 4 ¹⁾	0.205 5±0.013 8 ¹⁾	0.079 4±0.014 0 ¹⁾
刺芒柄花素	1	0.174 4±0.004 4	0.114 7±0.008 0	0.274 1±0.030 5	0.132 1±0.034 4
	2	0.086 8±0.007 1 ¹⁾	0.046 9±0.018 2 ¹⁾	0.146 0±0.004 6 ¹⁾	0.041 1±0.007 5 ¹⁾
	3	0.170 7±0.005 5	0.078 8±0.072 3	0.288 1±0.054 1	0.115 5±0.009 8
	4	0.170 0±0.005 2	0.112 5±0.009 1	0.281 4±0.010 9	0.100 7±0.015 9
	5	0.115 6±0.006 7 ¹⁾	0.078 2±0.003 8 ¹⁾	0.177 4±0.026 9 ¹⁾	0.059 4±0.013 9 ¹⁾
芦丁	1	0.050 7±0.017 4	0.053 0±0.006 3	0.068 9±0.010 6	0.050 4±0.071 7
	2	0.026 2±0.007 4 ¹⁾	0.027 3±0.001 7 ¹⁾	0.036 9±0.001 7 ¹⁾	0.015 2±0.034 1 ¹⁾
	3	0.049 7±0.016 4	0.050 9±0.002 8	0.111 7±0.093 0	0.056 7±0.004 7
	4	0.048 6±0.014 6	0.062 2±0.026 9	0.070 6±0.004 0	0.031 5±0.002 1
	5	0.033 6±0.010 1	0.035 8±0.004 2	0.034 0±0.024 6	0.018 8±0.004 2 ¹⁾
甘草苷	1	0.179 6±0.037 8	0.135 7±0.010 9	0.145 2±0.014 6	0.084 1±0.026 5
	2	0.082 9±0.009 7 ¹⁾	0.071 3±0.007 0 ¹⁾	0.097 3±0.037 6 ¹⁾	0.032 6±0.017 1 ¹⁾
	3	0.164 5±0.011 4	0.130 4±0.018 4	0.167 2±0.043 7	0.083 9±0.014 0
	4	0.175 5±0.037 3	0.131 2±0.011 4	0.150 2±0.006 1	0.087 9±0.007 9
	5	0.110 7±0.008 4 ¹⁾	0.086 4±0.017 1 ¹⁾	0.104 0±0.004 4 ¹⁾	0.044 6±0.007 6 ¹⁾

注: 1组-单独豆科中药灌流组; 2组-豆浆+豆科中药组; 3组-预灌流豆浆 0.5 h 组; 4组-预灌流豆浆 1 h 组; 5组-预灌流豆浆 2 h 组。

灌流液浓度: 葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷浓度分别为 0.10, 0.05, 0.57, 0.25 mg·mL⁻¹。与 1 组相比, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Group 1-perfused with legume traditional Chinese medicine alone group; group 2-soybean milk + legume traditional Chinese medicine group; group 3-pre-perfusion soybean milk 0.5 h group; group 4-pre-perfusion soybean milk 1 h group; group 5-pre-perfusion soybean milk 2 h group. The concentrations of puerarin, formononetin, rutin and liquiritin were 0.10, 0.05, 0.57 and 0.25 mg·mL⁻¹, respectively. Compared with group 1, ¹⁾ $P<0.01$.

表 6 葛根素、刺芒柄花素、甘草苷、芦丁在不同给药组大鼠空肠段的吸收速率常数(K_a)和表观渗透率 P_{app} ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 6 Absorption rate constants(K_a) and apparent permeability(P_{app}) of puerarin, anthocyanin, glycyrrhizin and rutin in jejunum of rats in different administration groups ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

化合物	组别	$K_a/\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$	$P_{app}/\times 10^{-5}\text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$
葛根素	A	0.101 1 $\pm$ 0.012 2	33.69 $\pm$ 4.07
	B	0.020 8 $\pm$ 0.001 8 ¹⁾	6.93 $\pm$ 0.59 ¹⁾
	C	0.081 1 $\pm$ 0.011 7	27.03 $\pm$ 3.88
	D	0.094 8 $\pm$ 0.004 8	31.59 $\pm$ 1.61
刺芒柄花素	A	0.025 5 $\pm$ 0.003 8	25.52 $\pm$ 3.82
	B	0.010 9 $\pm$ 0.002 2 ¹⁾	10.87 $\pm$ 2.17 ¹⁾
	C	0.022 1 $\pm$ 0.001 8	22.09 $\pm$ 1.84
	D	0.022 5 $\pm$ 0.001 6	22.46 $\pm$ 1.62
芦丁	A	0.017 3 $\pm$ 0.002 8	3.03 $\pm$ 0.48
	B	0.007 1 $\pm$ 0.000 9 ¹⁾	1.25 $\pm$ 0.16 ¹⁾
	C	0.015 2 $\pm$ 0.001 4	2.68 $\pm$ 0.24
	D	0.015 6 $\pm$ 0.001 2	2.74 $\pm$ 0.21
甘草苷	A	0.012 5 $\pm$ 0.001 8	2.89 $\pm$ 0.41
	B	0.005 9 $\pm$ 0.001 4 ¹⁾	1.36 $\pm$ 0.32 ¹⁾
	C	0.015 4 $\pm$ 0.001 4	3.59 $\pm$ 0.32
	D	0.011 1 $\pm$ 0.000 7	2.78 $\pm$ 0.36

注: A 组-单独给药组; B 组-豆浆+中药组; C 组-维拉帕米+中药组; D 组-丙磺舒+中药组; 与 A 组相比, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Group A-treated with single drug; group B-soybean milk + traditional Chinese medicine group; group C-verapamil +traditional Chinese medicine group; group D-probenecid+traditional Chinese medicine group; compared with group A, ¹⁾ $P<0.01$.

2.6 方法学考察

血浆和肠液中未发现干扰分析物或内标的内源性物质, 方法具有良好的特异性。葛根素、刺芒柄花素、芦丁、甘草苷在药动学和肠吸收试验中线性回归方程和相关系数符合要求, 药动学试验中各成分线性关系为葛根素 $Y=0.5753X+3.488\ 9$ ($5\sim 1\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 刺芒柄花素 $Y=0.627\ 7X+3.174\ 9$ ($5\sim 500\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 芦丁 $Y=0.623\ 7X+4.152\ 2$ ($5\sim 1\ 000\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 甘草苷 $Y=0.556\ 7X+2.777\ 7$ ($5\sim 200\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。肠吸收试验中各成分线性关系为葛根素 $Y=0.505\ 3X+9.579\ 8$ ($10\sim 1\ 250\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 刺芒柄花素 $Y=0.5731X+16.52$ ($28\sim 2\ 820\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 芦丁 $Y=0.8549X+15.209$ ($26\sim 2\ 580\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 甘草苷 $Y=0.902\ 7X+9.600\ 8$ ($10\sim 2\ 830\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。血浆和肠液样品中葛根素、刺芒柄花素、甘草苷和芦丁的日内、日间准确度和精密度均符合要求, 血浆中葛根素日内和日间准确率为 $2.15\%\sim 5.23\%$, RSD 为 $4.53\%\sim 7.67\%$, 刺芒柄花素日内和日间准确度

为 $5.09\%\sim 7.17\%$, RSD 为 $4.69\%\sim 9.39\%$, 芦丁日间和日内准确率为 $1.79\%\sim 7.68\%$, RSD 为 $5.30\%\sim 9.26\%$, 甘草苷日间和日内准确率为 $4.45\%\sim 7.17\%$, RSD 为 $5.26\%\sim 8.32\%$ 。肠液样品中葛根素日内和日间准确率为 $-3.67\%\sim 17.62\%$, RSD 为 $7.68\%\sim 14.51\%$, 刺芒柄花素日内和日间准确率为 $-3.39\%\sim 7.18\%$, RSD 为 $7.26\%\sim 14.66\%$, 芦丁日间和日内准确率为 $-2.51\%\sim 7.69\%$, RSD 为 $8.57\%\sim 14.51\%$, 甘草苷日间和日内准确率为 $-9.28\%\sim 11.42\%$, RSD 为 $6.10\%\sim 15.01\%$ 。各成分基质效应和回收率均在 $85\%\sim 115\%$ 。对葛根素、刺芒柄花素、甘草苷、芦丁在不同贮存条件下的稳定性进行了全面评价, 各成分在 3 种试验条件下在血液和肠液中精密度和准确度均稳定, 血浆样本中葛根素 RSD 为 $3.53\%\sim 11.54\%$, 刺芒柄花素 RSD 为 $3.21\%\sim 12.85\%$, 芦丁 RSD 为 $3.11\%\sim 11.03\%$, 甘草苷 RSD 为 $3.59\%\sim 8.60\%$ 。肠液中葛根素 RSD 为 $5.72\%\sim 12.78\%$, 刺芒柄花素 RSD 为 $3.35\%\sim 10.82\%$, 芦丁 RSD 为 $2.76\%\sim 8.20\%$, 甘草苷 RSD 为 $2.91\%\sim 13.48\%$ 。上述方法学考察结果均符合《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》要求。

3 讨论

肠道是吸收营养物质和功效成分最主要的部位, 因此, 有必要对功效成分口服后的体内吸收情况和吸收部位进行考察。药动力学研究表明, 豆浆显著降低葛根素、甘草苷、芦丁和刺芒柄花素在大鼠体内的 AUC_{0-t} 、 C_{max} 。葛根也是心脑血管疾病和糖尿病患者的常用中药, 葛根素是其代表性功效成分, 具有良好的退热、镇静、增加冠状动脉血流量和调节血糖的作用^[23]; 甘草有调和诸药的作用, 因此几乎所有和中药相关的方剂及食疗食谱中均有甘草的应用, 而甘草苷是甘草中重要的单体活性成分^[24]; 芦丁有维生素 P 样作用和抗炎作用, 常用作食用抗氧化剂和营养增强剂; 刺芒柄花素在葛根和黄芪等多类豆科中药中均存在, 这些功效成分在体内吸收不佳, 将直接影响葛根、甘草、槐花和黄芪在体内发挥应有的作用。

在体肠灌注研究结果与药动力学结果一致, 豆浆显著减少了葛根素、刺芒柄花素、芦丁、甘草苷在大鼠各肠段的吸收, 且不论成分是以主动转运为主还是以被动扩散为主, 豆浆均可对其肠道吸收产生显著抑制。根据本研究, 芦丁在大鼠肠段以被动扩散为主, 根据被动扩散的特点分析,

豆浆对其吸收的影响可能和加大芦丁跨膜转运难度有关。芦丁为水溶性大的药物,本身就较难跨膜,肠道的吸收利用率较低,而同时服用豆浆时,豆浆中含有较多的油脂,附着在肠壁,会增加芦丁跨膜吸收的难度,进一步降低芦丁的肠道吸收量。豆浆对葛根素、甘草苷和刺芒柄花素的主动转运过程也有较大的影响。在预灌流 2 h 豆浆并用生理盐水冲洗肠道消除豆浆中的物质对肠道微环境即时影响后,仍对葛根素、刺芒柄花素和甘草苷的吸收产生抑制,推测可能是豆浆中的成分和葛根素等功效成分有共同的转运体,长期灌流豆浆后,竞争性抑制了许多主动转运的蛋白,从而影响了功效成分的吸收,而灌流豆浆时间较短(0.5, 1 h)的情况下这种作用尚不显著,因此对葛根素等功效成分吸收的影响不大。该研究结果提示,不要在服用豆浆的同时服用药物,且大量服用豆浆后,即便不与豆浆同时服用,仍有可能对药物的吸收产生影响。

为探究豆浆对主要功效成分吸收抑制的机制,本研究采用外翻肠囊法结合 P-gp 和 MRP2 抑制剂,探究豆浆对葛根素等功效成分吸收的影响是否和外排蛋白有关。外翻肠囊的结果与在体肠灌流的结果一致,豆浆显著减少了葛根素、刺芒柄花素、芦丁、甘草苷在肠道的吸收和转运。然而,根据外翻肠囊的结果和已有的文献报道,豆浆影响上述功效成分吸收的机制仍不明确。一些研究表明, P-gp 和 MRP2 转运体介导了其中一种主动转运^[25-27],但根据此次试验结果,豆浆对葛根素、刺芒柄花素、芦丁、甘草苷的肠道吸收转运影响似乎和这 2 类外排蛋白无关。根据本实验结果,加入维拉帕米或丙磺舒后对于葛根素、刺芒柄花素、芦丁和甘草苷的 Q_{tn} 、 K_a 和 P_{app} 均未有显著差异,说明 P-gp 和 MRP2 这 2 类蛋白在上述 4 种功效成分的肠吸收转运中起到的作用有限,这些差异可能与其他转运蛋白有关。人体胃肠道除了 P-gp 和 MRP2 外,还有乳腺癌耐药蛋白(breast cancer resistance protein, BCRP)、有机阴离子转运多肽(organic anion transport polypeptide, OATP)、有机阴离子转运体(organic anion transporter, OAT)、有机阳离子转运体(organic cation transporter, OCT)等多种转运蛋白均参与药物的转运。这些蛋白底物范围多种多样,其中就包括黄酮类化合物。Caco-2 细胞模型研究表明,葛根素、芒柄花素在

肠道的处置受到 MRP 和 OAT 的介导^[28],BCRP 蛋白也在诸多异黄酮类成分的转运中起到关键作用,许多异黄酮类化合物既是 BCRP 的底物,也是 BCRP 的抑制剂^[29]。向轶群^[30]采用中国仓鼠卵巢细胞模型研究也发现许多黄酮类成分如葛根素可以竞争性抑制中 OATP2B1 对荧光底物的转运,表明这些黄酮类成分也是 OATP2B1 的底物。大豆中富含的异黄酮类成分(染料木素、大豆苷、大豆苷元)已经被证实对上述蛋白有较大的影响。人胚肾 293H 细胞模型研究表明,染料木素可以显著抑制 OAT1 和 OAT3 的活性^[31],MDCKII 细胞模型研究显示大豆异黄酮(大豆苷元、大豆苷元、染料木素、鹰嘴豆芽素 A 等)及其代谢物可能通过抑制 OATP2B1 影响外源物质(包括药物)的跨组织屏障转运^[32],而体内外试验均表明染料木素和大豆苷是 BCRP 的底物和抑制剂^[29]。上述文献报道说明,大豆中的许多异黄酮类成分可能通过抑制 OAT、OATPS 等转运蛋白,减少肠道细胞对葛根、黄芪和甘草中的黄酮类成分的摄入,进而降低这些中药的生物利用度。因此,在未来的研究中可围绕这些转运蛋白进一步探究豆浆抑制豆科中药吸收的机制。

本研究通过药动学、在体肠灌流和外翻肠囊法研究了豆浆和豆科中药的相互作用。结果表明,豆浆显著抑制了葛根、黄芪、甘草、槐花这 4 个豆科中药中的代表性黄酮类功效成分在肠道的吸收转运,降低这些药物在体内的有效浓度。本研究表明,为保证豆科中药的临床疗效,服用含豆科中药的保健品或食疗方剂时应避免同时服用大豆类食物,且在大量服用豆类食物后最好间隔较长时间再服用豆科中药。

REFERENCES

- [1] MARROUM P J, NUTHALAPATI S, PARIKH A, et al. Industry perspective on standardizing food-effect studies for new drug development[J]. Clin Pharmacokinet, 2018, 57(8): 901-909.
- [2] ITAGAKI S, OTSUKA Y, KUBO S, et al. Intestinal uptake of nateglinide by an intestinal fluorescein transporter[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1668(2): 190-194.
- [3] ITAGAKI S, KOBAYASHI Y, OTSUKA Y, et al. Food-drug interaction between ferulic acid and nateglinide involving the fluorescein/H⁺ cotransport system[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(7): 2499-2502.
- [4] DENG J, ZHU X, CHEN Z, et al. A review of food-drug interactions on oral drug absorption[J]. Drugs, 2017, 77(17):

- 1833-1855.
- [5] GUO L Q, YAMAZOE Y. Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(2): 129-136.
- [6] DRESSER G K, BAILEY D G, LEAKE B F, et al. Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 71(1): 11-20.
- [7] DENG T M, PENG C, PENG D Y, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and discussion of Q-markers[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2021, 46(11): 2660-2676.
- [8] JIANG M Y, ZHAO S J, YANG S S, et al. An “essential herbal medicine”—licorice: A review of phytochemicals and its effects in combination preparations[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020(249): 112439.
- [9] ZHANG Y L, WANG M Y, YANG J Y, et al. Research progress of chemical constituents and pharmacological effects of baked licorice[J]. *Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai(上海中医药大学学报)*, 2015, 29(3): 99-102.
- [10] PEI W H, HE F, CHENG C S, et al. Research progress on the quality evaluation methods of traditional Chinese medicine *Astragali Radix*[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2020, 37(5): 620-628.
- [11] SUN Z H, SHAO J, GUO M. A review on chemical components and pharmacological effects of *Huangqi*[J]. *Clin J Chin Med(中医临床研究)*, 2015, 7(25): 22-25.
- [12] MAJI A K, PANDIT S, BANERJI P, et al. *Pueraria tuberosa*: A review on its phytochemical and therapeutic potential[J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(23): 2111-2127.
- [13] CHU J M, MA S Y, LI H F, et al. Progress in effective components and pharmacological effects of *Puerariae Lobatae Radix*[J]. *Food Drug(食品与药品)*, 2015, 17(2): 142-146.
- [14] DOLGHIH E, JACOBSON M P. Predicting efflux ratios and blood-brain barrier penetration from chemical structure: Combining passive permeability with active efflux by P-glycoprotein[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2013, 4(2): 361-367.
- [15] YU X, CHI S S, JIAO Q S, et al. Study on compatibility of active ingredients of Simiao Yongan Decoction in rats with *in situ* single-pass intestinal perfusion model[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2019, 44(10): 2163-2170.
- [16] CHEN Y, ZHANG Y W, ZHOU Y L, et al. Optimization of sirolimus micelles by response surface methodology and its effect on small intestinal absorption[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2020, 37(8): 939-944.
- [17] CHEN Y, LIU F, GONG Z P, et al. Study on absorption characteristics of *Gastrodia elata* powder with different particle sizes based on rat everted intestinal sac model *in vitro*[J]. *China Pharm(中国药房)*, 2020, 31(4): 413-422.
- [18] CHEN X M, ZHAO Y, GUO H. Study on intestinal absorption of oxymatrine phospholipid complex by everted gut sac method[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2019, 36(8): 946-950.
- [19] TANG X W, LÜ P, DONG T T, et al. Comparison and suggestion for implementation of “Guidance for Nonclinical Pharmacokinetics of Medicinal Products” and ICH S3B guidance[J]. *Drugs Clin(现代药物与临床)*, 2018, 33(8): 2142-2144.
- [20] ZHANG Y, HUO M, ZHOU J, et al. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel[J]. *Comput Methods Programs Biomed*, 2010, 99(3): 306-314.
- [21] NIE S F, PAN W S, YANG X G, et al. Evaluation of gravimetry in the rat single-pass intestinal perfusion technique [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2005, 14(10): 56-59.
- [22] WANG X Y, LIAN H, LU X Y, et al. Intestinal absorption of phenolic acids in *Rhus chinensis* extracts by *in situ* single-pass perfusion model in rats[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2019, 44(11): 2373-2378.
- [23] ZHOU Y X, ZHANG H, PENG C. Puerarin: a review of pharmacological effects[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(7): 961-975.
- [24] DOU K N, WANG F, LUO H L, et al. Application of glycyrrhiza and its extractive in food[J]. *Food Res Dev(食品研究与开发)*, 2014, 35(21): 140-142.
- [25] ZHANG L. Pharmacokinetics and drug delivery systems for puerarin, a bioactive flavone from traditional Chinese medicine[J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 860-869.
- [26] ZHANG G Y, OU R L, LI F Y, et al. Regulation of drug-metabolizing enzymes and efflux transporters by *Astragali Radix* decoction and its main bioactive compounds: Implication for clinical drug-drug interactions[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016(180): 104-113.
- [27] HE R, XU Y S, PENG J J, et al. The effects of 18 β -glycyrrhetic acid and glycyrrhizin on intestinal absorption of paeoniflorin using the everted rat gut sac model [J]. *J Nat Med*, 2017, 71(1): 198-207.
- [28] CHEN J, LIN H M, HU M. Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 55(2): 159-169.
- [29] BIRCSAK K M, ALEKSUNES L M. Interaction of isoflavones with the BCRP/ABCG2 drug transporter[J]. *Curr Drug Metab*, 2015, 16(2): 124-140.
- [30] XIANG Y Q. Studies on the interactions between fluorescent substrates and flavonoids mediated by human hepatic OATPs[D]. Suzhou: Soochow University, 2019.
- [31] WONG C C, BOTTING N P, ORFILA C, et al. Flavonoid conjugates interact with organic anion transporters(OATs) and attenuate cytotoxicity of adefovir mediated by organic anion transporter 1(OAT1/SLC22A6)[J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81(7): 942-949.
- [32] NAVRÁTILOVÁ L, APPLOVÁ L, HORKÝ P, et al. Interaction of soy isoflavones and their main metabolites with hOATP2B1 transporter[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2018, 391(10): 1063-1071.

收稿日期: 2020-08-10
(本文责编: 曹粤锋)