

ICS **.***.**
C**



团体标准

T/CACM ****-20**

含中药肠吸收液体外实验操作规程

Research procedures and standards on Chinese materia medica -containing
intestinal absorption solution applied to pharmacological experiment in vitro

(文件类型：公示稿)

(完成时间：2025 年 1 月)

20**-**-**发布

20**-**-**实施

中华中医药学会发布

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 制备原理.....	1
5 试剂和材料.....	2
6 实验步骤.....	2
7 质量保证和控制.....	4
8 操作注意事项.....	5
参考文献.....	6

前 言

本文件按照GB/T1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国中医科学院提出。

本文件由中华中医药学会归口。

本文件起草单位：中国中医学科学院医学实验中心、中国中医学科学院中药研究所、河南中医药大学、中国医学科学院药用植物研究所、首都医科大学、江西中医药大学、浙江中医药大学、广州中医药大学、广东药科大学、南京中医药大学。

本文件主要起草人：杨洪军、苗明三、孙桂波、李玉洁、张方博。

本文件其他起草人：陈颖、郭非非、龚慕辛、黄颖、季旭明、孔祥英、陆茵、聂波、吴宏伟、朱晶晶、张旻昱（姓氏拼音首字母排序）。

含中药肠吸收液体外实验操作规程

1 范围

本文件确立了用于体外实验研究的含中药肠吸收液制备的标准操作规程。

本文件适用于多数以口服形式给药的中药单味药、中药复方或成方制剂的研究，特别是水溶性至中等极性成分的体外实验研究，不适用于难溶于台氏液中的中药成分、脂溶性成分或挥发油类成分的研究。本文件可应用于中药药理、方剂配伍、质量评价、药效物质基础以及中西医结合基础等研究，可在普通环境的实验室操作。

2 规范性引用文件

本文件无规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

外翻肠囊法 Everted gut sac method

本法由英国科学家 Wilson 和 Wiseman 于 1954 年创建，指动物在无麻或全麻状态下，快速分离小肠，去除肠系膜，生理盐水或缓冲液冲洗干净。根据实验目的截取不同解剖部位的肠段，将其黏膜翻向外侧，结扎一端形成肠囊状，内充以人工培养液后，结扎另一端，置于含有被测物质的培养液中，通入 95% 氧气和 5% 二氧化碳的混合气体，培养一定的时间。最早用于研究葡萄糖和氨基酸在肠道的代谢和转运，经多次改进成为最常用的体外肠道吸收生物模型，用于研究药物体外吸收、肠道代谢以及转运蛋白的运输等。该法操作简便，实验条件可控，重复性好，经济适用。

3.2

含中药肠吸收液 Chinese materia medica-containing intestinal absorption solution

按照外翻肠囊法的操作步骤，制备实验动物不同解剖部位的肠囊，将肠囊外翻并结扎一侧，内充以适量 Tyrode 缓冲液（英文名 Tyrode's solution，也称台式液），置于通入 95% 氧气和 5% 二氧化碳的中药供试液中，37℃ 恒温孵育和交换一定的时间，得到肠管内含中药的液体，经过滤处理后，即为含中药肠吸收液。

4 制备原理

外翻肠囊法保留了完整组织和黏膜的特性，可在体外模拟体内生理状态下不同肠段对药物的吸收情况。通过外翻肠囊法制备的含中药肠吸收液，作为中药（复方）口服后吸收入血的药效成分/组分，应用于细胞、离体组织器官和类器官等，开展药效评价、机制研究和有效成分辨识等研究。

5 试剂和材料

5.1 实验动物

一般建议选择雄性大鼠，可选取 SPF 级 Sprague Dawley (SD) 大鼠，(8~10) 周龄，体重 (230±20) g。

5.2 试剂配制

Tyrode 缓冲液是模拟小肠生理环境的营养液，其目的是使小肠能够长时间存活。配方：氯化钾 (KCl) 0.28 g、磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄) 0.05 g、氯化钠 (NaCl) 8.00 g、氯化镁 (MgCl₂) 0.10 g、碳酸氢钠 (NaHCO₃) 1.00 g 溶于 500 mL 蒸馏水中，密闭冷藏；氯化钙 (CaCl₂) 0.20 g 用 500 mL 蒸馏水溶解，密闭冷藏；使用前在不断搅拌下将二者均匀混合，加入 1.00 g 葡萄糖，用稀盐酸调节 pH 值至 7.4。

5.3 仪器设备

电子天平；离体组织器官实验系统，包括恒温循环水槽、组织器官孵育槽和高压气瓶；手术器械包括直剪、弯镊、弯头止血钳、中空硅胶套管 (长 1 cm，外径 4 mm，内径 2 mm)、可吸收性 1 号外科缝线、1 mL 注射器 (配不锈钢针头) 和 5 mL 注射器等；0.22 μm 无菌滤膜；1.5 mL 无菌 EP 管；氮吹仪。

5.4 受试中药供试液

由于受试中药的不同成分在台氏液中的溶解度不同，且肠道吸收部位和吸收时间均存在差异，导致含中药肠吸收液的浓度不同。本法首先用水或乙醇对受试中药饮片进行提取，将提取液旋蒸至干浸膏状提取物，或真空冷冻干燥得冻干粉，拟提供两种制备受试中药供试液的方法。

5.4.1 按照临床给药量

按照动物与人的每公斤体重或体表面积剂量折算系数，将临床人体给药量经换算成大鼠的等效用药剂量，计算得到待溶解的提取物质量。称量取样后，加入适量空白Tyrode 缓冲液，溶解形成均匀的悬浊液，即得供试液。

5.4.2 按照实验需要

按照体外实验所需的浓度要求，制备含中药肠吸收液。可将受试中药提取物少量多次溶解于适量空白Tyrode 缓冲液中，保证形成均匀的悬浊液，即得供试液。

6 实验步骤

6.1 含中药肠吸收液的制备

6.1.1 实验前大鼠禁食 12 h，自由饮水。

6.1.2 打开水浴槽电源和循环水开关，调节水温至 37 ℃。

- 6.1.3 量取 25 mL 含中药供试液的台氏液，加入孵育槽中；打开气瓶，通入 95% 氧气和 5% 二氧化碳的混合气体，调节孵育槽中每秒有 (1~2) 个气泡冒出。
- 6.1.4 大鼠颈椎脱臼处死（麻醉剂会影响肠管活性）。右手抓住鼠尾根部并将其提起，放在鼠笼盖或其他粗糙面上，用左手拇指、食指用力向下按压鼠头及颈部（耳朵下方较细处），右手抓住鼠尾根部用力拉向后上方，造成颈椎脱臼，脊髓与脑干断离后，立即死亡。
- 6.1.5 沿腹中线依次剪开皮肤和肌肉，尽量增大腹腔打开的视野，用弯头止血钳固定剪开的皮肤和肌肉。
- 6.1.6 游离并剪断胃幽门下至回盲瓣之间的小肠，用弯镊小心分离肠壁上附着的脂肪组织。
- 6.1.7 自胃幽门下 10 cm 开始截取肠段，量取 14 cm 为肠段 1；依次前 10 cm 肠段舍弃，分别再量取两个长度 14 cm 的肠段 2 和肠段 3；最后从回盲瓣以上 5 cm 处截取 14 cm 为肠段 4。将肠段迅速浸泡于装有 4℃ Tyrode 缓冲液的玻璃平皿中。
- 6.1.8 将玻璃平皿置于碎冰上，小心分离附着在肠囊上的脂肪组织、结缔组织和血块等。
- 6.1.9 用 5 mL 注射器吸取 4℃ Tyrode 缓冲液，冲洗剥离完毕的肠管，至肠管内无内容物。
- 6.1.10 将硅胶套管的一端插入一侧肠段顶端外壁中，将肠道内表面翻转至外表面，用 4℃ Tyrode 缓冲液冲洗肠段内表面。
- 6.1.11 用手术线将肠囊一端结扎，另一端用线固定在硅胶套管上，并连接于 1 mL 注射器针头上，保证不漏液。注射器吸取 2 mL 空白 Tyrode 缓冲液，注入肠管中。
- 6.1.12 将肠段放置并固定于孵育槽中，确保肠囊完全浸没在受试中药供试液的液面下，平衡 5 min，开始实验。
- 6.1.13 交换 (1~2) 小时后，结束实验，用注射器吸出肠囊内液体，-20℃ 保存。关闭气瓶和水浴槽，冲洗孵育槽。

6.2 空白肠吸收液的制备

按照上述实验步骤，量取 25 mL 空白 Tyrode 缓冲液加入孵育槽中，将肠管中注入 2 mL 空白 Tyrode 缓冲液，交换 (1~2) 小时后，用注射器吸出肠囊内液体，即为空白肠吸收液。

6.3 体外实验样品处理

6.3.1 体外药效实验用样品

使用 0.22 μm 无菌滤膜将含中药肠吸收液过滤，分装置于 1.5 mL 无菌 EP 管中，-20℃ 保存待用，避免反复冻融导致化学成分含量变化。空白肠吸收液同法过滤和分装保存。使用时室温复融后，可直接用于细胞和离体组织的药效评价实验。

6.3.2 化学分析用样品

将含中药肠吸收液室温融化，氮吹仪大流速吹干，加 0.2 mL 溶剂（具体溶剂结合文献报道），超声溶解，0.22 μm 滤膜过滤。

6.4 含中药肠吸收液的浓度确定

6.4.1 初始浓度的确定

含中药肠吸收液中化学成分众多，无法整体和直接表征其真实含量。本文件对含中药肠吸收液初始浓度的计算方法是基于将中药提取物溶于Tyrode 缓冲液中得到的质量体积比浓度，等量为含中药肠吸收液的初始浓度。举例说明，将 10 g 中药干浸膏溶于 100 mL Tyrode 缓冲液中，形成无沉淀的均一悬浊液，采用此中药悬浊液制备的肠吸收液，其初始浓度为 0.1 g/mL。

6.4.2 实验浓度的确定

利用受试中药供试液制备得到的含中药肠吸收液，通常情况下初始浓度较高，可能会有一定的细胞毒作用。因此进行体外药理实验时，需将此浓度原液根据实验需要稀释至不同浓度，采用 CCK-8 法或 MTT 法，检测梯度浓度下的各细胞存活率，确保后续实验使用的稀释浓度对细胞无毒性作用，再结合存活率结果来确定最佳的实验浓度。

7 质量保证和控制

7.1 生物学评价

翻转肠囊及实验条件等诸多因素都会引起肠黏膜的破坏，影响实验结果，建议根据实验条件选择如下方法检测：

7.1.1 肠管平滑肌张力

实验开始前，可采用肌张力测定系统测定任意一段肠管平滑肌张力，以评价实验操作步骤是否影响肠管平滑肌活性，但已测定平滑肌张力的肠管不可再用于制备含中药肠吸收液。

7.1.2 肠黏膜细胞活性

实验结束后，可以参照以下方法来评价肠黏膜细胞活性。

- a) 取肠囊内液体，比色法测定乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）的含量。
- b) 取肠管组织，比色法检测三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）含量。

7.1.3 肠管通透性

a) 使用空白肠吸收液配制不同浓度的台盼蓝溶液（如 3.13、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 $\mu\text{g/mL}$ ），经过交换后，收集肠囊内液体，波长 620 nm 测定吸光度，进行线性回归，绘制标准曲线。

b) 实验开始前向受试中药供试液中加入一定量的台盼蓝，超声溶解，使其终浓度在标准曲线范围。实验结束后，取囊内液体，检测吸光度，通过标准曲线计算台盼蓝的浓度，评价肠管的通透性。

7.2 化学分析

按照《中华人民共和国药典》（2020年版）三部及文献报道的分析方法，可采用适宜的分析方法（如 HPLC、LC-MS、GC-MS 等）检测，分析含中药肠吸收液中的化学成分，尽量选取与中药功效相关的成分，进行含量测定和特征图谱表征，作为本方法的质控指标。

7.3 稳定性实验

针对含中药肠吸收液中的化学成分，可采用适合的分析方法（如 LC-MS、LC-UV、GC-MS 等），对其保存条件下（如 -20℃），存储时间的稳定性进行考察，测定放置不同时间条件下（如 1、2、3、6、12 月）的化学成分含量变化情况，保证实验周期内所用含中药肠吸收液的稳定性。可对多个实验批次所获得的含中药肠吸收液进行化学成分鉴定，保证该制备方法的稳定性。

8 操作注意事项

- 8.1 分离肠管过程中，需浸泡于充满 4℃ Tyrode 缓冲液的平皿（直径 10 cm）中，置于冰上操作，始终保持低温，以保持肠管活性。
- 8.2 分离附着在肠囊上的脂肪组织和结缔组织时，操作应快速且轻柔，避免对肠管用力撕扯，以最大程度保留肠管活性和完整性。
- 8.3 使用硅胶套管翻转肠管以及结扎肠管时，均应小心轻柔操作，避免对肠管进行牵拉，以保留肠管活性。
- 8.4 将肠管从活体中取出后，肠管活性逐渐丧失甚至严重破坏，且受药材和动物个体差异等因素影响，因此将（1~2）小时确定为制备含中药肠吸收液的最佳孵育和交换时间范围。
- 8.5 实验过程中，随时观察孵育槽中气体的流速，并观察肠管是否充盈，组织是否完整无损，有无漏液。
- 8.6 从开始分离肠管到将肠管放置和固定于孵育槽中，整个实验过程最好不超过 30 min，以保持肠管活性。
- 8.7 实验设计需要添加空白肠吸收液组作为溶剂对照组，以消除溶剂可能对实验结果的干扰。
- 8.8 严格按照本法提供的步骤进行操作，保证实验过程带来的误差为最小。

参 考 文 献

- [1] CAI Q, LI Y, ZHANG Y, et al. Xinshubao tablet ameliorates myocardial injury against heart failure via the DCN/PPAR α /PGC-1 α /P300 pathway [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023, 166: 115285.
- [2] WANG M, WANG M, ZHAO J, et al. Dengzhan Shengmai capsule attenuates cardiac fibrosis in post-myocardial infarction rats by regulating LTBP2 and TGF- β 1/Smad3 pathway [J]. *Phytomedicine*, 2023, 116: 154849.
- [3] ZHANG M, GUO F, LI X, et al. Yi-Xin-Shu capsule ameliorates cardiac hypertrophy by regulating RB/HDAC1/GATA4 signaling pathway based on proteomic and mass spectrometry image analysis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154185.
- [4] XI Y, MIAO Y, ZHOU R, et al. Exploration of the Specific Pathology of HXMM Tablet Against Retinal Injury Based on Drug Attack Model to Network Robustness [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 826535.
- [5] 李煜, 丁茹, 张方博, 杨洪军. 蛭蛇通络胶囊抗炎及舒张血管的有效组分辨识 [J]. *中国现代中药*, 2022, 24(7): 1303-1316.
- [6] 丁茹, 李煜, 张毅, 等. 蛭蛇通络胶囊及其拆方组分肠吸收液抗氧化及抗凝血研究 [J]. *中医药导报*, 2022, 28(2): 1-12.
- [7] 李煜, 田继祥, 徐核, 等. 蛭蛇通络胶囊治疗缺血性脑卒中潜在有效成分及作用机制的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(12): 3024-3033.
- [8] 贡磊磊, 许海玉, 王岚, 等. 基于 RNA-Seq 高通量测序分析脑心通胶囊抑制炎症反应转录组学特征 [J]. *中国中药杂志*. 2020, 45(1): 149-156.
- [9] 许海玉, 侯文彬, 李珂, 等. 基于整合药理学的中药质量标志物发现与应用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6): 1-8.
- [10] 何子龙, 赵晔, 张毅, 等. 脑心通胶囊肠吸收液保护过氧化氢致 H9c2 心肌细胞损伤的作用机制及有效药味筛选 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(4): 29-35.
- [11] 郭宇飞, 赵晔, 何子龙, 等. 脑心通胶囊肠吸收液清除 DPPH 自由基的有效成分辨识研究[J]. *中国现代中药*, 2019, 21(4): 448-453.
- [12] 郭宇飞, 赵晔, 何子龙, 等. 脑心通胶囊肠吸收液抗 ADP 诱导血小板凝集的有效成分辨识研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(23): 4639-4644.
- [13] 张旻昱, 龚慕辛, 杨洪军. 含药肠吸收液: 一种新的中药体外药理实验方法 [J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3457-3462.
- [14] 贡磊磊, 许海玉, 王岚, 等. 基于肠外翻-离体血管联用方法的银丹心脑通软胶囊血管活性评价[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5): 1724-1729.
- [15] 王萍, 唐仕欢, 苏瑾, 等. 基于整合药理学的中药现代研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(7): 1297-1302.
- [16] ZHANG M, WU H, GUO F, et al. Identification of active components in Yixinshu Capsule with protective effects against myocardial dysfunction on human induced pluripotent stem cell-

derived cardiomyocytes by an integrative approach [J]. *Molecular BioSystems*, 2017, 13(8): 1469-1480.

[17] 黄颖, 吴宏伟, 王燕平. 独活肠吸收液对大鼠离体胸主动脉张力的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(2): 187-190,195.

[18] 耿亚, 杨洪军, 马月香, 等. 基于“肠外翻-心肌细胞”联用模型的益气活血方药效学作用评价及机制探讨 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 46(20): 3821-3827.

[19] 郭宇飞, 杨洪军, 王燕平, 等. 伞形科辛味中药抗血小板聚集的作用研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(12): 1629-1631,1693.

[20] 何子龙, 方文娟, 张方博, 等. 疏风解毒胶囊肠吸收液对 LPS 诱导巨噬细胞释放细胞因子的影响 [J]. *中国现代中药*, 2015, 17(4): 345-348.

[21] 秦海蛟, 柳梦婷, 唐力英, 等. 肠外翻囊法研究淫羊藿肠吸收成分及其吸收特征 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(22): 163-168.

[22] ZHANG F, HUANG B, ZHAO Y, et al. BNC Protects H9c2 Cardiomyoblasts from H₂O₂-Induced Oxidative Injury through ERK1/2 Signaling Pathway [J]. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, 2013, 2013: 802784.

[23] 雷云, 李先端, 杨洪军, 等. 基于成分分析和活性评价的延胡索醋制的研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(21): 2992-2996.

[24] 黄斌, 李耿, 郭宇飞, 等. 脑心通胶囊中 4 个成分肠吸收研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(06): 889-893.

[25] 黄斌, 陈晓萌, 张迎春, 等. 元胡止痛方肠吸收液对大鼠离体胸主动脉环张力的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(5): 117-120.

[26] 陈晓萌, 张迎春, 林朔, 等. 外翻肠囊法发现元胡止痛片吸收成分群的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(13): 2005-2011.

[27] ZHANG Y, XU H, CHEN X, et al. Study on the application of intestinal absorption in vitro coupled with bioactivity assessment in Yuanhu Zhitong preparation [J]. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012, 6(10): 1941-1947.

[28] WILSON T H, WISEMAN G. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface [J]. *Journal of physiology*, 1954, 123(1): 116-125.