

· 经典名方 ·

使药石菖蒲对定志小丸中人参皂苷类成分肠吸收的影响

汪鼎¹, 刘晓闯², 纪娟¹, 彭代银¹, 周安^{1*}

(1. 安徽中医药大学 科研实验中心, 中药复方安徽省重点实验室, 合肥 230038;
2. 安徽中医药大学 第一附属医院, 合肥 230031)

[摘要] **目的:**探究使药石菖蒲对定志小丸中人参皂苷成分肠吸收的影响,从肠吸收角度揭示石菖蒲“佐使则有功”的科学内涵。**方法:**采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定大鼠样品中人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 的浓度;通过大鼠在体肠灌注试验比较不同配伍方式下定志小丸中3种人参皂苷类成分肠吸收速率常数(K_a)与表观通透系数(P_{app})的差异;通过大鼠外翻肠囊试验考察不同剂量石菖蒲挥发油及P-糖蛋白(P-gp)抑制剂维拉帕米对3种人参皂苷类成分累积吸收量的影响。**结果:**缺失石菖蒲条件下定志小丸中3种人参皂苷类成分的P_{app}均≤0.191×10⁻³ cm·min⁻¹。与缺失石菖蒲组相比,缺石菖蒲挥发油组的K_a和P_{app}无显著性差异,但定志小丸全方组的K_a提高了3.97~8.35倍,P_{app}提高了3.99~8.49倍;外翻肠囊研究表明定志小丸中石菖蒲挥发油能显著促进3种人参皂苷类成分在大鼠肠道的累积吸收量,但没有剂量依赖性。**结论:**石菖蒲挥发油可明显促进定志小丸中3种人参皂苷类成分的肠吸收,其促吸收机制可能与抑制P-gp有关。

[关键词] 定志小丸;石菖蒲;人参皂苷类;外翻肠囊法;P-糖蛋白;在体单向肠灌注法;维拉帕米

[中图分类号] R22;R24;R28;C37;R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)08-0007-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190552

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.2209.050.html>

[网络出版时间] 2018-11-19 11:48

Effect of *Acori Tatarinowii Rhizoma* on Intestinal Absorption of Ginsenosides in Dingzhi Xiaowan

WANG Ding¹, LIU Xiao-chuang², JI Juan¹, PENG Dai-yin¹, ZHOU An^{1*}

(1. *Experimental Research Center, Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;*
2. *The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of *Acori Tatarinowii Rhizoma* on intestinal absorption of ginsenosides in Dingzhi Xiaowan, and reveal the mechanism of *Acori Tatarinowii Rhizoma* acting as "adjuvant drug" in this formula. **Method:** The contents of ginsenoside Rg₁, Re and Rb₁ were measured by UPLC-MS/MS and the absorption of three ginsenosides in different intestine segments was investigated by rat single pass intestinal perfusion *in situ*, including absorption rate constant (K_a) and apparent permeability coefficient (P_{app}). Everted intestinal sac model was used to investigate the absorption dosage of three ginsenosides affected by volatile oil from *Acori Tatarinowii Rhizoma* and verapamil [Ver, a P-glycoprotein (P-gp) inhibitor]. **Result:** P_{app} values of three ginsenosides were ≤0.191×10⁻³ cm·min⁻¹ in Dingzhi Xiaowan when lack of *Acori Tatarinowii Rhizoma*. Compared with lack of *Acori Tatarinowii Rhizoma* in Dingzhi Xiaowan group, the K_a and P_{app} values of lack of

[收稿日期] 20180926(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81303245);安徽省高校省级科学研究重点项目(KJ2013A171, KJ2016A398);安徽中医药大学研究生科技创新基金项目(2016YZ06)

[第一作者] 汪鼎,在读硕士,从事药物分析研究, E-mail:411653657@qq.com

[通信作者] *周安,博士,教授,从事中药分析及药效物质基础研究, Tel:0551-65169752, E-mail:anzhou@ahcm.edu.cn

volatile oil from *Acori Tatarinowii Rhizoma* in Dingzhi Xiaowan group slightly increased without significant difference in the four intestinal segments, but when the prescription had *Acori Tatarinowii Rhizoma*, the K_a increased by 3.97-8.35 fold and the P_{app} increased by 3.99-8.49 fold. The results of everted intestinal sac test showed that volatile oil of *Acori Tatarinowii Rhizoma* could significantly promote the intestinal absorption of ginsenoside Rg_1 , Re and Rb_1 , but there was no dose-dependent. **Conclusion:** Volatile oil of *Acori Tatarinowii Rhizoma* can promote the intestinal absorption of three ginsenosides in Dingzhi Xiaowan, and the mechanism may be related to the inhibiting function on P-gp.

[**Key words**] Dingzhi Xiaowan; *Acori Tatarinowii Rhizoma*; ginsenosides; everted gut sac method; P-glycoprotein; single pass intestinal perfusion *in situ*; verapamil

定志小丸源于唐代孙思邈的《备急千金要方》，由人参、茯苓、石菖蒲、远志 4 味药材共为细末后炼蜜为丸而成，具有补益心脾、益智定志之功效，主治心气不定、五脏不足，甚者忧愁悲伤不乐、忽忽喜忘、朝差暮剧、暮差朝发狂眩^[1]。目前该方已成为临床用于改善和治疗以记忆障碍为早期临床症状的老年性痴呆的基本方剂之一。前期药理研究表明定志小丸对 β -淀粉样肽₂₅₋₃₅ ($A\beta_{25-35}$) 损伤的 PC12 神经细胞具有保护作用，可增加大鼠脑内单胺类神经递质（去甲肾上腺素，多巴胺，5-羟色胺等）的含量、改善东莨菪碱所致小鼠学习记忆障碍、参与并调节老年痴呆症发病机制的多个方面^[2-3]。

人参为定志小丸组方中的君药，具有益智、宁心安神的作用。人参皂苷类成分被认为是作用于中枢神经系统且具有益智作用的主要药效物质^[4-5]，但难以被胃肠吸收，生物利用度低，研究报道人参皂苷 Rg_1 , Re 和 Rb_1 的口服生物利用度仅分别为 1.9%^[6]，0.28%^[7] 和 0.62%^[8]。对于口服药物而言，能够被吸收是其发挥药效的前提，中药复方可通过配伍使药（如冰片、石菖蒲等）提高难吸收药物的胃肠吸收和生物利用度^[9-10]，如冰片可提高丹参中 3 种丹酚酸类成分在大鼠体内的生物利用度^[11]，在体肠循环研究证实其主要通过促进 3 种丹酚酸类成分的肠道吸收来提高生物利用度^[12]。为探究定志小丸是否通过配伍使药石菖蒲来促进该方中人参皂苷类成分的肠吸收，本实验采用大鼠在体单向肠灌注模型及大鼠外翻肠囊模型考察石菖蒲及其挥发油对定志小丸中 3 种人参皂苷类成分（人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 ）吸收速率常数和表观通透系数的影响，并考察不同剂量石菖蒲挥发油及盐酸维拉帕米注射液对 3 种人参皂苷类成分累积吸收量的影响，从肠吸收角度揭示使药石菖蒲对这 3 种人参皂苷类成分肠吸收的影响。

1 材料

1290 型超高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司），Triple Quad™ 4500 型质谱仪（美国 AB Sciex 公司），ALPHA1-2 L 型真空冷冻干燥机（德国 Christ 公司），HL-2 型恒流泵（上海嘉鹏科技有限公司），CP225D 型 1/10 万电子天平（德国 Sartorius 公司），Centrifuge 5430R 型低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司），BR125 IR 250W 红外线保温灯（荷兰 Philips 公司）。

人参片、远志、茯苓、石菖蒲药材均购于合肥市同仁堂大药房，由安徽中医药大学科研实验中心刘先华高级实验师鉴定，人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* 的干燥根，远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* 的干燥根，茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* 的干燥菌核，石菖蒲为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* 的干燥根茎；人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 对照品（中国食品药品检定研究院，批号分别为 110703-201027, 110754-201123, 110704-201116, 纯度均 $\geq 98\%$ ）；黄芪甲苷对照品（北京北纳创联生物技术研究院，批号 48523, 纯度 $> 98\%$ ），盐酸维拉帕米注射液（上海禾丰制药有限公司，批号 43150401, 规格 2 mL:5 mg），水为双蒸水，甲醇和乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠，雄性，体质量（230 \pm 20）g，由安徽医科大学实验动物中心提供，合格证号 SCXK（皖）2011-002，本文所涉及的动物实验完全遵守国家科学技术委员会发布的《实验动物管理条例》和卫生部发布的《医学实验动物管理实施细则》。

2 方法

2.1 提取物的制备 取石菖蒲药材 120 g，粉碎，过 40 目筛，加 8 倍量水，用挥发油提取器连续提取 6 h，停止加热，静置 30 min，收集挥发油，得挥发油 1.56 mL，水提液及残渣备用。称取人参片 180 g，茯苓 180 g，远志 120 g，粉碎，过 40 目筛，加 8 倍量

50% 乙醇于 80 °C 加热回流 1 h, 过滤, 重复提取 3 次, 合并滤液, 于 50 °C 减压浓缩至小体积后, 冷冻干燥, 得缺石菖蒲方冻干粉(提取物 I), 计算提取率为 19.33%。称取人参片 180 g, 茯苓 180 g, 远志 120 g, 以及提取挥发油后的石菖蒲水提液及残渣, 按照提取物 I 的制备方法提取, 得缺石菖蒲挥发油方冻干粉(提取物 II), 计算提取率为 20.83%。在提取物 II 中按复方比例加入石菖蒲挥发油, 即得定志小丸全方冻干粉(提取物 III)。

2.2 供试品溶液的配制 按文献[13]的方法制备 Krebs-Ringer 营养缓冲液(K-R 液), 取 K-R 液适量进行大鼠在体肠灌注试验, 收集流出液, 得空白大鼠肠灌注液, 用于配制药液。以 K-R 液为溶剂, 取提取物 I, II 和 III 适量, 分别配制供试品溶液 I (质量浓度 $7.92 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), II (质量浓度 $9.90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 III (质量浓度 $9.90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 均相当于人参药材质量浓度 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。另取供试品溶液 II 适量, 根据石菖蒲挥发油提取率和质量比加入石菖蒲挥发油, 制备低(III-L, 人参-茯苓-远志-石菖蒲 3:3:2:1), 中(III-M, 人参-茯苓-远志-石菖蒲 3:3:2:2), 高(III-H, 人参-茯苓-远志-石菖蒲 3:3:2:3) 3 个浓度的供试品溶液, 考察不同浓度石菖蒲挥发油对 3 种人参皂苷类成分离体肠吸收的影响。

2.3 对照品溶液的配制 精密称取人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 对照品 15.05, 15.08, 14.94 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇溶解后定容, 摇匀, 将 3 种对照品储备液于 -20 °C 冰箱储存, 备用。精密移取各对照品储备液适量至 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 得人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 质量浓度均为 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。精密称取适量内标物黄芪甲苷对照品至 10 mL 量瓶中, 用甲醇超声使溶解并定容, 配制成 $1.005 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内标溶液, 备用。

2.4 人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 的 UPLC-MS/MS 含量测定

2.4.1 检测条件 Waters ACQUITY UPLC® BEH- C_{18} 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 2 min, 90% ~ 35% A; 2 ~ 2.5 min, 35% ~ 10% A; 2.5 ~ 3 min, 10% ~ 90% A; 3 ~ 4.5 min, 90% A), 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 25 °C, 进样量 4 μL 。采用多反应监测模式(MRM)进行正离子检测, 电喷雾离子源(ESI), 喷雾电压 5.5 kV, 辅助气压力 344.75 kPa, 鞘气压力 137.9 kPa, 离子源温度 500 °C, 用于定量分析的

人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 检测离子对分别为 m/z 823.6 ~ 643.8, m/z 969.7 ~ 789.8, m/z 1 131.7 ~ 789.8, 内标物黄芪甲苷的检测离子对 m/z 823.6 ~ 789.5。

2.4.2 灌流液样品的处理 用移液枪精密吸取灌流液 200 μL , 加入黄芪甲苷内标溶液 20 μL , 加入甲醇 180 μL , 涡旋 2 min, $15\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清液 4 μL 进行 UPLC-MS/MS 检测。

2.4.3 专属性考察 取空白肠灌流液, 加热至 37 °C, 加入适量的人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 混合对照品溶液及黄芪甲苷内标溶液, 按 2.4.1 项下条件测定, 观察和比较空白组、对照品组及样品组中人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 及内标物黄芪甲苷的色谱行为。

2.4.4 标准曲线的制备 精密吸取适量人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 混合对照品溶液及黄芪甲苷内标溶液, 用空白肠灌流液配成质量浓度分别为 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液, 内标物黄芪甲苷终质量浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 按 2.4.2 项下方法处理, 按 2.4.1 项下条件测定, 以 3 种人参皂苷类成分对照品与内标的峰面积之比为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 建立线性回归方程。

2.4.5 精密度考察 精密吸取适量人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 混合对照品溶液及黄芪甲苷内标溶液, 用空白肠灌流液配制成低、中、高 3 个质量浓度(人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 的低、中、高质量浓度均分别为 0.5, 2.0, 8.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 下同)的质控溶液, 按 2.4.2 项下方法处理, 按 2.4.1 项下条件测定, 每个质量浓度进行 6 个样本测定, 考察日内精密度; 连续测定 3 d, 考察日间精密度。

2.4.6 提取回收率 精密吸取适量人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 混合对照品溶液及黄芪甲苷内标溶液, 用空白肠灌流液配制成低、中、高 3 个质量浓度的质控溶液, 按 2.4.2 项下方法处理, 按 2.4.1 项下条件测定; 取适量空白肠灌流液, 按 2.4.2 项下方法处理, 取上清液配制低、中、高 3 个质量浓度的质控溶液, 加入适量黄芪甲苷内标溶液, 混匀, 按 2.4.1 项下条件测定。每个质量浓度进行 6 个样本分析, 以 2 种处理方法中每个质量浓度的指标成分峰面积比值计算回收率。

2.4.7 稳定性考察 配制低、中、高 3 个质量浓度的质控溶液, 37 °C 恒温水浴下放置, 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 取样, 按 2.4.2 项下方法处理, 按 2.4.1 项下条件测定, 计算指标成分峰面积的 RSD。

2.4.8 肠道物理吸附考察 取大鼠小肠,外翻后洗净,置于供试药液中,37 ℃ 条件下孵育 120 min,测定孵育开始及结束后 3 种人参皂苷类成分的质量浓度,比较质量浓度的变化情况。

2.5 大鼠在体单向肠灌注模型试验 参照文献[14]建立大鼠在体单向肠灌注模型。用 37 ℃ 预热的供试液充满各个肠段,以 0.5 mL·min⁻¹ 流速灌注 10 min,将流速调至 0.2 mL·min⁻¹,平衡 20 min 后开始计时,分别在 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 min 收集各肠段出口处灌流液,采用重量法进行校正,消除灌流体积变化的影响,每次收集时精确称取进口瓶质量变化(ΔM_{in})和出口瓶质量变化(ΔM_{out})。按 2.4.1 项下条件测定肠灌流液中 3 种人参皂苷类成分的含量。实验结束后处死大鼠,剪下被灌流肠段,测量,计算药物的吸收速率常数(K_a)及表观通透系数(P_{app})。

$$K_a = [1 - (C_{out} \times \Delta M_{out}) / (C_{in} \times \Delta M_{in})] \times v / V$$

$$P_{app} = -v \times \ln[(C_{out} \times \Delta M_{out}) / (C_{in} \times \Delta M_{in})] / (2\pi \times R \times L)$$

式中 C_{in} 和 C_{out} 分别为肠道进、出口灌流液质量浓度,R 为灌流肠段的横截面半径,L 为灌流肠段的长度,v 为灌流速度(0.2 mL·min⁻¹),V 为肠灌流液的体积(πR²L)。按 2.2 项下方法配制供试品溶液 I, II, III, 考察石菖蒲对 3 种人参皂苷类成分在大鼠不同肠段吸收的影响。

2.6 大鼠外翻肠囊模型试验 参照文献[15]建立大鼠外翻肠囊模型。平衡 5 min 后将体系放入装有 20 mL 供试品溶液的麦氏浴槽中,分别在 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 时从肠囊内取样 200 μL,同时补足空白 K-R 液 200 μL。按 2.4.1 项下条件测定肠囊液中 3 种人参皂苷类成分的含量,计算药物的累积吸收量(Q)。

$$Q = 0.2C_n \times V_{平衡} / V_{取样} + 0.2 \times \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

式中 C_n 为各时间点检测到的指标成分质量浓度,C_i 为第 i(i ≤ n - 1) 个时间点取样的实测指标成分质量浓度,V_{平衡} 为平衡前肠管中加入的 K-R 液体积,V_{取样} 为每次取样的体积。按 2.2 项下配制供试品溶液 I, II, III-L, III-M, III-H, 考察石菖蒲及不同质量浓度石菖蒲挥发油对 3 种人参皂苷类成分肠吸收影响;另取供试品溶液 II, 加入适量盐酸维拉帕米注射液配成含维拉帕米(100 mg·L⁻¹)的供试品溶液 II-Ver, 考察 P-糖蛋白(P-gp)抑制剂对 3 种人参皂苷类成分肠吸收的影响。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计学分析软件,各组间数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),P < 0.05 表示组间差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 专属性考察 专属性试验结果表明,人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 及内标物黄芪甲苷的保留时间分别为 3.44, 3.39, 3.47, 3.65 min, 空白基质及肠吸收液中的内源性物质不干扰待测样品,说明该方法专属性较好,见图 1。

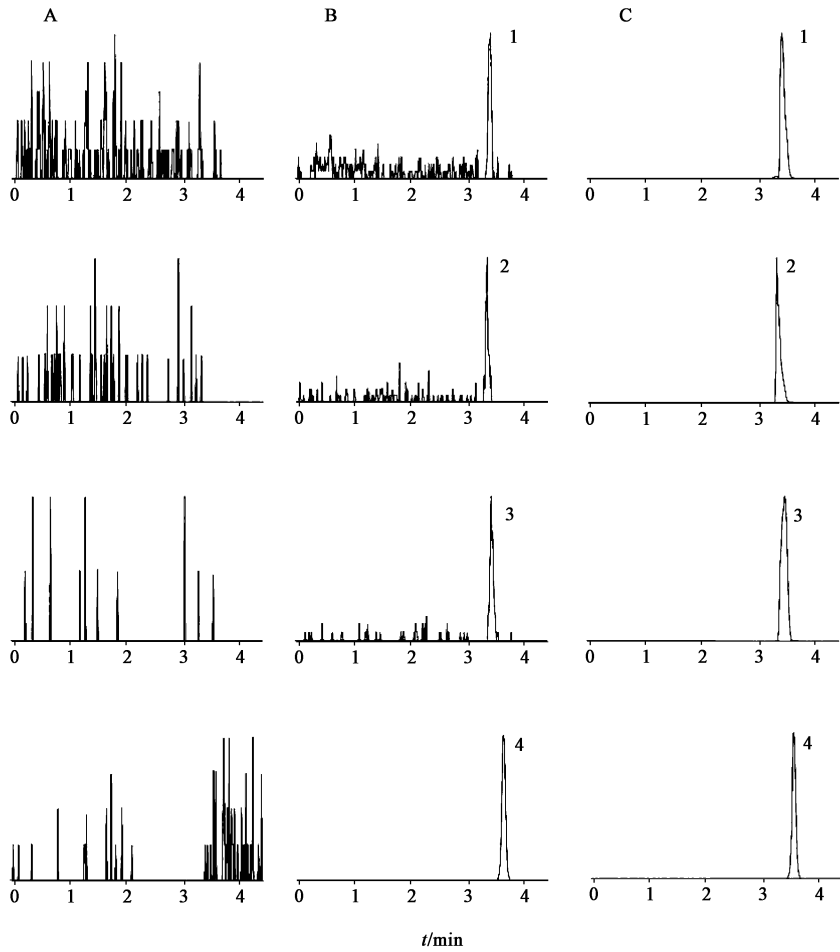
3.2 标准曲线的绘制 得到人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 的回归方程分别为 Y = 0.005 3X + 0.275 5 (R² = 0.999 4), Y = 0.001 9X + 0.081 2 (R² = 0.999 1), Y = 0.003 8X + 0.217 6 (R² = 0.999 7), 线性范围均为 0.5 ~ 8.0 mg·L⁻¹, 定量下限(LLOQ)分别为 0.2, 0.2, 0.5 μg·L⁻¹。

3.3 精密度考察、提取回收率及稳定性考察 研究结果显示,人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 的日内精密度和日间精密度 RSD 均 < 2.0%, 提取回收率处于 95.1% ~ 99.2%, 稳定性 RSD 分别为 0.1% ~ 0.5%, 0.2% ~ 0.9% 和 0.2% ~ 0.3%。表明该分析方法具有良好的精密度及提取回收率,且样品在 24 h 内稳定性良好,可用于这 3 种人参皂苷类成分的定量分析。

3.4 提取物的含量测定及肠道物理吸附试验 提取物 I 中人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 的质量分数分别为 0.487%, 0.419%, 0.630%; 提取物 II 中人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 的质量分数分别为 0.362%, 0.321%, 0.459%; 提取物 III 和提取物 II 中人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 的质量分数一致。物理吸附结果表明 2 h 后药物剩余量 > 98.5%, 可忽略物理吸附对实验的影响。

3.5 指标成分的在体肠吸收特征 按 2.5 项下方法考察石菖蒲对定志小丸中人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 肠吸收的影响,结果见表 1, 2。

由表 1, 2 可知,供试品溶液 I 中 3 种人参皂苷类成分在十二指肠、空肠、回肠、结肠段的 K_a 处于 0.022 ~ 0.085 h⁻¹, P_{app} 处于 0.05 × 10⁻³ ~ 0.191 × 10⁻³ cm·min⁻¹; 3 种人参皂苷类成分在空肠的吸收最好。供试品溶液 II 中人参皂苷 Rg₁, Re, Rb₁ 在十二指肠、空肠、回肠、结肠段的 K_a 均 < 0.12 h⁻¹, P_{app} 均 < 0.26 × 10⁻³ cm·min⁻¹, 表明 3 种人参皂苷类成分的肠吸收较差;与供试品溶液 I 中相应指标成分在各肠段的 K_a 和 P_{app} 相比,供试品 II 无显著性差异。说明石菖蒲在去除挥发油后对 3 种人参皂苷类成分的肠吸收基本没有影响。与供试品溶液 I 和 II



A. 空白基质; B. 对照品(定量限); C. 供试品; 1. 人参皂苷 R_{g1}; 2. 人参皂苷 R_e; 3. 人参皂苷 R_{b1}; 4. 黄芪甲苷(IS)

图 1 肠灌流液的 UPLC-MS/MS 色谱

Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of intestinal perfusate

表 1 不同供试品溶液中人参皂苷 R_{g1}, R_e, R_{b1} 在十二指肠、空肠、结肠及回肠的 K_a ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 K_a of ginsenoside R_{g1}, R_e and R_{b1} from different testing samples in duodenum, jejunum, colon and ileum ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

h⁻¹

成分	供试品溶液	十二指肠	空肠	结肠	回肠
人参皂苷 R _{g1}	I	0.062 ± 0.016	0.077 ± 0.015	0.069 ± 0.009	0.036 ± 0.020
	II	0.076 ± 0.016	0.102 ± 0.029	0.070 ± 0.026	0.049 ± 0.014
	III	0.518 ± 0.010 ^{1,2)}	0.535 ± 0.019 ^{1,2)}	0.353 ± 0.030 ^{1,2)}	0.229 ± 0.034 ^{1,2)}
人参皂苷 R _e	I	0.057 ± 0.031	0.085 ± 0.025	0.061 ± 0.014	0.032 ± 0.022
	II	0.071 ± 0.039	0.098 ± 0.012	0.071 ± 0.014	0.050 ± 0.016
	III	0.301 ± 0.031 ^{1,2)}	0.421 ± 0.087 ^{1,2)}	0.254 ± 0.029 ^{1,2)}	0.189 ± 0.034 ^{1,2)}
人参皂苷 R _{b1}	I	0.038 ± 0.003	0.079 ± 0.006	0.059 ± 0.005	0.022 ± 0.004
	II	0.047 ± 0.011	0.113 ± 0.007	0.079 ± 0.024	0.024 ± 0.010
	III	0.297 ± 0.022 ^{1,2)}	0.452 ± 0.060 ^{1,2)}	0.234 ± 0.028 ^{1,2)}	0.144 ± 0.010 ^{1,2)}

注:与供试品溶液 I 比较¹⁾ P < 0.01;与供试品溶液 II 比较²⁾ P < 0.01(表 2 同)。

比较,供试品溶液 III 中 3 种人参皂苷类成分在 4 个肠段的 K_a 和 P_{app} 显著提高 (P < 0.01), 表明石菖蒲

挥发油可显著提高 3 种人参皂苷类成分的肠吸收, 其中空肠段促吸收作用最佳。

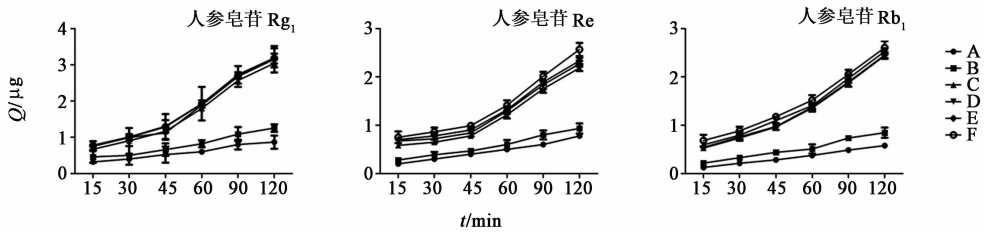
表 2 不同供试品溶液中人参皂苷 Rg_1 , Re 和 Rb_1 在十二指肠、空肠、结肠及回肠的 P_{app} ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 P_{app} of ginsenoside Rg_1 , Re and Rb_1 from different testing samples in duodenum, jejunum, colon and ileum ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

成分	供试品溶液	$P_{app} (\times 10^{-3}) / \text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$			
		十二指肠	空肠	结肠	回肠
人参皂苷 Rg_1	I	0.139 ± 0.035	0.173 ± 0.033	0.156 ± 0.021	0.081 ± 0.046
	II	0.171 ± 0.036	0.239 ± 0.064	0.158 ± 0.058	0.109 ± 0.032
	III	$1.180 \pm 0.023^{1,2)}$	$1.221 \pm 0.044^{1,2)}$	$0.801 \pm 0.069^{1,2)}$	$0.516 \pm 0.031^{1,2)}$
人参皂苷 Re	I	0.129 ± 0.068	0.191 ± 0.057	0.138 ± 0.031	0.071 ± 0.049
	II	0.182 ± 0.087	0.258 ± 0.028	0.160 ± 0.032	0.091 ± 0.031
	III	$0.681 \pm 0.071^{1,2)}$	$0.957 \pm 0.247^{1,2)}$	$0.573 \pm 0.067^{1,2)}$	$0.426 \pm 0.076^{1,2)}$
人参皂苷 Rb_1	I	0.084 ± 0.007	0.178 ± 0.013	0.132 ± 0.012	0.050 ± 0.010
	II	0.105 ± 0.024	0.224 ± 0.016	0.176 ± 0.055	0.054 ± 0.023
	III	$0.672 \pm 0.050^{1,2)}$	$1.029 \pm 0.208^{1,2)}$	$0.527 \pm 0.064^{1,2)}$	$0.324 \pm 0.023^{1,2)}$

3.6 外翻肠囊法研究石菖蒲挥发油对人参皂苷类成分肠吸收的影响 按 2.6 项下方法考察不同浓度石菖蒲挥发油及维拉帕米对人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 吸收量的影响, 见图 2。结果显示各供试品溶液的 $Q-t$ 曲线在 120 min 内均呈现上升趋势。与供试品溶液 I 和 II 比较, 供试品溶液 III-L, III-M, III-H 和 II-Ver 中人参皂苷 Rg_1 , Re , Rb_1 的 Q 均显著提高

($P < 0.01$); 而供试品溶液 II-Ver 中 3 种人参皂苷类成分的吸收与供试品溶液 III-L, III-M, III-H 比较没有显著性差异; 供试品溶液 III-L, III-M 和 III-H 之间差异亦无统计学意义。说明石菖蒲挥发油可显著促进 3 种人参皂苷类成分的 Q , 促吸收作用可能与抑制 P-gp 有关, 但石菖蒲挥发油对人参皂苷类成分 Q 的影响没有浓度依赖性。



A. 供试品溶液 I; B. 供试品溶液 II; C. 供试品溶液 III-L; D. 供试品溶液 III-M; E. 供试品溶液 III-H; F. 供试品溶液 II-Ver

图 2 不同样品中人参皂苷 Rg_1 , Re 和 Rb_1 的累积吸收曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Cumulative absorption curves of ginsenosides Rg_1 , Re and Rb_1 in different samples ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

药物吸收方式研究的方法包括细胞模型法、外翻肠囊法和在体单向肠灌注法等, 其中在体单向肠灌注法能保证肠道血液循环和神经系统的完整性, 能很好地模拟肠道环境, 所得 K_a 与 P_{app} 更准确^[16]。大鼠肠段的内径约为人体的 1/10, 与人体肠灌注的速度 ($2 \sim 3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 相比, 大鼠肠灌注模型采用 $0.2 \sim 0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 进行灌注, 这样可以更好地模拟人体肠道蠕动的生理状态, 参照文献^[17], 本研究选择 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度进行灌注。传统计算净水流值一般采用酚红法, 但也有文献报道酚红在灌注过程中会影响药物的转运和吸收^[18], 故本文采用

重量法对水分变化进行校正, 可直接反映水分肠道吸收和待测药物实际浓度, 求得的 K_a 和 P_{app} 准确性更好。

在体单向肠灌注试验结果显示, 加入石菖蒲挥发油后 3 种人参皂苷类成分的肠吸收显著增加, K_a 增加了 3.97 ~ 8.35 倍, P_{app} 增加了 3.99 ~ 8.49 倍, 其中以空肠促吸收作用最为明显, 说明石菖蒲挥发油具有一定的促吸收作用。外翻肠囊研究结果表明, 加入石菖蒲挥发油后 3 种人参皂苷类成分的 Q 明显高于缺石菖蒲组和缺石菖蒲挥发油组, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 验证了石菖蒲挥发油能够促进定志小丸中 3 种人参皂苷类成分的肠吸

收;同时,随着石菖蒲挥发油浓度的增加, Q 无显著变化,说明石菖蒲挥发油的剂量大小对 3 种人参皂苷类成分的肠吸收没有显著影响。肠道内药物的转运主要与二肽载体, P-gp 及寡肽载体有关,其中 P-gp 可将药物从小肠上皮细胞逆转运至肠腔,从而降低药物的吸收。文献报道芳香开窍类中药可以通过抑制 P-gp 来促进药物吸收^[19],本研究在缺石菖蒲挥发油条件下加入 P-gp 抑制剂——盐酸维拉帕米注射液,发现与加入石菖蒲挥发油后比较, Q 无显著变化,说明石菖蒲挥发油促进 3 种人参皂苷类成分肠吸收的作用机制可能与抑制 P-gp 有关。石菖蒲作为定志小丸中的使药,可促进君药人参中人参皂苷的肠吸收,这与中医传统认为石菖蒲“独行则势弱,佐使则有功”相一致,可为该方临床应用提供实验依据,并为后续探究石菖蒲靶向性提供参考。

[参考文献]

[1] 孙思邈. 备急千金要方. 第 14 卷[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:265-266.

[2] DONG X Z, LI Z L, ZHENG X L, et al. A representative prescription for emotional disease, Ding-Zhi-Xiao-Wan restores 5-HT system deficit through interfering the synthesis and transshipment in chronic mild stress-induced depressive rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(3):1053-1061.

[3] 闫娟娟, 刘明, 胡园, 等. 定志小丸对东莨菪碱所致小鼠学习记忆障碍的影响及机制 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(21):3293-3296.

[4] WANG Z Y, LIU J G, LI H, et al. Pharmacological effects of active components of Chinese herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease: a review [J]. *Am J Chinese Med*, 2016, 44(8):1525-1541.

[5] 苗凤茹, 刘光宇, 林力. 人参提取物及大鼠灌胃给药后入血成分的定性研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(2):148-153.

[6] Odani T, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. II. The absorption, distribution and excretion of ginsenoside Rg₁ in the rat [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31(3):1059-1066.

[7] Kyungmi J, Jihae L, Heeyoung J, et al. Pharmacokinetic study of ginsenoside Re with pure ginsenoside Re and ginseng berry extracts in mouse using ultra performance liquid chromatography/mass spectrometric method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(1):278-280.

[8] 韩旻, 傅韶, 方晓玲. 三七皂苷中人参皂苷 Rg₁ 与 Rb₁ 口服吸收及其体内药代动力学的研究和比较 [J]. *药学学报*, 2007, 42(8):849-853.

[9] 纪娟, 周安, 张亚中, 等. 芳香开窍类中药促进药物体内吸收的研究进展 [J]. *江西中医药大学学报*, 2016, 28(2):106-109.

[10] 冯波, 靖慧军, 郭敏娟, 等. 石菖蒲挥发油和水煎液的抗焦虑作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(9):207-210.

[11] 赖筱娟, 刘汉清, 李俊松. 丹酚酸提取物中 3 种成分的大鼠肠吸收特性及冰片对其吸收的影响 [J]. *药学学报*, 2010, 45(12):1576-1581.

[12] LAI X J, ZHANG L, LI J S. Comparative pharmacokinetic and bioavailability studies of three salvianolic acids after the administration of *Salviae Miltiorrhizae* alone or with synthetical borneol in rats [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(6):883-888.

[13] 程漩格, 王素军, 曾洁, 等. 大鼠在体单向肠灌注模型研究异绿原酸 A 的肠吸收特性 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(18):108-112.

[14] 梁诗婷, 邢丹丹, 梁红萍, 等. 复方丹酚滴丸中冰片对丹酚酸大鼠在体肠吸收特性的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(12):98-101.

[15] 刘艺, 程梅梅, 董健健, 等. 外翻肠囊法研究肝豆汤醇提物主要成分的肠吸收特征 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(13):2571-2576.

[16] Wahajuddin, Singh S P, Patel K, et al. Prediction of human absorption of a trioxane antimalarial drug (CDRI 99/411) using an in-house validated in situ single-pass intestinal perfusion model [J]. *Arzneimittel Forsch*, 2011, 61(7):532-537.

[17] Dahan A, West B T, Amidon G L. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single-pass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 36(2/3):320-329.

[18] Issa C, Gupta P, Bansal A K. Implications of density correction in gravimetric method for water flux determination using rat single-pass intestinal perfusion technique: a technical note [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2003, 4(2):44-49.

[19] 王利苹, 奉建芳, 胡凯莉. 芳香开窍类中药对血脑屏障通透性的调节作用及其机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(6):949-954.

[责任编辑 刘德文]