

异功散中人参皂苷类成分在脾虚大鼠模型 肠吸收动力学变化及其陈皮的影响^{*}

沈龙宇¹, 朱昕昀¹, 胡宇¹, 韦祎², 黄巍^{1**}

(1. 成都中医药大学基础医学院 成都 611137; 2. 海南医学院 海口 571199)

摘要:目的 基于脾虚大鼠模型探讨异功散中陈皮对人参皂苷类成分肠吸收变化的影响及其影响是否与P-gp蛋白外排作用有关。方法 分组设计加入P-gp蛋白激动剂利福平与抑制剂维拉帕米,将36只SD大鼠随机分为空白对照组(6只)与模型组(30只),予以皮下注射利血平建立脾虚模型后将模型组分为异功散组(Y组)、去陈皮异功散组(Y-C组)、异功散利福平组(Y+R组)、去陈皮异功散利福平组(Y-C+R组)、去陈皮异功散维拉帕米组(Y-C+V组),以人参皂苷Rb1、人参皂苷Re及人参皂苷Rg1为指标成分,进行在体单向肠灌流实验,采用HPLC-MS测定指标成分含量并计算肠吸收动力学参数有效渗透系数(P_{eff})与吸收速率常数(K_a)。结果 与Y组相比,Y-C组中人参皂苷Rb1和人参皂苷Re在多个灌流时段的 P_{eff} 显著降低,Y+R组中人参皂苷Rb1、人参皂苷Re及人参皂苷Rg1的 P_{eff} 和 K_a 在多个灌流时段降低,表明陈皮促进人参皂苷Rb1和人参皂苷Re肠吸收且该作用与P-gp蛋白活性有关,但未能影响人参皂苷Rg1的肠吸收;与Y-C组相比,Y-C+V组中P-gp蛋白抑制剂维拉帕米使人参皂苷Rb1和人参皂苷Re在多个灌流时段 P_{eff} 显著升高,而Y-C+R组中P-gp蛋白激动剂利福平使人参皂苷Rb1、人参皂苷Re及人参皂苷Rg1的 P_{eff} 和 K_a 在多个灌流时段显著降低,说明无陈皮干预下,人参皂苷Rb1、人参皂苷Re及人参皂苷Rg1也可能是P-gp蛋白的底物。结论 异功散中陈皮通过发挥抑制P-gp蛋白活性的类维拉帕米作用来促进人参皂苷Rb1和人参皂苷Re肠吸收。

关键词: 异功散 肠吸收动力学 在体单向肠灌流实验 P-gp蛋白

doi: 10.11842/wst.20230701006 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

异功散出自北宋儿科医家钱乙的著作《小儿药证直诀》,该方由四君子汤加陈皮组成,循《内经》“甘温益胃”之法,达健运脾中、行气化滞之功,是治疗脾胃气虚兼气滞证的基础方和代表方^[1-2]。药理研究表明,异功散具有抗炎、免疫调节等广泛药理活性^[3-6],被用于慢性胃炎^[7-9]、小儿厌食症^[10-11]、肠易激综合征等疾病的治疗,临床疗效明确,应用潜力巨大^[12]。

口服生物利用度是决定中药有效成分在体内发挥活性的关键,而药物的肠吸收与其口服生物利用度

密切相关。人参皂苷Rb1、人参皂苷Rg1和人参皂苷Re被证明是人参的重要活性化学成分,但其在机体内肠吸收特性较差,进而影响其口服生物利用度,不利于其药理作用的发挥。据中医理论认识,陈皮味辛而善行,具有行气理滞、健脾燥湿之功用,与人参、茯苓、白术、甘草等补益药物配伍,通过畅气除滞以使全方补而不滞,发挥协同增效的重要功效。相关研究亦发现,陈皮可能促进中药成分肠吸收从而发挥“行气”的功效^[13-14]。

收稿日期:2023-07-01

修回日期:2023-10-28

^{*} 国家自然科学基金委员会地区科学基金项目(81860816):基于异功散中陈皮对肠吸收动力学影响的“补而不滞”配伍机制研究,负责人:韦祎。

^{**} 通讯作者:黄巍,教授,硕士研究生导师,主要研究方向:方剂配伍规律的研究。

小肠上皮细胞中广泛分布的P糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)所介导的大分子外排可降低药物在机体内肠吸收,进而影响其口服生物利用度。因此,为探讨陈皮是否促进异功散中有效成分肠吸收,并进一步探索其可能的作用机制,本研究通过利血平皮下注射21天,以大鼠体重质量改变、体征半定量指标评价以及尿D-木糖排泄率作为评价指标,建立大鼠脾气虚证模型,并进行在体单向肠灌注实验,选择人参皂苷Rb1、人参皂苷Rg1和人参皂苷Re作为异功散指标成分,并联合P-gp抑制剂维拉帕米及激动剂利福平^[15-18],测定指标成分含量并计算肠吸收动力学参数有效渗透系数(P_{eff})与吸收速率常数(K_a)。明确异功散中人参皂苷类成分在脾虚大鼠模型肠吸收动力学变化及其陈皮的影响,以期对异功散的合理临床运用提供理论基础^[19-21]。

1 材料

1.1 仪器

Waters2695高效液相色谱仪、Waters2996光电二极管阵列检测器、QuattroMicroAPIMS型三重四级杆质谱仪、E2M30型机械泵(英国EDWARDS公司);AthenaC18型液相色谱柱(上海安谱实验科技股份有限公司);XW-80A型旋涡混匀器(海门其林贝尔仪器有限公司);TD24A-WS型台式冷冻离心机(湖南湘仪科学仪器设备有限公司);KQ-100DE型超声波清洗机(昆山超声仪器厂);WD-12型水浴氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司);BT100-2J型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司);HH-501(A)型超级恒温水浴锅(金坛区白塔新宝仪器厂);TDP-T1型红外加热灯(四川恒明科技开发有限公司);pHS-320型高精度智能酸碱度计(成都世纪方舟科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

异功散组成:陈皮36g(批号21120701),购自安国市一方药业有限公司;人参36g(批号220319002),购自北京仟草中药饮片有限公司;白术36g(批号211201)、甘草36g(批号210901),购自北京本草方源(亳州)药业科技有限公司;茯苓36g(批号210726),购自厦门燕来福制药有限公司。中药经成都中医药大学张廷模教授鉴定。

试剂:利血平(批号S31410)、D-木糖(批号S11037)、维拉帕米盐酸盐(批号S17115)、利福平(批

号S25463)均购于上海源叶生物科技有限公司;人参皂苷Rb1对照品(批号110704-202230)纯度95.1%、人参皂苷Re对照品(批号110754-202129)纯度96%、人参皂苷Rg1对照品(批号110703-202034)纯度94%,均购于中国食品与药品检定研究院;芍药苷对照品(批号AF21060802)购于成都埃法生物科技有限公司,纯度98%;戊巴比妥钠(批号090205)购于科昊生物工程有限责任公司;99%冰乙酸(批号210616)购于四川西陇化工有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,购于德国SIMARK公司。

1.3 动物

SD大鼠,SPF级,36只,雄性,6-8周龄,体质量200±20g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004,实验动物使用许可证号:SYXK(川)2020-225。

2 方法

2.1 色谱及质谱条件

色谱条件:色谱柱Athena C18(2.1 mm×100 mm, 5 μm),流动相为乙腈(A)-0.1%乙酸铵水溶液(B),柱温:40℃;样品室温:15℃;进样量:10 μL;流速:0.4 mL·min⁻¹。梯度洗脱程序:0-5 min, 16% A:84% B;5-6 min, 16%-21% A:84%-79% B;6-11 min, 21% A:79% B;11-15 min, 21% A-50% A:79% B-50% B;15-21 min, 50% A:50% B;21-25 min, 50% A-60% A:50% B-40% B;25-30 min, 60% A:40% B;30-35 min, 60% A-16% A:40% B-84% B。

质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),多反应检测(MRM)模式进行正离子检测。毛细管电压:3.6 kV;离子源温度:135℃;脱溶剂气:氮气;脱溶剂气流量:400 L·h⁻¹;脱溶剂气温度:350℃;碰撞气为氩气。质谱条件见表1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 冻干粉制备方法

异功散全方:称取人参36g、白术36g、茯苓36g、甘草36g、陈皮36g,合计180g。加入10倍量水,浸泡30 min后煎煮20 min,收集滤液;再加入8倍量水,煎煮2次,每次各20 min,滤过。合并3次的滤液压浓缩成冻干粉。共得冻干粉总重量49.3g,每1g冻干粉含药含有生药3.65g。受试中药水提取物收率为27.40%。

异功散减陈皮方:去陈皮,制备方法同异功散全

表1 各指标成分检测离子对信息

成分	母离子(m/z)	子离子(m/z)	传输电压(V)	碰撞电压(V)
人参皂苷 Rb1	1131.64	365.2	85	65
人参皂苷 Re	969.54	789.6	65	55
人参皂苷 Rg1	823.54	203.2	70	50
芍药苷	500.28	179.2	55	16

方,称取冻干粉总重量,共得42.5 g冻干粉,每1 g冻干粉约含有生药3.39 g。受试中药水提取物收率为29.50%。

2.2.2 Krebs-Ringer 营养液(K-R液)的配制

精密称取NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、NaHCO₃ 1.37 g、NaH₂PO₄ 0.32 g、MgCl₂ 0.02 g、Glucose 1.40 g,溶解在少量灭菌注射用水中。再将CaCl₂ 0.37 g单独溶解并逐滴加入灭菌注射用水中定容至1000 mL后调节pH=7.4。

2.2.3 对照品溶液和内标溶液的制备

精密称取人参皂苷 Rb1 (95.1%)、人参皂苷 Re (96%)、人参皂苷 Rg1 (94%)对照品0.020 g,用75%乙腈水溶解、摇匀后定容至50 mL,得质量浓度分别为380、384、376 μg·mL⁻¹的单一成分储备液,置于4℃冰箱中避光保存备用。精密称取芍药苷(98%)对照品0.020 g,加取适量甲醇溶解、摇匀,定容至20 mL后得质量浓度为980 μg·mL⁻¹的内标溶液,置于4℃冰箱中避光保存备用。

2.2.4 肠灌流供试液的配制

分别精密称取异功散全方、异功散去陈皮方的冻干粉1.37 g、1.47 g,用K-R液稀释、定容至100 mL,即得质量浓度分别约为50 mg生药材·mL⁻¹的肠灌流供试液^[22]。精密称取适量维拉帕米加入异功散去陈皮方供试液,配制含维拉帕米(100 mg·L⁻¹)的肠灌流供试液;精密称取适量利福平,分别加入异功散全方供试液、异功散去陈皮方供试液,配制成各含利福平(100 mg·L⁻¹)的肠灌流供试液。

2.2.5 空白大鼠肠灌流液的采集

取K-R液适量,按照在体单向肠灌流实验方法进行灌流,即得空白肠灌流液^[23]。

2.2.6 肠灌流液分析样品的制备

将异功散全方肠灌流供试液置于37℃恒温水浴锅中预热,进行肠灌流实验,在出口处收集灌流液。精密量取肠灌流液100 μL,加入150 μL芍药苷内标溶液,将样品置于旋涡混匀器上充分混匀,台式冷冻离

心机(13000 rpm, 10 min)离心后取上清液,置于水浴氮吹仪(37℃)上吹干,200 μL甲醇复溶并充分混匀,置于超声波清洗机(100%功率,30 min)超声,再次离心(13000 rpm, 10 min)后,取上清液100 μL进样分析。

2.2.7 肠灌流液质控样品的制备

精密量取人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1对照品溶液各10 μL,加入100 μL空白肠灌流液与150 μL芍药苷内标溶液,后续按“2.2.6”方法处理后再进行分析。

2.3 分析样品的处理方法

将样品置于旋涡混匀器上充分混匀,台式冷冻离心机(13 000 rpm, 10 min)离心后取上清液,置于水浴氮吹仪(37℃)上吹干,200 μL甲醇复溶并充分混匀,置于超声波清洗机(100%功率,30 min)超声,再次离心(13 000 rpm, 10 min)后,取上清液100 μL进样分析。

2.4 脾气虚证大鼠模型的建立

2.4.1 造模试剂的配制

精密称取8 mg利血平粉末,置于15 mL容量瓶中,以0.5%冰乙酸溶解并定容,配成0.8 mg·mL⁻¹的利血平溶液,当天配用,4℃避光保存。

2.4.2 大鼠造模方法

大鼠适应性喂养1周后,随机分为空白对照组大鼠6只和模型组大鼠30只。于每日10:00开始,模型组大鼠按0.8 mg·kg⁻¹剂量背部皮下注射利血平溶液,持续21天,空白对照组大鼠背部皮下注射等量的0.9% NaCl溶液^[24]。

2.5 大鼠在体单向肠灌流模型建立

2.5.1 分组

将“2.4”中成功建立脾气虚证的30只SD大鼠,按体质量分层分为5组,每组各6只大鼠:异功散全方组(Y组)、去陈皮异功散组(Y-C组)、去陈皮异功散维拉帕米组(Y-C+V组)、异功散利福平组(Y+R组)、去陈皮异功散利福平组(Y-C+R组)。

2.5.2 大鼠在体单向肠灌注实验

SD大鼠禁食不禁水12 h,用1%戊巴比妥钠溶液($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉。固定大鼠,沿大鼠的腹部中线剪开腹部,切口约3 cm。找到实验所考察的肠段(从胃部幽门下行1 cm处开始沿小肠下行至盲肠上端1 cm的全段小肠)的两端处各剪一个小V型口,将硅胶管插入并结扎(尽量避开血管来切口及结扎),用浸有生理盐水的纱布覆盖伤口保湿,用红外加热灯照射保温。以预热至 37°C 的生理盐水从小肠上端开口轻缓冲洗肠道,直至肠段无内容物后通入空气来排净生理盐水。用50 mL预热至 37°C 的含药肠灌注供试液以 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速灌注平衡肠段10 min后,在平衡肠段10 min后收集1 mL灌注液作为首个采样时间点;在进口处用已知质量的装有含药灌注液的进口处小瓶开始灌注,在出口处用另一已知质量的接收小瓶来收集肠灌注液,分别于0、0.5、1、1.5、2 h时收集1次灌注液,同时迅速更换下一个已知质量的含药灌入液小瓶和收集液小瓶,冷却至室温后,将灌入和收集的药液称重,共收集2 h的时间点。肠灌注结束后麻醉处死大鼠,剪取考察肠段,并在测量肠道的长度(l)和横截面半径(r)^[23]。

2.5.3 肠吸收动力学参数的计算与数据处理

采用改良重量法校正肠灌注液体积^[25]。将精密量取各时段灌入液1 mL倒入已称重的干净玻璃烧杯中再称量液体质量,按公式(1)计算灌入液的校正密度 ρ_{in} ;将精密量取各时段收集液1 mL倒入已称重的干净玻璃烧杯中再称量液体质量,按公式(2)计算收集液的校正密度 ρ_{out} 。按公式(3)和公式(4)分别计算药物 P_{eff} 和 K_a 。

$$V_{in} = \frac{M_{in}}{\rho_{in}} \quad (1)$$

$$V_{out} = \frac{M_{out}}{\rho_{out}} \quad (2)$$

$$P_{eff} = \frac{-Q_{in} \ln \left(\frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{V_{out}}{V_{in}} \right)}{2\pi r l} \quad (3)$$

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \cdot \frac{V_{out}}{V_{in}} \right) \cdot \frac{Q_{in}}{\pi r^2 l} \quad (4)$$

其中, M_{in} 和 M_{out} 分别表示一定时间内灌入液和收集液的质量(g); V_{in} 和 V_{out} 分别为灌入液和收集液的体积(mL); C_{in} 和 C_{out} 分别为灌入液和收集液中药物的质量浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); Q_{in} 为肠灌注液灌注速度($0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$);

r 和 l 分别为灌注肠段的内径半径(cm)和长度(cm)。

2.6 数据分析

采用Graphpad 9.0统计分析软件分析数据,计量资料结果以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用单因素方差分析(One-Way ANOVA);组间比较,方差齐性采用Dunnett检验,方差不齐采用Dunnett T3检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.7 方法学验证

2.7.1 专属性实验

精密量取空白肠灌注液100 μL ,按“2.3”的操作方法处理后进样分析,另分别量取肠灌注液分析样品及肠灌注液质控样品100 μL 进样分析,观察和比较空白肠灌注液、质控样品和分析样品人参皂苷Rb1、人参皂苷Re、人参皂苷Rg1的色谱行为。

2.7.2 标准曲线制备及线性关系考察

精密量取空白肠灌注液100 μL ,内标溶液150 μL ,分别加入2 μL 、6 μL 、10 μL 、14 μL 、18 μL 及22 μL 的人参皂苷Rb1、人参皂苷Re、人参皂苷Rg1对照品溶液,按照“2.3”方法处理样本,制备成不同质量浓度的对照品测定溶液(人参皂苷Rb1质量分别为浓度:3.80、11.40、19.00、26.60、34.20、41.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;人参皂苷Re质量浓度:3.84、11.52、19.20、26.88、34.56、42.24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;人参皂苷Rg1质量浓度:3.76、11.28、18.80、26.32、33.84、41.36 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;内标芍药苷最终质量浓度:735 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),进样分析,以各成分浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,以待测物与内标峰面积的比值 Y ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为纵坐标,进行回归计算。

2.7.3 精密度实验

分别精密量取人参皂苷Rb1、人参皂苷Re、人参皂苷Rg1对照品溶液2 μL 、6 μL 、10 μL ,加入空白肠灌注液100 μL ,内标溶液150 μL ,按照“2.3”方法处理样本,制备成低、中、高3种质量浓度的质控溶液,对每个质量浓度的质控溶液进行3个样本测定,计算指标峰面积,考察日内精密度;连续测定3天,考察日间精密度。精密度以相对标准偏差RSD来评价。

2.7.4 加样回收率考察

将“2.7.3”制备的质控溶液进样检测,计算质量浓度,将所得质量浓度与实际质量浓度的比值作为方法加样回收率的考察指标。

2.7.5 稳定性考察

将“2.7.3”制备的质控溶液置于恒温水浴锅中,

37℃孵育 2 h, 分别于 0、60、120 min 时取样, 计算指标峰面积, 以 RSD 作为评价指标考察方法稳定性。

3 结果

3.1 脾气虚证大鼠造模结果

以大鼠体质量变化、体征半定量指标评分、尿 D-木糖排泄率测定为评价标准。结果见表 2、表 3、表 4。结果显示, 模型组与空白对照组相比较, 大鼠体质量显著降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)、体征半定量指标评分皆显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.0001$) 且尿 D-木糖排泄率显著下降 ($P<0.0001$), 提示脾气虚大鼠模型成功建立。

3.2 方法学验证结果

3.2.1 专属性实验结果

色谱图见图 1。结果表明, 人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1 和内标芍药苷的保留时间分别为 15.53 min、12.31 min、11.89 min 和 1.68 min, 各待测成分的分离度均良好, 无其他物质干扰, 提示本方法有较强的专属性。

3.2.2 标准曲线

结果表明, 各指标成分在所设的浓度范围内线性关系良好, 各指标成分的相关系数 R^2 皆大于 0.999, 结果见表 3。

3.2.3 精密度实验结果

人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1 的日内精密度、日间精密度结果见表 4。结果显示, 人参皂苷

Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1 的日内精密度、日间精密度皆小于 9%, 表明所建立的方法精密度良好, 可用于肠灌流液样品的检测。

3.2.4 加样回收率考察结果

人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1 的加样回收率结果见表 4。人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1 在不同质量浓度下的加样回收率均为 91.7%~107.1%, 满足测定要求。

3.2.5 稳定性考察结果

人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1 在不同质量浓度下的稳定性结果见表 4。在 37℃孵育 2 h 条件下, 结果显示, 人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1 峰面积的 RSD 均小于 9%, 说明各指标成分在肠灌流液中至少可以稳定 2 h。

3.3 肠吸收动力学变化

3.3.1 异功散人参皂苷类成分肠吸收动力学变化及陈皮的影响

人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1 的肠吸收的 P_{eff} 及 K_a 分别见表 5、表 6。比较 Y 组、Y-C 组的指标成分在各个时段的 P_{eff} 与 K_a 可以发现, 与 Y 组相比, Y-C 组中人参皂苷 Rb1 在各个灌流时段的 P_{eff} 皆显著降低 ($P<0.05$); 在灌流第 0~30 min 时, Y-C 组中人参皂苷 Re 的 P_{eff} 显著降低 ($P<0.05$)。与 0~30 min 相比, Y 组、Y-C 组中人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re 和人参皂苷 Rg1 在各个时段的 P_{eff} 皆有不同程度的下降。

表 2 脾气虚证大鼠造模评价表 ($\bar{x}\pm s$, 空白对照组 $n=6$, 模型组 $n=30$)

评价标准	造模时间	空白对照组	模型组
大鼠体质量变化(g)	造模第 1 天	255.5±17.9	242.3±34.0
	造模第 7 天	309.2±20.9	259.7±46.2*
	造模第 14 天	329.5±21.8	280.0±50.9*
	造模第 21 天	339.6±22.1	270.1±50.1**
大鼠体征半定量指标评分	造模第 7 天	0.500±0.548	1.857±1.351*
	造模第 14 天	0.667±0.516	4.429±1.342****
	造模第 21 天	0.833±0.753	6.143±1.027****
造模前后大鼠尿 D-木糖排泄率(%)	造模前	46.09±7.46	43.52±19.09
	造模第 21 天	45.76±6.02	11.53±7.51****

注: 与空白对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

表 3 各指标成分的标准曲线方程

成分	线性范围 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	线性关系	相关系数 (R^2)
人参皂苷 Rb1	3.80~41.80	$Y=153.182X+315.382$	0.9990
人参皂苷 Re	3.84~42.24	$Y=23.7316X+12.8925$	0.9994
人参皂苷 Rg1	3.76~41.36	$Y=65.8849X+46.0210$	0.9997

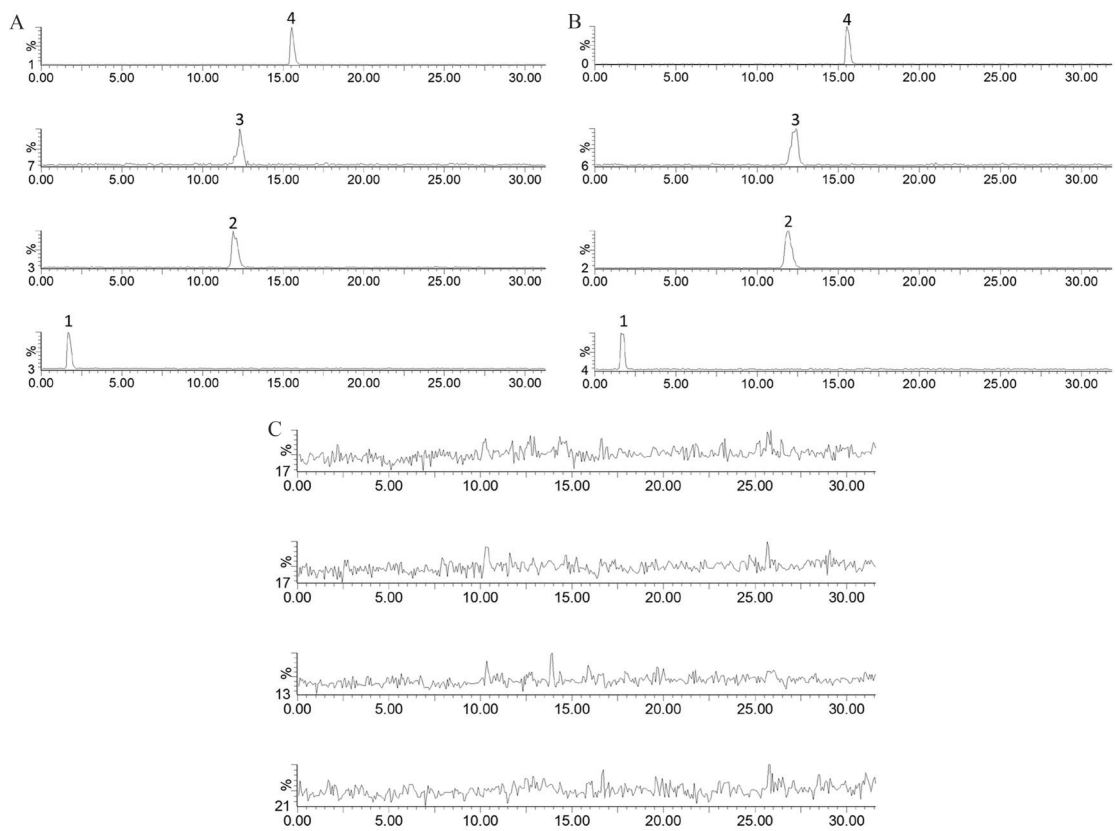


图1 专属性考察色谱图

注:A:质控样品色谱图;B:分析样品色谱图;C:空白肠灌注液色谱图;1:芍药苷;2:人参皂苷Re;3:人参皂苷Rg1;4:人参皂苷Rb1。

表4 各指标成分的精密度、加样回收率及稳定性

成分	质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	日内精密度(RSD%)	日间精密度(RSD%)	加样回收率(%)	稳定性(RSD%)
人参皂苷Rb1	3.80	4.97	5.63	98.3-101.1	4.58
	11.40	5.26	7.15	95.8-106.6	3.45
	19.00	6.27	3.00	94.5-102.4	4.28
人参皂苷Re	3.84	8.57	6.03	96.4-100.8	1.53
	11.52	4.36	6.64	94.8-102.4	2.29
	19.20	4.63	2.33	95.1-108.0	4.19
人参皂苷Rg1	3.76	1.33	5.81	99.3-107.1	1.37
	11.28	2.14	8.88	91.7-102.0	8.15
	18.80	1.84	6.86	96.5-103.1	3.26

与Y组相比,Y-C组中人参皂苷Rb1的 K_a 在各个灌流时段皆呈下降趋势,在90-120 min时具有显著差异($P<0.05$);在0-30 min时,Y-C组中人参皂苷Re的 K_a 显著降低($P<0.05$)。同样,Y组、Y-C组中人参皂苷Rb1、人参皂苷Re和人参皂苷Rg1在各时段的 K_a 皆有不同程度的下降,这与 P_{eff} 结果表现出相似性。

3.3.2 异功散中陈皮影响人参皂苷类成分肠吸收与P-gp蛋白外排作用的相关性

与Y-C组相比,Y-C+V组中人参皂苷Rb1在各个

灌流时段的 P_{eff} 皆显著升高($P<0.001$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.05$),并恢复至Y组中人参皂苷Rb1的 P_{eff} 水平;在0-30 min时段,Y-C+V组中人参皂苷Re的 P_{eff} 也出现同样变化($P<0.05$)。

与Y-C组相比,Y-C+R组中人参皂苷Rb1的 P_{eff} 在各个灌流时段都显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.0001$ 或 $P<0.05$),同时人参皂苷Rb1的 K_a 在各个灌流时段皆显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 或 $P<0.01$);人参皂苷Re的 P_{eff} 和 K_a 在60-90 min时显著降

表5 人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1 的 $P_{\text{eff}} \times 10^{-5} (\bar{x} \pm s, n=6, \text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$

成分	时间 (min)	Y 组	Y-C 组	Y-C+V 组	Y+R 组	Y-C+R 组
人参皂苷 Rb1	0-30	8.960±1.425	5.582±0.807*	6.849±2.324 ^{△△△}	4.069±1.809***	2.909±1.299 [△]
	30-60	5.052±1.180	3.391±1.074*	5.801±1.073 ^{△△}	1.242±0.792****	0.936±0.686 ^{△△}
	60-90	5.718±1.399	4.058±0.976*	6.025±1.090 ^{△△}	0.813±0.527****	0.410±0.407 ^{△△△△}
	90-120	3.843±0.987	2.153±1.053*	3.571±0.779 [△]	2.067±0.596*	0.718±0.340 [△]
人参皂苷 Re	0-30	5.341±0.595	2.838±0.691*	4.998±1.572 [△]	2.100±1.596***	3.191±1.257
	30-60	2.492±0.978	2.634±1.581	2.227±1.420	1.348±1.009	2.358±1.893
	60-90	2.568±1.273	2.906±1.124	1.387±1.126	0.903±0.648*	0.825±0.443 ^{△△}
	90-120	2.031±1.143	2.238±1.076	1.942±1.652	2.260±0.426	1.292±0.417
人参皂苷 Rg1	0-30	5.336±0.814	4.782±1.586	5.242±1.119	1.481±0.919***	3.557±0.778
	30-60	2.550±0.919	2.774±0.908	3.504±1.350	1.998±0.931	3.147±1.833
	60-90	2.048±1.302	3.184±0.567	3.074±0.997	1.266±0.746	0.865±0.435 ^{△△△}
	90-120	1.619±0.620	2.245±1.655	3.999±1.864	1.519±0.089	0.926±0.992

注:与 Y 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.001$,*** $P<0.0001$;与 Y-C 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$,^{△△△} $P<0.001$,^{△△△△} $P<0.0001$ 。

表6 人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1 的 $K_a \times 10^{-5} (\bar{x} \pm s, n=6, \text{s})$

成分	时间 (min)	Y 组	Y-C 组	Y-C+V 组	Y+R 组	Y-C+R 组
人参皂苷 Rb1	0-30	6.495±0.455	5.418±0.383	5.660±0.506	4.587±1.188**	3.955±1.232 [△]
	30-60	5.339±0.730	4.144±0.912	5.485±0.477	2.069±1.193****	1.561±0.995 ^{△△△}
	60-90	5.578±0.827	4.577±0.604	5.603±0.591	1.747±1.273****	0.790±0.772 ^{△△△△}
	90-120	4.630±0.817	3.033±1.111*	4.347±0.476	3.211±0.715	1.407±0.587 ^{△△#}
人参皂苷 Re	0-30	5.502±0.291	3.730±0.565*	5.119±1.013	2.844±1.526***	3.943±1.073
	30-60	3.501±0.934	3.336±1.543	3.045±1.526	2.113±1.353	2.915±1.896
	60-90	3.144±1.332	3.709±1.118	2.252±1.345	1.523±0.913	1.543±0.685 [△]
	90-120	2.932±1.297	3.052±1.013	2.759±1.822	3.447±0.444	2.705±1.282
人参皂苷 Rg1	0-30	5.523±0.594	4.936±0.606	5.269±0.628	2.419±0.947****	4.330±0.611
	30-60	3.577±0.944	3.610±0.677	4.227±1.097	2.940±0.905	3.685±1.446
	60-90	2.942±1.483	4.014±0.368	3.967±0.946	2.047±0.999	1.485±0.654 ^{△△}
	90-120	2.558±0.786	2.862±1.551	4.462±1.078	2.573±0.119	1.425±1.384

注:与 Y 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$;与 Y-C 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$,^{△△△} $P<0.001$,^{△△△△} $P<0.0001$;与 Y+R 组比较,* $P<0.05$ 。

低($P<0.01$ 或 $P<0.05$),人参皂苷 Rg1 的 P_{eff} 和 K_a 在 60-90 min 时也降低($P<0.001$ 或 $P<0.01$)。

与 Y 组相比,Y+R 组中人参皂苷 Rb1 的 P_{eff} 在各个灌流时段降低($P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 或 $P<0.0001$ 或 $P<0.05$),同时人参皂苷 Rb1 的 K_a 在 0-30 min、30-60 min 和 60-90 min 时段显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.0001$ 或 $P<0.0001$),人参皂苷 Re 的 P_{eff} 分别在灌流时段 0-30 min、60-90 min 显著降低($P<0.001$ 或 $P<0.05$),人参皂苷 Re 的 K_a 在 0-30 min 显著降低($P<0.001$),人参皂苷 Rg1 的 P_{eff} 与 K_a 在 0-30 min 时间段也出现降低($P<0.001$ 或 $P<0.0001$)。此外,在 90-120 min 时,与 Y+R 组相比,Y-C+R 组中人参皂苷 Rb1 的 K_a 显著升高($P<0.05$)。

4 讨论

异功散中陈皮能使全方在行补益之效的同时不碍于滋腻而阻滞气机,使其适用于治疗脾胃气虚兼气滞证。本研究试从肠吸收动力学的角度探讨陈皮发挥“行气”作用的现代科学内涵,为异功散的合理临床运用提供理论依据。目前的各项研究表明人参、甘草和白术是四君子汤有效化学成分的主要来源^[26-27]。其中甘草作为使药,且有学者通过体外研究发现甘草可能干预 P-gp 蛋白从而影响药物的肠吸收特性^[28],因此本研究不考虑采用甘草有效成分作为指标成分。白术中主要含有白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III 等倍半萜类成分,在特定批次的白术样品中检出白术内

酯I的含量最高^[29],因此本研究将白术内酯I作为白术的待检测指标成分,但由于白术内酯I化学性质不稳定,可能在供试液制备过程中发生了结构的改变^[30-32],导致供试液未能检出白术内酯I,因此本研究最终选择人参的主要有效成分人参皂苷Rb1、人参皂苷Rg1和人参皂苷Re作为指标成分^[33-37]。

通常认为,药物在大鼠肠道的 P_{eff} 小于 0.03×10^{-4} cm/s则表明该药物肠道吸收较差;而 P_{eff} 大于 0.2×10^{-4} cm/s时则提示该药物肠道吸收较好,若 P_{eff} 居于二者之间则可以说该药物在肠道具有中等吸收^[38]。Y组进行肠灌注时,指标成分人参皂苷Rb1和人参皂苷Re在各个灌注时间段的皆大于 0.2×10^{-4} cm/s,提示人参皂苷Rb1和人参皂苷Re具有良好的肠吸收效应,这与其他学者研究结果一致^[39-40]。人参皂苷Rg1的 P_{eff} 在0-30 min、30-60 min、60-90 min时均大于 0.2×10^{-4} cm/s,而在90-120 min时 P_{eff} 小于 0.2×10^{-4} cm/s,这提示人参皂苷Rg1在肠道可能为中等吸收,其吸收效应相较于人参皂苷Rb1和人参皂苷Re而言则更弱。

比较Y组及Y-C组中三个指标成分 P_{eff} 和 K_a 的变化,可发现陈皮显著增加了人参皂苷Rb1与人参皂苷Re在肠道的吸收,并促进二者肠吸收速率,但人参皂苷Rg1的肠吸收可能不受陈皮的影响。三种指标成分在肠道的吸收量及吸收速率随灌注时间的增加而呈下降趋势,这可能与指标成分在肠道内的吸收属被动扩散有关^[41]。与Y-C组相比,Y-C+V组中人参皂苷Rb1与人参皂苷Re在各个灌注时段的 P_{eff} 的变化提示人参皂苷Rb1和人参皂苷Re的肠吸收与P-gp蛋白的外排作用密切相关,二者可能是P-gp蛋白的底物,而陈皮可能发挥抑制P-gp蛋白活性以促进人参皂苷Rb1和人参皂苷Re的肠吸收。与Y-C组相比,Y-C+R组中除人参皂苷Re在某些灌注时段出现 P_{eff} 和 K_a 的降低以外,人参皂苷Rb1的 P_{eff} 和 K_a 在多个灌注时段皆显

著降低,说明即使没有陈皮的干预,P-gp蛋白的过度表达也会显著影响到人参皂苷Rb1和人参皂苷Re的肠吸收,同时更进一步证明了人参皂苷Rb1可能是P-gp蛋白的底物。与Y组相比,Y+R组中人参皂苷Rb1和人参皂苷Re的 P_{eff} 和 K_a 在多个灌注时段降低,这提示陈皮对于人参皂苷Rb1和人参皂苷Re的促肠吸收效应受到了P-gp蛋白活性的影响。此外,在90-120 min时,与Y-C+R相比,Y+R组中人参皂苷Rb1的 K_a 显著升高的变化表明陈皮可有效逆转由利福平导致人参皂苷Rb1肠吸收速率减慢的效应。本研究在结果中虽未发现陈皮能对人参皂苷Rg1的肠吸收造成显著影响,但Y+R组与Y组相比、Y-C+R组与Y-C组相比,人参皂苷Rg1的 P_{eff} 和 K_a 在多个灌注时段出现降低,这也提示人参皂苷Rg1可能是P-gp蛋白的底物,其肠吸收亦与P-gp蛋白密切相关。

由于小肠自身会吸收和分泌水分,使灌流液体积发生改变,从而导致测定的指标成分浓度结果出现误差,因此需要对灌流液体积进行水分校正。常用的两种水分校正的方法有酚红法与重量法,由于酚红在长时间的灌流中会在一定程度上被肠道吸收,且酚红本身也干扰指标成分在肠道的吸收转运或分析测定的可能性^[42],因此本研究采用了黄嗣航等^[25]研究提出的改良重量法对灌流液体积进行校正以消除其体积变化对指标成分含量的影响。

5 小结

本研究通过在体单向肠灌注实验发现异功散中陈皮促进人参皂苷Rb1和人参皂苷Re的肠吸收且该影响可能与P-gp转运蛋白有关,为揭示陈皮“行气”功效的科学内涵及进一步发掘高效安全的P-gp蛋白抑制剂、提升临床药物的口服生物利用度提供了依据和新的思路。

参考文献

- 何牟,李静,杨骏,等.经典名方四君子汤的历史沿革与关键信息考证.上海中医药杂志,2023,57(4):83-90.
- 冯英强,韩亚雅,闫宏丽,等.从小儿异功散看门九章的大病以胃思想.湖北中医杂志,2019,41(1):45-47.
- 刘克伟,陈英妹,甄如义.“培土生金法”对早期支气管哮喘幼鼠气道炎症影响分析.中国医药科学,2020,10(13):32-35.
- 刘华,欧阳学认,张雪丽,等.异功散早期干预对支气管哮喘幼年小鼠气道炎症的影响.环球中医药,2017,10(10):1167-1169.
- 姜一陵,郑秦,季玉婷,等.异功散调节巨噬细胞铁代谢的机制研究.上海中医药大学学报,2019,33(3):53-60.
- 梁燕妮,欧阳学认,廖永州.异功散对哮喘小鼠气道炎症反应和肠道菌群的影响.世界中医药,2021,16(10):1534-1538.
- 赵克学.柴枳异功散治疗慢性胃炎30例疗效观察.云南中医中药杂志,2010,31(9):41-42.
- 张件云.柴芍异功散为主分型辨治慢性浅表性胃炎224例总结.湖南中医杂志,2011,27(5):3-19.

- 9 王瑞华. 加味异功散治疗慢性萎缩性胃炎 60 例. 实用中医药杂志, 2011, 27(10):679.
- 10 郭明玉, 陈荣坤. 异功散加味治疗小儿厌食症 368 例. 江西中医药, 2001, 32(6):43.
- 11 韩喧, 赵丽萍. 异功散联合刺四缝治疗小儿厌食 60 例. 中国中医药现代远程教育, 2013, 11(19):47.
- 12 黄礼, 韦伟, 刘英莲. 加味异功散辅助马来酸曲美布汀治疗腹泻型肠易激综合征疗效及对结肠组织酪酪肽和密封蛋白 1 表达的影响. 广州中医药大学学报, 2022, 39(3):508-515.
- 13 傅曼琴, 肖更生, 吴继军, 等. 广陈皮促消化功能物质基础的研究. 中国食品学报, 2018, 18(1):56-64.
- 14 李荃, 郑鹏, 黎攀, 等. 广陈皮药理作用与临床应用研究进展. 吉林中医药, 2022, 42(9):1092-1095.
- 15 Elmeliy M, Vourvahis M, Guo C, *et al.* Effect of P-glycoprotein (P-gp) inducers on exposure of P-gp substrates: Review of clinical drug-drug interaction studies. *Clin Pharmacokinet*, 2020, 59(6):699-714.
- 16 Ledwith K V, Gibbs M E, Barnes R W, *et al.* Cooperativity between verapamil and ATP bound to the efflux transporter P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol*, 2016, 118:96-108.
- 17 Efferth T, Volm M. Multiple resistance to carcinogens and xenobiotics: P-glycoproteins as universal detoxifiers. *Arch Toxicol*, 2017, 91(7):2515-2538.
- 18 Nguyen T T L, Duong V A, Maeng H J. Pharmaceutical formulations with P-glycoprotein inhibitory effect as promising approaches for enhancing oral drug absorption and bioavailability. *Pharmaceutics*, 2021, 13(7):1103.
- 19 董一昕, 李腾辉, 刘燕, 等. 两种脾气虚证模型大鼠临床证候特征的比较. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(2):150-154.
- 20 刘婧, 乔波, 谭周进. 中医脾气虚证现代实质研究进展. 世界华人消化杂志, 2022, 30(16):693-700.
- 21 中华中医药学会脾胃病分会. 脾虚证中医诊疗专家共识意见 (2017). 中医杂志, 2017, 58(17):1525-1530.
- 22 安歆, 张华, 张艺竹, 等. 采用在体单向肠灌注流模型研究葛根芩连汤不同配伍组主要指标成分的肠吸收特性. 药科学报, 2012, 47(12):1696-1702.
- 23 李梅, 刘帆, 陈艳, 等. 基于大鼠在体循环肠灌注流模型研究不同粒径天麻粉的肠吸收动力学. 中国中药杂志, 2020, 45(1):179-187.
- 24 梁雪丹, 林传权, 曾信平, 等. 基于体征半定量指标评价的利血平致脾气虚大鼠模型的研究. 中药新药与临床药理, 2019, 30(1):26-32.
- 25 黄嗣航, 龙晓英, 袁飞, 等. 酚红法和改良重量法分别研究葛根素的大鼠在体肠吸收机制. 广东药学院学报, 2012, 28(6):603-607.
- 26 朱容慧, 赵军宁, 毕岳琦, 等. 中药肠吸收动力学研究进展. 药物评价研究, 2010, 33(1):25-29.
- 27 孟雪, 贾璞, 张毅, 等. P-gp 调控的石菖蒲对远志成分肠吸收特性的影响. 现代中药研究与实践, 2019, 33(5):19-23.
- 28 何丹, 颜苗, 李焕德, 等. 甘草提取物及其主要成分对 Caco-2 细胞膜上 P-gp 功能和表达的影响. 中国药理学杂志, 2010, 45(10):751-755.
- 29 姚兆敏, 汪电雷, 彭华胜, 等. 白术 UPLC 指纹图谱模式识别及含量测定研究. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5):622-629.
- 30 梁志远, 甘秀海, 吴坤, 等. 正交试验优选白术中白术内酯 I 和白术内酯 III 提取工艺. 中成药, 2015, 37(6):1356-1360.
- 31 Deng M, Chen H J, Long J Y, *et al.* Atractylenolides (I, II, and III): A review of their pharmacology and pharmacokinetics. *Arch Pharm Res*, 2021, 44(7):633-654.
- 32 周海艳, 高云佳, 王敏, 等. UPLC 同时测定不同产地白术中 3 种白术内酯成分的含量. 中国药品标准, 2023, 24(1):5-14.
- 33 张羽, 黄美祯, 潘春曲, 等. 四君子汤有效化学成分以及防治消化系统疾病机制研究进展. 海南医学院学报, 2023, 29(7):554-560.
- 34 王灿灿, 戴黎蓉, 赵旻, 等. UPLC 法同时测定四君子汤中 7 种化学成分的含量. 沈阳药科大学学报, 2018, 35(8):639-645.
- 35 Qu G L, Qi X S, Shao S, *et al.* Pharmacokinetics of Sijunzi Decoction in rat plasma after oral administration using ultra-high-performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(11):e4334.
- 36 Zhao Q Q, Gao X, Yan G L, *et al.* Chinmedomics facilitated quality-marker discovery of Sijunzi Decoction to treat spleen qi deficiency syndrome. *Front Med*, 2020, 14(3):335-356.
- 37 王科, 刘培, 张莉丹, 等. 基于指纹图谱和 6 种成分含量测定的四君子汤质量控制研究. 中药材, 2020, 43(5):1170-1175.
- 38 王丽峰, 国大亮, 黄富强, 等. 大鼠在体单向肠灌注流法对核黄素肠吸收的研究. 药学研究, 2016, 35(3):136-138.
- 39 万悦, 申雨棣, 邹俊凤, 等. 理中汤提取物中 5 种主要活性成分在体肠吸收特征研究. 药科学报, 2021, 56(6):1689-1695.
- 40 陶嘉悦, 刘斯琪, 汪静, 等. 外翻肠囊法研究异功散的肠吸收特征. 中国现代中药, 2023, 25(1):90-98.
- 41 李文兰, 南莉莉, 季宇彬, 等. 人参中人参皂苷 Rg₁, Rb₁ 在体肠吸收影响因素的研究. 中国中药杂志, 2009, 34(20):2627-2632.
- 42 王帅, 李清清, 王帆, 等. 葛根素药物纳米晶自稳定 pickering 乳的大鼠肠吸收特性研究. 中国中药杂志, 2018, 43(10):2162-2167.

Changes in Intestinal Absorption Kinetics of Ginsenosides in Yi Gong San in the Rat Model of Spleen Deficiency and its Effect of Pericarpium Citri Reticulatae

SHEN Longyu¹, ZHU Xinyun¹, HU Yu¹, WEI Yi², HUANG Wei¹

(1. College of Basic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Hainan Medical College, Haikou 571199, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Pericarpium Citri Reticulatae on changes of the intestinal absorption of ginsenoside components in Yi Gong San based on the rat model of spleen deficiency and whether its effect is related to the exocytosis of P-gp protein. Methods The group design included the P-gp protein agonist rifampicin and the inhibitor verapamil, and 36 SD rats were randomly divided into a blank control group (6 rats) and a model group (30 rats), and then subcutaneously injected with rifampicin to establish a model of splenic deficiency, and then the model group was divided into the Yigong San fullparty (Y) group, the lack of Pericarpium Citri Reticulatae (Y-C) group, the YiGong San combined with rifampin (Y+R) group, the lack of Pericarpium Citri Reticulatae combined with verapamil (Y-C+V) group and the lack of Pericarpium Citri Reticulatae combined with rifampin (Y-C+R) group, Ginsenoside Rb1, ginsenoside Re and ginsenoside Rg1 were used as the index components in an in situ unidirectional intestinal perfusion test, and HPLC-MS was used to determine the content of the index components and to calculate the kinetic parameters of intestinal absorption, the effective permeability coefficient (P_{eff}) and the absorption rate constant (K_a). Results Compared with group Y, P_{eff} of ginsenoside Rb1 and Re were significantly lower in Y-C at multiple perfusion sessions, and P_{eff} and K_a of ginsenoside Rb1, ginsenoside Re, and ginsenoside Rg1 were lower in Y+R at multiple perfusion sessions, suggesting that Pericarpium Citri Reticulatae promotes the intestinal absorption of ginsenoside Rb1 and ginsenoside Re and that this effect is related to the activity of the P-gp protein, but failed to change the intestinal absorption of ginsenoside Rg1. The P-gp protein inhibitor verapamil significantly increased the P_{eff} of ginsenoside Rb1 and Re in the Y-C+V compared with the Y-C, while the P-gp protein agonist rifampicin significantly decreased the P_{eff} and K_a of ginsenoside Rb1, ginsenoside Re, and ginsenoside Rg1 in the Y-C+R in multiple perfusion sessions. The significant decrease in P_{eff} and K_a at multiple perfusion times suggests that ginsenoside Rb1, ginsenoside Re, and ginsenoside Rg1 may be substrates for P-gp proteins in the absence of Pericarpium Citri Reticulatae intervention. Conclusion Pericarpium Citri Reticulatae promotes the intestinal absorption of ginsenoside Rb1 and ginsenoside Re by exerting a verapamil-like effect that inhibits the activity of P-gp proteins in Yi Gong San.

Keywords: Yi Gong San, Kinetics of intestinal absorption, In situ unidirectional intestinal perfusion test, P-gp protein

(责任编辑: 李青)