

• 药理与临床 •

吴茱萸汤外翻肠囊吸收成分与原药中各成分相关关系研究

许永崧, 潘学强, 龚慕辛*, 贺蕊, 卢旭然, 尚雅文

首都医科大学中医药学院, 北京 100069

摘要: 目的 研究吴茱萸汤中9种成分的量对其自身吸收进入外翻肠囊成分量的影响, 以指导吴茱萸汤改善偏头痛模型鼠指标的样品的调配。方法 采用大鼠外翻肠囊模型获取10种吴茱萸汤吸收样品, 以HPLC-DAD对吴茱萸汤及外翻肠囊吸收样品中9种成分进行定量、半定量, 得到各成分在吴茱萸汤中的量以及在肠囊中的累积吸收量。用偏最小二乘回归法(partial least squares regression, PLSR)对吴茱萸汤中各成分的量及总体吸收量进行相关分析。结果 在实验质量浓度范围内, 柠檬黄素-3-O- β -D-葡萄糖苷、人参皂苷Rg₁、6-姜辣素、吴茱萸苦素在吴茱萸汤中质量浓度越高, 吸收入肠囊的总量越多; 而人参皂苷Re、人参皂苷Rb₁、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱则相反。成分之间对吸收的相互影响关系十分复杂。结论 在根据吸收谱-效相关分析结果调配吴茱萸汤样品时, 应考虑成分吸收的相互影响关系以达到更佳疗效。

关键词: 吴茱萸汤; 外翻肠囊; 吸收; 偏最小二乘回归; 相关分析

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)17-2490-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.17.013

Correlation between absorption ingredients in Wuzhuyu Decoction and uptake amount in everted intestinal sac

XU Yong-song, PAN Xue-qiang, GONG Mu-xin, HE Rui, LU Xu-ran, SHANG Ya-wen

Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To explore the influence of the contents of nine ingredients in Wuzhuyu decoction on its own uptake amount into the everted intestinal sac, in order to blend Wuzhuyu decoction samples to improve the index of migraine model rats. **Methods** The everted intestinal sac model was established to determine the absorption samples of 10 kinds of Wuzhuyu decoction. HPLC-DAD method was used to analyze the contents of nine ingredients in Wuzhuyu decoction and absorption samples quantitatively and semi-quantitatively. The partial least squares regression method was used to correlate the contents in the decoction and the total absorption quantity of nine ingredients. **Results** In the experimental concentration range, the higher the concentration of limocitrin-3-O- β -D-glucoside, ginsenoside Rg₁, 6-gingerol, and rutaevin in the decoction were, the more they were absorbed into the intestine sac, while ginsenosides Re, Rb₁, limonin, evodiamine, and rutaecarpine were contrary. The interaction of different ingredients on each other's absorption was complicated. **Conclusion** The above relationship should be considered to obtain the satisfactory samples of Wuzhuyu decoction.

Key words: Wuzhuyu decoction; everted intestinal sac; absorption; partial least squares regression; correlation analysis

吴茱萸汤出自《伤寒论》, 历代用其治疗虚寒性偏头痛。前期研究采用分析外翻肠囊吸收成分与偏头痛模型小鼠药效指标之间关系的吸收谱-效相关方法, 发现了影响药效指标的效应成分^[1], 并拟以此指导吴茱萸汤各成分的调配以达到更佳疗效。但在比较吴茱萸汤吸收谱-效分析结果和药效的药物谱-效分析结果时发现, 少数成分在不同谱-效分析

中产生作用的结果相反, 如在药物谱-效相关研究中, 吴茱萸碱的量越高, 越有利于偏头痛模型组小鼠脑组织5-羟色胺(5-HT)量的升高, 而在吸收谱-效相关研究中则相反, 即吸收量越高, 越不利于5-HT量的改善^[1]。考虑可能是吸收环节的影响, 因此本实验研究各成分质量浓度对其本身吸收入肠囊量的影响, 探究各成分间对吸收的相互影响, 为吴

收稿日期: 2014-01-07

基金项目: 北京市教育委员会科技计划面上项目(SQKM201210025011); 首都中医药研究专项重点课题(13ZY02)

作者简介: 许永崧, 硕士研究生。Tel: 13501135486 E-mail: komatuxys@foxmail.com

*通信作者 龚慕辛, 博士, 博士生导师, 从事中药复方物质基础研究。Tel: (010)83911632 E-mail: gongmuxin@126.com

茺蔚汤药效物质成分调配提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ALC-M 组织-器官恒温水浴系统(上海奥尔科特生物技术有限公司); Agilent 1100 系列高效液相色谱系统, Chemstation 色谱工作站, 含四元泵、自动进样器、DAD 检测器 (Agilent 公司); MG—2200 氮吹仪(EYELA 公司); 3K15 低温高速离心机(Sigma 公司); DV215CD 电子分析天平 (Sartorius 公司); KQ—250 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Thermo 超低温冰箱(Fisher 公司, 美国); ALPHA 1—2 PLUS 冷冻干燥机 (Christ, 德国); ZH—2 涡旋混合器 (天津药典标准仪器厂); SY—601 超级恒温水浴 (天津市欧诺仪器仪表有限公司)。

1.2 药品与试剂

吴茺蔚碱 (批号 110801-200908, 质量分数 99.7%)、吴茺蔚次碱 (批号 110801-201207, 质量分数 99.4%)、柠檬苦素 (批号 110800-201205, 质量分数 88.5%)、人参皂苷 Rg₁ (批号 110703-201128, 质量分数 93.4%)、人参皂苷 Re (批号 110754-201123, 质量分数 89.1%)、人参皂苷 Rb₁ (批号 110704-201223, 质量分数 95.9%)、6-姜辣素 (批号 111833-201102, 质量分数 98.6%), 以上对照品购自中国食品药品检定研究院; 柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷 (自制, 质量分数 ≥95%); 乙腈 (色谱纯)、甲醇 (色谱纯) 购自 Fisher 公司。

吴茺蔚、人参、生姜、大枣等饮片均由首都医科大学中医药学院中药资源教研室罗容副教授鉴定, 符合《中国药典》2010 年版各药项下规定。

1.3 实验动物

Wistar 大鼠, 雄性, 体质量 (300±20) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK (京) 2012-0001。

2 方法

2.1 吴茺蔚汤样品溶液的制备

将吴茺蔚汤组方各药味配伍, 按照文献方法^[2]进行煎煮, 药液减压浓缩并干燥成干膏, 共煎煮 10 种汤 (编号 1~10) 以及各缺味阴性吴茺蔚汤。

取吴茺蔚汤干膏适量, 精密称定 (约相当于生药量 3.5 g), 加入分析甲醇 20 mL 超声 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加色谱甲醇溶解, 定容至 5 mL, 用 0.45 μm 针头滤器滤过, 取 10 μL 进样, 测定各成分。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取各对照品, 用甲醇超声溶解, 定容, 作为混合对照品母液。各对照品的质量浓度如下: 柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷 0.152 mg/mL、人参皂苷 Rg₁ 1.682 mg/mL、人参皂苷 Re 0.542 mg/mL、人参皂苷 Rb₁ 1.134 mg/mL、柠檬苦素 1.846 mg/mL、6-姜辣素 0.258 2 mg/mL、吴茺蔚碱 0.092 mg/mL、吴茺蔚次碱 0.044 mg/mL。

2.3 Tyrode 缓冲液的配制

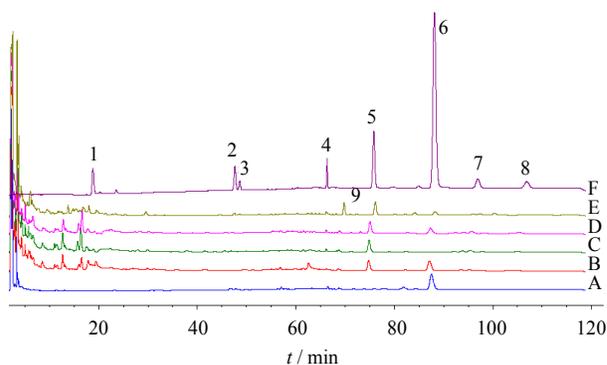
按照文献方法^[3]配制。

2.4 色谱条件

Kromasil-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 甲醇-乙腈-水梯度洗脱 (0~5 min, 1:16:83; 5~10 min, 1:16:83~1:19:80; 10~45 min, 1:19:80~4:19:77; 45~55 min, 4:19:77~4:25:71; 55~65 min, 4:25:71~4:34:62; 65~110 min, 4:34:62), 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm, 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μL。

2.5 吴茺蔚汤样品测定的方法学考察

2.5.1 专属性试验 比较混合对照品溶液、吴茺蔚汤样品溶液以及各缺味阴性样品溶液的色谱行为。在“2.4”项色谱条件下, 8 种对照品峰形良好, 各峰分离度高, 各阴性对照液和吴茺蔚汤中其他成分对其无干扰, 说明方法专属性较好, 结果见图 1。



A-吴茺蔚阴性对照液 B-人参阴性对照液 C-生姜阴性对照液 D-大枣阴性对照液 E-吴茺蔚汤 F-混合对照品 1-柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷 2-人参皂苷 Rg₁ 3-人参皂苷 Re 4-人参皂苷 Rb₁ 5-柠檬苦素 6-6-姜辣素 7-吴茺蔚碱 8-吴茺蔚次碱 9-吴茺蔚苦素
A-Evodiae Rutaecarpae Fructus negative control solution B-ginseng negative control solution C-Zingiberis Recens Rhizoma negative control solution D-Jujubae Fructus negative control solution E-Wuzhuoyu decoction F-mixed solution of reference substances 1-limocitrin-3-O-β-D-glucoside 2-ginsenoside Rg₁ 3-ginsenoside Re 4-ginsenoside Rb₁ 5-limonin 6-6-gingerol 7-evodiamine 8-rutaecarpine 9-ruteavin

图 1 吴茺蔚汤专属性 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of specificity for Wuzhuoyu Decoction

2.5.2 标准曲线的制备 取各对照品,按文献方法^[1]以甲醇配制成不同浓度的混合对照品溶液,用 0.45 μm 针头滤器滤过,进样 10 μL。线性关系考察结果见表 1。

2.5.3 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,测定各成分,计算 RSD,结果均小于 3%,符合分析要求。

2.5.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,分别于 0、3、6、9、12 h 进样,测定,计算 RSD,结果均小于 5%,说明在 12 h 内样品稳定,

符合分析要求。

2.5.5 重复性试验 取 3 号汤的干膏 6 份,每份 0.90 g,精密称定,按“2.1”项下方法制成供试品溶液,进样 10 μL,测定,计算 RSD。结果均小于 5%,符合分析要求。

2.5.6 加样回收率试验 取 3 号汤的干膏 6 份,每份 0.45 g,精密称定,分别加入 8 种对照品适量,按“2.1”项下方法制成供试品溶液,进样 10 μL,测定,计算回收率和 RSD。各成分回收率在 97.03%~104.7%,RSD 均小于 5%,符合分析要求。

表 1 吴茱萸汤中 8 种成分的线性关系考察

Table 1 Linear relationship of eight ingredients in Wuzhuyu Decoction

成分	回归方程	r	线性范围 / (μg·mL ⁻¹)
柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷	Y=33 742 X-95.59	0.999 5	19.00~152.00
人参皂苷 Rg ₁	Y=2 737 X+32.69	0.999 5	210.60~1 682.00
人参皂苷 Re	Y=2 999 X-10.01	0.999 5	67.90~542.00
人参皂苷 Rb ₁	Y=2 460 X+12.81	0.999 5	142.00~1 134.00
柠檬苦素	Y=6 970 X-32.03	0.999 5	57.80~1 846.00
6-姜辣素	Y=66 623 X-153.0	0.999 5	14.10~258.20
吴茱萸碱	Y=41 984 X-18.26	0.999 5	11.50~92.00
吴茱萸次碱	Y=75 447 X-65.67	0.999 5	5.50~44.00

2.6 外翻肠囊吸收样品溶液的制备

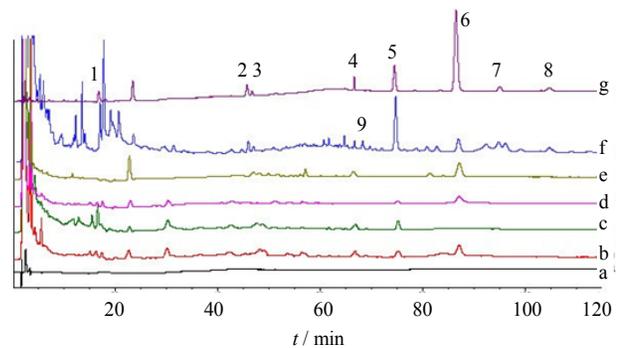
按文献方法^[3]于给药后 15、30、45、60、90 min (空肠),15、30、45、60、90、120 min (回肠)分别取样,每次 200 μL,同时补充同体积 37 °C 预热的台氏液。将空肠前 4 个时间点样品混合,回肠前 5 个时间点样品混合,最后 1 个时间点样品单独放置,-20 °C 保存。取样结束后,测量肠囊内剩余药液体积。按文献方法^[3]处理样品,冷冻干燥后甲醇超声提取,离心后氮气吹干,以甲醇复溶后,取 20 μL 进样,测定。

2.7 外翻肠囊吸收样品溶液测定^[1]

外翻肠囊吸收样品的测定参考文献方法^[1],方法专属性考察结果见图 2,线性关系考察结果见表 2,准确度试验、精密度试验、稳定性试验、萃取回收率试验,实验结果均符合生物样品分析要求。

2.8 累积吸收量计算方法

药物累积吸收量按公式 $Q=C_1 \times V_1 + C_2 \times 0.1 \times (V+V_2) / V$ 计算,Q 为空肠 90 min 内或回肠 120 min 内药物的累积吸收量,C₁ 为混合样品质量浓度,V₁ 为混合样品体积,C₂ 为最后 1 个时间点样品质量浓



a-空白 Tyrode 液 b-大枣阴性对照液 c-生姜阴性对照液 d-人参阴性对照液 e-吴茱萸阴性对照液 f-吴茱萸汤 g-混合对照品
1-柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷 2-人参皂苷 Rg₁ 3-人参皂苷 Re 4-人参皂苷 Rb₁ 5-柠檬苦素 6-6-姜辣素 7-吴茱萸碱 8-吴茱萸次碱 9-吴茱萸苦素
a-blank Tyrode's solution b-Jujubae Fructus control solution c-Zingiberis Recens Rhizoma negative control solution d-ginseng negative control solution e-Evodiae Rutaecarpae Fructus negative control solution f-Wuzhuyu decoction g-mixed solution of reference substances 1-limocitrin-3-O-β-D-glucoside 2-ginsenoside Rg₁ 3-ginsenoside Re 4-ginsenoside Rb₁ 5-limonin 6-6-gingerol 7-evodiamine 8-rutaecarpine 9-ruteavin

图 2 外翻肠囊吸收样品检测专属性 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of specificity for absorption samples in everted intestinal sacs

度, V_2 为肠囊内剩余药液体积, V 为每次取样体积 200 μL , 肠囊总体吸收量为空肠与回肠吸收量之和。

3 结果与分析

3.1 10种吴茱萸汤中各成分测定结果

结果见表3。

3.2 10种吴茱萸汤外翻肠囊样品累积吸收量比较

按照“2.8”中公式计算累积吸收量, 结果见表

4。结果显示柠檬黄素-3- O - β - D -葡萄糖苷、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Rb_1 、吴茱萸苦素、柠檬苦素及 6-姜辣素在不同质量浓度时均可进入空肠或回肠; 吴茱萸碱在 3 号汤组空肠和回肠中均未检出, 在其他汤组的空肠或回肠中检出; 人参皂苷 Re 在 10 号汤组空肠和回肠中均未检出; 吴茱萸次碱仅在 1 号汤组空肠及 2 号汤组回肠中检出。

表2 吸收样品中8种成分的线性关系考察

Table 2 Linear relationship of eight ingredients in absorption samples

成分	回归方程	r	线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
柠檬黄素-3- O - β - D -葡萄糖苷	$Y=54\ 891 X-219.6$	0.999 5	11.98~65.00
人参皂苷 Rg_1	$Y=4\ 231 X+22.05$	0.999 0	54.93~298.00
人参皂苷 Re	$Y=5\ 812 X-45.89$	0.999 5	44.97~244.00
人参皂苷 Rb_1	$Y=5\ 170 X-33.91$	0.999 5	52.35~284.00
柠檬苦素	$Y=12\ 427 X-8.325$	0.999 5	30.97~168.00
6-姜辣素	$Y=17\ 436 X-159.0$	0.999 5	5.53~30.00
吴茱萸碱	$Y=14\ 981 X-71.73$	0.999 5	3.69~20.00
吴茱萸次碱	$Y=90\ 195 X-62.69$	0.999 0	3.871~21.000

表3 10种吴茱萸汤中9种成分测定结果

Table 3 Detemination of nine ingredients in 10 kinds of Wuzhuyu Decoction

汤号	$\rho / (\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$								吴茱萸苦素 [#]
	柠檬黄素-3- O - β - D -葡萄糖苷	人参皂苷 Rg_1	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb_1	柠檬苦素	6-姜辣素	吴茱萸碱	吴茱萸次碱	
1	0.426 5	1.233 6	0.704 7	1.638 8	0.345 5	0.098 6	0.105 1	0.070 6	2 591.9
2	0.069 9	0.352 9	0.194 9	0.533 5	1.114 8	0.088 0	0.162 2	0.027 0	7 976.3
3	0.066 0	0.219 9	0.091 2	0.122 1	0.529 6	0.022 0	0.026 8	0.008 3	409.2
4	0.043 7	0.252 4	0.099 6	0.239 8	0.763 6	0.032 4	0.028 6	0.006 6	3 997.9
5	0.282 8	0.798 1	0.347 3	0.859 6	2.522 5	0.156 3	0.312 5	0.065 4	23 990.0
6	0.340 6	0.476 1	0.221 0	0.521 3	0.222 5	0.056 9	0.095 0	0.042 9	1 380.0
7	0.042 4	0.208 9	0.129 8	0.151 6	0.455 2	0.046 8	0.085 2	0.011 6	3 008.9
8	0.383 5	0.884 7	0.548 9	1.636 2	5.149 2	0.298 6	0.179 0	0.041 8	24 909.4
9	0.108 9	0.346 8	0.243 4	0.690 6	1.658 0	0.048 1	0.061 4	0.014 7	7 805.2
10	0.122 0	0.399 4	0.265 4	0.467 6	0.673 3	0.067 9	0.154 4	0.049 3	6 289.4

[#]经 LC-MS、HPLC-DAD 确定为吴茱萸苦素, 因无对照品, 以峰面积进行半定量 (表4同)

[#]was identified as ruteavine with the method of LC-MS and HPLC-DAD, and the peak area was applied to semi-quantitative analysis for lacking substance (The same in Table 4)

3.3 相关关系分析结果

吴茱萸汤中成分与外翻肠囊累积吸收量的偏最小二乘回归 (PLSR) 结果见图3。结果中相关系数为正表示吴茱萸汤中成分的量越高外翻肠囊吸收量 (空肠、回肠、总体) 越大, 负数反之。

从结果可知, 在空肠, 柠檬黄素-3- O - β - D -葡萄糖苷、人参皂苷 Rg_1 、吴茱萸苦素、柠檬苦素、

6-姜辣素在汤中的量越高, 吸收入肠囊的量越大, 人参皂苷 Re 、人参皂苷 Rb_1 、吴茱萸碱、吴茱萸次碱反之。在回肠, 柠檬黄素-3- O - β - D -葡萄糖苷、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 、吴茱萸苦素、6-姜辣素、吴茱萸碱在汤中的量越高, 吸收入肠囊的量越大, 人参皂苷 Rb_1 、柠檬苦素、吴茱萸次碱反之。就总体吸收量而言, 柠檬黄素-3- O - β - D -葡萄

表4 10种吴茱萸汤中9种成分的外翻肠囊吸收量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Absorption amounts of nine ingredients in 10 kinds of Wuzhuyu Decoction in everted intestinal sacs ($\bar{x} \pm s, n=6$)

汤号	Q/mg									吴茱萸苦素
	柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷	人参皂苷 Rg ₁	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb ₁	柠檬苦素	6-姜辣素	吴茱萸碱	吴茱萸次碱		
空肠	1	0.028 8±0.008 6	0.107 9±0.034 5	0.055 5±0.017 5	0.025 1±0.010 0	0.012 7±0.004 4	0.043 0±0.013 7	0.006 4±0.011 4	0.000 4±0.000 7	506.4±193.3
	2	0.015 0±0.005 2	0.046 1±0.027 2	0.023 3±0.014 4	0.050 9±0.018 4	0.064 8±0.018 1	0.067 0±0.017 4	0	0	1 164.8±236.7
	3	0.039 6±0.014 0	0.201 4±0.103 9	0.061 2±0.029 0	0.063 6±0.022 3	0.078 7±0.035 5	0.083 7±0.019 4	0	0	246.9± 98.1
	4	0.020 3±0.006 7	0.015 8±0.026 1	0.007 7±0.018 8	0.110 1±0.075 6	0.057 7±0.021 3	0.131 5±0.040 5	0.024 7±0.026 8	0	1 097.4±183.4
	5	0.032 5±0.007 3	0.036 7±0.015 7	0.016 0±0.007 4	0.040 0±0.026 9	0.054 1±0.009 3	0.050 5±0.007 8	0.008 4±0.006 7	0	860.7±296.9
	6	0.030 3±0.018 1	0.066 1±0.012 3	0.031 9±0.007 6	0.496 0±0.036 7	0.008 6±0.001 6	0.026 9±0.005 1	0	0	262.9± 60.3
	7	0.023 7±0.005 2	0.058 7±0.039 5	0.002 9±0.007 1	0.069 9±0.017 8	0.087 4±0.024 4	0.071 2±0.024 6	0.003 0±0.003 6	0	898.5±203.5
	8	0.022 6±0.009 3	0.017 2±0.019 6	0.002 7±0.006 7	0.027 6±0.008 7	0.058 8±0.017 0	0.065 2±0.023 1	0	0	820.0±163.5
	9	0.023 1±0.016 8	0.012 7±0.019 5	0.004 7±0.010 6	0.035 5±0.015 8	0.076 2±0.023 2	0.075 7±0.022 4	0.002 6±0.005 8	0	1 117.2±213.0
	10	0.012 0±0.002 3	0.018 4±0.032 1	0	0.198 3±0.047 0	0.034 7±0.019 7	0.054 4±0.025 4	0.008 6±0.021 1	0	713.2±699.7
回肠	1	0.042 9±0.007 7	0.179 6±0.027 0	0.087 2±0.016 7	0.039 5±0.008 2	0.019 6±0.006 2	0.075 4±0.010 2	0	0	544.1± 95.4
	2	0.017 7±0.004 2	0.086 1±0.042 0	0.048 0±0.015 7	0.051 2±0.016 6	0.094 2±0.026 6	0.092 6±0.017 5	0.005 8±0.013 0	0.000 9±0.002 0	1 445.2±441.4
	3	0.030 9±0.007 9	0.288 9±0.071 6	0.064 6±0.017 5	0.073 3±0.033 9	0.076 0±0.017 8	0.101 4±0.023 1	0	0	437.7±169.7
	4	0.040 8±0.012 9	0.016 7±0.040 8	0.007 8±0.019 1	0.082 2±0.028 0	0.135 7±0.045 3	0.207 1±0.057 5	0.004 1±0.010 1	0	1 407.2±491.2
	5	0.043 5±0.006 0	0.054 0±0.049 6	0.017 1±0.010 1	0.052 5±0.027 7	0.077 3±0.016 5	0.081 7±0.017 3	0.017 6±0.009 9	0	1 192.6±326.7
	6	0.024 6±0.003 7	0.077 7±0.008 5	0.037 9±0.004 1	0.032 9±0.015 6	0.010 6±0.003 1	0.034 2±0.003 5	0.001 6±0.002 5	0	369.3±116.0
	7	0.032 9±0.011 6	0.092 4±0.067 2	0.036 2±0.033 3	0.086 4±0.023 9	0.112 5±0.029 2	0.088 6±0.024 6	0.024 7±0.016 3	0	982.4±210.0
	8	0.034 3±0.008 0	0.049 7±0.029 7	0.026 2±0.021 2	0.044 2±0.019 5	0.083 1±0.021 0	0.087 4±0.031 7	0.004 8±0.008 0	0	1 245.4±195.9
	9	0.036 3±0.015 4	0.106 6±0.071 0	0.058 2±0.028 3	0.096 0±0.054 5	0.162 9±0.056 7	0.144 3±0.039 5	0.010 5±0.016 8	0	1 643.2±285.7
	10	0.008 6±0.002 7	0.028 3±0.047 6	0	0.145 9±0.096 2	0.035 7±0.013 3	0.040 8±0.034 8	0	0	931.1±543.7
总体吸收量	1	0.071 7±0.014 1	0.287 5±0.045 8	0.142 7±0.026 6	0.064 6±0.017 9	0.032 2±0.010 3	0.118 4±0.021 8	0.006 4±0.011 4	0.000 4±0.000 7	1 050.5±158.8
	2	0.032 7±0.010 1	0.132 2±0.070 7	0.071 2±0.032 1	0.102 1±0.038 6	0.159 0±0.055 2	0.159 6±0.045 6	0.005 8±0.011 9	0.000 9±0.001 8	2 610.0±720.0
	3	0.070 6±0.012 7	0.490 3±0.138 5	0.125 8±0.030 9	0.137 0±0.036 1	0.154 7±0.034 9	0.185 1±0.029 5	0	0	684.6±193.0
	4	0.061 1±0.018 3	0.032 5±0.041 4	0.015 5±0.024 0	0.192 3±0.084 0	0.193 5±0.056 9	0.338 6±0.090 4	0.028 8±0.024 6	0	2 504.6±542.6
	5	0.076 0±0.009 3	0.090 7±0.058 9	0.033 2±0.016 5	0.092 5±0.031 1	0.131 4±0.011 6	0.132 2±0.024 1	0.026 0±0.014 7	0	2 053.3±408.8
	6	0.054 9±0.017 1	0.143 8±0.014 9	0.069 7±0.009 7	0.082 5±0.048 0	0.019 3±0.002 1	0.061 1±0.004 8	0.001 6±0.002 5	0	631.4±134.5
	7	0.056 7±0.008 4	0.151 1±0.063 1	0.039 1±0.038 9	0.156 2±0.024 4	0.199 9±0.026 8	0.159 8±0.028 8	0.027 6±0.017 0	0	1 881.0±157.8
	8	0.056 9±0.016 2	0.066 8±0.023 8	0.028 9±0.019 6	0.071 8±0.019 4	0.141 9±0.030 6	0.152 6±0.046 2	0.004 8±0.008 0	0	2 065.4±308.9
	9	0.057 6±0.028 9	0.126 3±0.096 3	0.068 4±0.039 7	0.133 1±0.006 8	0.242 2±0.069 8	0.224 6±0.048 2	0.012 7±0.022 7	0	2 760.5±471.5
	10	0.020 5±0.003 4	0.046 7±0.045 2	0	0.344 2±0.092 9	0.070 4±0.024 6	0.095 2±0.036 3	0.008 6±0.021 1	0	1 644.3±768.0

糖苷、人参皂苷 Rg₁、6-姜辣素、吴茱萸苦素在汤中的量越高，吸收入肠囊的量越大，人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱反之。

4 讨论

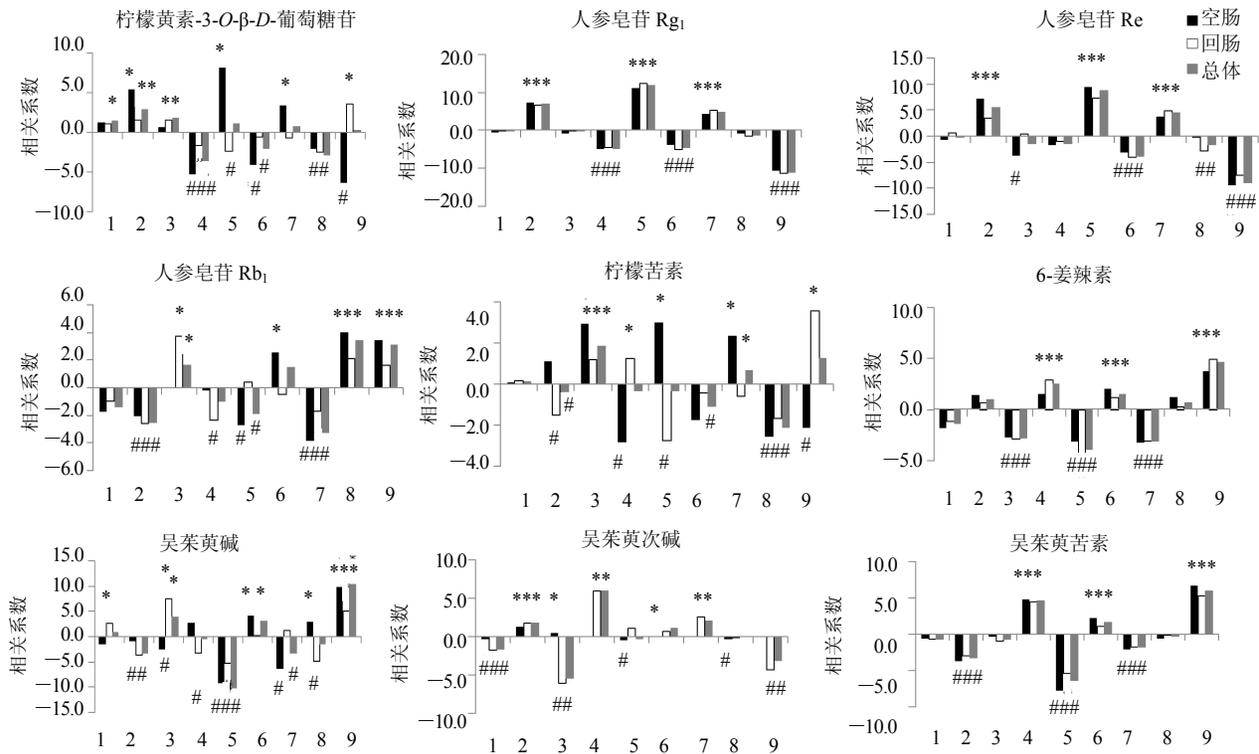
4.1 柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷和吴茱萸苦素

目前鲜有关于柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷和

吴茱萸苦素口服吸收研究的报道。在本实验中，柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷(42.4~426.5 μg/mL)和吴茱萸苦素在总体吸收量相关系数为正，推测其吸收机制为被动扩散。

4.2 人参皂苷 Rg₁

有文献报道^[4]指出人参皂苷 Rg₁ 肠壁吸收机制为被动扩散。龚慕辛等^[3]研究发现，人参皂苷 Rg₁



1-柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷 2-人参皂苷 Rg₁ 3-人参皂苷 Re 4-人参皂苷 Rb₁ 5-柠檬苦素 6-6-姜辣素 7-吴茱萸碱 8-吴茱萸次碱 9-吴茱萸苦素
*代表该成分对相应成分影响正向作用排前3位, #代表该成分对相应成分影响负向作用排前3位
1-limocitrin-3-O-β-D-glucoside 2-ginsenoside Rg₁ 3-ginsenoside Re 4-ginsenoside Rb₁ 5-limonin 6-6-gingerol 7-evodiamine 8-rutaecarpine 9-ruteavin
*Top 3 positive effects on the corresponding components, # Top 3 negative effects on the corresponding components

图3 吴茱萸汤9种成分的量与肠囊吸收量的相关分析结果

Fig. 3 Related analysis of nine ingredients between Wuzhuyu Decoction and absorption amounts in everted intestinal sacs

在不同质量浓度 (28.56、14.28、7.14 μg/mL) 均可进入肠囊, 且给药质量浓度越大, 人参皂苷 Rg₁ 的吸收量越大。但冯亮等^[5]以大鼠在体肠循环实验研究人参皂苷 Rg₁ 的在体肠吸收动力学时发现, 吸收速率常数在低质量浓度 (20 μg/mL) 和中质量浓度 (200 μg/mL) 时相同, 且大于高质量浓度 (2 000 μg/mL) 时, 认为其吸收机制可能存在主动转运或促进扩散。本实验人参皂苷 Rg₁ (208.9~1 233.6 μg/mL) 在总体吸收量相关系数为正, 说明人参皂苷 Rg₁ 的肠吸收为被动扩散。质量浓度不同是否对其吸收影响不同, 其单体和在复方中的吸收是否不同有待进一步证实。

有研究^[4]表明人参皂苷 Rg₁ (75~750 μg/mL) 的吸收过程不受细胞膜外排载体的作用, 不是 P-糖蛋白 (P-gp) 的底物。但也有文献报道^[6]指出, P-gp 抑制剂维拉帕米可增加人参皂苷 Rg₁ (100 μg/mL) 在鼠肺上皮细胞中的质量浓度, 利用 Caco-2 细胞模型研究人参皂苷 Rg₁ 对 P-gp 功能和表达的影响^[7], 发现高质量浓度 (20 μg/mL) 的人参皂苷 Rg₁ 可通

过直接影响 P-gp 外排作用而减少细胞内 P-gp 底物罗丹明-123 的外排, 增强罗丹明-123 跨小肠上皮细胞的转运; 萨础拉等^[8]以外翻肠囊模型研究三七皂苷的吸收及 P-gp 相互作用研究中发现人参皂苷 Rg₁ (300 μg/mL) 具有明显的 P-gp 底物转运特性及抑制 P-gp 底物外排作用。以上研究说明人参皂苷 Rg₁ 是 P-gp 的底物, 并抑制 P-gp。人参皂苷 Rg₁ 是否通过抑制 P-gp 而增强自身的吸收, 有待于进一步研究。

4.3 人参皂苷 Re

蒋杰等^[9]发现人口服 300 mL 生脉饮时, 人参皂苷 Re 的药代动力学属于一级动力学吸收。水文波^[10]以外翻肠囊法研究三七提取物中 5 种皂苷的小肠吸收时也发现, 人参皂苷 Re 的肠吸收属于一级动力学过程, 高质量浓度 (0.31 μg/mL) 给药时肠吸收量明显增加。龚慕辛等^[3]研究中同样发现人参皂苷 Re 的肠囊吸收量高质量浓度 (147.8 μg/mL) > 中质量浓度 (73.9 μg/mL) = 低质量浓度 (36.9 μg/mL)。但从本实验的结果上看, 人参皂苷 Re 在空肠及总

体吸收量的回归系数均为负值, 在回肠的回归系数为正值, 但数值偏小, 本实验中人参皂苷 Re 为 91.2~704.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 不排除有特殊吸收机制存在, 有待于进一步研究。

4.4 人参皂苷 Rb₁

有文献报道^[4]指出人参皂苷 Rb₁ 的肠壁吸收机制为单纯的被动扩散, 吸收过程不受细胞膜外排载体的作用, 而本研究结果有所不同, 本实验中人参皂苷 Rb₁ 质量浓度为 122.1~1 638.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 质量浓度范围大, 可能是研究结果不同的原因, 不排除有特殊吸收机制存在, 有待于进一步研究。

有研究^[8,11]表明人参皂苷 Rb₁ (30~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 为 P-gp 的底物, 能通过抑制 P-gp 的活性而提高人参皂苷 Rb₁ 的吸收。本实验结果似与上述结论不同, 有待进一步研究。

4.5 柠檬苦素

张秀云等^[12]以原位肠灌流与 Caco-2 细胞研究柠檬苦素的吸收机制时, 发现原位灌流时浓度 (4.0、8.0、12.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对柠檬苦素的吸收没有显著性影响, 在 Caco-2 细胞实验中发现当给药质量浓度大于 141.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后, 柠檬苦素的吸收存在饱和现象, 其吸收机制不是单纯扩散, 可能为促进扩散。龚慕辛等^[3]的研究中发现, 柠檬苦素在空肠肠囊吸收量高质量浓度 (480.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > 中质量浓度 (240.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) > 低质量浓度 (120.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 而在回肠肠囊吸收量为高质量浓度 > 低质量浓度 > 中质量浓度, 本实验汤中柠檬苦素的质量浓度为 222.5~5 149.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 质量浓度范围大, 可能是造成柠檬苦素在空肠和回肠的吸收情况不同的原因。

有研究^[12]认为 P-gp 抑制剂如维拉帕米能够显著提高 Caco-2 细胞对柠檬苦素 (141.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的吸收, 柠檬苦素为 P-gp 的底物。另有文献报道^[13]指出柠檬苦素是一种强效 P-gp 抑制剂, 在 9.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时即可发挥作用, 这可能是本研究发现柠檬苦素能够促进人参皂苷 Rg₁ 吸收的原因。

4.6 6-姜辣素

龚慕辛等^[3]的研究中发现在不同质量浓度 (52.32、26.16、13.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 情况下其均能很快进入肠囊, 且随着给药浓度越大, 肠囊的吸收量越大。Nievergelt 等^[14]以 Caco-2 细胞模型研究 6-姜辣素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的吸收机制时发现为被动扩散, 本实验结果与其研究结果一致。

Nievergelt 等^[14]还发现 6-姜辣素在浓度为 8.8

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 不管是单体还是混合物给药, 对 P-gp 均不表现抑制作用, 推测其不是 P-gp 的底物或者抑制剂。但是, Zhang 等^[15]同样以 Caco-2 细胞模型研究 6-姜辣素的吸收机制时发现, 6-姜辣素在 29.4、73.6、147.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均对 P-gp 有抑制作用, 这提示药物的浓度不同, 对 P-gp 的影响也有不同。本实验吴茱萸汤中 6-姜辣素质量浓度为 22.0~298.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 推测对 P-gp 作用可能随浓度不同而不同, 这可能是 6-姜辣素对同为 P-gp 蛋白底物的柠檬苦素、人参皂苷 Rg₁ 肠囊吸收影响不一致的原因。

4.7 吴茱萸碱

龚慕辛等^[3]的研究发现, 不同给药剂量、肠段对吴茱萸碱的吸收有很大影响: 吴茱萸碱高质量浓度 (626.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 时在空肠和回肠中均未检出, 中质量浓度 (313.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 仅在空肠的 150 min 后检出, 而低质量浓度 (156.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 却在 60 min 后在空肠和回肠中均检出, 表明给药浓度越高, 越难吸收, 与本实验吴茱萸碱空肠的相关系数为负值相符, 推测其吸收机制不是被动扩散; 而在回肠的相关系数为正值, 可能为被动吸收。本实验中吴茱萸碱质量浓度为 26.8~312.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 范围较上述大, 可能是本实验结果与其结果有一定相似性而不完全相同的原因。

Adams 等^[16]以 CEM/ADR5000 细胞研究吴茱萸碱、吴茱萸次碱对 P-gp 的影响时发现, 吴茱萸碱、吴茱萸次碱对 P-gp 的作用很弱, 且吴茱萸碱并不通过 P-gp 转运。而在董宇等^[17]的研究中同样发现吴茱萸碱 (15.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的转运不受 P-gp 的影响。

4.8 吴茱萸次碱

裘国丽等^[18]给健康兔 ig 吴茱萸提取物发现, 吴茱萸次碱 (生药 15 g/kg) 在动物体内的吸收有一个滞后时间。龚慕辛等^[3]研究也发现吴茱萸次碱 (392.4、196.2、98.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的吸收滞后现象。本实验中吴茱萸次碱 (6.6~70.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 在空肠和回肠仅检测出少量, 原因可能为本实验肠囊最大吸收时间为 120 min, 吴茱萸次碱未能在此时间内被肠囊有效吸收。董宇等^[17]用肠外翻模型研究吴茱萸提取物不同剂量在大鼠不同肠段的体外肠吸收特征时发现, 吴茱萸次碱 (9.6、19.2、57.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 为零级吸收, 在空肠和回肠为主动转运。但吴海^[19]以原位肠灌流模型研究吴茱萸次碱 (3.72、7.1、14.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 吸收机制时, 其吸收呈一级速率过程。是否是因为不同浓度造成结果差异, 有待于进

一步证实。

董宇等^[17]用肠外翻模型研究制吴茱萸提取物不同剂量及其与 P-gp 的关系时发现,吴茱萸次碱的转运不受 P-gp 的影响。但吴海^[19]以 Caco-2 模型研究吸收机制时,吴茱萸次碱的平均表观渗透系数随浓度(9、16、24 $\mu\text{g/mL}$)的增加而逐渐减低,推测转运机制可能兼有载体介导和被动扩散。说明不同质量浓度,对吴茱萸次碱的吸收有一定影响,而在本实验中,吴茱萸次碱的质量浓度为 6.6~70.6 $\mu\text{g/mL}$,是否存在载体介导有待于进一步证实。

5 结论

外翻肠囊模型以其操作简单、快捷、重现性好等成为研究药物肠吸收的常用体外模型。该模型保持了良好的组织活性,吸收结果与人的吸收水平接近;外翻肠囊模型中囊内药物只有吸收相,没有消除相,只有药物的累积,而没有药物的代谢分布,为寻找药物可吸收成分提供了方便。近年来有越来越多的学者采用其进行中药单味药以及复方的吸收研究。本课题组发现,辅以偏 PLSR 法进行结果的相关分析,该模型还可用于研究复方中多种成分在吸收过程中的相互影响。

PLSR 法是建立在主成分分析和主成分回归基础上的一种多元数据分析方法,集多元线性回归分析、典型相关分析和主成分分析的基本功能为一体,可以提供一种“多对多”线性回归建模的方法^[20],是谱效相关研究中的一种分析方法,适用于自变量之间存在多重共线性或模型中样本数小于自变量数目的情况^[21]。其突出优点是以样本总体对预测值的影响程度为考察对象,而不是单个因素对预测值的影响程度,充分考虑了单个因素间的综合作用对预测值的影响;在回归速率上,其比一般的多元回归方法更快,对样本的要求更加宽松^[22]。

本实验以 9 种成分为观察指标,考察了各成分量对自身肠囊吸收量的影响。结果为解释吸收谱-效分析结果与药物谱-效分析部分结果相反提供了依据,也提示复方多成分在吸收环节的复杂相互作用可能与药物浓度有关。各成分对自身吸收影响的机制,有可能与 P-gp 蛋白有关,仍需要进一步考察。

总之,本实验结果提示,在确定复方的有效成分后,如要寻找各成分之间的最优量与配比,使之达到较优疗效,还应考虑吸收环节作用,进行科学的实验设计进行筛选。

参考文献

- [1] 潘学强, 吴燕川, 龚慕辛, 等. 外翻肠囊吸收成分与药效相关研究吴茱萸汤治疗偏头痛的药效物质 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 56-62.
- [2] 王雅琦, 龚慕辛, 王智民, 等. 吴茱萸汤大孔树脂精制工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 1-6.
- [3] 龚慕辛, 王雅琦, 宋亚芳, 等. 外翻肠囊法快速发现吴茱萸汤吸收成分群的研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(11): 1399-1404.
- [4] Ham M, Han L M, Wang Q S, *et al.* Mechanism of oral absorption of *Panax notoginseng* saponins [J]. *Acta Pharm Sin*, 2006, 41: 498-505.
- [5] 冯亮, 蒋学华, 周静, 等. 三七皂苷 R₁ 和人参皂苷 Rg₁ 的大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(14): 1097-1102.
- [6] Meng Z, Zhang H, Zhao Y, *et al.* Transport behavior and efflux of Rg₁ in rat pulmonary cells [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(6): 635-638.
- [7] 宋娟, 刘晓磊, 何娟, 等. 川芎嗪和人参皂苷 Rg₁ 对 Caco-2 细胞 P-糖蛋白功能和表达的影响 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(13): 987-991.
- [8] 萨础拉, 吕航, 姜艳艳, 等. 三七皂苷在大鼠外翻肠囊中的吸收及与 P-糖蛋白相互作用研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(12): 836-842.
- [9] 蒋杰, 李沙, 龚培力, 等. 单剂量口服“生脉饮”人体药代动力学研究 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2007, 36(2): 272-274.
- [10] 水文波. 中药活性成分的小肠吸收研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [11] Li W L, Ding J X, Bai J, *et al.* Study in situ on rat intestinal absorption mechanism and influential factors of ginsenosides Rb₁ and Rg₁ in Bazhen decoction [J]. *Adv Mater Res*, 2011, 1332(282): 457-460.
- [12] 张秀云, 柯学, 何玲, 等. 大鼠小肠原位灌流与 Caco-2 细胞法研究柠檬苦素吸收机制 [J]. 药理学报, 2012, 47(2): 229-232.
- [13] El-Readi M Z, Hamdan D, Farrag N, *et al.* Inhibition of P-glycoprotein activity by limonin and other secondary metabolites from *Citrus* species in human colon and leukaemia cell lines [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 626(2/3): 139-145.
- [14] Nievergelt A, Huonker P, Schoop R, *et al.* Identification of serotonin 5-HT_{1A} receptor partial agonists in ginger [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(9): 3345-3351.
- [15] Zhang W, Lim L Y. Effects of spice constituents on P-glycoprotein-mediated transport and CYP3A4-mediated metabolism *in vitro* [J]. *Drug Metab Dispos*, 2008, 36(7): 1283-1290.

- [16] Adams M, Mahringer A, Kunert O, *et al.* Cytotoxicity and P-glycoprotein modulating effects of quinolones and indoloquinazolines from the Chinese herb *Evodia rutaecarpa* [J]. *Planta Med*, 2007, 73(15): 1554-1557.
- [17] 董宇, 张英丰, 杨庆, 等. 制吴茱萸提取物在肠外翻中的吸收研究及与 P-gp 的关系 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(2): 63-68.
- [18] 裘国丽. 黄连-吴茱萸药对的体内分析及药动学研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [19] 吴海. 吴茱萸次碱吸收机理研究 [D]. 成都: 四川大学, 2007.
- [20] 王惠文, 吴载斌, 孟洁. 偏最小二乘回归的线性与非线性方法 [M]. 北京: 国防工业出版社, 2006.
- [21] 潘学强, 黄菊英, 龚慕辛, 等. 谱效相关分析方法在中药药效物质基础研究中的应用进展 [J]. 北京中医药, 2013, 32(10): 731-735.
- [22] 吴琼, 原忠虎, 王晓宁. 基于偏最小二乘回归分析综述 [J]. 沈阳大学学报, 2007, 19(2): 33-35.