

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)18-0038-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.18.009



大鼠体内3种形态西洋参中6种人参皂苷吸收研究*

耿超¹, 于现花², 刘军玲¹, 刘骅^{1△}

(1. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051; 2. 亳州学院, 安徽 亳州 236000)

摘要:目的 比较3种形态西洋参6种人参皂苷在大鼠体内的吸收情况。方法 以西洋参传统饮片、粗粉、破壁饮片中的6种人参皂苷(人参皂苷 Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd)为考察指标。采用高效液相色谱-电喷雾检测器(HPLC-CAD)法,测定大鼠血清中6种人参皂苷的血药浓度,采用DAS 2.0软件进行拟合,得到药物代谢动力学参数。比较3种形态西洋参6种人参皂苷在大鼠体内的吸收差异。结果 与传统饮片和粗粉比较,西洋参破壁饮片6种人参皂苷的峰浓度及药-时曲线下面积更优($P < 0.05$),且半衰期更长、达峰时间更短、生物利用度更高,综合排序为破壁饮片 > 粗粉 > 传统饮片。结论 与传统饮片及粗粉比较,等剂量下西洋参破壁饮片中6种人参皂苷在大鼠体内消除速率更慢,相对生物利用度更高。

关键词:西洋参;破壁饮片;人参皂苷;药物代谢动力学

Absorption of Six Ginsenosides in Three Forms of Panacis Quinquefolii Radix in Rats

GENG Chao¹, YU Xianhua², LIU Junling¹, LIU Hua¹

(1. Anhui Institutes for Food and Drug Control, Hefei, Anhui, China 230051; 2. Bozhou University, Bozhou, Anhui, China 236000)

Abstract: Objective To compare the absorption of six ginsenosides in three forms of Panacis Quinquefolii Radix in rats. **Methods** With six ginsenosides (ginsenosides Re, Rb₁, Rc, Rb₂, Rb₃, Rd) in traditional decoction pieces, crude powder, and wall-breaking decoction pieces of Panacis Quinquefolii Radix as the investigation indicators, the blood concentrations of six ginsenosides in rat serum were determined by the high-performance liquid chromatography-charged aerosol detector (HPLC-CAD) method. The pharmacokinetic parameters were obtained by fitting with the DAS 2.0 software. The absorption differences of six ginsenosides in three forms of Panacis Quinquefolii Radix in rats were compared. **Results** Compared with those in the traditional decoction pieces and crude powder, the peak concentration and area under the blood concentration-time curve of the six ginsenosides in the wall-breaking decoction pieces of Panacis Quinquefolii Radix were better ($P < 0.05$), the half-life was longer, the time to peak was shorter, and the bioavailability was higher. The comprehensive evaluation of wall-breaking decoction pieces was the best, followed by the crude powder and traditional decoction pieces. **Conclusion** Compared with those in the traditional decoction pieces and crude powder, the elimination rate of six ginsenosides in the wall-breaking decoction pieces of Panacis Quinquefolii Radix at the equal dose in rats is lower and the relative bioavailability is higher.

Key words: Panacis Quinquefolii Radix; wall-breaking decoction pieces; ginsenoside; pharmacokinetics

西洋参药材为五加科植物西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的干燥根,气微而特异,味微苦、甘,化学成分复杂,生物活性广泛,药理作用独特^[1-3]。目前,对西洋参入血成分的分析多停留在定性鉴别层面^[4-5],有关定量分析研究也多为模拟代谢转化的体外溶出研究。为了更准确地模拟人体口服西洋参入血后的药物代谢动力学(简称药动学)参数,对比不同形态西洋参口服入血成分的吸收差异^[6],课题组前期对西洋参3种形态(破壁饮片、粗粉、传统饮片)进行了体外溶出试验,发现破壁饮片体外溶出率超95%。在此,采用高效液相色谱-电喷雾检测器(HPLC-CAD)法,选择人参皂苷6种主要活性成分指标(人参皂苷 Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd),研究3种形态西洋参在大鼠体内的吸收差异。现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate 3000型高效液相色谱仪[含电雾式检测器(CAD),美国 Dionex 公司,检测精度为 1.5×10^{-9} (g/mL 萘-甲醇)]; XP26型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 1 μ g); Millipore Simplicity-185 型超纯水仪(美国 Millipore 公司); HN132 样品浓缩仪(济南海能仪器有限公司); IKA 涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司); JW-3021 HR 型高速冷冻离心机(安徽省嘉文仪器装备有限公司)。

1.2 试药

对照品人参皂苷 Re(批号为 110754-201626,含量 $\geq 92.7\%$)、人参皂苷 Rb₁(批号为 110704-201122,

*基金项目:安徽省重点研究和开发计划项目[201904a07020076]。

第一作者:耿超,男,大学本科,主管药师,研究方向为中药药理学,(电子信箱)32238651@qq.com。

[△]通信作者:刘骅,女,硕士,副主任药师,研究方向为药品检验及药理学,(电子信箱)ahmulh@163.com。

含量 $\geq 92.9\%$)、人参皂苷Rc(批号为110021-14-0,含量 $\geq 98\%$)、人参皂苷Rb₂(批号为111715-200501,含量 $\geq 98\%$)、人参皂苷Rb₃(批号为111686-200501,含量 $\geq 98\%$)、人参皂苷Rd(批号111818-201001,含量 $\geq 94.4\%$),均购自中国食品药品检定研究院。乙腈为质谱级,甲醇为色谱级,水为超纯水。西洋参药材购于安徽宏信药业发展有限公司,经安徽省食品药品检验研究院张亚中主任中药师鉴定为正品。

1.3 动物

SPF级SD大鼠18只,雌雄各半,8~10周龄,体重200~250 g。由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,实验动物使用许可证号为SYXK(皖)2022-006,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2019-0010,屏障环境,温度25℃,相对湿度50%。给药前12 h禁食,不禁饮。符合实验动物伦理要求(批件号:安徽省食品药品检验研究院伦理第03号)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[5-6]

色谱柱:Waters XBridge C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~5 min时81%B,5~25 min时81%B→78%B,25~30 min时78%B→74%B,30~55 min时74%B→50%B,55~60 min时50%B→81%B);流速:1 mL/min;柱温:30℃;进样量:10 μL。雾化气:氮气(纯度99.99%);雾化温度:35℃;雾率:1.0;采样频率5 Hz;过滤常数3.6 s。

2.2 药材样品及溶液制备

药材样品:取西洋参药材适量,直接切片,得传统饮片;取传统饮片,通过气流碰撞粉碎制粒,得破壁饮片;取传统饮片经粉碎机粉碎,得粗粉。

混合对照品溶液:分别取各对照品适量,精密称定,置同一100 mL容量瓶中,加甲醇溶解,配制成含人参皂苷Re、Rb₁、Rc、Rb₂、Rb₃、Rd分别为30.3,137.7,40.8,6.1,5.8,42.5 μg/mL的混合对照品贮备液。精密量取5 mL、2.5 mL、1.25 mL、0.5 mL、0.35 mL、

0.25 mL,分别置5 mL容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得系列质量浓度混合对照品溶液。

供试品溶液^[7-8]:称取3种样品各5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,模拟实际给药方式,加入30倍量沸水,充分摇匀,沸水浴中提取40 min,4 000 r/min离心15 min,取上清液。残渣在加30倍量沸水充分摇匀,于沸水浴中提取30 min,4 000 r/min离心15 min,取上清液。合并2次上清液(共约30 mL),得均含3种样品0.1671 g/mL的供试品溶液。

血清样品前处理:精密吸取血清样品200 μL,置1.5 mL EP管中,加入乙腈500 μL,涡旋混合3 min,混悬液于4℃、12 000 r/min离心5 min,分取上清液500 μL,氮气吹干,残留物用200 μL 50%甲醇复溶,再次涡旋混合5 min,4℃、12 000 r/min离心5 min,取上清液,即得。

2.3 方法学考察^[9-14]

专属性试验:取2.2项下混合对照品溶液+空白血清、给药后血清样品、空白血清,按2.2项下方法预处理,并按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果各成分色谱峰分离较好,空白血清中的内源性物质不干扰指标成分的定量测定,专属性良好。详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下系列混合对照品溶液200 μL,加入空白血清200 μL,按2.2项下方法预处理,并按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以待测成分质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1(Re, Rb₁, Rc, Rb₂, Rb₃, Rd分别代表人参皂苷Re, 人参皂苷Rb₁, 人参皂苷Rc, 人参皂苷Rb₂, 人参皂苷Rb₃, 人参皂苷Rd, 下表同)。

定量限与检测限考察:精密量取2.2项下混合对照品贮备液,倍比稀释,各取200 μL,分别加入空白血清200 μL,按2.2项下方法预处理,并按2.1项下色谱条件进样,以信噪比分别为10:1及3:1时的待测成分质量浓度为定量限及检测限。结果见表1。

精密度试验:取2.2项下3种质量浓度(线性范围极值及中间值)的混合对照品溶液200 μL,分别精密加

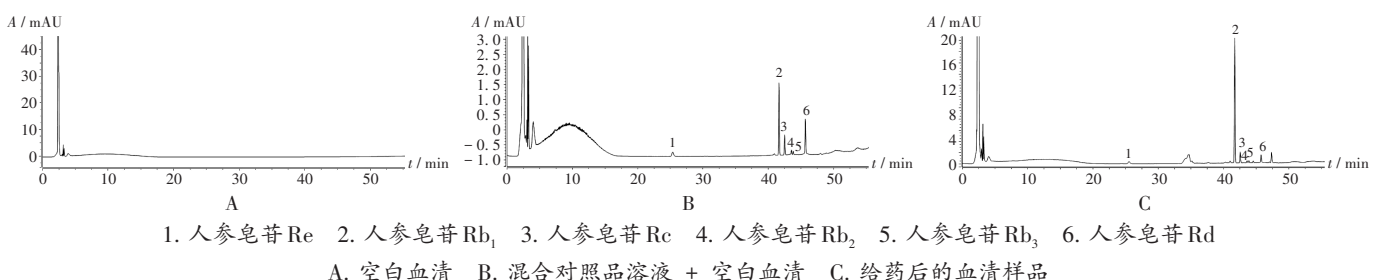


图1 高效液相色谱图

1. Ginsenoside Re 2. Ginsenoside Rb₁ 3. Ginsenoside Rc 4. Ginsenoside Rb₂ 5. Ginsenoside Rb₃ 6. Ginsenoside Rd
A. Blank serum B. Mixed reference solution + blank serum C. Serum sample after administration

Fig. 1 HPLC chromatograms

入空白血清 200 μL ,按 2.2 项下方法预处理,各 6 份。并按 2.1 项下色谱条件进样,1 d 1 次,连续测定 3 d,记录峰面积,计算相对误差(RE)及 RSD 值。结果见表 2。

表 1 线性关系及检测限、定量限结果 ($n = 6$)

Tab. 1 Results of the linear relation test, limit of detection and limit of quantification investigation ($n = 6$)

待测成分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	定量限 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	检测限 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Re	$Y_1 = 0.0012X_1 - 0.0001$	0.9995	1.52~30.30	1.52	0.61
Rb ₁	$Y_2 = 0.0012X_2 - 0.0004$	0.9990	6.89~137.70	6.89	2.75
Rc	$Y_3 = 0.0016X_3 - 0.0005$	0.9992	2.04~40.80	2.04	0.82
Rb ₂	$Y_4 = 0.0027X_4 + 0.0001$	0.9993	0.31~6.01	0.31	0.12
Rb ₃	$Y_5 = 0.0025X_5 - 0.0001$	0.9999	0.29~4.50	0.29	0.12
Rd	$Y_6 = 0.0013X_6 + 0.0003$	0.9999	2.28~65.50	2.28	0.85

表 2 精密度的试验结果 ($\%, n = 6$)

Tab. 2 Results of the precision test ($\%, n = 6$)

指标	质量浓度	Re	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd	
日内	RSD	高	4.63	3.95	6.47	5.21	7.35	6.75
		中	3.41	4.09	2.74	2.83	3.43	8.37
		低	2.97	3.45	3.15	3.26	2.93	5.63
	RE	高	0.93	1.97	-6.25	1.27	-3.52	-3.95
		中	-2.57	-4.18	-2.33	2.68	0.33	-2.72
		低	-5.95	-1.32	-8.34	-3.20	-7.16	-3.01
日间	RSD	高	4.34	4.14	3.91	5.043	4.37	0.48
		中	5.16	4.82	6.73	6.34	5.13	1.19
		低	6.03	5.74	3.52	4.65	6.07	-5.60
	RE	高	2.17	-4.52	-3.93	1.65	-6.04	-5.71
		中	0.71	-3.80	-5.03	2.56	-7.44	-8.86
		低	-2.43	-0.51	-4.68	3.37	-8.12	0.34

稳定性试验:取精密度的试验项下高、中、低质量浓度的血清样品,各 6 份,分别经室温放置 24 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内放置 3 d、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱反复冻融 3 次,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算 RSD 值。结果见表 3。

提取回收率试验:取精密度的试验项下高、中、低质量浓度的血清样品,各 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样

表 3 稳定性试验结果 ($\%, n = 6$)

Tab. 3 Results of the stability test ($\%, n = 6$)

条件	质量浓度	Re	Rb ₁	Rc	Rb ₂	Rb ₃	Rd
室温放置 24 h	高	9.10	9.43	9.41	10.23	9.34	12.74
	中	8.39	10.03	8.74	11.84	10.44	11.35
	低	7.93	11.49	6.91	9.27	9.39	9.86
-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 3 d	高	10.91	10.01	7.25	10.26	10.25	7.97
	中	8.49	8.64	8.30	8.64	10.13	7.71
	低	9.29	8.53	9.31	7.27	9.15	10.04
-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻融 3 次	高	6.42	7.81	5.92	10.03	7.13	10.42
	中	7.58	8.84	6.78	8.30	8.12	8.15
	低	8.17	9.70	7.53	11.61	7.06	9.67

测定,得峰面积 A_1 ;另取高、中、低质量浓度混合对照品溶液,按 2.2 项下方法预处理,并按 2.1 项下色谱条件进样测定,得峰面积 A_2 。提取回收率 $(R) = A_1 / A_2 \times 100\%$ 。结果见表 4(高、中、低分别为高、中、低质量浓度)。

表 4 提取回收试验结果 ($\%, n = 6$)

Tab. 4 Results of the extraction recovery test ($\%, n = 6$)

待测成分	提取回收率			RSD		
	高	中	低	高	中	低
Re	62.24	65.13	66.41	6.49	7.28	8.73
Rb ₁	76.76	81.45	85.54	6.31	4.58	5.32
Rc	73.23	76.80	72.83	8.34	5.62	6.36
Rb ₂	67.94	72.05	69.91	7.29	7.39	9.15
Rb ₃	68.66	75.37	81.15	8.93	6.93	5.19
Rd	72.86	83.48	73.73	9.20	8.45	7.38

2.4 药动学参数测定

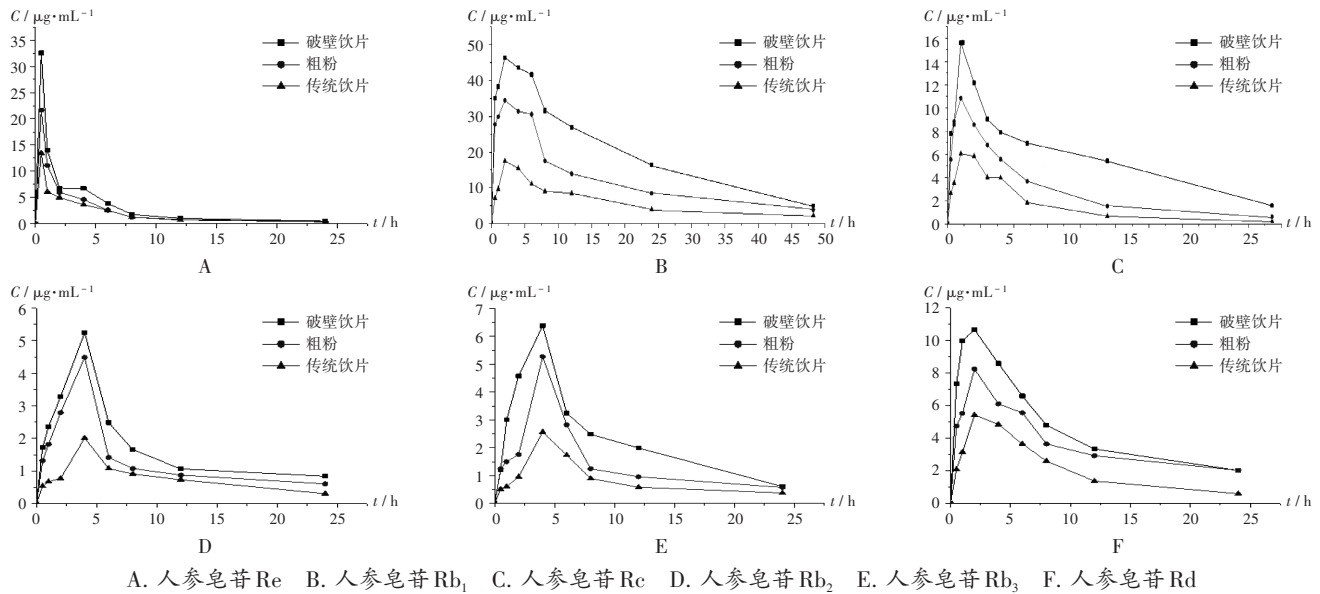
取 18 只大鼠,随机分为 3 组,各 6 只(雌雄各半)。给药前采集空白血清。每组大鼠分别予不同供试品溶液 1.0 mL 灌胃。给药后 0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、24 h、48 h 对大鼠眼底静脉丛取血 0.5 mL,置 EP 管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中静置 1 h,2 000 r/min 离心 10 min,取上层血清^[9-10]。以传统饮片为对照,分别计算粗粉和破壁饮片的相对生物利用度。

按 2.2 项下方法预处理,并按 2.1 项下色谱条件进样测定,以标准曲线法计算各成分的血药浓度,数据导入 DAS 2.0 学软件进行拟合计算,得 6 种人参皂苷在大鼠体内相应的药动学参数,包括达峰时间(t_{max})、峰浓度(C_{max})、半衰期($t_{1/2}$)、药-时曲线下面积($AUC_{0 \rightarrow \infty}$)、相对生物利用度(F_{rel})。数据采用 SPSS 24.0 统计学软件分析,组间比较行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果见图 2、表 5。

可见,西洋参破壁饮片释放量最大,与体外溶出试验结果一致。6 种成分的相对生物利用度均有提高,且破壁饮片高于粗粉,说明破壁饮片在混悬液给药条件下生物利用度显著优于传统饮片煎煮给药条件。3 种形态西洋参中人参皂苷 Re 的血药浓度均在 0.5 h 左右达峰, $t_{1/2}$ 均值约为 1.26 h;其余 5 种人参皂苷均在 4 h 内达峰,其中除人参皂苷 Rb₁的 $t_{1/2}$ 均值在 13 h 左右外,其他成分均在 6 h 左右。说明人参皂苷 Re 在大鼠体内吸收最快,消除也最快;而人参皂苷 Rb₁ 消除速率最慢,在体内滞留时间最长,药效最持久。破壁饮片中的人参皂苷 C_{max} 及 AUC 值显著优于粗粉和传统饮片,表明破壁饮片在大鼠体内的相对生物利用度更大。

3 讨论

生活中,人们通常以保温杯泡服西洋参饮片,冲服



A. 人参皂苷 Re B. 人参皂苷 Rb₁ C. 人参皂苷 Rc D. 人参皂苷 Rb₂ E. 人参皂苷 Rb₃ F. 人参皂苷 Rd

图2 血药浓度-时间曲线

A. Ginsenoside Re B. Ginsenoside Rb₁ C. Ginsenoside Rc D. Ginsenoside Rb₂ E. Ginsenoside Rb₃ F. Ginsenoside Rd

Fig. 2 Blood concentration - time curve

表5 6种人参皂苷的药动学参数($\bar{X} \pm s$)

Tab. 5 Pharmacokinetic parameters of six ginsenosides ($\bar{X} \pm s$)

待测成分	t_{\min} (h)			C_{\min} (μg/mL)			$t_{1/2}$ (h)			AUC_{0-24} [(μg·h)/mL]			F_{rel}	
	破壁饮片	粗粉	传统饮片	破壁饮片	粗粉	传统饮片	破壁饮片	粗粉	传统饮片	破壁饮片	粗粉	传统饮片	破壁饮片	粗粉
Re	0.49±1.27	0.53±4.34	0.61±2.48	32.15±1.14	21.52±1.42**	13.57±0.33*	1.55±0.08	1.27±1.39	0.95±0.48	285.81±121.49	195.33±115.38*	173.57±112.47*	165%	112%
Rb ₁	2.17±1.47	3.09±3.58	3.12±2.76	46.08±2.19	34.45±1.44**	17.18±0.38*	13.02±0.42	12.48±0.34	10.23±1.31**	1564.28±824.48	1326.72±704.45*	785.32±534.25*	199%	169%
Rc	2.08±3.18	2.15±2.96	2.27±3.62	15.39±0.47	10.42±0.51**	6.33±1.58*	7.58±0.30	7.32±0.85	6.95±1.43	672.43±327.43	349.47±201.46*	265.28±133.27*	253%	132%
Rb ₂	2.23±0.89	2.42±1.68	3.01±0.95**	5.71±2.08	4.11±0.57	2.48±1.48*	5.65±1.45	5.28±1.14	5.12±0.48	175.37±69.96	126.42±52.18*	89.51±37.24*	196%	141%
Rb ₃	4.46±0.23	5.01±1.49	5.11±0.27	6.71±0.54	5.70±1.55	2.02±2.57*	6.52±1.63	5.89±0.89	5.18±1.53	201.14±127.47	187.22±86.68*	91.38±45.72*	220%	205%
Rd	4.01±0.30	4.06±0.37	4.15±0.76	10.47±0.62	8.03±0.31**	5.21±1.49*	7.15±1.37	6.39±2.55	3.23±0.47**	402.81±201.43	258.46±134.32*	216.48±98.54*	186%	119%

注:与破壁饮片比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note:Compared with those in the wall - breaking decoction pieces,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

西洋参粉摄取的相当于水溶性提取物。为了更好地模拟日常实际使用情况,本研究中比较和评价了口服吸收西洋参破壁饮片、粗粉与传统饮片入血后皂苷类成分在体内吸收情况。且为探索西洋参3种形态皂苷类成分在大鼠体内吸收变化趋势,采用外标法对人参皂苷6种成分进行定量分析。虽然外标法存在因操作条件变化、流动相、仪器等因素引起的误差,但此研究是在同一实验条件下进行横向比较,故误差对实验结论无明显影响。在后续药动学-药物效应动力学(PK-PD)研究中,将采用内标法提高定量分析的精度,进一步考察西洋参3种形态6个组分之间血药浓度的精准差异。

药物的粒径大小直接影响药物的溶出量及生物利用度,粒径越小,比表面积越大,溶出速率及吸收速率越快,吸收量越多^[15-16]。结果表明,相较于粗粉和传统饮片,西洋参破壁饮片在大鼠体内释放量最大,消除速率最慢,生物利用度最高,三者综合排序为破壁饮片 >

粗粉 > 传统饮片,与体外溶出结果一致^[17]。破壁饮片是遵循中医药理论并保留传统饮片全成分的前提下,运用超微气流粉碎技术,将植物细胞壁打破,从而使中药的有效成分得到完全释放。本研究中仅考察了等剂量下不同形态西洋参中人参皂苷类成分在大鼠体内的药动学参数,后续将对破壁饮片与传统饮片疗效差异,运用PK-PD结合模型进一步研究,寻找二者关联性,准确衡量药物体内过程。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:360-361.
- [2] 林红强,李平亚,刘金平,等. 野生西洋参鉴别、化学成分及药理作用研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2017,29(12): 2157-2162.
- [3] 汤慧丽,王宪昌,李 佳,等. 西洋参皂苷类成分及其生物活性、质量控制的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2022,47(1):36-47.