

金银花-连翘配伍比例对有效成分溶出 和大鼠体内药动学的影响

林以宁, 高茹, 张萌, 高缘*

(中国药科大学中药学院, 南京 211198)

[摘要] **目的:**比较金银花-连翘药对配伍前后及不同配伍比例煎出液中绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A 的溶出量,考察配伍比例对绿原酸在大鼠体内药动学行为的影响。**方法:**采用 HPLC 测定金银花-连翘单煎、共煎提取物中绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A 的含量;分别给予大鼠灌胃金银花-连翘 1:1, 1:2 共煎提取物(剂量为绿原酸 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),测定血浆中绿原酸浓度,用 DAS 软件根据非房室模型法计算药动学参数。**结果:**绿原酸和连翘苷在共煎提取物中含量高于单煎提取物,而连翘酯苷 A 在药对中煎出量低于连翘单煎液。金银花-连翘(1:1, 1:2)共煎提取物的药时曲线下面积(AUC_{0-t})分别为 0.95, 1.19 $\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, C_{max} 分别为 0.18, 0.26 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 药动学行为无显著差异。**结论:**金银花-连翘配伍有助于绿原酸和连翘苷的溶出,但连翘酯苷 A 的溶出量减少。不同配伍比例的金银花-连翘提取物按相同绿原酸剂量给药,绿原酸在大鼠体内的药动学参数无明显差异。

[关键词] 金银花; 连翘; 绿原酸; 连翘苷; 连翘酯苷 A; 药代动力学

[中图分类号] R945; R289.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0180-04

[doi] 10.11653/syfj2013170180

Effects of Different Compatibility Proportions of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* on Dissolution of Active Ingredients and *in vivo* Pharmacokinetics in Rats

LIN Yi-ning, GAO Ru, ZHANG Meng, GAO Yuan*

(School of Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] **Objective:** To compare dissolution of chlorogenic acid, phillyrin and forsythoside A in decoction of different compatibility proportions of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus*, and investigate effects of different compatibility proportions on *in vivo* pharmacokinetics of chlorogenic acid in rats. **Method:** HPLC was adopted to determine the contents of chlorogenic acid, phillyrin and forsythoside A in single decoction and co-decoction of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus*; Rats were intragastric administered co-decoction of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* with ratio of 1:1 and 1:2 (dosage of chlorogenic acid was $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), then the concentration of chlorogenic acid was determined, pharmacokinetic parameters were calculated with DAS software by non-compartment model. **Result:** The contents of chlorogenic acid and phillyrin in co-decoctions were higher than that in single decoctions, but the content of forsythoside A was decreased when *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* decocted together. After intragastric administered co-decoction of *Lonicerae Japonicae Flos* and *Forsythiae Fructus* with ratio of 1:1 and 1:2, AUC_{0-t} were 0.95, 1.19 $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, and C_{max} were 0.18, 0.26 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; Pharmacokinetics had no significant difference. **Conclusion:** Dissolution of chlorogenic acid and phillyrin were increased with compatibility of *Lonicerae Japonicae Flos* and

[收稿日期] 20130331(015)

[基金项目] 江苏省基础研究计划(自然科学基金)项目(BK2010429)

[第一作者] 林以宁, 博士, 副教授, 从事中药制剂研究, Tel: 025-86185126, E-mail: lynzyb@163.com

[通讯作者] * 高缘, 博士, 副教授, 从事药物新剂型研究, E-mail: newgaoyuan@163.com

Forsythiae Fructus, while forsythoside A was decreased in co-decoctions. Pharmacokinetic parameters of chlorogenic acid showed no significant differences between 1:1 and 1:2 decoctions at the same dosage of chlorogenic acid.

[Key words] Lonicerae Japonicae Flos; Forsythiae Fructus; chlorogenic acid; phillyrin; forsythoside A; pharmacokinetics

金银花和连翘均为清热解毒之首药,前者轻宣疏散,后者轻清透邪,两药配伍,共奏辛凉解表、清热解毒之功效。金银花-连翘为临床上常用药对,在121种中成药处方中含有该药对,金银花与连翘的常用配伍比为1:1,1:2^[1-2]。金银花-连翘配伍具有明显的协同增效作用,研究报道金银花-连翘(1:1)配伍的解热、抗炎作用优于配比1:2^[3-4],而药效往往与化学成分组成及含量呈相关性。绿原酸、连翘苷、连翘酯苷A为金银花-连翘药对中主要化学成分,故本实验考察金银花-连翘配伍前后、配伍比例对绿原酸、连翘苷、连翘酯苷A溶出的影响,同时比较不同配伍比例对绿原酸在大鼠体内药代动力学行为的影响。

1 材料

Agilent 1100系列高效液相色谱仪(美国Agilent公司),HC-2066型离心机(安徽中科中佳),WH-3微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司)。

金银花、连翘(均购自河南新密仁厚国仁馆,经作者林以宁鉴定,分别为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花,木犀科植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥果实),绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号110753-200413,纯度>99%),连翘苷、连翘酯苷A对照品(上海融禾医药科技有限公司,批号分别为101022,101107),原儿茶醛对照品(阿达玛斯试剂有限公司,纯度99%),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

健康SD大鼠,清洁级,雄性,体重200~250g,购自南京市江宁区青龙山动物繁殖厂,许可证编号SCXK(浙)2008-0033。

2 方法与结果

2.1 提取物的制备^[5]

2.1.1 金银花-连翘(1:1)提取物 取金银花粉末、连翘粉末各50g,加10倍量水温浸30min,煎煮2次,每次1.5h,合并煎液,滤过,浓缩,冷冻干燥,即得。

2.1.2 金银花-连翘(1:2)提取物 称取金银花粉末25g,连翘粉末50g,按2.1.1项下方法制备,

即得。

2.1.3 金银花、连翘提取物 分别称取金银花、连翘粉末各50g,分别按2.1.1项下方法制备,即得。

2.2 有效成分含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取绿原酸、连翘苷、连翘酯苷A对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加50%甲醇制成3种成分质量浓度均为0.5g·L⁻¹的溶液,即得。

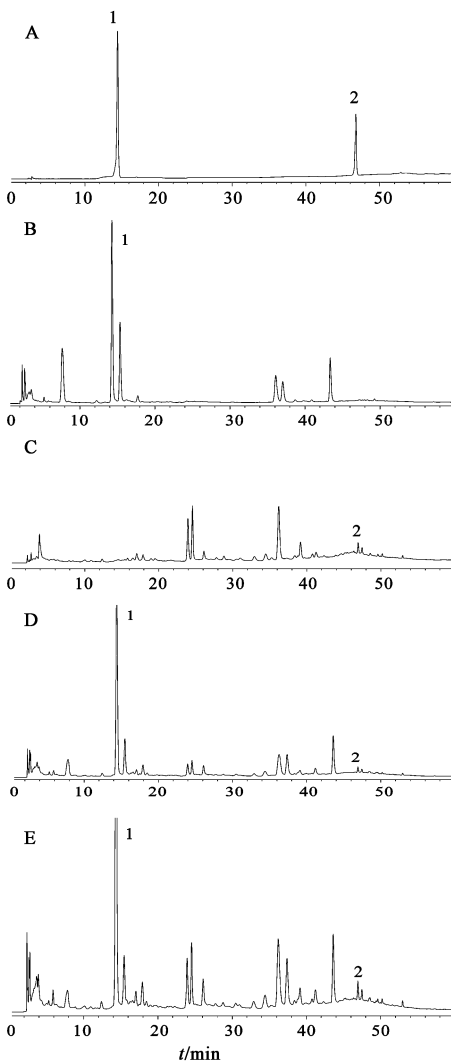
2.2.2 供试品溶液的制备 分别取金银花、连翘、金银花-连翘(1:1)、金银花-连翘(1:2)提取物各0.20g,精密称定,置于25mL量瓶中,加50%甲醇25mL超声使溶解,定容至刻度,经0.45μm微孔滤膜滤过,适度稀释,即得金银花、连翘、金银花-连翘(1:1)、金银花-连翘(1:2)供试品溶液。

2.2.3 色谱条件

2.2.3.1 绿原酸、连翘苷^[6] Hederac₁₈色谱柱(4.6mm×250mm,5μm,江苏汉邦科技有限公司),流动相甲醇(A)-0.01%磷酸(B)梯度洗脱(0~30min,22%~35%A;30~40min,35%~45%A;40~50min,45%~70%A;50~60min,70%A),流速1.0mL·min⁻¹,检测波长280nm,柱温35℃,进样量20μL,见图1。

2.2.3.2 连翘酯苷A^[7] Hederac₁₈色谱柱(4.6mm×250mm,5μm,江苏汉邦科技有限公司),流动相乙腈-0.01%磷酸(18:82),流速1.0mL·min⁻¹,检测波长330nm,柱温30℃,进样量20μL,见图2。

2.2.4 样品测定 分别测定各供试品溶液中绿原酸、连翘苷、连翘酯苷A含量,有效成分的溶出量分别按金银花、连翘药材投药50g的煎出量表示。结果表明金银花、连翘单煎液不影响连翘苷、绿原酸的含量测定,金银花单煎液不影响连翘酯苷A含量的测定。绿原酸在金银花-连翘(1:1,1:2)共煎液中溶出量分别是单煎液(787.57mg)的1.42,1.62倍,随连翘配伍比例增加,绿原酸煎出量呈增加趋势。连翘苷在金银花-连翘(1:1,1:2)共煎液中溶出量分别是单煎液(29.27mg)的1.54,1.35倍,随金银花配伍比重增加,连翘苷溶出增加。但连翘酯苷A的溶出量随金银花配伍比例增加而降低,在金银花-连翘



A. 对照品; B. 金银花单煎液; C. 连翘单煎液;
D. 金银花-连翘(1:1)共煎液; E. 金银花-连翘(1:2)共煎液;
1. 绿原酸; 2. 连翘苷

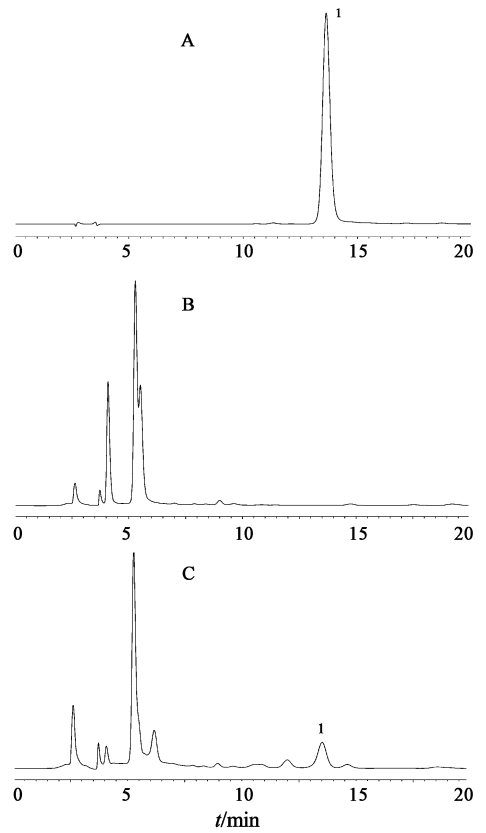
图 1 提取液中绿原酸、连翘苷 HPLC

(1:1, 1:2) 共煎液中的溶出量分别是单煎液 (453.21 mg) 的 0.63, 0.80 倍。

2.3 大鼠体内药动学分析

2.3.1 给药方案与样品采集 大鼠随机分为 2 组, 每组 6 只, 试验前禁食 12 h, 可自由饮水。分别灌胃给予金银花-连翘(1:1, 1:2) 提取物溶液, 给药剂量按绿原酸计均为 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 分别于给药后 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 9, 12 h 经眼眶后静脉丛取血, 于肝素化试管中, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存待测。

2.3.2 血浆样品前处理 取血浆 $100 \text{ } \mu\text{L}$, 加 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 原儿茶醛内标溶液 $20 \text{ } \mu\text{L}$, 涡旋 30 s 混匀, 加 1% 甲酸乙腈溶液 $400 \text{ } \mu\text{L}$, 涡旋 1 min 混匀, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液至另一洁净试管



A. 对照品; B. 金银花单煎液;
C. 金银花-连翘(1:2)共煎液; 1. 连翘酯苷 A

图 2 提取液中连翘酯苷 A 的 HPLC

中, 挥干溶剂, 残渣用 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 流动相溶解, 涡旋混合 1 min, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液进行 HPLC 分析。

2.3.3 色谱条件^[7] 流动相乙腈-0.2% 磷酸 (15:85), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 324 nm, 柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样量 $30 \text{ } \mu\text{L}$ 。绿原酸在 $0.0625 \sim 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好 ($r = 0.9998$), 最低定量限 $0.0625 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.4 数据分析 分别计算给药组大鼠在不同时间点的绿原酸平均血药浓度, 绘制平均血药浓度-时间曲线, 采用 DAS 2.1.1 软件、非房室模型对血药浓度-时间数据进行处理, 求出主要药动学参数, 其中 C_{max} 和 T_{max} 为实测值, 对主要药动学参数进行 t 检验统计分析。金银花-连翘(1:1) 与金银花-连翘(1:2) 提取物的绿原酸药动学参数、平均血药浓度-时间曲线分别见表 1 和图 3, 结果表明金银花-连翘(1:1) 给药组的药动学参数与 1:2 给药组无显著差异, 说明在同等给药剂量下, 金银花-连翘不同配比的共煎液灌胃给予大鼠后, 绿原酸在大鼠体内的药动学参数无显著性差异。

表1 金银花-连翘不同配伍时绿原酸在大鼠体内主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	金银花-连翘 (1:1)	金银花-连翘 (1:2)
$C_{max}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.18 ± 0.03	0.26 ± 0.09
T_{max}/h	1.25 ± 0.52	1.42 ± 0.56
$t_{1/2}/\text{h}$	5.00 ± 3.01	3.46 ± 0.78
$\text{AUC}_{0-t}/\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	0.95 ± 0.20	1.19 ± 0.32
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	1.19 ± 0.31	1.32 ± 0.29
MRT/h	7.33 ± 3.67	5.40 ± 1.12

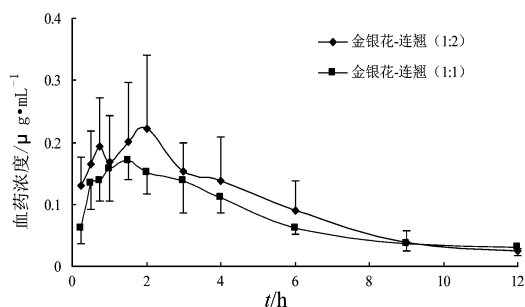


图3 金银花-连翘不同配伍时绿原酸在大鼠体内的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)

3 讨论

金银花、连翘为相须药对,金银花与连翘配伍较单味用药效果好,两药配伍后绿原酸和连翘苷的煎出量均有提高,且金银花-连翘不同配伍比例对绿原酸药动学的影响未见差异。前期试验发现绿原酸AUC与给药剂量呈正相关^[9],本试验中金银花-连翘共煎液中绿原酸的煎出量高于金银花,推测配伍后由于提高了绿原酸的煎出量,故相应提高了绿原酸AUC,体现两药配伍的协同性。

药效学研究表明,药对1:1配比的抗炎、解热作用优于1:2配比^[3-4]。金银花可抑制连翘在肝脏的代谢^[10-11],在金银花-连翘(1:1,1:2)配比中,推测1:1配比对肝脏代谢的抑制作用可能高于1:2配比,与药效学结果相吻合。

[参考文献]

- [1] 夏伯候,王智民,林丽美,等. 银翘药对的药效学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(3):80.
- [2] 焦庆华. 连翘在银翘散中的作用及地位刍议[J]. 安徽中医临床杂志,2002,14(4):224.
- [3] 段红妍,马成. 金银花与连翘配伍退热机制的实验研究[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(11):1214.
- [4] 林丽美,王智民,王金华,等. 金银花、连翘及银翘药对水煎剂的抗炎、解热作用研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(4):473.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:611.
- [6] HAN J, YE M, GUO H, et al. Analysis of multiple constituents in a Chinese herbal preparation Shuang-Huang-Lian oral liquid by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ [J]. J Pharm Biomed Anal,2007,44(2):430.
- [7] 熊艳,朱晶晶,王智民,等. 连翘及其制剂的分析方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(7):97.
- [8] GAO R, LIN Y, LIANG G, et al. Comparative pharmacokinetic study of chlorogenic acid after oral administration of Lonicerae Japonicae Flos and Shuang-Huang-Lian in normal and febrile rats [J]. Phytother Res,2013,1002(10):4958.
- [9] REN J, JIANG X H, LI C R. Investigation on the absorption kinetics of chlorogenic acid in rats by HPLC [J]. Arch Pharm Res,2007,30(7):911.
- [10] ZHOU W, DI L Q, SHAN J J, et al. *In vitro* metabolism in Sprague-Dawley rat liver microsomes of forsythoside A in different compositions of Shuang-Huang-Lian [J]. Fitoterapia,2011,82(8):1222.
- [11] ZHOU W, DI L Q, SHAN J J, et al. Intestinal absorption of forsythoside A in different compositions of Shuang-Huang-Lian [J]. Fitoterapia,2011,82(3):375.

[责任编辑 全燕]