

甘草与大黄配伍对大黄酸在大鼠体内药动学的影响

韩刚^{*}, 康欣, 翟冠钰, 范颖, 王彦雪, 刘莉, 喇万英
(华北煤炭医学院药理学系, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 研究甘草与大黄配伍时, 甘草对大黄酸在大鼠体内药动学的影响。方法: 大鼠分别灌服大黄和大黄甘草汤, 高效液相色谱法测定大黄酸血药浓度。色谱柱为 Zorbox SB C₁₈(4.6 mm ×150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水-冰醋酸(77:22:1); 检测波长为 428 nm; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为室温。血药浓度数据采用 3P97 药动学软件进行分析。结果: 大黄酸血药浓度在 0.1~15 μg·mL⁻¹ 范围线性关系良好。大鼠灌服大黄和大黄甘草汤后, 大黄酸血浆浓度-时间曲线均符合二房室模型。大黄和大黄甘草汤相比较, 两者的 AUC, T_{max}, C_{max}, 均存在显著性差异(P<0.05)。结论: 甘草与大黄配伍, 可降低大黄酸在大鼠体内的血药浓度, 降低大黄酸对肝脏的损伤。

[关键词] 甘草; 大黄; 配伍; 大黄甘草汤; 大黄酸; 药动学; 高效液相色谱

[中图分类号] R285 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)09-0072-03

Effect of Compatibility Using Glycyrrhiza and Rhubarb on Pharmacokinetics of Rhein in Rats

HAN Gang, KANG Xin, ZHAI Guan-yu, FAN Ying, WANG Yan-xue, LIU Li, LA Wan-ying
(Pharmaceutical Department, North China Coal Medical University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of compatibility using glycyrrhiza and rhubarb on pharmacokinetics of rhein in rats. **Method:** Sprague Dawley rats were administrated with rhubarb and Dahuanggancao Decoction respectively. The rhein in plasma was measured by high performance liquid chromatography. An HPLC method was established with Zorbox SB C₁₈ column (4.6 mm ×150 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water-acetic acid (77:22:1), the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and a detection wavelength was at 428 nm. Pharmacokinetic parameters were determined from the plasma concentration-time data with the software 3P97. **Result:** Rhein was linear in the range of 0.1-15 mg·L⁻¹. The concentration-time curves of rhein fitted well into two-compartment models in rats. Significant difference was found between the two groups. There existed significant (P<0.05) differences in AUC, T_{max}, C_{max} in plasma concentration of rhein between rhubarb and Dahuanggancao Decoction. **Conclusion:** The concentration of rhein was decrease and the hepatic injury was reduced when glycyrrhiza was compatible with rhubarb in rats.

[Key words] Glycyrrhiza; rhubarb; compatibility; Dahuanggancao Decoction; rhein; pharmacokinetics; HPLC

大黄具有泻热通肠、凉血解毒、逐瘀通经、利湿退黄等功效, 主要含有大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚等蒽醌类化合物^[1]。甘草补脾益气、清热解毒、止咳祛痰、调和诸药, 主要成分为甘草酸。素有“十方九草”之说^[2]。近年来研究发现, 甘草或甘草酸, 可影响细胞色素 P450 酶的活性。甘草与多种药物配伍时, 对相配伍药物的药动学产生

影响^[3]。这一作用与祖国传统医学认为甘草能“调合百药, 缓和药性”的观点相吻合。

甘草与大黄配伍的经典方剂大黄甘草汤, 出自《金匮要略》, 以大黄为主, 配甘草组成^[4]。大黄通滞泻下、清热解毒, 甘草补中益脾、润燥缓急。二者配伍, 苦寒与甘平相结合, 能清, 能下, 能通, 解毒而不伤正。本实验研究甘草与大黄配伍后, 甘草对大黄中大黄酸在大鼠体内药动学的影响, 为研究中药复方配伍提供参考。

1 材料

1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司, Agi-

[收稿日期] 20100219(001)

[通讯作者] * 韩刚, 教授, 中药有效成分及药物新剂型研究,

Tel: 0315-3726303, E-mail: yxxhg@163.com

lent 工作站); SD-Basic 喷雾干燥机(英国 Labplant 公司); 氮吹仪(天津奥特赛恩斯公司); KDC-16H 高速离心机(科大创新公司); BP211D 电子天平(赛多利斯); SK-1 型快速混匀器(江苏医疗仪器厂)。大黄、甘草均购自唐山市同仁堂药店, 经华北煤炭医学院喇万英教授鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的根茎和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的根茎; 大黄酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0757-200206); 色谱纯甲醇(Fisher 公司)。清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体重 180 ~ 220 g, 华北煤炭医学院动物中心提供, 动物许可证号 SCXK(京) 20060330。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent 公司 Zorbox SB C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相甲醇-水-冰醋酸 (77:22:1); 检测波长 428 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温室温^[5]。

2.2 对照品溶液的制备 取大黄酸对照品适量, 精密称定, 甲醇溶解并稀释至刻度, 配成大黄酸浓度为 0.5 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 血浆样品预处理 将血浆样品置于涂有肝素抗凝剂的具塞离心管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分离血浆, 取 0.2 mL 血浆, 加入 0.5 mL 色谱纯甲醇, 涡旋混合振荡 30 s, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 沉淀蛋白, 提取大黄酸, 取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 20 μL 进样测定大黄酸的峰面积^[6]。

2.4 供试品溶液的制备 大黄甘草汤按大黄与甘

草的比为 2:1 的比例称取药材, 同时称取等量的大黄, 分别将大黄及大黄甘草汤置于回流装置中, 加入 10 倍量蒸馏水, 浸泡 30 min, 加热至沸腾, 并保持微沸 40 min, 冷却, 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 移取上清液, 残渣再加入 8 倍量蒸馏水, 加热至沸腾, 保持微沸 20 min, 同法操作, 合并 2 次上清液^[7]。调节喷雾干燥机喷口温度 150 ℃, 上清液喷雾干燥, 得大黄甘草汤喷干粉和大黄喷干粉, HPLC 分别测定喷干粉中大黄酸的含量。

2.5 动物分组与给药 20 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为大黄组, 大黄甘草汤组。实验前 12 h 禁食, 自由饮水。分别用 0.8% 的羧甲基纤维素钠溶液将大黄甘草汤喷干粉和大黄喷干粉制成混悬液。灌服时按大黄酸 10 mg·kg⁻¹ 的剂量给药。于给药后 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 480, 600 min 大鼠眼眶静脉丛取血 0.5 mL 于肝素化试管中, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液 100 μL, 按 2.3 项下同法操作, 记录大黄酸峰面积。

2.6 数据分析 所得数据采用 3P97 软件拟合药动学房室模型, 计算药动学参数。大黄甘草汤与大黄之间的差异采用 *t* 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 方法专属性 空白血浆、空白血浆加大黄酸对照品、大黄甘草汤和大黄给药后含药血浆的色谱图。见图 1, 在选定的色谱条件下, 血浆中内源性成分不干扰大黄酸的测定。

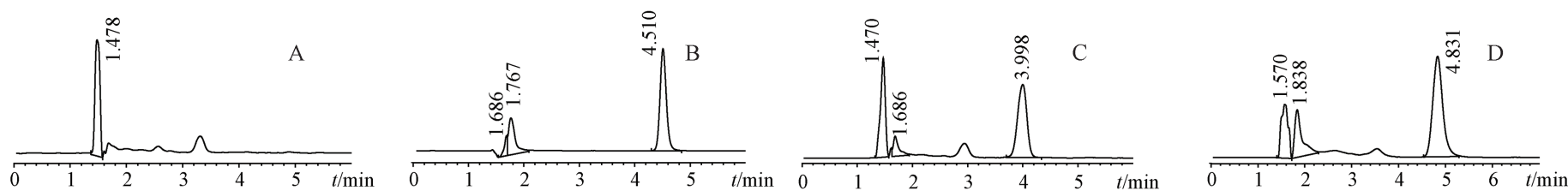


图 1 大鼠灌服大黄甘草汤、大黄前后血浆色谱图

A. 空白血浆; B. 血浆样品中加入大黄酸; C. 灌服大黄甘草汤后血浆样品; D. 灌服大黄后血浆样品色谱图

3.2 标准曲线 精密量取大黄酸对照品溶液适量, 置于离心管中, 加入大鼠空白血浆 100 μL, 制成大黄酸浓度分别为 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 7.0, 12.0, 15.0 μg·mL⁻¹ 的系列血浆样本, 按“血浆样品预处理”项下操作, 以峰面积 *Y*, 血药浓度 *C*, 进行线性回归, 得线性回归方程 $Y = 28.082 C + 1.691$ ($r = 0.999 1$), 样品在 0.1 ~ 15 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

3.3 精密度实验 分别取大黄酸对照品溶液制成浓度为 1.0, 5.0, 12.0 mg·L⁻¹ 的血浆样品, 每个浓度平行作 5 份, 按 2.3 项下操作, 在 1 d 内测定 5 次。

结果测得低、中、高 3 种浓度的 RSD 值分别为 5.45%, 4.12%, 4.14%。日间精密度同上法制备血浆样品, 每天测定 1 次, 连续测定 5 d。结果测得低、中、高 3 种浓度血浆样品的 RSD 分别为 5.48%, 5.12%, 4.87%。

3.4 提取回收率 精密量取 100 μL 空白血浆置于离心管中, 分别加入适量的大黄酸对照品溶液, 制成浓度分别为 1.0, 5.0, 12.0 μg·mL⁻¹ 的血浆样本, 每个浓度平行作 5 份, 按 2.3 项下操作, 进样测定, 记录大黄酸峰面积 *S*; 另取 1.0, 5.0, 12.0 μg·mL⁻¹ 大

黄酸对照品溶液,氮吹仪吹干后加流动相 100 μL 溶解,进样测定,记录大黄酸峰面积 A ,用 S 比 A ,计算大黄酸的提取回收率分别为 86.39%, 87.86%, 87.41%。其平均回收率大于 85% 符合药动学研究要求。见表 1。

表 1 大鼠血浆中大黄提取回收率

浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	峰面积 S	峰面积 A	提取回收率 / %
1.0	24.200 8	28.013 5	86.39
5.0	120.917	137.625	87.86
12	295.725	338.308	87.41

3.5 稳定性实验 取大黄酸对照品溶液适量,制成浓度为 1.0, 5.0, 12.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 低、中、高 3 个浓度的血浆样品,在 -20 条件下存放 5 d,室温放置 12 h,冻融 3 次。按 2.3 项下操作,进样测定。结果低、中、高 3 个浓度样品测定值的 RSD 分别为 5.27%, 5.10%, 4.82%。表明样品在该实验条件下稳定。

3.6 药动学参数 大鼠灌服大黄甘草汤及大黄后,血药浓度数据经 3P97 程序拟合药动学模型,计算药动学参数。大黄甘草汤与大黄中大黄酸在大鼠体内药动学过程均符合二房室模型,主要药动学参数见表 2,平均血药浓度-时间曲线见图 2。

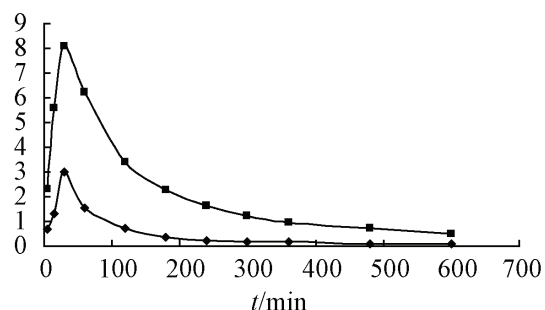


图 2 大黄酸在大鼠体内的药-时曲线

— — 大黄; - - 大黄甘草汤

表 2 大黄酸在大鼠体内主要药动学参数

参数	单位	大黄	大黄甘草汤
C_{\max}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	7.38 \pm 0.67	1.98 \pm 0.16 ¹⁾
T_{\max}	h	0.53 \pm 0.084	0.57 \pm 0.088
AUC	$\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	24.04 \pm 2.37	5.35 \pm 0.48 ¹⁾
$T_{1/2}$	h	0.73 \pm 0.089	0.55 \pm 0.092
$t_{1/2}$	h	4.39 \pm 0.48	6.92 \pm 1.04
CL	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	3.12 \pm 0.28	6.93 \pm 0.65 ¹⁾

注:与 大黄组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

大鼠灌服大黄甘草汤和大黄后,血浆中可检测到的主要成分为大黄酸。大黄酸与其它成分达到基线分离,说明此条件下大黄中其他成分及血浆内源性物质均不干扰大黄酸的测定。

大鼠灌服大黄甘草汤和大黄后,32 min 左右,大黄酸血药浓度达到峰值,说明大黄酸在大鼠体内迅速吸收入血; C_{\max} 分别为 1.98 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 7.38 $\mu\text{g}\cdot$

mL^{-1} , AUC 分别为 5.35 \pm 0.48 $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 (24.04 \pm 2.37) $\mu\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。经两组样本 t 检验,结果达峰浓度 C_{\max} 和血药浓度-时间曲线下面积 AUC 的差异均具有显著意义 ($P < 0.05$);灌服大黄所得 C_{\max} , AUC 值均大于灌服大黄甘草汤,大黄甘草汤中大黄酸清除率增大。

大黄中游离蒽醌直接刺激大肠黏膜促进大肠的蠕动,产生导泻作用,由于大黄作用猛烈,这种作用常引起腹部疼痛。有研究表明,甘草与大黄配伍,可以抑制由大黄引起的结肠环强烈的收缩,从而缓解大黄泻下作用时出现的腹痛^[8]。这与甘草的解痉缓急作用是一致的。过量摄入大黄,可以造成肝损伤^[9]。甘草与大黄配伍后,大黄中的结合蒽醌直接刺激肠黏膜产生泻下作用,吸收入血的游离蒽醌通过甘草酸诱导 CYP3A 酶^[10],加快其代谢,减轻大黄酸对肝脏的损伤。这说明大黄与甘草配伍两者产生相辅相成的协同作用,更好地发挥各自的药效。

[参考文献]

- [1] 陈东东,李丽,张村,等.提取温度和时间对大黄片主要蒽醌苷类成分的影响[J].中国实验方剂学,2009,15(10):50.
- [2] 刘彬,齐云,宋杨,等.甘草皂苷与桔梗皂苷合用的时间协同研究[J].中国实验方剂学,2007,13(4):28.
- [3] 陈洁,彭仁琇.18-甘草酸对格列本脲在实验性糖尿病大鼠体内药动学的影响[J].中国药学杂志,2006,41(10):774.
- [4] 叶腾辉.论《金匱要略》呕吐的辨证与治疗[J].四川中医,2004,22(3):23.
- [5] 韩刚,安静,孙海燕.通脉降脂胶囊质量标准的建立[J].中成药,2005,27(7):778.
- [6] 韩刚,翟丽,赵琳琳,等.姜黄素固体分散体在大鼠体内的药动学研究[J].中国药学杂志,2009,44(9):698.
- [7] 韩刚,金光灿,叶小舟,等.大黄甘草汤中甘草酸对蒽醌类化合物提取率的影响[J].时珍国医国药,2009,20(3):704.
- [8] 寻庆英,王翠芬,魏义全,等.甘草对大鼠小肠动力功能影响的实验研究[J].中国应用生理学杂志,2004,20(4):389.
- [9] 由田,杨骥,吕晶玉.过量大黄对小鼠肝脏细胞的毒性作用[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2008,17(3):303.
- [10] 王宇光,杨明会,马增春.18 β -甘草酸和 18 α -甘草酸对大鼠原代肝细胞 CYP3A 酶表达的影响[J].中国中药杂志,2009,34(3):307.

[责任编辑 顾雪竹]