

三黄泻心汤及大黄中大黄酸在大鼠体内的药代动力学

辛 颖, 耿慧春, 张 嵩, 刘照振, 马英丽*
(黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 研究三黄泻心汤中大黄酸在大鼠体内的药代动力学规律。比较大鼠灌服三黄泻心汤和单味大黄煎剂后大黄酸的药代动力学特征差异。方法: 大鼠灌服三黄泻心汤 20 生药 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和单味大黄 10 生药 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, 经高氯酸沉淀血浆蛋白、乙醚萃取后, 用高效液相色谱法测定大黄酸血药浓度。色谱柱为 Shimadzu VP-ODS 色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液 (82: 18), 流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长为 245 nm, 血药浓度-时间数据采用 3P97 药代动力学软件进行药代动力学分析。结果: 大鼠灌服三黄泻心汤和单味大黄煎剂后, 大黄酸血浆浓度-时间曲线均符合二室模型, 三黄泻心汤中大黄酸 $T_{1/2\beta}$ (18.26 \pm 4.72) h 和单味大黄中大黄酸 $T_{1/2\beta}$ (10.69 \pm 2.19) h, 存在显著性差异 ($P < 0.01$); 剂量校正后三黄泻心汤和单味大黄中大黄酸的 C_{\max}/D 分别为 (0.82 \pm 0.06) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 (0.68 \pm 0.04) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, AUC/D 分别为 (9.05 \pm 1.49) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $\cdot\text{h}$ 和 (6.87 \pm 1.60) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $\cdot\text{h}$, 存在显著性差异 ($P < 0.05$)。结论: 三黄泻心汤中大黄酸的 C_{\max} , AUC, $T_{1/2\beta}$ 值均显著大于单味大黄, 说明方剂的药味配伍促进了大黄酸的吸收利用。

[关键词] 三黄泻心汤; 大黄; 大黄酸; 药代动力学

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)03-0056-04

Pharmacokinetic Study of Rhein from Sanhuang Xiexin Decoction and Radix et Rhizoma Rhei in Rats

XIN Ying, GENG Hui-chun, ZHANG Song, LIU Zhao-zhen, MA Ying-li*
(Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the pharmacokinetics of rhein from Sanhuang Xiexin Decoction in rats, and compare the pharmacokinetics of rhein after ig administration of Sanhuang Xiexin Decoction and Radix et Rhiyoma Rhei. **Methods:** Wistar rats were given(ig) a single dose of Sanhuang Xiexin Decoction $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ or Radix et Rhiyoma Rhei $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The plasma concentration of Rhein was measured by high performance liquid chromatography after extracted with perchloric acid and ether. An HPLC method was established with (SHIMADZU) VP-ODS column (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-water-0.2% phosphoric acid (82: 18), the flow rate was $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and a detection wavelength was 245 nm. Pharmacokinetic parameters were determined from the plasma concentration-time data with the software 3P97. **Results:** The concentration-time curves of rhein fitted well into two-compartment models in rats. The elimination $T_{1/2}$ of rhein in Sanhuang Xiexin Decoction and Radix et Rhiyoma Rhei were (18.26 \pm 4.72) h and (10.69 \pm 2.19) h respectively. Significant difference was found between the two groups. There existed significant ($P < 0.05$) differences in plasma concentration and AUC of rhein between Sanhuang Xiexin Decoction and Radix et Rhiyoma Rhei. The values of normalized AUC by dose of rhein from Sanhuang Xiexin Decoction and Radix et Rhiyoma Rhei were (9.05 \pm 1.49) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $\cdot\text{h}$ and (6.87 \pm 1.60) ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $\cdot\text{h}$ respectively. The values of normalized C_{\max} by dose of

[收稿日期] 2008-07-10

[基金项目] 黑龙江省博士创新基金项目[2007年]

[通讯作者] * 马英丽, Tel: (0451) 82196178; E-mail: mylt666@sina.com

rhein were $(0.82 \pm 0.06) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(0.68 \pm 0.04) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. **Conclusions:** The compound compatibility of the decoction promoted the absorption of rhein. It indicated that there is rationality in the compatibility of Sanhuang Xiexin Decoction.

[**Key words**] Sanhuang Xiexin Decoction; Radix et Rhizoma Rhei; rhein; pharmacokinetics

三黄泻心汤由大黄、黄连、黄芩 3 味常用中药组成, 出自汉·张仲景《金匱要略》, 是清热解毒, 治疗各种出血证^[1]、心胃火邪内炽证的经典方剂。本实验采用高效液相色谱法, 对方中君药大黄主要活性成分大黄酸在大鼠体内的药代动力学特征进行了研究, 并分析比较了全方与单味大黄口服给药后大黄酸在大鼠体内的动态变化过程差异。

1 材料

1.1 仪器 LC-2010A 液相色谱仪(日本岛津公司); SPD-10A 紫外检测器; CLASS-VP 工作站; 800 型电动离心机; XW-80C 涡旋混合器; AB204-N 分析天平; BRANSON BS3200S-T 型超声振荡仪。

1.2 试剂 甲醇: 色谱纯(美国天地 TEDIA 公司); 乙腈: 色谱纯(美国天地 TEDIA 公司); 水为纯净水; 磷酸: 色谱纯(天津市科密欧试剂开发中心); 乙醚: 分析纯(天津市东丽区天大化学试剂厂); 乙酸、高氯酸: 分析纯(天津市津东天正精细化学试剂厂)。

1.3 试验药物 大黄、黄连、黄芩购自北京同仁堂哈尔滨药店有限责任公司, 经黑龙江中医药大学药学院生药教研室都晓伟教授鉴定。按三黄泻心汤方中大黄、黄芩、黄连 2: 1: 1 的比例称取药材, 将 3 味药及单味大黄分别置于两个烧杯中, 加入 10 倍量蒸馏水, 浸泡 30 min, 加热至沸腾, 并保持微沸 40 min, 纱布滤过, 再加入 8 倍量蒸馏水, 加热至沸腾, 保持微沸 20 min, 纱布滤过, 两次滤液合并于各自烧杯中, 置 60 °C 水浴中浓缩至全方及单味大黄水煎液浓度分别为含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.50 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。测定大黄酸含量: 三黄泻心汤中含量为 $0.82 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 单味大黄煎剂中含量为 $1.78 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 对照品: 大黄酸(批号: 757-9402) 中国药品生物制品检定所。

1.4 动物 Wistar 大鼠, (180~220) g, 雄性, 由长春高新动物实验研究中心提供, 许可证号: SCXK-(吉) 2003~0004。

2 方法

2.1 色谱条件 Shimadzu ODS 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液(82: 18, v/v), 检测波长 245 nm, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 灵敏度

为 0.5 AUFS。

2.2 对照品溶液的配制 取大黄酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 配成大黄酸含量为 $1.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液, 经倍数稀释配成 0.65, 1.30, 2.60, 6.50, 13.00, 26.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 共 6 个浓度的对照品溶液。

2.3 血浆样品预处理 取血浆 100 μL, 加入 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的高氯酸 0.05 mL 沉淀血浆蛋白, 旋涡混合 30 s 后, 精密加入 1 mL 乙醚萃取, 旋涡混合 3 min, 以 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上层有机相, 乙醚萃取 2 次, 合并有机相, 氮气吹干, 残渣用各为 100 μL 的 2% 乙酸甲醇与乙腈混合液溶解, 吸取该溶液过微孔滤膜(0.22 μm), 20 μL 进样于 HPLC 分析。

2.4 药动学实验 取 Wistar 大鼠 12 只, 雄性, 180 g ~ 220 g 分成 2 组, 每组 6 只。实验前 12 h 禁食, 自由饮水。分别灌服三黄泻心汤 ($20 \text{ 生药} \cdot \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其中含大黄酸 $16.375 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和大黄煎剂 ($10 \text{ 生药} \cdot \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其中含大黄酸 $17.663 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 生药大黄含量与 $20 \text{ 生药} \cdot \text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 三黄泻心汤生药中大黄含量等量)。于给药 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 24.0 h 后, 眼眶取血 0.3 mL 于肝素化试管中, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 100 μL, 按“血浆样品预处理”项下同法操作, 记录大黄酸峰面积, 由随行标准曲线计算血药浓度, 所得数据采用 3P97 软件, 拟合药代动力学房室模型, 求算药代动力学参数。复方与单味药之间的差异采用 *t* 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 方法与专属性 大黄酸对照品、空白血浆、空白血浆加大黄酸对照品、全方和大黄煎剂分别给药后含药血浆的色谱图见图 1。由图可知, 在选定的色谱条件下, 血浆中内源性成分不干扰大黄酸的检测, 理论塔板数不小于 4000, 分离度大于 1.5, 大黄酸出峰时间为 7.70 min。

3.2 线性范围和灵敏度 在 100 μL 空白血浆中加入 200 μL 一系列浓度的对照品溶液, 使相应的血浆浓度为 0.65, 1.30, 2.60, 6.50, 13.00, 26.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,

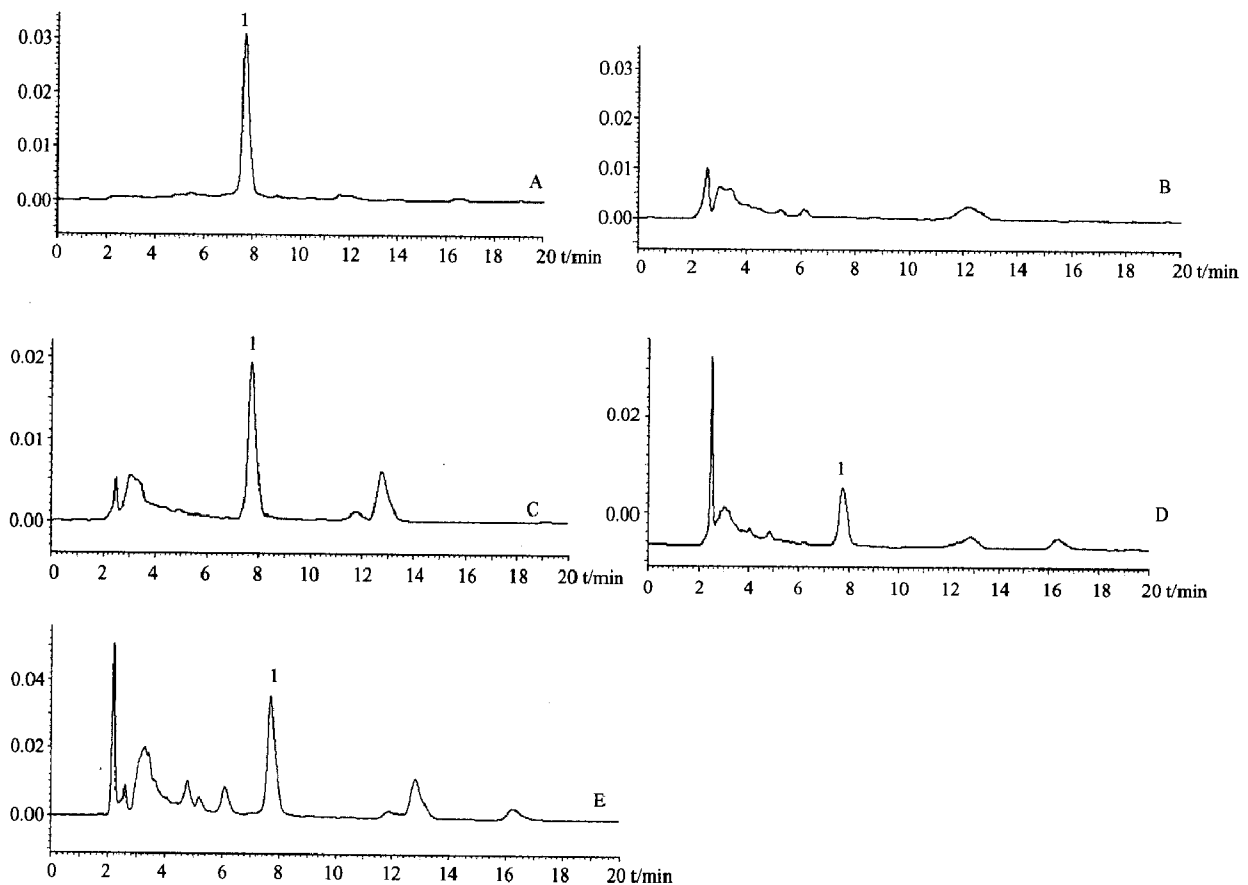


图 1 大黄酸 HPLC 色谱图

A 对照品大黄酸; B 空白血浆; C 空白血浆+ 大黄酸对照品;

D 灌服单味大黄煎剂后含药血浆色谱图; E 灌服全方后含药血浆色谱图; 1 大黄酸

按“血浆样品预处理”项下操作,以对照品峰面积为纵坐标(Y),大黄酸血药浓度为横坐标(C),作加权直线回归计算标准曲线,得到方程 $Y = 4.5 \times 10^4 C - 1.9 \times 10^3$ (权重系数为 $1/C^2$, $R = 0.9991$),样品在 $(0.65 \sim 26.00) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。最低检测限为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 3$)。

3.3 精密度 日内精密度 取空白血浆 $100 \mu\text{L}$,配制成浓度为 $1.30, 6.50, 26.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 血浆样品,每个浓度平行作 6 份,按“血浆样品预处理”项下操作,每个样品进样 3 次,在 1 天内用同台仪器和当日的标准曲线测定并计算日内精密度。结果低,中,高 3 种浓度的 RSD 值分别为 $8.55\%, 6.21\%, 7.14\%$ 。

日间精密度 同上法制备血浆样品,每个浓度 6 份,每份进样 3 次,连续 3 d 用同台仪器及当日标准曲线进行测定并求算日间精密度,结果低,中,高 3 种浓度的 RSD 值分别为 $11.48\%, 1.82\%, 4.48\%$ 。

3.4 准确度 取空白血浆 $100 \mu\text{L}$,分别加入低,中,高 3 个浓度的对照品溶液 $200 \mu\text{L}$,使相应的血浆浓度为 $1.30, 6.50, 26.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每个浓度平行作 6 份,按“血浆样品预处理”项下操作,进样于 HPLC 分析测定,以当日的标准曲线计算实测浓度,准确度 = $C_{\text{实测}}/C_{\text{理论}} \times 100\%$ 。结果低,中,高 3 个浓度的方法准确度分别为 $105.45\%, 97.12\%, 95.51\%$,其 RSD 值分别为 $5.62\%, 7.27\%, 3.32\%$ 。

3.5 提取回收率 取空白血浆 $100 \mu\text{L}$,分别加入低,中,高 3 个浓度的对照品溶液 $200 \mu\text{L}$,使相应的血浆浓度为 $1.30, 6.50, 26.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每个浓度平行作 6 份,按“血浆样品预处理”项下操作,进样测定,记录大黄酸峰面积 A ,另取大黄酸对照品溶液,挥干后加入乙腈,2% 乙酸甲醇各 $100 \mu\text{L}$ 溶解进样,记录大黄酸面积 A_0 ,将 A 与 A_0 比较,计算大黄酸的提取回收率分别为 $80.39\%, 80.86\%, 78.41\%$,其

RSD 值分别为 9.11%, 3.75%, 6.89%。

3.6 稳定性 配制与“精密性、准确度与提取回收率”浓度相同的大黄酸血浆样品,在-20℃条件下存放 3 d,室温放置 20 h,冻融 3 次。按“血浆样品预处理”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 8.27%, 10.10%, 4.82%。表明样品在该实验条件下稳定。

3.7 药动学研究 大鼠灌服三黄泻心汤及大黄后在不同时间点采血并按所建立的方法测定其血药浓度,所得数据经 3P97 程序拟合药代动力学模型,计算药代动力学参数,以理论血药浓度与实测血药浓度相关系数最大且 AIC 值最小为原则,最终确定全方与单味大黄煎剂中大黄酸在大鼠体内均符合二室模型,两组主要药动学参数见表 1,平均血药浓度-时间曲线见图 2。

表 1 口服给药三黄泻心汤和单味大黄后大黄酸在大鼠血浆中的主要药动学参数($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Parameter	Unit	Sanhuang Xiexin Decoction	Rhubarb
$T_{1/2a}$	h	1.82 ± 0.20	1.50 ± 0.14
$T_{1/2\beta}$	h	18.26 ± 4.72	10.69 ± 2.19
$T_{1/2Ka}$	h	0.08 ± 0.01	0.91 ± 0.14
K_{21}	h^{-1}	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.04
K_{10}	h^{-1}	0.11 ± 0.02	0.19 ± 0.06
K_{12}	h^{-1}	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.02
$CL_{(S)}$	$\mu g \cdot h^{-1} \cdot (\mu g \cdot mL^{-1})^{-1}$	0.80 ± 0.25	0.87 ± 0.20
T_P	h	0.64 ± 0.02	1.70 ± 0.11
C_{max}	$\mu g \cdot mL^{-1}$	13.40 ± 0.93	12.03 ± 0.73
AUC_{0-8}	$(\mu g \cdot mL^{-1}) \times h$	148.26 ± 24.52	121.24 ± 32.71

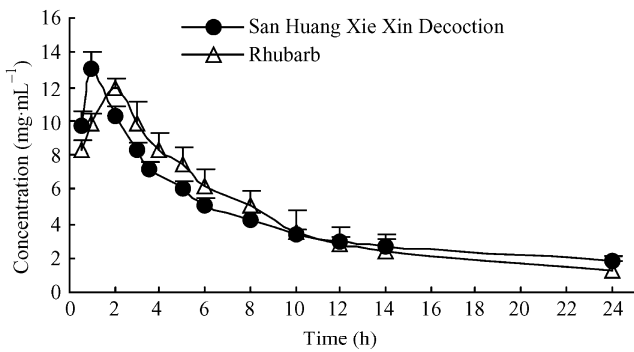


图 2 口服给药三黄泻心汤和单味大黄后大黄酸的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

考察了多种流动相系统分别为甲醇-0.1%磷酸水溶液,甲醇-0.2%磷酸水溶液,甲醇-醋酸水溶液,乙腈-磷酸水溶液,乙腈-醋酸水溶液等对分离的影响,结果以甲醇-0.2%磷酸水溶液为流动相比较好。在此色谱条件下,血浆色谱图如图 1 所示。灌服三黄泻心汤和单味大黄煎剂后,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它成分及血浆内源性物质、代谢产物均不干扰大黄酸的检测,出峰时间适宜。

从药时曲线图 2 可知,给药全方 0.6 h 后大黄酸血药浓度达到峰值,给药大黄煎液大黄酸血药浓度达峰时间为 1.7 h,说明大黄酸可被大鼠迅速吸收入血,并随时间呈动态变化。

由于三黄泻心汤与大黄中所含大黄酸含量不同,在比较与剂量相关的参数如 AUC, C_{max} 时,采用剂量校正,即用 AUC 和 C_{max} 分别除以每公斤体重的给药量 D 表示,结果如下:大鼠灌服三黄泻心汤和大黄后, C_{max}/D 分别为 $(0.82 \pm 0.06) \mu g \cdot mL^{-1}$ 和 $(0.68 \pm 0.04) \mu g \cdot mL^{-1}$, AUC/D 分别为 $(9.05 \pm 1.49) (\mu g \cdot mL^{-1}) \times h$ 和 $(6.87 \pm 1.60) (\mu g \cdot mL^{-1}) \times h$ 。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 ($P < 0.05$)。大鼠灌服全方所得 C_{max} , AUC 值大于灌服单味大黄,表明全方配伍有助于提高大黄酸在体内的吸收利用程度,有利于发挥其药效。

t 检验比较两组样本消除半衰期 ($T_{1/2\beta}$), 结果差异显著 ($P < 0.01$), 复方中大黄酸的消除比单味大黄中大黄酸的消除缓慢,说明复方配伍延长了大黄酸的作用效应,提高了药效,体现了中药复方作用持久的特点。

本实验药动学参数结果显示,全方 C_{max}/D , AUC/D, $T_{1/2\beta}$ 值均显著大于单味大黄,证实了复方作用优于单味药。其原因可能是复方中其它共存成分在体内有助于大黄酸吸收利用^[2-3], 延长其效应,但具体机制还需进一步研究。

本研究阐明了三黄泻心汤君药大黄中大黄酸的药代动力学特征,通过对复方与单味药口服给药后大黄酸在大鼠体内的动态变化过程的比较分析,从药代动力学角度进一步说明了复方配伍的合理性与整体性,为中药复方药代动力学研究方法提供了思路。

[参考文献]

- [1] 王仁媛,王军瑞.从泻心汤看大黄的止血效用[J].实用中医药杂志,2006,22(9):581.
- [2] De Witte P. Metabolism and pharmacokinetics of anthranoids [J]. Pharmacology, 1993, 47(suppl 1): 86-97.
- [3] 刘晓东,薛玉英,谢林,等.大鼠灌胃川芎、当归及其复方后阿魏酸的药代动力学[J].中国药科大学学报,2003,34(5):448-451.