

大黄及牛黄解毒片大鼠给药后血浆中大黄活性成分的药代动力学比较研究

刘玥昕, 吴 骁, 关 蓉, 杭太俊, 宋 敏*

(中国药科大学药物分析系, 南京 210009)

摘 要 考察大黄及牛黄解毒片给药后大黄活性成分在大鼠体内药代动力学行为的差异。大鼠分别灌胃给予大黄生药材 96 mg/kg(含总蒽醌 1.83 mg/kg, 相当于大黄酸 0.28 mg/kg、大黄素 0.30 mg/kg、大黄酚 0.81 mg/kg、芦荟大黄素 0.23 mg/kg 及大黄素甲醚 0.20 mg/kg)及牛黄解毒片 250 mg/kg(含总蒽醌与生药材等量, 相当于大黄酸 0.33 mg/kg、大黄素 0.38 mg/kg、大黄酚 0.71 mg/kg、芦荟大黄素 0.24 mg/kg 及大黄素甲醚 0.17 mg/kg), 血浆经甲醇沉淀后, 采用 LC-MS/MS 法测定大黄活性成分血药浓度, WinNonlin 7.0 软件计算药代动力学参数。大鼠灌胃大黄及牛黄解毒片后, 大黄酸的 c_{\max} 分别为 (121 ± 103) 及 $(474 \pm 251) \mu\text{g/L}$, AUC_{0-t} 分别为 (275 ± 176) 及 $(406 \pm 194) \mu\text{g} \cdot \text{h/L}$; 大黄酚异构体的 c_{\max} 分别为 $(2\,325 \pm 1\,390)$ 及 $(3\,580 \pm 2\,169) \mu\text{g/L}$, AUC_{0-t} 分别为 $(8\,170 \pm 2\,661)$ 及 $(8\,856 \pm 4\,023) \mu\text{g} \cdot \text{h/L}$; 仅在牛黄解毒片给药大鼠血浆中检测出大黄素, 且牛黄解毒片给药后大鼠血浆中大黄素的 c_{\max} 、 AUC 及 $t_{1/2}$, 大黄酚异构体的 V_d 及 CL 与单味大黄相比显著增加, 大黄酚异构体的 t_{\max} 显著下降。实验结果表明, 牛黄解毒片复方配伍增强了大黄活性成分在大鼠体内的吸收利用, 改变了大黄活性成分的药代动力学行为。

关键词 大黄; 牛黄解毒片; LC-MS/MS; 药代动力学

中图分类号 R969 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)04-0449-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180410

引用本文 刘玥昕, 吴骁, 关蓉, 等. 大黄及牛黄解毒片大鼠给药后血浆中大黄活性成分的药代动力学比较研究[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(4): 449-455.

Cite this article as: LIU Yuexin, WU Xiao, GUAN Rong, et al. Comparative pharmacokinetics of active anthraquinones ingredients after oral administration of Rhei Radix et Rhizoma and Niu Huang Jiedu Tablets to rats[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(4): 449-455.

Comparative pharmacokinetics of active anthraquinones ingredients after oral administration of Rhei Radix et Rhizoma and Niu Huang Jiedu Tablets to rats

LIU Yuexin, WU Xiao, GUAN Rong, HANG Taijun, SONG Min*

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The study aims to investigate different pharmacokinetic profiles of anthraquinones after oral administration of Rhei Radix et Rhizoma and Niu Huang Jiedu Tablets (NHJDT) in rats, respectively. Rats were administered with 96 mg/kg of Rhei Radix et Rhizoma (1.83 mg/kg of total anthraquinone, equivalent to 0.28 mg/kg of rhein, 0.30 mg/kg of emodin, 0.81 mg/kg of chrysophanol, 0.23 mg/kg of aloe-emodin and 0.20 mg/kg of physcion) or 250 mg/kg of NHJDT (equal dose of total anthraquinone as Rhei Radix et Rhizoma, equivalent to 0.33 mg/kg of rhein, 0.38 mg/kg of emodin, 0.71 mg/kg of chrysophanol, 0.24 mg/kg of aloe-emodin and 0.17 mg/kg of physcion), respectively. Followed by protein precipitation with methanol, the anthraquinones in plasma samples were determined by LC-MS/MS. The pharmacokinetic parameters were calculated by WinNonlin 7.0. The c_{\max} of rhein were (121 ± 103) and $(474 \pm 251) \mu\text{g/L}$, and the AUC_{0-t} were (275 ± 176) and $(406 \pm 194) \mu\text{g} \cdot \text{h/L}$ for Rhei Radix et Rhizoma and NHJDT, respectively. The c_{\max} of chrysophanol isomer were $(2\,325 \pm 1\,390)$ and

收稿日期 2018-03-15 *通信作者 Tel: 025-83271090 E-mail: cqsongmin@sina.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173648)

($3\,580 \pm 2\,169$) $\mu\text{g/L}$, and the AUC_{0-t} were ($8\,170 \pm 2\,661$) and ($8\,856 \pm 4\,023$) $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$, respectively. Emodin in very low levels was only detected in rat plasma samples after oral gavage of NHJDT. The c_{\max} , AUC and $t_{1/2}$ of rhein, as well as Vd and CL of chrysophanol isomer were observed with a much increased degree in comparison with Rhei Radix et Rhizoma counterparts. However, much shorter t_{\max} was found in NHJDT group. Therefore, NHJDT with co-existing components enhanced the absorption and influenced the pharmacokinetic behaviors of active ingredients in Rhei Radix et Rhizoma.

Key words Rhei Radix et Rhizoma; *Niu Huang Jie Du* Tablets; LC-MS/MS; pharmacokinetics

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81173648)

牛黄解毒片作为清热解毒的传统复方,历经 800 多年的发展,形成目前《中华人民共和国药典》收载的由人工牛黄、雄黄、石膏、大黄、黄芩、桔梗、冰片、甘草等八味中药以一定工艺炮制而成的中药复方制剂^[1-3]。临床上主要用于治疗火热内盛、咽喉肿痛、牙龈肿痛、口舌生疮及目赤肿痛^[1]。大黄作为其处方的主要成分之一,具有显著的泻下作用。近年来,随着研究的不断深入,其保肝利胆^[4]、抗凝抗炎^[4-5]的作用也逐渐得到证实。大黄的主要活性成分包括大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素及大黄素甲醚 5 种蒽醌类成分^[6-7]。

目前,对于大黄活性成分的体内过程研究主要针对单味药材大黄^[8-9],但对牛黄解毒片中大黄的药代动力学未见报道。本研究采用 LC-MS/MS 测定牛黄解毒片中大黄主要成分在大鼠血浆中的经时过程,分析药代动力学特征,并与给药单味大黄进行比较,从药代动力学角度揭示方剂配伍的特性。

1 材料

1.1 仪器

TSQ Quantum UltraAM 型 MS/MS 联用仪(美国 Thermo Finnigan 公司);XW-80C 型旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂);Explorer 超纯水机(上海沉黄科学仪器有限公司);BS110S 型万分之一天平(德国 Sartorius 公司);TGL-16 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪仪器有限公司);高速多功能粉碎机(永康市天祺盛世工贸有限公司)。

1.2 药品与试剂

牛黄解毒片(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂);大黄(安徽井泉中药股份有限公司);大黄酸对照品、大黄素对照品(含量 98.8%)、大黄酚对照品(含量 99.7%)、芦荟大黄素对照品

(含量 98.3%)、大黄素甲醚对照品(含量 99.8%)、1,8-二羟基蒽醌对照品(含量 99.4%)(成都德斯特生物技术有限公司);L-抗坏血酸(国药集团化学试剂有限公司,含量 99.7%);甲醇(美国 Tedia 公司,色谱纯);其余试剂均为市售分析纯。超纯水(自制,18.25 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重(200 ± 20)g,上海杰思捷实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0006。动物饲养于中国药科大学药学实验动物中心,饲养温度为(23 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,湿度为 40%~70%,12 h 照明。实验前禁食过夜 12 h,自由饮水。所有动物实验符合实验室动物饲料和使用指导原则,并通过中国药科大学伦理委员会的同意。

2 方法

2.1 牛黄解毒片与大黄灌胃溶液的制备

取生药大黄及牛黄解毒片适量,粉碎成细粉,精密称定,用 0.5% CMC-Na 分别配制成质量浓度为 20 mg/mL (含总蒽醌 19.03 g/kg ,相当于大黄酸 2.88 g/kg 、大黄素 3.15 g/kg 、大黄酚 8.48 g/kg 、芦荟大黄素 2.41 g/kg 及大黄素甲醚 2.11 g/kg)及 54 mg/mL (含总蒽醌 7.27 g/kg ,相当于大黄酸 1.31 g/kg 、大黄素 1.50 g/kg 、大黄酚 2.82 g/kg 、芦荟大黄素 0.96 g/kg 及大黄素甲醚 0.68 g/kg)的混悬液,于给药前充分混匀。

2.2 对照品溶液及内标溶液的配制

精密称定大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素及大黄素甲醚对照品适量,加入适量二甲亚砜溶解后,用甲醇稀释并配制成大黄酸 2~600 ng/mL ,大黄素 0.5~20 ng/mL ,大黄酚 10~400 ng/mL ,芦荟大黄素 10~400 ng/mL 及大黄素甲醚 10~400 ng/mL

范围的系列标准溶液。

精密称定1,8-二羟基蒽醌适量,加入适量二甲亚砜溶解后,用甲醇稀释并配制成1 $\mu\text{g/mL}$ 的内标工作液。

2.3 色谱及质谱条件

采用Inertsil ODS-3 C_8 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm)色谱柱,以0.1%甲酸铵水溶液(A)-0.1%甲酸铵甲醇溶液(B)为流动相,线性梯度洗脱[0 min, A-B(50:50)→1.0 min, A-B(50:50)→1.5 min, A-B(10:90)→9 min, A-B(10:90)→9.1 min, A-B(50:50)→10 min, A-B(50:50)],流速1.0 mL/min,柱温35 $^{\circ}\text{C}$,进样器温度15 $^{\circ}\text{C}$,进样量30 μL 。

电喷雾负离子化,喷雾电压-3 000 V,毛细管温度350 $^{\circ}\text{C}$,鞘气(N_2)压力40 kPa,辅助气(N_2)压力10 kPa,碰撞气(Ar)1.20 Pa,多反应监测:大黄酸 m/z 283.0→ m/z 239.0,碰撞能-17 eV;大黄素 m/z 269.0→ m/z 225.0,碰撞能-25 eV;大黄酚 m/z 253.1→ m/z 225.0,碰撞能-27 eV;芦荟大黄素 m/z 269.2→ m/z 240.0,碰撞能-22 eV;大黄素甲醚 m/z 283.2→ m/z 240.0,碰撞能-26 eV;内标1,8-二羟基蒽醌 m/z 239.0→ m/z 211.0,碰撞能-26 eV。

2.4 血浆样品前处理

精密量取血浆样品0.2 mL于2 mL聚塑离心管中,精密加入20% L-抗坏血酸溶液40 μL ,甲醇(标准曲线和质控样品中加入对应浓度的标准溶液)50 μL 及内标溶液50 μL ,涡旋混匀30 s,加入甲醇0.6 mL,涡旋混匀3 min后,12 000 r/min离心10 min,取上清液37 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,残渣加入初始比例流动相120 μL ,涡旋混匀3 min后,12 000 r/min离心10 min,取上清液30 μL 进行LC-MS/MS分析。

2.5 动物实验

SPF级SD大鼠40只,随机分为4组,每组10只,大鼠分别灌胃给予大黄96 mg/kg(含总蒽醌1.83 mg/kg,相当于大黄酸0.28 mg/kg、大黄素0.30 mg/kg、大黄酚0.81 mg/kg、芦荟大黄素0.23 mg/kg及大黄素甲醚0.20 mg/kg)或牛黄解毒片250 mg/kg(按人用临床等效日剂量换算,含总蒽醌与大黄生药材等量,相当于大黄酸0.33 mg/kg、大黄素0.38 mg/kg、大黄酚0.71 mg/kg、芦荟大黄素0.24 mg/kg及大黄素甲醚0.17 mg/kg),第1组及

第2组灌胃大黄,另两组灌胃牛黄解毒片,于给药前0 h及给药后3,5,10,20,30,40,50 min,1,2,3,4,8,12 h采集血浆样本。由于大鼠血容量有限,第1组及第3组于0,5,20,40 min,1,3,8 h;第2组及第4组于3,10,30,50 min,2,4,12 h大鼠眼内眦静脉丛取血0.4 mL至肝素化离心管中,4 000 r/min离心,分取血浆置-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。

3 结果

3.1 专属性

大鼠空白血浆、空白血浆添加一定浓度的大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素、大黄素甲醚及内标1,8-二羟基蒽醌溶液及大鼠给药1 h后血浆样品的典型色谱图如图1所示。大黄酸、大黄酚异构体、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚及内标1,8-二羟基蒽醌的保留时间分别约为3.9,4.0,4.3,5.1,5.8,6.6及5.2 min,血浆内源性物质对测定无干扰。

3.2 标准曲线及定量下限

精密量取空白血浆0.2 mL,加入20% L-抗坏血酸溶液40 μL ,分别精密加入系列大黄混合对照品溶液50 μL ,配制成大黄酸2~600 ng/mL,大黄素0.5~20 ng/mL,大黄酚10~400 ng/mL,芦荟大黄素10~400 ng/mL及大黄素甲醚10~400 ng/mL的系列标准血浆样本,自“精密加入内标溶液50 μL ”起,照“2.4”项下同法操作,记录色谱图。以大黄各成分峰面积(A_s)和内标峰面积(A_r)的比值 Y 对质量浓度 c (ng/mL)进行权重回归($1/c^2$)。得大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素及大黄素甲醚的回归方程分别为 $Y = -0.0170 + 0.0472c$ 、 $Y = 0.0182 + 0.464c$ 、 $Y = -0.000836 + 0.0000951c$ 、 $Y = 0.0281 + 0.00258c$ 及 $Y = 0.000285 + 0.0000616c$,各成分线性良好,相关系数 $r \geq 0.99$ 。该方法大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素及大黄素甲醚的定量下限分别为2,0.5,10,10及10 ng/mL,准确度在98.09%~114.20%,精密密度(RSD)小于15.61%,满足定量下限分析测定的要求。

3.3 准确度及精密密度

分别配制低、中、高不同质量浓度大黄酸(5,100,480 ng/mL)、大黄素(1,4,16 ng/mL)、大黄酚(20,80,320 ng/mL)、芦荟大黄素(20,80,320 ng/mL)及大黄素甲醚(20,80,320 ng/mL)血浆样本各

6份,照“2.4”项下同法操作,一个分析批内测定6次,计算批内变异。不同分析批测定3次,计算批

间变异。结果如表1所示,各成分准确度在89.51%~109.36%,精密性(RSD)小于20.19%。

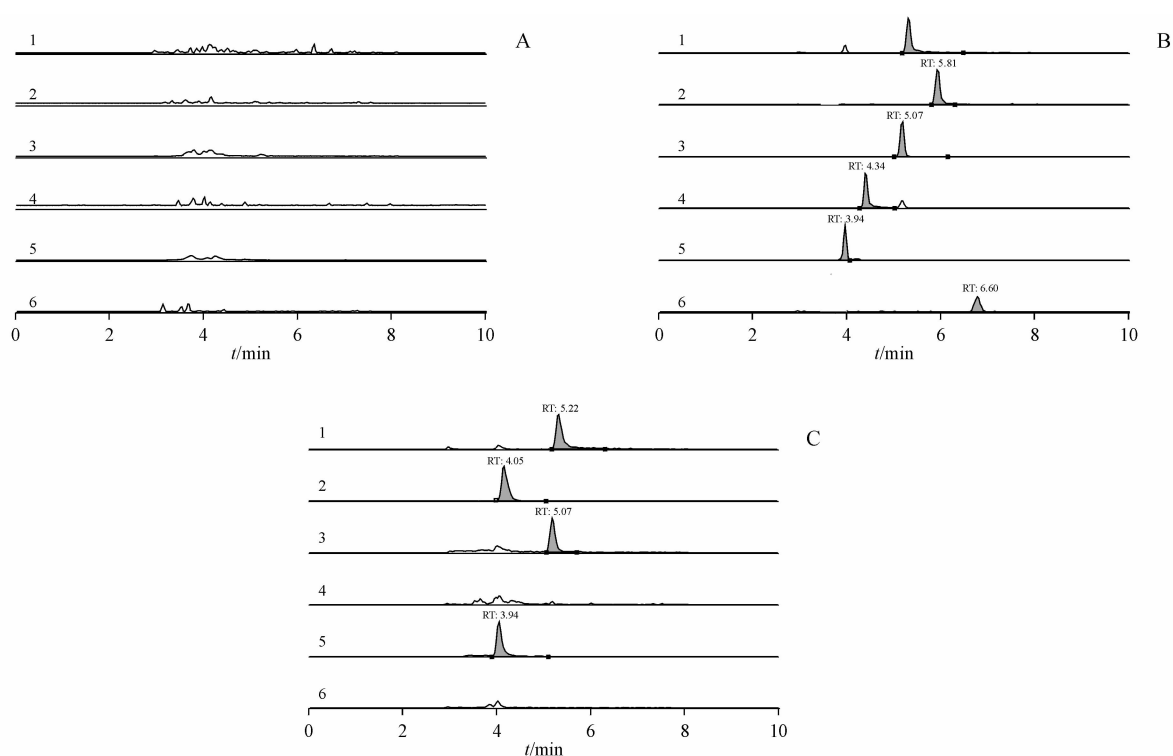


Figure 1 Chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with standard solution (B) and plasma sample obtained 1 h after oral administration of *Niu Huang Jiedu* Tablets (C)

1: 1,8-Dihydroxyanthraquinone (t_R 5.2 min); 2: Chrysophanol (t_R 5.8 min) and chrysophanol isomer (t_R 4.0 min); 3: Emodin (t_R 5.1 min); 4: Aloe-emodin (t_R 4.3 min); 5: Rhein (t_R 3.9 min); 6: Physcion (t_R 6.6 min)

Table 1 Inter- and intra-batch precision and accuracy of rhein, emodin, chrysophanol, aloe-emodin and physcion ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Analyte	$c/$ (ng/mL)	Inter-batch			Intra-batch		
		Measured concentration/ (ng/mL)	Accuracy/ %	RSD/ %	Measured concentration/ (ng/mL)	Accuracy/ %	RSD/ %
Rhein	5	5.13 \pm 0.34	102.53	6.73	5.47 \pm 0.74	109.36	13.49
	100	108.04 \pm 9.93	108.04	9.19	106.01 \pm 4.33	106.01	4.08
	480	494.04 \pm 32.01	102.92	6.48	468.42 \pm 64.19	97.59	13.70
Emodin	1	0.99 \pm 0.06	99.40	5.62	1.02 \pm 0.10	101.59	9.83
	4	3.94 \pm 0.17	98.38	4.24	4.10 \pm 0.59	102.56	14.39
	16	14.47 \pm 0.87	90.47	6.04	15.22 \pm 2.13	95.15	13.99
Chrysophanol	20	19.03 \pm 1.42	95.17	7.45	18.63 \pm 1.66	93.13	8.89
	80	79.19 \pm 2.99	98.99	3.78	79.09 \pm 3.87	98.87	4.89
	320	329.81 \pm 28.28	103.07	8.58	326.98 \pm 14.00	102.18	4.28
Aloe-emodin	20	20.29 \pm 2.49	101.43	12.30	19.00 \pm 2.24	95.02	11.78
	80	83.51 \pm 6.08	104.38	7.28	83.53 \pm 6.46	104.41	7.74
	320	330.86 \pm 17.21	103.39	5.20	334.04 \pm 9.63	104.39	2.88
Physcion	20	21.61 \pm 3.22	108.07	14.91	20.23 \pm 4.08	101.16	20.19
	80	73.21 \pm 3.96	91.51	5.40	71.61 \pm 5.56	89.51	7.77
	320	307.59 \pm 33.72	96.12	10.96	321.06 \pm 28.62	100.33	8.91

3.4 基质效应和提取回收率

取低、中、高混合对照品溶液 50 μL,加入 20% L-抗坏血酸溶液 40 μL,照“2.4”项下同法操作,作为基质效应对照组,记录样品峰面积和内标峰面积的比值为 A。取空白血浆,甲醇沉淀后分取上清液,加入对应浓度的混合对照品溶液,照“2.4”项下同法操作,作为基质效应样品组。记录样品峰面积和内标峰面积的比值为 B。按基质效应因子

(MF) = B/A × 100% 计算 MF。
照“3.3”项下分别配制低、中、高质量浓度的 QC 样品,作为提取回收率样品组,根据与基质效应样品组的峰面积比值计算提取回收率。基质效应和提取回收率结果见表 2,在低、中、高不同质量浓度下,QC 样品的基质效应和提取回收率稳定,符合生物样本定量分析的要求。

Table 2 Matrix effect and extraction recovery of rhein, emodin, chrysophanol, aloe-emodin and physcion ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Analyte	c/(ng/mL)	Matrix effect/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Rhein	5	158.61 ± 14.29	9.01	71.13 ± 1.48	2.08
	100	157.90 ± 4.90	3.11	64.29 ± 3.86	6.01
	480	179.55 ± 17.07	9.51	66.21 ± 3.93	5.94
Emodin	1	18.29 ± 1.71	9.33	80.44 ± 4.09	5.09
	4	15.18 ± 0.84	5.55	85.46 ± 2.84	3.32
	16	18.55 ± 1.06	5.73	90.78 ± 2.61	2.87
Chrysophanol	20	110.72 ± 14.61	13.20	72.28 ± 14.40	19.92
	80	100.12 ± 12.42	12.40	77.30 ± 10.66	13.79
	320	110.69 ± 7.03	6.35	88.71 ± 5.99	6.76
Aloe-emodin	20	61.29 ± 14.31	23.34	86.08 ± 11.66	13.54
	80	53.23 ± 3.67	6.89	72.89 ± 4.83	6.62
	320	80.65 ± 8.22	10.19	79.41 ± 2.76	3.47
Physcion	20	92.82 ± 18.11	19.51	58.68 ± 8.03	13.69
	80	96.52 ± 7.41	7.68	87.77 ± 17.01	19.38
	320	83.57 ± 6.81	8.14	90.34 ± 10.54	11.67

3.5 稳定性

考察了血浆样品于室温(25 ℃)放置 8 h,3 次冻融,处理后的血浆样品进样盘(15 ℃)放置 24 h

的稳定性,结果见表 3。大黄酸、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素及大黄素甲醚浓度均无明显变化,稳定性良好。

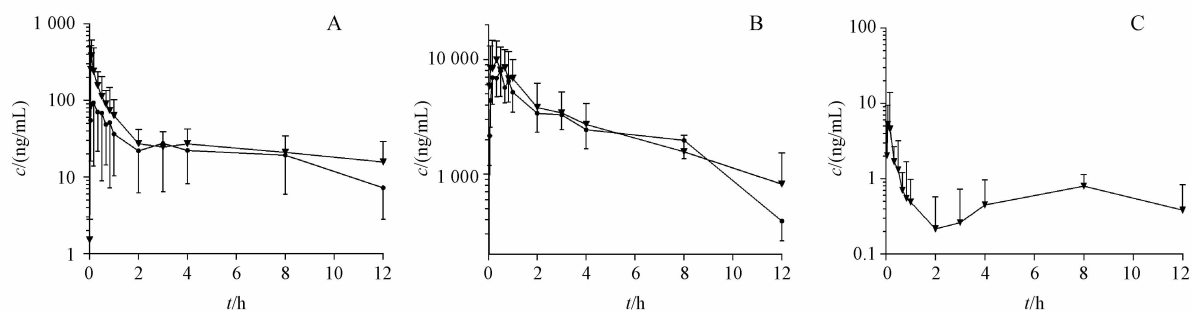
Table 3 Stability of rhein, emodin, chrysophanol, aloe-emodin and physcion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Analyte	c/(ng/mL)	Autosampler (15 ℃)		Freeze-thaw cycles		Room-temperature (25 ℃)	
		Measured concentration/(ng/mL)	RSD/%	Measured concentration/(ng/mL)	RSD/%	Measured concentration/(ng/mL)	RSD/%
Rhein	5	5.51 ± 0.46	8.29	6.11 ± 0.84	13.80	5.04 ± 0.36	7.24
	480	499.33 ± 60.07	12.03	506.28 ± 23.98	4.74	433.70 ± 26.96	6.22
Emodin	1	0.99 ± 0.10	9.61	1.10 ± 0.12	11.11	0.85 ± 0.15	18.02
	16	13.29 ± 2.03	15.31	14.91 ± 0.94	6.32	15.96 ± 1.54	9.63
Chrysophanol	20	16.15 ± 2.05	12.71	16.35 ± 2.34	14.34	18.22 ± 3.00	16.43
	320	283.49 ± 31.23	11.02	318.30 ± 21.61	6.79	349.31 ± 29.02	8.31
Aloe-emodin	20	23.18 ± 5.82	25.11	23.08 ± 4.80	20.77	20.00 ± 2.61	13.03
	320	281.03 ± 17.83	17.83	337.83 ± 37.75	11.17	329.26 ± 24.39	7.41
Physcion	20	17.87 ± 3.00	16.79	16.40 ± 2.94	17.95	19.05 ± 1.31	6.90
	320	351.71 ± 37.71	10.72	315.14 ± 23.36	7.41	302.53 ± 33.15	10.96

3.6 药代动力学研究

大鼠灌胃大黄及牛黄解毒片后不同时间点大黄 3 种活性成分的平均血药浓度-时间曲线见图 2,

所得数据经 WinNonlin7.0 软件计算药代动力学参数,结果见表 4。



—▼—NHJDT (250 mg/kg); —●—Rhei Radix et Rhizoma (96 mg/kg)

Figure 2 Mean plasma concentration-time profiles of rhein (A), chrysophanol isomer (B) and emodin (C) in rats after oral administration of Rhei Radix et Rhizoma and *Niu Huang Jie Du* Tablets (NHJDT), respectively ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters of rhein and chrysophanol isomer ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Parameter	Rhein		Chrysophanol isomer	
	Rhei Radix et Rhizoma	NHJDT	Rhei Radix et Rhizoma	NHJDT
$c_{\max}/(\mu\text{g/L})$	$121 \pm 103^*$	$474 \pm 251^*$	$8\,757 \pm 5\,226$	$13\,467 \pm 8\,153$
t_{\max}/h	0.14 ± 0.08	0.11 ± 0.08	$0.47 \pm 0.22^*$	$0.25 \pm 0.16^*$
$t_{1/2}/\text{h}$	$5.2 \pm 1.9^*$	$6.9 \pm 3.5^*$	3.4 ± 0.86	4.0 ± 2.0
$\text{AUC}_{0-4}/(\mu\text{g} \cdot \text{h/L})$	$275 \pm 176^*$	$406 \pm 194^*$	$30\,879 \pm 9\,984$	$33\,342 \pm 15\,105$
$\text{AUC}_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{h/L})$	$329 \pm 198^*$	$590 \pm 353^*$	$32\,937 \pm 10\,248$	$37\,727 \pm 16\,442$
$\text{Vd}/(\text{L/kg})$	$3\,406 \pm 2\,607$	$5\,204 \pm 3\,340$	$15.4 \pm 5.7^*$	$43.3 \pm 24.6^*$
$\text{CL}/(\text{L} \cdot \text{kg/h})$	427 ± 260	566 ± 292	$3.1 \pm 0.72^*$	$7.8 \pm 3.0^*$

* $P < 0.05$

4 讨论

对大鼠血浆样本前处理方法及色谱条件进行了优化。比较了甲醇沉淀、6 mol/L HCl 酸化后甲醇沉淀、乙酸乙酯提取、6 mol/L HCl 酸化后乙酸乙酯提取 4 种前处理方法,结果显示血浆样本经甲醇沉淀提取效率高,重复性好。处理过程中加入 20% L-抗坏血酸溶液,防止蒽醌类成分在前处理操作中被氧化。另外,对色谱条件进行了优化,考察了使用甲醇或乙腈作为有机相、流动相中加入甲酸或甲酸铵及色谱柱种类对大黄 5 种成分保留时间、峰形及响应的影响,以达到增强分离效果、缩短分析时间及提高灵敏度的目的。最终确定了以 0.1% 甲酸铵水溶液-0.1% 甲酸铵甲醇溶液为流动相,Inertsil ODS-3 C_8 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm) 为最佳色谱条件。

大鼠给药后血浆中检测到保留时间约为 4.1 min 的色谱峰,其 $[\text{M} - \text{H}]^-$ 峰及二级质谱均与保留时间约为 5.8 min 的大黄酚完全一致,推测为大黄酚异构体,这与大鼠给药大黄附子汤后血浆中检测到大黄酚异构体的文献[10]相似。大黄酚异构体保留时间较短,因此其与大黄酚相比极性更

大,推测其可能结构如图 3 所示。研究中因大黄酚异构体对照品无法获得,故以大黄酚对照品替代计算相对浓度。

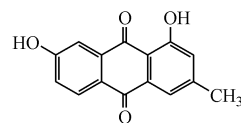


Figure 3 Chemical structure of chrysophanol isomer

大鼠给药后,血浆大黄素暴露量整体较低(图 2-C),这可能在很大程度上归因于大黄素在体内代谢成葡萄糖醛酸苷^[11],但其在血药浓度-时间曲线中仍呈现双峰现象,说明中药同系物成分多样,在体内的代谢与转化,还会相互影响特征成分的药代动力学行为。文献报道^[12],大鼠给予大黄附子汤后,芦荟大黄素的血药浓度-时间曲线呈现双峰现象,与本研究中大黄素的双峰现象,均由大黄酸在体内与大黄素及芦荟大黄素发生相互转化所致^[13]。

研究结果表明,大鼠灌胃单味大黄后,血浆中仅检测出大黄酸及大黄酚异构体 2 种成分;而牛黄解毒片全方给药后,血浆中检测出大黄酚异构体、大黄酸和较低浓度水平的大黄素 3 种成分。SPSS

独立样本 t 检验表明,牛黄解毒片给药后大鼠血浆中大黄酸的 c_{\max} 、AUC 及 $t_{1/2}$,大黄酚异构体的 Vd 及 CL 与单味大黄相比,显著增加,大黄酚异构体的 t_{\max} 显著下降。所以,复方配伍促进了大黄有效成分的吸收利用^[14-15],改变了大黄有效成分的药代动力学行为。

参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia; Part 1[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [2] Feng YL, Miao JW, Li J, et al. Safety evaluation of *Niu Huang Jiedu* tablet[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, **17**(39): 3221 – 3225.
- [3] Qiang SP, Zhang YJ, Sun J, et al. Arsenic speciation by HPLC-HG-AFS after oral administration of realgar and *Niu Huang Jiedu Pian* in Beagle dogs[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2013, **44**(2): 141 – 146.
- [4] Fu XS, Chen F, Liu XH, et al. Progress in research of chemical constituents and pharmacological actions of Rhubarb[J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2011, **20**(16): 1534 – 1538, 1568.
- [5] Hu LZ, Guo DY. Exploring the main physical and chemical parameters of rhubarb's impact on clotting time based on stepwise regression method[J]. *J Shaanxi Univ Sci Tech* (陕西科技大学学报), 2013, **31**(5): 156 – 163.
- [6] Yao AM, Huang JQ, Xu DX, et al. Quantitation of multiple constituents in *Zhi-Zi-Da-Huang* decoction by RP-HPLC and its application in the study of chemical components in herb compatibility[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2013, **44**(6): 531 – 535.
- [7] Ding L, Zou Y, Li ZY. The pharmacology and clinical application of rhubarb[J]. *Chin J Mod Drug Appl* (中国现代药物应用), 2011, (4): 165 – 166.
- [8] Wu WJ, Yan R, Yao MC, et al. Pharmacokinetics of anthraquinones in rat plasma after oral administration of a rhubarb extract[J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, **28**: 564 – 572.
- [9] Ye H, Wang Y, Wang L, et al. Rhein: a novel matrix for profiling and imaging of endogenous metabolites by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, **47**(6): 727 – 733.
- [10] Liu X, Wang XL, Wu L, et al. Investigation on the spectrum-effect relationships of *Da-Huang-Fu-Zi-Tang* in rats by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS method[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, **154**(3): 606 – 612.
- [11] Shia CS, Juang SH, Tsai SY, et al. Metabolism and pharmacokinetics of anthraquinones in *Rheum palmatum* in rats and *ex vivo* antioxidant activity[J]. *Planta Med*, 2009, **75**(13): 1386 – 1392.
- [12] Li H, Guo H, Li Wu L, et al. Comparative pharmacokinetics study of three anthraquinones in rat plasma after oral administration of Radix et Rhei Rhizoma extract and *Dahuang Fuzi Tang* by high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, **76**: 215 – 218.
- [13] Krumbiegel G, Schulz HU. Rhein and aloe-Emodin kinetics from senna laxatives in man[J]. *Pharmacology*, 1993, **47**(1): 120 – 124.
- [14] Xie H, Ma YM, Wang TM, et al. Pharmacokinetics of rhein in *Taohe Chengqi* Decoction and rhubarb in rabbits[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2005, **21**(2): 1 – 3.
- [15] Xin Y, Geng HC, Zhang S, et al. Pharmacokinetic study of Rhein from *Sanhuang Xiexin* Decoction and Radix et Rhizoma Rhei in rats[J]. *Chin J Exp Trad Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2009, **3**(15): 56 – 59.