

[制 剂]

黄连香薷饮中 4 种成分在大鼠血浆中的药动学行为

吴巧凤, 严云良, 鲁银均
(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘要: **目的** 考察黄连香薷饮中 4 种成分在大鼠血浆中的药动学行为。**方法** 大鼠灌胃给予该药物稀释液 (9 g/kg) 后取血, HPLC 法测定血药浓度, 3p97 软件计算药动学参数。**结果** 盐酸小檗碱、芹菜素、和厚朴酚、厚朴酚的血药浓度-时间曲线均符合开放性一室模型, 其 T_{peak} 分别为 (1.436 5 ± 0.311 9)、(2.049 5 ± 0.705 5)、(1.359 0 ± 0.343 4)、(1.195 9 ± 0.334 6) h, AUC 分别为 (1.477 8 ± 0.484 0)、(1.063 0 ± 0.452 1)、(0.863 5 ± 0.269 7)、(7.010 5 ± 2.584 7) μg/(mL · h), C_{max} 分别为 (0.245 9 ± 0.019 4)、(0.129 6 ± 0.016 7)、(0.180 9 ± 0.021 3)、(0.966 7 ± 0.042 0) μg/mL。**结论** 与黄连香薷饮中其他 3 种成分比较, 厚朴酚体内吸收更好, 生物利用度更高。
关键词: 黄连香薷饮; 盐酸小檗碱; 芹菜素; 和厚朴酚; 厚朴酚; 药动学行为; 血浆; HPLC
中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)06-1278-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.06.010

Pharmacokinetic behaviors of four constituents in Huanglian Xiangru Decoction in rat plasma

WU Qiao-feng, YAN Yun-liang, LU Yin-jun
(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the pharmacokinetic behaviors of four constituents in Huanglian Xiangru Decoction in rat plasma. **METHODS** The rats intragastrically administered with diluted drug (9 g/kg) had their blood collected for the determination of plasma concentration by HPLC, after which pharmacokinetic parameters were calculated by 3p97 software. **RESULTS** The plasma concentration-time curves for berberine hydrochloride, apigenin, honokiol, magnolol accorded with open one compartment model, with the T_{peak} values of (1.436 5 ± 0.311 9), (2.049 5 ± 0.705 5), (1.359 0 ± 0.343 4), (1.195 9 ± 0.334 6) h, AUC values of (1.477 8 ± 0.484 0), (1.063 0 ± 0.452 1), (0.863 5 ± 0.269 7), (7.010 5 ± 2.584 7) μg/(mL · h), C_{max} values of (0.245 9 ± 0.019 4), (0.129 6 ± 0.016 7), (0.180 9 ± 0.021 3), (0.966 7 ± 0.042 0) μg/mL, respectively. **CONCLUSION** Compared with the other three constituents in Huanglian Xiangru Decoction, magnolol demonstrates better *in vivo* absorption and higher bioavailability.
KEY WORDS: Huanglian Xiangru Decoction; berberine hydrochloride; apigenin; honokiol; magnolol; pharmacokinetic behaviors; plasma; HPLC

黄连香薷饮源自《类证活人书》,由香薷、黄连、厚朴 3 味药组成^[1],临床常用于治疗时疫感冒、暑湿感冒等症^[2],具有抗病毒、解热、抗炎、镇痛等药理作用^[3]。课题组前期研究发现,黄连香薷饮具有显著的抗甲型 H₁N₁ 流感病毒作用,可

通过调节机体免疫功能、提高机体抗氧化能力、调控宿主 TLRs 信号通路多个环节的基因与蛋白表达等机制发挥抗流感作用^[4],其主要活性成分为盐酸小檗碱、芹菜素、和厚朴酚、厚朴酚等^[2-3]。目前,尚无其体内药效成分及代谢方面的研究,现有

收稿日期: 2017-10-12
基金项目: 国家自然科学基金 (81473335/H2803, 81274030/H2803); 浙江省自然科学基金 (LY15H290003/Y18H280023); 浙江省重中之重一级学科“中医学”建设-浙江中医药大学开放基金 (Yao2016015)
作者简介: 吴巧凤 (1963—), 女, 教授, 博士生导师, 从事天然药物活性成分研究。Tel: (0571) 61768165, E-mail: wqfyjm@sina.com

文献仅报道了盐酸小檗碱、芹菜素、和厚朴酚、厚朴酚在单味药、药对或复方中的含有量测定及药代动力学特征^[4-6]，未见四者同时测定及在大鼠体内药动学行为的报道。

中药药代动力学从中药活性成分被机体有效利用的角度出发，着重研究药物体内代谢规律，解决其临床有效性和安全性问题，而血药浓度为药代动力学主要研究方法，通过测定药物在体内不同时间点的血药浓度，结合数学模型分析，从而获得其体内代谢规律^[7-8]。本实验在前期研究基础上，根据中药复方多成分、多功效的作用特点，建立 HPLC 法同时测定黄连香薷饮含药血浆中盐酸小檗碱、芹菜素、和厚朴酚、厚朴酚的含有量，并研究其血药浓度在大鼠体内的药动学特征，进一步阐明其体内代谢过程，为指导该方临床合理用药、保证有效性和安全性提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪（配置 G1315D 二级管阵列检测器、G1311C 四元泵、G1316 柱温箱、ChemStation 色谱工作站，美国 Agilent 公司）；AB135-S 电子分析天平（梅特勒-托利多仪器有限公司）；Synergy 超纯水系统（美国 Millipore 公司）。

1.2 动物 清洁级雄性 SD 健康大鼠，体质量（200 ± 20）g，动物使用许可证号 SYXK（浙）2013-0184，由浙江中医药大学实验动物中心提供。严格按照相关要求饲喂营养颗粒饲料，自由饮水，温度（22 ± 2）℃，相对湿度 50% ~ 60%。

1.3 试药 黄连香薷饮由浙江中医药大学药学院制剂室提供（批号 20140127，生药量 1 g/mL，盐酸小檗碱、芹菜素、和厚朴酚、厚朴酚含有量分别为 0.566、0.015、0.048、0.024 mg/mL），-20℃保存，临用前以蒸馏水配制成所需灌胃浓度。盐酸小檗碱（批号 110713-200208）、芹菜素（批号 111901-201102）、和厚朴酚（批号 11070-201112）、厚朴酚（批号 110729-201513）对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯；水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取干燥至恒重的对照品盐酸小檗碱 1.08 mg、芹菜素 0.99 mg、和厚朴酚 1.40 mg、厚朴酚 1.07 mg，置于 5 mL 量瓶中，甲醇定容，即得盐酸小檗碱（216.0 μg/mL）、芹

菜素（198.0 μg/mL）、和厚朴酚（280.0 μg/mL）、厚朴酚（214.0 μg/mL）对照品溶液。分别精密吸取 500 μL 置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，即得含盐酸小檗碱（10.80 μg/mL）、芹菜素（9.90 μg/mL）、和厚朴酚（14.00 μg/mL）、厚朴酚（10.70 μg/mL）的混合对照品母液，稀释后，得溶液 I、II、III、IV、V、VI（表 1），置于 4℃冰箱中备用。

表 1 对照品溶液质量浓度（μg/mL）
Tab. 1 Solution concentrations of reference substances（μg/mL）

对照品溶液	盐酸小檗碱	芹菜素	和厚朴酚	厚朴酚
I	2.160	1.980	2.800	2.140
II	1.080	0.990	1.400	1.070
III	0.086 4	0.079 2	0.112 0	0.085 6
IV	0.043 2	0.039 6	0.056 0	0.042 8
V	0.021 6	0.019 8	0.028 0	0.021 4
VI	0.010 8	0.009 9	0.014 0	0.010 7

2.1.2 血浆供试品溶液 精密吸取空白、含药血浆各 200 μL，置于 Eppendorf 管中，加入 500 μL 3 mol/L HClO₄ 除蛋白，涡旋 30 s，70℃水浴加热 30 min，冷却，加乙醚 2 mL 萃取，4 000 r/min 离心 15 min，乙醚层全部转移至干净的 Eppendorf 管中，于 40℃水浴氮气流下吹干乙醚后，残渣用 100 μL 甲醇复溶，即得。

2.1.3 质控样品（QC）供试品溶液 吸取适量对照品溶液于具塞离心管中，挥干甲醇后加入 200 μL 空白血浆，其余操作同“2.1.2”项，即得高、中、低 3 个质量浓度的溶液（盐酸小檗碱 1.96、1.08、0.021 6 μg/mL，芹菜素 1.72、0.99、0.019 8 μg/mL，和厚朴酚 2.56、1.40、0.028 0 μg/mL，厚朴酚 1.91、1.07、0.021 4 μg/mL）。

2.2 含有量测定

2.2.1 色谱条件 Agilent Eclipse SDB-C₁₈ 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；以乙腈（A）-0.05% 磷酸水（每 100 mL 水中含 0.02 mmol KH₂PO₄，三乙胺调 pH 至 4，B）为流动相，梯度洗脱（0 ~ 16 min，15% → 16% A；16 ~ 26 min，16% → 22% A；26 ~ 37 min，22% → 27% A；37 ~ 57 min，27% → 63% A；57 ~ 75 min，63% → 95% A）；体积流量 0.6 mL/min；检测波长 294 nm；柱温 30℃；进样量 20 μL。

2.2.2 方法学考察

2.2.2.1 专属性试验 取空白血浆供试品、QC 供试品（低质量浓度）、含药血浆供试品溶液适量，在“2.2.1”项色谱条件下进样，结果见图 1。由

图可知,各成分峰形及分离度均较好,出峰时间稳定,不受内源性物质、代谢产物、其他杂质成分的干扰。

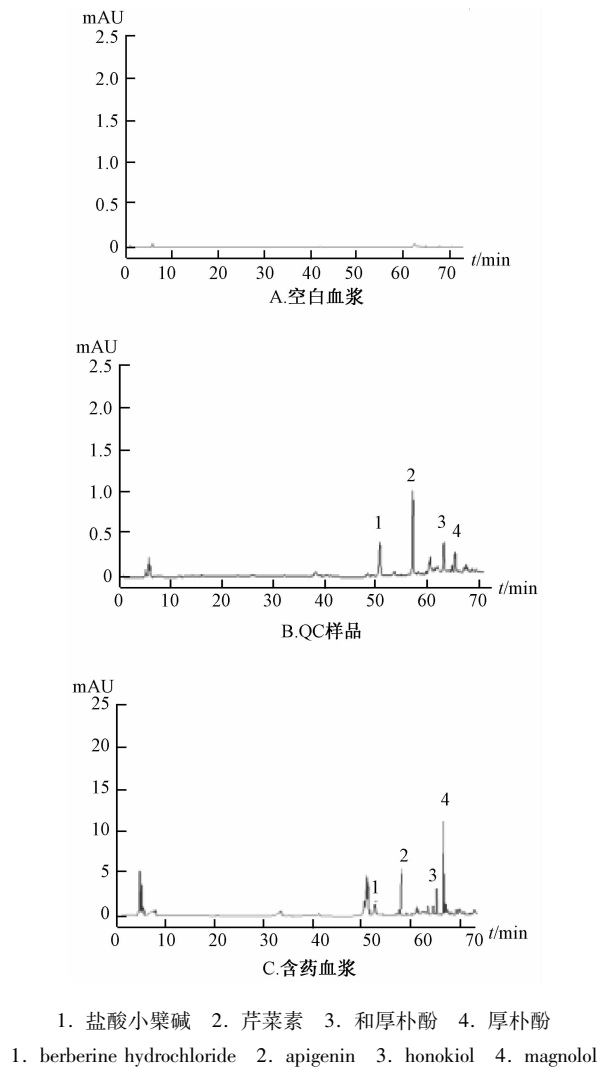


图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.2.2.2 线性关系考察 精密吸取系列对照品溶液Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ各100 μL,置于6个5 mL离心管中,挥干溶剂,加入空白血浆200 μL,

按“2.1.3”项下方法制备QC供试品溶液,平行3次,在“2.2.1”项色谱条件下进样。以各成分质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,再以信噪比S/N=3为检测限,S/N=10为定量限,结果见表2,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.2.2.3 精密度与准确度试验 根据“2.2.2.2”项下线性范围与《化学药物非临床药代动力学研究技术指导原则》,依法制备高、中、低3种质量浓度的QC供试品溶液,平行5份,在“2.2.1”项色谱条件下连续进样测定5 d,测得4种成分的日内、日间精密度RSD均小于15%,而且各高、中质量浓度样品的准确度均在85%~115%之间,低质量浓度均在80%~120%之间。

2.2.2.4 回收率与介质效应 取高、中、低3个质量浓度的QC样品,平行5份,按“2.1.2”项下方法操作,在“2.2.1”项色谱条件下进样分析,得到4种成分的质量浓度A₁;取空白血浆,按“2.1.2”项下方法操作,蛋白沉淀后,上清液中加入相同质量浓度的混合对照品溶液,同法操作,得到A₂;取上述相同质量浓度的混合对照品溶液,按“2.1.2”项下方法操作,进样分析,得到A₃,按A₁/A₂比例考察提取回收率,A₂/A₃比例考察介质效应。结果,4种成分高、中质量浓度供试品溶液的提取回收率和介质效应均在85%~115%之间,低质量浓度均在80%~120%之间,RSD均小于12%。

2.2.2.5 稳定性试验 按“2.1”项下方法制备高、中、低质量浓度的QC供试品溶液,平行3份,考察室温下8 h、反复冻融、-20℃下15 d的稳定性,测得其RSD均小于15%,而且高、中质量浓度QC供试品溶液的准确度均在85%~115%之间,低质量浓度均在80%~120%之间,表明其稳定性良好。

表2 各成分线性关系					
Tab. 2 Linear relationships of various constituents					
成分	回归方程	R ²	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	检测限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
盐酸小檗碱	Y=372.11X+4.640	0.999 8	0.010 8~2.16	0.002 15	0.007 16
芹菜素	Y=1 087.5X+15.699	0.999 8	0.009 9~1.98	0.001 75	0.005 83
和厚朴酚	Y=436.18X-2.076	0.999 7	0.014 0~2.80	0.002 24	0.007 46
厚朴酚	Y=349.11X+3.994	0.999 8	0.010 7~2.14	0.003 17	0.008 90

2.3 药代动力学研究 取大鼠5只,禁食12 h,蒸馏水稀释黄连香薷饮后按9 g/kg给药剂量灌胃给药,于15、30、45、60、90、120、150、180、240、360、480、720 min眼眶取血0.5 mL,置于肝素化试管中,摇匀后静置30 min,4℃离心15 min(4 000 r/min),取上层血浆,-20℃保存。

HPLC 法测定各成分不同时间点的血药浓度；3p97 学处理，所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果见表 3 和软件处理相应数据，计算 PK 参数，拟合药-时曲线 图 2。进行房室模型判别；SPSS 17.0 软件进行统计

表 3 各成分药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab. 3 Pharmacokinetic parameters for various constituents ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数	单位	各成分			
		盐酸小檗碱	芹菜素	和厚朴酚	厚朴酚
A	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$0.497\ 7 \pm 0.239\ 3$	$0.343\ 0 \pm 0.175\ 1$	$0.402\ 5 \pm 0.094\ 7$	$1.413\ 2 \pm 0.410\ 0$
K_a	h^{-1}	$1.544\ 7 \pm 0.439\ 3$	$1.113\ 2 \pm 0.630\ 0$	$1.439\ 1 \pm 0.442\ 1$	$2.556\ 9 \pm 1.082\ 0$
K_e	h^{-1}	$0.277\ 7 \pm 0.143\ 7$	$0.233\ 9 \pm 0.098\ 1$	$0.367\ 8 \pm 0.140\ 6$	$0.199\ 8 \pm 0.091\ 8$
T_{lag}	h	$0.090\ 6 \pm 0.068\ 9$	$0.199\ 3 \pm 0.059\ 2$	$0.173\ 8 \pm 0.053\ 1$	$0.075\ 8 \pm 0.092\ 2$
$t_{1/2}k_a$	h	$0.480\ 8 \pm 0.142\ 7$	$0.841\ 3 \pm 0.524\ 5$	$0.510\ 4 \pm 0.118\ 6$	$0.321\ 5 \pm 0.157\ 7$
$t_{1/2}k_e$	h	$2.917\ 6 \pm 1.086\ 7$	$3.921\ 3 \pm 3.009\ 5$	$2.115\ 8 \pm 0.781\ 6$	$4.034\ 4 \pm 1.615\ 0$
T_{peak}	h	$1.436\ 5 \pm 0.311\ 9$	$2.049\ 5 \pm 0.705\ 5$	$1.359\ 0 \pm 0.343\ 4$	$1.195\ 9 \pm 0.334\ 6$
C_{max}	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$0.245\ 9 \pm 0.019\ 4$	$0.129\ 6 \pm 0.016\ 7$	$0.180\ 9 \pm 0.021\ 3$	$0.966\ 7 \pm 0.042\ 0$
AUC	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$	$1.477\ 8 \pm 0.484\ 0$	$1.063\ 0 \pm 0.452\ 1$	$0.863\ 5 \pm 0.269\ 7$	$7.010\ 5 \pm 2.584\ 7$

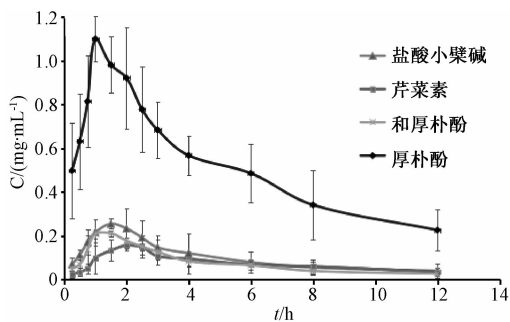


图 2 各成分血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Plasma concentration-time curves for various constituents

由此可知，大鼠灌胃黄连香薷饮后，盐酸小檗碱、芹菜素、和厚朴酚、厚朴酚在血浆中的体内代谢均符合开放性一室模型，其血药浓度变化特征为先快速增加，后缓慢下降。各成分达峰时间 (T_{peak})、吸收半衰期 ($t_{1/2}k_a$)、吸收速率常数 (k_a) 表明其在体内吸收均较快，以厚朴酚更明显；厚朴酚曲线下面积 (AUC)、药峰浓度 (C_{max}) 明显大于其他三者，在大鼠体内入血总量明显更高；各成分滞后时间 (T_{lag}) 较短，分别为 0.090 6、0.199 3、0.173 8、0.075 8 h，表明均可快速入血，并主要分布于血液中，以芹菜素更明显；根据消除半衰期 ($t_{1/2}k_e$) 和消除速率常数 (k_e)，各成分体内消除速度依次为和厚朴酚 > 盐酸小檗碱 > 芹菜素 > 厚朴酚。

3 讨论

中药复方体内代谢、吸收等药动学过程的未知性^[9]为中药开发难点之一，从中医整体观念出发来揭示中药复方药效成分的内在规律，已成为突破

该难点的新思路^[9-11]。据报道，小檗碱^[12]、厚朴总酚^[13]、芹菜素^[14]均具有抑制流感作用，故开展黄连香薷饮中盐酸小檗碱、芹菜素、和厚朴酚及厚朴酚的药动学研究与中医整体观念相符。

本实验显示，黄连香薷饮中盐酸小檗碱含有量明显高于厚朴酚，而大鼠血浆中厚朴酚的 AUC 及 C_{max} 最高，盐酸小檗碱相对较低，表明厚朴酚体内吸收较好^[4]，而盐酸小檗碱^[15-16]可能由于吸收较差、代谢范围较广，在口服剂量下的血药浓度低于厚朴酚。比较黄连香薷饮与黄连单味给药^[16]后血浆中盐酸小檗碱的药动学参数发现，两者均为一室模型， C_{max} 、 $t_{1/2}k_e$ 均相对较小，但黄连香薷饮明显高于黄连单味给药，表明虽然盐酸小檗碱体内吸收较差，但复方配伍后在一定程度上可促进其吸收，并延长在体时间^[17]。与厚朴单味给药的二室开放模型^[18]不同，黄连香薷饮给药后厚朴酚、和厚朴酚均为开放性一室模型，表明配伍后两者均可迅速达到体内分布平衡^[19]，而且前者更高，与文献报道相符^[18,20]，同时后者吸收较差，可能是受到复方中其余成分的影响^[20]导致其生物利用度降低，具体原因有待进一步研究。由药-时曲线、滞后时间 (T_{lag}) 及药动学参数可知，芹菜素在体内的滞后时间和达峰时间最长，消除半衰期也相对较长，与单一芹菜素^[21-22]明显不同，该成分来自黄连香薷饮中的君药香薷，进一步说明中药配伍的合理性和重要性。

中药复方中的单一成分并不能准确表征其代谢及药效作用规律，其中多成分、多途径及各成分之间的协同配伍作用将直接影响药物吸收代谢。因

此，应综合开展黄连香薷饮多成分药代动力学及药效学研究，这可更好地揭示复方内在作用规律，为其临床合理配伍用药提供科学依据。

参考文献：

[1] 胡惠兰, 王姿媛. 古方黄连香薷饮有效部位不同配比的药效研究[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(1): 72-75.

[2] 吴巧凤, 宓嘉琪, 吴新新, 等. 黄连香薷饮抗流感病毒作用的拆方研究[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(9): 2057-2059.

[3] Wu Q F, Zhu W R, Yan Y L, *et al.* Anti-H₁N₁ influenza effects and its possible mechanism of Huanglian Xiangru Decoc-tion[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 185: 282-288.

[4] 马莎莎, 邵玉凤, 吴祥猛, 等. LC-MS/MS 法研究厚朴酚与和厚朴酚在大鼠体内的药动学行为[J]. 质谱学报, 2013, 34(1): 23-28, 34.

[5] 解海, 郑艳超, 杨艳云, 等. 黄连、吴茱萸药对中盐酸小檗碱在急性胃溃疡模型大鼠体内的药代动力学研究[J]. 四川医学, 2013, 34(5): 589-591.

[6] 李海龙, 尹航, 文琪, 等. LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中芹黄春浓度及其在药代动力学研究中的应用[J]. 海南医学, 2016, 27(13): 2065-2069.

[7] 顾俊菲, 封亮, 张明华, 等. 中药组分结构特征对多成分/组分药代动力学影响的新探索[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(14): 2782-2786.

[8] Shen J L, Man K M, Huang P H, *et al.* Honokiol and magnolol as multifunctional antioxidative molecules for dermatologic disorders[J]. *Molecules*, 2010, 15(9): 6452-6465.

[9] 张忠亮, 李强, 杜思邈, 等. PK-PD 结合模型的研究现状及其应用于中医药领域面临的挑战[J]. 中草药, 2013, 44(2): 121-127.

[10] 王元清, 严建业, 师白梅, 等. 中药复方药效物质基础研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(5): 99-102.

[11] 郭倩, 田成旺, 任涛, 等. 中药药效物质基础研究进展[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2015, 17(3): 648-654.

[12] 吴莹, 李季倩, 孟建, 等. 小檗碱抗流感病毒性肺炎小鼠肺组织炎症损伤的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(9): 40-43.

[13] Wu X N, Yu C H, Cai W, *et al.* Protective effect of a polyphenolic rich extract from *Magnolia officinalis* bark on influenza virus-induced pneumonia in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(1): 191-194.

[14] 胡凤杨, 陆春妮, 汤有志. 取代基对黄酮类化合物流感病毒神经氨酸酶抑制活性的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(2): 144-147.

[15] 张丹, 韩静, 王晓琳, 等. LC-MS/MS 法测定人血浆中小檗碱的浓度及其药动学研究 (英文) [J]. 中国新药与临床杂志, 2013, 32(2): 123-129.

[16] 王静, 袁子民, 张朔, 等. 黄连提取物中盐酸小檗碱在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(19): 2284-2286.

[17] 孟斌, 张振秋. 黄连与厚朴配伍对盐酸小檗碱在大鼠体内药动学的影响[J]. 中成药, 2009, 31(6): 943-945.

[18] 王丹, 冯芳. 厚朴酚与和厚朴酚的体内药物分析方法及药代动力学研究近况[J]. 药学进展, 2011, 35(9): 396-400.

[19] 王雪. PK/PD 建模新方法—分形模型、分数阶模型与随机模型[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.

[20] 陈钰玲, 王淑萍, 王磊, 等. 胃肠安丸中主要成分厚朴酚及和厚朴酚的药代动力学研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(9): 1732-1738.

[21] 张宇, 常佩亮, 夏薇, 等. 反高效液相色谱法研究芹菜素在大鼠体内的药代动力学及组织分布[J]. 中华疾病控制杂志, 2009, 13(1): 79-82.

[22] 汤小斌, 龙恩武. 紫花地丁中芹菜素在大鼠体内的药动学研究[J]. 四川医学, 2014, 35(7): 785-787.