

温里药配伍提高赤芍效应成分芍药苷生物利用度的研究

杨祖贻¹ 裴瑾² 刘荣敏¹ 程佳¹ 万德光² 胡荣²

摘要 目的 研究温里药配伍对活血药赤芍效应成分芍药苷生物利用度的影响,探讨活血温里复方的药物配伍机理。**方法** 将温里药胡椒、吴茱萸、肉桂、小茴香、花椒分别与活血药赤芍配伍后灌胃小鼠,采用反相高效液相色谱法(reversed phase high-performance liquid chromatography, RP-HPLC)测定各复方在小鼠血浆中芍药苷血药浓度,以单用赤芍为对照,计算各配伍复方的相对生物利用度。**结果** 芍药苷在小鼠体内的药动学过程符合一室模型,温里药胡椒、吴茱萸、肉桂、小茴香、花椒分别与活血药赤芍配伍后,芍药苷相对生物利用度分别为 137.22%、123.62%、108.39%、226.02% 和 116.73%。各实验组与对照组峰浓度(C_{max})、血浆药物浓度-时间曲线下面积($AUC_{0-\infty}$)存在差异($P < 0.05$),而达峰时间(t_{max})无差异($P > 0.05$)。**结论** 温里药胡椒、肉桂、小茴香、吴茱萸、花椒分别与活血药赤芍配伍,能提高赤芍主要效应成分芍药苷的生物利用度,从复方效应成分药代动力学的角度揭示了活血温里复方配伍的科学内涵。

关键词 温里药;赤芍;芍药苷;相对生物利用度;反相高效液相色谱法

Study on Enhancing Bioavailability of Paeoniflorin by Combined Use with Chinese Herbs for Inner-Warming
YANG Zu-yi, PEI Jin, LIU Rong-min, et al *Sichuan Cancer Institute, Chengdu (610041)*

Abstract Objective To study the influence of Chinese herbs for inner-warming on the bioavailability of paeoniflorin (PF) and its mechanism. **Methods** Chinese herbs (pepper fruit, evodia fruit, cassia bark, fennel fruit and prickly-ash peel) were separately used in combination with PF for gastrogavage to mice. Reversed phase high-performance liquid chromatography was used to determine the plasma concentration of PF in mice after medication. The bioavailability of PF was calculated and compared, taking single use of red peony root for control. **Results** The pharmacokinetics of PF in mice was conformed to the one-compartment model, as combined use with Chinese herbs for inner-warming, the relative bioavailability of PF was 137.22% for pepper fruit, 123.62% for evodia fruit, 108.39% for cassia bark, 226.02% for fennel fruit and 116.73% for prickly-ash peel, there were difference of C_{max} and $AUC_{0-\infty}$ in comparison of these data with the control group ($P < 0.05$), but with no difference of t_{max} ($P > 0.05$). **Conclusion** The Chinese herbs used in this experiment in combination with red peony root could enhance the bioavailability of PF, which illustrated the scientific meaning of the recipe combination of Chinese herbs for activating blood circulation and inner-warming viewing from pharmacodynamics.

Key words Chinese herbs for inner-warming; red peony root; paeoniflorin; relative bioavailability; reversed phase high-performance liquid chromatography

赤芍是临床常用的活血化瘀药,芍药苷(paeoniflorin)是赤芍的主要有效成分之一,国内外研究发现芍药苷具有抗血栓形成、抗血小板凝集、抗凝血、激活纤溶、降血脂、改善高黏血症等药理作用。对芍药苷的体内代谢和药代动力学研究表明,芍药苷的胃肠吸收

很差,生物利用度低^[1,2]。临床使用活血温里复方即活血化瘀药与温里药配伍后温里药可提高活血药疗效,说明在活血温里复方中,温里药对活血药具有增效作用,其增效机理尚不清楚。本课题在前期研究中已建立了适用于多种温里药分别与活血药赤芍配伍后小鼠血浆中芍药苷浓度的反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分析方法,并发现一类温里药与活血药赤芍配伍后,在不同程度上提高了芍药苷血药浓度^[3]。为深入探讨活血温里复方药物配伍内涵,本研究进一步考察了温里药配伍对活血药赤芍效应成分芍药苷生物利

基金项目:国家中医药管理局科研基金(No. 02-03ZP50),四川省中医药管理局科研基金(No. 200217)资助

作者单位:1. 四川省肿瘤研究所(成都 610014);2. 成都中医药大学

通讯作者:杨祖贻, Tel: 028 - 85420351, E-mail: chianghm@163.

com

用度的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 HPLC 系统(包括 DAD 二极管阵列检测器、1100 数据工作站,美国安捷伦)。

1.2 药品和试剂 芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号 0736-200219)。赤芍、胡椒、肉桂、小茴香、吴茱萸、花椒药材购自四川省中药材公司,经成都中医药大学万德光教授鉴定。各复方制剂均为赤芍提取物分别与以上 5 味温里药提取物按 7:3 的比例混合用蒸馏水配制,各复方制剂中芍药苷浓度均为 49 mg/ml。复方制剂由四川省肿瘤研究所制备。所用甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为重蒸水。

1.3 动物 昆明种小鼠,雌雄各半,体重 22 g,由四川省中药研究所实验动物中心提供。

2 方法

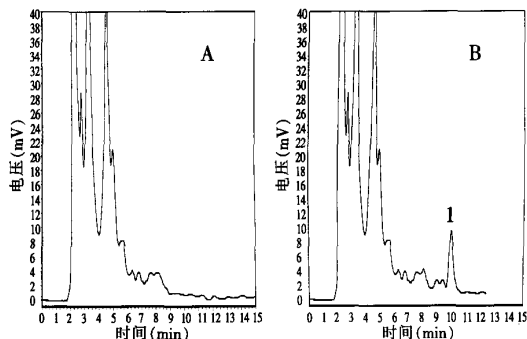
2.1 给药方案及样品采集 将小鼠随机分为空白对照组、对照组和实验组(I~V),每组 10 只。空腹 14 h 后,根据小鼠体重按芍药苷 490 mg/kg 剂量灌胃:空白对照组予水、对照组予赤芍提取物、实验组(I~V)分别予赤芍胡椒复方、赤芍肉桂复方、赤芍小茴香复方、赤芍吴茱萸复方、赤芍花椒复方灌胃。灌胃后分别于 30、60、90、120、150、180 min 不同时间点眼眶取静脉血 0.5 ml,用肝素血液抗凝,离心取上清获得血浆,按血样预处理方法处理后进样测定。

2.2 血浆样品处理 用微量加样器取 100 μ l 血浆,置于 0.5 ml 高速离心管中,加入 3 倍体积的乙醇,电动混匀器充分混匀后经 10 000 r/min 离心 20 min 取上清液置于 0.5 ml 试管中,置于 37℃ 水浴,挥干,用 50 μ l 甲醇重溶,再次 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液置微量进样管中。

2.3 体内分析方法的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈ (250.0 mm×4.6 mm, 7 μ m);流动相:甲醇:水(38:62);流速:0.5 ml/min;检测波长:230 nm;柱温:25℃;灵敏度:AUF=0.01;进样量:10 μ l。

2.3.2 方法专属性考察 在上述色谱条件下,分别测定芍药苷对照品,赤芍提取物,空白对照组、对照组、各实验组血浆中的芍药苷浓度。可见芍药苷与血浆中蛋白杂峰、内源性物质、芍药提取物的其他成分以及这些成分的体内代谢物和结合性成分均能很好的分离。通过二维、三维色谱图对其吸收峰定性,其保留时间均与对照品一致(图 1)。



注:A:空白对照组血浆;B:实验组血浆;1为芍药苷

图 1 小鼠血浆中芍药苷的 HPLC 图谱

2.3.3 芍药苷线性范围及检测限 配制 0.50 mg/ml 的芍药苷对照品溶液,分别取 1、5、10、50 μ l,室温下分别加入空白血浆 50 μ l,再加入甲醇定容 100 μ l,按色谱条件下操作测定($n=5$),以芍药苷峰面积与对应进样量进行直线回归,得此条件下芍药苷的回归方程为 $y=0.0004037A-0.001098$, $r=0.9999$ 。结果表明血浆中芍药苷在 5.0~250.0 ng/ μ l 范围内线性关系良好。以信噪比(S/N)为 3 时的芍药苷标准品浓度为 0.050 mg/ml 的芍药苷标准液 0.5、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μ l 分别加入到 50 μ l 空白血浆中,按血样预处理方法处理后进样分析。结果本方法的检测限为 1.49 ng/ μ l。

2.3.4 精密度试验 对照品溶液在 1 天内连续进样、测定 5 次,其峰面积日内 RSD 为 1.02%;同法测定对照组、实验组 1 血浆样品,其峰面积 RSD 分别为 2.36%、3.13%;另连续测定 5 天,对照品溶液、对照组、实验组 1 血浆样品峰面积日间 RSD 分别为 3.05%、4.66%、4.21%。结果表明该方法精密度较好,符合体内药物浓度测定的要求。

2.3.5 萃取回收率试验 精密量取芍药苷对照品溶液 5、10、20、40 μ l,室温下分别加入空白血浆 50 μ l,再加入甲醇定容,制成一定浓度的芍药苷血浆标准液,摇匀后按血样预处理方法处理、测定。测定结果可见,4 种浓度的平均回收率 > 90%,RSD 分别为 4.78%、7.78%、9.23% 和 7.61%,各浓度回收率符合体内药物浓度测定的要求。

2.4 芍药苷血药浓度测定 取已制备好的血浆样品,按上述色谱条件测定,由标准曲线计算出芍药苷的平均血药浓度。

2.5 药物动力学参数计算方法 根据所获得的血药浓度-时间数据,用 3P87 药动学程序计算药代动力学参数。

表 1 各组药动力学参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ke(min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	C _{max} (ng/μl)	t _{max} (min)	AUC _{0-∞} (ng·min·μl ⁻¹)
赤芍	10	0.0172±0.0025	40.19±4.58	41.56±3.82	56.17±5.32	4810.37±26.45
赤芍胡椒复方	10	0.0178±0.0036	38.92±5.02	88.98±5.98**	43.68±4.75	6600.74±106.08*
赤芍吴茱萸复方	10	0.0160±0.0029	43.12±3.86	69.14±6.03**	46.86±3.20	5946.36±53.45*
赤芍肉桂复方	10	0.0176±0.0037	39.43±5.26	58.86±6.27**	49.25±5.21	5214.02±65.60*
赤芍小茴香复方	10	0.0202±0.0040	34.28±4.21	119.89±3.33**	56.72±5.04	10872.19±73.08*
赤芍花椒复方	10	0.0156±0.0028	44.48±5.11	64.84±4.57**	46.45±6.12	5615.09±86.32*

注:与赤芍组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

结 果

1 体内药动学试验结果 3P87 程序进行房室模型曲线拟合,结合 AIC 进行判断,单剂量灌胃各赤芍温里复方体内过程符合一室模型。计算出相应的药动学参数,赤芍与温里药配伍各复方组与单用赤芍对照组比较,峰浓度(C_{max})、血浆药物浓度—时间曲线下面积(AUC_{0-∞})差异有显著性($P<0.01$, $P<0.05$),肾排泄率常数(Ke)、半衰期(t_{1/2})、达峰时间(t_{max})比较差异无显著性。见表 1。

2 相对生物利用度 由小鼠血浆芍药苷药时曲线下面积 AUC_{0-∞}计算赤芍与温里药配伍各复方与单用赤芍对照组的相对生物利用度,得出赤芍胡椒复方的平均相对生物利用度为 137.22%,赤芍吴茱萸复方为 123.62%、赤芍肉桂复方为 108.39%、赤芍小茴香复方为 226.02%、赤芍花椒复方为 116.73%。

讨 论

对芍药苷的体内代谢和药代动力学研究表明:芍药在口服使用时其主要有效成分芍药苷的胃肠吸收很差,大鼠灌胃 550 mg/kg 芍药苷后,24 h 后粪尿的累积排泄量分别占给药量的 10.6% 和 1.08%。静脉注射 55 mg/kg 芍药苷后,7 h 内胆汁累积排泄量占 8.64%。兔灌胃芍药苷后,C_{max} 为 21.6 mg/L。狗静脉注射 11.25 mg/kg 芍药苷后,芍药苷迅速出现在尿中,前 20 min 和 7 h 内,累积排泄量分别为给药量的 36.85%、79.30%。7 h 内胆汁排泄量占静脉注射量的 3.77%。实验表明芍药苷胃肠吸收差,在体内主要以原形从肾脏排泄,粪、胆汁排泄最少。在狗和兔体内,芍药苷血药浓度—时间曲线均符合二室开放模型,分布广泛,消除快,灌胃给药,在兔体内利用度低^[1,2]。

在本研究中,经用温里药与赤芍配伍后灌胃小鼠,测定小鼠血浆中芍药苷的血药浓度,根据所获得的血

药浓度—时间数据,进行房室模型曲线拟合,单剂量灌胃各赤芍温里复方体内过程符合一室模型,计算出相应的药动学参数并进行统计分析。结果表明,C_{max} 实验组与对照组比较最大血药浓度差异有显著性,温里药能明显提高活血药赤芍效应成分芍药苷的血药浓度($P<0.01$);t_{max}即达到最大血药浓度的时间比较差异无显著性($P>0.05$);AUC_{0-∞}实验组与对照组比较差异有显著性($P<0.05$);各实验组平均相对生物利用度分别为 137.22%、123.62%、108.39%、226.02% 和 116.73%。综上所述,温里药胡椒、肉桂、小茴香、吴茱萸、花椒分别与活血药赤芍配伍,能提高赤芍主要效应成分芍药苷的生物利用度。本研究从复方效应成分药代动力学的角度揭示了活血温里复方配伍的科学内涵。

参 考 文 献

1 王浴生,邓文龙主编.中药药理与应用.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1998:528—534.
Wang YS,Deng WL, editors. Pharmacology and applications of Chinese materia medica. 2 th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998:528—534.
2 黄泰康主编.常用中药成分与药理手册.北京:中国医药科技出版社,1994:1002—1016.
Huang TK, editor. Handbook of composition and pharmacology of commonly-used traditional Chinese medicine. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Sciences and Medicine Technology Publishing House, 1994:1002—1016.
3 杨祖贻,裴 瑾,刘荣敏,等.温里药配伍对口服赤芍小鼠血浆中芍药苷血药浓度的影响.中草药 2005;36(2):195—198.
Yang ZY, Pei J, Liu RM, et al. Effect of compatibility with warming-inside drugs on paeoniflorin in mouse plasma. Chin Tradit Herbal Drugs 2005;36(2):195—198.

(收稿:2004-08-25 修回:2005-06-12)