

· 中药转化医学研究 ·

# 大黄用于抗氧化的日服用次数研究

吕俊兰 袁海龙 靳世英 付珊珊 肖小河

**【摘要】 目的** 采用大黄含药血清体外抗氧化效应动力学结合大黄蒽醌类成分的整合药代动力学的方法研究大黄的日服用次数。**方法** 将 24 只大鼠随机分为 3 组, 每组 8 只, 每天分别灌服大黄提取物 3.6 g/kg, 1 次/天、1.8 g/kg, 2 次/天和 1.2 g/kg, 3 次/天, 分别于第一次给药前(0 小时)及给药后 5、10、15、30 分钟, 1、2、4、6、8、10、12、24 小时眼眶后静脉取血, 用于测定大鼠血中大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚以及大黄素甲醚五种蒽醌类成分的含量和对超氧阴离子的抑制率。计算上述成分在大鼠体内的药动学参数, 利用各成分曲线下面积(AUC<sub>0-∞</sub>)百分率作为自定义权重系数, 得到其整合药代动力学曲线, 再与抗氧化效应动力学进行相关性分析, 以此来制定大黄用于抗氧化时合理的日服用次数。**结果** 大黄蒽醌类成分整合药代动力学与含药血清体外抗氧化效应动力学具有良好的相关性。每日给药 2 次组整合药代动力学 AUC 及抗氧化效应动力学 AUC 均明显高于每日给药 1 次和 3 次组。**结论** 大黄用于抗氧化时以每日服用两次为宜。

**【关键词】** 大黄; 抗氧化; 整合药代动力学; 效应动力学; 血清药理学; 日服用次数

**【中图分类号】** R285.6 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.03.001

**Research on the daily administration times of Rhubarb** LÜ Jun-lan, YUAN Hai-long, JIN Shi-ying, et al. Department of Pharmacy, No. 302 of the Chinese PLA Hospital, Beijing 100039, China

Corresponding author: YUAN Hai-long, E-mail: yhlpharm@126.com

**【Abstract】 Objective** To study the rational daily administration times of Rhubarb when it is used to reduce oxidative damage. **Methods** 24 rats were separated into 3 groups, 8 in each group, then rhubarb extract was drenched to them 3.6 g/kg once a day, 1.8 g/kg twice a day and 1.2 g/kg three times a day, respectively, after they were modeled by carbon tetrachloride for 24 h. Blood collected from the veins behind the eye sockets after different intervals was used to determine the concentration of rheinic acid, aloemodin, chrysophanol, physcion, emodin in the blood plasma and the rate of removing superoxide anion in vitro. Calculation the pharmacokinetic parameters of the above components, use the area under the curve of each component (AUC<sub>0-∞</sub>) as a percentage of custom weighting factor to get its integrated pharmacokinetic curve, then conduct correlation analysis with the antioxidant effects, determine the rational daily administration times of rhubarb for the oxidative damage. **Results** There was good correlation between integrated pharmacokinetics rhubarb anthraquinones and the Pharmacodynamics of antioxidant effects in vitro. The AUC of integrated pharmacokinetics and the anti-oxidation kinetics when administrated 2 times a day were significantly higher than that administrated 1 or 3 times. **Conclusion** It is more appropriate to administer two times a day when Rhubarb is used as antioxidant.

**【Key words】** Rhubarb; Antioxidant; Integrated pharmacokinetics; Pharmacodynamics; Serum pharmacology; Daily administration times

基金项目: 国家自然科学基金(81073069)

作者单位: 100039 北京, 中国人民解放军第三〇二医院药学部[吕俊兰(硕士研究生)、靳世英、付珊珊(硕士研究生)、袁海龙], 中药研究所(肖小河); 成都中医药大学药学院(吕俊兰、付珊珊、靳世英)

作者简介: 吕俊兰(1986-), 女, 2009 级在读硕士研究生。研究方向: 中药新制剂、新剂型的研究。E-mail: ljiguowei@yahoo.cn

通讯作者: 袁海龙(1970-), 博士, 博士后, 副研究员, 硕士生导师。中国人民解放军中药研究所副所长, 中华中医药学会中成分分会秘书长, 世界中医药学会联合会中药制剂专业委员会常务理事。E-mail: yhlpharm@126.com

文献标引格式:

吕俊兰, 袁海龙, 靳世英, 等. 大黄用于抗氧化的日服用次数研究[J]. 环球中医药, 2012, 5(3): 161-164.

中药日服用次数是中药用法的重要内容,直接关系临床的安全性和有效性。目前,许多中药在临床上应用时很难确切的规定服用次数,一般多凭医生经验,每日服用三次较多。但是,这种服用方法是否是最科学的、最有效的,医生不敢保证,病人同样感到疑惑。

本课题组前期针对大黄泻下及治疗实验性黄疸的日服用次数做了一定的研究,发现在规定的剂量下,大黄以每日服用两次为佳<sup>[1,2]</sup>。本文继续围绕以“效”为核心,成分药动学为辅佐的 PD-PK 研究模型为研究中心,用蒽醌类成分的整合药代动力学代替大黄酸的药代动力学,并采用血清药理学的方法研究大黄含药血清体外抗氧化效应动力学,不断对大黄日服用次数的研究模式与方法进行探索和创新,以使其早日实现向临床研究和应用的转化。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

美国 Agilent 1200 型高效液相色谱仪;涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司, XW-80A);飞鸽牌离心机(上海安亭科学仪器厂,型号:TGL—16GB),电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司,型号:BAS124S];酶标仪(奥地利 TECAN 公司,型号:Infinite 200);大黄(购自甘肃省礼县药材公司,经解放军第三〇二医院肖小河研究员鉴定为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L. 的干燥根,批号 20080425);大黄酸,大黄素,芦荟大黄素,大黄素甲醚,大黄酚(标准品,中国药品生物制品检定所);甲醇(色谱纯,加拿大 Promptar 有限公司);乙腈(分析纯,北京化学试剂公司,批号 080611);盐酸(北京化工厂,批号 20091010);纯净水。

### 1.2 动物与分组

SD 大鼠购于中国人民解放军军事医学科学院,动物许可证号:SCXK-(军)2007-004,雄性,体重(220±20)g。将大鼠随机分为3组,每组8只,记为G1, G2, G3。

### 1.3 给药与取血

取大黄粗粉加10倍蒸馏水浸泡30分钟,煎煮20分钟,趁热滤过,残渣再加入10倍量的蒸馏水,煎煮20分钟,滤过,合并滤液,减压浓缩、干燥,粉碎为细粉,临用前加蒸馏水溶解。G1、G2、G3组分别给予大黄提取物3.6 g/kg, 1次/天(给药时间为早上9:00), 1.8 g/kg, 2次/天(给药时间为9:00和

13:00)和1.2 g/kg, 3次/天(给药时间分别为9:00、13:00和17:00)。分别于第一次给药前(0小时)及给药后5、10、15、30分钟, 1、2、4、6、8、10、12、24小时由大鼠眼眶后静脉取血于肝素钠浸润过的离心管中, 8000转/分离心10分钟,分离上清液, -20℃保存备用。

### 1.4 含药血清清除超氧阴离子自由基实验<sup>[3,4]</sup>

1.4.1 实验溶液的配制 取2.1 ml浓盐酸,加蒸馏水定容至250 ml,得到0.1 mol/L的HCl溶液;再称取三羟甲基氨基甲烷3.0285 g,加蒸馏水溶解,再加入114.5 ml 0.1 mol/L HCl溶液定容至500 ml,得pH=8.2的浓度为50 mmol/L的Tris-HCl缓冲液;称取邻苯三酚1.58 g,用0.1 mol/L的HCl溶液定容至500 ml,得25 mmol/L的邻苯三酚液。

1.4.2 实验方法 取pH 8.2的Tris-HCl缓冲溶液450 μl,置于25℃水浴中预热20分钟,分别加入100 μl血浆样品和30 μl 25 mmol/L邻苯三酚溶液,混匀后于25℃水浴中反应5分钟后,加入8 mol/L的HCl溶液100 μl终止反应。自氧化管以100 μl蒸馏水代替样品管中样品,操作方法同样品管,在325 nm处测定吸光值,以等体积pH值8.2的Tris-HCl缓冲液作为空白。计算超氧阴离子的清除率。

$$\text{超氧阴离子的清除率} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

式中,  $A_0$ 为自氧化管的吸光值;  $A_1$ 为样品管的吸光值。

### 1.5 整合药代动力学研究

1.5.1 对照品溶液的配制 分别精密称取大黄酸、大黄素甲醚、大黄素、大黄酚、芦荟大黄素对照品配制成48 μg/ml、26.8 μg/ml、34 μg/ml、84 μg/ml、20 μg/ml的对照品溶液,再精密吸取上述对照品溶液配制成浓度分别为4.8 μg/ml、5.36 μg/ml、6.8 μg/ml、8.4 μg/ml及2.0 μg/ml的混标溶液。

1.5.2 血浆样品的处理 吸取200 μl血浆,加入8 mol/L盐酸沉淀血浆蛋白,涡旋液体混合器上震荡30秒后,精密加入1 ml乙醚萃取,涡旋混合2分钟,12000转/分离心5分钟,分离有机相,37℃水浴上氮气吹干。

1.5.3 高效液相色谱的分析 色谱条件:Agilent C18柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.1%磷酸水溶液(71:29);柱温:30℃;流速:1 ml/min;检测波长:254 nm;进样量:20 μl。血浆样品按1.5.2项下处理后的残渣用200 μl的甲醇溶解,进样分析,记录五种蒽醌类成分的峰面积,以归

一化法计算相应的血药浓度。

1.5.4 基于曲线下面积( $AUC_{0-\infty}$ )自定义权重系数的大黄蒽醌整合药动力学模型的建立<sup>[5-7]</sup> 根据大黄提取物给药后测得的血药浓度—时间数据, DAS 软件计算药动力学参数, 获得大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚的  $AUC_{0-\infty}$  数据, 根据各成分在 5 种成分总  $AUC_{0-\infty}$  中所占比值自定义各成分在综合浓度中的权重系数( $\omega_i$ ), 将每一时间点下 5 种单体成分的血药浓度赋以各自的权重系数, 求算大黄蒽醌的综合浓度, 进一步进行整合药动力学参数的研究。大黄蒽醌各成分自定义权重系数及综合浓度的计算公式如下:

$$\begin{aligned} \sum AUC_{0-\infty} &= AUC_{0-\infty} \text{ 大黄酸} \\ &+ AUC_{0-\infty} \text{ 芦荟大黄素} + AUC_{0-\infty} \text{ 大黄素} \\ &+ AUC_{0-\infty} \text{ 大黄酚} + AUC_{0-\infty} \text{ 大黄素甲醚} \\ \omega_i &= \frac{AUC_{0-\infty i}}{\sum AUC_{0-\infty}} \\ C_T &= AUC_{0-\infty i} \times \omega_i \end{aligned}$$

式中  $i$  分别代表大黄酸, 芦荟大黄素, 大黄素, 大黄酚, 大黄素甲醚等五种蒽醌;  $\omega_i$  表示上述成分  $AUC_{0-\infty}$  在 5 种成分总  $AUC_{0-\infty}$  中的比值;  $C_T$  为自定义权重系数校正后大黄蒽醌在大鼠体内的综合浓度。

## 1.6 数据处理

药代动力学数据采用 DAS 2.1.1 软件进行数据分析, 药代动力学采用房室模型进行模拟; 相关性分析采用 SPSS 17.0 中的 pearson 双变量相关分析进行,  $P < 0.05$  时认为具有显著相关性。

## 2 结果

### 2.1 抗氧化效应动力学

给予大黄提取物后不同时间点的含药血清对超氧阴离子( $O_2 \cdot$ )抑制率的效应动力学曲线见图 1。给予大黄提取物后的含药血清可明显抑制超氧阴离子自由基, 且不同 G1、G2、G3 之间具有显著性差异。借鉴药代动力学研究中 C-T 曲线的解析, 利用 DAS 2.1.1 软件对上述 E-T 曲线进行房室模型拟合和参数计算, 三组的  $AUC_E$  分别为 649.716、1478.424、988.417,  $G_2 > G_3 > G_1$ 。

### 2.2 大黄五种蒽醌整合药代动力学研究

将大黄酸、芦荟大黄素、大黄素、大黄酚及大黄素甲醚五种蒽醌的血药浓度—时间数据利用 DAS 2.1.1 进行拟合, 得到各自的 AUC, 再采用基于曲线

下面积( $AUC_{0-\infty}$ )自定义权重系数的方法进行大黄五种蒽醌的药代动力学进行整合, 整合后的药—时曲线及药代动力学参数分别见图 2 和表 1。

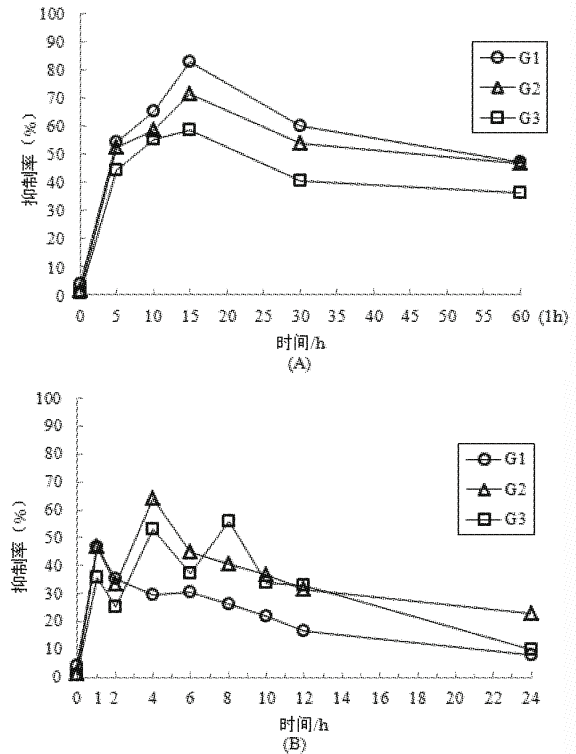


图 1 大黄含药血清清除超氧阴离子的效应动力学曲线

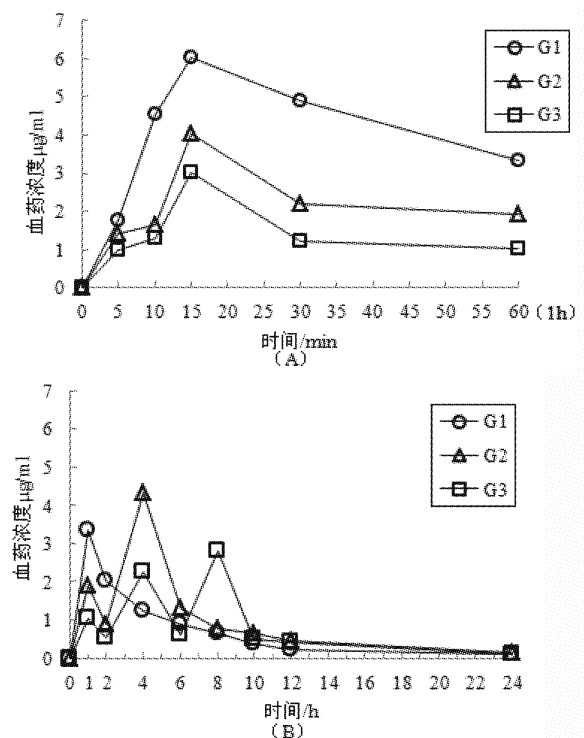


图 2 大黄蒽醌类成分的整合 C-T 曲线



表 1 大黄蒽醌类成分的整合药代动力学参数

房室参数	单位	参数值		
		G1	G2	G3
$t_{1/2\alpha}$	h	0.307	0.912	11.487
$t_{1/2\beta}$	h	3.436	6.373	11.489
$V_1/F$	$L \cdot kg^{-1}$	1.118	3.625	5.828
$CL/F$	$L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.577	0.394	0.391
$AUC(0-t)$	$mg \cdot L^{-1} \cdot h$	17.19	24.188	22.026
$AUC(0-\infty)$	$mg \cdot L^{-1} \cdot h$	17.345	25.412	20.583
K10	$h^{-1}$	0.516	0.109	0.067
K12	$h^{-1}$	1.084	0	0.007
K21	$h^{-1}$	0.857	0.76	0.06
Ka	$h^{-1}$	9.462	16.581	25.58
$t_{1/2Ka}$	h	0.073	0.042	0.027
Tlag	h	0.057	0.043	0.05

G1、G2、G3 组的整合  $C_{max}$  和  $AUC(0-t)$  分别为 6.02、4.04、3.03 和 17.19、24.19、22.03, G2 组  $C_{max}$  虽然低于 G1, 但由于第四小时给与第二次药后  $C_{max}$  回升至 4.31, 因而在 24 小时内  $AUC(0-t)$  明显高于 G1, 但与 G3 组差别较小, 其相对生物利用度为  $G2 > G3 > G1$ 。

### 2.3 整合药代动力学与效应动力学的相关性研究

将三组整合后的血药浓度数据与其相应的效应动力学数据进行 Pearson 相关性检验, 结果见表 2。G1、G2、G3 组的整合血药浓度与超氧阴离子抑制率的 Pearson 相关系数分别为 0.943、0.947、0.853,  $P$  值均为 0.000, 表明整合血药浓度与抗氧化效应具有显著的相关性。

表 2 整合药代动力学和效应动力学的 Pearson 相关性检验结果

组别	$n$	Pearson 相关系数	$P$ (双侧检验)
G1	13	0.943	0.000
G2	13	0.947	0.000
G3	13	0.853	0.000

## 3 结论与讨论

综合效应动力学和整合药代动力学数据, 笔者认为大黄用于抗氧化时以每天服用两次为佳。从药效上说, 每天服用两次清除超氧阴离子的  $AUC_E$ , 显著高于给药一次和三次组, 说明每天给药两次时总的抗氧化效应强于每天给药一次和三次; 从五种蒽醌的整合药代动力学上说, 每天给药两次组的大黄蒽醌类成分经整合后的  $AUC(0-t)$  也明显高于每天给药一次和三次, 两者结果一致。

现代对中药的研究主要集中在药效成分、药理作用、作用机理等研究领域, 这些研究虽然全面而深入, 却始终与临床研究隔着一道不可逾越的鸿

沟, 不能直接为临床服务。如今转化医学已成为当前医药学界迅猛发展的新兴领域之一, 它强调基础研究与应用之间的紧密结合, 这种新的医学研究模式倡导以患者为中心, 从临床工作中发现和提出问题, 进行深入基础研究, 然后再将基础研究成果快速应用于临床, 最终惠及广大患者。中药日服用次数与临床联系之紧密, 使得它成为转化医学中一个十分重要且不能忽视的关键问题, 日服用次数的研究可使基础研究与临床医疗之间建立更直接的联系。

中医药的疗效评价是转化医学研究的前提, 通过获得疗效的证据, 在临床推广应用, 才能实现从医疗卫生服务及政策制定的后期转化。因此本课题组提出基于以“效”为核心、成分药动学为辅助(即 PD-PK)模型的中药日服用次数研究方法<sup>[8,9]</sup>, 更加贴近临床, 弥补了“唯成分论”的不足, 适宜于中药日服用次数的研究。本文对前期建立的中药日服用次数的研究方法和模式进行了不断的探索与创新, 尤其是多效应成分的整合药代动力学以及血清药理学方法的提出和应用, 为多组分中药及中药复方的研究提供了可靠的基础。中药日服用次数可迅速实现基础研究到临床研究及应用的转化, 这不仅遵守了“源于临床, 证于实验, 回归临床”的研究思路, 更为转化医学研究提供了新的研究手段。

## 参 考 文 献

- [1] 周瑜, 吕俊兰, 袁海龙, 等. 中药大黄对便秘大鼠日服用次数合理性的初步研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(3): 518-522.
- [2] 吕俊兰, 付珊珊, 郭静静, 等. 大黄用于治疗大鼠实验性黄疸的日服用次数初步研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 29-33.
- [3] 曹燕, 庞市宾, 徐磊, 等. 金鸡菊提取物体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 144-147.
- [4] 韦霄, 黄兴贤, 蒋运生, 等. 3 种金花茶组植物提取物的抗氧化活性比较[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(5): 639-641.
- [5] 张启云, 徐良辉, 李冰涛, 等. 复方葛根芩连汤多效应成分分类整合药代动力学研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(1): 51-56.
- [6] 郝海平, 郑超楠, 王广基. 多组分、多靶点中药整体药代动力学研究的思考与探索[J]. 药学报, 2009, 44(3): 270-275.
- [7] 李晓宇, 郝海平, 王广基, 等. 三七总皂苷多效应成分整合药代动力学研究[J]. 中国天然药物, 2008, 6(5): 377-381.
- [8] 袁海龙, 肖小河. 论口服中药日服用次数合理性的现状与方法[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(6): 952-955.
- [9] 袁海龙, 肖小河. 基于 PD-PK 的中药日服用次数合理性评价模式构建[J]. 中草药, 2011, 46(10): 1251-1256.

(收稿日期: 2011-12-20)

(本文编辑: 张磊)