

注射用双黄连粉针在大鼠体内的药代动力学分析

周雪玲, 孔雪姣, 袁颖琳, 杨梅, 代晶*
(成都医学院药学院, 成都 610083)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定绿原酸、连翘酯苷 A 和黄芩苷的血药浓度, 探析注射用双黄连粉针中 3 种成分在大鼠体内的药代动力学特征。方法: 采用 HPLC 同时测定绿原酸、连翘酯苷 A 和黄芩苷含量, 以葛根素为内标, 流动相乙腈(A)-0.1% 磷酸(B)梯度洗脱(0~10 min, 10%~20% A; 10~35 min, 20%~35% A; 35~40 min, 35% A; 40~40.5 min, 35%~10% A; 40.5~55 min, 10% A), 绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷和葛根素的检测波长分别为 328, 328, 277, 249 nm。结果: 绿原酸和连翘酯苷 A 在 0.2~20 mg·L⁻¹、黄芩苷在 2.0~300 mg·L⁻¹ 线性关系良好($r > 0.999 4$); 日内和日间精密度的 RSD 均 < 13.6%, 低、中、高 3 个质量浓度样品的方法回收率在 88.3%~109.3%, 提取回收率均 > 80.8%。绿原酸、连翘酯苷 A 和黄芩苷的主要药动学参数 AUC₀₋₁ 分别为(8.406 ± 1.175), (9.696 ± 2.349), (145.35 ± 22.02) mg·h·L⁻¹; MRT₀₋ 依次为(0.619 ± 0.105), (0.634 ± 0.115), (0.456 ± 0.068) h; t_{1/2z} 分别为(0.532 ± 0.064), (0.732 ± 0.357), (0.542 ± 0.175) h; Vz 分别为(0.384 ± 0.050), (0.673 ± 0.422), (0.324 ± 0.072) L·kg⁻¹; CL_z 分别为(0.504 ± 0.067), (0.634 ± 0.150), (0.426 ± 0.066) L·h⁻¹·kg⁻¹。结论: 该方法灵敏、简便、准确, 适用于大鼠血浆中绿原酸、连翘酯苷 A 和黄芩苷的测定及注射用双黄连粉针的药代动力学研究。

[关键词] 双黄连粉针; 绿原酸; 连翘酯苷 A; 黄芩苷; 高效液相色谱法; 血药浓度; 药代动力学

[中图分类号] R283.6; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0168-04

[doi] 10.11653/syjf2013240168

In vivo Pharmacokinetics of Shuanghuanglian Powder Injection in Rats

ZHOU Xue-ling, KONG Xue-jiao, YUAN Ying-lin, YANG Mei, DAI Jing*
(School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

[收稿日期] 20130723(010)

[基金项目] 四川省教育厅理科重点项目(12ZA026); 成都医学院创新实验项目(CX201224)

[第一作者] 周雪玲, 学士, 从事药物制剂研究, Tel: 15196617606, E-mail: 15196617606@163.com

[通讯作者] * 代晶, 博士, 讲师, 从事药物代谢与药代动力学研究, Tel: 028-62308639, E-mail: daijing320@126.com

- [3] Cao X, Deng W, Fu M, et al. Seventy-two-hour release formulation of the poorly soluble drug silybin based on porous silica nanoparticles; *in vitro* release kinetics and *in vitro/in vivo* correlations in beagle dogs [J]. Eur J Pharm Sci, 2013, 48(1/2): 64.
- [4] Khazim K, Gorin Y, Cavaglieri R C, et al. The antioxidant silybin prevents high glucose-induced oxidative stress and podocyte injury *in vitro* and *in vivo* [J]. Am J Physiol: Renal Physiol, 2013, 305(1): 691.
- [5] 何杨, 刘彬丽, 李木子, 等. 快速膜乳化-溶剂萃取/挥发法制备水飞蓟宾 PLGA 微球的工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 1.
- [6] Thongphasuk P, Stremmel W, Chamulitrat W. 2, 3-Dehydrosilybin is a better DNA topoisomerase I inhibitor than its parental si-lybin [J]. J Chemotherapy, 2009, 55(1): 42.
- [7] 孙启文, 陈军, 陈明磊, 等. 高车前苷油水分分配系数的测定及大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 193.
- [8] 周伟, 狄留庆, 毕肖林, 等. 在体肠循环法研究连翘酯苷 A 的肠吸收机制 [J]. 药学学报, 2010, 45(11): 1373.
- [9] 马宁, 王建芬, 徐芳, 等. 白藜芦醇衍生物大鼠在体肠吸收特性研究 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(4): 586.
- [10] 何承华, 张振海, 王舒, 等. 芹菜素大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(9): 1416.

[责任编辑 全燕]

[Abstract] Objective: To develop a HPLC method for simultaneous determination of chlorogenic acid, forsythiaside A and baicalin in rat plasma, and investigate pharmacokinetics characteristics of these three ingredients from Shuanghuanglian powder injection. **Method:** Plasma samples were precipitated by acetonitrile-methanol (1:1). HPLC was adopted to simultaneous determine contents of chlorogenic acid, forsythiaside A and baicalin with puerarin as internal standard, mobile phase composed of acetonitrile (A) -0.1% phosphoric acid (B) with a gradient elution program (0-10 min, 10% -20% A; 10-35 min, 20% -35% A; 35-40 min, 35% A; 40-40.5 min, 35% -10% A; 40.5-55 min, 10% A), detection wavelength of chlorogenic acid, forsythiaside A, baicalin and puerarin were 328, 328, 277, 249 nm, respectively. **Result:** Excellent linear relationships were obtained in the range of 0.2-20 mg·L⁻¹ for chlorogenic acid and forsythiaside A, but it was 2.0-300 mg·L⁻¹ for baicalin ($r > 0.9994$); RSD of both intra-day and inter-day precisions were less than 13.6%, the assay recoveries at three levels were 88.3%-109.3%, the extract recoveries were more than 80.8%. Main pharmacokinetic parameters of chlorogenic acid, forsythiaside A and baicalin: AUC_{0-t} were (8.406 ± 1.175), (9.696 ± 2.349) and (145.35 ± 22.02) mg·h·L⁻¹; MRT_{0-t} were (0.619 ± 0.105), (0.634 ± 0.115) and (0.456 ± 0.068) h; t_{1/2z} were (0.532 ± 0.064), (0.732 ± 0.357) and (0.542 ± 0.175) h; Vz were (0.384 ± 0.050), (0.673 ± 0.422) and (0.324 ± 0.072) L·kg⁻¹; CL_z were (0.504 ± 0.067), (0.634 ± 0.150) and (0.426 ± 0.066) L·h⁻¹·kg⁻¹, respectively. **Conclusion:** This determination method was sensitive, simple and accurate, it was suitable for determining contents of chlorogenic acid, forsythiaside A and baicalin in rat plasma and pharmacokinetics of Shuanghuanglian powder injection.

[Key words] Shuanghuanglian powder injection; chlorogenic acid; forsythiaside A; baicalin; HPLC; plasma concentration; pharmacokinetics

注射用双黄连粉针(冻干)(SHL)收载于2010年版《中国药典》,是国内最早研制成功的注射用纯中药复方制剂,由金银花、连翘、黄芩三味药材组成,具有清热解毒、疏风解表之功效,是目前临床治疗呼吸道感染性疾病的首选药物之一^[1],但随着临床应用的日益广泛,其不良反应报道亦趋增多^[2]。SHL成分复杂,其多成分的含量测定方法报道较多^[3-4],但药动学研究却多集中于某单一成分,如绿原酸、黄芩苷或连翘苷等^[5-8],难以反映整体复方的动力学特征。连翘酯苷A是连翘中重要活性成分,在SHL中含量较高^[3-4],其药动学研究却鲜有报道^[9-10]。本实验选择绿原酸、连翘酯苷A、黄芩苷为考察指标,建立三者在大鼠血浆中的含量测定方法,为提高SHL的安全性和有效性提供实验依据。

1 材料

Ultimate 3000型高效液相色谱仪(美国戴安公司),Biofuge Stratos型台式高速离心机(美国Thermo公司)。绿原酸、连翘酯苷A、黄芩苷、葛根素对照品(均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为110753-200413, 111810-201001, 110715-201016, 110752-200912),注射用双黄连粉针(冻干)(哈药集团中药二厂,批号1104210),甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

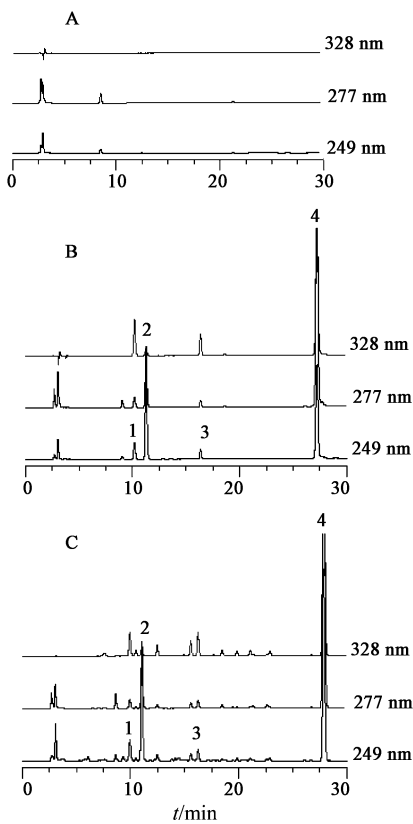
雄性SD大鼠,6只,体重(250 ± 20)g,购自四川大学华西实验动物中心,合格证号SYXK(川)2008-113,试验前适应性喂养1周。

2 方法与结果

2.1 溶液配制 分别精密称取绿原酸、连翘酯苷A、黄芩苷对照品适量,用甲醇稀释配制质量浓度分别为1,1,5 g·L⁻¹的贮备液。分别精密量取适量贮备液,用甲醇稀释成系列对照品溶液,绿原酸、连翘酯苷A的质量浓度分别为200,150,100,50,20,10,5,2 mg·L⁻¹,黄芩苷质量浓度分别为3 000,2 000,1 000,500,200,100,50,20 mg·L⁻¹;另精密称取适量葛根素对照品,用甲醇稀释配成400 mg·L⁻¹的内标溶液。将上述溶液置于4℃冰箱保存,备用。

2.2 色谱条件 Welchrom C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1%磷酸(B)梯度洗脱(0~10 min, 10%~20% A; 10~35 min, 20%~35% A; 35~40 min, 35% A; 40~40.5 min, 35%~10% A; 40.5~55 min, 10% A),体积流量1 mL·min⁻¹,绿原酸、连翘酯苷A、黄芩苷和葛根素的检测波长分别为328, 328, 277, 249 nm,柱温30℃,进样量20 μL,见图1。

2.3 血浆样品处理 取血浆样品100 μL,加入1 mol·L⁻¹盐酸5 μL混合均匀,加入内标溶液10 μL



A. 空白血浆; B. 空白血浆加混合对照品和内标; C. 给药血浆;
1. 绿原酸; 2. 葛根素; 3. 连翘酯苷 A; 4. 黄芩苷

图 1 注射用双黄连粉针 HPLC

和乙腈-甲醇(1:1)100 μL , 涡旋 3 min, 于 18 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液进样分析。

2.4 线性关系及定量限 精密量取系列对照品溶液各 10 μL , 置 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上挥干溶剂, 各加入空白血浆 100 μL 混合均匀, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积比为纵坐标, 得绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷回归方程分别为 $Y = 0.0183X - 0.0034$ ($r = 0.9999$), $Y = 0.013X - 0.0007$ ($r = 0.9998$), $Y = 0.0141X + 0.0015$ ($r = 0.9994$), 线性范围为 0.20 ~

20.0, 0.20 ~ 20.0, 2.0 ~ 300.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 按信噪比 ≥ 10 计算定量下限分别为 0.20, 0.20, 0.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 精密度试验 精密量取各待测物对照品溶液, 制备低、中、高 3 个质量浓度的质控样品溶液 ($n = 5$), 绿原酸、连翘酯苷 A 质量浓度依次为 0.5, 5.0, 15.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 黄芩苷质量浓度分别为 5.0, 50.0, 200.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。分别按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下色谱条件测定, 结果绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷日内精密度的 RSD 分别为 7.2% ~ 9.9%, 1.5% ~ 11.8%, 3.0% ~ 9.1%, 日间精密度的 RSD 依次为 3.8% ~ 13.6%, 2.3% ~ 10.7%, 4.6% ~ 10.1%。

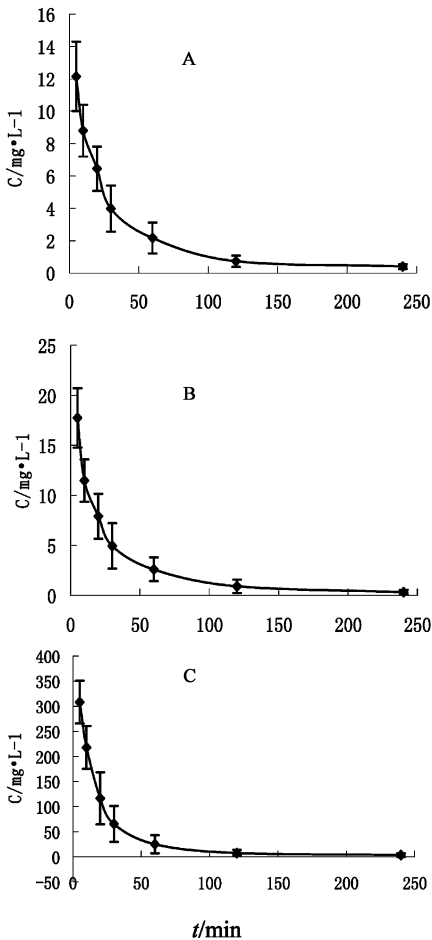
2.6 稳定性试验 精密量取 2.5 项下制备的质控样品溶液, 分别考察在室温下放置 48 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 2 周和 -20 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次的稳定性, 结果显示绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷 3 个质量浓度的 RSD 在 3.3% ~ 7.9%, 表明各待测物在这 3 种条件下基本稳定。

2.7 回收率试验 精密量取 2.5 项下制备的质控样品溶液, 每个质量浓度 5 份, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下色谱条件测定, 结果绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷的方法回收率分别为 88.8% ~ 100.7%, 88.3% ~ 109.3%, 88.4% ~ 105.4%, 提取回收率依次为 >90.2%, >94.4%, >80.8%。

2.8 药动学研究 取健康大鼠 6 只, 试验前禁食 12 h, 自由饮水。按 300 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 经尾静脉注射给药后(相当于绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷依次为 4.25, 5.98, 60.94 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 分别于 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240 min 从眶静脉取血 0.5 mL, 置于肝素化离心管中, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取血浆 100 μL , 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下色谱条件测定各成分血药浓度, 经 DAS 3.1.6 药动学软件处理, 药时曲线见图 2, 采用非房室模型计算统计矩参数, 结果见表 1。

表 1 注射用双黄连粉针在大鼠体内主要药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

统计距参数	单位	绿原酸	连翘酯苷 A	黄芩苷
AUC_{0-t}	$\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	8.406 ± 1.175	9.696 ± 2.349	145.35 ± 22.02
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	8.555 ± 1.115	9.919 ± 2.547	146.02 ± 22.71
MRT_{0-t}	h	0.619 ± 0.105	0.634 ± 0.115	0.456 ± 0.068
$\text{MRT}_{0-\infty}$	h	0.666 ± 0.075	0.734 ± 0.224	0.475 ± 0.087
$t_{1/2z}$	h	0.532 ± 0.064	0.732 ± 0.357	0.542 ± 0.175
V_z	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.384 ± 0.050	0.673 ± 0.422	0.324 ± 0.072
CL_z	$\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.504 ± 0.067	0.634 ± 0.150	0.426 ± 0.066



A. 绿原酸;B. 连翘酯苷 A;C. 黄芩苷

图2 注射用双黄连粉针在大鼠体内的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

SHL 临床应用广泛,不良反应亦非常突出,其主要活性成分绿原酸、黄芩苷等均可能是引起 SHL 安全性问题的诱因^[11-12]。SHL 与其他药物或 SHL 自身成分间均存在相互作用^[6,13-14]。为了给 SHL 临床药物检测提供科学方法,本实验建立了同时测定 SHL 中绿原酸、连翘酯苷 A、黄芩苷含量的 HPLC,能够灵敏、简便、准确地测定这 3 种成分的血药浓度。药代动力学参数(MRT, $t_{1/2z}$)显示,3 种成分在大鼠体内驻留时间较短,体内消除速率较快; V_z 较小,提示 3 种成分主要存在于血液中,在其他组织分布较少。因此,为了提高 SHL 的安全性,除了严格控制自身质量外,还应根据其药代动力学特点,合理联合用药,适当调整给药剂量或给药间隔时间。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:846.

[2] 张赞玲,阎敏,龙丽萍,等. 双黄连注射剂致严重不良反应/事件相关因素分析[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(11):1704.

[3] HAN J, YE M, GUO H, et al. Analysis of multiple constituents in a Chinese herbal preparation Shuang-Huang-Lian oral liquid by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ [J]. J Pharm Biomed Anal,2007,44(2):430.

[4] 卞婷婷,安益强,汤道权,等. HPLC 法同时测定双黄连冻干粉中 11 个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2012,32(1):52.

[5] 胡樱,程明川,杭太俊,等. 绿原酸和双黄连粉针剂中的成分绿原酸在大鼠体内的药动学比较[J]. 中国新药与临床杂志,2009,28(4):301.

[6] 曾凡林,崔红花,沈志滨,等. 地塞米松对注射用双黄连中绿原酸在大鼠体内的药动学影响[J]. 现代药物与临床,2010,25(1):45.

[7] 李秋红,刘佩莉,冯宇飞,等. 双黄连粉针不同剂量给药后黄芩苷的药动学及唾液中的分布[J]. 中国现代应用药学,2009,26(1):3.

[8] 曾凡林,沈志滨,张鑫. 注射用双黄连中连翘苷的药代动力学研究[J]. 中药材,2010,33(10):1602.

[9] 程凌飞,褚扬,胡晨旭,等. 连翘酯苷 A 在大鼠体内的药动学及其血浆蛋白结合率研究[J]. 中国新药杂志,2010,19(23):2138.

[10] 王进东,柴秋彦,张立伟. 连翘酯苷在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2008,10(4):53.

[11] 黄芳华. 绿原酸及其中药注射剂的安全性问题状况分析[J]. 中国中药杂志,2008,33(22):2716.

[12] 张瑞霞,汤纳平,林海霞,等. 绿原酸和双黄连粉针剂致敏性比较评价[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2010,12(6):1005.

[13] 曾凡林,崔红花,沈志滨,等. 地塞米松对注射用双黄连中绿原酸在大鼠体内的药动学影响[J]. 现代药物与临床,2010,25(1):45.

[14] DI B, FENG N P, LIU W Y. Pharmacokinetic comparisons of Shuang-Huang-Lian with the different combinations of its constitutional herbs [J]. J Ethnopharmacol,2006,107(3):401.

[责任编辑 全燕]