

· 药物代谢 ·

# 贯叶金丝桃中金丝桃苷在比格犬体内的药代动力学研究

尹兴斌<sup>1</sup>, 曲昌海<sup>1</sup>, 张晓燕<sup>2</sup>, 张慧<sup>1</sup>, 冯丽君<sup>1</sup>, 曹飒丽<sup>1</sup>, 倪健<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 军事医学科学院, 北京 100850)

[摘要] 目的: 建立 beagle 犬血浆样品中金丝桃苷的 HPLC 含量测定方法, 研究贯叶金丝桃提取物在 beagle 犬体内的药代动力学。方法: 采用 Dikma C<sub>18</sub>(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 乙腈-0.1% 磷酸(42:58) 为流动相, 检测波长 360 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 以普拉洛芬为内标, 建立含量测定方法。选用 6 只健康 beagle 犬作为试验动物, 口服贯叶金丝桃提取物胶囊后, 分别于给药前和给药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 h 取血, 通过 HPLC 测定金丝桃苷的含量, 并采用 Kinetica 4.4 软件进行非房室模型拟合, 计算药代动力学参数。结果: 金丝桃苷线性范围为 0.5 ~ 100 mg·L<sup>-1</sup>, 日间、日内精密度 < 5.9%, 在冷冻放置、冻融以及室温放置的条件下准确度均在 91.23% ~ 100.32%, 回收率为 89.95% ~ 95.32%。金丝桃苷的主要药代动力学参数为 T<sub>max</sub> = (2.17 ± 0.41) h, C<sub>max</sub> = (13.88 ± 1.26) mg·L<sup>-1</sup>, AUC<sub>0-24</sub> = (68.52 ± 12.96) μg·h<sup>-1</sup>·mL<sup>-1</sup>, AUC<sub>0-∞</sub> = (96.69 ± 30.94) μg·h<sup>-1</sup>·mL<sup>-1</sup>, MRT = (8.28 ± 3.79) h。结论: 建立了金丝桃苷 beagle 犬血药浓度的 HPLC 测定方法, 操作方便, 结果准确, 可用于金丝桃苷的药代动力学研究。

[关键词] 金丝桃苷; 高效液相色谱; 药代动力学; 比格犬

[中图分类号] R285.5, R283 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)02-0140-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121107.1346.017.html>

[网络出版时间] 2012-11-7 13:46

## Pharmacokinetic study of hyperoside in beagle dog plasma after oral administration of *Hypericum Perforatum* L. extract

YIN Xing-bin<sup>1</sup>, QU Chang-hai<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-yan<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>, FENG Li-jun<sup>1</sup>, CAO Sa-li<sup>1</sup>, NI Jian<sup>1\*</sup>

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pharmacokinetic properties of hyperoside in beagle dog plasma. **Method:** The analysis was carried out on a Diamonsil C<sub>18</sub>(2) reversed-phase column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by isocratic elution with acetonitrile and 0.1% phosphoric acid (42:58). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was set at 360 nm. Beagle dogs were oral administrated, and at different time points, the concentrations of hyperoside in dog plasma were determined by HPLC method. Main pharmacokinetics parameters were estimated by non-compartmental analysis using the Kinetica 4.4 software. **Result:** Linear response was obtained for hyperoside ranging from 0.5 to 100 mg·L<sup>-1</sup>. The intra-and inter-day precisions (RSDs) were less than 5.9%. The extraction recovery ranged from 89.95% to 95.32%. Stability studies showed that hyperoside was stable in preparation and analytical process. Hyperoside plasma concentration reached a maximum at (2.17 ± 0.41) h after administration with an average C<sub>max</sub> of (13.88 ± 1.26) mg·L<sup>-1</sup>. The area under the curve (AUC<sub>0-∞</sub>) was (96.69 ± 30.94) μg·h<sup>-1</sup>·mL<sup>-1</sup>. The MRT was (8.28 ± 3.79) h. **Conclusion:** The results indicated that the validated

[收稿日期] 20120717(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(面上项目, 81173563); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-026); 北京中医药大学复方中药制药创新团队(2011-CX70-13)

[第一作者] 尹兴斌, 在读博士, 从事中药制剂新技术及体内过程研究

[通讯作者] \* 倪健, 教授, 博士生导师, 从事中药制剂新技术及体内过程研究, Tel: 010-84738607, E-mail: njtem@263.net

method was successfully used to determine the concentration-time profiles of hyperoside.

[Key words] hyperoside; HPLC; pharmacokinetics; beagle dog

贯叶金丝桃又名贯叶连翘,是藤黄科植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的干燥地上部分,味辛,性寒,归肝经,具有疏肝解郁、清热利湿、消肿通乳的功效,用于肝气郁结,情志不畅,心胸郁闷,关节肿痛,乳痈,乳少等症<sup>[1]</sup>。现代药理实验证明,贯叶金丝桃具有抗抑郁、抗焦虑、抗病毒、抗菌、抗肿瘤作用<sup>[2-7]</sup>。贯叶金丝桃含有多种化学成分,主要有苯并二萜酮类化合物、间苯三酚化合物及黄酮类化合物等<sup>[8]</sup>,代表化合物有金丝桃苷、金丝桃素、伪金丝桃素、原金丝桃素、槲皮素、芦丁等化合物。自2005年版《中国药典》以来,金丝桃苷一直是贯叶金丝桃药材含量测定的指标性成分<sup>[1]</sup>,也是贯叶金丝桃化学成分研究和药理作用研究的热点化合物,具有镇痛、抗炎、抗氧化、心肌保护、肝保护、脑缺血保护、镇静、抗抑郁等作用<sup>[9-14]</sup>。虽然有多篇文献报道金丝桃苷的含量测定方法<sup>[15-19]</sup>和金丝桃苷在大鼠体内的药代动力学研究<sup>[20-22]</sup>,但至今未见有关于金丝桃苷在比格犬体内药代动力学的文献报道。

药物代谢动力学(Pharmacokinetic)是研究药物在动物体内的含量随时间变化规律的科学,是药理学的一种,主要研究机体对药物的处置的动态变化,包括药物在机体内的吸收、分布、代谢及排泄的过程,对指导新药设计,优化给药方案,改进剂型,提供高效、速效(或缓释)、低毒(或低副作用)的药物制剂,可以发挥重大作用<sup>[23-25]</sup>。本实验将以金丝桃苷为指标,研究贯叶金丝桃提取物口服给药后在 beagle 犬体内的药代动力学情况,研究结果可以为贯叶金丝桃相关制剂的研发和临床应用提供理论和试验依据。

## 1 仪器与试剂

液相色谱仪(岛津 LC M20A,二极管阵列检测器),BT125D 型电子天平(赛多利斯,0.01 mg),G16 型医用高速离心机(河北省安新县白洋离心机厂,18 000 r·min<sup>-1</sup>),UGC-12W 型氮吹仪(北京优晟联合科技有限公司,12 孔),Vortex-6 型多功能旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),移液枪(Transferrpette® S, Germany BRAND, 200 μL, 1, 5 mL)。

金丝桃苷对照品(批号 111521-200402)由中国药品生物制品检定所提供;普拉洛芬原料药(内标)由军事医学科学院提供;贯叶金丝桃胶囊(山东省

中医院制备,将提取纯化后的贯叶金丝桃提取物填入 0#胶囊中,每粒含 0.30 g 提取物,含有 58.17 mg 金丝桃苷),甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司),乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司),磷酸(分析纯,天津市光复科技发展有限公司),水(娃哈哈纯净水),氮气(北京如源如泉科技有限公司,纯度 99.99%)。

Beagle 犬(军事医学科学院动物房提供),雄性,体重(12.2 ± 1.0) kg,合格证号 SCXK(京)2007-0001。

## 2 方法与结果

### 2.1 标准溶液的配制

精密称取金丝桃苷对照品适量,置于量瓶中,以甲醇溶解,配制成 1.00 g·L<sup>-1</sup> 的标准储备液。

精密量取标准储备液适量,置于量瓶中,加甲醇稀释至一定体积,配制成含有 100 mg·L<sup>-1</sup> 金丝桃苷的中间标准溶液。再取上述中间标准溶液,以甲醇进行系列稀释,依次获得含金丝桃苷 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 的标准系列溶液。

内标普拉洛芬标准溶液:精密称取普拉洛芬对照品适量,以甲醇溶解并稀释,配制成 1.00 g·L<sup>-1</sup> 的标准储备液。临用时再用甲醇稀释为 2 mg·L<sup>-1</sup> 的工作浓度,直接用于沉淀血浆样品的蛋白。

### 2.2 血浆样品的处理

取空白血浆 0.5 mL,置 10 mL 离心管中,加入母液 0.5 mL,加入内标甲醇溶液 1.5 mL,涡旋 1 min 后使蛋白充分沉淀;置高速离心机中,12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后,移取上清液至 5 mL 离心管中,置氮吹仪中水浴 40 °C 吹干,吹干后残渣加入 200 μL 甲醇复溶,涡旋 30 s 后,置 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上清液进样测定。

### 2.3 色谱条件

Dikma C<sub>18</sub>(2) 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸(42:58),检测波长 360 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 20 μL。

### 2.4 方法学考察

#### 2.4.1 方法专属性

分别制备 beagle 犬空白血浆,空白血浆 + 金丝桃苷对照品及内标对照品,给药 10 h 后血浆,按照 2.2 所述方法处理后进样。

#### 2.4.2 线性范围

空白血浆中定量加入 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 的标准系列溶液,按 2.2 中血浆样品处理方法操作,吹干后 200 μL 甲醇复溶,涡旋 30 s 后,置 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,取上

清液样分析。

**2.4.3 精密度** 制备血浆质量浓度为 0.5, 10, 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的含药血浆(即低、中和高浓度的样品),按 2.2 中血浆样品处理方法操作,连续做 3 d,共 3 批,每批每个浓度平行做 6 份样品,计算批内精密度和批间精密度。

**2.4.4 稳定性** 制备血浆质量浓度为 0.5, 10, 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的含药血浆,置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻,然后取出室温下解冻,如此反复冻融 3 次,最后一次室温解冻后,按 2.2 方法处理后测定,计算冻融稳定性;制备血浆质量浓度为 0.5, 10, 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的含药血浆,放置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻 30 d,室温解冻后,按 2.2 方法处理后测定,计算长期冻存稳定性;制备血浆质量浓度为 0.5, 10, 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的含药血浆,按 2.2 方法处理后,在室温( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )条件下放置 24 h 后进样,测定药物浓度,计算放置稳定性。

**2.4.5 回收率** 制备血浆质量浓度为 0.5, 10, 50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的含药血浆,按 2.2 中血浆样品处理方法操作,测定药物浓度,计算回收率。

**2.5 药代动力学试验** 选用 6 只健康 beagle 犬作为试验动物,禁食 12 h 后,口服 1 粒贯叶金丝桃胶囊(按照临床常用剂量),分别于给药前和给药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 h 取血,每次取血约 3 ~ 4 mL,轻摇使与抗凝剂混合均匀。置离心机中,转速  $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,分离血浆,置  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中冷冻,备用待测。

**2.6 统计学方法** 数据采用  $\bar{x} \pm s$  的表达方法,药代动力学参数采用 Kinetica 4.4 软件进行非房室模型拟合,计算药代动力学参数。

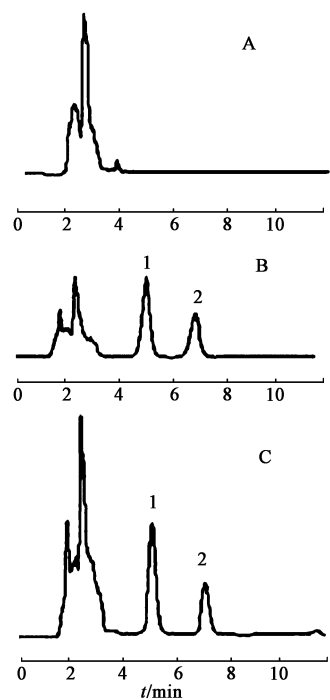
### 3 结果

**3.1 方法专属性** 空白血浆、含对照品血浆及给药后血浆测定的 HPLC 色谱图见图 1,从图中可以看出,各个化合物分离良好,血浆内源物对分离检测无干扰,金丝桃苷和内标的出峰时间分别为 5.5, 6.3 min。

**3.2 线性范围** 分别用金丝桃苷的峰面积与内标峰面积比对血浆浓度作加权最小二乘法线性回归,所用权重为  $1/X^2$ ,得相应的回归方程。金丝桃苷在比格犬血浆中的线性方程为  $Y = 0.5003X - 0.3902$  ( $r = 0.9991$ ),线性范围为  $0.5 \sim 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,标准曲线回归方程的相关系数均  $> 0.99$ ,符合 ICH 的规定要求。

**3.3 精密度试验** 在低、中、高 3 个浓度下,金丝桃苷连续测定的 RSD 均  $\leq 5.9\%$ ,精密度良好。

**3.4 稳定性试验** 在 3 种条件下,多次测定样品的



A. 空白血浆; B. 含有金丝桃苷和内标的血浆;  
C. 给药 10 h 后血浆样品; 1. 金丝桃苷; 2. 内标(普拉洛芬)

图 1 空白血浆、对照品及含药血浆 HPLC

准确度均在 91.23% ~ 100.32%,说明样品含量没有发生明显变化,在冷冻放置、冻融以及处理后室温放置的条件下,样品较稳定。

**3.5 回收率实验结果** 金丝桃苷在低、中、高 3 个浓度的平均回收率均在 89.95% ~ 95.32%,方法准确度高,该方法可以用于金丝桃苷在血浆样品中的测定。

**3.6 药代动力学试验** 金丝桃苷血药浓度与时间曲线见图 2,金丝桃苷的药代动力学参数见表 1。

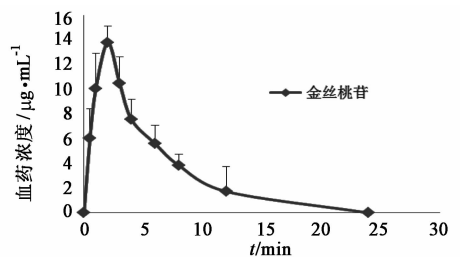


图 2 口服给药后金丝桃苷的药-时曲线( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 4 讨论

本实验建立了测定 beagle 犬血浆中金丝桃苷血药浓度的高效液相色谱法,该方法的日内、日间的精密度、稳定性和回收率均符合 ICH 血药浓度测定的要求,适合测定 beagle 犬血浆中金丝桃苷的血药浓度。

曾考察过乙腈-水、甲醇-水、乙腈-磷酸水溶液及

表1 口服给药后金丝桃苷药代动力学参数( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

药动学参数	金丝桃苷
$T_{\max}/h$	$2.17 \pm 0.41$
$C_{\max}/mg \cdot L^{-1}$	$13.88 \pm 1.26$
$AUC_{0-24}/\mu g \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$	$68.52 \pm 12.96$
$AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot h^{-1} \cdot mL^{-1}$	$96.69 \pm 30.94$
MRT/h	$8.28 \pm 3.79$

甲醇-磷酸水溶液从高到低的不同比例,并对不同浓度的磷酸水溶液进行了考察,结果表明当乙腈-磷酸(42:58),磷酸水溶液浓度为0.1%时,金丝桃苷峰形良好,分离效果较好,血浆内源成分峰无干扰,保留时间合适,因此选用了乙腈-0.1%磷酸(42:58)作为流动相。

采用 Kinetic 4.4 软件进行非房室模型拟合,计算药代动力学参数,发现金丝桃苷在犬体内 2~3 h 达到浓度最高值,平均滞留时间(MRT)在 9 h 内,说明金丝桃苷在体内迅速吸收,滞留时间较长,此研究结果提示金丝桃苷可能在体内能迅速发挥作用并且持续时间较长。

#### [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,2010:215,159.

[2] 杨得彼,甘良春,胡海燕. 国外对贯叶连翘抗抑郁疗效的临床验证[J]. 中西医结合学报,2004,2(3):231.

[3] Anna R B. Evaluation of chemical stability of St John's wort commercial extract and some preparations [J]. Inter J Pharm,2001, 213: 199.

[4] Linde K, Ramirez G, Mulrow C D, et al. John's wort for depression: an overview and meta-analysis of randomized clinical trials[J]. BMJ,1996,313(7052):253.

[5] 朱晓薇. 贯叶金丝桃研究进展I——药代动力学、药效学和临床应用[J]. 国外医药:植物药分册,1998, 13(5):210.

[6] Maraleda G, Wu T T, Jilbert A R, et al. Inhibition of duck hepatitis B virus replication by hypericin [J]. Antiviral Res,1993,20(3):235.

[7] 刘金钊,王晓莉,张俊松,等. 贯叶连翘在癌症治疗中应用前景[J]. 中国现代中药,2006,8(2):22.

[8] 徐皓. 贯叶连翘化学成分及药理作用研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(14):4219.

[9] 马传庚,向泽茂,徐叔云,等. 金丝桃苷中枢镇痛作用及其机制的研究[J]. 中国药理学通报,1991,7(5):345.

[10] 韩喻美,赵小曼,晏金平. 金丝桃苷与维生素 E 对小鼠脑肝组织的保护作用[J]. 江西医学院学报,2002,42

(1):37.

[11] 贾永蕊,胡然,库宝善. 贯叶连翘提取物和盐酸赖氨酸复方(赖金丝)的抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2004,10(2):35.

[12] 陈红艳,王建华,任振学,等. 金丝桃苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的防护作用[J]. 中西医结合学报,2006,4(5):526.

[13] 李庆林,陈志武,马传庚. 金丝桃苷对原代培养的大鼠心肌细胞缺氧-再给氧损伤的影响[J]. 中草药,2006,37(4):575.

[14] 王卫星,胡新颖,刘鹏,等. 金丝桃苷等 10 个天然黄酮类化合物的抗抑郁活性筛选研究[J]. 中草药,2007,38(6):900.

[15] 李彦冰,邹淑君,张立剑,等. HPLC 测定抑郁宁颗粒中金丝桃苷的含量[J]. 中医药信息,2011,28(4):44.

[16] 黄媛平. 胆宁片中金丝桃苷、橙皮苷和白藜芦醇的同时测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):81.

[17] 张新华,韦建荣,万近福. 虎尾草中金丝桃苷和总黄酮含量测定[J]. 时珍国医国药,2011,22(9):2229.

[18] 柯仲成,桂双英,周亚球. 聚酰胺树脂吸附纯化贯叶金丝桃中金丝桃苷的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(11):9.

[19] 叶绿萍,刘小意,陆海鹏,等. 赶山鞭中金丝桃苷的 HPLC 测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):78.

[20] Xixiang Ying, Xiansheng Meng, Siyuan Wang, et al. Simultaneous determination of three polyphenols in rat plasma after orally administering hawthorn leaves extract by the HPLC method [J]. Nat Prod Res, 2012, 26(6):585.

[21] Xun Liu, Dong Wang, Siyuan Wang, et al. LC determination and pharmacokinetic study of hyperoside in rat plasma after intravenous administration [J]. Yakugaku Zasshi, 2010,130(6):873.

[22] Siyuan Wang, Jiyang Cai, Wenjie Zhang, et al. HPLC determination of five polyphenols in rat plasma after intravenous administering Hawthorn leaves extract and its application to pharmacokinetic study [J]. Yakugaku Zasshi, 2010, 130(11):1603.

[23] 唐洪梅,李锐. 中药及复方制剂现代化研究的重点——药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(5):56.

[24] 向大雄,李焕德,胥新元. 中药复方药代动力学研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(1):61.

[25] 罗芬,池玉梅,吴皓. 中药代谢动力学研究概述[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(14):284.

[责任编辑 邹晓翠]