

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.09.009

给药途径及杞归八味口服液对大鼠二苯乙烯苷药代动力学的影响*

傅若秋,王显凤,张琳,段冬玉,陈剑鸿[△]

(中国人民解放军陆军特色医学中心药剂科,重庆 400042)

摘要:目的 考察不同给药途径及中药复方杞归八味口服液对二苯乙烯苷药代动力学的影响。方法 将15只SD大鼠随机分为A组(60 mg/kg 二苯乙烯苷、腹腔注射)、B组(60 mg/kg 二苯乙烯苷、灌胃)、C组[杞归八味口服液(相当于60 mg/kg 二苯乙烯苷)、灌胃],各5只。3组大鼠分别于不同时间点剪尾取血,采用高效液相色谱法检测血药浓度。结果 A组、B组大鼠的药代动力学过程均符合血管外给药二室模型;A组、B组大鼠给药后能快速进入体循环,2 min即能在血液检测到药物,平均达峰时间(t_{max})分别为(9.00±4.18)min和(14.00±5.48)min;B组大鼠给药后峰浓度(C_{max})和药时曲线下面积($AUC_{0-\infty}$)分别为(0.44±0.40)mg/L和(6.04±6.68)mg·min/L,显著低于A组的(23.79±7.12)mg/L和(435.89±75.69)mg·min/L($P<0.05$);B组大鼠的相对生物利用度为1.39%;C组大鼠二苯乙烯苷的血药浓度低于检测限(0.025 mg/L)。结论 口服二苯乙烯苷的生物利用度极低,而杞归八味口服液能使其生物利用度进一步降低。

关键词:二苯乙烯苷;杞归八味口服液;药代动力学;高效液相色谱法;腹腔注射;灌胃给药;血药浓度;大鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)09-0031-04

Effects of Administration Routes and Qiguibawei Oral Liquid on the Pharmacokinetics of Stilbene Glucoside in Rats

FU Ruqiu, WANG Xianfeng, ZHANG Lin, DUAN Dongyu, CHEN Jianhong

(Department of Pharmacy, Army Characteristic Medical Center of the PLA, Chongqing, China 400042)

Abstract: Objective To investigate the effects of different administration routes and traditional Chinese medicine compound(Qiguibawei Oral Liquid) on the pharmacokinetics of stilbene glucoside. **Methods** A total of 15 SD rats were randomly divided into group A (60 mg/kg of stilbene glucoside, intraperitoneal injection), group B(60 mg/kg of stilbene glucoside, intragastric administration), group C [Qiguibawei Oral Liquid(equivalent to 60 mg/kg of stilbene glucoside, intragastric administration), five rats in each group. The blood samples were collected by cutting tail of rats in the three groups at different time points, and the blood concentration was detected by the high-performance liquid chromatography(HPLC). **Results** The pharmacokinetic process of the rats in the groups A and B was consistent with the two-compartment model of extravascular administration. After administration, stilbene glycoside could enter the systemic circulation quickly and be detected in the blood within 2 min in group A and group B, and the mean time to peak(t_{max}) was (9.00±4.18) min and (14.00±5.48) min, respectively. The maximum concentration(C_{max}) and the area under the drug time curve ($AUC_{0-\infty}$) in group B were (0.44±0.40) mg/L and (6.04±6.68) mg·min/L, which were significantly lower than (23.79±7.12) mg/L and (435.89±75.69) mg·min/L in group A. The relative bioavailability in group B was 1.39%, and the plasma concentration of stilbene glucoside in group C was lower than the limit of detection(0.025 mg/L). **Conclusion** The bioavailability of oral administration of stilbene glucoside is very low, and Qiguibawei Oral Liquid further reduces its bioavailability.

Key words: stilbene glucoside; Qiguibawei Oral Liquid; pharmacokinetics; HPLC; intraperitoneal injection; intragastric administration; plasma concentration; rats

杞归八味口服液(曾用名益精灵口服液)为我院特色自制制剂,由何首乌、枸杞子、菟丝子、牛膝、当归、补骨脂、茯苓、陈皮8味中药组方,具有健脑安神、滋补肝肾功效,用于失眠多梦、健忘、腰膝酸软、神疲乏力等症,疗效显著,已在临床使用近30年。何首乌为方中君药,主要水溶性成分为二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷),为何首乌的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化、神经保护等多种药理学活性^[1-6]。同时,二苯乙烯苷也是2015年版《中国药典

(一部)》规定的何首乌质量检测指标成分,杞归八味口服液质量标准也将其作为指标成分^[7],但在胃肠道中不易吸收^[8-9]。为了解不同给药途径及中药复方对二苯乙烯苷药代动力学的影响,本研究中考察了腹腔注射、灌胃2种给药途径,以及杞归八味口服液灌胃情况下,二苯乙烯苷在大鼠体内的药代动力学特征。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱(HPLC)仪[配有SPD-20A

*基金项目:重庆市卫生计生委中医科研项目[Zy201801004]。

第一作者:傅若秋,男,博士研究生,主管药师,研发方向为药物新制剂及药理学,(电子信箱)zxmfrq@163.com。

[△]通信作者:陈剑鸿,女,博士研究生,主任药师,研究方向为新药研发及药理学,(电子信箱)chenjh_110@263.net。

型紫外(UV)检测器、SIL-20AC型自动进样器,日本岛津公司];BT25S型电子分析天平(德国赛多利斯公司,精度为十万分之一);Vortex-5型涡旋仪(海门其林贝尔公司);CS15型高速低温离心机(美国贝克曼公司)。

1.2 试药

二苯乙烯苷对照品(批号为19051603,含量为99.44%),虎杖苷对照品(批号为19062702,含量为98.26%),均购自成都曼思特生物科技有限公司;杞归八味口服液(本院自制,批号为200415,二苯乙烯苷含量为4.10 mg/mL);甲醇(色谱纯,美国霍尼韦尔公司);纯化水(实验室自制);其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD大鼠15只,雄性,体质量(260 ± 10)g,陆军特色医学中心动物实验中心提供,动物实验许可证号为SYXK(军)2017-0058,动物实验符合动物实验伦理委员会《实验动物福利伦理原则》要求。动物均予普通饲料喂养,给药前12 h禁食不禁饮,置温度为23~27℃、相对湿度为45%~55%、自然光照条件下的动物实验房内。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:迪马C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(40:60, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:320 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取二苯乙烯苷对照品10.80 mg,精密称定,加甲醇溶解,定容至10 mL容量瓶中,得质量浓度为1080 μg/mL

的对照品贮备液,按倍数稀释法用甲醇稀释成质量浓度为1080.00,540.00,270.00,67.50,16.90,8.44,4.22,2.11,1.06 μg/mL的系列对照品溶液。取虎杖苷对照品2.30 mg,精密称定,用1 mL甲醇溶解,配成质量浓度为2.30 mg/mL的虎杖苷内标贮备液,取贮备液适量,用甲醇稀释100倍,得质量浓度为23.0 μg/mL的虎杖苷内标溶液。取二苯乙烯苷适量,精密称定,用生理盐水溶解,配成质量浓度为8 mg/mL(供腹腔注射用)及4 mg/mL(供灌胃用)的二苯乙烯苷溶液。按生产工艺制备,并按质量标准检测合格的杞归八味口服液(二苯乙烯苷含量为4.1 mg/mL)。

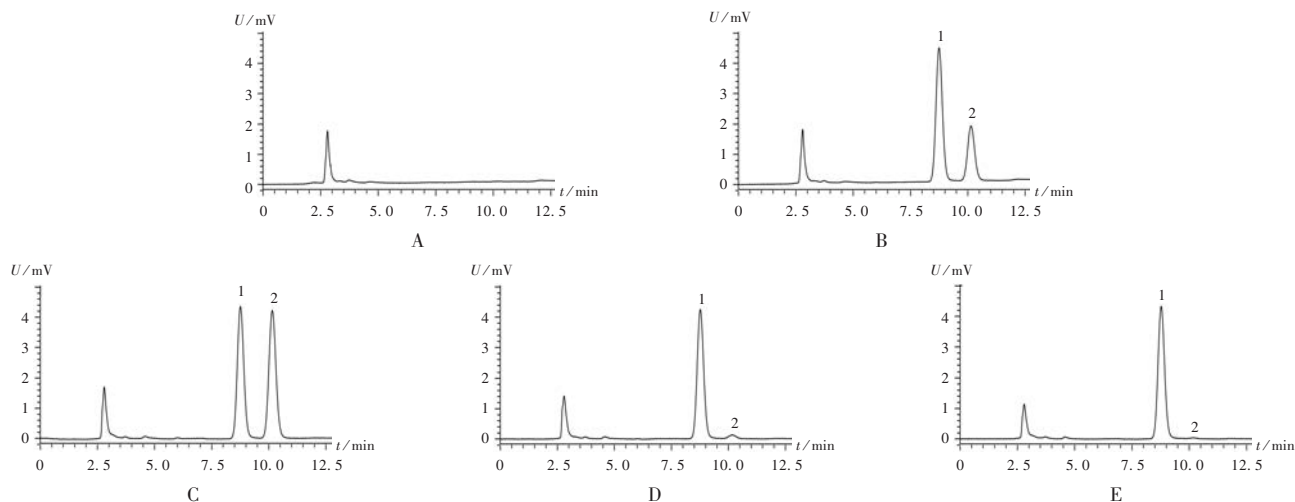
2.3 血清样品处理

取大鼠血清100 μL,加虎杖苷内标溶液50 μL,甲醇360 μL,涡旋30 s,14 000 r/min离心5 min,取上清液10 μL,进样,进行定量分析。

2.4 方法学考察

专属性试验:分别取大鼠空白血清、空白血清加二苯乙烯苷,大鼠给药后(二苯乙烯苷腹腔注射、二苯乙烯苷灌胃、杞归八味口服液灌胃)的血清样品,按2.3项下方法处理血清样品,按2.1项下色谱条件进样测定。结果二苯乙烯苷与内标虎杖苷的保留时间分别为10.14 min和8.75 min,分离度大于1.5,血清中内源性物质不干扰二苯乙烯苷和内标的测定。详见图1。

线性关系考察及检测限、定量限确定:取空白血清100 μL,精密加入不同质量浓度的二苯乙烯苷甲醇溶液10 μL,涡旋混匀,使血清中二苯乙烯苷质量浓度分



1. 内标(虎杖苷) 2. 二苯乙烯苷

A. 空白血样 B. 空白血样加二苯乙烯苷及内标 C. 二苯乙烯苷腹腔注射的血样

D. 二苯乙烯苷灌胃的血样 E. 杞归八味口服液灌胃的血样

图1 高效液相色谱图

1. internal standard(polydatin) 2. stilbene glucoside

A. Blank blood sample B. Blank blood sample + stilbene glucoside + internal standard C. Blood sample of stilbene glucoside by intraperitoneal injection

D. Blood samples of stilbene glucoside by intragastric administration E. Blood samples of Qiguiawei Oral Liquid by intragastric administration

Fig. 1 HPLC chromatograms

别为 108.000, 54.000, 27.000, 6.750, 1.690, 0.844, 0.422, 0.106 mg/L, 按 2.3 项下方法处理血清样品(甲醇加入量为 350 μ L), 按 2.1 项下色谱条件进样测定。以二苯乙烯苷峰面积与虎杖苷峰面积的比值(Y)为纵坐标、二苯乙烯苷质量浓度(X , mg/L)为横坐标进行线性回归, 并绘制标准曲线, 回归方程为 $Y=0.077\ 568X+0.002\ 861$, $r=0.999\ 9$ ($n=8$)。结果表明, 二苯乙烯苷质量浓度在 0.106 ~ 108.000 mg/L 范围内与二苯乙烯苷峰面积和虎杖苷峰面积的比值线性关系良好。检测限($S/N=3$)为 0.025 mg/L, 定量限($S/N=10$)为 0.106 mg/L。

加样回收试验和精密度试验: 依法制备二苯乙烯苷低、中、高质量浓度(0.422, 6.750, 54.000 mg/L)的模拟血清样品各 6 份, 按 2.3 项下方法处理血清样品(甲醇加入量为 350 μ L), 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录二苯乙烯苷及内标虎杖苷的峰面积, 并代入线性回归方程计算模拟血清样品中二苯乙烯苷的质量浓度(即测得质量浓度)。结果见表 1。

表 1 加样回收试验和精密度试验结果

Tab. 1 Results of the recovery test and the precision test

二苯乙烯苷标示质量浓度 (mg/L)	平均实测质量浓度 ($\bar{X} \pm s$, mg/L, $n=6$)	平均回收率 ($\bar{X} \pm s$, %, $n=6$)	日内精密度试验结果的 RSD (%, $n=6$)	日间精密度试验结果的 RSD (%, $n=18$)
0.422	0.402 $\pm$ 0.036	95.37 $\pm$ 8.42	8.83	9.38
6.750	6.61 $\pm$ 0.17	97.86 $\pm$ 2.56	2.62	5.52
54.000	53.57 $\pm$ 1.60	99.20 $\pm$ 2.96	2.98	5.22

稳定性试验: 依法制备二苯乙烯苷低、中、高质量浓度(0.422, 6.750, 54.000 mg/L)的模拟血清样品各 6 份, 考察模拟血清样品室温放置 4 h、反复冻融 3 次、-20 $^{\circ}$ C 冻存 15 d, 以及按 2.3 项下方法处理后于 4 $^{\circ}$ C 放置 24 h 的稳定性。结果见表 2, 表明在不同条件下, 模拟血清样品中的二苯乙烯苷均稳定($RSD \leq 10\%$)。

表 2 稳定性试验结果($n=6$)

Tab. 2 Results of the stability test($n=6$)

二苯乙烯苷质量浓度(mg/L)	室温放置 4 h	反复冻融 3 次	-20 $^{\circ}$ C 冻存 15 d	4 $^{\circ}$ C 放置 24 h
0.422	2.54	5.15	4.85	8.42
6.750	5.86	3.87	4.49	1.69
54.000	2.89	5.31	1.73	6.22

2.5 药代动力学试验

将健康雄性 SD 大鼠随机分为 A 组(60 mg/kg 二苯乙烯苷、腹腔注射)、B 组(60 mg/kg 二苯乙烯苷、灌胃)、C 组[枳归八味口服液(相当于 60 mg/kg 二苯乙烯苷)、灌胃], 各 5 只, 禁食不禁饮 12 h 后, 分别给予相应药物, 于给药后 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180,

240 min 时剪尾取血 300 ~ 400 μ L, 分离, 收集血清, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存待测。取血清样品, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下色谱条件进样测定 5 次, 记录二苯乙烯苷及内标虎杖苷的峰面积, 代入线性回归方程, 计算不同时间点血清药物浓度(见表 3), 并以时间(X , min)为横坐标、血药浓度(Y , mg/L)为纵坐标绘制平均血药浓度-时间曲线(见图 2)。

表 3 3 组大鼠各采血时间点的血药浓度($\bar{X} \pm s$, mg/L, $n=5$)

Tab. 3 The plasma concentration of rats in the three groups at each time point($\bar{X} \pm s$, mg/L, $n=5$)

采血时间点(min)	A 组	B 组	C 组
2	11.56 $\pm$ 4.05	0.05 $\pm$ 0.06	0.02 $\pm$ 0.04
5	21.67 $\pm$ 7.79	0.07 $\pm$ 0.10	0.01 $\pm$ 0.02
10	19.73 $\pm$ 2.90	0.41 $\pm$ 0.51	0.00 $\pm$ 0.00
15	16.31 $\pm$ 5.83	0.31 $\pm$ 0.38	0.00 $\pm$ 0.00
20	11.38 $\pm$ 4.60	0.25 $\pm$ 0.19	0.00 $\pm$ 0.00
30	6.41 $\pm$ 2.74	0.10 $\pm$ 0.04	0.00 $\pm$ 0.00
45	3.02 $\pm$ 1.31	0.04 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.00
60	1.81 $\pm$ 1.42	0.02 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.00
90	0.61 $\pm$ 0.32	0.01 $\pm$ 0.01	0.00 $\pm$ 0.00
120	0.27 $\pm$ 0.18	0.01 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.00
180	0.10 $\pm$ 0.11	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
240	0.07 $\pm$ 0.08	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

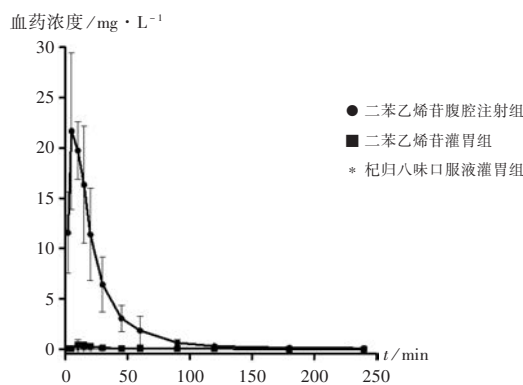


图 2 平均血药浓度-时间曲线图

Fig. 2 The profile of mean plasma concentration-time

血药浓度数据采用 DAS 1.0 软件进行拟合, 计算药代动力学参数, 并采用 SPSS 13.0 统计学软件分析。结果显示, A 组、B 组大鼠的药代动力学过程均符合血管外给药二室模型, 大鼠腹腔注射及灌胃后二苯乙烯苷均能快速进入体循环, 给药后 2 min 即能在血中检测到药物, 其平均达峰时间(t_{max})分别为(9.0 $\pm$ 4.2) min 和(14.0 $\pm$ 5.5) min; 但二苯乙烯苷灌胃进入体循环的药量很少, 其平均峰浓度(C_{max})、血药浓度时间-曲线下面积 $AUC_{0-240\ min}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 分别只有腹腔注射的 1.85%, 1.38%, 1.39% (见表 4); 而灌胃给予枳归八味口服液后进入体循环的二苯乙烯苷就更少, 各时间点的

表4 二苯乙烯苷主要药代动力学参数($\bar{X} \pm s, n=5$)
Tab. 4 Main pharmacokinetic parameters of stilbene glucoside
($\bar{X} \pm s, n=5$)

药代动力学参数	A组	B组
$t_{\max}$ (min)	9.00 ± 4.18	14.00 ± 5.48
$C_{\max}$ (mg/L)	23.79 ± 7.12	0.44 ± 0.40 *
$t_{1/2\alpha}$ (min)	1.30 ± 1.51	23.31 ± 41.62
$t_{1/2\alpha}$ (min)	11.02 ± 4.96	8.08 ± 5.08
$t_{1/2\beta}$ (min)	41.81 ± 34.26	12.90 ± 4.86
$AUC_{0-240\min}$ (mg · min/L)	431.84 ± 77.70	5.96 ± 6.73 *
$AUC_{0-\infty}$ (mg · min/L)	435.89 ± 75.69	6.04 ± 6.68 *

注:与A组比较,* $P < 0.01$ 。 $t_{1/2\alpha}$ 为吸收半衰期, $t_{1/2\alpha}$ 为分布相半衰期, $t_{1/2\beta}$ 为消除相半衰期。

Note: compared with those in group A, * $P < 0.01$. $t_{1/2\alpha}$ is the half-life for the absorption phase, $t_{1/2\alpha}$ is the half-life for the distribution phase, $t_{1/2\beta}$ is the half-life for the elimination phase.

血药浓度大多低于检测限(0.025 mg/L),导致有效血药浓度数据点太少而无法拟合药代动力学参数。

3 讨论

血清样品采用甲醇直接沉淀蛋白,14 000 r/min离心,取上层血清进样,相比滤膜过滤,具有所需血样少、操作简便快速、结果稳定等优点。曾考虑采用氮吹浓缩的方法浓缩样品,以提高检测灵敏度,但由于二苯乙烯苷为水溶性成分,有机溶剂萃取回收率极低,导致灵敏度反而下降;而甲醇沉淀离心后的上层血清中因含有水分,导致氮吹浓缩的效率极低,且精密度不高,变异性太大。故仍采取4倍量甲醇直接沉淀蛋白的方法进行样品处理,检测限和定量限分别为0.025 mg/L和0.106 mg/L,基本能满足检测需要。

药代动力学研究中,大鼠采血多从眼眶静脉丛采血^[10-12],但存在以下缺点:1)操作时对动物刺激较大,大鼠容易挣扎,采血时间准确性易受影响;2)同一只眼睛多次采血后,不容易采出血来;3)血样溶血的发生率较高;4)毛细管反复扎眼角,在感官上易给操作者带来心理负担。因此,本试验采用剪尾取血的方法采集血样,将大鼠置倒扣的泡沫盒中,露出尾巴,剪掉尾尖约1.5 cm,从尾根向尾尖方向轻轻挤压,即可顺利采血。大鼠由于处于黑暗环境,且采血手法轻柔,较安静配合,给药后采血时间易控制(可控制在±30 s内),同一创口可多次采血,每次可采血300~400 μL(可分离出血清150~200 μL),且基本无溶血现象。

二苯乙烯苷是何首乌的主要活性成分之一^[3,13-14],但其在胃肠道吸收不佳^[15],本研究结果也证实了此现象,且二苯乙烯苷口服给药的生物利用度只有腹腔注射的1.38%。何首乌是中药复方制剂杞归八味口服液的君药,其二苯乙烯苷含量也是杞归八味口服液质量检测的指标成分,但其复方成分并不促进二苯乙烯苷在胃肠

道的吸收,反而使吸收变差,导致血药浓度大多低于检测限(0.025 mg/L);由于杞归八味口服液中二苯乙烯苷的临床等效口服剂量仅相当于本试验中二苯乙烯苷所用剂量(60 mg/kg)的20%,甚至更低,故推测二苯乙烯苷可能不是杞归八味口服液发挥药理作用的活性物质。

参考文献

- [1] 刘梦,姚丽伟,陈淑云,等.二苯乙烯苷通过APOE-TREM2介导的抗炎机制研究[J].中药新药与临床药理,2020,31(7):755-761.
- [2] HUANG C, WANG YZ, WANG J, et al. TSG (2,3,4',5-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside) suppresses induction of pro-inflammatory factors by attenuating the binding activity of nuclear factor-κB in microglia[J]. J Neuroinflamm, 2013, 10: 129-141.
- [3] 相聪坤,王蕊,袁志芳.何首乌二苯乙烯苷类提取物对高脂血症大鼠血脂代谢的影响及其抗氧化作用[J].中国药业,2009,18(24):19-20.
- [4] ZHANG W, CHEN XF, HUANG YJ, et al. 2,3,4',5-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside inhibits angiotensin II-induced cardiac fibroblast proliferation via suppression of the reactive oxygen species-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(5): 429-437.
- [5] 赵兴裕.二苯乙烯苷对创伤性脑损伤模型小鼠的神经保护作用[J].中国药房,2016,27(13):1804-1807.
- [6] ZHANG LL, HUANG LH, LI XB, et al. Potential molecular mechanisms mediating the protective effects of tetrahydroxystilbene glucoside on MPP⁺-induced PC12 cell apoptosis[J]. Mol Cell Biochem, 2017, 436(1/2):203-213.
- [7] 赖艳,温悦,贝莹琰,等.HPLC法测定益精灵口服液二苯乙烯苷的含量[J].中国医院用药评价与分析,2011,11(10):915-916.
- [8] 王春英,李敏,袁志芳,等.二苯乙烯苷大鼠在体胃肠吸收动力学研究[J].中草药,2008,39(8):1215-1219.
- [9] 欧阳慧子,任晓亮,王强,等.二苯乙烯苷及其β-环糊精包合物在大鼠体内药代动力学研究[J].天津中医药大学学报,2011,30(3):165-168.
- [10] 何文娟,王伟美,贡莹,等.CYP2D6抑制剂对艾瑞昔布大鼠体内药代动力学的影响[J].中国药业,2020,29(7):71-74.
- [11] 黄钰茹,张景勃,石明芯,等.大鼠口服羟基红花黄色素A的药动学特征研究[J].中国药理学杂志,2020,55(1):39-43.
- [12] 胡欣彤,丁丽琴,李巍,等.大鼠ig牡丹皮提取物后丹皮酚及其代谢产物的药动学研究[J].中草药,2019,50(24):6017-6023.
- [13] 陈冰冰,姜爱玲,张岩.何首乌有效成分二苯乙烯苷的药理活性研究进展[J].中国临床药理学与治疗学,2016,21(6):710-715.
- [14] WU JJ, HU WF, GONG Y, et al. Current pharmacological developments in 2,3,4',5-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside (TSG)[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 811:21-29.
- [15] 王春英,张兰桐,袁志芳,等.何首乌有效成分二苯乙烯苷的药代动力学研究[J].药学报,2002,37(12):955-958.

(收稿日期:2020-08-28)