



# 桂枝茯苓胶囊主要效应成分在比格犬体内的药代动力学

朱克近<sup>1,2,3</sup>, 孙晓萍<sup>1,2,3</sup>, 常秀娟<sup>1,2,3</sup>, 秦建平<sup>1,2,3</sup>, 吕新勇<sup>1,2,3</sup>, 王振中<sup>1,2,3</sup>, 萧伟<sup>1,2,3</sup>\*

- (1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001;  
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001;  
3. 江苏省企业院士工作室, 江苏 连云港 222001))

**[摘要]** 目的:研究桂枝茯苓胶囊中主要成分芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷在比格犬体内的药代动力学特征。方法:比格犬口服给予桂枝茯苓胶囊 0.044 8, 0.179 2 g · kg<sup>-1</sup>后,前肢静脉收集血浆样本,经固相萃取小柱富集后,HPLC-MS/MS 检测血药浓度,DAS 2.0 软件计算药代动力学参数。结果:芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷体内检测定量限分别为 0.25, 2.64, 0.04 μg · L<sup>-1</sup>,不同剂量下芍药苷  $t_{1/2}$  分别为 4.33, 3.62 h;芍药内酯苷  $t_{1/2}$  分别为 6.16, 5.91 h,苦杏仁苷  $t_{1/2}$  分别为 2.43, 1.32 h;各成分体内 AUC<sub>0- $t$</sub>  与剂量有较好相关性。结论:芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷在体内均有较高暴露量,可用二室模型来描述。

**[关键词]** 芍药苷;芍药内酯苷;苦杏仁苷;桂枝茯苓胶囊;药代动力学

桂枝茯苓胶囊是由桂枝茯苓丸经剂型改革而来,其处方来源于东汉·张仲景的《金匱要略》,由桂枝、白芍、茯苓、牡丹皮、桃仁组成,是目前治疗妇科血瘀疾病的首选药,其主要成分有芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷、丹皮酚、肉桂酸等。前期研究表明<sup>[1]</sup>以上单体成分均有抑制离体子宫收缩的作用,本实验将成品中含量较高的芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷作为检测对象,研究其在动物体内的暴露程度,为体内药效实验提供量效方面的支持。

## 1 材料

液相色谱-质谱联用系统(Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX);Finnigan surveyor 高效液相色谱仪,恒温自动进样器,柱温箱,电喷雾离子化接口,三重四极杆质谱仪。

对照品芍药苷、芍药内酯、苦杏仁苷、栀子苷(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110820-200403, 110736-200630, 110749-200410);桂枝茯苓胶囊(江苏康缘药业股份有限公司,每粒 0.31 g,批

号 081001,含量测定每粒含苦杏仁苷 6.21 mg,芍药苷 8.39 mg,芍药内酯苷 1.2 mg);乙腈、甲醇(色谱纯,美国天地公司),乙酸乙酯(分析纯,南京化学试剂有限公司);冰乙酸(色谱纯,Fisher)。

比格犬 3 只,雄性,体重(12 ± 2) kg,由南京亚东实验动物研究中心提供,生产许可证号 SCXK(苏)2007-0013。

## 2 方法

**2.1 色谱条件** Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 色谱柱(2.0 mm × 150 mm, 3 μm),柱温 40 °C,流速 0.2 mL · min<sup>-1</sup>,流动相乙腈-0.1% 乙酸(16:84),进样量 5 μL。

**2.2 质谱条件** 电喷雾离子源(ESI),负离子检测;喷雾电压 3 200 V,鞘气流速 30 mL · min<sup>-1</sup>,辅助气流速 15 mL · min<sup>-1</sup>,毛细管温度 320 °C,碰撞能量 18 V。采集方式为选择性反应检测(SRM),苦杏仁苷  $m/z$  516/323;芍药苷  $m/z$  539/449, 121;芍药内酯苷  $m/z$  539/449, 121;栀子苷(内标)  $m/z$  447/225。

**2.3 样品处理** 取 200 μL 血浆样品,以 0.1% 乙酸稀释至 1 mL,13 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 7 min 后取上清液,以 0.4 mL · min<sup>-1</sup> 流速上预先用 1 mL 甲醇和 1 mL 活化的 Waters oasis HLB 1cc 柱,分别以 1 mL 5% 甲醇、200 μL 20% 甲醇、200 μL 90% 甲醇淋洗,600 μL 甲醇洗脱,洗脱液在 40 °C 下温和氮气吹干,

**[稿件编号]** 20110316021

**[基金项目]** 国家重大新药创制专项(2009ZX09504-004)

**[通信作者]** \* 萧伟,研究员级高级工程师,博士,主要研究方向:中药新型制剂的研究与开发, Tel: (0518) 85521946, E-mail: kanion-xw2010@126.com

**[作者简介]** 朱克近,硕士,主要从事新药在美国的临床试验研究工作, Tel: (0518) 85522009, E-mail: wzhzh-nj@tom.com

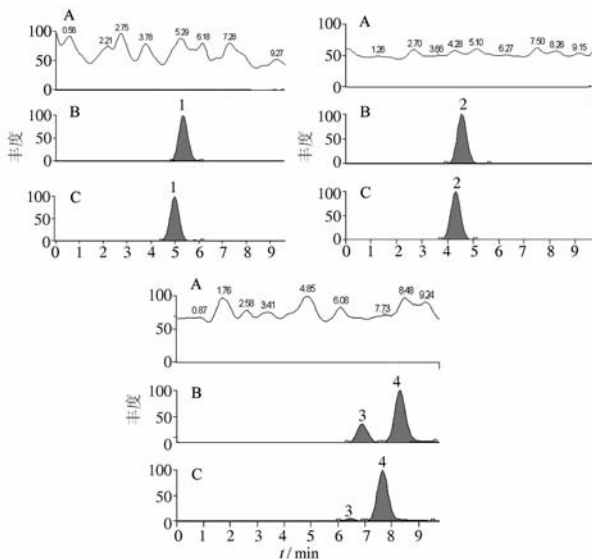
定容至 100  $\mu\text{L}$  进样。

**2.4 给药及血样采集** 3 只受试犬给药前禁食 12 h, 不禁水, 实验前取空白血浆, 将胶囊直接塞入会厌部, 使犬自动吞咽并注入清水 40 mL, 分别于药后 10, 20, 30, 40, 50 min, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 在前肢静脉取血 1.5 mL, 肝素抗凝, 4 800  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 12 min 后收集上清液, 给药 4 h 后统一恢复给食, 血浆于  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  冰冻保存备用。

**2.5 药代动力学参数计算** 采用 DAS 2.0 药代动力学软件计算芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷在体内的药代动力学参数。

### 3 结果

**3.1 方法专属性考察** 血浆内源性物质及其他杂质基本不干扰样品的分离测定, 见图 1。



1. 栀子苷( $m/z$  447/225); 2. 苦杏仁苷( $m/z$  516/323); 3. 芍药内酯苷( $m/z$  539/449.3, 121); 4. 芍药苷( $m/z$  539/449.3, 121); A. 空白血浆; B. 空白血浆加对照品; C. 给药后 50 min 血浆。

图 1 比格犬血浆样品质谱图

**3.2 工作曲线制备** 精密吸取芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷混合对照品溶液, 分别用 50% 甲醇稀释成系列浓度。取空白血浆 200  $\mu\text{L}$ , 分别加入等体积不同浓度的对照品溶液, 使芍药苷的血浆浓度分别为 0.25, 1.00, 4.00, 16.02, 64.06, 256.25, 1 025.00  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 芍药内酯苷的血浆浓度分别为 2.64, 10.57, 42.29, 169.17, 676.67  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 苦杏仁苷的血浆浓度分别为 0.04, 0.17, 0.69, 2.75, 11.00, 44.01, 176.04  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 按血浆处理方法进

行操作, 得回归方程分别为  $Y = 0.064\ 5X + 0.161\ 4$  ( $R^2 = 1.000$ ),  $Y = 0.014\ 4X + 0.037\ 4$  ( $R^2 = 0.999\ 7$ ),  $Y = 0.050\ 3X + 0.006$  ( $R^2 = 0.999\ 9$ )。

**3.3 回收率考察** 制备芍药苷的质控样本(QC)使其质量浓度分别为 4.79, 71.88, 718.75  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 芍药内酯苷的 QC 分别为 3.61, 54.13, 541.33  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 苦杏仁苷的 QC 分别为 0.94, 14.08, 140.83  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 每个浓度 5 份, 另取对照品用流动相稀释, 使其浓度与样品进样浓度一致, 求各对应浓度待测物质的峰面积比, 得芍药苷低、中、高浓度的平均提取回收率分别为 89.88%, 98.82%, 86.48%, 芍药内酯苷低、中、高浓度的平均提取回收率分别为 107.4%, 102.9%, 85.35%, 苦杏仁苷低、中、高浓度的平均提取回收率分别为 89.09%, 106.3%, 83.87%。

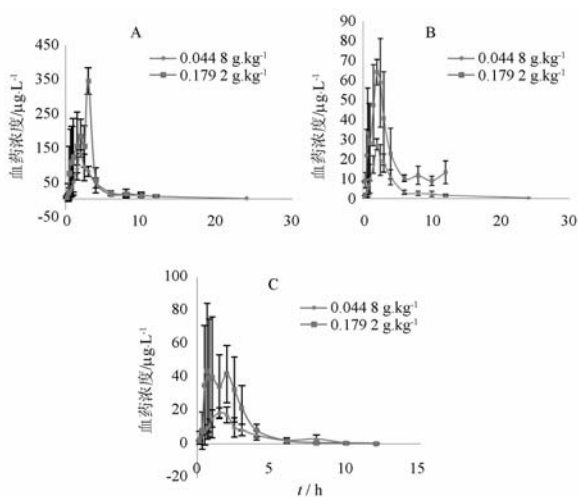
**3.4 定量限与检测限的考察** 取空白血浆 200  $\mu\text{L}$  加入不同浓度的对照品溶液, 制成不同浓度的血浆, 按工作曲线制备方法处理, 进样分析, 每个浓度重复 5 次, 测得  $\text{RSD} < 20\%$  的药物浓度定为定量下限, 测得信噪比大于 3 的药物浓度定为最低检测质量浓度。芍药苷定量下限为 0.25  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最低检测质量浓度为 0.06  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 芍药内酯苷定量下限为 2.64  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最低检测质量浓度为 0.17  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 苦杏仁苷定量下限为 0.04  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最低检测质量浓度为 0.01  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**3.5 日内和日间精密度考察** 按 3.3 项制备 QC 样本, 按 2.4 项处理后进样分析, 计算日内批次的  $\text{RSD}$  (每个浓度 5 份), 重复 3 批, 计算日间批次的  $\text{RSD}$ 。测得芍药苷低、中、高浓度日内  $\text{RSD}$  分别为 6.0%, 4.9%, 9.2%; 日间  $\text{RSD}$  分别为 15%, 9.1%, 5.6%; 芍药内酯苷的日内  $\text{RSD}$  分别为 6.0%, 6.0%, 7.0%; 日间  $\text{RSD}$  分别为 7.9%, 5.2%, 4.2%; 苦杏仁苷日内  $\text{RSD}$  分别为 10.1%, 6.1%, 7.1%; 日间  $\text{RSD}$  分别为 7.8%, 11%, 4.9%。

**3.6 血浆样品稳定性考察** 按 3.3 项制备 QC 样本, 分别考察进样盘放置 12 h, 室温放置 8 h, 冰冻 30 d, 反复冻融 3 次情况下的样本稳定性, 结果表明样本中芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷在上述条件下稳定性好。

**3.7 芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷在比格犬体内的血药浓度** 比格犬给予桂枝茯苓胶囊后, 芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷在体内的经时过程见图 2, 药

代动力学参数见表1。



A. 芍药苷; B. 芍药内酯苷; C. 苦杏仁苷。

图2 灌服不同剂量胶囊后药物在体内的药时曲线

结果显示,苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷在体内的代谢均可用开放二室模型来描述,不同给药剂量下苦杏仁苷在比格犬体内的平均半衰期分别为2.43, 1.32 h,芍药内酯苷的平均半衰期分别为6.16, 5.91 h,芍药苷的平均半衰期分别为4.33, 3.62 h,提示苦杏仁苷在体内消除较快,平均滞留时间较短,芍药内酯苷与芍药苷消除较慢,平均滞留时间长。3种主要成分的血药浓度与剂量呈依赖关系。

#### 4 结论

本文建立了HPLC-MS/MS同时测定血浆芍药苷、芍药内酯苷、苦杏仁苷的方法。实验比较了甲醇沉淀、乙腈沉淀等直接沉淀蛋白的方法,发现芍药苷与芍药内酯苷的回收率低于50%,采用固相萃取小柱富集样本后,方法灵敏度及样本提取回收率明显提高,检测限可达0.01~0.06 μg·L<sup>-1</sup>,是检测血药浓度的有效方法。

表1 灌服不同剂量胶囊后药物在比格犬体内的药代参数( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

药动学参数	0.0448 g·kg <sup>-1</sup>			0.1792 g·kg <sup>-1</sup>		
	芍药苷	芍药内酯苷	苦杏仁苷	芍药苷	芍药内酯苷	苦杏仁苷
AUC <sub>0-t</sub> /h·μg <sup>-1</sup> ·L <sup>-1</sup>	444.95 ± 44.19	98.03 ± 17.65	61.00 ± 18.16	870.62 ± 300.93	245.46 ± 52.35	124.73 ± 30.19
AUC <sub>0-∞</sub> /h·μg <sup>-1</sup> ·L <sup>-1</sup>	471.55 ± 76.24	101.71 ± 14.89	62.75 ± 17.64	874.38 ± 300.43	311.44 ± 46.11	124.94 ± 30.10
MRT <sub>0-t</sub> /h	4.49 ± 0.44	5.11 ± 0.80	3.17 ± 0.49	5.38 ± 2.29	3.98 ± 0.73	2.28.0 ± 0.58
MRT <sub>0-∞</sub> /h	5.34 ± 0.58	6.27 ± 1.79	3.57 ± 0.72	5.49 ± 2.34	7.63 ± 1.91	2.30 ± 0.59
t <sub>1/2</sub> /h	4.33 ± 1.68	6.16 ± 2.40	2.43 ± 1.03	3.62 ± 1.50	5.91 ± 2.47	1.32 ± 0.18
t <sub>max</sub> /h	2.00 ± 0.00	2.00 ± 0.00	1.50 ± 0.50	2.33 ± 0.76	2.00 ± 0.50	1.11 ± 0.77
CL/L·h <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup>	96.69 ± 15.72	446.97 ± 66.92	748.02 ± 181.96	219.68 ± 64.60	584.43 ± 91.81	1492.44 ± 365.24
C <sub>max</sub> /μg·L <sup>-1</sup>	132.94 ± 10.04	27.42 ± 2.84	19.85 ± 2.92	383.29 ± 353.49	69.80 ± 13.06	63.76 ± 16.87

文献报道<sup>[2]</sup>含芍药苷的复方注射液经犬体内代谢,其半衰期为106~152 min,血浆浓度及AUC<sub>0-t</sub>均随剂量增加而增加;白芍制备的有效部位静脉给药后,芍药苷在犬体内半衰期为59~87 min,有二室模型的特征,且呈线性代谢<sup>[3]</sup>;此外,胡椒、肉桂、小茴香、吴茱萸、花椒的相关成分<sup>[4]</sup>和青藤碱<sup>[5]</sup>能提高白芍中芍药苷的生物利用度,四逆散<sup>[6]</sup>、桃红四物汤<sup>[7]</sup>与当归中的相关成分<sup>[8]</sup>可显著降低芍药苷的生物利用度。本实验桂枝茯苓胶囊中芍药苷的达峰时间为2~2.33 h,平均半衰期分别为4.33, 3.62 h,较文献报道长,提示可能存在药物代谢相互作用。静脉注射液苦杏仁苷,大鼠体内半衰期为69 min,呈三室模型代谢特征,但灌胃给药后体内未见药物原型,而是以野樱苷形式入血<sup>[9]</sup>。桂枝

茯苓胶囊中苦杏仁苷含量较高,但犬体内苦杏仁苷峰浓度及AUC<sub>0-t</sub>均较其他成分低,这可能与口服后肠道酶解有关,后续研究可增加检测其代谢物野樱苷。灌胃给予大鼠芍药内酯苷,达峰时间20 min, t<sub>1/2</sub>为64~70 min, AUC<sub>0-t</sub>和C<sub>max</sub>与剂量呈现良好的线性关系<sup>[10]</sup>。本实验中苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷的AUC<sub>0-t</sub>与剂量有较好相关性,且两个剂量组的平均半衰期均无明显差异,各待测物不同剂量下体内的平均滞留时间相差较小,提示血药浓度与剂量呈依赖关系。其中芍药苷不同剂量下AUC<sub>0-t</sub>均高出其他成分的4倍,体内暴露程度最高,继续探索该活性成分在靶器官中的血药浓度变化趋势将进一步揭示其在作用部位的代谢特征,探索靶器官药物浓度与效应之间的联系。



[参考文献]

- [1] 王振中, 范麒如, 窦霞, 等. 桂枝茯苓胶囊对大鼠体外培养卵巢颗粒细胞增殖的影响及物质基础评价[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(10): 1307.
- [2] 樊天宇, 文红梅, 过科家, 等. 通络冻干粉针中栀子苷、芍药苷 beagle 犬药代动力学研究[J]. 中药药理与临床, 2007; 23(1): 50.
- [3] 杨昭毅. 芍药苷在犬和大鼠体内的药物动力学研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2000.
- [4] 杨祖贻, 裴瑾, 刘荣敏, 等. 温里药配伍提高赤芍效应成分芍药苷生物利用度的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(9): 822.
- [5] Liu Z Q, Zhou H, Liu L, et al. Influence of co-administrated sinomenine on pharmacokinetic fate of paeoniflorin in unrestrained conscious rats[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 99(1): 61.
- [6] 刘东锋, 张莉, 陈婷. 四逆散有效成分芍药苷药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(2): 36.
- [7] 郭春燕, 张力, 姜华. 小鼠灌胃赤芍单味药和桃红四物汤后体内芍药苷的水平比较[J]. 中国临床康复, 2006, 10(47): 206.
- [8] 武洁, 姚楠, 王大为. HPLC-MS/MS 测定大鼠血浆中的芍药苷及其药动学研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(20): 2369.
- [9] 房敏峰, 付志玲, 王启林, 等. 炮制对苦杏仁中苦杏仁苷在大鼠体内代谢的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2684.
- [10] 王巧, 杨汉煜, 刘伟娜, 等. 液相色谱-质谱联用测定大鼠血浆中芍药内酯苷及其药动学研究[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(15): 1170.

## Pharmacokinetics of Guizhi Fuling capsule in beagle dogs

ZHU Kejin<sup>1,2,3</sup>, SUN Xiaoping<sup>1,2,3</sup>, CHANG Xiujuan<sup>1,2,3</sup>, QIN Jianping<sup>1,2,3</sup>, LV Xinyong<sup>1,2,3</sup>,  
WANG Zhenzhong<sup>1,2,3</sup>, XIAO Wei<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China;

3. Enterprises Academician Workstations in Jiangsu Province, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate pharmacokinetic parameters of peoniflorin, albiflorin and amygdaloside after administration of Guizhi Fuling capsule in beagle dogs. **Method:** Plasma was collected from forelimb vein of Beagle dogs after oral administration of Guizhi Fuling capsule. HPLC-MS/MS method was used to determine the concentrations of constituents in plasma. The pharmacokinetic parameters were analyzed by program DAS 2.0. **Result:** The limit of quantitation of peoniflorin, albiflorin and amygdaloside were 0.25, 2.64, 0.04  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively. After administrated with different doses, half-life of peoniflorin in dogs were 4.33, 3.62 h, albiflorin were 6.16, 5.91 h, amygdaloside were 2.43, 1.32 h. The  $\text{AUC}_{0-t}$  of all components were related to dose. **Conclusion:** The pharmacokinetic course of peoniflorin, albiflorin and amygdaloside can be described by two-compartment model, and these components have high expose.

[Key words] peoniflorin; albiflorin; amygdaloside; Guizhi Fuling capsule; pharmacokinetics

doi:10.4268/cjcmm20110815

[责任编辑 马超一]