

银杏叶片中银杏黄酮在 Beagle 犬体内的药动学研究

王大力¹, 狄斌^{2*}, 李龙², 程明川² (1.浙江省湖州市中心医院, 浙江 湖州 313000; 2.中国药科大学, 南京 210009)

摘要: 目的 以槲皮素为代表, 研究银杏叶片中银杏黄酮类成分在 Beagle 犬体内的药动学特征。方法 Beagle 犬口服给药银杏叶片后, 按设定时间静脉采血。血样经固相萃取、酸水解后, 以 HPLC-ECD 测定不同时间点血浆中槲皮素的浓度。应用 DAS 数据处理软件对数据进行统计学处理。结果 口服给药后, 槲皮素在 Beagle 犬体内的药动学过程符合二房室模型, 其主要药动学参数为 $t_{1/2\alpha}$ 5.67 h, AUC_{0-t} 63.8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, C_{max} 15.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结论 建立的方法简单、灵敏、准确, 可用于研究以槲皮素为代表的银杏黄酮类成分的药动学特征, 为银杏叶片的临床应用提供了依据。

关键词: 银杏黄酮; 槲皮素; 高效液相色谱-电化学检测法; 药动学

中图分类号: R945.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)06-0483-04

Pharmacokinetics of Ginkgo Flavones in Ginkgo Leaf Tablets in Beagle Dogs

WANG Dali¹, DI Bin^{2*}, LI Long², CHENG Mingchuan² (1. The Central Hospital of Huzhou of Zhejiang, Huzhou 313000, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate pharmacokinetics of ginkgo flavones in Beagle dogs by quercetin, a typical aglycone of ginkgo flavones. **METHODS** Blood samples were collected at scheduled time points after a single oral administration of ginkgo leaf tablets. The concentration of quercetin in plasma was determined by HPLC-ECD after solid-phase extraction (SPE) and hydrolyzed by HCl. The main parameters of pharmacokinetics were calculated by DAS software. **RESULTS** The concentration-time course of quercetin was best fitted to a two-compartment model after oral administration. The main pharmacokinetic parameters were $t_{1/2\alpha}$ 5.67 h, AUC_{0-t} 63.8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, C_{max} 15.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive and accurate. It provides an important method for the determination and pharmacokinetics study of quercetin. **KEY WORDS:** ginkgo flavones; quercetin; HPLC-ECD; pharmacokinetics

银杏叶为银杏科植物银杏(*Ginkgo biloba* L.)的干燥叶, 具有敛肺、平喘、活血化淤、止痛的功效^[1]。银杏叶制剂主要用于动脉硬化及高血压所致的冠状动脉供血不全、心绞痛、心肌梗塞、脑血栓、脑血管痉挛等症^[2-3], 其有效成分是黄酮和内酯类化合物。槲皮素、山萘酚和异鼠李素是银杏黄酮的最重要的组成成分, 主要以与葡萄糖、鼠李糖等结合成糖苷的形式存在。

目前银杏叶片中银杏黄酮成分的药动学研究少有报道。由于槲皮素是银杏黄酮的主要水解苷元之一, 因此, 目前的药动学研究主要针对该化合物。且仅有少量文献报道了口服银杏提取物后, 生物样本中槲皮素浓度的测定方法^[4-5], 其中包括 LC-MS^[6-7]、HPLC-UV^[8-9]和 HPLC-ECD^[10-11]等多种方法, 但上述方法受样品前处理方法的限制, 灵敏度均不高。本研究采用电化学检测器, 将酸水解与固相萃取法结合, 建立了给药银杏叶片后, 测定酸水解血浆中银杏总黄酮后所得槲皮素苷元总量的方法, 并将该方法成功用于研究银杏叶片

中银杏黄酮类成分在 Beagle 犬体内的药动学特征, 为银杏叶片的临床应用提供了依据。

1 材料

1.1 仪器

2010C 四元泵液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司, 含在线真空脱气机、四元梯度泵、控温自动进样器、柱温箱); Coulochem III 库仑阵列电化学检测器(美国 ESA 公司); Phenomenex C₁₈ 色谱柱(Gemini, 250 mm×4.6 mm, 5 μm); Supelclean LC-18 固相萃取柱[500 mg:(6 mL)⁻¹]。

1.2 试剂

槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110752-200209, 纯度: 98.11%); 银杏叶片(银可络)(深圳海王药业有限公司, 批号: 030905, 每片含总黄酮醇苷 9.6 mg, 萜类内酯 4.8 mg); 甲醇(色谱纯, 美国 Merck 公司); 磷酸(分析纯, 南京化学试剂一厂), 磷酸二氢钠(色谱纯, 瑞士 Fluka 公司); 水(自制纯化水, 美国 PALL 公司 PL5242 纯化水制备系统)。

作者简介: 王大力, 男, 副主任药师 Tel: (0572)2023301-6811 教授 Tel: (025)83271269 E-mail: ddw888@vip.sina.com

E-mail: wangdl660059@sina.com *通信作者: 狄斌, 男, 博士, 副

1.3 动物

成年 Beagle 犬 5 条, 体质量 8~10 kg, ♂, 由中国药科大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号: SCSKXK(苏)2002-0001。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(含 20 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠, 调节 pH 2.8)(56:44); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 分析电极电压: 250 mV。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取槲皮素对照品适量置量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 1 mg·mL⁻¹ 的贮备液。精密量取贮备液适量, 以甲醇为溶剂, 定量稀释制成每 1 mL 含槲皮素分别为 0.010, 0.025, 0.050, 0.10, 0.25, 0.50 和 1.0 μg 的对照品溶液。

2.3 药动学实验

5 条 Beagle 犬, ♂, 给药前一周前肢静脉取空白血浆 50 mL 于肝素化试管中, 离心后置 -20 °C 冷冻待测。口服给药银杏叶片, 每条 2 片(每片含总黄酮醇苷 9.6 mg); 给药时用医用镊将药物放置于 Beagle 犬的咽部, Beagle 犬自然吞咽后再灌服蒸馏水 50 mL。于 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h, 在前肢静脉取血, 每次约取血 3 mL 于肝素化试管中, 离心取血浆置于 -20 °C 立即冷冻待测。

2.4 血浆样品的处理

将冷冻的 Beagle 犬血浆样品于室温下融化, 精密吸取 500 μL, 置 5 mL 离心管中, 精密加入磷酸二氢钠溶液(pH 2.8, 20 mmol·L⁻¹) 1 mL, 混匀 30 s; 将样品全部加载于经预处理过[分别用 5 mL 甲醇, 5 mL 水及 5 mL 磷酸二氢钠溶液(pH 2.8, 20 mmol·L⁻¹)冲洗]的 C₁₈ 小柱(Supelclean LC-18 SPE 柱, 500 mg/6 mL), 用 5 mL 水冲洗杂质, 继以 3 mL 甲醇洗脱, 洗脱液置 10 mL 具旋塞硬质塑料离心管中, 加入 6 mol·L⁻¹ 的 HCl 20 μL, 密封后于 80 °C 水浴加热水解 30 min, 再于 50 °C 水浴氮气流吹干溶剂。残渣用流动相 100 μL 涡旋溶解 3 min, 将溶液转移至 1.0 mL 样品管, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液 20 μL 进样分析。

3 结果

3.1 血浆样品的测定

3.1.1 专属性考察 按“2.1”项下的色谱条件,

取“2.3”项下空白血浆、12 h 的血浆样品和加入 5 ng·mL⁻¹ 槲皮素对照品的空白血浆, 按“2.4”项下方法处理, 另取 20 ng·mL⁻¹ 槲皮素对照品溶液, 各 20 μL, 进样测定。槲皮素的保留时间在 14.3 min 左右, 无杂峰干扰测定, 基线平稳, 色谱图见图 1。本方法具有较高的特异性, 能准确测定血浆中槲皮素的浓度, 且灵敏度较高。

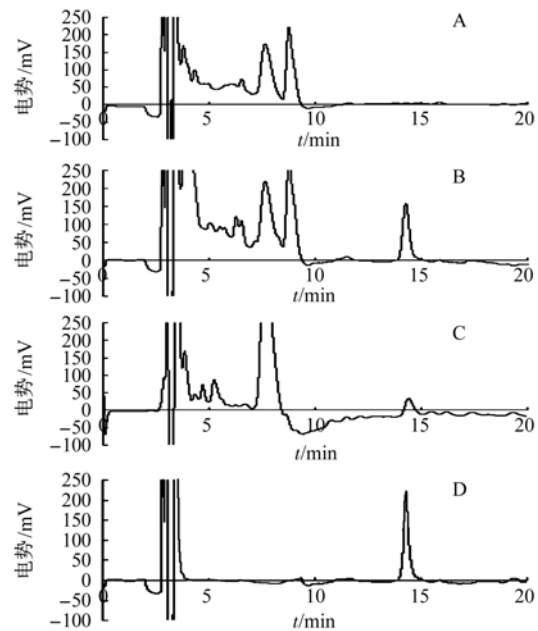


图 1 HPLC-ECD 色谱图

A-空白血浆; B-为含槲皮素的血浆; C-口服给药 12 h 后槲皮素的血浆; D-槲皮素对照品溶液

Fig 1 HPLC-ECD chromatograms

A-blank plasma; B-plasma containing quercetin; C-plasma collected 1h after oral administration of ginkgo leaf tablets; D-the standard solution of quercetin

3.1.2 线性范围及定量限 精密吸取槲皮素对照品溶液适量, 置 5 mL 离心管中, 加入 500 μL Beagle 犬空白血浆, 配制成每 1 mL 含槲皮素 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 ng 的系列血浆样本后, 按“2.4”项下方法处理。以槲皮素的峰面积对其浓度进行线性回归, 求得回归方程 $A = -28\ 669 + 3\ 597\ 122C$ ($r = 0.998\ 0$)。结果表明, 槲皮素在 0.2~20 ng·mL⁻¹ 的血浆浓度内线性关系良好, 其定量限为 0.2 ng·mL⁻¹。

3.1.3 精密度试验和准确度试验 配制含槲皮素 0.5, 2, 10 ng·mL⁻¹ 低、中、高 3 个浓度的血浆样本各 5 份, 连续测定 3 d。根据当日随行标准曲线计算血浆样品浓度, 求得日内精密度, 日间精密度和准确度。结果表明日内、日间 RSD 均小于 10%; 方法准确度为 85%~110%。

3.1.4 提取回收率试验 配制含槲皮素 0.5, 2,

10 ng·mL⁻¹ 低、中、高 3 个浓度的血浆样本各 5 份。按“2.4”项下方法操作测定。同时配制相同浓度的以流动相为基质的对照品溶液各 2 份直接进样测定。对照品血浆测定值和对照品溶液测定值之比为提取回收率。测定结果表明低、中、高 3 个浓度槲皮素提取回收率均分别为 80%，88%和 86%。

3.1.5 稳定性试验 含槲皮素 0.5, 2, 10 ng·mL⁻¹ 低、中、高 3 个浓度的血浆样本，立即按“2.4”项下方法操作测定由当天标准曲线求得其浓度，作为 0 h 的浓度。另考察血浆样品在室温下保存 5 h，在-20 °C 冷冻保存 10 d 及进样溶液 48 h 内的稳定性，结果表明与 0 h 样品测得浓度比较，各情况下的样品测得浓度的偏差均小于 15%，提示实验条件下的血浆样品和进样溶液稳定性均良好。

3.2 银杏叶片中银杏黄酮在犬体内的药动学研究
取“2.3”项下的血浆样品，按“2.4”项下方法，测定血药浓度，血药浓度-时间曲线见图 2。槲皮素的药-时数据用 DAS 2.0 药动学程序处理，拟合的药-时曲线符合口服给药的二房室模型，权重系数为 1/C²，求得口服给药银杏叶片后槲皮素的药动学参数，结果见表 1。

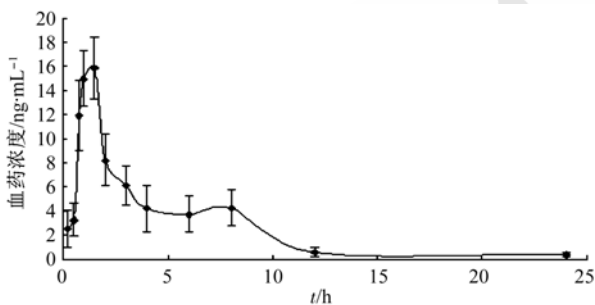


图 2 Beagle 犬口服给药后槲皮素的药-时曲线
Fig 2 Plasma concentration-time curves in Beagle dogs after oral administration of ginkgo leaf tablets

表 1 Beagle 犬口服给药后血浆中槲皮素的药代动力学参数 (n=5)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of quercetin in plasma after oral administration of ginkgo leaf tablets to Beagle dogs (n=5)

药动学参数	均数	标准差
AUC _{0-t} /μg·L ⁻¹ ·h	63.8	30.3
MRT _{0-t} /h	5.24	1.27
VRT _{0-t} /h ²	24.1	8.9
Zeta/1·h ⁻¹	0.122	0.051
T _{1/2z} /h	5.67	2.14
T _{max} /h	1.5	0.4
V _z /F/L·kg ⁻¹	2 346.5	704.6
CL _z /F/L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	286.9	96.2
C _{max} /μg·L ⁻¹	15.9	6.77

4 讨论

本实验建立了给药银杏叶片后，利用酸水解结合固相萃取前处理，采用电化学检测器测定犬血浆中总槲皮素浓度的方法。研究了银杏叶片中以槲皮素为代表的银杏黄酮类成分在 Beagle 犬体内的药动学特征，为银杏叶片的临床应用提供了依据。

本研究比较了 200, 250, 300, 350, 400 mV 不同分析电压对信号的影响，发现在 250 mV 时信噪比达到最大，灵敏度最高，同时优化了酸水解的时间，反应温度及加入盐酸的体积，发现加入 6 mol·L⁻¹ 的 HCl 20 μL，密封后以 80 °C 水浴加热水解 30 min 时，酸水解已完全。定量下限达 0.2 ng·mL⁻¹。为了排除基质的干扰，实验主要调节了流动相的 pH 和固相萃取淋洗剂(水)体积。实验分别考察了 pH 4.0, 3.5, 3, 2.8, 2.5，淋洗剂体积 3, 4, 5, 6 mL 时基质对槲皮素测定的干扰情况。结果发现流动相 pH 值越低槲皮素保留越强，淋洗剂体积越大基质峰越少，综合考虑色谱柱的耐酸性和分析效率，最终确定流动相为 pH 2.8，淋洗剂体积 5 mL。本研究最终建立的经固相萃取，酸水解后 HPLC-ECD 测定方法简单、灵敏、准确，可用于槲皮素的血药浓度分析及其药代动力学研究。

槲皮素苷及其苷元的药动学研究中出现双峰现象。Crespy 等^[12]利用大鼠空肠和回肠进行槲皮素和芦丁原位灌流实验，表明其有效吸收部位可能在肠道上段，并发现 2/3 的槲皮素在灌流过程中吸收进入肠壁，但同时又有 52%的槲皮素以结合物的形式(葡萄糖醛酸苷或硫酸苷)重新分泌入肠腔。另有研究表明^[13]，在人肝脏、肾及小肠中发现胞质体含 β-葡萄糖苷酶，认为槲皮素苷也许通过葡萄糖载体进入肠囊肿，进入门静脉前在此发生水解。本实验中槲皮素在 Beagle 犬体内成二房室模型，图 2 中的次峰可能正是因为肝肠循环所致。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 296-297.
- [2] WANG M, GUZILINUER T. Clinical efficacy of Yinxingdamo Injection combined with antithrombotic therapy for treating the patients with acute coronary syndrome [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(13): 1379-1381.
- [3] MA S W, CHEN L Y, HE S J, et al. Protective effect of ginkgolide K on cerebral ischemia [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(10): 877-880.

- [4] WATSON D G, OLIVEIRA E J. Solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of *Ginkgo biloba* tablets [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci*, 1999, 723(1/2): 203-210.
- [5] WANG F M, YAO T W, ZENG S. Determination of quercetin and kaempferol in human urine after orally administrated tablet of ginkgo biloba extract by HPLC [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33(2): 317-321.
- [6] HONG Y J, MITCHELL A E. Metabolic profiling of flavonol metabolites in human urine by liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(22): 6794-6801.
- [7] WANG L, MORRIS M E. Liquid chromatography–tandem mass spectroscopy assay for quercetin and conjugated quercetin metabolites in human plasma and urine [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 821(2): 194-201.
- [8] SALKA E, NIELSEN, LARS O D. Column-switching high-performance liquid chromatographic assay for the determination of quercetin in human urine with ultraviolet absorbance detection [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci*, 1998, 707(1/2): 81-89.
- [9] JONES D J, LIM C K, FERRY D R, et al. Determination of quercetin in human plasma by HPLC with spectrophotometric or electrochemical detection [J]. *Biomed Chromatogr*, 1998, 12(4): 232-235.
- [10] ERLUND I, ALFTHAN G, SIREN H, et al. Validated method for the quantitation of quercetin from human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci*, 1999, 727(1/2): 179-189.
- [11] JIN D, HAKAMATA H, TAKAHASHI K, et al. Determination of quercetin in human plasma after ingestion of commercial canned green tea by semi-micro HPLC with electrochemical detection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2004, 18(9): 662-666.
- [12] CRESPIY V, MORAND C, MANACH C, et al. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277 (1): 120-126.
- [13] HAN Z. The study on pharmacokinetics of quercetin [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mat Med*(云南中医中药杂志), 2007, 28(2): 45-46.

收稿日期：2011-10-27