

制何首乌中主要药效/毒效成分的生物药剂学分类系统评价研究

曹雪晓¹, 任晓亮¹, 王 萌^{2*}, 孙立丽¹, 邓雁如¹

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617

2. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 301617

摘要: 目的 对制何首乌 5 种主要药效/毒效成分没食子酸、大黄素、二苯乙烯苷、大黄素甲醚和大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷进行生物药剂学分类系统 (BCS) 研究。方法 分别采用平衡溶解度法和外翻肠囊法研究各代表成分的溶解度和渗透性, 采用 2 种软件 Pipeline Pilot 7.5 和 ChemDraw 7.0 预测各成分的溶解性和渗透性参数, 采用美国食品药品监督管理局 (FDA) 标准分别对代表成分实测值与预测值进行经典 BCS 分类研究, 同时评估其相关性。结果 初步判定制何首乌中大黄素、大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷及大黄素甲醚为 BCS IV 类药物; 二苯乙烯苷和没食子酸属于 BCS III 类成分, 渗透性是其吸收过程中主要限制因素。蒽醌类化合物的 BCS 分类研究存在差异, 软件预测存在假阳性。结论 采用体外生物利用度快速评价方法对制何首乌中 5 种主要药效/毒效成分进行 BCS 分类研究, 为中药体内吸收预测和体外安全性评价提供研究思路和实验范例。

关键词: 制何首乌; 溶解度; 渗透性; 生物药剂学分类系统; 药效; 毒效; 没食子酸; 大黄素; 二苯乙烯苷; 大黄素甲醚; 大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷; 平衡溶解度法; 外翻肠囊法; 相关性; 蒽醌; 假阳性; 体外生物利用度; 体内吸收; 安全性

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)13-3451-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.012

A systematic evaluation of biopharmaceutics classification system of main efficacy and toxic ingredients in *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*

CAO Xue-xiao¹, REN Xiao-liang¹, WANG Meng², SUN Li-li¹, DENG Yan-ru¹

1. School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective Biopharmaceutics classification system (BCS) of five main pharmacological/toxic components (gallic acid, emodin, stilbene glycoside, physcion, and emodin-8-O- β -D-glucoside) of *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* (PMRP) were carried out. **Methods** The solubility and permeability of each representative component were studied by equilibrium solubility method and everted intestinal sac method, respectively. Using two softwares (Pipeline Pilot 7.5, ChemDraw 7.0) to predict the solubility and permeability parameters of each component. Classical BCS classification of measured and predicted values of representative components was conducted according to Food and Drug Administration (FDA) standards, and their correlation was evaluated. **Results** The emodin, emodin-8-O- β -D-glucoside, and physcion in PMRP was preliminary determined as BCS IV drugs. THSG and gallic acid belong to BCS III drugs, and permeability was the main limiting factor in their absorption process. There was software which predicts false positives of anthraquinone in BCS classification studies. **Conclusion** In this study, five main pharmacodynamic/toxic components of PMRP were classified by BCS method, which provided data support and technical reference for *in vivo* absorption prediction and *in vitro* safety evaluation of traditional Chinese medicine.

Key words: *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*; solubility; permeability; biopharmaceutics classification system (BCS); pesticide effect; toxic effect; gallic acid; emodin; stilbene glycoside; physcion; emodin-8-O- β -D-glucoside; equilibrium solubility method; everted gut sacs method; correlation; anthraquinone; false positive; bioavailability *in vitro*; absorption *in vivo*; security

收稿日期: 2020-01-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目“基于对偶传播人工神经网络整合生物药剂学的‘丸者缓也’中药制剂理论分子机制研究”(81873191)

作者简介: 曹雪晓, 博士研究生, 从事中药分析研究。Tel: (022)59596221 E-mail: xuehen.3@163.com

*通信作者 王 萌, 博士, 副研究员, 从事中药分析研究。Tel: (022)59596221 E-mail: wangmeng@tjutc.edu.cn

生物药剂学分类系统(BCS)是依据药物的体外溶解性和肠道渗透性的高低,将药物分成 4 大类^[1]:第 I 类为高溶解度-高渗透性药物,其溶解性和渗透性不会限制体内吸收;第 II 类为低溶解度-高渗透性药物,药物渗透性不会限制体内吸收;第 III 类为高溶解度-低渗透性药物,此类药物的体内吸收几乎不受剂型因素影响,其跨小肠上皮细胞的能力是其吸收的限速步骤;第 IV 类为低溶解度-低渗透性药物,这类药物溶解性和透过性均会限制吸收,成药性差。目前,BCS 分类系统已成为近年来新药开发和监督管理强有力的工具之一^[2-4]。不仅用于新药研发阶段候选药物的筛选或进行合理的剂型设计,还可用于预测药物体内相关性。

制何首乌 *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* 始载于《开宝本草》,为蓼科何首乌属植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根的炮制品,具有补肝肾、益精血、乌须发、化浊调脂等功效^[5]。中药所含成分复杂,逐一进行体内过程筛选存在较大的困难,BCS 为其提供了一种体外生物利用度评价方法,将大量实验简化为二维参数,主要从影响药物吸收的 2 个重要参数溶解度和渗透性对药物进行分类,从而对活性或毒性成分进行体外生物利用度评价^[4,6-7],但目前中药领域的应用较少。本研究基于前期研究结果选择具有肝细胞毒性的没食子酸和大黄素^[8-10],主要活性成分二苯乙烯苷,不同极性的无肝细胞毒性的大黄素甲醚和大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷为模型药物^[11],对制何首乌中 5 种主要药效/毒效成分进行 BCS 分类研究,为制何首乌所含活性成分的生物药剂学分类研究提供数据支持。

1 仪器与材料

1.1 材料及试剂

二苯乙烯苷(批号 W13-3-6)、没食子酸(批号 W00-5-4)、大黄素(批号 W00-1-5)、大黄素甲醚(批号 W05-1-6)、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(批号 W17-9-5)对照品均购自天津中新药业股份有限公司,质量分数均>98%;氯化钠、氯化钾、氯化镁、氯化钙、碳酸氢钠、葡萄糖、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、乙腈(色谱级)购自美国 Sigma Aldrich 公司;盐酸购自天津市科密欧化学试剂有限公司;甲酸(色谱级)购自天津市大茂化学试剂厂。

1.2 仪器

H class 超高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;

Milli-Q 超纯水仪,美国 Millipore 公司;H1650-W 离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;TK-20B 型透皮扩散仪,上海锴凯科技贸易有限公司;BP121S 十万分之一天平,德国 Sartorius 公司;SB-3200D 数控超声波清洗器,宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 实验动物

健康雄性大鼠,品系 SD (Sprague-Dawley),级别普通,体质量(250 $\pm$ 10)g,由中国军事科学院提供,许可证号 SCXK-(军)2012-0004,动物伦理审查批准号 TJAB-TJU20160039。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取二苯乙烯苷 4.34 mg、没食子酸 4.90 mg 于 10 mL 量瓶中,称取大黄素 1.52 mg、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 2.35 mg、大黄素甲醚 1.50 mg 于 25 mL 量瓶中,甲醇定容即得对照品储备液。

2.2 色谱条件

Waters BEH RP C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B);采用等度洗脱^[11-12]:二苯乙烯苷(15% A:85% B, 320 nm);没食子酸(10% A:90% B, 273 nm);大黄素(55% A:45% B, 254 nm);大黄素甲醚(60% A:40% B, 254 nm);大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(30% A:70% B, 254 nm);体积流量 0.2 mL/min;柱温 35 $^{\circ}$ C;进样量 5 μ L。

精密度、重复性、稳定性试验中没食子酸、大黄素、二苯乙烯苷、大黄素甲醚和大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷的保留时间 RSD<2%、峰面积 RSD<3%,均符合要求,表明精密度、重复性良好,样品溶液在 24 h 内稳定。5 种成分的平均加样回收率分别为 99.8%、101.2%、101.2%、98.7%、96.9% ($n=6$),均符合方法学考察要求。

没食子酸、大黄素、二苯乙烯苷、大黄素甲醚和大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷的线性回归方程分别为 $Y=11\,270\,X+4\,439$, $r=0.999\,6$; $Y=41\,035\,X+12\,659$, $r=0.999\,5$; $Y=2\,895.5\,X+7\,701.4$, $r=0.999\,8$; $Y=7\,909.6\,X+8\,577.1$, $r=0.999\,8$; $Y=15\,546.57\,X+1\,098.12$, $r=0.999\,9$;结果表明没食子酸、大黄素、二苯乙烯苷、大黄素甲醚和大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷分别在 10~50 mg/mL、0.05~20 μ g/mL、10~500 mg/mL、1~40 μ g/mL、0.22~6.94 μ g/mL 线性关系良好。

2.3 溶液配制

2.3.1 Krebs-Ringer's 肠营养液的配制 称取 NaCl 8.00 g、KCl 0.20 g、MgSO₄ 0.26 g、NaH₂PO₄ 0.065 g、NaHCO₃ 1.00 g 加水溶解,临用前分别加入 CaCl₂ 0.20 g 和葡萄糖 1.00 g,边搅拌边加入超纯水定容至 1 L。

2.3.2 渗透性样品溶液的配制 精密称取二苯乙烯苷、没食子酸、大黄素、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚对照品适量,加 K-R 液溶解并定容至 100 mL,即得二苯乙烯苷 52.0 μg/mL、没食子酸 52.7 μg/mL、大黄素 24.0 μg/mL、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷 18.4 μg/mL、大黄素甲醚 22.7 μg/mL 的供试品溶液。

2.4 制何首乌主要成分的平衡溶解度研究

依据 FDA 标准方法进行平衡溶解度^[13]的测定,取过量的各成分于 250 mL 超纯水中,在 37 °C 水浴中、60 r/min 下磁力搅拌平衡 24 h,使各成分在超纯水(pH 7.0)中饱和,取 200 μL 饱和溶液于 12 000 r/min 离心 5 min,超纯水稀释后,UPLC 分析,实验平行 3 组进行以保证结果的准确性。

2.5 制何首乌主要成分的透过性研究

实验依据文献方法并在实验室适宜的条件下进行^[14]。大鼠实验前禁食 12 h,自由饮水,麻醉后沿腹白线剖开腹部,迅速取出 10 cm 左右肠段立即放入氧气饱和的冷的 Krebs-Ringer's 肠营养液中清洗,除去浆膜层外面的脂肪组织,用玻璃棒将肠道翻转使黏膜面朝外,洗净内容物,切去两端各 1 cm,一端结扎,另一端系于剪去底部的内衬管上,向肠囊内注入空白 Krebs-Ringer's 液。平衡 5 min,将肠囊置于 37 °C 恒温并盛有 100 mL 一定质量浓度的各药液的烧杯中,恒流泵通空气。分别于 15、30、60、90、120 min 取样 0.2 mL,同时补充等体积、新鲜且 37 °C 恒温的空白 Krebs-Ringer's 肠营养液,取样后测量各肠段的长度和内径,计算肠囊的表面积。样品在 12 000 r/min 下离心 5 min,取上清液 UPLC 进样分析,实验平行 3 组进行以保证结果的准确性。

3 结果

3.1 制何首乌各成分在超纯水中的溶解度

根据经典 BCS 理论,参考 FDA 对 BCS 溶解性的标准评判药物溶解度高低:在 37 °C,pH 值在 1~6.8 时,剂量数(D_0)≤1,为高溶解性,反之则为低溶解性。 D_0 是反映药物溶解性与口服吸收关系的参数,体现了药物的溶解性能。

通过计算,二苯乙烯苷、没食子酸、大黄素、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷在水中的平衡溶解度(C_s)分别为 76 590.00、12 020.00、0.12、4.54 μg/mL($n=3$)。其次,依据公式 $D_0=D/(V_0C_s)$ 计算 D_0 (其中 D 为药物的剂量,制何首乌的每日最大剂量为 12 g,结合《中国药典》以及相关文献报道^[15-18],按照制何首乌的每日最大口服剂量确定二苯乙烯苷、没食子酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷的每日最大剂量分别为 84.0、18.52、6.00、6.00、34.32 mg; V_0 为溶解药物所需的体液体积,按照典型生物等效性实验协议规定^[1]为 250 mL; C_s 为药物的溶解度)。

根据上式计算得到制何首乌各代表性成分二苯乙烯苷、没食子酸、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷在超纯水介质中的 D_0 分别为 4.39×10^{-3} 、 6.16×10^{-3} 、200、>24、30.24。结果显示二苯乙烯苷、没食子酸为高溶解性成分,大黄素、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷为低溶解性成分,而大黄素甲醚在超纯水介质中基本无法检测到,也属于低溶解性成分。

3.2 制何首乌中主要成分的渗透性研究

制何首乌中二苯乙烯苷和没食子酸在各时间点的单位肠管面积累积吸收量(Q_n)见图 1,分别计

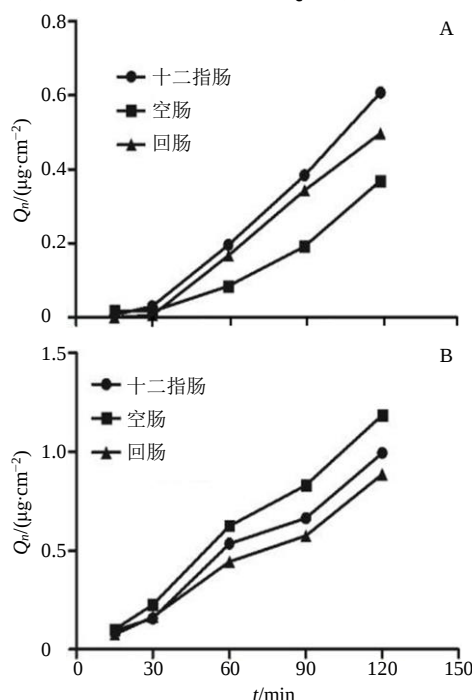


图 1 制何首乌中二苯乙烯苷 (A) 和没食子酸 (B) 在不同时间段的累积吸收曲线

Fig. 1 Cumulative absorption curves of stilbene glycoside (A) and gallic acid (B) in PMRP

算取样终点时 (120 min) 不同药物在肠中的累积吸收量 (Q_z)、渗透系数 (P_{app}) 以及吸收率 (P), 考察药物对肠吸收的影响, 结果见表 1。

$$Q_n = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / A \quad (n \geq 1)$$

$$P_{app} = Q_n / (tC)$$

C_i 为各取样点质量浓度, V 为肠段体积, V_i 为取样体积, A 为肠段表面积, t 为取样终点时间, C 为样品初始质量浓度

二苯乙烯苷和没食子酸在不同肠段的累积吸收存在一定差异, 二苯乙烯苷在十二指肠的吸收最好, 而没食子酸在空肠段的吸收最好。

表 1 各成分的 Q_z 、 P_{app} 、 P ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Q_z , P_{app} , and P of each component ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

成分	肠段	$C/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$Q_z/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$P_{app}/(\times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1})$	$P/\%$
二苯乙烯苷	十二指肠	6.59 ± 0.26	0.608 ± 0.120	1.624 ± 0.080	12.67 ± 0.16
	空肠	5.16 ± 0.15	0.369 ± 0.130	0.986 ± 0.090	9.92 ± 0.12
	回肠	7.30 ± 0.17	0.498 ± 0.220	1.330 ± 0.100	14.04 ± 0.12
没食子酸	十二指肠	13.84 ± 0.36	0.994 ± 0.340	2.620 ± 0.080	26.26 ± 0.23
	空肠	16.02 ± 0.28	1.186 ± 0.150	3.126 ± 0.110	30.40 ± 0.56
	回肠	12.06 ± 0.34	0.887 ± 0.170	2.338 ± 0.090	22.88 ± 0.32

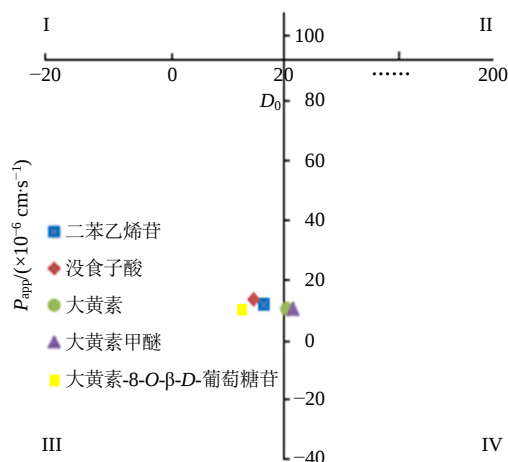


图 2 基于 P_{app} 和 D_0 的制何首乌代表成分经典 BCS 分类
Fig. 2 BCS classification of representative components of PMRP based on P_{app} and D_0

烯苷 (THSG) 和没食子酸均为 BCS III 类药, 大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷均为 BCS IV 类药。

3.3.2 基于软件模拟计算制何首乌中代表成分经典 BCS 分类研究 采用 Pipeline Pilot 7.5^[20] 预测制何首乌主要药效毒效成分在 25 °C 水中的溶解度 ($\lg S$) 及 AlgP 值, 并结合制何首乌各代表成分的服药量推算出 D_0 。采用 ChemDraw 7.0^[21] 预测得到各代表成

分渗透性高低的评判标准以外翻肠囊法得到的美托洛尔 P_{app} 值为判断标准, $P_{app} \geq 8.4 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 为高渗透性物质, 反之则为低渗透性物质, 由此可知本实验中二苯乙烯苷和没食子酸均为低渗透性物质, 大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷无法透过肠壁, 也为低渗透性物质。

3.3 制何首乌主要药效/毒效成分的经典生物药理学分类研究

3.3.1 基于实验方法的制何首乌代表成分经典 BCS 分类 依据经典 BCS 分类标准^[19] 对制何首乌中代表成分进行 BCS 分类, 结果如图 2。其中, 二苯乙

分的油水分配系数 ($\lg P$), 具体结果见表 2。根据预测结果对制何首乌中 5 种代表性成分进行 BCS 分类。以美托洛尔为参比物质, $\lg P \geq 1.632$ 为高渗透性药物, 反之则为低渗透性药物。依据经典 BCS 分类标准^[19] 对制何首乌代表成分进行 BCS 分类。基于软件预测值 D_0 - $\lg P$ 的制何首乌代表成分经典 BCS 分类结果 (图 3) 与基于 D_0 - AlgP 的经典 BCS 分类结果相同, 二苯乙烯苷 (THSG)、没食子酸与大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷为 BCS III 类药, 而大黄素、大黄素甲醚为 BCS I 类药。

3.3.3 软件预测值假阳性与假阴性结果排查 以预

表 2 制何首乌代表成分预测结果

Table 2 Prediction results of representative components of PMRP

成分	$\lg S/$ ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$S/$ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	D_0	AlgP	$\lg P$
二苯乙烯苷	-2.509 0	1.259 0	0.267 0	0.918	0.830
没食子酸	-0.291 0	87.047 0	0.000 9	0.733	0.420
大黄素	-2.258 0	1.492 0	0.016 1	2.568	1.740
大黄素甲醚	-2.798 0	0.453 0	0.053 0	2.794	2.000
大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷	-2.108 0	3.370 0	0.040 7	0.638	-0.100

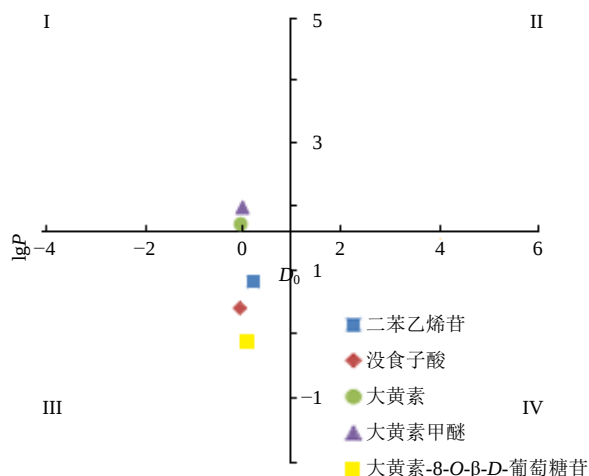


图 3 基于软件预测值 D_0 和 $\lg P$ 的制何首乌代表成分经典 BCS 分类结果

Fig. 3 BCS classification of representative components of PMRP based on software prediction value D_0 and $\lg P$

测 D_0 值为横坐标, 实测 D_0 值为纵坐标, 对软件预测得到的溶解性参数 D_0 进行假阳性、假阴性结果排查。以溶解性高低临界值 1 为标准, 坐标轴相交在点 (1, 1) 处, 以此确定坐标象限图, 如图 4, 可知软件预测的大黄素、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷和大黄素甲醚的 D_0 值为假阳性结果。

以外翻肠囊法得到的制何首乌各代表成分的渗透系数 P_{app} 为准, 对软件预测得到的渗透性参数 $\lg P$ 假阳性、假阴性结果进行排查, 如图 5 可知, 大黄素和大黄素甲醚的 $\lg P$ 值为假阳性结果。

4 讨论

本研究在前期研究基础上利用实验方法及两种软件模型对制何首乌中主要药效/毒效成分进行生物药剂学分类研究, 对口服中药制何首乌的多种成

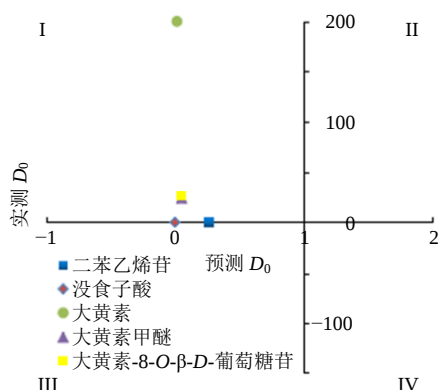


图 4 基于溶解性参数预测值的制何首乌代表成分经典 BCS 分类结果

Fig. 4 BCS classification of representative components of PMRP based on prediction of solubility parameters

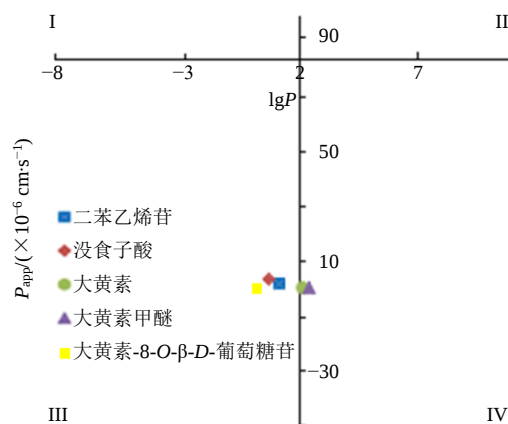


图 5 基于透过性参数预测值的制何首乌代表成分经典 BCS 分类结果

Fig. 5 BCS classification of representative components of PMRP based on prediction of permeability parameters

分进行生物利用度的体外评价。在考察 BCS 方法对中药活性成分适用性的同时, 评估实验方法与软件预测方法对制何首乌各代表成分 BCS 分类结果的相关性。

实验方法 BCS 分类结果初步判定制何首乌中大黄素、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷及大黄素甲醚为 BCS IV 类药物, 根据软件预测值及分类标准大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷被分为 BCS III 类药物, 而大黄素和大黄素甲醚为 BCS I 类药物, 蒽醌类成分 BCS 分类研究中实验方法和软件预测结果存在差异。研究发现实际中, 大黄素和大黄素甲醚为多羟基的蒽醌类化合物, 具有一定的酸性, 在 pH 7.0 超纯水介质中难以成盐, 溶解性不好, 故为低溶解性药物, 与文献报道基本一致^[22], 而在软件模拟中预测为易溶性导致分类结果出现假阳性。文献报道的大黄素透过性实验多采用饱和甲醇溶液稀释而成, 且加入 *N,N*-二甲基甲酰胺来增加其溶解度, 故透过性较好^[23-24]; 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷为含蒽醌类结构的大分子化合物, 在软件模拟计算中作为糖苷类成分, 溶解性预测结果较好, 与实验结果存在较大差异^[25], 说明现有的 BCS 预测方法对蒽醌类成分并不完全适用, 有待进一步改进。

制何首乌主要药效成分二苯乙烯苷为多羟基酚类化合物, 高浓度下具有体外肝细胞毒性的没食子酸为有机酸, 二者水溶性均良好, 属于高溶解性物质, 其实验值与软件预测结果一致, 均为 BCS III 类药物, 透过性是药物吸收过程中主要的限制因素, 考虑到药物实际的使用和调剂过程, BCS III 类药物

在符合快速溶出条件下, 极有可能经口服吸收进入体内, 经肝脏代谢累积发挥药效或毒效作用。本研究开发的方法对制何首乌中多种活性或肝细胞毒性成分的体外生物利用度与体内吸收做出初步预测, 可以为中药有效成分成药性评价及安全性体外评价提供新的思路与技术支持。

参考文献

- [1] Amidon G L, Lennernäs H, Shah V P, *et al.* A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of *in vitro* drug product and *in vivo* bioavailability [J]. *Pharm Res*, 1995, 12(3): 413-420.
- [2] Cristofaletti R, Chang C, Dressman J B, *et al.* A comparative analysis of biopharmaceutics classification system and biopharmaceutics drug disposition classification system: A cross-sectional survey with 500 bioequivalence studies [J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102(9): 3136-3144.
- [3] 邢雪, 郭晓, 任晓亮, 等. 杠柳毒苷、杠柳次苷及杠柳苷元生物药剂学分类研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(5): 1082-1087.
- [4] 王秀清, 刘宇灵, 林龙飞, 等. 中药相关生物药剂学分类系统的发展、检测方法及应用 [J]. *中草药*, 2018, 49(12): 2742-2748.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [6] Trivikram R, Pandey I P. Biopharmaceutics classification system-basis for waiver of *in-vivo* bioavailability and bioequivalence studies [J]. *J Chem Pharm Res*, 2015, 7(10): 555-558.
- [7] 刘丹, 封亮, 宋婕, 等. 中药组分整体生物药剂学分类系统研究思路与策略 [J]. *中草药*, 2017, 48(23): 4831-4835.
- [8] 汪祺, 李勇, 王亚丹, 等. 基于分子对接和体外大鼠肝微粒体抑制实验综合考察何首乌中潜在肝毒性成分研究 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(4): 635-640.
- [9] 王婉茹, 洪滨, 单国顺. 何首乌肝毒性作用机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(2): 378-382.
- [10] 郇丹, 李晓菲, 尹萍, 等. 基于炮制减毒思想的何首乌肝毒性物质基础初步研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(10): 2044-2050.
- [11] 王珏, 朱育凤, 姚毅, 等. HPLC 同时测定何首乌中 5 种成分及指纹图谱的建立 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(6): 75-81.
- [12] 戴晖, 蒙凤贞. 高效液相色谱法测定何首乌中二苯乙炔苷及大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷的含量 [J]. *北方药学*, 2016, 13(9): 11-12.
- [13] Ma Z, Cao X X, Guo X, *et al.* Establishment and validation of an *in vitro* screening method for traditional Chinese medicine-induced nephrotoxicity [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2018, doi: 10.1155/2018/2461915.
- [14] US Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutical classification system [S]. 2000.
- [15] 陈晓萌, 张迎春, 林朔, 等. 外翻肠囊法发现元胡止痛片吸收成分群的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(13): 2005-2011.
- [16] 姚晓峰, 仲来福. 人肝癌细胞系 HepG2 在遗传毒物检测中的应用及其进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(2): 145-150.
- [17] Kuruvilla S, Qualls C J, Tyler R D, *et al.* Effects of minimally toxic levels of carbonyl cyanide P-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), elucidated through differential gene expression with biochemical and morphological correlations [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 73(2): 348-361.
- [18] Jaeschke H, McGill M R, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity [J]. *Drug Metabol Rev*, 2012, 44(1): 88-106.
- [19] 张瑞晨, 刘斌, 孙震晓, 等. 何首乌提取物对人正常肝细胞 L02 周期阻滞及凋亡的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2010, 8(6): 554-561.
- [20] Li H, Li J, Liu L, *et al.* Elucidation of the intestinal absorption mechanism of celastrol using the Caco-2 cell transwell model [J]. *Planta Med*, 2016, 82(13): 1202-1207.
- [21] Kim J A, Han E, Eun C J, *et al.* Real-time concurrent monitoring of apoptosis, cytosolic calcium, and mitochondria permeability transition for hypermulticolor high-content screening of drug-induced mitochondrial dysfunction-mediated hepatotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 214(2): 175-181.
- [22] Tetko I, Tanchuk Y V, Kasheva T, *et al.* Estimation of aqueous solubility of chemical compounds using *E*-state indices [J]. *J Chem Inf Comput Sci*, 2001, 41: 1488-93.
- [23] 张艳, 王平, 王进荣, 等. 在体单向肠灌注流模型研究大黄素的大鼠肠吸收特性 [J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(3): 286-290.
- [24] 王平, 孟宪丽, 王进荣, 等. 5 种大黄游离蒽醌大鼠在体肠吸收的单向灌注流法研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(4): 790-792.
- [25] 刘商. 何首乌中大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷的分离纯化与抗癌活性研究 [J]. *新中医*, 2015, 47(4): 264-266.