

异绿原酸 A 在大鼠体内的生物利用度和药物代谢动力学

程漩格, 王素军*, 曾洁, 钟运鸣, 黄丽花, 臧林泉, 陈吉生
(广东药学院药科学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究异绿原酸 A 在大鼠体内的生物利用度和药代动力学,为该制剂的临床应用提供参考。**方法:**建立大鼠血浆中异绿原酸 A 的 HPLC 检测,检测波长 300 nm,流动相甲醇-0.1% 磷酸水(50:50)。考察大鼠经静脉注射(32 mg·kg⁻¹)与灌胃(90 mg·kg⁻¹)给予异绿原酸 A 后的血药浓度变化,利用 3P97 软件计算药动学参数,根据药时曲线下面积 AUC_{0-∞} 和给药剂量,计算异绿原酸 A 的绝对生物利用度。**结果:**异绿原酸 A 在 0.16~110.00 mg·L⁻¹ 线性良好(R²=0.998);质量浓度分别为 0.43, 6.88, 55.00 mg·L⁻¹ 的异绿原酸 A 的提取回收率分别为(89.43±2.84)%, (93.16±3.95)%, (85.91±2.04)%;日内精密度 RSD 分别为 11.8%, 4.0%, 4.0%, 日间精密度 RSD 分别为 6.5%, 5.8%, 5.8%。大鼠静脉注射和灌胃异绿原酸 A 后,异绿原酸 A 在大鼠体内的代谢过程均符合二室模型,消除半衰期分别为(29.49±0.75), (44.48±0.13) min, AUC_{0-∞} 分别为(355.40±32.58), (319.91±51.00) mg·min⁻¹·L⁻¹。异绿原酸 A 在大鼠体内的绝对生物利用度 30.71%。**结论:**异绿原酸 A 在大鼠体内的过程符合线性动力学过程,且代谢快、半衰期短。

[关键词] 异绿原酸 A; 静脉给药; 灌胃给药; 消除半衰期; 绝对生物利用度; 药代动力学

[中图分类号] R969.1; R945; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0079-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160079

Absolute Bioavailability and Pharmacokinetics of Isochlorogenic Acid A in Rats CHENG Xuan-ge, WANG Su-jun*, ZENG Jie, ZHONG Yun-ming, HUANG Li-hua, ZANG Lin-quan, CHEN Ji-sheng (School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study pharmacokinetics and bioavailability of isochlorogenic acid A in rats with different administration way. **Method:** A HPLC method was developed for determination of isochlorogenic acid A in rat plasma. Intravenous and intragastric doses of 32 mg·kg⁻¹ and 90 mg·kg⁻¹ were respectively administered, the concentration of isochlorogenic acid A were determined with HPLC, detection wavelength was set at 300 nm. Pharmacokinetic parameters were calculated with 3P97 software. Absolute bioavailability of isochlorogenic acid A was calculated according to AUC_{0-∞} and doses of isochlorogenic acid A by intravenous and intragastric administration. **Result:** Excellent linear relationship was obtained in the range of 0.16-110.00 mg·L⁻¹ with R² of 0.998. Recoveries of isochlorogenic acid A with three concentrations (0.43, 6.88, 55.00 mg·L⁻¹) were (89.43±2.84)%, (93.16±3.95)% and (85.91±2.04)%. The intra-day RSD were 11.8%, 4.0% and 4.0%. The inter-day RSD were 6.5%, 5.8% and 5.8%, respectively. Metabolic processes of isochlorogenic acid A in rats fitted in with two-compartment model following intravenous and intragastric administration. Elimination half-life were (29.49±0.75) min and (44.48±0.13) min. AUC_{0-∞} were (355.40±32.58), (319.91±51.00) mg·min⁻¹·L⁻¹. Its absolute bioavailability in rats was 30.71%. **Conclusion:** Metabolic processes of isochlorogenic acid A in rats conform to linear dynamics with fast metabolism and short half-life.

[Key words] isochlorogenic acid A; intravenous administration; intragastric administration; elimination half-life; absolute bioavailability; pharmacokinetics

[收稿日期] 20150316(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073141);广东省“十二五”医学重点学科项目(81073141)

[第一作者] 程漩格,在读硕士,从事中药药理与药动学研究,E-mail:exg717@hotmail.com

[通讯作者] *王素军,教授,硕士生导师,从事中药药理与药动学研究,Tel:020-39352561,E-mail:guangdongyao11@163.com

异绿原酸 A 属咖啡酰奎尼酸类中二咖啡酰奎尼酸类。咖啡酰奎尼酸类成分是由奎尼酸和不同数目的咖啡酸酯化形成的一类天然化合物。二咖啡酰奎尼酸类成分在菊科、忍冬科、豆科等植物中分布较广^[1]。常见的二咖啡酰奎尼酸类成分有 3,5-二咖啡酰奎尼酸(异绿原酸 A),3,4-二咖啡酰奎尼酸(异绿原酸 B)和 4,5-二咖啡酰奎尼酸(异绿原酸 C)。现代药理学研究表明二咖啡酰奎尼酸类成分具有抗氧化、抗炎、抗微生物等药理作用^[2-4],但二咖啡酰奎尼酸类化合物受到关注主要是因为其具有抗乙型肝炎病毒(HBV)活性和保肝作用^[5]。最新研究证明异绿原酸 A 具有抑制 HBV 复制,抗 HBV 的活性。

目前临床用于治疗 HBV 药物主要有抗病毒药物和免疫调节剂。抗病毒药物以拉米夫定为代表,免疫调节剂以干扰素为代表。最新研究证明异绿原酸 A 体外抗 HBV 的活性较水飞蓟素和苦参碱强^[6]。药效学试验表明天然的异绿原酸 A 毒性非常低,有望开发成为新型的抗 HBV 药物。乙型肝炎以慢性肝炎患者居多,口服是慢性病患者最常采用的给药方式。目前,异绿原酸 A 的相关研究均局限于从植物提取与药效学机制的探讨,关于其药代动力学领域却未涉及,本实验拟考察异绿原酸 A 在大鼠体内的药代动力学和绝对生物利用度,为该成分的制剂开发提供参考。

1 材料

LC-100 型高效液相色谱仪(上海伍丰公司),TGL-16G 型飞鸽高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。异绿原酸 A 对照品(四川成都普瑞法科技开发有限公司,批号 12022803),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

24 只 SPF 级 SD 大鼠,200 ~ 250 g,雌雄各半,购于广州中医药大学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2008-0020。

2 方法与结果

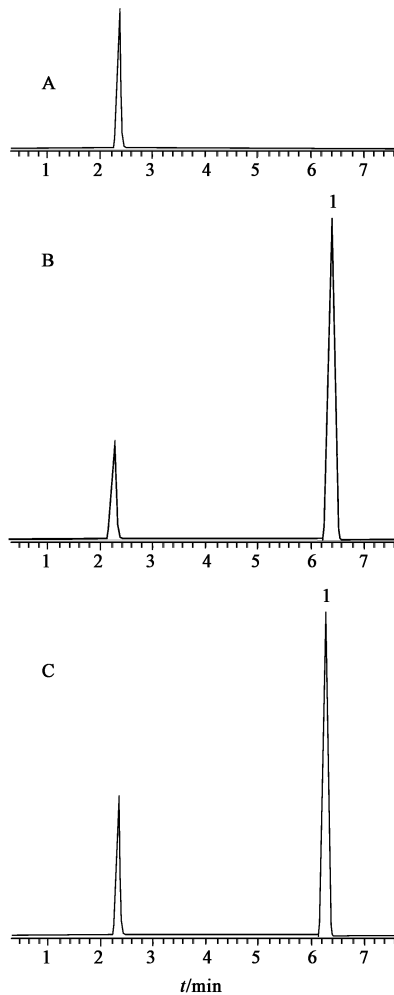
2.1 色谱条件 Shodex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),柱温 30 °C,检测波长 300 nm,流动相甲醇-0.1% 磷酸水溶液(50:50),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL。

2.2 对照品溶液配制 精密称取异绿原酸 A 对照品 2.2 mg,加甲醇溶解并制成 0.44 g·L⁻¹ 贮备液。

2.3 血浆样品预处理 精密吸取血浆样品 100 μL 置离心管中,加入甲醇 300 μL 用旋涡混合器充分振荡 1 min,于 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,

氮气吹干,残渣加甲醇 100 μL 复溶,取上清液进样分析。

2.4 专属性试验 取空白血浆、异绿原酸 A 对照品贮备液 + 空白血浆,给药后大鼠血浆样品,按 2.1 项下条件测定,结果表明空白血浆大鼠体内内源物质对异绿原酸 A 出峰位置不存在干扰,见图 1。



A. 空白血浆;B. 对照品 + 空白血浆;C. 血浆样品;1. 异绿原酸 A

图 1 大鼠静脉注射给药 15 min 后血浆样品 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of plasma sample from rats at 15 min after intravenous administration

2.5 标准曲线及质控样品的制备 精密吸取异绿原酸 A 对照品贮备液适量,加甲醇稀释成系列对照品溶液。吸取系列对照品溶液 50 μL 于空白血浆 150 μL 中,配制质量浓度分别为 0.16,0.43,0.86,1.72,3.44,6.88,13.75,27.50,55.00,110.00 mg·L⁻¹ 的血浆样品溶液,按 2.3 项下方法处理,按 2.1 项下条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 54.57X - 13.44$ ($R^2 = 0.998$),线性范围 0.16 ~ 110.00 mg·L⁻¹。

2.6 精密度试验 取空白组血浆 150 μL,精密加

入异绿原酸 A 对照品贮备液使其质量浓度分别约 0.43, 6.88, 55.00 mg·L⁻¹ (n = 5), 按 2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下条件测定, 每天测定 5 次, 连续 5 d, 计算日内精密度 RSD 分别为 11.8%, 4.0%, 4.0%, 日间精密度依次为 6.5%, 5.8%, 5.8%, 表明仪器精密度良好。

2.7 回收率试验 配制 2.6 项下低、中、高质量浓度的异绿原酸 A 血浆样品各 5 份, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.1 项下条件测定, 与相应质量浓度对照品溶液的峰面积比较, 计算提取回收率分别为 (89.43 ± 2.84)%, (93.16 ± 3.95)%, (85.91 ± 2.04)%。

2.8 稳定性试验 配制 2.6 项下低、中、高质量浓度的血浆样品, 考察样品在室温放置 12 h, 得 RSD 分别为 1.6%, 5.4%, 11.0%; -18 °C 和室温反复冻融 3 次, 得 RSD 分别 5.9%, 0.7%, 4.4%; -80 °C 下保存 1 个月, 得 RSD 分别为 2.4%, 12.1%, 7.9%, 表明异绿原酸 A 在血浆中稳定性良好。

2.9 药物代谢动力学分析 24 只 SD 大鼠随机分为 4 组, 雌雄各半, 每组 6 只。静脉注射组大鼠分别

按异绿原酸 A 低、中、高 (16, 32, 64 mg·kg⁻¹) 剂量静脉注射给药, 灌胃组大鼠按剂量 90 mg·kg⁻¹ 灌胃给予异绿原酸 A, 各组均于给药前及给药后 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 min 眼球后静脉丛采血 0.25 mL, 精密吸取血浆样品 100 μL 置离心管中, 按 2.3 项下方法处理, -20 °C 低温保存待测。

血药浓度-时间数据采用 3P97 药代动力学软件求算药动学参数。药峰浓度 (C_{max}), 达峰时间 (T_{max}) 以实测值计算, 药时曲线下面积 (AUC) 按梯形面积法计算, 时间取 0 ~ t min。计算绝对生物利用度 (F_{abs}) = AUC_{ig} × D_{iv} / AUC_{iv} × D_{ig} × 100%, D_{ig} 和 D_{iv} 分别为大鼠灌胃给药 (ig) 和静脉注射 (iv) 的给药剂量。结果表明异绿原酸 A 在大鼠体内的药动学行为均符合二室模型, 主要药动学参数见表 1。利用 SPSS17.0 软件对低、中、高 3 个剂量组的半衰期 (t_{1/2}) 进行单因素方差分析, 结果显示无显著性差异; 3 个剂量组的 AUC 均有显著性差异, 且随着剂量的增加而增加, 说明异绿原酸 A 在大鼠体内的药动学行为属线性动力学; 根据不同性别大鼠的 t_{1/2} 和 AUC 显示无显著性性别差异存在。

表 1 大鼠静脉注射异绿原酸 A 后的药动学参数 (x̄ ± s, n = 6)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of isochlorogenic acid A after intravenous administration in rats (x̄ ± s, n = 6)

参数	单位	异绿原酸 A 剂量/mg·kg ⁻¹		
		16	32	64
t _{1/2}	min	29.77 ± 0.57	29.49 ± 0.75	29.65 ± 0.88
V	L·kg ⁻¹	0.32 ± 0.91	0.99 ± 0.89	1.28 ± 0.83
CL	mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	92.41 ± 17.45	93.00 ± 15.46	98.00 ± 14.68
AUC _{0-t}	mg·min ⁻¹ ·L ⁻¹	265.65 ± 26.57	302.90 ± 24.40	554.89 ± 25.78
AUC _{0-∞}	mg·min ⁻¹ ·L ⁻¹	282.19 ± 37.32	355.40 ± 32.50	578.76 ± 36.30

2.10 异绿原酸 A 的生物利用度研究 大鼠分别按 32 mg·kg⁻¹ (iv) 与 90 mg·kg⁻¹ (ig) 剂量给予异绿原酸 A, 考察异绿原酸 A 在大鼠体内的绝对生物利用度。血药浓度-时间数据利用药代动力学软件 3P87 进行拟合, 结果表明 ig 和 iv 后, 异绿原酸 A 在大鼠体内的药动学行为均符合二室模型, 主要药动学参数见表 2, iv 后平均血药浓度-时间曲线见图 2。计算异绿原酸 A 在大鼠体内的绝对生物利用度 30.71%。

3 讨论

异绿原酸 A 是许多中成药制剂的有效成分之一, 如双黄连注射液、清开灵颗粒等。随着这类中成药在临床上的广泛应用, 关于异绿原酸 A 吸收特性

表 2 大鼠静脉注射与灌胃给予异绿原酸 A 后的药代动力学参数 (x̄ ± s, n = 6)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of isochlorogenic acid A after intravenous and intragastric administration in rats (x̄ ± s, n = 6)

参数	单位	静脉注射组	灌胃组
t _{1/2}	min	29.49 ± 0.75	44.48 ± 0.13
V	L·kg ⁻¹	0.99 ± 0.89	2.42 ± 0.41
CL	mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	93.00 ± 15.46	89.64 ± 0.75
AUC _{0-t}	mg·min ⁻¹ ·L ⁻¹	302.90 ± 24.40	287.85 ± 44.83
AUC _{0-∞}	mg·min ⁻¹ ·L ⁻¹	355.40 ± 32.50	319.91 ± 51.00
T _{max}	min	-	20.00 ± 3.29
C _{max}	mg·L ⁻¹	-	9.00 ± 0.97

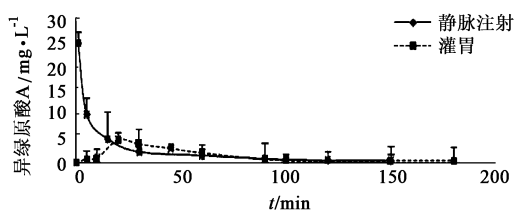


图 2 大鼠静脉注射与灌胃异绿原酸 A 后平均药-时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 2 Plasma concentration-time curves of isochlorogenic acid A after a single intravenous and intragastric administration ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

及代谢动力学的研究就显得比较重要。本文对异绿原酸 A 在正常大鼠体内的药动学行为进行研究,结果显示在考察的质量浓度范围内,随给药剂量的增大,AUC 增大,药物的 $t_{1/2}$ 保持一致,表明异绿原酸 A 在体内符合线性动力学过程,即 $t_{1/2}$ 与剂量无关,AUC 与剂量成正比。

生物利用度考察时,静脉注射组不是不同剂量组中的中质量浓度,对之前实验也是一种佐证。随后采用单次 *ig* 和 *iv* 方式对异绿原酸 A 在大鼠体内的生物利用度进行研究,*ig* 剂量经再三摸索^[6-8],确定了最合适的给药剂量,单次 *ig* 和 *iv* 后,异绿原酸 A 在大鼠体内的药动学过程均符合二室模型,且在体内代谢快, $t_{1/2}$ 短。

前期实验表明异绿原酸 A 在小肠段吸收较好,符合弱酸性异绿原酸 A 在肠道的吸收特性。*ig* 后,绝对生物利用度达 30.71%,可能与异绿原酸 A 的解离常数有关。Hogben 等^[9]研究了药物在小肠的吸收情况,解离常数 2~9 的物质能很快地被吸收,这一点是符合 pH 对肠道吸收规律的影响。

[参考文献]

[1] Wang S Y, Chang H N, Lin K T, et al. Antioxidant properties and phytochemical characteristics of extracts

from *Lactuca indica* [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51 (5):1506-1512.

[2] Könczöla A, Bényi Z, Sipos M M, et al. Antioxidant activity-guided phytochemical investigation of *Artemisia gmelinii* Webb. ex Stechm.: Isolation and spectroscopic challenges of 3,5-*O*-dicaffeoyl quinic acid and its ethyl ester [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 59:83-89.

[3] Park K H, Park M, Choi S E, et al. The anti-oxidative and anti-inflammatory effects of caffeoyl derivatives from the roots of *Aconitum koreanum* R. RAYMOND [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32 (12):2029-2033.

[4] Fiamegos Y C, Kastritis P L, Exarchou V, et al. Antimicrobial and efflux pump inhibitory activity of caffeoylquinic acids from *Artemisia absinthium* against gram-positive pathogenic bacteria [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (4):e18127.

[5] Wu H Y, Hao B J, Cao H C, et al. Anti-hepatitis B virus effect and possible mechanism of action of 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid *in vitro* and *in vivo* [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 50 (4):612-620.

[6] Hao B J, Wu H Y, Wang J G, et al. Hepatoprotective and antiviral properties of isochlorogenic acid A from *Laggeta alata* against hepatitis B virus infection [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144 (1):190-194.

[7] Zha R P, Xu W, Wang W Y, et al. Prevention of lipopolysaccharide-induced injury by 3,5-dicaffeoylquinic acid in endothelial cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28 (8):1143-1148.

[8] McDougall B, King P J, Wu B W, et al. Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42 (1):140-146.

[9] Hogben C A, Schanker L S, Tocco D J, et al. Absorption of drugs from the stomach. II. The human [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1957, 120 (4):540-545.

[责任编辑 刘德文]