

鞣花酸微球在家兔体内的药代动力学分析

陈慧琳, 于龙, 张华*, 周海梅, 李晓娟, 祝世发
(石河子大学药学院, 新疆石河子 832002)

[摘要] 目的:通过家兔口服鞣花酸微球研究其药动学特征。方法:采用锐孔法制备鞣花酸微球,采用 HPLC 测定鞣花酸含量,Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(23:77),流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,检测波长 254 nm,柱温 30 ℃。利用 DAS 2.0 软件分析鞣花酸微球和鞣花酸片的药代动力学参数差异。结果:鞣花酸线性范围 0.01 ~ 1.50 mg·L⁻¹ ($r=0.9994$),最低检测限 0.01 mg·L⁻¹。家兔口服给药后,鞣花酸的药-时曲线出现双峰,可能在家兔体内存在肝肠循环。鞣花酸微球的药动学特征符合二室模型,主要药动学参数分布半衰期($t_{1/2\beta}$)(7.683 ± 2.762) h;消除半衰期($t_{1/2\alpha}$)(7.161 ± 1.275) h;达峰时间(t_{\max})(3.00 ± 0) h;药峰浓度(C_{\max})(1.121 ± 0.259) mg·L⁻¹。结论:鞣花酸微球化后,比鞣花酸片的作用时间更长,生物利用度显著提高。

[关键词] 鞣花酸;微球;药物代谢动力学;片剂

[中图分类号] R969.1;R945;R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)09-0077-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016090077

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160314.1549.002.html>

[网络出版时间] 2016-03-14 15:49

Pharmacokinetics of Ellagic Acid Microspheres in Rabbits

CHEN Hui-lin, YU Long, ZHANG Hua*, ZHOU Hai-mei, LI Xiao-juan, ZHU Shi-fa
(College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

[Abstract] **Objective:** To study on pharmacokinetic characteristics of ellagic acid microspheres in rabbits by oral administration. **Method:** Orifice method was used to prepare ellagic acid microspheres, HPLC was employed to determine the concentration of ellagic acid with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (23:77) at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, detection wavelength was set at 254 nm, column temperature was controlled at 30 ℃. Pharmacokinetic parameters differences of ellagic acid microspheres and ellagic acid tablets were analyzed by DAS 2.0. **Result:** The linear range of ellagic acid was within 0.01-1.50 mg·L⁻¹ with r of 0.9994, quantitation limit was 0.01 mg·L⁻¹. Plasma concentration-time curve of ellagic acid showed double peak, there may be enterohepatic circulation in rabbits. Pharmacokinetic of ellagic acid microspheres could be evaluated by two-compartment model. Main pharmacokinetic parameters were shown as $t_{1/2\beta}$ of (7.683 ± 2.762) h, $t_{1/2\alpha}$ of (7.161 ± 1.275) h, t_{\max} of (3.00 ± 0) h and C_{\max} of (1.121 ± 0.259) mg·L⁻¹. **Conclusion:** By comparing with ellagic acid tablets, ellagic acid microspheres exhibits higher bioavailability and longer action duration in rabbits.

[Key words] ellagic acid; microspheres; pharmacokinetics; tablets

鞣花酸是一种广泛存在于石榴、草莓、葡萄、苹果、蔓越桔、黑莓和胡桃中的一种天然多酚组分。在

[收稿日期] 20150707(012)

[基金项目] 石河子大学大学生研究训练计划项目(SRP2015263);兵团青年科技创新专项(2013CB013);兵团医药专项课题(2011BA056)

[第一作者] 陈慧琳,从事药物新剂型的研究,E-mail:793886624@qq.com

[通讯作者] *张华,硕士,讲师,从事药物新剂型的研究,Tel:0993-2057010,E-mail:zh_pha@shzu.edu.cn

石榴科植物中(石榴叶的提取物及石榴汁),鞣花酸含量尤为丰富。近年来,随着对鞣花酸的深入研究发现,鞣花酸对许多肿瘤均有治疗作用,其中包括白血病、肺癌、肝癌、食管癌、结肠癌,乳腺癌,膀胱癌和前列腺癌等^[1-5]。口服鞣花酸的半衰期较短,生物利用度有限^[6]。为延长鞣花酸的作用时间,提高其生物利用度,国内外进行了鞣花酸的制剂类型研究探索,结果证实采用锐孔法制备鞣花酸微球是可行的,且质量控制方法简单、可靠^[7]。本实验建立了 HPLC 检测家兔血浆中鞣花酸含量的方法,并研究鞣花酸微球在家兔体内的药动学特征及口服生物利用度,为鞣花酸的新制剂研究和开发提供参考。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),TP-300 型超声波提取器(天鹏电子新技术有限公司),TGL16C 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),BS110 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

鞣花酸对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,纯度 >95%,批号 MUST-12110903),鞣花酸微球(自制,批号 20141220),鞣花酸片(自制,批号 20141226,规格 80 mg/片),壳聚糖(北京普博欣生物科技有限责任公司),海藻酸钠(国药集团化学试剂有限公司),肝素钠粉末(上海蓝季科技发展有限公司,批号 100111),乙腈和甲醇为色谱纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

健康家兔 12 只,雌雄兼用,体重 1.8 ~ 2.3 kg,由新疆医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(新)2003-0002,实验前适应性喂养 3 d。

2 方法与结果

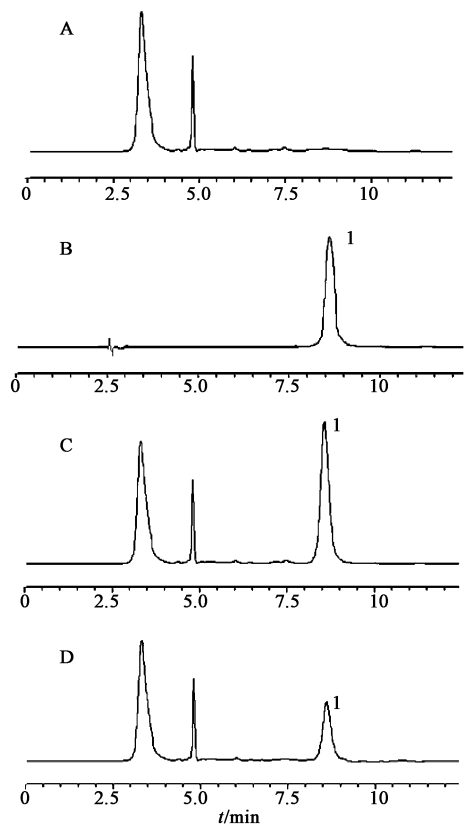
2.1 鞣花酸微球的制备^[7] 称取壳聚糖适量,溶于 25 mL 的 1% 乙酸溶液中,加无水氯化钙搅拌溶解,使氯化钙达一定浓度。另称取一定量鞣花酸溶解于 25 mL 水中,加入一定量海藻酸钠,搅匀,得混悬液。在一定温度的水浴中,将海藻酸钠鞣花酸混悬液缓慢滴加到壳聚糖氯化钙溶液中,在 600 r·min⁻¹ 的转速下搅拌,15 min 后移开水浴,加水(与水浴温度相同)100 mL 不断搅拌,自然冷却至室温,用氢氧化钠溶液调节 pH,新生的微球加戊二醛 0.6 mL 固化 60 min,抽滤,水洗 3 次后抽滤,放入 45 °C 烘箱中烘干,即得。

2.2 鞣花酸片的制备 将鞣花酸、乳糖、淀粉分别过 80 目筛,混匀后加适量淀粉浆制软材,在 20 目筛下制粒,置 50 ~ 60 °C 烘箱中干燥后过 14 目筛整粒,加羟甲淀粉钠和硬脂酸镁充分混匀后压片,

备用^[8]。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取鞣花酸对照品适量,用甲醇溶解并制成 20 mg·L⁻¹ 储备液,于 4 °C 冰箱中保存。待用时精密吸取适量,用甲醇稀释至所需浓度即可。

2.4 色谱条件及专属性考察^[9-10] Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(23:77),流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,检测波长 254 nm,柱温 30 °C。分别考察了空白血浆、鞣花酸对照品、空白血浆 + 鞣花酸对照品、家兔口服鞣花酸微球血浆的色谱图,见图 1。结果显示鞣花酸色谱峰峰形良好,与相邻组分分离完全,血浆内源性成分对测定无干扰,鞣花酸的保留时间约 8.6 min。



A. 空白血浆; B. 对照品; C. 空白血浆 + 鞣花酸; D. 供试品; 1. 鞣花酸
图 1 家兔口服鞣花酸微球后血浆样品 HPLC
Fig. 1 HPLC chromatograms of rabbit plasma samples after oral administration of ellagic acid microspheres

2.5 血浆样品的处理 精密量取经肝素抗凝的血浆样品 500 μL,置于 10 mL 离心管中,加入 50% 磷酸水溶液 15 μL 和 1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 175 μL,涡旋振荡混匀 3 min,加入甲醇 1 mL 和乙腈 2.5 mL,混合沉淀蛋白,超声 20 min,以 2 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液,37 °C 水浴挥干。残

渣加甲醇 300 μL 充分溶解,量取 20 μL 进样^[10],记录峰面积^[11-12],按 2.4 项下条件测定。

2.6 标准曲线绘制^[13] 取肝素抗凝的空白血浆 7 份,每份 500 μL ,分别加入不同质量浓度的鞣花酸对照品溶液 100 μL ,配成鞣花酸质量浓度为 0.005, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 5.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品,按 2.5 项下方法处理,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得鞣花酸回归方程 $Y = 2\ 698.9X + 1\ 002.5$ ($r = 0.999\ 4$),线性范围 0.01 ~ 1.50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.7 精密度和回收率试验 取含鞣花酸质量浓度分别为 0.05, 0.50, 1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆,按 2.5 项下方法处理 ($n = 5$),计算日内精密度的 RSD 分别为 0.6%, 1.5%, 1.5%。取家兔空白血浆,按 2.5 项下方法处理,配成鞣花酸低、中、高浓度的血浆药物溶液 ($n = 5$),质量浓度分别为 0.05, 0.50, 1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,计算鞣花酸低、中、高质量浓度的相对回收率分别为 (95.7 \pm 5.3)%, (96.5 \pm 4.8)%, (96.9 \pm 4.3)%, RSD 3.2%。鞣花酸在血浆中回收率稳定,平均回收率均 > 95%,符合检测要求。

2.8 稳定性考察 取含鞣花酸质量浓度分别为 0.05, 0.50, 1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品,按 2.5 项下方法处理,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 进行 HPLC 分析,计算鞣花酸峰面积的 RSD 4.4%,表明血浆样品在 10 h 内稳定性良好。

2.9 血浆样品的采集与处理 健康的家兔 12 只进行单剂量单次给药,实验前 12 h 禁食不禁水,以开口器撬开兔口,按 80 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 将鞣花酸微球及片剂送至咽喉部,用水冲服。给药后分别在 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 24, 30, 42, 48 h 耳缘静脉取血 2.0 mL,置于肝素抗凝的试管中,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, $-20\ ^\circ\text{C}$ 保存待测^[14],见图 2。血药浓度经药动学软件 DAS 2.0 分析,按赤池信息准则 (AIC) 值最小原则选择房室模型^[14],结果鞣花酸微球与鞣花酸片剂均符合二室模型,药时曲线中出现双峰,主要药动学参数见表 1,结果显示鞣花酸微球较鞣花酸片的 t_{max} 延长。

3 讨论

鞣花酸微球和鞣花酸片在家兔体内代谢过程都呈现双峰现象,鞣花酸微球在体内约 3 h 首次达到峰值,且峰面积较大,约 24 h 出现第 2 个吸收峰,其峰面积比第 1 个峰面积低;鞣花酸片在体内约 30 min 首次达到峰值,约 3 h 出现第 2 个吸收峰,其峰面积也比第 1 个峰面积低。由于普通制剂和缓释制剂均出现双峰,可排除由于微球表面的药物和尚未

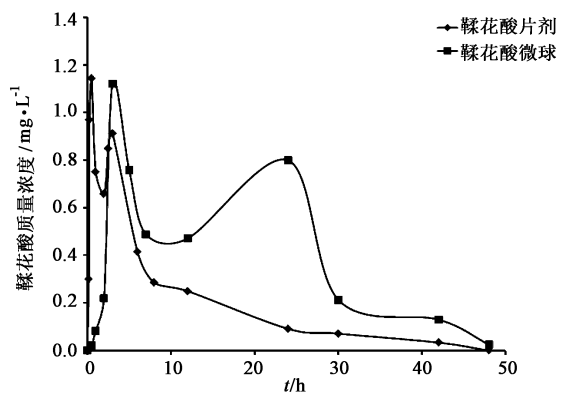


图 2 家兔给予鞣花酸不同制剂后的血药浓度-时间曲线
Fig. 2 Concentration-time curves after oral administration of different preparation of ellagic acid

表 1 家兔口服给予鞣花酸不同制剂后的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Pharmacokinetic parameters of different preparation of ellagic acid after oral administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	微球	片剂
$t_{1/2\alpha}$	h	7.161 \pm 1.275	6.644 \pm 0.682
$t_{1/2\beta}$	h	7.683 \pm 2.762	6.919 \pm 0.389
$t_{1/2K_a}$	h	2.703 \pm 0.414	0.465 \pm 0.021
K_a	h^{-1}	0.256 \pm 0.345	1.490 \pm 0.892
t_{max}	h	3.000 \pm 0	0.500 \pm 0
C_{max}	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	1.121 \pm 0.259	1.143 \pm 0.112
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	22.792 \pm 3.523	9.390 \pm 0.980
AUC_{0-t}	$\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	18.675 \pm 3.577	8.682 \pm 0.749
$\text{MRT}_{0-\infty}$	h	24.244 \pm 3.374	12.722 \pm 0.313
MRT_{0-t}	h	18.236 \pm 0.681	10.299 \pm 0.512

包于囊内的药物晶体所致的“爆破效应”,形成了首个释药高峰,药物从微球内的再次释放形成了第 2 个吸收峰。原因可能是鞣花酸在家兔体内存在肝肠循环,鞣花酸分子在肝内生物转化,在胆囊存储、在胆汁中转运和肠重吸收之间需要延迟一段时间。

由图 2 可知,鞣花酸微球的作用时间明显优于鞣花酸片。研究发现鞣花酸单体在家兔体内的药动学特征为口服血药浓度较低,大部分经胃吸收达峰时间短,快速吸收、分布和消除。由于鞣花酸片比鞣花酸微球的吸收速度常数 (K_a) 大,所以鞣花酸片的 t_{max} 比微球快。片剂的 $t_{1/2\alpha}$ 比微球短,证明了鞣花酸片体内分布速度较快,可能是由于微球化延缓了药物的释放时间,因此分布相对较慢。通过药时曲线下面积 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 计算微球的相对生物利用度 242.7%^[14],较鞣花酸片在家兔体内的生物利用度有了很大的提高。

[参考文献]

- [1] Angelika R, Ronald E W. Ellagic acid content of red raspberry juice as influence by cultivar, processing, and environmental factors[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41(11):1951-1960.
- [2] 王妙飞,程庚金生,张道英,等. 水解法制取五倍子鞣花酸的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 233-234.
- [3] 张目,朱少娟,严泽民,等. HPLC测定地榆中没食子酸和鞣花酸的含量[J]. 现代科学仪器, 2009, 10(5): 69-70.
- [4] 刘振平,陈祥贵,杨潇,等. RP-HPLC同时测定石榴皮提取物中的3种鞣质成分[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19):2645-2647.
- [5] 刘栋,潘小钢,李雅琳,等. 鞣花酸抑制黑素细胞黑素合成及黑素传递的实验研究[J]. 天津医药, 2014, 42(3):208-210.
- [6] Peng Q, Zhang Z R, Sun X, et al. Mechanisms of phospholipid complex loaded nanoparticles enhancing the oral bioavailability[J]. Mol Pharm, 2010, 7(2):565-575.
- [7] 张华,靳诗英,周海梅,等. 鞣花酸微球的制备及体外释放度考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(7):11-13.
- [8] 裴贵珍,陈文,张华,等. 鞣花酸片在家兔体内药代动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 136-138.
- [9] 张华,裴桂珍,李桂华,等. 鞣花酸片剂的制备及其含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(13): 39-42.
- [10] 张华,陈虹,杨丹,等. 鞣花酸大鼠在体肠吸收研究[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(14):1167-1170.
- [11] 宋艺君,刘晓婷,冯丽莉,等. 丹皮酚在肝癌模型大鼠体内的药动学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21):145-148.
- [12] 罗雪梅,丁黎,顾新,等. 盐酸哌甲酯在血浆中的稳定性及其药动学研究[J]. 药科学报, 2014, 49(1): 83-88.
- [13] 杨小玲,刘地发,刘伟,等. 山香圆叶药材中鞣花酸的提取分离与含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10):54-57.
- [14] 舒刚,叶连娟,杨乐,等. 地克珠利肠溶微囊在家兔体内的药代动力学研究[J]. 中国兽医科学, 2013, 43(6):639-644.

[责任编辑 刘德文]