

· 药物代谢 ·

大鼠口服不同形式茯苓三萜类成分提取物后 有效成分的药代动力学分析

温彬宇¹, 闫妍¹, 王维皓², 王昭日³, 刘明川³, 黄佳慧³, 李建荣^{2*}

(1. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 杏辉天力(杭州)药业有限公司, 杭州 311110)

[摘要] **目的:**建立 UPLC-Q-TOF/MS 测定大鼠口服茯苓三萜类成分提取物粉末及软胶囊内容物后土莫酸及去氢土莫酸的血浆药物浓度,研究这 2 个成分的体内药代动力学过程,比较二者在粉末与软胶囊内容物中的药代动力学差异。**方法:**血浆样品采用乙酸乙酯提取,以甘草次酸为内标物,流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~3 min, 50%~70% B; 3~3.5 min, 70%~100% B; 3.5~4.5 min, 100% B),正离子模式,毛细管电压 3 kV,锥孔电压 40 V,离子源温度 120 ℃,脱溶剂温度 500 ℃,脱溶剂气流速 800 L·h⁻¹。**结果:**软胶囊内容物中土莫酸和去氢土莫酸药峰浓度(C_{max})及药时曲线下面积(AUC_{0-t})均大于粉末。软胶囊内容物中土莫酸的达峰时间(T_{max})大于粉末,而去氢土莫酸的 T_{max} 则小于粉末。**结论:**植物油的加入促进了土莫酸和去氢土莫酸的吸收,推测由于土莫酸和去氢土莫酸的化学结构不同,剂型变化后会引起吸收速率的改变。

[关键词] 茯苓提取物; 三萜类成分; 土莫酸; 去氢土莫酸; 甘草次酸; 药代动力学; 软胶囊内容物

[中图分类号] R969.1; R284.1; R284.2; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)07-0097-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017070097

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170109.1137.008.html>

[网络出版时间] 2017-01-09 11:37

Pharmacokinetics of Effective Components After Oral Administration of Poria Triterpenoids Extract with Different Forms in Rats

WEN Bin-yu¹, YAN Yan¹, WANG Wei-hao², WANG Zhao-ri³,
LIU Ming-chuan³, HUANG Jia-hui³, LI Jian-rong^{2*}

(1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Sinphar Tian-li (Hangzhou) Pharmaceutical Co. Ltd., Hangzhou 311110, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of UPLC-Q-TOF/MS for determination of tumulosic acid and dehydro-tumulosic acid in rat plasma after oral administration of Poria triterpenoids extract powder and soft capsules content, differences of pharmacokinetics of tumulosic acid and dehydro-tumulosic acid in two forms were compared. **Method:** Liquid-liquid extraction was adopted to extract plasma samples with ethyl acetate, taking glycyrrhetic acid as internal standard, good chromatographic separation was achieved with the mobile phase consisting of 0.1% acetic acid in acetonitrile and 0.1% acetic acid in water for gradient elution. Mass conditions were as following: positive sensitive mode, capillary voltage of 3 kV, ion source temperature of 120 ℃, desolvent

[收稿日期] 20160905(003)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-001);北京中医药大学自主课题(2016-JYB-JSMS-046)

[第一作者] 温彬宇,博士,助理研究员,从事中药药理及药代动力学研究,Tel:010-67689634,E-mail:wen-binyu@163.com

[通讯作者] *李建荣,研究员,从事中药药理及中药毒理研究,Tel:010-64056575,E-mail:jrongliem@sina.com

temperature of 500 °C and desolvation gas flow of 800 L·h⁻¹. **Result:** C_{max} and AUC_{0-t} of tumulosic acid and dehydro-tumulosic acid in soft capsules content were greater than those of powder. T_{max} of tumulosic acid in soft capsules content was longer than that of the powder, but T_{max} of dehydro-tumulosic acid was lower than that of powder. **Conclusion:** These results indicate that vegetable oil can promote the absorption of tumulosic acid and dehydro-tumulosic acid. It is probably that the different form of Poria triterpenoids extract lead to the change of absorption rate due to the different chemical structure of tumulosic acid and dehydro-tumulosic acid.

[Key words] Poria extract; triterpenoids; tumulosic acid; dehydro-tumulosic acid; glycyrrhetic acid; pharmacokinetics; soft capsules content

茯苓为多孔菌科真菌茯苓的干燥菌核,味甘、淡,性平,归心、肺、脾、肾经,具有利水渗湿、健脾、宁心之功效,用于治疗水肿尿少、痰饮眩悸、脾虚食少、便溏泄泻、心神不安、惊悸失眠^[1]。现代药理研究表明茯苓具有抗肿瘤、调节免疫功能、抗炎、抗过敏等方面的生物活性^[2]。其中三萜类成分是茯苓中主要的药效成分之一^[3],具有较强的抗癌和调节免疫作用。这类成分对艾氏腹水瘤、肉瘤 S180 和白血病 L1210 细胞有显著抑制作用,对小鼠 Lewis 肺癌的转移也有一定作用,与环磷酰胺等抗癌药合用有一定的协同作用及免疫增强作用等^[4-6]。此外,茯苓三萜类成分还能够显著降低小鼠血清中天门冬氨酸氨基转移酶和谷氨酸-丙酮酸转氨酶的活性。病理切片清楚地显示茯苓三萜类成分能够显著减轻小鼠肝损伤的程度,对 CCl₄ 所致的小鼠肝损伤有明显治疗作用。其中土莫酸和去氢土莫酸是茯苓三萜类成分中发挥药效的主要活性成分,具有抗肿瘤、抗白血病等药理活性^[7-9]。本课题组前期药理实验结果显示 Lewis 肺癌小鼠口服茯苓三萜类成分提取物粉末抗肿瘤效果较差;据文献报道土莫酸和去氢土莫酸在体内吸收较差^[10]。因此,推测由于这 2 种成分吸收较差从而影响了药效的发挥。本实验以土莫酸及去氢土莫酸为指标成分,通过 UPLC-Q-TOF/MS 对大鼠口服茯苓三萜类成分提取物粉末和茯苓三萜类成分提取物软胶囊内容物后的药代动力学进行比较研究,为茯苓三萜类成分的进一步研究与开发提供实验依据。

1 材料

Synapt G2 型超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS, 美国 Waters 公司), AB135-S 型 1/10 万电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司), ABS2TM 型自动采血仪 (美国 Instech Laboratories, Inc.), 独立通气笼 (461 mm × 274 mm × 229 mm, 意大利 Tecniplast 公司)。

茯苓三萜类成分提取物 [杏辉天力 (杭州) 药业

有限公司,茯苓药材经 70% 乙醇提取、减压浓缩后得茯苓浸膏;茯苓浸膏经反复碱酸处理、水洗等精制步骤,获得三萜类成分质量分数 >50% 的提取物,其中土莫酸、去氢土莫酸质量分数分别为 37%, 27%],茯苓三萜类成分软胶囊内容物 (中国中医科学院中药研究所杨滨研究员制备,称取茯苓三萜类成分提取物粉末,过 100 目筛,加适量植物油分散使溶解,研磨 5 min 使均匀,去气泡,分装,即得,茯苓三萜类成分提取物粉末质量分数 50.1%),去氢土莫酸和土莫酸 (自制,经核磁和质谱鉴定,采用峰面积归一化法计算,纯度均 >98%),甘草次酸 (中国食品药品检定研究院,批号 110723-200612,纯度 99.9%),水为屈臣氏蒸馏水,乙腈、甲酸为质谱级,其他试剂均为分析纯。

健康成年雄性 SD 大鼠,体重 (240 ± 20) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK (京)2012-0001。经北京中医药大学东方医院动物伦理委员会批准,编号 201650。

2 方法与结果

2.1 对照品及内标溶液的配制 精密称取土莫酸、去氢土莫酸对照品 2.536, 2.152 mg, 分别加甲醇定容至 10 mL, 得 2 个成分的储备液; 分别精密量取各对照品储备液, 加甲醇逐级稀释, 得系列对照品溶液, 置于 4 °C 冰箱保存。称取一定量甘草次酸 (内标), 加甲醇定容至 10 mL, 得 13.9 mg·L⁻¹ 内标溶液。

2.2 检测条件^[11]

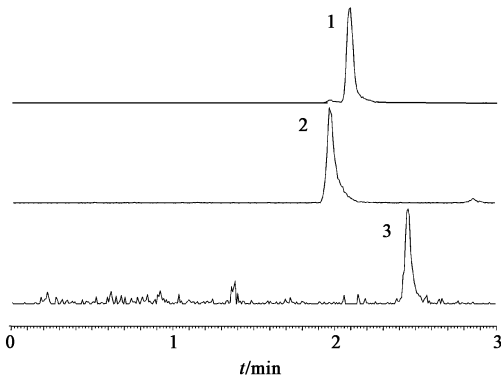
2.2.1 色谱条件 Waters UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈溶液 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 3 min, 50% ~ 70% B; 3 ~ 3.5 min, 70% ~ 100% B; 3.5 ~ 4.5 min, 100% B)。

2.2.2 质谱条件 正离子模式, 毛细管电压 3 kV, 锥孔电压 40 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂温度设置 500 °C, 脱溶剂气流速 800 L·h⁻¹。

2.3 血浆样品处理 吸取血浆 100 μL , 加入内标 25 μL 及 2% 乙酸 25 μL , 涡旋后加入乙酸乙酯 1 mL, 涡旋振荡 10 min, 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 800 μL , 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干, 加乙腈 100 μL 复溶, 涡旋后 14 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液转移至进样小瓶待测。

2.4 方法学考察 取空白大鼠血浆, 分别加入土莫酸及去氢土莫酸对照品溶液, 配制成不同质量浓度的血浆样品, 按 2.3 项下方法处理后进样分析。通过考察方法专属性, 建立标准曲线及线性范围, 并对方法的提取回收率、精密度及稳定性进行研究, 确保测定方法的可靠。

2.4.1 专属性试验 分别取空白血浆、空白血浆 + 土莫酸 + 去氢土莫酸及给药后血浆样品, 按 2.3 项下方法处理, 结果土莫酸、去氢土莫酸及甘草次酸的保留时间分别为 2.14, 2.02, 2.48 min。其中给药后血浆样品的色谱图见图 1。



1. 土莫酸; 2. 去氢土莫酸; 3. 甘草次酸

图 1 大鼠口服茯苓提取物粉末后 1 h 血浆样品 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of rat plasma after oral administration of Poria triterpenoids extract powder at 1 h

2.4.2 标准曲线和定量限 分别取一定量空白大鼠血浆加入不同质量浓度的土莫酸或去氢土莫酸, 使土莫酸质量浓度分别为 1.268, 2.536, 12.68, 25.36, 50.72, 253.6, 507.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 去氢土莫酸质量浓度分别为 2.152, 10.76, 21.52, 43.04, 215.2, 430.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 样品处理方法同 2.3 项, 以指标成分峰面积与内标物峰面积之比为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 结果二者的标准曲线分别为 $Y = 144.09X + 0.6705$ ($R^2 = 0.9985$), $Y = 65.566X - 4.5047$ ($R^2 = 0.9932$), 线性范围依次为 2.536 ~ 507.2, 10.76 ~ 430.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。土莫酸和去氢土莫酸的定量限分别为 2.536, 10.76 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在本模式下, 二者的最低检测限分别为 0.001, 0.001 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4.3 提取回收率及精密度试验 按照 2.4.2 项

下的方法配制低、中、高质量浓度 (2.536, 25.36, 253.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的土莫酸血浆样品和低、中、高质量浓度 (10.76, 21.52, 215.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的去氢土莫酸血浆样品, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下方法测定, 在 1 d 内每个质量浓度平行测定 6 个样品, 见表 1, 结果说明该分析方法符合生物样品测定要求。

表 1 土莫酸及去氢土莫酸的提取回收率及精密度试验 ($n = 6$)

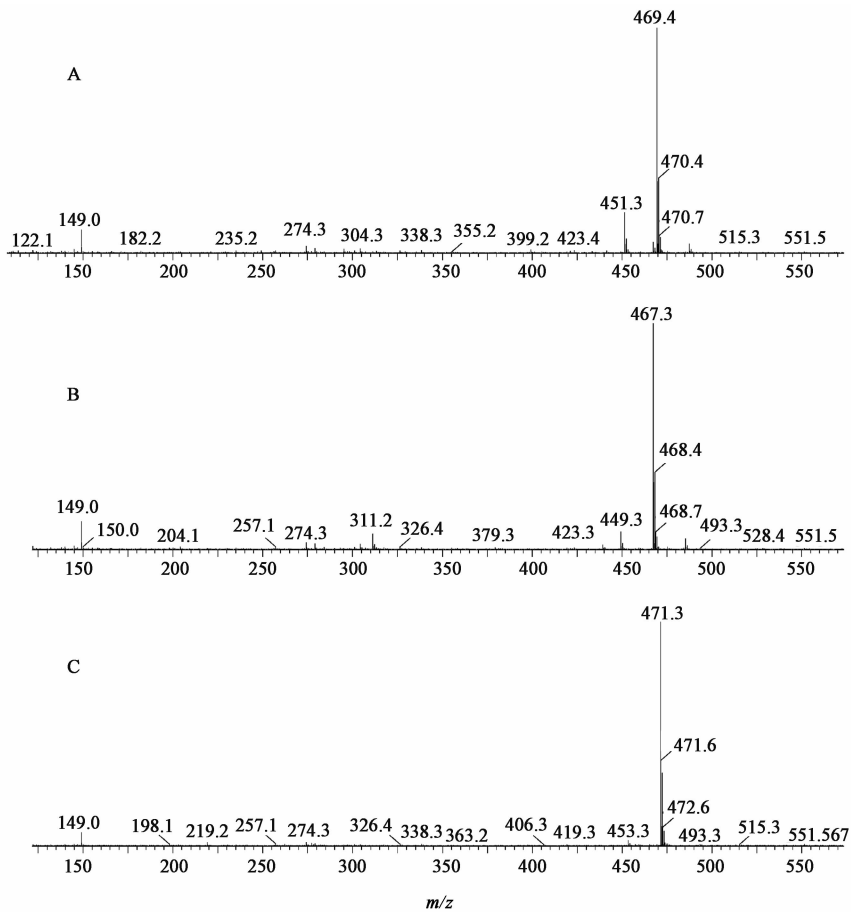
Table 1 Precision and accuracy tests of tumulosic acid and dehydro-tumulosic acid in rat plasma ($n = 6$)

成分	质量浓度 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	提取回收率 $/\%$	日内精密度 RSD $/\%$
土莫酸	2.536	88.92 \pm 11.29	8.4
	25.36	83.32 \pm 8.44	8.3
	253.6	80.55 \pm 10.68	7.1
去氢土莫酸	10.76	92.03 \pm 8.48	10.8
	21.52	83.25 \pm 9.99	9.0
	215.2	80.11 \pm 6.80	8.4

2.5 药代动力学研究 健康 SD 雄性大鼠 14 只, 随机分为茯苓三萜类成分提取物粉末组及茯苓三萜类成分提取物软胶囊内容物组, 每组 7 只, 均按剂型 225 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以茯苓三萜类成分提取物计) 灌胃给药, 每组以给药前的空白血浆为自身对照, 分别于给药前和给药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 24 h 使用自动采血仪采集全血, 振摇, 使与肝素 0.05 mL 充分混匀, 4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 取上清液 (血浆) 100 μL 放入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待处理。血浆样品按 2.3 项下方法处理后进行 UPLC-Q-TOF/MS 分析, 药代动力学参数采用 Kinetica 2000 (v 3.0) 软件以 NCA 模型拟合。分析土莫酸、去氢土莫酸及甘草次酸的质谱图见图 2, 根据特征离子, 选择定量的离子分别为土莫酸 m/z 469.4, 去氢土莫酸 m/z 467.3 及甘草次酸 m/z 471.3。药代动力学分析见表 2 和图 3。

3 讨论

本实验采用液液萃取法处理血浆样品, 通过 UPLC-Q-TOF/MS 进行测定, 结果表明该方法灵敏可靠, 可用于大鼠口服不同形式茯苓三萜提取物后土莫酸及去氢土莫酸的药代动力学研究。预试验考察血浆样品处理方法及检测方法时发现, 按文献 [12] 处理方法采用乙醚或乙酸乙酯进行液液萃取, 乙醚属于管制麻醉品, 不易买到; 乙酸乙酯萃取时加入盐酸酸化后提取, 酸性较大, 易破坏化合物的稳定性导致提取率下降, 因此在样品提取过程中先采用 2%



A. 去氢土莫酸; B. 土莫酸; C. 甘草次酸

图 2 土莫酸、去氢土莫酸及甘草次酸的 MS

Fig. 2 MS of tumulosic acid, dehydro-tumulosic acid and glycyrrhetic acid

表 2 不同形式茯苓三萜类成分提取物中土莫酸和去氢土莫酸的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of tumulosic acid and dehydro-tumulosic acid after oral administration of Poria triterpenoids extract powder and soft capsules content in rats ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

成分	剂型	$C_{max}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	T_{max}/h	$t_{1/2}/\text{h}$	$\text{AUC}_{0-t}/\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
土莫酸	粉末	273.05 ± 151.31	2.72 ± 1.47	7.35 ± 0.62	$3\ 533.24 \pm 1\ 147.11$
	软胶囊内容物	315.40 ± 144.96	3.00 ± 0.93	6.07 ± 1.33	$3\ 761.77 \pm 1\ 076.45$
去氢土莫酸	粉末	264.88 ± 102.78	3.27 ± 1.10	5.43 ± 3.54	$4\ 805.82 \pm 1\ 314.01$
	软胶囊内容物	340.66 ± 111.92	2.57 ± 0.86	4.55 ± 1.99	$5\ 078.25 \pm 1\ 937.07$

乙酸酸化,取得了较好的效果。同时采用 UPLC-Q-TOF/MS 进行测定,极大地缩短了测定时间,样品测定时间仅 4.5 min,提高了测定效率。

本实验灌胃用的茯苓三萜类成分提取物粉末是其有效部位原料。前期药理实验发现茯苓三萜类成分提取物及其固体分散体粉末的吸收均较差,故将提取物粉末用植物油制成软胶囊内容物,以期增加茯苓三萜类成分提取物的吸收。通过对比茯苓三萜类成分提取物粉末及软胶囊内容物的药代动力学参数发现,软胶囊内容物的土莫酸和去氢土莫酸药峰

浓度 (C_{max}) 及药时曲线下面积 (AUC_{0-t}) 均大于粉末,说明软胶囊内容物中植物油的加入促进了土莫酸和去氢土莫酸的吸收。

按照经典房室模型理论,剂型的变化不应该会导致半衰期 ($t_{1/2}$) 的变化。但本实验发现土莫酸和去氢土莫酸的粉末和软胶囊内容物 $t_{1/2}$ 相差较大,原因可能为①研究对象为茯苓提取物,主要成分多,相互作用复杂,且采用非房室模型拟合;②植物油本身作为油性基质避免了土莫酸和去氢土莫酸与血液中蛋白或细胞直接接触,且随着其结构被破坏或其他

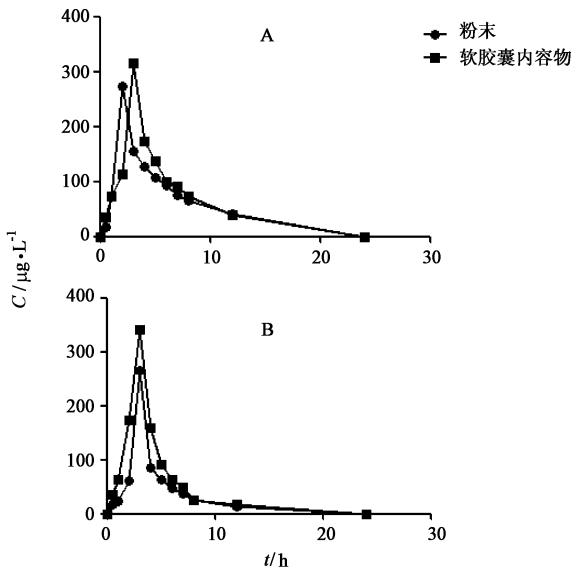


图 3 不同形式茯苓三萜类成分提取物中土莫酸 (A) 和去氢土莫酸 (B) 的药-时曲线

Fig. 3 Plasma concentration-time curves of tumulosic acid (A) and dehydro-tumulosic acid (B) after oral administration of Poria triterpenoids extract powder and soft capsules content

原因逐渐释放药物入血,可能也会改变了二者的消除代谢行为,从而导致了 $t_{1/2}$ 的较大变化。后续将通过改变不同剂型,考察茯苓三萜类成分提取物中有效成分在大鼠体内的吸收和代谢,同时结合药效试验,为茯苓提取物应用于临床提供实验依据。

[参考文献]

[1] 肖培根. 新编中药志[M]. 3 版. 北京: 化学工业出版社, 2002: 890.
[2] 郑捷, 郑宇翔, 肖凤霞, 等. 土茯苓对急性汞中毒大鼠的保护作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (4): 163-166.
[3] 马玲, 尹蕾, 王兵, 等. 茯苓研究进展[J]. 亚太传统中药, 2015, 11 (12): 55-59.
[4] 咎俊峰, 徐斌, 刘军锋, 等. 20 个产地茯苓三萜成

分 RP-HPLC-ELSD 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (21): 65-68.

[5] 张先淑, 胡先明. 茯苓三萜化合物的药理作用及临床应用研究进展[J]. 重庆工贸职业技术学院学报, 2011, 4 (5): 46-50.
[6] 张先淑, 饶志刚, 胡先明, 等. 茯苓总三萜对小鼠肝损伤的预防作用[J]. 食品科学, 2012, 33 (15): 270-273.
[7] 仲兆金, 刘浚. 茯苓有效成分三萜的研究进展[J]. 中成药, 2001, 23 (1): 58-62.
[8] 徐硕, 姜文清, 邝咏梅, 等. 茯苓的化学成分及生物活性研究进展[J]. 西北药学杂志, 2016, 31 (3): 327-330.
[9] 宋潇, 谢昭明, 黄丹, 等. 茯苓 HPLC 指纹图谱及化学模式识别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (17): 36-39.
[10] SONG Z, BI K, LUO X. High-performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic study of dehydrotumulosic acid in the plasma of rats having taken the traditional Chinese medicinal preparation Ling-Gui-Zhu-Gan decoction[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 788 (2): 387-391.
[11] XIAO F, LI Q, LIANG K, et al. Comparative pharmacokinetics of three triterpene acids in rat plasma after oral administration of Poria extract and its formulated herbal preparation: GuiZhi-FuLing capsule [J]. Fitoterapia, 2012, 83 (1): 117-124.
[12] LV C, LI Q, ZHANG Y, et al. A UFLC-MS/MS method with a switching ionization mode for simultaneous quantitation of polygalaxanthone III, four ginsenosides and tumulosic acid in rat plasma: application to a comparative pharmacokinetic study in normal and Alzheimer's disease rats[J]. J Mass Spectrom, 2013, 48 (8): 904-913.

[责任编辑 刘德文]