

· 药物代谢 ·

丹皮酚在肝癌模型大鼠体内的药动学研究

宋艺君¹, 刘晓婷¹, 冯丽莉¹, 王湘¹, 张东星¹, 蔡大勇², 王玥琦^{1*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] **目的:**建立测定肝癌模型大鼠血浆中丹皮酚浓度的超高效液相色谱(UPLC)法,并用于丹皮酚灌胃给药后在大鼠体内的药动学研究。**方法:**大鼠分成3组,分别单次灌胃给予高、中、低剂量259.2, 194.4, 129.6 mg·kg⁻¹丹皮酚,于给药后不同时间点采集血样,UPLC测定血药浓度。选用C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相甲醇-水(70:30),流速0.3 mL·min⁻¹,检测波长274 nm,柱温25℃,进样量2.1 μL。**结果:**丹皮酚在血浆样品中标准曲线线性范围为0.323~41.4 mg·L⁻¹,*r*=0.999 9,其血药浓度数据用WinNonlin软件处理,丹皮酚在肝癌模型大鼠体内的血药浓度-时间过程符合二房室模型,AUC, C_{max}随给药剂量增加而显著增加,T_{max}, T_{1/2β}, CL随给药剂量增加无明显改变。**结论:**该方法简便,快速,重复性好,适用于丹皮酚在肝癌模型大鼠体内的药动学研究。肝癌模型大鼠灌胃不同剂量丹皮酚后的药动学参数存在一定差异。

[关键词] 丹皮酚; 血药浓度; UPLC; 药动学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0145-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120827.1045.007.html>

[网络出版时间] 2012-08-27 10:45

Pharmacokinetic Study of Paeonol in Liver Cancer Model Rat

SONG Yi-jun¹, LIU Xiao-ting¹, FENG Li-li¹, WANG Xiang¹,
ZHANG Dong-xing¹, CAI Da-yong², WANG Yue-qi^{1*}

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. The Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a sensitive ultraperformance liquid chromatography (UPLC) method for determining the plasma concentration of paeonol in liver cancer model rat and to evaluate its pharmacokinetic characteristics. **Method:** Rats were divided into three groups, a single ig dose of 259.2, 194.4, 129.6 mg·kg⁻¹ paeonol was given respectively. Paeonol was separated on a C₁₈ column with methanol: water (70:30) as mobile phase. The plasma concentration of paeonol was determined and its pharmacokinetic parameters were calculated by using WinNonlin 5.2.1. **Result:** The linear range of the method for paeonol was 0.323-41.4 mg·L⁻¹. The plasma concentration-time course showed two compartment model, with the increased dose, AUC, C_{max} has a significant increase, while T_{max}, T_{1/2β}, CL have no significant change. **Conclusion:** The UPLC method for determining paeonol concentration in plasma is simple, rapid, sensitive and suitable for pharmacokinetic study. There are some differences between pharmacokinetic parameters in liver cancer model rats with different dose of paeonol.

[Key words] paeonol; drug blood concentration; UPLC; pharmacokinetic

[收稿日期] 20120513(008)

[基金项目] 国家科技部重大新药创制科技重大专项(2009ZX09502-017);教育部重点研究项目(108019);北京中医药大学创新团队项目(2011-CXD-04)

[第一作者] 宋艺君,在读博士生,从事中药防治常见病的研究,Tel:15201309790,E-mail: songyijun200506@126.com

[通讯作者] *王玥琦,教授,博士生导师,从事中药防治常见病的研究,Tel:010-64286851,E-mail: yueqiwnq@gmail.com

丹皮酚 (paeonol, Pae), 又称牡丹酚, 是从中药徐长卿 (萝藦科植物徐长卿 *Cynanchum paniculatum* Kitag. 的干燥根及根茎) 和牡丹皮 (毛茛科植物牡丹 *Aeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮) 中分离得到的生物活性物质。其药理活性广泛, 具有抗心律失常、抗脑缺血、抗炎、镇痛、抗肿瘤、免疫调节等作用^[1]。药理学研究表明丹皮酚通过抑制 PI3K 通路, 增强诱导人肝癌细胞株凋亡, 从而抑制肝癌细胞的增殖^[2]。本文建立了超高效液相色谱 (UPLC) 测定大鼠血浆中丹皮酚浓度的方法, 采用乙酸乙酯萃取法, 该方法简便, 快速, 重复性好; 通过对灌胃 (ig) 给药后在肝癌模型大鼠体内的药动学研究, 旨在探索其在体内的吸收、分布、代谢、排泄规律, 进而为临床用药提供指导。

1 材料

1.1 药品和试剂 丹皮酚原料药 (批号 101021, 广西亿康药业股份有限公司), 丹皮酚对照品 (批号 0708-9704, 中国药品生物制品检定所), 二-乙基亚硝酸胺 (DEN, 0.95 g·mL⁻¹, Sigma 公司), 甲醇、乙腈 (均为色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司产品), 娃哈哈纯净水 (杭州娃哈哈集团), 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Acquity 型超高效液相色谱仪, PDA 型检测器 (美国 Waters 公司), KQ-500 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), AL104-IC 型电子分析天平 (上海梅特勒-托利多仪器有限公司), QL901 型涡旋混合器 (海门市麒麟医用仪器厂), LG16-W 型台式高速离心机 (北京京立离心机有限公司)。

1.3 动物 清洁级 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 (220 ± 20) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号-SCXK (京) 2008-0013。

2 方法

2.1 动物分组与造模 大鼠 21 只, 按体重均衡随机分为 3 组, 分别为高、中、低剂量组。适应性饲养 1 周后, 给予 ip DEN 50 mg·kg⁻¹ 复制肝癌模型^[3], 每周 2 次。

2.2 给药与取样 大鼠于造模 18 周时, 禁食不禁水 12 h 后, 采用 ig 途径分别给予丹皮酚 129.6, 194.4, 259.2 mg·kg⁻¹。在大鼠清醒状态下, 分别于给药后 0.5, 3, 5, 7, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 min 球后静脉丛取血 0.2 mL 于含有肝素的 EP 管中, 采集完毕后, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取血浆备用。

2.3 血浆样品预处理 精密吸取 25 μL 血浆, 置于 EP 管内, 先加入盐酸 2 μL, 涡旋 10 s, 再加入 3 倍量

体积乙酸乙酯萃取, 涡旋 30 s, 离心 12 000 r·min⁻¹ 8 min, 取上清液置于另外一个 EP 管, 同法再萃取一次, 合并 2 次上清液自然挥干, 残渣用流动相 70 μL 溶解, 涡旋 30 s, 离心 12 000 r·min⁻¹ 8 min, 取上清 55 μL 置于 EP 管, -4 °C 冰箱放置 30 min, 离心 12 000 r·min⁻¹, 8 min, 取上清 40 μL 置于进样瓶中, UPLC 自动进样。

2.4 分析方法

2.4.1 色谱条件 Waters Acquity C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 柱; 流动相甲醇-水 (70:30); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 检测波长 274 nm; 柱温 20 °C; 进样量 2.1 μL。

2.4.2 对照品溶液制备 精密称取丹皮酚对照品 2.07 mg 于 10 mL 的量瓶中, 用流动相制成 0.207 g·L⁻¹ 的丹皮酚储备液, 4 °C 冰箱保存备用。

2.4.3 专属性试验 大鼠空白血浆和 ig 丹皮酚后的大鼠血浆样品, 按照 2.3 项下方法处理, 分别进样分析得到色谱图, 直接进样丹皮酚对照品溶液得到色谱图, 通过 3 张色谱图比较丹皮酚峰位置是否存在干扰。

2.4.4 标准曲线制备 在空白血浆中加入适量丹皮酚对照品溶液, 分别制成质量浓度为 41.4, 20.7, 10.35, 5.18, 2.59, 1.29, 0.65, 0.323 mg·L⁻¹ 的含丹皮酚血浆样品, 按 2.3 项下方法处理, 进样分析。以丹皮酚峰面积 *Y* 对丹皮酚质量浓度 *X* (mg·L⁻¹) 进行线性回归, 建立回归方程。

2.4.5 精密度试验 按照标准曲线项下操作, 分别制备丹皮酚质量浓度为 20.7, 5.18, 1.29 mg·L⁻¹ 的标准空白血浆样本, 按 2.3 项下方法平行操作, 进样分析。于日内平行处理 5 份样品, 考察日内精密度; 每天各测定 5 份样品, 连续 5 d, 考察日间精密度。

2.4.6 绝对回收率试验 取 25 μL 的空白血浆 3 份, 分别加入 3 个浓度的丹皮酚对照品溶液 10 μL, 配置成含丹皮酚 20.7, 5.18, 1.29 mg·L⁻¹ 的含药血浆样品。按照 2.3 项下方法处理, 进样分析记录色谱峰面积; 另用水代替空白血浆制作相同浓度的含药水溶液, 直接进样分析, 记录色谱峰面积。每个浓度平行操作 5 份。以血浆中丹皮酚测得量与水中丹皮酚测得量之比计算绝对回收率。

2.4.7 相对回收率试验 取 25 μL 的空白血浆 3 份, 分别加入 3 个浓度的丹皮酚对照品溶液 10 μL, 配置成含丹皮酚 20.7, 5.18, 1.29 mg·L⁻¹ 的含药血浆样品, 按照 2.3 项下方法处理, 得到丹皮酚色谱峰面积 A₁; 用水代替空白血浆, 按照上述方法操作, 进

样测定,得到丹皮酚色谱峰面积 A2。每个浓度平行操作 5 份。以 $A1/A2 \cdot 100\%$ 计算相对回收率。

2.4.8 稳定性试验 按照标准曲线项下操作,分别制备丹皮酚质量浓度为 20.7, 5.18, 1.29 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准空白血浆样本各 5 份,按照 2.3 项下方法处理,室温保存,于 0, 2, 4, 8, 10 h 分别进样分析,记录丹皮酚峰面积,计算丹皮酚浓度。

2.4.9 药代动力学分析 测试样品直接注入色谱仪中,按照上述色谱条件进行检测,采用标准曲线法计算血药浓度。对血药浓度数据进行房室模型判别,计算 C_{\max} , T_{\max} , $T_{1/2}$, CL, AUC 等药动学参数。

2.4.10 统计学方法 血药浓度数据用 WinNonlin 软件处理,药动学参数用 SPSS 17.0 软件统计进行方差分析,试验所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

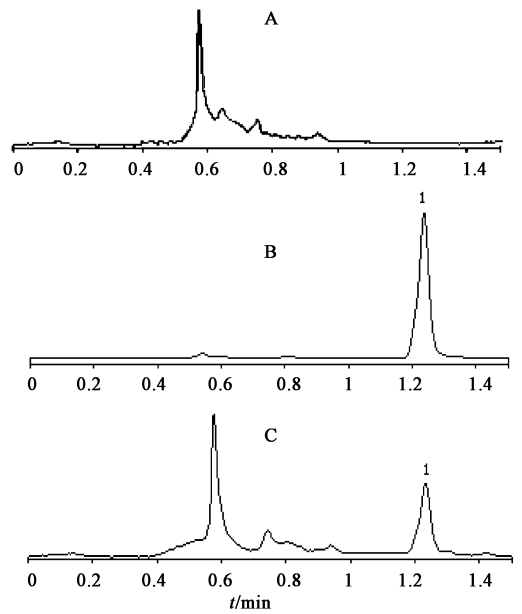
3 结果

3.1 专属性 在上述色谱条件下,丹皮酚的保留时间约为 1.23 min,理论塔板数大于 4 000。空白血浆的内源性物质对丹皮酚的测定无干扰,见图 1。

3.2 标准曲线 以丹皮酚峰面积 Y 对丹皮酚质量浓度 X ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行线性回归,回归方程 $Y = 17\ 141X + 77.68$, $r = 0.999\ 9$ 。丹皮酚在 0.323 ~ 41.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

3.3 精密度 丹皮酚低、中、高浓度日内精密度 RSD 分别为 4.25%, 1.91%, 2.82%; 日间精密度 RSD 分别为 4.89%, 2.49%, 1.8%。精密度 RSD 均小于 4.9%,符合试验要求。

3.4 回收率 丹皮酚低、中、高浓度的绝对回收率分别为 $(89.89 \pm 7.34)\%$, $(90.69 \pm 1.68)\%$, $(92.12 \pm 1.62)\%$, 低、中、高浓度的相对回收率分别为 $(90.36 \pm 3.41)\%$, $(93.34 \pm 2.88)\%$, $(94.24 \pm 2.11)\%$ 。丹皮酚在血浆中回收率稳定,平均回收率均达 89% 以上,符合试验要求。



A. 空白血浆; B. 丹皮酚对照品; C. 给药后血浆样品; 1. 丹皮酚
图 1 丹皮酚的 UPLC

3.5 稳定性 丹皮酚低、中、高浓度的 RSD 分别为 4.00%, 3.93%, 3.34%。表明丹皮酚的含药血浆经过处理后室温放置 10 h,仍可被准确测定。

3.6 丹皮酚在肝癌模型大鼠体内的药动学参数 给大鼠 ig 丹皮酚后的平均血药浓度-时间曲线见图 2,用 WinNonlin 药动学软件处理,房室模型拟合符合二房室模型,主要药动学参数见表 1。

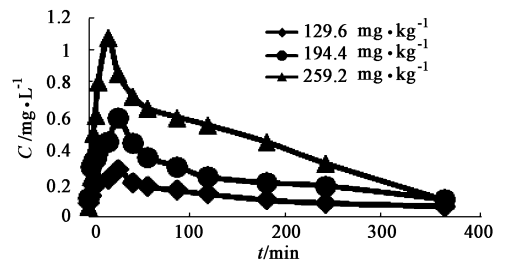


图 2 丹皮酚血药浓度-时间曲线

表 1 丹皮酚主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

丹皮酚剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	AUC/ $\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	T_{\max}/min	$C_{\max}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$T_{1/2\beta}/\text{h}$	CL/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$
259.2	$260.76 \pm 16.34^{2,4)}$	23.32 ± 3.12	$25.18 \pm 0.11^{2,3)}$	1.08 ± 0.30	327.87 ± 27.34
194.4	$189.67 \pm 6.90^{2)}$	24.65 ± 2.45	$19.8 \pm 0.13^{2)}$	1.29 ± 0.21	343.43 ± 34.09
129.6	126.91 ± 4.56	22.62 ± 2.39	13.45 ± 0.03	1.02 ± 0.22	321.19 ± 40.86

注:与小剂量组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

丹皮酚是小分子酚类,熔点低(51 ~ 52 $^{\circ}\text{C}$),易挥发,属于脂溶性成分^[1]。萃取剂考察了乙醚和乙酸乙酯,乙醚本身极性偏小,又容易挥发,造成样品

浓度升高。所以选择乙酸乙酯作为萃取剂。

丹皮酚属于弱酸性的酚类化合物,因此血样处理时采取了先将血浆样品酸化^[4]使得丹皮酚游离,再用乙酸乙酯萃取的办法,同时盐酸也有沉淀蛋白

的作用。最终确定以 10% 的盐酸来酸化样品,得到的样品回收率较高。

丹皮酚测定方法有 GC-MS^[5], HPLC^[6-8]、胶束电动毛细管色谱法^[9], 薄层扫描法^[10], 近红外光谱法^[11]等。本文采用 UPLC 对其进行含量测定。经检测,该方法处理的样品杂质峰少,可以实现丹皮酚和其他干扰物质色谱峰的有效分离。结果表明,仪器精密度高,稳定性好;且方法简单易行,方法的线性、回收率、精密度均符合要求。该方法较 HPLC 明显提高了定性分析的准确度和定量分析的重复性、可靠性,适于丹皮酚的药代动力学研究。

AUC 随剂量增加而增加,基本呈线性关系,这同文献报道的有相似性^[12],表示两者之间关系的方程式为 $Y = 1.032X - 8.327 (r = 0.9993)$, 丹皮酚高、中、低剂量之间的比例为 1:1.5:2,高、中、低剂量的 AUC 值分别为 (260.76 ± 16.34) , (189.67 ± 6.90) , $(126.91 \pm 4.56) \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, AUC 之比为 1:1.49:2.05; C_{max} 分别为 (25.18 ± 0.11) , (19.8 ± 0.13) , (13.45 ± 0.03) , C_{max} 与剂量之间的方程式为 $Y = 0.090X + 1.881, r = 0.998$ 。丹皮酚高、中、低剂量的 CL 基本一致,均值为 (330.83 ± 11.41) , CL 分别为 (327.87 ± 27.34) , (343.43 ± 34.09) , $(321.19 \pm 40.86) \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$,同时剂量改变, $T_{1/2\beta}$ 也无明显改变。初步表明丹皮酚在体内的药动学过程基本符合线性动力学模型。

本试验选择疾病状态的肝癌模型大鼠为研究对象,采用超高效液相色谱法观察丹皮酚在肝癌模型大鼠体内的药动学过程,以期明确丹皮酚在肝癌模型大鼠体内的药动学过程,为指导临床应用有着积极的意义;与正常大鼠药动学参数比较, C_{max} , AUC, $T_{1/2\beta}$ 明显变大,CL 明显降低^[13],这可能与疾病状态有关,具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 李骅,王四旺,张邦乐. 丹皮酚的药理活性和药动学研究进展[J]. 亚太传统医药,2010,6(2):110.
[2] 张荣发. 丹皮酚的研究进展[J]. 中国医药指南,

2008,6(18):110.

[3] Meng Fang, Sylviane Dewaele, Yun-peng Zhao, et al. Serum N-glycome biomarker for monitoring development of DENA-induced hepatocellular carcinoma in rat[J]. Molecular Cancer,2010,9:215.
[4] Jian-Yang Pan, Yi-Yu Cheng. Identification and analysis of absorbed and metabolic components in rat plasma after oral administration of 'Shuangdan' granule by HPLC-DAD-ESI-MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006,42:565.
[5] 武静,王本杰,魏春敏,等. HPLC 法测定丹皮酚血浓度及其胶囊与片剂人体生物等效性研究[J]. 山东大学学报,2007,45(7):726.
[6] 吕士杰,李妍,卢晓晶,等. HPLC 测定芩丹颗粒中黄芩苷、栀子苷和丹皮酚[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):81.
[7] 潘洪平,陈莫,符翠莉. 高效液相色谱法测定桂枝茯苓胶囊中丹皮酚含量[J]. 中国中药杂志,2002,27(8):591.
[8] 孟宪波,郑晖. HPLC 测定柴芍丸中芍药苷、栀子苷及丹皮酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):72.
[9] 陈群,李士敏. 丹皮酚在小鼠血浆和脑组织中的分布研究[J]. 中国药房,2009,20(21):1620.
[10] 郭琳,郭伟英. 丹皮酚制剂不同给药途径在家兔体内的药动学研究[J]. 辽宁医学院学报,2007,28(4):4.
[10] 刘义梅. 薄层色谱法测定知柏地黄丸中丹皮酚的含量[J]. 湖北中医杂志,2005,27(7):52.
[11] 白雁,史会齐,龚海燕,等. 近红外光谱法测定不同厂家六味地黄丸中丹皮酚[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(17):63.
[12] 王瑛兰,李凌军,张微. 天钩降压胶囊中丹皮酚在大鼠体内药代动力学[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):114.
[13] 马丽焱,缪剑华,许旭东,等. 丹皮酚在清醒大鼠体内的药动学和绝对生物利用度[J]. 时珍国医国药,2009,20(2):413.

[责任编辑 聂淑琴]