

· 药物代谢 ·

升麻苷 H-2 在大鼠体内的药代动力学及生物利用度

盖芸芸^{1,2}, 沙春洁², 刘万卉², 韩江滨², 孙严彤^{1,3*}

(1. 吉林大学生命科学院药物代谢研究中心, 长春 130012; 2. 长效缓控释和靶向制剂及技术国家重点实验室, 山东烟台 264003; 3. 吉林大学药学院, 长春 130012)

[摘要] 目的: 研究升麻苷 H-2 在大鼠体内药代动力学特征及生物利用度。方法: 建立大鼠血浆中升麻苷 H-2 的 LC-MS-MS 测定方法, 考察大鼠静脉注射升麻苷 H-2, 灌胃升麻苷 H-2 和升麻提取物后升麻苷 H-2 的血药浓度变化, 并用 DAS 2.0 药动学数据处理软件计算药动学参数。结果: (ESI-) 离子化条件下多反应监测方式进行扫描, 用于定量分析的离子反应分别为 m/z 635.5 \rightarrow 131.1 (升麻苷 H-2) 和 783.5 \rightarrow 161.1 (R_g , 内标), 升麻苷 H-2 在 0.5 ~ 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 线性良好。平均回收率 > 87.0%, 日内、日间 RSD 均 < 11%。大鼠静脉注射升麻苷 H-2 单体, $t_{1/2}$ 为 1.03 h, CL 为 691 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 灌胃升麻苷 H-2 和升麻提取物, T_{max} 分别为 0.5, 4.0 h, 绝对生物利用度分别为 21.2%, 36.7%。结论: 该方法灵敏、快速、准确, 可用于大鼠血浆中升麻苷 H-2 的浓度测定及临床前药代动力学研究。比较升麻提取物和升麻苷 H-2 单体口服给药后的药代动力学参数和生物利用度, 表明升麻提取液中的其他成分对升麻苷 H-2 有促进其吸收的作用, 或升麻苷之间存在相互代谢转化, 为升麻制剂研制和临床应用提供实验依据。

[关键词] 升麻苷 H-2; 药代动力学; 液相色谱-串联质谱法; 固相萃取

[中图分类号] R285; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0149-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1214.058.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 12:14

Pharmacokinetics and Absolute Bioavailability of Cimicifugoside H-2 in Rats

GAI Yun-yun^{1,2}, SHA Chun-jie², LIU Wan-hui², HAN Jiang-bin², SUN Yan-tong^{1,3*}

(1. Research Center for Drug Metabolism, College of Life Science, Jilin University, Changchun 130012, China;
2. State Key Laboratory of Long-acting and Targeted Drug Delivery Technologies, Yantai 264003, China;
3. College of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pharmacokinetic properties of cimicifugoside H-2 in rats, and the absolute bioavailability of cimicifugoside H-2 *in vivo* were also scarcely reported. **Method:** SD rats were administrated an intravenous dose of cimicifugoside H-2 (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and oral dose of cimicifugoside H-2 (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) or *Cimicifuga foetida* extract (50 $\text{mg}\cdot\text{kg}$), respectively. At different time points, the concentrations of cimicifugoside H-2 in rat plasma were determined by LC-MS-MS method. Main pharmacokinetics parameters were estimated by non-compartmental analysis using the DAS 2.0 software. **Result:** The curves showed excellent linear regressions within the range of tested concentrations. The intra-and inter-day variations were below 11% in terms of RSD. The recoveries were 87.0% -91.6% for spiked cimicifugoside H-2 samples. The PK parameters after iv administration of individual cimicifugoside were respectively: elimination half-life 1.03 h^{-1} ; clearance 691 $\text{mL}\cdot$

[收稿日期] 20120523(011)

[基金项目] 国家“十一五”重大科技专项基金课题(2009ZX09304-003)

[第一作者] 盖芸芸, 博士研究生, 从事药代动力学研究, E-mail: gaiyunyun@luye.cn

[通讯作者] * 孙严彤, 博士, 讲师 从事药物分析研究, Tel:0431-85619704, E-mail: sunyt@jiu.edu.cn

$\text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. PK parameters following oral administration of the extract and clemastine H-2 was respectively: T_{\max} 0.5 and 4.0 h. Absolute oral bioavailability (F) was 21.2% and 36.7%. **Conclusion:** This method proved to be specific, accurate and sensitive to be applied to the pharmacokinetics studies of H-2 in rats. Comparison of the pharmacokinetics of clemastine H-2 given alone and together in rat suggest that administration of herbal preparations of *Clemastine* for clinical use may provide longer duration of action than administration of single isomers.

[Key words] clemastine H-2; pharmacokinetics; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid phase extraction (SPE)

升麻属 *Clemastine* 植物属毛茛科金莲花亚科多年生草本,大多可作药用。《中国药典》收录的常用中药升麻原植物有 3 种^[1],升麻 *Clemastine foetida* L. 是其中之一,在我国分布区域广,资源量大。其根茎具有清热解毒、升举阳气、发表透疹的功效,主治风热头痛、齿痛、咽喉痛、子宫脱垂等症。其中的三萜类成分具有解毒、抑制核苷运转、抗病毒和抗骨质疏松等活性^[2-6],近年在临床开始用于女性更年期综合征的治疗^[7]。升麻苷 H-2 是升麻中有效成分之一,目前有关升麻提取物的报道主要集中在质量标准 and 药理作用方面^[8-10],缺乏药物动力学资料^[11]。本实验采用液相色谱-串联质谱方法测定了升麻苷 H-2 的血浆药物浓度,对大鼠单次灌胃升麻苷 H-2 单体和升麻提取物的药代动力学及绝对生物利用度进行比较研究,探讨中药多组分对升麻苷 H-2 单体有效成分的药代动力学行为的影响,为升麻的制剂研制和临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 API4000 质谱仪(美国 Applied Biosystem 公司),配有电喷雾离子源(ESI)以及 Analyst 1.4.2 软件数据处理系统;Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配有真空脱气机、二元梯度泵、自动进样器和柱温箱;MILI-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司);20 通道固相萃取装置, Oasis HLB 固相萃取柱(美国 Waters 公司)。

1.2 药品与试剂 药品对照品升麻苷 H-2、人参皂苷 Rg_3 (内标,自制,纯度为 98%);甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);醋酸铵(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich);空白血浆为大鼠全血经肝素抗凝,离心,分离所得。

1.3 动物 Sprague Dawley 大鼠,18 只,雌雄各半,体重(220 ± 20)g,吉林大学基础医学院动物中心提供,动物合格证号 SCXK(吉)2008-0005 号。

2 方法

2.1 升麻异丙醇提取物的制备 称取干燥粉碎升

麻药材(过 2 号筛) 500 g,加入 45% 异丙醇加热回流提取 3 次,合并提取液,真空减压浓缩干燥浓缩成干浸膏。经 HPLC 测定升麻苷 H-2 在提取物中的含量为 17.2%。

2.2 给药方案

2.2.1 药液的配置 灌胃给药溶液:用 0.5% CMC-Na 将升麻苷 H-2、升麻提取物分别制成 1, 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬液,临用前配置。

静脉给药溶液:用 5% 的生理盐水将升麻苷 H-2 制成 1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的澄清溶液,临用前配置。

2.3 给药与样品采集 SD 大鼠 18 只,随机分成 3 组,每组 6 只,雌雄各半,实验前适应性喂养 2 d,给药前禁食 12 h,自由饮水。大鼠灌胃给药量参照人与动物之间体表面积比例(剂量换算用)表折算^[7],分别尾静脉注射升麻苷 H-2(5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、灌服升麻苷 H-2(5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和升麻提取物(50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)于给药前及给药后,0.083,0.25,0.5,1,2,3,4,6,8,12,18,24,36,48 h 由眼眶后静脉丛取血约 300 μL ;置于肝素化离心试管中,立即离心,分离血浆,于 -40 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存,直至分析。

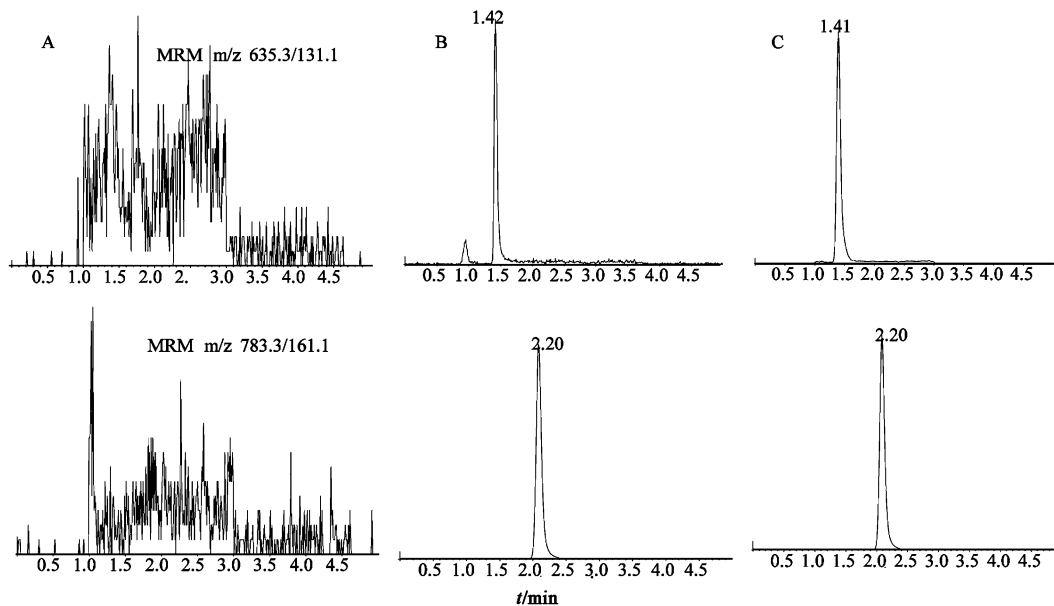
2.4 血浆样品处理 精密量取血浆样品 50 μL 置离心管中,加入内标溶液 50 μL (500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Rg_3),补加水 100 μL ,涡旋 1 min 混匀,13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后取上清液。Oasis HLB 固相萃取柱分别用 1 mL 甲醇、1 mL 水活化后,将上清液全部转移上固相萃取柱,分别用 1 mL 水和 1 mL 甲醇-水(40:60)洗脱,最后用 1 mL 甲醇-水(90:10)洗脱,收集洗脱液并于 40 $^{\circ}\text{C}$ 压缩氮气吹干后加入 50 μL 流动相复溶,涡旋混合 1 min,进样 10 μL 进行 LC-MS-MS 分析。

2.5 色谱及质谱条件 色谱条件 Waters SunFire C_{18} 柱(2.1 mm × 50 mm,3.5 μm),流动相 A 为 0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵,流动相 B 为甲醇,梯度洗脱(0 ~ 0.5 min, 60% ~ 5% A; 0.5 ~ 2.5 min, 5% A; 2.5 ~ 4.5 min, 60% A),流速 0.4 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,

进样量 10 μL 。

离子源为电喷雾离子源 (ESI 源);离子喷射电压为 -4.0 kV ;气帘气压力为 18 psi;源内气体 GS1 为 50 psi;加热气 GS2 为 55 psi;加热气温度为 $500\text{ }^\circ\text{C}$;碰撞电压 DP 为 -104 V ;碰撞能量 CE 为 -19.8 eV ;负离子方式扫描,扫描方式为多反应监测 (MRM),用于定量分析的离子反应分别为 m/z 635.5 \rightarrow 131.1 (升麻苷 H-2) 和 m/z 783.5 \rightarrow 161.1 (IS)。

2.6 数据分析 采用 DAS 2.0 药动学程序处理血



A. 空白大鼠血浆;B. 空白大鼠血浆分别加入 $0.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 升麻苷 H-2 和内标 Rg3;C. 大鼠灌胃给予 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 升麻苷 H-2 后 0.5 h 的血浆样品

图 1 升麻苷 H-2 和内标 Rg3 的典型 MRM 色谱

3.2 标准曲线与线性范围 取空白大鼠血浆 $50\text{ }\mu\text{L}$,加入升麻苷 H-2 系列标准溶液 $50\text{ }\mu\text{L}$,配置成相当于浓度为 $0.5, 2.0, 10.0, 50.0, 200, 500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品,按 2.3 项下操作。以血浆中待测物浓度 (C) 为横坐标,待测物与内标物的峰面积比值 (Y) 为纵坐标,用加权 ($W = 1/C^2$) 最小二乘法进行回归运算,所得直线回归方程即为标准曲线。典型的回归方程为: $Y = 0.80 \times 10^{-4} \times C + 2.64 \times 10^{-2}$, $r = 0.9981$ 。按色谱峰信噪比 (S/N) 为 3 作为检测下限,升麻苷 H-2 血浆的最低检测线为 $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.3 精密度和准确度 取大鼠空白血浆 $50\text{ }\mu\text{L}$,按 3.2 项下方法配制升麻苷 H-2 低、中、高 3 个浓度 ($1.0, 20, 400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的质控 (QC) 样品,按 2.3 项下操作每浓度 6 样本分析,连续测定 3 d,随行标准曲线。以样品的实测浓度与配制浓度相对照,结果进行方差分析,求得本法的精密度 (RSD) 与准确

度 (RE),结果上述方法的日内日间 RSD 均小于 11%,RE 小于 0.8%,数据表明,该法各项指标均符合生物样品分析指导原则的要求。

3 结果

3.1 方法的专属性 分别取 6 只大鼠的空白血浆各 $50\text{ }\mu\text{L}$,按 2.3 项下操作 (不加内标),得色谱图 1A;将一定浓度的升麻苷 H-2 和内标标准溶液加入空白血浆,同法操作,得色谱图 1B,待测物和内标的保留时间分别约为 1.42, 2.20 min;取受试大鼠给药后的血浆样品,同法操作,得色谱图 1C。结果表明,血浆中的内源性物质不干扰升麻苷 H-2 及内标的测定。

3.4 提取回收率及样品稳定性考察 分别取低、中、高 3 个质量浓度 ($1.0, 20, 400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的标准溶液,按 3.2 项下操作,以经过提取的所得色谱峰面积和未经过提取直接进样所得色谱峰面积之比,考察样品的提取率。在以上 3 个浓度水平下,样品的提取回收率分别为 91.6%, 87.0%, 89.3%。内标经相同提取过程处理,其回收率为 91.7%。

3.5 升麻苷 H-2 在大鼠体内的药代动力学参数和绝对生物利用度 大鼠分别尾静脉注射升麻苷 H-2 单体 ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、灌胃升麻苷 H-2 单体 ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和

考察了升麻苷 H-2 在不同保存条件下的稳定性。血浆样品在 3 次反复冻融及长期稳定性 (冰冻条件下放置 30 d) 的试验无明显降解。室温条件下其在流动相中至少可稳定存在 24 h。

考察了升麻苷 H-2 在不同保存条件下的稳定性。血浆样品在 3 次反复冻融及长期稳定性 (冰冻条件下放置 30 d) 的试验无明显降解。室温条件下其在流动相中至少可稳定存在 24 h。

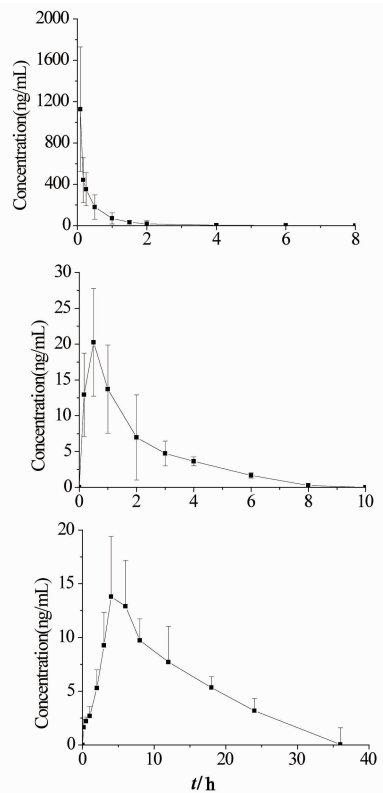
灌胃升麻总皂苷 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 后的升麻苷 H-2 平均药-时曲线分别见图 2。用 DAS 2.0 药动学软件对所测数据进行处理,以非房室模型的统计矩方法计算药代动力学参数,并根据下式计算升麻苷 H-2 在大鼠体内的绝对生物利用度,结果见表 1。

4 讨论与结论

升麻苷 H-2 为升麻主要成分之一,药代动力学研究相对缺乏,所以建立合适的体内分析方法和进行药代动力学研究十分重要。

4.1 血浆样品的处理 生物样品中药物含量极微,与内源性成份相混杂。本实验考察了甲醇、乙腈沉淀、酸沉淀蛋白法、液-液萃取和固相萃取等种方法。结果表明:沉淀蛋白法虽然具有较高的提取回收率,但血浆内源性物质对测定干扰较大;升麻苷 H-2 极性较大,采用液-液萃取提取回收率较低。固相萃取的回收率高,重复性好,无内源性物质干扰,最低定量下限可达 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,满足生物样品的测定要求。

4.2 升麻苷 H-2 在大鼠体内药代动力学特点 大鼠单次静注升麻苷 H-2 后,结果显示 $t_{1/2} = 1.03 \text{ h}$,说明升麻苷 H-2 在大鼠体内消除较快,无明显蓄积作用,可能主要分布于血液,组织分布较少,为下一步分布研究提供实验依据。由表 1 知,灌胃升麻苷



A. 静脉注射升麻苷 H-2 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); B. 灌胃升麻苷 H-2 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); C. 灌胃升麻提取物 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)
图 2 升麻苷 H-2 平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$)

表 1 升麻苷 H-2 在大鼠体内主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

药动学参数		静脉给药 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	灌胃升麻苷 H-2 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	灌胃升麻总皂苷 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
C_{\max}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	1126 ± 345	21.4 ± 7.3	18.3 ± 6.1
T_{\max}	h	-	0.50 ± 0.31	4.0 ± 1.7
$t_{1/2}$	h	1.03 ± 0.51	1.46 ± 0.67	3.3 ± 0.94
$AUC_{(0-t)}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	306 ± 138	65 ± 21	191 ± 54
$AUC_{(0-\infty)}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	309 ± 141	76 ± 21	197 ± 53
$MRT_{(0-t)}$	h	0.19 ± 0.04	1.81 ± 0.79	11.7 ± 3.28
$MRT_{(0-\infty)}$	h	0.20 ± 0.04	2.51 ± 1.06	11.9 ± 3.14
CL	$\text{mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	691 ± 37.9	138 ± 45.6	26.2 ± 8.38
V	$\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	284 ± 122.1	391 ± 144	124 ± 60.4
F	%	-	21.2 ± 9.96	36.7 ± 9.27

H-2 升麻苷 H-2 达峰时间 T_{\max} 为 0.5 h , $C_{\max} = 21.4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,升麻苷 H-2 在大鼠体内的绝对生物利用度为 21.2% ,表明升麻苷 H-2 在大鼠体内吸收尚可,为口服剂型的开发提供的数据参考。

4.3 升麻苷 H-2 的口服绝对生物利用度比较 大鼠灌胃升麻提取物 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,建立了液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中的升麻苷 H-2 浓度,结果表明该方法简便、准确,灵敏度高,干扰小,可以用于升麻苷 H-2 血药浓度的测定及其药代动力学的研究。发现了中药提取物与其单体形式之间体内药代

动力学有显著差异,对研究中药复方各种成分对药物代谢动力学的影响有重要意义。

[参考文献]

[1] 中国药典.一部[S].2010:50.
[2] 林玉萍,邱明华,李忠荣.升麻属植物的化学成分与生物活性研究[J].天然产物研究与开发,2002,14(6):58.
[3] Tian Z, Pan R L, Si J Y, et al. Cytotoxicity of cycloartane triterpenoids from aerial part of *Cimicifuga foetida* L. [J]. Fitoterapia, 2006, 77(1):39.

天山雪莲微乳的小鼠局部药代动力学

邢建国¹, 王新春^{2,3*}, 马晓莉², 袁勇², 王丽萍³, 陈卫军²

(1. 新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004;

2. 石河子大学医学院一附院, 新疆 石河子 832008; 3. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002)

[摘要] 目的: 制备天山雪莲微乳, 考察天山雪莲微乳在小鼠腹部皮肤滞留量与时间的关系及其局部经皮给药的药代动力学, 探讨其皮肤吸收作用。方法: 测定制备样品的 Zeta 电位、多分散指数、粒径分布等理化指标; 以绿原酸、芦丁为指标性成分, 采用 HPLC 测定不同给药时间皮肤中绿原酸、芦丁生物滞留量, DAS 软件拟合药物动力学参数。结果: 天山雪莲微乳平均粒径 54.51 nm, 多分散系数 0.281, Zeta 电位 -0.687 mV; 在小鼠皮肤中滞留量的动力学过程符合二室模型。结论: 天山雪莲微乳中有效成分能较快渗透进入皮肤, 并在皮肤局部较长时间蓄积。

[关键词] 天山雪莲; 微乳; 皮肤局部; 药代动力学

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0153-04

Local Pharmacokinetic of *Saussurea involucrata* Microemulsion in Rat

XING Jian-guo¹, WANG Xin-chun^{2,3*}, MA Xiao-li²,

YUAN Yong², WANG Li-ping³, CHEN Wei-jun²

(1. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China;

2. First Affiliated Hospital, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832008, China;

3. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare *Saussurea involucrata* microemulsion, investigate relationship between retention volume and time of of *S. involucrata* microemulsion in abdominal skin of mice, investigate its pharmacokinetics of local transdermal drug delivery, and investigate its skin absorption effect. **Method:**

[收稿日期] 20120621(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960528)

[第一作者] 邢建国, 研究员, 从事民族药新制剂及新剂型研究, Tel:0991-2300682, E-mail:xjguodd@163.com

[通讯作者] *王新春, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药新药开发及其新型纳米给药系统研究, Tel:0993-2855827, E-mail:cwjwxc@163.com

- [4] 范云双, 姚智, 滕杰, 等. 绿升麻中具有抗肿瘤活性的三萜类化合物[J]. 中草药, 2007, 38(2):167.
- [5] 刘兆平, 杨陟华, 朱茂祥, 等. 黑升麻的雌激素活性及其对人类乳腺癌 MCF27 细胞雌激素受体水平的影响[J]. 卫生研究, 2001, 30(2):77.
- [6] 薛宝云, 李文, 李丽, 等. 防风色原酮甙类成分的药理活性研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(5):971.
- [7] 张丹, 徐克惠, 段秀荣. 希明婷片治疗妇女围绝经期综合征的临床观察[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15(12):934.
- [8] 王冰, 张振秋, 孙艳涛. HPLC 切换波长法同时测定升麻中 5 种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2):391.
- [9] 靳波, 刘友平, 陈鸿平, 等. 西升麻中三萜皂苷类分离鉴定及药材质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):103.
- [10] 李庆辉. HPLC 法测定祛风胜湿颗粒中升麻苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3):64.
- [11] 王颖琳, 沙春洁, 刘万卉, 等. 液相色谱-串联质谱法测定 Beagle 犬血浆中升麻苷 H-1 的浓度[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8):1453.

[责任编辑 邹晓翠]