

鞣花酸片在家兔体内药代动力学研究

裴贵珍, 陈文*, 张华, 李桂华

(新疆石河子大学药学院教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002)

[摘要] 目的: 建立鞣花酸片血药浓度的高效液相色谱测定方法, 并进行该药物在家兔体内的药代动力学研究。方法: 采用 Agilent C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 磷酸水 (23:77) 为流动相, 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 ℃。结果: 家兔血浆中, 鞣花酸的线性范围为 0.013 ~ 1.635 mg·L⁻¹ ($r=0.9989$), 方法回收率 >95%, 最低检测限为 0.010 mg·L⁻¹, 家兔口服给药后, 鞣花酸的药时曲线出现双峰, 在家兔体内存在肝肠循环。结论: 实验建立了家兔血浆中鞣花酸含量的 HPLC 测定方法, 专属性强, 可用于该药在家兔体内的药代动力学研究。

[关键词] 鞣花酸片; 药代动力学; 高效液相色谱

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0136-03

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120411.0913.018 **[网络出版时间]** 2012-04-11 9:19

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120411.0919.018.html>

Pharmacokinetics of Ellagic Acid Tablets in Rabbits

PEI Gui-zhen, CHEN Wen*, ZHANG Hua, LI Gui-hua

(College of Pharmacy of Shihezi University, Shihezi 832002, China)

[Abstract] **Objective:** To develop an HPLC method for the determination of ellagic acid tablets in rabbits plasma and to study the pharmacokinetics of ellagic acid tablets in rabbits. **Method:** An Agilent C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was adopted, the mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.1% phosphoric acid solution (23:77) at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, the detection wavelength was set at 254 nm and the column temperature was controlled at 30 ℃. **Result:** The retention time of ellagic acid was observed at 8.5 min. The linear range of calibration curve was within drug concentrations of 0.013-1.635 mg·L⁻¹ ($r=0.9989$). The quantitation limit was 0.010 mg·L⁻¹. The recoveries of three levels were more than 95%. The plasma ellagic acid concentration-time curve could be evaluated by the two compartment model. **Conclusion:** The developed HPLC method for the pharmacokinetic study of ellagic acid tablets is precise.

[Key words] ellagic acid tablets; pharmacokinetics; HPLC

鞣花酸(ellagic acid, EA)是广泛存在于各种坚果、软果(如石榴皮、五倍子)等植物组织中的一种天然多酚成分^[1], 是没食子酸的二聚衍生物, 具有强大的清除氧自由基、抗氧化活性、促进凝血、促进外伤愈合及抗炎等作用^[2,4], 对结肠癌、食管癌、肝

癌、肺癌、舌及皮肤肿瘤等有很好的抑制作用, 是最有前景的天然抗癌药之一。本实验在鞣花酸片基础上, 建立了血浆中鞣花酸的 HPLC 测定方法^[5], 对鞣花酸片在家兔体内的药代动力学特征^[6]进行研究, 获得了其药代动力学参数, 为鞣花酸在家兔体内药代动力学做出参考。

1 材料

1.1 仪器 SHIMADZU 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), 台式离心机(上海安亭科学仪器有限公司)。

1.2 试药与动物 鞣花酸对照品(纯度 >95%, 由

[收稿日期] 20120112(006)

[基金项目] 兵团医药专项课题(2011BA056)

[第一作者] 裴贵珍, 硕士, E-mail: xiaouyal@sina.cn

[通讯作者] * 陈文, 硕士, 教授, 从事药物制剂与新药剂型研究, Tel: 13179930326, E-mail: chen-wen2000@126.com

Chestnut Bark 提供),乙腈和甲醇为色谱纯,水为纯化水,磷酸和磷酸二氢钾为分析纯,鞣花酸片由石河子大学药学院药剂科提供(每片含鞣花酸 30 mg)。

家兔 10 只,雌雄兼用,体重 1.8 ~ 2.3 kg,由石河子大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(新)2010-04,实验前适应性喂养 3 d。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.1% 磷酸水 23:77,流速 0.8 mL·min⁻¹,进样量 10 μL,检测波长 254 nm,柱温 30 ℃。

2.2 对照品储液的制备 精密称取鞣花酸对照品适量,用甲醇溶解,制备成质量浓度为 20.00 mg·L⁻¹的对照品储备液,于 4 ℃ 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。

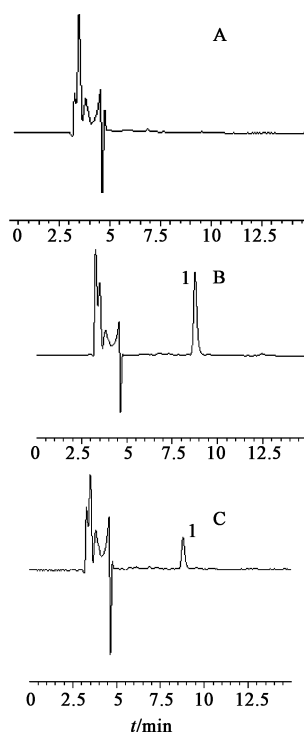
2.3 血浆样品的处理 精密量取肝素抗凝的血浆样品 500 μL,置于 10 mL 离心管中,加入 50% 磷酸溶液 15 μL 和 1 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 175 μL,涡旋振荡 2 min,加入 1 mL 甲醇和 2.5 mL 乙腈,混合沉淀蛋白,超声 20 min 后,以 2 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液置于离心真空浓缩机 37 ℃ 挥干,加入 100 μL 甲醇充分溶解,取 20 μL 进样。

2.4 血浆样品的采集 家兔实验前 12 h 禁食不禁水,分别灌胃给予鞣花酸片(80 mg·kg⁻¹),分别于给药后,0.17,0.25,0.5,1,1.5,2,3,4,6,8,12,24 h 耳缘静脉取血 0.5 mL,置于肝素抗凝的试管中,10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后分离血浆, -20 ℃ 保存待测。

3 结果

3.1 专属性考察 在色谱条件下,分别考察了空白血浆、空白血浆加鞣花酸对照品、家兔口服鞣花酸片血浆的色谱行为和鞣花酸的色谱峰面积-时间曲线图。由图 1 可见,鞣花酸峰形良好,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为 8.5 min。

3.2 线性范围 取肝素抗凝的空白血浆 500 μL,分别加入对照品溶液 100 μL,配成质量浓度为 0.005,0.010,0.200,0.500,1.000,1.500,2.000,5.000 mg·L⁻¹ 的对照品血浆,按 2.3 项下方法操作,进行测定,记录峰面积。以峰面积(*Y*)对血药浓度(*X*)进行线性回归,回归方程为 $Y = 2\,698.9X + 1\,002.5$, $R^2 = 0.998\,9$ ($n = 6$),血浆中鞣花酸在 0.010 ~ 1.500 mg·L⁻¹ 线性关系良好,定量限为



A. 空白血浆; B. 空白血浆加对照品;
C. 家兔口服后血浆样本; 1. 鞣花酸

图 1 鞣花酸片血浆高效液相色谱图

0.010 mg·L⁻¹。

3.3 回收率试验 取家兔空白血浆,按 2.3 项下方法操作,配制质量浓度为 0.050,0.500,1.000 mg·L⁻¹ 的对照品血浆各 5 份,以当日的标准曲线计算鞣花酸实测值,结果低、中、高 3 个浓度的方法回收率 ($n = 5$) 分别为 95.7%,96.5%,96.9%,其 RSD 分别为 5.3%,4.8%,4.3%。

3.4 精密度制备 含鞣花酸质量浓度分别为 0.050,0.500,1.000 mg·L⁻¹ 的对照品血浆,按 2.3 项下方法操作分析,每份样品溶液进样 3 次,3 d 内分别平行制备上述样品,结果其日间精密度 RSD ($n = 3$) 分别为 6.1%,6.0%,5.6%;日内精密度 RSD ($n = 3$) 分别为 5.6%,5.1%,5.3%,提示本方法精密度良好。

3.5 稳定性考察 考察了鞣花酸血浆样品冻融 2 次, -20 ℃ 冰箱中存放 7 d 及室温放置 12 d 的稳定性。结果表明,血浆样品中鞣花酸浓度在冻融 2 次,冻存 7 d,室温放置 12 d 测得 RSD ($n = 3$) 分别为 4.8%,4.2%,4.6%。

3.6 药代动力学试验 10 只家兔灌胃给予鞣花酸 80 mg·kg⁻¹ 后,分别于给药后不同时间点自耳缘静脉取血,血样经肝素抗凝后分离血浆,按 2.3 项下方法操作。测定血浆中鞣花酸,其血浆中药-时曲线见

图 2。

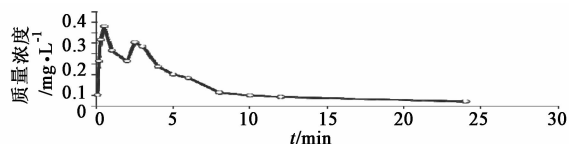


图 2 口服给予家兔鞣花酸片后血中鞣花酸浓度-时间曲线 (n = 5)

血药浓度经药动学软件 DAS 拟合处理后,鞣花酸片符合二室模型, C-T 曲线中出现双峰,分别在 0.5, 2.5 h, 血药浓度峰值为 0.381, 0.304 mg·L⁻¹, 采用非房室方法计算药动学参数, 主要参数见表 1。

表 1 鞣花酸片口服给药在家兔血液的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

参数	单位	数值
AUC _(0-∞)	mg·h·L ⁻¹	2.474 ± 0.39
MRT _(0-∞)	h	6.159 ± 1.694
T _{1/2}	h	2.328 ± 0.938
T _{max}	h	0.568 ± 0.27
C _{max}	mg·L ⁻¹	0.529 ± 0.037
CL _{z/F}	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	37.87 ± 7.803
VRT _(0-t)	h ²	7.366 ± 0.831
AUMC _(0-∞)	mg·h ² ·L ⁻¹	17.013 ± 1.39

4 讨论

从药-时曲线中可看到鞣花酸片在家兔体内代谢过程^[6]呈现双峰,鞣花酸在体内 30 min 左右首次达到峰值,且峰面积较大,2.5 h 左右出现第 2 个吸收峰,其峰面积比第 1 个峰面积低。出现在其可能原因为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。选用乙腈和磷酸水溶液作流动相,磷酸对鞣花酸起到离子抑制作用,使其与杂质峰达到很好的分离。流速对分离度的影响在一定流速范围内,流速减小,柱效提高,分离度变大。但若流速过慢,分析时间延长,纵向扩散的影响

变大,柱效降低。流速过高,物质来不及分离就被洗出,分离效果差。

以家兔为研究对象,参考大鼠口服给予鞣花酸 0.3 g·kg⁻¹ (相当于含鞣花酸 85.3 mg·kg⁻¹),按公式换算:

$$\text{家兔剂量} = \frac{\text{大鼠的剂量} \times \text{大鼠的质量} \times \text{大鼠的转换因子}}{\text{家兔的质量}}$$

试验证实,采用乙腈作蛋白沉淀剂^[7],其药物释出效果优于甲醇,因此选择乙腈为沉淀剂,药物释出率高,而且能充分沉淀蛋白,继续增加沉淀剂用量,药物释出率无明显增加,参照文献确定沉淀剂用量为 2 倍于血浆体积。

[参考文献]

- [1] 刘延泽,李海霞. 石榴皮中的鞣质及多元酚类成分[J]. 中草药, 2007, 38(4): 502.
- [2] 李海霞,王钊,刘延泽. 石榴科植物化学成份及药理活性研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(8): 765.
- [3] Bhagavathi A N, Otto G, Mark C W, et al. P53/p21 (WAF1/CIP1) expression and its possible role in G₁ arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells [J]. Cancer Letters, 1999, 136: 215.
- [4] 孟甄,孙立红,陈芸芸,等. 石榴叶鞣质对高血脂高血糖模型动物脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(1): 22.
- [5] 周本宏,吴振华,刘春,等. 高效液相色谱测定石榴皮鞣花酸的含量[J]. 广东药学报, 2005, 21(6): 693.
- [6] 董宇,赵兰英,吴萍,等. 生理药代动力学模型的特征及其国内外研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 247.
- [7] 雷帆,邢东明. 向兰石榴叶提取物中鞣花酸在大鼠体内药动力学研究[J]. 药品评价, 2005, 2(1): 38.

[责任编辑 邹晓翠]