

· 药物代谢 ·

8-乙酰哈巴苷大鼠体内药代动力学

刘德文^{1,2}, 张毅¹, 李德凤¹, 王锦玉¹, 游云¹, 曹岚², 王芳², 冯伟红¹, 刘晓谦¹, 陈两绵¹, 全燕^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西中医学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 建立血浆中 8-乙酰哈巴苷的 HPLC 测定方法, 研究大鼠不同给药途径给予 8-乙酰哈巴苷后的药代动力学特征。方法: 大鼠分别注射和灌胃 8-乙酰哈巴苷, 于不同时间点取血; 采用 HPLC, 流动相乙腈-异丙醇-水 (1.8:10.2:88), 检测波长 207 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 绘制药-时曲线, 建立药代动力学模型, 计算药代动力学参数。结果: 8-乙酰哈巴苷在血浆中的回归方程为 $Y = 613\ 753.13X - 86\ 995.55$ ($r = 0.999\ 2$), 在 0.015 3 ~ 22.995 μg 线性关系良好。高、中、低 3 个剂量组日内精密 RSD 分别为 0.59%, 0.38%, 0.55%; 日间精密 RSD 分别为 3.9%, 2.1%, 1.5%。回收率分别为 94.89%, 95.85%, 95.25%。灌胃途径在体内基本检测不出; 注射途径 3 个剂量组主要药代动力学参数 $t_{1/2}$ 分别为 (21.15 ± 3.36), (24.26 ± 5.50), (16.58 ± 5.65) min; t_{max} 分别为 (4.98 ± 0), (4.98 ± 0), (4.98 ± 0) min; C_{max} 分别为 (2.25 ± 1.41), (0.09 ± 0.03), (0.02 ± 0.007) g·L⁻¹。结论: 该法灵敏度高, 专属性强, 准确可靠, 操作快速简便, 可用于 8-乙酰哈巴苷在大鼠体内的药代动力学研究, 注射给予 8-乙酰哈巴苷在大鼠体内吸收快且不完全, 消除相对较慢, 但具有良好的药代动力学特征, 房室模型拟合分析为一房室模型。

[关键词] 8-乙酰哈巴苷; 高效液相色谱法; 不同给药途径; 药时曲线; 药代动力学

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0129-04

Pharmacokinetic of 8-acetylharpagide in Rats

LIU De-wen^{1,2}, ZHANG Yi¹, LI De-feng¹, WANG Jin-yu¹, YOU Yun¹, CAO Lan²,
WANG Fang², FENG Wei-hong¹, LIU Xiao-qian¹, CHEN Liang-mian¹, TONG Yan^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a plasma 8-acetylharpagide in HPLC determination of Khabarovsk to study different routes of administration in rats given 8-acetylharpagide Haba pharmacokinetics after. **Method:** Rats were injected and orally 8-acetylharpagide, blood was collected at different time points; detected in plasma by HPLC 8-acetylharpagide, acetonitrile-isopropyl alcohol-water (1.8:10.2:88), detection wavelength 207 nm, flow rate 1.0 mL·min⁻¹, draw the curve, the establishment of pharmacokinetic models, calculation of pharmacokinetic parameters. **Result:** Regression equation of 8-acetylharpagide in plasma was $Y = 613\ 753.13X - 86\ 995.55$ ($r = 0.999\ 2$). In the range of 0.015 3~22.995 μg with good linear relationship. The intra-day and inter-day precision of three dosage were 0.59%, 0.38%, 0.55%; 3.9%, 2.1%, 1.5% respectively. The extraction recoveries were 94.89%, 95.85%, 95.25%. The intragastric approach basically can not be detected in the body; The main pharmacokinetic parameters of injection means by three dosage group were as follows: $t_{1/2}$ (21.15 ± 3.36), (24.26 ± 5.50), (16.58 ± 5.65) min; t_{max} (4.98 ± 0), (4.98 ± 0), (4.98 ± 0) min; C_{max} (2.25 ± 1.41), (0.09 ±

[收稿日期] 2011-06-17

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09301-005)

[第一作者] 刘德文, 硕士, 从事中药药剂研究, Tel: 010-84027721, E-mail: wdl122000@163.com

[通讯作者] * 全燕, 研究员, 从事中药新剂型研究与开发, Tel: 010-84027721, E-mail: tongyan1012@sohu.com

0.03), (0.02 ± 0.007) g·L⁻¹. **Conclusion:** This method was proved to be sensitive, selective and simple. It can be successfully applied to the pharmacokinetic study of 8-acetylharpagide. The injection given to 8-acetylharpagide in rats in vivo absorption of Khabarovsk fast and does not completely eliminate relatively slow, but with good pharmacokinetic characteristics, compartment model fitting analysis for the compartment model.

[**Key words**] 8-acetylharpagide; performance liquid chromatography; different routes of administration; concentration-time curve; pharmacokinetics

筋骨草原植物为金疮小草 *Ajuga decumbens* Thunb, 别名白毛夏枯草、散血草、青鱼胆草、苦草、苦地胆、破血丹、白毛串、蜜蜂草等。始载于唐《本草拾遗》^[1], 陈藏器谓:“味甘平, 无毒, 主金疮, 止血, 长肌, 鼻中衄血”。现代药理学研究表明, 筋骨草中的 8-乙酰哈巴苷具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎等药理活性^[2]。有关 8-乙酰哈巴苷在体内的药代动力学研究未见报道。本文采用 HPLC 建立了大鼠血浆中 8-乙酰哈巴苷的分析检测方法, 并测定大鼠不同给药途径的经时血药浓度, 研究大鼠体内的药代动力学过程, 为其制剂和临床研究等提供合理的科学依据。

1 材料

Waters Alliance 高效液相色谱仪 (2695 溶剂管理系统, 2996 二极管阵列检测器, Empower² 色谱工作站), Sartorius BP211D 型 1/10 万电子天平 (美国 Sartorius 公司), BSA224S-CW 型电子天平 (美国 Sartorius 公司), N-1100 型 EYELA 旋转蒸发器 (东京理化器械独资工厂), EHD-9023S 型烘箱 (艾德生仪器有限公司), SHZ-D (Ⅲ) 型循环水式真空泵 (巩义市英峪予华仪器厂), TGL-16C 型台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

乙腈为色谱纯, 丙酮, 无水乙醇, 甲醇为分析纯, 生理盐水 (四川科伦药业股份有限公司), 纯净水 (娃哈哈)。8-乙酰哈巴苷对照品 (实验室自制, 含量 99% 以上), 8-乙酰哈巴苷中试样品 (批号 20100706)。

SPF 级别 SD 大鼠北京大学医学部实验动物科学部提供, 许可证编号: SCXK (京) 2006-0008。

2 方法与结果^[3-12]

SD 大鼠禁食不禁水 12 h, 尾静脉注射给药, 正常给药量为 30 mg·kg⁻¹, 给药后 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240 min 后取血, 每次取血一定量, 加少量肝素抗凝, 离心, 取血浆上清液适量, 加甲醇沉降蛋白, 离心, 取上清液进行高效液相含量测定。

2.1 色谱条件 Thermo C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250

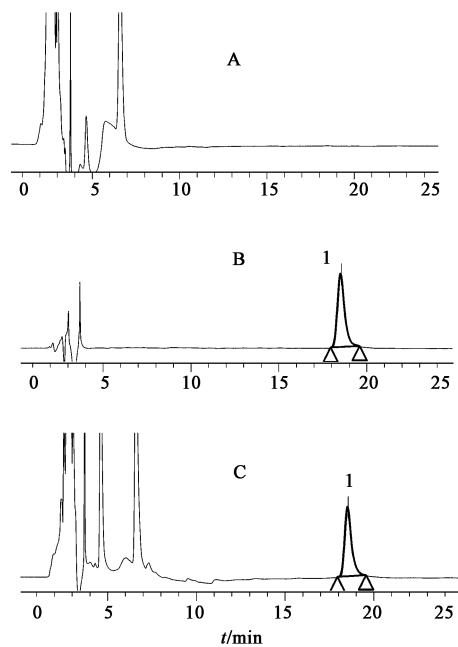
mm, 5 μm), 流动相乙腈-异丙醇-水 (1.8: 10.2: 88), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 207 nm, 柱温 25 °C。

2.2 对照品溶液的配制 精密称取 8-乙酰哈巴苷对照品适量, 甲醇溶解配制成 1.150 g·L⁻¹ 的储备液。分别精密量取储备液适量, 用甲醇逐级稀释成系列对照品溶液, 置 4 °C 冰箱中保存。

2.3 血浆样品的处理 取血浆样品 150 μL, 置于 1.5 mL 离心管中, 精密吸取 8-乙酰哈巴苷系列对照品溶液 450 μL, 涡旋 30 s, 离心 10 min (1 万 r·min⁻¹), 取上清液即为样品, 进样。

2.4 方法学验证

2.4.1 方法专属性 分别取大鼠空白血浆、空白血浆加 8-乙酰哈巴苷对照品溶液、给药后血浆样品, 按照 2.3 项下方法处理。结果表明, 在本试验条件下, 8-乙酰哈巴苷色谱峰分离良好, 其他杂峰不干扰 8-乙酰哈巴苷的测定。见图 1。



A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 对照品; C. 样品; 1. 8-乙酰哈巴苷

图 1 8-乙酰哈巴苷 HPLC

2.4.2 线性范围 取大鼠空白血浆 150 μL, 依次加

入系列对照品溶液 450 μL , 配制成 1.150, 0.767, 0.383, 0.287, 0.153, 0.115, 0.076 7, 0.038 3, 0.015 3, 0.003 83, 0.001 92, 0.001 53, 0.000 767 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 对照品血浆。按 2.3 项下方法处理, 进行测定, 建立标准曲线。以血浆中 8-乙酰哈巴苷的质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 得到回归方程为 $Y = 613\ 753.13X - 86\ 995.55$ ($r = 0.999\ 2$), 表明血浆中 8-乙酰哈巴苷在 0.015 3 ~ 22.995 μg 线性关系良好。

2.4.3 检测限和定量限 以信噪比 (S/N) 为 3 时的进样量为本分析方法的检测限, 信噪比 (S/N) 为 10 时的进样量为定量限。结果表明 8-乙酰哈巴苷的最低检测限定为 0.01 μg , 定量限为 0.015 3 μg 。

2.4.4 精密度测定 8-乙酰哈巴苷对照品溶液加入空白大鼠血浆, 按 2.3 项下方法处理, 依次配成高、中、低 (0.767, 0.076 7, 0.007 67 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 个质量浓度, 分别于日内连续进样 6 次, 连续测定 3 d。得到高、中、低 3 个质量浓度的日间精密度分别为 3.9%, 2.1%, 1.5%; 日内精密度 RSD 分别为 0.59%, 0.38%, 0.55%。

2.4.5 回收率测定 取 2.4.4 项下高、中、低 3 个质量浓度溶液 (0.767, 0.076 7, 0.007 67 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 按 2.3 项下方法处理后, 进行 HPLC 测定 ($n = 5$)。以血浆中 8-乙酰哈巴苷峰面积与对照品峰面积的比, 评价本法的提取回收率。得到高、中、低 3 个质量浓度下提取回收率依次为 94.89%, 95.85%, 95.25%; RSD 依次为 0.86%, 0.66%, 2.37%。

2.6 不同给药途径的药代动力学

2.6.1 注射途径

2.6.1.1 样本采集与处理 取健康 SD 大鼠 (雌性) 15 只, 随机分为 3 组, 试验前禁食不禁水 12 h, 称重, 每只大鼠取空白血 0.5 mL, 3 组大鼠分别按高 (120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中 (30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低 (7.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 3 个剂量给药, 给药后分别于 5, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 180, 240 min 眼眶取血约 0.5 mL, 置于先肝素化的离心管中, 离心 15 min (3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液 150 μL 于离心管中, 按 2.3 项下操作, 进行分析。

2.6.1.2 数据处理 血药浓度采用 WinNonlin 5.0.1 软件进行处理, 血药浓度-时间曲线见图 2, 药代动力学参数见表 1。

从表 1 中数据可知, 高、中、低 3 个剂量给药对 $t_{1/2}$, t_{max} , V_d , K_e , MRT 等药代动力学参数影响不大,

无明显差异, 即具有不依赖剂量的特点; 同时 C_{max} , AUC_{0-1} , $AUC_{0-\infty}$, CL/F 等参数受剂量的影响, 并与剂量增加趋势一致。

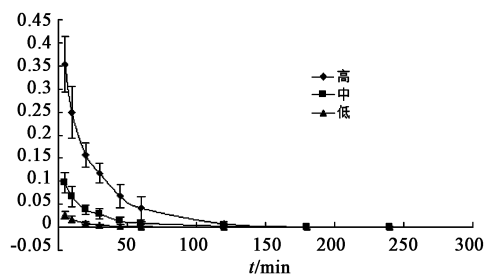


图 2 8-乙酰哈巴苷药-时曲线

表 1 8-乙酰哈巴苷大鼠体内的药代动力学参数

参数	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		
	120	30	7.5
$t_{1/2}/\text{min}$	21.15 \pm 3.36	24.26 \pm 5.50	16.58 \pm 5.65
$t_{\text{max}}/\text{min}$	4.98 \pm 0	4.98 \pm 0	4.98 \pm 0
$C_{\text{max}}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	2.25 \pm 1.41	0.09 \pm 0.03	0.02 \pm 0.007
$AUC_{0-1}/\text{h}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	153.46 \pm 31.53	33.61 \pm 9.08	5.52 \pm 1.56
$AUC_{0-\infty}/\text{h}\cdot\mu\text{g}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$	157.20 \pm 33.85	36.26 \pm 11.55	6.52 \pm 1.95
$CL/F/\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$	131.33 \pm 75.86	86.11 \pm 63.95	19.52 \pm 9.29
MRT/min	30.53 \pm 4.85	35.01 \pm 7.94	23.93 \pm 8.15
K_e/h^{-1}	2.01 \pm 0.31	1.79 \pm 0.34	3.48 \pm 0
V_d/L^{-1}	0.09 \pm 0.01	0.12 \pm 0.03	0.13 \pm 0.06

2.6.2 灌胃途径 取健康 SD 大鼠 (雌性) 2 只, 试验前禁食不禁水 12 h, 称重, 每只大鼠取空白血 0.5 mL, 大鼠按 120 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量给药, 给药后分别于 20, 40 min; 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8 h 眼眶取血约 0.5 mL, 置于先肝素化的离心管中, 离心 15 min (3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 取上清液 150 μL 于离心管中, 按 2.3 项下操作, 进行分析。结果表明灌胃途径给药时, 在血液中检测不出 8-乙酰哈巴苷, 结合其在酸、碱溶液中的不稳定性等性质, 可初步推测 8-乙酰哈巴苷在大鼠胃液的酸性环境中可能已经遭到破坏, 从而检测不出。

3 讨论

由于 8-乙酰哈巴苷的水中溶解度很高, 因此本试验中不同途径给药时药物的配制使用生理盐水定容。

8-乙酰哈巴苷在体液中含量较低, 因此 HPLC 测定其在血浆中浓度, 其关键在于对样品的预处理, 试验对同一只大鼠不同取血点和不同大鼠相同取血

点沉降蛋白完全时甲醇的用量进行比较,最后确定血样的 3 倍量甲醇即可沉降全部蛋白。方法学研究首先选用的流动相是乙腈-水(12:88),分离效果很差,通过对 7 个不同配比流动相的考察 ① 乙腈-水(12:88),② 乙腈-水(15:85),③ 乙腈-水(10:90),④ 异丙醇-水(12:88),⑤ 乙腈-异丙醇-水(2:10:88),⑥ 乙腈-异丙醇-水(1.8:10.2:88),⑦ 乙腈-异丙醇-水(4:8:88);最后确定为乙腈-异丙醇-水(1.8:10.2:88)为最佳,方法专属性很高。通过预试验发现不需要加入内标物,同时不需进行氮气吹干等程序,即可在血浆中直接检测出 8-乙酰哈巴苷。

本试验首次对 8-乙酰哈巴苷在大鼠体内的药代动力学进行研究,结果在对大鼠注射途径药代动力学参数进行分析后,发现 8-乙酰哈巴苷的房室模型非常符合一房室模型,可推测其进入体内后即可均匀分布全身的体液和组织中,口服途径在大鼠体内检测不出 8-乙酰哈巴苷,可能与其在酸中非常不稳定有关。另外我们对该药的结肠和直肠给药途径进行了初步研究,已证实这 2 种途径可在大鼠血中检测到目标物,其药代动力学参数有待进一步确定。

[参考文献]

[1] 陈藏器.本草拾遗[M].黄志钧校.合肥:安徽科技出版社,2003:113.
[2] 谢浙裕,秦明珠,房玉玲.8-乙酰哈巴苷的药理作用[J].国外医药·植物药分册,2005,20(2):56.
[3] 中国药典.一部[S].2010:325.

[4] 谢浙裕,秦明珠.白毛夏枯草中 8-*O*-acetylharpagide 提取方法的优选[J].中国医院药学杂志,2009,29(2):127.
[5] 岳党昆,丁广治,全燕,等.HPLC 测定筋骨草中乙酰哈巴苷的含量[J].中国中药杂志,2006,31(4):289.
[6] AN Fu-rong, CUI Lan, LIU Xiao-yan, et al. Bioavailability and pharmacokinetics of anastrozole in healthy male volunteers [J]. J Shanghai Sec Med U, 2002, 14(2):91.
[7] 庞志功,汪宝淇,姜洪涛.小檗碱的药物代谢动力学[J].分析科学,1997,13(1):51.
[8] 徐新军,刘皋林,张正行,等.药物代谢动力学研究中分析方法建立时应注意的一些问题[J].药学分析,2001,21(4):302.
[9] LI Kang, BI Kai-shun. RP-HPLC determination and pharmacokinetic comparison of cinnamic acid in rat plasma after administration of Di-Gu-Pi decoction and pure cinnamic acid [J]. Chem Res Chinese U, 2006, 22(1):56.
[10] 王宁生.药物代谢动力学研究中的生物样品分析[J].中药新药与临床药理,1999,10(1):4.
[11] 杜鹏,钱之玉,余卫平,等.RP-HPLC 法研究西红花酸在大鼠体内的药代动力学和组织分布特性[J].药物分析,2004,24(2):149.
[12] 刘虹,朱晓月,王萌,等.HPLC 测定血浆中荷叶碱的浓度及其在大鼠体内的药代动力学研究[J].中国实验方剂学,2010,16(12):165.

[责任编辑 全燕]