

秦皮甲素两种给药途径在大鼠体内药代动力学研究

何群^{1,2},姜宇¹,陈本超¹,陈光宇¹,郭锦明^{1*},谢名君¹

(1.湖南中医药大学药学院,湖南长沙410208;2.湖南省教育厅药学“十二五”重点学科;湖南长沙410208)

[摘要] 目的 研究秦皮甲素两种给药途径在大鼠体内的药代动力学。方法 秦皮甲素经大鼠灌胃(ig)和腹腔注射(ip)给药(100 mg/kg)后,采集不同时间点的大鼠血样,采用HPLC测定秦皮甲素在大鼠血浆中的浓度并计算其药代动力学参数。结果 秦皮甲素灌胃给药和腹腔注射给药两种途径的药代动力学均符合一级吸收一室开放模型,其关键药代动力学参数分别为 $AUC_{0 \rightarrow \infty} = (3.76 \pm 0.44) \text{ mg} \cdot \text{h/L}$, $(149.64 \pm 20.71) \text{ mg} \cdot \text{h/L}$; $Ke = (0.83 \pm 0.22)/\text{h}$, $(1.38 \pm 0.13)/\text{h}$; $C_{\max} = (2.63 \pm 0.60) \text{ mg/L}$, $(164.37 \pm 16.94) \text{ mg/L}$; $T_{\max} = (0.17 \pm 0.00) \text{ h}$, $(0.17 \pm 0.00) \text{ h}$; $T_{1/2 (ke)} = (0.88 \pm 0.21) \text{ h}$, $(0.51 \pm 0.05) \text{ h}$; $MRT = (1.69 \pm 0.31) \text{ h}$, $(0.99 \pm 0.06) \text{ h}$ 。结论 秦皮甲素两种给药途径的主要药代动力学参数有显著性差异,腹腔注射给药代谢速度较高,可以更加有效地降低血尿酸。

[关键词] 秦皮甲素;药物动力学;给药途径;HPLC

[中图分类号] R285.5;R969.1

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.01.008

Pharmacokinetic Study of Aesculin in Rats of Two Administration Routine in Vivo

HE Qun^{1,2}, JIANG Yu¹, CHEN Benchao¹, CHEN Guangyu¹, GUO Jinming^{1*}, XIE Mingjun¹

(1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Pharmaceutical “Twelfth Five-Year Plan” Key Disciplines of Department of Education of Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To study the pharmacokinetics of aesculin in rats of two administration routine in vivo. **Methods** The rats were given aesculin by intragastric administration (ip) and intraperitoneal injection (ig) with a dosage of 100 mg/kg. The plasma at different time points was collected. The concentration of aesculin in rats' plasma was determined by HPLC and its pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** The pharmacokinetics of aesculin by ig and ip routine met first-order and mono-compartment model, the critical parameters shown as below, respectively: $AUC_{0 \rightarrow \infty} = (3.76 \pm 0.44) \text{ mg} \cdot \text{h/L}$, $(149.64 \pm 20.71) \text{ mg} \cdot \text{h/L}$; $Ke = (0.83 \pm 0.22)/\text{h}$, $(1.38 \pm 0.13)/\text{h}$; $C_{\max} = (2.63 \pm 0.60) \text{ mg/L}$, $(164.37 \pm 16.94) \text{ mg/L}$; $T_{\max} = (0.17 \pm 0.00) \text{ h}$, $(0.17 \pm 0.00) \text{ h}$; $T_{1/2 (ke)} = (0.88 \pm 0.21) \text{ h}$, $(0.51 \pm 0.05) \text{ h}$; $MRT = (1.69 \pm 0.31) \text{ h}$, $(0.99 \pm 0.06) \text{ h}$ 。 **Conclusion** The pharmacokinetic parameters of aesculin by two routines showed significant difference, the ig route was with higher metabolic rate and can reduce blood uric acid effectively.

[Keywords] aesculin; pharmacokinetics; administration routine; HPLC

秦皮甲素是从中药秦皮中提取的一种可以治疗高尿酸血症的有效成分,但腹腔注射与口服灌胃降低血尿酸作用相差甚远^[1-2]。国内外已有学者对秦皮甲素大鼠口服灌胃药动学^[3-4]进行研究,结果表明:秦皮甲素体内转运符合一级吸收单室开放模型,但尚无秦皮甲素腹腔注射或其他给药途径体内转运特

点的研究报道,本文采用血药浓度法,对秦皮甲素腹腔注射与口服灌胃两种给药途径,相同剂量下的药动学特征进行研究,以期探明不同给药途径秦皮甲素药时变化与药效的关系,进一步论证腹腔注射与口服灌胃降低血尿酸作用相差甚远是否为采样时间不合适所致,为秦皮甲素临床治疗原发性高尿酸血

[收稿日期] 2015-05-08

[基金项目] 湖南省教育厅计划课题(60010499)。

[作者简介] 何群,女,教授,硕士研究生导师,研究方向:剂型与疗效的研究。

[通讯作者] *郭锦明,男,高级实验师,E-mail:ggl88@163.com。

症提供实验依据。

1 材料

1.1 实验仪器

Agilent-1200 LC 高效液相色谱仪 (G1311A 四元梯度泵, G1314A 紫外检测器); AR124CN 型电子天平 (奥豪斯仪器有限公司); ODS 分析色谱柱 XB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 涡旋混合器 (江苏医疗仪器厂); TGL-16 高速台式离心机 (上海安亭离心机厂)。

1.2 药品与试剂

秦皮甲素原料(质量分数>98.5%, 南京泽朗医药科技有限公司, 批号 ZL090321); 秦皮甲素对照品(质量分数>99.5%, 中国食品药品检定研究院, 批号 110740-200104); 色谱纯甲醇(Tedia company, 批号 CAS-46-23-8); 水为新鲜双蒸水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康成年 SD 大鼠, 雄性, 一级, 体质量 180-220 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(湘)2009-0004。

2 方法

2.1 色谱条件

Welchrom XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.1%三乙胺水溶液 (磷酸调 pH3.0)=18:82; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 338 nm; 柱温 35 °C; 进样量 20 μL。

2.2 标准品溶液的制备

取秦皮甲素对照品约 6.5 mg, 精密称定, 置于 2 mL 容量瓶中, 加入适量甲醇使溶解并定容至刻度, 摇匀, 配制成 3.25 mg/mL 的秦皮甲素标准贮备液。

2.3 药物溶液的配制

取秦皮甲素原料适量, 精密称定, 分散于 0.8% CMC-Na 溶液中, 超声使其溶解, 制得浓度为 20 mg/mL 的秦皮甲素溶液。

2.4 血浆样品的采集

取 10 只健康的 SD 雄性大鼠随机分为 2 组, 禁食 12 h 后给药, 正常光照, 按 100 mg/kg 剂量分别灌胃和腹腔注射给药, 分别于 5、10、15、30、45、60、90、120、180 min 从眼睛静脉血

管取血样, 置于肝素化的离心管中, 取样量约 0.4 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血浆于 -20 °C 冷冻保存待用。

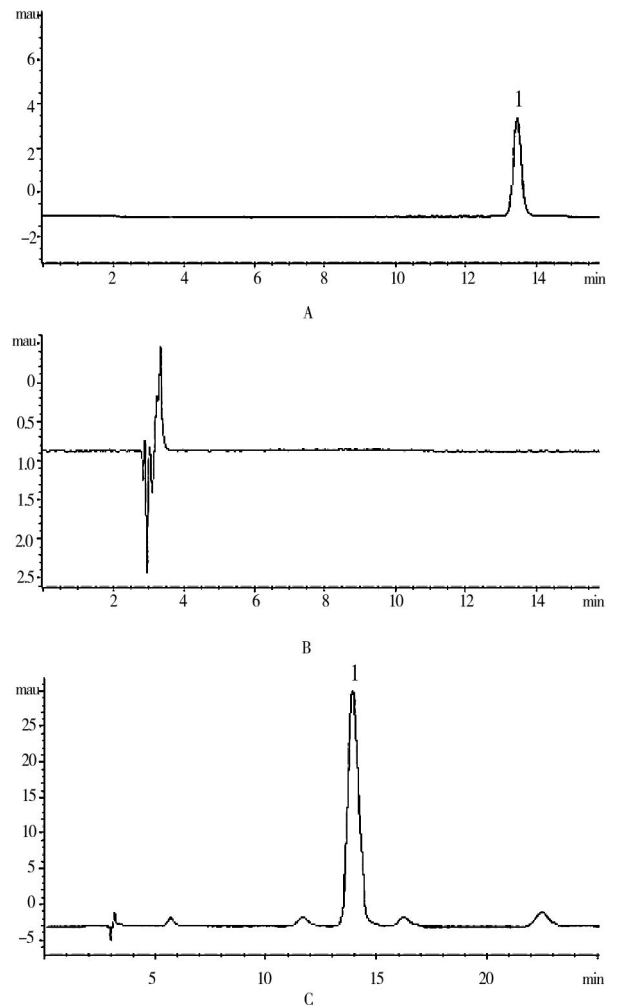
2.5 血样处理

吸取上述大鼠血浆 100 μL, 并加入甲醇 400 μL, 室温下涡旋 10 min 后, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液至干净试管中直接进样。

3 结果

3.1 专属性考察

分别吸取秦皮甲素标准品溶液、大鼠空白血浆、给药后血样, 按“2.5”项下处理, “2.1”项下色谱条件测定, 供试品峰的保留时间为 13.5 min, 理论塔板数大于 4 000。血浆中内源性物质及大鼠血浆中的代谢产物对秦皮甲素峰无干扰, 见图 1。



注: A. 秦皮甲素标准品(甲醇溶解); B. 空白血浆; C. 给药后血样; 1. 秦皮甲素

图 1 大鼠血浆内秦皮甲素检测 HPLC 图

3.2 血浆标准曲线的制备

分别配制浓度为 1 300.0、650.0、325.0、130.0、

65.0 mg/L的秦皮甲素标准溶液 A, 再加入空白血浆 100 μ L, 室温下涡旋震荡 5 min 混匀, 继续加甲醇 390 μ L, 室温下涡旋震荡 10 min 后再 12 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液即得浓度为 65.0、26.0、13.0、6.5、2.6、1.3 mg/L 的秦皮甲素血浆标准溶液 A, 各取 20 μ L 进样测定。以秦皮甲素浓度 C (mg/L) 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标进行直线回归, 得高浓度秦皮甲素的线性方程为

$$A=43.37C-62.59 \quad (r=0.999 \ 3, n=5)$$

表明秦皮甲素在 65.0~1.3 mg/L 内呈良好线性关系。同法制备浓度为 0.78、0.39、0.208、0.104、0.052 mg/L 的秦皮甲素血浆标准溶液 B, 得低浓度秦皮甲素的线性方程为

$$A=35.25C-0.0856 \quad (r=0.999 \ 6, n=5)$$

表明秦皮甲素 B 在 0.78~0.052 mg/L 内呈良好线性关系。

3.3 检测限考察

取浓度分别为 0.104、0.052、0.026 mg/L 的秦皮甲素血浆标准溶液, 按“2.1”项下方法进样, 测定各浓度样品的峰高与噪音(基线峰高), 取信噪比 S/N=3, 得本分析方法的最低检测限为 0.026 mg/L, 结合“3.2”确定其定量限为 0.052 mg/L。

3.4 精密度考察

取浓度分别为 65.0、13.0、2.6 mg/L 的秦皮甲素血浆标准溶液 A, 按“2.1”项下方法测定, 每个浓度测定 5 次, 计算日内精密度。结果: 65.0、13.0、2.6 mg/L 的秦皮甲素血浆标准溶液 A 日内 RSD (n=5) 分别为 0.957%、3.602%、5.873%, 均小于 10%。同法得 0.78、0.208、0.052 mg/L 的秦皮甲素血浆标准溶液 B 日内 RSD (n=5) 分别为 4.408%、3.423%、4.891%, 均小于 10%, 表明该方法精密度良好。

3.5 绝对回收率测定

精密吸取 3 250、650、130 mg/L 秦皮甲素标准溶液 10 μ L, 加入空白血浆-甲醇(V:V=1:4)混合后离心的上清液 490 μ L, 室温下涡旋震荡 10 min 后, 再 12 000 r/min 离心 20 min, 得浓度分别为 65.0、13.0、2.6 mg/L 的秦皮甲素参比溶液; 重复 3 次, 吸取上清液按“2.1”项下方法测定, 由相应标准曲线方程计算其质量浓度 C_s , 以加入的标准液的浓度与 C_s 之比计算绝对回收率, 秦皮甲素血浆标准溶液 A 的绝对回收率分别为 97.13% \pm 3.32%、95.12% \pm 2.89%、97.23% \pm 0.52%, RSD 分别为 3.294%、3.128%、0.537%。同法得 0.78、0.208、0.052 mg/L 秦皮

甲素血浆标准溶液 B 的绝对回收率分别为 95.12% \pm 2.52%、95.36% \pm 0.46%、98.72% \pm 2.16%, RSD 分别为 2.679%、0.521%、2.413%。

3.6 药代动力学参数

大鼠按灌胃、腹腔注射两种给药途径给予剂量为 100 mg/kg 的秦皮甲素后, 血浆中秦皮甲素平均浓度-时间数据见图 2、图 3。采用药动学软件 3P97 拟合, 计算出主要药代动力学参数, 采用 PPS 9.5 统计学软件对灌胃及腹腔注射两种给药途径的药代动力学参数进行方差分析。结果见表 1。

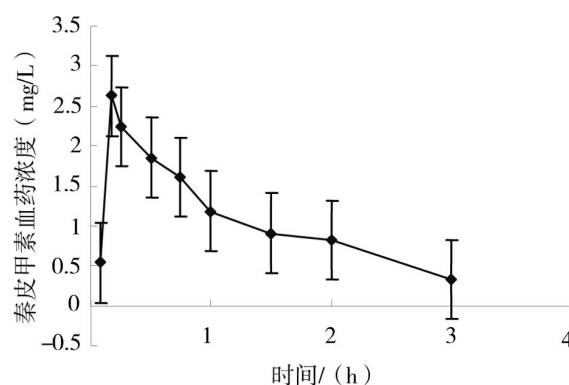


图2 大鼠灌胃给药秦皮甲素血药浓度-时间曲线图

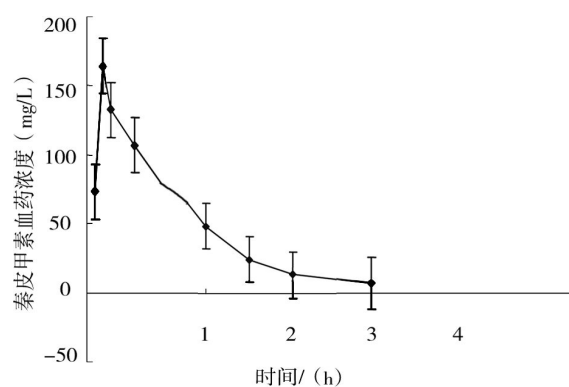


图3 大鼠腹腔注射给药秦皮甲素血药浓度-时间曲线图

表1 秦皮甲素两种给药途径药代动力学参数 (x \pm s)

药代动力学参数	灌胃给药	腹腔注射给药	F	P
A (mg/L)	3.31 \pm 1.40	232.54 \pm 46.95**	1 125	0.000 4
ke (1/h)	0.83 \pm 0.22	1.38 \pm 0.13**	3	0.003 0
ka (1/h)	8.22 \pm 1.85	8.72 \pm 1.04	3	0.617 2
T _{1/2(ka)} (h)	0.09 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	4	0.355 9
T _{1/2(ke)} (h)	0.88 \pm 0.21	0.51 \pm 0.05**	18	0.005 0
T _{max} (h)	0.17 \pm 0.00	0.17 \pm 0.00	-	-
C _{max} (mg/L)	2.63 \pm 0.60	164.37 \pm 16.94**	797	0.000 0
V/F(c) (L)	7.38 \pm 2.05	0.10 \pm 0.03**	4 669	0.001 4
AUC _{0-∞} (mg·h/L)	3.76 \pm 0.44	149.64 \pm 20.71**	2215	0.000 1
MRT (h)	1.69 \pm 0.31	0.99 \pm 0.06**	27	0.007 7

注:与灌胃组比较,**P<0.01。

4 分析与讨论

4.1 色谱条件的选择

已报道的色谱条件^[4]不适合此血浆供试品的分离,因此对流动相进行优化,选择甲醇-0.1%三乙胺水溶液(磷酸调 pH3.0),可使血样中秦皮甲素与杂质峰型分离度良好,皆可基线分离,且检测限较低,可满足体内药物分析要求。

4.2 不同给药途径大鼠药动学差异分析

秦皮甲素大鼠灌胃与腹腔注射给药药动学行为差异主要体现在: C_{max} 、 V/F (c)、 AUC_{0-t} 、 k_e ($P<0.01$),而 k_a 与 f 无统计学差异,故认为不同给药途径的秦皮甲素在大鼠体内的组织分布是造成其降低尿酸作用差异的主要原因。推测腹腔注射给药后秦皮甲素主要分布于大鼠的脉管系统,多经肝脏代谢;而口服给药后秦皮甲素迅速分布于全身的高血流量灌注组织,一部分经肝脏代谢,一部分在分布的器官中代谢。故使得平均滞留时间 $MRT_{ip} < MRT_{ig}$ 、一级消除速率常数 $ke_{ip} > ke_{ig}$ 。

4.3 对秦皮甲素降低尿酸作用时滞原因的推测

Kong L 等人报道^[1]秦皮甲素腹腔注射给药具有

降低尿酸作用但存在时滞(服药后 1.5-5 h 为其作用时间),可能是滞留时间段内有降低尿酸作用的代谢成分产生^[5-7]。

参考文献:

- [1] Kong L, Zhou J, Wen Y, et al. Aesculin possesses potent hypouricemic action in rodents but is devoid of xanthine oxidase/dehydr-ogenase inhibitory activity [J]. *Planta Med*, 2002, 68 (2): 175-178.
- [2] 余江毅,熊宁宁,刘芳,等.秦皮总香豆素治疗原发性高尿酸血症的探索性临床试验[J]. *中国临床药理学杂志*, 2008, 24(1): 3-5.
- [3] Li Y, Yang X, Cai Z, et al. Determination of aesculin in rat plasma by high performance liquid chromatography method and its application to pharmacokinetics studies [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 858(1-2): 199-204.
- [4] 夏小燕,居文政,许美娟,等.秦皮甲素大鼠体内药代动力学研究[J]. *江苏中医药*, 2008, 40(2): 81-83.
- [5] 姜宇,何群,赵碧清,何欣,陈本超,秦皮甲素大鼠肠吸收动力学研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(12): 53-57.
- [6] 姜宇,何群.秦皮甲素平衡溶解度及表观油/水分配系数的研究[J]. *中国药房*, 2010, 21(29): 2 725-2 727.
- [7] 曾金,王猛猛,沈淑娇,等.隐丹参酮单剂量和多剂量给药在大鼠体内药代动力学研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2015, 35(4): 1-5.

(本文编辑 苏维)

(上接第 36 页)最新提出的观点,愈痫灵方已在小儿病毒性脑炎继发性癫痫的临床治疗中取得一定成效^[18]。本研究从炎症反应因子的表达入手,为癫痫“从毒论治”提供一定的佐证,为临床治疗提供了更加丰富的依据。

参考文献:

- [1] 解学孔.癫痫病学[M].北京:人民卫生出版社,1995.245-254.
- [2] 王新德.神经病学·癫痫与发作性疾病[M].北京:人民卫生出版社,2001:47.
- [3] 裴林.毒邪可伏蕴为痫[J]. *北京中医药大学学报*, 2009, 32 (3): 149-151,155.
- [4] Vezzani, A. and A. Friedman, Brain inflammation as a biomarker in epilepsy[J]. *Biomark Med*, 2011, 5(5): 607-614.
- [5] 张曦,李智雄,王净净,等.愈痫灵对 PTZ 致痫鼠认知功能障碍与海马 P-CREB、CAMK IV 表达的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2015, 35(10): 18-21.
- [6] Riazi, K, M.A. Galic, and Q.J. Pittman, Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability[J]. *Epilepsy Res*, 2010, 89(1): 34-42.
- [7] 王丽, Jono, walson. PD. 大鼠戊四氮 (PTZ) 点燃模型的建立[J]. *药理学学报*, 1993, 28(7): 486-488.
- [8] Ono J, Vieth RF, Walson PD. Electroencephalographic observation of seizures induced by pentylenetetrazol injection in rats[J]. *Functional Neurol*, 1990, 5: 345.
- [9] 贺石林,王键,王净净主编.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖

南科学技术出版社,2001:48-49.

- [10] 肖倩,赵永波.癫痫与炎症因子[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2011, 18(1): 48-50.
- [11] Auvin S, Mazarati A, Shin D, et al. Inflammation enhances epileptogenesis in the developing rat brain[J]. *J Neurobiol Dis*, 2010, 40(1): 303-310.
- [12] Maroso M, Balosso S, Ravizza T, et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures[J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 413-419.
- [13] Zhang R, Sun L, Hayashi Y, et al. Acute p38-mediated inhibition of NMDA-induced outward currents in hippocampal CA1 neurons by interleukin-1β[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 38(1): 68-77.
- [14] 牛志尊,黄密,马作峰,等.癫痫中医因病位的现代文献研究[J]. *新中医*, 2014, 46(1): 193-196.
- [15] 李进安,朱百科,王净净.癫痫认知功能障碍的中医病因病机探析[J]. *中医药导报*, 2007, 13 (3): 12-14.
- [16] 宋炜,蔡鹏,杜雷,等.丙泊酚对癫痫大鼠学习记忆及海马 TLR4 表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(12): 1 725-1 729.
- [17] 甘娜,尹飞,孔惠敏,等. IL-1β 和 NF-κB 在慢性内侧颞叶癫痫模型中的相互作用[J]. *神经解剖学杂志*, 2013, 29(6): 637-643.
- [18] 张尚波,王净净,钟金桥,等.毒邪内蕴型癫痫中医治验二则——小儿病毒性脑炎继发性癫痫 [J]. *数字中医药与诊断*, 2014, 2(2): 83-85.

(本文编辑 杨瑛)