

间苯三酚颗粒在家兔体内的药动学研究

杨瑞玲^{1,2*}, 刘宏^{1#}, 陈丹³, 曹金发^{1,2}, 沈晶晶^{1,2}(1.广州军区武汉总医院药剂科, 武汉 430070; 2.湖北中医药大学药学院, 武汉 430065; 3.解放军第161医院药剂科, 武汉 430010)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0939-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.23

摘要 目的:建立间苯三酚血药浓度的测定方法,并研究间苯三酚颗粒在家兔体内的药动学特征。方法:取6只健康家兔ig给予间苯三酚颗粒(80 mg/kg)溶液,于给药前和给药后0.083、0.17、0.25、0.3、0.33、0.42、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6 h分别自耳动脉采血1.5 ml。采用高效液相色谱法检测其血药浓度,色谱柱为Welchrom C₁₈,流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(3.5:96.5),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为267 nm,进样量为20 μl,内标为对苯二酚。采用DAS 2.1.1药动学软件计算其药动学参数。结果:间苯三酚在0.12~3.0 μg/ml质量浓度范围内与其峰面积与内标峰面积的比值呈良好的线性关系($r=0.999\ 3$),提取回收率为86.02%~91.33%,RSD为4.9%~5.3% ($n=3$),日内RSD为4.5%~5.6% ($n=3$),日间RSD为4.9%~5.8% ($n=3$);间苯三酚在家兔体内的药动学参数 $t_{1/2\beta}$ 、 t_{\max} 、 C_{\max} 、 $AUC_{0-6\ h}$ 分别为(1.05±0.16) h、(0.25±0.05) h、(1 076.01±19.62) μg/L、(919.02±34.00) μg·h/L。结论:该法专属性强、精密度高,符合血浆样品测定要求,可用于间苯三酚家兔体内的药动学研究。间苯三酚颗粒在家兔体内代谢过程符合一室模型。

关键词 间苯三酚;颗粒剂;高效液相色谱法;药动学;兔

Pharmacokinetic Study of Phloroglucinol Granules in Rabbits *in vivo*

YANG Rui-ling^{1,2}, LIU Hong¹, CHEN Dan³, CAO Jin-fa^{1,2}, SHEN Jing-jing^{1,2}(1.Dept. of Pharmacy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military, Wuhan 430070, China; 2.College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 3.Dept. of Pharmacy, No. 161 Hospital of PLA, Wuhan 430010, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the HPLC method to determine the plasma concentration of phloroglucinol granules in rabbits *in vivo*. METHODS: In total of 1.5 ml ear arterial blood of 6 healthy rabbits was collected before and 0.083, 0.17, 0.25, 0.3, 0.33, 0.42, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4 and 6 h after phloroglucinol granules (80 mg/kg) solution. HPLC was conducted to determine the drug concentration with chromatographic column of Welchrom C₁₈ column, mobile phase was acetonitrile-phosphate buffer (3.5:96.5) with the flow speed of 1.0 ml/min, column temperature was 30 ℃, detection wavelength was 267 nm, injection volume was 20 μl. The pharmacokinetics parameters were calculated by DAS 2.1.1. RESULTS: There was a good linear relationship between phloroglucinol and the ratio of peak area and internal standard peak area in the range of 0.12-3.0 μg/ml ($r=0.999\ 3$); extraction recovery was in the range of 86.02%-91.33%, RSD was in 4.9%-5.3% ($n=3$); intra-day RSD was 4.5%-5.6% ($n=3$), inter-day RSD was 4.9%-5.8% ($n=3$). The pharmacokinetic parameters of phloroglucinol $t_{1/2\beta}$, t_{\max} , C_{\max} , $AUC_{0-6\ h}$ were (1.05±0.16) h, (0.25±0.05) h, (1 076.01±19.62) μg/L, (919.02±34.00) μg·h/L. CONCLUSIONS: This method has advantages in strong specificity, good precision. It is in line with the requirements of plasma samples determination, which can be used for studying the pharmacokinetic of phloroglucinol in rabbits. Phloroglucinol granules consistent with single model in rabbits *in vivo* metabolism process.

KEYWORDS Phloroglucinol; Granules; HPLC; Pharmacokinetic; Rabbits

MUC5AC mucin production in human airway epithelial (NCI-H292) cells[J]. *J Immunol*, 2011, 186(6): 3 392.

- [17] Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna Jde J, Meza-Cervantes P, *et al*. Naegleria fowleri induces MUC5AC and pro-inflammatory cytokines in human epithelial cells via ROS production and EGFR activation[J]. *Microbiology*, 2009, 155(11): 3 739.
- [18] Wang J, Liu YT, Xiao L, *et al*. Anti-inflammatory ef-

fects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF-kB pathway[J]. *Inflammation*, 2014, 37(6): 2 085.

- [19] Wang E, Chen F, Hu X, *et al*. Protective effects of apigenin against furan-induced toxicity in mice[J]. *Food Funct*, 2014, 5(8): 1 804.

- [20] Lee Y, Sung B, Kang YJ, *et al*. Apigenin-induced apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy formation in HCT116 human colon cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(5): 1 599.

* 硕士研究生。研究方向:药物制剂新技术与新剂型。E-mail: ling19880611@126.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:药物制剂新技术与新剂型。电话:027-50772871。E-mail:honguil@163.com

(收稿日期:2014-08-11 修回日期:2014-11-25)

(编辑:张静)

间苯三酚(Phloroglucinol)是一种毒副作用较小的亲肌性非阿托品非罂粟碱类平滑肌解痉药^[1],临床上主要用于消化科、妇科所出现的痉挛性疼痛^[2-4]。其特点是在解除平滑肌痉挛的同时,不产生一系列抗胆碱样副作用,也不会引起低血压、心率加快、心率失常等相应症状,且对心血管功能无明显影响^[5]。目前,间苯三酚的临床应用剂型有注射液、注射用粉末及口服冻干片,前期笔者针对现有剂型的局限性,研究开发了其口服新剂型——间苯三酚颗粒^[6]。关于间苯三酚在动物或人体内的药动学研究文献报道较少,笔者在建立血浆样品中间苯三酚检测的高效液相色谱法的基础上,对间苯三酚颗粒在家兔体内的药动学特征进行了研究,以为其进一步开发与利用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1220型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);TGL-16B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

间苯三酚对照品(百灵威化学技术有限公司,批号:LN40M09,纯度:>99.0%);对苯二酚(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20121016,纯度:≥99.0%);间苯三酚颗粒(广州军区武汉总医院药剂科自制,批号:130501,规格:每袋80 mg);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 动物

健康家兔,♀♂各半,体质量(2.5±0.5) kg,均由华中科技大学实验动物中心提供,动物合格证号为SCXK(鄂)2010-0009,实验前于洁净环境中饲养7 d。动物实验均按照实验动物医学伦理审查委员会批准的动物协议和指南进行。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[7-9]

色谱柱:Welchrom C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-磷酸盐缓冲液(3.5:96.5),流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:267 nm;进样量:20 μl;内标:对苯二酚。

2.2 对照品贮备液的制备

取间苯三酚对照品适量,精密称定,用甲醇溶解制成质量浓度为1 mg/ml的对照品贮备液,于4 ℃冰箱中保存。待用时精密吸取适量,用甲醇稀释至所需的工作浓度。

2.3 内标溶液的制备

取对苯二酚适量,精密称定,加水溶解制成质量浓度为10 μg/ml的对苯二酚水溶液,于4 ℃冰箱中保存,备用。

2.4 血浆样品的处理与测定

取血浆样品200 μl,置于1.5 ml EP管中,加入内标溶液50 μl和4.5%高氯酸溶液200 μl,混合5 min,然后以16 000×g离心10 min,取上清液20 μl进样测定。

2.5 专属性考察

取空白血浆、空白血浆+间苯三酚对照品、家兔服药后0.42 h的待测血浆样品,除空白血浆不加内标外,其余按照“2.4”项下方法进行血浆样品处理,进样测定,记录色谱。结果显示,间苯三酚的保留时间约为7.9 min,内标的保留时间约为10.5 min,二者峰形良好,血浆内源性物质不干扰测定。色谱图见图1。

2.6 标准曲线的制备

取空白血浆150 μl,加入系列对照品溶液150 μl,配制成质

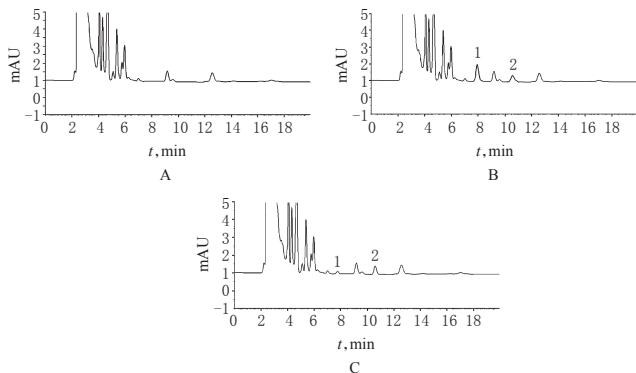


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆;B.空白血浆+对照品;C.血浆样品;1.间苯三酚;2.内标

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+control; C. plasma sample; 1. phloroglucinol; 2. internal standard

量浓度分别为0.12、0.24、0.45、0.6、1.5、3.0 μg/ml的血浆溶液,按“2.4”项下方法处理后,进样测定,记录峰面积。以血药浓度(x)为横坐标、间苯三酚与内标峰面积的比值(y)为纵坐标,进行线性回归分析。得回归方程为 $y=0.157x+0.251$ ($r=0.9993$)。结果表明,间苯三酚在0.12~3.0 μg/ml质量浓度范围内与其峰面积和内标峰面积的比值呈良好的线性关系。

2.7 提取回收率试验

取空白血浆,按“2.6”项下方法操作制成质量浓度分别为0.12、0.6、3.0 μg/ml(低、中、高质量浓度)的血浆样品,各5份,照“2.4”项下方法处理后,进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算血药浓度;以其与相应质量浓度的间苯三酚对照品溶液的测得量进行比较,计算提取回收率。结果显示,低、中、高质量浓度血浆溶液的提取回收率依次为86.02%、91.33%、89.78%,RSD分别为5.3%、5.2%、4.9%($n=5$)。

2.8 精密度试验

取间苯三酚质量浓度为0.12、0.6、3.0 μg/ml的血浆溶液,按“2.4”项下方法处理后,进行测定,同日内每份样品测定3次,考察日内精密度;3 d内同法平行制备上述血浆溶液,处理后,进样测定,考察日间精密度。结果显示,日内RSD分别为5.3%、4.5%、5.6%($n=3$),日间RSD分别为5.8%、4.9%、5.1%($n=3$)。

2.9 药动学实验

取健康家兔6只,禁食12 h后,在耳动脉埋入1枚留置针,用胶带固定,分别ig给予间苯三酚颗粒(给药剂量为80 mg/kg,参照间苯三酚口服冻干片人用剂量与家兔剂量进行换算而得)溶液。于给药前和给药后0.083、0.17、0.25、0.3、0.33、0.42、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6 h从留置针中各取血1.5 ml,置于肝素抗凝的EP管中,25 000×g离心10 min,取上层血浆,按“2.4”项下方法处理后,进样测定,记录峰面积,代入回归方程计算间苯三酚的血药浓度,绘制药-时曲线,见图2。

取药时间与血药浓度数据经DAS 2.1.1药动学软件进行拟合处理后,主要的药动学参数结果见表1。

从图2和表1可以看出,间苯三酚颗粒在家兔体内的代谢过程符合一室模型。

3 讨论

目前,在家兔体内药动学研究中,以颈动脉和耳缘静脉取

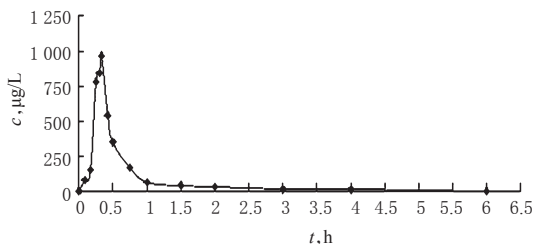


图2 间苯三酚在家兔体内的药-时曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig 2 Drug concentration-time profile of phloroglucinol in rabbits *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表1 间苯三酚在家兔体内的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of phloroglucinol in rabbits *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	结果
AUC _{0-6h} , μg·h/L	919.02 ± 34.00
MRT _{0-∞} , h	1.06 ± 0.03
t _{1/2β} , h	1.05 ± 0.16
t _{max} , h	0.25 ± 0.05
c _{max} , μg/L	1 076.01 ± 19.62
CLz/F, L/(h·kg)	87.15 ± 3.23
VRT _{0-∞} , h ²	1.13 ± 0.05
AUMC _{0-∞} , μg·h ² /L	973.87 ± 58.30

血较为常见,但两者取血时间较长、取血量不易控制,易造成较大取血误差,而且对动物创伤性较大。本实验预先在家兔耳中央动脉埋入留置针,每次取血时只需用注射器从留置针抽取所需血量,采血完成后,用肝素钠封管即可。本方法采血时间较短、血流顺畅,避免了因在取血过程中耗时长、血流不顺畅所致的取血不准,最大限度地降低了采血误差。此外,该法对实验动物创伤性小,提高了实验动物的依从性,可反复多次取血。

前期在血浆样品处理^[9-10]方法的优化试验中,对最优沉淀剂进行了重点考察。笔者曾尝试使用过多种溶剂作为沉淀剂,如有机溶剂甲醇、乙腈及两者的混合物;或无机溶剂高氯酸、冰醋酸;或有机与无机混合沉淀剂硫酸锌甲醇溶液。结果发现,这些沉淀剂中以高氯酸的沉淀效果最好。进一步对高氯酸的使用浓度进行探讨,发现其浓度为4.5%时对血浆蛋白沉淀效果最好,且进样测定后图谱基线平稳、峰形较理想、分

离度较好。

因间苯三酚保留时间较短,与血浆中的杂质峰混在一起难以辨别,故笔者在预试验中分别对流动相比比例、酸碱度及流速等条件进行了考察。结果发现,该试验对流动相比比例非常敏感:有机相比比例较高时,间苯三酚与杂质峰混在一起;有机相比比例过低时,基线难以平衡。故最终条件确定为流动相乙腈-磷酸盐缓冲液比例为3.5:96.5,流速为1.0 ml/min。

本研究进行了多次预试验,对给药方法、留置针的埋入方法、血浆样品的保存方式等进行了探索,并对血药浓度测定的高效液相色谱法进行了方法学验证,最终确定了本试验各环节较理想的条件,获得了准确、可靠的试验结果,为间苯三酚制剂在体内样品的分析方法提供了一定参考。通过对间苯三酚颗粒在家兔体内的药动学研究,为该制剂进一步开发应用奠定了实验基础。

参考文献

- [1] 李健和,易利丹,彭六保,等.间苯三酚的药理作用与临床应用[J].中国新药与临床杂志,2011,30(7):494.
- [2] 叶萍,李兆申.间苯三酚注射液治疗痉挛性腹痛的临床观察[J].第二军医大学学报,2002,23(4):426.
- [3] 付永勇,何贤省.间苯三酚舌下含服治疗急性胃肠痉挛性腹痛疗效分析[J].中国全科医学,2009,12(2B):305.
- [4] 汪艳红,韩伟珍.间苯三酚在产妇自然分娩中的临床应用[J].中国医院药学杂志,2004,24(2):96.
- [5] Anderson FA. Final report on the safety assessment of phloroglucinol[J]. *J Am Cell Toxicol*, 1996, 14(6): 468.
- [6] 杨瑞玲.一种间苯三酚颗粒剂及其制备方法:中国,201410024718.4 [P].2014-01-20.
- [7] 王辉,孙庆荣,章家伟,等.高效液相色谱法测定间苯三酚原料药有关物质[J].中南药学,2013,11(4):306.
- [8] 陈咏昕,林冬焯.高效液相色谱法测定间苯三酚口服冻干片的溶出度[J].广东药学院学报,2005,21(6):679.
- [9] 裴贵珍,陈文,张华,等.鞣花酸片在家兔体内药代动力学研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(12):136.
- [10] 严春临,张季,张丹参,等.大黄酚包合物在家兔体内药物代谢动力学研究[J].中成药,2011,33(12):2 072.

(收稿日期:2014-07-07 修回日期:2014-11-25)

(编辑:邹丽娟)

中国与阿根廷签署加强卫生合作协议

本刊讯 2015年2月4日,习近平主席和阿根廷总统克里斯蒂娜在北京共同见证了《中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会与阿根廷共和国卫生部关于加强卫生与医学科学合作的框架协议》的签署。国家卫生计生委主任李斌与阿根廷外交部长蒂梅尔曼分别代表各自政府签署该协议。

双方一致同意,继续扩大在疾病控制、医学科研、人才培养和卫生政策等共同感兴趣领域的交流,并推动机构间开展务实合作。本协议将在中阿卫生与医学科学合作委员会指导下执行。

中国与阿根廷在卫生领域交往始于上世纪90年代。2004

年两国政府签署了《卫生和医学科学合作框架协议》。2013年两国卫生行政部门签署了《卫生合作2013—2016年度执行计划》。近年来,通过卫生行政管理人员和医疗卫生专家的互访,双方进一步加深了解,交流合作日益频繁。

2月4日,中阿政府间常设委员会第一次会议在北京召开,由两国外长主持。卫生计生委国际合作司负责人代表中阿卫生和医学科学委员会在会上发言,介绍了中阿卫生领域的合作情况。两国外长在会上强调,在卫生领域,中阿两国同样面临新发传染病、慢性疾病的双重负担,希望互学互鉴,加强合作,共同提高两国人民的健康水平。