

# HPLC法测定大鼠血浆中穿心莲内酯类衍生物的含量及其药动学研究<sup>Δ</sup>

刘蕾\*,张瑜,韩光#,华素(河南大学药物研究所,河南开封 475004)

中图分类号 R285.5;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-0967-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.03

**摘要** 目的:建立大鼠血浆中穿心莲内酯类衍生物(ADC)含量的高效液相色谱(HPLC)测定方法。方法:色谱柱为ODS C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(23:77, V/V),流速为1.2 ml/min,柱温为25 ℃,检测波长为208 nm,进样量为20 μl,内标物为芦荟苷。大鼠分别经灌胃和尾静脉注射给予ADC后,测定不同时间血药浓度。采用3p87软件计算药动学参数。结果:大鼠分别经灌胃和尾静脉注射给予ADC后, $t_{1/2\alpha}$ 分别为(1.47±0.15)、(0.45±0.03)h, $t_{1/2\beta}$ 分别为(5.82±0.29)、(2.51±0.13)h,V/F分别为(1.32±0.12)、(0.38±0.04)L,AUC<sub>0-24h</sub>分别为(567.51±28.55)、(243.58±12.17)μg/(ml·h),CL/F分别为(0.53±0.03)、(0.16±0.02)L/(h·kg)。灌胃ADC后, $t_{max}$ 为2h, $c_{max}$ 为132.33 μg/ml。结论:本方法操作简便、准确、灵敏度高、重复性好,可用于ADC血药浓度的监测及其药动学研究。

**关键词** ADC;高效液相色谱法;药动学

## Determination of ADC in Plasma by HPLC and Its Pharmacokinetics in Rats

LIU Lei,ZHANG Yu,HAN Guang,HUA Su(Institute of Pharmaceutics, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of ADC in rat plasma and study the pharmacokinetics of ADC in rats. METHODS: Chromatographic separation was performed on an C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-water (23:77, V/V) as mobile phase at a flow rate of 1.2 ml/min with UV detection at 208 nm, the column temperature was at 25 ℃ and aloin was used as an internal standard. ADC was intragastric administered and caudal vein injection to rats respectively. The concentrations of ADC in rat plasma were determined by HPLC and used to analyze the pharmacokinetic parameters in the compartment model by 3p87 program. RESULTS: After intragastric administration vs. caudal vein administration of ADC, pharmaceutical parameters were as follows:  $t_{1/2\alpha}$  were (1.47±0.15)h, (0.45±0.03)h;  $t_{1/2\beta}$  were (5.82±0.29)h, (2.51±0.13)h; V/F were (1.32±0.12)L, (0.38±0.04)L; AUC<sub>0-24h</sub> were (567.51±28.55)μg/(ml·h), (243.58±12.17)μg/(ml·h); CL/F were (0.53±0.03)L/(h·kg), (0.16±0.02)L/(h·kg). After intragastric administration of ADC,  $t_{max}$  was 2h  $c_{max}$  was 132.33 μg/ml. CONCLUSION: The method is simple and accurate with a high sensitivity and a good repeatability, and it can be applied to the evaluation of pharmacokinetic parameters of ADC in rats and blood concentration of ADC in clinical controlling.

**KEYWORDS** ADC; HPLC; Pharmacokinetics

质,从而引起细胞凋亡,在凋亡过程中主要表现为调控 Bcl-2 蛋白表达减少, Bax 蛋白表达增多, Bcl-2/Bax 比例下降, Bcl-2 与 Bax 的异源二聚体减少, Bax 同源二聚体增多<sup>[7-8]</sup>。研究发现,经雷公藤甲素处理的 L-02 细胞中线粒体内 Cyt-c 与抗凋亡的 Bcl-2 蛋白表达减弱,并呈浓度依赖性;而同时相对应的胞浆中 Cyt-c、p53 与促进凋亡的 Bax 蛋白表达增强,从而诱导细胞凋亡。

### 参考文献

- [1] 王月敏,张世良,夏素霞,等.雷公藤的毒性研究及对策[J].四川生理科学杂志,2008,30(1):28.
- [2] 张蕾,宋欣伟.雷公藤生殖毒性及减毒对策的研究进展[J].浙江中西医结合杂志,2010,20(10):656.

- [3] 姚金成,饶健,曾令贵,等.雷公藤甲素单次及多次给药对大鼠肝药酶活性的影响[J].中国药房,2010,21(11):961.
- [4] 李伟,张静,胡徐庞,等.PHA-767491 抑制多种肿瘤细胞生长[J].中国生物化学与分子生物学报,2010,26(5):455.
- [5] 康松涛.环氧化酶-2 和 P53 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及意义[J].国际医药卫生导报,2009,15(16):28.
- [6] Vazquez A, Bond EE, Levine AJ. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(12):979.
- [7] 程向东,杜义安,黄灵.苦参碱在调节 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达诱导 HepG2 细胞凋亡中的作用[J].中国肿瘤临床,2008,35(12):711.
- [8] 王彤,刘存志,刘玉珍,等. Bcl-2/Bax 基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展[J].中国老年学杂志,2008,28(16):1658.

Δ 基金项目:河南省科技创新人才项目资助(No.094100510020);河南大学校内自然科学基金资助项目(No.2009YBZR036)

\* 讲师。研究方向:天然药物结构修饰及新药开发。电话:0378-3880680。E-mail:liulei@henu.edu.cn

# 通信作者:教授。研究方向:天然药物结构修饰及新药开发。电话:0378-3880680。E-mail:hang@henu.edu.cn

(收稿日期:2012-04-05 修回日期:2012-06-02)

穿心莲为爵床科植物穿心莲 *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees 的干燥地上部分。原产于印度,我国华东、中南及西南等地有栽培。其味苦,性寒,归心、肺、大肠、膀胱经。具有清热解毒,凉血消肿之功效<sup>[1-2]</sup>。其中的主要有效成分为穿心莲二萜内酯类衍生物,近年来的研究表明,这类化合物在体内外都具有较显著的抗肿瘤作用<sup>[3-7]</sup>。

笔者前期合成了穿心莲内酯类衍生物(ADC),发现其具有非常显著的抗肿瘤活性,作为抗肿瘤药物具有较好的发展前景。作为ADC新药研究与开发的一部分,笔者建立了测定大鼠血浆中ADC含量的高效液相色谱(HPLC)法,并用于ADC在大鼠体内的药动学特征研究,以揭示ADC在大鼠体内的变化规律,为其新药研究与开发提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100型高效液相色谱仪,含G1311C型四元梯度泵、G1314B型紫外检测器、G1322A型真空脱气机、G1329B型自动进样器、G1316A型柱温箱、Empower色谱工作站(美国Agilent公司);TGL-16型高速离心机(金坛亿通电子有限公司);SK1-型快速混匀器(常州国华电器有限公司);KQ-300VDE型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

ADC对照品[河南大学药物研究所自制,结构经红外光谱(IR)、紫外光谱(UV)、质谱(MS)、核磁共振(<sup>1</sup>H-NMR)确证;经HPLC法测定,按面积归一化法计算,含量在99.6%以上];芦荟苷对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:110787-200504,纯度:≥98%);甲醇、乙腈为色谱纯(天津四有精细化学品有限公司);水为重蒸水。

### 1.3 动物

清洁级SD大鼠126只,♂,体质量(230±10)g,由河南省实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(豫)2005-0001]。动物置于(22±1)℃控温和光暗周期为12h环境下,给予清洁级普通大鼠饲料(河南省实验动物中心)饲养。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品贮备液 取ADC对照品29.75 mg,精密称定,置1 000 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,得29.75 μg/ml对照品贮备液,4℃贮藏,备用。

2.1.2 内标工作液 取芦荟苷对照品16.2 mg,置200 ml量瓶中,用甲醇溶解并定容,摇匀,得81 μg/ml的内标工作液,4℃贮藏,备用。

### 2.2 色谱条件

色谱柱:Dikma ODS C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(23:77, V/V);流速:1.2 ml/min;检测波长:208 nm;柱温:25℃,进样量:20 μl。

### 2.3 血浆样品的处理

取血浆样品200 μl,依次加入乙腈200 μl和内标工作液100 μl,涡旋10 min混匀。4 000 r/min离心20 min,收集上清液,于40℃水浴中用氮气流吹干,残渣加入100 μl甲醇溶解,超声15 min,4 000 r/min离心20 min,取上清液,经0.22 μm微孔滤膜过滤,精密吸取20 μl进样分析。

### 2.4 方法的专属性试验

取大鼠空白血浆,添加ADC对照品和内标的空白血浆及

添加内标的给药后血浆样品各一份,分别按“2.3”项下方法操作。结果,ADC及内标的保留时间分别约为23.8和14.5 min;血浆样品内源性物质对ADC和内标的测定均无干扰,方法专属性良好。高效液相色谱见图1。

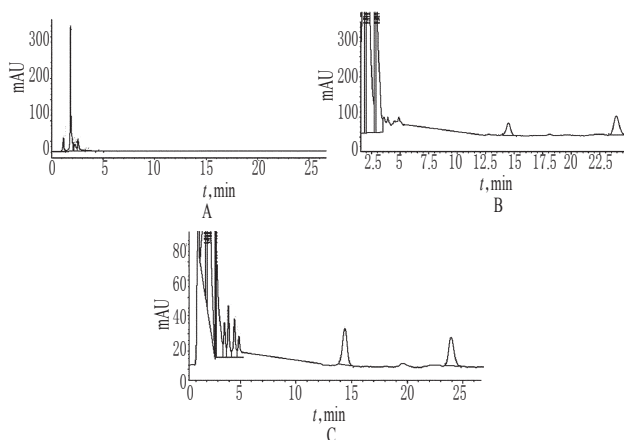


图1 高效液相色谱图

A. 空白血浆;B. 空白血浆+ADC对照品+内标;C. igADC 30 min后大鼠血浆样品

Fig 1 HPLC Chromatograms

A. blank plasma sample; B. blank plasma with ADC and internal standard C. rats plasma sample at 30 min after ig administration of ADC to rats

### 2.5 标准曲线的制备

为了避免高、低质量浓度造成的偏差,分别取上述对照品贮备液适量,挥去甲醇,加空白血浆制得低、高系列质量浓度[(0.059 5、0.119、0.357、0.595、1.190、2.975、5.950 μg/ml)和(5.95、11.90、35.70、59.50、119.0、154.70 μg/ml)]的样品,按“2.2”项下色谱条件进样测定。以ADC质量浓度(x)为横坐标,ADC峰面积和内标峰面积之比(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程分别为: $y=0.184 4x+0.009 6(r=0.999 5)$ , $y=0.192 4x+0.158 6(r=0.999 8)$ 。结果表明,ADC质量浓度在0.059 5~5.950 μg/ml和5.950~154.7 μg/ml范围内与其峰面积和内标峰面积之比呈良好线性关系。检测限为0.016 8 μg/ml。

### 2.6 精密度的试验

按“2.5”项下方法制备低、中、高质量浓度(0.119、11.90、142.8 μg/ml)的ADC标准工作液,再按“2.2”项下色谱条件测定日内精密度的(6次)和日间精密度(5 d)。结果,日内和日间精密度的RSD分别小于2.13%和2.97%。精密度的试验结果见表1。

表1 精密度和回收率试验结果

Tab 1 Precision and coefficient of recovery

加入质量浓度, μg/ml	日内RSD, %	日间RSD, %	回收率, %
0.119	2.13	2.97	99.66±2.84
11.9	1.98	2.09	98.71±1.18
142.8	2.03	2.88	100.20±0.24

### 2.7 回收率试验

按“2.3”项下方法制备低、中、高质量浓度(0.119、11.90、142.8 μg/ml)ADC的不同含药血浆(6份)。以含药血浆中ADC峰面积与未经提取的相同质量浓度ADC标准工作液峰面积比较,计算平均提取回收率,每个质量浓度计算3次。结果,提取回收率在98.71%~100.2%之间。回收率试验结果见表1。

## 2.8 稳定性试验

取“2.7”项下样品室温放置12 h,考察室温稳定性; -20 ℃放置30 d,考察长期稳定性。结果,低、中、高质量浓度样品的室温稳定性RSD均小于2.24%,长期稳定性RSD均小于2.55%,表明血浆样品在测定条件下稳定性良好。

## 2.9 药动学研究

取SD大鼠6只,实验前12 h禁食,但不禁水。按300 mg/kg ig ADC混悬液,给药后分别于15、30 min和1、2、3、4、5、6、8、10、12、24 h,于眼眶静脉取血0.6 ml,置肝素钠离心管中,4 000 r/min离心20 min,分离血浆,按“2.3”项下方法进样测定。 $t_{max}$ 为2 h, $c_{max}$ 为132.33  $\mu\text{g/ml}$ 。

另取SD大鼠6只,按40 mg/kg尾iv ADC,给药后分别于5、15、30、45 min和1、1.5、2、3、4、6、8、12 h,于眼眶静脉取血0.6 ml,按上述操作方法处理后进样测定。浓度-时间曲线见图2。将数据采用3p87软件进行处理,得到ADC在大鼠体内的药动学参数,详见表2。

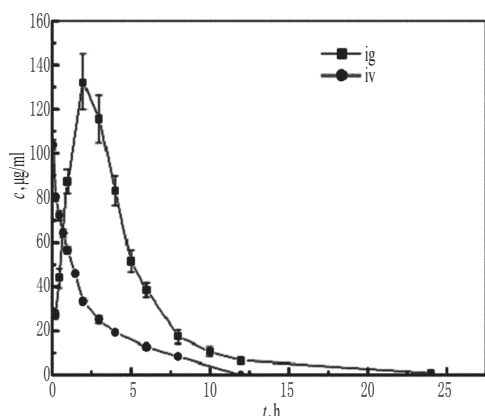


图2 浓度-时间曲线

Fig 2 Concentration-time curve

## 3 讨论

本研究建立的HPLC法测定ADC在大鼠血浆中的含量,以芦荟苷作内标,方法简便、准确、灵敏度高、重复性好,可为该药的进一步研究提供参考。本研究采用乙腈作为蛋白沉淀剂,与甲醇、石油醚、冰醋酸等相比,其蛋白沉淀效果最好。

大鼠分别ig和iv给药后,测定不同时间点ADC的血药浓度,并进行药动学参数计算,结果发现两种形式给药后的药动学过程均符合二室模型。其中,ig给药后血药浓度在2 h达到最大值,吸收较快,药物消除符合一级动力学;iv 12 h后,血样中基本监测不到药物。ig给药的绝对生物利用度仅为

表2 大鼠ig和iv给予ADC后的药动学参数

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of rat after ig or iv administration of ADC

参数	数值	
	ig	iv
V/F, L/kg	1.32 ± 0.12	0.38 ± 0.04
$t_{1/2\alpha}$ , h	1.47 ± 0.15	0.45 ± 0.03
$t_{1/2\beta}$ , h	5.82 ± 0.29	2.51 ± 0.13
$K_{21}$ , h	0.14 ± 0.01	0.99 ± 0.05
$K_{10}$ , h	0.40 ± 0.03	0.44 ± 0.02
$K_{12}$ , h	0.05 ± 0.01	0.41 ± 0.03
AUC <sub>0-24h</sub> , $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$	567.51 ± 28.35	243.58 ± 12.17
CL/F, L/(h·kg)	0.53 ± 0.03	0.16 ± 0.02

31.06%,说明药物口服吸收程度较低。研究结果提示,在ADC作为新药开发时,应注意剂型和处方研究,提高其生物利用度,从而改善其疗效。

## 参考文献

- [1] 郑虎占,董泽宏,余靖,等.中药现代研究与应用[M].北京:学苑出版社,1998:3 491.
- [2] 秦红岩,魏玉辉,赵刚,等.炎琥宁在大鼠体内血药浓度测定方法及其药动学研究[J].中国药房,2008,19(36):2 814.
- [3] 戴桂馥,王俊峰,徐海伟,等.穿心莲内酯对人食管癌EC9706细胞增殖和凋亡的影响[J].中国新药杂志,2006,15(16):1 363.
- [4] Kumar RA, Sridevi K, Kumar NV, et al. Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*[J]. *J Ethnopharmacol*,2004, 92(2/3):291.
- [5] Matsuda T, Kuroyanagi M, Sugiyama S, et al. Cell differentiation-inducing diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees[J]. *Chem Pharm Bull*,1994,42(6):1 216.
- [6] Cheung HY, Cheung SH, Li J, et al. Andrographolide isolated from *Andrographis paniculata* induces cell cycle arrest and mitochondrial-mediated apoptosis in human leukemic HL-60 cells[J]. *Planta Med*,2005,71(12):1 106.
- [7] Jiang CG, Li J B, Liu RR, et al. Andrographolide inhibits the adhesion of gastric cancer cells to endothelial cells by blocking E-selectin expression[J]. *Anticancer Res*,2007,27(4B):2 439.

(收稿日期:2012-05-11 修回日期:2012-07-24)

## 卫生部副部长、国家中医药管理局局长王国强表示:2013年将完善中医药新闻发布制度

本刊讯 2013年2月1日,卫生部副部长、国家中医药管理局局长王国强在该局主办的新春媒体座谈会上表示,2013年,国家中医药管理局将建立中医药新闻定期发布制度。国家中医药管理局副局长吴刚以及局各司办负责人与部分在京媒体代表一起参加了座谈。

在认真听取媒体代表发言后,王国强介绍了国家中医药管理局贯彻落实“十八大”精神的总体工作思路:一是争取将中医药发展纳入国家战略,在“五位一体”建设中提高贡献率和显示度;二是狠抓提高中医药临床疗效这个关键问题,千方

百计满足广大群众中医药服务需求;三是加强中医药监督管理,更加重视与新闻媒体开展合作。他透露,2013年还将发布中医药发展白皮书,开展第二批国医大师评选活动,并在深化“医改”中推进落实若干重点工作。

王国强表示,2013年将定期举办新闻发布会,完善中医药新闻发布制度。面对新的传播环境,要更新观念,争取主动,充分利用和发挥大众传媒的作用。同时,还要为相关编辑记者提供中医药知识系统培训,并组织开展形式多样的采访和调研活动。