

救必应酸琥珀酰酯在大鼠体内的药动学和绝对生物利用度研究^Δ

赫玉芳^{1,2*}, 南敏伦¹, 赵昱玮¹, 吕娜³, 李阔³, 王文君⁴, 何忠梅³(1. 吉林省中医药科学院植物化学研究所, 长春 130012; 2. 吉林修正药业新药开发有限公司, 长春 130118; 3. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 4. 长春市绿园区西新双丰社区卫生服务站, 长春 130013)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)31-4350-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.31.09

摘要 目的: 研究救必应酸琥珀酰酯(SRA)在大鼠体内的药动学和绝对生物利用度。方法: 将Wistar大鼠随机分成ig组(30 mg/kg)和尾iv组(15 mg/kg), 每组10只, 按相应给药方法和剂量给予SRA, 于给药后5、10、20、30、40、60、90、150、210、270、390、510 min尾静脉取血0.2 ml。以丹参酮II_A为内标, 采用反相-高效液相色谱法测定其血药浓度, 3p97软件计算药动学参数和绝对生物利用度。结果: ig组大鼠的 c_{max} 为(1.02±0.27) μg/ml, t_{max} 为(26.64±2.74) min, $t_{1/2}$ 为(42.79±3.46) min, $AUC_{0-510 min}$ 为(92.27±9.26) μg·min/ml; 尾iv组大鼠的 $t_{1/2}$ 为(17.21±1.58) min, $AUC_{0-510 min}$ 为(320.50±11.89) μg·min/ml。SRA口服绝对生物利用度为14.40%。结论: SRA在大鼠体内的药动学特征符合单室模型; 口服绝对生物利用度较高。

关键词 救必应酸琥珀酰酯; 反相-高效液相色谱法; 大鼠; 药动学; 绝对生物利用度

Pharmacokinetics and Absolute Bioavailability Study of Succinyl Rotundic Acid in Rats

HE Yufang^{1,2}, NAN Minlun¹, ZHAO Yuwei¹, LYU Na³, LI Kuo³, WANG Wenjun⁴, HE Zhongmei³(1. Institute of Phytochemistry Research, Jilin Academy of Chinese Medical Sciences, Changchun 130012, China; 2. Jilin Xiuzheng Pharmaceutical Development Co., Ltd., Changchun 130118, China; 3. College of Chinese Herbal Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 4. Changchun Lüyuan District Xixin Shuangfeng Community Health Service Station, Changchun 130013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pharmacokinetics and absolute bioavailability of succinyl rotundic acid (SRA) in rats. METHODS: Wistar rats were randomly divided into intragastric injection (ig) group (30 mg/kg) and tail intravenous injection (iv) group (15 mg/kg), with 10 rats in each group. They were given SRA with relevant usage and dosage. The blood sample of tail vein 0.2 ml was respectively taken after 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 150, 210, 270, 390, 510 min of administration. The plasma concentration of SRA was determined by RP-HPLC using tanshinone II_A as internal standard. The pharmacokinetic parameters and absolute bioavailability were calculated by using 3p97 software. RESULTS: The pharmacokinetic parameters of ig group were that c_{max} was (1.02±0.27) μg/ml, t_{max} was (26.64±2.74) min, $t_{1/2}$ was (42.79±3.46) min and $AUC_{0-510 min}$ was (92.27±9.26) μg·min/ml; those of tail iv group were that $t_{1/2}$ was (17.21±1.58) min, and $AUC_{0-510 min}$ was (320.50±11.89) μg·min/ml. Oral absolute bioavailability of SRA was 14.40%. CONCLUSIONS: The pharmacokinetic characteristics of SRA in rats conform to one-compartment model, and the absolute bioavailability is high.

KEYWORDS Succinyl rotundic acid; RP-HPLC; Rats; Pharmacokinetics; Absolute bioavailability

- 血热出血模型[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9): 1 319.
- [6] 鄢艳, 关焕玉, 王爱民, 等. 黔产白及的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(18): 58.
- [7] 王爱民, 鄢艳, 兰波, 等. UPLC同时测定白及药材中9种指标成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2 051.
- [8] 何迅, 王爱民, 李勇军, 等. HPLC测定白及中militarine含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2 076.
- [9] 刘星星, 董莉, 张晓红, 等. 止血生物效价用于白及品质评价的研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3 764.
- [10] 张颖, 周岐新, 赖舒. 白及多糖对骨髓造血功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25(4): 35
- [11] 贾秀梅, 张振凌, 吴瑞环. 鲜地黄及保鲜加工品对血热出血模型大鼠凉血止血药效比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(6): 127.
- [12] 柳佳, 张丽, 姚映芒, 等. 侧柏炭对血热出血证大鼠的作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 9.
- [13] 耿启彬, 黄海龙, 翁壮锋, 等. 茜草和茜草炭对正常大鼠凝血-纤溶系统的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13): 279.
- [14] 费鲜明, 周永列, 祁金文, 等. 木瓜蛋白酶体外对血小板聚集的抑制作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(8): 906.
- [15] 刘伟志, 裴玲燕, 张纯芳, 等. 蒙药阿给炭对急性胃溃疡合并出血模型大鼠凝血-纤溶系统影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(12): 2 817.
- [16] 王珍, 杨靖亚, 宋书杰, 等. 三七素对凝血功能的影响及止血机制[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(3): 356.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.31470418)

* 研究员, 博士。研究方向: 植物化学及结构修饰。电话: 0431-86058683。E-mail: hyf_1992@163.com

(收稿日期: 2016-05-02 修回日期: 2016-06-20)

(编辑: 邹丽娟)

救必应酸(Rotundic acid)也称铁冬青酸,是一种五环三萜酸类化合物。据文献报道,救必应酸具有抗肿瘤^[1-3]、降血脂^[4]、预防和治疗心脑血管疾病^[5]等药理作用。但由于救必应酸极性较小、脂溶性较强、水溶性较差、生物利用度较低,严重制约了其在临床上的应用。

近年来从天然中草药入手,采用中药化学的提取分离技术找到先导化合物,然后经过化学修饰得到结构明确、溶解性更好、生物利用度更高、生物活性更强、疗效更确切的化合物是目前新药研发的趋势和热点。国内外学者已经开展了对五环三萜类化合物的结构修饰工作,如齐敦果酸、熊果酸、甘草次酸、桦木酸、积雪草酸、乳香酸等,并进行抗肿瘤活性研究^[6-10],而且已筛选出一些高溶解度、高活性、低毒性的化合物。基于以上原因,笔者为进一步增加救必应酸的极性、提高其水溶性、改善其生物利用度,也进行了救必应酸的结构修饰,首次成功合成了新化合物救必应酸琥珀酰酯(Succinyl rotundic acid, SRA)。本实验中,笔者采用反相-高效液相色谱(RP-HPLC)法测定了不同给药途径下大鼠血浆中SRA的浓度,从而研究SRA的药动学过程,计算SRA的绝对生物利用度。SRA和救必应酸的结构式见图1。

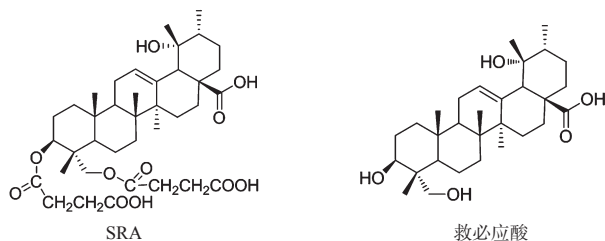


图1 SRA和救必应酸的结构式

Fig 1 Molecular structures of SRA and rotundic acid

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260型HPLC仪,包括G1311C高压输液泵、G1329B自动进样器、G1316A柱温箱、G1314B紫外检测器、M8301AA色谱工作站(美国安捷伦公司);5810R型台式高速离心机(美国贝克曼库尔特公司);BSA224S型分析天平(德国赛多利斯公司);HHS-21-6型水浴恒温振荡器(常州诺基仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

SRA(吉林省中医药科学院植物化学研究所自制,批号:2050801,纯度:≥99%);丹参酮II_A(内标,中国食品药品检定研究院,批号:110766-200619,纯度:≥98%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

1.3 动物

Wistar大鼠,♂,体质量180~220 g,由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供,实验动物许可证号:SCXK(吉)-2014-0004。本实验已通过吉林省实验动物伦理委员会同意。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.05%磷酸水(83:17),流速:1.0 ml/min;柱温:25 ℃;检测波长:210 nm;进样量:20 μl。

2.2 SRA溶液的制备

精密称取SRA 5 mg,置于5 ml量瓶中,用甲醇溶解定容至刻度,得到1 mg/ml溶液,置于4 ℃冰箱中保存备用。临用前再制备成所需质量浓度的溶液。

2.3 给药溶液的制备

ig给药溶液:SRA用5%的二甲基亚砜(DMSO)-植物油溶解制成3.0 mg/ml混悬液,临用前制备。iv给药溶液:SRA用10% DMSO-生理盐水溶解制成15 mg/ml澄清液,临用前制备。

2.4 给药方案

将20只Wistar大鼠随机分成ig组(30 mg/kg)和尾iv组(15 mg/kg),每组10只。大鼠实验前适应性喂养7 d,给药前禁食12 h、不禁水,按相应给药方法和剂量给予相应药物,给药后2 h内禁水、全程禁食。分别于给药后5、10、20、30、40、60、90、150、210、270、390、510 min尾静脉取血0.2 ml(给药后2 h内,每0.5 h ip与取血量等等的生理盐水,2 h后允许自由饮水),分离血浆,将血浆密封后置于-20 ℃冰箱保存,备用^[11]。

2.5 血浆样品的处理

取血浆0.2 ml加5.0 μg/ml丹参酮II_A(内标)甲醇溶液0.2 ml,旋涡振荡30 s,静置10 min后将此混合液以离心半径为13 cm、6 000 r/min离心10 min,除去蛋白,取上清液,加入到含有25 mg氯化钠的4 ml离心管中,涡旋混合10 min,以离心半径为13 cm、6 000 r/min离心10 min,取上清液,过0.45 μm滤膜,取20 μl进样分析^[12]。

2.6 分析方法学评价

2.6.1 方法专属性 取空白血浆,以及大鼠ig给药后30、90 min的血浆样品,按“2.5”项下方法处理后,照“2.1”项色谱条件下进样测定,记录色谱。结果显示,SRA与内标能完全分离,血浆中内源性物质不干扰SRA和内标的检测,SRA的保留时间约为6.25 min,内标的保留时间约为7.26 min。血浆中SRA及内标的理论板数均大于4 000。色谱图见图2。

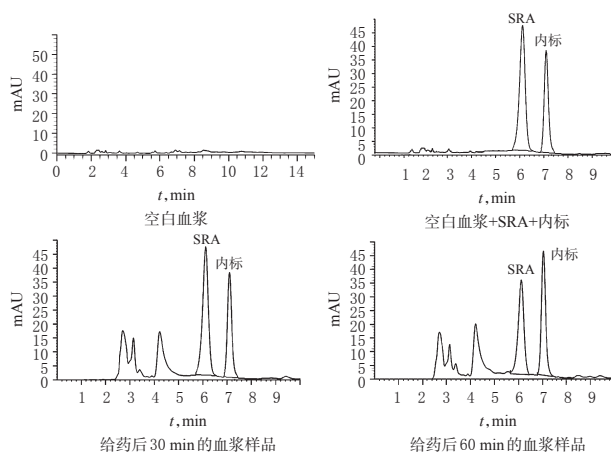


图2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.6.2 线性关系考察 精密称取SRA 0.5 mg,以甲醇制备成一系列浓度的对照品溶液,取0.5 ml血浆分别加入到100 μl各系列浓度的对照品溶液中制备成0.50、2.00、5.00、10.00、15.00、20.00 μg/ml的血浆样品,按“2.5”项下方法处理后,照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以SRA峰面积与内标峰面积的比值(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=0.5912x+0.9901$ ($r^2=0.9997$)。结果表明,SRA检测质量浓度的线性范围为0.50~20.00 μg/ml。

2.6.3 精密度试验 取SRA溶液及大鼠空白血浆,按倍数稀释法制成低、中、高3种质量浓度(0.50、10.00、20.00 μg/ml)的血浆样品,按“2.5”项下方法处理后,照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。同日内测定6次考察日内精密度,连续测定6 d考察日间精密度。结果显示,低、中、高质量浓度血浆样品SRA峰面积的日内RSD分别为2.98%、1.95%、1.35%

($n=6$), 日间RSD分别为3.02%、2.25%、1.89% ($n=6$)。结果表明方法精密度良好。

2.6.4 回收率试验 (1)方法回收率:制备低、中、高质量浓度(0.50、10.00、20.00 $\mu\text{g/ml}$)的SRA血浆样品,每个质量浓度6份,按“2.5”项下方法处理后,照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,依据回归方程计算SRA的浓度,计算方法回收率。结果显示,低、中、高质量浓度血浆样品的方法回收率分别为(98.21 \pm 9.02)%、(97.26 \pm 6.58)%、(98.77 \pm 2.44)%, RSD分别为3.08%、2.65%、1.89% ($n=6$)。(2)提取回收率:制备低、中、高质量浓度(0.50、10.00、20.00 $\mu\text{g/ml}$)的SRA对照品溶液,每个质量浓度6份,直接进样测定峰面积为 A_1 ;另取SRA对照品溶液适量,用空白血浆制成质量浓度分别为5.00、100.00、200.00 $\mu\text{g/ml}$ 的血浆样品,按“2.5”项下方法处理后,照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积为 A_2 。以 $A_2/A_1 \times 100\%$ 计算提取回收率,结果显示,低、中、高质量浓度血浆样品提取回收率分别为(72.35 \pm 4.15)%、(71.98 \pm 2.23)%、(73.03 \pm 1.02)%, RSD分别为3.32%、2.69%、3.02% ($n=6$)。

2.6.5 稳定性考察 取SRA溶液及大鼠空白血浆,按倍数稀释法制成低、中、高质量浓度(0.50、10.00、20.00 $\mu\text{g/ml}$)的血浆样品,分别考察在室温下放置6 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 放置14 d、反复冻融3次后的稳定性。结果显示,3种条件下血浆样品中SRA峰面积的RSD均小于3%,说明血浆样品在上述条件下稳定^[13]。

2.7 药动学参数和绝对生物利用度

取“2.4”项下各时间点的血浆,按“2.5”项下方法处理后,照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,依据回归方程计算SRA的质量浓度,绘制药-时曲线。采用3p97药动学软件,按单室模型计算药动学参数,并计算绝对生物利用度($F, \%$) = $(\text{AUC}_{\text{ig}} \times D_{\text{iv}}) / (\text{AUC}_{\text{iv}} \times D_{\text{ig}}) \times 100\%$,式中 D 为给药剂量^[12]。结果显示,大鼠体内SRA的口服绝对生物利用度为14.40%。两组大鼠血浆中SRA的药-时曲线见图3,药动学参数见表1。

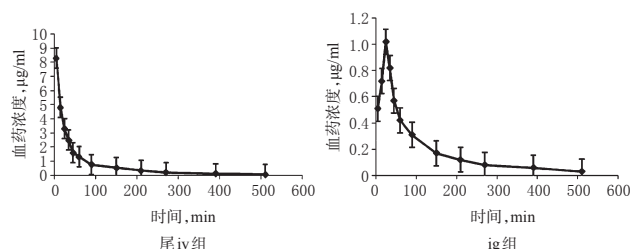


图3 两组大鼠血浆中SRA的药-时曲线

Fig 3 Plasma concentration-time curves of SRA of rats in two groups

表1 两组大鼠血浆中SRA的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of SRA of rats in two groups($\bar{x} \pm s, n=10$)

参数	ig组	尾iv组
$C_{\text{max}}, \mu\text{g/ml}$	1.02 \pm 0.27	
$t_{\text{max}}, \text{min}$	26.64 \pm 2.74	
$t_{1/2}, \text{min}$	42.79 \pm 3.46	17.21 \pm 1.58
$V, \text{L/kg}$	18.54 \pm 1.25	0.92 \pm 0.18
CL, ml/min	1.18 \pm 0.37	0.10 \pm 0.08
$\text{AUC}_{0-510 \text{ min}}, \mu\text{g} \cdot \text{min/ml}$	92.27 \pm 9.26	320.50 \pm 11.89

3 讨论

SRA是在救必应酸结构修饰中发现的具有生物活性的新化合物。为研究其生物利用度,本实验建立了RP-HPLC法用于测定大鼠体内SRA血药浓度,并对ig和iv给药途径下的药动学参数进行了检测分析。实验结果可为SRA在不同给药途

径下的药效学研究提供给药剂量的参考。

本实验结果表明,大鼠体内SRA的口服绝对生物利用度为14.40%,笔者以前的研究结果显示救必应酸的生物利用度仅为4.52%^[14]。经过实验发现,救必应酸具有较强的亲脂性,为了提高其生物利用度,可以在救必应酸的结构中接一些亲水性的基团,以增加救必应酸的亲水性。因此,经过结构修饰后得到的化合物SRA与其先导化合物救必应酸相比,生物利用度有了较大提高,成药性更强。实验所建立的SRA的血药浓度测定方法经过方法学研究,证明了其能很好地分离SRA及内标,并且不受辅料的干扰,方法灵敏度高、专属性强,能够满足血药浓度和药动学研究的需要。本实验结果为救必应酸进一步的结构修饰提供了参考和借鉴。

参考文献

- [1] 许睿.救必应化学成分研究及抗肿瘤活性成分初步筛选[D].广州:广东中医药大学,2009.
- [2] He YF, Nan ML, Sun JM, *et al.* Synthesis, characterization and cytotoxicity of new rotundic acid derivatives[J]. *Molecules*, 2012, 17(2):1 278.
- [3] He YF, Nan ML, Sun JM, *et al.* Design, synthesis and cytotoxicity of cell death mechanism of rotundic acid derivatives[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(9):2 543.
- [4] Chen Y, He YF, Nan ML, *et al.* Novel rotundic acid derivatives: synthesis, structural characterization and in vitro antitumor activity[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(2):353.
- [5] 赵全成,南敏伦,赫玉芳,等.救必应酸在制备防治心脑血管疾病的药物中的应用:中国,201010204596.9[P].2010-06-22.
- [6] 贺兴隆.齐墩果酸衍生物的合成与表征及其抑菌活性的研究[D].大连:辽宁师范大学,2011.
- [7] Meng YQ, Liu D, Cai LL, *et al.* The synthesis of ursolic acid derivatives with cytotoxic activity and the investigation of their preliminary mechanism of action[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(2):848.
- [8] 杨定菊,李颖,尹述凡.3-O-乙酰基熊果酸-3-乙酰基-2-(未)取代苯基]-2,3-二氢-1,3,4-噁二唑-5-甲酯的合成及其抗炎活性研究[J].*有机化学*, 2008, 28(6):1 055.
- [9] Liu D, Meng YQ, Zhao Y. Synthesis and anti-tumor activity of novel amide derivatives of ursolic acid[J]. *Chem Res Chinese U*, 2008, 24(1):42.
- [10] Yamaguchi H, Noshita T, Yu T, *et al.* Novel effects of glycyrrhetic acid on the central nervous system tumorigenic progenitor cells: induction of actin disruption and tumor cell-selective toxicity[J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45(7):2 943.
- [11] 韩文莉,陆巍,何东平,等.盐酸小檗碱磷脂复合物在兔体内的药动学及相对生物利用度研究[J].*中国药房*, 2011, 22(17):1 564.
- [12] 孙亚楠,张祥,刘子荣,等.益母草碱口服油包油微乳在大鼠体内的药动学研究[J].*中国药房*, 2015, 26(1):30.
- [13] 张红艳,孙洪胜,刘健,等.葛根素固体自微乳胶囊在大鼠体内的药动学研究[J].*中国药房*, 2015, 26(34):4 773.
- [14] 赫玉芳.救必应酸的制备及其衍生物的设计、合成和抗肿瘤活性研究[D].长春:吉林大学,2013.

(收稿日期:2016-01-19 修回日期:2016-03-23)

(编辑:邹丽娟)