

文章编号:1001-6880(2016)5-0680-05

灯盏甲素在正常和脑缺血再灌注损伤大鼠体内的药代动力学研究

胡杰^{1,3},侯佳¹,李月婷^{1,3},王爱民^{1,2},黄勇^{1,3*}¹贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室; ²贵州医科大学民族药与中药开发利用教育部工程研究中心;³贵州医科大学药学院,贵阳 550004

摘要:建立准确、灵敏的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS)法,研究灯盏甲素在正常和脑缺血再灌注损伤(MCAO)大鼠体内的药代动力学。采用改良Zea longa方法制作MCAO模型,正常和模型大鼠灌服灯盏细辛提取物后,UPLC-MS法测定灯盏甲素的血药浓度,通过DAS2.0软件拟合出药动学参数,SPSS11.5统计学软件对结果进行统计分析,比较灯盏甲素在正常和MCAO大鼠体内的药代动力学差异。与正常大鼠的药动学特征相比,灯盏甲素在MCAO大鼠血浆中的药时曲线下面积(AUC)、达峰浓度(C_{max})均明显增大,清除率(Cl_{ZF})、表观分布容积(V_{ZF})和平均滞留时间(MRT)减小,其血药浓度-时间曲线存在明显的双峰。表明灯盏甲素在MCAO大鼠体内较正常大鼠体内生物利用度显著提高,反映了该药用于临床治疗脑缺血损伤疾病的合理性。造成这种差异吸收的原因可能是脑缺血再灌注损伤机体的膜通透性增强使药物跨膜转运加快,也可能是毛细血管通透性增强使通过细胞旁路通道的药物转运加快。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱;灯盏细辛提取物;灯盏甲素;脑缺血再灌注损伤模型;药代动力学

中图分类号:R969.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.007

Pharmacokinetics of Apigenin-7-O-glucuronide in Normal and Middle Cerebral Artery Occlusion Rats

HU Jie^{1,3}, HOU Jia¹, LI Yue-ting^{1,3}, WANG Ai-min^{1,2}, HUANG Yong^{1,3*}¹Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmacy; ²Engineering Research

Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University;

³School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Abstract: To develop an accurate and sensitive ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS) method for determination of apigenin-7-O-glucuronide in rat plasma and study the pharmacokinetics of apigenin-7-O-glucuronide in normal rat and middle cerebral artery occlusion (MCAO) rat. MCAO model was established by meliorative Zea longa method. Normal group and model group were given orally with *Erigeron breviscapus* extract. The concentrations of apigenin-7-O-glucuronide in rat plasma of normal group and model group were compared after oral administration of the same dose of *E. breviscapus* extract. Compared with normal group, the values of AUC and C_{max} increased and the values of Cl_{ZF} , V_{ZF} and MRT decreased in model group. The results indicated that bioavailability of model group increased remarkably, which reflected the rationality of apigenin-7-O-glucuronide in the clinical treatment of cerebral ischemia diseases.

Key words: UPLC-MS; *Erigeron breviscapus*; apigenin-7-O-glucuronide; middle cerebral artery occlusion model; pharmacokinetics

灯盏花素是菊科植物灯盏细辛中分离的黄酮类有效成分。研究表明灯盏花素具有扩张血管、抗血小板聚集等作用,临幊上主要用于缺血性心脑血管疾病的治疗^[1]。灯盏花素由灯盏甲素和灯盏乙素共同组成,其中,灯盏甲素作为灯盏花素的组成部分之一,其药代动力学性质国内外却鲜有研究。

收稿日期:2016-01-08 接受日期:2016-03-09

基金项目:国家自然基金(81260636);贵州省科学技术基金(2013-2035);贵州省高等学校创新能力提升计划(2013-04);贵州省中药现代化科技产业专项基金(2013-4001);贵州省中药管理局项目(QZYY-2015-080)

*通讯作者 Tel:86-851-86908899; E-mail:759843553@qq.com

大多实验通过研究正常动物的药动学行为,以此表征药物的体内过程。但药物在疾病状态下的体内过程与正常状态并不相同。对于临床应用而言,研究动物病理状态下的药动学行为并将其与正常动物的药动学行为进行比较将更有意义。

缺血再灌注损伤是临床实践中一个常见的病理过程。近年来,灯盏花素的各种制剂已广泛应用于临幊上脑卒中、心绞痛等疾病的治疗。因此,本实验选择脑缺血再灌注损伤模型(middle cerebral artery occlusion model,简称MCAO模型),采用改良Zea longa方法研究口服给予灯盏细辛提取物后在正常和MCAO大鼠血浆中灯盏甲素的药代动力学特征,比较两种状态下灯盏甲素的药动学差异,并探究脑缺血再灌注对灯盏甲素药动学的影响。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

灯盏甲素对照品(批号D07-130912,纯度≥0.98,中国固体制剂制造技术国家工程研究中心);葛根素(批号0752-9605,纯度≥0.98,中国药品生物制品鉴定所);甲酸(色谱纯,德国Merck公司);甲醇(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);蒸馏水(广州屈臣氏有限公司)。

灯盏细辛产于贵州省黔南州,由贵州医科大学药学院药用植物学与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为菊科植物短亭飞蓬 *Erigenrm breviscapus* (Vant.) Hand.-Mass 的干燥全草。

1.2 仪器

WATERS ACQUITY UPLC超高压液相三重四级杆质谱联用仪(二元梯度泵,真空脱气机,柱温箱,Masslynx 4.1质谱工作站,自动进样器);Allegra 64R低温高速离心机(美国Beckman Coulter公司)^[2];ZH-2涡旋混合器(天津药典标准仪器厂);Allegra 64R低温高速离心机(美国Beckman Coulter);AE240十万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);MTN-2800D氮吹浓缩装置(天津奥特塞恩斯仪器有限公司);CQ 250A-TS超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂)。

1.3 实验动物

健康SD大鼠雌雄兼用,体重为(250±20)g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,动物许可证号SCXK(渝)2012-0008。

1.4 药代动力学数据处理

采用DAS 2.0数据处理软件进行药代动力学参数计算和数据拟合。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm,1.7 μm)柱,保护柱:Waters Van Guard BEH C₁₈(2.1 mm×5 mm,1.7 μm),流速:0.35 mL/min,柱温:45℃,进样器的温度:25℃,流动相:0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~3.0 min,5%~25% A;3.1~4.0 min,25%~90% A;4.1~5.0 min,90%~5% A)。进样体积为1 μL。

2.2 质谱条件

采用电喷雾电离源(ESI),毛细管电离电压:3 kV,离子源温度:120℃;喷雾气与反吹气:N₂,去溶剂气流速:650 L/h,去溶剂气温度:350℃,扫描方式:正离子模式,选择离子扫描(灯盏甲素:m/z 447.0,锥孔电压为35 V;内标葛根素:m/z 417.0,锥孔电压为40 v),质谱数据采集及处理软件为Mass-Lynx V4.1工作站。

2.3 标准溶液的配制

2.3.1 对照品溶液

精密称取灯盏甲素(10.58 mg),用甲醇定容至10 mL。获得灯盏甲素(1.058 mg/mL)的储备液。分别精密量取灯盏甲素对照品储备液适量,用甲醇按梯度稀释成所需浓度,得混合系列标准溶液。置冰箱(-20℃)保存,备用。

2.3.2 内标溶液

精密称取葛根素(10.33 mg),用甲醇定容至25 mL。获得葛根素(0.4132 mg/mL)的储备液。取内标储备液适量至5 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成2 μg/mL的内标溶液,置冰箱(-20℃)保存,备用。

2.4 MCAO模型制备

取大鼠用10%水合氯醛(10 mL/kg)麻醉,动物仰卧位固定,术区常规消毒,沿颈正中线切口约3 cm,用止血钳钝性分离其下组织,再用眼科镊分离颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)并结扎,绕线颈内动脉(ICA)并用止血钳牵拉,然后在距CCA分叉处3 mm左右用维纳斯剪剪一小口,将线栓插入ICA,用眼科镊轻轻送入至线栓黑色标记过颈动脉交叉处并有抵触感为度,即实现了大脑中动脉

(MCA)的阻断。MCA 阻断 1 h 后,抽出线栓约 10 mm,进行再灌注 24 h。手术及再灌注期间死亡大鼠不计人实验。

2.5 血浆样品处理方法

取大鼠血浆 100 μL ,置 1.5 mL 塑料离心管中,依次加入 50 μL 1% 甲酸,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葛根素内标溶液 75 μL ,涡混,加甲醇 275 μL ,涡混 1 min,超声(5 min,80 r),离心(12000 rpm,10 min,常温),取上清液置离心管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干。150 μL 初始流动相溶解,超声 5 min,涡混 1 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、15000 rpm 离

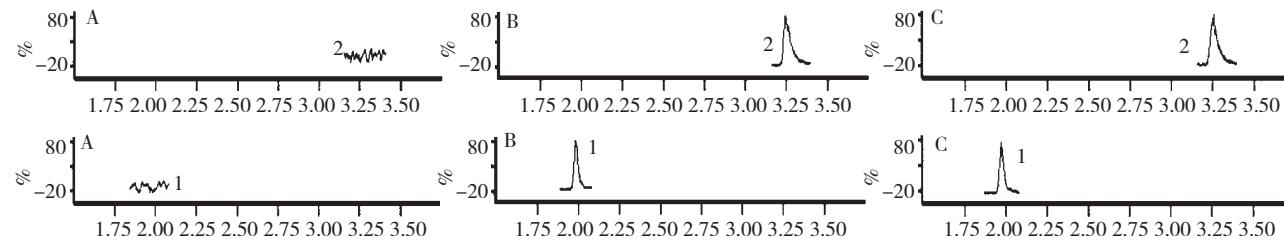


图 1 空白血浆(A)、空白血浆加对照品溶液(B)及实测样品(C)的 UPLC-MS 选择离子色谱图

Fig. 1 Typical selected UPLC-MS chromatograms of rat blank plasma (A), blank plasma spiked with three components and IS (B) as well as rat plasma sample collected at 10 min after i.g of 12.5 g/kg of *E. breviscapus* extract (C)

1. 葛根素(内标),2. 灯盏甲素

1. Puerarin (IS); 2. Apigenin-7-O-glucuronide

2.6.2 线性范围和 LLOQ

分别精密量取灯盏甲素对照品储备液适量,用甲醇按梯度稀释成所需浓度(826.6、413.3、206.6、103.3、51.7、25.8 ng/mL),得混合系列标准溶液。分别加至 100 μL 大鼠空白血浆中,按“2.5”项下操作,配制成相当于大鼠血浆药物浓度,以待测物的峰面积与内标峰面积之比(A/A_i)为纵坐标 Y ,各物质浓度(C)为横坐标 X 进行直线回归,建立标准曲线。灯盏甲素的回归曲线方程为 $Y = 2.296 \times 10^{-4}X + 1.22 \times 10^{-2}$,定量限(LLOQ)是 25.8 ng/mL(LLOQ 的定义为 $S/N \geq 10$),标准曲线相关系数(r)大于 0.99,大鼠血浆中灯盏甲素在 25.8 ~ 826.6 ng/mL 范围内线性关系良好^[3]。

2.6.3 准确度和精密度

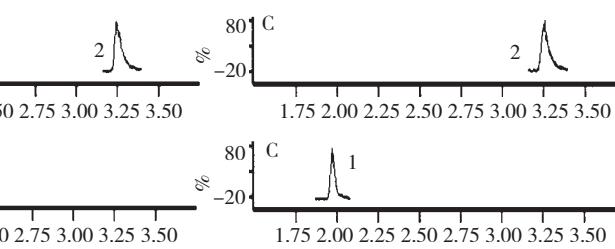
按“2.6.2”项下配制灯盏甲素大鼠血浆高、中、低三个浓度的质量控制样品(QC),每一个浓度进行 6 样本分析,按“2.5”项下操作,日内连续进样,并与标准曲线同时进行。每个系列浓度做 6 份,计算日内精密度;3 种浓度连续测定 5 d,计算日间精密度。结果表明灯盏甲素日内和日间精密度 RSD(%) 均小于 20%,准确度在 88.5% ~ 97.1% 之间,提示该

心 10 min,取上清液进样 UPLC-MS 分析。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性考察

在其选定的色谱条件和质谱条件下灯盏甲素及内标葛根素监测离子反应分别为 m/z 447.0; m/z 417.0。空白血浆、空白血浆外加灯盏甲素和内标以及大鼠给药后血浆样品色谱图见图 1,灯盏甲素及内标的保留时间分别为 3.24 和 1.95 min,各成分间分离良好,未见血浆中杂质干扰。



方法准确、可靠、重现性好。

2.6.4 提取回收率

取大鼠空白血浆 100 μL ,按“2.6.2”项下分别配制低、中、高三个浓度的质控样品(QC),每个浓度平行 5 份,按“2.5”项下操作(A 样品);另取空白血浆 100 μL ,除不加混合标准溶液外,其余按“2.5”项下操作,向获得的上清液中加入相应低、中、高浓度的混合标准溶液和内标,吹干,残留物以 150 μL 初始流动相溶解(B 样品);另取上述低、中、高浓度的混合标准溶液与内标,吹干,残留物以 150 μL 初始流动相溶解(C 样品)。提取回收率计算方法为 B 样品与 A 样品色谱峰面积之比,基质效应计算方法为 B 样品与 C 样品的色谱峰面积之比。结果低、中、高三个浓度灯盏甲素及内标的提取回收率和基质效应在 80.3% ~ 114.5% 范围内。实验结果表明提取回收率良好,不存在明显的基质效应。

2.6.5 样品稳定性

按“2.6.2”项下分别配制灯盏甲素血浆低、中、高三个浓度质量控制样品(QC),样品处理后至自动进样器中,在 6 h 分别进样,以考察处理后血浆样品中灯盏甲素在自动进样器条件下的稳定性,以每一

浓度 5 样本分析,结果表明灯盏甲素的处理后血浆样品在自动进样器中 6 h 均稳定。同法配制低、中、高三个浓度血浆样品(QC),分别在室温(约 20 ℃)下放置 6 h,4 ℃下冷藏 8 h,冻融 3 次,经处理后进样测定浓度,以考察血浆中灯盏甲素在室温,冷藏,反复冻融条件下的稳定性。以每一浓度 5 样本分析,结果表明灯盏甲素血浆样品在室温下放置 6 h,4 ℃下冷藏 8 h 和经 3 次冻融循环均比较稳定。

2.7 实验方案与样品检测

健康 SD 大鼠 12 只,雄性,体重为 (250 ± 20) g,随机分为两组(正常组和模型组),每组 6 只。给药剂量(按照生药量计算)为 12.5 g/kg,给药前 12 h 禁食,自由饮水。口服灌胃灯盏细辛提取物溶液。于给药前和给药后 0.5、1、4、6、8、10、12、18、24、30、36 h 经颈静脉采血约 0.3 mL 置涂有肝素的塑料离心管中,5000 rpm 离心 3 min,分离血浆于-20 ℃冰箱中保存,直至分析。

2.8 大鼠给药后血浆浓度及药物动力学参数

正常鼠和模型鼠口服灯盏细辛提取物后,平均血药浓度-时间曲线见图 2。采用 DAS2.0 软件计算药动学参数,对药物在大鼠体内的动力学过程进行房室模型拟合,再通过 SPSS 11.5 统计学软件对正常鼠和模型鼠的药动学参数进行差异性分析,见表 1。结果表明口服灯盏细辛提取物后,灯盏甲素在正常和模型鼠体内代谢过程均符合一级动力学二室模型。与正常鼠的药动特征相比,灯盏甲素在模型鼠体内 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 和 C_{max} 显著增加($P \leq 0.01$),药物生物利用度显著提高,其血药浓度-时间曲线存在明显的双峰。

3 结论

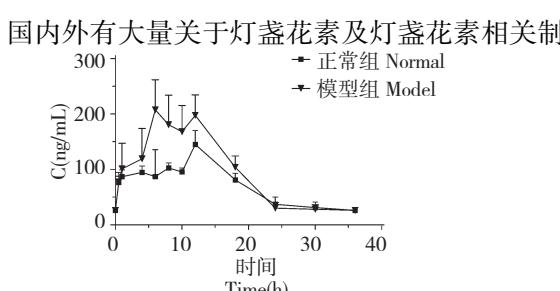


图 2 大鼠口服灯盏细辛提取物后灯盏甲素的 C-t 曲线($n=6$)

Fig. 2 Concentration-time profiles of apigenin-7-O-glucuronide after i.g. administration of *E. breviscapus* extract to rat ($n=6$)

表 1 灯盏甲素在大鼠体内的主要药动学参数($n=6$)

Table 1 The pharmacokinetic parameters describing disposition of apigenin-7-O-glucuronide after i.g. administration of 12.5 g/kg^f. *E. breviscapus* extract to rat ($n=6$)

参数 Parameters	单位 Unit	灯盏甲素 Apigenin-7-O-glucuronide	
		正常组 Normal	模型组 Model
$AUC_{(0-t)}$	mg/L * h	2561.5 ± 220.9	$3466.2 \pm 521.6^{* *}$
$AUC_{(0-\infty)}$	mg/L * h	2775.5 ± 266.9	$3829.4 \pm 463.5^{* *}$
MRT _(0-t)	h	13 ± 0.9	$11.5 \pm 0.9^{*}$
MRT _(0-\infty)	h	18.7 ± 2.9	$15.5 \pm 2^{*}$
$t_{1/2z}$	h	8.04 ± 2.6	9.57 ± 1.6
T_{max}	h	12 ± 3.5	8 ± 3.4
$Cl_{z/F}$	L/h/kg	4.5 ± 0.5	$3.3 \pm 0.3^{* *}$
$V_{z/F}$	L/kg	59.2 ± 11.7	$39 \pm 10.6^{*}$
C_{max}	mg/L	145.2 ± 20.3	$210.1 \pm 45.5^{* *}$

注:与正常组比较, $* P \leq 0.05$, $^{* *} P \leq 0.01$ 。

Note: compared with normal group, $P \leq 0.05$, $^{* *} P \leq 0.01$.

剂的药动学研究报道。但很少有学者关注其中灯盏甲素的药动学特征,而病理状态下灯盏甲素的药动学研究,几乎没有关注过。临幊上大多数药物是作用于病理状态的机体。相对于正常机体而言,病理状态的机体可能极大地改变药物的体内过程,因此,病理状态下的药代动力学数据更具有临幊参考价值,这一观点与本研究的实验结果相符^[4]。

从药时曲线看,灯盏甲素在前 30 min 吸收速率较快,然后缓慢吸收,直至 8 h 后到达达峰浓度,36 h 后基本消除完毕。并且,模型组的药时曲线出现双峰现象。通过查阅国内外相关文献,并未见关于灯盏甲素的药动学研究。而与其化学性质相似的灯盏乙素的药动学研究甚多。国外多篇文献^[5-7]曾报道灯盏乙素吸收缓慢且出现双峰现象,并对其现象进行解释。由此预测灯盏甲素的药时曲线出现双峰可能是其在胃或肠腔双重位置被吸收,也可能是药物重吸收或肝肠循环吸收所致^[7]。

实验结果表明,大鼠血浆中灯盏甲素的血药浓度时间符合非房室模型。而正常组和模型组的部分药动学参数存在显著差异,正常组的 $AUC_{(0-t)}$ 为 2561.5 ± 220.9 、 C_{max} 为 145.2 ± 20.3 ,模型组的 $AUC_{(0-t)}$ 为 3466.2 ± 521.6 、 C_{max} 为 210.1 ± 45.5 。造成这种差异的原因可能是口服药物在病理机体内的异常吸收。脑缺血再灌注损伤的机体吸收药物时,细胞膜

因病理状态受损,通透性增强,使灯盏甲素跨膜转运加快;由于灯盏甲素分子量较小,其转运方式可能顺浓度梯度经细胞旁路通道入血,病理状态机体的毛细血管通透性增加使通过细胞旁路通道的药物转运加快,药物吸收较多。但究竟是何种因素导致这样的差异,有待于进一步的研究^[8]。

参考文献

- 1 Pan W(潘文),Pan JH(潘金火). Study on preparation of breviscapine bilayer sustained-release tablets and their release behavior *in vitro*. *Res Pract Chin Med*(现代中药研究与实践),2008,6:62-64.
- 2 Huang Y(黄勇),Hu J(胡杰),Lu Y(陆苑),et al. Pharmacokinetics of three index components in flower of *Polygonum orientale* L. in rat plasma by UPLC-MS. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报),2015,9:1314-1318.
- 3 Hu J(胡杰),Li YT(李月婷),Hou JY(侯靖宇),et al. Simultaneous determination of five main index compounds in *Radix Paeoniae Rubra* by UPLC-MS. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2015,27:282-285.

(上接第 667 页)

- 7 Lu YM,Lu WJ,Wang W,et al. Thermodynamic studies of partitioning behavior of cytochrome c in ionic liquid-based aqueous two-phase system. *Talanta*,2011,85:1621-1626.
- 8 Thommes J,Etzel M. Alternatives to chromatographic separations. *Biotechnol Prog*,2007,23:42-45.
- 9 Fan F(范芳). Application development of aqueous two-phase extraction technology. *Chem Bioeng*(化学与生物工程),2011,28(7):16-19.
- 10 Pei Y,Wang J,Wu K,et al. Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. *Sep Purif Technol*,2009,64:288-295.
- 11 Li ZY(李志勇),Pei YC(裴渊超),Wang FY(王慧勇),et al. Progress in environmentally friendly ionic liquids aqueous two-phase systems. *Chin Sci Bull*(科学通报),2015,60:2457-2465.
- 12 Li P(李兵),Zhu BC(朱宝成). Separation and purification of urokinase by aqueous two-phase extraction. *Chin J Bioproc Eng*(生物加工过程),2013,11(3):29-33.
- 13 Cai M(蔡马),Yu Q(于群),Zhu XC(朱新产). Isolation of *Momordica charantia* seed proteins using polyethylene glycol/ammonium sulfate aqueous two-phase system and its an-

- 4 Ai JC(艾进超),Zhou HF(周慧芬),Shu MC(舒明春),et al. Study on pharmacokinetics-pharmacodynamics correlation of Danshensu in rats with focal cerebral ischemia. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志),2014,14:2751-2755.
- 5 Huang JM,Li N,Yu YQ,et al. Determination of aglycone conjugated metabolites of scutellarinin rat plasma by HPLC. *J Pharm Biomed*,2006,40:465-471.
- 6 Zhang XR,Guan J,Zhu HY,et al. Simultaneous determination of scutellarin and tetrahydropalmatine of Deng-yan granule in rat plasma by UFLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B*,2014,971:126-132.
- 7 Huang JM,Weng WY,Huang XB,et al. Pharmacokinetics of scutellarin and its aglycone conjugated metabolites in rats. *Eur J Drug Metab Pharm*,2005,30:165-170.
- 8 He XH(何希辉). Pharmacokinetics of paeoniflorin in *Paeoniae Radix* extract in rat and effects of *Paeoniae Radix* extract on monoamine neurotransmitters in cortex,hippocampus and striatum of rat brain. Beijing:Peking Union Medical College(中国协和医科大学),PhD. 2004.

timicrobial activity. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2011,23:612-619.

- 14 Lu Q(陆强),Deng X(邓修). 提取与分离天然产物中有有效成分的新方法——双水相萃取技术. *Chin Tradit Patent Med*(中成药),2000,22:653-655.
- 15 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*,1976,72:248-254.
- 16 Lu YM,Lu WJ,Wang W,et al. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol(PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. *Food Bioprod Process*,2010,88:40-46.
- 17 Yang X(杨雪),Zhang ZQ(张志清),Li QL(李青莲),et al. Optimization of the extraction condition for wheat bran esterase in aqueous two-phase systems by response surface analysis. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2014,35:257-263.
- 18 Silva FFM,Fernandes-Platzgummer A,Aires-Barros MR,et al. Integrated purification of monoclonal antibodies directly from cell culture medium with aqueous two-phase systems. *Sep Purif Technol*,2014,132:330-335.