

· 基于药物体系导向研究专题 ·

正常大鼠体内女贞子红景天苷制备物药代动力学表征研究

彭平 赵丽敏 刘斌 姜艳艳 冯朵 孙道涵 杨书娟 朱乃亮 石任兵

【摘要】 目的 建立超高效液相色谱法, PDA 检测器同时测定大鼠血清中红景天苷及酪醇的含量分析方法, 以研究女贞子红景天苷制备物药代动力学表征及其类药特性。**方法** 采用 UPLC-PDA 色谱法, ACQUITY UPLC H-CLASS T3 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈—水 (3 : 97), 流速 0.3 mL/min; 柱温 25 °C。**结果** 入血成分红景天苷 C_{max} 19.29 μg/mL、 T_{max} 0.5 h、 $T_{1/2}$ 3.28 h、 $K_0.21$, 酪醇 C_{max} 0.32 μg/mL、 T_{max} 0.75 h, 血药浓度比值 (酪醇 : 红景天苷) 最大为 2.99 : 100, 为体外含量比值的 9.65 倍。**结论** 所建方法简便经济、稳定易行; 以入血成分体内外浓度、含量比值动态变化与药代动力学表征关联分析, 揭示了女贞子红景天苷制备物类药特性。

【关键词】 红景天苷; 酪醇; 药代动力学表征; 超高效液相色谱法

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.03.005

Pharmacokinetic characterization of salidroside extract from Ligustri Lucidi Fructus in rats PENG Ping, ZHAO Li-min, LIU Bin, et al. Key Unit of Exploring Effective Substances of Classical and Famous Formulas of State Administration of Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: SHI Ren-bing, E-mail: shirb@126.com

【Abstract】 Objective The concentration of salidroside and tyrosol in serum of rats is determined by using UPLC-PDA to investigate the pharmacokinetic parameters and characters of salidroside extract prepared from Ligustri Lucidi Fructus. **Methods** UPLC-PCA was performed on ACQUITY UPLC H-CLASS T3 column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) with salicin as the internal standard. The mobile phase was acetonitrile: water solution (3: 97, v/v) at a flow rate of 0.3 mL/min. The temperature of column was 25 °C. **Results** The pharmacokinetics parameters of salidroside in rat including C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$ and K were 19.29 μg/mL, 0.5 h, 3.28 h, 0.21, respectively. The pharmacokinetics parameters of tyrosol in rat including C_{max} , T_{max} were 0.32 μg/mL and 0.75 h, respectively. The maximum content ratio of tyrosol / salidroside in vivo was 2.99/100, which was 9.65 times higher than the ratio in vitro. **Conclusion** The established method showing stability was easy to execute, which revealed the drug-like characters of salidroside extract from Ligustri Lucidi Fructus.

【Key words】 Salidroside; Tyrosol; Pharmacokinetic; Ultra performance liquid chromatography

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划 (2012BAI29B06); 北京中医药大学科研创新团队资助项目 (2011-CXTD-12); 北京中医药大学重点学科开放课题 (2013-2DXKKF-23)

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院 国家中医药管理局中药经典名方有效物质发现重点实验室 [彭平 (博士研究生)、赵丽敏 (硕士研究生)、刘斌、孙道涵 (硕士研究生)、冯朵 (硕士研究生)、杨书娟 (硕士研究生)、朱乃亮 (博士研究生)、姜艳艳、石任兵]; 北京市教委中药质量控制技术工程中心 (石任兵、刘斌、姜艳艳)

作者简介: 彭平 (1987 -), 女, 2012 年在读博士研究生。研究方向: 中药有效物质基础研究。E-mail: pengping2177@126.com

通讯作者: 石任兵 (1957 -), 博士, 教授, 博士生导师。研究方向: 中药 (复方) 有效物质基础研究与药物创新。E-mail: shirb@126.com

红景天苷为中药红景天特性功效成分。现代药理学研究表明, 红景天苷及其苷元酪醇均具有抗炎、抗肿瘤、保护心脑血管及其它脏器等作用^[1-3]。为了解决基于红景天苷的药物开发资源问题, 本课题组研究建立了基于碱转化大孔吸附树脂分离富集, 由女贞子制备红景天苷系列制备物的工艺方法与质量控制体系, 经放大验证工艺经济稳定简便可行^[4-9], 从而为基于红景天苷的药物创新提供了药原支撑。目前已报道了诸多体内外红景天苷的含量测定方法, 但对其代谢产物酪醇含量的同时测定

方法只有超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)^[10-11],使得分析条件因仪器昂贵而受到一定的限制,鉴于此,笔者建立 UPLC-PDA 同时测定制备物红景天苷及酪醇体外含量的分析方法,并成功应用于制备物质量控制与药物动力学表征及其类药特性的系统研究,在研究中发现了制备物、红景天苷与酪醇以及所构建的有关药物体系体内表征特性,体现出药物体系的三大基本特性:自然性、协同性、亲和性^[12-13]。研究结果为深入系统进行制备物药物研究奠定了基础,同时亦为基于红景天苷的药物创新提供研究思路与分析方法学借鉴。

笔者拟陆续系统报道有关研究结果,本文首先报道所建立的 UPLC-PDA 同时测定大鼠血清中制备物红景天苷及酪醇的含量分析方法,与应用于药代动力学表征及其类药特性的研究结果。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters ACQUITY 超高效液相色谱仪,PDA 检测器,Empower 工作站,自动进样;Waters ACQUITY UPLC H-CLASS T3 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm),METTLER TOLEDO XS204(METTLER TOLEDO, 瑞士),METTLER TOLEDO XP26(METTLER TOLEDO, 瑞士),sigma 1-14 小型台式离心机(sigma, 德国),Labconco® CentriVap 离心浓缩仪(LABCONCO, 美国),涡旋混合器(其林贝尔, 中国),0.2 μm 微孔滤器。

1.2 药品与试剂

红景天苷对照品(北京方程生物科技有限公司,批号 130426;含量 99.9%)、水杨苷对照品(北京方程生物科技有限公司,生产批号 121118;含量 99.9%)、酪醇对照品(北京方程生物科技有限公司,批号 120927;含量 99.9%)、高氯酸(分析纯,天津市鑫源化工有限公司)、色谱乙腈(色谱纯,Fisher 公司)、哇哈哈纯净水。

女贞子红景天苷制备物:取女贞子药材(浙江产地)70%乙醇提取,经碱转化后,大孔树脂分离富集制备而得。(批次:20130926,由课题组制备,样品经高效液相色谱法测定,红景天苷含量 64.5%,酪醇含量 0.2%)。

1.3 实验动物

健康 Sprague-Dawley(SD),雌性,大鼠,体质量 200~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公

司提供,许可证编号:SCXK(京)2012-0001。

2 方法

2.1 女贞子红景天苷制备物给药方案与样品采集

采用单次正常大鼠口服灌胃 100 mg/kg 制备物(样品中红景天苷含量 64.5%,酪醇含量 0.2%),并于给药后 2 分钟、5 分钟、10 分钟、15 分钟、30 分钟、45 分钟、1 小时、1.5 小时、2 小时、3 小时、4 小时、8 小时、12 小时、24 小时时间点(每时间点 5 只大鼠)腹主动脉取血,每次 5 mL,4000 r/min 离心 10 分钟,分离血清,即为含药血清,于 -80℃ 保存备用。

2.2 血样处理方法

取 300 μL 含药血清,置于 2 mL 离心管内,准确加入 50 μL 质量浓度为 100 μg/mL 的内标水杨苷溶液,涡旋 30 秒,加 0.4 mol/mL 高氯酸 180 μL,涡旋 30 秒,静置 15 分钟,14800 r/min 高速离心 15 分钟,取上清液 200 μL 加 1 μL 50% NaOH 调 pH 到 6~7,过 0.22 μm 微孔滤器,供 UPLC-PDA 检测分析。

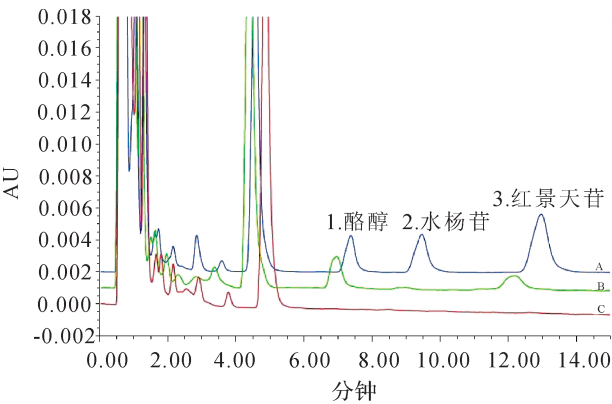
2.3 体内分析方法建立及液相色谱条件及系统适用性

2.3.1 对照品溶液的配制 精密称取红景天苷、酪醇、水杨苷对照品各 10 mg,分别置于 10 mL 容量瓶中用流动相溶解并定容至 10 mL,得质量浓度均为 1 mg/mL 的母液,用时用流动相稀释至所需浓度。

Waters ACQUITY 超高效液相色谱仪,PDA 检测器,Empower 工作站,ACQUITY UPLC H-CLASS T3 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);流动相:乙腈-水(3:97),流速为 0.3 mL/min;柱温为 25℃;进样体积为 10 μL,检测波长 276 nm。

血清中杂质对成分测定无干扰,且红景天苷、酪醇和水杨苷分离效果良好,具有较好的专属性,分析条件可行,色谱图见图 1。

2.3.2 线性关系与灵敏度考察 取空白血清加入红景天苷和酪醇混合对照品溶液,配制成红景天苷浓度分别为 1、5、10、25、50、100、200 μg/mL,酪醇浓度分别为 0.5、1、5、10、25、50、100 μg/mL 的血清样品,按血样处理方法处理并测定,以红景天苷或酪醇与内标浓度比(X)为横坐标,红景天苷或酪醇与内标峰面积之比(Y)为纵坐标绘制标准曲线。红景天苷体内浓度回归方程为: $Y = 1.1958X - 0.1421$, $R = 0.9996$ ($n = 7$),线性范围为 1~200 μg/mL,酪醇体内浓度回归方程为: $Y = 2.6114X - 0.0323$, $R =$



A 对照品 + 空白血清; B 样品; C 空白血清;
峰 1 水杨苷; 峰 2 酪醇; 峰 3 红景天苷

图 1 空白血清和含药血清 UPLC 色谱对比图

0.9996 ($n = 7$), 线性范围为 0.5 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 。配制已知浓度的红景天苷、酪醇对照品溶液测得方法最低检测限 ($S/N = 3$) 分别为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$, 最低定量限 ($S/N = 10$) 分别为 1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.3 回收率与精密度考察 取空白血清加入红景天苷和酪醇混合对照品溶液配制成低、中、高浓度血清样品 (红景天苷质量浓度分别为 5、25、100 $\mu\text{g/mL}$, 酪醇质量浓度分别为 1、10、50 $\mu\text{g/mL}$) 各 5 份, 按血清处理方法处理测定, 每一浓度进行 5 份样本分析, 连续测定 3 天, 根据标准曲线计算相对回收率 ($n = 5$)、绝对回收率 ($n = 5$)、日内 RSD ($n = 5$) 和日间 RSD ($n = 3$), 见表 1。

2.3.4 稳定性考察 取空白血清加入红景天苷和酪醇混合对照品溶液, 配制成低、中、高浓度的血清样品 (红景天苷质量浓度分别为 5、25、100 $\mu\text{g/mL}$, 酪醇质量浓度分别为 1、10、50 $\mu\text{g/mL}$) 各 3 份, 一份于常温 (24 $^{\circ}\text{C}$) 放置 24 小时 (测定时间为放置 0、4、8、12、24 小时), 一份于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 天 (测定时间为放置 1、8、15、22、30 天), 一份于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 5 次 (测定时间为冻融次数 1、2、3、4、5), 于相应测定时间测定各血样中红景天苷和酪醇的浓度。结果表明红景天苷和酪醇在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置及反复冻融条件下稳定性较好, 见表 2。

表 1 红景天苷及酪醇体内含量测定回收率与精密度考察结果

对照品	浓度 $\mu\text{g/mL}$	回收率		精密度 RSD (%)			
		相对回收率 (%)	RSD (%)	绝对回收率 (%)	RSD (%)	日内	日间
红景天苷	5	86.67	6.58	94.42	1.33	9.27	10.10
	25	90.14	2.09	95.75	0.96	2.56	3.11
	100	96.09	1.11	94.37	2.01	1.67	4.01
酪醇	1	88.76	7.02	93.71	1.10	8.56	12.23
	10	95.45	1.44	92.78	1.03	2.08	3.33
	50	92.80	2.13	94.42	2.05	5.45	6.12

表 2 红景天苷及酪醇体内含量测定稳定性考察结果 ($n = 5$)

对照品	浓度 $\mu\text{g/mL}$	稳定性					
		24 小时内 稳定性 $\mu\text{g/mL}$	RSD (%)	冻融稳定性 $\mu\text{g/mL}$	RSD (%)	长期稳定性 $\mu\text{g/mL}$	RSD (%)
红景天苷	5	4.27	1.19	4.67	12.37	4.06	8.10
	25	21.46	0.97	22.79	9.79	23.67	6.89
	100	96.46	1.77	95.23	6.01	94.04	3.34
酪醇	1	0.85	2.03	0.81	12.98	0.79	9.89
	10	9.43	1.03	9.18	7.37	9.02	2.67
	50	47.06	2.10	47.22	5.24	45.26	4.78

表 3 红景天苷制备物给药后不同时间点红景天苷的血药浓度(μg/mL)

时间	例数 (n)	血药浓度(μg/mL)					平均值 (μg/mL)	SD
		1	2	3	4	5		
2 分钟	5	4.12	3.26	4.29	3.19	3.72	3.71	0.49
5 分钟	5	4.94	5.48	6.67	6.56	6.94	6.12	0.86
10 分钟	5	14.08	12.35	12.02	13.24	12.87	12.91	0.80
15 分钟	5	18.69	16.71	12.99	13.81	14.45	15.33	2.33
30 分钟	5	24.16	16.70	18.69	16.71	20.17	19.29	3.09
45 分钟	5	18.47	14.27	15.83	15.25	13.43	15.45	1.92
1.00 小时	5	6.28	6.55	7.32	8.50	6.46	7.02	0.92
1.50 小时	5	3.92	3.73	3.37	3.12	3.17	3.46	0.35
2.00 小时	5	3.78	3.80	2.37	3.39	3.13	3.30	0.58
3.00 小时	5	2.59	2.53	2.63	2.60	2.43	2.55	0.08
4.00 小时	5	—	—	—	—	—	—	—
8.00 小时	5	—	—	—	—	—	—	—
12.00 小时	5	—	—	—	—	—	—	—
24.00 小时	5	—	—	—	—	—	—	—

表 4 制备物红景天苷大鼠体内药代动力学参数

半衰期 $T_{1/2}$ (h)	最大血药浓度时间 T_{max} (h)	最大血药浓度值 C_{max} (μg/mL)	曲线下面积 AUC_{0-t} (μg/mL × h)	平均滞留时间 $MRT_{0-inf_{obs}}$ (h)	清除率 K (CL/V)
3.28	0.50	19.29	21.00	3.43	0.21

3 结果

3.1 血药浓度测定结果

取各组血清样品制备测定,并计算口服制备物各时间点红景天苷血药浓度,结果见表 3。在制备物血药浓度检测中,于 0.5 小时、0.75 小时、1 小时时间点可检测到酪醇的吸收峰,并计算血药浓度分别约为 $0.30 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.32 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.21 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ 。

3.2 药代动力学表征分析

采用生物学统计软件 PKSolver 计算得红景天苷制备物大鼠体内主要成分红景天苷的药代动力学参数,见表 4,其体内动态变化药时曲线见图 2。

3.3 红景天苷及酪醇体内外含量相对比值分析

以红景天苷含量为参比,计算体内外制备物中

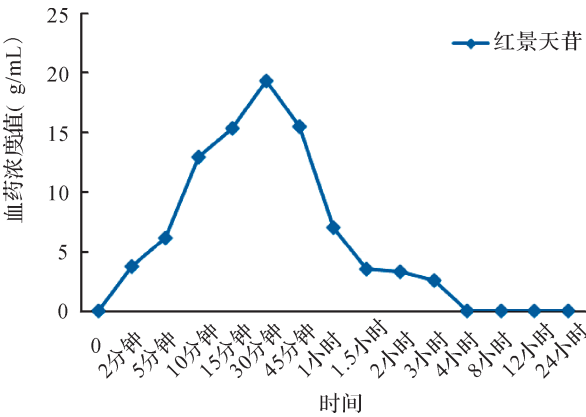


图 2 制备物红景天苷大鼠体内药-时曲线

成分酪醇含量与红景天苷含量比值,即体外制备物成分含量比值为:酪醇:红景天苷;体内成分血药浓度比值为:酪醇:红景天苷,结果见表 5。

表 5 体内外制备物红景天苷与酪醇动态含量比值

女贞子红景天苷制备物	酪醇：红景天含量苷比值
制备物体外	
0.5 小时	0.31 : 100
0.75 小时	0.31 : 100
1 小时	0.31 : 100
制备物体内	
0.5 小时	1.56 : 100
0.75 小时	2.07 : 100
1 小时	2.99 : 100

结果显示,以红景天苷含量为参比,酪醇与红景天苷含量比值排序为:制备物体外 < 体内 0.5 小时 < 体内 0.75 小时 < 体内 1 小时;在大鼠体内酪醇与红景天苷含量比值较制备物增大了 5.03 ~ 9.65 倍,且从给药后 0.5 小时到 1 小时持续了 0.5 小时的增量动态变化。

4 讨论

本研究建立了 UPLC-PDA 同时测定大鼠血清中红景天苷及酪醇的含量分析方法,并成功应用于女贞子红景天苷制备物药代动力学表征及其类药特性研究。研究发现女贞子红景天苷制备物在正常大鼠体内类药成分主要以红景天苷原型存在,其药代动力学表征为:吸收快、生物利用度较高;而酪醇表征为体内最大血药浓度出现相对滞后,且与红景天苷的血药浓度比值较制备物成分含量比值呈明显增高,并与红景天苷具有部分共血药与协同吸收时间。因此,酪醇的体内表征及其来源是制备物中的微量酪醇在体内以原型存在? 还是制备物中红景天苷由机体“有意”所为的代谢产物,而与红景天苷构成药物体系,从而对其药物属性特性产生协同性? 这引起课题组的高度关注,并系统探究其原委,揭示出其药物体系基本表征特性。以制备物及其在正常大鼠体内红景天苷及酪醇含量、含量比值动态变化与药代动力学表征关联分析,揭示了女贞子红景天苷制备物类药特性,为对其进行深入创新药物研究奠定了基础,同时亦为有关药物研究提供

了思考以及技术与方法学支撑。

正常状态下大鼠女贞子红景天苷制备物体内药代动力学表征研究结果发现,大鼠体内可同时存在红景天苷和酪醇成分,但酪醇成分血药浓度在正常状态下仅达到检测限,但在课题组系统研究中发现,在有关病理模型状态下大鼠体内酪醇成分血药浓度明显增高,高出最低定量限,并应用本分析方法成功研究了女贞子红景天苷制备物的有关药物体系及其药物属性与特性,有关实验结果将进一步报道。

参 考 文 献

[1] 张明发,沈雅琴. 红景天苷及其苷元酪醇的抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用[J]. 药物评价研究,2013,36(3):228-234.

[2] 张明发,沈雅琴. 红景天苷及其苷元酪醇的心血管保护作用[J]. 中国新药杂志,2012,21:2521-2525.

[3] 谢卉,朱大会. 红景天苷对神经系统疾病病理作用的研究进展[J]. 中国中药杂志,2012,37(17):2505-2509.

[4] 周文娟,石任兵. 女贞子有效部位制备工艺及其质量控制方法研究[D]. 北京:北京中医药大学,2008.

[5] 石任兵,周文娟,田恒康,等. 一种从女贞子中制备高纯度红景天苷的方法:中国,CN101279992[P]. 2008-10-08.

[6] 李娟,石任兵. 基于碱转化的女贞子红景天苷部位及其单一成分的制备与质量标准研究[D]. 北京:北京中医药大学,2011.

[7] 石任兵,姜艳艳,李娟. 一种从女贞子中制备红景天苷的新方法:中国,CN102321127A[P]. 2012-01-18.

[8] 彭晓敏,石任兵. 基于碱转化的女贞子中红景天苷制备工艺及其质量标准研究[D]. 北京:北京中医药大学,2012.

[9] 石任兵,彭平,姜艳艳,等. 一种从女贞子中制备系列纯度红景天苷的方法:中国,CN103351415A[P]. 2013-10-16.

[10] 郭娜. 红景天苷及其代谢产物酪醇在大鼠体内的药物代谢动力学研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2012.

[11] 吴超凡,李耿,符崖. LC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中红景天苷和酪醇及其药物动力学研究[J]. 中药新药与临床药理,2013,(2):169-172.

[12] 石任兵,王永炎. 自然药观的相关性思考[J]. 北京中医药大学学报,2012,35(4):221-225.

[13] 石任兵,王永炎,姜艳艳,等. 论中药化学发展近况[J]. 北京中医药大学学报,2012,35(3):3-159.

(收稿日期:2014-09-10)
(本文编辑:董历华)