

1, 5-二咖啡酰奎宁酸与其四乙酰化物 相对生物利用度的研究

时美慧^①, 顾若兰^①, 甘慧^①, 李俭^①, 汤晴^①, 宋佃卫^①, 吴卓娜^①, 董俊兴^②, 孟志云^①

[摘要] 目的 比较 1, 5-二咖啡酰奎宁酸与其四乙酰化物在大鼠体内的生物利用度, 为目标化合物的筛选和结构优化提供参考依据。方法 Wistar大鼠随机分两组, 分别灌胃给予等摩尔数的 1, 5-二咖啡酰奎宁酸 (100 mg/kg) 和四乙酰化物 (133 mg/kg)。血浆样品经乙酸乙酯萃取后, 以乙腈-水 (5 mmol/L 乙酸铵, pH 5.0) 为流动相, 用 Ultimate C₁₈ 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 5 μm) 分离, 采用液相色谱串联质谱法同时监测两个化合物。结果 两个化合物均在 5~1000 ng/ml 范围内呈良好线性关系, 精密度、准确度、基质效应、提取回收率等各项指标都满足生物样品测定的要求。四乙酰化物在大鼠体内迅速转化成活性代谢产物 1, 5-二咖啡酰奎宁酸, 血浆中没有检测到四乙酰化物和可能的三乙酰化、二乙酰化和单乙酰化物。以 1, 5-二咖啡酰奎宁酸的量计算, 大鼠口服四乙酰化物与口服 1, 5-二咖啡酰奎宁酸的相对生物利用度为 64%。结论 四乙酰化物的生物利用度低于 1, 5-二咖啡酰奎宁酸, 开发口服制剂时 1, 5-二咖啡酰奎宁酸优于四乙酰化物。

[关键词] 1, 5-二咖啡酰奎宁酸; 四乙酰化物; 相对生物利用度; 药代动力学; 液相色谱串联质谱法

[中图分类号] R969.1; R965

[文献标志码] A

[文章编号] 1008-9926(2011)04-0286-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2011.04.02

The relative bioavailability of 1, 5-Dicaffeoylquinic acid and its tetra-acetylate

SHIM erhui^①, GU Ruolan^①, GAN Hui^①, LI Jian^①, TANG Qing^①, SONG Dianwei^①,
WU Zhuona^①, DONG Junxing^②, MENG Zhiyun^①

^① Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

^② Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

[Abstract] **Objective** To study the relative bioavailability of 1, 5-dicaffeoylquinic acid and its tetra-acetylate. **Methods** Wistar rats were randomly divided into 2 groups administered respectively with 1, 5-dicaffeoylquinic acid (100 mg/kg) and its tetra-acetylate (133 mg/kg) of an equal number of moles. Analytes were extracted from plasma samples by liquid-liquid extraction with ethyl acetate, separated on a C₁₈ reversed phase column with 5 mmol/L ammonium acetate and acetonitrile as the mobile phase. Simultaneous determination of 1, 5-dicaffeoylquinic acid and its tetra-acetylate was performed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Results** Linearity was good over the range of 5-1000 ng/ml for each analyte. In addition, the accuracy, precision, specificity, extraction recovery and matrix effect were satisfactory. The concentration of tetra-acetylate is below the lower limit of quantitation. 1, 5-dicaffeoylquinic acid was detected in the rat plasma. There was no triacetylate, diacetylate or monoacetylate. The relative bioavailability of tetra-acetylate and 1, 5-dicaffeoylquinic acid was 64% according to the quantitation of 1, 5-dicaffeoylquinic acid. **Conclusion** The bioavailability of tetra-acetylate was lower than that of 1, 5-dicaffeoylquinic acid.

[Key words] 1, 5-dicaffeoylquinic acid; tetra-acetylate; relative bioavailability; pharmacokinetics; liquid chromatography/tandem mass spectrometry

基金项目: 国家十一五重大专项: “完善和全面提升临床前药物代谢动力学技术平台”, No. 2009ZX909304-004

作者简介: 时美慧, 硕士。研究方向: 药代动力学。

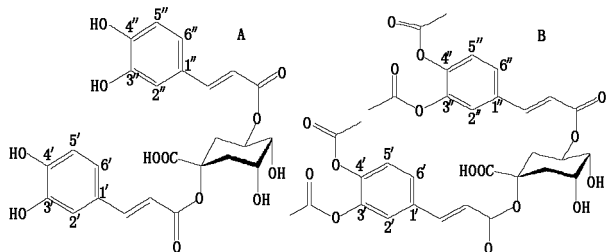
作者单位: ① 100850 北京, 军事医学科学院野战输血研究所;

② 100850 北京, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所

通讯作者: 孟志云, Tel: (010) 66931993 E-mail: mengzhiyun@vip.163.com

1, 5-二咖啡酰奎宁酸 (1, 5-dicaffeoylquinic acid, 1, 5-DCQA) 为中药旋覆花的有效成分, 具有多方面的生理活性^[1, 2]。它是我国具有自主知识产权的化合物, 已获得国家发明专利^[1], 其抑制人类免疫缺陷病毒的作用已经在细胞与整体动物等多种实验模型上得到证实, 现已进入 II 期临床研究阶段^[3]。

根据已有的 1, 5-DCQA 的 药代动力学 研究报道^[3], 我们对其进行结构优化, 期待得到药代性质更好的化合物。本研究中将 1, 5-DCQA 结构中的 2 分子咖啡酸上 3'、4' 及 3''、4'' 位的羟基进行乙酰化 (见图 1), 比较改造后的化合物的生物利用度。



A: 1, 5-二咖啡酰奎宁酸;

B: 1, 5-二-(3', 4'-二乙酰基)-咖啡酰奎宁酸

图 1 化学结构

1 材料

1.1 仪器与试剂 Finnigan TSQ Quantum 液相质谱联用系统, 包括 Finnigan TSQ Quantum 三级四极杆质谱仪、Finnigan Surveyor 自动进样器和 mass 泵、Xcalibur 数据处理系统 (均为美国热电公司); 低温高速离心机 (美国 Sigma 公司)。1, 5-DCQA 及其四乙酰化物 (纯度 > 99%, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所提供, 批号: 100119, 100221); 葛根素 (中国药品生物制品检定所); 羧甲基纤维素钠 (规格: 25 kg 袋, 河北铭泰化工有限公司, 批号: HV100216); 乙腈、乙酸为色谱纯, 醋酸铵、乙酸乙酯为分析纯, 蒸馏水 (自制三蒸水)。

1.2 动物 Wistar 大鼠, ♂ 体质量 180~220 g, 10~12 周龄 [军事医学科学院实验动物中心, 动物合格证号: SCXK(军)2007-004, 动物实验设施使用许可证号: SYXK(军)2007-004]。饲养条件: 大鼠均独笼饲养于室温为 22℃, 湿度为 50%~100%, 12 h 昼夜更替的动物室内。期间自由饮水进食, 提供实验室标准动物饲料。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件 (1) 色谱条件 色谱柱: Ultimate C₁₈ 柱 (50 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相: 乙酸铵 (5 mmol/L, pH 5.0)-乙腈; 流速: 0.2 mL/min; 梯度洗脱方法: 0~2 min, 5% 乙腈; 2.1~5.5 min, 50% 乙腈; 5.6~8 min, 乙腈 5%。(2) 质谱条件 ESI 离子源; 负离子扫描; 鞘气: 25 arh; 辅助气: 25 arh; 电压: 3800 V; 毛细管温度: 300℃; 采用选择反应检测

(SRM) 方式进行检测: 1, 5-DCQA m/z 为 515⁺ 191, 四乙酰化物 m/z 为 683⁺ 335, 377, 葛根素 m/z 为 415⁺ 267。

2.2 溶液的制备 1, 5-DCQA, 四乙酰化物以及内标均用流动相乙酸铵 (5 mmol/L, pH 5.0)-乙腈以 1:1 比例的混合溶液溶解成 2 mg/mL 的贮备液。

2.3 生物样品处理 精密量取血浆 100 μL 加 10 μL HCl (7.2 mol/L) 调节 pH 值, 加入 10 μL 200 ng/mL 的内标, 混匀后加入 200 μL 乙酸乙酯, 涡旋振荡 3 min, 14 000 r/min 离心 5 min, 转移上清, 共萃取两次, 合并上清, N₂ 流下吹干, 流动相 (1:1) 溶液进行复溶, 进行分析。

2.4 分组与给药 Wistar 大鼠 6 只, 随机分为 2 组, 两种药物分别用 1% 羧甲基纤维素钠溶液配制成为 20 和 26.6 mg/mL 按体质量灌胃给药, 给药量 1, 5-DCQA 为 100 mg/kg, 四乙酰化物为 133 mg/kg 均于给药前 0 h 及给药后 0.083, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12 h 采集血样置于肝素化管中, 8000 r/min 离心 10 min 取上清血浆。按上述 2.3 项进行血浆的处理, 用随行标准曲线计算血浆中的药物浓度。

2.5 统计学处理 使用计算机程序 Excel for Windows 7.0a 和 Microcal origin 7.5 进行数据处理和制图。采用 Winolin[®] ver 5.2 (Pharsight Corporation 美国) 药代动力学数据处理软件拟合药代动力学参数, 按非房室模型用统计矩法进行拟合。

2.6 方法学确证

2.6.1 方法的专属性 分别对空白大鼠血浆 (图 2A), 大鼠血浆中加入标准物质 (图 2B) 以及两种化合物经大鼠给药后 5 min 的血浆生物样品 (图 2C, 图 2D)。图 2 中上图为内标、中图为 1, 5-DCQA, 下图为四乙酰化物。由图 2 可知血浆中的杂质在本实验条件下对两个待测物及内标的定量分离以及测定没有影响。

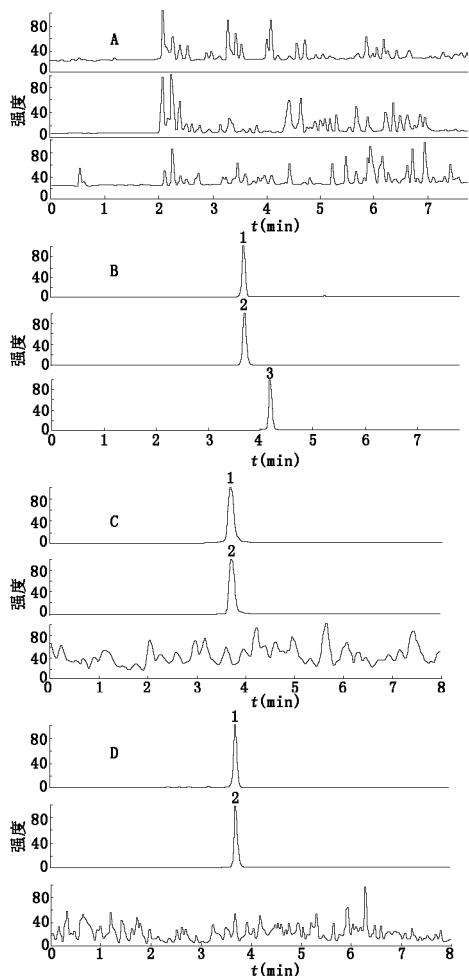
2.6.2 线性范围及定量下限 取空白大鼠血浆 90 μL 加入 10 μL 不同浓度的两种待测物混合溶液的一系列标准溶液, 使血浆中两个待测物浓度分别为 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ng/mL 按 2.3 项下处理后进行样品分析。以待测物各自的浓度 (X) 为横坐标, 以各待测物与内标的峰面积比值 (Y) 为纵坐标, 做线性回归, 得 1, 5-DCQA、四乙酰化物的直线回归方程分别为:

$$Y = 0.00080244 + 0.00157883X, R^2 = 0.9927$$

$$Y = 0.000486853 + 0.000418017X, R^2 = 0.9918$$

结果表明, 两个待测物在 5~1000 ng/mL 的浓度范

围内呈良好线性关系,最低定量下限为 5 ng/ml



A: 空白血浆; B: 空白血浆加入标准品及内标;
C: 给 1, 5-DCQA 后大鼠体内血浆样品;
D: 给四乙酰化物后大鼠体内血浆样品;
1: 内标; 2: 1, 5-DCQA; 3: 四乙酰化物
图 2 大鼠血浆样品的典型色谱图

2.6.3 基质效应和绝对回收率 配置浓度为 10, 100, 1000 ng/ml 的标准血浆样品,按 2.6.2 项下处理,另稀释 10, 100, 1000 ng/ml 的标准溶液,分析测定,计算加入基质和不加基质的峰面积的百分比,以考察 3 个待测物的绝对回收率。取空白血浆,按 2.3 项下处理,制备空白基质,空白基质中加入 3 个待测物的标准品,制成 10, 100, 1000 ng/ml 的溶液,另稀释 10, 100, 1000 ng/ml 的标准溶液,分析测定,计算加入基质和不加基质的峰面积的百分比,以考察血浆对待测物的质谱响应有无抑制效应。基质效应和绝对回收率结果见表 1。结果表明本试验方法对两种化合物没有基质效应,回收率高于 88%。

表 1 1, 5-DCQA 及其四乙酰化物的基质效应和回收率测定结果 (n = 3)

化合物	浓度 (ng/ml)	基质效应		绝对回收率	
		$\bar{x} \pm s$	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)
1, 5-DCQA	10	93.3 ± 11.6	12.4	90.0 ± 9.3	10.4
	100	102.3 ± 6.4	8.0	88.8 ± 5.1	5.7
	1000	97.9 ± 5.0	6.9	96.0 ± 5.4	5.6
四乙酰化物	10	87.6 ± 11.8	13.4	100.6 ± 4.4	4.4
	100	102.3 ± 6.4	6.3	98.1 ± 11.7	11.9
	1000	97.9 ± 5.0	5.1	104.6 ± 0.3	0.3

2.6.4 精密度和准确度 配制 10, 100, 1000 ng/ml 的血浆样本,每批次每个浓度 5 个样本,完成 3 个批次,考察批内、批间精密度和准确度。结果见表 2。

表 2 1, 5-DCQA 及其四乙酰化物精密度和准确度测定结果 (n = 5)

化合物	加入浓度 (ng/ml)	测定浓度 (ng/ml)	SD (%)		RSD (%)		RE (%)
			批内	批间	批内	批间	
1, 5-DCQA	10	10.5	0.9	1.2	8.4	11.5	4.6
	100	97.5	6.6	4.1	6.8	4.2	-2.5
	1000	1021.6	55.4	137.5	5.4	13.5	2.2
四乙酰化物	10	9.7	0.8	1.1	8.1	11.6	-3.2
	100	97.1	7.0	10.5	7.2	10.8	-2.9
	1000	978.5	48.4	109.2	5.0	11.2	-2.2

上述结果表明,本文所建立的同时测定 1, 5-DCQA 及四乙酰化物的分析方法符合指导原则要求,可用于大鼠体内生物利用度的研究。

2.7 血药浓度-时间曲线 四乙酰化物进入大鼠体内后,在大鼠血浆中的四乙酰化物的浓度低于检测限,其中只能检测到 1, 5-DCQA,提示该化合物在体内转化成活性代谢产物 1, 5-DCQA。口服 1, 5-DCQA 及四乙酰化物后的平均血药浓度-时间曲线见图 3,药代参数见表 3。与直接给予 1, 5-DCQA 相比,给予四乙酰化物组的 1, 5-DCQA 两次达峰时间均提前。试验结果平行样本药代参数差异比较大。造成这种现象的原因除了试验样本数较少存在大鼠之间个体差异问题外,文献 [3, 7] 报道可能与体内的儿茶酚氧位甲基转移酶的基因多态性有关。
(下转 343 页)

以测定制剂中甲磺酸酚妥拉明杂质的含量。本文从样品中分离出一个含 2% ~ 3% 的杂质, 其含量较高, 应当纳入甲磺酸酚妥拉明注射液质量标准中加以控制。采用紫外吸收系数法或紫外吸收对照品法均是测定制剂中杂质和主成分含量的总和, 不能真实反映药品的质量。主要杂质的结构和药效还有待进一步研究。处方中含有 5% 葡萄糖, 对样品中 5-羟甲基糠醛进行了测定, 结果表明 5-羟甲基糠醛保留时间约为 3 min, 不干扰甲磺酸酚妥拉明和主要杂质的测定。本品经酸、碱、氧化、高温和光照破坏试验的结果表明, 对酸、氧化、高温和光照较稳定, 对碱较为敏感。文献 [2] 采用重量法测定含量, 干燥恒重操作麻烦费时, 且沉淀黏附于器壁上不易洗涤干净, 易造成误差大, 本文建立的 HPLC 法

可替代重量法, 简便、快速、专属、结果准确。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 临床用药须知 (化学和生物制品卷) [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 175
 [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部) [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 133
 [3] British Pharmacopoeia [S]. 2010: 651
 [4] 孙玲, 徐惠. 高效液相色谱法测定甲磺酸酚妥拉明注射剂的含量 [J]. 山东医药工业, 1999, 18(5): 14-15
 [5] 王丽珍. 紫外分光光度法测定甲磺酸酚妥拉明注射剂的含量 [J]. 江苏药学与临床研究, 1998, 6(1): 23-24

(收稿日期: 2010-09-25; 修回日期: 2010-11-12)

(本文编辑 金杨红)

(上接 288 页)

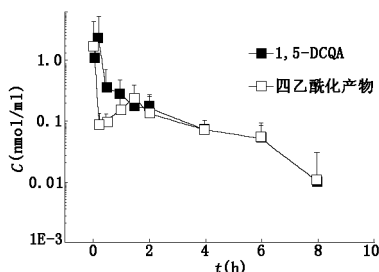


图 3 口服 1,5-DCQA 及四乙酰化物后的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 3 口服 1,5-DCQA 和四乙酰化物的主要药代动力学参数

参数	1,5-DCQA (100 mg/kg)	四乙酰化物 (133 mg/kg)
AUC _{0-t} (h·nmol/L)	1.41 ± 1.02	0.90 ± 0.67
AUMC _{0-t} (h ² ·nmol/L)	2.34 ± 0.72	2.17 ± 0.17
MRT _{0-t} (h)	1.66 ± 1.19	2.42 ± 0.64
t _{1/2} (h)	1.57 ± 0.33	1.19 ± 0.33
T _{max} (h)	0.25 (第一个峰) 2 (第二个峰)	0.083 (第一个峰) 1.5 (第二个峰)
C _{max} (nmol/ml)	2.12 ± 2.76 0.16 ± 0.08	1.20 ± 1.88 0.24 ± 0.15
AUC 比值		0.64

3 讨论

考虑到 1,5-DCQA 可能不是四乙酰化物经口服给药后转化的唯一代谢产物, 对于未知样品进行分析时均检测单乙酰化, 二乙酰化以及三乙酰化产物, 检测结果均与空白血浆对照, 未检测到上述物质, 所以可以初步认为 1,5-DCQA 为四乙酰化物在大鼠体内转化的主要活性产物, 而且转化迅速, 这样生成的 1,5-DCQA 的量就可以作为其体内吸收量。由于等摩尔量给药后体

内的 1,5-DCQA 的 AUC 与 1,5-DCQA 直接给药后的 AUC 比值为 0.64 即进入体内转化成 1,5-DCQA 的量仅为等摩尔给药后的 1,5-DCQA 的 64%, 因此四乙酰化物的生物利用度低于 1,5-DCQA, 开发口服制剂时 1,5-DCQA 优于四乙酰化物。四乙酰化物及 1,5-DCQA 在大鼠体内均出现了双吸收位点, 初步判断第一个位点在胃, 第二个在肠道, 而且在胃中吸收量较大, 提示可能开发胃滞留片来提高药物的生物利用度。

[参考文献]

[1] 董俊兴, 汤仲明, 米志宝, 等. 二咖啡酰奎宁酸在治疗乙型肝炎及逆转录病毒有关疾病中的用途及新咖啡酰奎宁酸衍生物 [P]. 中国: 96111691 2002-07-17
 [2] 孙燕荣, 董俊兴, 吕秋军, 等. 二咖啡酰奎宁酸抗肝纤维化及脂质过氧化作用的研究 [J]. 军事医学科学院院刊, 2002, 26(1): 39-42
 [3] 杨波. 1,5-二咖啡酰奎宁酸的体内外代谢及药代动力学研究 [D]. 沈阳药科大学博士论文 (第五章), 2005: 86-101
 [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010 附录 194-195
 [5] Gu RL, Dou GF, Wang J, et al. Simultaneous determination of 1,5-dicaffeoylquinic acid and its active metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pharmacokinetic studies [J]. *J Chromatography B*, 2007, 852: 85-91
 [6] Liu JL, Dou GF, Meng ZY, et al. An improved LC-MS/MS method for simultaneous determination of 1,5-dicaffeoylquinic acid and its active metabolites in human plasma and its application to a pharmacokinetic study in patients [J]. *Bioanalytical Chromatography*, 2010, 24: 935-940
 [7] Zhu BL. Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis [J]. *Curr Drug Metab*, 2002, 3(3): 321-349

(收稿日期: 2011-03-21; 修回日期: 2011-05-10)

(本文编辑 金杨红)