

冬凌草甲素在小鼠体内的药代动力学研究

郑海娜¹, 李吉学^{1,2*}, 姚会枝¹

(1. 河南大学 药学院, 河南 开封 475004; 2. 河南大学 药物研究所, 河南 开封 475004)

【摘要】 目的: 建立小鼠血浆中冬凌草甲素的高效液相测定方法, 探讨冬凌草甲素在小鼠体内的药代动力学过程。方法: 小鼠按 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 尾静脉注射冬凌草甲素后, 不同时间点摘除眼球取血, 乙酸乙酯萃取血浆, HPLC 测定血浆中冬凌草甲素的浓度, 并用 3P97 软件拟合, 计算药代动力学参数。结果: 冬凌草甲素在 $0.202 \sim 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好 $r = 0.9987$, 测得低、中、高浓度方法回收率均大于 93%, 低、中、高浓度日内、日间精密度 RSD 均小于 9%。冬凌草甲素小鼠尾静脉注射给药后, 在体内呈二室模型分布, 其药代动力学方程为 $C = 16.1925e^{-0.5546t} + 5.4757e^{-0.0163t}$, 主要药代动力学参数为 $t_{1/2\alpha} 1.2499 \text{ min}$, $t_{1/2\beta} 42.6384 \text{ min}$, $K_{21} 0.1523 \text{ min}^{-1}$, $K_{12} 0.3593 \text{ min}^{-1}$, $K_{10} 0.0592 \text{ min}^{-1}$, $\text{AUC} 366.0350 \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{CL} 0.0273 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, $V_C 0.4615 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。结论: 建立的 RP-HPLC 测定方法适用于体内冬凌草甲素的含量测定及药代动力学研究, 冬凌草甲素在小鼠体内吸收快、分布也快, 药物起效迅速, 在体内以消除为主。

【关键词】 冬凌草甲素; 药代动力学; 高效液相色谱; 二室模型

冬凌草甲素 (oridonin, ORI) 是从唇形科香茶菜属 *Rabdosia* 植物中分离出的一种贝壳杉烯二萜类天然有机化合物, 具有一定的抗癌活性。有研究表明, 冬凌草甲素可显著降低细胞的端粒酶活性, 从而抑制 Raji, HL-60, NB4 等细胞的生长, 诱导细胞发生凋亡^[1-2]。也有实验发现冬凌草甲素对人体肝癌 BEL-7402 细胞具有较强的杀伤作用^[3]。临床上用于治疗原发性肝癌也显示了一定疗效, 半年生存率可达 29.6%^[4]。本文采用 RP-HPLC 对小鼠尾静脉注射冬凌草甲素后的药代动力学进行了研究, 经 3P97 软件拟合, 计算其药代动力学参数, 为临床合理用药提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 冬凌草甲素 (西安昊轩生物科技有限公司, 纯度 98%, 经核磁共振波谱鉴定); 氯化钠注射液 (山东鲁抗辰欣药业有限公司, 批号 20090819); 甲醇 (天津市四友精细化学品有限公司出品, 一级色谱纯, 批号 090822); 乙酸乙酯 (天津市德恩化学试剂有限公司, 分析纯, 批号 20090731); 哇哈哈饮用纯净水。

1.2 动物 昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 $(25 \pm 5) \text{ g}$, 河南省实验动物中心提供, 合格证号 SYXK(豫) 2005-0012。

1.3 仪器 高效液相色谱仪 (日本岛津), 包括 LC-10ATvp 泵 2 台, SPD-10Avp 紫外检测器, CTO-10Avp 柱温箱, CBM-2Avp 型色谱工作站。WFZ-26A 紫外-可见分光光度计 (天津市光学仪器厂); AEU-210 型电子分析天平 (湘仪天平仪器设备有限公司); TTL-DC 型多功能氮吹仪 (青岛华清集团有限公司); QL-901 型涡旋振荡仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); TGL-16C 型台式高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); 芬兰 Biohit-Genex 手动可调移液器 [百得实验室仪器 (苏州) 有限公司]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil C₁₈ 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 预柱 ($4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相 甲醇-水 (60:40); 检测波长 238 nm; 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

2.2 血浆样品处理 精密吸取血浆样品 $100 \mu\text{L}$, 置 5 mL PE 离心管中, 精密加入乙酸乙酯 2 mL , 用涡旋混合器充分振摇 5 min , $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 吸取上层有机相 1.5 mL , 置另一 5 mL 离心管中, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴, 氮气吹干, 加入甲醇 $100 \mu\text{L}$, 用涡旋混合器充分振摇 5 min , $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 。上清液 $20 \mu\text{L}$ 在上述色谱条件下进样分析, 记录 HPLC 图, 代入标准曲线计算血浆中 ORI 的浓度。

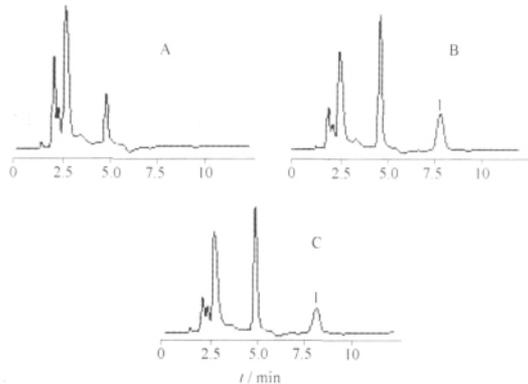
[稿件编号] 20110614001

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究指导计划项目 (2010B350001); 河南大学博士启动金项目

[通信作者] * 李吉学, Tel: (0378) 3880588, E-mail: lijx@henu.edu.cn

2.3 冬凌草甲素对照品溶液的配制 精密称取 ORI 对照品 5 mg, 于 25 mL 量瓶中, 加适量甲醇使其充分溶解, 加甲醇至刻度, 得 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准储备液。精密量取 ORI 标准储备液适量稀释成 $20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 然后再依次稀释成质量浓度分别为 12.0, 7.20, 4.32, 2.59, 1.56, 0.933, 0.560, 0.336, 0.202 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列 ORI 对照品溶液, 4°C 冷藏避光贮藏备用。

2.4 HPLC 分析方法的专属性考察 在上述色谱条件下, 冬凌草甲素的保留时间为 8.08 min。空白血浆、空白血浆中加入冬凌草甲素及给药后小鼠血浆样品的色谱图见图 1, 在选定色谱条件下, 血浆中的内源性物质不干扰 ORI 的测定, 所用方法专属性较强。



A. 空白血浆; B. 空白血浆加冬凌草甲素;
C. 血浆样品; 1. 冬凌草甲素。

图 1 小鼠血浆中冬凌草甲素色谱图

2.5 标准曲线的建立 分别量取上述系列浓度的 ORI 对照品溶液 $100 \mu\text{L}$, 置具塞离心管中, 50°C 水浴, 氮气吹干, 再分别加入空白血浆 $100 \mu\text{L}$ 至上述离心管中, 制备成系列相应浓度的含药血浆样品溶液, 按 2.2 项提取处理后分别进样, 进行色谱分析。以待测物浓度 (X) 为横坐标, 待测物峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归, 得标准曲线方程为 $Y = 6655.2X + 6089.6$, $r = 0.9987$ 。ORI 在 $0.202 \sim 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好, 符合分析测定要求。以 $S/N = 3:1$ 计, ORI 的最低检测限为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 最低定量限为 $0.202 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 回收率考察 分别取低、中、高 ($1.56, 12.0, 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 个质量浓度的 ORI 对照品溶液 $100 \mu\text{L}$, 每个浓度平行做 6 份, 置具塞离心管中, 50°C 水浴, 氮气吹干, 再分别加入空白血浆 $100 \mu\text{L}$ 至上述离心管中, 制备成相应浓度的质量控制样品, 按 2.2 项提取处理后, 一组用来 1 d 内连续测定 3 次, 另一组每天进样 1 次连续测定 3 d, 记录峰面积并按回归方程计算药物质量浓度, 结果低、中、高浓度的日内 RSD 分别为 4.57%, 4.33%, 2.65%; 日间 RSD 分别为 8.90%, 5.29%, 3.10%。由测定结果可知, 所有样品的日内 RSD 小于 5%, 日间 RSD 小于 9%, 精密度良好, 样品在该条件下稳定, 符合生物样品的质量控制要求。

2.7 精密度和稳定性考察 分别取低、中、高 ($1.56, 12.0, 20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 个质量浓度的 ORI 对照品溶液 $100 \mu\text{L}$ (各 2 份), 置具塞离心管中, 50°C 水浴, 氮气吹干, 再分别加入空白血浆 $100 \mu\text{L}$ 至上述离心管中, 制备成相应浓度的质量控制样品, 按 2.2 项提取处理后, 一组用来 1 d 内连续测定 3 次, 另一组每天进样 1 次连续测定 3 d, 记录峰面积并按回归方程计算药物质量浓度, 结果低、中、高浓度的日内 RSD 分别为 4.57%, 4.33%, 2.65%; 日间 RSD 分别为 8.90%, 5.29%, 3.10%。由测定结果可知, 所有样品的日内 RSD 小于 5%, 日间 RSD 小于 9%, 精密度良好, 样品在该条件下稳定, 符合生物样品的质量控制要求。

2.8 小鼠静脉注射冬凌草甲素的药代动力学研究 小鼠 50 只, 实验前禁食 12 h 以上, 自由饮水。经尾静脉注射冬凌草甲素 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (药物质量浓度 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 于给药前及给药后 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min 时摘除眼球取血 (每个时间点 5 只小鼠), 分别置于草酸钾抗凝离心管中, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 各取血浆 $100 \mu\text{L}$, 按 2.2 项提取处理后分别进样, 测定小鼠血浆中 ORI 的浓度, 以血药浓度对时间作图, 小鼠尾静脉注射 ORI 溶液后的平均血药浓度-时间曲线见图 2。

小鼠 50 只, 实验前禁食 12 h 以上, 自由饮水。经尾静脉注射冬凌草甲素 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (药物质量浓度 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 于给药前及给药后 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min 时摘除眼球取血 (每个时间点 5 只小鼠), 分别置于草酸钾抗凝离心管中, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 各取血浆 $100 \mu\text{L}$, 按 2.2 项提取处理后分别进样, 测定小鼠血浆中 ORI 的浓度, 以血药浓度对时间作图, 小鼠尾静脉注射 ORI 溶液后的平均血药浓度-时间曲线见图 2。

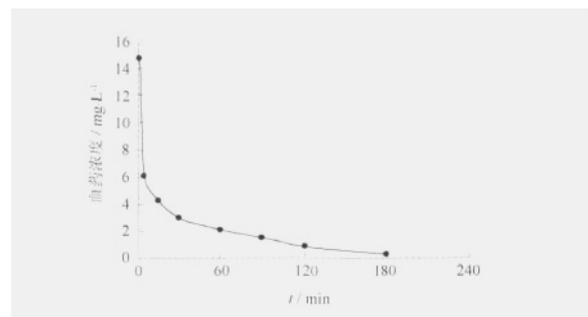


图 2 小鼠尾静脉注射 ORI 溶液平均血药浓度-时间曲线 ($n = 5$)

将给药后不同时间取血测得的平均血药浓度和时间数据用 3P97 药代动力学软件拟合, 通过进行一

房室、二房室、三房室对各权重为 $1, 1/C, 1/C^2$ 的情况进行拟合, 比较药时曲线拟合图, 以加权残差平方和 (WSS)、拟合优度值 (goodness of fit)、数据信息标准 (AIC) 为参数, 确定合适的模型。结果表明小鼠尾静脉注射 ORI 后, 其体内过程符合二室模型, 权重为 $1/C^2$ 拟合最好, ORI 的药代动力学方程为 $C = 16.1925e^{-0.5546t} + 5.4757e^{-0.0163t}$, 药代动力学参数见表 1。

表 1 用 3P97 软件模拟的房室药代动力学参数

参数	数值	参数	数值
$A/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	16.192 5	K_{21}/min^{-1}	0.152 3
α/min^{-1}	0.554 6	K_{12}/min^{-1}	0.359 3
$B/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	5.475 7	K_{10}/min^{-1}	0.059 2
β/min^{-1}	0.016 3	$\text{AUC}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$	366.035 0
$V_c/\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.461 5	$\text{CL}/\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.027 3
$t_{1/2\alpha}/\text{min}$	1.249 9	AIC	-15.503 4
$t_{1/2\beta}/\text{min}$	42.638 4	MRT/min	53.858 8

3 讨论

3.1 色谱条件的选择 测定波长的选择是通过在一定浓度的 ORI 溶液于 200 ~ 400 nm 进行扫描, 由扫描图谱可见 ORI 在 238 nm 处有最大吸收, 确定 HPLC 检测波长为 238 nm。另外参阅相关文献 [5-6], 初步确定流动相系统为甲醇-水, 然而对于有机相-水相体积比说法不一, 对于小鼠血浆样品的测定, 反复摸索, 通过比较甲醇-水 (70:30) 与甲醇-水 (60:40) 条件下色谱图可知, 在甲醇-水 (70:30) 条件下 ORI 的保留时间为 4.90 min 左右, 小鼠血浆中的内源性物质会干扰 ORI 测定, 而在甲醇-水 (60:40) 条件下血浆中各组分峰分离较好, 且无内源性物质的干扰。

3.2 样品处理方法的讨论 在色谱技术日新月异的发展的同时, 样品的前处理方法也在发展, 从液-液萃取 (LLE) 到液-固萃取 (SFE), 从 SPE 到固相微量提取 (SPME), 样品前处理方法的发展趋势是简单快速、减少样品用量、减少环境污染、降低成本、提高回收率。尽管这些年来有了很大的发展, 但是国内在生物样品的处理时还是以经典的方法 LLE、蛋白质沉淀法为主 [7]。另外, 根据 RE Majors 的统计, 一半以上的预处理是通过液-液萃取完成的 [8]。

ORI 不溶于水, 可溶于乙醚、乙酸乙酯、甲醇、乙醇等有机溶剂 [9], 关于生物样品中 ORI 萃取剂的选

择, 文献 [5-6] 中通过研究选定乙酸乙酯作为萃取剂, 由于用乙酸乙酯提取具有较高的提取回收率和更少的内源性物质的干扰。因此, 考察了 2 种对给药后的小鼠血浆样品预处理方法: ①将给药后的小鼠血浆加入 2 倍量的乙腈, 涡旋 5 min, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 高速离心取上清液, 然后用乙酸乙酯提取; ②将给药后的小鼠血浆直接用乙酸乙酯提取。即先用蛋白质沉淀法作为前处理方法, 再用 LLE 法对样品中的药物进行提取和富集; 或直接用 LLE 法对样品中的药物进行提取和富集。2 种处理方法比较发现处理方法②的提取回收率为比方法①高出 20% 左右。

3.3 药代动力学参数讨论 药-时曲线显示出 ORI 的体内过程是线性的。关于房室数的选择, 可根据 F 检验和 AIC 选择房室数, 对于相同的权, 当 F 检验有显著意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 时, 应取 AIC 较小的房室数, 结果, 二房室模型的 AIC 最小; 关于权重的选择, 首先比较拟合优度值 (goodness of fit), 数值越小越好, 如数值相等或相近, 再同时结合最低检测浓度, 参考最大绝对误差和相对误差。在上述评价原则下比较, 权重为 $1/C^2$ 拟合最好。通过 3P97 药代动力学软件拟合, ORI 的药代动力学模型符合二房室模型, 权重为 $1/C^2$ 时拟合最好。

对血药浓度的药物动力学分析结果显示, ORI 的分布半衰期、消除半衰期及平均滞留时间 MRT 均很短, 分别为 $t_{1/2\alpha}$ 1.249 9 min, $t_{1/2\beta}$ 42.638 4 min, MRT 53.858 8 min, 说明 ORI 在体内的循环和作用时间较短。另外, $t_{1/2\beta}$ 远大于 $t_{1/2\alpha}$, 说明 ORI 在体内以消除过程为主。 K_{12} 大于 K_{21} , 说明 ORI 从中央房室向外周房室转运速率大于从外周房室向中央房室转运的速率。稳态表观分布容积 $V_{ss} = V_c (1 + K_{12}/K_{21})$ [10], 为 $1.550\ 3\ \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$, 中央室表观分布容积 V_c 为 $0.461\ 5\ \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$, 中央室分布容积占总表观分布容积的 29.76%, 说明药物主要分布在大循环和血流丰富的组织中。

[参考文献]

- [1] 刘加军, 潘祥林, 伍新尧, 等. 冬凌草甲素对 Raji 细胞的增殖抑制作用及其机制[J]. 中草药, 2004, 35(7): 774.
- [2] 申家英, 杨波. 冬凌草甲素对 HL-60 细胞的生长抑制作用及其对细胞端粒酶活性的调节[J]. 白血病·淋巴瘤, 2003, 12(4): 224.
- [3] 葛明, 马用法, 张中兴, 等. 冬凌草甲素和乙素对人肝癌 BEL-7402 细胞株杀伤作用的研究[J]. 药学通报, 1981, 16(5): 6.

- [4] 王瑞林. 冬凌草治疗原发性肝癌31例临床观察[J]. 癌症, 1984, 8(1): 50.
- [5] Mei Yinghao, Xu Jie, Zhao Jihui, et al. An HPLC method for determination of oridonin in rabbits using isoporsalen as an internal standard and its application to pharmacokinetic studies for oridonin-loaded nanoparticles[J]. J Chromat B, 2008, 869(1/2): 138.
- [6] J Ge. Determination of oridonin in rat plasma by reverse-phase high-performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Ana, 2007, 43: 793.
- [7] 吕娟丽, 孙燕芳, 朱薇薇. 临床药物色谱分析前处理方法的进展[J]. 医学研究通讯 2000, 29(12): 29.
- [8] Majors M E. Liquid extraction techniques for sample preparation [J]. LC-GC Int, 1998, 2(1): 10.
- [9] Zhang D R, Ren T C. Pharmaceutical progress of Oridonin [J]. Chin Pharm J, 2003, 38(11): 817.
- [11] 朱家璧. 药物动力学[M]. 3版. 北京科学技术出版社, 1984: 208.

Study on pharmacokinetics of oridonin in mice

ZHENG Haina¹, LI Jixue^{1,2*}, YAO Huizhi¹

(1. Pharmacological College of Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. Pharmacological Institute of Henan University, Kaifeng 475004, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a HPLC method for the determination of plasma concentration of oridonin (ORI) and study the pharmacokinetics of ORI in mice. **Method:** Blood was sampled from mice which were injected ORI by $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ at different time intervals, and the concentration of ORI was determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters were accessed by 3P97. **Result:** The calibration curve was linear ($r=0.9987$) within the range of $0.202\text{--}20.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for ORI in plasma. The average recoveries were more than 93%. The within-day and between-day precisions were no more than 9%. After *iv* oridonin in mice, the plasma concentration-time course fitted well to two-compartment model. The pharmacokinetic equation was $C = 16.1925e^{-0.5546t} + 5.4757e^{-0.0163t}$. The pharmacokinetic parameters were below: $t_{1/2\alpha}$ 1.2499 min, $t_{1/2\beta}$ 42.6384 min, K_{21} 0.1523 min^{-1} , K_{12} 0.3593 min^{-1} , K_{10} 0.0592 min^{-1} , AUC 366.0350 $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{mL}^{-1}$, CL 0.0273 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, V_C 0.4615 $\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$. **Conclusion:** The method can be used to determine the concentration and to investigate the pharmacokinetics of ORI in mice. ORI was absorbed and distributed very fast in mice. The effect of ORI was rapid. The elimination was the main process.

[Key words] oridonin; pharmacokinetics; HPLC; two-compartment model

doi: 10.4268/cjcm20112428

[责任编辑 张宁宁]