

文章编号: 1006 - 2858(2008)12 - 0944 - 04

没食子酸在大鼠体内的药物动力学及生物利用度

王晓莉¹, 栗 晖¹, 高晓霞¹, 赵云丽¹, 袁 丹², 于治国¹

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立大鼠血浆中没食子酸的高效液相测定方法; 研究大鼠灌胃与静脉给药后没食子酸的药代动力学过程及生物利用度。方法 分别灌胃和静脉给予大鼠没食子酸, 不同时间点采血, 样品经甲醇沉淀蛋白后, 采用 Phenomenex C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 4 μm) 色谱柱, 甲醇 - 体积分数为 0.5% 的冰醋酸水溶液 (体积比为 7:93) 为流动相, 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 272 nm, 以对乙酰氨基酚为内标测定血浆中没食子酸的浓度。应用 DAS 2.0 软件计算药代动力学参数。结果 大鼠灌胃给药后 $t_{1/2\alpha}$ 为 46.57 min, $t_{1/2\beta}$ 为 56.54 min, t_{max} 为 66.00 min, ρ_{max} 为 3.96 mg · L⁻¹, AUC_{0~t} 为 396.5 mg · min · L⁻¹; 静脉给药后 $t_{1/2\alpha}$ 为 9.90 min, $t_{1/2\beta}$ 为 78.88 min, AUC_{0~t} 为 461.9 mg · min · L⁻¹。结论 大鼠灌胃和静脉给予没食子酸后, 其药 - 时过程均符合二室模型, 绝对生物利用度为 42.9%。

关键词: 没食子酸; 大鼠血浆; 药代动力学; 生物利用度; 高效液相色谱法
中图分类号: R 94 **文献标志码:** A

没食子酸 (gallic acid, GA) 又称五倍子酸, 化学名为 3,4,5-三羟基苯甲酸。没食子酸是传统中药的常见成分, 广泛存在于地锦草、五倍子、葡萄、茶叶等植物中。药理活性研究表明, 没食子酸具有止血^[1]、抗氧化^[2-3]、抗肿瘤^[4-5]、杀锥虫^[6]和保护肝脏^[7-8]等诸多功效。到目前为止, 对其报道多集中在药理及提取、分析方面, 有关其制剂、药代动力学和生物药剂学的报道较少。Siranoush Shahrzad^[9]等人曾经研究并报道过红茶中没食子酸在人体内的药代动力学及相对生物利用度; 邵留^[10]曾经以鱼为研究对象, 对其灌胃给予没食子酸后的药代动力学行为进行研究; 兰薇^[11]等采用 RP-HPLC 法测定广枣酚酸溶液灌胃后家兔血浆中没食子酸的浓度。但是, 灌胃给药后没食子酸的生物利用度尚未见报道, 本文作者以大鼠为研究对象, 建立了大鼠血浆中没食子酸的高效液相测定方法, 同时, 对灌胃和尾静脉注射后没食子酸的药代动力学行为与绝对生物利用度进行研究, 为没食子酸进一步开发利用提供依据。

1 仪器与材料

LC-10ATvp-UV 高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司), Anstar 色谱数据处理系统 (美

国 Suntek Science 公司), BS 110 S 电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司), TCL-16G 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), XW-80 涡旋混合器 (江苏海门市麒麟医用仪器厂)。

没食子酸为自制, 对乙酰氨基酚对照品 (中国药品生物制品检定所, 100018-200408), 甲醇 (色谱纯, 天津市康科德科技有限公司), 其他所用试剂均为分析纯, 重蒸水为自制。

没食子酸溶液的配制: 精密称取没食子酸适量, 以生理盐水为溶剂分别配成质量浓度为 10、50 g · L⁻¹ 的样品溶液, 于 4 °C 冰箱中保存, 前者供灌胃用, 后者供尾静脉注射用。

Wistar 大鼠, 体质量为 220~250 g, 沈阳药科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (辽) 2003-008。

2 方法

2.1 动物分组及给药方案

健康 Wistar 大鼠 10 只, 雄性, 随机分为 2 组, 每组 5 只。

灌胃给药: 给药剂量为 150 mg · kg⁻¹。分别于给药后 0、10、20、30、60、90、120、180、240、300 min 于眼后静脉丛采血各 0.5 mL。静脉给

收稿日期: 2008-03-28

作者简介: 王晓莉 (1982-), 女 (汉族), 辽宁沈阳人, 硕士研究生, E-mail: ppliang@163.com; 于治国 (1958-), 男 (汉族), 山东莱西人, 教授, 博士, 主要从事中药复方药物代谢动力学及中药质量控制方法研究, Tel: 024-23986295, E-mail: zhiguo-yu@163.com。

药:给药剂量:75 mg·kg⁻¹。分别于给药后 0、1、5、10、20、30、45、60、75、90、120 min 于眼后静脉丛采血各 0.5 mL。血样以 4 000 r·min⁻¹ 的转速离心 5 min,吸取血浆,冷冻备用。试验期间自由饮水,试验前禁食 12 h。

2.2 溶液的制备

没食子酸系列标准溶液的配制:取没食子酸对照品约 25 mg,精密称定,置于 25 mL 容量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为没食子酸对照品储备液。分别精密吸取对照品储备液适量,置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇配成质量浓度分别为 0.6、1.2、3.0、6.0、12.0、30.0、60.0 mg·L⁻¹ 的没食子酸系列标准溶液。

内标溶液的制备:取对乙酰氨基酚对照品适量,精密称定,置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对乙酰氨基酚对照品储备液(1.0 g·L⁻¹)。精密量取对乙酰氨基酚对照品储备液 0.3 mL,置 25 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为内标溶液(30.0 mg·L⁻¹),冰箱(4 °C)内保存备用。

2.3 血浆样品的测定

2.3.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 4 μm),流动相:甲醇-体积分数为

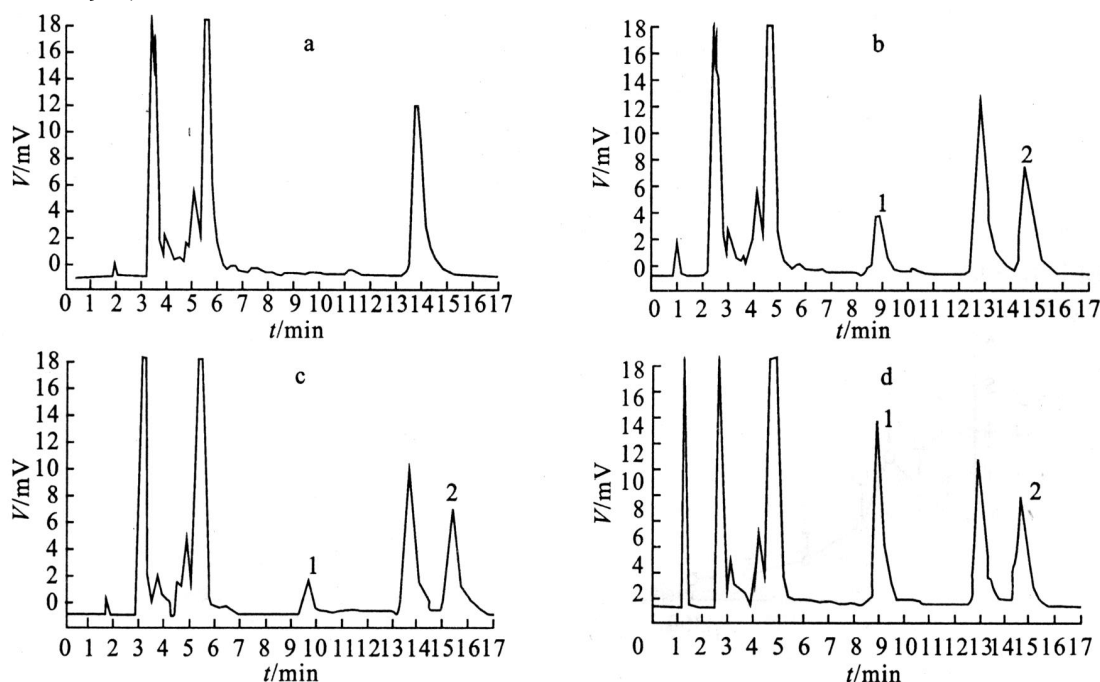
0.5%的冰醋酸水溶液(体积比为 7:93),流速:1.0 mL·min⁻¹,检测波长:272 nm,进样量:20 μL,柱温:室温。

2.3.2 血浆样品处理

精密吸取大鼠血浆样品 200 μL,依次加入甲醇 100 μL,内标(对乙酰氨基酚 30 mg·L⁻¹) 100 μL,质量分数为 2%的甲酸水溶液 100 μL,甲醇 600 μL,涡旋混合 5 min,以 12 000 r·min⁻¹ 的转速离心 5 min。将上清液转移到 EP 管中,于 40 °C 水浴中空气吹干,残渣以 100 μL 甲醇-水(体积比为 1:1)溶液溶解后,超声 1 min,涡旋振荡 5 min,以 12 000 r·min⁻¹ 的转速离心 5 min 后,取上清液 20 μL 注入高效液相色谱仪,记录色谱图。

2.4 分析方法的专属性

将空白血浆、加没食子酸和内标的空白血浆、大鼠灌胃给予没食子酸后经“2.4.2”条方法处理的血浆样品、大鼠尾静脉给予没食子酸后经“2.3.2”条方法处理的血浆样品按上述的色谱条件进样分析,结果见色谱图 1。结果表明,没食子酸的保留时间约为 9.4 min,内标的保留时间约为 15.2 min,血浆中内源性物质不干扰没食子酸和内标的测定。



a—Blank plasma;b—Blank plasma spiked with gallic acid and acetaminophen;c—Rat plasma sample collected at 20 min after iv of gallic acid;d—Rat plasma sample collected at 10 min after iv of gallic acid;1—Gallic acid;2—Acetaminophen

Fig. 1 Chromatograms of gallic acid and acetaminophen in rat plasma

2.5 标准曲线与定量下限

取大鼠空白血浆 200 μL,加入没食子酸系列

标准溶液 100 μL,制成相当于没食子酸血浆质量浓度分别为 0.3、0.6、1.5、3.0、6.0、15.0、30.0 mg L⁻¹的样品,除不加入 100 μL 甲醇外,其余按“2.3.2”条操作,建立标准曲线。以血浆样品中待测物质量浓度 ρ 为横坐标,待测物与内标峰面积的比值 Y 为纵坐标,用加权(1/ρ²)最小二乘法^[12]进行回归运算,求得的直线回归方程即为标准曲线,回归方程为 $Y = 9.093 \times 10^{-2} \rho + 2.47 \times 10^{-3}$, $r^2 = 0.996\ 4$ ($n = 7$)。表明血浆样品中没食子酸在 0.3~30.0 mg L⁻¹内,线性关系良好,血浆样品最低定量限为 0.3 mg L⁻¹。

2.6 精密度与准确度

取空白血浆 200 μL,按“2.5”条制备没食子酸低、中、高(0.6、6.0、24.0 mg L⁻¹)3个质量浓度的质量控制(QC)样品,每一质量浓度进行6个样本分析,连续测定3d,并与标准曲线同时进行,以当日的标准曲线计算QC样品的质量浓度,与配制质量浓度对照,将QC样品的结果进行方差分析^[13],求算方法的准确度与精密度,结果日内RSD<6.0%,日间RSD<12.0%,准确度RE在±8.3%之间。试验数据表明,测定血浆中没食子酸的分析方法符合有关国际规范^[14]要求。

2.7 回收率及样品稳定性考察

分别取低、中、高3个质量浓度的质量控制样品,按“2.5”条操作,以提取后的没食子酸色谱峰面积与未经提取直接进样获得的色谱峰面积之比,考察样品的提取回收率。3种质量浓度下样品的提取回收率分别为(88.0±5.4)%、(84.3±6.8)%和(80.3±3.5)%($n = 6$),同法可得内标的提取回收率为(81.8±3.2)%($n = 6$)。按样品测定项下制备QC样品,分别考察了室温下放置

24 h、冷冻(-20℃)保存20 d和经3次冻-融循环后的稳定性,结果表明,血浆样品中没食子酸无明显降解。

2.8 数据统计处理

将大鼠灌胃及静脉给予没食子酸后的血药浓度-时间数据用DAS 2.0软件处理进行拟合、计算,得到灌胃及静脉给药后的药物动力学参数。

3 结果

实验结果表明,灌胃及静脉给药后,没食子酸在大鼠体内均符合二室模型,其主要药物动力学参数见表1。灌胃及静脉给药后的药-时曲线分别见图2。

根据绝对生物利用度的计算公式:绝对生物利用度 = $[AUC_{0 \sim t}(ig) \cdot D_{iv}] / [AUC_{0 \sim t}(iv) \cdot D_{ig}] \times 100\%$,可得没食子酸在大鼠体内的绝对生物利用度为42.9%。

Table 1 Main pharmacokinetics parameters of gallic acid after ig and iv

Parameter	ig	iv
$t_{1/2\alpha}/\text{min}$	46.57	9.90
$t_{1/2\beta}/\text{min}$	56.54	78.88
k_{21}/min^{-1}	0.021	0.032
k_{10}/min^{-1}	0.222	0.067
k_{12}/min^{-1}	0.004	0.097
$AUC_{0 \sim t}/(\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1})$	396.5	461.9
$CL_s/(\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1})$	0.421	0.207
$V_c/(\text{L} \cdot \text{kg}^{-1})$	16.050	3.326
$t_{\text{max}}/\text{min}$	66.00	-
$\rho_{\text{max}}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	3.96	-

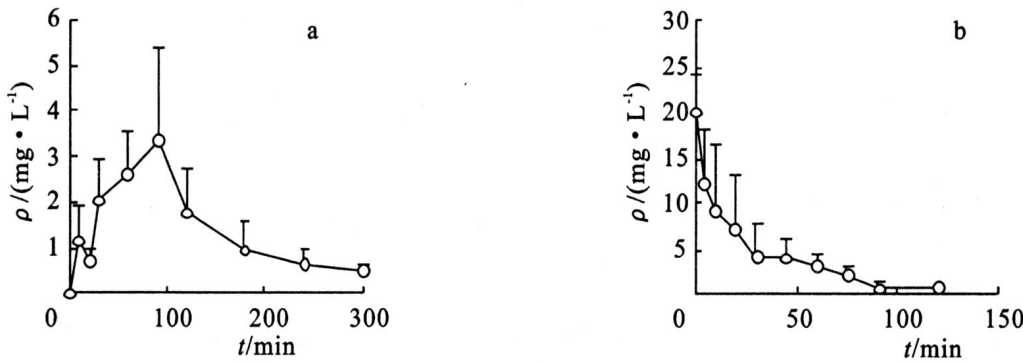


Fig. 2 Mean plasma concentration (ρ)-time (t) curve of gallic acid after ig(a) and iv(b) ($n = 5$)

4 讨论

没食子酸极性较大,因此采用沉淀蛋白法进

行血浆样品预处理,试验中考察了不同的蛋白沉淀试剂(甲醇、乙腈、体积分数为95%的乙醇溶液、丙酮、高氯酸和三氯乙酸),其中,甲醇提取回

收率最高,且无内源性物质干扰,最终确定甲醇为蛋白沉淀试剂。另外,没食子酸呈酸性,提取溶剂加入酸可增大提取回收率。分别考察了甲酸、磷酸和冰醋酸,以甲酸效果最好。此外,涡旋时间对提取回收率也有影响,实验表明涡旋 5 min 为宜。

内标的选择:分别考察了对羟基苯甲酸、3,5-二硝基苯甲酸、对硝基苯甲酸和对乙酰氨基酚作为内标,结果对乙酰氨基酚与没食子酸保留时间接近,且达到良好的分离、提取回收率较高,所以最终选择了对乙酰氨基酚。

灌胃和静脉给药后,没食子酸在大鼠体内的药物动力学行为均符合二室模型。灌胃给药后的药物动力学行为与有关文献[9-10]曾报道的口服给药后,没食子酸在人、鲫鱼、家兔体内的药物动力学行为均符合二室模型。但是,没食子酸在鲫鱼体内的分布半衰期和消除半衰期分别为 2.62 h 和 41.64 h,而其在人和家兔体内的分布半衰期和消除半衰期与大鼠相近。原因可能是在鱼体内,药物主要通过肾脏血管和腮被动扩散消除,而哺乳动物则主要通过肾脏的主动转运消除。大鼠静脉给予没食子酸后,分布相生物半衰期为 9.91 min,消除相生物半衰期为 78.88 min,表明没食子酸进入体内后,由中央室迅速向周边室分布,当分布达平衡时, $k_{12} X_c = k_{21} X_p$, 得 $X_c/X_p = k_{21}/k_{12} \approx 0.33$, 可知药物由周边室向中央室的转运较慢。表观分布容积 V_c 为 $3.326 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$, 约为大鼠平均血容量的 60 倍,提示没食子酸在大鼠体内分布广泛。

实验结果表明,与折合成等剂量静脉注射给药的 AUC 相比,灌胃给药的绝对生物利用度为 42.9%。

本文作者建立了大鼠血浆中没食子酸的含量测定方法,该方法简便、灵敏、准确,将其应用于大鼠灌胃及静脉后没食子酸的药动力学及生物利用度研究,为没食子酸的进一步开发应用提供依据。

参考文献:

[1] 董鹏,唐万斌,郭连芳.地锦草止血作用研究[J].武警医学,1997,8(2):117-119.

- [2] 范培红,娄红祥.葡萄籽多酚的分离鉴定及其对细胞 DNA 氧化损伤的防护作用[J].药学报,2004,39(11):869-875.
- [3] SAKAGAMI H, SATOH K. Prooxidant ascorbic acid and gallic acid[J]. Anticancer Res, 1997, 17(1A):221-224.
- [4] OHNO Y, FUKUDA K, TAKEMURA G, et al. Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 1999, 10(9):845-851.
- [5] OHNO T, LNONE M, OGIHARA Y. Cytotoxic activity of gallic acid against liver metastasis of mastocytoma cells P815[J]. Anticancer Res, 2001, 21(6A):3875-3880.
- [6] KOIDE T, NNOSE M, INOUE M, et al. Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds[J]. Phanta Med, 1998, 64(1):27-30.
- [7] ANAND K K, SINGH B, SAXENA A K, et al. 3,4,5-trihydroxy benzoic acid (gallic acid), the hepatoprotective principle in the fruits of Terminalia bellericabiosay guided activity[J]. Pharmacol Res, 1997, 36(4):315-321.
- [8] 郑民实,孔庚星,张鑫,等.没食子酸抗 HBsAg/HBeAg 的实验研究[J].实用中医药杂志,1998,14(1):5-7.
- [9] SIRANOUSH S, KAZUMASA A, ANTJE W, et al. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans[J]. Journal of Nutrition, 2001, 131:1207-1210.
- [10] 邵留.斑地锦有效成分的药动药效学研究[D].重庆:西南农业大学,2005.
- [11] 兰薇,王世祥,房敏峰,等.蒙药广枣中没食子酸在正常和气滞血瘀家兔体内的药代动力学研究[J].中国民族医药杂志,2007,6(6):48-49.
- [12] 钟大放.以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J].药物分析杂志,1996,16(5):343-346.
- [13] KARNES H T, MARCH C. Precision, accuracy, and data acceptance criteria in biopharmaceutical analysis[J]. Pharm Res, 1993, 10(10):1420-1426.
- [14] SHAH V P, MIDHA K K, DIGHE S, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies[J]. Pharm Sci, 1992, 81(3):309-312.

(下转至第 963 页)

Chemical constituents from the stems and leaves of marine mangrove plant *Pluchea indica*(L.) Less.

WANG Jian¹, PEI Yue-hu¹, LIN Wen-han², DENG Zhi-wei³, QIAO Li¹

(1. School of Traditional Chinese Material Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. State Key Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Peiking Univesity, Beijing 100083, China; 3. Analytical and Test Center, Beijing Normal University, Beijing 100075, China)

Abstract : Objective To investigate the chemical constituents of the stems and leaves of *Pluchea indica*(L.) Less. . **Methods** The compounds were isolated by silica gel chromatography column in associating with Sephadex LH-20 and HPLC chromatography. Their structures were elucidated by spectroscopic analysis. **Results** Six compounds, including three sesquiterpenes and three thiopene derivatives, were obtained. Their structures were identified as 2-(pant-1,3-diynyl)-5-(4-acetoxy-3-hydroxybuta-1-ynyl)-thiophene (1), 2-(pant-1,3-diynyl)-5-(4-acetoxy-3-chlorobuta-1-ynyl)-thiophene (2), 2-(pant-1,3-diynyl)-5-(3,4-dihydroxybuta-1-ynyl)-thiophene (3), valenc-1(10)-ene-8,11-diol (4), valenc-1(10)-ene-2,8,11-triol (5), 1,2,4,8-tetramethyl-(4*R*,7*S*,8*R*,11*R*)-3-cycloundecenone (6). **Conclusions** Compounds 2 - 6 are isolated from *Pluchea indica*(L.) Less. for the first time.

Key words : mangrove; *Pluchea indica*(L.) Less. ; chemical constituent ; structural determination

(上接第 947 页)

Pharmacokinetics and absolute bioavailability of gallic acid in rat plasma

WANG Xiao-li¹, LI Hui¹, GAO Xiao-xia¹, ZHAO Yun-li¹, YUAN Dan², YU Zhi-guo¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract : Objective To develop a method for the quantitative determination of gallic acid in rat plasma by high performance liquid chromatography (HPLC), and study the pharmacokinetics and absolute bioavailability in rats. **Methods** Acetaminophen was selected as internal standard, and the plasma samples were pre-treated by protein precipitation with methanol. Phenomenex C₁₈ was used with the mobile phase of methanol and water contained 0.5 % glacial acetic acid (V : V = 7 : 93) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, and detection wavelength was set at UV 272 nm. **Results** After *ig* of gallic acid, the values of *t*_{1/2α}, *t*_{1/2β}, *t*_{max}, *C*_{max} and AUC_{0-∞} were 46.57 min, 56.54 min, 66.00 min, 3.96 mg · L⁻¹ and 396.5 mg · min · L⁻¹, respectively; As for *iv*, *t*_{1/2α}, *t*_{1/2β} and AUC_{0-∞}, the values were 9.90 min, 78.88 min and 461.9 mg · min · L⁻¹, respectively. **Conclusions** The concentration-time curves of gallic acid in rats after *ig* and *iv* administration shows that they both fit two-compartment model. Absolute bioavailability of gallic acid is 42.9 %.

Key words : gallic acid; rat plasma; pharmacokinetics; absolute bioavailability; HPLC