

关木通药材中马兜铃酸 A 的药动学研究

田葆萍^{1,2}, 张兰桐¹, 袁志芳¹, 崔晓红¹, 刘红菊¹ (1. 河北医科大学药学院药物分析教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 总装备部军事医学研究所, 北京 9702信箱 15号, 北京 100101)

摘要:目的 采用高效液相色谱法测定血浆中马兜铃酸 A 的浓度, 研究小鼠灌胃给予关木通提取液后体内马兜铃酸 A 的药动学特点。方法 采用 DiamonsilTM C₁₈ 色谱柱 (250mm × 4.6mm, 5μm), 以甲醇-水-冰乙酸 (72: 27: 1) 为流动相, 流速 1.0mL·min⁻¹, 检测波长 315nm。小鼠按马兜铃酸 A 4.0mg·kg⁻¹ 灌胃给予关木通提取液后, 经 HPLC 法测定血浆药物浓度。结果 马兜铃酸 A 在 0.1098 ~ 3.66mg·L⁻¹ 的浓度范围内线性关系良好 ($r=0.9998$, $n=7$), 最低检测浓度为 0.0183mg·L⁻¹。马兜铃酸 A 高、中、低 3 种不同浓度的平均回收率及相对标准偏差分别为 97.07% (1.0%), 97.10% (1.1%) 和 99.36% (0.8%), 该法的日内和日间精密度的 RSD 值均小于 9.3%。小鼠给药后, 药动学房室模型为一室模型, 主要药动学参数 $T_{1/2(ka)}$, $T_{1/2(ke)}$, T_{max} , AUC, C_{max} , $CL/F_{(s)}$, $V/F_{(e)}$ 分别为: 3.94, 16.29, 10.65min, 104.88(mg/L)·min, 2.84mg/L, 0.038mg/kg/min/(mg/L), 0.

作者简介: 田葆萍, 女, 1976, 硕士研究生, Tel: 0311-6265625

通讯作者: 张兰桐, Tel: (0311) 6266419, E-mail: zhanglantong@263.net

89 (mg/kg) / (mg/L)。结论 本实验建立了关木通药材中马兜铃酸 A 血药浓度的 HPLC 测定方法, 阐明了马兜铃酸 A 的药动学特征。

关键词: 高效液相色谱法; 关木通; 马兜铃酸 A; 药动学

中图分类号: R969.11 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)02-0137-04

Study on pharmacokinetics of aristolochic acid *caulis aristolochiae Manchuriensis* extraction

TIAN Bao-ping^{1,2}, ZHANG Lan-tong¹, YUAN Zhi-fang¹, et al(1. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Institute of Military of Medicine, Department of General Equipment, Beijing 100101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a reversed-phase HPLC method for the study of pharmacokinetics of aristolochic acid A from *Caulis Aristolochiae manshuriensis* extraction in mice after single oral administration. **METHOD** The determination of aristolochic acid A concentration was performed by HPLC on a waters apparatus with a 315 nm ultraviolet detection and DiamonsilTM C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), which was eluted with a mixture of methanol-water-acetic acid (72: 27: 1) solution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹ and at a room temperature of 24°C. Mice were given the extraction by oral administration at dose of 4.0 mg/kg aristolochic acid A and plasma concentrations were determined by HPLC. **RESULTS** The standard curve showed a good linearity over a range of 0.1098 ~ 36.6 mg · L⁻¹ for aristolochic acid A ($r=0.9998$, $n=7$). The lowest determination concentration of aristolochic acid A was 0.0183 mg · L⁻¹. The average recoveries and relative standard deviations of aristolochic acid A were 99.36% (0.8%), 97.10% (1.0%), and 97.08% (1.0%), respectively. The relative standard deviations of intra-day and inter-day precisions for the method were all less than 9.3%. After single oral administration of the extraction to mice, the mean plasma concentration-time course was found to fit a one-compartment model. The main pharmacokinetic parameters of aristolochic acid A as follows: $T_{1/2(ka)}$, $T_{1/2(ke)}$, T_{max} , AUC, C_{max} , $CL/F_{(s)}$, $V/F_{(c)}$ were 3.94 min, 16.29 min, 10.65 min, 104.88 (mg/L) · min, 2.84 mg/L, 0.038 mg/kg/min/(mg/L), 0.89 (mg/kg)/(mg/L). **CONCLUSION** It is a good method to determine the concentration of aristolochic acid A in plasma and to obtain pharmacokinetic parameters.

KEY WORDS: HPLC; *Caulis aristolochiae manshuriensis*; aristolochic acid A; pharmacokinetics

自 2000 年 5 月美国食品和药品管理局 (FDA) 分别公布了对产业界和卫生界有关含有马兜铃酸植物药物和食品的通告^[1]以来, 中草药肾病已成为国内外中医药界广泛关注和重点研究的课题之一。我们测定了关木通、青木香和马兜铃等中药材及冠心苏合胶囊、排石颗粒等复方制剂中马兜铃酸 A 的含量^[2], 为了进一步阐明马兜铃酸 A 在体内的吸收、分布、代谢、排泄等一系列过程, 本实验采用高效液相色谱法测定体内马兜铃酸 A 的血药浓度, 建立体内分析方法, 并对小鼠灌胃给药后的药动学特征进行研究, 结果满意。同时, 本研究为复方制剂中马兜铃酸 A 的药代动力学研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

动物为昆明种小鼠 (25 ~ 30 g), ♀ ♂ 各半 (河北省实验动物中心, 动物合格证号为冀动字 II 级 04056 号), 试验前禁食 14 ~ 16 h, 饮水不限。

1.2 试剂与药品

马兜铃酸 A 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 746-9002); 关木通 (石家庄市药材站, 并经河北医科大学聂凤禔教授鉴定); 甲醇为色谱纯; 冰醋酸为分析纯。

1.3 仪器

高效液相色谱仪 (美国 Waters 515 泵, 2487 紫外检测器), 色谱柱为 DiamonsilTM C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), C₁₈ 保

护柱 (北京分析仪器厂)。

1.4 关木通提取液的制备

取关木通粉末 (40 目) 250 g, 加 10 倍量的蒸馏水, 煎煮 3 次, 滤过, 合并提取液, 浓缩至约 50 mL, 备用。经 HPLC 测定, 关木通提取液中马兜铃酸 A 的含量为 1.482 mg · mL⁻¹。

1.5 血浆中马兜铃酸 A 的测定^[3]

1.5.1 血浆样品预处理 取血浆 0.2 mL, 加 0.6 mL 甲醇沉淀蛋白, 涡流混旋 10 s, 以 3000 r · min⁻¹ 速度离心 10 min, 取上清液, 滤膜 (0.45 μm) 滤过, 进样 20 μL, 以峰面积进行定量。

1.5.2 色谱条件 以甲醇-水-冰乙酸 (72: 27: 1) 为流动相; 检测波长 315 nm; 流速 1.0 mL · min⁻¹; 灵敏度 0.5 AUFC。在此色谱条件下, 马兜铃酸 A 的色谱峰分离度大于 2.0, 理论板数不小于 3000, 保留时间 (t_R) 约为 15 min, 不对称因子 1.0 ~ 1.20, 代谢物或其它杂质峰无干扰。空白血浆、空白血浆中加入马兜铃酸 A 对照品及血浆样品的 HPLC 色谱图分别见图 1。

1.6 标准曲线的绘制

对照品溶液的配制 取马兜铃酸 A 对照品适量, 精密称定。加甲醇溶解并稀释制成浓度为 0.183 mg · mL⁻¹ 的标准贮备液, 临用前用甲醇稀释。

取空白血浆 0.2 mL, 精密加入一系列浓度的对照品溶液 0.6 mL, 按“血浆样品的预处理”项下同法操作, 记录马兜铃

酸 A 的峰面积。以血浆中马兜铃酸 A 的浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性回归,结果得到回归方程 $Y = 13.72 X + 0.0169$ 。马兜铃酸 A 在 $0.1098 \sim 3.66 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内线性关系良好,相关系数 $r = 0.9998$ ($n = 7$)。最低检测浓度为 $0.0183 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.7 回收率试验

取空白血浆 0.2 mL,按高、中、低 3 种不同浓度加入对照品溶液 0.6 mL,每个浓度平行 5 份。按“血浆样品的预处理”项下同法操作,注入色谱仪,测定峰面积,计算平均回收率及相对标准偏差,见表 1。

1.8 精密度与稳定性试验

日内变异 取空白血浆 0.2 mL,按高、中、低 3 种不同浓度加入对照品溶液 0.6 mL,每个浓度平行作 5 份,按“血浆样品的预处理”项下同法操作,每个样本分别进样 3~5 次,在同日内同一条标准曲线进行测定,计算日内精密度。结果见

表 1 马兜铃酸 A 的血浆回收率及相对标准偏差 RSD% ($n = 5$)

实际浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		测定值 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)					$\bar{x}$	SD	RSD(%)
高	0.732	0.714	0.708	0.710	0.701	0.720	97.07	1.0	1.0
	回收率 (%)	97.5	96.7	97.0	95.8	98.4			
中	0.366	0.359	0.360	0.352	0.351	0.355	97.10	1.1	1.1
	回收率 (%)	98.1	98.4	96.2	95.9	97.0			
低	0.1098	0.110	0.110	0.109	0.109	0.108	99.36	0.9	0.8
	回收率 (%)	100.1	100.3	98.9	99.0	98.5			

表 2 马兜铃酸 A 血浆浓度检测日内精密度试验结果 ($n = 5$)

Tab 2 The relative standard deviations of intra-day precision for the method to determine the concentrations of aristolochic acid A in plasma ($n = 5$)

血浆药物浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)		测定值 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)					$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
高浓度	0.622	0.642	0.632	0.668	0.660	0.645	0.645 ± 0.02	3.0
中浓度	0.359	0.360	0.352	0.351	0.355	0.355	0.355 ± 0.004	1.1
低浓度	0.113	0.104	0.109	0.112	0.108	0.109	0.109 ± 0.004	3.3

日间变异 按高、中、低 3 种不同浓度加入对照品溶液,每个浓度平行做 4 份,每个样本分别进样 3~5 次,在一周内

表 3 马兜铃酸 A 血浆药物浓度检测日间精密度试验结果 ($n = 4$)

Tab 3 The relative standard deviations of inter-day precision for the method to determine the concentrations of aristolochic acid A in plasma ($n = 4$)

血浆分组		测定值 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)				$\bar{x} \pm s$	RSD%
测定日期	1	3	5	7			
高浓度	0.632	0.656	0.603	0.527	0.604	0.604 ± 0.056	9.3
中浓度	0.360	0.354	0.345	0.347	0.352	0.352 ± 0.007	1.9
低浓度	0.112	0.110	0.105	0.102	0.107	0.107 ± 0.004	4.3

由精密度试验结果表明:血浆样中的马兜铃酸 A 在高、中、低 3 种不同浓度下,日内、日间 RSD 均小于 9.3%,说明样品溶液在试验条件下稳定。

1.9 药动学试验

1.9.1 方法取昆明种小鼠,♀♂各半,给药剂量按马兜铃酸 A $4 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 口服灌胃给予关木通提取液。给药后分别于不同时间 (5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 min) 摘

表 2。

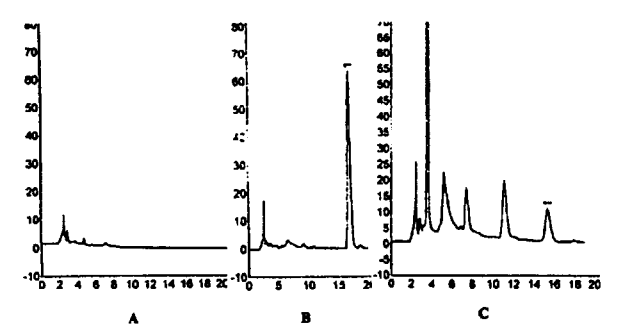


图 1 A.空白血浆;B.空白血浆加马兜铃酸 A 对照品;C.给药后血浆样品;1.马兜铃酸 A

Fig 1 a Chromatograms of blank plasma (A); Plasma spiked with aristolochic acid A (B); plasma sample after oral administration to mice (C); 1. aristolochic acid A

不同日用不同标准曲线进行测定,计算日间精密度,结果见表 3。

1.9.2 数据处理小鼠口服关木通提取液后,马兜铃酸 A 的药-时曲线见图 2。取每个时间点的血浆药物浓度均值 ($n =$

6).采用 3P97药动学处理软件进行自动拟合。以理论血药浓度值与实验测定值的相关系数最大和 AIC 最小作为判断标准,判断房室模型。

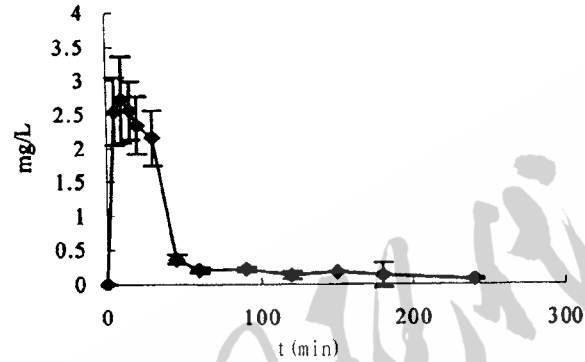


图 2 小鼠灌胃给予关木通提取液后马兜铃酸 A 的药-时曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of aristolochic acid A after oral administration to mice

表 4 小鼠灌胃给予关木通提取液后马兜铃酸 A 的药动学参数

Tab 4 Pharmacokinetic parameters of aristolochic acid A after oral administration to mice

Parameters	Value	Parameters	Value
$T_{1/2}(ka)$	3.94 min	C_{max}	2.84 mg/L
$T_{1/2}(ke)$	16.29 min	$CL/F(s)$	0.038 mg/kg/min/(mg/L)
$T_{(max)}$	10.65 min	$V/F(c)$	0.89 (mg/kg)/(mg/L)
AUC	104.88 • min(mg/L)		

2 结果

药动学曲线经拟合符合一室模型^[4],主要药动学参数见表 4。

3 讨论

本实验建立了关木通提取液中马兜铃酸 A 血药浓度的 HPLC 测定方法,方法的专属性强,结果准确。

本实验研究了马兜铃酸 A 在小鼠体内的药代动力学特征,药动力学参数和药-时曲线显示,马兜铃酸 A 在小鼠体内的吸收迅速, T_{max} 仅 10 min 左右,然后迅速分布,但在给药 240 min 后仍在血浆中检测到马兜铃酸 A,这可能是马兜铃酸 A 在体内蓄积中毒的主要原因。

在实验中发现马兜铃酸 A 色谱峰的保留时间受温度影响较大,故在恒温 24℃ 下进行试验。另外,经反复实验以大黄酚为内标保留时间合适,但在生物样本中不能与马兜铃酸 A 很好的分离,故未使用内标法测定。

参考文献

[1] 饶向荣,李深,李秀英,等. 对美国 FDA 关于马兜铃酸中草药肾损害的分析 [J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(2): 82.

[2] 张兰桐,崔晓红,袁志芳,等. RP-HPLC 法测定中药材及其制剂中马兜铃酸 A 的含量 [J]. 药物分析杂志, 2003, 23(3): 215.

[3] 马红梅,张伯礼,徐宗佩,等. 关木通肾毒性机制的实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(6): 404.

[4] 韩国柱 主编. 中草药药代动力学 [M]. 中国医药科技出版社. 1999, 36.