

# 地骨皮甲素盐酸盐的体外代谢稳定性和体内药动学研究

高欢<sup>1</sup>, 刘雅倩<sup>2</sup>, 吴琼<sup>1</sup>, 马群<sup>1</sup>, 赵庆春<sup>1\*</sup> (1.中国人民解放军北部战区总医院药剂科, 沈阳 110003; 2.江苏先声药业有限公司药物安全与警戒部门, 南京 210042)

**摘要:** 目的 建立测定大鼠肝微粒体和血清中地骨皮甲素盐酸盐(kukoamine A hydrochlorid, KuA-H)含量的方法, 研究其在肝微粒体中的代谢稳定性和血清中的药动学特征。方法 将含 KuA-H 的大鼠肝微粒体孵育体系于 37 °C 的水浴下分别孵育多个时间点时加入含 76 ng·mL<sup>-1</sup> 卡马西平的冰乙醇终止反应, 再采用乙腈沉淀蛋白对血样预处理, 以 HPLC-MS/MS 测定大鼠肝微粒体和血清中 KuA-H 的含量。以 ACE Excel Super C<sub>18</sub> 为色谱柱, 以水(0.1%甲酸)-乙腈(0.1%甲酸)为流动相梯度洗脱, 流速为 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 40 °C, 进样量 5 μL; 采用电喷雾离子源, 以多反应监测模式进行正离子检测, 分别以 *m/z* 531.3→222.4(KuA-H)、*m/z* 237.3→192.2(内标)为定量分析的离子对。以孵育 0 min 时 KuA-H 的含量为参照, 计算其在大鼠肝微粒体孵育体系中剩余百分率, 测定大鼠灌胃给药后不同时间点血样中 KuA-H 含量, 用 DAS 2.0 软件计算药动学参数。结果 KuA-H 在大鼠肝微粒体和血清中检测的线性范围分别为 30~900 ng·mL<sup>-1</sup> 和 12.5~2 000 ng·mL<sup>-1</sup>, 精密度和准确度、提取回收率、基质效应和稳定性均符合生物样品定量分析要求。KuA-H 在大鼠肝微粒体中孵育 60 min 内剩余百分率范围为 85.5%~101.5%, 药动学参数: *C*<sub>max</sub> 为 (107.9±29.2)ng·mL<sup>-1</sup>, *t*<sub>1/2</sub> 为 (4.71±1.92)h, *AUC*<sub>0-t</sub> 为 (252.2±34.7)ng·h·mL<sup>-1</sup>, *t*<sub>max</sub> 为 (0.46±0.10)h。结论 建立的 HPLC-MS/MS 快速、灵敏, 适用于 KuA-H 体外代谢稳定性和体内药动学研究。

**关键词:** 地骨皮甲素盐酸盐; HPLC-MS/MS; 肝微粒体; 代谢稳定性; 药动学

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)24-3218-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.24.005

引用本文: 高欢, 刘雅倩, 吴琼, 等. 地骨皮甲素盐酸盐的体外代谢稳定性和体内药动学研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(24): 3218-3224.

## Metabolic Stability *In vitro* and Pharmacokinetic Studies *In vivo* of Kukoamine A Hydrochlorid

GAO Huan<sup>1</sup>, LIU Yaqian<sup>2</sup>, WU Qiong<sup>1</sup>, MA Qun<sup>1</sup>, ZHAO Qingchun<sup>1\*</sup> (1.Department of Pharmacy, General Hospital of Northern Theater Command of People's Liberation Army of China, Shenyang 110003, China; 2.Drug Safety and Vigilance Department, Jiangsu Xiansheng Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210042, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method for determining the content of kukoamine A hydrochloride(KuA-H) in liver microsomes and plasma of rats, and to study its metabolic stability in liver microsomes and pharmacokinetics characteristics in plasma. **METHODS** The rat liver microsome incubation system containing KuA-H was incubated in a water bath at 37 °C for multiple time points, and ice acetonitrile containing 76 ng·mL<sup>-1</sup> carbamazepine was added to terminate the reaction. The plasma samples were precipitated with acetonitrile, and the content of KuA-H in rat liver microsomes and plasma was determined by HPLC-MS/MS. The determination was performed on ACE Excel Super C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of water(0.1% formic acid)-acetonitrile(0.1% formic acid) for gradient elution at the flow rate of 0.2 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was set at 40 °C, and the injection volume was 5 μL. Electrospray ionization source was performed in a positive electrospray ionization mode in the multiple reaction monitoring mode. The ion transitions for quantitative analysis were *m/z* 531.3→222.4 (KuA-H) and *m/z* 237.3→192.2(internal standard), respectively. Taking the content of KuA-H at 0 min of incubation as a reference, the remaining percentage of it in the rat liver microsome incubation system was calculated, and the content of KuA-H in plasma samples at different time points was determine after intragastric administration. The pharmacokinetic parameters were calculated using DAS 2.0 software. **RESULTS** The linear ranges of KuA-H in rat liver microsomes and plasma were 30~900 ng·mL<sup>-1</sup> and 12.5~2 000 ng·mL<sup>-1</sup>, respectively. The precision and accuracy, extraction recovery rate, matrix effect and stability met the quantitative analysis requirements of biological sample. The remaining percentage of KuA-H within 60 min of incubation in rat liver microsomes ranged from 85.5% to 101.5%. The main pharmacokinetic parameters were as follows: *C*<sub>max</sub> was (107.9±29.2)ng·mL<sup>-1</sup>, *t*<sub>1/2</sub> was (4.71±1.92)h, *AUC*<sub>0-t</sub> was (252.2±34.7)ng·h·mL<sup>-1</sup>, and *t*<sub>max</sub> was (0.46±0.10)h. **CONCLUSION** The HPLC-MS/MS established is rapid and sensitive, which is suitable for *in vitro* metabolic stability and *in vivo*

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2014ZX09J14101-05C)

作者简介: 高欢, 女, 硕士, 药师 E-mail: 1540879030@qq.com \*通信作者: 赵庆春, 男, 博士, 主任药师 E-mail: Zhaoqingchun1967@163.com

地骨皮为茄科植物枸杞 *Lycium chinese* Mill. 或宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥根皮, 具有清肺降火、凉血除蒸的功效<sup>[1]</sup>, 用于治疗阴虚潮热、肺热咳嗽等症<sup>[2]</sup>。现代药理研究证实地骨皮具有降血糖、血压、血脂及抑菌抗病毒等药理活性<sup>[3-6]</sup>。地骨皮中含生物碱类、有机酸及其酯类、蒽醌类等生物活性成分<sup>[7]</sup>。地骨皮甲素(kukoamine A, KuA) 是其主要的生物碱类成分。Jiang 等<sup>[8]</sup>首次证明了 KuA 和地骨皮乙素对淀粉样蛋白  $\beta$  和人胰岛淀粉样蛋白多肽的聚集具有抑制作用, 推测其可能是预防和治疗阿尔茨海默病和 2 型糖尿病的有效策略。因此, 课题组前期借助计算机辅助药物设计的活性预测, 结合活性验证, 筛选出具有神经保护活性的 KuA, 并通过硅胶柱色谱和制备液相在地骨皮中分离得到 KuA, 且完成了地骨皮甲素盐酸盐(kukoamine A hydrochloride, KuA-H) 的全合成。同时对其体内外药效进行了评价, 深入研究了 KuA 的神经保护活性<sup>[9-14]</sup>, 展现出成为一个创新药物的潜质。非临床药动学研究在新药研发的评价过程中起着重要作用, 然而目前尚无文献报道 KuA-H 药动学相关研究。因此, 本研究拟建立一种快速、灵敏的 HPLC-MS/MS 法对 KuA-H 的体外代谢稳定性、体内药动学进行研究, 为其成药性评价提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津, 配有 SIL-20AC 自动进样器, CTO-20A 柱温箱); API 3200MD 三重四级杆质谱仪(美国 AB SCIEX 公司)及配备的 Analyst MD Software 1.6.2 数据采集及分析软件(MultiQuant MD 3.0.2 数据分析模块); ACE Excel Super C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3  $\mu$ m); TGL-20M 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); HZF-A2000 电子天平(奥豪斯仪器有限公司); UV120D 电子分析天平(日本岛津); DK-98-11 电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司); XK 96-3 型微量振荡器(江苏新康医疗器械有限公司); HNY-2102C 恒温培养振荡器(天津市欧诺仪器仪表有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

KuA-H(北部战区总医院自制, 批号:

20190804, 20190807; 含量>95%); 卡马西平(中国食品药品检定研究院, 批号: 100142-201706; 含量>98%); 还原型辅酶 II 四钠(批号: 52A0113, NADPHNa<sub>4</sub>)、葡萄糖-6-磷酸(G-6-P, 批号: 115B039)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH, 批号: 125A015)均购自中国索莱宝科技有限公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 氯化镁等试剂均为分析纯, 水为纯净水。

### 1.3 肝微粒体

大鼠肝微粒体(3SMC1, RLMs, 北京汇智泰康医药技术有限公司), 质量浓度为 20 mg·mL<sup>-1</sup>(以蛋白计)。

### 1.4 动物

Sprague-Dawley(SD)大鼠, SPF 级, 健康雄性, 体质量(240±20)g, 购自辽宁省长生生物技术有限公司, 生产许可证号: SCXK(辽)2015-0001。购买后进行 1 周适应性饲养, 饲养温度 25  $^{\circ}$ C, 实验前自由饮水, 禁食 12 h。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱与质谱条件

以 ACE Excel Super C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 3  $\mu$ m)为色谱柱, 以水(0.1%甲酸, A)-乙腈(0.1%甲酸, B)为流动相进行梯度洗脱(0~3 min, 15%B; 3~4 min, 15%→90%B; 4~6 min, 90%→15%B; 6~8 min, 15%B), 流速为 0.2 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 40  $^{\circ}$ C, 进样量 5  $\mu$ L; 采用电喷雾离子源(ESI), 以多反应监测模式(MRM)进行正离子检测, 离子化电压 5 500 V, 离子源温度 450  $^{\circ}$ C, 喷雾气 40 psi, 辅助加热气 40 psi, 气帘气 35 psi, 碰撞气 5 psi。优化的 MRM 参数见表 1, 二级质谱图及化学结构见图 1。

表 1 KuA-H 及卡马西平(内标)优化的 MRM 参数

Tab. 1 Optimized MRM parameters of KuA-H and carbamazepine(IS)

分析物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
KuA-H	531.300	222.400	97	48
卡马西平(内标)	237.300	192.200	56	33

### 2.2 溶液的配制

2.2.1 KuA-H 贮备液 精密称定 KuA-H 适量, 用 DMSO 溶解, 配成 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的储备液, 置于 4  $^{\circ}$ C

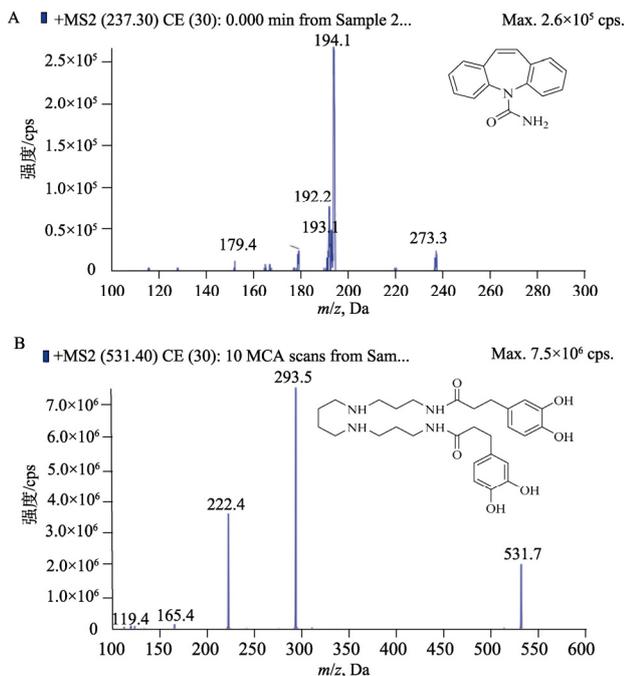


图1 KuA-H(A)和卡马西平(IS, B)二级质谱图及化学结构  
Fig. 1 MS/MS spectra and chemical structures of KuA-H (A) and carbamazepine (IS, B)

冰箱保存。临用时，稀释至所需浓度即可。

**2.2.2 内标溶液和终止液** 精密称定卡马西平适量，加入乙腈溶解，制成浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液，用乙腈稀释成  $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的内标溶液，置于  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  冰箱保存，备用。再取适量内标溶液加入乙腈稀释成浓度为  $76 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的终止液，置于  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  冰箱保存，备用。

**2.2.3 还原型辅酶 II 溶液** 精密量取  $\text{NADPHNa}_4$  溶液  $4 \text{ } \mu\text{L}$ 、G-6-P 溶液  $4 \text{ } \mu\text{L}$ 、G-6-PDH 溶液  $4 \text{ } \mu\text{L}$ 、 $\text{MgCl}_2$  溶液  $12 \text{ } \mu\text{L}$ ，混匀即得。

### 2.3 孵育体系的建立与处理

冰浴下向代谢孵育体系中加入大鼠肝微粒体  $5 \text{ } \mu\text{L}$ 、KuA-H 溶液 ( $600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  $2 \text{ } \mu\text{L}$ 、PBS  $169 \text{ } \mu\text{L}$ ，于  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$  水浴中预孵育  $5 \text{ min}$ ，然后加入预孵育  $5 \text{ min}$  后的 NADPH 再生系统启动反应，分别于  $0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 180 \text{ min}$  后取出各孵育体系，迅速加入  $400 \text{ } \mu\text{L}$  含卡马西平 ( $76 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的冰乙腈溶液终止反应，涡旋  $3 \text{ min}$ ，于  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 、 $17\ 790 \times g$  离心  $10 \text{ min}$ ，取上清液  $30 \text{ } \mu\text{L}$  进样分析，测定样品中 KuA-H 含量。试验平行重复 3 次。

### 2.4 血浆样品的处理

量取  $50 \text{ } \mu\text{L}$  空白血浆，依次加入内标溶液  $5 \text{ } \mu\text{L}$  ( $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、乙腈  $5 \text{ } \mu\text{L}$ ，涡旋  $30 \text{ s}$  充分混合，再加入  $140 \text{ } \mu\text{L}$  乙腈作为蛋白沉淀剂，涡旋  $3 \text{ min}$ ，

混匀，于  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 、 $17\ 790 \times g$  离心  $10 \text{ min}$ 。吸取上清液适量，进行 LC-MS/MS 分析。

### 2.5 方法学考察

**2.5.1 专属性考察** 分别取空白肝微粒体(不加内标和 KuA-H)  $5 \text{ } \mu\text{L}$ 、空白肝微粒体加内标 ( $7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和 KuA-H ( $360 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、大鼠代谢  $90 \text{ min}$  后肝微粒体样品(按“2.3”项下方法制得)，以及空白血浆、空白血浆加入 KuA-H ( $800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和内标 ( $4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、灌胃给药  $0.5 \text{ h}$  后的大鼠血浆样品加入内标 ( $4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) (按“2.4”项下方法制得)。所有样品按照“2.1”项下条件进样分析，记录色谱图。结果见图 2，KuA-H 和卡马西平的  $t_R$  分别为  $1.42, 6.57 \text{ min}$ ，分离度及峰形良好，且内源性物质对 KuA-H 和内标的测定均无干扰。

**2.5.2 线性关系与定量下限考察** 精密量取  $5 \text{ } \mu\text{L}$  空白肝微粒体，加入配制好的  $2 \text{ } \mu\text{L}$  不同浓度 ( $3, 6, 15, 30, 60, 90 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 KuA-H 标准溶液，配制成终浓度为  $30, 60, 150, 300, 600, 900 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 KuA-H 肝微粒体标准曲线样品。再取  $50 \text{ } \mu\text{L}$  空白血浆，加入配制好的  $5 \text{ } \mu\text{L}$  不同浓度 KuA-H 标准溶液 ( $0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 10, 20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )，配制成终浓度为  $12.5, 25, 50, 100, 200, 1\ 000, 2\ 000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 KuA-H 血浆标准曲线样品。肝微粒体标准曲线样品和血浆标准曲线样品分别按“2.3”和“2.4”项下方法处理后，按“2.1”项下条件进样分析，记录峰面积。以 KuA-H 与内标的峰面积比为纵坐标，KuA-H 浓度为横坐标，采用加权最小二乘法进行线性拟合得到标准曲线，分别为  $y=0.043\ 3x-0.073\ 1$  ( $r=0.997\ 0$ ) 和  $y=0.000\ 4x-0.005\ 2$  ( $r=0.995\ 1$ )。结果表明，KuA-H 在肝微粒体中  $30\sim 900 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  和在血浆中  $12.5\sim 2\ 000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的浓度范围内线性关系良好，定量下限 (LLOQ) 分别为  $30, 12.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.5.3 准确度与精密度试验** 取  $5 \text{ } \mu\text{L}$  灭活肝微粒体，分别加入配制好的  $2 \text{ } \mu\text{L}$  的 LLOQ ( $3 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、低 ( $6 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中 ( $36 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、高 ( $72 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 浓度的 KuA-H 质控溶液，配制成终浓度为  $30, 60, 360, 720 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LLOQ、低、中、高浓度的 KuA-H 肝微粒体质控样品。精密量取  $50 \text{ } \mu\text{L}$  空白血浆，分别加入配制好的  $5 \text{ } \mu\text{L}$  的 LLOQ ( $0.125 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、低 ( $0.2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中 ( $8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、高 ( $16 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 浓度的 KuA-H 质控溶液，配制成终浓度为  $12.5, 20, 800, 1\ 600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 LLOQ、低、中、高浓度的

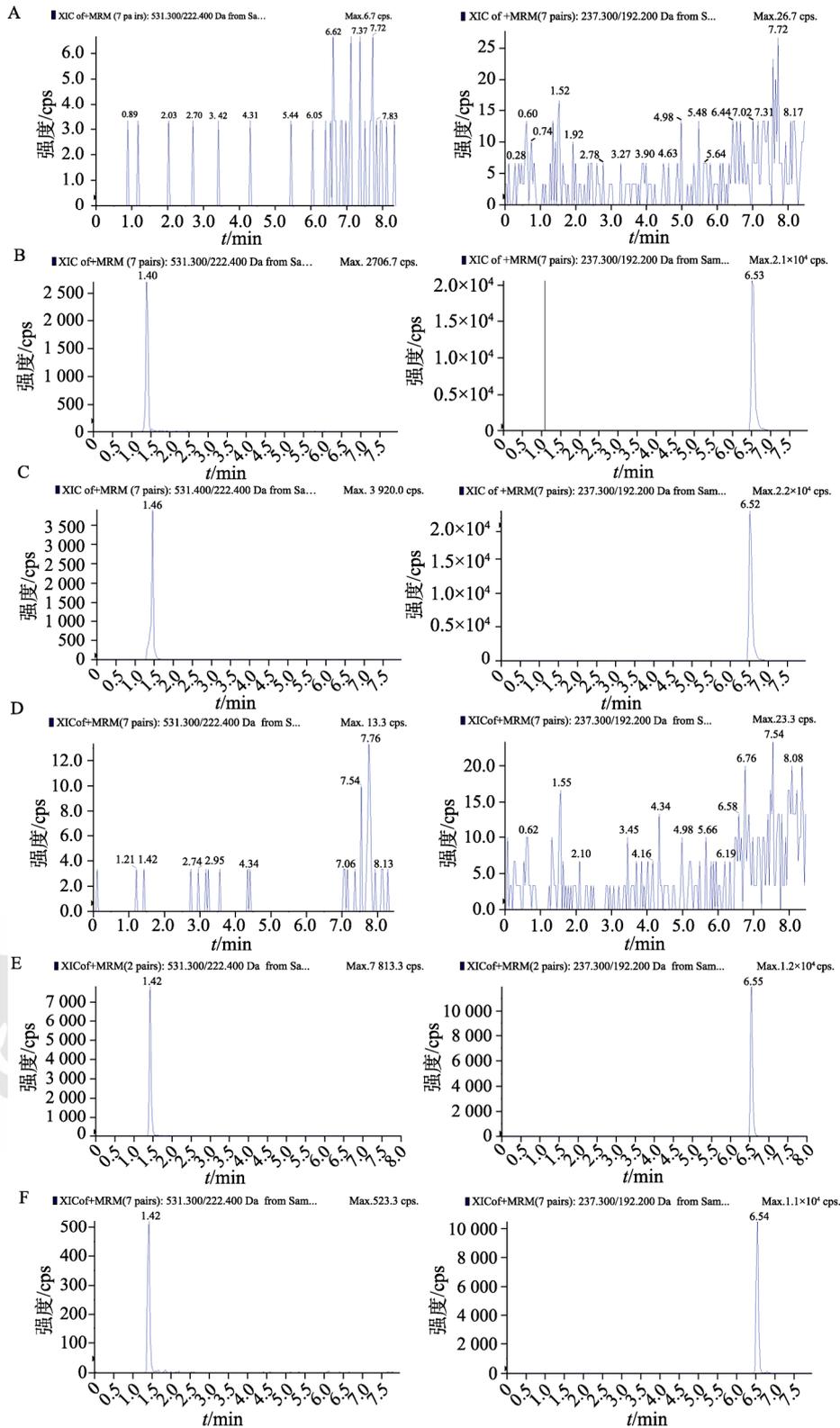


图 2 化合物地骨皮甲素盐酸盐和内标卡马西平肝微粒体和血浆样品典型 MRM 图谱

A-空白肝微粒体; B-空白肝微粒体加入地骨皮甲素盐酸盐(360 ng·mL<sup>-1</sup>)和卡马西平(7 ng·mL<sup>-1</sup>); C-正常代谢 90 min 后大鼠肝微粒体样品; D-空白血浆; E-空白血浆加入地骨皮甲素盐酸盐(800 ng·mL<sup>-1</sup>)和卡马西平(4 ng·mL<sup>-1</sup>); F-灌胃给药 0.5 h 后的大鼠血浆样品。

**Fig. 2** Representative MRM chromatograms of the compounds KuA-H and internal standard carbamazepine in liver microsomes samples and rat plasma

A-blank liver microsomes; B-blank liver microsomes spiked with KuA-H(360 ng·mL<sup>-1</sup>) and carbamazepine(7 ng·mL<sup>-1</sup>); C-rat liver microsomes samples after normal metabolism for 90 min; D-blank plasma; E-blank plasma spiked with KuA-H (800 ng·mL<sup>-1</sup>) and carbamazepine (4 ng·mL<sup>-1</sup>); F-plasma samples obtained from rat after intragastric administration for 0.5 h.

KuA-H 血浆质控样品。肝微粒体和血浆质控样品分别按“2.3”和“2.4”项下方法处理，各浓度平行制备 6 份，再按“2.1”项下条件进样分析，连续测定 3 d，记录峰面积，计算浓度，考察日内和日间精密度，结果以相对标准偏差(RSD)表示。以实测质量浓度与理论质量浓度进行比较以评价准确度，结果以相对误差(relative error, RE)表示。结果见表 2~3。结果表明，KuA-H 在肝微粒体和血浆中的 LLOQ、低、中、高 4 个质量浓度的日间和日内 RSD 均<15.0%，RE 在±15%内，准确度良好。

表 2 KuA-H 在大鼠肝微粒体中的日内、日间精密度和准确度、提取回收率和基质效应结果

Tab. 2 Results of Intra day and inter day precision, accuracy, extraction recovery rate and matrix effects for KuA-H in rat liver microsomes

理论浓度/ ng·mL <sup>-1</sup>	日内(n=6)		日间(n=3)		基质效应		提取回收率	
	RSD/%	RSD/%	RE/%	平均值/%	RSD/%	平均值/%	RSD/%	RSD/%
30	1.2	2.5	-0.8	/	/	/	/	/
60	2.7	5.6	-7.9	102.6±5.5	5.4	93.5±7.1	7.6	
360	3.6	14.3	7.0	98.1±5.2	5.3	95.1±8.6	9.1	
720	1.8	13.3	-10.1	101.5±6.0	6.0	96.3±5.5	5.8	

表 3 KuA-H 在大鼠血浆中的日内、日间精密度和准确度、提取回收率和基质效应结果

Tab. 3 Results of precision, accuracy, extraction recovery rate and matrix effects for KuA-H in rat plasma

理论浓度/ ng·mL <sup>-1</sup>	日内(n=6)		日间(n=3)		基质效应		提取回收率	
	RSD/%	RSD/%	RE/%	平均值/%	RSD/%	平均值/%	RSD/%	RSD/%
12.5	7.9	9.1	5.2	/	/	/	/	/
20	5.5	11.1	6.9	97.9±8.5	8.8	87.5±10.7	12.2	
800	9.2	13.6	-7.9	103.4±6.9	6.7	85.6±11.1	13.1	
1 600	6.1	10.5	1.1	101.9±4.8	4.7	77.7±3.9	5.1	

**2.5.4 提取回收率与基质效应试验** 分别按“2.3”和“2.4”项下方法制备终浓度为低、中、高 3 个浓度的肝微粒体和血浆质控样品，按“2.1”项下条件进样分析，记录峰面积  $A_1$ ；另外，分别取空白肝微粒体 5  $\mu$ L 和空白血浆 50  $\mu$ L，除不加标准溶液与内标溶液外，再分别按相应方法制备，在上清液中加入低、中、高 3 个浓度的标准溶液和内标溶液，进样分析，记录峰面积  $A_2$ ；同时用乙腈配制成终浓度为低、中、高 3 个浓度的肝微粒体和血浆质控样品，进样分析，记录峰面积  $A_3$ 。各浓度平行制备 6 份样品。通过以下公式进行计算。计算求得低、中、高 3 个浓度质控样品的提取回收率和基质效应，及其对应的 RSD 值。结果表明，KuA-H

在肝微粒体和血浆中提取回收率和基质效应值均在(100%±15%)内，RSD 值<15%。结果见表 2~3。

$$\text{提取回收率}(\%)=(A_1/A_2)\times 100\% \quad (1)$$

$$\text{基质效应}(\%)=(A_2/A_3)\times 100\% \quad (2)$$

**2.5.5 稳定性试验** 分别按“2.3”和“2.4”项下方法制备终浓度为低、中、高 3 个浓度的肝微粒体和血浆质控样品，分别在室温放置 24 h、自动进样器放置 3 d、反复冻融 3 次(-20  $^{\circ}$ C 至室温)、-20  $^{\circ}$ C 放置 14 d，按“2.1”项下条件进样分析，记录峰面积，得到 KuA-H 含量，计算 RSD 值。结果如表 4 所示，各样品 RSD 均<15%，稳定性良好。

表 4 KuA-H 在大鼠肝微粒体和血浆中的稳定性(n=3)

Tab. 4 Stability of KuA-H in liver microsomes and rat plasma(n=3)

条件	RSD/%					
	肝微粒体			血浆		
质控样品浓度/ng·mL <sup>-1</sup>	60	360	720	20	800	1 600
室温放置 12 h	1.9	9.3	3.0	4.7	7.2	6.1
自动进样器放置 3 d	6.7	0.5	4.4	2.7	2.7	3.4
反复冻融 3 次	2.6	5.3	5.4	7.0	3.0	4.4
-20 $^{\circ}$ C 放置 14 d	8.7	8.8	2.4	6.7	1.1	1.9

**2.6 KuA-H 在大鼠肝微粒体中的代谢稳定性研究** 按“2.3”项下方法建立与处理大鼠肝微粒体体系，在孵育一定时间后，取出样品，经处理后取上清液进行 HPLC-MS/MS 定量分析，计算得到各肝微粒体中孵育不同时间后剩余的母药含量。以孵育时间为横坐标(min)，以剩余母药含量的百分比为纵坐标(%)作图。结果显示，600 ng·mL<sup>-1</sup> KuA-H 在体外肝微粒体中 37  $^{\circ}$ C 恒温孵育 60 min 内，剩余母药含量在 85.5%~101.5%，变化趋势并不明显，表明 KuA-H 在模拟的体外药物代谢环境中，具有较好的稳定性，而孵育 90~180 min，剩余母药含量随时间而减少，在 54.1%~81.5%，说明选用的大鼠肝微粒体具有代谢活性，结果见图 3。

## 2.7 药动学实验

取 SD 大鼠 6 只称重并标号，分别于单次灌胃给予 100 mg·kg<sup>-1</sup> KuA-H 后 0.083, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 经眼眶静脉采血，用涂有肝素钠的 1.5 mL EP 管收集血液，在低温冷冻离心机中 4  $^{\circ}$ C、850 $\times$ g 离心 10 min 后，吸取上层澄清血浆于另一 EP 管中，放置于-20  $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。在定量分析时，按“2.4”项下方法处理血样，再按“2.1”项下方法，进样分析，得到血药浓度-时间曲线见图 4。采用 DAS2.0 药动学软

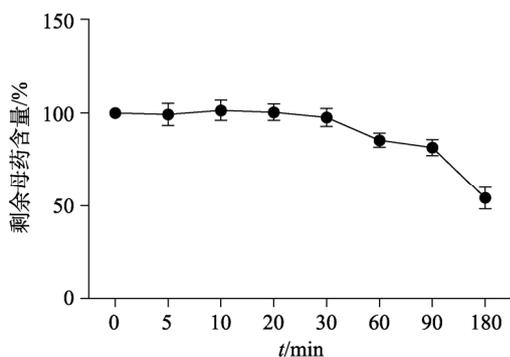


图3 KuA-H(600 ng·mL<sup>-1</sup>)在RLMs中的代谢稳定性  
Fig. 3 Metabolic stability of KuA-H(600 ng·mL<sup>-1</sup>) in rat liver microsomes

件中非房室模型统计矩算法计算灌胃给药后的药动学参数,结果见表5。结果显示,血药浓度的峰值( $C_{max}$ )为(107.9±29.2)ng·mL<sup>-1</sup>,达峰时间( $t_{max}$ )为(0.46±0.10)h,药时曲线下面积  $AUC_{0-t}$  为(252.2±34.7)ng·h·mL<sup>-1</sup>,  $AUC_{0-\infty}$ 为(348.9±42.8)ng·h·mL<sup>-1</sup>,半衰期( $t_{1/2}$ )为(4.71±1.92)h,平均滞留时间( $MRT_{0-\infty}$ )为(6.49±2.42)h,血浆清除率( $CL_z$ )为(290.3±36.9)L·h<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>。

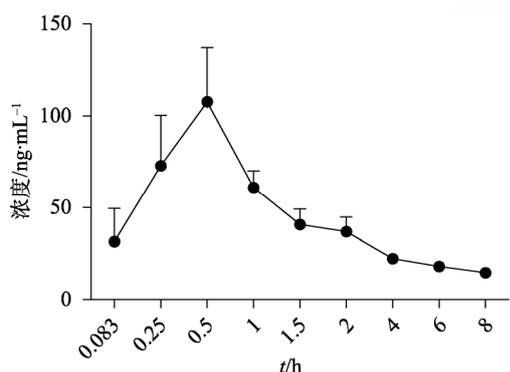


图4 KuA-H平均血浆药物浓度-时间曲线  
Fig. 4 KuA-H average plasma drug concentration-time curve

表5 KuA-H灌胃给药后的主要药动学参数( $\bar{x} \pm s$ , n=6)  
Tab. 5 Main pharmacokinetic parameters of KuA-H after intragastric administration( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

药动学参数	灌胃给药(100 mg·kg <sup>-1</sup> )
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	107.9±29.2
$AUC_{0-t}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	252.2±34.7
$AUC_{0-\infty}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	348.9±42.8
$t_{1/2}/h$	4.71±1.92
$CL_z/L \cdot h \cdot kg^{-1}$	290.3±36.9
$MRT_{0-\infty}/h$	6.49±2.42
$VZ/L \cdot kg^{-1}$	1 918±628
$t_{max}/h$	0.46±0.10

### 3 讨论

#### 3.1 体外代谢稳定性分析

本研究选用了省时省力、稳定高效的体外代

谢研究,并且结合实验条件,选择的体外孵育系统为大鼠肝微粒体,并在体外大鼠肝微粒体中模拟了药物的代谢环境,结果显示KuA-H在肝微粒体孵育体系中具有较好的代谢稳定性,对进一步评估KuA-H的成药性提供了参考价值。虽然应用体外替代方法是目前安全性评价的发展趋势。但与体内相比,体外试验系统的主要缺陷包括两个方面:一是缺乏整体神经-体液-免疫调节;二是缺乏代谢转化作用。因此,为了进一步准确评估KuA-H的成药性、安全性与药代动力学性质,进行了后续的大鼠体内药动学研究。

#### 3.2 大鼠药动学参数分析

单次灌胃给予SD大鼠KuA-H(100 mg·kg<sup>-1</sup>)后,药动学研究表明:血药浓度的峰值( $C_{max}$ )为(107.9±29.2)ng·mL<sup>-1</sup>,达峰时间( $t_{max}$ )为(0.46±0.10)h,其中达峰时间并未>1 h,说明KuA-H给药后能够迅速吸收入血并达到血药浓度峰值,灌胃给药后  $t_{1/2}$  为(4.71±1.92)h,提示药物的药效持续时间较短,建立血药浓度的稳态可能需要较大剂量或增加给药频率,且血浆清除率为(290.3±36.9)L·h<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>,考虑KuA-H的半衰期较短可能与清除率较高有一定程度上的关系。

#### 3.3 代谢稳定性与药动学的联系

药物代谢在临床前研究中具有重要的指导意义<sup>[15-16]</sup>,代谢稳定性差意味着化合物在体内容易被代谢,进而导致不良的药动学性质。与体内代谢研究相比,体外代谢研究操作快速高效,可直接观察目标化合物的代谢稳定性,节省了大量的样品和实验动物,并且可以在一定程度上预测目标化合物的体内药动学行为,对药动学研究的模型选择具有指导意义。通过体外代谢稳定试验结果可知,KuA-H在模拟的体外药物代谢环境中60 min内具有较好的稳定性,对体内药动学行为进行预测,以确定其有进一步研究的价值。

综上所述,本研究成功建立了一种快速、灵敏的HPLC-MS/MS法用于测定肝微粒体和血浆中KuA-H含量,该方法的精密度、稳定性、专属性、基质效应、准确度和回收率均符合生物样品分析方法的要求,适用于KuA-H的体外代谢稳定性和体内药动学研究。

### REFERENCES

[1] 中国药典.一部[S]. 2020: 124.

- [2] ZHOU X W, XU G J, WANG Q. Studies on the chemical constituents in roots of *Lycium chinense* mill[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1996, 21(11): 675-676.
- [3] QIAN D, ZHAO Y X, YANG G, et al. Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae)[J]. Molecules, 2017, 22(6): 911-944.
- [4] YANG Y N, AN Y W, ZHAN Z L, et al. Nine new compounds from the root bark of *Lycium chinense* and their  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity[J]. RSC Adv, 2017, 7(2): 805-812.
- [5] MENG L J, LIU B L, ZHANG Y, et al. Chemical constituents in root barks of *Lycium chinense*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(15): 2139-2142.
- [6] YAO X, PENG Y, XU L J, et al. Phytochemical and biological studies of *Lycium* medicinal plants[J]. Chem Biodivers, 2011, 8(6): 976-1010.
- [7] HAN J J. Chemical constituents and pharmacological activities of *Lycii* Cortex[J]. Drugs Clin(现代药物与临床), 2010, 25(3): 172-176.
- [8] JIANG G D, TAKASE M, AIHARA Y, et al. Inhibitory activities of kukoamines A and B from *Lycii* Cortex on amyloid aggregation related to Alzheimer's disease and type 2 diabetes[J]. J Nat Med, 2020, 74(1): 247-251.
- [9] HU X L, GAO L Y, NIU Y X, et al. Neuroprotection by Kukoamine A against oxidative stress may involve N-methyl-D-aspartate receptors[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(2): 287-298.
- [10] LIU J, JIANG X W, ZHANG Q, et al. Neuroprotective effects of Kukoamine A against cerebral ischemia via antioxidant and inactivation of apoptosis pathway[J]. Neurochem Int, 2017(107): 191-197.
- [11] ZHANG Y Q, CHENG Z H, WANG C L, et al. Neuroprotective effects of kukoamine a against radiation-induced rat brain injury through inhibition of oxidative stress and neuronal apoptosis[J]. Neurochem Res, 2016, 41(10): 2549-2558.
- [12] ZHANG Y Q, GAO L Y, CHENG Z H, et al. Kukoamine A prevents radiation-induced neuroinflammation and preserves hippocampal neurogenesis in rats by inhibiting activation of NF- $\kappa$ B and AP-1[J]. Neurotox Res, 2017, 31(2): 259-268.
- [13] HU X L, SONG Q, LI X, et al. Neuroprotective effects of Kukoamine A on neurotoxin-induced Parkinson's model through apoptosis inhibition and autophagy enhancement[J]. Neuropharmacology, 2017(117): 352-363.
- [14] WU H, PENG Y, SUN J G, et al. Application and development of in vitro metabolism study at early drug discovery stage[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2013, 48(7): 1071-1079.
- [15] LI G L, ZHANG W P, WU C Q, et al. Progress in research on drug metabolism in juvenile animals[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(4): 329-336.
- [16] XIANG Y L, FANG P F. Advance in hepatotoxicity biomarkers based on pharmacometabolomics[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2020, 39(11): 641-646.

收稿日期: 2022-01-18

(本文责编: 李艳芳)