

去甲异波尔定及其代谢产物的药动学与生物利用度研究

陈建忠^{1,2}, 俞桂新^{1,3*}, 王长虹¹, 王峥涛^{1,3} (1.上海中医药大学教育部中药标准化重点实验室, 上海 201203; 2.福建中医药大学药学院, 福州 350122; 3.上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

摘要: 目的 研究去甲异波尔定静脉注射和灌胃给药后, 其原型药物和主要代谢物去甲异波尔定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷在大鼠体内的药动学特征和生物利用度。方法 以 SD 大鼠为模型动物, 采用超高效液相色谱质谱检测法测定去甲异波尔定及其葡萄糖醛酸苷的血药浓度, 并计算药动学参数。结果 去甲异波尔定及其葡萄糖醛酸苷的绝对生物利用度分别为 2.77% 和 88.6%。大鼠静脉注射给药后, 去甲异波尔定及其葡萄糖醛酸苷的药动学参数 $t_{1/2}$ 分别为 (42.16 $\pm$ 36.56) 和 (275.26 $\pm$ 176.89) min, AUC_{0-t} 分别为 (55.25 $\pm$ 22.97) 和 (584.57 $\pm$ 216.18) $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$, k_e 分别为 (0.024 9 $\pm$ 0.012 9) 和 (0.003 7 $\pm$ 0.002 4) min^{-1} 。大鼠灌胃给药后, 去甲异波尔定及其葡萄糖醛酸苷的药动学参数 $C_{\max}$ 分别为 (0.14 $\pm$ 0.03) 和 (13.80 $\pm$ 1.46) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $T_{\max}$ 分别为 (23.33 $\pm$ 13.29) 和 (45.00 $\pm$ 9.49) min, $t_{1/2}$ 分别为 (30.20 $\pm$ 11.04) 和 (313.79 $\pm$ 181.20) min, AUC_{0-t} 分别为 (9.17 $\pm$ 2.44) 和 (3 108.69 $\pm$ 299.45) $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$, k_e 分别为 (0.025 2 $\pm$ 0.007 6) 和 (0.002 7 $\pm$ 0.001 0) min^{-1} 。统计学检验表明, 静脉注射和灌胃给药后去甲异波尔定及其葡萄糖醛酸苷的 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 、 $T_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 k_e 和 MRT 之间均有显著性差异 ($P<0.05$)。结论 去甲异波尔定在体内生物转化迅速且生物利用度低。与原型药物相比, 去甲异波尔定葡萄糖醛酸苷在体内的血药浓度较高且消除缓慢。

关键词: 去甲异波尔定; 代谢产物; 药动学; 生物利用度; 乌药

中图分类号: R945.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)06-0473-05

Pharmacokinetics and Bioavailability of Norisoboldine and its Metabolite in Rats

CHEN Jianzhong^{1,2}, CHOU Guixin^{1,3*}, WANG Changhong¹, WANG Zhengtao^{1,3} (1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 3. Shanghai R & D Centre for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the *in vivo* pharmacokinetic properties and bioavailability of norisoboldine and its major metabolite in rats after intravenous and oral administration. **METHODS** A UPLC-MS method was used to determine the plasma concentrations of norisoboldine and norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide in rats plasma. The pharmacokinetic parameters were calculated with PK solution software. **RESULTS** The absolute bioavailabilities for norisoboldine and norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide were 2.77% and 88.6%, respectively. After intravenous injection of norisoboldine, the main pharmacokinetic parameters of norisoboldine and norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide were as follows: $t_{1/2}$ (42.16 $\pm$ 36.56) and (275.26 $\pm$ 176.89) min, AUC_{0-t} (55.25 $\pm$ 22.97) and (584.57 $\pm$ 216.18) $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$, k_e (0.024 9 $\pm$ 0.012 9) and (0.003 7 $\pm$ 0.002 4) min^{-1} , respectively. Their major pharmacokinetic parameters after oral administration were as follows: $C_{\max}$ (0.14 $\pm$ 0.03) and (13.80 $\pm$ 1.46) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $T_{\max}$ (3.33 $\pm$ 13.29) and (45.00 $\pm$ 9.49) min, $t_{1/2}$ (30.20 $\pm$ 11.04) and (313.79 $\pm$ 181.20) min, AUC_{0-t} (9.17 $\pm$ 2.44) and (3 108.69 $\pm$ 299.45) $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$, k_e (0.025 2 $\pm$ 0.007 6) and (0.002 7 $\pm$ 0.001 0) min^{-1} , respectively. There were significant differences between oral and intravenous administration in $t_{1/2}$, AUC_{0-t} , $T_{\max}$, $C_{\max}$, k_e and MRT ($P<0.05$). **CONCLUSION** The absolute bioavailability for norisoboldine was poor in rats. Norisoboldine could be quickly biotransformed into norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide, a major metabolite of parent drug *in vivo*, and the plasma concentration of norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide was considerably higher than that of the parent drug.

KEY WORDS: norisoboldine; metabolite; pharmacokinetics; bioavailability; Linderae Radix

基金项目: 国家重大新药创制专项(2009ZX09103-374); 国家自然科学基金项目(81102882); 上海市科委中药现代化专项(09dz1972100)

作者简介: 陈建忠, 男, 博士, 讲师 Tel: (0591)22861135 E-mail: chenjj1977@126.com *通信作者: 俞桂新, 男, 教授, 博导 Tel: (021)50271706 E-mail: chouguxin@yahoo.com.cn

乌药为樟科山胡椒属植物乌药 *Lindera aggregata*(Sims)Kosterm.的干燥块根,是我国常用中药之一^[1]。化学成分研究表明乌药含有多种异喹啉类生物碱^[2-3],且具有抗类风湿性关节炎的作用,如乌药总碱口服给药能显著抑制大鼠佐剂性关节炎、小鼠胶原关节炎,并能显著抑制刀豆蛋白 A 引起的小鼠脾淋巴细胞增殖,脂多糖所致小鼠腹腔巨噬细胞释放一氧化氮(NO)和白细胞介素-1(IL-1)^[4-5]。其中去甲异波尔多定在乌药总碱中的含量为 37.8%,并且具有与乌药总碱类似的药理作用^[6]。因此,去甲异波尔多定被认为是主要的药效成分之一。笔者前期实验表明,去甲异波尔多定在大鼠体内发生广泛的药物代谢。经质谱和核磁共振分析鉴定,共发现了 5 种代谢产物,其中去甲异波尔多定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷是其最主要的代谢产物^[7]。同时笔者采用 UPLC-MS 法,建立了血浆中去甲异波尔多定和去甲异波尔多定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷的含量测定方法^[8]。本实验在前期研究基础上,利用所建立的 UPLC-MS 法,进一步研究大鼠静脉和灌胃给药后去甲异波尔多定及其代谢产物(去甲异波尔多定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷)在体内的药动学特征及生物利用度,为其剂型研究、新药开发和临床应用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 试药与动物

去甲异波尔多定(批号:20080210)和青藤碱(内标物,批号:20080320)由上海中药标准化研究中心提供(纯度>99%);去甲异波尔多定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷由本实验室从 4 L 大鼠尿液中,通过反复 MCI Gel CHP20P 柱色谱、反相柱色谱和半制备液相色谱等步骤制备获得(纯度>99%)^[7];乙腈、甲醇和甲酸由德国默克公司提供(色谱纯),水为自制重蒸水,其余溶剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠,♀ ♂ 各半,体质量 170~220 g,由上海中医药大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:SCXK(沪)2008-0016。

1.2 实验仪器

Waters ZQ-2000 UPLC-MS/超高效液相色谱质谱联用仪,包括自动进样器、输液泵、脱气机、单重四级杆质谱检测器等(美国 Waters 公司);HGC-24A 氮吹仪(天津恒奥科技发展有限公司);Avanti J-25I 离心机(Beckman Coulter Inc.)。

2 方法

2.1 给药方案与血样采集

2.1.1 静脉注射给药 健康 SD 大鼠 6 只,♀ ♂ 各半,给药前禁食 12 h,自由饮水。尾静脉注射去甲异波尔多定溶液,给药剂量为 10 mg·kg⁻¹,给药体积为 1.72 mL·kg⁻¹,于给药前及给药后 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 480, 720, 1 440 min 经眼眶后静脉丛取血约 0.3 mL,置涂有肝素的离心管中,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后分离血浆,置于-20 °C 冰箱中保存,直至分析。

2.1.2 灌胃给药 健康 SD 大鼠 6 只,♀ ♂ 各半,给药前禁食 12 h,自由饮水。灌胃给予去甲异波尔多定溶液,给药剂量为 60 mg·kg⁻¹,给药体积为 15 mL·kg⁻¹,其余步骤同上。

2.2 血浆中去甲异波尔多定及其代谢物浓度测定

2.2.1 色谱和质谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μ m);流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B),梯度洗脱(时间/A%): 0~2 min, 5%→18.5%, 2~2.5 min, 18.5%→95%, 2.5~4.5 min, 95%, 4.5~6 min, 5%。流速为 0.5 mL·min⁻¹;柱温为 45 °C;进样体积为 5 μ L。

质谱参数:电喷雾离子化源(ESI);毛细管电压:2.8 kV;锥孔电压:35 V;离子源温度:120 °C;去溶剂温度:350 °C;去溶剂气体流速:500 L·h⁻¹;锥孔气体流速:50 L·h⁻¹。检测方式:正离子模式检测;扫描方式为选择离子反应检测(SIR)模式;用于定量分析的目标离子均为质子化的准分子离子峰[M+H]⁺, m/z 314(去甲异波尔多定), m/z 490(去甲异波尔多定-9-O- α -葡萄糖醛酸苷), m/z 330(青藤碱,内标)。

2.2.2 血浆样品预处理 取大鼠血浆 100 μ L,补加 100 μ L 甲醇,再加入 400 μ L 的甲醇(含内标 6.25 ng·mL⁻¹)沉淀蛋白,涡旋 1 min,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 550 μ L,置于另一干净 1.5 mL 离心管,于 50 °C 氮气流下吹干,残留物用 100 μ L 0.1%甲酸溶液复溶,涡旋振荡 1 min,13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后,吸取上清液 5 μ L 进行 UPLC-MS 分析。

2.2.3 标准溶液的制备与测定 取大鼠空白血浆 100 μ L,依次加入适量去甲异波尔多定及其代谢物标准溶液,配制成相当于大鼠血浆中去甲异波尔多定及其代谢物的浓度分别为 0.01/0.025、0.02/0.05、0.05/0.5、0.1/1.0、0.2/2.5、0.5/5.0、1.0/10、2.0/25

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 其余步骤按“2.2.2”项下方法操作, 以待测物浓度为横坐标, 待测物与内标峰面积比值为纵坐标, 建立标准曲线, 用加权($1/C^2$)最小二乘法进行线性回归运算, 求得直线回归方程, 即为标准曲线。去甲异波尔定及其代谢物的回归方程分别: $Y=0.4501X+0.0023(r=0.9980)$; $Y=0.2195X+0.0007(r=0.9951)$; 它们的线性范围分别为 $0.01\sim 2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.025\sim 25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 定量限分别为: $10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.4 质控样品的制备与测定 按“2.2.3”项下方法分别配制去甲异波尔定及其代谢物的低、中、高 3 个大鼠血浆药物浓度($0.02/0.05$ 、 $0.2/2.5$ 和 $2.0/25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的质量控制样品(QC), 每个浓度平行 2 份, 均匀分布在未知样品中, 并与标准曲线同时进行。根据当日标准曲线计算 QC 样品的浓度, 与配制浓度对比, 以保证该批样品测定结果的可靠性。

2.2.5 数据处理 采用 PK solution 2™ 药动学软件(Summit Research Service, USA), 利用非房室模型计算给药后的药动学参数, 实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。统计学分析用 t 检验和 SPSS 方差分析, $P<0.05$ 有统计学意义。

3 结果与讨论

3.1 分析方法的适应性

笔者前期建立了 UPLC-MS 测定血浆中去甲异波尔定和代谢物去甲异波尔定-9- O - α -葡萄糖醛酸苷浓度的方法, 该方法分离度好、灵敏度高, 耐受性好, 操作简便和分析时间短, 为本次去甲异波尔定的体内药动学研究奠定了坚实的基础^[8]。同时在本实验中每批血浆样品测定时均建立新的标准曲线和随行均匀分布在未知样品中的去甲异波尔定和代谢物的低、中、高 3 个浓度($0.02/0.05$ 、 $0.2/2.5$ 和 $2.0/25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的平行双份质控样品, 以保证每批样品测定结果的可靠性。

3.2 静脉注射给药后药动学特征

大鼠静脉注射给药后, 血浆中去甲异波尔定的浓度迅速下降, 在 120 min 后血药浓度低于定量限($10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 结果见图 1。同时注射给药 5 min 后, 血浆中立即可以检测到代谢物去甲异波尔定-9- O - α -葡萄糖醛酸苷, 而且去甲异波尔定-9- O - α -葡萄糖醛酸苷的血药浓度远高于去甲异波尔定的血药浓度, 这说明去甲异波尔定在体内生物转化非常迅速, 结果见图 2。与原型药物相比, 去甲

异波尔定-9- O - α -葡萄糖醛酸苷的在体内的消除比较缓慢, 在 12 h 后血药浓度才低于定量限($25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

大鼠静脉注射给药后, 血药浓度数据经 PK solution 2™ 软件按非房室模型处理, 药动学参数见表 1。比较去甲异波尔定和去甲异波尔定-9- O - α -葡萄糖醛酸苷的药动学参数, 并进行统计学检验。结果表明静脉注射后, 去甲异波尔定和去甲异波尔定-9- O - α -葡萄糖醛酸苷的药动参数 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 、 k_e 和 MRT 之间差异有统计学意义($P<0.05$)。根据去甲异波尔定在大鼠肝微粒体中的代谢清除率推算, 去甲异波尔定在大鼠肝脏的清除率为 $59.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 占大鼠静脉给药后总清除率的 31.9%。因此, 肝脏代谢是去甲异波尔定体内清除的一条重要途径。

3.3 灌胃给药后药动学特征

大鼠灌胃给药后, 去甲异波尔定迅速吸收, 5 min 后就可以检测到, 23 min 达到最大血药浓度, 随后也迅速消除, 120 min 后血药浓度低于定量限, 结果见图 1。与静脉注射给药一样, 大鼠灌胃给药 5 min 后, 大鼠血浆中立即可以检测到去甲异波尔定-9- O - α -葡萄糖醛酸苷, 而且血药浓度也是大大高于去甲异波尔定原型药物的血药浓度, 因此不容忽视。与原型药物相比, 去甲异波尔定-9- O - α -葡萄糖醛酸苷的在体内的消除比较缓慢, 在 24 h 后血药浓度才低于定量限($25\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)。这说明去甲异波尔定吸收快速而且存在着明显的首过效应, 结果见图 2。

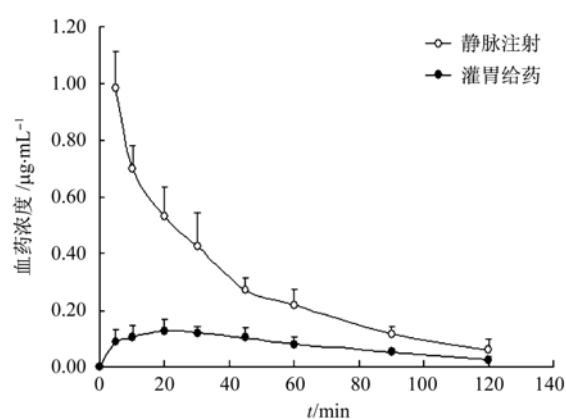


图 1 大鼠静脉注射($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和灌胃给药($60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后去甲异波尔定的平均药时曲线($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Fig 1 Mean plasma concentration-time profile of norisoboldine after a single intravenous and oral administration of 10 and $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ norisoboldine ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

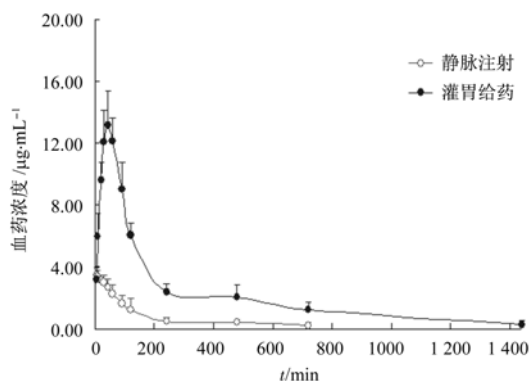


图2 大鼠静脉注射($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和灌胃给药($60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)后去甲异波定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷的平均药时曲线($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Fig 2 Mean plasma concentration-time profile of norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide after a single intravenous and oral administration of 10 and 60 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ norisoboldine($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

表1 大鼠静脉注射($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和灌胃给药($60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)去甲异波定后去甲异波定和去甲异波定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷的主要药动学参数($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of norisoboldine and norisoboldine-9-*O*- α -glucuronide in rats after a single intravenous and oral administration of norisoboldine($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

药动学参数	静脉给药		灌胃给药	
	去甲异波定	去甲异波定-9- <i>O</i> - α -葡萄糖醛酸苷	去甲异波定	去甲异波定-9- <i>O</i> - α -葡萄糖醛酸苷
$C_{\max}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	—	—	$0.14\pm 0.03^{1)}$	$13.80\pm 1.46^{1)}$
$T_{\max}/\text{min}$	—	—	$23.33\pm 13.29^{1)}$	$45.00\pm 9.49^{1)}$
k_a/min^{-1}	—	—	0.07 ± 0.03	0.01 ± 0.01
$T_{1/2}/\text{min}$	$42.16\pm 36.56^{1)}$	$275.26\pm 176.89^{1)}$	$30.20\pm 11.04^{1)}$	$313.79\pm 181.20^{1)}$
k_e/min^{-1}	$0.0249\pm 0.0129^{1)}$	$0.0037\pm 0.0024^{1)}$	$0.0252\pm 0.0076^{1)}$	$0.0027\pm 0.0010^{1)}$
$\text{AUC}_{0-t}/\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	$55.25\pm 22.97^{1)}$	$584.57\pm 216.18^{1)}$	$9.17\pm 2.44^{1)}$	$3108.69\pm 299.45^{1)}$
$\text{AUC}_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	$60.64\pm 22.45^{1)}$	$704.75\pm 317.89^{1)}$	$10.34\pm 3.01^{1)}$	$3295.73\pm 585.51^{1)}$
MRT/min	$43.38\pm 36.63^{1)}$	$324.45\pm 193.15^{1)}$	$60.43\pm 9.16^{1)}$	$407.10\pm 198.15^{1)}$
$\text{VdL}\cdot\text{kg}^{-1}$	10.67 ± 8.02	5.38 ± 1.87	257.68 ± 69.58	7.90 ± 2.99
$\text{CL}/\text{mL}\cdot\text{min}\cdot\text{kg}^{-1}$	186.04 ± 70.26	17.03 ± 7.61	6300.65 ± 2101.23	18.61 ± 2.74
F	—	—	2.77%	88.6%

注：与去甲异波定比较，¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with norisoboldine, ¹⁾ $P<0.05$

综上所述，无论是静脉注射还是灌胃给药，大鼠血浆中去甲异波定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷的血药浓度均明显高于原型药物的血药浓度；而且去甲异波定-9-*O*- α -葡萄糖醛酸苷的消除速度明显慢于原型药物，它们的药动学参数具有显著性差异。因此有必要进一步对该代谢物的药理学、药效学性质进行考察，并比较其活性差异，以期阐明真正的药效成分。

REFERENCES

[1] Ch.P(2010) Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 71-72.

[2] CHOU G X, NORIO N, MA C M, et al. Isoquinoline alkaloids from *Lindera aggregate* [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2005, 3(5): 272-275.

[3] GAN L S, ZHAO X, YAO W, et al. A novel bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Lindera aggregate* [J]. J Chem Res, 2008, 2008(5): 285-286.

[4] WANG C, DAI Y, CHOU G X, et al. Effects of total alkaloids from *Radix Linderae* on adjuvant-induced arthritis in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中国药理与临床), 2006, 22(3/4): 63-66.

[5] WANG C, DAI Y, YANG J, et al. Treatment with total alkaloids from *Radix Linderae* reduces inflammation and joint destruction in type II collagen-induced model for rheumatoid arthritis [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 111(2): 322-328.

[6] LUO Y B, LIU M, XIA Y, et al. Therapeutic effect of norisoboldine, an alkaloids isolated from *Radix Linderae*, on collagen-induced arthritis in mice [J]. Phytomedicine, 2010,

17(10): 726-731.

- [7] CHEN J Z, CHOU G X, WANG C H, et al. Characterization of new metabolites from *in vivo* biotransformation of norisoboldine by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(5): 687-693.

- [8] CHEN J Z, XU Y, CHOU G X, et al. Simultaneous determination of norisoboldine and its major metabolite in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study [J]. Biomed Chromatogr, 2011, 25(3): 367-372.

收稿日期: 2011-10-17