

- [16] YU X X, YI Y, ZHOU N. Rapid determination of icariin and epimedin C in epimedium by near infrared spectroscopy [J]. Chin J Spectrosc Lab(光谱实验室), 2012, 29(3): 1379-1383.
- [17] LI J C, XIAO W, SUN L. Rapid analysis of paeoniae radix alba by near infrared spectroscopy [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(6): 57-60.
- [18] YANG X, YANG R R, LUO D Q. The construction and application of baical skullcup roofs quantitative model by near infrared diffuse reflectance spectrometry [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2010, 25(3): 184-186.
- [19] ZHANG L, QIU F P, YU J. Modern near-infrared spectroscopic techniques [J]. Changchun Univ Technol: Nat Sci(长春工业大学学报: 自然科学版), 2003, 24(4): 23-25.

收稿日期: 2014-05-19

积雪草酸大鼠体内药动学考察

张雅雯¹, 尹丽娜¹, 梁泽华², 吴斌丽^{1,2}, 朱亮^{1,2}, 黄夏樱¹, 王胜浩^{1*} (1.浙江省医学科学院, 杭州 310013; 2.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要: 目的 建立大鼠血浆中积雪草酸(asiatic acid, AA)的柱前衍生化 HPLC, 探讨 AA 在大鼠体内的药动学。方法 SD 大鼠, ♂, 尾静脉注射 AA(10 mg·kg⁻¹), 于给药后不同时间采取血浆, 经 DIKMA Proelut PLS 柱固相萃取, 柱前衍生化 HPLC 测定血浆中 AA 浓度(以甘草次酸为内标), 药物统计软件(PKS 1.0)拟合统计药动学参数。结果 血药浓度在 0.1~20 μg·mL⁻¹ 内线性良好($r=0.999\ 6$), 平均提取回收率为 71.1~79.9%, 日内、日间精密度 RSD 均 <13%, 样品在 -20 °C 放置, 经 2 次冻融循环后基本稳定。AA 在大鼠体内药-时曲线符合一室开放模型, 主要药动学参数为: $t_{\max}=2.0$ min, $C_{\max}=14.7$ μg·mL⁻¹, $t_{1/2}=35.1$ min, $AUC_{0-t}=217.0$ μg·min·mL⁻¹, $AUC_{0-\infty}=234.3$ μg·min·mL⁻¹。结论 AA 在大鼠体内消除迅速, 所建立的提取及柱前衍生化 HPLC 适用于体内 AA 的测定。

关键词: 积雪草酸; 血药浓度; 固相萃取; 一室模型

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)03-0314-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.03.015

Study on Pharmacokinetics of Asiatic Acid in Rats

ZHANG Yawen¹, YIN Lina¹, LIANG Zehua², WU Binli^{1,2}, ZHU Liang^{1,2}, HUANG Xiaying¹, WANG Shenghao^{1*} (1.Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2.Department of Pharmacy, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a sensitive precolumn derivatization HPLC method for determination of plasma concentration of asiatic acid(AA) and evaluate its pharmacokinetics characteristics in rats. **METHODS** The male SD rats were intravenously administrated AA by 10mg·kg⁻¹. The plasma samples were taken at different times, concentrated by SPE method and determined by precolumn derivatization RP-HPLC method, the glycyrrhetic acid was used as an internal standard. The pharmacokinetic parameters were accessed by PKS 1.0. **RESULTS** Excellent liner relationship was obtained in the range of 0.1 to 20 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 6$). The averang extraction recovery was 71.1%~79.9%. The intra- and inter-day RSDs were less than 13%. The samples were stabled at -20 °C, and remained stable after twice freeze-thaw cycles. AA was fitted to a one compartment open model in rats, mainly pharmacokinetic parameters as follow: $t_{\max}=2.0$ min, $C_{\max}=14.7$ μg·mL⁻¹, $t_{1/2}=35.1$ min, $AUC_{0-t}=217.0$ μg·min·mL⁻¹, $AUC_{0-\infty}=234.3$ μg·min·mL⁻¹. **CONCLUSION** AA is disposed extensively and rapidly in rats. The method can be used to determine the concentration and to investigate the pharmacokinetics of AA in rats.

KEY WORDS: asiatic acid; plasma concentration; solid phase extraction; one compartment model

积雪草酸(asiatic acid, AA)为伞形科植物积雪草(*Centella asiatica* L. Urban)中含量较高的乌苏烷

型五环三萜酸, 具有治疗皮肤创伤、抗炎、护肝、抗肿瘤等多种药理作用^[1-3]。1971 年首次报道了采

基金项目: 浙江省科技厅项目(2011F10048); 浙江省新世纪 151 人才工程(第二层次); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目(2008); 浙江省医学重点学科群建设资助项目(XKQ-010-001)

作者简介: 张雅雯, 女, 硕士生 Tel: (0571)88215622 E-mail: zyw.25@163.com *通信作者: 王胜浩, 男, 博士, 研究员 Tel: (0571)88215622 E-mail: wshenghao@yahoo.com

用同位素标记法追踪测定 AA 静脉给药后的代谢途径及血药浓度^[4],但此法测得的血药浓度专属性不强,后续虽有口服积雪草提取物(50%乙醇的 AA 提取物,含量为 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)^[5]、积雪草苷以及积雪草总苷提取物的血药浓度检测报道^[6-10],涉及的检测设备包括液质和气质联用^[5,10],但至今仍无 AA 静脉给药后的药动学报道。

积雪草酸仅在短波长(约 200 nm)有较大吸收,且口服生物利用度低,代谢较快,体内药物浓度低,这给体内药物分析带来一定困难。为考察 AA 的体内特性,本实验建立了固相柱萃取结合柱前衍生化 HPLC 于 248 nm 处测定 AA 血药浓度,并以此方法进行了大鼠体内药动学研究,经药物统计软件(PKS 1.0)计算其药动学参数。研究结果可为类似中药成分的体内药动学研究提供借鉴。

1 仪器、试剂及动物

1.1 仪器与试剂

岛津 LC-20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司, PDA 检测器, SIL-20A 全自动进样器); Anke TGL-16C 离心机(上海安亭科学仪器厂); Agilent 液质联用(美国 Agilent 公司, LC: 1100 系列, MS: LCQ advantage); LGJ-10D 冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司); AA(广西昌洲天然产物开发有限公司, 批号: 20080625, 色谱纯度>99%); 甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA, 上海晨易生物科技有限公司, 批号: 200600509, 色谱纯度约 99%); 对甲苯胺(中国上海亭新化工试剂厂, 批号: 20090101, 分析纯); 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCl, 上海共价化学科技有限公司, 分析纯); 甲醇、乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

1.2 动物

清洁级 SD 大鼠, ♂, 体质量: 180~220 g, 由浙江省医学科学院实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(浙)20080033。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)(DIKMA); 流动相: 甲醇-乙腈=1:1(A), 水(B), 梯度洗脱(0~12 min, 29%B; 12~28 min, 14%→29%B, 28~34 min, 29%B); 流速: $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 35 °C; 检测波长: 248 nm;

进样量: 20 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 AA 50 mg 至 50 mL 量瓶, 加甲醇溶解并定容至刻度, 得 AA 储备液($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); 精密称取内标 GA 50 mg 至 50 mL 量瓶, 加甲醇溶解并定容至刻度, 得 GA 储备液($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 4 °C 保存, 3 个月内稳定。

精密移取 GA 储备液 1 mL 至 50 mL 量瓶, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀得 GA 内标溶液(I.S, $20.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 分别精密移取 AA 储备液适量和内标 20 μL 至干燥试管中, 室温下氮气吹干, 残渣用 0.25 mL 空白血浆混合均匀, 最终制成 AA 浓度为 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列溶液。质控样品(0.5, 2.5, 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 同法制备。

2.3 血浆样品的固相萃取与衍生化

精密移取内标 20 μL 至干燥试管中, 氮气吹干, 残渣用 0.25 mL 血浆样品混合均匀, 加入 KCl/HCl 缓冲液($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 1.5)1 mL, 涡旋 5 min, 超声 5 min, 上样。依次以 KCl/HCl 缓冲液($0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 1.5)、30%甲醇、55%甲醇(含 2%冰醋酸)、60%甲醇、甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 氮气下吹干, 参照实验室已建立的衍生化技术进行柱前衍生化^[6]。

2.4 药动学试验

2.4.1 大鼠静脉给药体内评价 取 SD 大鼠, ♂, 6 只, 实验前禁食 24 h, 自由饮水。以 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 尾静脉注射 AA 溶液(以 DMSO 为溶剂, 药物浓度为 $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。给药后不同时间(2, 5, 10, 15, 30, 60, 120 min)尾静脉采血 0.5 mL, 离心后取 0.25 mL 血浆, 按“2.3”项下方法操作, 测定血浆中药物浓度。

2.4.2 药动学数据分析^[4] 利用药物统计软件(PKS 1.0, Shanghai Magnsoft Consulting)计算药动学参数。峰浓度(C_{max})和达峰时间(t_{max})为实测值; 血药浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-t})则通过梯形法计算得到。

3 结果

3.1 AA 和 GA 衍生化产物结构的初步确证

以 AA 和 GA 为原料, 分别加入对甲苯胺溶液和 EDC 溶液, 按“2.3”项下方法进行衍生化反应, 通过 HPLC 半制备柱的分离、收集、浓缩与冻干,

得到衍生化产物, 并进行质谱分析(离子源: ESI; 正、负离子检测模式; 碰撞气: 极高纯度氦气; 雾化气: 高纯度氮气; 毛细管电压: 3.5 kV; 雾化气压: 30 psi; 干燥气流速: 10 L·min⁻¹; 干燥器温度: 350 °C; 质量扫描范围: m/z 50~1 500)。结果显示 AA 衍生化产物检测到分子离子峰为 578.8 (M-H)和 1 177.5(2M+Na), GA 衍生化产物检测到的分子离子峰为 558.5(M-H)和 1 141.5(2M+Na), 推断为 AA 和 GA 分别与对甲苯胺失去一分子 H₂O 后的产物。

3.2 分析方法的验证

3.2.1 方法专属性 AA 的保留时间约为 15 min, 空白血浆的内源性物质对 AA 和 GA 均无干扰, 显示良好的专属性。结果见图 1。

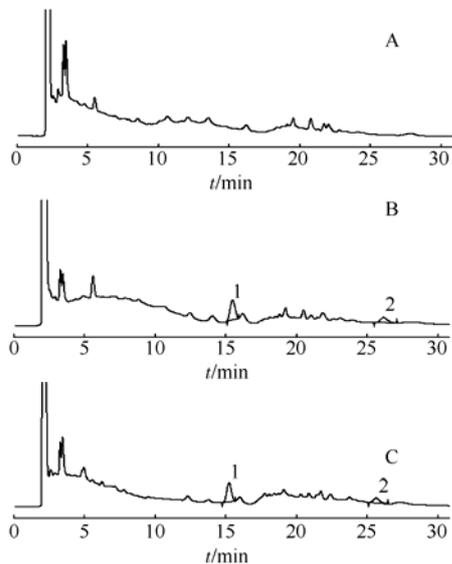


图 1 大鼠血浆中积雪草酸的色谱图
A-大鼠空白血浆; B-质控样品; C-大鼠静脉给药 AA 血浆样品 (10 min); 1-AA 衍生物; 2-GA 衍生物。

Fig. 1 Representative HPLC chromatograms of samples in rat plasma

A-blank rat plasma; B-sample of blank plasma spiked with AA and GA; C-rat plasma sample after intravenous administration of AA extract at 10 min spiked with GA; 1-AA derivative; 2-GA derivative.

3.2.2 线性范围 取 AA 浓度为 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液, 按“2.3”项下方法操作, 以药物与 GA 的峰高比值(Y)对 AA 浓度(C)进行线性回归。AA 浓度在 0.1~20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 线性关系良好, 回归方程为: $Y=0.443\ 6C-0.103\ 6$ ($r=0.999\ 6$)。方法的定量下限 (LLOQ)为 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (RSD=5.4%, $n=5$)。

3.2.3 精密度和回收率 取浓度为 0.5, 2.5, 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品($n=5$), 分别考察日内和日间精密度, 采用标准曲线求算, 该方法的日内精密度, 日间精密度均<13%, 方法回收率为 91.6%~110.7%, 结果见表 1。

3.2.4 提取回收率 分别取空白血浆 0.25 mL, 按“2.3”项下方法操作, 配成终浓度为 0.5, 2.5, 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的质控样品($n=5$), 通过比较相应浓度纯溶剂样品的峰高计算提取回收率, 平均提取回收率在 71.1%~79.9%之间, 内标回收率>80%。结果见表 1。

表 1 积雪草酸的精密度和提取回收率($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Precision, accuracy and recovery for assay of AA in rats plasma($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

| 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 提取回收率/% | | 方法回收率/% | 精密度 RSD/% | |
|---|----------|----------|-----------|-----------|------|
| | AA | GA | AA | 日内 | 日间 |
| 0.5 | 79.9±4.9 | 85.5±6.8 | 110.7±6.9 | 6.2 | 12.4 |
| 2.5 | 71.1±6.3 | 84.7±8.8 | 108.3±5.4 | 5.0 | 4.9 |
| 10.0 | 73.7±5.0 | 92.0±5.5 | 91.6±1.8 | 2.0 | 3.9 |

3.2.5 冻融稳定性试验 质控样品 (0.5, 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 冷冻(-20 °C) 保存, 分别冻融 0 次、冻融 1 次、冻融 2 次, 按“2.3”项下方法处理, 测定分析。低、高浓度质控样品的 RSD 分别为 10.5%和 3.8%, 显示 2 次冻融不影响样品的稳定性。

3.3 大鼠体内药动力学评价

SD 大鼠以 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 尾静脉注射 AA 溶液, 于给药后不同时间采血, 按“2.3”项下方法操作, 测定血浆中 AA 浓度, 平均血药浓度-时间曲线见图 2。

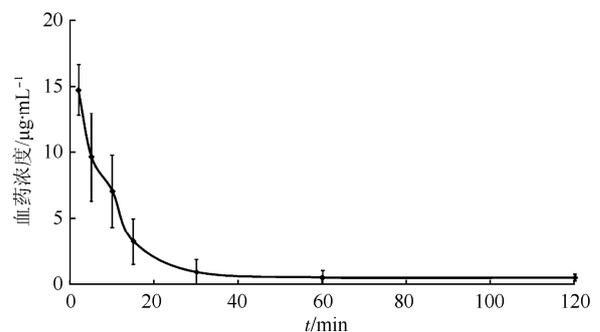


图 2 大鼠静脉给药 AA 后血药浓度-时间曲线($n=6$, $\bar{x}\pm s$)
Fig. 2 Plasma concentration-time curve of AA in rats after intravenous administration of asiatic acid($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

3.4 药动学数据计算

对 6 只 SD 大鼠进行尾静脉注射 AA 溶液的药动学研究, 所得数据用药物统计软件(PKS 1.0)拟合, 结果显示大鼠药-时曲线符合一室开放模型, 主要药动学参数为: $t_{\max}=2.0 \text{ min}$, $C_{\max}=14.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $t_{1/2}=35.1 \text{ min}$, $\text{AUC}_{0-t}=217.0 \mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}=234.3 \mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

4 讨论

积雪草总苷绝对生物利用度极低, 口服给药 ($150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 其生物利用度仅为 0.081%^[7]。积雪草苷口服后被肠道菌群代谢, 部分转化成苷元积雪草酸而吸收^[11], 且 AA 正是其发挥药效的主要物质基础^[9], 另有报道 AA 在 MDCK 细胞转运试验中, 通透系数(P_{eff})较积雪草苷明显高^[12], 提示 AA 具有较积雪草苷更好的肠道吸收转运潜力, 故本实验选择 AA 作为研究对象。

AA 静脉给药后 ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), 在大鼠体内呈一级动力学消除, $t_{1/2}=35.1 \text{ min}$, 提示药物消除速率较快。文献显示^[7], 大鼠静脉注射积雪草总苷 ($150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后, AA 的 $t_{1/2}$ 为 (3.75 ± 1.93)h, 远比本实验的 $t_{1/2}$ 长, Nair 等^[5]也有类似的报道 [$t_{1/2}=(4.69 \pm 1.40)$ h]。前者采用静脉注射积雪草总苷(其中 AA 含量 < 1%), 而后者口服给药积雪草 50% 乙醇提取物(主要成分为苷, AA 含量仅为 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), 两者所给服的药物, AA 含量均较低, 并以苷类成分为主, 这些积雪草苷类成分, 无论是静脉注射或口服给药, 均需经体内生物转化, 才能转化成 AA, 因而他们的 $t_{1/2}$ 也均比本实验的长。

对 SD 大鼠灌胃高浓度 AA ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 后, 发现其血药浓度低于定量限, 无法准确定量, 这与其口服吸收差有关。

固相柱是处理血浆样品比较经典的一种方法, 在早期研究中, 比较了不同固相柱(PLS 柱和 C_{18} 柱)的提取情况, 结果发现 PLS 柱的提取回收率较 C_{18} 柱高, 故选用了 PLS 柱进行处理。另外, 血浆样品上样前, 对加入的 KCl/HCl 缓冲液的 pH

值和离子强度进行比较, 发现当 pH 为 1.5、离子强度为 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时回收率最高, 其余条件下回收率 < 50%。

REFERENCES

- [1] CHEN J, HUA W Y, SUN H B. Advances in studies on biological activities of asiatic acid and its derivatives [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2006, 37(3): 458-460.
- [2] FENG X, GUO F F, ZHAO L, et al. Research progress on pharmacological effects of asiatic acid and its structural modification [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(7): 1037-1042.
- [3] KI Y L, OK-NAM B, SHELLEY W, et al. Neuroprotective effect of asiatic acid in rat model of focal embolic stroke [J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(8): 1397-1401.
- [4] CHASSEAUD L F, FRY B J, HAWKINS D R, et al. The metabolism of asiatic acid and asiaticoside in rat [J]. Arzneimittelforschung, 1971, 21(9):1379-1384.
- [5] NAIR S N, MENON S, SHAILAJAN S. A liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric method for quantification of asiatic acid from plasma: application to pharmacokinetic study in rats [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2012, 26(17): 1899-1908.
- [6] ZHENG X C, WANG S H. Determination of asiatic acid in beagle dog plasma after oral administration of Centella asiatica extract by precolumn derivatization RP-HPLC [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009, 877(5/6): 477-481.
- [7] OUYANG D W, XIAO F, QIN Y, et al. Determination of multi-constituents of centella total glucosides by LC-MS in rat plasma and their pharmacokinetics [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2014, 45(5):460-466.
- [8] RUSH W R, MURRAY G R, GRAHAM D J M. The comparative steady-state bioavailability of the active ingredients of madecassol [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1993, 18(4): 323-326.
- [9] GRIMALDI R, DE P F, D'ANGELO L, et al. Pharmacokinetics of the total triterpenic fraction of *Centella asiatica* after single and multiple administrations to healthy volunteers. A new assay for asiatic acid [J]. J Ethnopharmacol, 1990, 28(2): 235-241.
- [10] SHEN C Y, GU X C, WANG G Q, et al. Determination of asiatic acid in rat plasma by GC/MS [J]. J Chin Mass Spec Soc(质谱学报), 2006, 27(3):155-159.
- [11] WENG J, LYU Q J, TIAN Y, et al. Metabolism and transformation of asiaticoside by intestinal flora [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2006, 37(7): 1008-1011.
- [12] WENG J. Characterization of absorption and metabolism of asiaticoside and its analogs [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2006.

收稿日期: 2014-09-19