

· 药物动力学研究 ·

新藤黄酸在家兔体内的药代动力学研究

肖国丽¹, 赵学军¹, 刘卫海^{1,3}, 张 言¹, 赖小平^{1,3}, 赵爱国^{1,2,3} (1. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广东 广州 510006; 2. 清远医药集团, 广东 清远 511518; 3. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808)

摘要: **目的** 建立家兔血浆中新藤黄酸的 HPLC 测定法, 并研究其药代动力学。**方法** 家兔静脉注射新藤黄酸后于不同时间点取血, 经 HCl 酸化, 乙酸乙酯提取处理, 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱, 以乙腈-0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵-醋酸(80:20:0.1)为流动相; 柱温: 30 ℃, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 355 nm; 测定血浆中的新藤黄酸的浓度, 并用非房室模型估算药代动力学参数。**结果** 新藤黄酸在 0.518~266 mg·L⁻¹ 线性关系良好($r=0.9995$), 回收率大于 90%, 日内、日间精密度(RSD)均小于 15%, 其消除半衰期($t_{1/2}$)为 23.38 min, 分布容积(V)为 0.13 L·kg⁻¹, 药-时曲线下面积(AUC_{0-∞})为 1107.00 mg·min·L⁻¹。**结论** 该法可用于新藤黄酸的药代动力学研究, 新藤黄酸在家兔体内消除迅速, 滞留时间短。

关键词: 新藤黄酸; 高效液相色谱; 家兔; 药代动力学

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)01-0163-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.015

Pharmacokinetics of Neogambogic Acid in Rabbits

XIAO Guoli¹, ZHAO Xuejun¹, LIU Weihai^{1,3}, ZHANG Yan¹, LAI Xiaoping^{1,3}, ZHAO Aiguo^{1,2,3} (1. New Drug R&D Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Qingyuan Medicine Group, Qingyuan 511518 Guangdong, China; 3. Dongguan Mathematic and Theoretic Engineering Academy of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish a HPLC method for the measurement of neogambogic acid concentration in rabbit plasma, and to study the pharmacokinetics of neogambogic acid in rabbits. **Methods** The plasma samples were collected at different time after intravenous injection of single dose of neogambogic acid, and then were acidified with HCl, extracted with ethyl acetate and evaporated for dryness. The residuals were dissolved with mobile phase and injected into Phenomenex Luna C₁₈ column. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1 mol·L⁻¹ ammonium acetate-acetic acid(80:20:0.1), and was delivered at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The elute was detected at UV 355 nm. The column temperature was 30 ℃. The pharmacokinetic parameters were assessed with non-compartment model. **Results** The standard curve was linear in the range of 0.518~266 mg·L⁻¹ ($r=0.9995$), and the recovery of neogambogic acid was over 90%. The relative standard intra-day and inter-day deviation was less than 15%. The pharmacokinetic results showed that the drug was rapidly eliminated from plasma and elimination half life ($t_{1/2}$) was 23.38 min, the apparent volume of distribution was 0.13 L·kg⁻¹. The AUC_{0-∞} was 1107.00 mg·min·L⁻¹. **Conclusion** The established HPLC method is suitable for the pharmacokinetic study of neogambogic acid. The elimination of neogambogic acid is fast in rabbits, and the retention time is short.

Keywords: Neogambogic acid; HPLC; Rabbits; Pharmacokinetics

收稿日期: 2012-08-01

作者简介: 肖国丽, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药新产品开发。Email: xgl2010gz@hotmail.com。通讯作者: 赵爱国, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药理。Email: zaghy@hotmai.com。

基金项目: 广东省高等学校科技创新团队项目(06CXTD004); 广东省科技计划重点项目(2008A030101002); 东莞市科技计划高等院校和科研机构项目(2007108101080)。

藤黄(gamboge)为藤黄科植物藤黄 *Garcinia han-baryi* Hook.f.的树干被割伤后流出的胶状树脂^[1]。中医药记载藤黄具有破毒蚀疮、破血散结之功效。据文献报道^[2-3],藤黄对小鼠腹水型肝癌 ECA、ARS、S180、S37 等多种肿瘤有明显抑制作用,对体外培养的人癌细胞 BEL-7402 与 HeLa 细胞株也有程度不等的杀伤作用。新藤黄酸是从藤黄中分离提取的一种抗癌有效成分。新藤黄酸与藤黄酸相比具有作用强,毒性低、稳定性好和抗癌谱广等特点^[4],对 S180、Lewis 肺癌、Las795 肺腺癌等实体癌均有较好抑制作用,并有一定的选择性抗转移作用^[5],能诱导 A549 细胞凋亡,干预人非小细胞肺癌的发生发展,调控肿瘤组织 VEGF 和 COX-2 蛋白的表达^[6]。但有关新藤黄酸在动物体内的药动学研究报道较少,本实验采用 HPLC 法测定新藤黄酸在家兔血浆中的浓度,研究新藤黄酸在家兔体内的药动学,为该药的临床前研究和评价及今后的临床研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Shimadzu LC-20AT 高效液相色谱仪(配 SIL-20A 自动进样器,SPD-M20A 二极管阵列检测器,CTO-20A 柱温箱,Shimadzu LC Solution 色谱工作站),日本 Shimadzu 公司;CP225D 1/10 万电子天平,德国赛多利斯公司;D2251 型电子天平,广州正一科技有限公司;TLG-16C 型高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;实验室专用超纯水机,重庆利迪现代水技术设备有限公司。

1.2 药品及试剂 新藤黄酸对照品及新藤黄酸,广州中医药大学新药开发研究中心,纯度大于 98%,批号:20120313;戊巴比妥钠、肝素钠,广州瑞舒生物有限公司;乙腈,色谱纯,德国 Merck 公司;其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 健康合格新西兰家兔 6 只,体质量 1.8~2.6 kg,广州中医药大学实验动物中心,合格证号:SCXK(粤)2008-0020。

2 方法与结果

2.1 给药方法 健康家兔 6 只,给药前禁食不禁水 12 h。耳缘静脉一次性注射新藤黄酸 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.2 血样采集 家兔于给药前和给药后 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 150 min 以 1%戊巴比妥钠 $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉,颈动脉取血 2 mL,置于经肝素钠处理过的离心管中, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,分离血浆,置 -20°C 冷冻保存待分析。

2.3 色谱条件 Phenomenex Luna C_{18} 色谱柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$),流动相:乙腈- $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵-醋酸(80:20:0.1),流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;检测波长: 355 nm;柱温: 30°C ;进样量: $20 \mu\text{L}$ 。

2.4 新藤黄酸标准溶液的配制 精密称取新藤黄酸对照品 5.32 mg,用乙腈溶解并定容至 10 mL,摇匀,配成 $532 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液,于 4°C 保存。

2.5 血浆样品处理 取血浆样品 0.8 mL,加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 50 μL 和乙酸乙酯 4 mL,涡旋振荡 2 min, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 3.42 mL, 40°C 下空气吹干,残留物用 100 μL 流动相溶解,涡旋振荡 10 s, $13000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min 后取上清液 20 μL 进样。

2.6 血药浓度测定方法

2.6.1 专属性试验 取空白血浆、空白血浆加对照品、给药 5 min 后血浆样品按 2.5 项下方法处理测定,新藤黄酸对照品直接测定。由图 1 可见,新藤黄酸在 214, 355 nm 有最大吸收,但从 214 nm 处的吸收来看,在此处可能含有其他物质的吸收,很可能会干扰新藤黄酸的检测,所以选择 355 nm 作为新藤黄酸的检测波长。由图 2 可知,在选定色谱条件下,新藤黄酸的保留时间约为 13.2 min,血浆中的内源性杂质峰均在此之前出现,不干扰新藤黄酸的测定,给药后也未见代谢物干扰。

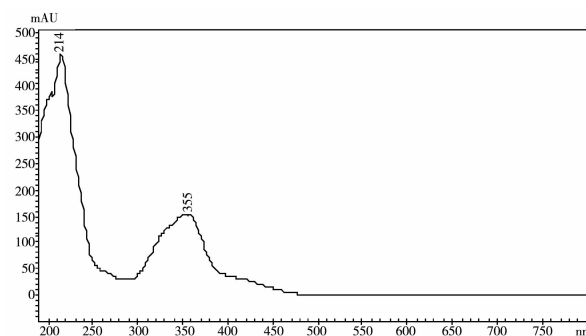


图1 新藤黄酸紫外光谱图

Figure 1 UV spectrogram of neogambogic acid

2.6.2 标准曲线、线性范围和最低检测浓度 取新藤黄酸储备液适量及空白血浆,通过稀释法制成质量浓度为 0.518, 1.037, 8.31, 33.25, 66.5, 133, 266 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的新藤黄酸血浆样品,按 2.5 项下方法处理进样,所得数据以血浆中新藤黄酸的浓度 X 对新藤黄酸的峰面积 Y 用加权最小二乘法进行线性回归($W=1/X^2$),得血浆中新藤黄酸的平均标准曲线 $Y=1.107 \times 10^4 X - 1.843 \times 10^3 (n=3)$, $r=0.9995$ 。结果表明,新藤黄酸在 0.518~266 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好,最低检测浓度为 0.258 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6.3 精密度和回收率 取新藤黄酸储备液适量及

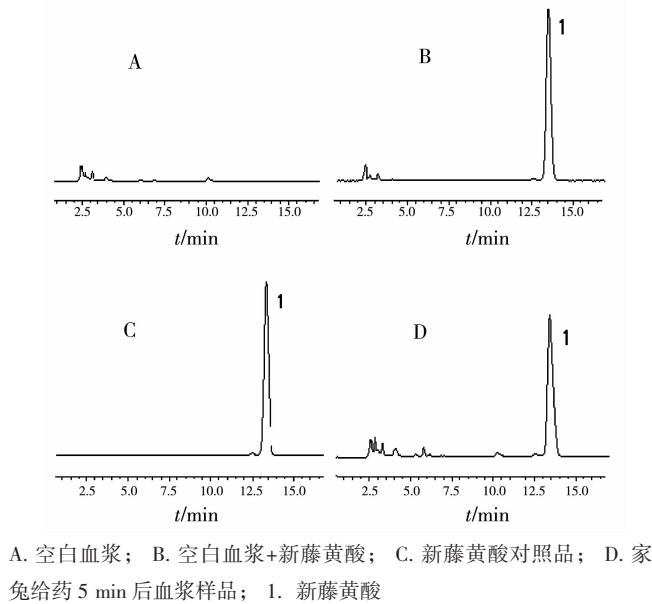


图2 新藤黄酸 HPLC 图

Figure 2 HPLC chromatograms of neogambogic acid

空白血浆，制成高、中、低 3 种不同浓度（1.037，8.13，33.25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ）质控样品，每种浓度平行做 5 份，按 2.5 项下方法处理测定，以当日的标准曲线计算新藤黄酸浓度，求得该方法的日内、日间精密度及回收率，结果见表 1。

表 1 精密度及回收率测定 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Recovery and precision for the analysis of neogambogic acid in plasma

加入量 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	日内		日间		回收率/%
	测得量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	测得量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	
1.037	0.96±0.08	8.64	1.04±0.13	12.10	92.26
8.13	7.97±0.73	9.14	8.04±0.88	11.00	95.88
33.25	30.7±2.9	9.43	31.71±2.72	8.57	92.32

2.6.4 冻融稳定性 高、中、低 3 个不同浓度质控样品，置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存 24 h 后，室温融化，再冷冻，连续 3 次，处理后进样测定，结果 RSD 均小于 7%，表明样品冻融稳定性良好。

2.7 血药浓度测定 6 只家兔单次静注新藤黄酸 $4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后的血浆按 2.5 项下方法处理测定，以新藤黄酸的峰面积代入标准曲线计算血药浓度，作平均血药浓度-时间曲线，见图 3。

2.8 药动学参数 用 DAS 2.1.1 药代动力学程序处理血药浓度数据，用非房室模型估算药代动力学参数，数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，其结果见表 2。

3 讨论

有文献报道，运用甲醇-0.1%磷酸(9:1)^[7]和甲

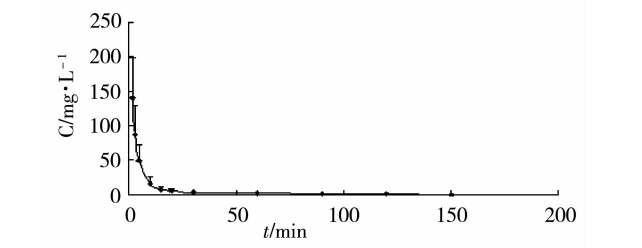


图3 家兔静注新藤黄酸后的平均血药浓度-时间曲线

Figure 3 Mean plasma drug concentration-time profile of neogambogic acid in rabbits after single intravenous administration

表 2 静注新藤黄酸后在家兔体内的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of neogambogic acid following intravenous injection of $4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in rabbits

参数	结果
$t_{1/2}/\text{min}$	23.38±17.40
$V/\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.13±0.12
$CL/\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	0.005±0.003
$\text{MRT}_{0-4}/\text{min}$	9.64±5.79
$\text{MRT}_{0-\infty}/\text{min}$	12.10±9.12
$\text{AUC}_{0-4}/\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	1091.92±428.22
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$	1107.01±428.27

醇-0.1%冰醋酸水溶液(93:7)^[8]作为流动相，对藤黄中的新藤黄酸进行测定。但在本实验室条件下，效果均不理想，经多次预试验，调整流动相组成和比例，以乙腈-0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸铵-醋酸(80:20:0.1)为流动相，取得了良好的分离效果。本实验建立了家兔血浆中新藤黄酸 HPLC 测定法，结果表明该法具有专一性强，重现性和精密度好，回收率高和样品处理简单等特点，适合于生物样品分析。

药动学研究结果表明，新藤黄酸在家兔体内的平均消除半衰期($t_{1/2}$)为 23.38 min，平均驻留时间(MRT_{0-4})为 9.64 min，总清除率(CL)为 $0.005\text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，说明药物消除快，在体内滞留时间短，可尝试通过改变剂型来延长作用时间。由于本实验采用单剂量注射给药来研究新藤黄酸在家兔体内的药动学，因此，新藤黄酸多剂量以及其他给药途径等的药动学有待于进一步研究，以制定出合理的给药方案。

参考文献:

[1] 南京医学院. 药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1960: 1161.
[2] 雷秋模, 刘金妹, 龚德恩, 等. 藤黄抗癌的实验研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1985, 7(4): 282.
[3] 孔令东, 叶定江, 吴皓. 藤黄的炮制及其现代研究概况[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(2): 89-91.

- [4] 吕归宝. 藤黄中新藤黄酸的分离及其结构[J]. 药学学报, 1984, 19(8): 636.
- [5] 曲宝玺, 郝晓阁, 李德华. 藤黄 II 号抗癌作用的实验研究[J]. 中国肿瘤临床, 1991, 18(1): 50-52.
- [6] 杨莉, 王梅, 程卉, 等. 新藤黄酸诱导细胞凋亡抑制 A549 细胞裸鼠移植瘤增长的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(9): 1217-1221.
- [7] 冯传平, 周娟, 黄鹏, 等. HPLC 测定新藤黄酸的含量[J]. 安徽中医学院学报, 2006, 25(5): 48-49.
- [8] 周安, 李庆林, 彭代银, 等. HPLC 法测定藤黄中藤黄酸和新藤黄酸的含量[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(8): 53-54.
- (编辑: 梁进权)

不同基质和促渗剂对川芎嗪凝胶经皮吸收的影响

卢映¹, 涂星², 吴俊洪¹, 吕耿彬¹, 陈豆¹, 陈晓丹¹, 黄雨威¹, 王利胜¹(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 考察不同基质和促渗剂对川芎嗪凝胶经皮吸收的影响。**方法** 采用改良 Franz 扩散池, 以离体裸鼠皮肤为屏障, 用 HPLC 法测定不同基质(1 %卡波姆、5 %CMC-Na、5 %HPMC)和不同促渗剂(氮酮、油酸、冰片和冰片-薄荷脑低共融物)对川芎嗪凝胶的累积渗透量、渗透吸收速率、增渗倍数等参数的影响。**结果** 以 1 %卡波姆为基质时透皮吸收效果最好, 几种促渗剂均可较好的促进川芎嗪凝胶的经皮吸收, 尤以 5 %氮酮以及冰片-薄荷脑(3 % : 3 %)低共融物的促渗效果最佳。**结论** 1 %卡波姆为最佳的凝胶基质, 5 %氮酮或者冰片-薄荷脑(3 % : 3 %)低共融物为川芎嗪凝胶最佳的促渗剂。

关键词: 川芎嗪凝胶; 基质; 促渗剂; 经皮吸收, 高效液相色谱

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0166-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.016

Effect of Different Matrices and Penetration Enhancers on Transdermal Absorption of Tetramethylpyrazine Gel
LU Ying¹, TU Xing², WU Junhong¹, LV Gengbin¹, CHEN Dou¹, CHEN Xiaodan¹, HUANG Yuwei¹, WANG Lisheng¹ (1. School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of different matrices and penetration enhancers on the transdermal absorption of the tetramethylpyrazine (TMP) gel. **Methods** Improved Franz diffusion cell was adopted as the apparatus for in-vitro nude mouse skin permeation. The kinetic parameters of percutaneous absorption, such as permeability amount, penetration rate and enhancing rate were determined by HPLC. Different matrices (1 % carbopol, 5 % CMC-Na, 5 % HPMC) and different penetration enhancers such as azone, oleic acid(OA) borneol and borneol-mentholum eutectic mixture were investigated in percutaneous absorption effects. **Results** The effect of the transdermal absorption of the TMP gel was the best when the matrix was 1 % carbopol. All the penetration enhancers increases the absorption of the TMP gel significantly, in particular 5 % azone and 6 % borneol-mentholum eutectic mixture(3 % : 3 %). **Conclusion** The optimal matrix is one percent of carbopol, and the optimal penetration enhancer is the five percent of azone or the six percent of borneol-mentholum eutectic mixture(3 % : 3 %).

Keywords: Tetramethylpyrazine gel; Matrices; Penetration enhancers; Percutaneous absorption; HPLC

川芎嗪(Tetramethylpyrazine, TMP)是从川芎中提取的主要有效成分, 具有扩张血管、抑制血小板聚集、防止血栓形成、改善脑缺血等多种作用, 疗效显著, 但其半衰期短, 需要频繁给药以维持有效

血药浓度^[1-2]。川芎嗪的分子量小, 熔点低且易挥发, 已证实有良好的透皮性能^[3], 将其制成适宜的外用制剂并添加适宜的促渗剂能够达到延长药物作用时间, 减少给药次数的目的^[4]。因此, 本文拟

收稿日期: 2012-07-15

作者简介: 卢映, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物新剂型与新技术。Email: 626418922@qq.com。通讯作者: 王利胜, 教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 药物新剂型与新技术。Email: 541718797@qq.com。