

热毒宁注射液在大鼠体内的药代动力学研究*

□毕宇安 孙晓萍 王振中 刘 涛
孙 兰 常秀娟 萧 伟**

(江苏康缘药业股份有限公司/中药制药过程新技术国家重点实验室 连云港 222001)

摘 要:目的:研究热毒宁注射液中栀子苷、绿原酸在大鼠体内的药代动力学特征。方法:大鼠尾静脉分别注射 5.20、10.40、16.00g(生药)·kg⁻¹ 热毒宁注射液后,收集血浆样本,采用 HPLC 检测栀子苷与绿原酸的血药浓度,以 DAS 2.0 软件计算药代动力学参数。结果:不同给药剂量下栀子苷与绿原酸的体内平均半衰期分别为 41~52min、37~52min,栀子苷、绿原酸的 AUC_(0-t)与剂量成正比。结论:栀子苷和绿原酸在体内的药代动力学过程均可用二室模型来描述,且二者在大鼠体内呈线性代谢。

关键词:绿原酸 栀子苷 热毒宁注射液 药代动力学

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.06.019

热毒宁注射液由金银花、栀子、青蒿等中药组成,具有清热,疏风,解毒之功效,用于上呼吸道感染(外感风热证)所致的高热、微恶风寒、头身痛、咳嗽、痰黄等症,是治疗上呼吸道感染,抗病毒的安全、高效纯中药注射剂,属于国家二类新药。其中栀子苷与绿原酸是其质量检测指标,且文献研究证实^[1-2],栀子苷具有镇痛,抗炎等药理作用,绿原酸具有抗菌、抗炎、抗病毒、保肝利胆等方面的药理作用,实验选取这两种活性成分作为体内代谢的监测对象,探索其在动物体内的药代动力学特征,为临床合理用药的安全性和有效性提供参考依据。

一、仪器与材料

1. 仪 器

收稿日期: 2010-04-02

修回日期: 2010-04-13

* 科学技术部国家重大新药创制(2009ZX09313-032):创新中药中试放大研究技术平台,负责人:萧伟。

** 通讯作者:萧伟,本刊编委,研究员级高级工程师,博士,主要研究方向:中药新型制剂的研究与开发,Tel:0518-85521956,E-mail:wzhzh-nj@tom.com。

Agilent 1100 高效液相色谱仪,Agilent Chem Station 工作站,MWD 检测器,双元泵,ALS 进样器。

2. 药品与试剂

栀子苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号:110749200511),绿原酸对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号:110753200413),葛根素对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号:110752200209)。热毒宁注射液,由江苏康缘药业股份有限公司提供,规格:10mL,批号:070913,实验时以 0.9%氯化钠注射液稀释后给药。甲醇(HPLC,美国天地公司),磷酸(批号:060310166),盐酸(批号:070130123)由南京化学试剂有限公司提供。

3. 动 物

清洁级 SD 大鼠,由南京军区医学动物实验中心提供,合格证号:SCXK(苏)2003-0004,雌雄各半,体重 250±20g。

二、实验方法

1. 色谱条件

流动相:乙腈:0.1%磷酸(86:14),流速:1.0mL·min⁻¹,柱温:25℃,绿原酸、栀子苷、内标葛根素的检测波长分别为:250nm、238nm、327nm,检测时间为0~7.10min:327nm;7.15~8.50min:250nm;8.55~10.00min:238nm;10.1min:327nm。进样量10μL。

2. 样品处理

取抗凝血浆0.2mL,加入15μL内标液(250μg·mL⁻¹葛根素),涡旋15s,加入0.2mol·L⁻¹HCl30μL,涡旋15s,加入0.4mL甲醇(HPLC)涡旋20s除蛋白,13000rpm离心20min,取上清0.4mL进样,进样量10μL。

3. 给药方法

取清洁级SD大鼠18只,雌雄各半,随机分为3组,分别按5.20、10.40、16.00g(生药)·kg⁻¹3个剂量尾静脉注射药物(分别用0.9%氯化钠注射液稀释成0.52g·mL⁻¹、0.104g·mL⁻¹、0.16g·mL⁻¹浓度的溶液),于给药前和给药后1min、5min、10min、15min、30min、45min、1h、1.5h、2h、3h、4h、5h取血0.5mL,肝素抗凝,4800rpm离心15min,取上层血浆0.2mL,按样品处理方法处理后进样。

4. 数据处理与药代动力学参数计算

记录栀子苷、绿原酸与内标的峰面积比,根据工作曲线得出的回归方程计算实测浓度,将血药浓度时间数据录入DAS 2.0药代动力学软件,估算栀子苷和绿原酸在体内的药代动力学参数。所有参数以表示,采用单因素方差分析Dunnett 双侧t检验比较组间差异。

三、结果

1. 方法专属性

在本实验条件下,栀子苷、绿原酸、葛根素与血浆中的内源性物质,代谢物达到良好分离,对所测物质无干扰。

2. 工作曲线制备

取大鼠空白血浆160μL,分别加入不同浓度的栀子苷和绿原酸标准溶液20μL,使血浆中栀子苷和绿原酸的浓度分别为:200μg·mL⁻¹、100μg·mL⁻¹、50μg·mL⁻¹、25μg·mL⁻¹、12.5μg·mL⁻¹、6.25μg·mL⁻¹、3.125μg·mL⁻¹,按样品处理方法处理后进样,分别以栀子苷峰面积与

内标峰面积的比值、绿原酸峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标,栀子苷和绿原酸的浓度为横坐标进行回归,得出栀子苷和绿原酸的回归方程分别为 $y=-0.002+0.011x$, $y=-0.001+0.021x$,相关系数分别为0.996,0.997。

3. 回收率

在大鼠空白血浆中加入不同浓度的栀子苷和绿原酸标准溶液,使血浆中栀子苷和绿原酸的浓度分别为:4μg·mL⁻¹、20μg·mL⁻¹、100μg·mL⁻¹。按样品处理方法处理后进样,计算栀子苷和绿原酸与内标的峰面积比,分别代入栀子苷和绿原酸的标准曲线的回归方程,计算二者的方法回收率,得出栀子苷和绿原酸高、中、低3个浓度的回收率分别为112.90%,90.22%,95.93%;103.41%,87.75%,93.50%。提取回收率均在85%以上。

4. 定量下限和最低检测浓度

以信噪比大于3的浓度为最低检测浓度,以信噪比大于10的检测浓度为定量下限,得出栀子苷和绿原酸的最低检测浓度分别为1.17μg·mL⁻¹,1μg·mL⁻¹,定量下限为3.125μg·mL⁻¹。

5. 日内和日间精密度

在大鼠空白血浆中加入不同浓度的栀子苷和绿原酸标准溶液,按样品处理方法处理后进样,测定日内变异及1周内5天的日间变异。测得低、中、高3个浓度的栀子苷、绿原酸日内RSD分别为:3.24%,2.64%,4.05%;2.83%,4.05%,3.55%;低、中、高3个浓度的栀子苷、绿原酸日间RSD分别为4.92%,5.21%,4.62%;8.23%,4.48%,4.13%。

6. 稳定性考察

取空白血浆200μL,分别加入等体积不同浓度的栀子苷、绿原酸对照品溶液,每个浓度各5份,按照血浆处理方法处理后分析,分别在立即测定、室温放置8h、冰冻和反复冻融等不同存放条件下进行稳定性考察。结果表明,样本中栀子苷与绿原酸在上述条件下稳定性好。

7. 栀子苷和绿原酸在大鼠体内的血药浓度

大鼠分别按5.20、10.40、16.00g·kg⁻¹3个剂量尾静脉注射药物后,经时过程的血药浓度,见图2-3。

8. 栀子苷和绿原酸在大鼠体内的房室模型及药代动力学参数估算

大鼠分别按5.20、10.40、16.00g·kg⁻¹3个剂量尾静脉注射药物后,其药代动力学参数,见表1-2,提

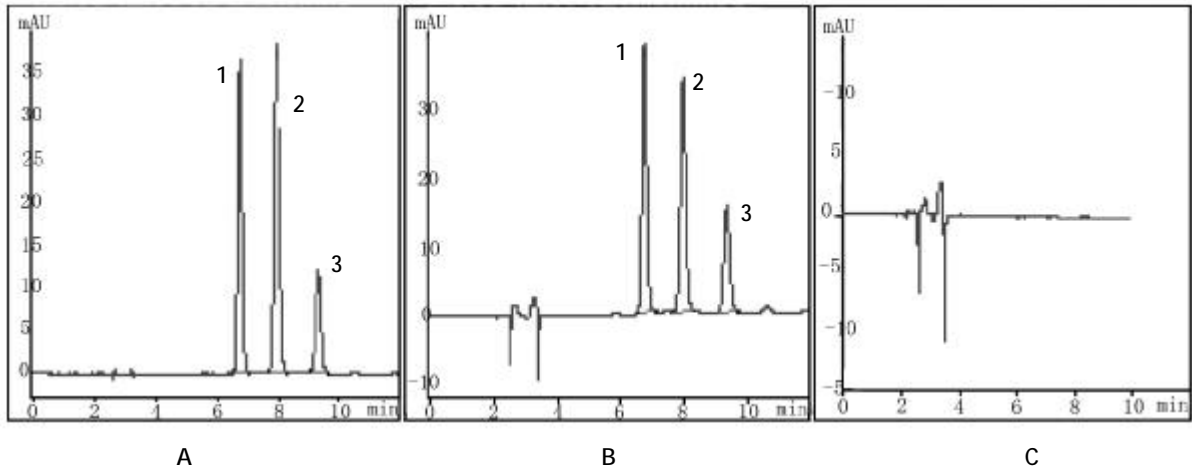


图 1 对照品与供试品色谱图

注:A 混合对照品色谱图,B 给药后血浆供试品色谱图,C 空白血浆供试品色谱图;1、绿原酸(6.76min), 2、葛根素(7.96min), 3、栀子苷(9.31min)。

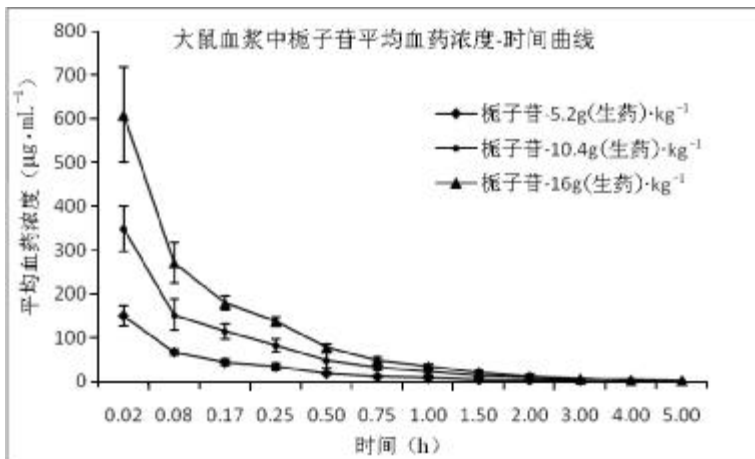


图 2 尾静脉注射不同剂量后栀子苷在体内的平均药时曲线($\bar{x} \pm SD$)

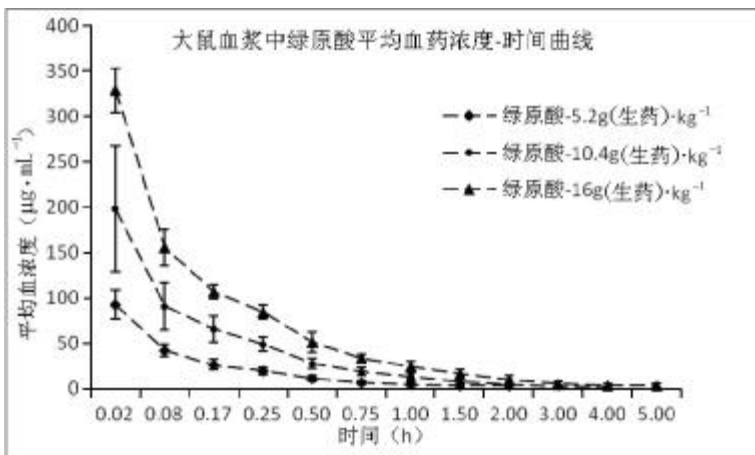


图 3 尾静脉注射不同剂量后绿原酸在体内的平均药时曲线($\bar{x} \pm SD$)

示栀子苷与绿原酸在大鼠体内的量变过程可以用二室模型来描述。将不同剂量下栀子苷与绿原酸的半衰期 $t_{1/2z}$ 分别做 Dunnett 双侧 t 检验, 结果显示不同剂量下各指标的半衰期无显著差异, $P < 0.05$ 。

四、结 论

本文建立了 HPLC 同时测定血浆栀子苷与绿原酸浓度的方法^[3], 实验中采用甲醇加酸沉淀蛋白的方法, 二者的提取回收率较高, 重复性好, 专属性好, 且操作简便, 可以作为检测二者血药浓度的可靠方法。

实验结果表明, 静注热毒宁注射液后, 其主要成分栀子苷和绿原酸在体内的动力学过程均可用二室模型来描述。不同给药剂量下栀子苷与绿原酸的体内半衰期的平均值分别为 41~52min, 37~52min, 表观容积分别为 $112 \sim 130L \cdot kg^{-1}$, $178 \sim 191L \cdot kg^{-1}$, 提示这两种成分体内消除迅速, 分布广泛。文献报道^[4-6], 栀子苷单体半衰期为 42min, 绿原酸单体半衰期为 12min, 与单体代谢过程相比, 热毒宁注射液中绿原酸的半衰期有所延长, 这可能与制剂中药物配伍有关。对不同剂量下栀子苷和绿原酸 $AUC_{(0-t)}$ 做对数转换后, 其与药物剂量的

表1 给药后栀子苷在体内的药代动力学参数 (n=6)

参数	单位	5.20g(生药)·kg ⁻¹	10.40g(生药)·kg ⁻¹	16.00g(生药)·kg ⁻¹
AUC _(0-t)	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	36.30±6.28	99.10±17.26	162.65±26.00
AUC _(0-∞)	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	39.03±6.63	102.29±18.67	165.49±26.70
MRT _(0-t)	h	0.44±0.11	0.66±0.18	0.64±0.17
MRT _(0-∞)	h	0.63±0.15	0.80±0.26	0.71±0.19
t _{1/2z}	h	0.68±0.20	0.87±0.34	0.81±0.20
Tmax	h	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
CLz	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	136.18±20.60	105.05±21.98	98.94±16.52
Vz	L·kg ⁻¹	130.06±30.08	124.72±33.42	112.04±20.67
Cmax	mg·L ⁻¹	150.30±23.66	349.30±108.43	608.90±52.10

表2 给药后绿原酸在体内的药代动力学参数(n=6)

参数	单位	5.20g(生药)·kg ⁻¹	10.40g(生药)·kg ⁻¹	16g(生药)·kg ⁻¹
AUC _(0-t)	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	21.96±5.38	56.94±13.21	104.18±17.86
AUC _(0-∞)	mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹	24.54±7.01	59.41±14.21	108.17±19.08
MRT _(0-t)	h	0.40±0.12	0.60±0.16	0.72±0.24
MRT _(0-∞)	h	0.63±0.24	0.75±0.23	0.87±0.31
t _{1/2z}	h	0.61±0.20	0.77±0.30	0.85±0.30
Tmax	h	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
CLz	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	226.25±60.13	184.98±48.93	151.81±26.04
Vz	L·kg ⁻¹	187.97±41.50	191.01±50.04	178.28±31.89
Cmax	mg·L ⁻¹	92.71±15.85	198.15±69.52	328.67±24.84

相关系数(r^2)分别为0.963、0.984,且不同剂量下各指标的半衰期无显著差异,提示热毒宁注射液进入体内后,其主要成分栀子苷、绿原酸在大鼠体内呈线性代谢。

参考文献

- 张学兰, 孙秀梅. 炮制对栀子部分成分及解热作用的影响. 中药材, 1995(3):136-139.
- 张靛灵, 马琼, 高锦明. 绿原酸及其类似物与生物活性. 中草药, 2001, 32(2):173-176.
- 梁健成, 黄义昆, 蔡震. 高效液相色谱法同时测定热毒宁注射液中绿原酸和栀子苷的含量. 中国新药杂志, 2008, 17(17):1522-1524.
- 何心, 赵铁敏, 郡修德. 绿原酸的药代动力学研究. 中成药, 1999, 21(4):161-162.
- 樊天宇, 文红梅, 过科家. 通络冻干粉针中栀子苷芍药苷犬药代动力学研究. 中药药理与临床, 2007, 23(1):50-54.
- 江莉, 黄熙, 秦锋. 栀子与柴芩承气汤中栀子苷在大鼠体内的药动学比较. 中药药理与临床, 2007, 23(5):13-15.

Pharmacokinetic Study of Renduning Injection in Rats

Bi Yuan^{1,2}, Sun Xiaoping^{1,2}, Wang Zhenzhong^{1,2}, Liu Tao^{1,2}, Sun Lan^{1,2}, Chang Xiujuan^{1,2}, Xiao Wei^{1,2}

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd, Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of Pharmaceutical New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China)

Abstract: This work aimed to investigate the pharmacokinetic parameters of geniposide and chlorogenic acid after administration of reduning injection. The rats were given three doses of reduning injection by the tail vein. The plasma was collected, and the HPLC method was used to determine the concentration of geniposide and chlorogenic acid in plasma. The concentration-time curves were described and pharmacokinetic parameters were analyzed by program DAS 2.0. After the administration of different doses, the half-life of geniposide and chlorogenic acid in rats were respectively 41-52 min and 37-52 min, with their AUC (0-t) being propotional to the dose. The results show that the concentration-time of geniposide and chlorogenic acid in rats could be described by a two-compartment model, suggesting that two ingredients would present linear pharmacokinetics.

Keywords: Geniposide, Chlorogenic acid, Reduning injection, Phamacokinetics

(责任编辑:张志华 李沙沙, 责任译审:张立崴)