

# 白花前胡丁素在大鼠体内的药动学研究

张宇杰<sup>1\*</sup>, 姜爱雯<sup>1</sup>, 刘晓明<sup>1</sup>, 张海红<sup>2</sup>, 王丽红<sup>1</sup>(1.河北北方学院附属第一医院药剂科, 河北 张家口 075000; 2.河北北方学院药理教研室, 河北 张家口 075000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1791-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.19

**摘要** 目的:建立白花前胡丁素(PD)的血浆浓度测定方法,研究PD在大鼠体内的药动学特征。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Odyssil C<sub>18</sub>,流动相为甲醇-水(75:25, V/V),流速为0.8 ml/min,检测波长为323 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μl。24只雄性SD大鼠随机均分为PD高、低剂量(20、10 mg/kg)组。大鼠尾iv给药0.016 7、0.083 3、0.166 7、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4 h后眼眶采血测定血药浓度,采用3p87软件计算药动学参数。结果:PD检测质量浓度线性范围为0.05~51.2 μg/ml( $r^2=1.000$ ),精密密度试验的RSD均小于7.85%,方法回收率为83.12%~86.63%,提取回收率为80.19%~84.21%,稳定性试验的RSD均小于15%。PD高、低剂量组 $t_{1/2\alpha}$ 分别为(0.128 6±0.052 1)、(0.118 5±0.054 6) h, $t_{1/2\beta}$ 分别为(2.64±0.874)、(2.41±0.823) h, $c_{\max}$ 分别为(14.981 2±5.831)、(9.012 8±1.576) μg/ml, $t_{\max}$ 分别为(0.109 1±0.058 5)、(0.108 2±0.069 1) h,AUC<sub>0-4 h</sub>分别为(20.79±9.981)、(18.14±9.856) μg·h/ml,CL分别为(1.335 7±1.146)、(1.521 5±1.268) L·kg/h。结论:该方法灵敏度高、专属性强、操作简便、准确可靠,可应用于PD在大鼠体内的药动学特征研究。PD在大鼠体内的消除过程属于一级消除,符合二室模型。

**关键词** 高效液相色谱法;白花前胡丁素;血浆浓度;药动学;大鼠

## Study on Pharmacokinetics of Praeruptorin D in Rats *in vivo*

ZHANG Yu-jie<sup>1</sup>, JIANG Ai-wen<sup>1</sup>, LIU Xiao-ming<sup>1</sup>, ZHANG Hai-hong<sup>2</sup>, WANG Li-hong<sup>1</sup>(1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075000, China; 2.Dept. of Pharmacology, Hebei North University, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for determining the plasma concentration of praeruptorin D (PD) and investigate the pharmacokinetic characteristics of PD in rats *in vivo*. METHODS: HPLC was adopted. The column was Odyssil C<sub>18</sub> with the mobile phase of methanol-water (75:25, V/V), at the flow rate of 0.8 ml/min, with the detection wavelength of 323 nm, column temperature of 25 ℃ and the volume of 20 μl. 24 male SD rats were randomly divided into PD high and low dose groups (20 and 10 mg/kg). The plasma concentration was determined by orbital blood 0.016 7, 0.083 3, 0.166 7, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3 and 4 h after their tails were iv given the drug, and 3p87 software was employed to calculate pharmacokinetic parameters. RESULTS: In the determination of PD, the quality concentration linear range was 0.05-51.2 μg/ml ( $r^2=1.000$ ), the RSD of precision test was less than 7.85%, the method recovery was 83.12%-86.63%, the extraction recovery was 80.19%-84.21% and RSD of stability tests was less than 15%. The  $t_{1/2\alpha}$  in PD high and low dose groups were respectively (0.128 6±0.052 1) h and (0.118 5±0.054 6) h,  $t_{1/2\beta}$  were respectively (2.64±0.874) h and (2.41±0.823) h,  $c_{\max}$  were respectively (14.981 2±5.831) μg/ml and (9.012 8±1.576) μg/ml,  $t_{\max}$  were respectively (0.109 1±0.058 5) h and (0.108 2±0.069 1) h, AUC<sub>0-4 h</sub> were respectively (20.79±9.981) μg·h/ml and (18.14±9.856) μg·h/ml and CL were respectively (1.335 7±1.146) L·kg/h and (1.521 5±1.268) L·kg/h. CONCLUSIONS: The method is highly sensitive, exclusive, simple, accurate and reliable, and can be applied to study on the pharmacokinetic characteristics of PD in rats *in vivo*. The elimination of PD in rats was first-order elimination and compatible with two-compartment model.

**KEYWORDS** HPLC; Praeruptorin D; Plasma concentration; Pharmacokinetics; Rats

中药前胡为伞形科植物白花前胡(*Peucedanum praerupterum* Dunn.)的干燥根,是我国的传统中药。其具有宣散风热、降气化痰等功效,临床多用于感冒、咳嗽、痰多、痰热喘满等症。此外,现代药理学研究表明,白花前胡在心血管系统通过抑制电压依赖性Ca<sup>2+</sup>通道、加速血管平滑肌细胞NO的释放等途径,具有保护心肌细胞、缩小心肌梗死范围、降低血压等心血管保护作用<sup>[1]</sup>。还有研究表明,白花前胡能通过抑制肿瘤多药耐药基因P-糖蛋白(P-gp)的表达而发挥抗癌作用<sup>[2-5]</sup>。

开展白花前胡各组分的药动学研究,对该传统中药制剂的改进并最终应用于临床显得尤为重要。关于白花前胡3种主要成分中的甲素、丙素的药动学研究已有文献报道,但有关白花前胡丁素(PD)的药动学研究尚未见文献报道,因此本研究选取PD为研究对象,采用高效液相色谱法建立了大鼠血浆中PD的分析检测方法,并测定大鼠尾iv给予PD后的经时血药浓度,研究其在大鼠体内的药动学特征,为其用于临床提供实验依据<sup>[6-9]</sup>。

## 1 材料

\*药师。研究方向:药动学。E-mail:zyjxw1980@163.com

## 1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);QL-90型旋涡混匀器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);TDL80-2B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);BP-121S型电子天平(德国Satorius公司);RE-52A型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);DZKW-D-1型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂);ZF-20C型紫外检测仪(上海宝山顾村电光仪表厂);MH5000型可调型电热套(上海树立仪器仪表有限公司)。

## 1.2 药品与试剂

PD对照品(上海纯优生物科技有限公司,批号:130605,纯度:≥95%);蛇床子素(Ost,江苏恒瑞医药有限公司,批号:201305,纯度:99.7%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

## 1.3 动物

清洁级SD大鼠24只,♂,体质量(200±20)g,由河北省实验动物中心提供(实验动物生产合格证号:909047)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件<sup>[10]</sup>

色谱柱:Odyssey C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(75:25,V/V);流速:0.8 ml/min;检测波长:323 nm;柱温:25℃;进样量:20 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取PD对照品适量,甲醇溶解,制成质量浓度为102.4 μg/ml的贮备液,于4℃贮藏。临用前,用甲醇稀释成质量浓度分别为25.6、6.4、1.6、0.4、0.1 μg/ml的PD对照品系列溶液。

2.2.2 内标溶液的制备 精密称取Ost适量,甲醇溶解,制成质量浓度为100 μg/ml的贮备液,于4℃贮藏。临用前,用甲醇稀释成质量浓度为10 μg/ml的内标溶液。

2.2.3 iv溶液的制备 精密称取PD适量,丙二醇溶解,制成质量浓度为4.8 mg/ml的溶液,于4℃贮藏。

### 2.3 血浆样品预处理

吸取样品血浆200 μl,加入10 μg/ml内标溶液100 μl、叔丁基甲醚3 ml(分2次萃取),充分混旋,以离心半径为6 cm、10 000 r/min离心5 min,合并2次上清液,于N<sub>2</sub>流下吹干,残留物用200 μl甲醇溶解,0.45 μm微孔滤膜滤过。取20 μl进样,HPLC测定血药浓度<sup>[11-15]</sup>。

### 2.4 专属性试验

分别取对照品、空白血浆、含药空白血浆、给药后1 h大鼠血浆,按“2.3”项下方法处理后,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,PD、内标的保留时间分别为15.6、8.2 min,峰形良好,血浆中内源性物质不干扰PD的测定。色谱见图1。

### 2.5 标准曲线的制备

量取空白血浆20 ml,精密加入不同质量浓度的PD对照品溶液20 μl,使其质量浓度分别为0.05、0.2、0.8、3.2、12.8、51.2 μg/ml,按“2.3”项下方法处理后,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。以PD的峰面积与内标的峰面积比值(y)为纵坐标,以PD质量浓度为横坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=0.0876x-0.0016$ ( $r^2=1.000$ )。结果表明,PD质量浓度线性范围为0.05~51.2 μg/ml。按上述条件测得PD在大鼠血浆中最低定量限为0.05 μg/ml。

### 2.6 精密度试验

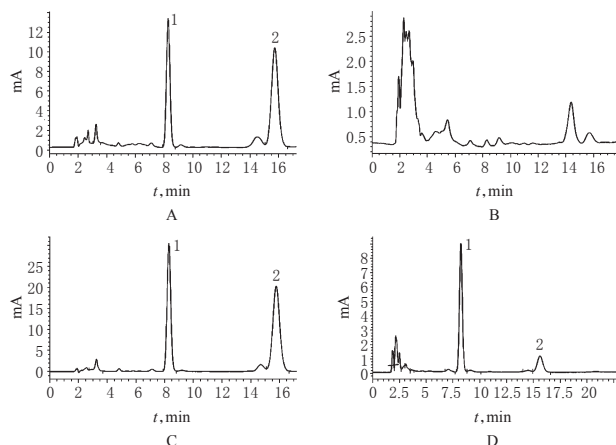


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.空白血浆;C.含药空白血浆;D.给药后血浆;1.内标;2.PD

Fig 1 HPLC chromatograms

A. reference; B. blank plasma; C. reference and blank plasma; D. plasma sample after drug administration; 1. internal standard; 2. PD

精密吸取空白血浆1 ml,加入不同质量浓度的PD对照品溶液,使其质量浓度分别为0.05、3.2、51.2 μg/ml,按“2.3”项下方法处理后,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图;每个浓度于同日提取分析6次,另每日测定1次,连续3 d内分别考察日内、日间精密度。结果表明,日内精密度的RSD≤5.88%(n=6),日间精密度的RSD≤7.84%(n=3)。精密度试验结果见表1。

表1 精密度试验结果( $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Results of precision test( $\bar{x} \pm s$ )

| PD<br>理论值, μg/ml | 日间精密度(n=3)   |        | 日内精密度(n=6)   |        |
|------------------|--------------|--------|--------------|--------|
|                  | 实测值, μg/ml   | RSD, % | 实测值, μg/ml   | RSD, % |
| 0.05             | 0.051±0.004  | 7.84   | 0.051±0.003  | 5.88   |
| 3.2              | 3.194±0.022  | 0.67   | 3.205±0.036  | 1.12   |
| 51.2             | 51.215±0.093 | 0.18   | 51.194±0.080 | 0.16   |

### 2.7 回收率试验

精密吸取空白血浆1 ml,加入不同质量浓度的PD对照品溶液,使其质量浓度分别为0.05、3.2、51.2 μg/ml,按“2.3”项下方法处理后,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。用测得的峰面积与相应浓度对照品溶液测得的峰面积进行比较,计算提取回收率;将血浆样品的峰面积代入标准曲线方程求出血浆浓度,计算方法回收率。回收率试验结果见表2。

表2 回收率试验结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 Results of recovery test( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 质量浓度, μg/ml | 提取回收率     |        | 方法回收率     |        |
|-------------|-----------|--------|-----------|--------|
|             | 测得值, %    | RSD, % | 测得值, %    | RSD, % |
| 0.05        | 84.21±1.9 | 7.16   | 86.00±2.8 | 7.75   |
| 3.2         | 80.19±0.8 | 6.26   | 83.12±1.1 | 5.59   |
| 51.2        | 83.58±2.9 | 8.32   | 86.63±3.7 | 7.53   |

### 2.8 稳定性试验

精密吸取空白血浆1 ml,加入不同质量浓度的PD对照品溶液,使其质量浓度分别为0.05、3.2、51.2 μg/ml,分别考察3种质量浓度在室温下放置24 h、-20℃放置7 d、反复冻融3次后的稳定性。结果,血浆样品中峰面积的RSD均小于15%,说明血浆样品在上述条件下稳定。

### 2.9 药动学实验

6只SD大鼠随机均分为高、低剂量(20、10 mg/kg,以人临床量10、5倍换算而得)组。实验前适应性喂养5 d,给药前禁食不禁水12 h,给药后2 h内禁水、全程禁食。分别于大鼠尾iv给药0.016 7、0.083 3、0.166 7、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4 h后眼眶静脉取血约0.5 ml,按“2.3”项下方法处理后,按上述色谱条件进样测定,记录色谱图。计算每只大鼠各时间点血浆中PD与内标的峰面积比,并利用回归方程计算各峰面积比值对应的血药浓度,最后用3p87药动学软件分析得出主要药动学参数。结果,在尾iv给予10、20 mg/kg两个剂量后,各参数差异无统计学意义,表明各参数与剂量无关。PD在大鼠体内的消除过程属于一级消除,符合二室模型。大鼠尾iv给予PD后的血浆浓度-时间曲线见图2;药动学参数见表3。

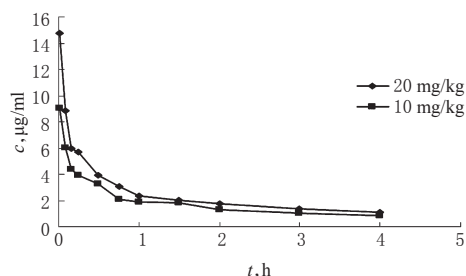


图2 大鼠尾iv给予PD后的血浆浓度-时间曲线

Fig 2 Plasma concentration-time curves of rats after iv given PD in tails

表3 大鼠尾iv给予PD后的药动学参数( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of rats after iv given PD in tails( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 药动学参数                  | 10 mg/kg          | 20 mg/kg          |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| $t_{1/2\alpha}$ , h    | 0.118 5 ± 0.054 6 | 0.128 6 ± 0.052 1 |
| $t_{1/2\beta}$ , h     | 2.41 ± 0.823      | 2.64 ± 0.874      |
| $c_{max}$ , μg/ml      | 9.012 8 ± 1.576   | 14.981 2 ± 5.831  |
| $t_{max}$ , h          | 0.108 2 ± 0.069 1 | 0.109 1 ± 0.058 5 |
| $AUC_{0-4h}$ , μg·h/ml | 18.14 ± 9.856     | 20.79 ± 9.981     |
| CL, L·kg/h             | 1.521 5 ± 1.268   | 1.335 7 ± 1.146   |
| V, L/kg                | 1.495 ± 0.651     | 1.438 ± 1.109     |
| $k_{21}$ , L/h         | 4.081 1 ± 0.981   | 5.290 0 ± 1.023   |
| $k_{10}$ , L/h         | 0.346 7 ± 0.375   | 0.350 0 ± 0.149   |
| $k_{12}$ , L/h         | 15.94 ± 6.871     | 13.47 ± 8.293     |

### 3 讨论

PD为角型吡喃香豆素类化合物,不溶于水,易溶于甲醇、二氯甲烷、二甲亚砜等有机溶剂,并在这些溶剂中稳定。在预实验中对血浆中PD的提取方法进行了考察,分别采用了叔丁基甲醚、乙酸乙酯、二氯甲烷与甲醇为提取剂,结果显示用叔丁基甲醚提取时其回收率最高。

内标物的选择应遵循以下原则:(1)其结构和理化性质与目标化合物的相似或相差不大;(2)液相保留时间在各待测组分之间或与之相近;(3)稳定且易得到;(4)与样品能够互溶但不发生化学反应;(5)内标物质质量浓度要适当。经过摸索和筛选,Ost在各方面均优于其他同类化合物,因此选定Ost为内标物。结果显示,PD与Ost峰形和分离度良好,方法简便可靠,灵敏度较高。

将血药浓度数据采用3p87药动学软件按一、二、三室模型拟合,结果PD呈二室模型分布。从大鼠的时间-浓度曲线可知,随着时间的增加血药浓度逐渐降低,属于一级消除。

在同一质量浓度下,不同大鼠的 $AUC_{0-4h}$ 重复性好。同时其他各参数重复性均较好,表明该目标化合物在大鼠体内的吸收分布消除均稳定。该法适用于血浆PD的浓度监测和药动学研究。

在不同质量浓度下,PD在大鼠体内的各药动学参数差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),表明药物半衰期、生物利用度、清除率等参数在给定的质量浓度范围内与剂量高低无关。

本研究通过测定白花前胡中主要活性成分PD的药动学参数,揭示其在大鼠体内的药动学规律,为中药白花前胡的科学、合理用药提供了佐证。

### 参考文献

- [1] 薛俊超.白花前胡化学成分及相关药理作用的研究进展[J].海峡药学,2012,24(2):35.
- [2] Wu JY, Fong WF, Zhang JX, et al. Reversal of multi-drug resistance in cancer cells by pyranocoumarin isolated from Radix Peucedani[J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 473(1):9.
- [3] 喻鹏久.白花前胡素类化合物抗炎活性以及分子作用机制的研究[D].广州:南方医科大学,2013.
- [4] 何冬梅,吴斐华,孔令义.白花前胡药理作用的研究进展[J].药学与临床研究,2007,15(3):168.
- [5] Liang T, Yue W, Li Q. Chemopreventive effects of Peucedanum praeruptorum DUNN and its major constituents on SGC7901 gastric cancer cells[J]. *Molecules*, 2010, 15(11):8 060.
- [6] 刘瑛,韩恩凤.白花前胡对心肺功能的药理作用[J].毒理学杂志,2007,21(4):328.
- [7] 王燕华,张迎春.白花前胡有效成分和临床药理学研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(3):258.
- [8] 吴霞,毕赢,王一涛.前胡化学成分及药理作用的研究进展[J].食品与药品,2010,12(11):442.
- [9] 张广健.七种香豆素类化合物对大鼠肝微粒体CYP3A4活性的影响[D].泰安:泰山医学院,2013.
- [10] 黄瑞红,杨慧文. RP-HPLC法测定清肺抑火丸中白花前胡甲素的含量[J].中国药房,2010,21(27):2 256.
- [11] 胡楠,梁日欣,王岚,等.延胡索提取物在大鼠血浆中的药动学研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):186.
- [12] 刘萍霞,刘频健,庄笑梅,等.抗肿瘤化合物MC002的活性代谢产物雷公藤内酯醇在大鼠体内药动学与组织分布[J].中国药理学与毒理学杂志,2011,25(2):206.
- [13] 殷志爽,王维聪,游远,等. HPLC测定大鼠血清中靛玉红的含量及其药动学研究[J].中国中药杂志,2010,35(9):1 148.
- [14] Zhang JY, Wang YF, Milton MN, et al. Disposition and pharmacokinetics of L-N6-(1-iminoethyl) lysine-5-tetrazole-amide, a selective iNOS inhibitor in rats[J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(5):1 229.
- [15] 刘虹,朱晓月,王萌,等. HPLC测定血浆中荷叶碱的浓度及其在大鼠体内的药动学研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(12):165.

(收稿日期:2014-09-01 修回日期:2014-09-25)

(编辑:张 静)