

白头翁皂苷 B4 在大鼠体内药代动力学规律及肺组织分布^{*}

狄孟华^{1**}, 李桂凤², 李 言², 崔京浩², 王永林¹, 杨世林^{1***}

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 苏州大学 药学院, 江苏 苏州 215123)

[摘 要] 目的: 建立用高效液相色谱(HPLC)法测定 Wistar 大鼠血浆及肺组织中白头翁皂苷 B4(B4) 的含量,研究其在大鼠体内的药代动力学规律及肺组织分布特征。方法: 以气管滴注给予 6 mg/kg 的白头翁皂苷 B4 的大鼠作为气管滴注组,并与尾静脉给予 6 mg/kg 白头翁皂苷 B4 注射的大鼠作为尾静脉注射组,采用 HPLC 法于不同时间点(第 5、15、30 min 及 1、2、4、6、8、10、12、14、24 h)的血药浓度,并于给药后 5 min 及 1、2、4、8、12、24 h 时测定测定气管滴注组大鼠肺组织中的 B4 浓度。结果: HPLC 法测定血浆样品及肺组织样品中的内源性物质未对 B4 的检测结果形成干扰, B4 在血浆及肺组织中的浓度分别在 0.5 ~ 100.0 mg/L、0.5 ~ 400.0 mg/L 范围与峰面积线性关系良好,最低定量限均为 0.5 mg/L(S/N > 10);室温下 24 h 的稳定性 RE < 11%,3 次冻融稳定性 RE < 13%;白头翁皂苷 B4 在大鼠体内药动学过程符合二室模型;HPLC 法测定结果表明,大鼠经气管滴注给药后,药物在肺中积蓄,且缓慢释放入血。结论: 建立的 HPLC 法稳定可靠,肺部给予药物白头翁皂苷 B4 后,药物在肺中产生积蓄,缓慢入血,延长在体内的保留时间。

[关键词] 药代动力学; 高效液相色谱; 白头翁皂苷 B4; 气管滴注; 肺组织; 血浆

[中图分类号] R285.5; O657.63 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)07-0745-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.07.001

Pharmacokinetics and Lung Tissue Distribution of Anemoside B4 in Rats

DI Menghua¹, LI Guifeng², LI Yan², CUI Jinghao², WANG Yonglin¹, YANG Shilin¹

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. College of Pharmacy, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method to determine anemoside B4 content in rat plasma and lung tissue, and study pharmacokinetics and distribution in lung tissue in rats. **Methods:** B4 (6 mg/kg) was administered by intratracheal instillation and compared with the intravenous injection group with same quantity. Adopting HPLC method to determine plasma-drug concentration at different time point (at 5, 15, 30 min and 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24 h); drug concentration was determined after intratracheal instillation of B4 in rat (at 5 min after drug and 1, 2, 4, 8, 12, 24 h). **Results:** Endogenous substances in plasma sample and lung tissue samples did not interfere with the B4 test results; B4 showed good peak area linear relationship with the plasma and lung tissue with the concentration of 0.5 ~ 100.0 mg/L and 0.5 ~ 400.0 mg/L, with low quantification limit of 0.5 mg/L (S/N > 10); 24 h under room temperature showed stability RE < 11%, three times freeze-thaw stability was RE < 13%; the pharmacokinetics of B4 conformed to a two-compartment model after intratracheal instillation and intravenous injection. B4 was administered via tracheal instillation, drugs accumulated in the lungs and then slowly released to blood. **Conclusions:** Stable HPLC method was successfully devel-

*[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(K113231513)

** 贵州医科大学 2015 级硕士研究生

*** 通信作者 E-mail: sun17908@126.com

oped. B4 was administered via tracheal instillation, drugs accumulate in the lungs, slowly enter the blood and prolong the retention time in the body.

[**Key words**] pharmacokinetics; high efficiency liquid chromatography; anemoside B4; tracheal drip; lung tissue; plasma

白头翁皂苷 B4 (anemoside B4, B4) 是从毛茛科多年生草本植物白头翁中提取具有药理活性的五环三萜类皂苷^[1], 其主要组成有三萜皂苷、三萜酸、木脂素、胡萝卜苷及糖蛋白等, 而三萜类皂苷是中药白头翁主要活性成分之一^[2-3]。白头翁皂苷具有多种药理活性, 主要包括抗炎活性、抗菌活性、免疫增强功能及抗肿瘤活性^[4-9]。有学者对白头翁皂苷 B3、BD、B7、B10 及 B11 的组织分布情况进行报道^[10-11], 而 B4 作为白头翁皂苷重要的成分之一, 目前却未见关于 B4 的药动力学的报道, 本研究通过建立 B4 在大鼠体内的分析测定方法, 对其在大鼠体内的药动学规律及肺组织分布进行研究, 为以后 B4 在临床的应用提供前期实验数据。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及动物

1.1.1 主要材料、试剂 LC-15C 型高效液相色谱 (HPLC) 仪 (日本岛津)、TGL-20M 型高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司)、M-16710-12 型涡旋混合器 (美国 Barnstead Thermolyne 公司)、T18B 型组织匀浆机 (德国 IKA)、MD200-1 型氮气吹扫仪 (杭州奥盛仪器有限公司)、白头翁皂苷 B4 雾化吸入剂 (自制)、水合氯醛 (批号 20110824, 国药集团)、甲醇 (sigma 公司)、乙腈 (sigma 公司)、超纯水。

1.1.2 实验动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 (180 ~ 220 g), 购自苏州大学实验动物中心, 合格证号 SCXK (苏) 2015-0005。实验开始前 12 h 给大鼠禁食, 但自由饮水, 实验开始 4 h 后给予正常进食及自由饮水。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Cogent C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸-乙腈 (27% ~ 73% 血浆样品, 28% ~ 72% 肺组织样品), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 205 nm, 柱温为 30 °C, 进样量 20 μL, 理论塔板数不低于 3 000。

1.2.2 样品预处理 (1) 血浆样品预处理: 精密

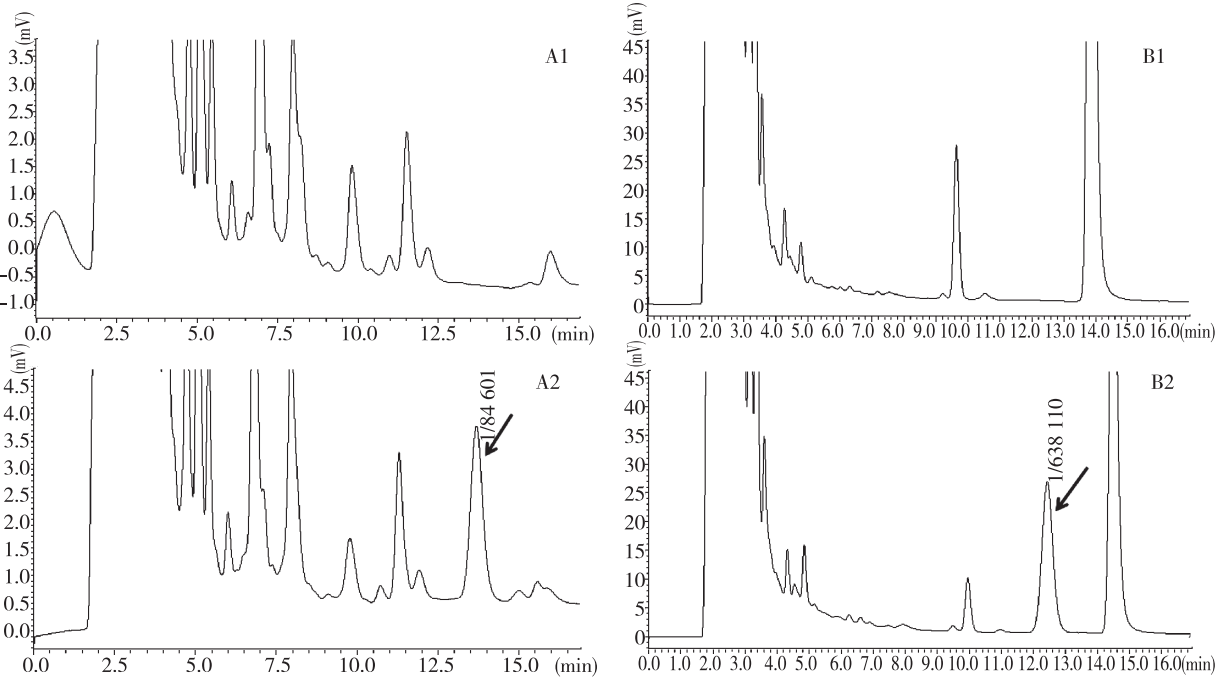
吸取血浆 0.2 mL, 加入到 2.0 mL EP 管中, 再加入甲醇 1.2 mL 涡旋 5 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min, 小心吸出上清液, 氮气吹干, 加 0.2 mL 流动相复溶, 经 0.22 μm 有机滤膜过滤, 取 20 μL 进样, 检测血浆中药物浓度。(2) 肺组织样品预处理: 将大鼠处死, 解剖小心取出肺脏, 生理盐水洗净肺表面血渍, 滤纸吸干, 置于 10.0 mL EP 管中, 加入生理盐水 4.0 mL, 组织匀浆, 精密吸取匀浆液 0.3 mL, 置 2.0 mL EP 管中, 加入甲醇 1.2 mL 涡旋 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 小心吸出上清, 氮气吹干, 加 0.3 mL 流动相复溶, 经 0.22 μm 有机滤膜过滤, 取 20 μL 进样, 检测肺组织中 B4 含量。

1.2.3 动物实验 取健康雄性 Wistar 大鼠 12 只, 随机均分为 2 组, 第 1 组采用气管滴注法给予白头翁皂苷 B4 雾化吸入剂^[12-13], 用手术剪在大鼠颈部位置剪开一小切口, 分离出白色环形软骨状气管, 用 1 mL 注射器吸取适量 B4 雾化吸入剂, 针头顺着气管插入, 将制剂缓缓推入, 使药物完全进入肺深部, 完成操作, 给药剂量为 6 mg/kg (按 B4 的量计算); 第 2 组给予尾静脉注射白头翁皂苷 B4 雾化吸入剂, 给药剂量为 6 mg/kg (按 B4 的量计算)。给药后分别在第 5、15、30 min 及 1、2、4、6、8、10、12、14、24 h 时眼眶取血 0.5 mL, 置肝素化的离心管中, 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血浆 0.2 mL, -20 °C 冰箱保存待测。另取雄性 Wistar 大鼠 21 只, 采用气管滴注给予白头翁皂苷 B4 雾化吸入剂, 给药剂量为 6 mg/kg (按 B4 的量计算), 分别于给药后 5 min 及 1、2、4、8、12、24 h 时将大鼠脱臼处死 (每个时间点处死大鼠 3 只), 立即解剖, 小心分离出肺脏, 用生理盐水清洗, 滤纸吸干表面血渍后称重, -20 °C 条件下保存待测。

2 结果

2.1 方法专属性

按“1.2.1”项下色谱条件测定空白血浆样品、加样血浆样品和空白肺组织、加样肺组织样品的色谱图 (图 1), 结果显示, 血浆样品及肺组织样品中的内源性物质未对 B4 的检测结果形成干扰。



注:A1 为空白血浆,A2 为加样血浆样品(20.0 mg/L),B1 为空白肺组织,B2 为加样肺组织样品(100.0 mg/L)

图 1 HPLC 色谱法检测 B4 的专属性

Fig. 1 HPLC chromatograms of the specificity test

2.2 HPLC 色谱法检测 B4 的线性范围

2.2.1 B4 在血浆中的线性范围 制备白头皂苷 B4 质量浓度分别为 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 及 100.0 mg/L 的系列甲醇标准液,吸取空白血浆 0.2 mL,加入上述系列标准液 0.2 mL,再加甲醇 1.0 mL 涡旋混匀,按血浆样品预处理法进行处理,配制成浓度分别为 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 及 100.0 mg/L 的系列含药血浆标准溶液;各取 20 μ L 进样,以记录的色谱图峰面积 A 对血浆标准溶液中药物浓度 C 进行线性回归,求得 B4 在血浆样品中的标准线性方程为: $A = 4\,267.3C + 294.17$, $r = 0.999\,9$;结果显示 B4 在血浆中浓度在 0.5 ~ 100.0 mg/L 范围与峰面积线性关系良好,最低定量限为 0.5 mg/L ($S/N > 10$)。

2.2.2 B4 在肺组织中的线性范围 制备白头皂苷 B4 质量浓度分别为 0.5、1.0、5.0、25.0、100.0、200.0 及 400.0 mg/L 的系列甲醇标准液,吸取 0.3 mL 空白肺组织匀浆液,加入上述系列标准液 0.3 mL,再加甲醇 0.9 mL 涡旋混匀,按肺组织样品预处理法进行处理,配制得浓度分别为 0.5、1.0、5.0、25.0、100.0、200.0 及 400.0 mg/L 的系列含药大鼠肺组织标准溶液;各取 20 μ L 进样,以药物的峰面积 A 对肺组织中药物浓度(C)进行线性回归,求得 B4 在大鼠肺组织中的曲线方程为: $A =$

$6\,346.1C - 2\,531.9$, $r = 0.999\,9$ 。结果显示 B4 在肺组织中浓度在 0.5 ~ 400.0 mg/L 范围与峰面积线性关系良好,最低定量限为 0.5 mg/L ($S/N > 10$)。

2.3 精密度和准确度

吸取空白血浆 0.2 mL,按“2.2.1”项下方法配制成含 B4 的 1.0、50.0、100.0 mg/L 低、中、高浓度血浆样品。吸取空白肺组织匀浆液 0.3 mL,按“2.2.2”项下方法配制得含 B4 的 1.0、200.0 及 400.0 mg/L 低、中、高浓度肺组织样品;以上 2 组样品各进样 20 μ L、每个质量浓度平行制备 5 份样品、每个质量浓度连续进样 5 次,重复操作、连续进样 3 d、根据峰面积求算日内和日间精密度和准确度,结果见表 1。

表 1 B4 在血浆及肺组织中的精密度和准确度($n = 5$)

Tab. 1 Accuracy and precision of B4 in plasma and lung

样本	C (mg/L)	日内(%)		日间(%)	
		精密度	准确度	精密度	准确度
血浆	1.0	1.7	9.8	3.2	11.9
	50.0	0.4	1.4	3.8	-1.7
	100.0	0.6	-0.1	1.3	-1.6
肺组织	1.0	1.7	2.3	2.5	4.1
	200.0	0.3	-0.3	1.3	-3.0
	400.0	0.2	-0.1	1.0	0.5

2.4 回收率

按“2.3”项下方法配制得低、中、高浓度的含 B4 血浆样品(1.0、50.0 及 100.0 mg/L)和肺组织样品(1.0、200.0 及 400.0 mg/L),样品经 HPLC 测定,记录 B4 在血浆样品及肺组织样品中的峰面积 A1。另取空白血浆 0.2 mL、加入甲醇 1.2 mL、按“1.2.2”项下方法处理,氮气吹干后加入相应低、中、高浓度的 B4 甲醇标准液,取空白肺组织匀浆液 0.3 mL,加入甲醇 1.2 mL 按“1.2.2”项下方法处理,氮气吹干后加入相应低、中、高浓度的 B4 甲醇标准液,进样分析记录 B4 在血浆样品及肺组织样品中的峰面积 A2,按 $A1/A2 \times 100\%$ 计算提取回收率,结果见表 2。

表 2 B4 在血浆及肺组织中的回收率($n=5$)
Tab.2 Recovery rate of B4 in the plasma and lung of rats

样本	接入量 (mg/L)	回收率 (%)	精密度 (%)
血浆	1.0	106.9 ± 3.5	3.3
	50.0	101.1 ± 5.9	5.8
	100.0	97.8 ± 2.3	2.4
肺组织	1.0	113.5 ± 5.7	5.0
	200.0	107.0 ± 3.6	3.4
	400.0	103.4 ± 4.7	4.5

2.5 稳定性

按“2.3”项下方法配制得低、中、高浓度的 B4 血浆样品和肺组织样品,考察样品室温下放置 24 h 和样品反复冻融 3 次的稳定性,结果测得室温下 24 h 的稳定性 RE < 11%, 3 次冻融稳定性 RE < 13%。

2.6 B4 在大鼠体内药代动力学和肺组织分布

2.6.1 B4 在大鼠血药浓度及药代动力学参数测定

大鼠经气管滴注和尾静脉注射给药(剂量为 6 mg/kg,按 B4 的量计算)的平均血药浓度-时间曲线见图 2,结果表明 B4 经肺部给药后可以延长药物在体内的保留时间。数据用 DAS 2.1 软件处理,拟合药动学模型,计算药动学参数,最终确定 B4 在大鼠体内符合二室模型,药动学参数见表 3。

2.6.2 气管给药 B₄ 在大鼠肺中分布 大鼠经气管滴注给药(剂量为 6 mg/kg,按 B₄ 的量计算)后药物在肺组织中的分布情况见图 3。结果显示经过 24 h 的释放,肺组织中药物浓度仍为 125.5 μg/g。

3 讨论

有研究报道,采用如乙酸乙酯液液萃取法、乙

748

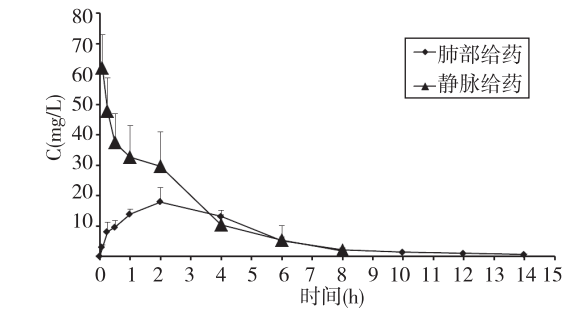


图 2 经肺部或尾静脉注射给药后 B4 在大鼠血浆中药物浓度-时间曲线($n=6$)
Fig.2 Mean plasma concentration-time curves of B4 in rats after intratracheal instillation and intravenous injection

表 3 B4 经肺部或尾静脉注射给药后 B4 在血浆中的药代动力学参数($n=6$)
Tab.3 Pharmacokinetic parameters of B4 after intratracheal instillation and intravenous injection

药代动力学参数	B4 给药	
	经气管滴注组	静脉注射组
$AUC_{0-\infty} [mg/(L \cdot min)]$	5 235.837 ± 873.304 ⁽¹⁾	7 481.886 ± 1 357.932
$AUC_{0-t} [mg/(L \cdot min)]$	5 010.875 ± 972.541	7 284.243 ± 1 337.280
$MRT_{0-\infty} (min)$	368.295 ± 32.719 ⁽²⁾	137.145 ± 18.244
$t_{1/2\alpha} (min)$	95.613 ± 12.405	101.837 ± 5.356
$t_{1/2\beta} (min)$	389.023 ± 46.241 ⁽³⁾	98.425 ± 10.371
$V (L/kg)$	0.237 ± 0.025	0.105 ± 0.027
$CL [L/(min \cdot kg)]$	0.001 ± 0.000	0.001 ± 0.000
$T_{max} (min)$	120.000 ± 0.000	/
$C_{max} (mg/L)$	16.475 ± 4.821	/

与静脉注射组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$, ⁽³⁾ $P < 0.001$

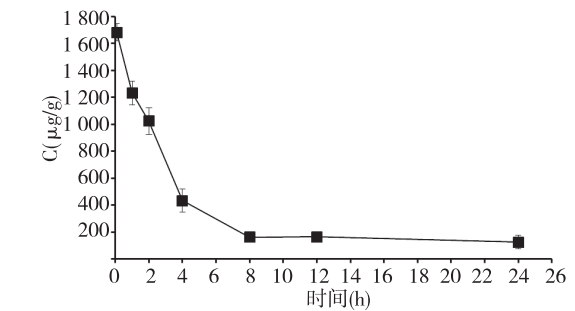


图 3 气管滴注给药后大鼠肺组织中 B₄ 浓度-时间曲线($n=3$)
Fig.3 Mean residual concentration-time curves of B₄ in lung of rats after intratracheal instillation

腈蛋白沉淀法、乙腈/甲醇混合蛋白沉淀法处理样品,但内源性物质仍对目标峰的测定产生干扰^[14-15]。而采用甲醇沉淀蛋白,氮气吹干后流动相复溶可以除去许多内源性物质的干扰,使得目标峰有效分离,提高方法灵敏度^[16]。B₄ 为水溶性药物,经口服给药其吸收差,而经肺部给药可以有效提高其在体内的吸收,增加生物利用度。课题组前期对 B₄ 在细胞学及药效学方面的研究,最终确定 B₄ 在大鼠体内的给药剂量为 6 mg/kg。本研究所制的雾化吸入剂其辅料均为生物相容的安全性物质,制剂可用于静脉注射。本研究通过对不同方式给药后,B₄ 的药代动力学规律及其在肺组织的分布研究,从图 2 可知通过尾静脉注射给药后,由于不存在吸收过程,药物迅速从血液中向外周分布,8 h 后血浆中未检测到药物;而气管滴注给药后,由于药物缓慢进入血液,2 h 时血药浓度达最高,之后缓慢消除,释放 14 h 后仍可在血浆中检测到药物,说明通过肺部给药可以延长药物在体内的保留时间。由图 3 可知通过气管滴注给药后,经过 24 h 的释放肺部药物浓度仍为 125.5 μg/g,表明经肺部给药后药物可滞留于肺部,缓慢渗入血液。通过软件 DAS 2.1 对药物经肺部给药和尾静脉给药后 B₄ 在血浆中药物浓度进行处理,结果显示,肺部给药组的 $t_{1/2\beta}$ 和 $MRT_{0-\infty}$ 分别是尾静脉给药组的 4.0 和 2.7 倍,而尾静脉给药组的 $AUC_{0-\infty}$ 为肺部给药组的 1.4 倍。以上结果充分说明经肺部给药后,药物在肺中积蓄,药物缓慢释放入血,延长在体内的保留时间。

4 参考文献

[1] 关颖丽,刘建宇,许永男. 白头翁属植物三萜皂苷及生物活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(1):80-84.
 [2] LI W, SUN Y N, YAN X T, et al. Isolation of nematocidal triterpenoid saponins from *Pulsatilla koreana* root and their activities against *Meloidogyne incognita* [J]. Mole-

cules, 2013, 18(5):5306-5316.
 [3] 陈振华,管咏梅,杨世林,等. 白头翁研究进展[J]. 中成药, 2014, 36(11):2380-2383.
 [4] 连姗,江蔚新,薛睿. 白头翁皂苷成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(2):35-38.
 [5] 张文远,卢磊. 白头翁醇提物对三硝基苯磺酸诱导大鼠结肠炎细胞免疫调节的研究[J]. 西部医学, 2009, 21(4):536-538.
 [6] SHU Z, CHEN Z, DING X J. Three new triterpenoids from *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel and their cytotoxic activities[J]. Heterocycles, 2011, 83(10):2365-2372.
 [7] 王海侠,郑新勇,郜尽. 白头翁皂苷 B₄ 体外抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖并诱导其凋亡[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2011, 31(10):1481-1485.
 [8] 李敏,方明治. 白头翁皂苷 B₄、粉防己碱对奥沙利铂耐药的结肠癌细胞的耐药逆转作用及其机制[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(1):38-44.
 [9] 罗颖颖. 白头翁皂苷抗肿瘤作用及机制研究[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2014.
 [10] 刘亚丽,宋永贵,关志宇,等. 白头翁皂苷在大鼠体内的肠吸收研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3):543-549.
 [11] 刘亚丽,宋永贵,魏韶锋,等. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 分析白头翁皂苷 B₃ 在大鼠肠道菌群中的代谢产物[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(23):72-76.
 [12] 王龙梅. 肺吸入他达拉非 PLGA 微球的研究[D]. 济南:山东大学, 2016.
 [13] 张志岳. 依托泊苷吸入微球剂的研究[D]. 济南:山东大学, 2012.
 [14] 何艳. 返魂草素吸入粉雾剂的研究[D]. 大连:大连医科大学, 2013.
 [15] 曾肖肖. 2-甲氧基雌二醇干粉吸入剂的研究[D]. 郑州:郑州大学, 2014.
 [16] 杨丽丽,汪电雷,陶秀华,等. 原儿茶酸在大鼠体内的药动学及组织分布[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(4):263-266.

(2018-05-10 收稿,2018-07-08 修回)
 中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅