

自动采样技术研究梓醇的药动学

武丽南^{1,2}, 陆 榕², 刘昌孝², 司端运^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 应用自动采样技术和传统采样方法对梓醇在大鼠体内的药动学进行研究, 比较两种采样方法对梓醇药动学参数的影响。**方法** 成年 Wistar 大鼠 12 只, 随机分为 2 组, ig 给予大鼠 100 mg/kg 梓醇供试品后不同时间点分别采用自动采样技术与传统手动采样方法收集大鼠血样, 经 LC-MS/MS 方法分析测得不同时间的血药浓度, 应用 DAS 2.0 计算程序、非隔室模型计算药动学参数并以单因素方差分析法对两种方法所得的药动学参数进行评价。**结果** 大鼠 ig 给予梓醇供试品 100 mg/kg 后, 两组试验的血药浓度数据的变化趋势高度一致, 两条平均药-时曲线趋势接近, 达峰时间分别为 1.5、1.0 h, $C_{\max}$ 相差 10% 左右, 计算所得各药动学参数单因素方差分析结果显示两组的各个参数均无显著差异。**结论** 采用两种方法收集的血样分析计算所得的梓醇在大鼠体内药动学特征基本相同。

关键词: 自动采样; 梓醇; 药动学

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)02-0099-04

Pharmacokinetics of catalpol by automated sampling

WU Li-nan^{1,2}, LU Rong², LIU Chang-xiao², SI Duan-yun²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. State Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Pharmacokinetics, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the pharmacokinetics of catalpol in rats by two different blood sampling techniques (manual sampling vs automated sampling) and compare the two methods on pharmacokinetics of catalpol. **Methods** Two different blood sampling techniques were used in two groups of rats after ig administration of 100 mg/kg catalpol. The plasma concentration of catalpol was determined by LC-MS/MS method. The main pharmacokinetic parameters were obtained by DAS 2.0 program and evaluated by Oneway ANOVA. **Results** After ig administration of 100 mg/kg catalpol to the rats, the concentration-time curves of both sampling techniques were similar, and the $t_{\max}$ were 1.5 and 1.0 h. $C_{\max}$ of automated sampling group was 10% higher than that of the manual sampling group. **Conclusion** The pharmacokinetic parameters of two groups are basically the same.

Key words: automated sampling; catalpol; pharmacokinetics

生物样品采集是在设定时间间隔内采集若干血样、尿样、粪样、胆汁、脑脊液等的过程^[1]。临床前的药动学、药效学研究和安全性评价必须进行动物实验, 其生物样品的采集和分析是重要环节。通过对生物样品的分析, 获得科学可靠的实验数据是进行新药研究的基础。然而随着科学技术的发展, 对高通量药物筛选以及药物临床前研究的速度和质量要求逐渐提高。目前在临床前药动学研究中, 从动物取样的传统方法主要有两种: (1) 按照设定的时间对同一动物连续人工取样; (2) 在每一设定时

间点处死动物后再取生物样品。无论哪种方法, 耗费人力的同时也不可避免地增加了结果的误差^[1-7]。近年来, 国外成功地设计和研制出一套动物实验的自动化采样系统, 并且将其应用于临床前药动学研究^[2-5]。

梓醇是地黄“滋阴”作用的主要活性成分^[8-9], 具有利尿、缓泻、降血糖、保肝及抗衰老等药理作用, 目前国内应用自动采样技术进行药物临床前药动学研究未见报道。本实验在已有文献基础上^[6-7,10], 应用 LC-MS/MS 法分析两种采样方法(自动采样和

收稿日期: 2011-12-05

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2010CB735602)

作者简介: 武丽南, 女, 硕士研究生, 研究方向为药动学。Tel: 13821370300 E-mail: wulinan327@163.com

*通讯作者 司端运, 男, 研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为药动学。Tel: (022)84845243 E-mail: ddysi@sohu.com

人工采样) 所得血样的梓醇浓度, 研究其在大鼠体内的药动学, 并比较两种采样方法所得药动学参数, 为自动采样技术的进一步评价及其在药物临床前研究的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器

梓醇供试品(青海央宗药业有限公司, 批号 20080228, 质量分数 92.5%), 梓醇对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110808-200508, 质量分数 99.5%), 桃叶珊瑚苷(aucubin)对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 111761-200601, 质量分数 99.5%); 甲醇、无水甲酸为色谱纯(天津康科德试剂有限公司), 超纯水为石英亚沸高纯水蒸馏器自制。清醒动物自动采样系统 AccuSampler (DiaLab 公司), TSQ Quantum Discovery MAX 液相色谱-质谱联用仪(美国 Thermo Finnigan 公司, 配有 ESI 源、Surveyor 输液泵、Surveyor 自动进样系统以及 Xcalibur 1.4 数据处理工作站)。DAS 2.0 计算程序(中国药理学学会数学药理专业委员会)。

1.2 实验设计

1.2.1 实验分组 本实验采用成年 Wistar 大鼠 12 只, 雌雄各半, 体质量 250~270 g, 中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供, 动物生产合格证 SCXK 津 2009-0001。在温度 20~22 °C, 相对湿度 45%~65%, 光照/黑暗 12 h/12 h 条件下饲养, 自由饮食、饮水, 适应性饲养一周后开始实验。随机分成 2 组(每组 6 只, 雌雄各半), 分别为自动采样组和人工采样组。

1.2.2 给药方案 精密称量梓醇供试品, 用生理盐水溶解后 ig 给药, 给药剂量为 100 mg/kg, 给药体积为 10 mL/kg。

1.2.3 采血方案 分别于 ig 给药前(0 h)、给药后 0.083、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、24 h 取血约 0.3 mL, 以肝素抗凝, 12 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆。

1.2.4 动物实验 自动采样组在实验大鼠经异氟烷麻醉后, 于药代实验前 48 h 行大鼠颈动脉置管手术, 术后所有大鼠都安置在自动采样仪的容器中恢复 2 d, 可以自由饮食。在动物恢复和实验期间, 通过设定的程序定时向留置导管中输入含肝素的生理盐水(每 20 min 输入 20 IU/mL), 在保持血容量稳定的同时保证了动脉导管的通畅。实验前禁食过夜, 给药前对动物进行麻醉(麻醉 1 min), 给药后按拟定

的采样方案实施动脉血定量的采集。人工采样组实验前禁食过夜, 给药后按采血方案(人工)眼眶后静脉丛采集血样。

1.3 血药浓度测定

1.3.1 LC-MS/MS 条件 Diamonsil® C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 25 °C; 流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液(30:70); 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 10 μL。电喷雾离子化电离源(ESI), 喷雾电压 4 500 V; 离子传输毛细管温度 320 °C; 鞘气和辅助气(氮气)压力分别为 2.76×10⁵、1.03×10⁵ Pa; 碰撞气(氩气)压力为 0.11 Pa; 扫描方式为选择反应监测(SRM), 用于定量分析的离子对分别为 m/z 380.0→183.0(梓醇), m/z 364.0→167.0(桃叶珊瑚苷), 碰撞能均为 15 eV; 扫描时间为 6.5 min。

1.3.2 血浆校正曲线 用甲醇配制 100 μg/mL 梓醇标准贮备液, 稀释成 0.01、0.02、0.1、0.5、2、10、20 μg/mL 梓醇系列标准液。用甲醇配制 100 μg/mL 内标(桃叶珊瑚苷)标准贮备液, 稀释至 2 μg/mL 内标标准溶液。棕色瓶配制, 4 °C 保存。肝素抗凝的大鼠血浆 100 μL, 加入 100 μL 梓醇系列标准溶液和 300 μL 内标, 涡旋振荡 15 s, 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 进样 10 μL, 进行 LC-MS/MS 分析。以浓度(X)与峰面积比(Y)进行直线回归($W=1/X^2$, W 为权重), 得到回归方程, 即血浆校正曲线。

1.3.3 血浆样品浓度测定 给药后肝素抗凝的大鼠血浆 100 μL, 加入 100 μL 甲醇和 300 μL 内标, 涡旋振荡 15 s, 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 进样 10 μL, 进行 LC-MS/MS 分析。计算梓醇与内标物的峰面积比, 参照血浆校正曲线, 应用 Xcalibur 1.4 数据处理工作站计算获得各时间血浆药物浓度。

1.4 药动学参数计算

血药浓度-时间数据应用 DAS 2.0 计算程序, 采用非隔室模型计算所有的药动学数据, 获得主要的药动学参数。

2 结果

2.1 大鼠血浆中梓醇定量分析

方法学确证结果显示, 在选定的色谱质谱条件下, 血浆中的内源性物质不干扰目标测定; 该方法的线性范围为 0.01~20 μg/mL, 代表性的校正曲线回归方程: $Y=9.12 \times 10^{-4} + 3.50 \times 10^{-4} X$ ($r=0.991$); 定量下限(LLOQ)为 0.010 μg/mL, 准确度在±20%

以内,精密度小于10.2%;高、中、低3个质量浓度(0.02、0.5、16 $\mu\text{g/mL}$)回收率为(87.7 $\pm$ 7.92)%;批内、批间精密度RSD<10%;处理后的梓醇血浆样品在进样器中放置24 h、血浆样品室温放置8 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融3次,稳定性均良好;样品高出定量上限浓度样品,稀释后准确度均在 $\pm$ 7.90%以内,精密度小于1.90%。应用建立的分析方法,测定未知样品药物浓度。绘制血药浓度-时间曲线见图1。大鼠ig给药100 mg/kg后,两组试验的血药浓度数据和平均药-时曲线的变化趋势一致。

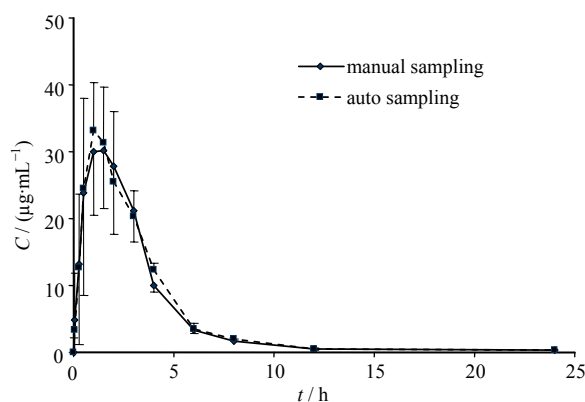


图1 大鼠ig给予梓醇100 mg/kg后两种采样方法的药时曲线比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 1 Plasma concentration-time curves of catalpol after oral administration of 100 mg/kg to rats sampled by two sampling methods ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.2 药动学参数

应用DAS 2.0药动学软件进行处理。采用非隔室模型计算所有的药动学数据,统计矩法计算AUC, $C_{\max}$ 和 $t_{\max}$ 按实测值计算,达峰时间分别为1.5、1.0 h, $C_{\max}$ 相差10%左右,获得的主要药动学参数见表1。单因素方差分析结果显示两实验组的各个参数无显著差异($P>0.05$)。

3 讨论

传统人工采样常在动物处于清醒状态或麻醉状态下操作。在清醒状态操作,动物受到刺激容易产生应激反应和疼痛感,从而导致各项生理指标发生变化,进而一定程度上影响实验数据的准确性;在麻醉状态取样,所得出的数据在某种程度上又不能反映正常生理状态下的真实情况,数据的科学性和真实性也受到质疑^[1-2]。应用自动采样系统收集生物样品,采样过程自动化,减少试验中人为因素的干扰;无刺激、无疼痛地采集动物的血浆样品,避免由于动物采样过程中的刺激或疼痛导致各项生理指

表1 大鼠ig给予梓醇100 mg/kg后手动采样组和自动采样组的药动学参数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Pharmacokinetics parameters of catalpol after ig administration of 100 mg/kg to rats sampled by two sampling methods ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	手动采样组	自动采样组
V/F (c)	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	2.72 $\pm$ 0.832	2.66 $\pm$ 0.574
$t_{1/2}$	h	2.15 $\pm$ 0.352	2.18 $\pm$ 0.497
CL (s)	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	0.877 $\pm$ 0.325	0.847 $\pm$ 0.414
AUC_{0-T}	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	112.0 $\pm$ 25.0	116 $\pm$ 20.3
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	114.0 $\pm$ 23.7	118 $\pm$ 19.5
MRT_{0-T}	h	2.69 $\pm$ 0.406	2.75 $\pm$ 0.393
$\text{MRT}_{0-\infty}$	h	2.85 $\pm$ 0.425	2.93 $\pm$ 0.412
$t_{\max}$	h	1.50 $\pm$ 0.341	1.00 $\pm$ 0.125
$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	30.2 $\pm$ 9.32	33.1 $\pm$ 6.21

标发生变化,对实验数据的准确性造成的影响;且对于同一个实验对象,可以一次性地获取多个药动学参数并能同时监测其生理行为,减少实验动物数量^[6-7]。但是,目前由于自动采样技术仪器成本和对手术质量的要求都很高,国内应用其进行的临床前药动学研究并不多。梓醇是口服给药治疗糖尿病的一类新药^[10],70%以上的药物以原型药的形式经尿液排泄,因此,梓醇可以认为是弱代谢型药物。在本实验室临床前药代研究中发现,如果将同一个体上连续采样所得到的血浆药物浓度与组织分布实验中相同时间点的血药浓度相比,它们之间有较大的差异,为了弄清这一差别是否由于大量失血造成,本实验以梓醇作为目标药物,对比两种方法对药动学参数的影响。

本实验建立分析方法时,桃叶珊瑚苷的结构与目标药物梓醇的结构相近,其质谱条件、色谱行为、回收率都与目标药物相近,且对目标药物的测定无干扰,故选择桃叶珊瑚苷作为内标。待测物梓醇和内标的结构式如图2所示。

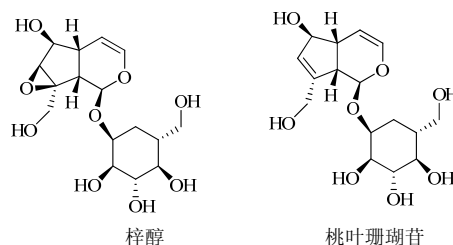


图2 目标药物(梓醇)和内标(桃叶珊瑚苷)的结构式

Fig. 2 Structures of target drug (catalpol) and IS (aucubin)

经典房室模型分析方法是经典药动学的基础,但房室模型带有较多理论假设,而且要确定哪种模型最佳常不可避免地带有随意性,当模型选择有差别时,得出的药动学参数差异很大。一种基于统计矩理论的分析方法被应用于药动学研究,此方法不依赖于动力学模型,故称非隔室分析^[11-12]。目前体内数据解析中非隔室模型已经成为主流处理方法,各国药品审评当局均推荐采用。所以,综合考虑以上原因,采用非隔室模型计算所有的药动学数据。

本实验结果表明,自动采样技术与传统手动采样方法研究梓醇药动学所得数据并无显著差异。然而有文献报道,应用两种采样方法研究卡马西平的药动学参数结果存在显著差异^[4-5],可能由于药物不同,采样方法对药物在动物体内的药动学影响有所差异。本实验为自动采样技术的研究及其在以后临床前研究过程的应用提供实验依据。

参考文献

- [1] 邓庆丽, 王小林, 蒋华芳, 等. 动物活体自动采样技术的应用和评价 [J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(8): 665-671.
- [2] Xie F, Wulster-Radcliffe M, Hilt R, *et al.* Determination of naringenin in rat plasma with the Culex automated blood sampler coupled with liquid chromatography/electrochemistry [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet*, 2004, 4(1): 29-35.
- [3] Tian F, Zhu Y, Long H, *et al.* Liquid chromatography coupled with multi channel electrochemical detection for the determination of daidzin in rat blood sampled by all automated blood sampling system [J]. *J Chromatogr B Anal-Techinol Biomed Life Sci*, 2002, 772(1): 173-177.
- [4] Zhu Y X, Chang H, Wulster-Radcliffe M, *et al.* Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of carbamazepine and its main metabolite in rat plasma utilizing an automated blood sampling system [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(1): 119-125.
- [5] Xie F, Bruntletti C S, Zhu Y, *et al.* Good preclinical bioanalytical chemistry requires proper sampling from laboratory animals: automation of blood and micro dialysis sampling improves the pro-activity of LC/MS/MS [J]. *Anal Sci*, 2003, 19(4): 479-485.
- [6] Peter S, Hampsch J, Cregor M, *et al.* Culex ABS Part I: Introduction to automated blood sampling [J]. *Cur Sep*, 2000, 18(4): 139-145.
- [7] Bohs C, Cregor M, Gunaratna G, *et al.* Culex automated blood sampler part II: Managing freely-moving animals and monitoring their activity [J]. *Cur Sep*, 2000, 18(4): 147-151.
- [8] 王 敏, 刘红彦, 黄璐琦, 等. 道地产区地黄不同品种含梓醇量的比较 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 444-446.
- [9] 邱建国, 贾正平, 张汝学, 等. 生地与熟地中糖类和梓醇的比较研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1117-1119.
- [10] Lu R, Gu Y, Si D Y, *et al.* Quantitation of catalpol in rat plasma by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(29): 3589-3594.
- [11] 韩国柱. 中草药药代动力学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1992.
- [12] 王广基, 刘晓东, 柳晓泉. 药物代谢动力学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.