

大鼠 ig 桦木酸的血浆药动学研究

杨玉焕¹, 霍 燃¹, 王子铭¹, 郭盛磊², 郑 健^{1*}

1. 东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 东北油田盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040
2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 用超高效液相色谱-质谱联用技术 (UPLC-MS/MS) 研究大鼠 ig 给药桦木酸的血浆药动学。方法 大鼠颈静脉插管后 ig 给予 250 mg/kg 的桦木酸棉籽油悬浊液 (100 mg/mL), 于给药前和给药后 0.08、0.17、0.33、0.5、1、2、4、6、8、12、24 和 48 h 时取血, 血液样品经醋酸乙酯提取, 对甲苯磺酰异氰酸酯 (PTSI) 柱前衍生化后, 采用 UPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中桦木酸的量。结果 桦木酸以 250 mg/kg 剂量大鼠 ig 给药以后, 桦木酸在 (1.2±0.4) h 达到最大血药浓度值 (158.5±26.8) ng/mL, 24 h 后基本检测不到。药时曲线下面积 AUC₀₋₂₄ 和 AUC_{0-∞} 分别为 (292.41±100.6) ng·h/mL 和 (331.45±113.3) ng·h/mL, 半衰期 ($t_{1/2}$) 和平均滞留时间 (MRT) 分别为 (3.8±1.4) h 和 (4.8±2.1) h。结论 UPLC-MS/MS 方法可成功用于经口给药桦木酸大鼠血浆药动学研究, 桦木酸的口服吸收极差。

关键词: UPLC-MS/MS; 桦木酸; 药动学

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2015)06-0629-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.06.009

Pharmacokinetic study of betulinic acid in rats after oral administration

YANG Yu-huan¹, HUO Ran¹, WANG Zi-ming¹, GUO Sheng-lei², ZHENG Jian¹

1. Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Key Laboratory of Saline-Alkali Vegetation Ecology Restoration in OilField, Ministry of Education, Harbin 150040, China
2. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, PR China

Abstract: Objective The pharmacokinetic study of betulinic acid in rat plasma after oral administration of betulinic acid was studied by UPLC-MS/MS. **Methods** The rats were orally administered with betulinic acid (100 mg/mL suspended in cottonseed oil) at the dose of 250 mg/kg after taken jugular vein cannulation. The blood samples were collected before administration and 0.08 h, 0.17 h, 0.33 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 24 h and 48 h after administration. The plasma sample was extracted with ethyl acetate and derivatized with *p*-toluenesulfonylisocyanate (PTSI), and the concentration of betulinic acid was determined using UPLC-MS/MS. **Results** After oral dosing, betulinic acid reached the maximum concentration of (158.5±26.8) ng/mL at (1.2±0.4) h, and could not be detectable after 24 h. AUC₀₋₂₄ and AUC_{0-∞} were (292.41±100.6) and (331.45±113.3) ng·h/mL, respectively. $t_{1/2}$ and MRT were (3.8±1.4) and (4.8±2.1) h, respectively. **Conclusion** The UPLC-MS/MS method is successfully applied to the pharmacokinetic study of betulinic acid in rat plasma. The absorption of betulinic acid is extremely low.

Key words: UPLC-MS/MS; betulinic acid; pharmacokinetic

桦木酸 (betulinic acid), 又称白桦酸、白桦脂酸, 是从白桦树皮和酸枣等植物中提取的一种羽扇豆烷型五环三萜类化合物^[1-2]。近年来的相关研究表明, 桦木酸具有显著的抗 HIV 活性, 并具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎、保肝、保护心血管和抗氧化等药理作用和生物活性, 是一种极具潜力的植物来源药

物^[3-6]。桦木酸的分子结构式见图 1。

液相色谱-质谱联用技术 (LC-MS/MS) 以液相色谱作为分离系统, 质谱作为检测系统, 样品在液相色谱和质谱部分经过分离和离子化, 经由检测器得到质谱图, 与分子结构信息具有更强的对应关系, 方法专属性更强, 灵敏度更高。由于桦木酸分子极

收稿日期: 2015-08-10

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (C201101); 黑龙江中医药大学优秀创新人才支持计划

作者简介: 杨玉焕, 学士, 副教授, 研究方向为药物代谢研究。Tel: (0451)82191247 E-mail: yuhuan570524@163.com

*通信作者 郑 健 Tel: (0451)82192185 E-mail: zhengjian@nefu.edu.cn

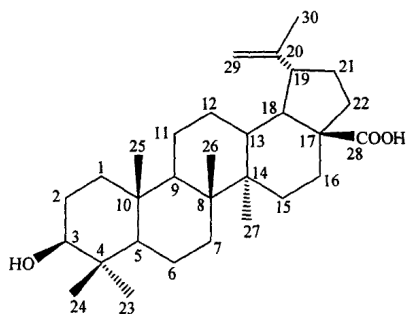


图1 桦木酸结构式

Fig. 1 Structure of betulinic acid

性低难电离,无法直接进行 LC-MS/MS 分析,口服给药后血药浓度测定困难^[7]。Hu 等^[8]通过建立桦木酸柱前衍生方法,实现了桦木酸的联用检测方法,比液相色谱的灵敏性更高,为口服给药桦木酸的血浆药动力学研究提供了方法基础。本研究旨在采用超高效液相色谱-质谱联用技术 (UPLC-MS/MS) 研究大鼠口服给药桦木酸的血浆药动力学规律,拟为评价桦木酸在体内的代谢规律提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

AcquityUPLC-MS 质谱系统,包括超高压液相系统和四极杆质谱仪 (美国 Waters 公司),超高压色谱柱 (美国 Waters 公司); WH-861 漩涡混合器 (江苏省太仓市科教器材厂); BL-310 电子天平 (德国 Sartorius 公司); Sorvall Legend Micro 17 离心机 (美国 Thermo 公司); 微量移液器 (200 μ L、1 000 μ L) (德国 Eppendorf 公司); MG-2200 金属恒温槽 (日本东京理化 Eylea)

1.2 试药

桦木酸 (质量分数 99%) 购自上海智化医药科技有限公司,对甲苯磺酰异氰酸酯 (PTSI, 质量分数 98%) 和色谱纯乙腈购自 Sigma 公司。色谱纯醋酸乙酯购自 Fisher Scientific 公司,水为超纯水。其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

SPF 级 Wistar 雄性成年大鼠,体质量为 200 $\pm$ 20 g,购于长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,合格证号为 SCXK (吉)-2011-0004。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[8]

Waters 高压液相-质谱仪联用系统,包括超高压液相色谱仪 Acquity UPLC 和串联四级杆质谱仪。

所用色谱柱为 Waters BEH 苯基柱 (1.7 μ m, 50 mm $\times$ 2.1 mm),柱温为室温,运行时样品保持在 4 $^{\circ}$ C。乙腈为流动相 A,5 mmol/mL 乙酸铵 (pH 3.5) 为流动相 B,体积流量为 0.25 mL/min,进样体积为 5 μ L,运行时间为 3 min。梯度洗脱条件见表 1。

表1 梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution conditions

时间/min	A/%	B/%
0	75	25
0.7	75	25
0.8	90	10
2.0	90	10
2.1	75	25
3.0	75	25

2.2 质谱条件^[8]

离子源为电喷雾电离 (ESI) 模式,采用负离子检测。扫描方式为多反应 (MRM) 检测模式。脱溶剂气为氮气,体积流量为 650 L/h,温度为 450 $^{\circ}$ C; 雾化气为氮气,体积流量为 50 L/h,电喷雾电压为 2.5 kV,锥孔电压设为 70 V,源温度为 150 $^{\circ}$ C。数据通过 Waters Masslynx V4.1 软件进行分析处理。桦木酸检测条件中的电离电压及锥孔电压条件设置见表 2。

表2 桦木酸的 ESI-MS/MS 参数

Table 2 ESI-MS/MS parameters of betulinic acid

分析物	前体离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	驻留时 间/s	锥孔电 压/V	碰撞能 量/eV
桦木酸	652.2 (定性)	455.3	0.105	70	55
	652.2 (定量)	195.9	0.105	70	45

2.3 桦木酸灌胃液的制备

称取桦木酸 500 mg,精密称定,加入到棉籽油 5 mL 中,研磨均匀,得到质量浓度为 100 mg/mL 的乳浊液,超声、涡旋使其混合均匀,4 $^{\circ}$ C 保存。ig 给药前需重新涡旋、超声,使其混合均匀。

2.4 血浆样品的采集

雄性 Wistar 大鼠颈静脉插管后第 2 天称量大鼠体质量,以 250 mg/kg 的剂量 ig 给予大鼠桦木酸棉籽油悬浊液 (100 mg/mL)。给药前取 300 μ L 空白血液;并分别于给药后 0.08、0.17、0.33、0.5、1、2、4、6、8、12、24 和 48 h 取约 300 μ L 血液,快速将血液加入到肝素处理过的离心管中,置于冰上

保存。将得到的血液样品在 4 °C 条件下 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 得到血浆样品-80 °C 冰冻保存备用。

2.5 样品处理

取给药后大鼠血浆样品 100 μ L 加入到 1.5 mL 离心管中, 加入 500 μ L 醋酸乙酯。涡旋 5 min, 15 000 r/min 离心 10 min。然后将上层醋酸乙酯移出, 40 °C N_2 气吹干。剩余的残留物加入 100 μ L 乙腈复溶, 涡旋混匀, 随后加 10 μ L 60% PTSD 的乙腈溶液衍生, 静置 3 min 使衍生反应完全, 加入 90 μ L 乙酸铵水溶液 (5 mmol/mL), 涡旋 30 s 终止反应。取上清 150 μ L 加入到内衬管中, 进液质进行分析。

2.6 方法专属性

取空白血浆、空白血浆加桦木酸 (5 ng/mL)、大鼠 ig 给药 250 mg/kg 桦木酸后 30 min 的血浆样品按“2.5”项下的样品制备方法制备样品后, 按照“2.1”和“2.2”项的色谱和质谱条件进行检测。结果表明, 色谱分离良好, 且血浆中内源性物质不干扰样品的测定, 该方法具有较高的专属性, 桦木酸的保留时间为 1.24 min, 色谱图见图 2。

2.7 标准曲线的制备

按照“2.5”项样品的处理方法, 制备标准曲线样品。以桦木酸的质量浓度为横坐标, 测得的桦木酸的峰面积为纵坐标, 采用加权最小二乘法进行回归运算, 得到标准曲线回归方程为 $Y=17.251X+33.425$, $r^2=0.9992$, 线性范围为 5~1 280 ng/mL。

2.8 血药浓度测定

根据标准曲线计算各时间点样品的血药浓度, 对给药后大鼠的血药浓度进行分析, 得到药物浓度-时间曲线 (图 3)。依据药动学计算软件 KineticaTM (version 5.0, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) 非房室模型的分析方法, 计算相应的药动学参数, 结果见表 3。

结果表明, 桦木酸以 250 mg/kg 剂量 ig 给药大鼠后, 在 (1.2 ± 0.4) h 达到最大血药浓度 (C_{max}) 值 (158.5 ± 26.8) ng/mL, 并在 24 h 以后 (即 24 h 和 48 h 时间点) 未能检测到桦木酸, 血药浓度较低。

3 结论

本文利用 UPLC-MS/MS 方法研究了大鼠 ig 给药桦木酸 250 mg/kg 后, 桦木酸在大鼠血浆中的药动学情况。结果显示, 桦木酸的半衰期 ($t_{1/2}$) 和平均滞留时间 (MRT) 均较短, 药时曲线下面积 (AUC_{0-24} 、 $AUC_{0-\infty}$) 及 C_{max} 均较小, 表明桦木酸的

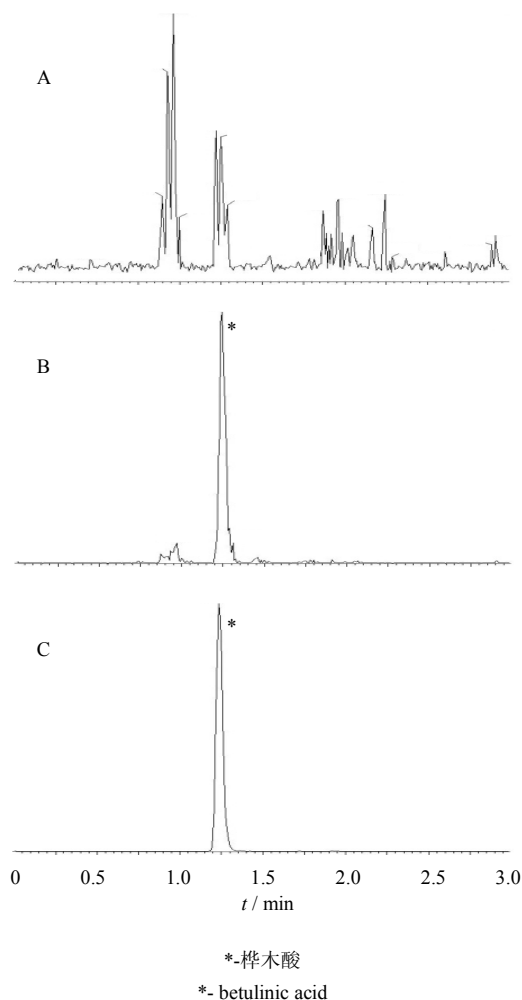


图 2 大鼠空白血浆样品 (A)、大鼠空白血浆加桦木酸 (5 ng/mL) 的样品 (B) 和大鼠 ig 给药桦木酸 250 mg/kg 后 30 min 的血浆样品 (C) 色谱图

Fig. 2 Chromatogram of blank plasma sample (A), blank plasma with betulinic acid sample (B), and plasma sample of rats after 30 min of ig administration with betulinic acid 250 mg/kg (C)

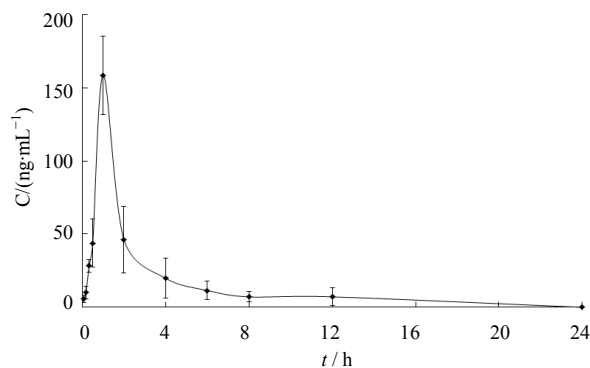


图 3 ig 给药 250 mg/kg 桦木酸后大鼠血浆中桦木酸的药物浓度-时间曲线

Fig. 3 Drug concentration time curve of betulinic acid in rat plasma after ig administration with betulinic acid 250 mg/kg

表3 250 mg/kg ig 给药后大鼠血浆中桦木酸的药动学参数

Table 3 Pharmacokinetic parameters of betulinic acid in rat plasma after ig administration with betulinic acid 250 mg/kg

参数	单位	数值
$C_{\max}$	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	158.5 ± 26.8
$t_{\max}$	h	1.2 ± 0.4
AUC_{0-24}	$\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	292.41 ± 100.6
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	331.45 ± 113.3
$t_{1/2}$	h	3.8 ± 1.4
MRT	h	4.8 ± 2.1

口服吸收率极差, 应考虑静脉注射或其他给药剂型进行给药。

参考文献

- [1] Eckerman C, Ekman R. Comparison of solvents for extraction and crystallization of betulinol from birch bark waste [J]. *Pap Puu-pap Tim*, 1985, 67: 100-1061.
- [2] Pakdel H, Népo Murwanashyaka J, Roy C. Extraction of betulin by vacuum pyrolysis of birch bark [J]. *J Wood Chem Technol*, 2002, 22(2-3): 147-155.
- [3] Pavel A K. Birch bark research and development [J]. *Nat Prod Rep*, 2006, 23: 919-942.
- [4] Alakurtti S, Mäkelä T, Koskimies S, *et al.* Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29(1): 1-13.
- [5] Recio M C, Giner R M, Máñez S, *et al.* Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas* [J]. *Planta Med*, 1995, 61(1): 9-12.
- [6] 易金娥, 邬静, 文利新, 等. 桦木酸的药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(14): 2118-2124.
- [7] Zhao G L, Yan W D, Dao C. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2007, 43: 959-962.
- [8] Hu Z W, Wang Z M, Liu Y, *et al.* Development and validation of a LC-ESI/MS/MS method via precolumn derivatization for the determination of betulinic acid in rat plasma. submitted.