

阿魏酸钠 Beagle犬血药浓度测定及药物动力学研究

周欣, 张敏新, 张晶, 宋洪涛(南京军区福州总医院药学科, 福建福州 350025)

摘要 目的: 建立阿魏酸钠血药浓度测定方法并进行阿魏酸钠片的体内药动力学研究。方法: 采用高效液相色谱法, 样品以甲醇处理, 以替硝唑为内标, 药物/内标峰高比定量。流动相为 0.1% 醋酸水溶液: 乙腈 (80: 20); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 320 nm。结果: 在血药浓度 0.04~25.0 μg/mL 范围内阿魏酸钠线性关系良好 ($r=0.9996$), 方法回收率为 94.0%~103.6%, 提取回收率 >70%, 日内、日间 RSD < 10%, 检测限为 4.12 ng/mL。阿魏酸钠片在 Beagle 犬体内的药动力学过程符合双隔室一级吸收模型, $t_{1/2(\alpha)} = (0.208 \pm 0.045)$ h, $t_{1/2(\beta)} = (2.228 \pm 0.927)$ h。结论: 本方法专属性好、灵敏度高, 适用于阿魏酸钠 Beagle 犬血药浓度测定及药动力学研究。

关键词 阿魏酸钠; Beagle 犬; HPLC; 药物动力学

中图分类号: R945 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)06-0451-04

Determination of plasma concentration of sodium ferulate by HPLC and study on its pharmacokinetics in Beagle dogs

ZHOU Xin, ZHANG Mingxin, ZHANG Jing, SONG Hongtao (Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China)

ABSTRACT **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography method for analysis of sodium ferulate in Beagle dog plasma and to study the pharmacokinetics of sodium ferulate tablets. **Methods** Sodium ferulate in plasma was extracted with methyl alcohol, separated on a Kromasil C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) and the peak height ratio of sodium ferulate to the internal standard tinidazole was measured. Plasma concentration of sodium ferulate was determined at 320 nm using 0.1% acetic acid solution: acetonitrile (80: 20) as the mobile phase and the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** Sodium ferulate was linear in the range of 0.04~25.0 μg/mL ($r=0.9996$). The recovery of sodium ferulate was in the range of 94.0%~103.6%. The absolute recovery was more than 70%. The relative standard deviations of intraday and interday were less than 10%. The minimum detectable concentration of sodium ferulate was 4.12 ng/mL. The plasma concentration-time curve of sodium ferulate oral tablet was found to be two-compartment model and $t_{1/2(\alpha)}$ was (0.208 ± 0.045) h, $t_{1/2(\beta)}$ was (2.228 ± 0.927) h. **Conclusion** The method is sensitive, specific for the quantitative determination of sodium ferulate in the plasma of Beagle dog. It is suitable for pharmacokinetics study of sodium ferulate.

KEY WORDS Sodium ferulate; HPLC; Beagle dog; pharmacokinetics

阿魏酸钠 (sodium ferulate) 化学名为 3-甲氧基-羟基桂皮酸钠, 为血管内皮保护剂, 具有抗氧化、清除自由基、松弛血管平滑肌以及抑制血小板的聚集等作用, 其片剂及注射剂已上市, 在临床上主要用于心、脑血管等疾病的治疗^[1]。

目前, 有关阿魏酸钠的体内药动力学模型及药动力学参数的文献较多, 但对其药动力学模型及半衰期等参数报道不一, 部分文献认为阿魏酸钠在体内呈单室模型, 其 $t_{1/2}$ 据报道从 29.78 min 到 5.824 h 不

等^[2-5]; 而有的文献报道阿魏酸钠在体内呈双室模型, 其 $t_{1/2(\alpha)}$ 从 3.4 min 到 41.5 min 不等, 而 $t_{1/2(\beta)}$ 值亦从 0.29 h 到 225 min 不等^[6-8]。甚至不同厂家市售的魏酸钠片及注射剂, 其说明书中的药动力学模型及药动力学参数也相差甚远。因此, 为了对阿魏酸钠新剂型的研发及临床应用提供相关依据, 笔者建立了阿魏酸钠 Beagle 犬血药浓度测定方法, 并以自制普通片为模型药物进行其药代动力学研究。

1 仪器及材料

1.1 仪器 1200型高效液相色谱仪: 1200四元泵、VWD紫外检测器、智能柱温箱、Chemstation色谱工作站 (美国安捷伦科技公司); FA1104电子天平 (上

作者简介: 周欣 (1977-), 女, 硕士, 主管药师。Tel (0591) 22859169; E-mail zibaohuan@ yahoo.com.cn

通讯作者: 宋洪涛。Tel (0591) 83712298; E-mail sohoto@ vip.sohu.com.

海民桥精密科学仪器有限公司); WH-3型涡旋混合器(上海沪西分析仪器厂有限公司); LD5-2A低速离心机(北京医用离心机厂); KDC-160HR高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司); 微量取样器 20~200 μL ; 100~1 000 μL (Fimnpipette Thermo Electron)。

1.2 试剂 阿魏酸钠对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0773-9910); 阿魏酸钠原料药(成都第一制药厂,批号 070823,含量 99.8%); 替硝唑对照品(成都科伦大制药,批号 060513,含量 99.9%); 阿魏酸钠片(自制,批号 081023,规格 300 mg/片); 色谱纯乙腈、色谱纯甲醇(SIGMA-ALDRICH公司); 其他试剂均为分析纯。

1.3 实验动物 Beagle犬 6只,雌雄各半,体重(15 \pm 3) kg 四川省简阳市简城比尔动物养殖场,合格证号: SCXK(川)2004-15。

2 方法与结果

2.1 阿魏酸钠体内样品分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil C18柱(200 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 保护柱为 Eclipse XDB-C18(12.5 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1% 醋酸水溶液:乙腈(80:20); 流速为 1.0 mL/min; 检测波长 320 nm; 进样量 20 μL ; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 以替硝唑为内标,药物/内标峰面积比定量。

2.1.2 溶液的配制 ①阿魏酸钠对照品储备液的配制:精取阿魏酸钠标准品适量于棕色量瓶中,双蒸

水溶解并定容,配制成 1.0 mg/mL的对照品储备液,放置于冰箱中避光保存备用。临用时用双蒸水稀释至所需浓度。②内标溶液的配制:精取替硝唑 30.1 mg于 100 mL量瓶中,甲醇溶解并定容,得到 301 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。再取 1 mL用蒸馏水稀释为浓度 30.1 $\mu\text{g/mL}$ 的内标液,用于测定生物样品中的阿魏酸钠。

2.1.3 样品的预处理 Beagle犬前肢静脉取血 2 mL置 EDTA抗凝管中,4 000 r/min离心 10 min,分离血浆备用。用微量加样器吸取犬血浆 260 μL ,置于 1.5 mL离心管中,加入内标液 40 μL ,涡旋混合 30 s,加入甲醇 600 μL ,于旋涡混合器上旋涡 1 min,以 10 000 r/min离心 10 min,取上清液 20 μL 进样作色谱检测。

2.2 阿魏酸钠体内样品分析方法的评价

2.2.1 方法专属性 取空白犬血浆 260 μL ,按“2.1.3样品的预处理”项下方法操作,在本试验建立的色谱分离条件下进行 HPLC分析,得到空白样品的色谱图图 1 A;将内标溶液及阿魏酸钠标准品加入空白血浆中,同法操作,得到相应的色谱图图 1 B;取 Beagle犬给药后收集的血浆样品,同法操作,得色谱图图 1 C。阿魏酸钠的保留时间为 8.68 min,内标替硝唑的保留时间为 6.03 min。药物峰和内标峰峰形良好,两峰分离良好。与空白生物样品的色谱图比较,证明在所用 HPLC条件下,生物样品中内源性物质不干扰阿魏酸钠的测定,可确保分析的准确性。

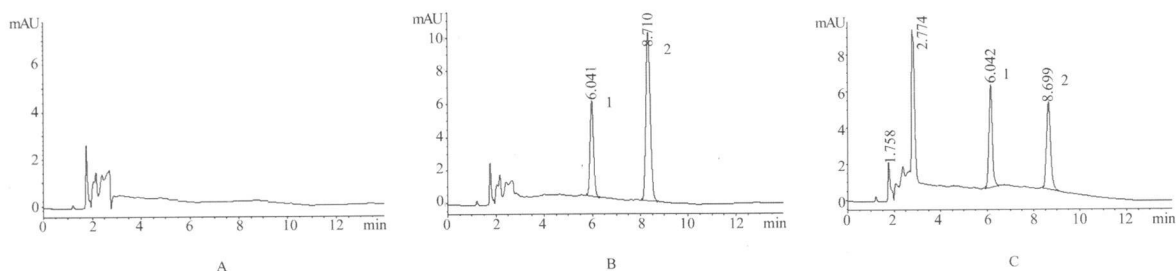


图 1 血浆中阿魏酸钠与内标物替硝唑的 HPLC 色谱图

A 空白血浆; B 空白血浆中添加替硝唑及阿魏酸钠标准品; C 给药后血浆样品图;

1 替硝唑; 2 阿魏酸钠

2.2.2 线性关系及检测限 取离心管分别加入空白犬血浆 260 μL ,然后各加入不同浓度的阿魏酸钠标准溶液,使其血浆药物浓度为 0.04、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 。分别加入替硝唑内标液 40 μL 。按上述血样预处理方法进行处理后进样,以阿魏酸钠血药浓度为横坐标,阿魏酸钠与内标物替硝唑的峰面积比为纵坐标,求得标准曲线回

归方程为 $Y = 0.44197X - 0.01482$, $r = 0.9996$ 。结果表明:在血药浓度 0.04~25.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内阿魏酸钠线性关系良好。以 $S/N \geq 3$ 为标准,测得本方法检测限为 4.12 ng/mL。

2.2.3 精密度试验 ①日内精密度:按照标准曲线项下操作方法,配制高、中、低 3 个浓度点的阿魏酸钠质控样品液,即 0.05、1.0、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 。每个浓度配

制 5份样品,于 1 d内测定其浓度(样品液应避免光保存),根据标准曲线方程计算实测浓度和标准差;②日间精密密度:配制高、中、低 3个浓度点的阿魏酸钠质控样品液各 5份于 5 d内分别进行测定。结果见表 1,结果表明本方法的日内、日间精密密度符合要求。

表 1 血浆中阿魏酸钠精密密度实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	日内		日间	
	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)	$\bar{x} \pm s$	RSD (%)
0.05	0.048 ± 0.003	6.25	0.052 ± 0.005	9.62
1.0	0.993 ± 0.048	4.83	0.987 ± 0.052	5.27
25.0	24.8 ± 0.972	3.92	25.6 ± 1.074	4.20

2.2.4 准确度试验 按照标准曲线项下操作方法,用空白血浆加阿魏酸钠标准液配制成高、中、低 3种已知药物浓度的阿魏酸钠样品液,每种浓度分别配制 5个样品,测定其峰面积比值,代入标准曲线方程计算,取均值。结果与实际浓度比较,计算方法回收率,结果表明本方法准确度符合要求,见表 2。

表 2 血浆中阿魏酸钠回收率实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

加入量 ($\mu\text{g/mL}$)	测定量 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	RSD (%)
0.05	0.047 ± 0.003	94.0 ± 6.00	6.38
1.0	0.988 ± 0.043	98.8 ± 4.30	4.35
25.0	25.9 ± 1.972	103.6 ± 7.88	7.61

表 4 血浆中阿魏酸钠稳定性实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

样品浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	室温避光		-20℃冷冻		血样冻融	
	测定量 ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	测定量 ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	测定量 ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)
0.05	0.047 ± 0.002	4.25	0.046 ± 0.002	4.35	0.047 ± 0.003	6.38
1.0	0.992 ± 0.027	2.72	0.990 ± 0.046	4.65	0.991 ± 0.048	4.84
25.0	25.8 ± 0.687	2.66	25.7 ± 0.766	2.98	25.7 ± 0.887	3.45

2.3 阿魏酸钠片药代动力学研究

2.3.1 给药方案与样品采集 实验前,Beagle犬禁食 12 h 在清醒状态下口服给予阿魏酸钠片 300 mg,给药 2 h后统一进食,并于不同时间静脉采血 2 mL,实验过程中 Beagle犬均处于活动状态。采血时间点如下:0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 h。样品预处理及含量测定均按上述方法操作。整个操作过程中待测样品均严格避光。

2.3.2 数据处理 将测得的 HPLC 数据代入每个分析批建立的标准曲线方程,计算各时间点血浆中阿魏酸钠的浓度。以时间为横坐标,血药浓度为纵坐标拟合药时曲线。将血药浓度数据输入计算机,利用 3P97 药动力学程序进行每一个体的血药浓度-时间数据分析,计算药动力学参数。以最小 AIC 值确定房室模型、选择权重系数进行拟合,得到药物在动物

2.2.5 提取回收率测定 按照标准曲线项下操作方法,用空白血浆加阿魏酸钠标准液配制成高、中、低 3种已知药物浓度的阿魏酸钠样品液,每种浓度分别配制 5个样品,测定其峰面积比值,代入标准曲线方程计算,取均值。其结果与未经样品处理(相同浓度标准液直接添加到处理过的血样中)浓度比较,计算方法回收率,结果表明本方法准确度符合要求,见表 3。

表 3 血浆中阿魏酸钠提取回收率实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

加入量 ($\mu\text{g/mL}$)	测定量 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)	RSD (%)
0.05	0.035 ± 0.003	70.1 ± 6.00	8.57
1.0	0.774 ± 0.037	74.4 ± 2.89	3.88
25.0	18.05 ± 1.110	72.2 ± 4.42	6.12

2.2.6 稳定性试验 按照标准曲线项下操作方法,用空白血浆加阿魏酸钠标准液配制成 0.05, 1, 25.0 $\mu\text{g/mL}$ 3种浓度的阿魏酸钠样品液,室温避光放置 0, 2, 4, 6 h,测定其峰面积比值,计算 RSD (%) 值;取上述 3种浓度阿魏酸钠血浆样品置 -20℃冰箱中保存,分别于 0, 3, 5, 10 d取出,测定其质量浓度,得血浆样品冷冻贮存的稳定性结果;取上述血样反复冻融 3次后测定其质量浓度,得血浆样品冻融稳定性结果。结果见表 4。

体内的处置特征。

2.3.3 实验结果 按照血浆样品的测定条件、方法测定阿魏酸钠片血药浓度,结果见表 5。图 2 显示了平均血浆药物浓度-时间曲线。由图可见,阿魏酸钠片单剂量口服给药后在 15~20 min 内血药浓度即达最高值,给药 5 h后血药浓度即降到定量限附近 [$(0.046 \pm 0.013) \mu\text{g/mL}$]。

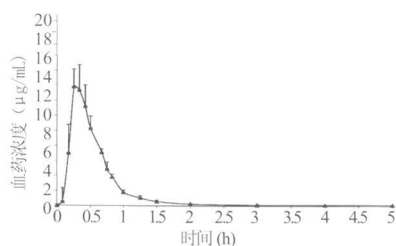


图 2 阿魏酸钠片单剂量口服给药后 Beagle犬平均血浆药物浓度-时间曲线

表 5 阿魏酸钠片药动学参数

参数	单位	$\bar{x} \pm s$	参数	单位	$\bar{x} \pm s$
A	($\mu\text{g/mL}$)	63.471 \pm 18.8	$t_{1/2(Ka)}$	(h)	0.113 \pm 0.011
α	(1/h)	3.447 \pm 0.629	K_{21}	(1/h)	0.418 \pm 0.247
B	($\mu\text{g/mL}$)	0.375 \pm 0.473	K_{10}	(1/h)	3.117 \pm 0.557
β	(1/h)	0.372 \pm 0.196	K_{12}	(1/h)	0.284 \pm 0.141
K_a	(1/h)	6.194 \pm 0.580	CL_s	(L/h)	41.117 \pm 6.360
Lag time	(h)	0.079 \pm 0.003	T peak	(h)	0.277 \pm 0.041
V/F(c)	(L)	13.244 \pm 4.048	C max	($\mu\text{g/mL}$)	15.840 \pm 3.373
$t_{1/2\alpha}$	(h)	0.208 \pm 0.045	AUC _{0-t}	[$\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})$]	9.064 \pm 1.700
$t_{1/2\beta}$	(h)	2.228 \pm 0.927	MRT	(h)	0.611 \pm 0.086

将阿魏酸钠片的血药浓度-时间数据用 3P97 程序进行拟合,并且运用矩计矩法计算 MRT、AUC_{0-t}等药动力学参数, t_{max} 及 G_{max} 以实测值表示,结果见表 5。结果表明: Beagle 犬单剂量给药后,自制阿魏酸钠片在 Beagle 犬体内的药动学过程符合双隔室一级吸收模型,权重为 $1/C^2$ 。

3 讨论

3.1 实验过程中对多种血样预处理方法进行摸索。曾试用血浆样品酸化后乙醚或醋酸乙酯提取等方法进行样品处理,虽然样品处理后较为干净且由于提取过程中样品浓缩可提高灵敏度,但其操作比较繁琐;本实验尝试血浆用乙腈、甲醇、高氯酸沉淀蛋白,结果发现:乙腈及高氯酸在本实验中对蛋白沉淀效果不佳,样品中有内源性杂质干扰阿魏酸测定;而用甲醇沉淀蛋白,可明显减少内源性物质对阿魏酸钠测定的干扰,操作简便、重复性好,并且由于其操作时间短及处理过程易避光,可避免阿魏酸见光分解,并经实验发现该方法灵敏度可以满足本研究测定需要,因此最终选用甲醇蛋白沉淀法处理血样。

3.2 生物药物分析的样品数量比较多,处理过程复杂,采用内标法对样品进行分析可以消除样品在预处理过程中操作不完全平衡一致时对分析结果造成的影响。本实验对内标的选择进行了考察,对香豆素、对羟基苯甲酸、替硝唑进行比较,发现选用替硝唑为内标时,提取率稳定,色谱峰分离良好,可满足测试需要。

3.3 由药代动力学参数可知,阿魏酸钠片 Beagle 犬口服给药后在其体内呈双隔室一级吸收模型,其中吸收相半衰期 $t_{1/2(Ka)} = 0.208 \pm 0.045 \text{ h}$,分布相的半衰期 $t_{1/2\alpha} = (0.208 \pm 0.045) \text{ h}$,说明阿魏酸钠在体内吸收及分布迅速,15 min 左右即达到血药浓度峰值;消除相的半衰期 $t_{1/2\beta} = (2.228 \pm 0.927) \text{ h}$,说明阿魏酸钠在体内消除较为迅速。

3.4 目前对阿魏酸钠药动学模型及半衰期等参数报道不一,部分文献认为阿魏酸钠在体内呈单室模

型,其 $t_{1/2}$ 据报道相差甚远:分别为 29.78 min (犬)^[2]、5.824 h (犬)^[3]、2.48 h (大鼠)^[4]、1.61 h (兔)^[5];而有的文献报阿魏酸钠在体内呈双室模型,其药动学参数也相差很大,如陈国广等报道阿魏酸钠在大鼠体内 $t_{1/2\alpha}$ 为 3.040 min, $t_{1/2\beta}$ 为 225.284 min^[6];在犬体内 $t_{1/2\alpha}$ 为 0.290 h, $t_{1/2\beta}$ 为 0.293 h^[7];在人体内 $t_{1/2\alpha}$ 为 41.543 min, $t_{1/2\beta}$ 为 91.005 min^[8]。其药动学模型及参数报道不一的原因,可能与实验动物种类及个体差异有关,与研究人员取样点的设计也有一定关系。本研究为了较为详实的反应阿魏酸钠体内的药动学过程,在预试验的基础上针对阿魏酸钠体内吸收分布快的特性,加大取样时间点的密度,所得药-时曲线能较为客观的反应其药动过程,对阿魏酸钠体内的药动力学有一定参考价值,为阿魏酸钠制剂今后的研发及临床应用提供相关依据。

参考文献:

- [1] 赵东平,杨文钰,陈兴福.阿魏酸的研究进展[J].时珍国医国药,2008,19(8):1840.
- [2] 何跃生,袁玲,曲树明.HPLC法测定阿魏酸钠在Beagle犬体内血浆浓度及药动学研究[J].天津医药,2007,35(9):687.
- [3] 何黎黎,张志荣,李立立.阿魏酸钠微孔渗透泵片的体内药动学与生物利用度[J].中国药学杂志,2007,42(4):295.
- [4] 杨翠平,曹俊岭,韩群英.HPLC法对参蛇偏瘫胶囊中阿魏酸的药代动力学研究[J].中医研究,2006,19(9):22.
- [5] 刘艳娟,杜智敏,王珍.乳腺丸中阿魏酸在兔体内的药动学研究[J].中草药,2006,37(4):527.
- [6] 陈国广,孟蕾,王永禄,等.当归补血汤中阿魏酸的药动力学研究[J].时珍国医国药,2006,17(5):744.
- [7] 徐术,胡晋红,李凤前.HPLC测定Beagle犬血浆中阿魏酸钠的浓度及其药代动力学研究[J].中成药,2005,27(9):1062.
- [8] 杨玉兴,黄熙,张航向,等.肝郁脾虚证患者口服加味逍遥散后血清阿魏酸药动学研究[J].北京中医药大学学报,2006,29(10):694.

收稿日期:2009-05-21