

HPLC/MS法研究左旋黄皮酰胺及其代谢物在 Beagle犬血浆中的药代动力学

宋 敏¹, 钱 文², 杭太俊¹, 张正行^{1*}

(1. 中国药科大学 药物分析教研室, 江苏 南京 210009; 2. 江苏省药品检验所, 江苏 南京 210008)

摘要: 目的 用 HPLC/MS法研究左旋黄皮酰胺 [(-)-clau]及其代谢物 6-羟基-黄皮酰胺 (6-OH-clau)在 Beagle犬血浆中的药代动力学过程。方法 Beagle犬灌胃左旋黄皮酰胺 30 mg·kg⁻¹,采集静脉血样,血浆经乙酸乙酯萃取分离后,用 HPLC/MS选择性正离子检测内标(格列吡嗪, [M+H]⁺, m/z 446)法测定左旋黄皮酰胺 ([M+H]⁺, m/z 298)及 6-羟基-黄皮酰胺 ([M+H-H₂O]⁺, m/z 296)的浓度,以甲醇-水-冰醋酸(60:40:0.8)为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹。用 3P97软件计算药代动力学参数。结果 左旋黄皮酰胺和 6-羟基-黄皮酰胺分别在 1.0~200 ng·mL⁻¹和 0.2~40.0 ng·mL⁻¹线性关系良好 (r>0.999),萃取回收率均大于 85%。原药及其代谢物的体内过程均符合二室模型;左旋黄皮酰胺及 6-羟基-黄皮酰胺的 C_{max}分别为 (21±10) ng·mL⁻¹和 (3.9±2.2) ng·mL⁻¹; T_{max}分别为 (0.8±0.5) h和 (1.3±0.5) h; T_{1/2α}分别为 (0.9±0.6) h和 (1.4±0.6) h; T_{1/2β}分别为 (19±23) h和 (13±12) h; AUC_{0-24h}分别为 (69±14) h·ng·mL⁻¹和 (12±7) h·ng·mL⁻¹。结论 Beagle犬灌胃左旋黄皮酰胺后迅速吸收,血药浓度一相消除很快,但末端消除较慢;其代谢物 6-羟基-黄皮酰胺血药浓度经时过程与左旋黄皮酰胺相似,但血药浓度相对较小。

关键词: 左旋黄皮酰胺; 6-羟基-黄皮酰胺; 药代动力学; 高效液相色谱 质谱法

中图分类号: R917.101 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2005)10-0940-05

Pharmacokinetics of (-)-clausenam ide and its major metabolite 6-hydroxyl-clausenam ide in Beagle dogs by HPLC/MS

SONG Min¹, QIAN Wen², HANG Tai-jun¹, ZHANG Zheng-xing^{1*}

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Jiangsu Institute for Drug Control, Nanjing 210008, China)

Abstract: Aim To establish a sensitive and accurate method to study the pharmacokinetics of (-)-clausenam ide [(-)-clau] and its major metabolite 6-hydroxyl-clausenam ide (6-OH-clau) in the plasma of the Beagle dog. **Methods** (-)-Clau was orally administered to six Beagle dogs at the dose of 30 mg·kg⁻¹, venous blood from front leg was sampled and plasma was separated for analysis. After extraction with ethyl acetate, the plasma samples were analyzed by HPLC/MS and the mobile phase was a mixture of methanol-water-acetic acid (60:40:0.8) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The API-ES positive ion SIM detection was carried out for the detection of both (-)-clau ([M+H]⁺, m/z 298) and 6-OH-clau ([M+H-H₂O]⁺, m/z 296) with glipzide (glip) ([M+H]⁺, m/z 446) as internal standard. The pharmacokinetic parameters were calculated by 3P97 software. **Results** There was good linear relationship (r>0.999) between the SIM responses and the concentrations for (-)-clau and 6-OH-clau at the range from 1.0 to 200 ng·mL⁻¹ and 0.2 to 40.0 ng·mL⁻¹, respectively. The absolute recovery was greater than 85%. The plasma concentration-time curves of (-)-clau and 6-OH-clau were both best fitted to a two-compartment model. The C_{max} of (-)-clau and 6-OH-clau were (21±10)

$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(3.9 \pm 2.2) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, T_{max} were $(0.8 \pm 0.5) \text{ h}$ and $(1.3 \pm 0.5) \text{ h}$, $T_{1/2\alpha}$ were $(0.9 \pm 0.6) \text{ h}$ and $(1.4 \pm 0.6) \text{ h}$, $T_{1/2\beta}$ were $(19 \pm 23) \text{ h}$ and $(13 \pm 12) \text{ h}$, $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ were $(69 \pm 14) \text{ h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(12 \pm 7) \text{ h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. **Conclusion** The established HPLC/MS method was sensitive and specific for the determination of (-)-clau. It was shown that the absorption and first phase elimination of (-)-clau were very quick in Beagle dogs, but the terminal elimination was very slow. The plasma concentration profile of its major metabolite 6-OH-clau was similar to (-)-clau and the AUC was relatively small in comparison with (-)-clau.

Key words: (-)-clausenam ide; 6-hydroxyl-clausenam ide; pharmacokinetics; HPLC/MS

黄皮酰胺是芸香科黄皮属植物黄皮 *Clausena lansium* (Lour.) Sheels 叶中提取分离得到的有效成分^[1], 有拮抗 $\text{A}\beta$ 神经毒性, 改善中枢胆碱系统功能等作用。其分子结构中含有 4 个手性碳原子, 左旋黄皮酰胺 [(-)-clausenam ide, (-)-clau] (图 1 a), 为 3*S*, 4*R*, 5*R*, 7*S* 构型, 有较好的促智作用。姚庆强等^[2] 已对黄皮酰胺在大鼠体内的药代动力学及代谢转化进行了系统研究。结果表明, (+) 和 (-) 黄皮酰胺在大鼠体内的代谢过程存在立体选择性, 而左旋黄皮酰胺在大鼠体内主要代谢为 6 羟基黄皮酰胺 (6-hydroxyl-clausenam ide, 6-OH-clau, 图 1 b)。

本文建立了左旋黄皮酰胺及其主要代谢产物 6 羟基黄皮酰胺的灵敏、准确的 HPLC/MS 测定法, 进一步对黄皮酰胺在 Beagle 犬血浆中的药代动力学过程和特点进行了分析研究。为临床研究提供参考依据。

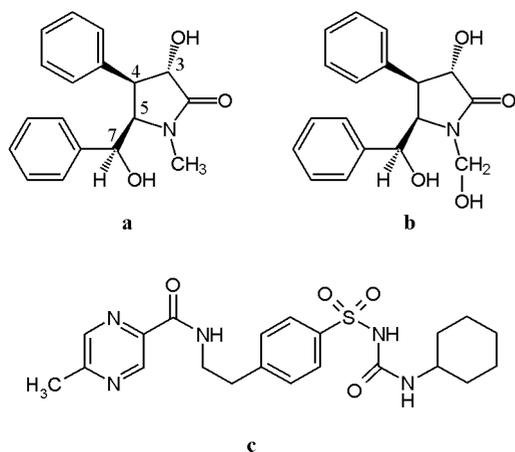


Figure 1 Structures of (-)-clausenam ide [(-)-clau] (a), 6-hydroxyl-clausenam ide (6-OH-clau) (b) and glipizide (glip, internal standard) (c)

材料与方法

药品与试剂 左旋黄皮酰胺 (批号: 030802, 含量: 99.6%), 6 羟基黄皮酰胺 (含量: 99.5%), 由中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所提供。

格列吡嗪: 化学对照品, 购自中国药品生物制品检定所。

甲醇: HPLC 试剂 (Merck); 乙酸乙酯、冰醋酸: 分析纯 (南京化学试剂厂); 纯净水: 自制二次重蒸水。

动物 Beagle 犬, 雌雄兼用, 体重 10.0 ~ 11.5 kg, 由南京医科大学动物实验中心提供, 许可证号: SYXK(苏) 2002-0013 号。

色谱-质谱联用系统条件 HP1100 HPLC/MS 液质联用系统 (美国安捷伦公司)。色谱柱: Shimpack-C₈ (150 mm × 4.6 mm ID, 5 μm), 预柱为 C₈ (10 mm × 2.0 mm ID, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸 (60:40:0.8); 流速: 1.0 mL · min⁻¹。API-ES 选择性正离子检测, 内标法测定左旋黄皮酰胺及其主要代谢物 6 羟基黄皮酰胺的浓度。检测离子: 格列吡嗪, $[M+H]^+$ m/z 446; 左旋黄皮酰胺, $[M+H]^+$ m/z 298; 6 羟基黄皮酰胺, $[M+H-H_2O]^+$ m/z 296。API-ES 工作参数: 干燥氮气温度 350 °C, 流量 10.0 L · min⁻¹, 雾化器压力 384 kPa, 裂解电压 70 eV, 毛细管电压 4 kV, 柱尾分流 (3:1)。

对照品溶液的配制

左旋黄皮酰胺对照品溶液 精密称取左旋黄皮酰胺约 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 100 μg · mL⁻¹ 的左旋黄皮酰胺贮备液; 精密量取贮备液适量, 以甲醇为溶剂, 定量稀释成 0.20, 2.0 和 20 μg · mL⁻¹ 左旋黄皮酰胺对照品溶液。

6 羟基黄皮酰胺对照品溶液 精密称取 6 羟基黄皮酰胺约 10 mg, 同上操作, 定量稀释成 0.01, 0.10 和 1.0 μg · mL⁻¹ 6 羟基黄皮酰胺对照品溶液。

格列吡嗪内标溶液 精密称取格列吡嗪约 12.5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 250 μg · mL⁻¹ 的贮备液; 精密量取贮备液适量, 以甲醇为溶剂, 定量稀释制成

2.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液, 作为内标溶液。

药代动力学试验设计 Beagle 犬 6 只 (雌雄兼用), 各灌胃 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 用温开水 10 mL 送服, 分别于给药前及给药后 10, 20, 30, 45 min 和 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 9.0, 10.0, 12.0, 24.0 h 从前肢皮下隐静脉取血, 置肝素抗凝处理过的试管中, 分离血浆, 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待测。Beagle 犬于受试的前晚起禁食, 于服药 4 h 后统一进食。

左旋黄皮酰胺灌胃液的配制 精密称取左旋黄皮酰胺 3.0 g, 置研钵中, 滴加 1 ~ 2 mL Tween-80 研磨均匀, 加入适量蒸馏水继续研磨成浑悬液, 用蒸馏水稀释至 100 mL 灌胃液, 供动物给药用。

血浆样品处理与分析 精密吸取血浆样品 0.2 mL, 置 10 mL 离心管中, 精密加入内标溶液 20 μL ($2.5\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 涡旋混匀 0.5 min, 加入乙酸乙酯 2 mL, 涡旋 3 min, $3\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分取上层有机相 1.6 mL, 于干燥 N_2 流 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 吹干, 残留物加入流动相 100 μL , 涡旋 2 min 使溶解, $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分取上清液, 取 10 μL 按上述 HPLC/MS 条件进行测定。样品分析色谱图见图 2。

药代动力学数据分析 采用 3P97 药代动力学程序计算药代动力学参数, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结果与讨论

1 血浆样品测定

1.1 提取溶剂选择 犬血浆中左旋黄皮酰胺和 6-羟基黄皮酰胺的含量均较低, 因此采用溶剂提取法进行分离浓缩较为适宜。文献^[3]报道用氯仿提取, 试验表明, 以乙酸乙酯进行提取杂质干扰少, 提取率高, 具有良好专属性。

1.2 线性范围及检测限 分别精密吸取左旋黄皮酰胺和 6-羟基黄皮酰胺对照品溶液适量, 置 10 mL 离心管中, 加入犬空白血浆 0.2 mL, 配制左旋黄皮酰胺质量浓度分别为 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50, 100 和 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 6-羟基黄皮酰胺质量浓度分别为 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0, 20.0 和 40.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列血浆样本, 按上述“血浆样品处理”方法, 自“精密加入内标溶液 20 μL ”起同样操作, 并进行色谱分析, 记录色谱峰面积 (A_s) 与内标色谱峰面积 (A_i)。以峰面积比 $R (R = A_s / A_i)$ 对浓度 (C , $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归。结果左旋黄皮酰胺血浆浓度在 $1.00 \sim 200\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好, $R = 0.011\ 07C + 0.008\ 49$, $r = 0.999\ 7$; 6-羟基黄皮酰胺血浆浓度在 $0.2 \sim 40.0\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好, $R = 0.013\ 11C + 0.008\ 498$, $r = 0.999\ 5$ 。以 $S/N = 3$

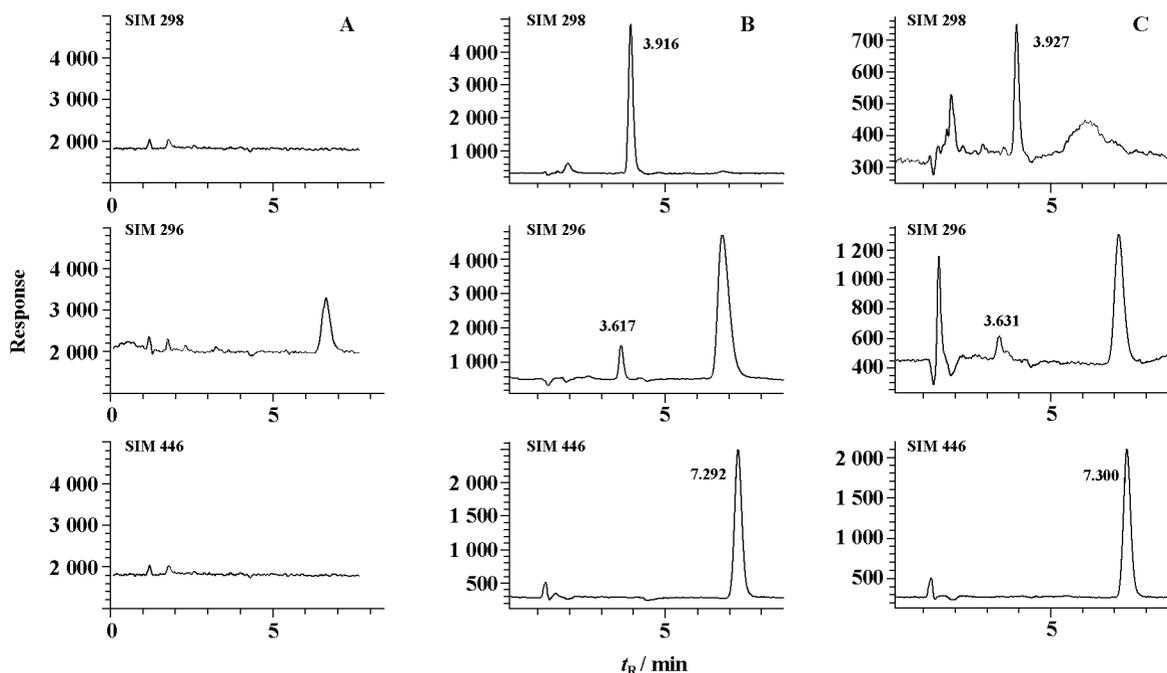


Figure 2 HPLC/MS chromatograms for determination of (-)-clau. A: Blank plasma; B: Blank plasma spiked with (-)-clau $100\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{\text{R}(-)\text{-clau}} = 3.9\ \text{min}$; 6-OH-clau $20.0\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{\text{R}6\text{-OH-clau}} = 3.6\ \text{min}$; glip $250\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{\text{R}glip} = 7.3\ \text{min}$; C: Plasma sample 2 h after ig (-)-clau $30\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in Beagle dog, $C_{(-)\text{-clau}} = 10.27\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{\text{R}(-)\text{-clau}} = 3.9\ \text{min}$; $C_{6\text{-OH-clau}} = 1.44\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{\text{R}6\text{-OH-clau}} = 3.6\ \text{min}$; $C_{glip} = 250\ \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{\text{R}glip} = 7.3\ \text{min}$

Table 1 Extraction recovery and precision of HPLC/MS method determining (-)-clau and 6-OH-clau in dog plasma ($n=5$)

Added/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	Extraction recovery		Within-day		Between-day		
	Found/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	Rec/%	Found/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	Found/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD/%	
(-)-Clau	5.00	4.8 \pm 0.2	96.8	5.5 \pm 0.5	8.4	5.2 \pm 0.4	3.5
	20.00	18.0 \pm 1.2	90.0	18.5 \pm 0.5	2.9	19.4 \pm 0.6	3.0
	200.00	193 \pm 10	96.3	200.09 \pm 0.09	0.04	200.09 \pm 0.14	0.07
6-OH-Clau	1.00	0.91 \pm 0.10	91.1	1.06 \pm 0.08	7.4	1.09 \pm 0.06	5.5
	4.00	3.57 \pm 0.20	89.2	3.84 \pm 0.12	3.1	3.91 \pm 0.07	1.8
	40.00	36.2 \pm 0.9	90.4	40.01 \pm 0.01	0.02	40.00 \pm 0.02	0.05

计算,左旋黄皮酰胺和 6-羟基黄皮酰胺的最低检测浓度分别为 0.6 和 0.2 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.3 回收率和精密度 左旋黄皮酰胺和 6-羟基黄皮酰胺的萃取回收率和精密度结果见表 1,结果表明平均萃取回收率均大于 85%,日内和日间测定的 RSD 均小于 10% ($n=5$),取测定精密度的样本结果计算方法回收率,为 97.3% ~ 103.4%。可见,本方法的回收率和精密度符合药代动力学研究的要求。

1.4 稳定性考察 按“线性范围”测定方法配制含有左旋黄皮酰胺 5.00, 20.0 和 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 种不同浓度的血浆样本,并分别于 -20°C 冻融 1 ~ 5 次。按上述“血浆样品处理与分析”同样测定。测得左旋黄皮酰胺与内标的色谱峰面积比 (A_s/A_r),并计算其 RSD%,结果 3 种浓度的样品测定的 RSD% 分别为 14.6%, 9.1% 和 1.3%,表明本血浆样品冻融 5 次仍稳定。

2 Beagle犬药代动力学

Beagle犬 6 条,灌胃左旋黄皮酰胺 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的平均血浆药物浓度-时间曲线见图 3A。结果表明,给药后 1.0 h 内左旋黄皮酰胺达到最高血药浓度,随后浓度迅速下降,约 3 h 后下降趋于平缓,24 h 消除至 (0.8 \pm 0.7) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

6-羟基黄皮酰胺的平均血浆药物浓度-时间曲线见图 3B。结果表明,给药左旋黄皮酰胺 1.0 h 后其代谢物 6-羟基黄皮酰胺产生并达到最高血药浓度,约 4 h 后下降趋于平缓,在 10 h 时血药浓度稍有回升,这是由于肝肠胆循环导致化合物再次吸收所致。

采用 3P97 软件进行药代动力学参数计算,以 AIC 判别房室模型,结果表明 Beagle犬灌胃左旋黄皮酰胺 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后,左旋黄皮酰胺及其代谢物 6-羟基黄皮酰胺的药时曲线均符合二房室模型,其药代动力学参数如表 2 所示。

Beagle犬灌胃左旋黄皮酰胺后迅速吸收,血药浓度一相消除很快,但末端消除较慢;其代谢物 6-

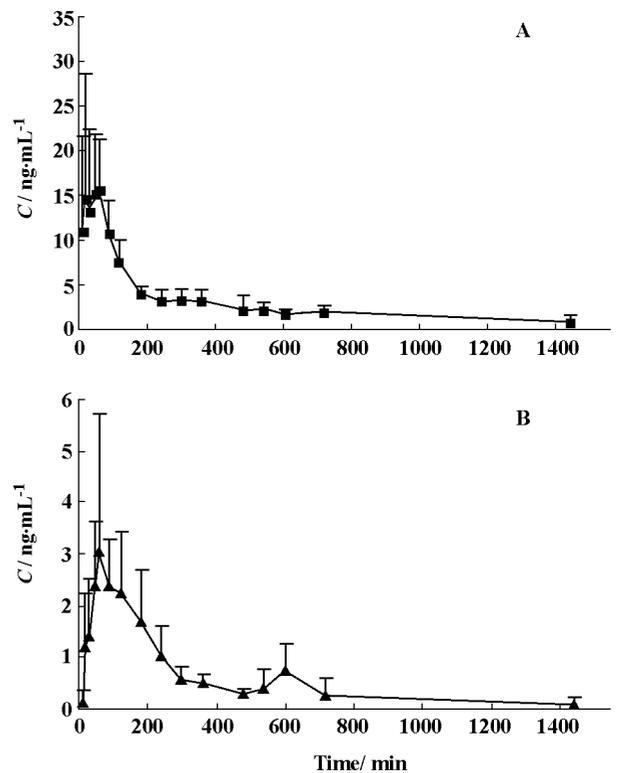


Figure 3 Mean plasma concentration-time curve after single dose of (-)-clau 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in Beagle dogs ($n=6$). A: (-)-Clau; B: 6-OH-Clau

Table 2 Pharmacokinetic parameters of (-)-clau and 6-OH-clau after single dose of (-)-clau 30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in Beagle dogs ($n=6$)

Parameter	(-)-Clau	6-OH-Clau
$A/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	27 \pm 19	5 \pm 4
$B/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	5 \pm 4	0.6 \pm 0.9
$T_{1/2\alpha}/\text{h}$	0.9 \pm 0.6	1.4 \pm 0.6
$T_{1/2\beta}/\text{h}$	19 \pm 23	13 \pm 12
$V/L \cdot \text{kg}^{-1}$	179 \pm 75	1473 \pm 524
K_{21}/h^{-1}	0.3 \pm 0.3	0.3 \pm 0.3
K_{10}/h^{-1}	0.20 \pm 0.20	0.30 \pm 0.10
K_{12}/h^{-1}	0.6 \pm 0.3	0.20 \pm 0.20
$CL/L \cdot \text{min}^{-1}$	7 \pm 4	75 \pm 30
$AUC_{0-24\text{h}}/\text{h} \cdot \text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	69 \pm 14	12 \pm 7
T_{max}/h	0.8 \pm 0.5	1.3 \pm 0.5
$C_{\text{max}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	21 \pm 10	3.9 \pm 2.2

羟基-黄皮酰胺血药浓度经时过程与左旋黄皮酰胺相似,但是血药浓度相对较小,其 AUC_{0-24h} 仅约为原药的 18.1%。

朱传江等^[3]曾对左旋黄皮酰胺及其代谢物在大鼠体内的药代动力学过程进行了研究,结果显示大鼠在尾静脉注射 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左旋黄皮酰胺后,原药及代谢物 6-羟基-黄皮酰胺均呈现二房室模型消除,其 $T_{1/2\alpha}$ 分别为 $(0.20 \pm 0.03) \text{ h}$ 和 $(0.30 \pm 0.05) \text{ h}$, $T_{1/2\beta}$ 分别为 $(2.6 \pm 0.3) \text{ h}$ 和 $(4.0 \pm 0.8) \text{ h}$ 。

与大鼠尾静脉注射左旋黄皮酰胺 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后所测得的药代动力学数据相比^[3],Beagle 犬灌胃左旋黄皮酰胺 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后原药及其代谢物的 $T_{1/2\alpha}$ 和 $T_{1/2\beta}$ 都明显增长。

致谢:中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所张均田研究员、王慕邹研究员和屈志炜副研究员在试验设计和药品提供方面均给予指导帮助。

References

- [1] Yang MH, Cao YH, Li WX, *et al.* Isolation and structural elucidation of clausenam ide from the leaves of *Clausena lansium* (Lour.) Skeels [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1987, **22**(1): 33 - 40.
- [2] Yao QQ, Wang Y, Yang SM, *et al.* Biotransformation of (+)- and (-)-clausenam ide in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, **36**(3): 224 - 228.
- [3] Zhu CJ, Zhang JT, Qu ZW. Determination of plasma concentration of (-)-clau and 6-OH-clau in rats by HPLC and their pharmacokinetics [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2000, **35**(7): 500 - 504.