文章编号:1000-5404(2006)21-2171-03

论著

八宝素的组织分布和排泄研究

刘颖菊[1,2],尚京川[2,3],高丽佳[1,2],周丽平[2,3],母昭德[2,3],何颖娜[2,3] (重庆医科大学:[1]药理学教研室,[2]重庆市生物化学与分子药理学重点实验室,[3]化学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 研究八宝素(Hylotelephin)的组织分布和排泄,为临床试验提供依据。**方法** 用HPLC紫外检测法,以蒽为内标,苯甲酰氯为衍生剂,甲醇-水为流动相,测定静脉注射八宝素后生物样品中的药物含量。**结果** Beagle犬静脉注射八宝素10.6 mg/kg后5 min药物已迅速分布到各组织;药后90 min大部分组织中药物含量明显低于5 min时的含量。药物主要分布在肾、肝和脾组织,其次在心、肺、肠等组织中。肾、肝和脾中的药物含量与相同时间的血浆药物浓度接近。大鼠静脉注射八宝素36 mg/kg后从尿、粪和胆汁(0~48 h)中排泄的原型药物分别占给药总量的88.45%,0.61%和1.08%;给药后3 h 67%药物已从体内排出。**结论** 八宝素在Beagle犬体内分布和排泄较快,药物主要分布在肾、肝、脾和血浆等组织中,主要以原型药物方式由尿液排泄。

关键词:八宝素;组织分布;排泄;高效液相色谱法
中图法分类号:R914.4;R969.1 **文献标识码**:A

Tissue distribution and excretion of Hylotelephin

LIU Ying-ju[1,2], SHANG Jing-chuan[2,3], GAO Li-jia[1,2], ZHOU Li-ping[2,3], MU Zhao-de[2,3], HE Ying-na[2,3] ([1]Department of Pharmacology, [2]Key Laboratory of Chongqing Biochemistry and Molecular Pharmacology, [3]Department of Chemistry, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate tissue distribution of Hylotelephin in Beagle dogs and excretion of Hylotelephin in rats. **Methods** A high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection was developed to study the concentrations of Hylotelephin in biological samples, taking anthracene as an internal standard, Benzoyl chloride as the pre-column derivatization of Hylotelephin and methanol-water as the mobile phase. **Results** After a single intravenous dose of 10.6 mg/kg Hylotelephin in beagle dogs, parent drug was widely distributed to virtually all tissues in 5 min and the concentration of Hylotelephin in most tissues at 90 min were lower than those at 5 min obviously. Hylotelephin was mainly distributed in kidney, liver and spleen, secondly in heart, lung and intestine. The parent drug concentration in kidney, liver and spleen was similar to that in blood at the same time point. After a single intravenous dose of 36 mg/kg Hylotelephin in rats, the excretion of the parent drug in urine, feces and bile amounted to 88.45%, 0.61% and 1.08% of the dose, respectively. The parent drug excretion amounted to 67% of the dose in 3 h. **Conclusion** Hylotelephin was distributed and eliminated in Beagle dogs rapidly. It was mostly distributed in kidney, liver, spleen and plasma. The parent drug excretion was 88% *via* urine.

Key words: Hylotelephin; tissue distribution; excretion; HPLC

八宝素(Hylotelephin)是一种从景天科植物八宝或瓦松等全草中提取、分离得到景酮糖酐,再与丙酮进一步缩合得到的化合物,其化学名称为异丙叉景酮糖酐(isopropylidene sedoheptuiosan),具有抗鸭乙型肝炎病毒的作用,是正在开发的Ⅰ类新药[1,2]。为全面了解八宝素在动物体内的动态变化规律和特点,我们在进行了药物代谢动力学研究后,再进一步研究药物的组织分布和排泄,为临床试验提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

八宝素(异丙叉景酮糖酐)标准品及受试药物,由广东省大日生物化学药业有限公司提供,批号0303241。蒽、苯甲酰氯、氢氧化钠、盐酸为分析纯,乙腈、甲醇为色谱纯,实验用双蒸水

作者简介:刘颖菊(1963-),女,四川省德昌县人,博士,副教授,主要从事神经药理和新药临床前药动学方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68485038, E-mail: liuyingjbh@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-11-30;修回日期:2006-01-20

经0.45 μm滤膜过滤。

1.2 实验动物

Beagle犬12只由四川省医学科学院实验动物中心提供，合格证为：医动字第24103123号，体质量为9～12 kg。Wistar大鼠10只由重庆医科大学实验动物中心提供，合格证为：医动字第24104212号，体质量为180～220 g，鼠龄90～100 d。

1.3 主要仪器

Agilent1100高效液相色谱仪配紫外检测器及色谱数据处理系统（美国安捷伦公司）。超纯水器（Milli-Q plus，USA，Millipore公司）；微孔滤膜及过滤装置（USA，Millipore）。

1.4 生物样品中八宝素的测定方法

1.4.1 色谱条件 Eclipse XDB C_8（4.6×150 mm，5 μm）色谱柱，ODS-C_{18}固相萃取柱（200 mg，3 ml）（美国安捷伦公司）；流动相：甲醇－双蒸水62∶38（组织）或66∶34（尿，胆汁，粪）；流速：1 ml/min；柱温：35 ℃；紫外检测波长：232 nm；进样量：30 μl。

1.4.2 生物样品的处理 参考关于糖及糖醇[3-5]的HPLC分析方法，建立组织、尿、粪及胆汁中药物浓度测定方法。取25%组织匀浆，3 000 r/min离心10 min，取上清液0.4 ml加入0.8 ml乙腈（含内标：蒽2 μg）和100 μl双蒸水，混旋1 min，超声10 min，12 000 r/min离心15 min。取上清液加入4.0 mol/L NaOH 0.5 ml，混匀后加入苯甲酰氯10 μl，混旋1 min后40 ℃水浴30 min。用4.0 mol/L盐酸中和后加入双蒸水3 ml，混匀上C_{18}固相萃取柱（预先用3 ml甲醇和3 ml双蒸水过柱），然后用15 ml双蒸水和15 ml 15%甲醇液冲洗，收集0.6 ml甲醇洗脱液，混匀取30 μl进样，记录八宝素衍生物和内标的峰面积。采用内标标准曲线法以峰面积比值定量。另按同法进行尿液、胆汁、粪上清液（50%粪匀浆3 000 r/min离心10 min）药物浓度测定。

1.5 组织分布试验

取Beagle犬10只，分2组，具体比例（2∶3），八宝素单次静脉注射10.6 mg/kg，于给药后5 min、90 min分别用3%戊巴比妥钠麻醉后处死，立即取出脑、心、肺、肝、肾、脾、胃、小肠、肌肉、脂肪、卵巢、睾丸等组织（对称取样），用双蒸水做成25%组织匀浆。以不给药的相应组织匀浆作为空白对照。

1.6 排泄试验

1.6.1 尿粪排泄 取大鼠5只，雌雄搭配，置入代谢笼中，收集给药前尿和粪作为空白对照；然后一次尾静脉注射36 mg/kg八宝素。收集给药后0～48 h的尿和粪。

1.6.2 胆汁排泄 大鼠5只，3%戊巴比妥钠麻醉后做胆管引流术，收集给药前胆汁作为空白对照；然后单次尾静脉注射36 mg/kg八宝素，收集给药后0～48 h的胆汁。

1.7 统计学分析

实验数据用$\bar{x}\pm s$表示，采用SAS 8.0统计软件，进行组间均数t检验。

2 结果

2.1 八宝素的光谱特征

在本色谱条件下，八宝素和内标（蒽）的保留时间：在组织样品中分别为9.65和15.72 min，在尿液、粪和胆汁中分别为6.52和10.64 min。

2.2 标准曲线

将稀释的八宝素工作标准溶液加入空白组织匀浆中，使药物浓度分别为2.5、5.0、12.5、25.0和50 μg/ml，以药物浓度（C）与峰面积比值（Sy/Sn，八宝素的峰面积/内标峰面积）进行直线回归，组织匀浆中药物浓度在2.5～50 μg/ml之间，峰面积比值与药物浓度呈线性关系。测定肝、肾、脾等组织的标准曲线分别为：

肾组织：C＝－0.045 2＋21.789 Sy/Sn（r＝0.999 6）

肝组织：C＝0.624 3＋20.591 Sy/Sn（r＝0.999 6）

脾组织：C＝0.047 9＋19.942 Sy/Sn（r＝0.999 1）

尿、粪、胆汁标准曲线与组织标准曲线的制备方法相同，结果如下：

尿：C＝－94.319＋2 094 6 Sy/Sn（100～8 000 μg/ml，r＝0.999 4）。胆汁：C＝－0.229 6＋19.926 Sy/Sn（4.0～200.0 μg/ml，r＝0.999 3）。粪：C＝0.448 3＋23.856 Sy/Sn（2.5～50 μg/ml，r＝0.999 8）。

2.3 回收率、精密度和稳定性测定

八宝素的检测限为0.1 μg/ml。八宝素在5.0、200.0和8 000.0 μg/ml，3个浓度范围内的平均相对回收率在91.4%～105.9%。日内精密度和5 d的日间精密度，RSD在0.65%～6.78%。经样品冻融分析，其测定准确度在90.5%～105.9%。

2.4 组织分布

Beagle犬单次静脉注射八宝素10.6 mg/kg后5 min药物已迅速分布到各组织，90 min时药物在大多数组织中含量较5 min时的明显降低。两时间点均是肾组织药物含量最高，其次为肝、脾、心、肺、肠等，肾、肝和脾组织中的药物含量与相同时间的血浆药物浓度接近（表1）。

表1 八宝素10.6 mg/kg单次静脉注射后在比格犬体内的组织分布（μg/g，n＝5，$\bar{x}\pm s$）

组织	注射后时间（t/min）	
	5	90
脑	2.0±0.3	1.9±0.9
心	7.7±1.5	3.2±1.6[b]
肺	6.0±1.7	1.74±0.21[b]
肝脏	17.0±4.0	6.3±1.7[b]
肾	18.1±2.6	6.9±0.7[b]
脾	11.1±1.1	5.8±1.1[b]
胃	4.5±2.8	2.1±0.7[a]
肠	6.1±2.0	2.5±1.7[b]
肌肉	3.4±1.7	2.7±0.5
脂肪	6.4±2.1	0.0[b]
生殖腺	3.9±0.7	4.0±1.9
血浆	12.39±0.19	6.1±0.7[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与注射后5 min比较

2.5 尿、粪和胆汁排泄

大鼠一次静脉注射八宝素36 mg/kg后0～48 h，八宝素主要以原型通过尿液排泄，排泄量占给药总量的88.45%，排泄

的高峰在给药后前 3 h。只有少量药物通过粪便和胆汁排泄，仅分别占给药总量的 0.61% 和 1.08%（表 2）。

表 2　八宝素 36 mg/kg 单次静脉注射后在大鼠体内通过尿粪和胆汁的排泄（$n=5$，%，$\bar{x}\pm s$）

时间（t/h）	尿	粪	胆汁
1 - 3	67 ± 8.0	-	0.69 ± 0.07
3 - 6	8.3 ± 1.8	-	0.24 ± 0.04
6 - 12	7.0 ± 2.1	0.12 ± 0.05	0.12 ± 0.03
12 - 24	5.7 ± 1.4	0.16 ± 0.03	0.025 ± 0.004
24 - 48	0.45 ± 0.11	0.33 ± 0.10	0.005 ± 0.003

3　讨论

本研究首次利用 HPLC 方法，通过与苯甲酰氯的衍生反应，以甲醇-水作为流动相测定八宝素在组织和尿等样品中的浓度。由于样品不同，流动相甲醇-水的比例有一定差异，故八宝素与内标蒽在不同生物样品中的保留时间分别有一定变化，但特异性仍较好，平均回收率为 95.40% ~ 103.2%。该方法操作简便，精密度及重现性均较好，能满足药代动力学研究的要求[6]。八宝素为糖类化合物，在正常的紫外区域和可见光范围没有吸收，也无荧光，只能采用示差折光检测器直接检测。但是示差折光检测器的灵敏度较低，并易受温度及溶液浓度变化的影响，且不适用于梯度洗脱。为了解决糖类的检测问题，发展了柱前、柱后衍生化的方法，即样品在柱前或柱后制备成各种衍生物，这些衍生物或对紫外线敏感，或具有荧光吸收，使用紫外线或者荧光检测，其灵敏度与示差折光检测相比有很大提高[7,8]。本实验中八宝素浓度在 100 μg/ml 以上时用示差折光检测器才能测出，无法满足实验要求，采用八宝素与苯甲酰氯柱前衍生化后用紫外检测器测定，最低检测限达到 0.1 μg/ml，较用示差检测器提高了 1 000 倍。

本实验结果显示八宝素给药 5 min 后即可在体内广泛分布，90 min 后各组织中药物浓度明显降低。药物主要分布在肾、肝、脾等器官中，在同一时间三器官药物浓度与血浆浓度接近。此结果与该药药代动力学研究得到的 $T_{1/2}\alpha$ 为 2 min，$T_{1/2}\beta$ 为 2 h，中央室表观分布容积占总表观分布容积的比值为 59.25% 相吻合，说明药物分布速度较快，主要分布在大循环和血流丰富的组织中。由于八宝素是一抗肝炎病毒药物，其在肝内高分布的特点有利于发挥抗肝炎病毒作用，对治疗病毒性肝炎有极大的好处，但肝、肾等组织也可能成为药物毒性的靶器官。结果还显示药物不易通过血脑屏障，在生殖腺中消除较慢，故药物对生殖系统有无毒性需作进一步研究。

排泄试验显示，本品主要以原型药物方式由尿液排泄，原型药物排泄量占总给药量的 90% 左右，说明只有少量药物在体内代谢。药物从体内排泄的速度较快，在给药后 3 h 67% 药物已排出，这与药动学结果也一致。

参考文献：

[1] 山东省医学科学院药物研究所. 一种新的抗病毒化合物八宝素的制法及其制剂：中国，96115901.4[P]. 1997 - 03 - 19.

[2] 山东省医学科学院药物研究所. 八宝素在制备抗病毒新药中的应用：中国，99112550.9[P]. 2000 - 12 - 20.

[3] 徐秀珠，徐根良. 糖和糖醇的高效液相色谱分析[J]. 分析化学，1999，27(5)：547 - 550.

[4] 王　静，王　晴，向文胜. 色谱法在糖类化合物分析中的应用[J]. 分析化学，2001，29(2)：222 - 227.

[5] THOMPSON R M. Analysis of mono- and disaccharides by high-performance liquid chromatography of the benzyloxime-perbenzoyl derivatives[J]. J Chromatogr，1978，166(1)：201 - 212.

[6] LIU C X，WEI G L，LI Q S. Methodology study of validation for bioanalysis on studies on pharmacokinetics，bioavailability[J]. Asian J Drug Metab Pharmacokinet，2001，1(4)：279 - 286.

[7] PEELEN G O，DE-JONG J G，WEVERS R A. High performance liquid chromatography of monosaccharides and oligosaccharides in a complex biological matrix[J]. Anal Biochem，1991，198(2)：334 - 341.

[8] YAO M，QI Y，BI K，*et al*. A precolumn derivatization high-performance liquid chromatographic method with improved sensitivity and specificity for the determination of astragaloside IV in Radix Astragali[J]. J Chromatogr Sci，2000，38(8)：325 - 328.

（编辑　陈聪连）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱（mmHg），但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡]（kPa）的换算系数（1 mmHg = 0.133 kPa）。

本刊编辑部