

成,进而抑制了肿瘤的生长和转移。

现代医学认为,肿瘤的侵袭与转移是一个多因素参与、多步骤的复杂过程。抗血管生成仅是鲑鱼软骨多糖抑制肿瘤生长和转移的机制之一,本课题组将进一步筛选对鲑鱼软骨多糖敏感瘤株,并深入探讨其抗肿瘤作用机制。

References:

- [1] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and oth-

er solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(2): 169-180.

- [2] Eatock M M, Schatzlein A, Kaye S B. Tumor vasculature as a target for anticancer therapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2000, 26(3): 191-204.

- [3] Lee A, Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis [J]. *Science*, 1983, 221 (4616): 1185-1187.

- [4] Tanaka F, Oyanagi H, Takenaka K, et al. Glomeruloid microvascular proliferation is superior to intratumoral microvessel density as a prognostic marker in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(20): 6791-6794.

樟柳碱在 Beagle 犬血清中的药动学研究

黄莹^{1,2}, 只德广², 徐为人², 刘昌孝²

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学放射医学研究所, 天津 300192; 2. 天津药物研究院
天津药代动力学与药效动力学省部共建国家重点实验室, 天津 300193)

摘要:目的 建立高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 测定 Beagle 犬血清中樟柳碱的分析方法。方法 采用沉淀及萃取相结合的方法提取样品, LC-MS 分析方法, 选择负离子测定模式, 测定 Beagle 犬单剂量 iv 樟柳碱 0.2 mg/kg 后樟柳碱的血药浓度。结果 该方法线性、回收率和重现性良好, 批内、批间变异系数均在 10% 以内, 样品提取后 24 h 内稳定, 灵敏度可达到 1 ng/mL, 出峰时间为 3.1 min, C_{max} 为 (145.07 ± 32.63) ng/mL, t_{max} 为 (0.04 ± 0.06) h, $AUC_{(0-\infty)}$ 为 (361.10 ± 26.01) mg · h/mL, CL 为 (5.56 ± 0.41) L/h, $t_{1/2}$ 为 (1.67 ± 0.34) h, Vd 为 (13.39 ± 3.05) L。结论 此方法简便、快速, 专属性强, 灵敏度高, 能够准确测定血中氢溴酸樟柳碱, 有实际意义。

关键词:樟柳碱; 高效液相色谱-质谱联用; 药动学; 血药浓度

中图分类号: R285.61

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)08-1214-04

Pharmacokinetics of anisodine in Beagle dogs serum by LC-MS

HUANG Ying^{1,2}, ZHI De-guang², XU Wei-ren², LIU Chang-xiao²

(1. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China; 2. Tianjin State Key Laboratory of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics,
Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

Key words: anisodine; LC-MS; pharmacokinetics; drug concentration

莨菪类药物樟柳碱 (anisodine) 是从茄科植物山莨菪 *Anisodus tanguticus* (Maxim.) Pascher 根中提取得到的一种生物碱, 为 M 胆碱受体阻断剂, 其化学结构和东莨菪碱相似, 药理作用类似于阿托品类化合物, 具有较强的中枢和外周抗胆碱活性, 也有解除血管痉挛, 改善微循环, 解痉、平喘、抑制唾液分泌, 散瞳, 对抗有机磷中毒等作用, 其毒性比同类药物山莨菪碱、阿托品、山莨菪低^[1]。目前临床上主要用氢溴酸樟柳碱治疗眼部缺血性疾病、视神经病变及全身性血管病的眼底病变^[2~4]。由于樟柳碱的剂量低, 导致用药后血药浓度极低, 目前已报道的樟柳碱的分析方法有高效液相色谱法^[5,6]、高效毛细管

电泳法、导数光谱法等^[7,8], 但这些方法均无法准确地对其进行检测。本实验以 LC-MS 研究了 Beagle 犬血清中樟柳碱的测定方法, 同时研究了 Beagle 犬 iv 后的药动学过程。

1 材料

1.1 试剂: 甲醇, 南开大学精益教育技术装备公司; 乙腈, 天津市康科德科技有限公司; 去离子水, 天津半导体研究所; 三氯乙酸 (TCA), 如皋市化学试剂厂; 三乙胺, 天津市化学试剂批发公司产品; 生理盐水, 大冢制药有限公司。

1.2 试验药品: 氢溴酸樟柳碱 (以下简称樟柳碱) 由北京紫竹药业有限公司提供; 样品用前以生理盐

水配制成适当质量浓度用于 iv 给药。水杨酸(内标)由天津药物研究院合成室提供,批号 20030516。

1.3 仪器:NL—2000 TPA 分析天平,日本岛津公司;TGL—16B 高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;XW—80A 型涡旋混和器,上海精科实业有限公司;2695 液-质联用仪,美国 Waters 公司。

1.4 动物:雄性 Beagle 犬,体重 8~10 kg,由上海新冈动物场提供,合格证书:沪动合格证字 118 号饲养环境及设施,沪动合格证字 119 号实验用犬质量。

2 方法

2.1 樟柳碱的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件:流动相,乙腈-0.1% 甲酸(30:70);体积流量 0.2 mL/min;柱温 30 °C;固定相, C_{18} 柱(100 mm×3.0 mm, 5 μ m);Waters 2695 液-质联用仪,采用 ESI 源电喷雾离子化,选择负离子模式,毛细管电压:300 kV;碰撞电压:20 V,分离电压:4 V,氮气体积流量为 300 L/h;离子源温度 105 °C;进样量 10 μ L,樟柳碱 m/z 181.0,保留时间 3.1 min;内标水杨酸 m/z 137.0,保留时间为 6.1 min。

2.1.2 血样处理:取 0.475 mL 血清样品加入 25 μ L 水杨酸乙醇溶液,混匀,加入 1 mol/L NaOH 溶液 50 μ L,混匀,静置 3 h,加入 1 mol/L 盐酸 100 μ L,放置 10 min,加 1 mL 乙腈,振摇,离心,取上清液以 2 mL 醋酸乙酯提取,振摇,离心,取上层有机相 2 mL,氮气吹干,以 50 μ L 流动相复溶,10 μ L 进样。

2.1.3 标准曲线的制备:于 0.45 mL 空白犬血清中加入不同质量浓度的樟柳碱对照品溶液 25 μ L,水杨酸溶液 25 μ L,得到终质量浓度为 0、1、2、5、10、50、100、500 ng/mL 樟柳碱和终质量浓度为 100 ng/mL 水杨酸的标准血清样品,重复操作,每个质量浓度水平做 5 管样品。血样处理同上。

2.1.4 回收率试验:于 0.45 mL 空白血清中加入不同质量浓度的樟柳碱对照品溶液 25 μ L,水杨酸溶液 25 μ L,得到终质量浓度为 2、10、100 ng/mL 樟柳碱和终质量浓度为 100 ng/mL 的水杨酸标准血清样品,每个质量浓度重复 5 个样品,同上法测定。与所用初始质量浓度的常用液比较计算回收率。

2.1.5 精密度试验:于 0.45 mL 空白血清中加入不同质量浓度的樟柳碱对照品溶液 25 μ L,水杨酸溶液 25 μ L,得到终质量浓度为 2、10、100 ng/mL 樟柳碱和终质量浓度为 100 ng/mL 水杨酸的标准血清样品,每个质量浓度重复 5 个样品,同上法测定,重复 3 批,计算批内、批间差异。

2.1.6 样品稳定性试验:于 0.45 mL 空白血清中加入不同质量浓度的樟柳碱对照品溶液 25 μ L,水杨酸溶液 25 μ L,得到终质量浓度为 2、10、100 ng/mL 的樟柳碱和终质量浓度为 100 ng/mL 水杨酸的标准血清样品,同上法每个质量浓度在试验过程中测定 3 次(0、12、24 h),计算各测定值之间的差异。

2.1.7 冻融稳定性:于 0.90 mL 空白血清中加入不同质量浓度的樟柳碱对照品溶液 50 μ L,水杨酸溶液 50 μ L,得到终质量浓度为 2、10、100 ng/mL 樟柳碱和终质量浓度为 100 ng/mL 的水杨酸的标准血清样品,将以上样品分为两份,一份立即提取,另一份冷冻保存,至 24 h 后,取出进行同样的提取操作,比较冻融前后的差异。

2.2 血样采集及保存:雄性 Beagle 犬 6 只,禁食 12 h,iv 0.2 mg/kg 樟柳碱。于药后 0、1、10、20、30、45 min 和 1、1.5、2、3、4、6、8、10 h 自肘静脉采 3 mL 全血,分离血清,冷冻保存至测定。

2.3 数据处理:按上述方法处理测定后,计算不同时间下的血药浓度和药代参数,达峰时间(t_{max})和峰浓度(C_{max})以实测值计算,末相消除速率(k_e)以末相对数血药浓度时间曲线的直线部分拟合,末相消除半衰期($t_{1/2}$)以 0.693 除以 k_e 计算,表观分布容积 [V_d =剂量/(AUC× k_e)],AUC_{0-∞},以梯形法计算,总清除率(CL)=剂量/AUC。

3 结果

3.1 方法学验证

3.1.1 方法特异性:氢溴酸樟柳碱的结构中有一个碱性氮和酯键,一方面酯键在体内很容易水解,另一方面,由于分子极性较大,需要碱化提取,在碱化过程中分子也容易水解,这些因素容易造成原型药测定的误差较大,在预试验中发现,樟柳碱在碱性条件下放置一定时间后能定量水解产生一个酸和一个碱性分子。用液-质联用测定樟柳碱的酸性碎片分子,特异性较好,采用二级负离子测定,其 m/z 181 碎片离子吸收较强,能够准确、专一地测定出血清样品中樟柳碱的浓度,图 1 给出了方法学特异性图谱。

3.1.2 标准曲线:以测得的各标准血清样品的樟柳碱的峰面积与内标峰面积的比值(A)对其质量浓度(C)作直线回归,所得标准曲线为 $C=1075.434A+1.528$ ($r=0.998$),检测灵敏度为 1 ng/mL,线性范围为 1~500 ng/mL。

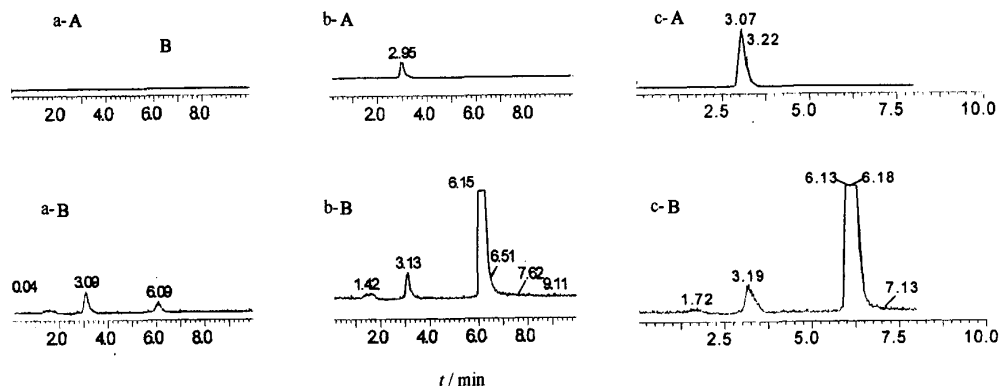
3.1.3 回收率试验:2、10、100 ng/mL 的 3 个质量浓度的标准血清样品各 5 个复管,测得的响应值与同质量浓度的樟柳碱标准样品水溶液测得的结果相比

所得的回收率分别为 67.5%、89.5%、84.6%，平均回收率为 $(80.5 \pm 12.2)\%$ ，RSD 在 20% 以内。

3.1.4 批内变异系数和批间变异系数：樟柳碱批内、批间测定的准确性和重现性较好，血样比较稳定，血清中樟柳碱质量浓度的 RSD 在 10% 以内。

3.1.5 24 h 内样品稳定性：樟柳碱血清样品比较稳定，不同时间的测定过程中高、中、低 3 个质量浓度 RSD 在 15% 以内。

3.1.6 冻融稳定性：2、10 和 100 ng/mL 3 个质量浓度的标准血清样品，冷冻 24 h 前后的测定结果表



A- m/z 151 樟柳碱二级特征离子峰； B- m/z 93 内标水杨酸二级特征离子峰

A-secondary characteristic ion peak of m/z 151 anisidine B-secondary characteristic ion peak of m/z 93 internal standard salicylic acid

图 1 空白血清 (a)、空白血清+樟柳碱+水杨酸 (b) 和 Beagle 犬 iv 樟柳碱 2 h 血样 (c) 质谱图

Fig. 1 Mass chromatogram of blank serum (a), blank serum+anisidine+salicylic acid (b), and serum obtained from Beagle dogs 2 h after iv anisidine at single dose of 0.2 mg/kg (c)

明，冷冻前后的量没有明显变化，RSD 在 15% 以内，因此血样的冷冻保存是合理的。

3.2 樟柳碱血药浓度测定及药动学参数：6 只 Beagle 犬 iv 樟柳碱后，测得血中樟柳碱药时曲线见图 2。以每只动物的血药浓度时间数据计算药代参数，结果见表 1。

表 1 樟柳碱 iv 给药后药动学参数 ($n=6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of iv anisidine in Beagle dogs ($n=6$)

参数	单位	$(\bar{x} \pm s)$
AUC _(0-t)	ng · h · mL ⁻¹	361.10 ± 26.01
AUC _(t-∞)	ng · h · mL ⁻¹	5.04 ± 1.73
k_e	h ⁻¹	-0.43 ± 0.10
$t_{1/2}$	h	1.67 ± 0.34
V_d	L	13.39 ± 3.05
CL	L · h ⁻¹	5.56 ± 0.41
C_{max}	ng · mL ⁻¹	145.07 ± 32.63
t_{max} T_{peak}	h	0.04 ± 0.06

4 讨论

研究发现，樟柳碱在体内会部分水解，而此测定方法是利用原型药物的体外完全水解产物来间接测定原型药的血药浓度，所以该方法只能反映代谢产物及原型药的整体代谢过程，而并不能准确地反映原型药的代谢过程。

根据樟柳碱的紫外吸收波的峰形和响应值发现，其最大吸收波长为 210 nm，正好位于末端吸收

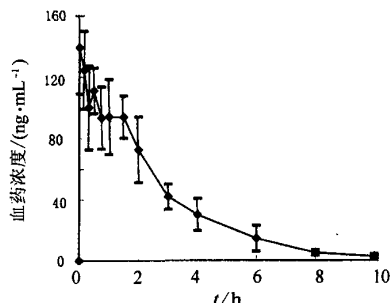


图 2 樟柳碱 iv 给药后的 Beagle 犬血清樟柳碱药时曲线
Fig. 2 Mean serum concentration-time curve of anisidine in Beagle dogs observed after iv administration at single dose of 0.2 mg/kg

位置，HPLC 检测易受杂质干扰，难以进行专属、灵敏的测定，而且樟柳碱剂量低，一般的检测技术很难满足给药后血药浓度的测定要求。经研究发现，樟柳碱在碱性条件下水解所生成的 m/z 181 片段，采用二级负离子测定，吸收较强，本实验使用 LC-MS 测定 Beagle 犬血清中氢溴酸樟柳碱。研究结果表明：使用该方法灵敏度可达到 1 ng/mL，出峰时间为 3.1 min，线性、回收率和重现性良好，批内、批间变异系数均在 10% 以内，样品提取后 24 h 内稳定，血样保存方法不会影响样品的量，说明该方法可靠性较好。因此，使用 LC-MS 测定 Beagle 犬血清中樟柳碱的浓度，可大大提高专属性、灵敏度及分析速度

等,有实际意义。

本实验采用了先沉淀后萃取的提取方法,能够更加有效地去除样品中的杂质,排除干扰,且方法简便、易行,回收率较高,能满足 LC-MS 测定的要求。

References:

- [1] Xu Y. The clinical application of belladonna [J]. *China Foreign Med J* (中华中西医杂志), 2004, 2(12): 64-65.
- [2] Xu M, Yao S H, Sun A F. Curative effect and nursing of compound anisodine injection for ischemic optic neuropathy [J]. *J Chin Mod Ophthalmol* (中华现代眼科学杂志), 2004, 1(4): 377-378.
- [3] Guan J. The treatment of compound anisodine for commotio retinae [J]. *Chin J Pract Ophthalmol* (中国实用眼科杂志), 2001, 19(4): 314.
- [4] Dong D S, Wei W B, Jiao Y H. The clinical observation of compound anisodine for secondary ischemic eyeground [J]. *J Clin Ophthalmol* (临床眼科杂志), 1999, 7(3): 162-163.
- [5] Wang Y. Assay of anisodine hydrobromide by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1999, 19(4): 254-256.
- [6] Kuhr W G. Capillary electrophoresis [J]. *Anal Chem*, 1990, 62: 403R.
- [7] Lin M, Fan G R, Zhang Z X, et al. Systematic separation and quantitative analysis of tropane alkaloids in belladonna preparation by high performance capillary electrophoresis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(8): 518-520.
- [8] Bai L, Wang X L. Determination of the concentration of anisodine hydrobromide injection by derivative spectrophotometry [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1995, 15 (Suppl): 143-144.

川芎当归提取物对血管平滑肌细胞 MAPK 信号通路 与周期蛋白的调控效应

李淑颖¹, 侯永忠², 葛志强^{2*}

(1. 天津大学医院, 天津 300072; 2. 天津大学 制药工程系, 天津 300072)

摘要:目的 揭示川芎当归提取物 (ELCAS) 抑制血管平滑肌细胞增生的分子机制。方法 以体外培养的原代大鼠血管平滑肌细胞为研究对象, 应用 Western blot 方法检测不同质量浓度 ELCAS 对血管平滑肌细胞内的 ERK、JNK、p38 磷酸化水平的影响, 以及周期蛋白 Cyclin D1 和细胞周期抑制子 p21 的表达情况。结果 ELCAS 能显著抑制 ERK、JNK 和 p38 的磷酸化以及血清诱导的 Cyclin D1 蛋白的表达, 并表现出良好的浓度依赖性; 同时 ELCAS 能剂量依赖性地促进细胞内周期蛋白抑制子 p21 过表达, 并抑制 pRb 磷酸化水平和 Cyclin D1 蛋白表达。结论 ELCAS 可通过抑制 MAPK 信号通路以及对周期蛋白的调控来抑制血管平滑肌细胞增生。

关键词: 川芎; 当归; 周期蛋白 Cyclin D1; 血管平滑肌细胞

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2006)08-1217-05

Effect of extracts of *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* on MAPK pathway and cycle proteins in vascular smooth muscle cells

LI Shu-ying¹, HOU Yong-zhong², GE Zhi-qiang²

(1. Hospital of Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Department of Pharmaceutical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Key words: *Ligusticum chuanxiong* Hort.; *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels; cycle proteins Cyclin D1; vascular smooth muscle cell

川芎与当归是著名的对药, 以川芎和当归等剂量构成的复方称之为“佛手散”。临床上主要以滴丸和软胶囊形式用于治疗心、脑血管疾病, 并具有显著的疗效。近来研究发现复方川芎当归能明显缩小缺血再灌注脑组织梗死范围, 显著减轻病理损伤程度,

抵抗脑神经细胞坏死^[1]。该复方对实验性心肌损伤有明显的减轻和改善作用, 并显著地增强心肌的存活率。在对复方的有效物质探索方面, 近年的研究表明川芎当归的活性物质主要为阿魏酸、挥发油和川芎嗪。阿魏酸和挥发油是川芎当归中共有的化学成

收稿日期: 2005-12-25

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (20236040)

作者简介: 李淑颖 (1962—), 女, 河北邢台人, 主管技师, 研究方向为药理学。

* 通讯作者 葛志强 Tel: (022) 27403888 E-mail: gezhq@eyou.com