

瑞香素不同给药途径在大鼠体内药动学研究

刘 嘉,狄留庆,单进军,静芸芸

(南京中医药大学中医药研究院,江苏 南京 210029)

摘要:目的 建立大鼠血浆中瑞香素的测定方法,观察瑞香素在大鼠体内的药动学行为。方法 将大鼠随机分组,分别 ig 瑞香素溶液 250、312.5、375 mg/kg,尾 iv 瑞香素溶液 50、62.5、75 mg/kg, HPLC 测定不同时间间隔的血药浓度,运用 DAS 1.0 药动学程序计算药动学参数。结果 大鼠 ig 给药后符合单室开放模型;iv 后也符合单室开放模型。结论 瑞香素在大鼠体内能快速分布并消除,两种给药途径瑞香素的体内药动学过程不同,静注和口服给药各有优势。

关键词:瑞香素; HPLC; 药动学

中图分类号:R285.61

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)01-0106-03

瑞香素(daphnetin)是从瑞香属植物长白瑞香 *Daphne koreana* Nakai 中提取出来的有效成分,又名祖师麻甲素,为我国首创的新药,其化学名为 7,8-二羟基香豆素(7,8-dithydroxycoumarin),主要存在于瑞香科属植物中。目前,有关瑞香素的化学、药理研究较多,但关于其代谢研究还很少。本实验采用 HPLC 法,对 iv 和 ig 瑞香素后大鼠血浆中的药动学过程进行了研究,进而比较这两种不同给药途径的吸收代谢情况。

1 材料

1.1 仪器:Agilent 1100 液相色谱仪,DAD 紫外检测器(Agilent 科技有限公司);YXJ-2 台式高速离心机(金坛市金城国胜实验仪器厂);微量移液器(北京青云卓立精密设备有限公司);HH-6 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司)。

1.2 药品与试剂:瑞香素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 0900-20010,质量分数 99.8%);瑞香素原料药(长春迪瑞制药有限公司,批号 20051113);甲醇为色谱纯;水为二蒸水;其他试剂均为分析纯。

1.3 动物:SD 大鼠,48 只,体质量 200~250 g,雄性,由南京中医药大学动物中心提供。

2 方法

2.1 色谱条件:色谱柱为 Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.5% 醋酸 (25/75);体积流量:1.0 mL/min;检测波长:327 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液配制:精密称取干燥至恒重的瑞香素对照品适量,加甲醇溶解制成 928 μg/mL 的对照品溶液,备用。精密称取干燥至恒重的瑞香素原料药适量,按照不同的给药剂量和途径配制溶液,溶剂为丙二醇-二甲亚砜 (3/1),备用。

2.3 血浆样品的预处理:取空白血浆 500 μL 置有肝素的离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液置另一离心管中,加入醋酸乙酯 600 μL,涡旋混合 1 min 至萃取完全,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液至离心管中,于 30℃ 水浴氮气吹干,残渣加入 0.5 mL 甲醇,涡旋 1 min,8 000 r/min 离心 5 min,离心后取上清液 10 μL 注入高效液相色谱仪分析。

2.4 标准曲线与线性范围:取空白血浆 7 份,加入 928 μg/mL 瑞香素溶液配制成 92.8、46.4、23.2、11.6、5.8、2.9、1.45 μg/mL 的溶液,液相色谱仪进样 20 μL 测定,以质量浓度 (X) 为横坐标,峰面积 (Y) 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程: $Y = 45.82 X + 9.7509$, $r = 0.9993$,表明瑞香素在 1.45~92.8 μg/mL 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验:空白血浆中加入瑞香素配制质量浓度为 23.2 μg/mL 的瑞香素溶液,连续进样 5 次,测定峰面积,其 RSD 为 0.53%。

2.6 回收率试验:空白血浆中加入瑞香素对照品配制 11.6、23.2、46.4 μg/mL 3 个水平的瑞香素溶液,分别进样测定峰面积,按 2.4 项下标准曲线方程求得药物质量浓度,计算回收率分别为 95.6%、

收稿日期:2008-05-09

基金项目:教育部重点研究项目(208051);江苏省中医药局科研项目计划(HZ07069);

江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(2007238)

作者简介:刘 嘉(1983—),男,江苏南京人,硕士研究生,主要从事中药新剂型、新技术以及生物药剂学研究。

Tel: 13770704461 E-mail: liujia402@163.com

*通讯作者 狄留庆 Tel: (025) 86798226 E-mail: diliuqing@yahoo.com.cn

96.9 %、98.4 % ,RSD 为 0.73 % ($n=3$)。

2.7 稳定性试验:血浆样品处理后,将上清液于 $-10 \sim -5$ 密闭避光保存,15 d 内基本稳定;不避光,室温 ($20 \sim 25$) 下密闭保存,12 h 内基本稳定。

2.8 大鼠 ig 和 iv 瑞香素的药动学研究:大鼠给药前均禁食 12 h,全程不禁水,给药前分别取 0.5 mL 空白血浆作同组对照。分别 ig 瑞香素溶液 250、312.5、375 mg/kg,以及 iv 瑞香素溶液 50、62.5、75 mg/kg,每个剂量 8 只大鼠;ig 给药后,分别于 5、10、15、20、30、45、60、90、120 min,iv 给药后,分别于 2、5、10、15、20、30、45、60、90 min 眼眶取血 0.5 mL,置于预先肝素化的试管中,8 000 r/min 离心 5 min,取上层血浆约 200 μ L,按前述血浆样品的预处理方法操作。

2.9 数据处理:数据经 DAS 1.0 药动学程序处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 色谱行为:在上述色谱条件下,将大鼠的空白血浆与空白血浆中加入瑞香素及给药后大鼠血浆色谱图进行比较,结果表明血浆中内源性物质不干扰瑞香素的测定,且峰形良好。见图 1。

3.2 药动学研究:大鼠 ig 与 iv 给药后,不同时间瑞香素的平均血药浓度-时间曲线见图 2 和 3。

用 DAS 1.0 药动学程序对血药浓度-时间数据进行计算,根据 AIC,拟合优度选择房室数,选择 AIC 最小者,拟合优度最小 R^2 值最大者。判断大鼠经 ig 瑞香素后为一室开放模型,iv 瑞香素后也为一室开放模型。药动学参数见表 1。

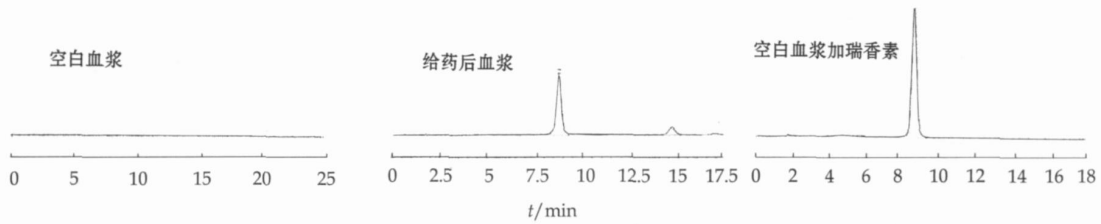


图 1 瑞香素的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of daphentin

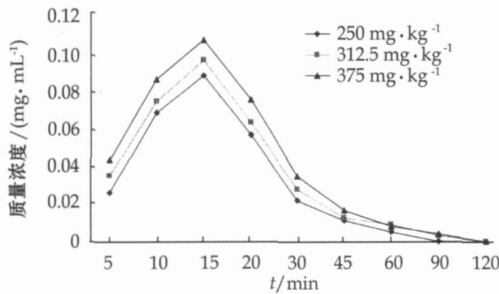


图 2 大鼠 ig 不同剂量瑞香素平均药-时曲线

Fig. 2 Plasma concentration-time curve after ig daphentin in rats

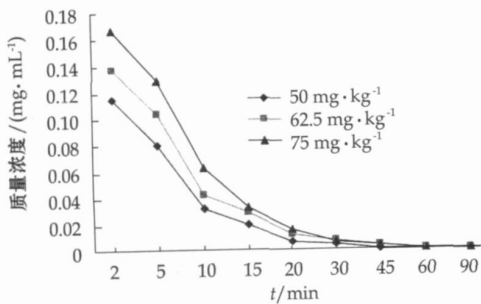


图 3 大鼠 iv 不同剂量瑞香素平均药-时曲线

Fig. 3 Plasma concentration-time curve after iv daphentin in rats

表 1 大鼠不同给药后瑞香素的药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of daphentin by different administration ways in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

参 数	iv	ig
Ke/h^{-1}	7.620 ± 1.433	6.538 ± 1.249
Ka/h^{-1}	-	1.682 ± 0.330
$t_{1/2(a)}/h$	-	0.412 ± 0.080
$t_{1/2(e)}/h$	0.091 ± 0.017	0.106 ± 0.020
t_{max}/h	0	0.213 ± 0.045
$C_{max}/(mg \cdot mL^{-1})$	0.144 ± 0.032	0.097 ± 0.022
$AUC/(mg \cdot h \cdot mL^{-1})$	0.252 ± 0.058	0.204 ± 0.049

4 讨论

4.1 流动相的选择:由于生物样品中内源性物质较多,流动相考察了不同比例的甲醇-0.5 % 醋酸。将甲醇-0.5 % 醋酸比例调整为 75 : 25 进行实验^[1],保留时间合适,且分离效果较好。最终选择该比例为流动相。

4.2 血浆样品处理方法的建立:中药有效成分的量通常较低,进入体内后浓度更低,血浆样品处理方法稀释了样品浓度,给检测带来困难,因此考察不同的血浆样品处理方法就显得极为重要。文献报道的血浆样品处理方法有蛋白沉淀法、沸水浴法和固相萃

取法。本实验采用了蛋白沉淀法^[2],考察了醋酸乙酯、氯仿、乙醚 3 种试剂处理血浆样品。计算用 3 种不同试剂处理血浆样品的瑞香素提取率大小为醋酸乙酯 > 乙醚 > 氯仿,而用乙醚处理的血浆杂峰较多,故选用醋酸乙酯为萃取溶剂。

4.3 药动学结果的探讨:瑞香素 iv 给药后在大鼠体内符合一室开放模型,而 ig 给药后在大鼠体内也符合一室开放模型。

瑞香素 iv 后的 $t_{1/2(e)}$ 为 0.091 和 ig 后的 $t_{1/2(e)}$ 为 0.106,说明瑞香素属于快速消除药物,且两种给药途径使瑞香素在大鼠体内的保留时间不同,ig 给药比 iv 给药在体内停留时间长些。iv 给药曲线下

面积 (AUC) 为 0.252 mg · h/mL, ig 给药为 0.204 mg · h/mL,两者差异不大,但在给药剂量上,ig 给药为 iv 给药剂量的数倍,提示瑞香素 iv 给药的药物利用率大于 ig 给药。

由此可知,瑞香素在临床用药上需要采取相应的制剂手段增加其在体内的保留时间,才可确保其疗效。静注和口服给药各有优势。

参考文献:

- [1] 钱桂英,单进军,狄留庆.瑞香素大鼠在体肠吸收动力学研究[J].南京中医药大学学报,2007,23(3):177-178.
- [2] Tsai T H, Chou C J, Chen C F. Pharmacokinetics of paeonol after intravenous administration in rats [J]. J Pharm Sci, 1994, 83(9): 1307-1309.

珍珠菜提取物对肝癌抑制作用的研究

唐丽华¹,王祎茜¹,梁中琴²,游本刚¹,杨世林¹

(1. 苏州大学医学部 药学院,江苏 苏州 215123; 2. 苏州大学医学部 基础医学与生物科学学院,江苏 苏州 215123)

摘要:目的 观察珍珠菜提取物 (ZE4) 对肝癌体内外的抑制作用。方法 体外采用 MTT 法、³H-TdR 掺入法、集落形成实验观察 ZE4 对肝癌 SMMC-7721 细胞的杀伤作用;采用划痕实验法与内皮细胞黏附实验观察 ZE4 对 SMMC-7721 细胞迁移的抑制作用。体内以抑瘤率和脏器指数为指标观察 ZE4 对小鼠肝癌 H22 的作用。结果 ZE4 可抑制 SMMC-7721 细胞的增殖和转移;体内实验显示 ZE4 可显著抑制小鼠肝癌 H22 的增殖,抑瘤率均在 30% 以上,其中中剂量 (200 mg/kg) 组的效果最好,可达到 57.8%。结论 ZE4 对肝癌有很好的抑制作用。

关键词:珍珠菜;肝癌;转移;凋亡

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)01-0108-04

肝癌在我国癌症发病率中高居第 2 位,且在某些地区呈逐年增高趋势。由于肝癌恶性程度高,病情发展快,治疗难度大,成为严重威胁人类健康和生命的“癌症之王”。虽然手术治疗是首选,但并不能解决肿瘤的扩散与转移。所以药物治疗成为中、晚期肝癌常用的治疗方法。中药因不良反应小,且有去邪扶正之功效,更易被患者接受,因此从中草药中寻找抗肿瘤药物已成为人们关注的焦点。

珍珠菜为报春花科植物虎尾珍珠菜 *Lysimachia clethroides* Duby 的根或全草^[1],具有清热解毒、活血调经、利水消肿等功效;在民间广泛用于治疗咽喉肿痛、虫蛇咬伤、跌打损伤、妇女月经不调等症。珍珠菜的化学成分研究较多,而药理作用研究却少见报道^[2]。早在 1977 年就有报道显示珍珠菜总黄酮苷具有良好的抗肿瘤作用^[3],但其后报道甚

少。本课题组通过对珍珠菜抗肿瘤有效部位的进一步纯化,提高了提取物中总黄酮的量,观察了该提取物 (ZE4) 体外对人肝癌细胞 (SMMC-7721) 的作用和体内对荷瘤 H₂₂ 小鼠的抑瘤作用。

1 材料与仪器

1.1 药物:珍珠菜采用醇提水沉法提取后,浓缩至一定浓度,经大孔吸附树脂分离纯化,经体外筛选得到活性部位 (ZE4),其中总黄酮质量分数为 33.35%。

1.2 试剂和仪器:培养基 RPMI 1640 培养基, Gibco 产品;超级新生小牛血清 (FBS),杭州四季青生物材料研究所生产;胰酶、四氮唑蓝 (MTT) 为 AMRESO 分装;氟尿嘧啶注射液 (5-FU,南通精华制药有限公司,批号 051002);注射用盐酸柔比星 (DSR,深圳万乐有限公司,批号 0505E1);³H-TdR

收稿日期:2008-05-10

基金项目:江苏省苏州市社会发展基金资助项目 (ZS0307);苏州大学医学发展基金项目 (EE132609)

作者简介:唐丽华(1952—),女,副教授,硕士生导师,研究方向为中药药理、中药新制剂及新剂型研究。

Tel: (0512) 65880029 E-mail: tanglihua@suda.edu.cn.