

注射用苦参素纳米球与普通粉针剂在大鼠体内药动学比较

陈 纭, 金 涌*

安徽医科大学药学院 药物分析教研室, 安徽 合肥 230032

摘要: 目的 比较注射用苦参素纳米球(KU-PLGA-NS)与注射用苦参素普通粉针剂(KUI)在大鼠体内的药动学特性。方法 建立HPLC法检测大鼠血浆中苦参素,采用ANOVA法选择房室模型,将所测得的血药浓度-时间数据,采用DAS程序进行分析,根据 F 值与AIC选择房室模型求算药动学参数。结果 等剂量KU-PLGA-NS和KUI的 AUC_{0-t} 分别为 (785.57 ± 170.92) 、 $(342.43 \pm 54.49) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$, $C_{\max}$ 为 (18.51 ± 2.47) 、 $(28.48 \pm 5.40) \text{ mg/L}$, $t_{1/2\text{Ke}}$ 为 (91.69 ± 1.94) 、 $(11.51 \pm 2.47) \text{ min}$ 。结论 KU-PLGA-NS在大鼠体内的药动学特性与KUI比较AUC和 $C_{\max}$ 增加, $t_{1/2}$ 延长。

关键词: 苦参素; 纳米球; 药动学; 血药浓度; 房室模型

中图分类号: R285.51 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0526-04

Pharmacokinetic comparison between Kushenin Injection Nanoparticles and common injection in rats

CHEN Yun, JIN Yong

Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract: Objective To compare the *in vivo* pharmacokinetic properties of Kushenin Injection Nanoparticles (KU-PLGA-NS) with the ordinary Kushenin Injection (KUI) of rats. **Methods** A method has been developed and validated for the quantification of kushenin in rat plasma. Using ANOVA method to choose the compartment model, The plasma concentration-time data were measured and then analyzed by DAS program on the computer. According to F values, the AIC choice compartment model pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** The main pharmacokinetic parameters of KU-PLGA-NS and KUI were as follows: AUC_{0-t} were (785.57 ± 170.92) and $(342.43 \pm 54.49) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$, respectively; $C_{\max}$ were (18.51 ± 2.47) and $(28.48 \pm 5.40) \text{ mg/L}$, respectively; $t_{1/2\text{Ke}}$ were (91.69 ± 1.94) and $(11.51 \pm 2.47) \text{ min}$, respectively. **Conclusion** Comparison of *in vivo* pharmacokinetic characteristics of rats between KU-PLGA-NS and KUI has a significant change with AUC and $C_{\max}$ increase and $t_{1/2}$ extension.

Key words: kushenin; nanoparticles; pharmacokinetics; blood drug concentration; compartment model

苦参素(kushenin)又名氧化苦参碱(oxytmatrine),是从豆科植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 的种子或苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的根中提取的一种生物碱。苦参素具有抗炎、抗病毒、增强免疫功能和抗肿瘤等作用^[1],近年来发现其对病毒性肝炎亦有明显治疗作用。苦参素是我国自主开发完成,享有完全知识产权的纯天然生物碱类药物,现有多种该药的制剂研究报道,包括胶囊、片剂、注射液等^[2-3]。该药物已广泛地应用于临床,主要在治疗乙型肝炎、白细胞减少症、心律

失常、湿疹等方面有较好疗效^[4-5]。但目前临床上使用的苦参素半衰期较短,大多为2.6 h左右,且不良反应较多,并在肝中浓度小。而纳米给药系统在实现靶向和缓释给药,以及提高难溶性药物的生物利用度,降低药物不良反应等方面具有良好应用前景^[6-7]。本研究通过比较注射用苦参素纳米球(KU-PLGA-NS)与苦参素普通粉针剂(KUI) ip 给药后大鼠血浆药物浓度变化规律和药动学参数,考察苦参素纳米球的药动学特性,评价其临床应用前景。

1 材料与方法

收稿日期: 2010-05-06

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(070413117); 安徽医科大学校级研究项目(2008kj12); 国家中医药管理局中医药科研三级实验室“中药药理实验室”项目(TCM-2009-197)

作者简介: 陈 纭(1981—),男,汉族,安徽池州人,讲师,硕士,主要从事药物分析研究工作。

Tel: 13856020743 E-mail: chenyun3503@sina.com

*通讯作者 金 涌 Tel: (0551)5518877 E-mail: jiyayd@sina.com

1.1 药品与试剂

苦参素对照品(中国药品生物制品检定所,质量分数99.5%),KUI(批号20090821,质量分数96.9%)由陕西龙孚生物化工有限责任公司提供;KU-PLGA-NS(批号20090821,质量分数97.6%)自制^[8],其平均包封率为79.5%,平均载药量为1.75%,平均粒径为190.5 nm。甲醇为色谱纯(天津市运盛化学试剂科技有限公司),磷酸和其他试剂均为分析纯(天津化学试剂三厂)。

1.2 仪器与设备

岛津高效液相色谱仪(包括色谱数据 LC-sloution System、CTO—20AS 系统控制器、LC—20AT 输液泵和 SPD—20A 紫外检测器),色谱柱为 Kromasil-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, 天津市色谱科技有限公司);全自动高速冷冻离心机 GL20A(湖南仪器仪表总厂离心机厂);XW—80A 旋涡振荡器(上海精科实业有限公司)。

1.3 生物样品来源

健康SD大鼠40只,雌雄各半,体质量180~220 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,普通级。动物随机分成4组,每组10只。

1.4 色谱条件

色谱柱为 Kromasil-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液-甲醇(35:65);检测波长229 nm;灵敏度0.001 AUFS;柱温30℃;体积流量1.0 mL/min;进样量20 μL。

1.5 给药方案

大鼠ip给药,其中3组分别ip KU-PLGA-NS(3、6、12 mg/kg),另1组ip KUI(6 mg/kg)。

1.6 血浆样本的采集

大鼠给药前禁食12 h,整个实验期间自由饮水。于给药前0 h和给药后按时间点(2、5、10、20、45、60、90、120、240 min)从大鼠眼底静脉丛取血0.5 mL于肝素化试管中,静置,4 000 r/min离心10 min,取血浆0.2 mL,冰箱保存待测。

1.7 血浆样品处理

取血浆200 μL,分别加入甲醇100 μL,生理盐水200 μL,涡旋震荡混匀,再加醋酸乙酯2 mL,涡旋震荡约45 s,3 000 r/min离心10 min,取有机层,重复一次,合并有机相,40℃氮气吹干,流动相重溶,转移至EP管中,4 000 r/min离心10 min,20 μL进样。

1.8 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用ANOVA法选择房室模型。将所测得的血药浓度-时间数据,采用DAS程序在计算机上进行分析,根据F值与AIC选择房室模型,并求算药动学参数。组间比较采用Student's *t* 检验。

2 实验结果

2.1 方法专属性

取大鼠空白血浆,除不加对照品溶液外,其余按“1.7”项下方法处理并分析,获得空白血浆的色谱图;将一定浓度苦参素对照品溶液加入空白血浆中,同法操作,获得相应的色谱图。血浆色谱图中苦参素的保留时间为5.5 min左右,药物峰附近未见杂质峰干扰,生物样品中内源性物质均不干扰体内苦参素的测定,见图1。

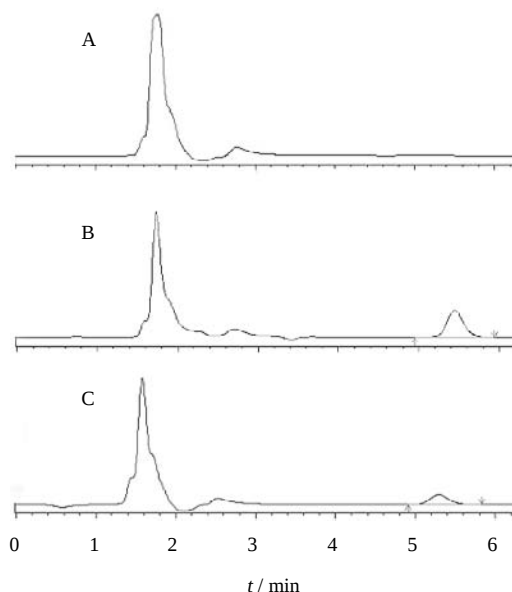


图1 空白血浆(A)、空白血浆+苦参素(B)和血浆样品(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank + kushenin (B), and plasma sample (C)

2.2 标准曲线

取大鼠空白血浆300 μL,加苦参素对照品系列溶液200 μL,配制成苦参素1.25、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 μg/mL的血浆样品,在1.25~80 μg/mL苦参素血浆浓度与色谱峰面积比线性关系良好,线性回归方程为 $y=193\ 889x+1\ 950.2$ ($r=0.999\ 7$, $P<0.05$, $n=7$),最低检测度0.05 μg/mL。

2.3 方法回收率

选择大鼠血浆样品进行回收率考察,配制低、

中、高3种不同质量浓度的苦参素标准生物体液样品,按上述样品预处理步骤操作,生物样品中苦参素色谱峰面积代入相应的标准曲线,通过测得量与加入量比值求得苦参素40、10、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 相对回收率分别为 $(98\pm3)\%$ 、 $(100\pm2)\%$ 、 $(107\pm5)\%$ ($n=5$),结果符合临床前药动学的研究要求。

2.4 方法精密度

选择大鼠血浆样品进行精密度考察,按生物样品标准曲线测定方法配制低、中、高3种不同浓度的苦参素标准生物体液样品,按上述生物样品预处理步骤同法操作,测定日间和日内相对标准差,其中日内测定5次,日间测定5d,每天1次,40、10、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 苦参素的日内RSD分别为3.2%、0.5%、0.8%,日间RSD分别为2.1%、1.3%、0.8%,均小于6.5%。

2.5 生物样品稳定性

2.5.1 室温稳定性 将高、中、低(40、10、2.5 $\mu\text{g/mL}$)3种质量浓度血浆样品,按血浆样品提取与处理项下操作,于室温($18\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$)放置24h后,测定其浓度,观察其稳定性。结果1h的RSD分别为4.3%、2.7%、1.7%,24h后的RSD为3.3%、1.5%、1.3% ($n=5$),高、中、低3种生物样品RSD均小于6.5%。

2.5.2 冻融稳定性 将高、中、低3种浓度血浆样品,按血浆样品提取与处理项下操作,放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存24h,反复冻融3次后,测定其浓度,观察其稳定性。结果冻融前的RSD分别为3.2%、3.8%、1.3%,冻融后的RSD为3.5%、2.3%、1.7% ($n=5$),高、中、低3种生物样品RSD均小于6.5%。

2.5.3 长期稳定性 将高、中、低3种浓度血浆样

品,按血浆样品提取与处理项下操作,放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,放置15d后,测定其浓度,观察其稳定性。结果1d的RSD分别为4.3%、2.8%、1.2%,15d后RSD为3.7%、2.5%、2.8% ($n=5$),高、中、低3种生物样品RSD均小于6.5%。

2.6 药动学结果

2.6.1 药时曲线 结果见图2。

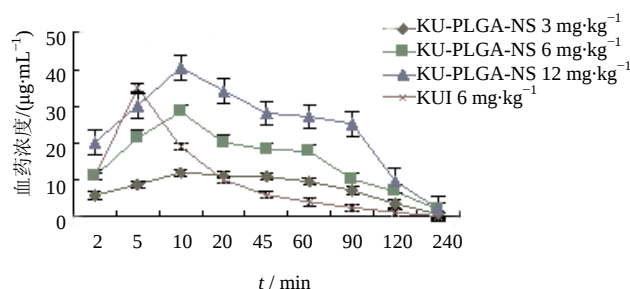


图2 大鼠ip KU-PLGA-NS和KUI血药浓度-时间曲线
($\bar{x}\pm s, n=10$)

Fig. 2 Concentration-time curve of KU-PLGA-NS

and KUI in plasma ($\bar{x}\pm s, n=10$)

2.6.2 KU-PLGA-NS 药动学参数估算 根据血药浓度时间数据拟和符合一级吸收的一房室模型,按权重系数 $1/C^2$ 进行计算,其药动学参数见表1。其中3个剂量KU-PLGA-NS的 $t_{1/2\text{Ke}}$ 、 t_{max} 无显著性差异,而 AUC_{0-t} 和 C_{max} 呈剂量依赖性增加。

3 讨论

本研究表明KU-PLGA-NS(3、6、12 mg/kg)的血药经时过程均符合一级吸收的一房室模型,其主要药动学参数 AUC 、 C_{max} 在3~12 mg/kg呈剂量依赖性增加,提示KU-PLGA-NS在这个范围内药物剂量与血药浓度呈线性关系。 t_{max} 和 $t_{1/2\text{Ke}}$ 都显著延

表1 大鼠ip KU-PLGA-NS和KUI的药动学参数($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of KU-PLGA-NS and KUI by ip injection in rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

参数	单位	KU-PLGA-NS			KUI 6 mg·kg ⁻¹
		3 mg·kg ⁻¹	6 mg·kg ⁻¹	12 mg·kg ⁻¹	
$t_{1/2\text{Ka}}$	min	3.71 $\pm$ 2.34	3.69 $\pm$ 1.94*	3.45 $\pm$ 2.49	2.63 $\pm$ 3.39
$t_{1/2\text{Ke}}$	min	90.71 $\pm$ 2.34	91.69 $\pm$ 1.94**	92.45 $\pm$ 2.49	11.51 $\pm$ 2.47
AUC_{0-t}	mg·L ⁻¹ ·min	271.36 $\pm$ 78.87	785.17 $\pm$ 170.21**	996.24 $\pm$ 165.43	342.43 $\pm$ 54.49
t_{max}	min	10.00 $\pm$ 0.82	10.10 $\pm$ 0.74*	10.20 $\pm$ 1.21	5.09 $\pm$ 0.97
C_{max}	mg·L ⁻¹	11.82 $\pm$ 2.29	28.48 $\pm$ 5.40**	40.21 $\pm$ 5.13	35.05 $\pm$ 2.84
CL	L·min ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00

与KUI组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs KUI group

长,提示药物吸收较快,消除较慢,在体内驻留时间比市售普通粉针剂长,解决了普通粉针剂生物利用度低的问题。该结果为进一步开发和临床合理应用苦参素奠定了理论基础。

本实验采用了 KU-PLGA-NS 和 KUI 平行比较的方法,考察纳米剂型的药动学特征,为临床用药提供参考。从实验得到数据可以看出,中剂量 KU-PLGA-NS 大鼠注射后其 AUC 和 $C_{\max}$ 高于苦参素原料药, KU-PLGA-NS 的 AUC_{0-t} 为 $(785.57 \pm 170.92) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$, $C_{\max}$ 为 $(28.48 \pm 5.40) \text{ mg/L}$, 而 KUI 的分别为 $(342.43 \pm 54.49) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$, $(18.51 \pm 2.47) \text{ mg/L}$, 表明 KU-PLGA-NS 与 KUI 相比,具有吸收完全、生物利用度高的特点。中剂量 KU-PLGA-NS 和 KUI 的 $t_{1/2K_e}$ 分别为 $(91.69 \pm 1.94) \text{ min}$ 、 $(11.51 \pm 2.47) \text{ min}$, 这些结果提示, KU-PLGA-NS 比 KUI 更快、更多地分布到组织内,在体内的存在时间更长,有利于药物活性的发挥。KU-PLGA-NS 是否更易进入组织,是否对某些组织具有靶向性,需要通过进一步开展药物组织分布研究加以证明,这对进一步完善苦参素药动学研究有着重要意义。

参考文献

- [1] 朱晓伟, 宝金荣, 布仁. 苦参碱和氧化苦参碱抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 82-84.
- [2] 徐彬, 杨惠娣, 侯爱君. 苦参碱治疗慢性病毒性肝炎的作用 [J]. 国外医药合成药生化药: 制剂分册, 2002, 23(6): 356-358.
- [3] 肖贵南, 陆惠文, 宣全. 注射用苦参素细菌内毒素检查法的研究 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1332-1335.
- [4] 李正蓉. 苦参碱的药理与临床研究进展 [J]. 华西药学杂志, 2003, 18(6): 435-437.
- [5] 贾建伟, 杨积明, 袁桂玉, 等. 苦参素治疗慢性乙型肝炎的疗效及其影响因素探讨 [J]. 中草药, 2003, 34(11): 1030-1031.
- [6] Zhang L, Liu W, Zhang R, et al. Pharmacokinetic study of matrine, oxymatrine and oxysophocarpine in rat plasma after oral administration of *Sophora flavescens* Ait extract by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(4-5): 892-598.
- [7] 兰雪莲, 贾晓斌, 陈彦, 等. 几种纳米给药系统在改善中药 ADME/Tox 性质方面的应用 [J]. 中草药, 2008, 39(11): 1746-1748.
- [8] 陈纭, 金涌, 李俊. 苦参碱靶向缓释纳米球的制备及影响因素考察 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1203-1206.