

• 药理与临床 •

大黄酸大鼠体内血液/肾脏同步药动学研究

钟懿聪¹, 管佳妮¹, 马建萍¹, 马小琼², 骆晓婷¹, 魏颖慧^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学附属第一医院 国家中医临床研究基地, 浙江 杭州 310006

摘要: 目的 研究大黄酸(RH) iv 给药后在大鼠血液和肾脏内的同步药动学行为以评价 RH 肾脏的渗透性。方法 应用 HPLC 法测定给药后大鼠血浆中 RH 质量浓度, 经血浆蛋白结合率折算为血中游离药物浓度; 采用微透析(MD)技术定时获取肾脏透析液, 高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)技术测定大鼠肾脏透析液中 RH 的质量浓度; 采用非房室模型拟合药动学参数。结果 给药后 RH 较快进入肾脏, 在给药后 1 h 左右浓度达到峰值, 其后持续下降, 在给药后整个过程中, 肾脏药物浓度均明显低于血液药物浓度。RH 给药后在大鼠血液及肾脏中的平均滞留时间(MRT)分别为(87.217±29.889)、(122.387±12.521) min; 药时曲线下面积(AUC)分别为(114.236±45.585)、(16.596±1.732) μg·min/mL, 肾脏渗透率(AUC_{肾脏}/AUC_{血液})为 0.161±0.056。结论 大鼠血液/肾脏同步药动学研究是研究药物肾脏渗透性能的有效方法; RH iv 给药后可有效地向肾脏渗透, 从而有利于肾脏疾病的治疗。

关键词: 大黄酸; 微透析; 同步药动学; 肾脏渗透; 液质联用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)21-3202-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.014

Simultaneous pharmacokinetics of rhein in rat plasma and kidney

ZHONG Yi-cong¹, GUAN Jia-ni¹, MA Jian-ping¹, MA Xiao-qiong², LUO Xiao-ting¹, WEI Ying-hui¹

1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. National Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine, the First Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China

Abstract: Objective To investigate the pharmacokinetics of rhein (RH) in rat plasma and kidney simultaneously. **Methods** An HPLC method was developed to determine the concentration of RH in rat plasma, which was corrected with protein binding. Renal microdialysis (MD) technique was employed to collect dialysate sample continuously. Then the MD samples were detected by HPLC-MS/MS method. **Results** RH was distributed into kidney of rats rapidly after administration. The maximum concentration of RH in rat kidney was reached at 1 h followed by continuously decreased. During the whole process, the concentration of RH in rat kidney was significantly lower than that in plasma after administration. The MRT of RH in plasma and kidney was (87.217 ± 29.889) and (122.387 ± 12.521) min, respectively. The areas under the curve (AUC) of RH in plasma and kidney were (114.236 ± 45.585) and (16.596 ± 1.732) μg·min/mL, respectively. The kidney penetration was 0.161 ± 0.056. **Conclusion** Simultaneous pharmacokinetic study in rat plasma and kidney is an effective method to investigate drug kidney penetration. RH can penetrate rat's kidney after administration to exert its effect.

Key words: rhein; microdialysis; simultaneous pharmacokinetics; kidney penetration; HPLC-MS/MS

大黄酸(rhein, RH)是大黄、芦荟、何首乌等多种中药的主要有效成分, 具有抗肿瘤^[1]、抗炎^[2]、抗菌^[3]等广泛的药理作用^[4]。因其具有显著的抗炎作用, RH 被用于肝纤维化^[5]及糖尿病肾病^[6]的治

疗。特别引人瞩目的是, RH 可从多个环节^[7]调节肾脏功能, 因而成为极具前景的抗糖尿病肾病新药。阐明药物的药动学特征对全面认识药物的体内作用及制定临床给药方案具有重要意义; 阐明 RH 在血

收稿日期: 2015-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373982); 浙江省自然科学基金资助项目(LY13H280007)

作者简介: 钟懿聪(1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为药物新剂型及新技术研究。Tel: (0571)86633173 E-mail: zyc1182483837@163.com

*通信作者 魏颖慧, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药物新剂型及新技术研究。Tel: (0571)86633173 E-mail: yhw_nn@zcmu.edu.cn

液及肾脏组织的同步药动学特征将有助于了解药物肾脏渗透性能、解析药动/药效间的相关性、发展新型给药系统(如肾脏靶向给药系统)、优化个性化治疗方案。目前 RH 在大鼠血浆中的药动学行为研究已有报道^[8-9],而在血液-组织中的同步药动学行为未见报道。本实验对 iv 给药后 RH 在大鼠血液/肾脏同步药动学行为进行了研究,以建立血液、肾脏药物浓度关系,评价 RH 的肾脏渗透性。微透析(microdialysis, MD)技术是近年来发展的一种在体、实时取样技术,已成为药动学研究新方法^[10-11]。为准确研究 RH 的肾脏经时过程,本研究采用 MD 技术在肾脏组织连续定时取样分析,从而更加科学地评价 RH 的肾脏渗透性。

1 材料

1.1 药品与试剂

RH 原料药(HPLC 检测质量分数≥98%,南京泽朗医药科技有限公司,批号 20131113); RH 对照品(HPLC 检测质量分数≥99.9%,中国食品药品检定研究院,批号 110757-200206); 1,8-二羟基蒽醌对照品(中国食品药品检定研究院,批号 0829-9702); 甲醇(色谱纯,美国霍尼韦尔公司); 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Waters 高效液相色谱仪(Waters e2695 泵、2998 全波长检测器、Empower Application 工作站,美国 Waters 公司); Michrom Paradigm MG4 高效液相色谱仪(美国 Michrom Bioresources 公司); 自动进样器(瑞士 CTC Analytics AG 公司); 质谱仪 4000 Q-Trap(美国 AB SCIEX 公司); 定量分析软件(Analyst software v 1.5.2); CP225D 电子分析天平(德国 Sartorius 公司); TGL-16B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); Labconco 浓缩离心仪(美国 Labconco 有限公司); Mill-Q 超纯水器、Millipore 超滤管(49.9 mm, 相对分子质量 10 000),均购于美国 Millipore 公司; 微透析系统: CMA 400 单通道

微量灌注泵、CMA 470 低温收集器、CMA 30 线性微透析探针(外径 0.24 mm,膜长 10 mm,截留相对分子质量 6 000),购于瑞典 CMA 公司。

1.3 实验动物

健康 SD 大鼠,雄性,体质量(200±20)g, SPF 级,浙江省医学科学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(浙)20140001。实验前禁食 12 h,自由饮水。

2 方法与结果

2.1 血浆中 RH 分析方法的建立

2.1.1 HPLC 色谱条件 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(73:27); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 检测波长 254 nm。

2.1.2 溶液的制备

(1) RH 对照品溶液制备: 取 RH 对照品适量,精密称定,加少量二甲基亚砜(DMSO)超声溶解后,置于 20 mL 量瓶中加入甲醇稀释至刻度,得质量浓度为 250 μg/mL 的储备液,于 4 °C 冰箱中保存备用。

(2) 内标(IS)溶液的制备: 取 1,8-二羟基蒽醌对照品适量,精密称定,置于 25 mL 量瓶中加入甲醇超声溶解并稀释至刻度,得质量浓度为 100 μg/mL 的内标溶液,于 4 °C 冰箱中保存备用。

2.1.3 血浆样品处理 精密吸取血浆样品 100 μL,加入 IS 溶液(100 μg/mL) 10 μL,涡旋 30 s 混匀,加入 2 mol/L HCl 20 μL,涡旋混匀,再加入 0.5 mL 醋酸乙酯,涡旋 3 min 后,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液置于离心管中,于浓缩离心仪内挥干有机溶剂,残渣加入 100 μL 甲醇,涡旋 90 s,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液进行 HPLC 分析。

2.1.4 专属性考察 分别取空白血浆、空白血浆+RH 对照品+IS 以及给药后大鼠血浆样品+IS,按“2.1.1”项色谱条件进样测定。RH 的保留时间为 6.2 min, IS 的保留时间为 9.5 min, RH 与 IS 出峰处无内源性物质干扰,表明色谱行为及专属性良好。色谱图见图 1。

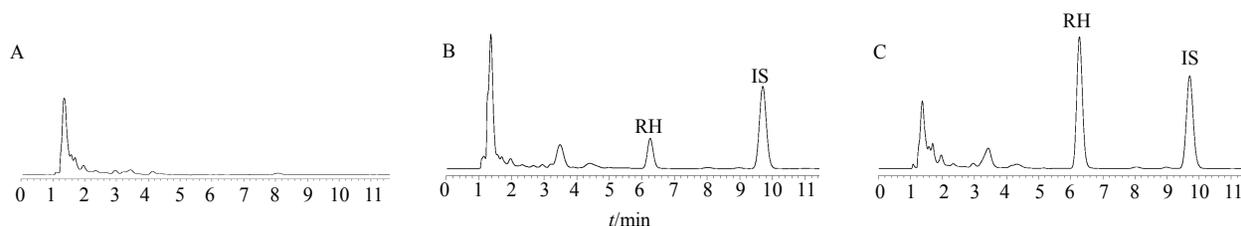


图 1 空白血浆(A)、空白血浆+RH+IS(B)和给药后大鼠血浆样品+IS(C) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC of blank plasma (A), blank plasma + RH + IS (B), and plasma sample after iv administration of RH + IS (C)

2.1.5 线性关系考察 在大鼠空白血浆中精密加入适量 RH 对照品储备液, 配制质量浓度分别为 0.100 4、0.200 8、1.004 0、2.008 0、10.040 0、20.080 0、40.160 0、50.200 0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列含药血浆样品, 按“2.1.3”项方法处理, 按“2.1.1”项色谱条件进样分析。以血浆中 RH 的质量浓度 (X) 对 RH 与 IS 的峰面积比值 (Y) 进行加权最小二乘回归 (权重为 $1/X$), 得血浆中 RH 的标准曲线方程 $Y=0.103\ 2\ X+0.008\ 5$ ($r=0.999\ 8$), 线性范围为 0.100 4~50.200 0 $\mu\text{g/mL}$ 。RH 的最低检测限为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ ($S/N>5$)。

2.1.6 精密度试验 取 RH 对照品储备液及大鼠空白血浆, 配制低、中、高 3 种质量浓度 (0.200 8、2.008 0、20.080 0 $\mu\text{g/mL}$) 的血浆样品, 按“2.1.3”项方法处理后, 按“2.1.1”项色谱条件进样, 于同日内测定 5 次, 考察日内精密度; 各样品每日测定 1 次, 连续测定 5 d, 考察日间精密度。结果表明, 日内及日间精密度 RSD 均 $<8\%$, 符合生物样品测定要求。

2.1.7 回收率试验

(1) 方法回收率试验: 取 RH 对照品储备液及大鼠空白血浆, 配制低、中、高 3 种质量浓度 (0.200 8、2.008 0、20.080 0 $\mu\text{g/mL}$) 的血浆样品, 按“2.1.3”项方法处理, 按“2.1.1”项色谱条件进样测定, 将 RH 峰面积与 IS 峰面积比值代入标准曲线方程计算 RH 质量浓度, 以测得量与加入量比值计算方法回收率。结果表明, 低、中、高 3 种质量浓度的方法回收率分别为 $(95.57\pm 3.21)\%$ 、 $(106.99\pm 4.98)\%$ 、 $(97.11\pm 3.42)\%$, 均大于 85% , 符合生物样品定量要求。

(2) 提取回收率试验: 取 RH 对照品储备液及大鼠空白血浆, 配制低、中、高 3 种质量浓度 (0.200 8、2.008 0、20.080 0 $\mu\text{g/mL}$) 的血浆样品, 按“2.1.3”项方法处理, 按“2.1.1”项色谱条件进样测定, 获得相应峰面积 (A); 同时另取空白血浆, 除不加对照品溶液和内标溶液外, 其余按“2.1.3”项方法处理, 向获得的溶液中加入相应质量浓度的 RH 对照品和 IS 溶液, 涡旋混合, 真空浓缩后加 100 μL 甲醇溶解后进样分析, 获得相应峰面积 (B)。以每一质量浓度 2 种处理方法的峰面积比值 (A/B) 计算提取回收率。结果表明, 低、中、高 3 种质量浓度的提取回收率分别为 $(78.66\pm 2.13)\%$ 、 $(88.51\pm 2.76)\%$ 、 $(84.15\pm 3.02)\%$, 均大于 50% , 符合生物样品定量要求。

2.1.8 稳定性试验 取 RH 对照品储备液及大鼠空白血浆, 配制低、中、高 3 种质量浓度 (0.200 8、2.008 0、20.080 0 $\mu\text{g/mL}$) 的血浆样品各 6 份, 按

“2.1.3”项方法处理, 分别于室温放置 12 h 后、反复冻融 3 次后、 $-70\ ^\circ\text{C}$ 保存 15 d 后进样测定。3 种条件下低、中、高质量浓度血浆样品 RSD 分别为 5.87% 、 4.21% 、 3.31% , 7.59% 、 6.79% 、 4.72% 和 7.24% 、 7.18% 、 4.54% 。表明血浆样品稳定性良好, 符合方法学要求。

2.2 肾脏透析液中 RH 分析方法的建立

2.2.1 色谱及质谱条件

色谱条件: CAPCELL PAK MG II C_{18} 色谱柱 (100 mm \times 2 mm, 3 μm); 柱温 $25\ ^\circ\text{C}$; 流动相为乙腈 (0.1%甲酸, A)-水 (0.1%甲酸, B); 梯度洗脱: 0~10 min, 40%~60% A; 10~11 min, 60%~100% A; 11~15 min, 100% A; 15~15.1 min, 100%~40% A; 15.1~20 min, 40% A; 体积流量 0.2 mL/min; 分析时间 20 min; 进样量 5 μL 。

质谱条件: AP-ESI 离子源, 采用负离子、多级反应监测 (MRM) 模式, RH 质谱条件主要参数: m/z 283.1 \rightarrow 238.9, 去簇电压 $-73.0\ \text{V}$, 碰撞能量 $-39.0\ \text{eV}$, 入口电压 $-10.0\ \text{V}$, 电喷雾电压 $-4\ 500\ \text{V}$, 去溶剂温度 $500\ ^\circ\text{C}$ 。

2.2.2 专属性考察 分别取空白透析液、空白透析液+RH 对照品和给药后大鼠肾脏透析液, 按“2.2.1”项色谱条件进样测定。RH 峰形良好, 保留时间约为 7 min, 透析液中内源性物质不干扰样品测定, 表明色谱行为及专属性良好。色谱图见图 2。

2.2.3 线性关系考察 精密吸取适量 RH 对照品储备液, 加空白透析液配制质量浓度分别为 0.525、1.050、2.100、5.250、10.500、21.000、52.500、105.000 ng/mL 的系列样品溶液。直接进样测定, 以空白透析液中 RH 的质量浓度 (X) 对 RH 峰面积 (Y) 进行加权 (权重为 $1/X$) 线性回归, 得回归方程 $Y=393.540\ 8\ X+444.992$, $r=0.996\ 7$, 线性范围为 0.525~105.000 ng/mL。最低定量限为 0.525 ng/mL ($S/N>5$)。

2.2.4 精密度与方法回收率试验 精密吸取适量 RH 对照品储备液, 加空白透析液配制低、中、高 3 种质量浓度 (2.1、21.0、105.0 ng/mL) 的样品溶液, 分别于同日内平行测定 5 次以考察日内精密度, 连续测定 5 d 以考察日间精密度。透析液样品中 RH 色谱峰面积代入随行透析液标准曲线, 通过测得量与加入量的比值求算回收率。结果表明, 低、中、高 3 种质量浓度的日内及日间精密度 RSD 均 $<10\%$; 方法回收率分别为 $(105.24\pm 5.71)\%$ 、 $(105.86\pm 3.76)\%$ 、 $(101.40\pm 2.63)\%$, 符合方法学要求。

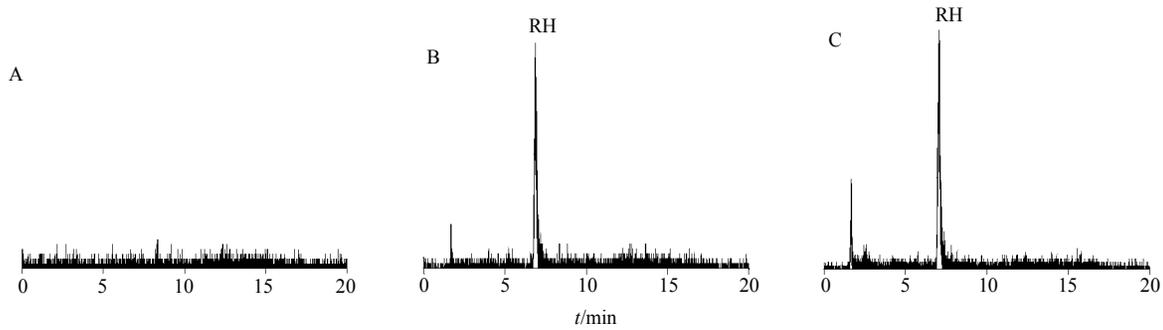


图2 空白肾脏透析液 (A)、空白肾脏透析液+RH (B) 和给药后大鼠肾脏透析液样品 (C) MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of blank renal microdialysate (A), blank microdialysate + RH (B), and renal microdialysate after iv administration of RH (C)

2.2.5 稳定性试验 精密吸取适量 RH 对照品储备液, 加空白透析液配制低、中、高 3 种质量浓度 (2.1、21.0、105.0 ng/mL) 的样品溶液各 6 份, 分别于室温放置 12 h 后、反复冻融 3 次后、-70 °C 保存 15 d 后测定。结果测得 3 种条件下低、中、高 3 种质量浓度透析液样品 RSD 分别为 4.57%、2.70%、3.14%, 5.03%、3.21%、2.26% 和 5.23%、3.71%、2.13%, 表明透析液样品稳定性良好, 符合方法学要求。

2.2.6 基质效应 精密吸取适量 RH 对照品储备液, 加空白透析液配制低、中、高 3 种质量浓度 (2.1、21.0、105.0 ng/mL) 的透析液样品溶液, 每个质量浓度各制备 3 份; 精密吸取适量 RH 对照品储备液, 加流动相配制低、中、高 3 种质量浓度 (2.1、21.0、105.0 ng/mL) 的对照品溶液, 每个质量浓度制备 3 份。按“2.2.1”分析条件测定, 考察样品溶液和对照品溶液的色谱峰面积, 两者对应的峰面积比值即为透析液样品的基质效应。结果表明, 低、中、高 3 种质量浓度的基质效应分别 (108.41 ± 4.32)%、(103.02 ± 3.24)%、(101.05 ± 1.34)%, 可见无明显基质效应。

2.3 RH 大鼠体内血液/肾脏同步药动学研究

2.3.1 给药方案及样品采集 健康 SD 大鼠 4 只, 实验前适应性喂养 2 d, 给药前禁食 24 h, 自由饮水, 给药后 2 h 内禁水, 全程禁食。大鼠 ip 10% 水合氯醛 (300 mg/kg) 麻醉后, 仰卧位固定于解剖板, 身下垫保温垫, 使其体温保持在 37.5 °C 左右。分离右颈动脉, 进行颈动脉插管以采集血样。纵向切开腹部皮肤, 打开肾周围筋膜, 游离出左肾, 将用肝素钠浸润过的引导针管沿肾长轴背侧植入肾皮质层 (深度 1.0~2.0 mm), 将微透析探针顺引导针方向植入肾皮质中, 去除引导管, 用止血海绵止血后将肾脏复位, 用手术线缝合探针尾端固定于腹腔壁以防探针

脱落, 逐层关闭腹腔。随即以灌流液 [1% DMSO + 20% 乙醇的林格氏液 (Ringer's 液), 1 μL/min] 灌注肾脏部位探针。灌流平衡 1 h 后, iv RH 3 mg/kg, 并分别于给药后 0、0.08、0.15、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6 h 取血约 0.3 mL, 置于肝素化的离心管中, 5 000 r/min 离心 10 min 分离得到大鼠血浆。同时每隔 30 min 收集肾脏透析液。

血浆样品按“2.1.3”项方法处理后, 按“2.1.1”项方法进样测定; 透析液样品不经处理直接按“2.2.1”项方法进样测定。

2.3.2 微透析探针在体回收率测定 大鼠肾脏微透析实验结束后, 继续灌流 2 h 空白 Ringer's 液, 然后更换含 50 ng/mL RH 的灌流液继续灌流, 每 30 min 收集一次透析液, 收集 4 份样品, 首份样品弃去, 后 3 份样品进样测定。以灌流液和透析液浓度差值与灌流液浓度比值为体内回收率。测得探针的平均回收率为 (36.36 ± 3.45)%, 该值用于透析液样品中药物浓度校正。

2.3.3 RH 血浆蛋白结合率测定 精密吸取适量 RH 对照品储备液, 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液配制低、中、高 3 种质量浓度 (2.1、21.0、105.0 ng/mL) 的样品溶液, 分别测定超滤前后缓冲盐溶液中 RH 的质量浓度, 计算离心超滤管对药物的吸附率。结果测得离心超滤管对药物的吸附率小于 1%, 因此超滤管的吸附作用忽略不计。

分别精密吸取低、中、高 3 种质量浓度 (2.1、21.0、105.0 ng/mL) 的 RH 样品溶液 200 μL 置于离心管中, 真空浓缩仪中挥干溶剂后, 加入空白大鼠血浆 1 mL, 涡旋混合均匀, 置于 37 °C 水浴孵育 1 h, 得血浆样品。精密吸取 100 μL 血浆样品按“2.1.3”项下方法处理, 进样分析求算血浆中药物总浓度; 另

精密吸取 400 μL 血浆样品于超滤离心管中, 10 000 r/min 离心 30 min, 取超滤液 100 μL 按“2.1.3”项方法处理, 进样分析, 求算药物浓度。

血浆蛋白结合率 = (血浆中药物总浓度 - 超滤液中药物浓度) / 血浆中药物总浓度

结果 RH 与大鼠的血浆蛋白结合率为 (89.52 ± 3.75) %, 与文献报道一致^[12], 且呈非浓度依赖性。

2.3.4 药动学参数 大鼠血浆中总药物浓度-时间及肾脏中游离药物浓度-时间曲线见图 3。采用 Phoenix Winnonlin 6.3 药动学软件进行非房室模型分析, 求算血液及肾脏透析液中 RH 药动学参数, 见表 1。结果表明肾脏渗透率 (AUC_{肾脏}/AUC_{血液}) 为 0.161 ± 0.056。

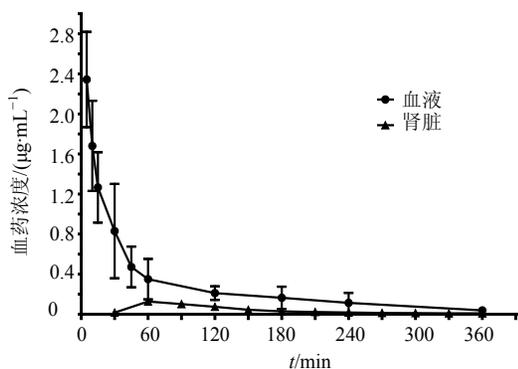


图 3 大鼠 iv RH 后血液/肾脏药物浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 3 Concentration-time curves of RH in plasma and kidney after iv administration of RH ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

表 1 大鼠 iv RH 后药物在血液/肾脏的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of RH in plasma and kidney after iv administration ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

参数	单位	血液	肾脏
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.344 ± 0.476	0.128 ± 0.019
t_{max}	min	—	60
MRT	min	87.217 ± 29.889	122.387 ± 12.521
$t_{1/2}$	min	60.442 ± 20.713	84.814 ± 8.677
$AUC_{0 \rightarrow t}$	$\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	109.191 ± 140.813	14.319 ± 1.441
$AUC_{0 \rightarrow inf}$	$\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$	114.236 ± 45.585	16.596 ± 1.732

3 讨论

近年来研究表明, RH 可显著抑制肾小球系膜细胞的增生、肥大以及细胞外基质的产生, 同时 RH 能抑制人肾小管上皮细胞转化生长因子- β (TGF- β_1) 的 mRNA 和蛋白表达, 保护肾脏固有细胞功能^[13], 对糖尿病肾病治疗具有独特疗效。对 RH 进行血液/肾脏同步药动学研究有助于建立血液及病变部位间药物浓度关系, 评价 RH 肾脏渗透性能, 更好地建立药动-药效 (PK-PD) 关系。为了更准确获取药物肾脏经时过程, 本研究采用 MD 结合 HPLC-MS/MS 方法进行了 RH 大鼠肾脏药动学研究。MD 目前已广泛用于在体组织连续取样^[14], 具有对动物应激小、基本不影响体液体积、样品无需前处理等特点。此外, MD 技术还可实现同一动物不同组织部位取样^[15]。已有文献报道采用微透析技术研究了抗菌药物^[16]、抗真菌药物^[17-18]、抗纤维化药物的肾脏药动力学, 目前未见 MD 技术用于肾脏疾病药物药动学研究。

微透析实验中所用灌流液多为 Ringer's 液, 故较适宜于极性成分的采样分析。RH 亲脂性很强, 血浆蛋白结合率高 [本实验中测得其结合率为

(89.52 ± 3.75) %], 因此有必要采取措施提高探针回收率。目前常用的提高微透析探针回收率的方法为使用灌流液改性剂, 如二甲基亚砜 (DMSO)、乙醇等。本实验选择含 10% 乙醇的 Ringer's 液、含 20% 乙醇的 Ringer's 液、含 1% DMSO + 20% 乙醇的 Ringer's 液和含 5% DMSO + 20% 乙醇的 Ringer's 液作为灌流液进行体外探针回收率考察。结果表明, 随着乙醇、DMSO 体积分数的增大, 体外回收率有所增加, 但考虑到乙醇、DMSO 比例过大会影响动物内环境, 对动物生理状态、实验过程造成不可预知的后果, 因此本研究考虑在提高回收率的同时尽量减小对内环境的影响, 选择 1% DMSO + 20% 乙醇的 Ringer's 液为灌流液。

本实验研究发现, iv 给药后, 肾脏组织中药物浓度在 1 h 达到峰值, 随后持续下降, 表明 RH 给药后可较快分布于肾脏组织, 随后在肾脏组织中缓慢消除。在给药后整个过程中, 肾脏组织药物浓度均明显低于血液中的浓度。血液及肾脏的 AUC 分别为 (114.236 ± 45.585)、(16.596 ± 1.732) $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$, 肾脏渗透率 (AUC_{肾脏}/AUC_{血液}) 为 0.161 ± 0.056。文献报道氟康唑^[17]在正常大鼠和模型大鼠的肾脏渗透

率分别为 0.87 和 0.89; 伏立康唑^[18]大鼠肾脏渗透率为 0.34。本研究结果表明 RH 与肾脏有一定的亲和力, 可有效向肾脏渗透, 但其肾脏渗透性能还具有一定的局限性, 可采用纳米粒^[19]等载体进一步提高其肾脏渗透性, 此外, 其肾脏转运机制还需进一步深入研究。

参考文献

[1] Lin M L, Chung J G, Lu Y C, *et al.* Rhein inhibits invasion and migration of human nasopharyngeal carcinoma cells *in vitro* by down-regulation of matrix metalloproteinases-9 and vascular endothelial growth factor [J]. *Oral Oncol*, 2009, 45(6): 531-537.

[2] Gao Y, Chen X, Fang L, *et al.* Rhein exerts pro- and anti-inflammatory actions by targeting IKK β inhibition in LPS-activated macrophages [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 72: 104-112.

[3] Azelmat J, Larente J F, Grenier D. The anthraquinone rhein exhibits synergistic antibacterial activity in association with metronidazole or natural compounds and attenuates virulence gene expression in *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Arch Oral Biol*, 2014, 60(2): 342-346.

[4] 李晓红, 李蒙, 陶艳蓉. 大黄酸及其衍生物药理作用新进展 [J]. *现代药物与临床*, 2010, 25(6): 417-421.

[5] 谭力学, 李孝生, 刘增权, 等. 川芎嗪和 RH 联用对大鼠肝纤维化的抑制作用 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(11): 692-693.

[6] Jia Z H, Liu Z H, Zheng J M, *et al.* Combined therapy of rhein and benazepril on the treatment of diabetic nephropathy in db/db mice [J]. *Exp Clin Endocr Diab*, 2007, 115(9): 571-576.

[7] Zeng C C, Liu X, Chen G R, *et al.* The molecular mechanism of rhein in diabetic nephropathy [J]. *Evid Based Compl Alt*, 2014, 2014: 1-7.

[8] Dai X Y, Yan Y L, Wu Q F, *et al.* Comparative pharmacokinetics of rhein and chrysophanol after oral administration of Qu yu Qing re granules in normal and acute blood stasis rabbits [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(2): 338-343.

[9] Hou M L, Chang L W, Lin C H, *et al.* Determination of bioactive components in chinese herbal formulae and pharmacokinetics of rhein in rats by UPLC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2014, 19(4): 4058-4075.

[10] 朱黎霞, 张英丰. 血液微透析法结合液质联用的丹参水煎液清醒动物多次给药药动学研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(15): 2206-2209.

[11] 徐月红, 叶卉, 郭秀彩, 等. 微透析联用反相高效液相色谱研究白芥子涂方皮肤药动学 [J]. *中草药*, 2012, 43(2): 336-340.

[12] 冯素香, 吴加, 李建生, 等. RH5 个蒽醌类成分与大鼠血浆蛋白结合率的测定 [J]. *中国现代应用药学*, 2013, 3(1): 1-5.

[13] 曾嵘, 王俭勤, 段书众. RH 对人肾小管上皮细胞血小板反应蛋白 1 和转化生长因子 β_1 表达的影响 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2008, 17(3): 248-251.

[14] 赖宝林, 王利胜, 夏祖猛, 等. 微透析采样技术进行芎冰微乳经大鼠鼻腔给药的脑靶向性研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46(24): 1906-1910.

[15] 周佳, 秦升, 肖和平, 等. 微透析技术研究左氧氟沙星在大鼠脑和血中的药动学 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(6): 466-469.

[16] de Araújo B V, Laureano J V, Grünspan L D, *et al.* Validation of an efficient LC-microdialysis method for gemifloxacin quantitation in lung, kidney and liver of rats [J]. *J Chromatogr B*, 2013(919/920): 62-66.

[17] Azeredo F J, de Araújo B V, Haas S E, *et al.* Comparison of fluconazole renal penetration levels in healthy and *Candida albicans*-infected Wistar rats [J]. *Antimicrob Agents Che*, 2012, 56(11): 5852-5857.

[18] Araujo B V, Silva C F, Haas S E, *et al.* Free renal levels of voriconazole determined by microdialysis in healthy and *Candida sp.*-infected Wistar rats [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 33(2): 154-159.

[19] Choi C H, Zuckerman J E, Webster P, *et al.* Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(16): 6656-6661.