

β -七叶皂苷钠在家兔体内的药动学研究

罗宁^{1*}, 张斯汉¹, 颜晗², 赵奎³(1.深圳市龙岗区人民医院, 广东深圳 518172; 2.深圳市药品检验所, 广东深圳 518019; 3.深圳市人民医院, 广东深圳 518019)

中图分类号 R285;R969 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)15-1362-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.15.07

摘要 目的:建立家兔血液中七叶皂苷钠的测定方法。方法:应用酶联免疫吸附分析(ELISA)方法,测定正常家兔与脑缺血再灌注模型家兔静脉注射 β -七叶皂苷钠(5 mg/kg)后的血药浓度,并对其药动学参数进行分析。结果:正常家兔与模型家兔静脉注射 β -七叶皂苷钠后,主要药动学参数 $t_{1/2\alpha}$ 分别为(0.343 \pm 0.061)、(0.854 \pm 0.079)h, $t_{1/2\beta}$ 分别为(23.325 \pm 10.36)、(34.283 \pm 13.74)h,CL分别为(1.600 \pm 1.206)、(0.718 \pm 0.428)L/h, V_d 分别为(53.827 \pm 36.42)、(14.799 \pm 10.15)L, AUC_{0-24h} 分别为(2.919 \pm 0.981)、(26.417 \pm 9.207) μ g/(h·L), $AUC_{0-\infty}$ 分别为(3.126 \pm 1.253)、(27.848 \pm 8.745) μ g/(h·L), c_{max} 分别为(4.126 \pm 0.927)、(7.905 \pm 1.054)mg/L。结论: β -七叶皂苷钠在脑缺血再灌注模型大鼠体内的消除较正常大鼠慢,在体内停留的时间较长。提示 β -七叶皂苷钠在临床对症治疗时应考虑其药动学特点。

关键词 β -七叶皂苷钠;家兔;药动学

Pharmacokinetics Study of β -aescin Sodium in Rabbits

LUO Ning¹, ZHANG Si-han¹, YAN Han², ZHAO Kui³(1.Shenzhen Longgang District People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518172, China; 2. Shenzhen Institute for Drug Control, Guangdong Shenzhen 518019, China; 3. Shenzhen People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518019, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the concentration determination of β -aescin sodium in blood of rabbits. METHODS: ELISA method was adopted. The blood concentration of β -aescin sodium in normal rabbits and cerebral ischemia-reperfusion rabbits were determined after i.v. injection of β -aescin(5 mg/kg). The pharmacokinetic parameters were analyzed. RESULTS: After i.v. injection of β -aescin sodium, main pharmacokinetic parameters of normal rabbits vs. model rabbits were as follows: $t_{1/2\alpha}$ were (0.343 \pm 0.061) h vs.(0.854 \pm 0.079) h; $t_{1/2\beta}$ were (23.325 \pm 10.36) h vs. (34.283 \pm 13.74) h; CL were (1.600 \pm 1.206) L/h vs. (0.718 \pm 0.428) L/h; V_d were (53.827 \pm 36.42) L vs.(14.799 \pm 10.15) L; AUC_{0-24h} were (2.919 \pm 0.981) μ g/(h·L) vs.(26.417 \pm 9.207) μ g/(h·L); $AUC_{0-\infty}$ were (3.126 \pm 1.253) μ g/(h·L) vs.(27.848 \pm 8.745) μ g/(h·L); c_{max} were(4.126 \pm 0.927) mg/L vs.(7.905 \pm 1.054) mg/L. CONCLUSION: The elimination of β -aescin sodium in cerebral ischemia-reperfusion rats is slower than in normal rats, remain inside the body for a long time. The pharmacokinetic characteristics of β -aescin should be considered in the clinical symptomatic treatment.

KEY WORDS β -aescin sodium; Rabbits; Pharmacokinetics

β -七叶皂苷钠是七叶树科植物天师粟或中药娑罗子的干燥成熟果实中提取的三萜皂苷的钠盐,具有抗炎、抗渗出、提高静脉张力、改善微循环、促进脑功能恢复、促进血肿溶化和

吸收、促进肾上腺皮质分泌皮质类固醇及清除氧自由基等广泛的药理作用^[1]。为探讨 β -七叶皂苷钠在家兔体内的药动学特点,本研究应用酶联免疫吸附分析(Enzyme-linked

ty evaluation of scutellarein as a potent agent for the therapy of ischemic cerebrovascular disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(11):8 208.

[4] 万丽丽,郭澄,野黄芩苷药动学研究进展[J]. *中国药房*, 2007, 18(30):2 385.

[5] 杨丽梅,顾军,李建宇,等.灯盏乙素衍生物的合成及抗大鼠心肌缺血活性研究[J]. *天津中医药*, 2010, 27(3):240.

[6] 傅晓钟,张伟,王永林,等.灯盏乙素苷元 4'-L-氨基酸衍生物的设计、合成与抗氧化活性[J]. *药学学报*, 2011, 46

(5):548.

[7] 杨静,陈赛贞,王婷.氧化应激致PC12细胞凋亡的信号传导途径的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2011, 25(1):102.

[8] 赵松.洋金花对PD大鼠抗氧化作用的实验研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2008.

[9] 吕风月,李军泉,张海燕,等.脑室内注射脂多糖致脑内炎症大鼠模型黑质多巴胺能神经元与胶质细胞的早期变化[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(1):1.

(收稿日期:2012-05-10 修回日期:2012-07-12)

* 副主任药师。研究方向:临床药学。电话:0755-28932833。
E-mail:szluoning@sina.com

immunosorbent assay, ELISA)检测方法,测定正常家兔与脑缺血再灌注家兔经iv β -七叶皂苷钠5 mg/kg后的血药浓度,并对其药动学参数进行了研究。

1 材料

1.1 仪器

HP1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);M200型酶标仪(瑞士Tecan公司);Evolution300型紫外分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 药品与试剂

β -七叶皂苷钠注射液(山东绿叶制药有限公司,批号:20110608); β -七叶皂苷钠酶联标记物(HRP- β -七叶皂苷钠)参考文献方法^[1-2]由笔者自制; β -七叶皂苷钠对照品(中国食品药品检定研究院,批号:10941-0002);牛血清白蛋白(BSA)、吐温20、DEAE-D52纤维素、羊抗兔二抗均由美国Sigma公司提供;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康家兔,♀♂兼半,体质量为(2.2±0.02)kg,由中山大学实验动物中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2004-0011]。

2 方法与结果

2.1 特异性试验

以 β -七叶皂苷钠半数(50%)抑制HRP- β -七叶皂苷钠与抗体反应时的质量浓度($x=54.51$ ng/ml)作为标准,分别将 α -七叶皂苷、krypto-七叶皂苷、地高辛半数(50%)抑制HRP- β -七叶皂苷钠与抗体反应的质量浓度($y=454.5$ 、605.67、908.5 ng/ml)同 x 比值的百分数用来评价抗体的特异性。结果, α -七叶皂苷、krypto-七叶皂苷、地高辛与抗体发生交叉反应的平均值分别为0.12%、0.09%、0.06%,表明该方法特异性高。

2.2 血浆样品的处理

取血浆样品0.2 ml,置于10 ml玻璃离心管中,再加入1.2 ml乙酸乙酯-石油醚(50:50, V/V),涡旋混合5 min,4 000 r/min离心10 min,取乙酸乙酯-石油醚层,置于10 ml玻璃离心管中,40℃下氮气吹干,残渣加入100 μ l流动相涡旋振荡1 min溶解,12 000 r/min离心10 min,取上清液20 μ l进样。

2.3 标准曲线的制备^[3-5]

精确称取一定量的 β -七叶皂苷钠对照品,用少许0.1 mol/L的NaOH溶液溶解,再用空白血浆将其稀释成质量浓度分别为2、4、8、16、32、64、128 ng/ml的系列血浆溶液。用包被缓冲液将羊抗兔二抗稀释至5 ng/ml,并加入到96孔板中,100 μ l/孔,4℃孵育过夜。第2天在96孔板内加入100 μ l封闭缓冲液,室温封闭30 min,然后用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗涤3次;洗涤结束后,加入 β -七叶皂苷钠的系列血浆溶液20 μ l/孔、稀释的抗 β -七叶皂苷钠的抗体50 μ l/孔与HRP- β -七叶皂苷钠50 μ l/孔,室温孵育60 min,再用PBST洗涤3次;加入显色剂100 μ l/孔,在室温下反应15 min,最后加入终止液。于450 nm波长处测定吸光度(OD)值。以血药浓度的对数(logc)为横坐标,测得的OD值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为

$y = -0.107 + 0.852 \log c$ ($r = 0.999 0, n = 7$)。结果表明, β -七叶皂苷钠的血药浓度在2~128 ng/ml范围内与其OD值呈良好线性关系。

2.4 精密度试验

按“2.2”项下方法制备低、中、高质量浓度(2、16、128 ng/ml)的不同含药血浆,测定日内精密度(6次)和日间精密度(3 d)。结果,日内精密度的RSD分别为2.3%、5.6%、7.1%,日间精密度的RSD分别为4.2%、3.7%、3.5%,表明本方法精密度较好。

2.5 回收率试验

按“2.2”项下方法制备低、中、高质量浓度(2、16、128 ng/ml)的不同含药血浆,各6份。将检测得到的OD值代入标准曲线回算,获得回算质量浓度,其与加入质量浓度的比值即为该方法的提取回收率^[6,7]。结果,低、中、高质量浓度 β -七叶皂苷钠的平均提取回收率分别为97.89%、96.57%、97.42%,RSD<4.4%。

2.6 稳定性试验

取“2.4”项下样品,室温放置24 h,考察室温稳定性;反复冻融3次,考察冻融稳定性;-20℃放置14 d,考察长期稳定性。结果,3种贮藏条件下低、中、高质量浓度血浆样品的相对偏差均在(±10.3)%以内,RSD<5.2%,表明血浆样品在测定条件下稳定性良好。

2.7 药动学研究

实验分为两组,即正常用药、模型用药组。参照文献^[9]复制家兔右侧大脑中动脉栓塞模型。缺血30 min后,从耳缘iv β -七叶皂苷钠5 mg/kg,用3%戊巴比妥麻醉,分离颈总动脉,分别于给药后5、10、15、20、25、30、40、50、60、80、100、120、150、180、240、300 min从颈总动脉取血1 ml;正常用药组相同操作。全血样品均经肝素抗凝,5 000 r/min离心10 min,分取血浆,-20℃贮藏,待测。

正常用药组家兔在iv β -七叶皂苷钠后,血药浓度迅速下降,约2 h后,血药浓度下降速率减慢;模型用药组家兔脑缺血30 min后,从耳缘iv β -七叶皂苷钠5 mg/kg,其体内药物代谢速率比正常健康家兔明显减慢,尤其在2~3 h时药物代谢减慢,且在3 h出现一个较低的血药浓度峰,随后峰值下降。浓度-时间曲线见图1;药动学参数见表1。

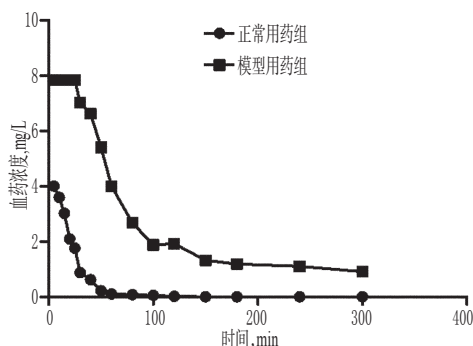


图1 浓度-时间曲线
Fig 1 Blood concentration-time curves

表1 药动学参数

Tab 1 Pharmacokinetic parameters

参数	正常用药组	模型用药组
$t_{1/2\alpha}$, h	0.343 ± 0.061	0.854 ± 0.079
$t_{1/2\beta}$, h	23.325 ± 10.36	34.283 ± 13.74
V_d , L	53.827 ± 36.42	14.799 ± 10.15
V_L , L	1.183 ± 0.941	2.413 ± 1.627
CL, L/h	1.600 ± 1.206	0.718 ± 0.428
AUC ₀₋₂₄ , μg/(h·L)	2.919 ± 0.981	26.417 ± 9.207
AUC _{0-∞} , μg/(h·L)	3.126 ± 1.253	27.848 ± 8.745
K_{12} , L/h	1.353 ± 0.639	0.298 ± 0.127
K_{21} , L/h	0.655 ± 0.294	0.430 ± 0.173
K_{10} , L/h	0.044 ± 0.062	0.132 ± 0.189
c_{min} , mg/L	4.126 ± 0.927	7.905 ± 1.054

3 讨论

由于七叶皂苷本身不溶于水,目前临床上使用的制剂为注射用七叶皂苷钠^[8-9]。已有相关文献^[2-3]报道可自行制备七叶皂苷钠的内标物,所以本研究借鉴该方法取得了较好的结果。为了探讨七叶皂苷钠在家兔体内的药动学特点,笔者应用ELISA检测方法,测定正常家兔及脑缺血再灌注家兔经iv β-七叶皂苷钠5 mg/kg后的血药浓度,并对其药动学参数进行研究。结果显示,α-七叶皂苷、krypto-七叶皂苷、地高辛与抗体发生交叉反应的平均值分别为0.12%、0.09%、0.06%,表明这些物质在β-七叶皂苷钠抑制HRP-β-七叶皂苷钠和抗体结合时与该物质相差较大,没有重合,即这些相似物质不会干扰β-七叶皂苷钠的检测,该方法特异性高。正常健康家兔在iv β-七叶皂苷钠后,血药浓度迅速下降,约2 h后,血药浓度下降速率减慢;而脑缺血再灌注模型家兔脑缺血30 min后,从耳缘iv β-七叶皂苷钠5 mg/kg,其体内药物代谢规律与正常健康家兔明显不同,脑缺血再灌注家兔体内的药物代谢速率明显减慢,尤其在2~3 h时药物代谢减慢,且在3 h出现一个较低的血药浓度峰,随后峰值下降。上述研究结果表明,β-七叶皂苷钠在脑缺血再灌注大鼠体内的消除较正常大鼠慢,在体内停留的时间较长。提示β-七叶皂苷钠在临床对症治疗时应考虑其药动学特点。

参考文献

[1] Kunz K, Lorkowski G, Petersen G, *et al.* Bioavailability of escin after administration of two oral formulations con-

taining aesculus extract[J]. *Arzneimittelforschung*, 1998, 48(8):822.

- [2] Loew D, Schrödter A, Schwankl W, *et al.* Measurement of the bioavailability of aescin-containing extracts[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2000, 22(7): 537.
- [3] 黄毅,刘松青,林彩,等.羟基喜树碱脂自制剂注射液与市售注射液家兔体内药代动力学行为的比较[J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(6):517.
- [4] Wu XJ, Zhang ML, Cui XY, *et al.* Comparative pharmacokinetics and bioavailability of escinIa and isoescsin Ia after administration of escin and of pure escin Ia and isoescsin Ia in rat[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(1): 201.
- [5] Liu L, Wu X, Wu D, *et al.* A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of escin Ia and escin Ib in human plasma: application to a pharmacokinetic study after intravenous administration [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(12):1 309.
- [6] Wu X, Liu L, Zhang M, *et al.* Simultaneous analysis of isomers of escin saponins in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetic study after oral administration [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(11/12): 861.
- [7] Sirtori CR. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile [J]. *Pharmacol Res*, 2001, 44(3):183.
- [8] Bässler D, Okpanyi S, Schrödter A, *et al.* Bioavailability of beta-aescin from horse chestnut seed extract: comparative clinical studies of two Galenic formulations [J]. *Adv Ther*, 2003, 20(5):295.
- [9] Buralgassi S, Monti D, Brignoccoli A, *et al.* Development of cultured rabbit corneal epithelium for drug permeation studies: a comparison with excised rabbit cornea [J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2004, 20(6):518.

(收稿日期:2012-09-28 修回日期:2013-01-03)

第45届国际食品添加剂法典委员会会议在京召开

本刊讯 2013年3月18日至22日,第45届国际食品添加剂法典委员会(简称CCFA)会议在京举行,国家卫生与计划生育委员会副主任陈啸宏出席开幕式并致辞。

陈啸宏指出,2009年以来,我国进一步建立健全食品安全法规制度、深入开展食品安全综合治理、加快食品安全国家标准体系建设、加强食品安全风险评估和监测等工作并取得了成效。他表示,中国愿意与世界各国一道,继续推进食品安全工作,为维护人民健康权益做出努力。

本次会议是我国担任国际食品添加剂法典委员会主持国以来主办的第7次会议。来自56个成员国和1个成员组织(欧盟)及33个国际组织的260余名代表参加了本届会议。本次会议重点研究了食品添加剂法典通用标准(GSFA)、食品添加剂编码系统(INS)、国际粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会(JECFA)优先评估的食品添加剂名单、食品添加剂质量规格标准等相关内容。