

紫苏醇壳聚糖亚微乳在大鼠体内的药动学研究

刘琳*(郑州大学附属郑州中心医院, 郑州 450009)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4255-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.12

摘要 目的:研究紫苏醇(POH)溶液(POH-SL)、POH亚微乳(POH-SE)与POH壳聚糖亚微乳(POH-CSSE)在大鼠体内的药动学特征。方法:将大鼠随机分为POH-SL组、POH-SE组及POH-CSSE组,每组6只,尾静脉注射相应药物65 mg/kg,采用高效液相色谱法检测给药后5、10、15、30、45、60、120、240、360、480、600 min的血药浓度, Kinetic 4.4.1 软件计算药动学参数。色谱条件:色谱柱为Agilent Zorbax XDB C₁₈,流动相为乙腈-水(40:60),流速为1.0 ml/min,检测波长为210 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:POH检测质量浓度的线性范围为0.05~25 μg/ml($r=0.9996$),平均方法回收率为(95.64±0.03)%~(98.65±0.09)%,RSD≤8.62%($n=5$)。POH-SL、POH-SE、POH-CSSE的药动学参数分别为 $t_{1/2\beta}$ (81.65±0.107)、(121.58±0.021)、(130.69±0.031) min, $AUC_{0-\infty}$ (4 944.19±0.024)、(6 716.22±0.044)、(7 008.46±0.035) mg·min/L, K_{10} (0.005 397±0.012)、(0.004 216±0.012)、(0.004 186±0.013) min⁻¹;其中与POH-SL比较,POH-SE和POH-CSSE的 $t_{1/2\beta}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 明显增加($P<0.05$)。结论:POH-CSSE在体内有较好的长循环作用,有助于延长POH的吸收。

关键词 紫苏醇;壳聚糖;亚微乳;大鼠;药动学

Study on Pharmacokinetics of Perillyl Alcohol Chitosan Submicron Emulsions in Rats

LIU Lin(Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450009, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pharmacokinetics characteristics of Perillyl alcohol (POH) solution (POH-SL), Perillyl alcohol submicron emulsions (POH-SE) and Perillyl alcohol chitosan submicron emulsions (POH-CSSE) in rats. METHODS: Rats were randomly divided into POH-SL group, POH-SE group and POH-CSSE group with 6 rats in each group. They were given relevant medicines 65 mg/kg intravenously via tail vein. The plasma concentrations of POH were determined by HPLC 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 and 600 min after medication. The pharmacokinetic parameters of POH were calculated by Kinetic 4.4.1 software. The determination was performed on Agilent Zorbax XDB C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (40:60) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm and column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μl. RESULTS: The linear range of POH were 0.05-25 μg/ml ($r=0.9996$) with average recovery of (95.64±0.03)%-(98.65±0.09)% (RSD≤8.62%, $n=5$). The pharmacokinetic parameters of POH-SL, POH-SE and POH-CSSE were as follows: $t_{1/2\beta}$ (81.65±0.107) min, (121.58±0.021) min and (130.69±0.031) min; $AUC_{0-\infty}$: (4 944.19±0.024) mg·min/L, (6 716.22±0.044) mg·min/L and (7 008.46±0.035) mg·min/L; K_{10} : (0.005 397±0.021) min⁻¹, (0.004 216±0.012) min⁻¹ and (0.004 186±0.013) min⁻¹. Compared with POH-SL, $t_{1/2\beta}$ and $AUC_{0-\infty}$ of POH-SE and POH-CSSE were increased significantly ($P<0.05$). CONCLUSIONS: POH-CSSE has a better long-circulating effect in rats, which can extend absorption of POH.

KEY WORDS Perillyl alcohol; Chitosan; Submicron emulsion; Rats; Pharmacokinetics

中性胰岛素注射液注射前溶液澄清无泡沫,经无针注射器注射后,产生浑浊和泡沫,这种变化是由于无针注射器高压喷射所致。高压喷射影响了药物的表现性质,会不会改变药物的含量呢?本着这个初衷笔者进行了本研究,结果表明无针注射器高压喷射并不会明显影响中性胰岛素注射液的含量;而且模拟皮肤注射也进一步证实了无针注射器对中性胰岛素注射液含量未见明显影响。然而无针注射器对中性胰岛素注射液其他方面的性质,如pH值、相关蛋白质、高分子蛋白质等有无影响,尚需进一步研究。

*主管药师。研究方向:临床药学。电话:0371-67690017。E-mail:liuliner9@126.com

参考文献

- [1] 刘琳.剂量可调型无针注射器的体内外评价[D].武汉:华中科技大学,2008:4.
- [2] 祝清芬,国明,魏霞.GB-03无针注射器对重组人胰岛素注射液生物活性的影响[J].中国现代应用药学,2011,28(8):707.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:846.
- [4] 罗远菊.无针注射器注射效果的药学评价[D].武汉:湖北中医药大学,2012:5.

(收稿日期:2013-02-01 修回日期:2013-06-12)

紫苏醇[(S)-(-)-perillyl alcohol, POH] 是一种广谱、高效、低毒、具有抗肿瘤作用的单萜类物质^[1],其药理作用主要为解热、抗菌、止痛和定喘等,对乳腺癌、直肠癌、皮肤癌都有一定的疗效,且处于临床研究阶段;但POH口服胶囊制剂Ⅱ期临床试验表明其有较大的胃肠刺激性,已经有患者口服后因无法耐受而退出临床研究的病例。笔者前期已完成了静脉注射用POH亚微乳(POH-SE)处方和工艺的优化及其含量测定的研究^[2],相分布和体外释放研究结果表明该亚微乳具有缓释作用^[3],POH-SE在大鼠体内的组织分布研究也已有文献报道^[4]。壳聚糖具有良好的组织相容性、生物黏附性、靶向性和体内可降解性,为此,笔者制备了POH壳聚糖亚微乳(POH-CSSE)以增加POH的缓释性。本文采用常规血药浓度测定法,利用非隔室模型考察POH的药动学特征,分别研究了POH溶液(POH-SL)、POH-SE与POH-CSSE静脉注射后在大鼠体内的药动学过程,为研究POH的给药方案及临床应用奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);YKH-II 型涡旋混合器(江西医疗器械厂);LG 10-24A 型高速离心机(北京医用离心机厂,离心半径:13.5 cm);电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司)。

1.2 药品与试剂

POH-SE(批号:20080802,含量:12.5 mg/ml)、POH-CSSE(批号:20080803,含量:12.5 mg/ml)和 POH-SL(批号:20080822,含量:12.5 mg/ml)均为郑州大学附属郑州中心医院自制;POH 对照品(美国 Sigma 公司,批号:080119,纯度:≥96%);甲醇、乙腈为色谱纯,丙二醇等其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠,♂ ♀ 各半,体质量(250±20) g,由郑州大学实验动物中心提供,许可证号为 SCXK(豫)2005-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax XDB C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(40:60),流速:1.0 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μl。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取 POH 对照品适量,用甲醇配制成 20、10、5、2.5、2.0、1.0 μg/ml 的系列溶液,冷藏保存备用。

2.3 血浆样品的处理

取血浆样品 100 μl,加入乙腈 200 μl,涡旋震荡 3 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上层液 20 μl 进样分析。

2.4 专属性考察

分别取大鼠空白血浆、POH 对照品溶液及大鼠给药 30 min 后的血浆样品 100 μl,按“2.3”项下方法操作,进样测定,记录色谱。色谱图见图 1。

由图 1 可知,POH 的保留时间约为 16 min,峰形良好,血浆中杂质对 POH 的测定无干扰。

2.5 线性关系考察

取大鼠空白血浆 100 μl 共 9 份,分别加入 POH 系列对照品溶液 20 μl,配制成质量浓度分别为 25、20、10、5、2.5、2.0、1.0、0.2、0.05 μg/ml 的血浆样品,按“2.3”项下方法处理后,进样测定,记录色谱。以质量浓度(*c*)为横坐标,POH 峰面积(*A*)为纵

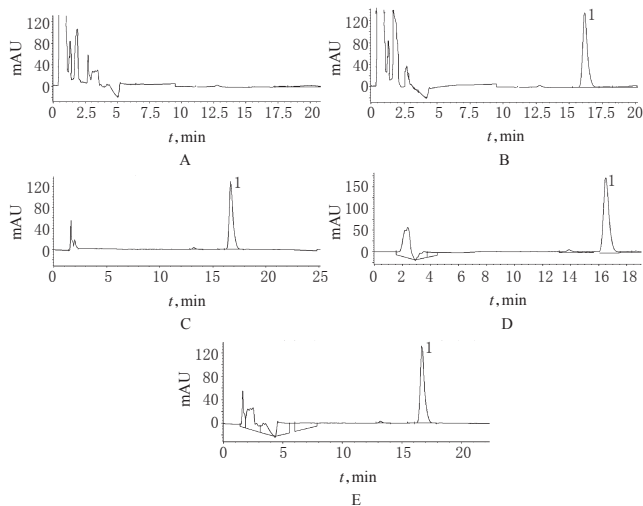


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. POH 对照品; C. POH-SL 血浆样品; D. POH-SE 血浆样品; E. POH-CSSE 血浆样品; 1. POH

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. POH control; C. plasma sample of POH-SL; D. plasma sample of POH-SE; E. plasma sample of POH-CSSE; 1. POH

坐标,进行回归分析,得回归方程为 $A = 16.995c - 24.601$ ($r = 0.9996$)。结果表明,血浆样品中 POH 检测质量浓度的线性范围为 0.05~25 μg/ml,定量限为 0.05 μg/ml,检测限为 0.015 μg/ml。

2.6 回收率与精密度试验

按“2.5”项下方法分别配制质量浓度为 0.2、2.5、20 μg/ml 的血浆样品,各 5 份,处理后进样,计算方法回收率;另取 POH 对照品,稀释后进样测定,计算提取回收率。同一样本同日内测定 5 次,考察日内精密度;每日测定 1 次,连续测定 5 d,考察日间精密度,结果见表 1。

表 1 回收率与精密度试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Results of recovery and precision tests($\bar{x} \pm s, n=5$)

加入量, μg/ml	日内 RSD, %	日间 RSD, %	方法回收率, %	RSD, %	提取回收率, %	RSD, %
0.2	4.78	5.92	98.65±0.09	8.62	88.61±0.11	9.75
2.5	2.17	3.46	96.58±0.04	4.56	84.32±0.08	9.43
20.0	1.53	2.18	95.64±0.03	2.33	82.15±0.07	8.91

2.7 稳定性考察

配制质量浓度分别为 0.2、2.5、20 μg/ml 的血浆样品,各 3 份,考察冷冻(-20 ℃)24 h 和反复冻融 3 次以及萃取后再冷冻(-20 ℃)24 h 的稳定性。结果表明,血浆样品冷冻后含量的 RSD 为 7.0%~15% ($n=5$),反复冻融后含量的 RSD 为 3%~14% ($n=5$),萃取后再冷冻后含量的 RSD 为 2%~20% ($n=5$),提示血浆样品直接冷冻和反复冻融的稳定性较好,萃取后再冷冻则不稳定。因此血浆样品预处理后应立即测定。

2.8 给药方案与血样采集

取 SD 大鼠 18 只,随机分成 3 组,分别为 POH-SL 组、POH-SE 组、POH-CSSE 组,通过预试验确定给药剂量,以 65 g/kg 的剂量经大鼠尾静脉缓慢推注给予相应药物,分别于给药后 5、10、15、30、45、60、120、240、360、480、600 min 眼内眦取血 0.5 ml,置于预先肝素化的 1.5 ml 尖底离心管中,8 000 r/min 离心 10 min,并置于肝素钠抗凝的离心管内,离心分离血浆,

-20 ℃保存待测;精密吸取上层血浆 100 μl,按照“2.3”项下方法处理,进样测定,代入回归方程计算血药浓度。

2.9 药动学结果分析

将“2.8”项下所得血药浓度经时数据用 Kinetic 4.4.1 药动学软件进行曲线拟合,根据 AIC 判据和 *F* 检验综合判断,经 *t* 检验方差分析结果。药-时曲线见图 2。

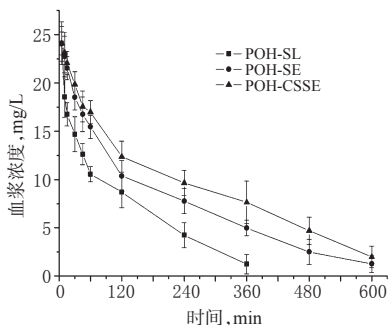


图 2 3 种 POH 样品在大鼠体内的药-时曲线

Fig 2 Plasma concentration-time curves of 3 kinds of POH samples in rats

结果,POH-SL 的药动学方程为 $c=16.84e^{-0.0601t}+18.73e^{-0.00403t}$, POH-SE 的药动学方程为 $c=15.63e^{-0.0129t}+9.66e^{-0.0397t}$, POH-CSSE 的药动学方程为 $c=17.06e^{-0.0118t}+8.74e^{-0.0665t}$,表明 POH-SL、POH-SE、POH-CSSE 在大鼠体内的药动学行为均符合二室模型。药动学参数见表 2。

与 POH-SL 比较,POH-SE、POH-CSSE 的 $t_{1/2\beta}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 均明显增加, K_{10} 明显减小($P<0.05$),可见亚微乳剂消除减慢、体内循环时间延长,其中壳聚糖修饰的亚微乳更明显^[5-7],有助于延长 POH 的吸收。

3 讨论

本文建立了测定大鼠血浆中 POH 的高效液相色谱法。在该色谱条件下,内源性物质与 POH 均能得到较好分离,测定结果准确,重现性好,POH 检测质量浓度在 0.05~25 μg/ml 内峰面积与测得质量浓度呈良好的线性关系。用乙腈作为蛋白沉淀剂,可以将 POH 等脂溶性成分更好地保留在有机相中,有效提高了血浆样品中 POH 的回收率和检测方法的灵敏度。

大鼠分别经尾静脉注射 POH-SL、POH-SE、POH-CSSE 后

表 2 3 种 POH 样品在大鼠体内的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of 3 kinds of POH samples in rats($\bar{x} \pm s, n=5$)

参数	POH-SL	POH-SE	POH-CSSE
β, min^{-1}	0.004 03 ± 0.011	0.039 7 ± 0.013*	0.066 5 ± 0.012*
$c_{\text{max}}, \text{mg/L}$	26.24 ± 0.021	28.54 ± 0.016	28.93 ± 0.022
$t_{1/2\alpha}, \text{min}$	15.93 ± 0.016	19.16 ± 0.022	18.95 ± 0.026
$t_{1/2\beta}, \text{min}$	81.65 ± 0.017	121.58 ± 0.021*	130.69 ± 0.031*
$V, \text{L/mg}$	2 173 000 ± 0.018	2 699 000 ± 0.017	2 549 000 ± 0.026
$CL, \text{L}/(\text{mg} \cdot \text{min})$	11 660 ± 0.015	10 210 ± 0.011	10 060 ± 0.013
$AUC_{0-\infty}, \text{mg} \cdot \text{min}/\text{L}$	4 944.19 ± 0.024	6 716.22 ± 0.044*	7 008.46 ± 0.035*
K_{10}, min^{-1}	0.005 397 ± 0.012	0.004 216 ± 0.012*	0.004 186 ± 0.013*

与 POH-SL 比较: * $P<0.05$

vs. POH-SL: * $P<0.05$

的吸收均符合二室模型。POH-SE 和 POH-CSSE 的药动学特征曲线相似,但 POH-CSSE 的体内长循环作用更明显。

参考文献

- [1] Crowell PL. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes[J]. *J Nutr*, 1999, 129(3): 775S.
- [2] 华海婴,刘琳,赵永星,等.紫苏醇亚微乳剂的制备及其 HPLC 法测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2008, 39(6): 447.
- [3] 华海婴,赵永星,刘琳.紫苏醇亚微乳中药物的相分布和体外释放研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2009, 40(1): 32.
- [4] 李建勋,赵永星,华海婴,等.紫苏醇亚微乳在大鼠体内的组织分布研究[J]. *中国医药工业杂志*, 2010, 41(11): 841.
- [5] Wang Y, Mesfin GM, Rodriguez CA, et al. Venous irritation, pharmacokinetics, and tissue distribution of tirilazad in rats following intravenous administration of a novel supersaturated submicron lipid emulsion[J]. *Pharm Res*, 1999, 16(6): 930.
- [6] 田玲玲,唐星,何海冰,等.依托泊苷静脉注射亚微乳的制备及其体内评价[J]. *药学学报*, 2007, 42(8): 892.
- [7] Zhang HY, Tang X, Li HY, et al. A lipid microsphere vehicle for vinorelbine: stability, safety and pharmacokinetics[J]. *Int J Pharm*, 2008, 348(1/2): 70.

(收稿日期:2013-02-16 修回日期:2013-04-09)

我国生产的疫苗首次通过世界卫生组织预认证

本刊讯 2013 年 10 月 9 日世界卫生组织(WHO)通报国家食品药品监督管理局,中国生物技术股份有限公司下属的成都生物制品研究所有限责任公司生产的乙型肝炎减毒活疫苗通过了 WHO 的疫苗预认证,成为中国通过 WHO 预认证的首个疫苗产品。这标志着在经历了不懈的努力后,中国疫苗产品的监管、研制和生产获得了国际的广泛认可,产品得以进入国际市场。

国产乙型肝炎减毒活疫苗通过 WHO 的疫苗预认证后,联合国采购机构即可将此产品列入采购目录。更重要的是,因中国产疫苗产品的质量、产能和价格优势,将为发展中国家儿童免于乙型肝炎危害提供有力支撑。对此,WHO 总干事陈冯富珍博士表示“中国疫苗生产潜力巨大,我们希望能够看到越来越多的中国疫苗产品通过世界卫生组织的预认证,全世界都会因此而受益”。

2011 年 3 月 WHO 宣布我国国家药品监管机构通过了 WHO 疫苗监管体系的评估,从此,中国的疫苗生产企业具备了申请 WHO 疫苗预认证的资格,打开了中国疫苗产品进入国际市场的大门。近年来,随着食品药品监管部门采取推行新修订《药品生产质量管理规范》(2010 版)等多项措施,不断提高生产标准和监管水平,我国药品生产企业整体水平迅速提高,为中国疫苗产品获得国际认可创造了条件。

中国药品生产企业为全世界提供安全有效的疫苗产品是中国履行国际责任和义务的体现。国家食品药品监督管理局将继续提高监管能力,加强各项监管措施,鼓励、支持和引导企业研制、生产向国际标准看齐,通过 WHO 预认证这个平台,努力让更多符合国际标准的高质量药品进入国际市场,并以此为契机,促进我国药品产业的全面升级和药品质量水平的全面提升。