

葛根素固体自微乳胶囊在大鼠体内的药动学研究^Δ

张红艳^{1*}, 孙洪胜², 刘健¹, 隋晓丽¹, 田晓倩¹ (1. 山东中医药大学第二附属医院, 济南 250001; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4773-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.07

摘要 目的: 研究葛根素固体自微乳胶囊在大鼠体内的药动学特征。方法: 取大鼠随机分为两组, 每组18只, 分别ig葛根素固体自微乳胶囊和市售愈风宁心片, 给药量以葛根素计为158.15 mg/kg。于给药后0、5、10、20、40、60、90、120、180、240、360、480、600 min尾静脉取血0.2 ml, 采用高效液相色谱法检测葛根素的血药浓度, 采用3p87软件计算药动学参数和相对生物利用度。结果: 葛根素在大鼠体内代谢符合一室模型; 葛根素固体自微乳胶囊和愈风宁心片给药后的药动学参数分别为 c_{max} (1.032 0 ± 0.020 6)、(0.587 3 ± 0.011 7) μg/ml, $t_{1/2ke}$ (116.431 4 ± 2.166 0)、(88.222 6 ± 1.752 4) min, AUC_{0-t} (261.532 2 ± 1.464 0)、(102.835 5 ± 1.957 4) μg·min/ml; 相对生物利用度为238.77%。结论: 与愈风宁心片比较, 葛根素固体自微乳胶囊在大鼠体内吸收更完全, 消除更快。

关键词 葛根素; 固体自微乳胶囊; 大鼠; 药动学; 生物利用度

Pharmacokinetic Study of Puerarin Solid Self-microemulsion Capsules in Rats *in vivo*

ZHANG Hong-yan¹, SUN Hong-sheng², LIU Jian¹, SUI Xiao-li¹, TIAN Xiao-qian¹ (1. The Second Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250001, China; 2. The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the pharmacokinetic characteristics of Puerarin solid self-microemulsion capsules in rats *in vivo*. **METHODS:** The rats were randomly divided into two groups with 18 rats in each group. They were given Puerarin solid self-microemulsion capsules (S-SMEDDS capsules) and commercially available Yufeng ningxin tablet, with the dose of 158.15 mg/kg puerarin. The 0.2 ml blood samples were collected from tail vein 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 600 min after medication, respectively. The blood concentration of puerarin was determined by HPLC, and pharmacokinetic parameters and relative bioavailability were calculated by using 3p87 software. **RESULTS:** The metabolism of puerarin was one-compartment model in rats. Pharmacokinetic parameters of S-SMEDDS capsules and Yufeng ningxin tablet were as follows as c_{max} of (1.032 0 ± 0.020 6) and (0.587 3 ± 0.011 7) μg/ml, $t_{1/2ke}$ of (116.431 4 ± 2.166 0) and (88.222 6 ± 1.752 4) min, AUC_{0-t} of (261.532 2 ± 1.464 0) and (102.835 5 ± 1.957 4) μg·min/ml. Relative bioavailability was 238.77%. **CONCLUSIONS:** Compared with Yufeng ningxin tablet, S-SMEDDS capsules are absorbed more completely and removed faster.

KEYWORDS Puerarin; Solid self-microemulsion capsule; Rat; Pharmacokinetics; Bioavailability

葛根素是一种异黄酮类化合物^[1], 具有扩张外周血管、降低血压、增加冠状动脉血流量、降低心肌耗氧量、改善血流动力学指标等药理作用, 临床主要用于冠心病、心绞痛、高血压等心脑血管疾病的治疗, 其毒性低、安全范围广、疗效好^[2-3]。目前, 市售的愈风宁心片是由葛根浸膏制得, 主要成分是葛根素。作为口服制剂, 其用量较大, 且研究表明其在家兔和大鼠体内的生物利用度都较低^[4], 原因是葛根素的水溶性和脂溶性都较差, 使其口服生物利用度低, 限制了其在临床应用。为了提高葛根素体内的生物利用度, 笔者参考文献[5]的方法研制了葛根素固体自微乳, 并采用灌胃(ig)给药途径, 研究了葛根素固体自微乳胶囊在大鼠体内的药动学特征, 并与市售愈风宁心片进行了比较, 现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

6EC型液相色谱仪(美国Waters公司); 85-2恒温磁力搅拌器(江苏金坛中大仪器厂); 60C型低速台式离心机(安新县白洋离心机厂); CAY-1型液体快速混合器(北京长安仪器厂); 5200H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); HH-S21·6型双列六孔电热恒温水浴锅(山东医疗器械厂)。

Δ基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(No.2009-086)

*中药师, 硕士研究生。研究方向: 中药新药研发。电话: 0531-82436123。E-mail: hongyan9507@163.com

1.2 药品与试剂

葛根素对照品(安康禾烨麦迪森植物药业有限公司, 批号: 20100917, 纯度: >99%); 葛根素固体自微乳胶囊(山东中医药大学附属医院自制, 批号: 20100807, 规格: 每粒500 mg); 愈风宁心片(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 批号: 9123662, 规格: 每片0.28 g); 肝素钠注射液(天津市生物化学制药厂, 批号: 090918, 规格: 5 000 U: 2 ml); 高氯酸(天津市鑫源化工有限公司); 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

Wistar大鼠, ♂, 体质量为(200 ± 10) g, 由山东大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(鲁)20030004。饲养条件: 室温(20 ± 2) °C, 相对湿度60%~70%, 通风良好, 环境安静, 室内保持12 h照明、12 h黑暗, 并定期消毒。每笼5只大鼠, 自由摄食饮水。

2 方法与结果

2.1 血浆样品的处理

取0.2 ml血浆样品, 置于涂有肝素的离心试管中, 于涡旋混合器上混合5 min, 以离心半径13 cm、6 000 r/min离心20 min, 取上清液进样分析。

2.2 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动

相:甲醇-水(25:75, V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:250 nm;柱温:40 °C;进样量:50 μl。

2.3 专属性试验

取大鼠空白血浆、空白血浆+0.288 μg/ml的葛根素对照品溶液和给药后40 min的血浆样品,按“2.1”项下方法操作后,进样测定,记录色谱。结果表明,葛根素与血浆中的内源性物质分离情况良好,无杂质峰干扰。色谱见图1。

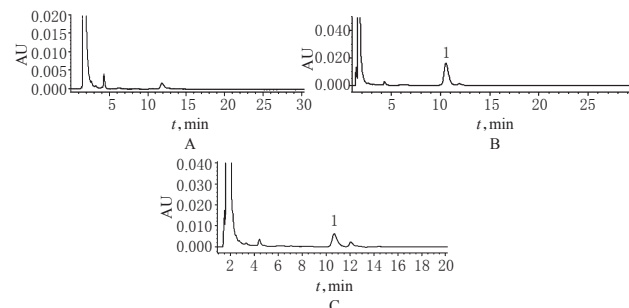


图1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+对照品; C. 血浆样品; 1. 葛根素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+substance control; C. plasma sample; 1. puerarin

2.4 线性关系考察

精密称取葛根素对照品2.88 mg,置于100 ml量瓶中,用30%乙醇稀释制成28.8 μg/ml的溶液;再精密量取0.05、0.1、0.5、1、2.5、5 ml于50 ml量瓶中,用30%乙醇稀释制成0.028 8、0.115 2、0.288、0.576、1.44、2.88 μg/ml的系列对照品溶液。取空白血浆0.2 ml置于具塞试管中,加系列对照品溶液制成含葛根素0.014 4、0.057 6、0.144、0.288、0.72、1.44 μg/ml的血浆样品,按“2.1”项下方法操作后,进样测定,记录峰面积。以葛根素质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=47\ 436x+782.9$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明,葛根素检测质量浓度的线性范围为0.014 4~1.44 μg/ml。

2.5 回收率试验

精密量取空白血浆0.2 ml,按“2.4”项下方法制备含葛根素0.014 4、0.288、1.44 μg/ml(低、中、高水平)的血浆样品,各3份,按“2.1”项下方法操作后进样测定。记录峰面积,代入回归方程计算浓度,与加入量比较计算方法回收率,与相应质量浓度的葛根素对照品溶液比较计算提取回收率,结果见表1。

表2 两组大鼠体内葛根素的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters *in vivo* of puerarin in rats of two groups($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	K_e, min^{-1}	K_d, min^{-1}	$t_{1/2k}, \text{min}$	$t_{1/2k}, \text{min}$	$t_{\text{max}}, \text{min}$	$c_{\text{max}}, \mu\text{g}/\text{ml}$	$\text{AUC}_{0-t}, \mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$
实验组	0.008 7±0.000 1	0.040 7±0.000 8	16.504 0±0.328 0	116.431 4±2.166 0	61.235 1±0.986 0	1.032 0±0.020 6	261.532 2±1.464 0
对照组	0.008 1±0.000 1	0.046 0±0.000 9	16.468 5±0.325 3	88.222 6±1.752 4	77.663 5±1.514 1	0.587 3±0.011 7	102.835 5±1.957 4

由表2可知,与市售愈风宁心片比较,葛根素固体自微乳胶囊在大鼠体内吸收更完全,消除更快。采用血药浓度法计算相对生物利用度,结果显示,葛根素固体自微乳胶囊相对于市售愈风宁心片的相对生物利用度为238.77%,表明相对于市售愈风宁心片,葛根素固体自微乳胶囊的生物利用度提高了2倍多。

3 讨论

近年来,对于亲脂性和水难溶性药物的自微乳给药系统的研究越来越多。殷静^[5]发现尼莫地平自微乳胶囊与国外尼莫地平片比较,两者在Beagle犬体内的 $t_{1/2}$ 和 c_{max} 无明显差

表1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery tests

加入量, μg/ml	测得量, μg/ml	方法回收率, %	平均方法回收率, %	RSD, %	提取回收率, %	平均提取回收率, %	RSD, %
0.014 4	0.014 1	97.92	98.13±1.07	1.10	95.36	96.43±1.01	1.05
	0.014 0	97.22			96.55		
	0.014 3	99.31			97.37		
0.288	0.285	98.96	99.63±0.95	0.95	96.14	96.98±0.88	0.90
	0.286	99.31			96.91		
	0.290	100.69			97.89		
1.44	1.43	99.31	99.77±1.46	1.46	96.14	96.40±1.11	1.15
	1.42	98.61			95.59		
	1.46	101.39			97.73		

2.6 精密度试验

按“2.5”项下方法制备低、中、高水平的血浆样品,按“2.1”项下方法操作后进样测定,记录峰面积。同日内测定5次,考察日内精密度;连续测定5 d,考察日间精密度。结果显示,低、中、高水平血浆样品的日内RSD分别为1.68%、0.89%、1.68%($n=5$),日间RSD分别为1.37%、1.78%、2.24%($n=5$)。

2.7 药动学实验

取大鼠36只,实验前禁食过夜,随机均分成对照组与实验组,分别ig愈风宁心片混悬液和葛根素固体自微乳胶囊内容物混悬液,给药量按葛根素计为158.15 mg/kg(按人临床常用剂量换算)。分别于给药后0、5、10、20、40、60、90、120、180、240、360、480、600 min尾静脉取血0.2 ml,按“2.1”项下方法操作后进样测定。采用3p87软件拟合分析,计算药动学参数。结果显示,葛根素在大鼠体内的药动学符合一室模型。两组大鼠体内葛根素的药-时曲线见图2,药动学参数见表2。

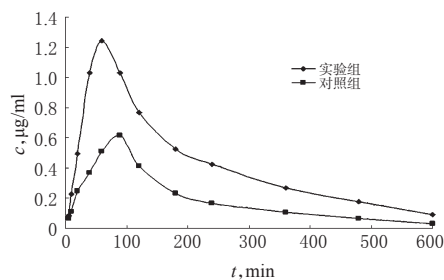


图2 两组大鼠体内葛根素的药-时曲线

Fig 2 Plasma concentration-time curves *in vivo* of puerarin in rats of two groups

异,但其相对生物利用度却为314.9%;崔晶^[6]发现,姜黄素固体自微乳相对于姜黄素原料药,其口服吸收率明显提高;史朝晖^[7]发现ig α-细辛脑自微乳的生物利用度明显高于市售细辛脑片,其相对生物利用度为481.6%。综上所述,自微乳给药系统在提高水难溶性药物的口服生物利用度、减少用量方面具有独特优势。

通过近年来对葛根素自微乳给药系统的报道可以看出,将葛根素制成自微乳制剂具有一定的潜在优势。崔升森^[8]制备了葛根素自微乳制剂,并研究了其与市售愈风宁心片在大鼠、家兔和Beagle犬体内的药动学过程,结果发现,两者ig

二氢丹参酮对人肺癌 GLC-82 细胞的抑制作用及其机制研究[△]

孙 蓓^{1,2*}, 叶因涛¹, 王 冬¹, 钱钧强¹, 娄建石^{2#}(1.天津医科大学肿瘤医院/国家肿瘤临床医学研究中心/天津市“肿瘤防治”重点实验室,天津 300060;2.天津医科大学基础医学院,天津 300070)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4775-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.08

摘要 目的:研究二氢丹参酮(DTS)对人肺癌 GLC-82 细胞的抑制作用及其作用机制。方法:以质量浓度为 0(空白对照)、5、10、20、40、80、100 μg/ml 的 DTS 作用细胞 24、48 h 后,采用 MTT 法测定细胞的增殖抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀);流式细胞术检测 17.85 μg/ml DTS 作用 12、24、48 h 后细胞的凋亡情况,计算凋亡率;Western blot 法检测 Bcl-2、Bax 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)蛋白的表达。结果:与空白对照组比较,DTS 组细胞的增殖受到抑制,作用 24、48 h 后最大细胞抑制率分别为 54.48%、64.95%,IC₅₀ 分别为 62.36、33.94 μg/ml;DTS 可诱导细胞的凋亡且与作用时间呈正相关,凋亡率为 5.6%~29.6%;Western blot 检测结果表明,DTS 能下调细胞中 Bcl-2 蛋白的表达、上调 Caspase-3 蛋白的表达($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:DTS 对人肺癌 GLC-82 细胞有较强的抑制作用,并诱导其凋亡,其机制可能与下调 Bcl-2 蛋白的表达、上调 Caspase-3 蛋白的表达有关。

关键词 人肺癌 GLC-82 细胞;二氢丹参酮;细胞凋亡;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 蛋白

Inhibitory Effect and Its Mechanism of Dihydrotanshinone on Human Lung Cancer GLC-82 Cell

SUN Bei^{1,2*}, YE Yin-tao¹, WANG Dong¹, QIAN Jun-qiang¹, LOU Jian-shi²(1.Cancer Hospital of Tianjin Medical University/National Clinical Research Center for Cancer/Tianjin Key Lab of “Cancer Prevention and Therapy”, Tianjin 300060, China;2.College of Basic Medical Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of dihydrotanshinone (DTS) on human lung cancer GLC-82 cell and its mechanism. METHODS: After treated with 0 (blank control), 5, 10, 20, 40, 80 and 100 μg/ml DTS for 24 and 48 h, MTT assay was used to measure the inhibition rates and IC₅₀ of cells; cell apoptosis was detected by flow cytometry after treated with 17.85 μg/ml DTS for 12, 24 and 48 h to calculate apoptotic rate; Western blot was used to detect the protein expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3. RESULTS: Compared with blank control group, different concentrations of DTS inhibited the proliferation of cells; 24 and 48 h maximal inhibition rate were 54.48% and 64.95%, respectively; IC₅₀ were 62.36 and 33.94 μg/ml. DTS could induce cell apoptosis in positive time dependent manner, and the range of inhibition rate was 5.6%-29.6%; Western blot showed DTS could down-regulate the expression of Bcl-2 protein and up-regulate the expression of Caspase-3 protein ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: DTS have significant inhibitory effect on GLC-82 cells and also induce cell apoptosis, by a possible mechanism of down-regulating the expression of Bcl-2 protein and up-regulating the expression of Caspase-3 protein.

KEYWORDS Human lung cancer GLC-82 cell; Dihydrotanshinone; Cell apoptosis; Caspase-3 protein

后血清药物浓度最高,在肝、肾、脾、肺、心、脑等组织的分布无显著性差异,且葛根黄酮自微乳制剂的组织药物浓度显著高于同组织的愈风宁心片,其相对生物利用度分别为(182 ± 40)%、(227 ± 34)%和(249 ± 43)%。

本课题在前人研究的基础上,运用中医药理论,对葛根素固体自微乳的制备进行了优化^①。本文通过对自制葛根素固体自微乳胶囊进行药动学研究,建立了大鼠体内分析方法,并通过测定 ig 葛根素固体自微乳胶囊和市售愈风宁心片后大鼠体内的血药浓度,得出前者相对生物利用度为 238.77%,证明了相对于市售愈风宁心片,自微乳化给药系统可提高葛根素的生物利用度。

参考文献

△ 基金项目:天津医科大学科学基金青年项目(No.2014KYQ06)
* 副主任药师,硕士。电话:022-23340123。研究方向:临床药理学。E-mail:sunpei003@sina.com
通信作者:教授,博士生导师。电话:022-83336888。研究方向:心血管药理学、临床药理学。E-mail:jianshilou@163.com

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:925.
- [2] 马佳佳,李红梅,董治宇,等.葛根素的药理作用及其临床应用[J].第四军医大学学报,2002,23(Suppl):64.
- [3] 洪赟飞.葛根素口服自微乳化给药系统的研究[D].上海:上海医药工业研究院,2005:1-54.
- [4] 孙洪胜,傅春升,张红艳.葛根素固体自微乳制剂的制备及其质量评价[J].中国药房,2011,22(39):3 677.
- [5] 殷静.尼莫地平自微乳化胶囊的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2004:1-83.
- [6] 崔晶.姜黄素固体自微乳化制剂的研究[D].济南:山东大学,2006:1-87.
- [7] 史朝晖.α-细辛脑自微乳化胶囊的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2004:1-66.
- [8] 崔升森.葛根素体内药动学及葛根黄酮自微乳化软胶囊的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2004:1-136.

(收稿日期:2015-01-12 修回日期:2015-06-10)

(编辑:邹丽娟)