

· 药物代谢 ·

## LC-MS/MS 考察白芷香豆素成分对硫酸长春新碱 肠道转运及药代动力学的影响

祝婧云<sup>1</sup>, 管雪静<sup>2</sup>, 蒋且英<sup>2</sup>, 赵国巍<sup>2</sup>, 廖正根<sup>2</sup>, 梁新丽<sup>2\*</sup>

(1. 南昌大学第四附属医院, 南昌 330003;

2. 江西中医药大学, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**研究白芷香豆素类成分欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素对硫酸长春新碱肠道转运及药代动力学的影响。**方法:**采用 MDCK-MDR1 细胞模型,考察欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素对硫酸长春新碱肠道转运的影响。采用 LC-MS/MS 测定给药后不同时间血浆中药物浓度,研究欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素成分对硫酸长春新碱药代动力学的影响。**结果:**长春新碱配伍质量浓度为 10.80, 5.42, 1.35 mg·L<sup>-1</sup> 欧前胡素的表观渗透系数 ( $P_{app}$ ) 分别为  $(0.287 2 \pm 0.026 6) \times 10^{-6}$ ,  $(0.351 5 \pm 0.041 6) \times 10^{-6}$ ,  $(0.294 9 \pm 0.006 8) \times 10^{-6}$  cm·s<sup>-1</sup>, 三者与硫酸长春新碱的  $P_{app}$  [ $(0.227 2 \pm 0.014 8) \times 10^{-6}$  cm·s<sup>-1</sup>] 比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。硫酸长春新碱与欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素配伍后药时曲线下峰面积 ( $AUC_{0-t}$ ) 分别为  $(343.50 \pm 10.29)$ ,  $(348.70 \pm 27.99)$ ,  $(235.70 \pm 17.56)$  μg·h·L<sup>-1</sup>, 与硫酸长春新碱组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。药峰浓度 ( $C_{max}$ ) 分别为  $(81.870 \pm 8.517)$ ,  $(83.010 \pm 9.276)$ ,  $(60.440 \pm 6.679)$  μg·L<sup>-1</sup>, 与硫酸长春新碱组的比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。**结论:**白芷香豆素类成分能促进硫酸长春新碱的肠道转运,提高其生物利用度。

**[关键词]** 白芷; MDCK-MDR1 细胞模型; 香豆素; 长春新碱; 肠道转运; 药代动力学; P-糖蛋白

**[中图分类号]** R22; R289; R285.5; R945; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0082-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180707

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180112.1450.005.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-15 15:53

### Effect of Coumarins from Angelicae Dahuricae Radix on Intestinal Transport Absorption and Pharmacokinetics of Vincristine Sulfate by LC-MS/MS

ZHU Jing-yun<sup>1</sup>, GUAN Xue-jing<sup>2</sup>, JIANG Qie-ying<sup>2</sup>, ZHAO Guo-wei<sup>2</sup>, LIAO Zheng-gen<sup>2</sup>, LIANG Xin-li<sup>2\*</sup>

(1. The Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330003, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influence of coumarins from Angelicae Dahuricae Radix, such as imperatorin, isoimperatorin and oxypeucedanin, on intestinal transport and pharmacokinetics of vincristine sulfate in rats. **Method:** MDCK-MDR1 cell model was used to investigate the effect of imperatorin, isoimperatorin and oxypeucedanin on intestinal transport of vincristine sulfate. The drug plasma concentration was determined by LC-MS/MS at different time, and the effect of coumarins from Angelicae Dahuricae Radix on the pharmacokinetics of vincristine sulfate was investigated. **Result:** The apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) of vincristine sulfate compatibility of 10.80, 5.42, 1.35 mg·L<sup>-1</sup> of imperatorin were  $(0.287 2 \pm 0.026 6) \times 10^{-6}$ ,  $(0.351 5 \pm$

**[收稿日期]** 20170808(012)

**[基金项目]** 江西省青年科学家培养对象项目(20153BCB23019);中国博士后科学基金项目(163145);江西省自然科学基金项目(20161ACB21020);江西省卫生计生委中医药科研项目(2016A021)

**[第一作者]** 祝婧云, 硕士, 主管药师, 从事临床药学研究, Tel:0791-87029457, E-mail:271174521@qq.com

**[通信作者]** \*梁新丽, 博士, 副教授, 从事药剂学研究, Tel:0791-87118658, E-mail:paln7@163.com

$0.0416) \times 10^{-6}$ ,  $(0.2949 \pm 0.0068) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , they had significant difference ( $P < 0.05$ ) when compared with  $P_{\text{app}} = (0.2272 \pm 0.0148) \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  of vincristine sulfate.  $\text{AUC}_{0-4}$  of vincristine sulfate compatibility of imperatorin, isoimperatorin and oxypeucedanin were  $(343.50 \pm 10.29)$ ,  $(348.70 \pm 27.99)$ ,  $(235.70 \pm 17.56) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ , their  $C_{\text{max}}$  were  $(81.87 \pm 8.517)$ ,  $(83.01 \pm 9.276)$ ,  $(60.44 \pm 6.679) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; there were significant difference ( $P < 0.01$ ) when compared with the control group of vincristine sulfate.

**Conclusion:** Coumarins from Angelicae Dahuricae Radix can promote the transport absorption of vincristine sulfate and improve its bioavailability.

[**Key words**] Angelicae Dahuricae Radix; MDCK-MDR1 cell model; coumarins; vincristine sulfate; intestinal transport; pharmacokinetics; P-glycoprotein

长春新碱为夹竹桃科植物长春花中提取出的生物碱,抗肿瘤作用良好<sup>[1-2]</sup>。其硫酸盐——硫酸长春新碱已被广泛应用于临床。研究表明硫酸长春新碱的转运受 P-糖蛋白(P-gp)的影响<sup>[3-4]</sup>。P-gp 是一种重要的药物转运蛋白,与药物结合后,使药物泵出细胞外,导致药物浓度下降,进而影响药物吸收,导致发生肿瘤的多药耐药性<sup>[5-6]</sup>。因此,提高抗肿瘤药物在体内的浓度对临床具有重要意义。

白芷为我国常用中药材之一,具有祛风散寒、燥湿排脓、止痛等功效<sup>[7]</sup>,其主要活性组分为香豆素类。前期研究发现白芷香豆素类成分可促进其配伍药对中活性成分的肠道转运<sup>[8-9]</sup>,还发现白芷香豆素类成分中的欧前胡素、异欧前胡素和氧化前胡素能够促进硫酸长春新碱透过 Caco-2 单层细胞<sup>[10]</sup>。本实验拟通过监测给药大鼠血药浓度来进一步研究白芷中香豆素类成分对硫酸长春新碱吸收的影响,采用 P-gp 稳定且高表达的 MDCK-MDR1 细胞模型研究白芷香豆素类成分促硫酸长春新碱的吸收是否与 P-gp 有关,初步探讨白芷香豆素类成分促进硫酸长春新碱吸收的作用机制,为降低抗肿瘤药物的多药耐药性提供新思路。

## 1 材料

Millicell-ERS 型电阻仪(美国 Millipore 公司), SW-CJ-2F 型双人双面超净工作台(苏州净化设备有限公司), ELX800 型酶标仪(美国 BioTek 公司), XW-80A 型旋涡混合器(上海青浦沪西仪器厂), 3-18K 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司), DN-24A 型干式氮吹仪(上海比昂仪器制造有限公司), AB 4500 Qtrap 型液质联用仪(美国 AB Sciex 公司)。

0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)-0.25% 胰蛋白酶消化液, DMEM 高糖型培养基, 胎牛血清(FBS), L-谷氨酰胺均购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司; 12 孔 transwell 细胞培养板和 T-75 细胞培养瓶(美国 Coring 公司), MDCK-MDR1 细胞(上海

中亚生物基因研究所), 非必需氨基酸(德国 Sigma 公司), Hank's 平衡盐溶液(HBSS)和噻唑蓝(MTT)均购自北京索莱宝科技有限公司, 硫酸长春新碱(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 批号 BCTG-0436, 纯度 > 99%), 氧化前胡素对照品(上海融禾医药科技发展有限公司, 批号 100420, 纯度 > 99%), 欧前胡素和异欧前胡素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为 110826-200712, 110827-200407, 纯度均 > 99%), 水为双蒸水, 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 200 ~ 220 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 合格证号 SCXK(湘)2011-0003。本文涉及的动物实验经江西中医药大学伦理委员会审查后批准, 批准号 JZLLSC2017015。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

#### 2.1.1 MDCK-MDR1 细胞单层转运模型给药溶液

根据前期 MTT 结果, 当硫酸长春新碱、欧前胡素、氧化前胡素、异欧前胡素给药质量浓度分别在 257.3, 10.80, 10.20, 21.80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  以下时, 其细胞存活率均 > 90%, 为非细胞毒性剂量。故在无毒范围内选择高、中、低质量浓度作为转运试验的给药浓度。精密量取相同体积的硫酸长春新碱溶液于 10 mL 量瓶中, 分别加入高、中、低质量浓度的欧前胡素, 用 HBSS 定容至刻度, 摇匀, 得硫酸长春新碱 + 欧前胡素组。精密量取相同体积的硫酸长春新碱溶液于 10 mL 量瓶中, 分别加入高、中、低质量浓度的异欧前胡素, 用 HBSS 定容至刻度, 摇匀, 得硫酸长春新碱 + 异欧前胡素组。精密量取相同体积的硫酸长春新碱溶液于 10 mL 量瓶中, 分别加入高、中、低质量浓度的氧化前胡素, 用 HBSS 定容至刻度, 摇匀, 得硫酸长春新碱 + 氧化前胡素组。

#### 2.1.2 大鼠给药溶液 取一定量的欧前胡素, 置于

一定量的 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液中, 搅拌混匀, 制得 15 mg·kg<sup>-1</sup> 欧前胡素混悬液。取一定量异欧前胡素, 置于一定量的 0.5% CMC-Na 溶液中, 搅拌混匀, 制得 15 mg·kg<sup>-1</sup> 异欧前胡素混悬液。取一定量氧化前胡素对照品, 置于一定量的 0.5% CMC-Na 溶液中, 搅拌混匀, 制得 8 mg·kg<sup>-1</sup> 氧化前胡素混悬液。临用前现配并且充分搅拌均匀。称取一定量的硫酸长春新碱对照品置于一定量水中, 制得 0.8 g·L<sup>-1</sup> 硫酸长春新碱溶液。

## 2.2 MDCK-MDR1 细胞单层转运模型的建立<sup>[11]</sup>

MDCK-MDR1 细胞培养于 T-75 细胞培养瓶中, 培养基为高糖 DMEM 培养基, 其中含有 10% FBS, 1% 非必需氨基酸 (0.01 mmol·L<sup>-1</sup>) 和 L-谷氨酰胺 (2 mmol·L<sup>-1</sup>) 的混合液, 1% 青霉素 (100 U·mL<sup>-1</sup>) 和链霉素 (100 U·mL<sup>-1</sup>) 的混合液, 置于 37 ℃, 含 5% CO<sub>2</sub> 的空气供氧, 相对湿度 95% 的二氧化碳培养箱中进行培养。当对数生长期的 MDCK-MDR1 细胞在培养瓶中生长融合至 85% 时, 弃去培养液, 用不含钙、镁离子的 HBSS 清洗 3 次, 加 EDTA-胰蛋白酶消化液 1 mL, 消化至细胞刚好缩回至圆球状, 随即加入高糖 DMEM 培养基 1 mL 终止消化, 用移液枪吹打培养瓶上的细胞, 直至全部吹下, 此时将液体全部转移至新的离心管中, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min, 吸去上清液, 加入新鲜培养基 3 mL 吹匀至分散的细胞悬浮液, 利用细胞计数器计数, 调节细胞密度为 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL, 接种在 12 孔 transwell 细胞培养板中刷状缘侧 (AP) 细胞悬浮液 0.5 mL, 基底侧 (BL) 完全培养基 1.5 mL, 接种 24 h 后每天更换培养基, 细胞培养 6 d, 每日测定 Transwell 细胞培养皿的跨膜电阻, 记录, 跨膜电阻 ≥ 500 Ω·cm<sup>2</sup> 的细胞方可使用。

**2.3 MDCK-MDR1 细胞单层模型的转运试验** 按照 2.2 项下建立的 MDCK-MDR1 细胞单层转运模型, 分别考察不同浓度的欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素对硫酸长春新碱肠道转运的影响。将待测药物溶液 0.5 mL 加入 AP, 将空白 HBSS 1.5 mL 加入 BL, 放入二氧化碳细胞培养箱中继续培养 2 h, 2 h 后再取接收液 0.5 mL 于 BL, 置于 1.5 mL 离心管中, 按比例 1:1 加甲醇稀释样品, 涡旋 3 min, 于 16 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 以沉淀蛋白, 取上清液进行 LC-MS/MS 检测, 见表 1~3。结果发现欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素对硫酸长春新碱均有促吸收作用。

**2.4 硫酸长春新碱在 HBSS 中的稳定性考察** 精密吸取硫酸长春新碱对照品溶液, 用空白的 HBSS

表 1 欧前胡素对硫酸长春新碱转运的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Influence of imperatorin on transport of vicristine sulfate ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	硫酸长春新碱 /mg·L <sup>-1</sup>	欧前胡素 /mg·L <sup>-1</sup>	<i>P</i> <sub>app</sub> /cm·s <sup>-1</sup>
1	247.7	-	(0.227 2 ± 0.014 8) × 10 <sup>-6</sup>
2	253.7	10.80	(0.287 2 ± 0.026 6) × 10 <sup>-6</sup>
3	242.7	5.42	(0.351 5 ± 0.041 6) × 10 <sup>-6</sup>
4	244.3	1.35	(0.294 9 ± 0.006 8) × 10 <sup>-6</sup>

表 2 异欧前胡素对硫酸长春新碱转运的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Influence of isoimperatorin on transport of vicristine sulfate ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	硫酸长春新碱 /mg·L <sup>-1</sup>	异欧前胡素 /mg·L <sup>-1</sup>	<i>P</i> <sub>app</sub> /cm·s <sup>-1</sup>
1	261.4	-	(0.310 7 ± 0.028 2) × 10 <sup>-6</sup>
2	243.8	10.20	(0.397 7 ± 0.058 8) × 10 <sup>-6</sup>
3	249.7	5.10	(0.387 9 ± 0.037 3) × 10 <sup>-6</sup>
4	244.6	1.02	(0.372 1 ± 0.057 6) × 10 <sup>-6</sup>

表 3 氧化前胡素对硫酸长春新碱转运的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Influence of oxypeucedanin on transport of vicristine sulfate ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	硫酸长春新碱 /mg·L <sup>-1</sup>	氧化前胡素 /mg·L <sup>-1</sup>	<i>P</i> <sub>app</sub> /cm·s <sup>-1</sup>
1	250.0	-	(0.371 4 ± 0.038 0) × 10 <sup>-6</sup>
2	246.2	21.80	(0.517 7 ± 0.038 5) × 10 <sup>-6</sup>
3	248.5	5.45	(0.500 5 ± 0.044 5) × 10 <sup>-6</sup>
4	250.5	1.09	(0.471 3 ± 0.068 9) × 10 <sup>-6</sup>

稀释, 考察 0, 1, 2, 6, 12, 24, 48 h 后硫酸长春新碱的降解情况, 结果硫酸长春新碱在 48 h 的降解残存率 (97.95 ± 4.47)% (*n* = 5), 说明该成分在考察时间内稳定性良好。

## 2.5 硫酸长春新碱的 LC-MS/MS 分析

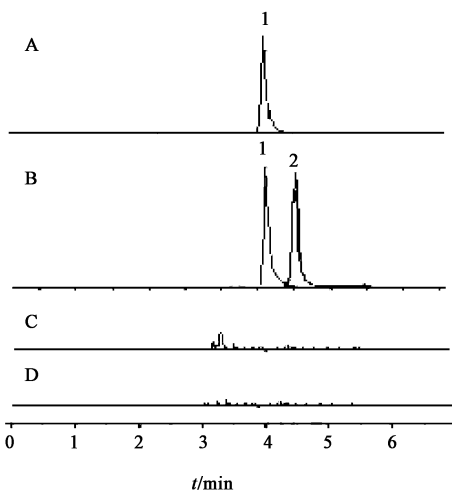
**2.5.1 色谱条件** 采用 ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm), 柱温 25 ℃, 流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL, 流动相 10 mmol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵水溶液 (A)-甲醇 (B) 梯度洗脱 (0~0.5 min, 20%~60% B; 0.5~3.0 min, 60%~70% B; 3.0~5.0 min, 70% B; 5.0~5.1 min, 70%~20% B; 5.1~7.0 min, 20% B)。

**2.5.2 质谱条件** 电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式, 多反应监测 (MRM) 方式, 测定硫酸长春新碱和硫酸长春碱 (内标) 的检测离子分别为 *m/z* 825.2 ~

807.5 和  $m/z$  811.3 ~ 355.2, 气帘气压力设定 241.3 kPa, 喷雾电压 5.5 kV, 去簇电压 200 V, 硫酸长春碱和硫酸长春新碱的碰撞能量分别为 45 eV 和 54 eV, 雾化器压力 344.7 kPa, 平衡器压力 344.7 kPa。

**2.5.3 血浆样品处理** 精密移取大鼠血浆 100  $\mu\text{L}$  于 10 mL 玻璃离心管中, 加入 200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  硫酸长春碱内标工作液 20  $\mu\text{L}$ , 涡旋 1 min。加入甲基叔丁基醚 1 mL, 继续涡旋 3 min, 全部转移至 1.5 mL 离心管中, 离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 16 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 10 min, 下同), 小心吸取上清液至新的 1.5 mL 离心管中, 置氮吹仪上 45  $^{\circ}\text{C}$  挥干溶剂。在原离心管中继续加入甲基叔丁基醚 1 mL, 重复以上步骤, 用流动相 100  $\mu\text{L}$  复溶 2 次氮吹后的残渣, 继续涡旋 3 min, 离心, 取上清液 10  $\mu\text{L}$  进样分析。

**2.5.4 方法的专属性** 按照 2.5.1 项下液质条件检测, 见图 1, 结果发现空白血浆及白芷香豆素类成分对硫酸长春新碱和硫酸长春碱检测无干扰。



A. 空白血浆 + 硫酸长春新碱; B. 空白血浆 + 硫酸长春新碱 + 硫酸长春碱血浆; C. 空白血浆; D. 空白血浆 + 欧前胡素; 1. 硫酸长春新碱; 2. 硫酸长春碱

图 1 不同大鼠血浆的 LC-MS/MS 色谱

Fig. 1 LC-MS/MS chromatograms of different rat plasma

**2.5.5 大鼠血浆中长春新碱方法学的建立** 精密移取空白血浆 100  $\mu\text{L}$  于玻璃离心管中, 加硫酸长春新碱对照品 20  $\mu\text{g}$ , 按 2.5.3 项下方法操作, 分别得到血浆样品中硫酸长春新碱质量浓度分别为 5.06, 10.12, 50.60, 101.2, 202.4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的系列溶液, 以硫酸长春新碱与硫酸长春碱(内标)的峰面积之比为纵坐标, 血药浓度为横坐标, 采用加权最小二乘法, 选择权重系数为  $1/C^2$ , 得到标准曲线方程  $Y = 0.00818X + 0.00858$  ( $R^2 = 0.9988$ ), 线性范围

5.06 ~ 202.4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。高、中、低 3 个质量浓度(202.4, 50.60, 5.06  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 下同)的回收率处于 85.47% ~ 94.62%, RSD 4.2% ~ 7.7%, 日内精密度 RSD 3.9% ~ 7.1%, 日间精密度 RSD 5.9% ~ 11.5%。硫酸长春新碱低、中、高质量浓度样品室温放置 6 h 后硫酸长春新碱质量浓度的相对偏差(RE) -2.8% ~ -12.6%, RSD  $\leq$  12%。

## 2.6 药代动力学研究

**2.6.1 血浆样品的采集** 大鼠随机分成 6 组, 每组 5 只, 实验前至少 12 h 禁食不禁水。3 组灌胃给予硫酸长春新碱(8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ); 其他 3 组分别灌胃给予硫酸长春新碱(8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 配伍氧化前胡素(8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 硫酸长春新碱(8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 配伍欧前胡素(15  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 硫酸长春新碱(8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 配伍异欧前胡素(15  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。各组分别于给药后 0.083, 0.166, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 眼眶静脉丛取血 0.5 mL, 置于 1.5 mL 肝素抗凝管中, 于 4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 精密吸取上清液至 1.5 mL 离心管中, 立即储存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱, 备用。

**2.6.2 血浆样品处理** 精密移取大鼠血浆 100  $\mu\text{L}$  于 10 mL 玻璃离心管中, 加入 200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  硫酸长春碱内标工作液 20  $\mu\text{L}$ , 涡旋 1 min。加入甲基叔丁基醚 1 mL, 继续涡旋 3 min, 全部转移至 1.5 mL 离心管中, 离心, 小心吸取上清液至新的 1.5 mL 离心管中, 置氮吹仪上 45  $^{\circ}\text{C}$  挥干溶剂。在原离心管中继续加入甲基叔丁基醚 1 mL, 重复以上步骤, 用流动相 100  $\mu\text{L}$  复溶 2 次氮吹后的残渣, 继续涡旋 3 min, 离心, 取上清液 10  $\mu\text{L}$  进样分析。

**2.6.3 硫酸长春新碱在血浆中稳定性考察** 精密吸取高、中、低质量浓度硫酸长春新碱对照品溶液于玻璃离心管中, 于 45  $^{\circ}\text{C}$  挥干溶剂后加入空白血浆 100  $\mu\text{L}$ , 涡旋 3 min, 分别考察样品在室温下放置 6 h, -20  $^{\circ}\text{C}$  放置 7 d 及 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻融 3 次的稳定性(每次在 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中放置 12 h)。结果显示硫酸长春新碱低、中、高质量浓度样品室温放置 6 h 后硫酸长春新碱质量浓度的 RE -2.8% ~ -12.6%, RSD  $\leq$  12%; -20  $^{\circ}\text{C}$  放置 7 d 后 RE -1.0% ~ -8.0%, RSD  $\leq$  13.6%; 冻融 3 次后 RE -4.0% ~ 2.1%, RSD  $\leq$  11.3%, 表明硫酸长春新碱血浆样品在上述条件下未呈现不稳定性。

**2.6.4 白芷香豆素对硫酸长春新碱在大鼠体内药代动力学的影响** 取 2.6.1 项下采集的血浆, 按 2.6.2 项下方法处理, 取 10  $\mu\text{L}$  按 2.5 项下条件进样分析, 带入标准曲线计算血浆样品浓度。利用

DAS 2.0 软件计算主要药代动力学参数,结合赤池信息判据最小原则(AIC)进行判断,大鼠灌胃硫酸长春新碱体内过程符合二室模型,结果见表 4~6,药时曲线见图 2~4。结果与未配伍组比较,白芷香豆素类成分与硫酸长春新碱配伍后药时曲线下面积(AUC<sub>0-t</sub>和 AUC<sub>0-∞</sub>)显著增大,药峰浓度(C<sub>max</sub>)增加 1~2 倍,表明白芷香豆素类化合物能够促进硫酸长春新碱的吸收,增加后者的生物利用度。

表 4 硫酸长春新碱配伍欧前胡素给药前后的药代动力学参数比较( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Pharmacokinetic parameters of vincristine sulfate before and after compatibility with imperatorin ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

参数	硫酸长春新碱	硫酸长春新碱 + 欧前胡素
AUC <sub>0-t</sub> /μg·h·L <sup>-1</sup>	162.80 ± 12.11	343.50 ± 10.29 <sup>2)</sup>
AUC <sub>0-∞</sub> /μg·h·L <sup>-1</sup>	241.90 ± 58.66	400.40 ± 32.75 <sup>2)</sup>
MRT <sub>0-t</sub> /h	4.589 ± 0.326	4.442 ± 0.288
MRT <sub>0-∞</sub> /h	9.091 ± 2.456	5.785 ± 0.859 <sup>1)</sup>
t <sub>1/2</sub> /h	7.552 ± 2.922	3.671 ± 1.355 <sup>1)</sup>
t <sub>max</sub> /h	1.5 ± 0.00	1.5 ± 0.00
CL/F/L·h·kg <sup>-1</sup>	34.540 ± 7.615	20.090 ± 1.582 <sup>1)</sup>
C <sub>max</sub> /μg·L <sup>-1</sup>	43.120 ± 5.828	81.870 ± 8.517 <sup>2)</sup>

注:与硫酸长春新碱组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01(表 5,6 同)。

表 5 硫酸长春新碱配伍异欧前胡素给药前后的药代动力学参数比较( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 5 Pharmacokinetic parameters of vincristine sulfate before and after compatibility with isoimperatorin ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

参数	硫酸长春新碱	硫酸长春新碱 + 异欧前胡素
AUC <sub>0-t</sub> /μg·h·L <sup>-1</sup>	144.600 ± 8.706	348.70 ± 27.99 <sup>2)</sup>
AUC <sub>0-∞</sub> /μg·h·L <sup>-1</sup>	203.30 ± 36.20	381.90 ± 26.25 <sup>2)</sup>
MRT <sub>0-t</sub> /h	4.623 ± 0.287	4.316 ± 0.168
MRT <sub>0-∞</sub> /h	8.806 ± 2.344	5.420 ± 0.350 <sup>1)</sup>
t <sub>1/2</sub> /h	6.650 ± 2.273	2.947 ± 0.672 <sup>1)</sup>
t <sub>max</sub> /h	1.5 ± 0	1.5 ± 0
CL/F/L·h·kg <sup>-1</sup>	40.440 ± 7.626	21.030 ± 1.412 <sup>2)</sup>
C <sub>max</sub> /μg·L <sup>-1</sup>	31.280 ± 4.782	83.010 ± 9.276 <sup>2)</sup>

**2.7 数据处理** 采用表观渗透系数(P<sub>app</sub>)表示药物的吸收情况,计算公式为 P<sub>app</sub> = ΔQ/(Δt × A × C<sub>0</sub>),式中 ΔQ 表示转运时间 Δt 内的药物转运速率,A 为聚碳酸酯膜的表面积(1.12 cm<sup>2</sup>),C<sub>0</sub> 为取样所在侧的初始给药浓度。每组数据为平行试验 3 份,使用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。大

表 6 硫酸长春新碱配伍氧化前胡素给药前后的药代动力学参数比较( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 6 Pharmacokinetic parameters of vincristine sulfate before and after compatibility with oxypeucedanin ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

参数	硫酸长春新碱	硫酸长春新碱 + 氧化前胡素
AUC <sub>0-t</sub> /μg·h·L <sup>-1</sup>	149.80 ± 18.73	235.70 ± 17.56 <sup>2)</sup>
AUC <sub>0-∞</sub> /μg·h·L <sup>-1</sup>	177.60 ± 25.34	276.300 ± 9.362 <sup>2)</sup>
MRT <sub>0-t</sub> /h	4.065 ± 0.322	4.015 ± 0.231
MRT <sub>0-∞</sub> /h	6.195 ± 1.337	6.333 ± 1.025
t <sub>1/2</sub> /h	4.550 ± 1.308	4.652 ± 0.895
t <sub>max</sub> /h	1.5 ± 0	1.5 ± 0
CL/F/L·h·kg <sup>-1</sup>	45.720 ± 6.081	28.980 ± 0.980 <sup>2)</sup>
C <sub>max</sub> /μg·L <sup>-1</sup>	36.900 ± 3.611	60.440 ± 6.679 <sup>2)</sup>

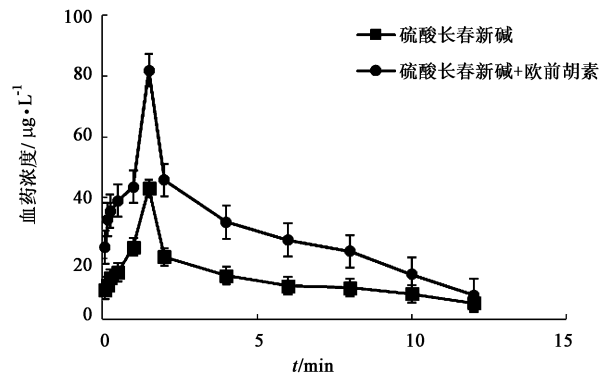


图 2 硫酸长春新碱配伍欧前胡素前后的药-时曲线( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Fig. 2 Plasma concentration-time profiles of vincristine sulfate before and after compatibility with imperatorin ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

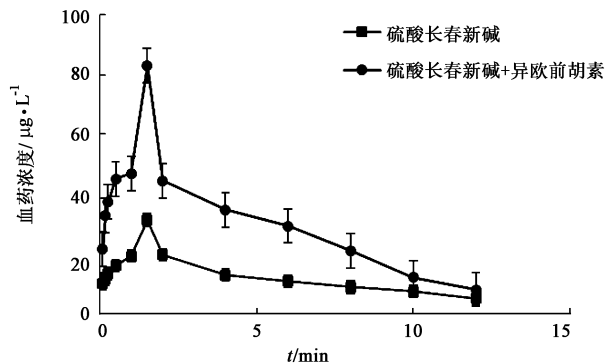


图 3 硫酸长春新碱配伍异欧前胡素前后的药-时曲线( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Fig. 3 Plasma concentration-time profiles of vincristine sulfate before and after compatibility with isoimperatorin ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

鼠静脉给药后测得的血药浓度-时间数据应用 DAS 2.0 软件进行处理,选择适宜的数学模型拟合,计算药代动力学参数。

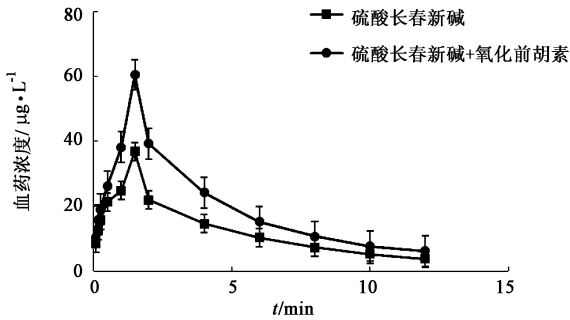


图 4 硫酸长春新碱配伍氧化前胡素前后的药-时曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Fig. 4 Plasma concentration-time profiles of vincristine sulfate before and after compatibility with oxypeucedanin ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 3 讨论

P-gp 是一种重要的药物转运蛋白,与药物结合后,在其核苷酸结合位点上结合腺苷三磷酸(ATP),ATP 水解后所释放的能量使药物泵出细胞外,导致药物浓度下降,进而影响药物吸收。P-gp 的高表达是导致药物外排、吸收降低的主要原因,P-gp 对药物的外排作用常常是导致药物在体内吸收受到抑制甚至发生多药耐药性的主要机制。如 P-gp 介导的肿瘤多药耐药、抗生素耐药等。因此,研究如何有效逆转 P-gp 介导药物外排具有重要意义。前期研究表明,白芷具有促进 P-gp 外排药物吸收的作用,且在细胞水平上证实白芷对 P-gp 外排功能具有一定的抑制作用<sup>[12-13]</sup>。故本文试图从细胞、整体动物水平研究白芷中香豆素类成分对 P-gp 介导药物硫酸长春新碱肠道转运的影响。MDCK-MDR1 细胞系为马尔丁达比犬上皮细胞发展的一种细胞间紧密连接的细胞系,低水平表达转运蛋白,低代谢活性,在极性细胞顶端侧特异性高表达 P-gp<sup>[14-17]</sup>。因此,可利用 MDCK-MDR1 细胞快速筛选模型,探讨白芷香豆素类成分对 P-gp 介导药物肠道转运的影响,并通过测定血药浓度对细胞模型结果作进一步验证,以保证实验结果的可靠性。因细胞实验培养需要时间,且时间跨度较长,细胞实验给药溶液都是现配现用,因此,存在称量误差,导致表 1~3 中的长春新碱质量浓度不一致,但无显著差异,对结果造成的影响较小。

本文研究结果表明,硫酸长春新碱单独给药和分别配伍白芷中欧前胡素、异欧前胡素及氧化前胡素后,药代动力学行为有明显差异。联合给药后  $AUC_{0-12}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  和  $C_{max}$  均较单独给药组显著提高,表明欧前胡素、异欧前胡素及氧化前胡素能提高硫酸

长春新碱的生物利用度。但是 3 种成分伍硫酸长春新碱后硫酸长春新碱的半衰期( $t_{1/2}$ )均没有延长,欧前胡素、异欧前胡素配伍硫酸长春新碱后  $t_{1/2}$  显著下降,而氧化前胡对硫酸长春新碱的  $t_{1/2}$  无影响。表明这 3 种成分增加硫酸长春新碱生物利用度的原因与对消除率的影响无关,可能是三者对介导硫酸长春新碱在体内外排作用的 P-gp 具有影响。MDCK-MDR1 细胞模型研究结果表明,欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素均能够促进 P-gp 介导的硫酸长春新碱的吸收,其中欧前胡素促进吸收作用显著,也提示白芷香豆素类化合物对 P-gp 外排有一定的抑制作用。本文从体内、体外实验研究了白芷香豆素类成分欧前胡素、异欧前胡素、氧化前胡素对硫酸长春新碱肠道转运的影响,提示白芷香豆素类化合物对 P-gp 外排有一定的抑制作用,为白芷活性成分作为吸收促进剂的研究与开发奠定基础,但其具体机制有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 高贤,单洪,辛宁,等.长春花化学成分和药理作用研究进展[J].现代药物与临床,2011,26(4):274-277.
- [2] 王丽敏,杨玉,张明远,等.金丝桃苷对耐长春新碱结肠癌 HCT8/VCR 细胞耐药逆转作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(22):92-96.
- [3] Ambudkar S V, Kimchi-Sarfaty C, Sauna Z E, et al. P-glycoprotein from genomics to mechanism [J]. Oncogene, 2003, 22(47):7468-7485.
- [4] Borst P, Zelcer N, van de Wetering K, et al. On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins [J]. FEBS Lett, 2006, 580(4):1085-1093.
- [5] Pleban K, Kopp S, Csaszar E, et al. P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach [J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(2):365-374.
- [6] Gottesman M M, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter [J]. Annu Rev Biochem, 1993, 62:385-427.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:105.
- [8] 梁新丽,祝婧云,廖正根,等.白芷提取物对葛根中葛根素肠吸收的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(10):1477-1482.
- [9] 祝婧云,梁新丽,王光发,等.白芷提取物对黄芩活性成分黄芩苷的吸收促进作用研究 [J]. 药学学报, 2012, 37(10):1477-1482.

- 2011, 46(2): 232-237.
- [10] 梁新丽, 朱梦良, 赵国巍, 等. 白芷呋喃香豆素类成分对葛根素、芍药苷、长春新碱肠道转运的影响[J]. 中草药, 2015, 46(7): 1007-1011.
- [11] 刘强, 高小玲, 柴逸峰, 等. 四氢帕马丁在 MDCK-MDR1 细胞系中的跨膜转运机制[J]. 药学服务与研究, 2012, 12(1): 34-37.
- [12] 梁新丽, 朱梦良, 招丽君, 等. Caco-2 细胞单层模型研究黄芩提取物中黄芩苷转运机制及白芷提取物对其转运的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2389-2393.
- [13] 招丽君, 廖正根, 梁新丽, 等. Caco-2 细胞单层模型研究葛根提取物中葛根素转运机制及白芷提取物对其转运的影响[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(20): 1638-1642.
- [14] 刘瑶, 曾苏. MDCK-MDR1 细胞模型及其在药物透过研究中的应用进展[J]. 药学报, 2008, 43(6): 559-564.
- [15] 郝然, 刘婷, 王毅, 等. 基于 MDCK 细胞单层的药物早期肾毒性检测初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 234-238.
- [16] Ramsohoye P V, Fritz I B. Preliminary characterization of glial-secreted factors responsible for the induction of high electrical across endothelial monolayers in a blood-brain barrier model [J]. Neurochem Res, 1998, 23(12): 1545-1551.
- [17] LAI C H, KUO K H. The critical component to establish *in vitro* BBB model: pericyte [J]. Brain Res Rev, 2005, 50(2): 258-265.

[责任编辑 刘德文]