

· 药物代谢 ·

小鼠体内半边旗 5F 微乳剂的药动学及组织分布特征

吕应年^{1,2*}, 何宇辉³, 田乐², 黄译锋³, 李立², 吴科锋²

- (1. 华东理工大学化学系, 上海 200238;
2. 广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023;
3. 广东医学院药学院, 广东 东莞 523808)

[摘要] **目的:** 考察半边旗抗癌二萜 5F 口服微乳剂在小鼠体内的组织分布及药物代谢动力学。**方法:** 采用 Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-0.5% 冰醋酸 (55:45), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 进样 20 μL, 柱温 35 °C。小鼠灌胃给药 5F 微乳剂与普通制剂后, 在不同时间点取血及内脏器官, 样品经处理后, 采用反相高效液相色谱法测定血清及组织匀浆液中 5F 的浓度, 分析其体内药物代谢动力学和组织分布。**结果:** 小鼠半边旗 5F 微乳剂药动学参数分别为 AUC_{0→t} 12.202 μg·L⁻¹·h⁻¹, C_{max} = 3.434 μg·L⁻¹ 和 T_{max} = 1.048 h, MRT_{0→t} 2.451 h, 相对生物利用度为对照组 616.15%。**结论:** 半边旗 5F 微乳剂口服生物利用度提高, 消除半衰期延长, 具有一定的缓释作用。

[关键词] 半边旗; 二萜; 口服微乳剂; 药动学; 组织分布

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0164-05

[doi] 10.11653/syfy2013180164

Pharmacokinetics and Tissues Distribution of 5F Microemulsion in Mice after Oral Administration

LV Ying-nian^{1,2*}, HE Yu-hui³, TIAN Le², HUANG Yi-feng³, LI Li², WU Ke-feng²

- (1. Department of Chemistry, East China University of Science and Technology, Shanghai 200238, China;
2. Guangdong Key Lab for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China;
3. College of Pharmacy, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pharmacokinetics and tissue distribution characteristics of the 5F oral microemulsion in mouse. **Method:** An Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted with the mobile phase of methanol and 0.5% acetic acid (55:45) at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The column room temperature was set at 35 °C and the injection volume was 20 μL. KM mice were orally administrated with 5F microemulsion at the dose of 20 mg·kg⁻¹. At the setting time intervals, blood were collected from the ocular artery directly from the mice after eyeball removal; serum was immediately separated by centrifugation. The heart, liver, spleen, lungs and kidneys of each mouse was rapidly collected following blood collections, and immediately washed, wiped with filter paper, weighed and homogenized with normal saline to 10%. The serum and homogenates were extracted and then HPLC analysis. **Result:** The pharmacokinetics after oral administrations of 5F microemulsion were AUC_{0→t} 12.202 μg·L⁻¹·h⁻¹, C_{max} 3.434 μg·L⁻¹, T_{max} 1.048 h, MRT_{0→t} 2.451 h. The relative bioavailability was 616.15% higher for microemulsion than that for the control. **Conclusion:** The average drug retention time was prolonged, and the relative bioavailability improved. 5F microemulsion has sustained-

[收稿日期] 20121218(005)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(S2012010008163); 广东高校优秀青年创新人才培养项目(201012103)

[通讯作者] * 吕应年, 副研究员, 从事天然活性产物研究, Tel:0759-2388405, 13692338157, E-mail:lyn7591@hotmail.com

release characteristic.

[Key words] *Pteris semipinnata*; diterpenoid; microemulsion; pharmacokinetic; tissue distribution

目前对恶性肿瘤的治疗由于毒副作用而常常具有局限性^[1],因此寻找高效的、低毒的抗肿瘤药物极具有重要意义,植物产物被广泛用于药物筛选则源于其巨大的药用价值及低毒性^[2,3]。

半边旗属凤尾蕨科植物,广泛分布于中国南方各省,作为民间常用中草药被收录为广东地方习用药材标准品种^[4]。半边旗乙醇提取物具有抗肿瘤活性,其主要成分 ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid (5F)是一种二萜类化合物^[5],分子中的 α 、 β -不饱和和环戊酮结构是发挥抗肿瘤作用的重要基团^[6],目前在治疗非小细胞性肺癌(NSCLC)中受到关注^[7],然而由于其体内代谢快、全身副作用大等缺点限制了该化合物的临床应用。本实验基于半边旗 5F 体内代谢快、全身副作用大等缺点,将 5F 制作成微乳剂,考察制剂在动物体内的分布和药代动力学,分析载药微粒的作用机制及优势,为岭南特色植物半边旗药物资源的开发利用理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪(Agilent 1200 LC 色谱系统,美国),G1311A 四元梯度泵及 G1322AA 真空泵,DAD1515B 二极管阵列检测器,HP1200 色谱工作站 冷冻离心机(Centrifuge 5415R),涡旋混合器,电子天平等。

甲醇,乙酸乙酯,冰醋酸(甲醇为色谱纯,其余为分析纯)由天津四友公司提供,0.9%生理盐水,半边旗 5F 微乳剂和半边旗 5F 对照品自制。

1.2 色谱条件 色谱柱为 Hypersil C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m),柱温 35 $^{\circ}$ C,流动相甲醇-0.5%乙酸(55:45),流速 0.8 mL \cdot min⁻¹,检测波长 242 nm,进样 20 μ L。

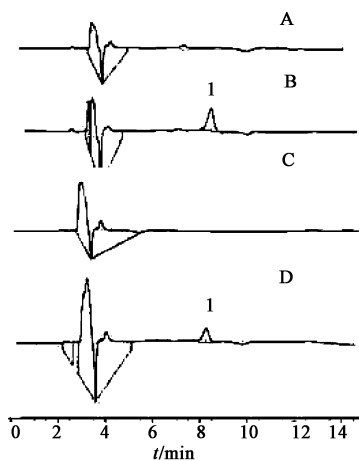
1.3 分组 洁净级昆明小鼠,质量在 22~30 g,由广东医学院实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(粤)2005-0001。取小鼠 80 只,随机分为实验组与对照组,每组 40 只,给药前禁食 12 h,自由饮水。

1.4 样品处理 血清的处理:取小鼠血清 200 μ L,加入冰醋酸 20 μ L,涡旋混匀 1 min,加入乙酸乙酯 1.2 mL,涡旋混合 1 min,12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,取有机相 1.0 mL,自然挥干,加 200 μ L 甲醇溶解,进样 20 μ L 进行分析,记录色谱图。

组织样品的处理:分别精密称取心肝脾肺肾适量,加入 9 倍体积的生理盐水匀浆,12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,加入 6 倍体积的萃取液(冰醋酸-乙酸乙酯 1.2:0.02),涡旋混合 1 min,3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min,取适量上清液,自然挥干,加入 100 μ L 甲醇溶解,进样 20 μ L 进行分析,记录色谱图。

2 结果

2.1 方法专属性 分别测定小鼠空白血浆、组织匀浆液(即空白样品)获得空白样品的色谱图,将一定浓度半边旗提取物 5F 标准液加入空白样品,按 1.2 方法操作,获得相应的色谱图(图 1);对两者进行比较。结果表明血浆和组织中半边旗 5F 保留时间约为 8.2 min,组织和血浆中内源性物质不干扰半边旗 5F 的测定。实验中,在检测限内心脏匀浆液中未检测到 5F,故心脏不作实验分析。



A. 空白血清;B. 含药血清;C. 空白肝匀浆液;D. 含药肝匀浆液

图 1 血清和代表性组织中 5F 的色谱

2.2 标准曲线 精密量取空白样品(血浆和组织匀浆各 80 μ L) 9 份,精密加入半边旗 5F 标准溶液(0.12 g \cdot L⁻¹)适量,涡旋振荡 2 min,配成系列半边旗 5F 溶液(0.12~2.4 mg \cdot L⁻¹),按 1.2 方法进样检测。以半边旗 5F 的峰面积(X)对质量浓度(Y)进行线性回归,求得直线回归方程,即为标准曲线,见表 1。

2.3 精密度和准确性 分别配制高(1.2 mg \cdot L⁻¹)、中(0.30 mg \cdot L⁻¹)、低(0.15 mg \cdot L⁻¹)3 个质量浓度的血浆样品和组织匀浆液各 5 份,按照 1.2 方法进行的操作后进样检测,计算日内精密度。连续 3 d

表 1 标准曲线

组织器官	回归方程	r^2	线性范围 /mg·L ⁻¹	LOD /mg·L ⁻¹
血清	$Y = 52.699X + 3.0069$	0.9978	0.12 ~ 2.4	0.01
肝	$Y = 37.992X + 4.6544$	0.9975	0.12 ~ 2.4	0.01
脾	$Y = 52.257X + 3.8690$	0.9963	0.12 ~ 2.4	0.01
肺	$Y = 52.661X + 4.1818$	0.9990	0.12 ~ 2.4	0.01
肾	$Y = 48.093X + 5.7281$	0.9965	0.12 ~ 2.4	0.01

按 1.2 方法操作,计算日间精密度的。检测结果表明半边旗 5F 在低、中、高浓度的日内、日间 RSD 均 < 15%,测得相对回收率在 85% ~ 105%,结果见表 2。
2.4 回收率 配制半边旗 5F 低、中、高(0.15, 0.30, 1.2 mg·L⁻¹)标准血清样品各 6 份,按照 1.4 项下方法处理后,按照 1.2 项下方法进样(组织样品也按此方法操作),另取用于配制对照血清样品的半边旗 5F 对照品溶液,用甲醇配制成相应浓度

表 2 各组织器官高、中、低 3 种质量浓度的精密度的准确度($\bar{x} \pm s$)

组织器官	C/mg·L ⁻¹	日内			日间		
		均值/mg·L ⁻¹	RSD/%	RE/%	均值/mg·L ⁻¹	RSD/%	RE/%
血清	0.15	0.156 ± 0.326	2.9	1.2	0.153 ± 0.495	4.5	-6.0
	0.30	0.328 ± 0.769	3.8	-0.2	0.326 ± 0.531	2.6	-0.8
	1.20	1.139 ± 1.596	2.5	-0.9	1.113 ± 2.794	4.5	-3.0
肝	0.15	0.121 ± 0.439	4.0	-3.7	0.125 ± 0.762	6.8	-3.8
	0.30	0.341 ± 0.630	3.0	-5.7	0.372 ± 1.208	5.4	0.7
	1.20	1.203 ± 1.719	2.8	-1.7	1.231 ± 2.711	4.4	0.5
脾	0.15	0.136 ± 0.383	3.5	1.3	0.137 ± 0.240	2.2	2.2
	0.30	0.359 ± 0.464	2.1	3.2	0.369 ± 1.145	5.0	5.5
	1.20	1.266 ± 1.316	1.9	-0.4	1.270 ± 1.264	1.8	-0.2
肺	0.15	0.144 ± 0.433	3.7	-1.3	0.153 ± 0.266	2.2	2.4
	0.30	0.304 ± 0.555	2.8	3.0	0.308 ± 0.843	4.1	4.1
	1.20	1.193 ± 1.353	2.0	1.2	1.178 ± 0.302	0.5	0.1
肾	0.15	0.121 ± 0.466	4.1	1.6	0.128 ± 0.703	6.0	4.6
	0.30	0.313 ± 0.702	3.4	0.8	0.331 ± 0.433	2.0	0.6
	1.20	1.242 ± 1.215	1.9	3.0	1.218 ± 1.046	1.6	1.1

溶液,不经处理直接按 1.2 项下方法进样,将测得的 2 组峰面积进行比较,计算高、中、低 3 种质量浓度的回收率($n=6$),结果见表 3。

2.5 稳定性 于空白血浆中加入不同质量浓度的半边旗 5F 标准溶液,使之血浆质量浓度分别为 0.15, 0.30, 1.2 mg·L⁻¹,按照 1.2 项下方法进行测定。3 种不同浓度溶液分别于 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36, 48 h 不同时间点进行测定,结果测得高、中、低浓度的 RSD 分别为 3.9%, 3.7%, 2.1%, RE 分别为 -1.3%, 0.5%, -0.9%。RSD 均 < 15%, RE 均 < 10%,说明半边旗 5F 有良好的稳定性。

3 药动学试验

KM 小鼠均为洁净级,80 只,体重在 22 ~ 30 g,实验前经检查证明健康。给药前禁食 12 h,自由饮水。实验组与对照组均以灌胃方式给药,剂量为 0.02 mL·g⁻¹。两组均于 15, 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h,各时间点分别取 5 只小鼠,眼眶取血,全血 4 °C 冰箱静置 2 h 后,3 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上层血清。取血后,立即处死动物,取心、肝、脾、肺及

表 3 各组织器官高、中、低 3 种质量浓度的回收率($\bar{x} \pm s, n=5$)

组织器官	C/mg·L ⁻¹	回收率/%	RSD/%
血清	0.15	91.4 ± 1.8	1.9
	0.30	88.6 ± 2.3	2.3
	1.20	88.5 ± 2.0	2.2
肝	0.15	94.3 ± 1.8	1.9
	0.30	102.5 ± 2.7	2.6
	1.20	85.3 ± 1.9	2.2
脾	0.15	86.5 ± 1.7	1.9
	0.30	95.4 ± 2.5	2.6
	1.20	97.6 ± 2.2	2.2
肺	0.15	96.1 ± 2.1	2.1
	0.30	85.5 ± 2.2	2.6
	1.20	91.8 ± 2.1	2.2
肾	0.15	91.4 ± 1.8	1.9
	0.30	91.0 ± 2.5	2.7
	1.20	88.5 ± 2.0	2.2

肾组织。血清和内脏组织 - 20 °C 冰箱保存备用。

待测血清用 1.4 项下方法进行样品处理,用标准曲线定量,得到的检测数据经 Excel 计算,得小鼠的半边旗 5F 的平均血药浓度-时间曲线,见图 2。经 DAS 软件计算得 5F 药代动力学参数,结果见表 4;待测组织样品用 1.4 项下方法进行样品处理,用标准曲线定量,得到的检测数据经 Excel 计算,得 80 只小鼠的半边旗 5F 的平均药物组织分布图,见图 3。

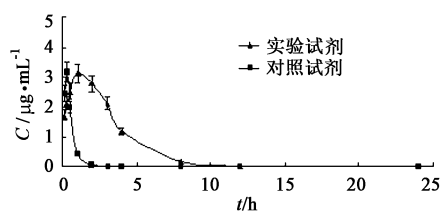


图 2 半边旗 5F 平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=5$)

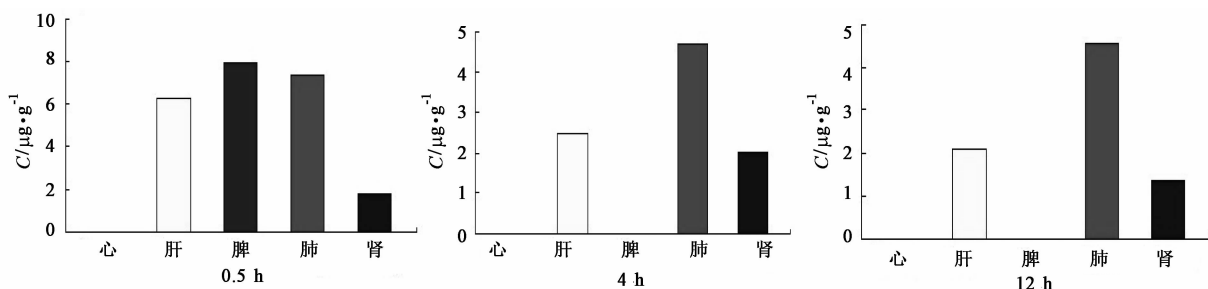


图 3 半边旗 5F 微乳剂在小鼠体内的不同时间点的组织分布

表 4 半边旗 5F 的药动学参数

药动学参数	5F 对照制剂	5F 微乳剂
T_{max}/h	0.330	1.050
$C_{max}/\mu g \cdot L^{-1}$	3.178	3.434
$T_{1/2}/h$	0.224	1.510
$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	10 124.586	1 606.179
$MRT_{0 \rightarrow t}/h$	0.483	2.451
$MRT_{0 \rightarrow \infty}/h$	0.503	2.698
$AUC_{0 \rightarrow t}/\mu g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	2.255	12.054
$AUC_{0 \rightarrow \infty}/\mu g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	2.463	12.740

4 讨论

半边旗是多年生草本植物,有效成分 5F 有显著的抗肿瘤活性,然而由于其体内代谢快、全身副作用大等缺点限制了该化合物的临床应用,故本实验组将 5F 制作成微乳剂。微乳剂作为药物转运系统,在于药物被包于内相,使药物避免与体液或组织液直接接触,从而可在长时间内缓释,延长药物的释放,而且具有淋巴定向输送和靶向定位作用^[8]。

本次实验中,用 DAS 软件对所测的血药浓度进行拟合,得到一系列药动学参数。结果表明,5F 微乳剂和 5F 普通制剂的药动学行为有显著的差别。灌胃给药后,两者血药浓度都迅速达到峰值,5F 普通制剂随着时间的延长血药浓度迅速下降,而 5F 微乳剂血药浓度明显地比 5F 普通制剂下降速度慢,5F 普通制剂在 2 h 时接近定量下限,5F 微乳剂血

药浓度在 30 min 时迅速升至 $2 \mu g \cdot L^{-1}$ 左右,维持此浓度一直到 3 h。由药动学参数可知,微乳剂的消除半衰期比对照液延长,AUC 增加,血浆药物清除速率降低,平均滞留时间普通制剂是它的 2.6 倍,提示 5F 微乳剂具有缓释和较长循环功能。这种结果产生的可能原因是 5F 微乳剂乳滴表面比较亲水,在体内能够适当避免肝、脾内皮吞噬系统的吞噬^[9],使乳滴能够长时间存留于循环系统,乳滴中的药物再缓慢从油相中扩散释放入体内^[10],使药物在血浆中保持较长较高的血药浓度,从而达到缓释的作用。

在组织分布的实验中,检出限范围内心脏匀浆液未检测到 5F,提示 5F 微乳剂可降低药物对心脏的毒性。通过 0.5,4,12 h 组织分布图,可以发现 0.5 h 时脾、肺的药物浓度最高,但是之后脾迅速消除至检测限以下,肺的药物浓度从 0.5 h 时 $7.3 \mu g \cdot g^{-1}$ 左右到 4 h 时 $4.5 \mu g \cdot g^{-1}$ 之后,一直稳定在 $4.5 \mu g \cdot g^{-1}$ 左右,提示 5F 具有一定的肺靶向和缓释作用。5F 微乳剂的平均粒径经测定 $< 50 \text{ nm}$ 。微乳剂经口服吸收入血液循环后,含药微粒经血液循环到达肺部时,可被分布在肺组织的网状内皮系统吞噬或被肺部毛细血管机械性摄取,使药物浓集于肺组织,从而增加肺部血药浓度,提高药物疗效^[11-12]。

在国内外学术研究中,5F 很早就被人们发现具有较好的抗肿瘤功能,实验中发现 5F 微乳剂具有肺靶向性,因此 5F 微乳剂对治疗肺部肿瘤有应用潜力。

[参考文献]

[1] 史国军,周宜强. 中医药联合化疗治疗胃癌术后的 Meta 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (1):261.

[2] Newman D J, Cragg G M, Shader K M. The influence of natural products upon drug discovery [J]. Nat Prod Rep, 2000, 17(3):215.

[3] 郭慧君,朱金华,刘春花,等. 不同滋阴中药对小鼠诱发性肺肿瘤发生及抗肿瘤免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):226.

[4] 广东省食品药品监督管理局. 关于同意收载半边旗为我省地方习用药材标准品种的批复[S]. 2006.

[5] 范世锦,郑雅元,吕应年,等. 优化刺齿凤尾蕨抗癌二萜的超声提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(11):49.

[6] 龚先玲,苟占平,梁念慈,等. 凤尾蕨属 6 种药用植物抗肿瘤有效部位筛选[J]. 时珍国医国药,2010,21 (7):1599.

[7] Chen G G, Liang N C, Lee J F, et al. Over-expression of Bcl-2 against *Pteris semipinnata* L. induced apoptosis of human colon cancer cells via a NF-kappa B-related pathway[J]. Apoptosis, 2004, 9(5):619.

[8] Wang C H. Sustained-release and controlled release of the emulsion research progress [J]. Int J Pharm, 1997, 24:300.

[9] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1998:616.

[10] 欧晓霞,汪征明,封亮. 熊果酸自微乳的制备及其生物利用度[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18 (1):36.

[11] 陈洪轩,陈倩倩,杨小云,等. 白藜芦醇乳脂体小鼠体内药动学及组织分布研究[J]. 南京中医药大学学报,2012,28 (4):350.

[12] 易红,杨华,高进,等. O/W 型微乳凝胶粒度分布特性的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17 (17):1.

[责任编辑 邹晓翠]

《中国中药杂志》2014 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究院所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2014 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11 - 2272/R,国际刊号 1101 - 5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 [www. cjcm. com. cn](http://www.cjcm.com.cn) 或 www. 中国中药杂志. com。

联系电话:稿件查询 010 - 64045830 转 602;主任电话 010 - 64058556;资源与栽培栏编辑:010 - 64048925;制剂栏编辑:010 - 64040392;化学栏编辑:010 - 64040113;药理栏编辑:010 - 84022522;临床栏编辑:010 - 64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010 - 64030625。