

中药艾迪注射液对异环磷酰胺在兔体内代谢的影响

张炜炜^{1,3}, 梁宁生^{2*}, 周长虹¹, 王昕昕¹

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西医科大学附属肿瘤医院临床药学科, 南宁 530021; 3. 烟台毓璜顶医院肿瘤内科, 山东烟台 264000)

【摘要】 目的: 研究异环磷酰胺 (ifosfamide, IFO) 与艾迪注射液联用, 是否对其代谢有影响, 为临床合理用药的安全性和有效性提供参考依据。方法: 对 6 只兔子采用随机自身交叉对照试验设计, 对照组予生理盐水 10 mL 和异环磷酰胺 0.11 g·kg⁻¹ 用生理盐水稀释至 10 mL, 实验组予艾迪注射液 1 mL·kg⁻¹ 和异环磷酰胺 0.11 g·kg⁻¹ 均用生理盐水稀释至 10 mL; 均通过耳缘静脉注射给药。采用 C₁₈ 固体萃取小柱处理血样, 然后用高效液相色谱法测定异环磷酰胺的浓度, 最后计算并比较 2 组药代动力学参数及生物利用度。结果: 对照组和实验组 AUC_{0-∞} 分别为 (140.53 ± 39.26), (120.02 ± 25.89) mg·L⁻¹·h⁻¹, AUC₀₋₄ 分别为 (128.37 ± 34.26), (119.18 ± 25.51) mg·L⁻¹·h⁻¹, C_{max} 分别为 (158.63 ± 16.35), (132.61 ± 21.07) mg·L⁻¹; 实验组的相对生物利用度 F_{0-∞} 为 (91.13 ± 34.50)%, F₀₋₄ 为 (97.62 ± 32.59)%; 实验组生物利用度小于对照组, 两组非生物等效。结论: 两组异环磷酰胺在兔体内的代谢均符合二室房室模型。实验组 IFO 的生物利用度显著性小于对照组, 提示艾迪对 IFO 在兔体内药代动力学有显著性影响; 艾迪注射液还使 IFO 在兔体内的血药浓度明显降低, 推测艾迪注射液可能使其疗效也有所降低。

【关键词】 异环磷酰胺; 艾迪注射液; 高效液相; 药代动力学; 生物利用度

【中图分类号】 R945 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2011)24-0104-05

【收稿日期】 20110816(016)

【第一作者】 张炜炜, 主治医师, 硕士研究生, 从事抗肿瘤药物研究, Tel: 0535-6691999-81907, E-mail: wiiwizh@sina.com

【通讯作者】 * 梁宁生, 教授, 博士生导师, 从事抗肿瘤药物研究, Tel: 0771-5310605, E-mail: liang01@163.com

苷^[9]。本研究在大鼠尿液中发现黄芩的代谢产物主要是野黄芩素-6-O-葡萄糖苷、汉黄芩素与千层纸素 A, 未检测到报道的相关成分。试验结果表明药材配伍会影响一些成分的体内代谢。

本研究有助于进一步明确葛根芩连汤药效物质基础。检测到的化合物尚有几个结构未能确定, 需要进一步的研究确认, 另外来自黄连药材的各类生物碱成分可能因为吸收等因素浓度太低, 在本试验中未检测到相应信号, 有待进行下一步的深入研究。

【参考文献】

[1] 曹佩雪, 梁光义, 李霞, 等. 葛根芩连汤不同配伍情况下葛根素、黄芩苷、小檗碱的含量比较[J]. 中国药学报, 2003, 18(8): 459.
[2] 谭晓梅, 吴艳萍. 葛根芩连汤配伍葛根素在兔体内药代动力学研究[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(5): 1.
[3] 陈丽红, 唐于平, 王强. 葛根芩连汤配方颗粒提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 14(16): 4.

[4] 李晓明, 杨滨, 黄璐琦. 高效液相色谱-质谱联用分析鉴别葛根的异黄酮成分[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1337.
[5] Chen L H, Tang Y P, Chen M J, et al. Chemical correlation between gegen qinlian dispensing granule and its four raw herbs by LC fingerprint[J]. Phytomedicine, 2010, 17: 100.
[6] 夏宏军, 朱珊, 梁键谋, 等. 大鼠灌胃灯盏花素后血浆、胆汁、尿液以及粪便中代谢产物的鉴定[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1362.
[7] Day A J, Bao Y, Morgan M R. Conjugation positions of quercetin glucuronides and effect on biological activity[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29: 1234.
[8] Yasuda Takaaki, Kano Yoshihiro, Saito Ken-ichi, et al. Urinary and biliary metabolites of puerarin in rats[J]. Biol Pharm Bull, 1995, 18(2): 300.
[9] 李建荣, 左凤, 张磊, 等. 泻心汤沉淀物代谢产物的研究 I [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1673.

【责任编辑】 聂淑琴

Influence of Aidi Injection on Pharmacokinetics of Ifosfamide in Rabbit

ZHANG Wei-wei^{1,3}, LIANG Ning-sheng^{2*}, ZHOU Chang-hong¹, WANG Xin-xin¹

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 2. Department of Pharmacy,

Affiliated Tumor Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

3. Oncology Department, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of Aidi injection on pharmacokinetics of ifosfamide (IFO) in rabbit providing evidence for rational and safe application. **Method:** The experiment was designed in a randomized cross-over study. The control group was given ifosfamide and NS, and the test group was given ifosfamide and Aidi. Plasma sample was treated with the C_{18} solid phase extraction column, then concentration of ifosfamide was determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters and bioequivalability of two groups were analyzed. **Result:** The main pharmacokinetic parameters of the control group and experimental group were as follows: $AUC_{0-\infty}$ were (140.53 ± 39.26) , $(120.02 \pm 25.89) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, AUC_{0-t} were (128.37 ± 34.2) , $(119.18 \pm 25.51) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, C_{\max} were (158.63 ± 16.35) , $(132.61 \pm 21.07) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The relative bioavailability of the test group were that $F_{0-\infty}$ was $(91.13 \pm 34.50)\%$, F_{0-t} was $(97.62 \pm 32.59)\%$. The result of statistical analysis showed that there was no bioequivalence between the control and the test groups and the latter was smaller. **Conclusion:** The pharmacokinetics of ifosfamide is belong to two compartments model. When ifosfamide and Aidi are administered to the rabbits, the bioavailability of ifosfamide is reduced significantly, which may suggest that the drug metabolism of ifosfamide can be affected significantly. In addition, Aidi injection can decrease the concentration of IFO in rabbits significantly, so the effect of IFO can be attenuated probably.

[Key words] ifosfamide; Aidi injection; HPLC; pharmacokinetics; bioavailability

异环磷酰胺 (ifosfamide, IFO) 为环磷酰胺的同分异构体, 是目前常用的抗肿瘤药物之一, 用于治疗许多常见恶性肿瘤, 如肉瘤、睾丸肿瘤、恶性淋巴瘤、肺癌、卵巢癌、子宫颈癌等, 毒副作用较大。目前临床上化疗的同时多联用中药, 以达到减毒、改善临床症状、生存质量提高的效应^[1-2]。艾迪注射液为临床上常用中成药, 组方为斑蝥、人参、黄芪、刺五加。功能主治: 清热解毒, 消瘀散结; 用于原发性肝癌, 肺癌, 直肠癌, 恶性淋巴瘤, 妇科恶性肿瘤等。用法用量: 成人一次 50 ~ 100 mL, 加入 0.9% 氯化钠注射液或 5% ~ 10% 葡萄糖注射液 400 ~ 450 mL 中静脉滴注, 1 日 1 次; 与放、化疗合用时, 疗程与放、化疗同步。与异环磷酰胺合用, 可减少化疗的毒副作用^[3]。我们研究艾迪注射液对异环磷酰胺药动学的影响, 为进一步开展各种化疗药物和中药的相互影响, 探索最佳的给药途径、联合用药方法等, 为临床合理、有效、安全的用药提供重要

依据。

1 材料

1.1 仪器 日本津岛 LC-10A 高效液相色谱仪 (包括 LC-10AT VP 泵, SPD-10A VP 紫外检测器, LC-10AT VP 柱温箱, 威玛通用色谱数据工作站)。Zorbax-ODS C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 广州万谱仪器有限公司产品。Cleanert ODS C_{18} (封端, 100 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 固相萃取小柱, 北京艾杰尔科技有限公司产品。TGL-16B 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂产品。

1.2 试剂 异环磷酰胺对照品 (纯度 99.7%), 由江苏恒瑞医药有限公司提供。环磷酰胺 (纯度 99.5%), 由江苏恒瑞医药有限公司提供。乙腈为色谱纯, 由国药集团化学试剂有限公司提供。二次重蒸水, 由广西医科大学实验中心提供。异环磷酰胺 (批号 08012811), 江苏恒瑞医药有限公司提供。艾迪注射液, 由斑蝥、刺五加、黄芪、人参组成, (批号 20080309), 贵州益佰制药股份有限公司提供。

1.3 动物 家兔 6 只,体重(1.90 ~ 2.25) kg,雌雄各半,由广西医科大学试验动物中心提供[动物证书,普通级,SCXK(桂)2009-0002]。

2 方法

2.1 血清中异环磷酰胺含量的测定

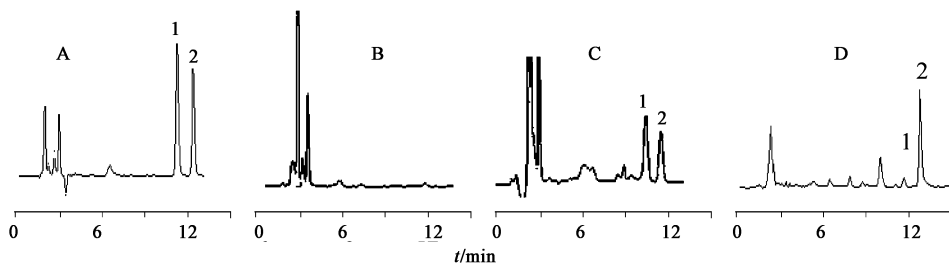
2.1.1 色谱条件 Zorbox-ODS C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),柱温室温,流动相乙腈-水(25:75),流速 1 mL·min⁻¹;检测波长 200 nm,进样量 20 μL。

2.1.2 对照品储备液与内标溶液的配制 精密称取异环磷酰胺对照品 1 g 于 100 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,得质量浓度 10 g·L⁻¹ 的异环磷酰胺储备液,于冰箱 4 °C 保存。取环磷酰胺对照品 0.2 g 于 100 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,得质量浓度为 2 g·L⁻¹ 的内标溶液,于冰箱 4 °C 保存。

2.1.3 血样处理 AGT 固相萃取小柱的活化:先用

2 mL 乙腈,再用 2 mL 生理盐水淋洗柱子;上样:取 0.5 mL 血清样品,加入内标 12.5 μL,加入小柱;淋洗:待血样完全流出后,先加入 1 mL 生理盐水冲洗,再用 1 mL 5% 乙腈进一步冲洗杂质,并加压将冲洗液完全挤出;用 0.5 mL 60% 乙腈洗脱,收集洗脱液,取 20 μL 进样测定。色谱图见图 1。保留时间:异环磷酰胺 11.6 min,环磷酰胺 12.8 min,峰形良好,无杂质峰干扰。

2.1.4 标准曲线和检测限 用 10 g·L⁻¹ 的异环磷酰胺的储备液,将其用空白血清稀释成 2.5, 5.0, 10, 25, 50, 100, 200 mg·L⁻¹ 的标准溶液,依 2.1.3 项下处理后进样测定。以异环磷酰胺与内标峰面积之比 Y 对异环磷酰胺浓度 X 得回归方程: $Y = 0.022X + 0.013$, $r = 0.9999$ 。异环磷酰胺血药浓度在 2.5 ~ 200 mg·L⁻¹ 具有良好的线性关系。在此色谱条件下,以信噪比为 3,异环磷酰胺的最低检测限为 0.5 mg·L⁻¹。



A. 对照品; B. 空白血清; C. 空白血清加入异环磷酰胺及内标; D. 血样
1. 异环磷酰胺; 2. 环磷酰胺

图 1 艾迪注射液家兔血药 HPLC

2.1.5 回收率和精密度 在空白血清中精密加入相应的异环磷酰胺储备液,配制 5, 50, 100 mg·L⁻¹ 的血样,按 2.1.3 项下操作进样,将血样中异环磷酰胺的峰面积与相应浓度的对照品溶液峰面积相比,得提取回收率。用标准曲线计算样品异环磷酰胺的浓度,计算方法回收率。同一天内每种浓度的样品平行操作 5 次和每天 1 次连续考察 5 d,分别计算方法的日内、日间精密度。见表 1。

表 1 异环磷酰胺回收率及精密度测定结果($\bar{x} \pm s, n = 5$)

加入浓度 /mg·L ⁻¹	提取回收率 /%	方法回收率 /%	RSD/%	
			日内	日间
100	92.0 ± 1.8	101.2 ± 3.5	1.1	2.1
50	93.6 ± 5.6	107.2 ± 1.5	2.9	4.1
5	89.3 ± 1.3	95.3 ± 4.3	2.2	2.4

2.1.6 稳定性考察 储备液的稳定性考察 取 2.1.2 项中 2 种对照品储备液和内标溶液在第 1, 7,

15, 30, 45, 60 天用流动相分别配成 50 mg·L⁻¹ 的溶液直接进样 20 μL,记录峰面积。10 g·L⁻¹ 的异环磷酰胺的储备液和内标液的峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.5%。表明对照品储备液和内标溶液至少在 60 d 内稳定。

样品在存放期间的稳定性 取空白血清数份,加入异环磷酰胺储备液及内标溶液,配成 50 mg·L⁻¹ 的血样,放置在 4 °C 冰箱中,分别于第 0, 5, 10, 15 天取样分析,考察在存放期间的稳定性,结果异环磷酰胺及内标峰面积的 RSD 分别为 2.8%, 3.2%。说明异环磷酰胺加内标血样在 4 °C 冰箱中至少能保存 15 d。

2.2 动物实验方案 根据人的用药剂量换算成兔子的用量是异环磷酰胺 0.11 g·kg⁻¹,艾迪 1 mL·kg⁻¹,均以生理盐水稀释到 10 mL 左右,通过耳缘静脉推注给药。实验组连续予艾迪 3 d,第 3 天先给艾

迪,30 min 后予 IFO;对照组连续予生理盐水(与艾迪等剂量)3 d,第3天先给生理盐水,30 min 后予 IFO。予生理盐水和艾迪均缓慢静推 10 min,每次予 IFO 静推均 3 min 内完成,给药过程中直至取血完毕兔子无死亡和明显的毒副反应。

本实验采用随机自身交叉对照试验设计,将 6 只兔子随机分为对照组和实验组,给药方案同 2.2;停药 3 周后同法进行交叉试验。

通过预试验,观察药物在兔体内的变化,设计 12 个采样点,依次为给药后 5,10,20,30,45 min 及 1,1.5,2,2.5,3,5,7 h。耳缘静脉取血,离心分离出血清,4 ℃ 冰箱保存,每 1 时间点用 6 只兔子。

2.3 数据处理 将各时间点获取的血清按前述方法检测 IFO 浓度,将测得的浓度取均数,作为主数据通过 3p97 程序计算,该数据符合线性动力学模型,分别计算出 9 种情况的结果:一,二,三房室各用 1,1/C,1/C/C3 种权重。房室的判别指标为 F 检验和 AIC 值,对于相同的权,当 F 检验差异 $P < 0.05$ 时,应取 AIC 值较小的房室数,当 F 检验差异 $P > 0.05$ 时,则取房室数少者。参考最大绝对误差和相对误差。判断房室模型后,求算药动学参数,达峰浓度(C_{max})采用实测值。将相应的药动学参数经对数转换后用 SPSS 统计软件进行方差分析及双单侧 t 检验法。相对生物利用度计算公式为:

$$F_{0-\infty} = AUC_{0-\infty}(\text{实验组}) / AUC_{0-\infty}(\text{对照组}) \times 100\%$$

$$F_{0-t} = AUC_{0-t}(\text{实验组}) / AUC_{0-t}(\text{对照组}) \times 100\%$$

若实验组 C_{max} 的 90% 可信区间落在对照组 70% ~ 143%,AUC 90% 的可信区间落在对照组 80% ~ 120%,则认为 2 组生物等效,经对数转换后数据的检验范围为 80% ~ 125%^[4-5]。

3 结果

3.1 血药浓度 通过耳缘静脉给药 IFO 0.11 g·kg⁻¹,所有受试动物无死亡,亦无明显的毒副反应,均在预定时间点采血,得血清后存于 4 ℃ 冰箱,按前述方法检测浓度,2 组血药浓度-时间关系见图 2。

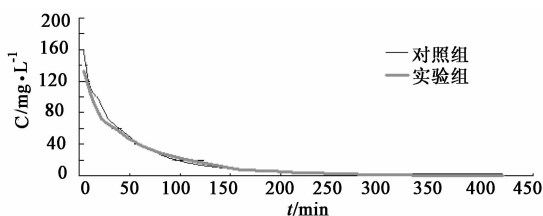


图 2 2 组异环磷酰胺血药浓度-时间数据

3.2 药动学参数 将测得的浓度取均数,作为主数据通过 3p97 程序计算,判定最佳的房室模型为二室房室模型,权重为 1/C/C;将所有数据经 3p97 程序进行批处理计算,得药动学参数见表 2。

表 2 异环磷酰胺在兔体内药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	对照组	实验组
A	146.95 ± 8.11	115.73 ± 60.2
α	$2.38 \times 10^{-2} \pm 1.53 \times 10^{-3}$	$1.73 \times 10^{-2} \pm 1.09 \times 10^{-3}$
B	5.19 ± 1.85	1.5 ± 2.47
β	$2.2 \times 10^{-3} \pm 9.7 \times 10^{-4}$	$3.11 \times 10^{-3} \pm 2.85 \times 10^{-3}$
$t_{\alpha/2}/h$	1.85 ± 0.44	0.35 ± 0.21
$t_{\beta/2}/h$	5.32 ± 3.09	3.15 ± 0.53
k_{12}/h^{-1}	0.5 ± 0.39	2.52 ± 2.0
k_{21}/h^{-1}	0.43 ± 0.25	2.88 ± 2.55
k_{10}/h^{-1}	1.21 ± 0.4	1.44 ± 0.34
V/L	1.44 ± 0.25	1.39 ± 0.35
$AUC_{0-\infty}/mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	140.53 ± 39.26	120.02 ± 25.89
$AUC_{0-t}/mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	128.37 ± 34.26	119.18 ± 25.51
CL/L·h ⁻¹	1.66 ± 0.81	1.96 ± 0.56
$C_{max}/mg \cdot L^{-1}$	158.63 ± 16.35	132.61 ± 21.07

3.3 生物等效性评价 本实验按前述的方法,将 C_{max} , $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} 经对数转换后,采用 SPSS 统计学程序进行处方间、周期间、个体间的 3 因素方差分析;然后进行双单侧 t 检验,得出 2 组非生物等效。实验组的相对生物利用度 $F_{0-\infty}$ 为 (91.13 ± 34.50)%, F_{0-t} 为 (97.62 ± 32.59)%,结合方差分析及双单侧 t 检验,实验组的实测 C_{max} , $AUC_{0-\infty}$, AUC_{0-t} 均小于对照组;所以,实验组生物利用度明显小于对照组,实验组的血药浓度也明显低于对照组。

4 讨论

IFO 是常用的化疗药物,易发生的不良反应为骨髓抑制、神经毒性、肾毒性等,均为剂量限制性;临床上常联用中药以达到减毒、增效等效应。因此,对 IFO 的药动学及与其他药物相互作用的研究很重要,但相关研究有限。国内对 IFO 药动学研究尚无报道;国外对 IFO 进行了各方面药动学研究^[7-9];特别是 Allen LM 等对人的 IFO 药动学做了较多的工作,已作为目前临床用药的依据^[10]。但是,IFO 在兔体内药动学代谢以及联用中药对 IFO 药动学影响的研究尚无报道。本实验采取双周期两处方交叉试验方法,实验组是在对照组给 IFO 的基础上加用艾迪,然后对 2 组 IFO 的相关药动学参数进行生物等效性

的研究。得出实验组生物利用度明显小于对照组,2 组 IFO 是非生物等效。由此确定按该实验的给药方法,艾迪对 IFO 在兔体内代谢的影响是有显著性差异的。

本实验初步判定在动物模型中,艾迪对 IFO 代谢是有影响的,使其在兔体内的血药浓度也明显降低。IFO 属于细胞周期非特异性药物,直接作用于 DNA 的药物,对整个增殖周期中的细胞均有杀伤作用;只有快速、大剂量给药才能杀死最多的肿瘤细胞。由此可见 IFO 的血药浓度与其疗效成正相关,IFO 在兔体内的血药浓度明显降低,推测艾迪同样可能会使 IFO 的疗效降低。

通过延长艾迪与 IFO 用药的间隔时间,或适当增加 IFO 的用药剂量等方法,以尽量消除艾迪对 IFO 在兔体内药物代谢动力学的负面影响,有待进一步研究。

随着肿瘤发病率和死亡率在全球范围内的提高,针对提高治疗肿瘤的药物疗效和减少毒副作用方面的研究日益重要;临床上常将中药联合化疗药物应用,以减轻化疗药物的毒副作用及协同杀灭肿瘤的作用。但是中药对联合应用化疗药物疗效影响方面的研究尚不充分,多是以临床上的最终疗效为判断指标(如临床受益率、临床症状改善率、生活质量 KPS 评分),而缺乏药动学参数、生物利用度等客观指标。

本实验是在中药和化疗药物联用时相互作用方面研究的新尝试,希望通过这方面研究对中西药联合治疗肿瘤方面探讨出更合理的用药方案,发挥最好的疗效。

[参考文献]

- [1] 周际昌. 实用肿瘤内科学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2005.
- [2] 孙燕. 异环磷酰胺临床研究进展[J]. 癌症,1992,11(3):181.
- [3] 刁兰萍,刘丽宏,王彬,等. 艾迪注射液配合化疗治疗非霍奇金淋巴瘤临床观察[J]. 肿瘤防治杂志,2003,10(8):871.
- [4] 孙韬,胡凯文. 恶性肿瘤中成药治疗[J]. 北京中医药大学学报:中医临床版,2007,14(2):44.
- [5] 韩可勤,黄圣凯. 生物等效性评价中数据对数变换后的一些统计问题[J]. 中国临床药理学杂志,1994,10(2):124.
- [6] 黄圣凯,韩可勤. 生物等效性评价的统计方法[J]. 中国药学杂志,1994,29(5):312.
- [7] Wagner T, Drings P. Pharmacokinetics and bioavailability of oral ifosfamide[J]. Arzneimittelforsch, 1986,36(5):878.
- [8] Cerny T, Margison J M, Thatcher N, et al. Bioavailability of ifosfamide in patients with bronchial carcinoma[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1986,18(3):261.
- [9] Wagner T, Hevdrich D, Jork T, et al. Comparative study on human pharmacokinetics of activated ifosfamide and cyclophosphamide by a modified fluorometric test [J]. J Cancer Res Clin Oncol,1981,100(1):95.
- [10] Allen L M, Creaven P J, Nelson R L. Studies on the human pharmacokinetics of isophosphamide[J]. Cancer Treat Rep, 1976,60(4):451.

[责任编辑 聂淑琴]