

解热药 YL2000 中蛇床子素在正常和发热大鼠体内 药物代谢动力学比较

邢东明¹, 赵玉男¹, 石 钺¹, 孙立红², 王 伟¹, 丁 怡¹, 杜力军¹

(1 清华大学生物科学与技术系药物药理研究室, 北京 100084;

2 中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

摘要: 目的: 探讨中药有效部位新药 YL2000 中蛇床子素在正常和发热大鼠体内的代谢动力学。方法: 采用高效液相色谱技术分别测定正常大鼠和干酵母致发热大鼠血浆中蛇床子素的含量, 使用 3P87 软件处理蛇床子素的时量数据, 计算各药代动力学参数。结果: 在正常和发热大鼠体内, 蛇床子素的达峰时间分别为 1.62h 和 4.02h, 峰值血药浓度分别达 0.03ug/ml 和 0.04ug/ml, $t_{1/2}(ke)$ 分别长达 2.98h 和 2.00h, $t_{1/2}(ka)$ 分别为 0.43h 和 1.09h, CL/F 值分别为 4221(mg/kg)/h/(ug/ml) 和 2715(mg/kg)/h/(ug/ml), $AUC_{(0-T)}$ 值分别为 0.189(ug/ml) * h 和 0.29(ug/ml) * h。结论: 发热对蛇床子素的药动学有一定的影响, 可以延缓它的吸收, 增加它的吸收率, 最终导致模型组的 $AUC_{(0-T)}$ 增大。

关键词: YL2000; 蛇床子素; 发热; 药代动力学; 大鼠

中图分类号: R285.5; R285.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)02-0030-04

Comparison for Pharmacokinetics of Osthole Contained in Antifebrile Complex YL2000 Between Normal and Febrile Rats

XING Dong-ming¹, ZHAO Yu-nan¹, SHI Yue¹, SUN Li-hong², WANG Wei¹, DING Yi¹, DU Li-jun¹

(1 Laboratory of Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences
and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China;

2 Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

Abstract: Objective: To explore pharmacokinetics for osthole of YL2000 in normal and febrile rats. Methods: The levels of osthole in plasma were measured through HPLC and the secondary parameters were obtained by fitting the osthole concentration-time data using 3P87 software. Results: In normal and febrile rats, the plasma concentration of osthole was peaked at 1.62h vs. 4.02h with a level of 0.03ug/ml vs. 0.04ug/ml, and the $t_{1/2}(ke)$, $t_{1/2}(ka)$, CL/F and $AUC_{(0-T)}$ of osthole was 2.98h vs. 2.00h, 0.43h vs. 1.09h, 4221(mg/kg)/h/(ug/ml) vs. 2715(mg/kg)/h/(ug/ml) and 0.189(ug/ml) * h vs. 0.29(ug/ml) * h, respectively. Conclusion: Fever induced effects on pharmacokinetics of osthole, including delay of absorption and increases in $AUC_{(0-T)}$.

Key words: YL2000; osthole; fever; pharmacokinetics; rat

YL2000 主要由黄芩、黄连、独活等药材的有效部位组成, 前期药理实验表明该药有很好的解热作用。蛇床子素(osthole)作为主要有效成分对全方来说有一定的代表性, 因此研究它的药代动力学对该药的药动学研究有一定的意义。与此同时, 很多研究都表明: 发热对药物药代动力学有一定的影响。考虑到该药临床主要用于发热患者, 我们同时还研

究了 YL2000 中蛇床子素在发热大鼠体内的药代动力学, 以期更全面的研究揭示蛇床子素在体内的动力学过程。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠, 体重(200±10)g, 购自北京维通利华实验动物有限公司, 合格证号: SCXK(京)2002-0003。

1.2 药品与试剂 蛇床子素对照品(中国药品生物制品检定所, 715-200010); YL2000(含蛇床子素 11mg/g, 由清华大学药物药理研究室提供, 批号: 011218-

1); 色谱乙腈 (Baker); 色谱甲醇 (北京化学试剂公司); 干酵母 (湖北安琪酵母股份有限公司); 磷酸二氢钾 (分析纯); 三蒸水。

1.3 仪器 Waters 高效液相色谱仪: model 490 紫外检测器, model 600 泵, Baseline 色谱工作站; 漩涡混合器 (WH, 江苏太仓通讯器材厂); TGL-16C 型高速离心机 (上海安亭科学仪器制造厂); 恒温水浴箱 (北京医疗设备厂)。

1.4 发热模型的制备及体温的测定 采用文献报道的方法制备发热模型^[1], 即将干酵母用生理盐水配成 15% 的混悬液, 按 5ml/kg 的剂量皮下注射给 SD 大鼠。大鼠每笼 5 只饲养于具备 12h 循环光照, 恒温恒湿 (22 ± 0.5 °C; 50 ± 10%) 的动物房内, 采用带有金属传感器的数字温度计对体温进行测定。测定时, 将数字温度计的金属传感器插入大鼠直肠内 7cm, 直到面板上显示的数值不再发生变化时, 记录此时的数值作为大鼠的体温^[2]。为避免大鼠对传感器的反应而导致体温的波动, 在正式实验前 1 周, 每天 3 次 (早、中、晚各 1 次) 用传感器对大鼠的直肠进行刺激。正式实验时, 0.5h 内测定大鼠体温 3 次, 取其均值作为大鼠的基础体温值, 皮下注射干酵母混悬液后, 开始计时, 以后每小时测定体温 1 次。

1.5 给药及采样 取 SD 雄性大鼠 100 只, 随机分成两组, 一组为正常组, 一组为发热模型组, 每组各 50 只; 各组再随机分成 10 小组, 每组 5 只。按 800mg/kg 灌胃给予 YL2000 (对于发热模型组大鼠, 待体温升高大于基础体温 0.8 °C 时, 开始给药), 然后在给药后 0.5、1、2、3、4、6、8、10、16、24h 分别给大鼠腹腔注射 10% 的乌拉坦 (10ml/kg) 并使其麻醉后, 摘眼球取血, 每个时间点采样 5 只大鼠 (n = 5), 采集血样经体外肝素抗凝, 以 3000r/min 离心 15min, 分离血浆, -20 °C 下保存待用。

1.6 标准液制备和色谱条件 精密称取蛇床子素对照品适量, 以甲醇配制成 200ug/ml 的标准溶液。色谱柱 (Supelcosil LC-18, 16cm × 4.6mm, 5um): 柱温: 35 °C; 流动相: 乙腈-水 = 49: 51; 流速: 1ml/min; 检测波长: 323nm; 进样体积: 20ul。

1.7 血样预处理 取 1ml 血浆于 10ml 的离心管中, 加入 3ml 的乙腈沉淀蛋白, 漩涡混和后以 3000 r/min 的速度离心 15min。将上清液转入 10ml 的青霉素瓶中, 37 °C 水浴挥干后, 定量加入 0.1ml 的甲醇漩涡溶解残渣, 15000 r/min 的速度离心 15min 后, 进样 20ul。本法的最低检测浓度为 10ng/ml。

1.8 线性范围 取空白血浆, 加入不同量的蛇床子素标准液, 配成每毫升血浆中含 0.01、0.025、0.05、0.10、0.20ug 的样品, 按“样品预处理”操作。以峰面积 (Y) 对浓度 (X) 作图, 得标准曲线 $Y = 311271X + 2674$, $r = 0.9992$ 。实验中根据峰面积并采用外标两点法定量血浆浓度。

1.9 回收率和精密度 分别取空白血浆, 配成 0.013、0.052、0.208ug/ml 3 组浓度, 按“样品预处理”操作。用外标两点法得出测量值后, 计算日内、日间精密度和回收率。结果: 标准血浆浓度为 0.013、0.052、0.208ug/ml 时, 日内精密度 RSD 分别为 12.7%、14.1% 和 3.1%; 日间精密度 RSD 分别为 10.2%、12.6% 和 6.7%; 其回收率分别是 (114.5 ± 14.5) %、(106.4 ± 15.0) % 和 (98.5 ± 3.1) %。

1.10 药代参数 以 3P87 软件^[3] 处理, 以 EXCEL 软件做统计学检验, 以 $P < 0.05$ 为具有显著性意义。

2 结果

2.1 模型组与正常大鼠体温变化曲线 干酵母混悬液注射于大鼠, 3h 后开始体温升高, 4h 时平均体温升高 0.8 °C, 8h 达最高峰, 整个体温升高过程持续约 24h。模型组 4h 以后的各时间点的体温与正常动物相比差异都有统计学意义。YL2000 大鼠灌胃后 2h, 开始抑制发热大鼠体温的继续升高, 给药后 4h 与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.05$), 以后使体温逐渐下降, 直至 18h 体温接近正常水平。

2.2 蛇床子素在动物体内的药时过程 (表 1) 根据峰面积按外标两点法计算血药浓度。在正常组 0.5、1 和 6h 处有两个点低于检测限, 模型组 2h 和 10h 处有 2 个点低于检测限, 我们将其浓度计为 0。

表 1 蛇床子素在正常和发热大鼠体内不同时间的血药浓度值 ($\bar{x} \pm s$; n = 5)

时间 (h)	C _{正常} (ug/ml)	C _{发热} (ug/ml)	时间 (h)	C _{正常} (ug/ml)	C _{发热} (ug/ml)
0.5	0.018 ± 0.020	—	6	0.005 ± 0.005* *	0.038 ± 0.016
1	0.030 ± 0.031	—	8	0.010 ± 0.012	0.032 ± 0.040
2	0.023 ± 0.016	0.008 ± 0.012	10	—	0.008 ± 0.007
3	0.050 ± 0.019	0.036 ± 0.010	16	—	—
4	0.013 ± 0.004*	0.052 ± 0.028	24	—	—

注: —, 低于检测限。与正常组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 蛇床子素在正常和发热大鼠体内的药代动力学参数 采用 3P87 药代动力学计算程序对正常和发热大鼠药时数据进行处理, 分别按一室、二室模型进行模拟, 获得 AIC 值和相关系数 r 。根据 AIC 最小

和 r 值最大原则, 判定 YL2000 的代表成分蛇床子素在正常和发热 SD 大鼠体内的药时过程都符合一级吸收的一室开放模型(权重参数都为 1)。两者的药代动力学参数见表 2。

表 2 蛇床子素在正常和发热大鼠体内的药代动力学参数

参数	单位	日期	日期
		正常组	发热组
A	ug/ml	0.05	0.22
Ke	l/h	0.23	0.34
Ka	l/h	1.59	0.63
$T_{1/2}(ka)$	h	0.43	1.09
$T_{1/2}(ke)$	h	2.98	2.00
T(peak)	h	1.62	4.02
C(peak)	ug/ml	0.03	0.04
$AUC_{(0-T)}$	(ug/ml) * h	0.189	0.29
CL/F	(mg/kg)/h/(ug/ml)	4221	2715
V/F	(mg/kg)/(ug/ml)	18187	7834

3 讨论

蛇床子素是驱风湿药独活的有效成分之一, 具有广谱的抗菌作用。现代药理实验证明其增加非特异性免疫功能的同时, 能够明显抑制迟发性超敏反应和小鼠被动皮肤过敏反应^[4-5]。有关蛇床子素药代动力学的研究不多。庞志功等通过使用薄层板-荧光分光光度法, 研究了灌胃给予兔蛇床子水煎剂后血浆中蛇床子素的时量变化, 结果表明: 蛇床子素吸收迅速, 达峰时间为 0.75h, 吸收相半衰期为 0.11h; 但消除却比较慢, 消除相半衰期达 17h, 因此属于快速吸收慢速消除药物^[6]。给大鼠静脉注射蛇床子素, 分布迅速($t_{1/2\alpha}$ 3.59min), 排泄时间($t_{1/2\beta}$) 为 41.13min^[7]。我们的研究表明, YL2000 中蛇床子素在正常大鼠体内的吸收较快, 达峰时间约为 1.6h, 这一点与文献一致; 而其消除相半衰期仅有约 3h, 与上述口服给药的文献报道相比, 时间大大缩短。分析其原因可能是复方中其它成分促进了蛇床子素的代谢。因为有文献报道, 黄芩苷就有选择性诱导肝细胞色素 P₄₅₀ 的作用^[8]。我们以 AUC 与口服药量的比值来反应药物的吸收率, 可以发现 YL2000 中蛇床子素在正常大鼠体内的 $AUC_{(0-T)}$ 与口服给药量的比值为 0.16% (大鼠血容量约为 7.4ml/100g^[9])。文献报道蛇床子水煎液家兔灌胃后体内 $AUC_{(0-T)}$ 与口服给药量的比值为 0.847%^[6] (家兔血容量约为 7.08%^[9]), 高于 YL2000 的吸收率约 5.3 倍(0.847/0.16)。提示 YL2000 中的蛇床子素吸收率

不算高, 其因素可能有: 薄层扫描与 HPLC 检测方法的差异; 给药对象不同, 存在着种属差异; 单独给药和复方给药的差异等。

尽管没有对 YL2000 中蛇床子素在正常和发热大鼠体内的药动学参数作统计学分析, 但是仅从两组均值的数据来看, 吸收相半衰期和达峰时间都超过正常一倍还多。YL2000 中蛇床子素在发热大鼠体内的 $AUC_{(0-T)}$ 与口服给药量的比值为 0.247%, 比正常大鼠的比值高 54.4% [(0.247- 0.16)/0.16]。这在一定程度上表明, 发热对蛇床子素的药动学有一定的影响, 它可以延缓蛇床子素吸收, 增加其吸收率, 同时发热大鼠时蛇床子素的清除速率降低也是导致模型组的 $AUC_{(0-T)}$ 增大的重要原因。机体在发热状态下, 其肝细胞色素 P₄₅₀ 的含量和活性都大大降低^[10-12], 导致代谢药物的能力下降的原因可能用来解释上述现象。

参考文献:

[1] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 298-300.

[2] Handler CM, Price RW, Geller EB, et al. Effect of Mu-Selective Opioid Antagonists on MIP-1 β and IL-1 β -induced fever[J]. Ann NY Acad Sci, 1998, 856: 270-273.

[3] 干鹏, 朱珠, 傅强, 等. 国内外常用 PK/PD 应用程序概述[J]. 中国药学杂志, 2001, 36(11): 777-779.

[4] 刘桦, 蒋韵, 韩英. 蛇床子素对小鼠免疫药理作用的研究[J]. 中草药, 1997, 28(9): 543-545.

[5] 陈志香, 段小波, 刘荣. 蛇床子素抗变态反应的研究[J]. 药学学报, 1988, 23(2): 96-99.

[6] 庞志功, 汪宝琪, 何丹. 用环糊精包含荧光法研究水煎剂中蛇床子素的药动学[J]. 西安医科大学学报, 2002, 23(1): 14-16.

[7] Tsai TH, Tsai TR, Chen CC et al. Pharmacokinetics of osthole in rat plasma using high performance liquid chromatography[J]. J Pharmaceutical and Biomedical analysis, 1996, 14(6): 749-53.

[8] 候艳宁, 程桂芳, 朱秀媛. 黄芩苷对小鼠肝细胞色素 P₄₅₀ 的选择性诱导[J]. 药学学报, 2000, 35(12): 890-892.

[9] 施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安: 陕西科技出版社, 1989. 38-48.

[10] Batra JK, Venkitesubramanian TA, Raj HG. Drug metabolism in experimental tuberculosis I: changes in hepatic and pulmonary monooxygenase activities due to infection. Eur J Drug Metab Pharmacokinet[J]. 1987, 12(3): 109-114.

[11] Endo Y, Tsuruya S, Fujihira E. Hepatic drug-metabolizing

enzyme activities and anti-inflammatory potency of hydrocortisone in rats with granulomatous inflammation. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* [J] . 1981, 33(2) : 195-206.

[12] Kraemer MH, Furukawa CT, Koup JR, et al. Altered theophylline clearance during an influenza B outbreak. *Pediatrics* [J] . 1982, 69(4) : 476-480.