

醋酸棉酚宫内给药装置在小鼠体内药动学研究

裘琳^{1,3}, 赵轶¹, 袁弘², 许泓¹, 胡富强², 林俊¹, 张信美^{1*} (1.浙江大学医学院附属妇产科医院, 杭州 310006; 2.浙江大学药学院药物制剂研究所, 杭州 310058; 3.杭州师范大学附属医院, 杭州 310015)

摘要: 目的 探索醋酸棉酚宫内给药装置在小鼠体内的药动学特征。方法 将醋酸棉酚宫内给药装置放入小鼠子宫内, 用 HPLC 测定血浆中药物浓度。结果 醋酸棉酚宫内给药装置放入小鼠子宫中, 体内血药浓度在 48 h 达到高峰($0.30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 随后呈现恒速释放的特征。结论 醋酸棉酚宫内给药装置在小鼠体内达峰时间迅速, 并能长时间维持稳定的药物释放, 有望用于子宫腺肌病的治疗。

关键词: 醋酸棉酚; 宫内给药装置; 子宫腺肌病; 小鼠

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)01-0063-04

基金项目: 浙江省科技厅项目(2006R10027)

作者简介: 裘琳, 女, 硕士, 副主任医师 Tel: (0571)88303627 E-mail: qiulin1997@163.com *通信作者: 张信美, 男, 硕士, 教授, 硕导 Tel: (0571)87061501 E-mail: xinmei6@yahoo.com

中国现代应用药学 2011 年 1 月第 28 卷第 1 期

Chin JMAP, 2011 January, Vol.28 No.1

• 63 •

QIU Lin^{1,3}, ZHAO Yi¹, YUAN Hong², XU Hong¹, HU Fuqiang², LIN Jun¹, ZHANG Xinmei^{1*} (1.Women's Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 2.Institute of Pharmaceutics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 3.The Affiliated Hospital of Hangzhou Normal University, Hangzhou 310015, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the release rate of gossypol acetate from a designed gossypol-loaded intrauterine device (IUD) in mice. **METHODS** The mice were administrated with gossypol acetate-loaded IUD and then the release rate of gossypol acetate from the IUD was tested by HPLC. **RESULTS** The results showed that the concentration of plasma gossypol acetate gradually increased to a peak level of $0.30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ on the second day, which was then maintained for several months. **CONCLUSION** A gossypol-loaded IUD is a reliable method of administration for gossypol acetate and it is possibly an effective way to treat adenomyosis in mice.

KEY WORDS: gossypol acetate; intrauterine contraceptive device; adenomyosis; mice

棉酚是从锦葵科植物陆地棉或同属其他植物的成熟种子或棉根皮中提取的有效成分,以醋酸棉酚的形式被广泛用于医药领域。醋酸棉酚口服多年来被成功用于男性避孕^[1],并有抗肿瘤、抗病毒、抗寄生虫等活性^[2-4]。以往较多研究表明,醋酸棉酚口服给药用于治疗妇科常见病如子宫腺肌病和子宫内膜异位症的疗效已被肯定,但因有较严重的低血钾反应而限制了其临床应用。醋酸棉酚除了全身性的药物作用机制外,最主要的作用靶点是在局部,即对卵巢雌、孕激素受体和子宫内腺甾体激素受体具有直接抑制作用,抑制子宫内腺细胞 DNA 合成,从而使子宫内病变部位逐渐萎缩达到治疗目的。本实验中,笔者将醋酸棉酚宫内给药装置放入小鼠子宫内,并通过测定给药后不同时间小鼠的血药浓度来探索醋酸棉酚宫内给药装置在小鼠体内的缓释特征,为进一步研究醋酸棉酚宫内给药治疗子宫腺肌病的临床效果提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品与材料

醋酸棉酚宫内给药装置(浙江大学药学院药物制剂研究所研制,其中醋酸棉酚原料药粉剂为西安北方药业有限公司提供,硅凝胶与硅凝胶硫化剂由上海医用橡胶制品研究所提供),甲醇、乙腈为色谱纯,其他所用试剂都为分析纯或色谱纯。

1.2 实验动物

健康未孕 ICR 小鼠,♀,6~7 周龄,体重为(20 ± 2.5)g,浙江中医药大学动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(沪)2007-0005。小鼠自由摄食和饮水,光照为亮/暗每 12 h 交替,温度、湿度和

通风符合浙江大学动物管理条例。

1.3 生物样本中醋酸棉酚 HPLC 测定方法学研究

1.3.1 醋酸棉酚宫内给药装置的制备 醋酸棉酚宫内给药棒以硅凝胶混合物为载体材料,其制备为:取硅凝胶(以下简称 A)与硅凝胶硫化剂(以下简称 B),按照 0.9:1.0 混合均匀;另称取醋酸棉酚适量,按照药物与载体材料的比例为 10%,加入混合均匀的硅凝胶乳液,搅拌、混匀得载药的硅凝胶乳液。将药物的硅凝胶乳液注入中空聚氯乙烯塑料管中,在 80℃ 条件下硫化 2 h,剪开塑料管,得到醋酸棉酚宫内给药棒,按照剂量切割成适当的大小。

1.3.2 仪器及色谱条件 Agilent 1100 高效液相色谱系统。色谱柱:Agilent Eclipse-XDB-C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.2%冰醋酸-乙腈(25:75);流速:1.2 mL·min⁻¹;检测波长:235 nm;柱温:25℃;进样量:20 μL。

1.3.3 血浆样品预处理 取小鼠血样于普通离心机以 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,吸取血浆 0.2 mL,加入乙腈 0.2 mL,涡旋振荡 3 min,置 4℃ 低温高速离心机以 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取 20 μL 上清液进样分析。

1.3.4 色谱行为 用乙腈配制浓度为 1.95, 3.9, 7.8, 15.6, 39.0, 97.5 μg·mL⁻¹ 系列对照品溶液。取空白血浆 0.2 mL,加入上述系列对照品溶液适量,配制成醋酸棉酚浓度分别为 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.95, 4.875 μg·mL⁻¹ 的对照品血浆,按“1.3.3”项下方法处理。在选定的色谱条件下,分别进样 20 μL,记录色谱图,见图 1。从色谱图可以看出,血浆中的其他组分与测定组分可完全分

离,其中醋酸棉酚的出峰时间为8.1 min。用二级管阵列紫外检测器对血浆中醋酸棉酚的色谱峰进行峰纯度检查,结果峰纯度为100%,说明无其他内源性成分干扰测定。

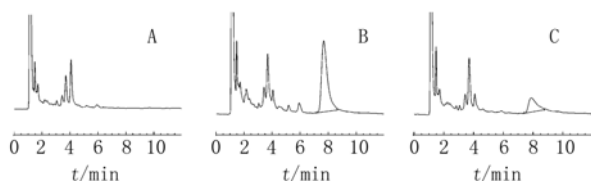


图1 高效液相色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆样品中加入醋酸棉酚; C-子宫内置入醋酸棉酚宫内给药装置8 h后小鼠血浆样品

Fig 1 HPLC chromatogram

A-blank plasma; B-blank plasma spiked with gossypol acetic acid; C-plasma sample of mouse after being administrated with gossypol acetate-loaded IUD for 8 h

1.3.5 线性关系考察 分别取“1.3.4”项下小鼠血浆对照品溶液测定并进行线性回归,以峰面积为纵坐标,醋酸棉酚浓度为横坐标,得小鼠血浆中醋酸棉酚的回归方程为: $A=28.131C+4.7923$ ($r=0.9993$)。结果表明,血浆中醋酸棉酚浓度在 $0.0975\sim4.875\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好,定量限为 $0.0975\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=5$, $\text{RSD}=6.4\%$)。

1.3.6 方法精密度和回收率 取小鼠空白生物样本,按“1.3.4”项下方法制备醋酸棉酚低、中、高($0.0975, 1.950, 4.875\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)3种浓度对照品样本血浆,按“1.3.3”项下方法处理后,进样测定,各浓度日内重复测定5次,并连续测定5 d,每天1次。日内RSD分别为6.4%, 1.9%, 3.8%; 日间RSD分别为10.8%, 5.4%, 6.6%。同法取低、中、高3种浓度对照品样本,按“1.3.3”项下方法操作,测得3种不同浓度的回收率,其结果均 $>90\%$ 。

1.3.7 样品稳定性考察 ①样品室温下放置稳定性:按“1.3.4”项下方法制备低、中、高($0.0975, 0.78, 4.875\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)3种浓度的样品,置室温中分别于0, 2, 4, 8 h内测定,结果其RSD均 $<6.48\%$,表明含醋酸棉酚对照品的血浆在室温下放置8 h内稳定。②样品冷冻稳定性:按“1.3.4”项下方法制备低、中、高($0.0975, 0.78, 4.875\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)3种浓度的样品放入冷冻($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)保存,分别于0, 5, 10, 30, 60 d时取出化冻后测定,测得RSD均 $<9.87\%$,表明含醋酸棉酚对照品的血浆冷冻保存60 d内稳定。

1.4 醋酸棉酚宫内给药装置的小鼠体内动态释放

试验

取已达到性成熟但未曾受孕的7周龄雌性ICR小鼠,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,常规腹部消毒开腹,分离出右侧子宫,在距两子宫连接处0.5 cm处剪一小口,将醋酸棉酚宫内给药装置(醋酸棉酚含量为 $1\text{ mg}/20\text{ g}$ 体重)插入子宫内,无需缝合,将子宫放回腹腔后,常规关腹。分别于术后1, 2, 3, 4, 5, 10, 11, 12, 20, 30, 45, 60 d ($n=3$)小鼠摘眼球采血后脱颈处死,取血肝素钠抗凝,离心,分离血浆,测定血浆中醋酸棉酚的药物浓度。

2 结果

醋酸棉酚宫内给药装置的小鼠体内动态释放实验显示小鼠体内醋酸棉酚的血药浓度在48 h达到高峰,随后基本保持一定的血药浓度呈现恒速释放的特征。结果见图2。

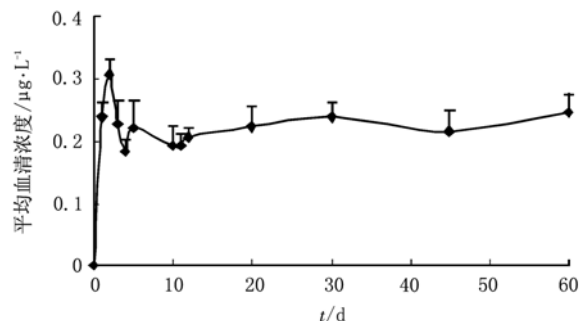


图2 醋酸棉酚宫内给药装置的小鼠体内动态释放曲线($n=3$)

Fig 2 The dynamic *in vivo* releasing curve of gossypol acetate-loaded intrauterine device($n=3$)

3 讨论

醋酸棉酚用于治疗子宫腺肌病和子宫内膜异位症的最主要的作用靶点是在局部,即这一作用不经过垂体-卵巢轴,药效直达病患部位,使治疗效果更加显著。Badaway等^[5]体外实验显示, $25\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $50\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 棉酚对子宫内膜细胞株存在增殖抑制及线粒体毒性,可以抑制子宫腺肌瘤细胞的增殖。醋酸棉酚口服用药因有严重的低血钾反应而限制了其临床应用,笔者将醋酸棉酚宫内给药装置放在子宫腔内让其长期定量释放,可发挥口服给药等的作用,且降低全身药物不良反应,提高患者的依从性,从而完成治疗期,提供了治疗子宫腺肌病和子宫内膜异位症的一种新思路。

目前棉酚的检测主要采用高效液相色谱法^[6-7],本实验通过方法学各项指标的考察,建立了测定小鼠血浆中醋酸棉酚的反相高效液相色谱法。该方法

灵敏、精确、可靠、简单,能满足实验检测的需要。

本实验结果显示,醋酸棉酚宫内给药装置小鼠体内释放实验提示小鼠体内的血药浓度在 48 h 达到高峰,随后基本保持较稳定的血药浓度,呈现恒速释放的特征,与笔者前期体外释放实验的曲线特征一致,说明醋酸棉酚宫内给药装置能够在小鼠体内较快地达到峰值,并能长时间维持稳定的药物浓度,从而产生长期的治疗作用。本实验结果为进一步研究醋酸棉酚宫内给药治疗子宫腺肌病的临床效果提供了有力的实验依据。

REFERENCES

- [1] JANERO D R, BURGHARDT B. Protection of rat myocardial phospholipid against peroxidative injury through superoxide-(xanthine oxidase)-dependent, iron-promoted Fenton chemistry by the male contraceptive gossypol [J]. *Biochem Pharmacol*, 1988, 37(17): 3335-3342.
- [2] BAUER J A, TRASK D K, KUMAR B, et al. Reversal of cisplatin resistance with a BH3 mimetic, (-)-gossypol, in head and neck cancer cells: role of wild-type p53 and Bcl-xL [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(7): 1096-1104.
- [3] TIAN D, WANG S M, ZHANG J R. Effects of gossypol acetic acid on cervical cancer cells proliferation [J]. *Med J Chin PLA (解放军医学杂志)*, 2008, 33(9): 1158.
- [4] KO C H, SHEN S C, YANG L Y, et al. Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(8): 1670-1679.
- [5] BADAWY S Z, SOUID A K, CUENCA V, et al. Gossypol inhibits proliferation of endometrioma cells in culture [J]. *Asian J Androl*, 2007, 9(3): 388-393.
- [6] CUN G H, CHEN J C, CAI D Y. Determination of gossypol in cotton root bark by HPLC [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2002, 27(3): 173-175.
- [7] CUI X M, XIE C X, ZHANG L J. Determination of gossypol acetic acid residues in muscle by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr (色谱)*, 2004, 22(5): 559.