

毛兰素注射液在大鼠体内药动学研究

杨兵勋¹, 周红华², 洪敏³, 盛龙生², 陈立钻¹, 孙继军¹, 沈春香¹, 于善凯¹, 夏克中¹, 陈武兵¹, 杨芳亮¹, 王增¹, 张旭峰¹ (1.浙江天昊药业有限公司, 杭州 310012; 2.中国药科大学, 南京 210009; 3.南京中医药大学, 南京 210029)

摘要: 目的 阐明毛兰素注射液在 SD 大鼠体内药动学规律。方法 SD 大鼠分别单次和隔天、每隔一个半衰期一次多剂量静脉注射毛兰素注射液。采用高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)测定大鼠静脉注射后不同时间大鼠血浆中毛兰素的血药浓度。结果 大鼠单次静脉注射 25, 50, 100 mg·kg⁻¹ 毛兰素注射液的主要药动学参数为: $T_{1/2\beta}$ 分别为 3.66, 3.75, 3.89 h; AUC₀₋₁₂ 分别为 1 453.0, 3 041.6, 6 731.6 ng·mL⁻¹·h; AUC_{0-∞} 分别为 1 462.0, 3 077.3, 6 788.7 ng·mL⁻¹·h; Vd 分别为 11.67, 10.37, 3.38 L·kg⁻¹; CL 分别为 0.049, 0.089, 0.024 L·kg⁻¹·h⁻¹; MRT 分别为 0.18, 0.28, 0.21 h; 50 mg·kg⁻¹ 剂量的毛兰素注射液隔日给药 5 次其药动学参数与单次给药相近; 而 50 mg·kg⁻¹ 剂量的毛兰素注射液每隔一个半衰期一次给药 5 次的 $T_{1/2\beta}$ 为 5.43 h, AUC_{(s0)(0-t)} 为 9 800.8 ng·mL⁻¹·h。结论 毛兰素注射液在大鼠体内的动力学过程与剂量相关, 毛兰素注射液单剂量给药的体内药动学符合开放型二房室模型, $T_{1/2\beta}$ 与给药剂量与关, 表明毛兰素在大鼠体内的消除过程符合

基金项目: 浙江省中药现代化重点项目(2007C13025)

作者简介: 杨兵勋, 男, 博士, 副主任医师

Tel: (0571)88858168

E-mail: yangbx001@yahoo.com.cn

一级动力学规律。隔日多剂量给药的消除过程亦符合一级动力学规律；而每隔一个半衰期一次多剂量给予 50 mg·kg⁻¹ 剂量的毛兰素其在大鼠体内则呈非线性消除。

关键词：毛兰素注射液；药动学；高效液相色谱-质谱联用

中图分类号：R969.1

文献标志码：A

文章编号：1007-7693(2010)08-0673-05

Pharmacokinetic Study of Erianin Fat Emulsion in Rats

YANG Bingxun¹, ZHOU Honghua², HONG Min³, SHENG Longsheng², CHEN Lizuan¹, SUN Jijun¹, SHEN Chunxiang¹, YU Shankai¹, XIA Kezhong¹, CHEN Wubing¹, YANG Fangliang¹, WANG Zeng¹, ZHANG Xufeng¹ (1. Zhejiang Tianhuang Medicinal Plant Pharmaceutical Co. Ltd., Hangzhou 310012, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 3. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To elucidate pharmacokinetics of erianin fat emulsion in rats. **METHODS** An HPLC-MS method was developed and used to determine the rats plasma concentration of erianin after intravenous injection at single, and dosage multiple dosages which with each two days and each half elimination time($t_{1/2}$) a time administration. **RESULTS** The parameters of single dosage as 25, 50, 100 mg·kg⁻¹ of erianin in rats: $T_{1/2\beta}$ values were 3.66, 3.75 and 3.89 h. AUC_{0-12} values were 1 453.0, 3 041.6, 6 731.6 ng·mL⁻¹·h. $AUC_{0-\infty}$ values were 1 462.0, 3 077.3, 6 788.7 ng·mL⁻¹·h. V_d values were 11.67, 10.37 and 3.38 L·kg⁻¹. CL values were 0.049, 0.089, 0.024 L·kg⁻¹·h⁻¹. MRT values were 0.18, 0.28, 0.21 h, respectively. The parameters of erianin multiple dosages with 50 mg·kg⁻¹ administration each two days were similar as the single dosage. However, the $T_{1/2\beta}$ value prolonged to 5.43 h, the $AUC_{(0-t)}$ elevated to 9 800.8 ng·mL⁻¹·h, while multiple dosage of 50 mg·kg⁻¹ each half elimination time. **CONCLUSION** The pharmacokinetics of erianin fat emulsion with single dosage administration in rats had dose-concentration linearity, the $T_{1/2\beta}$ values had no change within the dose range. It suggested that erianin fat emulsion pharmacokinetics was in accordance with two-compartment open model, and its elimination in rats obey with linear kinetics. However, administration with each $t_{1/2}$ a time at the dose of 50 mg·kg⁻¹ of erianin, its elimination obeyed nonlinear kinetics.

KEY WORDS: Erianin fat emulsion; pharmacokinetics; HPLC-MS

毛兰素注射液是利用从中药鼓槌石斛 *Dendrobium chrysotoxum* 及其同属植物中提取而得的联苄类化合物毛兰素(rianin)，经过乳化技术制备而成供静脉注射用的脂肪乳剂。文献报道^[1]，毛兰素对体外培养的人体白血病细胞株 K₅₆₂、人体白血病 HL-60、人体肺腺癌 A-549、人体结肠癌 HT-29、人体乳腺癌 MCF-7、HepG2 人体肝癌、SKMEL-5 和 MLM 黑色素瘤等肿瘤细胞株的生长均有较强的抑制作用。在体内，对 S180、ESC、HePA 等动物移植性肿瘤亦有明显疗效^[2-3]。机制研究发现，毛兰素能够选择性地抑制增殖期血管内皮细胞的增殖，并破坏其细胞骨架蛋白 M 和骨架蛋白 F，使扁平形的血管内皮细胞转变成圆形内皮细胞，进而导致血管腔狭窄，血流量下降，且作用可持续 24 h 以上。进一步病理组织学研究证实，毛兰素给药后能使人体肝癌、黑色素肿瘤出现广泛的出血性坏死^[3-4]。文献结果提示，毛兰素与 CA4P(combretastatin A4 phosphate)相似，同为选择性血管靶向剂(vascular disrupting agents, VDA)，对临床肿瘤具有潜在的治疗价值。

为阐明本品的体内过程，本试验采用 HPLC-MS

对毛兰素在大鼠体内的药动学参数进行了研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1100 HPLC-MS 高效液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司)，含在线脱气机、双高压梯度泵、自动进样器(可控温)、柱温箱、电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)。

1.2 材料

毛兰素注射液(浙江天皇药业有限公司，规格：0.5%，批号：030610)；毛兰素对照品(浙江天皇药业有限公司，批号：0201，含量 99.4%)；内标：C₁₈H₁₈O₅(Sigma 公司，批号：558508，含量 98%)。甲醇(Merck 公司)，色谱纯；乙酸铵(南京化学试剂厂)，分析纯；乙酸乙酯(南京化学试剂厂)，分析纯；水为重蒸水。

试验动物：SD 大鼠，由南京中医药大学动物实验中心提供，合格证号为 SYXK(苏)2002-0053。

2 试验方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Lichrospher C₁₈ 柱，250 mm×4.6 mm，5 μm；柱温：25 ℃；流动相：0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵

水溶液-甲醇(15:85); 流速: 1 mL·min⁻¹; 电喷雾离子源参数: 喷雾电压为 4 000 V; 干燥气为氮气, 流速 9.5 L·min⁻¹; 喷雾压力 275.8 kPa; 温度 350 °C; 裂解器电压: 60 V; 离子化方式: 电喷雾离子化, 正离子方式; 选择离子监测(SIM): *m/z* 319.1, 315.1。

2.2 血样处理

取 10 mL 尖底玻璃离心管, 加入待测血浆 0.2 mL, 加入内标溶液 25 μL(26.8 ng), 加乙酸乙酯 2 mL, 漩涡混合 3 min, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上层有机相 1.5 mL 于另一离心管中, 氮气流吹干(40 °C 水浴), 加入流动相 200 μL, 涡旋 60 s, 溶解残渣。12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取 40 μL 上层清液注入 HPLC/ESI/MS, 记录分析结果。

2.3 方法专属性

用“2.2”项下血样处理方法及“2.1”项下检测条件分析空白血浆、加对照品血浆、加内标血浆和注射毛兰素注射液后含药血浆。结果, 大鼠空白血浆中内源性物质不干扰样品及内标峰, 基线噪音小, 见图 1 和图 2。

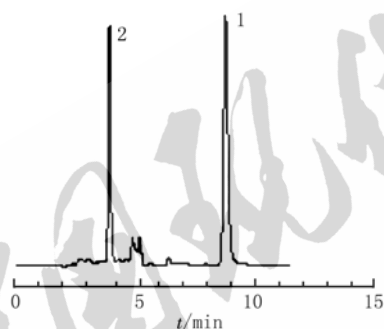


图 1 大鼠空白血浆加毛兰素及内标后的 HPLC-MS
1-内标; 2-毛兰素

Fig 1 HPLC-MS chromatograms of rats blank plasma added erianin and internal mark

1-internal mark; 2-erianin

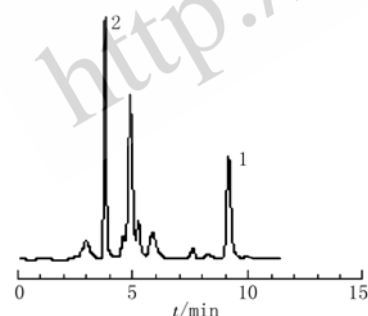


图 2 大鼠静脉注射毛兰素注射液后血浆的 HPLC-MS

1-内标; 2-毛兰素

Fig 2 HPLC-MS chromatograms of rats plasma after erianin i.v. injection

1-internal mark; 2-erianin

2.4 标准曲线与线性范围

取 10 mL 尖底玻璃离心管, 各加入空白血浆 0.2 mL, 定量加入内标溶液 25 μL, 定量加入毛兰素标准溶液, 分别配成毛兰素浓度为 1.03, 5.13, 10.25, 20.5, 51.25, 102.5, 307.5, 615, 1 025 ng·mL⁻¹ 的标准浓度系列; 按“2.1”项下方法分析。以毛兰素的标准浓度 *C* 为横坐标, 毛兰素与内标的峰面积比值($Y=A_s/A_i$)为纵坐标, 按 $1/y^2$ 权重进行线性回归, 绘制标准曲线图。结果表明, 在 1.03~1 025 ng·mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好, 线性曲线为: $Y=0.009\ 15C+0.000\ 09(r=0.998\ 2, n=5)$, 毛兰素的定量限为 1.03 ng·mL⁻¹(0.2 mL 血浆), 其信噪比为 8.1。

2.5 精密度试验

按“2.4”项下操作, 选取低, 中, 高 3 个浓度, 各 5 份, 配制含毛兰素浓度分别为 5.13, 102.5, 1 025 ng·mL⁻¹ 的血浆样品, 加入内标溶液 25 μL, 按“2.2”项下方法处理血样, HPLC-ESI-MS 分析, 计算毛兰素和内标的峰面积的比值, 代入标准曲线中求算日间和 5 日内浓度及 RSD。结果日内 RSD 分别为 4.13%, 3.14%, 3.51%, 日间 RSD 分别为 5.66%, 5.43%, 2.91%, 表明本法精密度良好, 适合本品测定。

2.6 回收率试验

配制含毛兰素浓度分别为 5.13, 102.5, 1 025 ng·mL⁻¹ 的血浆样品, 加入内标溶液 25 μL, 按“2.2”项下操作, HPLC-ESI-MS 分析, 测得毛兰素与内标的峰面积比值(A_{s1}/A_{i1}), 计算毛兰素浓度测得值与加入值的比值求得相对回收率; 另用乙酸铵水溶液-甲醇(15:85)溶液配制上述含内标的 3 种浓度的样品, 同法测得毛兰素与内标的峰面积比值(A_{s2}/A_{i2}), 按公式 $\frac{A_{s1}/A_{i1} \times 2/1.5}{A_{s2}/A_{i2}} \times 100\%$ 计算毛兰素的绝对回收率, 见表 1。

表 1 回收率试验结果(*n*=5)

Tab 1 Result of HPLC-MS method recovery test(*n*=5)

浓度/ ng·mL ⁻¹	相对回收率/%	RSD/%	绝对回收率/%	RSD/%
5.13	96.94±4.00	4.13	94.47±5.04	5.34
102.5	96.27±3.02	3.14	93.87±5.52	5.88
1 025	96.63±3.39	3.51	95.34±2.28	2.39

2.7 稳定性考察

取 2 mL 空白血浆各 3 份, 分别精密加入 410 ng·mL⁻¹ 毛兰素溶液配高, 中, 低浓度 3 份样品。各取 0.2 mL, 按“2.2”项下操作, 并进行 HPLC-MS

分析, 得到分析结果。剩余含药血浆放入-20℃冰箱中, 冷冻保存 3 d 和 5 d, 再分别用 37℃水浴化冻(3 d 样品冻融 1 次, 5 d 样品冻融 2 次), 同法测定。结果显示, 采取-20℃冷藏, 5 d 内样品仍稳定。

2.8 单剂量给药药动学试验

2.8.1 样品的采集与测定 SD 大鼠, ♀ ♂ 各半, 随机分成 3 组, 每组 ♀ ♂ 各半, 实验 25, 50, 100 mg·kg⁻¹ 3 个剂量组, 受试大鼠禁食 12 h 后于次日晨空腹尾静脉注射给药。于给药 0.08, 0.17, 0.25, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h 后各取静脉血 0.5 mL, 血样置肝素抗凝管内, 经 12 000 r·min⁻¹ 离心后分离血浆, 置-20℃保存备用, 每一时间点用 6 只大鼠, 按“2.4”项下方法分别测定各鼠的毛兰素血浆药物浓度。

2.8.2 动力学参数考察

2.8.2.1 单剂量给药大鼠血药浓度 大鼠静脉注射毛兰素注射液 3 个剂量后不同时间血浆中平均血药浓度曲线见图 3。

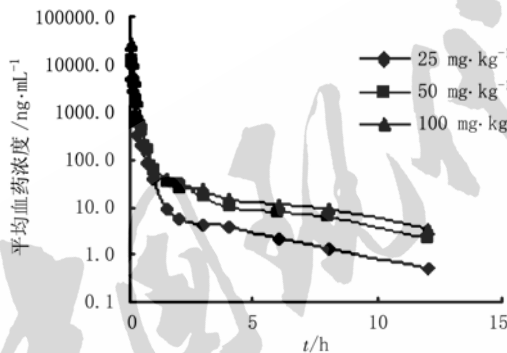


图 3 大鼠静脉注射毛兰素注射液后药-时曲线
Fig 3 Concentration-time curve after i.v. erianin fat emulsion in rats plasma

2.8.2.2 单剂量给药药动学参数 采用中国药理学学会数学药理委员会编制的 3P97 程序将血药浓度

-时间数据进行药动学参数计算。经模型拟合, 根据最小 AIC 准则, 符合二房室开放模型。二室模型与非房室模型(统计矩)计算的药物动力学参数见表 2 和表 3。

表 2 大鼠单剂量静脉注射毛兰素注射液的药动学参数(二房室模型)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of erianin at single dosages i.v. administration in rats

动力学参数	剂量/mg·kg ⁻¹			平均值
	25	50	100	
T _{1/2α} /h	0.15	0.14	0.093	0.13±0.03
T _{1/2β} /h	3.66	3.75	3.89	3.77±0.12
MRT/h	0.18	0.28	0.21	0.22±0.05
K ₂₁ /h ⁻¹	0.21	0.21	0.19	0.20±0.01
K ₁₀ /h ⁻¹	4.19	4.31	7.09	5.20±1.64
CL/L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹	0.049	0.089	0.024	0.054±0.033
Vd/L·kg ⁻¹	11.67	10.37	3.38	8.47±4.46

表 3 大鼠单剂量静脉注射毛兰素注射液的药动学参数(统计矩法)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of erianin at single dosage i.v. administration in rats processed by moment theory method

动力学参数	剂量/mg·kg ⁻¹		
	25	50	100
AUC _(S0) (0-t)/ng·mL ⁻¹ ·h	1 452.95	3 041.64	6 731.57
AUC _(S0) (0-∞)/ng·mL ⁻¹ ·h	1 462.03	3 077.25	6 788.66

2.8.2.3 多剂量给药与单剂量给药大鼠药动学参数比较试验 取健康 SD 大鼠, 随机分 2 组, 分别采取隔天和间隔 3.5 h(半衰期)连续 5 次静脉注射毛兰素注射液 50 mg·kg⁻¹。于设定时间取血, 按“2.2”项下方法进行血样处理和 HPLC-MS 分析, 结果与单剂量给药进行比较。结果发现, 隔天给药在大鼠体内的药动学参数与单剂量给药相似; 而每隔 3.5 h 半衰期连续 5 次给药后其半衰期为 5.43 h, 有所延长, 毛兰素的 AUC_{ss} 为 9 800.8 ng·mL⁻¹·h, 显著高于按临床给药计划隔天给药 5 次后的 AUC 值, 见表 4。

表 4 多剂量给药与单剂量给药大鼠药动学参数比较(统计矩法)

Tab 4 Compare pharmacokinetic parameters of erianin at 50 mg·kg⁻¹ single dosage i.v. administration with multiple dosage in rats (processed by moment theory method)

动力学参数	单次给药	隔天 1 次×5 次	每隔 t _{1/2} 1 次×5 次
C _{max} /ng·mL ⁻¹	11 935.4±8 975.6	12 356.07±3 523.7	21 567.5±8 682.9
T _{1/2α} /h	0.14	0.19±0.06	0.16
T _{1/2β} /h	3.75	2.66±0.43	5.43
MRT/h	0.28	0.35±0.08	1.47
CL/L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹	0.089	0.025±0.006	0.005 1
AUC _(S0) (0-t)/ng·mL ⁻¹ ·h	3 041.6	3 357.5±735.3	9 800.8

3 讨论

本试验建立了用 HPLC-MS 测定大鼠血浆中毛兰素浓度的方法, 在 $1.03 \sim 1\,025 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好; 本试验中毛兰素 3 个浓度的相对回收率和绝对回收率均在 90% 以上; 日内精密度和日间精密度均较高, 显示该方法灵敏, 专一, 准确, 符合生物样品分析要求。

大鼠单剂量静脉注射药-时曲线测定结果表明, 毛兰素注射液在大鼠体内的药动学符合二室模型, 静脉注射分布较快, 25, 50, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个剂量的分布相半衰期分别为 0.15, 0.14, 0.09 h, 消除相半衰期分别为 3.66, 3.75, 3.89 h, $T_{1/2\beta}$ 不随剂量而改变, 表明毛兰素在大鼠体内的消除过程符合一级动力学规律。

大鼠单剂量静脉注射毛兰素注射液 25, 50, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个剂量的 AUC_{0-12} 分别为 1 453.0, 3 041.6, 6 731.6 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$, 与剂量的线性相关系数 $r=0.999\,3$; $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 1 462.0, 3 077.3, 6 788.7 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$, 与剂量的线性相关系数 $r=0.999\,4$, 3 个剂量的清除率 CL 分别为 0.049, 0.089, $0.024 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。结果表明, 毛兰素注射液在大鼠体内的动力学过程有剂量相关性, 符合线性动力学过程。

大鼠单剂量静脉注射毛兰素注射液 25, 50, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个剂量的表观分布容积 V_d 分别为 11.67, 10.37, $3.38 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1}$, 表明毛兰素血浆蛋白

结合率较高。结果提示, 本品与血浆蛋白结合率较高的药品合用可能存在竞争现象。

毛兰素注射液 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量隔天连续 5 次给大鼠静脉注射其主要药动学参数分别为: $C_{\max}$: $(1\,2356.1 \pm 3\,523.7) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $T_{1/2\beta}$: $(2.66 \pm 0.43) \text{ h}$, $\text{AUC}_{(S_0)}(0-t)$: $(3\,357.5 \pm 735.3) \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$, 这与单剂量给药的药动学参数基本相近。而采用每隔 $T_{1/2\beta}$ 给药 1 次, 连续给药 5 次后, 其 $T_{1/2\beta}$ 明显延长, $C_{\max}$ 和 $\text{AUC}_{(S_0)}(0-t)$ 均显著升高。结果提示, 本品在此剂量下采用隔天给药方式仍遵从一级药动学规律消除, 不会导致在大鼠体内蓄积; 采用每隔 $T_{1/2\beta}$ 给药 1 次的方式给药, 本品在大鼠体内的消除则呈非线性动力学过程。

REFERENCES

- [1] CUSHMAN M, NAGARATHNAM D, GOPAL D, et al. Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization [J]. *J Med Chem*, 1991, 34(8): 2579-2588.
- [2] MA G X, XU G J, XU L S. Inhibitory effects of dendrobium chrysotoxum and its constituents on the mouse HePA and ESC [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 1994, 25(3): 188-189.
- [3] GONG Y Q, FAN Y, WU D Z, et al. *In vivo* and *in vitro* evaluation of erianin, a novel anti-angiogenic agent [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(10): 1554-1565.
- [4] GONG Y Q, FAN Y, LIU L, et al. Erianin induces a JNK/SAPK-dependent metabolic inhibition in human umbilical vein endothelial cells [J]. *In Vivo*, 2004, 18(2): 223-228.

收稿日期: 2009-12-28