

# 复方苦参注射液对大鼠体内多西他赛药物代谢动力学的影响

邢亚群<sup>1,2</sup>, 王迪生<sup>1</sup>, 汪庆飞<sup>1</sup>, 孙思雨<sup>1</sup>, 吴小祥<sup>1</sup>, 陈卫东<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的:**建立 HPLC 法测定大鼠血浆药物浓度,探讨不同剂量复方苦参注射液在大鼠体内对多西他赛多次给药后药物代谢动力学的影响。**方法:**将 24 只 SD 大鼠随机分为高、中、低剂量组和对照组,每组 6 只,大鼠尾静脉注射分别给予 2 倍临床等效量(3.6 mL/kg)、临床等效量(1.8 mL/kg)、1/2 倍临床等效量(0.9 mL/kg)的复方苦参注射液和 0.9% 氯化钠注射液,连续给药 7 d,第 7 天给予复方苦参注射液或 0.9% 氯化钠注射液 5 min 后,注射多西他赛 15 mg/kg,按时间点采集血样处理并检测分析,计算药物代谢动力学参数。**结果:**多次给药后高剂量组、中剂量组 AUC、 $C_{max}$  均低于对照组( $P < 0.05$ ),低剂量组与对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论:**复方苦参注射液联合使用多西他赛后血药浓度有所降低,对多西他赛的抑制作用具有剂量依赖性,可为临床用药提供一定参考。

**[关键词]** 复方苦参注射液;多西他赛;药物代谢动力学;大鼠

**[中图分类号]** R 969.1

**[文献标志码]** A

**DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.06.001

## Effect of compound Kushen injection on the pharmacokinetics of docetaxol in rats

XING Ya-qun<sup>1,2</sup>, WANG Di-sheng<sup>1</sup>, WANG Qing-fei<sup>1</sup>, SUN Si-yu<sup>1</sup>, WU Xiao-xiang<sup>1</sup>, CHEN Wei-dong<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233040;

2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei Anhui 230031, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of docetaxol concentration, and investigate the effects of different dosages of compound Kushen injection on the pharmacokinetics of multiple-dose docetaxol in rats. **Methods:** Twenty-four SD rats were randomly divided into the high-dose, medium-dose, low-dose and control groups (6 rats each group). The high-dose, medium-dose, low-dose and control groups were injected with 2 times clinical equivalent compound Kushen injection (3.6 mL/kg), clinical equivalent compound Kushen injection (1.8 mL/kg), 1/2 clinical equivalent compound Kushen injection (0.9 mL/kg) and 0.9% normal saline solution by caudal vein for 7 days, respectively, and all rats were injected with 15 mg/kg of docetaxol after 5 min of administration on the seventh day. The blood samples in four groups at different time-points were analyzed, and the pharmacokinetic parameters were calculated. **Results:** After multiple-dose, the AUC and  $C_{max}$  in high-dose and medium-dose groups were lower than those in control group ( $P < 0.05$ ), and the difference of which between low-dose group and control group was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusions:** The compound Kushen injection can reduce the blood concentration of docetaxol, there is a dose-dependent relationship between compound Kushen injection and docetaxol, which can provide a reference in clinical medication.

**[Key words]** compound Kushen injection; docetaxol; pharmacokinetics; rats

肿瘤治疗中的多药耐药问题已经成为目前化疗失败的关键原因之一,其形成机制复杂,产生耐药的 因素主要是药物外排蛋白 P-糖蛋白和肺耐药蛋白 等相关因子的表达水平<sup>[1]</sup>。近年来,临床上多在采用 细胞毒性药物化疗的同时,联用中药注射剂,以起到 减毒增效的作用<sup>[2]</sup>。中药苦参 (Sophorae Flavescentis Radix),又名苦骨、地槐等,是豆科植物

苦参 *Sophorae flavescens* Ait. 的干燥根,含有多种生 物碱和黄酮类化合物,其中主要活性成分苦参碱、氧 化苦参碱、脱氧苦参碱等具有诱导肿瘤细胞凋亡、调 节机体免疫功能、抑制肿瘤细胞转移和抑制升白细 胞的功能<sup>[3]</sup>。有学者<sup>[2,4]</sup>研究发现,复方苦参注射 液配合细胞毒性药物化疗有减毒并增效的作用,可 以改善恶性肿瘤放化疗产生的不良反应,对病人的 免疫功能有较好的保护作用。但是复方苦参注射液 本身所含成分复杂、药物代谢动力学(药动学)参数 研究缺乏,研究和明确中西药相互作用仍然是临床 中西药联合应用中较大的问题和困难<sup>[5]</sup>。本实验 旨在通过不同剂量复方苦参注射液与多西他赛注射 液联合用药,初步探讨两药联用后大鼠体内血药浓 度等药动学参数的变化,以期为临床治疗及合理用

[收稿日期] 2017-01-06 [修回日期] 2017-10-17

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81473387)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第二附属医院 药剂科,安徽 蚌埠 233040; 2. 安徽中医药大学 药学院,安徽 合肥 230031

[作者简介] 邢亚群 (1972-),女,硕士,副主任药师。

[通信作者] 陈卫东,博士生导师,教授。E-mail: anzhongdong@126.com

药提供参考。现作报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 LC-15C 高效液相色谱仪(日本岛津公司);SPD-15C 型紫外检测器(日本岛津公司);AB135-S 型十万分之一电子天平(METTLER TOLEDO 公司);XW-80A 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司);KQ-300B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TG16-WS 台式高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.1.2 药品与试剂 多西他赛标准品(中国食品药品检定研究院,纯度 99.3%,批号:100666-200401);多西他赛注射液(齐鲁制药有限公司,批号:5030021TB);紫杉醇标准品(中国食品药品检定研究院,纯度 99.6%,批号:100382-201102);复方苦参注射液(山西振东制药股份有限公司,批号:20151131);甲醇(上海星可高纯溶剂有限公司);乙腈(OCEANPAK);超纯水(Milli-Q 超纯水机制备,18.2  $\Omega$ )。

1.1.3 动物 SPF 级 SD 大鼠 24 只,体质量(200  $\pm$  20) g,雌雄各半,由安徽医科大学实验动物中心提供。

### 1.2 方 法

1.2.1 血浆样品的处理 精密吸取血浆 100  $\mu$ L,加入紫杉醇内标溶液(5  $\mu$ g/mL)11  $\mu$ L,加入甲醇 300  $\mu$ L,涡旋混匀 3 min,12 000 r/min 离心 10 min,取全部上清液,置于 1.5 mL 的 EP 管中,氮吹,加入 100  $\mu$ L 甲醇复溶,涡旋混匀,取上清液 20  $\mu$ L 进行分析。

1.2.2 HPLC 测定大鼠血浆中多西他赛含量的方法学考察

1.2.2.1 色谱条件 对不同比例乙腈-水、不同流速及不同柱温等条件进行优化选择,确定色谱条件为色谱柱: COSMOSIL C<sub>18</sub> (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m);流动相:乙腈-0.1% 磷酸水溶液(50: 50, V/V);流速:1.0 mL/min;紫外检测波长:230 nm;进样量:20  $\mu$ L;柱温:30  $^{\circ}$ C。

1.2.2.2 方法专属性考察 取大鼠空白血浆 3 份各 100  $\mu$ L,依次加入流动相和多西他赛、紫杉醇内标溶液各 20  $\mu$ L 混匀,加入甲醇 300  $\mu$ L,按“1.2.1”项下血浆处理方法,制得空白血浆、多西他赛标准品及内标标准品溶液,取上清液 20  $\mu$ L 进行分析。

1.2.2.3 标准曲线与线性范围 多西他赛标准对

照溶液的配制:精密称取多西他赛标准品 0.1 mg 置于 5 mL 棕色容量瓶中,甲醇定容即得 20  $\mu$ g/mL 多西他赛对照品储备液,4  $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。精密吸取储备液适量,按照“1.2.1”项下血浆样品处理方法,用 0.9% 氯化钠注射液稀释成浓度 0.15、0.30、0.60、1.20、2.40、4.80、7.50、9.60  $\mu$ g/mL 系列对照品溶液,用 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后按照“1.2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图和峰面积。

1.2.2.4 精密度和回收率考察 精密量取多西他赛对照液,配制成最低定量限(LLOQ)、低、中、高 4 个浓度(0.15、0.30、1.20 和 7.50  $\mu$ g/mL)的质控样品,每个浓度平行配制 5 份样品,计算日内精密度;每个浓度连续测定 3 d,计算日间精密度(每天均重新配制样品),按照“1.2.2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图和峰面积,计算日内和日间的 RSD。精密量取多西他赛标准溶液,分别加入大鼠空白血浆 100  $\mu$ L 和内标紫杉醇 11  $\mu$ L,配制成 LLOQ、低、中、高 4 种质量浓度的生物样本(0.15、0.30、1.20 和 7.50  $\mu$ g/mL),每个质量浓度均平行配制 5 个样本,按“1.2.1”项下血浆样品处理方法进行样品处理,“1.2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录多西他赛和内标紫杉醇色谱图和峰面积,计算 RSD。将进样分析得到的多西他赛峰面积和内标紫杉醇的峰面积比值,代入标准方程中计算浓度,用测得浓度与标示浓度之比计算相对回收率(%)。

1.2.2.5 反复冻融稳定性考察 精密量取一定量多西他赛标准溶液,制备低、中、高 3 个浓度的质控样品,置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱冻存,先后 2 次将血浆样品取出,自然温度下解冻后按照“1.2.1”项下方法处理样品,进样分析,记录色谱图和峰面积,考察多西他赛反复冻融的稳定性。

1.2.3 药代动力学研究 SD 大鼠 24 只随机分为高、中、低剂量组和对照组,每组 6 只。给药前禁食 12 h,自由饮水,采取尾静脉注射给药方法<sup>[6]</sup>。高、中、低剂量组和对照组大鼠尾静脉注射分别给予 2 倍临床等效量(3.6 mL/kg)、临床等效量(1.8 mL/kg)、1/2 倍临床等效量(0.9 mL/kg)的复方苦参注射液和 0.9% 氯化钠注射液,连续给药 7 d,第 7 天给予复方苦参注射液或 0.9% 氯化钠注射液 5 min 后,注射多西他赛 15 mg/kg。根据预实验结果设定,分别在给药后 3、5、10、15、30、60、120、240、480 min 眼眶取血 0.3 mL,置于肝素化的离心管中,4 000 r/min 离心 20 min。按“1.2.2.1”项下色谱条件和“1.2.1”项下血浆样品处理方法行 HPLC 分

析,记录峰面积。

1.3 统计学方法 采用方差分析和  $q$  检验。

## 2 结果

2.1 HPLC 测定大鼠血浆中多西他赛含量的方法学考察

2.1.1 方法专属性 多西他赛和内标紫杉醇的保留时间分别为 12.67 min 和 14.66 min,峰型较好,且空白血浆中的内源性杂质在此条件下对多西他赛和内标紫杉醇均无干扰。供试品中多西他赛和内标紫杉醇与多西他赛对照品和内标紫杉醇的保留时间相同,说明此条件的特异性较强,即该方法专属性好(见图 1)。

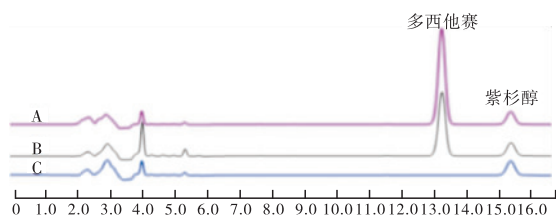


图1 方法专属性考察

2.1.2 标准曲线与线性范围 以多西他赛浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,线性回归得到标准曲线方程为  $Y = 0.90298X + 0.31671$  ( $r = 0.9983, n = 8$ )。表明多西他赛在血浆中  $0.15 \sim 9.60 \mu\text{g/mL}$  范围内线性关系良好,平行配制 5 份浓度为定量下限样品,进样分析,定量下限为  $0.15 \mu\text{g/mL}$ ,符合定量分析要求 ( $\leq 20\%$ )。

2.1.3 精密度和回收率 LLOQ 的日内和日间精密度的  $RSD < 20\%$ ,低、中、高 3 种质量浓度的日内和日间精密度的  $RSD < 15\%$ (见表 1)。回收率结果表明多西他赛在 LLOQ 和低、中、高 3 个浓度质控样本的相对回收率均在  $85\% \sim 115\%$  之间,每个浓度的  $RSD$  均  $< 15\%$ ,符合生物样品分析要求。

表 1 日内、日间精密度和回收率试验结果 ( $n = 5$ )

标示浓度/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	日内 $RSD/\%$	日间 $RSD/\%$	回收率	
			相对回收率/ $\%$	$RSD/\%$
0.15	12.97	2.65	95.88	3.03
0.30	5.77	5.35	97.07	13.66
1.20	9.41	1.76	97.03	2.04
7.50	9.20	3.86	101.86	1.91

2.1.4 反复冻融稳定性 结果显示,  $RSD$  分别为 2.56%、1.25% 和 1.25%, 试验分析测量时的冻融不会对样品的分析造成影响,符合生物样品的质控

要求。2.2 药代动力学分析 根据所得的血药浓度数据结果,绘制各组血药浓度-时间曲线图,从药时曲线的结果可知,联合使用复方苦参注射液的各组大鼠体内多西他赛浓度均小于对照组(见图 2)。高、中剂量组多次给药的  $C_{\text{max}}$  和 AUC 均低于对照组 ( $P < 0.05$ ),低剂量组与对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )(见表 2)。

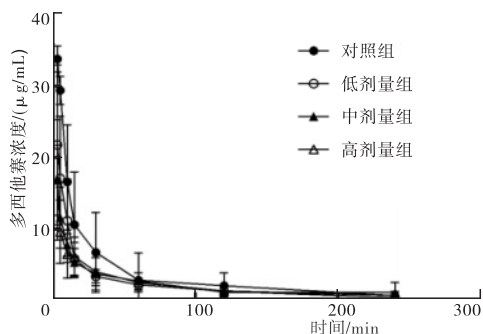


图2 血药浓度-时间曲线

## 3 讨论

多西他赛可使细胞周期停滞于  $G_2/M$  期,抑制细胞的有丝分裂,抑制纺锤体和纺锤丝的形成,阻止肿瘤细胞的增殖从而破坏肿瘤细胞的有丝分裂达到抗肿瘤的效果<sup>[7-8]</sup>。临床应用证实,复方苦参注射液与多西他赛注射液联用,具有减轻骨髓抑制,降低恶心、呕吐等消化道反应,保护肝脏功能和消除癌痛等功效,并在降低不良反应,增强疗效,提高肿瘤病人化疗依从性、改善化疗预后和生活质量等方面均取得了肯定效果<sup>[9-10]</sup>。由于多西他赛是紫杉醇类抗肿瘤药物,其基本结构与理化性质均与紫杉醇类似,故本实验选择以紫杉醇作为多西他赛浓度测定的内标<sup>[11]</sup>。本实验选用经济便宜的甲醇蛋白沉淀法对血浆生物样品进行前处理,但由于其在血浆中浓度低,故用甲醇蛋白沉淀后,取上清氮吹( $40^\circ\text{C}$ )挥干溶剂、复溶,进样分析。建立的 HPLC 生物样品定量分析方法具有专属性强和灵敏度高的特点,方法学结果显示,该方法稳定可靠,样品回收率高,可用于大鼠血浆中药代动力学研究。

参考相关文献<sup>[12]</sup>优化流动相的配制。多西他赛在  $220 \sim 240 \text{ nm}$  波长段有最大紫外吸收,结合本实验的探索,最终确定检测波长为  $230 \text{ nm}$ 。刘芳等<sup>[13]</sup>选用的流动相是甲醇-水,但在本实验中发现多西他赛与内标紫杉醇在该流动相下不能完全分离。后尝试林巧平等<sup>[14]</sup>研究方法,选用乙腈-水做流动相,调整到合适比例后,虽然两者能完全分离,

表2 大鼠体内多西他赛的统计距参数( $\bar{x} \pm s; n_i = 6$ )

参数	高剂量组	中剂量组	低剂量组	对照组	F	P	MS <sub>组内</sub>
AUC <sub>0-4</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	571.35 ± 207.92 *	586.29 ± 251.07 *	587.35 ± 196.89	1 095.05 ± 558.83	3.46	<0.05	114 330.878
AUC <sub>0-∞</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	666.08 ± 267.63 *	633.39 ± 693.48 *	828.64 ± 215.71	1 164.64 ± 635.95	3.41	<0.05	250 875.884
MRT <sub>0-∞</sub> /min	127.38 ± 84.13	129.2 ± 109.97	78.74 ± 35.87	57.31 ± 27.56	1.46	>0.05	5 304.367
t <sub>1/2</sub> /min	109.12 ± 97.74	93.81 ± 62.55	70.17 ± 38.10	53.52 ± 24.89	0.94	>0.05	3 884.183
CL/(L·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-1</sup> )	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.022 ± 0.01	1.86	>0.05	0.000
C <sub>max</sub> /(mg/L)	16.90 ± 10.18 *	16.83 ± 4.91 *	21.83 ± 13.03	34.21 ± 1.84	5.35	<0.01	75.227

q 检验:与对照组比较 \* P < 0.05

但是峰型拖尾严重,故选择在水相中加入 0.1% 磷酸,结果两者能完全分离且峰型较好,拖尾因子满足要求。

由于中成药的广泛使用,大家越来越关注中药与西药之间相互作用的影响<sup>[15]</sup>。本研究通过尾静脉给药方式,设立多次给药方法,分别考察了高、中、低剂量组的复方苦参注射液对多西他赛注射液影响,将所得的血药浓度进行比较,对复方苦参注射液与多西他赛注射液联合用药时复方苦参注射液对多西他赛的药代动力学影响进行了初步的研究。药时曲线图显示,各剂量组各点的血药浓度较对照组均有所降低,AUC 依次为高剂量组 < 中剂量组 < 低剂量组 < 对照组,C<sub>max</sub> 同样是高剂量组 < 中剂量组 < 低剂量组 < 对照组,AUC、C<sub>max</sub> 均降低了 50% 左右;多次给药后高、中剂量组的 C<sub>max</sub> 和 AUC 均明显小于对照组,而低剂量组与对照组差异无统计学意义。表明复方苦参注射液能够降低多西他赛注射液在血浆中的浓度,这与文献<sup>[16-17]</sup>报道的中药注射液联合化疗药物会产生剂量依赖性的特点一致。

综上,本实验建立的测定大鼠血浆中多西他赛浓度的 HPLC 法具有简单快捷、特异性强的特点,可用于大鼠血浆中多西他赛含量的测定。而复方苦参注射液联合使用多西他赛后血药浓度有所降低,对多西他赛的抑制作用具有剂量依赖性,该药动力学参数评价结果可为临床用药提供一定参考依据。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 朱宝英,黄静,王永林,等. P-糖蛋白及肿瘤多药耐药的逆转[J]. 中国药房,2011,22(6):550.
- [2] 黄思夏,范文斌,刘鹏,等. 复方苦参注射液联合铂类化疗药物治疗中晚期胃癌的 Meta 分析[J]. 中国中药杂志,2011,36(22):3198.
- [3] 鲍娇琳,陆金健,陈修平,等. 苦参碱与氧化苦参碱抗肿瘤作用及其机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(3):369.
- [4] XIAO Y, HONGBO LI, JIANG Z, et al. The effect of matrine on bone marrow and cell apoptosis of patients radiated by <sup>192</sup>Ir[J]. Medicinal Plant,2013,4(4):32.

- [5] ROUHI-BOROUJENI H, ROUHI-BOROUJENI H, HEIDARIAN E, et al. Herbs with anti-lipid effects and their interactions with statins as a chemical anti-hyperlipidemia group drugs: A systematic review[J]. ARYA Atheroscler,2015,11(4):244.
- [6] 王茂林,宣玲,唐碧,等. 环孢素 A 对心房颤动大鼠心房有效不应期及血清中 MMP-2、TIMP-2 水平的影响[J]. 蚌埠医学院学报,2014,39(2):141.
- [7] MOHAMMADIAN J, SABZICHI M, MOLAVI O, et al. Combined treatment with static and docetaxel alters the Bax/Bcl-2 gene expression ratio in human prostate cancer cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2016,17(11):5031.
- [8] PAGLIARO LC, ZURITA AJ, ARAUJO JC, et al. Presurgical docetaxel (Doc) and androgen deprivation therapy (ADT) in lymph node-positive prostate cancer (PCa)[J]. J Clin Oncol,2011,29(15 suppl):4619.
- [9] 方红明,蒋国军,万宇,等. 复方苦参注射液联合多西他赛每周方案治疗老年晚期非小细胞肺癌 33 例临床观察[J]. 中医杂志,2012,53(9):764.
- [10] 贾海清,王晓斌. 复方苦参注射液联合多西他赛和奈达铂治疗中晚期宫颈癌的临床研究[J]. 现代药物与临床,2016,31(3):363.
- [11] 谢玲玲,罗卓雅,洪建文,等. HPLC 法测定注射用多西他赛纳米粒中溶血磷脂酰胆碱含量[J]. 药物分析杂志,2014,34(5):874.
- [12] 王栋海,杨光刚,邹伟伟,等. 注射用多西他赛脂质体的制备及其体内外评价[J]. 中国新药杂志,2011,20(1):24.
- [13] 刘芳,王淑君. 多西他赛纳米乳注射液的制备与药代动力学研究[J]. 亚太传统医药,2013,9(3):38.
- [14] 林巧平,郭仁平,王青松,等. 注射用多西他赛脂质体的制备、体外释放及细胞毒作用[J]. 中国药科大学学报,2008,39(5):417.
- [15] LIU D, LIANG XC. New developments in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of combination of Chinese medicine and Western medicine[J]. Chin J Integr Med,2017,23(4):312.
- [16] 林高通,徐涛,罗俊,等. 复方苦参注射液在大鼠体内对伊马替尼药动力学的影响[J]. 中国现代应用药学,2016,33(12):1547.
- [17] SHI G, ZHANG L. Effects on type 2 diabetes complicated with pulmonary tuberculosis: regiment of insulin, isoniazid, rifampicin, pyrazinamide and ethambutol versus the regiment plus Qi-boosting and Yin-nourishing decoction of Traditional Chinese Medicine [J]. J Tradit Chin Med,2015,35(3):260.

( 本文编辑 卢玉清 )