

· 基础研究 ·

清热养心颗粒对大鼠灌服环孢素药动学影响[△]

吴磊, 戴国梁, 王琼, 陆超*

(南京中医药大学附属医院, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究清热养心颗粒(QG)对环孢素(cyclosporine A, CsA)的药代动力学的影响。方法: 超高效液相串联质谱测定大鼠全血中 CsA 浓度, 实验动物分为对照组和实验组, 对照组单独灌胃给予 CsA, 实验组灌胃给予清热养心颗粒及 CsA。DAS 3.0 药动学软件计算药动学参数。结果: CsA 单独给药、CsA-清热养心颗粒联合给药, CsA 在体内代谢动力学模型均为一室开放模型, 联合给药后, CsA 的 $t_{1/2}$ 显著延长, AUC 显著增大。结论: 清热养心颗粒可减慢 CsA 在体内的代谢过程。

[关键词] 清热养心颗粒; 环孢素; 大鼠; 药代动力学; 超高效液相串联质谱

Effect of Qingreyangxin Granule on Pharmacokinetics of Intragastrically Administered Cyclosporine A in Rats

WU Lei, DAI Guoliang, WANG Qiong, LU Chao*

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pharmacokinetic effect of Qingreyangxin granule (QG) on cyclosporine A (CsA) in rats. **Methods:** Concentration of cyclosporine A in rat whole blood was detected by UHPLC-MS/MS after rats were oral administration of QG or QG combined with CsA. Pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 3.0 pharmacokinetic software. **Results:** *In vivo* pharmacokinetic models of CsA were one-compartment open models in both of the QG group and the QG combined with CsA group. After compatibility, CsA showed a significant longer in $t_{1/2}$, with significant increase in AUC. **Conclusion:** QG can reduce metabolic process of CsA *in vivo*.

[Keywords] Qingreyangxin granule; cyclosporine A; rat; pharmacokinetics; UHPLC-MS/MS

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.6.012

环孢素(cyclosporine A, CsA)是一种临床常用的免疫抑制剂,适用于预防同种异体肾、肝、心、骨髓等器官或组织移植所发生的排斥反应。CsA的最小有效剂量到中毒剂量之间的剂量差值越窄,药物安全性越差。药物浓度过高会引起肾毒性、高血压等不良反应,但是不完全和不规则的口服吸收又会引起毒性的增加或免疫治疗失败^[1-2]。大多数药物和食物会通过调控 P-gp 或 CYP3A 等方面来影响 CsA 的治疗全过程,一些钙离子通道拮抗剂抑制 P-gp 和 CYP3A 从而使病人口服 CsA 后体内血药浓度的血药浓度-时间曲线下面积和峰浓度有了显著的提高^[3-5]。

清热养心颗粒(QG)的处方是由金银花、甘草、山豆根等多味药组成,是江苏省中医院专家总结了传统中医学家治疗病毒性心肌炎的经验方药后,临床多年尝试研制而成,具有清热解毒、养心安神功

能。金银花自古被中医誉为清热解毒的良药,其酚酸类成分具有显著的抗炎、抗氧化、抗凝血等作用^[6-7]。甘草性温,其活性成分甘草次酸有着一定的抗炎、抗病毒的功效^[8]。百合主治劳嗽、咳血、虚烦惊悸等症,活性成分薯蓣皂苷元有效提高氧自由基清除能力,对血管内皮细胞功能进行改善^[9]。苦参味苦,性寒,具有清热燥湿、祛风解毒的作用,其活性成分氧化苦参碱临床使用广泛,对心肌缺血和梗死有保护作用^[10-11]。临床上,病毒性心肌炎患者在服用清热养心颗粒时常会与环孢素同用,发现疗效显著。

本实验对大鼠进行研究,临床使用中等效治疗量作为参照,对单剂量给予清热养心颗粒后大鼠体内 CsA 药动学参数的变化情况进行考察,以及清热养心颗粒在口服 CsA 的体内药动学过程是否产生影

[△] [基金项目] 江苏省中医药管理局项目(JD201512);江苏省药学会-奥赛康医院药学基金(A201607)

* [通信作者] 陆超, 硕士, 主管中药师, 研究方向: 中药临床药代动力学; E-mail: sinkly228@126.com

响进行研究,进一步判断清热养心颗粒是否为影响 CsA 的血药浓度的主要因素,为临床使用研究提供更多的理论依据。

1 材料

1.1 试药

清热养心颗粒(江苏省中医院制剂,10 g/袋,批号:20160501);环孢素软胶囊(华北制药股份有限公司,25 mg/粒,批号:160110);对照品 CsA(浙江瑞邦药业有限公司,批号:10-140317,含量:99.3%);环孢素 D(上海同田生物技术股份有限公司,含量为95%,批号:13060821)。水为超纯水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

Agilent G6430UHPLC-MS/MS 液质联用仪(美国 Agilent 公司,所配超高效液相仪为 Agilent 1290);MassHunter 数据处理系统(version B.05.00);WH-2 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);AE240 电子天平(上海梅特勒-托利多有限公司);Millipore Driect-Q5 纯水机(法国 Millipore 公司);Labconco 离心浓缩仪(美国 Labconco 公司);Biofuge PrimoR 冷冻高速离心机(德国 Heraeus 公司)。

1.3 动物

SD 大鼠 16 只,雌雄各半,体重约 250~270 g,由南通大学比较医学中心提供,合格证号:SCXK(苏)2014-0001。

2 方法

2.1 色谱及质谱检测条件

Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.0 mm, 3 μm);流动相:甲醇-2 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液(75:25);流速:400 μL·min⁻¹;柱温:60℃。离子源:ESI;离子化模式:正离子;定量模式:多反应监测模式(MRM);毛细管电压:4000 V;干燥气温度:400℃;CsA 的 Fragmentor 及 CE 值分别为 100、15 V;内标环孢素 D 的 Fragmentor 及 CE 值分别为 110、10 V;检测对象:CsA m/z 220.2→ m/z 202.9;环孢素 D m/z 234.3→ m/z 216.9。

2.2 对照品溶液的配制

取对照品 CsA 适量,精密称定,甲醇作为溶剂,将其稀释成 0.05、0.25、0.5、2.5、5、10、50 μg·mL⁻¹ 的系列对照品溶液。放冰箱保存

(4℃),备用。

2.3 内标物溶液的配制

取对照品环孢素 D 适量,精密称定,甲醇作为溶剂,将其稀释成 1.1 μg·mL⁻¹ 的内标物溶液,放冰箱保存(4℃),备用。

2.4 全血样品处理

取全血 100 μL,精密吸取,加入氟化钠 10 mg,内标溶液 10 μL(1.1 μg·mL⁻¹),涡旋 30 s,加入乙醚 1 mL,涡旋 3 min,混合,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后吸取上清液乙醚层,40℃ 氮气吹干,加入 100 μL 75% 的甲醇水溶液进行复溶,涡旋振荡 2 min 后,冷冻高速离心机(12 000 r·min⁻¹)离心 10 min,吸取上清液,5 μL 分析进样。

2.5 药代动力学研究

大鼠 16 只(雌雄各半),每组随机分得 8 只,并标记为实验组与对照组,在大鼠给药之前 12 h 禁食不禁水。实验组同时灌胃给予 QG(100 mg·kg⁻¹)、与 CsA(10 mg·kg⁻¹);对照组只灌胃给予 CsA(10 mg·kg⁻¹)。2 组大鼠分别于给药前及给药后 0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、24、32、48 h 从眼底静脉丛采血约 0.2 mL。将全血样品于 4℃ 保存。

2.6 数据处理

根据测得的血药浓度-时间,采用 DAS 3.0 处理与拟合,获得药动学参数。采用 SPSS 15.0 软件对实验组和对照组的药动学参数进行配对 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

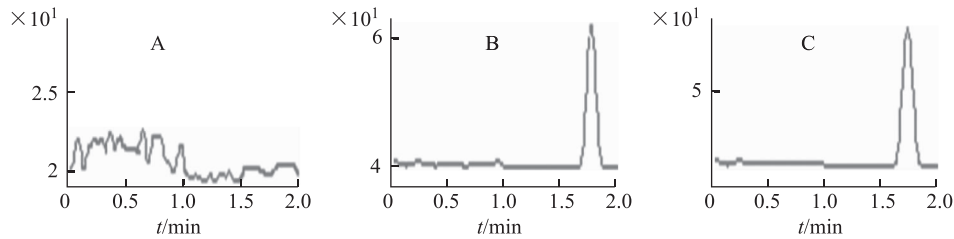
3 结果

3.1 专属性实验

在色谱检测下,CsA 和环孢素 D 的保留时间约为 1.85 min 和 1.71 min(见图 1、2)。CsA 和内标物环孢素 D 互不干扰,峰形较好,无杂峰干扰,基线平稳。

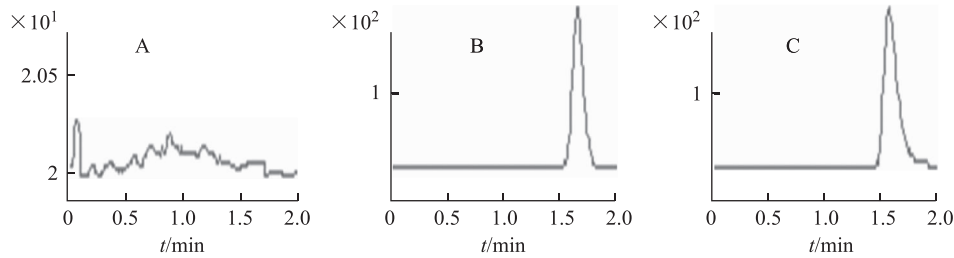
3.2 标准曲线制备

取空白全血 100 μL,加入 CsA 系列标准溶液各 10 μL,配制成相当于 CsA 全血质量浓度分别为 0.005、0.025、0.05、0.25、0.5、1、5 μg·mL⁻¹ 的全血样品。取 5 μL 分析,以峰面积与内标峰面积的比值 *Y* 对全血质量浓度 *X* 进行线性回归运算,求得 CsA 的回归方程: $Y = 0.456 2X - 0.346 1$ ($r = 0.994 9$),定量下限是 5 ng·mL⁻¹。



注: A. 空白全血样品; B. 空白全血加入 CsA ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)及环孢素 D($1.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C. 大鼠同时口服 QG 及 CsA 6 h 后全血样品; 下同。

图1 CsA 的 UHPLC-MS/MS 离子流图



注: A. 空白全血样品; B. 空白全血加入 CsA ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)及环孢素 D($1.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C. 大鼠同时口服 QG 及 CsA 6 h 后全血样品。

图2 环孢素 D(内标)的 UHPLC-MS/MS 离子流图

3.3 准确度和精密度

精密吸取空白全血 $100 \mu\text{L}$, 制备 CsA 3 个不同浓度(CsA 全血质量浓度为 0.01 、 0.5 、 $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的质控样品, 每个浓度平行 5 份, 连续 3 d。根据随性标准曲线求得实测浓度。通过实测浓度计算出精密度和准确度。结果显示: CsA 日内、日间准确度分别为 $96.2\% \sim 105.6\%$ ($\text{RSD} \leq 7.1\%$, $n = 5$) 和 $94.2\% \sim 107.3\%$ ($\text{RSD} \leq 7.9\%$, $n = 15$), 结果经鉴定符合分析要求。

3.4 提取回收率

取空白全血 $100 \mu\text{L}$, 配制 3.3 项下低、中、高 3 个不同质量浓度含药全血质控样品, 按 2.4 项下方法处理后分析, 以全血中 CsA 的峰面积与相应质量浓度对照品溶液中 CsA 峰面积的比值计算出上述 3 种质量浓度的提取回收率, 每个浓度平行做 5 份。经 UHPLC-MS/MS 测定后, 由低到高 3 个质量浓度下 CsA 的提取回收率分别为: ($71.4\% \pm 2.4\%$)、($72.3\% \pm 3.1\%$) 和 ($71.7\% \pm 2.7\%$)。同时得到内标的提取回收率为 ($69.6\% \pm 2.8\%$)。

3.5 稳定性考察

取空白全血 $100 \mu\text{L}$, 配制 3.3 项下 3 个质量浓度含药全血质控样品, 按上述样品的处理方法处理。分析物置溶液中 24 h(室温)、将含药的全血样品置

冰箱($-20 \text{ }^\circ\text{C}$)冻融 3 次、置冰箱($-40 \text{ }^\circ\text{C}$)长期冷冻 28 d, 对稳定性进行稳定性考察, 样品平行 3 份。结果显示, 24 h 后(室温)环孢素质量浓度的 RSD 均小于 8.3% , 冰箱($-40 \text{ }^\circ\text{C}$)保存 28 d 质量浓度的 RSD 均小于 9.6% , 环孢素经 3 个冻融期的质量浓度 RSD 均小于 7.8% 。

3.6 基质效应考察

取 1.5 mL EP 管若干, 分别精密吸取质量浓度为 0.1 、 5 、 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 CsA 对照品溶液各 $10 \mu\text{L}$, 同时加入 $10 \mu\text{L}$ 环孢素 D 溶液(内标), 再加入纯水补足至 $100 \mu\text{L}$, 涡旋震荡 30 s, 取 $5 \mu\text{L}$ 溶液进 UHPLC-MS/MS, 测定分析物及内标峰面积并定义为 A1。除不加环孢素 D 溶液(内标)外, 另按 2.4 项下方法制备空白全血样品若干, 氮气吹干后同上处理, 测定分析物及内标峰面积并定义为 A2。基质效应 ME(%) 等于两者之间的比值 ($A2/A1 \times 100\%$)。3 个不同浓度的 CsA 在全血样品中的基质效应分别为 88.6% 、 92.3% 、 91.7% ($n = 3$), 环孢素 D(内标)基质效应为 93.2% ($n = 9$)。

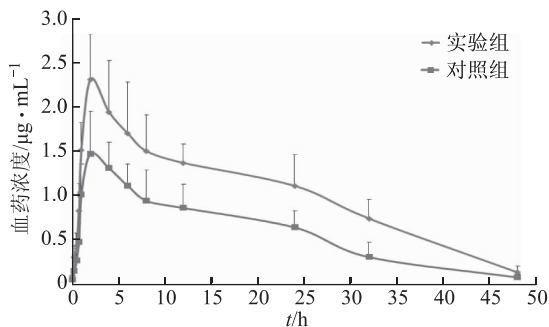
3.7 大鼠体内药代动力学

单独给大鼠灌胃环孢素($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、环孢素和清热养心颗粒共同灌胃($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的浓度-时间曲线见图 3。采 DAS 3.0 分析处理, 药动学参数

见表1。结果环孢素和清热养心颗粒共同灌胃前后,环孢素为一室开放模型。和清热养心颗粒共同灌胃后,环孢素的 $t_{1/2\beta}$ 延长; $AUC_{(0-t)}$ 增大; V/F 减小。

表1 对照组和实验组中大鼠体内环孢素的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

参数	组别	
	对照组	实验组
$t_{1/2}/h$	8.22 ± 1.12	13.567 ± 1.48 *
T_{max}/h	2.57 ± 0.89	3.42 ± 1.01
$AUC_{0-48h}/\mu g \cdot mL^{-1} \cdot h$	17.96 ± 2.53	32.26 ± 3.14 *
$AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot mL^{-1} \cdot h$	18.65 ± 3.02	34.55 ± 2.86 *
$C_{max}/\mu g \cdot mL^{-1}$	1.51 ± 0.53	2.25 ± 0.46
$V/F/L \cdot kg^{-1}$	2.25 ± 0.81	1.13 ± 0.39



注: * $P < 0.05$ 。

图3 对照组和实验组中大鼠体内环孢素的平均血药浓度-时间曲线

4 讨论

目前,一般采用荧光偏振免疫分析法检测全血中CsA的浓度,但成本较高。本实验改用UHPLC-MS/MS法测定全血样品浓度,经过方法学确证后,符合生物样品分析方法的要求,并且该方法灵敏度高、分析时间短,可用于临床上大批样品的连续测定。

相关中药与CsA药物相互作用的研究已有报道,研究表明,人体同时服用盐酸小檗碱与CsA时,可促进CsA的吸收,从而提高CsA的生物利用度^[12-13]。清热养心颗粒中黄连是全方的君药,而盐酸小檗碱是黄连主要活性成分,由此推测清热养心颗粒中的盐酸小檗碱促进了CsA的体内吸收,但确切的作用机制则有待进一步研究。

由于CsA治疗窗窄,毒性较大,体内CsA浓度的升高可能会引起严重不良反应。因此,临床上同时使用清热养心颗粒与CsA时,应密切监测CsA在

血液中的浓度及人体相关生化指标,避免不良反应的发生。

参考文献

- [1] Ernst E. St John's Wort supplements endanger the success of organ transplantation[J]. Arch Surg, 2002, 137(3): 316-319.
- [2] Hou Y C, Hsiu S L, Tsao C W, et al. Acute intoxication of cyclosporin caused by coadministration of decoctions of the fruits of Citrus aurantium and the Pericarps of Citrus grandis[J]. Planta Med, 2000, 66(7): 653-655.
- [3] Madsen J K, Jensen J D, Jensen L W, et al. Pharmacokinetic interaction between cyclosporine and the dihydropyridine calcium antagonist felodipine[J]. Eur J Clin Pharmacol, 1996, 50(3): 203-208.
- [4] Dahan A, Altman H. Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability--mechanism, extent and relevance[J]. Eur J Clin Nutr, 2004, 58(1): 1-9.
- [5] Dresser G K, Bailey D G. The effects of fruit juices on drug disposition: a new model for drug interactions[J]. Eur J Clin Invest, 2003, 33(2): 10-16.
- [6] Park W H, Kim S H, Kim C H. A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of Euonymus alatus; isolation and structure determination[J]. Toxicology, 2005, 207(3): 383-390.
- [7] 张鞍灵, 马琼, 高锦明, 等. 绿原酸及其类似物与生物活性[J]. 中草药, 2001, 32(2): 173-176.
- [8] 张世玲. 中草药药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 217.
- [9] 宁可永, 李贻奎, 高会丽, 等. 薯蓣皂苷元对大鼠急性心肌缺血的治疗作用[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(1): 1-3.
- [10] Lu L G, Zeng M D, Mao Y M, et al. Inhibitory effect of Oxymatrine on serum hepatitis B virus DNA in HBV transgenic mice[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(8): 1176-1179.
- [11] Campana C, Regazzi M B, Buggia I, et al. Clinically significant drug interactions with cyclosporin. An update[J]. Clin Pharmacokinet. 1996, 30(2): 141-179.
- [12] 李馨, 吴笑春, 辛华雯, 等. 盐酸小檗碱对肾移植受者环孢素A血浓度的影响[J]. 中华器官移植杂志, 2001, 22(4): 209-211.
- [13] 吴笑春, 李馨, 辛华雯, 等. 合用盐酸小檗碱对环孢素A人体药动学的影响[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(5): 432-435.

(收稿日期 2016-10-18)