

五酯软胶囊对西罗莫司在大鼠体内药动学的影响

徐文^{1*}, 刘涛¹, 付晓悦², 曹志红¹, 马敏¹, 隋忠国^{1#} (1. 青岛大学附属医院药学部, 山东青岛 266003; 2. 青岛大学附属医院器官移植中心, 山东青岛 266003)

中图分类号 R969.1; R969.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)10-1360-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.10.19

摘要 目的: 考察五酯软胶囊对西罗莫司在大鼠体内药动学的影响。方法: 取Wistar大鼠随机分为5组, 每组6只, 分别按极低、低、中、高剂量(67、134、268、536 mg/kg) ig五酯软胶囊内容物或空白溶剂, 0.5 h后再ig西罗莫司0.4 mg/kg。分别于西罗莫司给药前(0 h)和给药后0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12、24、36 h毛细血管眼眶取全血100 μ l于乙二胺四乙酸抗凝试管中, 采用液相色谱-质谱联用法测定全血中西罗莫司的浓度, 采用DAS 2.0药动学软件以非隔室模型计算药动学参数。结果: 极低、低、中、高剂量组和溶剂对照组大鼠体内西罗莫司的药动学参数 c_{max} 为(6.79 \pm 1.15)、(17.40 \pm 3.13)、(21.24 \pm 3.14)、(22.06 \pm 4.82)、(2.80 \pm 0.72) ng/ml; $t_{1/2}$ 为(11.01 \pm 0.82)、(12.20 \pm 2.02)、(12.28 \pm 2.38)、(12.36 \pm 0.73)、(10.59 \pm 0.69) h; $AUC_{0-\infty}$ 为(85.79 \pm 15.26)、(162.18 \pm 41.75)、(273.12 \pm 73.69)、(268.79 \pm 28.46)、(36.72 \pm 3.01) ng·h/ml。与溶剂对照组比较, 极低、低、中、高剂量组大鼠体内西罗莫司的 c_{max} 和 $AUC_{0-\infty}$ 均升高, 但 $t_{1/2}$ 变化不明显。结论: 五酯软胶囊可明显促进西罗莫司在大鼠体内的吸收。

关键词 五酯软胶囊; 西罗莫司; 药动学; 大鼠

Effects of Wuzhi Soft Capsule on the Pharmacokinetics of Sirolimus in Rats

XU Wen¹, LIU Tao¹, FU Xiaoyue², CAO Zhihong¹, MA Min¹, SUI Zhongguo¹ (1. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 266003, China; 2. Organ Transplantation Center, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Shandong Qingdao 266003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effect of Wuzhi soft capsule on the pharmacokinetics of sirolimus in rats. METHODS: Wistar rats were randomly divided into 5 groups, with 6 rats in each group. They were given very low-dose, low-dose, medium-dose and high-dose of Wuzhi soft capsule (67, 134, 268 and 536 mg/kg) ig or blank solvent, respectively; and then given sirolimus 0.4 mg/kg. The blood 100 μ l was sampled by capillary eyes before giving sirolimus (0 h) and 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24 and 36 h after giving sirolimus and put into edetic acid anticoagulation tube. Blood concentration of sirolimus was assayed by LC-MS/MS. The pharmacokinetic parameter was calculated by DAS 2.0 software using non-compartment model. RESULTS: The pharmacokinetic parameters of sirolimus in very low-dose, low-dose, medium-dose and high-dose groups and blank solvent group were c_{max} of (6.79 \pm 1.15), (17.40 \pm 3.13), (21.24 \pm 3.14), (22.06 \pm 4.82), (2.80 \pm 0.72) ng/ml; $t_{1/2}$ of (11.01 \pm 0.82), (12.20 \pm 2.02), (12.28 \pm 2.38), (12.36 \pm 0.73), (10.59 \pm 0.69) h; $AUC_{0-\infty}$ of (85.79 \pm 15.26), (162.18 \pm 41.75), (273.12 \pm 73.69), (268.79 \pm 28.46), (36.72 \pm 3.01) ng·h/ml, respectively. Compared with blank solvent group, c_{max} and $AUC_{0-\infty}$ of sirolimus were all increased in very low-dose, low-dose, medium-dose and high-dose groups, but $t_{1/2}$ changed slightly. CONCLUSIONS: Wuzhi soft capsule can substantially enhance the absorption of sirolimus in rats.

KEYWORDS Wuzhi soft capsule; Sirolimus; Pharmacokinetics; Rats

器官移植术后的患者需终身服用价格昂贵的免疫抑制剂, 经济负担严重^[1-2]。葡萄柚汁^[3]和南五味子^[4-6]可提高免疫抑制剂他克莫司的血药浓度以降低其给药剂量。在我院器官移植中心常将五酯软胶囊(一种市售的南五味子制剂)与他克莫司联用, 以提高他克莫司血药浓度过低患者的血药浓度。

西罗莫司(又称雷帕霉素)是较他克莫司更新的一种大环内酯类免疫抑制剂^[7-8], 其体内代谢途径与他克莫司相同, 主要被细胞色素P₄₅₀(CYP)3A代谢^[9], 存在首关代谢, 且治疗窗窄、价格高^[10], 目前未见西罗莫司与南五味子联用的报道。在本研究中笔者开展了动物试验以考察五酯软胶囊能否提高西罗莫司的血药浓度, 以及提高的幅度和药动学参数的改变情况, 以为临床安全、有效的用药方案提供参考。本研究采用液相色谱-

串联质谱联用法对大鼠全血中西罗莫司浓度进行测定, 该方法灵敏、准确, 且可避免代谢产物对检测结果的干扰^[11-12]。

1 材料

1.1 仪器

6410B三重四级杆液质联用仪(包括G1312B四元泵、G1322A真空脱气机、G1329B自动进样器、G1316B柱温箱)和MassHunter软件(美国安捷伦公司); BF-2000氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司); 5418离心机(德国艾本德公司); 超纯水机(美国密理博公司)。

1.2 药品与试剂

五酯软胶囊(四川光大制药有限公司, 批号: 1401110, 规格: 每粒0.5 g, 每粒含五味子酯甲4.0 mg); 西罗莫司片(商品名: 雷帕鸣[®], 惠氏制药有限公司, 批号: C70283, 规格: 每片1 mg); 西罗莫司对照品(批号: V900930, 纯度: \geq 95%)、他克莫司(内标)对照品(批号: F4679, 纯度: \geq 98%)均购自美国Sigma-Aldrich公司; 乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯, 其余试剂均为

* 副主任药师, 博士。研究方向: 临床药学。电话: 0532-82911767。E-mail: xuwen78@126.com

通信作者: 主任药师, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 临床药学、个体化给药。电话: 0532-82911277。E-mail: sz_guo@tom.com

分析纯。

1.3 动物

Wistar大鼠, ♂, 体质量260~280 g, 由青岛派特福德白鼠养殖专业合作社提供, 实验动物许可证号为SCXK(鲁)20080002。实验经青岛大学附属医院伦理委员会批准开展。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Zorbax SB-C₁₈(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm); 采用梯度洗脱, 流动相A为乙腈, 流动相B为0.1%甲酸溶液(A相的起始比例为20%, 0.5 min时升到100%, 然后维持至4.5 min), 流速为0.3 ml/min; 柱温为35 ℃; 进样量为20 μl。

2.1.2 质谱条件 质谱采用正离子模式, 电喷雾离子化源(ESI), 喷雾电压为4 000 V, 离子源温度为105 ℃; 雾化气为氮气, 采用的雾化压力为40 psi; 去溶剂气为氮气, 温度为350 ℃, 流速为10 L/min; 碰撞气为高纯氮气。采用多反应监测模式(MRM)对待测药物离子的浓度进行测定, 西罗莫司MRM条件为*m/z* 936.6→*m/z* 409.2, 传输能量135 V, 碰撞能量55 eV; 他克莫司(内标)的MRM条件为*m/z* 826.5→*m/z* 616.3, 传输能量250 V, 碰撞能量45 eV。

2.2 全血样品的预处理

2.2.1 标准曲线样品与质控样品的配制与预处理 取大鼠空白全血50 μl于试管中, 加入10 μl西罗莫司对照品溶液(质量浓度分别为0.25、0.50、1.25、5.0、12.5、50、125、250 ng/ml, 溶剂为10%乙腈溶液), 涡旋混合30s得到相当于全血质量浓度为0.05、0.10、0.25、1.0、2.5、10、25、50 ng/ml的标准曲线样品。按上述方法另行制备相当于全血质量浓度为0.10、2.5、25 ng/ml的样品作为质控样品。上述样品分别加入10 μl他克莫司溶液(内标, 质量浓度为100 ng/ml, 溶于10%乙腈溶液), 再涡旋混合30 s, 最后依次加入0.5 mol/L硫酸锌溶液50 μl和乙腈-甲醇混合液(50:50, *V/V*)240 μl, 涡旋混合2 min, 以离心半径5 cm、转速12 000 r/min离心10 min, 取上清液20 μl进样测定西罗莫司的浓度。

2.2.2 待测样品预处理 取待测大鼠全血50 μl于试管中, 加入10 μl空白溶剂(10%乙腈溶液), 涡旋混合30 s, 然后按“2.2.1”项下“加入10 μl他克莫司溶液……”开始操作, 测定西罗莫司的浓度。

2.3 标准曲线的制备

按“2.2.1”项下制得西罗莫司质量浓度分别为0.05、0.10、0.25、1.0、2.5、10、25、50 ng/ml的标准曲线样品, 预处理后, 按“2.1”项下方法进样测定。以西罗莫司质量浓度(*x*)为横坐标、西罗莫司峰面积和内标峰面积之比(*y*)为纵坐标, 进行线性回归。结果表明, 西罗莫司质量浓度在0.05~50 ng/ml范围内与峰面积比值的线性关系良好, 回归方程为 $y=1.93 \times 10^{-2}x+8.58 \times 10^{-3}$ ($r=0.9998$); 方法的检测限为0.02 ng/ml(信噪比为3), 定量限为0.05 ng/ml(信噪比为10); 内源性杂质不干扰西罗莫司和内标他克莫司的测定。

2.4 精密度试验

按“2.2.1”项下方法制备低、中、高质量浓度(0.10、2.5、25 ng/ml)的西罗莫司质控样品, 预处理后, 按“2.1”项下方法进样测定。连续测定6次考察日内精密度, 连续测定5天考察日间精密度, 结果见表1。

表1 精密度试验结果

Tab 1 Results of precision test

样品质量浓度, ng/ml	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$	RSD, %	$\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$	RSD, %
0.10	0.11 ± 0.01	4.61	0.09 ± 0.01	7.33
2.5	2.40 ± 0.10	3.86	2.31 ± 0.19	7.52
25	26.0 ± 1.00	4.01	26.3 ± 1.30	5.19

2.5 准确度试验

按“2.2.1”项下方法制备低、中、高质量浓度(0.10、2.5、25 ng/ml)的西罗莫司质控样品, 将含药血浆中西罗莫司和他克莫司的峰面积与未经提取的相同质量浓度的西罗莫司和他克莫司标准溶液的峰面积进行比较, 每个质量浓度重复测定6次计算平均提取回收率。结果, 西罗莫司在0.10、2.5、25 ng/ml时的提取回收率分别为(91.3 ± 10.6)%、(92.5 ± 7.3)%、(92.2 ± 8.1)%, 内标的提取回收率为(95.7 ± 4.9)%。

2.6 稳定性试验

取“2.2.1”项下低、中、高质量浓度(0.10、2.5、25 ng/ml)的西罗莫司质控样品于室温放置12 h, 考察室温放置稳定性; 在-20 ℃冰箱放置30 d, 考察低温长期放置的稳定性; 将质控样品于-20 ℃冷冻-室温融化, 重复3次考察冻融稳定性; 将预处理后的样品于室温放置24 h后进样测定, 考察预处理后样品的稳定性。结果显示, 低、中、高质量浓度质控样品室温放置12 h RSD均小于8.51%, -20 ℃放置30 d的RSD均小于5.77% ($n=3$), -20 ℃冷冻-室温融化循环3次的RSD均小于6.73% ($n=3$), 预处理后的样品室温放置24 h的RSD均小于5.53% ($n=3$), 表明样品在采集、储存、预处理及待检测过程均能保持稳定。

2.7 给药方案与样品采集及测定

取大鼠30只, 饲养于标准鼠笼中, 保持室温25 ℃, 相对湿度为60%, 自由进食标准鼠粮及饮水, 实验前饲养1周以适应环境。大鼠于实验前12 h禁食、自由饮水, 在实验期间自由饮水并于给药后2 h恢复自由进食标准鼠粮。大鼠按体质量随机分为5组, 其中4组大鼠ig五酯软胶囊内容物, 剂量分别为67、134、268、536 mg/kg(五酯软胶囊用大豆油稀释至适当的浓度, 给药体积均为0.5 ml, 分别称为极低、低、中、高剂量组); 第5组大鼠为溶剂对照组, ig 0.5 ml大豆油。各组大鼠给药30 min后再ig西罗莫司混悬液(混悬于0.5%的羧甲基纤维素钠, 西罗莫司混悬液现用现配且每次抽取前须研磨均匀), 给药剂量均为0.4 mg/kg(给药体积为0.5 ml)。五酯软胶囊剂量选择依据: 临床人用剂量为每次1粒, 每日3次, 药物相互作用研究的剂量一般是单次给予1日剂量, 则人的剂量为1.5 g, 按体表面积换算大鼠的剂量为133.9 mg/kg。本研究则取该剂量的0.5、1、2、4倍的剂量, 即67、134、268、536 mg/kg。各组动物在给予西罗莫司前(0 h)和给药后0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12、24、36 h毛细管眼眶取全血约100 μl于含乙二胺四乙酸的抗凝试管中, 置于-20 ℃保存。按“2.2.2”项下方法预处理血样后进样测定。各组大鼠体内西罗莫司的药-时曲线见图1。

由图1可知, 各个剂量的五酯软胶囊均可明显提高西罗莫司的血药峰浓度和药时曲线下面积; 随着五酯软胶囊剂量的升高, 西罗莫司血药浓度提高的幅度变大。采用DAS 2.0分析软件(中国药理学学会), 利用非隔室模型计算给药后的药动学参数。各组大鼠体内西罗莫司的药动学参数见表2。

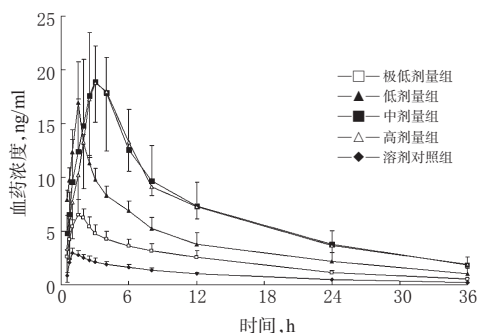


图1 各组大鼠体内西罗莫司的药-时曲线

Fig 1 Blood concentration-time curves of sirolimus in rats of each group

表2 各组大鼠体内西罗莫司的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of sirolimus in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动学参数	溶剂对照组	极低剂量组	低剂量组	中剂量组	高剂量组
t_{max}, h	1.08 ± 0.20	1.67 ± 0.26	1.67 ± 0.26	3.17 ± 0.68	3.17 ± 0.68
$c_{max}, ng/ml$	2.80 ± 0.72	6.79 ± 1.15	17.40 ± 3.13	21.24 ± 3.14	22.06 ± 4.82
$t_{1/2}, h$	10.59 ± 0.69	11.01 ± 0.82	12.20 ± 2.02	12.28 ± 2.38	12.36 ± 0.73
$AUC_{0-∞}, (ng \cdot h)/ml$	36.72 ± 3.01	85.79 ± 15.26	162.18 ± 41.75	273.12 ± 73.69	268.79 ± 28.46
$AUMC_{0-∞}, (ng \cdot h^2)/ml$	539.80 ± 30.18	1 312.12 ± 189.29	2 620.37 ± 1 268.23	4 601.15 ± 1 573.95	4 577.01 ± 671.17
MRT, h	14.75 ± 0.90	15.39 ± 0.76	15.50 ± 3.17	16.71 ± 2.21	16.98 ± 1.16

由表2可知,各个剂量的五酯软胶囊均大幅提高西罗莫司的血药浓度;随着五酯软胶囊剂量的增大,西罗莫司的 c_{max} 和 $AUC_{0-∞}$ 均增大;但当剂量增加到268 mg/kg后,随着剂量的增大,西罗莫司的 c_{max} 和 $AUC_{0-∞}$ 均无明显的变化,提示西罗莫司的体内吸收可能达到饱和。

3 讨论

实验结果表明,极低剂量的五酯软胶囊即可明显提高西罗莫司的血药浓度,提示五酯软胶囊有可能作为西罗莫司的吸收促进剂。随着五酯软胶囊剂量的增加,西罗莫司血药浓度的升高有饱和的趋势。

本研究发现五酯软胶囊可以提高大鼠ig西罗莫司后的血药浓度,主要体现在 c_{max} 和 $AUC_{0-∞}$ 明显增加,而对西罗莫司的 $t_{1/2}$ 影响较小,所以笔者推测其主要作用于肠壁细胞和肝细胞中的药物代谢酶,降低了西罗莫司的首关代谢。

本研究虽然证明五酯软胶囊可促进西罗莫司在大鼠体内的吸收,并且考虑到大鼠和人体代谢酶的相似性^[13],笔者推测五酯软胶囊很有可能也会促进西罗莫司在人体的吸收。但若将这一发现广泛应用于临床,除了须进行人体试验外,五酯软胶囊等南五味子制剂的质量标准也有待提高。目前国内南五味子制剂包括五酯软胶囊、五酯胶囊和五酯片等,主要临床应用是作为保肝药物,保肝的活性成分是五味子甲素为主的木脂素类,所以南五味子制剂的质量标准多是规定总木脂素或五味子甲素的最低含量,仅五酯软胶囊规定了五味子酯甲的最低含量。笔者的前期研究结果表明,五味子甲素对药物代谢酶CYP3A的活性影响很小,而五味子酯甲是促进他克莫司吸收的有效成分^[14],理论上推测五味子酯甲也是促进西罗莫司吸收的有效成分,因此有必要将五味子酯甲也作为南五味子制剂的指标成分;而且为了避免免疫抑制剂血药浓度的波动,建议将五味子酯甲的含量限定在较窄的范围。

参考文献

- [1] 辛华雯,李馨,吴笑春,等.五酯胶囊与他克莫司合用对肾移植受者的成本与效果评估研究[J].中国临床药理学杂志,2011,27(4):295.
- [2] 唐薇,胡丹,杨荆艳.肾移植受者联合应用五酯胶囊与FK506的药物经济学研究[J].护理实践与研究,2011,8(4):13.
- [3] Liu C, Shang YF, Zhang XF, et al. Co-administration of grapefruit juice increases bioavailability of tacrolimus in liver transplant patients: a prospective study[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2009, 65(9):881.
- [4] Xin HW, Li Q, Wu XC, et al. Effects of Schisandra sphenanthera extract on the blood concentration of tacrolimus in renal transplant recipients[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011, 67(12):1 309.
- [5] Jiang W, Wang X, Xu X, et al. Effect of Schisandra sphenanthera extract on the concentration of tacrolimus in the blood of liver transplant patients[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2010, 48(3):224.
- [6] Qin XL, Bi HC, Wang XD, et al. Mechanistic understanding of the different effects of Wuzhi tablet (Schisandra sphenanthera extract) on the absorption and first-pass intestinal and hepatic metabolism of tacrolimus (FK506) [J]. *Int J Pharm*, 2010, 389(1/2):114.
- [7] 张宁,张策,吕慧怡,等.西罗莫司在肝移植患者中应用的系统性评价[J].中国药房,2011,22(18):1 705.
- [8] 牟静,傅晓华,任斌,等.西罗莫司治疗肾移植后排斥反应的疗效、不良反应与其血药浓度的相关性分析[J].中国药房,2011,22(30):2 839.
- [9] Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, et al. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat[J]. *Drug Metab Dispos*, 1992, 20(5):753.
- [10] 王长希,尚文俊,陈立中,等.肾移植受者应用西罗莫司治疗窗的临床研究[J].中国新药与临床杂志,2005,24(1):41.
- [11] 杨梅,赵竿,江骥,等. LC-MS/MS法定量测定人全血中替西罗莫司及西罗莫司的药物浓度[J].药物分析杂志,2010,30(4):604.
- [12] 黄明珠,胡兴江,陈俊春,等.西罗莫司全血浓度测定方法及临床应用[J].中国临床药理学杂志,2014,30(5):445.
- [13] Yamasaki I, Yamada M, Uotsu N, et al. Inhibitory effects of kale ingestion on metabolism by cytochrome P450 enzymes in rats[J]. *Biomed Res*, 2012, 33(4):235.
- [14] 隋忠国,徐文,柳艳平,等.五味子酯甲促进他克莫司在大鼠体内口服吸收的研究[J].中国药房,2013,24(35):3 280.

(收稿日期:2015-07-29 修回日期:2015-09-19)

(编辑:邹丽娟)