

芫花酯甲干粉吸入剂的制备及大鼠体内组织分布

李曼¹, 段金威^{1,2}, 胡荣峰³, 陈志鹏^{1,2*}(¹南京中医药大学药学院, 南京 210023; ²江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210023;³安徽中医药大学, 合肥 230000)

摘要 将芫花酯甲制成干粉吸入剂直接输送至肺部, 实现在肺部的浓集, 降低芫花酯甲的毒副作用, 达到减毒增效的目的。采用可吸入乳糖作为载体, 将芫花酯甲吸附在乳糖表面, 以细颗粒分布比例(FPF)为评价指标衡量体外沉积率, 筛选出最优处方用于肺部给药, 建立大鼠心、肝、脾、肺、肾、脑以及生殖系统的UHPLC-MS/MS分析方法, 以静脉注射为参比, 考察肺部给药后芫花酯甲在各脏器的分布, 计算肺部靶向参数。结果显示, 粗糙乳糖与细粉乳糖的比例为10:1时的干粉吸入剂有最高的FPF, 通过比较芫花酯甲肺部给药与静脉注射后在大鼠各组织的分布, 发现肺部给药大大提高芫花酯甲在肺组织的浓度, 显著减少其在心、肝、脾、肾和生殖系统的分布, 表明芫花酯甲干粉吸入剂能使药物在肺部浓集, 降低药物在其他组织的分布, 提高疗效。

关键词 芫花酯甲; 干粉吸入剂; 肺部给药; 组织分布; UHPLC-MS/MS

中图分类号 R944; R969 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)03-0297-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170308

引用本文 李曼, 段金威, 胡荣峰, 等. 芫花酯甲干粉吸入剂的制备及大鼠体内组织分布[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(3):297-304.

Cite this article as: LI Man, DUAN Jin'ao, HU Rongfeng, et al. Preparation of dry powder inhalation of yuanhuacine and its tissue distribution in rats [J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(3):297-304.

Preparation of dry powder inhalation of yuanhuacine and its tissue distribution in rats

LI Man¹, DUAN Jin'ao^{1,2}, HU Rongfeng³, CHEN Zhipeng^{1,2*}

¹School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; ²Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing 210023; ³Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, China

Abstract The aim of the present study was to increase distribution of yuanhuacine in the lungs and achieve the purpose of reducing toxicity and increasing efficiency. Therefore, yuanhuacine was designed to be dry powder inhalers innovatively and directly delivered to the lungs. Accordingly, inhaled lactose was used as a carrier to adsorb yuanhuacine on the surface of lactose. Fine particle fraction (FPF) was utilized as evaluation index to filtrate the optimal prescription for pulmonary administration. Besides, an UHPLC-MS/MS method was established for the analysis of heart, liver, spleen, lung, kidney, brain and reproductive system of rats. Intravenous injection was taken as reference to investigate the distribution of yuanhuacine and calculate relevant targeting parameters. The experimental result indicated that the prescription (rough lactose : fine lactose = 10 : 1) has the highest FPF, which can be chosen as the most suitable prescription for pulmonary administration of yuanhuacine. Moreover, by comparing the distribution of yuanhuacine through pulmonary administration and intravenous injection, it was found that the concentration of yuanhuacine in the lung tissue was greatly increased by pulmonary administration, which decreased the distribution in heart, liver, spleen, kidney, brain and reproductive system, thus sequentially reducing the toxicity in other tissues and increased the efficiency.

Key words yuanhuacine; dry powder inhalation; pulmonary administration; tissue distribution; UHPLC-MS/MS

收稿日期 2016-11-04 ***通信作者** Tel:025-85811050 E-mail:czpcpu2000@hotmail.com

基金项目 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心开放课题资助项目(No. ZDXM-2-3); 国家自然科学基金资助项目(No. 81274100, No. 81473147)

This study was supported by the Open Project Program of Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization (No. ZDXM-2-3) and the National Natural Science Foundation of China (No. 81274100, No. 81473147)

芫花是中国特有的瑞香科植物,有消炎、镇痛、泻水逐饮、止咳平喘、抗菌等多种药理活性,古代多用于各种腹水和引产。现代研究表明芫花中含有多种的化学成分,包括黄酮类、瑞香烷型二萜原酸酯类、香豆素类等^[1-3],其中瑞香烷型二萜原酸酯类化合物被发现是一种有效的抗肿瘤成分^[4]。1978年,上海药物研究所应百平等^[5]首次从芫花根中发现具有引产作用的芫花酯甲,深入研究显示芫花酯甲属于一种新结构类型的 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂,对多种肿瘤细胞均具有较强的杀伤作用,尤其是对人肺癌 A549 细胞,但在杀伤肿瘤细胞的同时,对皮肤及黏膜有一定的刺激性,有一定的细胞毒性^[6],同时静脉给药后对肝和肾等器官均有较大的毒性,甚至还存在一定的生殖毒性^[7-9],对人体的伤害较大,这就为芫花酯甲在肺癌治疗上带来了不便。

肺部给药能直接将药物运送至肺部而发挥药效,一方面可减少药物用量,另一方面也可以减小药物的不良反应,是治疗呼吸系统疾病理想的给药途径,广泛应用于治疗肺炎、肺癌、哮喘等^[10]。干粉吸入剂(dry powder inhalation, DPI)是肺部给药常见的剂型^[11]。然而, DPI 中的药物微粉化后粒径小,易团聚难以分散,流动性不佳,稳定性无法保证,因此,性能优良的载体是提高药物粉末雾化效果和稳定性的关键因素。目前,常用的载体材料主要分为 4 类:碳水化合物、氨基酸、无机盐和蛋白质类。其中乳糖具有对呼吸道刺激性小、不良反应小、价格低廉等优点,是吸入粉雾剂载体的首选。此外,乳糖也是目前唯一被 FDA 批准可用于肺部吸入制剂的载体^[12]。大量的研究表明, DPI 中粗糙乳糖和细粉乳糖的比例对其肺部沉积量有着显著的影响。Kaialy 等^[13]研究发现,重结晶乳糖表面细粉颗粒浓度增加使得表面更为粗糙,有效改善药物在肺部的沉积。但是载体乳糖的粒径过小无法改善药物的分散性,粒径过大则由于惯性碰撞会沉积在呼吸道的上部,影响对药物的输送能力^[14],针对不同药物的理化性质,选择合适的比例是实现药物肺部沉积的关键。

本研究将芫花酯甲与可吸入乳糖混合制成干粉吸入剂,在体外通过新一代药用撞击器(next generation pharmaceutical impactor, NGI)模拟肺部

给药的方式,考察粗糙乳糖与细粉乳糖的比例对于芫花酯甲肺部沉积的影响,筛选出最适合于肺部给药的 DPI 处方,再将该处方制成芫花酯甲干粉吸入剂用于大鼠肺部给药,建立大鼠心、肝、脾、肺、肾以及生殖系统的 UHPLC-MS/MS 分析方法;以静脉注射为参比制剂,考察芫花酯甲肺部给药后在大鼠体内各脏器的分布情况,以期减少芫花酯甲的脱靶效应,达到减毒增效的目的,为芫花酯甲的进一步研究提供一个合理可行的方向。

1 材料

1.1 试药

芫花酯甲标准品(中国药物标准品研究中心,纯度 $\geq 98\%$);芫花酯甲原料药(四川维克奇生物科技有限公司,纯度 $> 90\%$);乙腈、甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);可吸入乳糖(德国美剂乐集团, Inhalac230, 400);克拉霉素(日本科赛公司,纯度 $\geq 98\%$);其余试剂均为市售分析纯,水为超纯水。

1.2 仪器

新一代药粉撞击器 NGI 170(美国 MSP 公司);Waters e2695 高效液相色谱仪及 Waters 2489 检测器(美国 Waters 公司);BS-124S 电子天平(德国 Sartorius 公司);DP-4M 肺部给药装置(美国 Penn-Century 公司);centriVap 离心浓缩仪(美国 Labconco 公司);XHF-D 高速分散器(宁波新芝生物科技有限公司);UHPLC-MS/MS 质谱联用系统:Shimadzu CBM20Alite 高效液相色谱系统(日本 Shimadzu 公司),Triple Quadrupole 5500 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.3 动物

SD 大鼠,雌雄各半,质量 180~220 g,由浙江省实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(浙)2014-0001。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方法

2.1 芫花酯甲 DPI 的制备

将不同粒径的可吸入乳糖(d_{50} : 70~110 μm ,

d_{50} :4~11 μm)混合作为 DPI 的载体。称取处方量的粗粒乳糖和细粉乳糖以及药物,按等量递增的方式逐步混合均匀,粗粉乳糖与细粉乳糖的比例分别为 1:1,5:1,10:1,20:1 和 1:0。

2.2 芫花酯甲 DPI 的处方筛选

以细颗粒分布比例(fine particle fraction, FPF)为评价体外沉积率的指标,考察不同粒径乳糖的比例对芫花酯甲 DPI 肺部给药性能的影响。FPF 是指 60 L/min 标准流速条件下,能沉积到肺部的有效微细粒子剂量,为空气动力学直径小于 5 μm 的累积药量与药物沉积总量的比^[15]。

将各处方分别制成 20 粒含药胶囊,每粒胶囊中含有粉末 50 mg。用 NGI 装置在 60 L/min 的流速模拟人体肺部给药,用 50% 甲醇冲洗各个收集盘和适配器等部件,12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液置于液相小瓶中,测定装置各级的药物沉积率,进行处方筛选。

2.3 芫花酯甲 DPI 组织分布研究

2.3.1 制剂的制备 将筛选的最优芫花酯甲 DPI (含药 6 $\mu\text{g}/\text{mg}$)装填于 DP-4M 装置用于肺部吸入。精密称取芫花酯甲 2 mg,用一定量的 DMSO 溶解,再用生理盐水稀释至 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 用于静脉注射。

2.3.2 组织样品的采集及处理 SD 大鼠雌雄各半,分为 2 组,每组 72 只,一组尾静脉注射芫花酯甲,另外一组肺部吸入芫花酯甲 DPI,剂量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,于给药后 1,2,4,6,9 h 将大鼠处死。处死大鼠后取心、肝、脾、肺、肾、脑和睾丸(子宫、卵巢),用生理盐水洗净,随后用滤纸吸干残留生理盐水。

取大鼠各组织样品(心、肝、脾、肺、肾、脑、子宫、卵巢、睾丸),称重,按组织质量与生理盐水体积比为 1:3 加入生理盐水制成匀浆液,吸取各组织匀浆液 100 μL 于 2 mL 尖底离心管中,加入克拉霉素(内标)10 μL ,0.02 mol/L Na_2CO_3 溶液 400 μL 摇振,再加入萃取试剂(乙醚-二氯甲烷,8:1)1 mL,涡旋混合 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,上清液转移至 1.5 mL 离心管中,37 $^{\circ}\text{C}$ 旋转浓缩至干,残渣用甲醇 100 μL 复溶,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于 UHPLC-MS/MS 分析。

2.4 芫花酯甲体内分析方法的建立

2.4.1 UHPLC-MS/MS 测定条件 Waters BEH- C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm,1.7 μm)液相条

件:A 为 0.1% 甲酸水溶液;B 为乙腈;梯度洗脱:0~0.1 min,40% B;0.1~2.5 min,40%~95% B;2.5~4.5 min,95% B;4.5~5.0 min,95%~40% B。流速为 0.3 mL/min,柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 5 μL 。质谱条件:质谱扫描方式为多反应检测模式(MRM)。使用下列参数:离子源温度:500 $^{\circ}\text{C}$;CUR:35 psi(1 psi = 6.89 kPa);CAD:8 V;IS:5 500 V;TEM:550 $^{\circ}\text{C}$;GS1:55 psi;GS2:55 psi;芫花酯甲(CE:26.15 V;DP:29.11 V);克拉霉素(CE:26.06 V;43.29 V)。用于定量分析的离子分别为 m/z 649.4/151.1(芫花酯甲)和 m/z 748.5/590.4(克拉霉素)。

2.4.2 专属性考察 分别取空白组织、空白组织加药物及内标、静脉给药和肺部给药后 0.5 h 的组织样品,按“2.3.2”项下方法操作,在上述色谱质谱条件下分离测定,考察大鼠各组织样品中内源性物质对芫花酯甲含量测定是否有干扰。

2.4.3 标准曲线制备 配置一系列质量浓度为 20,50,250,1 250,2 500,5 000,10 000,20 000,50 000,100 000,200 000 ng/mL 的芫花酯甲甲醇标准液。精密称取内标物克拉霉素 2 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,得质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标储备液。用甲醇稀释成质量浓度为 10 ng/mL 内标溶液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存。精密吸取芫花酯甲标准系列溶液 10 μL 和 10 ng/mL 内标 10 μL ,加入到各组织匀浆液 90 μL 中,配置成一系列质量浓度为 2,5,25,125,250,5 00 ng/mL 的芫花酯甲心、肝、脾、肾、脑、子宫、卵巢和睾丸匀浆液标准品,以及质量浓度为 5,125,500,1 000,5 000,10 000,20 000 ng/mL 的芫花酯甲肺匀浆液标准品。按上述“2.3.2”项下操作。

以各组织中芫花酯甲的峰面积与内标峰面积的比值(Y)为纵坐标,芫花酯甲各组织匀浆液标准品的质量浓度(c)为横坐标,得到回归方程及相关系数。

2.4.4 精密度与准确度考察 将质量浓度为 20,750,4 000 ng/mL 或 50,10 000,160 000 ng/mL 的芫花酯甲甲醇标准液分别用大鼠空白组织匀浆液稀释,配制成 2,75,400 ng/mL 3 个质量浓度的芫花酯甲心、肝、脾、肾、脑、子宫、卵巢和睾丸匀浆液标准品和 5,1 000,16 000 ng/mL 3 个质量浓度的芫花酯甲肺匀浆液标准品,按“2.3.2”项下操作,

UHPLC-MS/MS 进样。每个浓度重复 6 份样本分析,连续测定 3 d,根据当日的随行标准曲线,计算样品浓度。

2.4.5 提取回收率与基质效应

提取回收率:在空白组织样品中加入芫花酯甲标准溶液,制成芫花酯甲质量浓度分别为 2,75,400 ng/mL 的心、肝、脾、肾、脑、子宫、卵巢和睾丸匀浆液标准品和 5,1 000,16 000 ng/mL 的肺匀浆液标准品,按上述组织样品处理方法处理测定后,与同浓度的标准对照品进行比较。

基质效应:将空白组织样品按上述组织样品处理方法处理后,加入芫花酯甲标准溶液,制成芫花酯甲质量浓度分别为 2,75,400 ng/mL 的心、肝、脾、肾、脑、子宫、卵巢和睾丸匀浆液标准品和 5,1 000,16 000 ng/mL 的肺匀浆液标准品,再进行测定,与同浓度的标准对照品进行比较。

2.4.6 稳定性 根据实际情况,对短期稳定性、长期稳定性、冻融稳定性和进样前稳定性进行考察。短期稳定性是指将样品室温放置 4 h;长期稳定性是指样品在 -20 ℃放置 30 d;冻融稳定性是指在 -20 ℃和 37 ℃之间反复冻融 3 次;进样前稳定性是指制备好样品后放置在进样盘中 12 h。

3 结果

3.1 芫花酯甲 DPI 处方筛选

芫花酯甲 DPI 进样后计算 NGI 装置各级的药物沉积率如图 1 所示。各个处方的 FPF 如图 2 所示。

由于药物本身粒径小、流动性差、易团聚,同时药物粒径太小会在吸入的过程中随呼气排出体外,所以在芫花酯甲 DPI 的制备中加入粗糙乳糖,使药物吸附在粗糙乳糖表面,从而改善其流动性。但是如果药物与粗糙乳糖结合过强又不利于药物与载体的分离,会使药物和乳糖一起沉积在喉部及气管,难以到达深肺。基于这个原因,在芫花酯甲 DPI 的制备中加入细粉乳糖,细粉乳糖会占据粗糙乳糖表面的部分吸附位点,通过调节细粉乳糖的含量,改善药物从粗糙乳糖表面分离的能力,但是如果加入细粉乳糖比例过高,又会使药物无法与粗糙乳糖结合,使得药物团聚或者随呼气排除体外无法到达深肺。如图 2 所示,随着细粉乳糖比例的增加,芫花酯甲 DPI 的 FPF 一开始呈上升趋势,后来

又呈下降趋势。当粗糙乳糖与细粉乳糖的比例为 10:1 时,FPF 达到最大值,能够到达肺部发挥疗效的芫花酯甲量最多,所以选取这个处方用于芫花酯甲 DPI 大鼠体内组织分布研究。

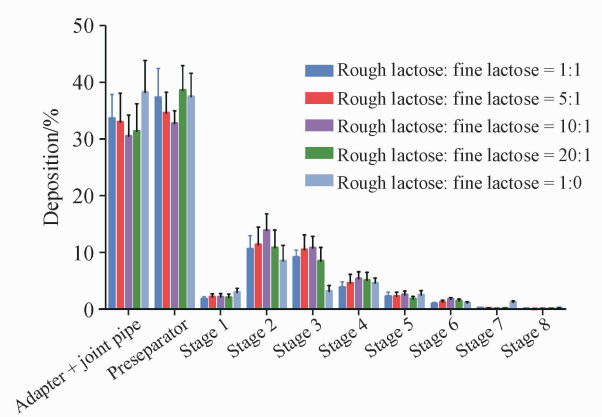


Figure 1 Detailed deposition of yanhuaquinone dry powder inhalation (DPI) with different prescription in next generation pharmaceutical impactor (NGI) device ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
The particle size of each layer: Stage 1 ($> 8.06 \mu\text{m}$), Stage 2 ($4.46\text{--}8.06 \mu\text{m}$), Stage 3 ($2.82\text{--}4.46 \mu\text{m}$), Stage 4 ($1.66\text{--}2.82 \mu\text{m}$), Stage 5 ($0.94\text{--}1.66 \mu\text{m}$), Stage 6 ($0.55\text{--}0.94 \mu\text{m}$), Stage 7 ($0.34\text{--}0.55 \mu\text{m}$), Stage 8 ($< 0.34 \mu\text{m}$)

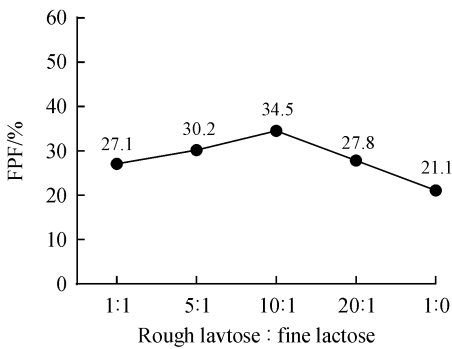


Figure 2 Fine particle fraction (FPF) of yanhuaquinone DPI with different proportion of fine lactose

3.2 体内分析方法学

3.2.1 方法专属性 空白肺组织,空白肺组织加对照品及内标,静脉给药后肺组织,肺部给药后肺组织色谱图见图 3。结果表明,在大鼠肺组织中对对照品与内标色谱峰分离良好,内源性物质无干扰。同法考察其他各组织,结果均无干扰。

3.2.2 标准曲线 以芫花酯甲浓度为横坐标,芫花酯甲与内标物的峰面积比值为纵坐标,求得的直线回归方程,即为标准曲线。结果见表 1。

3.2.3 精密度与准确度 精密度与准确度结果见表 2。方法的准确度和精密度均符合生物样品测定的相关要求。

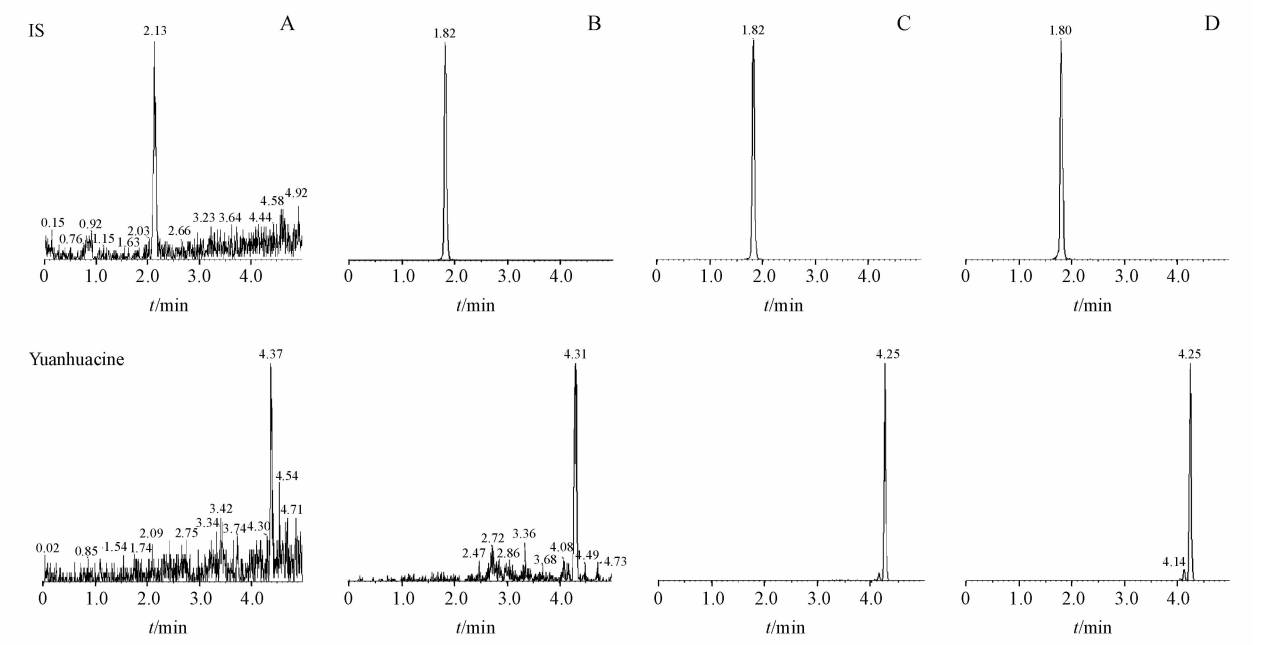


Figure 3 UHPLC-MS/MS chromatograms for yuanhuacine and IS detection in tissues
A: Blank lung tissues; B: Blank lung tissues spiked with standard solutions in LLOQ; C: Lung tissues sample obtained 0.5 h after intravenous administration of yuanhuacine; D: Lung tissues sample obtained 0.5 h after pulmonary administration of yuanhuacine

Table 1 Regression equation, correlation coefficient and linear range of yuanhuacine in rat tissues

| Tissue | Regression equation | <i>r</i> | Linear range/(ng/ mL) |
|--------|----------------------|----------|-------------------------|
| Heart | $Y=0.00218c+0.14891$ | 0.9957 | 2-500 |
| Liver | $Y=0.00400c+0.12204$ | 0.9945 | 2-500 |
| Spleen | $Y=0.00396c+0.01911$ | 0.9967 | 2-500 |
| Lung | $Y=0.00509c+0.22564$ | 0.9940 | 5-20000 |
| Kidney | $Y=0.00518c+0.15193$ | 0.9940 | 2-500 |
| Brain | $Y=0.00366c+0.06098$ | 0.9951 | 2-500 |
| Uterus | $Y=0.00706c+0.01634$ | 0.9953 | 2-500 |
| Ovary | $Y=0.00860c+0.08735$ | 0.9944 | 2-500 |
| Testis | $Y=0.00484c+0.10250$ | 0.9943 | 2-500 |

Table 2 Intraday and interday precision of yuanhuacine in rat tissues determined by UHPLC-MS/MS(*n* = 6)

| Tissue | <i>c</i> / (ng/ mL) | Intraday precision/% | Interday precision/% | Tissue | <i>c</i> / (ng/ mL) | Intraday precision/% | Interday precision/% |
|--------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Heart | 2 | 6.2 | 6.7 | Brain | 2 | 3.7 | 3.9 |
| | 75 | 5.3 | 5.2 | | 75 | 2.4 | 3.2 |
| | 400 | 3.4 | 3.6 | | 400 | 2.2 | 2.7 |
| Liver | 2 | 6.3 | 5.2 | Uterus | 2 | 4.4 | 4.2 |
| | 75 | 3.2 | 3.9 | | 75 | 1.5 | 2.5 |
| | 400 | 3.1 | 3.8 | | 400 | 3.2 | 3.9 |
| Spleen | 2 | 5.6 | 6.3 | Ovary | 2 | 5.3 | 5.9 |
| | 75 | 2.2 | 3.3 | | 75 | 3.2 | 2.6 |
| | 400 | 4.8 | 4.1 | | 400 | 2.8 | 2.9 |
| Lung | 5 | 4.9 | 4.5 | Testis | 2 | 3.7 | 3.2 |
| | 1000 | 2.5 | 2.1 | | 75 | 3.2 | 2.8 |
| | 16000 | 1.2 | 1.7 | | 400 | 2.1 | 2.9 |
| Kidney | 2 | 5.9 | 5.2 | | | | |
| | 75 | 4.1 | 2.1 | | | | |
| | 400 | 2.9 | 2.3 | | | | |

3.2.4 提取回收率与基质效应 芫花酯甲在各组织中的提取回收率在 74.73% ~ 87.02% 内,RSD 均小于 12%。内标的提取回收率在 82.72% ~ 95.42% 内。芫花酯甲的基质效应在 90.45% ~

102.19% 内,内标的基质效应在 92.48% ~ 104.61%。结果表明基质效应是可以忽略的。实验结果见表 3。

Table 3 Extraction recovery and matrix effect of yuanhuacine in rat tissues ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| Tissue | Added/(ng/mL) | Extraction recovery/% | RSD/% | Matrix effect/% | RSD/% |
|--------|---------------|-----------------------|-------|-----------------|-------|
| Heart | 2 | 82.31 ± 2.34 | 2.8 | 96.25 ± 5.12 | 5.3 |
| | 75 | 80.52 ± 3.45 | 4.3 | 101.02 ± 1.20 | 1.2 |
| | 400 | 84.44 ± 2.21 | 2.6 | 94.93 ± 4.17 | 4.4 |
| Liver | 2 | 80.82 ± 4.25 | 5.2 | 97.51 ± 2.61 | 2.7 |
| | 75 | 77.21 ± 2.31 | 3.0 | 94.27 ± 4.10 | 4.3 |
| | 400 | 83.72 ± 3.30 | 3.9 | 100.02 ± 2.11 | 2.1 |
| Spleen | 2 | 78.47 ± 2.15 | 2.7 | 93.15 ± 6.27 | 6.7 |
| | 75 | 80.24 ± 1.92 | 2.4 | 98.30 ± 4.13 | 4.2 |
| | 400 | 82.70 ± 4.10 | 5.0 | 95.77 ± 5.35 | 5.6 |
| Lung | 5 | 76.12 ± 1.39 | 1.8 | 96.21 ± 4.79 | 5.0 |
| | 1 000 | 80.17 ± 2.81 | 3.5 | 97.28 ± 3.42 | 3.5 |
| | 16 000 | 81.62 ± 1.85 | 2.3 | 98.92 ± 2.91 | 2.9 |
| Kidney | 2 | 82.16 ± 1.21 | 1.5 | 95.53 ± 5.27 | 5.5 |
| | 75 | 80.47 ± 4.18 | 5.2 | 98.17 ± 3.77 | 3.8 |
| | 400 | 81.27 ± 3.71 | 4.6 | 94.79 ± 4.74 | 5.0 |
| Brain | 2 | 80.31 ± 4.22 | 5.3 | 94.35 ± 3.90 | 4.1 |
| | 75 | 79.15 ± 2.63 | 3.3 | 98.24 ± 3.73 | 3.8 |
| | 400 | 83.74 ± 1.47 | 1.8 | 95.43 ± 4.61 | 4.8 |
| Uterus | 2 | 79.94 ± 3.91 | 4.9 | 97.08 ± 5.31 | 5.5 |
| | 75 | 78.74 ± 3.12 | 3.9 | 98.27 ± 3.55 | 3.6 |
| | 400 | 84.10 ± 2.10 | 2.5 | 96.72 ± 6.16 | 6.4 |
| Ovary | 2 | 80.33 ± 2.44 | 3.0 | 95.27 ± 4.60 | 4.8 |
| | 75 | 81.17 ± 3.22 | 4.0 | 98.75 ± 3.15 | 3.2 |
| | 400 | 82.51 ± 1.77 | 2.1 | 97.69 ± 4.02 | 4.1 |
| Testis | 2 | 78.27 ± 2.32 | 3.0 | 97.22 ± 4.61 | 4.7 |
| | 75 | 83.70 ± 2.10 | 2.5 | 99.04 ± 2.21 | 2.2 |
| | 400 | 84.27 ± 1.92 | 2.3 | 96.27 ± 4.13 | 4.3 |

3.2.5 稳定性 各储存条件下,芫花酯甲测定的相对误差在 12% 以内,说明样品室温放置 4 h,样品在 -20 ℃ 放置 30 d,样品在 -20 ℃ 和 37 ℃ 之间反复冻融 3 次以及制备好样品后放置在进样盘中 12 h 的过程中,芫花酯甲较为稳定,各存储条件不影响样本浓度的测定。

3.3 芫花酯甲 DPI 的组织分布

3.3.1 组织分布结果 芫花酯甲在大鼠各组织中的含量结果,如图 4。

实验结果表明,两种给药途径给药后,芫花酯甲在脾、肺、肾以及雌性生殖系统中均有分布,在心、肝、脑和睾丸中几乎检测不到。但是,由图 4 可以看出芫花酯甲肺部吸入后在肺部的浓度显著高于静脉注射给药,同时大大降低了在脾、肾和生殖系统的浓度。

3.3.2 靶向参数的求算 为了进一步全面的评价其靶向性,本研究计算了这两种制剂的靶向参数:相对摄取率(relative ratio,Re)、峰浓度比(concentration ratio,Ce)、靶向效率(targeting efficiency,Te)和相对靶向效率(relative targeting efficiency,R_{te})。

Re 考察的是两种给药方式在肺组织中 AUC 的比值,即 $Re = (AUC_{TT})_p / (AUC_{TT})_i$,其中,TT 表示靶组织(targeting tissue),p 表示肺部给药组(pulmonary administration),i 表示静脉给药组(intravenous administration)。Re 大于 1 表示肺部给药组相对于静脉给药组对肺组织有靶向性,Re 越大靶向性越强,由实验结果计算得 Re 为 6.27 ± 1.12 。肺部给药组在肺组织中的相对摄取率大于 1,表明肺部给药组相对于静脉给药组,具有一定的肺靶向性。

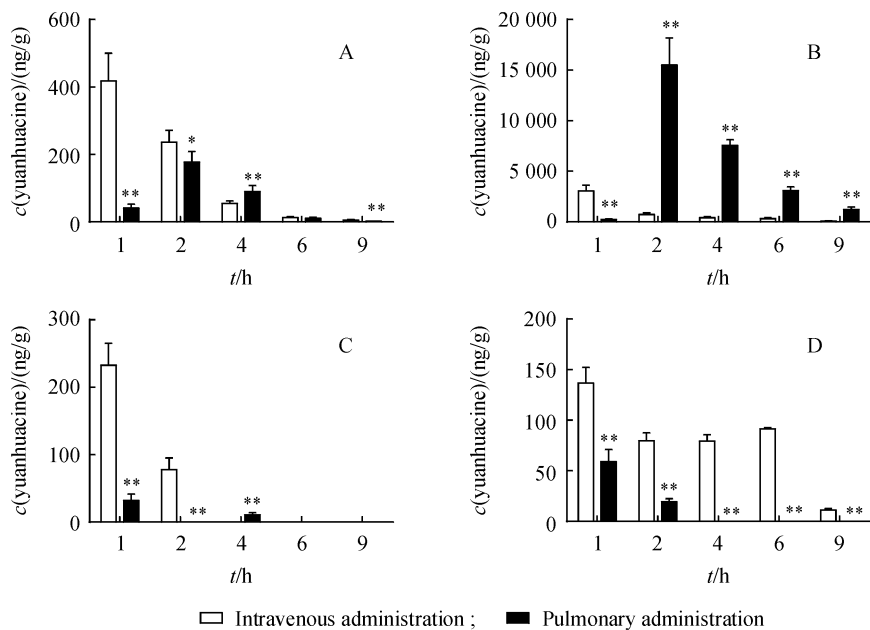


Figure 4 Tissues distribution of yuanhuacine in rat after intravenous administration and pulmonary administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
A: Spleen; B: Lung; C: Kidney; D: Reproductive system
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs intravenous administration

Ce 考察的是两种给药方式在靶组织中 c_{\max} 的比值,即 $Ce = (c_{\max\text{TT}})_p / (c_{\max\text{TT}})_i$,其中,TT 表示靶组织(targeting tissue),p 表示肺部给药组(pulmonary administration),i 表示静脉给药组(intravenous administration)。峰浓度比 Ce 表明制剂改变药物分布的效果,Ce 越大,表明改变药物分布的效果越明显。肺部给药组相对于静脉给药组的峰浓度比 Ce 为 5.17 ± 1.03 ;相对于静脉给药组,肺部给药组能改善芫花酯甲在肺组织的分布。

Te 是同一种给药方式在靶组织中的 AUC 与

非靶组织的 AUC 的比值,即 $Te = AUC_{\text{TT}} / AUC_{\text{NTT}}$,其中,TT 表示靶组织(targeting tissue),NTT 表示非靶组织(non-targeting tissue)。

R_{te} 是肺部给药组与静脉给药组 Te 的比值,能更直观地表征肺部给药组相对于静脉给药组在肺组织的选择性。

Te 以及 R_{te} 见表 4,相对于脾、肾和生殖系统,肺部给药组对肺的靶向性与静脉给药组相比均显著性增强。

Table 4 Lung targeting efficiency (Te) and relative targeting efficiency (R_{te}) of yuanhuacine DPI with pulmonary administration and intravenous administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| Targeting tissue/Non-targeting tissue | $Te_{(i)}$ | $Te_{(p)}$ | $Te_{(p)} / Te_{(i)}$ |
|---------------------------------------|------------------|--------------------------|-----------------------|
| Lung/Spleen | 5.86 ± 1.06 | $94.41 \pm 8.64^{**}$ | 16.41 ± 2.13 |
| Lung/Kidney | 2.73 ± 0.75 | $935.66 \pm 257.09^{**}$ | 367.37 ± 136.73 |
| Lung/Reproductive system | 10.86 ± 1.77 | $604.32 \pm 31.20^{**}$ | 57.14 ± 11.06 |

$Te_{(p)}$:targeting efficiency of pulmonary administration; $Te_{(i)}$:targeting efficiency of intravenous administration. ** $P < 0.01$ vs intravenous administration

4 讨 论

本研究利用乳糖能够改善芫花酯甲 DPI 雾化性能和稳定性的优势,将其用作肺部给药处方的载体,与芫花酯甲混合后用于肺部给药。通过 NGI 装置模拟人体肺部给药,计算各个处方的 FPF,筛

选出最优处方用于肺部给药。值得注意的是,该研究考察的影响因素单一,包括制备工艺在内的诸多因素均未考察,而药物与乳糖混合的顺序和方法都对 DPI 的 FPF 有一定的影响,所以芫花酯甲 DPI 处方的筛选还需要考察更多因素才能得出最优处方。

将选定的芫花酯甲 DPI 处方用于大鼠的肺部给药,对芫花酯甲的体内分析方法的研究结果表明,萃取溶剂的选择尤为重要。本课题组在预实验阶段尝试了多种萃取溶剂提取组织中的芫花酯甲,包括:纯乙酸乙酯、纯乙醚、乙醚-二氯甲烷(6:1)、乙醚-二氯甲烷(8:1)、乙醚-二氯甲烷(9:1),其中乙醚-二氯甲烷(8:1)时的萃取溶剂有最高的提取回收率和最小的基质效应,故将此萃取溶剂用于实验组织样品的处理。大鼠组织分布研究结果表明:通过肺部给药的方式能够大大提高芫花酯甲在肺组织的浓度,减少了其在心、肝、脾、肾、脑以及生殖系统的分布,降低了对其他组织的毒性,提高了疗效。

参考文献

- [1] Hong JY, Nam JW, Seo EK, *et al.* Daphnane diterpene esters with anti-proliferative activities against human lung cancer cells from *Daphne genkwa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2010, **58** (2): 234–237.
- [2] Song Y, Zhang S, Liu H, *et al.* Determination of genkwanin in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a bioavailability study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, **84**(84C): 129–134.
- [3] Li YN, Yin LH, Xu LN, *et al.* A simple and efficient protocol for large-scale preparation of three flavonoids from the flower of *Daphne genkwa* by combination of macroporous resin and counter-current chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2010, **33** (14): 2168–2175.
- [4] Chen Y, Guo J, Tang Y, *et al.* Pharmacokinetic profile and metabolite identification of yuanhuapine, a bioactive component in *Daphne genkwa* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, **112**: 60–69.
- [5] Ying BP, Wang CS, Chou PN, *et al.* Studies on the active principles of the root of Yuan-Hua (*Daphne Genkwa*) [J]. *Acta Chimi Sin* (化学学报), 1978, **35** (1,2): 103–108.
- [6] Zhan ZJ, Fan CQ, Ding J, *et al.* Novel diterpenoids with potent inhibitory activity against endothelium cell HMEC and cytotoxic activities from a well-known TCM plant *Daphne genkwa* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, **13** (3): 645–655.
- [7] Qiao Y, Zhao Y, Wu Q, *et al.* Full toxicity assessment of Genkwa Flos and the underlying mechanism in nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9** (3): e91825.
- [8] Chen YY, Guo JM, Qian YF, *et al.* Toxicity of daphnane-type diterpenoids from Genkwa Flos and their pharmacokinetic profile in rat [J]. *Phytomedicine*, 2013, **21** (1): 82–89.
- [9] Jiang Y, Gu L, Zhang R, *et al.* Evaluation of the indicative roles of seven potential biomarkers on hepato-nephrotoxicity induced by Genkwa Flos [J]. *J Ethnopharmacology*, 2014, **158P A** (3): 317–324.
- [10] Ding L, Hong XH. The current situation and perspective of TCM aerosols [J]. *Chin J Integr Med* (中国中西医结合杂志), 2007, **27** (10): 957–958.
- [11] Tang Y, Zhu JB, Gan L. Effect of HPMC capsule shell on the behaviour of dry powder inhalants [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2004, **35** (1): 32–35.
- [12] Karhu M, Kuikka J, Kauppinen T, *et al.* Pulmonary deposition of lactose carriers used in inhalation powders [J]. *Int J Pharm*, 2000, **196** (1): 95–103.
- [13] Kaialy W, Martin GP, Larhrib H, *et al.* The influence of physical properties and morphology of crystallised lactose on delivery of salbutamol sulphate from dry powder inhalers [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, **89** (89): 29–39.
- [14] Cao W, Chen Y, Zhang ZH. Application of lactose in dry powder inhaler [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2012, **29** (7): 591–596.
- [15] Council of Europe. *European Pharmacopoeia* (欧洲药典) [S]. France: European Directorate for the Quality of Medicines, 2013: 309.