

蛇床子素在急性肾损伤兔体内的药动学研究

王书华^{1*}, 安芳¹, 张力², 张丹参²

(¹ 河北北方学院化学教研室; ² 药理教研室, 张家口 075029)

【摘要】 目的: 对18例肾功能正常与受损兔iv蛇床子素(osthole, Ost)的药动学进行研究。方法: 按生化指标BUN值和Cre值作自身对照并进行肾病理切片, 分成3组(每组 $n=6$): 第1组(肾功能正常组), 第2组(肾功能轻度受损I组), 第3组(肾功能严重受损II组)。第1, 2组iv Ost溶液10 mg/kg, 第3组为7.5 mg/kg。HPLC法测定血浆中Ost的浓度。结果: 与正常组相比, 肾受损I、II组的表现分布容积(V_c)均无显著性改变, 肾轻度受损I组的各药动学参数亦无显著改变; 但肾受损II组的AUC、 $t_{1/2}$ 及CLs较正常组显著改变, 其中AUC升高到正常组的1.7倍, CLs比正常组降低了42%, 而 $t_{1/2}$ 较正常组延长了1.5倍。结论: 当肾衰较重(Cre升高4.2倍)时应调整给药方案。

【关键词】 蛇床子素; 肾功能受损; 药动学; HPLC法

【中图分类号】 R969.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2004)03-0248-03

蛇床子素又名甲基欧芹酚(osthole), 系从伞形科植物蛇床的成熟果实蛇床子(*Fructus Cnidii*)的总香豆素中分离得到的主要有效成分单体。动物药理实验研究表明: 蛇床子素对心血管系统、中枢神经系统等方面具有重要的作用^[1, 2]。蛇床子素药动学的研究已有报道^[3, 4], 而在疾病状态下的药动学研究国内外尚未见报道。本实验利用HPLC法研究了不同程度肾功能受损兔iv Ost后的药动学, 为临床上进一步进行人体内药动学的研究提供理论依据。

1 材料

1.1 试剂与药品

蛇床子素, 购自江苏药物研究所植化室, 实验前用 N, N -二甲基甲酰胺溶解, 吐温-80助溶, 生理盐水稀释至所需浓度。乙腈、甲醇为色谱纯。氯化钠为优级纯。甘油等试剂均为分析纯。BUN、Cre测定试剂盒(北京中生试剂公司)。实验用水为三重蒸馏水。

1.2 动物

新西兰纯种白兔, 体重 2.5 ± 0.1 kg, 雄性。均由张家口医学院动物中心提供。全部动物在本实验室饲养7 d后用于实验。

1.3 仪器设备

Agilent 1100 高效液相色谱仪; D-37520 冷冻离心机 Heraeus(德国); 756MC 紫外可见分光光度计; Olympus BHI 显微镜(日本)。

2 方法

2.1 兔肾衰模型的建立及形态学观察

参照文献^[5]采用一次性皮下注射50%甘油-生理盐水溶液15, 30 ml/kg致兔肾衰。于注射前和注射后24 h耳静脉取血, 测血中BUN值和Cre值作自身对照。Olympus BHI显微镜下观察肾受损兔的病理学改变, 并确定肾轻度受损I组和严重受损II组。

2.2 给药与血样采集

正常组和二种不同程度肾受损组白兔实验前用20%的氨基甲酸乙酯麻醉, iv蛇床子素溶液10, 7.5 ml/kg(含 N, N -二甲基甲酰胺10%, 吐温-80为2%), 注射蛇床子素前和注射后2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min分别由颈动脉插管取血0.5 ml, 置于离心管中备用。

2.3 血样处理^[3]

将不同时间收集的每一个血样0.3 ml分别置于1 ml的离心管中(内含1%肝素0.5 μ l, 80 $^{\circ}$ C烘

*【收稿日期】 2003-10-12 【*通讯作者】 Tel: 0313-8045184 Fax: 0313-8041660 E-mail: wangshuhua1965@yahoo.com.cn

【基金项目】 河北省科技攻关项目(No. d00276147)

干), 8 000 g 离心 5 min。取上清液 0.1 ml, 加入 0.2 ml 乙腈(内含丹皮酚 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 8 000 g 离心 5 min, 上清液分别过膜, 用 HPLC 法测蛇床子素的浓度。

2.4 高效液相色谱条件

色谱柱为 YWG-C18 (10 μm , 4.6 mm \times 250 mm), 20 μl 注射进样器, 流动相为甲醇-水(80:20), 流量 1 ml/min, 检测波长 322 nm, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。进样量 10 μl 。

2.5 标准曲线的制作

精确称取蛇床子素配制浓度为 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的贮备液。分别取兔新鲜血浆 1 ml 加入贮备液, 配成浓度为 0.125, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列标准溶液, 同血样处理方法进行处理。按 HPLC 测定条件, 以蛇床子素与内标物峰面积比值为纵坐标, 蛇床子素浓度为横坐标绘制标准曲线, 得标准曲线方程。

2.6 回收率和精密度

分别取 1 ml 血浆, 加入蛇床子素溶液使其浓度分别为 0.5, 4, 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 按血样处理法, HPLC 法测定回收率和日内、日间精密度。

2.7 数据处理

血药浓度时间数据以 3P87 程序进行拟合, 根据 AIC 最小的原则和 F 检验法选出最佳房室模型, 通过比较拟合优度值和最大误差, 选取值最小的确定权重, 计算各组的主要药动学参数。并对各组的药动学参数进行方差分析, 统计分析使用 SPSS 软件 10.0。

3 结 果

3.1 生化指标及肾病理切片

兔皮下注射甘油-生理盐水溶液后, 5~6 h 后有血尿, BUN 值升高 5~6 倍, Cre 值升高 3.5~4.2 倍, 肾切片可见管型和肾小管上皮细胞变性者为肾受损 I 组; 给药 5~6 h 后有血尿, BUN 值升高 6 倍以上, Cre 值升高 4.2 倍以上, 肾脏切片可见明显病理改变, 皮髓质出现肾小管上皮浊肿或坏死, 管型明显者判断为肾受损 II 组。

3.2 血药浓度测定方法的评价

HPLC 测定法表明, 蛇床子素和丹皮酚的保留时间分别为 6.94, 4.56 min, 较文献值^[3] 出峰时间短(因改变了流动相)。线性范围为 16.0~0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($r=0.9998$)。16.4, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 3 个浓度的回

收率为 99.0%, 99.2%, 98.7%; 日内、日间精密度的 RSD 小于 4% ($n=6$)。

3.3 药时曲线

各组给药后, 不同时间蛇床子素药时曲线(见图 1)。肾受损 II 组血药浓度在 30 min 后与正常组相比具有显著性差异 ($P<0.05$), 其中 180 min 时的浓度增高最大, 为正常组的 4.2 倍。曲线经拟合, 符合一级消除的二房室模型。

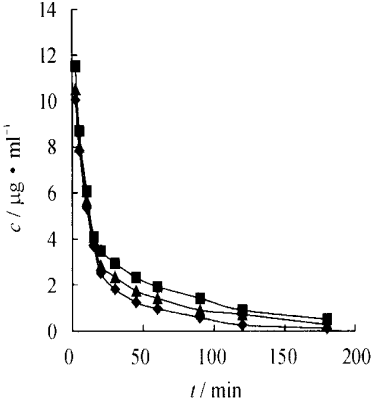


Fig 1. Plasma concentration-time curve after i.v. administration of osthole in rabbits at 10 mg/kg in normal($n=6$)
—○—normal; —▲—renal failure I; —■—renal failure II

3.4 药动学参数

正常与肾受损组蛇床子素药动学参数(见表 1)。与正常组相比, 肾受损 I、II 组的 V_c 均无显著性改变 ($P>0.05$), 轻度受损组的药动学参数亦无显著性变化。但是重度受损组的 $t_{1/2}$ 较正常组显著延长 ($P<0.05$), AUC 值显著增大 ($P<0.01$), CL_s 显著降低 ($P<0.01$), 其中 AUC 是正常组的 1.7 倍, $t_{1/2}$ 延长到对照组的 1.5 倍, CL_s 降低到对照组的 58%。

4 讨 论

本实验研究结果表明, iv 180 min 后 Osthole 浓度从正常组的 0.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 升高到肾受损 II 组的 0.51 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 这与总清除率的降低和 $t_{1/2}$ 延长造成药物在体内的蓄积一致。中医认为蛇床子归肾经, 是自古沿用的一味温肾助阳的补益药物^[9]。为进一步证明肾衰对 Osthole 在兔体内药代动力学的影响, 我们进行了 iv 给药后于不同时间取正常与肾衰(II)兔的肾脏, HPLC 法测定肾组织中 Osthole 的浓度。研究结果表明, 正常兔 iv 给药后 0.5 h 至 4.0 h, Osthole 的浓度由 0.61 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 降为 0.26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

ml, 下降幅度为 57.3%; 而肾衰(Ⅱ)兔 iv 给药后 0.5 h 至 4.0h, Osthole 的浓度由 0.87 μg/ml 降为 0.55 μg/ml, 下降幅度为 36.8%。提示 Osthole 在正常与肾衰兔肾脏中代谢具有显著性差异 ($P<$

0.05)。所以对肾功能严重受损的患者在进行 Osthole 的药动力学研究时应减少用量或延长给药间隔。

Tab 1. The parameter of pharmacokinetics by i. v. 10 mg/ kg administration of osthole ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Parameter	Normal	Renal failure(Ⅰ)	Renal failure(Ⅱ)
$t_{1/2}$ (min)	42.15±1.20	55.00±3.22	60.05±1.24*
Vc(L/kg)	0.78±0.014	0.74±0.019	0.65±0.010
AUC(μg·min/ml)	234.57±6.22	315.74±23.12	407.01±5.30**
CLs(L/min/kg)	0.043±0.0011	0.032±0.0023	0.025±0.0003**

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs normal

本实验中, 正常组的 $t_{1/2}$ 为 (42.15±1.20) min, 与文献 [3] 的结果一致。比庞志功等 [7] 报道的灌胃蛇床子(5g)水煎剂的 17.47 h 短很多, 这可能与给药途径有关, 但 AUC 值一致。

【参考文献】

[1] 沈丽霞(Shen LX), 张丹参(Zhang DS), 张力(Zhang L), 等. 蛇床子素对学习记忆的影响及其机制分析[J]. 药学报(*Acta Pharm Sin*), 1999, **34**(6): 405-409.
[2] 沈丽霞(Shen LX), 金乐群(Jin LQ), 张丹参(Zhang DS), 等. 蛇床子素对 AlCl₃ 致急性衰老模型小鼠记忆障碍的保护作用[J]. 药学报(*Acta Pharm Sin*), 2002, **37**(3): 178-180.

[3] Tsai TH, Tsai TR, Chen CC, *et al.* Pharmacokinetics of osthole in rat using high-performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1996, **14**(6): 749-753.
[4] 安芳(An F), 王书华(Wang SH), 张丹参(Zhang DS), 等. 蛇床子素在兔体内药物代谢动力学[J]. 药学报(*Acta Pharm Sin*), 2003, **38**(8): 571.
[5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982, 809.
[6] 王滨生(Wang BS). 蛇床子补虚作用的临床应用沿革[J]. 中国中药杂志(*China J Chin Mater Med*), 1995, **20**(1): 53-54.
[7] 庞志功(Pang ZG), 汪宝琪(Wang BQ), 何丹(He D). 用β-环糊精包含荧光法研究水煎剂中蛇床子素的药动学[J]. 西安医科大学学报(*J Xi'an Med Univ*), 2002, **23**(1): 14-16.

Pharmacokinetics of Osthole in Rabbits with Impaired Renal Function

WANG Shu-Hua¹, AN Fang¹, ZHANG Li², ZHANG Dan-Sheng²
(¹Department of Chemistry; ²Department of Pharmacology, Hebei North University, Zhangjiakou 075029, China)

【ABSTRACT】 AIM: The pharmacokinetics of osthole was studied in 18 rabbits with normal and impaired renal function after intravenous administration. **METHOD:** Eighteen New Zealand rabbits were randomly divided into three groups (for each group, $n=6$), based on their BUN, and Cre value, and their kidneys were taken out to make microscopic sections by HE colouring to confirm the different stages of renal failure: group 1 (normal renal function); group 2 (mild renal impairment); group 3 (severe renal impairment). All rabbits in group 1, 2 received dose of 10 mg/kg and 3 received dose of 7.5 mg/kg, respectively. The osthole concentration of plasma was determined by HPLC. **RESULT:** The apparent volumes of distribution were not significantly different from each other in the three groups. AUC was 1.7 fold, $t_{1/2}$ was 1.5 fold higher and CLs was 42% lower in group 3 than those in group 1. **CONCLUSION:** The results suggests that the therapeutical protocol of osthole for the patients with severe renal failure in clinic should be adjusted.

【KEY WORDS】 Osthole; Impaired renal function; Pharmacokinetics; HPLC