

水飞蓟素对大鼠体内他莫昔芬药动学的影响

祁英杰*, 闫小玉, 高文娟, 周艳, 陈晓辉, 毕开顺, 戴荣华[#](沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R285;R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)03-0210-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.03.06

摘要 目的:研究水飞蓟素对大鼠体内他莫昔芬药动学的影响。方法:色谱柱为Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-20 mmol/L K₂HPO₄水溶液(70:30, V:V, 磷酸调pH值至3.0),流速为1.0 ml/min,柱温为45 ℃,检测波长λ_{ex}=260 nm, λ_{em}=375 nm。对照组大鼠灌胃他莫昔芬丙二醇溶液(15 mg/kg),实验组大鼠在灌胃水飞蓟素水溶液(70 mg/kg)30 min后灌胃他莫昔芬丙二醇溶液(15 mg/kg)。测定不同时间2组大鼠血药浓度,以DAS 2.1.1版药动学程序软件计算药动学参数。结果:与对照组比较,实验组的c_{max}显著增加(P<0.05),AUC_{0-36 h}和AUC_{0-∞}分别增加了52.7%~80.1%和56.4%~82.1%(P=0.005),CL/F降低了29.5%~41.3%(P=0.005),而t_{1/2}和t_{max}没有显著性差异。结论:水飞蓟素对大鼠体内他莫昔芬的药动学有显著影响,临床上二者合用时应注意潜在的药物相互作用。

关键词 他莫昔芬;水飞蓟素;药动学;高效液相色谱法

Effects of Silymarin on Pharmacokinetics of Tamoxifen in Rats

QI Ying-jie, YAN Xiao-yu, GAO Wen-juan, ZHOU Yan, CHEN Xiao-hui, BI Kai-shun, DAI Rong-hua (School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of silymarin on pharmacokinetics of tamoxifen in rats. METHODS: The analysis was performed on a Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)column, with the acetonitrile-20 mmol/L K₂HPO₄(70:30, V:V, phosphoric acid to adjust the pH value to 3)as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min, Column temperature was 45 ℃, and the detective wave length were λ_{ex}=260 nm, λ_{em}=375 nm. Control group was given tamoxifen propylene glycol solution intragastrically (15 mg/kg); trial group was given silymarin solution 70 mg/kg, and received tamoxifen propylene glycol solution 15 mg/kg intragastrically 30 min later. Blood concentration of tamoxifen was determined by HPLC. The data were calculated by DAS2.0 software. RESULTS: Compared with control group, c_{max} of tamoxifen in trial group was increased significantly(P<0.05), AUC_{0-36 h} and AUC_{0-∞} of tamoxifen was increased by 52.7%-80.1% and 56.4%-82.1%(P=0.005), respectively; CL/F of tamoxifen was decreased by 29.5%-41.3%(P=0.005), and no change of t_{max} and t_{1/2} was observed. CONCLUSIONS: There is significant effect of silymarin on tamoxifen in rats. Great importance should be attached to drug interaction during combined use of them in the clinic.

KEY WORDS Tamoxifen; Silymarin; Pharmacokinetics; HPLC

表3 京大戟与红大戟各提取物对家兔破损皮肤刺激评分的比较

Tab 3 Comparison of skin irritation score of the extracts of *E. peginensis* and *K. valerianoides*

组别	n	红斑,只	水肿,只	反应级数	等级评价
空白对照组	4	0	0	0	无刺激性
京大戟水提取物组	4	8	4	3.0	中度刺激性
京大戟醇提取物组	4	14	12	6.5	强度刺激性
红大戟水提取物组	4	0	0	0	无刺激性
红大戟醇提取物组	4	0	0	0	无刺激性

实验,结果显示京大戟具有一定的急性毒性和眼、皮肤刺激性,这不仅证明了《本草纲目》中“其根辛苦,戟人咽喉”的认识^[6],也支持了《中国药典》对其“有毒”的规定。而红大戟的急性毒性和刺激性均不明显,故对于《中国药典》对其“有小毒”的规定还有待深入研究。

本研究结果表明,京大戟具有一定的急性毒性和刺激性,

* 硕士研究生。研究方向:药动学。电话:024-23986259。
E-mail:princessqyj@sina.com

[#] 通信作者:副教授,博士。研究方向:药动学。电话:024-23986259。E-mail:ronghuadai@sina.com

而红大戟的急性毒性和刺激性均不明显,两者的安全性存在差异。因此,为了保证两种大戟在临床用药的安全,有必要将其区别对待,不可混淆。至于两者在泻下和逐水等药效方面的异同,还有待今后进一步的比较研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:209, 140.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社, 2006:144, 1384.
- [3] 《中药、天然药物急性毒性实验技术指导原则》课题调研组. 中药、天然药物急性毒性实验技术指导原则[S]. 北京:国家食品药品监督管理局, 2005.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2001:234.
- [5] 曾明辉, 谭正怀, 陈璐, 等. 消痤洁肤乳膏皮肤用药安全性实验研究[J]. 中国药房, 2010, 21(45):4256.
- [6] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社, 1991:1131. (收稿日期:2012-02-15 修回日期:2012-06-27)

他莫昔芬(Tamoxifen)属于三苯乙烯非甾体抗雌激素类抗肿瘤药物,用于治疗乳腺癌^[1-2]。在体内,他莫昔芬主要通过肝脏细胞色素CYP3A4酶系统广泛代谢,是P-糖蛋白(P-gp)的底物^[3-5]。很多癌症患者在接受化疗药物的同时都会使用一些植物药。植物药可通过影响药物代谢酶活性和调节药物转运蛋白改变药物的吸收和代谢等过程,从而影响化疗药物的疗效或导致不良反应的发生。水飞蓟素(Silymarin)是由水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟宁、水飞蓟亭组成的保肝护肝的黄酮类成分,常被乳腺癌患者用作肝病治疗^[6-7]。有研究报道,水飞蓟宾能够影响大鼠体内他莫昔芬的药动学过程^[8]。因此,当水飞蓟素与他莫昔芬合用时,可能会产生潜在的药物相互作用。由于目前对二者相互作用的研究未见报道,故笔者研究水飞蓟素对大鼠体内他莫昔芬药动学的影响,为临床合理用药提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC 2010HT型高效液相色谱(HPLC)仪、LC-10ATvp型输液泵(日本岛津公司);T8ZW02型紫外杀菌灯(40 W,上海沪星公司);RF-10AXL型荧光检测器、AB135-S型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);XW-80A型涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);SC-2546型低速离心机、HC-2516型高速离心机(科大创新股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

他莫昔芬(昆山三友医药有限公司,批号:110401);水飞蓟素胶囊(德国马博士大药厂,批号:B09030311,规格:40 mg/粒);尼泊金丁酯(内标,山东禹王实业有限公司,批号:060105);乙腈、正己烷和磷酸为色谱纯,氢氧化钠为分析纯,水为纯净水。

1.3 动物

SD大鼠12只,♀,体质量(220±20)g,由沈阳药科大学实验动物中心提供(动物使用许可证号:SCXK(京)2009-0004)。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 他莫昔芬贮备液 精密称取他莫昔芬12.13 mg,置100 ml量瓶中,用乙腈溶解并定容,摇匀,得0.12 mg/ml的贮备液,4℃贮藏,备用。

2.1.2 他莫昔芬标准工作液 精密吸取他莫昔芬贮备液适量,加乙腈稀释至所需浓度,摇匀,即得。

2.1.3 内标工作液 精密称取尼泊金丁酯10.04 mg,用10 ml乙腈溶解制备成1 mg/ml的内标贮备液,4℃贮藏,备用。精密吸取内标贮备液适量,加乙腈稀释为20 μg/ml的内标工作液,即得。

2.2 色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:45℃;流动相:乙腈-20 mmol/L K₂HPO₄水溶液(70:30, V/V,磷酸调pH值至3.0);流速:1.0 ml/min;检测波长:λ_{ex}=260 nm,λ_{em}=375 nm;进样量:20 μl。

2.3 血浆样品的处理

取血浆样品200 μl,加20 μg/ml内标工作液50 μl和2 mmol/L的氢氧化钠溶液40 μl,涡旋20 s混匀。加入2 ml正己烷,涡旋3 min,以4 000 r/min离心10 min,取上层有机相转至

洁净的5 ml聚丙烯塑料管中,50℃下N₂吹干。用70%乙腈100 μl复溶,13 200/min离心5 min,吸取上清液置于200 μl聚丙烯塑料管中,紫外杀菌灯下垂直照射25 min。精密吸取20 μl进样分析。

2.4 标准曲线的制备

空白血浆中加入他莫昔芬标准工作液适量,制成含他莫昔芬分别为20、60、80、100、200和400 ng/ml的样品,按“2.3”项下方法处理后进样测定。以他莫昔芬和内标的峰面积比值(R)为纵坐标,他莫昔芬质量浓度(c)为横坐标,进行线性回归,得回归方程为 $R=0.020c-0.021$ ($r=0.9993, n=6$)。结果表明,他莫昔芬质量浓度在20~400 ng/ml范围内与他莫昔芬和内标的峰面积比值呈良好线性关系。定量下限为20 ng/ml。

2.5 专属性考察

分别取空白血浆、空白血浆+他莫昔芬+内标、大鼠给药后2 h血样进样测定。结果,内标和他莫昔芬的保留时间分别为3.3 min和13.5 min,内源性物质无干扰。色谱见图1。

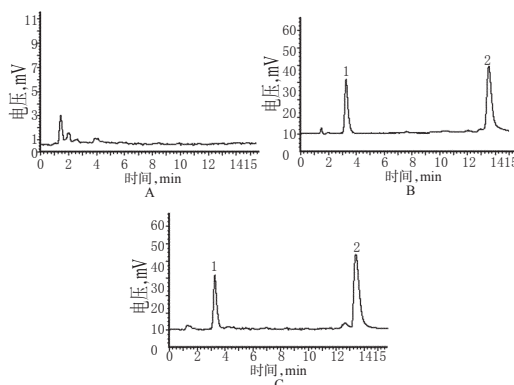


图1 高效液相色谱图

A.空白血浆; B.空白血浆+内标+他莫昔芬; C.大鼠给药后2 h血样; 1. 尼泊金丁酯; 2. 他莫昔芬

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma + internal standard + tamoxifen; C. plasma sample 2 h after administration; 1. butylparaben; 2. tamoxifen

2.6 精密度试验

按“2.4”项下方法制备低、中、高质量浓度(60、100、320 ng/ml)的他莫昔芬标准工作液,再按“2.2”项下色谱条件测定日内精密度(6次)和日间精密度(3 d)。结果,日内精密度的RSD分别为1.3%、7.3%和6.6%,日间精密度的RSD分别为7.5%、6.9%和3.9%。

2.7 回收率试验

按“2.3”项下方法,制备低、中、高质量浓度(60、100、320 ng/ml)他莫昔芬的不同含药血浆(6份)。以含药血浆中他莫昔芬峰面积与未经提取的相同质量浓度他莫昔芬标准工作液峰面积比较,计算平均提取回收率,每个质量浓度计算3次。结果,低、中、高质量浓度他莫昔芬的平均提取回收率分别为93.8%、94.5%和95.8%;内标的平均提取回收率为93.7%。

2.8 稳定性试验

取“2.7”项下样品,室温放置24 h,考察室温稳定性;反复冻融3次,考察冻融稳定性;−20℃放置14 d,考察长期稳定性。结果,3种贮藏条件下低、中、高质量浓度样品的相对偏差均在(±13.8%)以内,RSD<8.5%,表明血浆样品在测定条件下稳定性良好。

2.9 药动学研究

SD大鼠随机均分成2组,每组6只。给药前禁食12 h,自由饮水。对照组大鼠ig他莫昔芬丙二醇溶液(15 mg/kg);实验组大鼠ig水飞蓟素水溶液(70 mg/kg),30 min后ig他莫昔芬丙二醇溶液(15 mg/kg)。2组均于给药前和给药后0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、36 h眼眶取血0.4 ml,置肝素钠抗凝离心试管中,15 000 r/min离心5 min,分离血浆,-80 °C低温冷冻贮藏,待测。以DAS 2.1.1版药动学程序软件计算药动学参数,统计学处理采用SPSS16.0软件。大鼠ig 15 mg/kg他莫昔芬后的平均血药浓度-时间曲线见图2;药动学参数见表1。

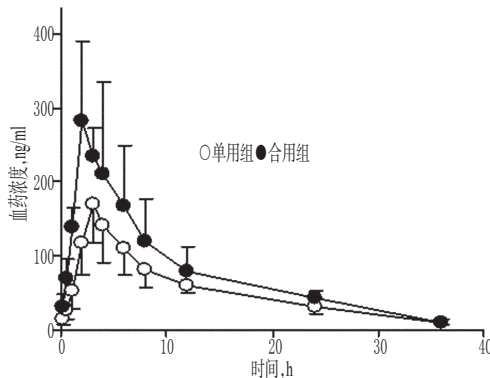


图2 大鼠ig 15 mg/kg他莫昔芬后的平均血药浓度-时间曲线 (n=6)

Fig 2 Mean blood concentration-time curves of tamoxifen in rats after intragastrical administration of tamoxifen 15 mg/kg (n=6)

表1 服用水飞蓟素前后大鼠体内他莫昔芬的药动学参数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of tamoxifen in rats before and after taking silymarin ($\bar{x} \pm s$)

参数	对照组	实验组
AUC _{0-36h} , μg/(h·L)	1 835 ± 244	2 803 ± 747
AUC _{0-∞} , μg/(h·L)	1 983 ± 209	3 105 ± 740
t _{1/2} , h	8.67 ± 2.67	9.24 ± 2.51
t _{max} , h	2.83 ± 0.75	2.83 ± 0.98
CL/F, L/(h·kg)	7.63 ± 0.80	5.04 ± 0.98
c _{max} , μg/L	196.9 ± 35.2	349.7 ± 79.9

3 讨论

笔者参照相关文献^[9],对他莫昔芬荧光衍生化反应的实验方法进行了研究,采用离线紫外照射柱前衍生化,通过比较各影响因素下他莫昔芬衍生化产物的色谱峰面积来确定最佳衍生化条件。实验考察了不同紫外光强度(紫外灯254 nm、紫外杀菌灯20 W、紫外杀菌灯40 W、紫外杀菌灯60 W)、不同照射时间(10、15、20、25、30 min)和不同容器(透明玻璃自动进样小瓶、聚丙烯塑料管)3种因素对他莫昔芬衍生化产物的影响。结果表明,紫外光强度对他莫昔芬影响较大,当紫外光强度为40 W时,他莫昔芬衍生化产物峰面积最大,随着紫外光强度的继续增加,衍生化产物峰面积下降;照射时间从10 min逐渐增加到30 min,衍生化产物峰面积先略有增加而后减小,照射25 min时衍生化产物的峰面积最大;反应容器对他莫昔芬影响不大,考虑到聚丙烯塑料管具有经济、方便的特点,故选用其作为反应容器。根据单因素实验的结果确定衍生化反应的最佳

条件为:在聚丙烯塑料管中,紫外杀菌灯40 W下垂直照射25 min。此条件下荧光产物响应高,衍生作用稳定、重复性好,可以作为他莫昔芬荧光衍生化反应的最佳条件。

本研究在选取内标物过程中考察了与尼泊金丁酯结构相似的氯米芬、托瑞米芬等,但发现血浆样品中均有不同吸收峰出现,与内标、药物难以分离,可能是内标经紫外照射后产生干扰峰,且与他莫昔芬、药物的结构差异小,影响分离所致。反复实验之后采取尼泊金丁酯作为内标,避免了这些问题。

实验组中,水飞蓟素的存在显著地改变了他莫昔芬的药动学参数。AUC_{0-36h}、AUC_{0-∞}、CL/F与c_{max}与对照组比较均有显著性差异(P<0.01)(AUC_{0-36h}、AUC_{0-∞}分别增加了52.7%~80.1%和56.4%~82.1%,CL/F降低了29.5%~41.3%),而t_{1/2}和t_{max}没有显著性差异。这可能是因为水飞蓟素是细胞色素CYP3A4介导代谢的底物,同是也是小肠和肝脏中外排蛋白P-gp的底物,水飞蓟素可以抑制这种代谢途径,促进他莫昔芬的肠吸收,减少其首关效应,从而使他莫昔芬的血药浓度升高,药-时曲线下面积增大,清除率降低。因此,在临床合用他莫昔芬和水飞蓟素时应谨慎,调整他莫昔芬剂量并适时检测其血药浓度,防止潜在药物相互作用的发生,避免不良反应,使临床用药更加合理、安全。

参考文献

- [1] 叶魏武,王晓稼.三苯氧胺与乳腺癌防治研究进展[J].肿瘤研究与临床,2005,17(6):425.
- [2] 孙素红,黄琴,曾峰.雌激素受体不同表达对局部晚期乳腺癌TC化疗方案的敏感性观察[J].中国药房,2009,20(20):1558.
- [3] Jacolot F, Simon I, Dreano I, *et al.* Identification of the cytochrome P₄₅₀ III_A family as the enzymes involved in the n-demethylation of tamoxifen in human liver micro-somes [J]. *Biochem Pharmacol*,1991,41(12):1911.
- [4] Mani C, Gelboin HV, Park SS, *et al.* Metabolism of the antimammary cancer antiestrogenic agent tamoxifen. I. Cytochrome P₄₅₀-catalysed N-demethylation and 4-hydroxylation[J]. *Drug Metab Dispos*, 1993, 21 (4) : 645.
- [5] Rao US, Fine RL, Scarborough GA. Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human P-glycoprotein [J]. *Biochem Pharmacol*,1994,48(2):287.
- [6] Bode JC. Silymarin for the therapy of liver disease[J]. *AJG*, 1999,94(2):545.
- [7] Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH. Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies[J]. *Integr Cancer Ther*,2007,6(2):110.
- [8] Kim CS, Choi SJ, Park CY, *et al.* Effects of silybinin on the pharmacokinetics of tamoxifen and its active metabolite, 4-hydroxytamoxifen in rats[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(2):79.
- [9] Golander Y, Sternson LA. Paired-ion chromatographic analysis of tamoxifen and two major metabolites in Plasma [J]. *J Chromatogr*,1980,181(1):41.

(收稿日期:2012-02-21 修回日期:2012-06-18)