

软坚散结方剂对大鼠体内 5-氟尿嘧啶药代动力学行为的影响

李锡晶¹, 刘国婷², 赵秀梅¹, 姚蔷³, 胡人杰^{1*}
(1. 天津市医药科学研究所, 天津 300020; 2. 天津市北辰医院, 天津 300400;
3. 天津市人民医院, 天津 300121)

[摘要] 目的:考察软坚散结方剂对 5-氟尿嘧啶大鼠体内药动学行为的影响。方法:大鼠单独注射 5-氟尿嘧啶或联合灌胃给予软坚散结方剂,利用 10% 高氯酸溶液提取血浆中 5-氟尿嘧啶,采用 HPLC 测定 5-氟尿嘧啶含量,流动相 0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 265 nm。运用 WinNonlin 5.2.1 软件以非房室模型法计算药动学参数。结果:在软坚散结方剂的干预下,5-氟尿嘧啶在大鼠体内血药浓度的达峰时间显著缩短,联用组和单用组分别为(0.381±0.075), (0.514±0.122) h;表观分布容积显著减少,2 组分别为(5.915±1.196), (11.307±5.393) mL;2 组的其他参数均未见显著性差异。结论:软坚散结方剂能促进大鼠体内 5-氟尿嘧啶的吸收,抑制后者由血液向组织中分布。

[关键词] 软坚散结方剂;水煎剂;5-氟尿嘧啶;药代动力学
[中图分类号] R969.1;R289.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)11-0089-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015110089
[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150414.1128.013.html>
[网络出版时间] 2015-04-14 11:28

Effect of Ruanjian Sanjie Prescription on Pharmacokinetic Behavior of 5-Fluorouracil in Rats LI Xi-jing¹, LIU Guo-ting², ZHAO Xiu-mei¹, YAO Qiang³, HU Ren-jie^{1*} (1. *Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China*; 2. *Tianjin Beichen Hospital, Tianjin 300400, China*; 3. *Tianjin People's Hospital, Tianjin 300121, China*)

[Abstract] **Objective:** To analysis effect of Ruanjian Sanjie (RJ) prescription on pharmacokinetic behavior of 5-fluorouracil (5-Fu) in rats. **Method:** Rats were divided into two groups, one group was given 5-Fu only and the other one was given 5-Fu and RJ prescription together. Plasma samples were separated and extracted by 10% perchloric acid solution, HPLC was employed to determine the content of 5-Fu with mobile phase of 0.01 mol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate, a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ and detection wavelength at 265 nm. Pharmacokinetic parameters were calculated by WinNonlin 5.2.1 software with non-compartmental model. **Result:** RJ prescription could obviously reduce T_{max} [the combined group was (0.381±0.075) h and the single group was (0.514±0.122) h] and apparent volume of distribution [the combined group was (5.915±1.196) mL and the single group was (11.307±5.393) mL] of 5-Fu in rats, but no obvious changes on other parameters. **Conclusion:** RJ prescription can promote absorption of 5-Fu in rats by intraperitoneal injection, while inhibiting trend of 5-Fu distribution from blood to tissues.

[Key words] Ruanjian Sanjie prescription; decoction; 5-fluorouracil; pharmacokinetics

药物作为肿瘤的主要治疗手段,在控制肿瘤生长、侵袭、转移方面发挥着重要作用。但由于绝大多数肿瘤化疗药物对肿瘤细胞(组织)不具有特异性,在杀伤肿瘤细胞的同时会不可避免地破坏正常组织细胞,产生一些毒副作用。很多癌症患者在接受常规化疗的同时采用中草药作为补充或替代的医治手

[收稿日期] 20141207(004)
[基金项目] 天津市卫生局中医、中西医结合科研专项(07038)
[第一作者] 李锡晶,硕士,研究实习员,从事中药药理、肿瘤药理研究,Tel:022-27236112,E-mail:lixijing1984@163.com
[通讯作者] *胡人杰,研究员,教授,硕士生导师,从事中药药理、肿瘤药理研究,E-mail:renjiehu@163.com

段,以降低化疗药物的毒性,提高治疗效果。临床实践证明中药确实具有一定抗癌、增强免疫、减轻化疗药物毒性的作用,通过单方、复方或其他制剂的形式应用于现有的化疗方案中^[1-2],同时配合西医治疗,可在减轻患者痛苦、提高生存质量等方面使肿瘤患者获益。

软坚散结法是中医治疗肿瘤的常用治则,中医理论认为该类药物能使肿块软化后逐渐消散^[3]。软坚散结方剂源自临床,由夏枯草、半夏、海藻、山慈菇组成,这 4 味中药均具有软坚散结的功效,药理学研究证明四者亦均具有明确的抗肿瘤活性^[4-8]。前期血清药理及体内抗肿瘤试验证实软坚散结方剂具有抗肿瘤活性,且对化疗药物 5-氟尿嘧啶具有增效作用^[9-10]。5-氟尿嘧啶作为单药或联合应用治疗恶性肿瘤的药物之一,至今仍是治疗胃癌、结肠癌、乳腺癌等的一线药物。该药作为 1 种细胞周期特异性药物,其活性产物会影响 DNA 合成和 RNA 翻译过程。虽疗效肯定,但其对骨髓和消化道的毒性和患者耐药性的产生使治疗效果不尽如人意^[11]。本实验选择 5-氟尿嘧啶作为软坚散结方剂的联合药物,采用 HPLC 考察了该方剂对 5-氟尿嘧啶在大鼠体内的代谢过程,探讨该方剂增效作用的机制,分析其对于肿瘤化疗药物药代动力学行为的影响,为肿瘤患者的临床联合用药方案设计提供实验依据。

1 材料

LC-2010AHT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),YGL-16G 型台式高速离心机(上海医用分析仪器厂),GL-88B 型涡旋振荡器(江苏海门市林贝尔仪器制造有限公司),AE240 型 1/1 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

夏枯草(唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* 的干燥果穗)、半夏(天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* 的干燥块茎)、海藻(马尾藻科植物海蒿子 *Sargassum pallidum* 的干燥藻体)、山慈菇(兰科植物杜鹃兰 *Crematstra appendiculata* 的干燥假鳞茎)均购于天津市仁心堂大药房,经天津市医药科学研究所朱永智研究员鉴定均符合 2010 年版《中国药典》的规定;5-氟尿嘧啶注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号 1007052),5-氟尿嘧啶对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100187-200602),0.9% 氯化钠注射液(天津金耀氨基酸有限公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 200 ~ 250 g,由军事医学科学院卫生环境医学研究所动物实验中心

提供,合格证号 SCXK(军)2009-003。

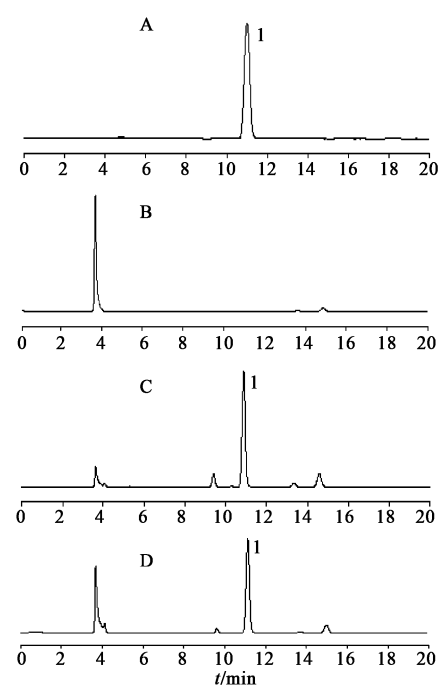
2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 软坚散结水煎剂^[12] 按处方比例[夏枯草-半夏-海藻-山慈菇(3:3:2:2)]称取药材共 500 g,置于大小适当的容器中,加 8 倍量水浸泡 2 h,煮沸 30 min,滤过,药渣加 6 倍量水煎煮 20 min,过滤,合并 2 次滤液,水浴锅浓缩至适当浓度,根据临床给药剂量按等效系数换算成大鼠给药剂量,给药时药液稀释至 0.9 g·mL⁻¹。

2.1.2 对照品溶液 精密称取 5-氟尿嘧啶对照品适量,加甲醇配成 1 g·L⁻¹的对照品溶液,4 ℃ 保存。

2.2 色谱条件 SinoChrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相 0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钾水溶液,流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 265 nm,柱温 30 ℃,进样量 20 μL,见图 1。



A. 对照品;B. 空白血样;C. 空白血浆 + 5-氟尿嘧啶;D. 供试品;1. 5-氟尿嘧啶

图 1 软坚散结水煎剂给药 1 h 后血浆 HPLC
Fig. 1 HPLC Chromatogram of plasma after administered Ruanjian Sanjie decoction in 1 h

2.3 血浆样品处理 精密吸取大鼠血浆样品 100 μL 加至 1.5 mL 具塞塑料离心管中,漩涡混匀 3 min,精密加入 10% 高氯酸溶液 200 μL,漩涡振荡 1 min,10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液分析。

2.4 线性范围及定量限 取大鼠空白血浆 100 μL,精密加入 5-氟尿嘧啶对照品溶液,使其质量浓

度分别为 0.1, 0.3, 1, 3, 5, 10, 30, 50, 100 mg·L⁻¹, 按 2.3 项下方法处理, 取上清液进样分析, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 6\,976.5X - 998.23$ ($R^2 = 0.999\,9$), 线性范围 0.1 ~ 100 mg·L⁻¹, 定量下限 0.1 mg·L⁻¹。

2.5 精密度试验 取空白血浆 100 μL, 精密加入 5-氟尿嘧啶对照品溶液, 分别配制 0.3, 10, 50 mg·L⁻¹ 的质量控制样品, 按 2.3 项下方法处理 ($n = 5$), 连续 3 d 测定样品浓度, 结果 3 个质量浓度的日内精密密度 RSD 分别为 2.6%, 0.6%, 0.1%, 日间精密密度 RSD 依次为 0.4%, 0.1%, 2.8%。

2.6 回收率试验 取空白血浆 100 μL, 精密加入 5-氟尿嘧啶对照品溶液, 分别配制 0.3, 10, 50 mg·L⁻¹ 的质控样品, 按 2.3 项下方法处理 ($n = 5$), 记录峰面积, 计算回收率分别为 100.3%, 102.6%, 102.3%, RSD 分别为 2.1%, 1.5%, 2.0%, 满足了生物样品的测定要求。

2.7 稳定性试验 取空白血浆 100 μL, 精密加入 5-氟尿嘧啶对照品溶液, 分别配制 0.3, 10, 50 mg·L⁻¹ 的质控样品, 每个质量浓度平行配制 15 个样品, 置 -20 ℃ 冰箱中保存, 分别冻融不同时间 (1, 3, 5 d), 按 2.3 项下方法处理, 考察样品在冷冻贮存条件下的稳定性, 结果该成分含量的 RSD 分别为 3.1%, 3.7%, 2.4%。

2.8 动物分组、给药及采样 取 SD 大鼠 12 只, 随机分成 2 组, 包括 5-氟尿嘧啶单用组和 5-氟尿嘧啶-软坚散结方联用组, 每组 6 只, 雌雄各半。联用组按 9 g·kg⁻¹ 灌胃软坚散结方剂, 连续给药 7 d, 单用组同法给予相同体积水。于末次给药后 1 h, 2 组动物均按 50 mg·kg⁻¹ 腹腔注射给予 5-氟尿嘧啶溶液。给药前取血作为空白对照, 分别在腹腔注射 5-氟尿嘧啶后 5, 10, 20, 30, 45 min 和 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12 h 用毛细管 (预先用肝素处理) 于眼眶内静脉丛取血 0.5 mL, 将采集血液置于 5 mL 肝素化的离心管中, 3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 得血浆, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.2 项下条件测定, 绘制药-时曲线, 见图 2。采用 WinNonlin 5.2.1 软件按非房室模型法计算给药后大鼠体内的 5-氟尿嘧啶药代动力学参数, 数据采用 SPSS 的独立样本 t 检验进行组间药动学参数差异的判定, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异, 见表 1。结果显示, 5-氟尿嘧啶与软坚散结方剂合用后能使大鼠体内 5-氟尿嘧啶血药浓度的达峰时间 (T_{max}) 显著缩短, 表观分布容积 (V_d) 显著降低 ($P < 0.05$), 而 2 组间消除速率常数 (K_e)、清除率

(CL)、达峰浓度 (C_{max})、药时曲线下面积 (AUC) 等参数均无显著性差异。

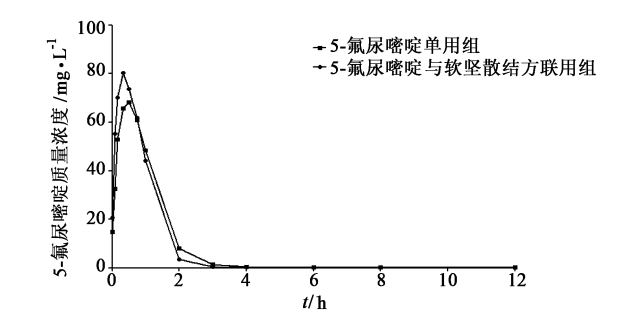


图 2 大鼠 5-氟尿嘧啶单用组和联用组的平均血药浓度-时间曲线 ($n = 6$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of 5-fluorouracil in rats between the single group and the combined group ($n = 6$)

表 1 5-氟尿嘧啶单用组和联用组的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 1 Pharmacokinetic parameters of 5-fluorouracil in rats between the single group and the combined group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	单用组	联用组
K_e	h^{-1}	0.064 ± 0.030	0.096 ± 0.026
$T_{1/2}$	h	9.881 ± 4.420	7.668 ± 1.812
T_{max}	h	0.514 ± 0.122	$0.381 \pm 0.075^{1)}$
C_{max}	$mg \cdot L^{-1}$	73.412 ± 8.709	81.746 ± 4.484
CL	$mL \cdot h^{-1}$	0.528 ± 0.150	0.542 ± 0.061
V_d	mL	11.307 ± 5.393	$5.915 \pm 1.196^{1)}$
$AUC_{0-\infty}$	$mg \cdot h \cdot L^{-1}$	101.113 ± 23.553	93.495 ± 10.899
$AUC_{0-12\,h}$	$mg \cdot h \cdot L^{-1}$	95.909 ± 23.264	91.304 ± 9.680

注: 与单用组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

5-氟尿嘧啶作为一线肿瘤化疗药物, 作用于核酸代谢环节, 通过阻碍 DNA 的合成而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。研究表明 5-氟尿嘧啶与其他药物联合应用时常会产生相互作用, 包括药代动力学方面的变化, 吡哆美辛、尼美舒利与 5-氟尿嘧啶联用后, 会对后者的药代动力学参数产生影响^[13-14]。中药联合 5-氟尿嘧啶可提高化疗敏感性, 并降低后者的毒副作用, 这在临床实践中并不少见, 但关于药动学相互影响的报道有限。目前, 我国关于中药-西药联合应用 (特别在肿瘤临床治疗中) 的研究多强调临床疗效的评价, 药代动力学相互作用等基础研究重视程度不够^[15]。

5-氟尿嘧啶血浆样品的前处理方法常采用液液萃取法和蛋白沉淀法^[16-19]。预试验以乙酸乙酯、不同比例乙酸乙酯-异丙醇等作为萃取液进行提取, 操作复杂且提取回收率低, HPLC 色谱图中显示有杂

质干扰。尝试采用甲醇、乙腈、三氯乙酸蛋白沉淀剂进行沉淀,结果显示甲醇沉淀法不能一次性完全沉淀蛋白,乙腈、三氯乙酸沉淀蛋白效果虽强于甲醇,但进样分析时内源性物质和 5-氟尿嘧啶会同时被洗脱出来,会干扰 5-氟尿嘧啶血浆样品的检测。采用 10% 高氯酸处理血浆样品时,方法简便、蛋白沉淀完全、进样样品稳定、提取回收率高,且血浆中代谢物对 5-氟尿嘧啶无干扰,适用于大量样品的连续分析。

本文采用非房室模型的统计矩计算相关药动学数据,结果显示在软坚散结方剂的干预下,5-氟尿嘧啶的 $T_{\max}$ 显著缩短, V_d 显著降低, $C_{\max}$ 亦有所提高,说明两药联合使用,软坚散结方剂能促进 5-氟尿嘧啶的吸收,可抑制 5-氟尿嘧啶由血液向组织中分布。末端消除半衰期 ($T_{1/2}$) 在数值上缩短了,提示软坚散结方剂能促进 5-氟尿嘧啶在体内排泄。综合分析表明软坚散结方剂在与 5-氟尿嘧啶联合使用时确实存在改变后者药代动力学行为的活性。

[参考文献]

[1] Ott M J. Complementary and alternative therapies in cancer symptom management[J]. Cancer Pract,2002,10 (3):162-166.

[2] Tian J H, Liu L S, Shi Z M, et al. A randomized controlled pilot trial of “Feiji Recipe” on quality of life of non-small cell lung cancer patients[J]. Am J Chin Med,2010,38(1):15-25.

[3] 李卫东. 中医药防治肿瘤的不同治法概述[J]. 医学综述,2012,18(2):269-272.

[4] Kim S H, Huang C Y, Tsai C Y, et al. The aqueous extract of *Prunella vulgaris* suppresses cell invasion and migration in human liver cancer cells by attenuating matrix metalloproteinases[J]. Am J Chin Med,2012,40 (3):643-656.

[5] 范汉东,王雪,蔡永君,等. 半夏中一种抗癌蛋白的纯化及其抗癌活性研究[J]. 湖北大学学报:自然科学版,2012,34(1):105-109.

[6] 董海玲,郭顺星,王春兰,等. 山慈菇的化学成分和药

理作用研究进展[J]. 中草药,2007,38(11):1734-1738.

[7] Mary J S, Vinotha P, Pradeep A M. Screening for *in vitro* cytotoxic activity of seaweed, *Sargassum* sp. against Hep-2 and MCF-7 cancer cell lines[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2012,13(12):6073-6076.

[8] Chen X M, Nie W J, Yu G Q, et al. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from *Sargassum fusiforme*[J]. Food Chem Toxicol,2012,50 (3/4):695-700.

[9] 胡人杰,陈鸿英,姚嫱,等. 软坚散结抗肿瘤方剂的优化研究[J]. 时珍国医国药,2014,25(2):348-349.

[10] 刘利萍,姚嫱,赵秀梅,等. 不同治则方剂对 5-氟尿嘧啶化疗增效作用的实验观察[J]. 时珍国医国药,2011,22(4):937-938.

[11] 韩勇. 影响 5-fu 疗效的研究进展[J]. 中国肿瘤临床,2010,37(21):1255-1259.

[12] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2006:119.

[13] 钱瑾,吴慧哲,詹丽芬. 吡喹酮对 5-氟尿嘧啶在大鼠体内药代动力学的影响[J] 中国药理学与毒理学杂志,2005,19(6):455-457.

[14] 吴慧哲,钱瑾,詹丽芬. 联用尼美舒利对 5-氟尿嘧啶在大鼠体内药代动力学的影响[J]. 中国医科大学学报,2006,35(3):265-266.

[15] 甄亚钦,孔德志,任雷鸣. 传统药物对西药药代动力学影响的研究与探索[J]. 药学学报,2014,49(2):175-182.

[16] 刘传华,刘师莲,卞继峰,等. HPLC 法快速测定 5-氟尿嘧啶血药浓度[J]. 药物分析杂志,2001,21(2):95-97.

[17] 张选红,吴珏珩,汤丽芬,等. 反相高效液相色谱法测定兔血清中 5-氟尿嘧啶的浓度[J]. 解剖学研究,2009,31(3):237-239.

[18] 冯婉玉,蔡爽,申建伟. 高效液相色谱法测定人血浆中氟尿嘧啶浓度[J]. 中国药理学杂志,2003,38(4):289-290.

[19] 钱瑾,吴慧哲,詹丽芬. 高效液相色谱法测定大鼠体内 5-氟尿嘧啶的血药浓度及药代动力学研究[J]. 中国医科大学学报,2006,35(1):36-37.

[责任编辑 刘德文]