

小鼠灌胃 ^3H - β , β -二甲基丙烯酸酯紫草素的组织分布与排泄研究

田慧芳^{1,2}, 孙东晓¹, 孟志云¹, 袁 丹²,
周佳雨^{1,3}, 郑华宁^{1,4}, 窦桂芳¹

(1. 军事医学科学院 野战输血研究所, 北京 100850; 2. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016;
3. 沈阳药科大学 生命科学院, 辽宁 沈阳 110016; 4. 浙江中医药大学 药学院, 浙江 杭州 310053)

摘要: 采用氧化燃烧炉技术处理小鼠给予 ^3H - β , β -二甲基丙烯酸酯紫草素灌胃后的组织样品和粪样(尿样直接加闪烁液测定), 用液闪计数器测定其放射性水平, 并采用 HPLC 法分析生物样品, 以研究放射性药物在小鼠体内的组织分布与排泄情况。研究结果显示: 小鼠的胃肠道放射性浓度最高, 肝脏、肺脏、肾脏、心脏等组织内放射性浓度次之, 骨骼肌、脊髓、脑中分布较少; 小鼠灌服 ^3H - β , β -二甲基丙烯酸酯紫草素(84.0 mg/kg, 22.3 MBq/kg)后, 336 h 从粪中收集到给药总放射剂量的(72.87±9.92)%, 尿液中回收到(8.43±0.26)%, 粪尿回收合计(81.30±9.79)%; 小鼠粪便中以原形药物为主, 血浆、尿样中均未检测到原形药物。以上结果提示, ^3H - β , β -二甲基丙烯酸酯紫草素在小鼠体内分布广, 排泄较完全, 经粪便排泄为主, 经肾排泄为辅。

关键词: ^3H - β , β -二甲基丙烯酸酯紫草素; 组织分布; 排泄

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-7512(2008)04-0209-06

Tissue Distribution and Excretion of Radioactivity in Mice After Intragastric Administration of ^3H - β , β -dimethylacrylshikonin

TIAN Hui-fang^{1,2}, SUN Dong-xiao¹, MENG Zhi-yun¹, YUAN Dan², ZHOU Jia-yu^{1,3},
ZHENG Hua-ning^{1,4}, DOU Gui-fang¹

(1. Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Beijing Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

2. School of Chinese Traditional Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

3. School of Life Science, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

4. Department of Pharmacology, School of Pharmacy,

Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Tissue distribution and excretion of radioactivity in mice after intragastric administration of ^3H - β , β -dimethylacrylshikonin were investigated. Tissues and feces were combusted by sample Oxidizer, the subsequent radioactivity measurements were carried out af-

ter addition of scintillator to the combusted samples and urine. The results showed that the radioactivity in gastrointestinal system was higher than that in the liver, lung, kidney and heart, while that in skeletal muscle, spinal cord, brain was lower. After single intragastric administration (chemical dose 84.0 mg/kg, radioactive dose 22.3 MBq/kg) of β , β -dimethylacrylshikonin to mice, the cumulative radioactivity excretion rate of urine and feces were $(8.43 \pm 0.26)\%$ and $(72.87 \pm 9.92)\%$ respectively within 336 h, the total excretion rate was $(81.30 \pm 9.79)\%$. The samples of plasma, feces and urine were also analyzed by HPLC. The result is that parent drug mainly existed in feces, not in plasma or urine. This study showed that ^3H - β , β -dimethylacrylshikonin was distributed widely in mice, and excreted mostly through fecal route and secondarily via urine.

Key words: ^3H - β , β -dimethylacrylshikonin; tissue distribution; excretion

β , β -二甲基丙烯酰紫草素是从新疆紫草 (*Arnebia Euchrona* (Royle) Johnston) 干燥根中提取出来的一种萘醌类化合物, 其化学结构示于图 1, 其药理作用广泛^[1-5], 而且最新研究结果表明, β , β -二甲基丙烯酰紫草素具有广谱抗病毒性, 可以显著地抗乙肝病毒, 其药效与拉米夫定相当, 且毒性小。

放射性生物样品的预处理方法可分为消化法(包括酸性消化法和碱性消化法)和燃烧法^[6]。燃烧法是将生物样品彻底氧化成 $^3\text{H}_2\text{O}$ 、 $^{14}\text{CO}_2$ 等简单化合物后再作均相或非均相测量的方法。此法的优点是处理后的样品单纯、无色、无化学发光和淬灭作用, 效率高, 适用于淬灭比较严重而放射性活度又比较低的样品, 特别是有严重颜色淬灭的样品^[7]。本工作拟采用氧化燃烧炉预处理法, 将生物样品置于燃烧杯中, 设定燃烧时间、闪烁液体积, 焚烧后得到的样品用液闪计数器测定放射性^[7], 考察 ^3H - β , β -二甲基丙烯酰紫草素原形药物及其代谢物总放射性在小鼠体内的组织分布与排泄过程, 并结合 HPLC 技术初步观察 β , β -二甲基丙烯酰紫草素在血浆、尿样及粪样中可能的代谢产物, 以研究放射性药物在小鼠体内的组织分布与排泄情况, 为将其开发为抗乙型肝炎病毒的国家一类新药提供基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器

307 型氧化燃烧炉: 美国 Perkin-Elmer 公司; Tri-Card 2900TR 液闪计数器: 美国 Perkin-Elmer 公司; SHIMADZU 型 HPLC, 包括 LC-

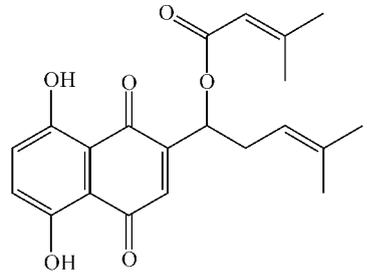


图 1 β , β -二甲基丙烯酰紫草素的化学结构

20AT 二元梯度泵, SPD-20A UV/VIS 检测器: 日本岛津公司; BS-100A 自动部分收集器: 上海沪西分析仪器厂。

1.2 药品和试剂

^3H - β , β -二甲基丙烯酰紫草素标准品, 放射性比活度为 1.1 TBq/g, 放化纯度为 98.4%; 上海应用物理研究所应用氚水交换法标记; β , β -二甲基丙烯酰紫草素标准品: 纯度为 96.4%, 北京金本草医药科技发展有限公司; MONOPHASE-S 氚荧光剂: 美国 Perkin-Elmer 公司, 批号为 6-060601; Optiphase 'supermix': 美国 Perkin-Elmer 公司, 批号为 0393721; 三蒸水: 实验室自制; 乙腈: 色谱纯, 美国 B&J 公司。

1.3 实验动物

昆明种小鼠: 雄性, 20 只, 体重 16~18 g, 购自军事医学科学院实验动物中心。动物合格证号: SCXK(军)2002-001, 动物实验设施使用许可证号: SYXK(军)2002-001。小鼠饲养遵照军事医学科学院药物代谢重点实验室标准操作规程。实验温度维持在 20~25 °C, 相对湿度为 30%~50%。

2 实验方法

2.1 ³H-β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素的纯化及纯度鉴定

采用半制备 HPLC 仪对 β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素进行³H 标记,半制备 HPLC 的制备条件: Hypersil ODS₂ 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm),流速 1 mL/min,流动相为 V(甲醇):V(氯仿):V(水):V(冰乙酸)=66:14:18:2,每 1 min 收集 1 瓶,每个样品收集 40 瓶,每瓶取 100 μL,加入 5 mL 闪烁液,通过 Tri-Card 2900TR 液闪计数器测定放射性。

2.2 样品的配制

取 2.1 制得的³H-β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素(标示值为 25 mg,放射性总活度为 26.64 MBq)的乙酸乙酯溶液 3 mL,加入 55.64 mg β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素,以满足小鼠给药化学剂量(84.0 mg/kg),分别取上述乙酸乙酯溶液 1 mL 于两个玻璃管中,其中 A 管用于组织分布实验,B 管用于排泄实验,将玻璃管用氮气吹干,向玻璃管中分别加入 7.5 mL 0.2%的 CMC-Na(羧甲基纤维素钠)溶液混悬。

2.3 ³H-β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素组织分布

15 只小鼠,随机分成 3 组,每组 5 只,单次灌胃 A 管混悬液 0.5 mL(放射剂量 27.1 MBq/kg),分别于给药后 4、22、48 h 处死,立即解剖小鼠采集体液和组织,采集的组织样品包括血浆、胆囊、小肠内容、肺、胃内容、胃、膀胱、胸腺、心等。将每份组织称重,然后分别放入氧化燃烧炉中燃烧 1 min,取出,分别加入 10 mL 闪烁液,由液闪计数器测定放射性计数。用 Microsoft Excel 和 Origin 进行数据处理和作图。

2.4 ³H-β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素粪便排泄

另取 5 只小鼠,分别单个饲养在代谢笼内。单次灌胃 B 管混悬液 0.5 mL(放射剂量 22.3 MBq/kg),给药前动物禁食 8 h,给药后禁食 4 h,自由饮水。于给药后 5、11、24、48、74、96、120、144、168、192、216、240、288、336 h 收集尿液和粪便样品。由于尿液容易挥发且沾染代谢笼,因此每次收集完尿液和粪便后,用 10 mL 水冲洗代谢笼,冲洗液的放射性与尿液合并计算,所有采集的样品于-20℃下保存。测定时,精密移取 1 mL 尿液,加入 10 mL Optiphase 'supermix' 闪烁液,用液闪计数器测定放射性。粪样中加入适量水浸泡混匀,分取 200 μL 放入

氧化燃烧炉中焚烧,焚烧后得到的样品用液闪计数器测定其放射性活度。

2.5 生物样品的 HPLC 分析

采用 HPLC 方法分析小鼠部分血浆、粪、尿样品放射性,并与 β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素标准品的 HPLC 图谱进行对照,以观察样品中可能存在的代谢产物。向 HPLC 系统注射 40 μL 样品,采用 BS-100A 自动部分收集器接收流出液,每 0.5 min 接收一个样品,各加入 1 mL 闪烁液后用液闪计数器测定放射性计数。血浆、粪便样品的 HPLC 分析条件为:以 Hypersil ODS₂ 柱(4.6 mm×150 mm,5 μm)为分析色谱柱,柱号 E1516450;流速 1 mL/min;流动相:乙腈-水,梯度洗脱(起始 95%的乙腈,25 min 后变为 100%乙腈,再维持 5 min,程序结束)。粪便样品以甲醇为提取液;尿液的分析条件为:以 Kromasil KR100-5C18(4.6 mm×250 mm)为分析色谱柱,柱号 E15842;流动相为乙腈-水,梯度洗脱(起始比例为 100%水,5~30 min 100%乙腈,40~41 min 100%水,维持到 45 min,程序结束)。采用 BS-100A 自动部分收集器,每 0.5 min 收集 1 瓶,每瓶加入闪烁液,用液闪计数器对其进行测定。

2.6 数据处理

组织分布研究中,由于各组织间的数据差异较大,方差不齐,不同时间点各组织的含量变化为不同个体得到的数据,故用 Student's *t* 检验比较不同组织药物含量与血浆中含量的差别。其他实验结果使用 Microsoft Excel 2003 及 origin 5.0 进行分析。

3 结果与讨论

3.1 ³H-β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素的纯化和纯度鉴定

³H-β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素与 β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素标准品 HPLC 谱图示于图 2。由图 2 可见,³H-β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素基本没有变化,保留时间不变。应用 HPLC 纯化³H-β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素后,测得标记物的放化纯度为 98.4%。

3.2 ³H-β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素组织分布

小鼠灌服³H-β,β-二甲基丙烯酸酐紫草素后不同时间各组织中总放射性的分布情况及各组织放射性暴露水平列于表 1。由表 1 可以看出,给

药后 4 h 放射性物质主要集中于胃、胃内容、大肠、大肠内容、小肠、小肠内容、胆囊和胆汁、肺中,除腿骨、胰腺、睾丸、脑骨骼肌以外,各组织中的放射性水平均高于血浆,其中肝放射性显著高于血浆,并具有统计学意义($P < 0.05$);给药后 22 h 在胃肠道仍可见较高的放射性水

平,其他大部分组织的放射性含量均低于血浆;给药后 48 h 各组织的放射活性水平均下降至较低水平,睾丸、肾、大肠的放射活性水平显著低于血浆($P < 0.01$),其它组织的水平也明显地低于血浆($0.01 < P < 0.05$)。

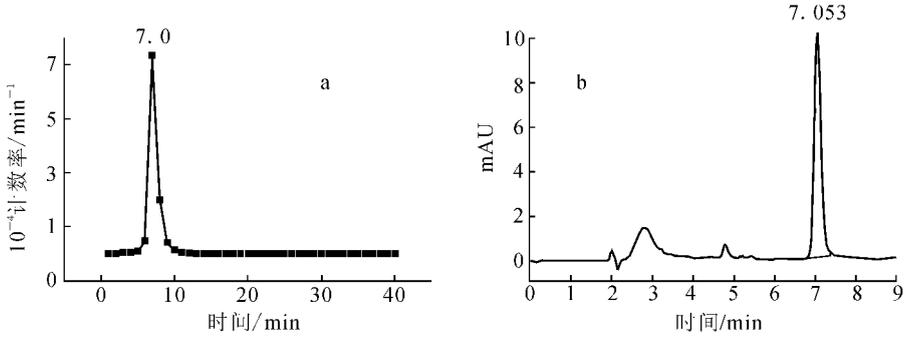


图 2 ^3H - β,β -二甲基丙烯酰紫草素与 β,β -二甲基丙烯酰紫草素标准品 HPLC 谱图

a —— ^3H - β,β -二甲基丙烯酰紫草素; b —— β,β -二甲基丙烯酰紫草素标准品

表 1 灌服 ^3H - β,β -二甲基丙烯酰紫草素后小鼠组织中的放射性分布 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组织	不同时间的放射计数			AUC _(0-48 h) / (Bq · h · g ⁻¹)
	4 h	22 h	48 h	
胆囊和胆汁	2.0×10^5	2.4×10^5	4×10^3 a)	7.66×10^6
大肠内容	5.1×10^4	1.7×10^5 a)	1×10^3	4.42×10^6
胃内容	3.3×10^5	1.4×10^4 a)	5×10^2 a)	3.97×10^6
小肠内容	9.4×10^4	3.0×10^4	5×10^2 b)	1.71×10^6
胃	4.3×10^4	1.4×10^4	3×10^4	8.3×10^5
肺	4.2×10^4	2×10^3	8×10^2 b)	5.1×10^5
脂肪	4×10^3	1.3×10^4	1×10^4	3.7×10^5
小肠	1.3×10^4 a)	7×10^3	1×10^4	3.3×10^5
大肠	8×10^3	7×10^3	3×10^2 c)	2.7×10^5
膀胱	1.5×10^4	2×10^3	1×10^4	2.4×10^5
肾上腺	6×10^3	5×10^3	1×10^4	2.1×10^5
胸腺	1.0×10^4	1×10^3	6×10^2 a), b)	1.5×10^5
肝	8×10^3 b)	1×10^3	6×10^2 b)	1.3×10^5
心	7×10^3	1×10^3	4×10^2 b)	1.1×10^5
血浆	1×10^3	3×10^3	1×10^4	1.0×10^5
腿骨	1×10^3	3×10^3	8×10^2	1.0×10^5
肾	5×10^3	1×10^3	5×10^2 c)	1.0×10^5
眼球	2×10^3	2×10^3	5×10^2 b)	7×10^4
脊髓	3×10^3	9×10^2	1×10^4	7×10^4
脾	2×10^3	1×10^3	4×10^2 b)	6×10^4
胰腺	1×10^3	1×10^3	5×10^2 b)	5×10^4
骨骼肌	1×10^3 a)	8×10^2	7×10^2	4×10^4
睾丸	1×10^3	1×10^3	3×10^2 c)	4×10^4
脑	7×10^2	5×10^2	1×10^4	3×10^4

注: a) $n=4$; b) 与血浆比较, $P < 0.05$; c) 与血浆比较, $P < 0.01$

实验中发现,个体间组织分布差异较大,推测可能是β,β-二甲基丙烯酰紫草素在小鼠体内有二次吸收现象,而每只鼠吸收再分布的个体时相差异可能造成组织分布数据差异大。另外,非同位素实验的结果显示,食物对β,β-二甲基丙烯酰紫草素的吸收影响也较大,食物对药物的吸收有促进作用,组织分布实验操作过程中发现有些鼠的胃肠内有食物,有的几乎没有,这可能也是组织分布数据差异大的原因之一,文献[6]中也做了相关的研究。具体的实验研究正在完善中。

3.3 粪尿排泄结果

小鼠灌服³H-β,β-二甲基丙烯酰紫草素后粪尿中的累积排泄率结果列于表 2。由表 2 可以看出,给药 336 h 后从粪便中回收到放射性剂量的(72.87±9.92)%,在尿液中回收到(8.43±0.26)%,粪尿合计为(81.30±9.79)%。在组织分布实验中观察到小鼠胆囊含胆汁具有最高的放射活性水平,粪便排泄的放射活性有可能部分来自胆汁排泄。

3.4 生物样品分析结果

小鼠灌服³H-β,β-二甲基丙烯酰紫草素后,血浆、尿样、粪样的 HPLC 分析色谱图示于图 3、

4。由图 3、4 可见,粪便中主要以原形药物存在,在血浆和尿液中未见明显的原形药物峰,主要是极性大的结合物或代谢产物。

表 2 小鼠灌服³H-β,β-二甲基丙烯酰紫草素后粪尿中的累积排泄率($\bar{x} \pm s, n=5$)

时间/h	累积排泄率/%		
	尿	粪	尿和粪
5	1.23±0.83	30.48±11.06	31.71±0.83
11	4.18±1.40	60.7±10.10	64.88±1.40
24	6.54±0.93	68.35±9.15	74.89±9.75
48	7.64±0.78	69.98±8.38	77.62±8.74
74	8.06±0.59	71.04±8.02	79.10±8.24
96	7.99±0.40 ¹⁾	71.76±10.17 ¹⁾	79.75±10.13 ¹⁾
120	8.04±0.38 ¹⁾	72.24±9.84 ¹⁾	80.28±9.80 ¹⁾
144	8.07±0.37 ¹⁾	72.42±9.90 ¹⁾	80.49±9.86 ¹⁾
168	8.09±0.38 ¹⁾	72.52±9.91 ¹⁾	80.61±9.86 ¹⁾
192	8.11±0.38 ¹⁾	72.62±9.92 ¹⁾	80.72±9.88 ¹⁾
216	8.14±0.37 ¹⁾	72.66±9.92 ¹⁾	80.80±9.88 ¹⁾
240	8.15±0.38 ¹⁾	72.71±9.91 ¹⁾	80.87±9.87 ¹⁾
288	8.20±0.42 ¹⁾	72.77±9.94 ¹⁾	80.97±9.88 ¹⁾
336	8.43±0.26 ¹⁾	72.87±9.92 ¹⁾	81.30±9.79 ¹⁾

注:1)n=3,有两只小鼠给药 96 h 后死亡

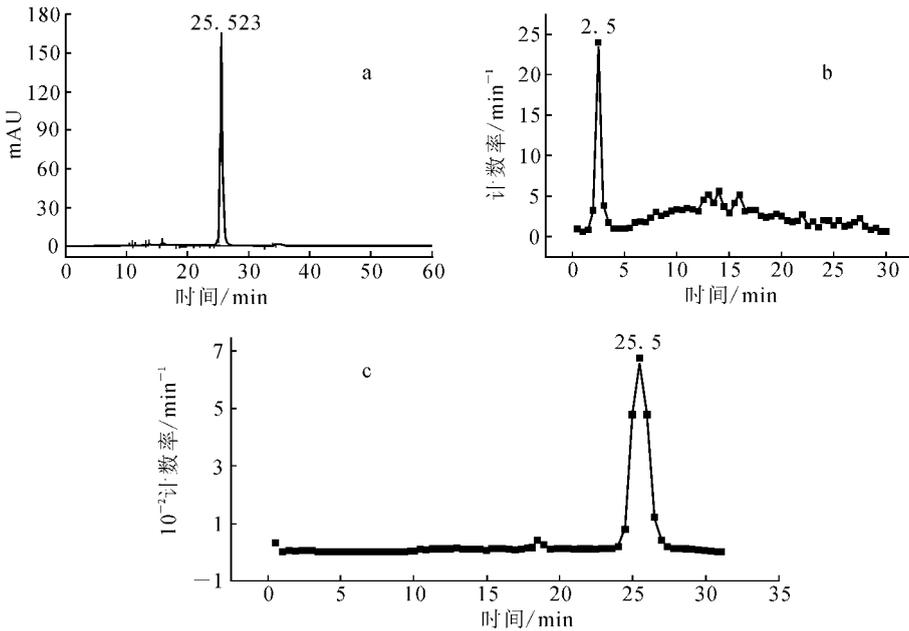


图 3 小鼠灌服³H-β,β-二甲基丙烯酰紫草素后血浆、粪样的 HPL 图

a——β,β-二甲基丙烯酰紫草素标准品色谱图;b——血浆 HPLC 图;c——粪样 HPLC 图

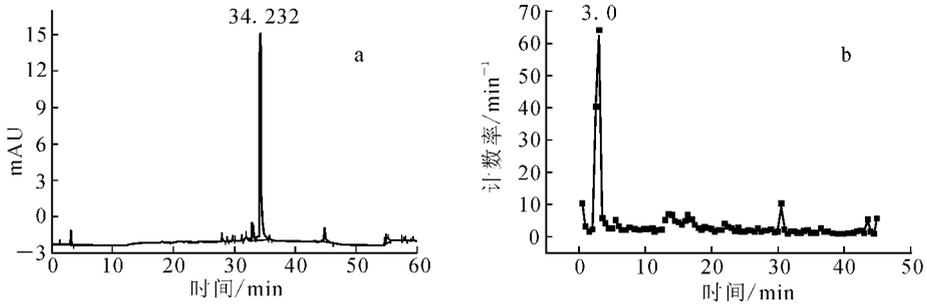


图 4 小鼠灌服 ^3H - β - β -二甲基丙烯酰紫草素后尿样的 HPLC 图
a —— β - β -二甲基丙烯酰紫草素标准品色谱图; b ——尿液样品 HPLC 图

4 小 结

雄性昆明种小鼠灌服 ^3H - β - β -二甲基丙烯酰紫草素后,组织分布研究结果表明,小鼠胃肠道及其内容物中的放射性含量远远高于其它组织,随时间推移,它们的放射性强度呈明显降低趋势。粪尿排泄结果表明,随粪便排出体外的总放射性含量大于放射性剂量的 70%,经 HPLC 法分析表明,粪样中以原形药物为主。

给药后 4 h 肝中放射性浓度明显高于血浆,并具有统计学意义($P < 0.05$),分析可能与 β - β -二甲基丙烯酰紫草素发挥抗乙肝病毒的药效以及肝脏是药物代谢转化的主要器官有关;给药后 22 h 的脂肪内放射性浓度较高,但是 48 h 其含量已降至较低水平,存在蓄积的可能性较小。

小鼠灌胃给药 336 h 后由粪、尿排泄的总放射性占给药放射剂量的(81.30 ± 9.79)%,且在 24 h 内已排泄了(74.89 ± 9.75)%,表明药物在小鼠体内排泄较完全,排泄途径以粪便排泄为主,尿液排泄为辅,提示该药的口服生物利用度可能较低。

本实验只测定了总放射性,而且个别测定的个体差异性较大,考虑其药理意义时需特别注意。

致谢:中科院上海应用物理研究所放射药物研究中心董墨老师等用氚标记了 β - β -二甲基丙烯酰

紫草素,在此表示衷心感谢。

参考文献:

- [1] PAPAGEORGION VP, ASSIMOPOULOU AN, COULADOUROS EA, et al. The Chemistry and Biology of Alkannin, Shikonin, and Related Naphthazarin Natural Products [J]. Angew Chem Int Ed, 1999, 38: 270-300.
- [2] KUNDAKOVIC T, FOKIALAKIS N, DOBRIC S, et al. Evaluation of the Anti-inflammatory and Cytotoxic activities of Naphthazarine Derivatives From *Onosma Leptantha* [J]. Phytomedicine, 2006, 13(4): 290-294.
- [3] 林志彬,王珮,阮元,等. β - β -二甲基丙烯酰紫草素的抗炎症作用[J]. 中国药理学报, 1980, 1(1): 60-63.
- [4] 姜爱莉,孙丽芹,刘玉鹏. 紫草抗氧化成分的提取及其活性研究[J]. 精细化工, 2002, 19(1): 51-54.
- [5] TANAKA Y, ODANI T. Pharmacodynamic Study on Shiunko; I. Antibacterial Effect of Shiunko [J]. Yakugaku Zasshi, 1972, 92(5): 525-530.
- [6] 孙东晓,田慧芳,孟志云,等. [^3H]-乙酰紫草素在小鼠体内的组织分布、排泄及血中分布研究 [J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(4): 348-352.
- [7] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第三版. 北京:人民卫生出版社, 2002:145-152.