

双醋瑞因在小鼠角膜中的药代动力学行为

窦新岩¹, 陈世伟², 杨柯¹, 金鑫¹, 张晔瑞³, 张红敏^{1*}

(1. 郑州大学人民医院/河南省人民医院眼科, 河南省立眼科医院/河南省眼科研究所, 河南郑州 450003; 2. 河南省口岸食品检验检测所, 河南郑州 450003; 3. 新乡医学院, 河南新乡 453003)

摘要: 目的 考察双醋瑞因在小鼠角膜中的药代动力学行为。方法 将2%双醋瑞因滴眼液单次滴入小鼠双眼结膜囊, 分别于滴眼后5、15、30、45、60、90、120、150、180 min处死动物, 取角膜, HPLC法测定角膜中双醋瑞因代谢产物大黄酸含量。结果 各个时间点小鼠角膜中均未检测到双醋瑞因, 而是其活性产物大黄酸。给药后5 min, 角膜中大黄酸含量最高, 为(143.59 ± 2.37) μg/g, 之后逐渐下降。角膜组织中药物浓度半衰期为(0.86 ± 0.06) h, 达到最大药物质量浓度所需时间为5 min (0.08 h), 最大药物质量浓度为(143.59 ± 19.61) μg/g。结论 双醋瑞因滴眼液能够透过角膜上皮到达小鼠角膜, 并完全转化为大黄酸, 具有良好的药代动力学特征。

关键词: 双醋瑞因; 药代动力学; 小鼠; 角膜; HPLC

中图分类号: R969.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)11-2289-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.11.013

Pharmacokinetic behaviors of diacerein in mouse corneas

DOU Xin-yan¹, CHEN Shi-wei², YANG Ke¹, JIN Xin¹, ZHANG Zhi-rui³, ZHANG Hong-min^{1*}

(1. Department of Ophthalmology, People's Hospital of Zhengzhou University & Henan Provincial People's Hospital; Henan Eye Hospital & Henan Eye Institute, Zhengzhou 450003, China; 2. Food Inspection and Testing Institute of Henan Province, Zhengzhou 450003, China; 3. Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

KEY WORDS: diacerein; pharmacokinetics; mice; corneas; HPLC

真菌性角膜炎是致盲率较高的感染性眼病^[1], 随着抗真菌药的开发, 其治愈率越来越高^[2], 但大多数患者临床治愈后会遗留下角膜白斑, 轻者影响视力, 重者致盲。双醋瑞因为萘醌类衍生物, 是治疗骨关节炎的上市药物, 能够抑制 IL-1 生成^[3-4]、中性粒细胞迁移、基质金属蛋白酶 8 或 9 产生^[5]。课题组前期研究显示, 其滴眼液能够减轻真菌性角膜炎引起的角膜炎症, 但缺乏其局部给药的药代动力学资料。因此, 本实验进行了双醋瑞因在小鼠角膜中的药代动力学研究, 以期为该成分药效学提供合理的依据。

1 材料

1.1 动物 SPF级昆明种小鼠, 雄性, 体质量36~38 g, 购自河南省实验动物中心, 许可证号 SCXK

(豫) 2015-0004, 动物合格证号 41003100002753。

1.2 试药 大黄酸(批号 201512)、双醋瑞因(批号 201512)对照品(中国食品药品检定研究院); 双醋瑞因原料药(批号 HL-20141105, 西安汇林生物科技有限公司); 2%双醋瑞因滴眼液(河南省眼科研究所)。甲醇为色谱纯(批号 OH45014, 美国 Tedia 公司); DMSO(批号 D2438-10ML, 美国 Sigma 公司); 冰醋酸(批号 20130619, 北京化工厂)。

1.3 仪器 2695型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); YZ20T4手术显微镜(苏州六六视觉科技股份有限公司); 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); HGC-24氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司); 涡旋混合器(上海青浦沪西仪器厂)。

收稿日期: 2017-01-22

基金项目: 河南省科技创新人才计划项目(144100510015); 河南省医学科技攻关计划项目(201203171); 河南省自然科学基金项目(162300410163)

作者简介: 窦新岩, 女, 硕士, 从事眼科疾病研究。Tel: 15921370396, E-mail: douxinyan0116@126.com

* 通信作者: 张红敏, 女, 博士, 研究员, 从事角膜与眼表疾病研究。Tel: (0371) 65580917, E-mail: zhm0906@163.com

2 方法与结果

2.1 给药及取材 固定小鼠，使眼球暴露，微量加样器分别向双眼结膜囊内滴入2%双醋瑞因滴眼液5 μL ，轻轻闭合双睑1 min。单次给药后5、15、30、45、60、90、120、150、180 min CO_2 处死小鼠，大量生理盐水冲洗眼球，取角膜，剔除非角膜组织，各时间点重复6次，角膜个数分别为1、1、2、2、3、4、6、6、7个。

2.2 色谱条件 Waters X-Bridge C_{18} 色谱柱 (3.5 μm , 3.0 mm \times 150 mm); 流动相0.1%冰醋酸-甲醇 (40 : 60); 体积流量0.8 mL/min; 柱温50 $^\circ\text{C}$; 检测波长258 nm; 进样量10 μL 。

2.3 对照品溶液制备

2.3.1 双醋瑞因 精密称取双醋瑞因0.003 g，置于50 mL量瓶中，加DMSO至刻度，配制成60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贮备液，取100 μL 至10 mL量瓶中，加甲醇至刻度，即得 (0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

2.3.2 大黄酸 精密称取大黄酸0.003 g，置于50 mL量瓶中，加DMSO至刻度，作为贮备液 (质量浓度为60 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，取400 μL 至10 mL量瓶中，加甲醇至刻度，即得 (2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，之后分别2倍稀释至1.2、0.6、0.3、0.15、0.075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.4 专属性考察 图1显示，2%双醋瑞因滴眼后，5 min角膜检测不到双醋瑞因。图2显示，滴眼后5 min双醋瑞因全部代谢成了大黄酸，无角膜成分干扰。

2.5 线性关系考察 精密吸取系列质量浓度的大黄酸对照品工作液各1 mL，分别加入小鼠角膜1个，剪碎，4 $^\circ\text{C}$ 下浸泡24 h，50 $^\circ\text{C}$ 下 N_2 吹干，0.1 mL甲醇复溶，涡旋仪振荡约5 min，3 000 r/min离心8 min，上清液进样10 μL ，HPLC测定，记录色谱图与峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y)，对应质量浓度 (0.75、1.5、3、6、12、24 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标 (X) 进行线性回归，得方程为 $Y = 7\,978.8X - 24.06$ ($r = 0.9995$)，在0.75 ~ 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密吸取0.15、0.45、1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液各1 mL，平行5份，按“2.5”项下方法操作，每个质量浓度在1 d内测定3次，即为日内精密度。再各精密吸取1 mL，平行5份，同法操作，每个质量浓度每天测定1次，连续3 d，即为日间精密度。结果，日内精密度RSD分别为7.43%、2.07%、1.36%，日间精密度RSD分别为5.70%、6.79%、1.18%，表明该方法精密度良好。

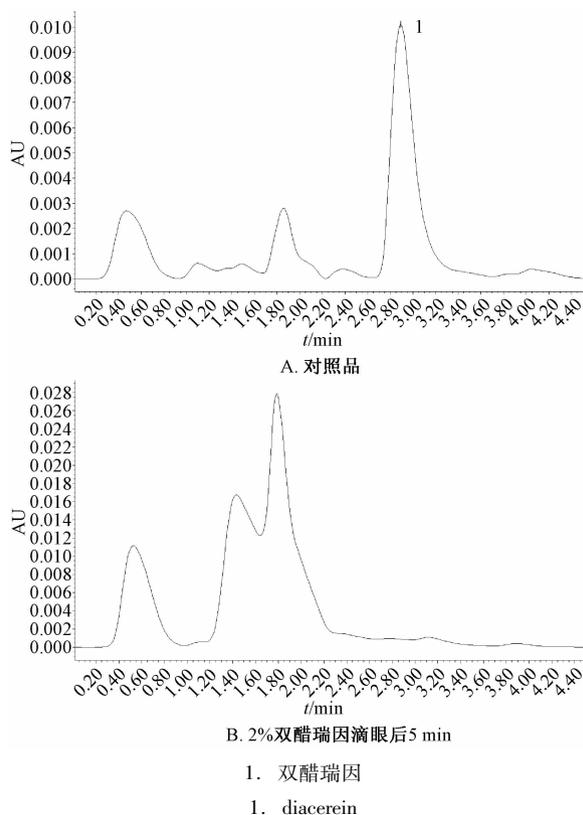


图1 双醋瑞因HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of diacerein

2.7 回收率试验 配制0.15、0.45、1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大黄酸溶液各1 mL，按“2.5”项下方法操作，得到质量浓度分别相当于1.5、4.5、18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的模拟角膜样品，HPLC法测定，测得平均回收率分别为97.14%、97.63%、98.63%，RSD分别为7.81%、3.75%、2.23%。

2.8 含有量测定 用滤纸轻轻吸干角膜表面水分，精密称定质量 (约为1.2 mg)。置于玻璃试管中，剪碎，加1 mL甲醇浸泡24 h， N_2 吹干，0.1 mL甲醇复溶，涡旋仪振荡约5 min，3 000 r/min离心8 min，取上清液10 μL 进样，HPLC法测定，根据“2.5”项下回归方程计算药物含有量，公式为含有量 = 大黄酸测定质量浓度 \times 测定总体积 (角膜体积 + 0.1 mL) / 角膜总质量，其中角膜体积相当于同等数量的角膜质量，0.1 mL为氮气吹干后加入的甲醇体积。滴眼后达峰时间为5 min，达峰质量浓度为 (14.65 \pm 2.37) $\mu\text{g}/\text{g}$ ，结果见表1。

2.9 药动学参数计算 采用DAS 2.1.1版药动学软件进行计算，结果见表2。由表可知，单次给药后双醋瑞因滴眼液半衰期为0.86 h，角膜达到最大药物质量浓度所需时间为5 min (0.08 h)，最大药物质量浓度为 (143.59 \pm 19.61) $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

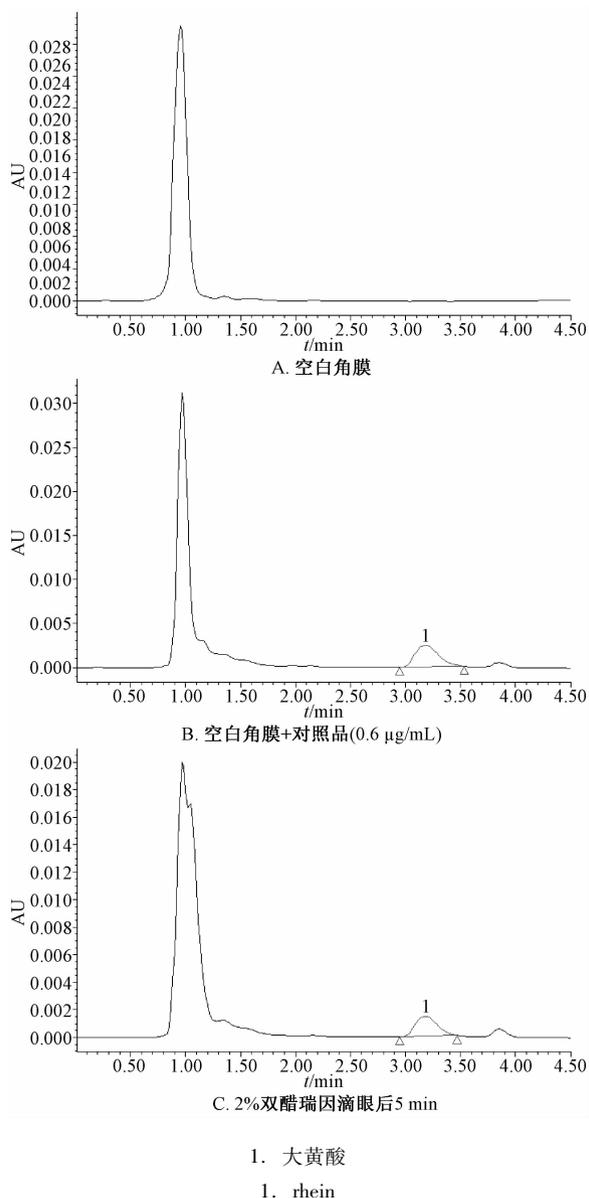


图2 大黄酸 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of rhein

表1 大黄酸含量测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Results of content determination of rhein ($\bar{x} \pm s$)

时间/min	大黄酸/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
5	143.59 ± 2.37
15	98.05 ± 1.31
30	65.95 ± 3.36
45	40.52 ± 0.80
60	39.23 ± 0.86
90	32.39 ± 0.27
120	18.13 ± 0.28
150	14.05 ± 0.70
180	9.08 ± 1.53

表2 双醋瑞因药动学参数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Pharmacokinetics parameters for diacerein ($\bar{x} \pm s$)

参数	单位	数值
AUC_{0-t}	$\mu\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$	114.26 ± 9.49
$AUC_{0-\infty}$	$\mu\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$	125.73 ± 10.75
$t_{1/2}$	h	0.86 ± 0.06
T_{max}	h	0.08 ± 0.00
C_{max}	$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	143.59 ± 19.61

3 讨论

双醋瑞因是公认的 IL-1 抑制剂，其胶囊应用于骨关节炎的治疗^[6-7]，在减轻胃溃疡^[8]、糖尿病^[9]及牙周病^[10]炎症反应方面亦有报道。课题组前期初步研究显示，在抗真菌药物治疗真菌性角膜炎的前提下，双醋瑞因眼局部用药时可以减轻角膜溃疡面积和深度，减少角膜穿孔率。由于目前尚无其药动学资料，因此本实验对此进行了研究，可为相关制剂用药提供依据。

滴眼液的药动学研究大多用家兔作为实验动物，主要是由于其角膜较大，需要样本数相对较少。但家兔与人类的基因差异较大，两者角膜结构有较大不同^[11]，而小鼠与人的基因同源性在 99.9% 以上，在眼科角膜研究上的应用越来越多^[12-13]。因此，本实验采用小鼠进行药动学实验，可为相关研究提供更多的动物选择。

本实验中角膜疾病滴眼的给药方式靶向作用于眼部组织，可减少药物在全身循环过程中所带来的不良反应。结果发现，局部应用双醋瑞因时，能够在角膜处快速转化为其活性代谢产物大黄酸，5 min 即可完全转化，与双醋瑞因经口服后到达血液和组织，完全转化为大黄酸的报道^[10]一致。

由于双醋瑞因在眼部的应用较少，尚不明确其有效质量浓度，而该成分在治疗骨关节炎时的有效质量浓度为 0.028 4 ~ 2.84 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[14-15]。本实验发现，单次给药后快速达到的峰质量浓度为 143.59 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，即使在 3 h 后，其质量浓度在角膜内仍有 9.08 $\mu\text{g}/\text{g}$ ，约为骨关节炎的 50 倍，推测双醋瑞因滴眼剂可能会达到有效抗炎质量浓度。

药物能否透过角膜上皮屏障是评价作用于角膜药物的关键指标，也是以角膜为作用靶点的药物能否应用于临床的关键。本实验结果表明，双醋瑞因滴眼液有良好的角膜上皮透过性，角膜组织的药物半衰期为 0.86 h，结合角膜内 3 h 质量浓度以及相关文献，可以得出其用药间隔，从而为该制剂合理应用提供理论依据。

致谢: 感谢河南省眼科研究所, 河南省立眼科医院张俊杰主任药师、周天洋副主任药师以及李景果博士在双醋瑞因滴眼液的配制及 HPLC 的使用方面给予指导和帮助。

参考文献:

[1] 杨彪, 张红敏, 王丽娅. 中性粒细胞在角膜真菌感染病程中的双相作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2015, 33(5): 470-473.

[2] Ramakrishnan T, Constantinou M, Jhanji V, et al. Factors affecting treatment outcomes with voriconazole in cases with fungal keratitis[J]. *Cornea*, 2013, 32(4): 445-449.

[3] Gao Y, Chen X, Fang L, et al. Rhein exerts pro- and anti-inflammatory actions by targeting IKK β inhibition in LPS-activated macrophages[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 72: 104-112.

[4] Gadotti V M, Martins D F, Pinto H F, et al. Diacerein decreases visceral pain through inhibition of glutamatergic neurotransmission and cytokine signaling in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 102(4): 549-554.

[5] 余佳, 吴晓晴, 孙海峰, 等. 大黄酸及其衍生物的生物活性研究进展[J]. 药学与临床研究, 2008, 16(2): 125-128.

[6] 李学朋. 双醋瑞因对黄韧带肥厚大白兔血清炎症因子调节及肥厚黄韧带病理结构的影响[J]. 中医正骨, 2014, 26(2): 8-11, 15.

[7] Panova E, Jones G. Benefit-risk assessment of diacerein in the treatment of osteoarthritis [J]. *Drug Saf*, 2015, 38(3):

245-252.

[8] Tamura T, Yokoyama T, Ohmori K. Effects of diacerein on indomethacin-induced gastric ulceration [J]. *Pharmacology*, 2001, 63(4): 228-233.

[9] Malaguti C, Vilella C A, Vieira K P, et al. Diacerein down-regulate proinflammatory cytokines expression and decrease the autoimmune diabetes frequency in nonobese diabetic (NOD) mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8(6): 782-791.

[10] Huang R Y, Lu S H, Su K W, et al. Diacerein: a potential therapeutic drug for periodontal disease [J]. *Med Hypotheses*, 2012, 79(2): 165-167.

[11] Ojeda J L, Ventosa J A, Piedra S. The three-dimensional microanatomy of the rabbit and human cornea. A chemical and mechanical microdissection-SEM approach [J]. *J Anat*, 2001, 199(Pt 5): 567-576.

[12] Henriksson J T, McDermott A M, Bergmanson J P. Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(8): 3648-3654.

[13] Michael L R. Animal models in eye research [J]. *Hum Genomics*, 2009, 3(4): 381-382.

[14] Yaron M, Shirazi I, Yaron I. Anti-interleukin-1 effects of diacerein and rhein in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures [J]. *Osteoarthr Cartil*, 1999, 7(3): 272-280.

[15] Gigant-Huselstein C, Dumas D, Payan E, et al. *In vitro* study of intracellular IL-1 β production and β 1 integrins expression in stimulated chondrocytes-effect of rhein [J]. *Biorheology*, 2002, 39(1-2): 277-285.