

齐墩果酸与二氢齐墩果酸灌胃及静脉注射给药后在大鼠体内的药动学研究

陈瑞*,李维,李永,刘瑶,黄静,汤磊[#](贵州医科大学医药卫生管理学院,贵阳 550004)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)13-1777-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.13.14

摘要 目的:研究齐墩果酸及其衍生物二氢齐墩果酸ig及iv给药在大鼠体内的药动学及绝对生物利用度。方法:12只SD大鼠随机分为齐墩果酸给药组和二氢齐墩果酸给药组,每组6只,两组大鼠均ig给药(50 mg/kg),1周后于尾iv给药(2 mg/kg)。分别于给药前及给药后(ig为0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、5、7、9、12 h,iv为0.05、0.15、0.25、0.5、0.75、1、2、3、5、7、9、12 h)尾静脉取血0.3 mL,采用超高效液相色谱(UPLC)-四级杆串联飞行时间质谱法(QTOF)测定血药浓度,DAS 2.0药动学软件计算药动学参数与绝对生物利用度。结果:大鼠ig与iv齐墩果酸后,AUC_{0-∞}分别为(232.10±7.17)、(1 203.99±19.65) ng·h/mL,*t*_{1/2}分别为(1.75±0.10)、(1.41±0.04) h;ig给药后*c*_{max}为(121.3±18.92) ng/mL,*t*_{max}为(0.54±0.10) h,绝对生物利用度为0.77%。大鼠ig与iv二氢齐墩果酸后,AUC_{0-∞}分别为(382.03±23.73)、(386.14±10.65) ng·h/mL,*t*_{1/2}分别为(2.47±0.45)、(1.44±0.03) h;ig给药后*c*_{max}为(124.52±12.28) ng/mL,*t*_{max}为(0.63±0.14) h,绝对生物利用度为3.96%。结论:在大鼠体内,二氢齐墩果酸的绝对生物利用度显著高于齐墩果酸。

关键词 齐墩果酸;二氢齐墩果酸;大鼠;超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱法;药动学;生物利用度

Study on the Pharmacokinetics of Oleanolic Acid and Dihydrooleanolic Acid by Intragastric Administration and Intravenous Injection in Rats *in vivo*

CHEN Rui, LI Wei, LI Yong, LIU Yao, HUANG Jing, TANG Lei (School of Medicine and Health Management, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pharmacokinetics and absolute bioavailability of oleanolic acid and its derivative dihydrooleanolic acid in rats *in vivo*. METHODS: 12 SD rats were randomly divided into oleanolic acid administration group and dihydrooleanolic acid administration group, 6 in each group. All rats were intragastrically given related medicine (50 mg/kg), then intravenously injected related medicine (2 mg/kg) in tail vein after 1 week. Sample blood 0.3 mL was taken from tail vein before administration and after administration (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, 9, 12 h for ig; 0.05, 0.15, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12 h for iv). UPLC-QTOF was conducted to determine the plasma concentration, and DAS 2.0 pharmacokinetic software was used to calculate pharmacokinetic parameters and absolute bioavailability. RESULTS: After ig and iv oleanolic acid, the AUC_{0-∞} were (232.10±7.17), (1 203.99±19.65) ng·h/mL, *t*_{1/2} were (1.75±0.10), (1.41±0.04) h respectively; after ig, *c*_{max} was (121.3±18.92) ng/mL, *t*_{max} was (0.54±0.10) h, absolute bioavailability was 0.77%. After ig and iv dihydrooleanolic acid, AUC_{0-∞} were (382.03±23.73), (386.14±10.65) ng·h/mL, *t*_{1/2} were (2.47±0.45), (1.44±0.03) h; after ig, *c*_{max} was (124.52±12.28) ng/mL, *t*_{max} was (0.63±0.14) h, absolute bioavailability was 3.96%. CONCLUSIONS: The absolute bioavailability of dihydrooleanolic acid is significantly higher than oleanolic acid in rats.

KEYWORDS Oleanolic acid; Dihydrooleanolic acid; Rats; UPLC-QTOF; Pharmacokinetics; Bioavailability

齐墩果酸(Oleanolic acid)是一类具有保肝护肾、抑制血小板凝集、降血脂、降糖、抗癌、抗应激、抗微生物等作用的五环三萜类化合物^[1-3]。笔者前期研究发现,齐墩果酸双键还原的衍生物二氢齐墩果酸具有较强的促葡萄糖消耗的活性,在治疗糖尿病方面有一定的研究基础。由于二氢齐墩果酸的药动学研究未见文献报道,因此在本研究中,笔者探讨了齐墩果酸及其衍生物二氢齐墩果酸ig及iv给药在大鼠体内的药动学及生物利用度,为其进一步应用提供实验基础。齐墩果酸和二氢齐墩果酸的化学结构式见图1。

* 硕士研究生。研究方向:药动学。电话:0581-8550366。E-mail:cherrie_amme@163.com

[#] 通信作者:教授,博士。研究方向:药物合成设计与药动学。电话:0581-8550366。E-mail:tgxx903@163.com

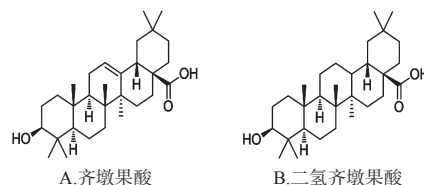


图1 齐墩果酸和二氢齐墩果酸的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of oleanolic acid and dihydrooleanolic acid

1 材料

1.1 仪器

G2-XS超高效液相色谱(UPLC)-四级杆串联飞行时间质谱(QTOF)仪,包括四元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、电喷雾四级杆串联飞行时间质谱仪、MassLynx V 4.1质谱工作站(美国Waters公司);AE240

十万分之一电子天平(上海菁海仪器有限公司)

1.2 药品与试剂

齐墩果酸原料药(批号:JZ15120901,纯度:>98%)、甘草次酸(内标)原料药(批号:JZ16040703,纯度:>98%)均购自南京景竹生物科技有限公司;二氢齐墩果酸原料药(贵州医科大学药物化学重点实验室制备,批号:20160318,纯度:>98%);甲酸、乙酸乙酯、甲基叔丁基醚为分析纯;甲醇、乙腈为色谱纯。

1.3 动物

清洁级SD大鼠12只,♀♂各半,体质量200~230g,购自第三军医大学实验动物中心,实验动物合格证号:SCXK(军)2012-0011。实验前禁食不禁水12h。

2 方法与结果

2.1 齐墩果酸、二氢齐墩果酸、内标贮备液的制备

精密称取齐墩果酸、二氢齐墩果酸、内标原料药适量,甲醇溶解并定容,制得质量浓度为20、20、10 μg/mL的齐墩果酸、二氢齐墩果酸、内标贮备液,置于4℃冰箱待用。使用时,将各贮备液稀释成所需质量浓度的溶液。

2.2 血浆样品的处理

取100 μL血浆样品,加入400 ng/mL内标溶液100 μL,依次加入甲醇400 μL、乙酸乙酯800 μL,涡旋混合15 min,离心(离心半径为3 cm,以下同,10 000 r/min)10 min,吸取上层溶液,氮气吹干,残渣加入100 μL甲醇溶解,离心(13 000 r/min)10 min,取上清液2 μL,进样分析。

2.3 色谱条件与质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Waters BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.2 min,60% A;0.2~4.0 min,2% A;4.0~5.5 min,60% A);流速:0.35 mL/min;柱温:40℃;检测波长:210 nm;进样量:2 μL。

2.3.2 质谱条件 电喷雾电离源(ESI);负离子模式采集模式;毛细管电压:2 kV,离子源:120℃;脱溶剂气温度:400℃,脱溶剂气流量:800 L/h,锥孔气流量:50 L/h;质谱数据采集及处理软件:MassLynx V4.1工作站;扫描方式:全信息串联质谱(MSE)。QTOF高分辨质谱图见图2。

2.4 专属性考察

取大鼠空白血浆100 μL,加齐墩果酸或二氢齐墩果酸贮备液100 μL,按“2.2”项下方法处理后,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定;另取空白血浆、给药45 min的血浆样品+内标进样测定。结果,内标和齐墩果酸能同时被检测到,出峰时间约为2.26、2.65 min;内标和二氢齐墩果酸能同时被检测到,出峰时间约为2.0、2.34 min。检测物质峰形良好,且与大鼠血浆中的内源性物质达到完全分离,色谱图见图3。

2.5 标准曲线与定量下限考察

取齐墩果酸、二氢齐墩果酸贮备液,分别稀释成质量浓度为1、5、16、40、80、200、400、1 000、2 000 ng/mL的齐墩果酸系列标准液,0.64、3.2、16、40、80、200、400 ng/mL

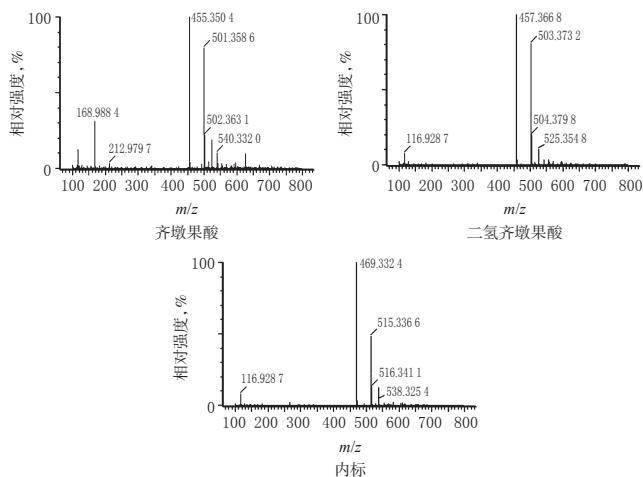


图2 质谱图

Fig 2 Mass spectrum

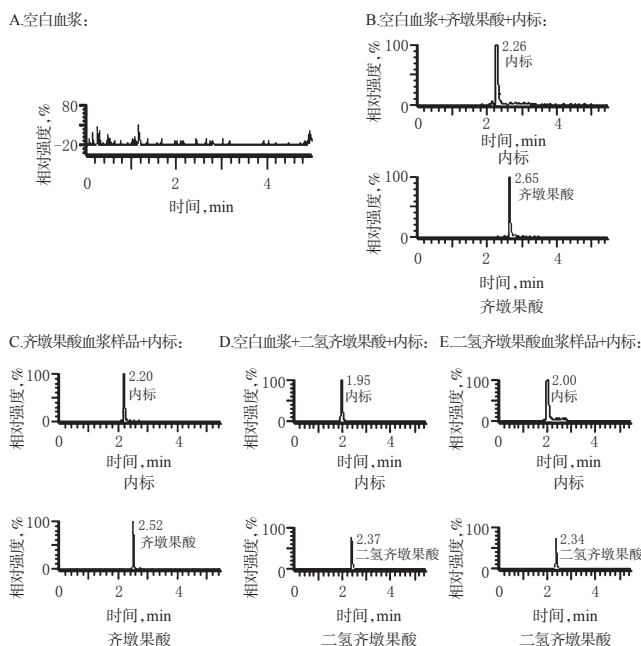


图3 LC-MS 色谱图

Fig 3 LC-MS chromatogram

的二氢齐墩果酸系列标准液。取大鼠空白血浆100 μL于2 mL EP管中,分别加入上述系列标准液100 μL,按“2.2”项下方法处理后,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定。以齐墩果酸或二氢齐墩果酸质量浓度为横坐标(x)、齐墩果酸或二氢齐墩果酸与内标的峰面积比为纵坐标(y)绘制标准曲线。结果,齐墩果酸、二氢齐墩果酸的回归方程分别为 $y=0.0074x-0.0015$ ($r=0.9994$)、 $y=0.0005x+0.0075$ ($r=0.9998$),线性范围分别为1~2 000、0.64~400 ng/mL,定量下限分别为1、0.64 ng/mL。

2.6 基质效应与提取回收率考察

取大鼠空白血浆100 μL,按“2.2”项下方法处理后,分别加入低、中、高质量浓度的齐墩果酸(40、400、2 000 ng/mL)或二氢齐墩果酸(0.64、80、400 ng/mL)溶液100 μL复溶,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算齐墩果酸或二氢齐墩果酸与内标峰面积比值(I),以相同质量

浓度的齐墩果酸或二氢齐墩果酸溶液直接进样获得的峰面积与内标峰面积比值(II),考察基质效应(I/II×100%)。取大鼠空白血浆,分别加入低、中、高质量浓度齐墩果酸或二氢齐墩果酸溶液100 μL,按“2.2”项下方法处理后,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算血浆样品中齐墩果酸或二氢齐墩果酸与内标峰面积比值(III),考察提取回收率(III/I×100%)。结果,齐墩果酸、二氢齐墩果酸的基质效应分别为90.8%~108.2%(RSD≤9.89%,n=5)、86.71%~95.1%(RSD≤5.97%,n=5);提取回收率分别为74.86%~88.87%(RSD≤10.21%,n=5)、78.61%~90.57%(RSD≤7.88%,n=5),表明该方法符合要求。

2.7 准确度和精密度考察

取大鼠空白血浆100 μL,分别加入“2.6”项下低、中、高质量浓度的齐墩果酸或二氢齐墩果酸溶液100 μL,平行5份,按“2.2”项下方法处理,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,进样测定5次,连续进样3 d,考察准确度和日内、日间精密度。结果,齐墩果酸的准确度为92.61%~112.3%(RSD=2.7%,n=5),日内(n=5)和日间(n=3)精密度RSD均小于10.0%;二氢齐墩果酸的准确度为88.54%~107.2%(RSD=3.5%,n=5),日内(n=5)和日间(n=3)精密度RSD均小于10.0%,表明该方法符合要求。

2.8 稳定性考察

取大鼠空白血浆100 μL,分别加入“2.6”项下低、中、高质量浓度的齐墩果酸或二氢齐墩果酸溶液100 μL,平行5份,按“2.2”项下方法处理后,分别于室温下放置6 h、4℃下冷藏12 h、反复冻融3次以及自动进样器放置6 h后进样测定。结果显示,齐墩果酸与二氢齐墩果酸在上述条件下均保持稳定,RSD均小于15%(n=5)。

2.9 药动学研究

2.9.1 齐墩果酸及二氢齐墩果酸工作溶液的制备 将齐墩果酸与二氢齐墩果酸溶解于助溶剂(N,N-二甲基乙酰胺-聚乙二醇(PEG)400-水之比为2:4:1,V/V/V,预实验表明仅使用助溶剂不影响大鼠的生理状态及相关物质的检测),即得。

2.9.2 分组、给药与取血 12只SD大鼠随机分为齐墩果酸给药组和二氢齐墩果酸给药组,每组6只,两组大鼠均ig给药(50 mg/kg,给药剂量根据预实验确定,为人体给药剂量的等效剂量的约6.3倍,下同),1周后于尾iv给药(2 mg/kg)。分别于给药前及给药后(ig为0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、5、7、9、12 h,iv为0.05、0.15、0.25、0.5、0.75、1、2、3、5、7、9、12 h)尾静脉取血0.3 mL,置于1.5 mL肝素化离心管中,离心(4 500 r/min)10 min,按“2.2”项下方法处理后,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定。采用DAS 2.0药动学软件进行拟合,计算齐墩果酸和二氢齐墩果酸在大鼠体内的药动学参数与绝对生物利用度(F)。

2.9.3 测定结果 齐墩果酸和二氢齐墩果酸ig和iv给

药的药-时曲线见图4,药动学参数见表1。

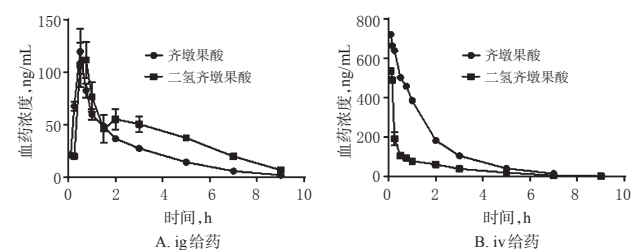


图4 齐墩果酸和二氢齐墩果酸在大鼠体内的药-时曲线
Fig 4 Concentration-time curve of oleanolic acid and dihydrooleanolic acid in rats

表1 齐墩果酸和二氢齐墩果酸在大鼠体内的主要药动学参数计算结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Calculation results of main pharmacokinetic parameters of oleanolic acid and dihydrooleanolic acid in rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动学参数	齐墩果酸		二氢齐墩果酸	
	iv(2 mg/kg)	ig(50 mg/kg)	iv(2 mg/kg)	ig(50 mg/kg)
AUC _{0-12h} , ng·h/mL	1 172.71 ± 17.90	225.77 ± 6.04	381.84 ± 10.89	350.01 ± 14.56
AUC _{0-∞} , ng·h/mL	1 203.99 ± 19.65	232.10 ± 7.17	386.14 ± 10.65	382.03 ± 23.73
t _{1/2} , h	1.41 ± 0.04	1.75 ± 0.10	1.44 ± 0.03	2.47 ± 0.45
CL, L/(kg·h)	1.66 ± 0.03	8.62 ± 0.27	129.57 ± 3.60	131.33 ± 8.73
V _d , L/kg	3.38 ± 0.09	21.79 ± 0.89	268.60 ± 12.44	464.68 ± 70.21
c _{max} , ng/mL		121.3 ± 18.92		124.52 ± 12.28
t _{max} , h		0.54 ± 0.10		0.63 ± 0.14
F, %		0.77		3.96

结果表明,齐墩果酸和二氢齐墩果酸在大鼠体内的药-时曲线特征符合血管外给药一级吸收单室模型;静脉注射给药符合单室模型,符合一级动力学过程消除。齐墩果酸、二氢齐墩果酸的绝对生物利用度分别为0.77%、3.96%。

3 讨论

齐墩果酸给予大鼠的剂量依据为文献[4-5],二氢齐墩果酸与齐墩果酸的结构相似,故所定给药剂量与齐墩果酸一致。由于齐墩果酸^[6-8]和二氢齐墩果酸为五环三萜类化合物,紫外吸收弱,且在血浆中血药浓度较低,而普通的HPLC灵敏度较低^[9-11],较难检出。故本研究采用UPLC-QTOF测定两药血药浓度,该法具有较高的灵敏度,齐墩果酸与二氢齐墩果酸的定量下限分别为1、0.64 ng/mL,可满足较低浓度的测定要求,具有较强的专属性,同时也缩短了样品的分析时间。

本研究结果显示,齐墩果酸的生物利用度为0.77%,与文献报道的0.7%^[12]较为接近。二氢齐墩果酸的绝对生物利用度为3.96%,显著高于齐墩果酸。V_d表示体内药物总量平衡后,按血药浓度计算的所需体液总体积。齐墩果酸iv与ig给药后的V_d值分别约为3~22 L,提示齐墩果酸很可能分布在体液中;二氢齐墩果酸2种给药方式的V_d值均大于100 L,提示二氢齐墩果酸很可能与组织特殊结合,后续研究将关注二氢齐墩果酸的分布情况。据相关研究报道,齐墩果酸在大鼠体内的药动学参数与剂量不相关^[13],且生物利用度低,这严重影

丹参酮对人工关节无菌性松动小鼠气囊模型中炎症反应的影响

赖笑雨^{1*}, 陈金财², 刘训志¹, 高 辉¹, 何 澄^{1#}(1.赣南医学院第一附属医院骨科, 江西 赣州 341000; 2.赣南医学院, 江西 赣州 341000)

中图分类号 R687 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)13-1780-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.13.15

摘要 目的:研究丹参酮对人工关节无菌性松动小鼠气囊模型中炎症反应的影响。方法:将小鼠随机分为空白对照组(生理盐水)、钛颗粒组(生理盐水)和丹参酮低、中、高剂量组(50、100、200 mg/kg),每组10只。所有小鼠建立气囊模型,除空白对照组小鼠气囊内注入0.5 mL生理盐水外,其余各组小鼠气囊内均注入0.5 mL钛颗粒悬液(10 mg/mL),24 h后按0.1 mL/10 g连续ig相应药物14 d。末次给药24 h后收集气囊,肉眼和苏木精-伊红染色显微镜观察气囊炎症情况,计算炎症细胞密度;实时定量聚合酶链式反应法检测气囊组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β)mRNA表达量;酶联免疫吸附法检测气囊组织中TNF- α 、IL- 1β 蛋白表达量。结果:与空白对照组比较,钛颗粒组小鼠气囊红肿明显,可见较多渗出及新生血管,炎症反应严重,炎症细胞密度明显增加($P<0.05$);TNF- α 、IL- 1β mRNA及蛋白表达明显增强($P<0.05$)。与钛颗粒组比较,丹参酮各剂量组小鼠气囊红肿减轻,渗出及新生血管减少,炎症反应减轻,炎症细胞密度明显减小($P<0.05$);TNF- α 、IL- 1β mRNA及蛋白表达明显减弱($P<0.05$),且呈剂量依赖性。结论:丹参酮可有效抑制人工关节无菌性松动小鼠气囊模型中的无菌性炎症反应。

关键词 丹参酮;无菌性松动;气囊模型;炎症因子;小鼠

Effect of Tanshinone on Inflammatory Response in Air-pouch Model Mice with Artificial Joint Aseptic Loosening

LAI Xiaoyu¹, CHEN Jincan², LIU Xunzhi¹, GAO Hui¹, HE Cheng¹(1.Dept. of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Jiangxi Ganzhou 341000, China; 2.Gannan Medical University, Jiangxi Ganzhou 341000, China)

响了齐墩果酸的临床应用。Li MJ等^[14]研究表明,齐墩果酸在体外肝微粒体的孵育浓度明显下降,可能与肝肠内酶的广泛代谢与其生物利用度低相关,后续可开展体外酶促动力学试验以研究二氢齐墩果酸的肝肠首关代谢作用对其生物利用度的影响。

参考文献

- [1] 李跃辉, 谢谊, 王银, 等. 喉咽清口服液齐墩果酸-28-O- β -D吡喃葡萄糖苷在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国医药导报, 2015, 12(19): 15-21.
- [2] Liu L, Wang X. Improved dissolution of oleanolic acid with ternary solid dispersions[J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2007, 8(4): E113.
- [3] 谢珺, 温明, 刘建明. 齐墩果酸口服自微乳在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中成药, 2012, 34(2): 257-260.
- [4] 田丽婷, 马龙, 堵年生. 齐墩果酸的药理作用研究概况[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(12): 884-886.
- [5] Kim NY, Lee, MK, Park, MJ, et al. Momordin I and oleanolic acid from kochiae fructus reduce carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats[J]. *Med Food*, 2005, 8(2): 177-183.
- [6] 唐思, 杨瑞, 张世良, 等. 参麦注射液活性成分在正常和心肌缺血Beagle犬体内的药代动力学研究[J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3475-3477.
- [7] 席佳, 唐海谊, 郑颖. 齐墩果酸口服制剂及其体内药代动力学研究进展[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(6): 507-515.
- [8] 姜艳彬, 单吉浩, 王莹, 等. LC-MS/MS技术在药物代谢研究中的应用进展[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3): 385-391.
- [9] 孟艳秋, 赵临襄, 王赓, 等. 五环三萜类化合物的构效关系[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(12): 1098-1102.
- [10] 张雪松, 张莹, 张雪岩. 利托那韦对舒芬太尼在家兔体内药代动力学的影响[J]. 中国药房, 2016, 27(22): 3048-3050.
- [11] 武丽南, 陆榕, 谷元, 等. 梓醇在大鼠体内的药代动力学和生物利用度研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(2): 126-130.
- [12] Jeong DW, Kim YH, Kim HH, et al. Dose-linear pharmacokinetics of oleanolic acid after intravenous and oral administration in rats[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2007, 28(2): 51-57.
- [13] 刘昌辉, 郑侠, 王宁生, 等. 齐墩果酸对大鼠体内细胞色素P₁₅₀酶活性的影响[J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(9): 37-42.
- [14] Li MJ, Wang FQ, Huang YH, et al. Systemic exposure to and disposition of catechols derived from salvia miltiorrhiza roots (danshen) after intravenous dosing danhong injection in human subjects, rats, and dogs[J]. *Drug Metab Dispos*, 2015, 5(43): 679-690.

* 主治医师, 硕士。研究方向: 人工关节无菌性松动。电话: 0797-8266017。E-mail: 562213821@qq.com

通信作者: 副主任医师。研究方向: 人工关节无菌性松动。电话: 0797-8269507。E-mail: jxgzhecheng@163.com

(收稿日期: 2016-08-11 修回日期: 2017-03-15)

(编辑: 刘明伟)