

文章编号:1001-6880(2014)1-0024-04

素馨花提取物橄榄苦苷在大鼠体内药代动力学研究

郝婷¹, 尹营松¹, 李亚洲¹, 刘丽艳¹, 陈四平², 赵桂琴¹¹ 承德医学院中药研究所/河北省中药研究与开发重点实验室, 承德 067000; ² 河北师范大学药物研究所, 石家庄 050011

摘要: 本文对素馨花中提取纯化所得橄榄苦苷在大鼠体内的药代动力学过程进行研究。将雄性 Wistar 大鼠随机分为橄榄苦苷 100、200、400 mg/kg 剂量组, 灌胃(i. g.)给药后不同时间采血, 离心, 血浆经甲醇-乙腈沉淀蛋白后, HPLC 测定不同时间点大鼠血浆中橄榄苦苷的含量。各给药组平均血药浓度-时间数据应用 3P97 软件进行药代动力学参数分析, 组间药动学参数用 SPSS 17.0 进行统计分析。结果表明, 橄榄苦苷在大鼠体内的药代动力学过程符合二室模型, 低、中、高剂量组的 $t_{1/2}$ 、CL/F、AUC 差异具有显著的统计学意义, 其中 $t_{1/2}$ 、CL/F 随给药剂量的增大而增大; AUC 随剂量的增大, 呈先减小后增大的趋势, 橄榄苦苷在大鼠体内的药代动力学呈非线性过程。

关键词: 橄榄苦苷; HPLC; 药代动力学

中图分类号: R285. 5

文献标识码: A

Study on Pharmacokinetics of Oleuropein from Jasminum officinale L. var. grandiflorum in Rats

HAO Ting¹, YIN Ying-song¹, LI Ya-zhou¹, LIU Li-yan¹, CHEN Si-ping², ZHAO Gui-qin^{1*}

¹ Institute of Chinese Mateia Medica, Chengde Medical College / Hebei Key Laboratory of Research and Development for Traditional Chinese Medicine, Chengde 067000, China; ² Institute of Medica, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050011, China

Abstract: The objective of this study was to study the pharmacokinetics of oleuropein extracted form *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum* in healthy rats. Male Wistar rats were randomly divided into 100, 200, 400 mg/kg of oleuropein group, The rats were intragastric administrated (i. g.) at different time. After the drug administration, blood sampling, centrifugal, plasma protein precipitation with methanol and acetonitrile were carried out. The concentration of oleuropein in blood serum was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) at different time points. The average blood oleuropein concentration-time data set was used to analyze the pharmacokinetic parameters by 3P97 software. The pharmacokinetic parameters between different groups were applied to SPSS 17.0 software for statistical analysis. The results showed that the pharmacokinetics of oleuropein in rats was fitted with two compartment model. The $t_{1/2}$, CL/F, AUC of low, medium and high dose sample group had significant difference. The $t_{1/2}$ and CL/F increased with the increasing of dose, while the AUC decreased firstly and then increased with increasing of dose. These results proved that the pharmacokinetics of oleuropein in rats were a non-linear process.

Key words: oleuropein; HPLC; pharmacokinetics

橄榄苦苷是一种裂环环烯醚萜苷类化合物, 作者从素馨花(*Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*)70%乙醇提取物中分离得到。该物质体内外抗乙型肝炎病毒(HBV)活性明确, 在素馨花药材中含量丰富(初步估算超过 5%)^[1], 易于分离纯化, 有望成为

新型抗 HBV 活性先导化合物。本文建立了测定橄榄苦苷含量的 HPLC 方法, 并应用该方法对橄榄苦苷在大鼠体内的药代动力学过程进行了研究。

1 材料

1.1 药品与试剂

甲醇(色谱纯, Dikmapure); 甲醇(分析纯, 天津赛孚试剂厂); 甲酸(分析纯, 天津市佳兴化工厂); 市售纯净水; 橄榄苦苷(实验室自制, 纯度大于

98%);内标物黄芩苷(中国药品生物制品检定所,批号:110715-201016)。

1.2 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(HPLC);HC-2062 高速离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);梅特勒-托利多 AG245 型分析天平(瑞士);KQ-100E 超声清洗器(昆明市超声仪器有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 120 只,体重 180~200 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证:0237506。

2 实验方法

2.1 色谱条件

Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm)色谱柱;流动相:水-甲醇-甲酸(63:37:1);检测波长:276 nm;流速:1 mL/min;柱温:30 °C;进样量:20 μL。

2.2 给药及样品采集

根据预实验结果,确定大鼠灌胃低、中和高剂量分别为 100、200 和 400 mg/kg。取 Wistar 大鼠 120 只,随机分成低、中、高剂量组,每组 40 只给药前 12 h 禁食,自由饮水。将橄榄苦苷配制为相应浓度的溶液,i. g. 给药,给药容积为 10 mL/kg,给药后自由饮水,分别于 i. g. 后 5、10、15、30、60、120、240、480 min 采用 400 μL 一次性负压采血管(肝素钠抗凝),腹主动脉取血 400 μL(每个时间点 5 只),于 2500 rpm 离心 15 min,分离血浆,-20 °C 保存。

2.3 血浆样品预处理^[2-5]

精密吸取空白血浆 100 μL,依次加入 1 mol/L 磷酸二氢钾溶液 50 μL 及 5 μL 内标物,涡旋 20 s,依次加入甲醇 100 μL,乙腈 350 μL,涡旋 5 min,超声 20 min,3000 rpm 离心,取上清液,40 °C 氮气挥干,残渣用 500 μL 流动相复溶,14000 rpm 离心,取上清液,进样 20 μL,HPLC 法测定。

2.4 血浆样品中橄榄苦苷标准曲线的制备

精密吸取空白血浆 100 μL,加入不同浓度橄榄苦苷系列标准溶液 25 μL 和 0.12 mg/mL 的内标溶液 5 μL,配置成橄榄苦苷血浆标准系列,浓度分别为 5.25、10.5、16.75、21、26.25、52.5 μg/mL,每一浓度平行配置 3 份,按“血浆样品处理”项操作后,取上清液,进样 20 μL,每个样品进样 3 次,HPLC 测定,记录峰面积,取平均值。

2.5 精密度与准确度

制备橄榄苦苷低、中、高 3 个浓度(5.25、16.75、26.25 μg/mL)为质量控制(QC)样品,每个浓度平行处理 5 份,按照“血浆样品处理”项操作,每个样品测定一次,于一个工作日内完成,计算日内精密度。同样的 QC 样品连续重复 3 d,计算日间精密度。

2.6 方法回收率的测定

制备橄榄苦苷低、中、高 3 个浓度(5.25、16.75、26.25 μg/mL)为质量控制(QC)样品,按“血浆样品处理”项操作,以提取后的色谱峰面积与内标溶的峰面积比值带入回归方程,所得浓度与实际浓度的比值即为方法回收率。

2.7 稳定性试验

考察橄榄苦苷低、中、高 3 个浓度(5.25、16.75、26.25 μg/mL)QC 样品的稳定性,以橄榄苦苷的峰面积为指标,血浆样品处理后,4 °C 放置 3 d,HPLC 检测,记录峰面积。

2.8 数据分析

灌胃给药后橄榄苦苷的血药浓度-时间数据用 3P97 药代动力学软件分析。组间药动学参数用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

3 结果

3.1 血浆样品中橄榄苦苷的标准曲线

以血浆样品中橄榄苦苷浓度为横坐标,待测物与内标的峰面积比值为纵坐标,求得橄榄苦苷标准曲线为 $y = 0.0442x - 0.038$ ($R^2 = 0.9991$),线性范围 5.25~52.5 μg/mL,信噪比 S/N = 3 时定量限为 5.25 μg/mL。

3.2 精密度与准确度

血浆中低、中、高浓度的橄榄苦苷的日内、日间精密度 RSD 值均小于 ±5%,准确度 RE 值均小于 ±10%,其中,血浆中低、中、高浓度的橄榄苦苷的日内峰面积 RSD 分别为 1.96%、2.34%、1.87%;血浆中低、中、高浓度的橄榄苦苷日间峰面积 RSD 分别为 2.89%、3.67%、2.96%。

3.3 方法回收率的测定

血浆中低、中、高浓度的橄榄苦苷的提取回收率分别为 96.9%、98.2%、102.7%。

3.4 稳定性试验

血浆中橄榄苦苷低、中、高 3 个浓度(5.25、16.75、26.25 μg/mL)QC 样品的稳定性,以橄榄苦

昔的峰面积为指标,血浆样品处理后,4 ℃放置3 d,橄榄苦昔的RSD分别为7.1%、8.4%、3.92%。

3.5 药时曲线及药代动力学参数

大鼠灌胃给予低、中、高3个剂量橄榄苦昔后的平均血药浓度-时间曲线(图2),所得实验数据用3P97药代动力学软件进行处理,所得药动学参数见表1,经3P97软件拟合,体内药代动力学过程符合

二室模型,结果显示半衰期 $t_{1/2}$ 分别为15.189、32.829、55.097 min,清除率CL/F分别为0.0174、0.0526、0.0653 $\mu\text{g}/(\mu\text{L} \cdot \text{min})$,随剂量的增大而延长,药物浓度-时间曲线下面积AUC分别为5759.51、3804.57、6250.72 $\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \mu\text{L})$,随剂量的增大先减小后增大,显示出非线性药代动力学特征

表1 大鼠灌胃不同剂量橄榄苦昔药动学参数($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of oleuropein after i. g. administration of different dose of oleuropein extract to rats ($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

参数 Parameter	单位 Unit	给药剂量 Dose		
		100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
速率常数 Ka	1/min	0.0442 ± 0.01725	0.0211 ± 0.00197	0.0291 ± 0.0049
分布半衰期 $t_{1/2(\alpha)}$	min	15.189 ± 3.908*	32.829 ± 3.33	55.097 ± 4.845
曲线下面积 AUC	$\mu\text{g}/(\text{min} \cdot \mu\text{L})$	5759.51 ± 1000*	3804.57 ± 289.39	6250.72 ± 555.4
清除率 CL/F(s)	$\mu\text{g}/(\mu\text{L} \cdot \text{min})$	0.0174 ± 0.0059*	0.0526 ± 0.0003	0.0653 ± 0.009
出峰时间 T (peak)	min	77.223 ± 6.93	72.482 ± 3.427	69.765 ± 9.632
最大血药浓度 C (max)	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	8.393 ± 1.22	17.876 ± 0.985	23.382 ± 2.333

注:与中、高剂量组比较,* $P < 0.05$ 。

Note: Compare with middle, high dose group, * $P < 0.05$.

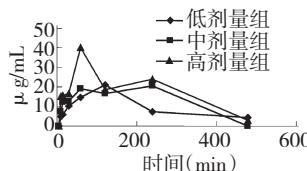


图1 大鼠灌胃不同剂量橄榄苦昔体内的平均药时曲线

Fig. 1 Mean plasma concentration-time curve of oleuropein after i. g. administration

4 讨论

由于大鼠个体间存在差异可能导致数据偏差,本实验中的大鼠均采用完全随机法进行分组。取各组大鼠血药浓度的平均值,用3P97药动学软件处理数据,求出药动学参数,尽可能减少由于大鼠个体差异所造成的数据偏差。

研究结果表明,大鼠灌胃不同剂量橄榄苦昔时,橄榄苦昔的 $t_{1/2}$ 随给药剂量增大而显著延长,AUC先减小后增大,推测橄榄苦昔在大鼠体内为非线性药代动力学过程^[6]。

实验结果显示,中、高剂量组(200 mg/kg和400 mg/kg)大鼠血浆的药时曲线出现双峰现象,而低剂量组(100 mg/kg)未出现双峰现象。药物的吸收出现多峰现象存在多种原因,如肝肠循环、多部位吸

收、体内再分布等。中、高剂量组的双峰现象可能是因为橄榄苦昔在大鼠体内的药代动力学存在肝肠循环,或快速分布至其它脏器后再次吸收入血。相关研究有待深入进行。

本实验也做了方法专属性考察,结果表明血浆中内源性杂质不干扰橄榄苦昔的含量测定,内标物与橄榄苦昔分离完全,峰形良好,该方法适用于本实验。

本研究均按照2010版药典的附录XIX B,即生物样品分析方法的基本要求,进行操作^[7],符合国内检测标准。

参考文献

- Zhao GQ(赵桂琴). Studies on the chemical constituents and anti-HBV activity of *Jasminum officinale* L. var. *grandiflorum*. Beijing: Academy of Military Medical Sciences (军事医学科学院), PhD. 2008.
- Zhao XY(赵绪元), Yao JC(姚金成), Hu L(胡领), et al. Determination of Baicalin of Yinhuang granules in rat plasma by HPLC and study on its pharmacokinetics. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19:645-647.
- Zhang Y(张杨), Zhang ZQ(张振秋), Sun ZS(孙兆姝), et al. Pharmacokinetic of berberine in combination of Cortex Phellodendri and Rhizoma atractylodis in rat. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2009, 31:1351-1354.

(下转第68页)