

# 京尼平苷酸在胆汁淤积型大鼠体内的药动学分析

陈浩, 闵剑斌, 黄小桃\*, 刘昌辉, 宓穗卿, 王宁生  
(广州中医药大学临床药理研究所, 广州 510405)

**[摘要]** 目的: 京尼平苷酸(GPA)具有利胆作用, 研究该成分在胆汁淤积病理模型状态下体内代谢过程的差别。方法: 大鼠随机分为正常组和 $\alpha$ -萘异硫氰酸酯(ANIT 剂量  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )诱导胆汁淤积模型组, 给予不同剂量 GPA(高、中、低剂量分别为  $100, 50, 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。采用蛋白沉淀法对大鼠血浆进行处理, 建立以绿原酸为内标的 HPLC-UV 检测方法, 流动相乙腈-0.5% 冰乙酸(28:72), 检测波长 238 nm, 利用 Stata12.0 软件拟合房室模型并计算各组大鼠的药动学参数。结果: ANIT 造胆汁淤积模型成功率 >95%。与正常组相比, 胆汁淤积模型降低了 GPA 在体内的消除速率常数( $K_e$ ), 延长了在体内的平均驻留时间( $\text{MRT}_{0-t}$ )和半衰期( $t_{1/2}$ ), 提高了药时曲线下面积  $\text{AUC}_{0-t}$  和  $\text{AUC}_{0-\infty}$ 。结论: 该分析方法满足了京尼平苷酸体内药物分析的要求, 胆汁淤积模型可降低京尼平苷酸的消除和排泄。

**[关键词]** 京尼平苷酸; 胆汁淤积;  $\alpha$ -萘异硫氰酸酯; 药物代谢动力学; 半衰期

**[中图分类号]** R969.1; R945; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)17-0075-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015170075

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150713.1427.002.html>

**[网络出版时间]** 2015-07-13 14:27

**Pharmacokinetics Analysis of Geniposidic Acid in Normal and Cholestatic Rats** CHEN Hao, MIN Jian-bin, HUANG Xiao-tao\*, LIU Chang-hui, MI Sui-qing, WANG Ning-sheng (Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** Geniposidic acid (GPA) can promote bile acid excretion, its metabolism process difference was studied in cholestatic model for development clinical role. **Method:** Rats were divided into the normal group and the cholestatic model group induced by  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate (ANIT, dose of  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), different doses of GPA were administered (high, medium and low doses of  $100, 50, 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). GPA and chlorogenic acid were extracted from plasma by protein precipitation, separated on phenomenex  $\text{C}_{18}$  column with a mobile phase of acetonitrile and water containing 0.5% acetic acid with rate of (28:72), detection wavelength was at 238 nm. Stata12.0 was adopted to fit compartment model and calculate pharmacokinetic parameters. **Result:** ANIT cholestasis model made a success rate of more than 95%. Compared with the normal group, rat with cholestasis model might reduce  $K_e$  and increase  $T_{1/2}$  of GPA *in vivo*, and might extend the mean residence time ( $\text{MRT}_{0-t}$ ) *in vivo*, also might improve  $\text{AUC}_{0-t}$  and  $\text{AUC}_{0-\infty}$ . **Conclusion:** This analytical method is suitable and reliable for *in vivo* analysis of GPA, cholestasis model can reduce elimination and excretion of GPA.

**[Key words]** geniposidic acid; cholestasis;  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate; pharmacokinetics; half-life

广州地处岭南湿热地区, 气候炎热, 湿润多雨, 导致该地多发湿热外邪入侵, 常常诱发胆汁郁积综合征, 这一病症主要是肝内细胞或者胆管水平的胆汁代谢障碍, 主要发生在胆汁生成、分泌或

流动过程中, 胆汁不能顺利排泄, 会引起郁积, 有害物质(如毒性胆汁酸)累积会引起肝脏损伤<sup>[1]</sup>。京尼平苷酸(梔子酸)存在于多味药材中, 具有一定的抗胆汁淤积作用<sup>[2]</sup>, 但京尼平苷酸体内药物

**[收稿日期]** 20150419(013)

**[基金项目]** 广东省高等学校科技创新重点项目[粤发改社(2009)972号]

**[第一作者]** 陈浩, 在读博士, 从事药物体内代谢分析研究, Tel:020-36585532, E-mail:chenhao211@126.com

**[通讯作者]** \* 黄小桃, 博士, 助理研究员, 从事药物体内代谢动力学与中药安全性评价研究, Tel:020-36585405, E-mail:Xth300@126.com

代谢动力学研究未见相关文献报道。本研究京尼平苷酸在 $\alpha$ -萘异硫氰酸酯(ANIT)诱导的肝内胆汁淤积模型和正常大鼠体内动力学过程,比较其体内动力学差别,为京尼平苷酸抗胆汁淤积药物的开发提供参考。

## 1 材料

1100系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), LH-20型高速冷冻离心机(中国中科中佳科技仪器有限公司), vortex-genie2型旋涡混合器(美国Scientific Industries公司), AEL-220型电子分析天平(日本Shimadzu公司), Milli-Q Integral型纯水仪(美国Millipore公司), Forma-80℃冰箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

京尼平苷酸(南京泽郎生物科技有限公司,批号20141012,纯度>95%),京尼平苷酸、绿原酸对照品(中国食品药品检定研究所,批号分别为111828-201102,110753-201415,纯度依次为98%,96.4%), $\alpha$ -萘异硫氰酸酯(ANIT,阿拉丁试剂,批号N10389),金龙鱼大豆油(食品级,好又多超市),甲醇和乙腈为色谱级,其他试剂均为分析纯。

60只体重250~300g的雄性SPF级SD大鼠,购于广东省医学实验动物中心,合格证号SCXK(粤)2013-0002,实验室习惯适应性饲养5d(温度22~26℃,湿度65%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 药物与试剂配置

**2.1.1 京尼平苷酸和绿原酸对照品溶液** 精密称取京尼平苷酸对照品10.3mg和绿原酸对照品5.22mg,分别置于10mL量瓶中,加甲醇定容,得 $1.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 京尼平苷酸和 $0.503\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 绿原酸对照品母液,4℃保存。

**2.1.2 诱导剂** 称取ANIT 1g溶于100mL大豆油中,超声溶解呈浑浊状态,即得。

**2.1.3 受试药** 精密称取京尼平苷酸1.053g溶于100mL水中,得 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 京尼平苷酸溶液,依次稀释得 $5, 2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 京尼平苷酸溶液,4℃保存。

### 2.2 大鼠胆汁淤积模型及体内药物代谢动力学

**2.2.1 胆汁淤积模型建立** 随机选取30只大鼠,称定体重,按 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量给予大鼠诱导剂,48h后眼眶静脉丛采血,处死并摘除部分总胆汁酸(TBA),总胆红素(TB),直接胆红素(DB)异常的大鼠,肝脏进行病理组织学检查。

**2.2.2 分组给药** 从正常组和模型组大鼠中各选取24只大鼠,各分为3组(高、中、低剂量分别为100,

$50, 25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),共6组,每组8只,按 $0.01\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 灌胃给药。

**2.2.3 血样采集** 大鼠分别于给药前,给药后5, 15, 30min和1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24h取血,每次约0.3mL,置于肝素化1.5mL离心管中,在4℃,  $3500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min,取上清血浆100 $\mu\text{L}$ , -80℃冷藏备用。

**2.2.4 血浆样品处理**<sup>[3]</sup> 取血浆样品100 $\mu\text{L}$ ,加入 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 绿原酸内标液50 $\mu\text{L}$ ,加10%三氯乙酸50 $\mu\text{L}$ ,涡旋15min,  $12000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15min,吸取上清液进样。

**2.3 数据处理** 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用SPSS 13.0软件进行统计学分析,药动学参数使用Stata12.0软件计算,多样本间均数比较采用单因素方差分析,方差齐性LSD-*t*检验,方差不齐使用Tamhane's T2检验。

**2.4 大鼠血液指标与病理检测** 取正常组和模型组大鼠各30只,48h后眼眶静脉丛采血,按2.2.4项下方法处理,按照试剂盒说明测定,结果正常组大鼠的TBA, TB, DB分别为 $(28.87\pm 3.16)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $(1.65\pm 0.40)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $(10.32\pm 2.15)\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,模型组大鼠的TBA, TB, DB分别为 $(79.72\pm 11.20)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $(42.24\pm 6.25)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $(34.59\pm 4.83)\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果显示胆汁淤积模型大鼠血清中的TBA, TB, DB均极显著高于正常组。从正常组和模型组大鼠中各选取3例进行病理组织学观察,正常组大鼠的肝细胞以中央静脉为中心,整体组织形态结构正常,单行排列成板状结构;模型组大鼠肝组织细胞内水肿明显,且水肿面积较大,组织间隙较大,肝组织间隙可见大量胆汁横溢,见图1。

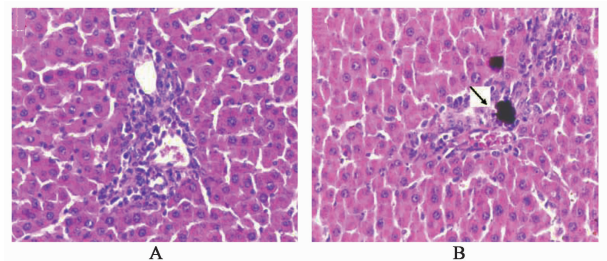


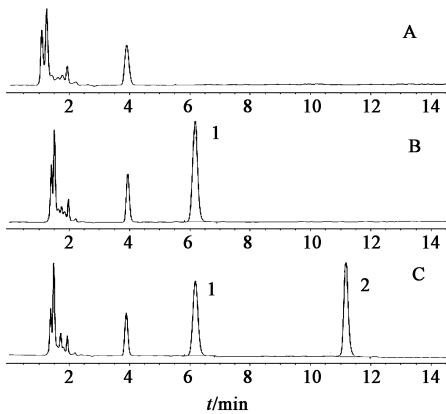
图1 正常组(A)和胆汁淤积模型组大鼠(B)的肝组织病理(HE,  $\times 200$ )

Fig.1 Pathology of liver sections from normal and ANIT-treated rats (HE,  $\times 200$ )

### 2.5 HPLC方法学考察

**2.5.1 色谱条件**<sup>[4]</sup> Phenomenex  $\text{C}_{18}$ 色谱柱(4.6mm  $\times$  250mm, 5 $\mu\text{m}$ ),流动相乙腈-0.5%冰乙酸

(28:72), 检测波长 238 nm, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。见图 2。



A. 阴性样品; B. 供试品; C. 供试品 + 内标(绿原酸); 1. 京尼平苷酸; 2. 绿原酸

图 2 大鼠血浆中京尼平苷酸 HPLC

Fig. 2 HPLC spectrum of geniposidic acid in rat plasma

**2.5.2 标准曲线绘制** 取系列空白大鼠血浆 100 μL, 加入京尼平苷酸系列对照品溶液, 按 2.2.4 项下方法操作, 制成京尼平苷酸终质量浓度分别为 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 150, 300 mg·L<sup>-1</sup>, 内标液的终质量浓度均为 100 mg·L<sup>-1</sup> 的系列血浆样品溶液, 按 2.5.1 项下条件测定, 以京尼平苷酸与绿原酸峰面积比值为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得标准曲线方程  $Y = 0.6657X - 0.4029$  ( $R^2 = 0.9995$ ), 线性范围 0.25 ~ 300 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.5.3 精密性与回收率考察** 按 2.2.4 项下方法操作, 制备京尼平苷酸质控样品 (0.5, 50, 250 mg·L<sup>-1</sup>), 计算日内精密性 (5 次/d) RSD 分别为 8.9%, 7.6%, 9.1%; 计算日间精密性 (连续测定 5 d, 每天 1 次) 依次为 8.4%, 9.3%, 8.6%。按 2.2.4 项下方法制备京尼平苷酸质控样品 (0.5, 50, 250 mg·L<sup>-1</sup>), 将等量京尼平苷酸对照品溶液的色谱峰与京尼平苷酸血浆液比较, 得京尼平苷酸的绝对回收率分别为 (68.43 ± 5.79)%, (84.36 ± 7.61)%, (75.63 ± 7.35)%。将京尼平苷酸加入血浆中处理后, 带入标准曲线计算质量浓度, 与加入量比较, 考察样品的方法回收率分别为 (75.73 ± 8.67)%, (88.21 ± 7.36)%, (85.38 ± 8.54)%。

**2.5.4 稳定性试验** 按 2.2.4 项下方法操作, 配制 3 个质量浓度 (0.5, 50, 250 mg·L<sup>-1</sup>) 的京尼平苷酸血浆样品, 分别室温放置 24 h, 4 °C 放置 1 周, -80 °C 冷冻 30 d 后按 2.5.1 项下条件测定, 结果见表 1。

表 1 大鼠血浆中京尼平苷酸在不同储存条件下的稳定性考察 (n=5)

Table 1 Stability of geniposidic acid in rat plasma under different storage conditions (n=5)

储存条件	质量浓度 /mg·L <sup>-1</sup>	测得值 ( $\bar{x} \pm s$ ) /mg·L <sup>-1</sup>	RSD /%	RE /%
室温 24 h	0.5	0.46 ± 0.06	13.0	8.0
	50	47.84 ± 4.17	8.7	4.3
	250	235.56 ± 22.34	9.5	5.8
4 °C 储存 1 周	0.5	0.44 ± 0.07	15.9	12.0
	50	44.14 ± 5.84	13.2	11.7
	250	238.54 ± 23.92	10.0	4.6
-80 °C 储存 30 d	0.5	0.45 ± 0.06	13.3	10.0
	50	45.37 ± 5.84	12.9	9.3
	250	233.51 ± 26.84	11.5	6.6

注: RE 表示相对误差。

**2.6 京尼平苷酸体内药动力学分析** 按 2.2.4 项下方法处理大鼠血浆样品, 按 2.5.1 项下条件测定, 绘制药-时曲线, 见图 3。利用 Stata12.0 软件对正常组和胆汁淤积组大鼠血药浓度和时间的结果进行动力学模型拟合, 判定京尼平苷酸口服的动力学过程为血管外二房室模型, 药代动力学参数见表 2。结果显示剂量对京尼平苷酸在大鼠体内的消除速率常数 ( $K_e$ ) 和消除半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 无明显的影响, 无统计学差异。但与正常组相比, 模型组大鼠的  $K_e$  减低,  $t_{1/2}$  明显延长, 且具有统计学差异。模型组大鼠的达峰浓度 ( $C_{max}$ ) 均比相应浓度正常组大鼠的要高, 且具有统计学差异。ANIT 诱导的胆汁淤积模型组大鼠体内的京尼平苷酸平均驻留时间 ( $MRT_{0-t}$ ) 相对相应浓度正常组大鼠的均延长, 均具有统计学差异。京尼平苷酸在胆汁淤积组大鼠体内的药时曲线下面积 ( $AUC_{0-t}$ ) 均显著高于相应浓度正常组大鼠体内。

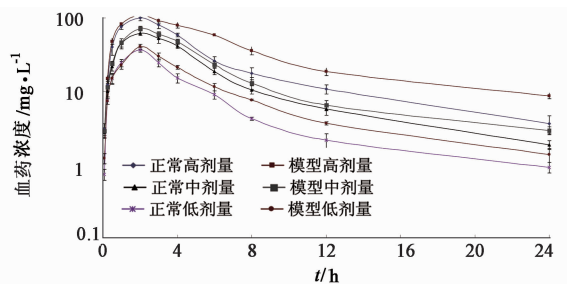


图 3 京尼平苷酸在正常组和胆汁淤积模型组大鼠体内的药-时曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 3 Concentration-time curves of geniposidic acid in normal and cholestasis rats ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

表 2 京尼平苷酸给药后在正常组和胆汁淤积模型组大鼠的体内药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Pharmacokinetic parameters of geniposidic acid in normal and cholestasis rats after oral administration ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

参数	正常组			模型组		
	100 mg·kg <sup>-1</sup>	50 mg·kg <sup>-1</sup>	25 mg·kg <sup>-1</sup>	100 mg·kg <sup>-1</sup>	50 mg·kg <sup>-1</sup>	25 mg·kg <sup>-1</sup>
$K_e/h^{-1}$	0.33 ± 0.10	0.29 ± 0.07	0.30 ± 0.08	0.23 ± 0.05 <sup>1)</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.22 ± 0.05 <sup>1)</sup>
$t_{1/2}/h$	2.18 ± 0.37	2.45 ± 0.72	2.31 ± 0.44	3.08 ± 0.79 <sup>1)</sup>	2.95 ± 0.64 <sup>1)</sup>	3.11 ± 0.81 <sup>1)</sup>
$C_{max}/mg \cdot L^{-1}$	99.87 ± 8.34	61.92 ± 4.62	36.85 ± 2.62	109.49 ± 8.26 <sup>1)</sup>	72.04 ± 5.14 <sup>1)</sup>	40.39 ± 3.19 <sup>1)</sup>
$MRT_{0-t}/h$	5.64 ± 1.36	5.82 ± 0.97	5.35 ± 1.2	7.64 ± 1.86 <sup>1)</sup>	6.95 ± 1.17 <sup>1)</sup>	7.35 ± 1.52 <sup>1)</sup>
$MRT_{0-\infty}/h$	7.81 ± 1.64	8.03 ± 1.55	8.14 ± 1.73	10.04 ± 2.01 <sup>1)</sup>	9.54 ± 1.87 <sup>1)</sup>	9.97 ± 2.11 <sup>1)</sup>
$AUC_{0-t}/mg \cdot h \cdot L^{-1}$	328.19 ± 38.57	168.54 ± 21.23	96.73 ± 17.68	398.54 ± 42.16 <sup>1)</sup>	205.93 ± 36.87 <sup>1)</sup>	123.53 ± 28.79 <sup>1)</sup>
$AUC_{0-\infty}/mg \cdot h \cdot L^{-1}$	406.64 ± 73.06	218.85 ± 59.54	129.59 ± 15.85	411.82 ± 59.28	225.69 ± 39.79	134.33 ± 45.57

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

ANIT 诱导的大鼠肝内胆汁淤积模型广泛用于保肝利胆的实验研究,可造成肝细胞和胆管细胞的急性损伤,引起肝脏组织病理学的改变,并且伴随着血液中 TBA, TB 及 DB 急剧升高,DB 升高预示着明显的肝内胆汁淤积,胆汁不能外排。外排的胆汁流降低,肝细胞炎性病变或坏死,与人肝内胆汁淤积病理相似,故该模型被广泛用作利胆药物的研究<sup>[5]</sup>。京尼平苷酸是一种环烯醚萜葡萄糖苷,在杜仲、龙船花及车前草的种子内含量较高,具有提高记忆力、抗肿瘤、抗衰老、促进胆汁分泌<sup>[6]</sup>等药理作用。

本文通过 HPLC 测定京尼平苷酸在正常组和胆汁淤积组大鼠体内的药物浓度,模拟代谢动力学过程及其在体内过程参数的变化,这种结合正常状态和病理模型状态下的体内动力学过程研究发现,相同给药剂量下,模型组  $C_{max}$  高于正常组大鼠,原因可能由于京尼平苷酸在模型状态下降低了  $K_e$  和延长了  $t_{1/2}$ ,相对延长了药物在大鼠体内的  $MRT_{0-t}$ 。研究药物在病理模型状态下的动力学过程,更契合药物开发的目的性和可靠性,对探索京尼平苷酸保肝利胆的起效和作用时间更加合理。

### [参考文献]

- [1] Paumgartner G. Pharmacotherapy of cholestatic liver diseases[J]. J Digest Dis, 2010, 11(3):119-125.
- [2] Goto H, Takikawa H. Effect of genipin on cholestasis induced by estradiol-17beta-glucuronide and lithocholate-3-O-glucuronide in rats[J]. Hepatol Res, 2010, 40(5):524-529.
- [3] Huang Y Z, Liu E W, Wang L, et al. LC/MS/MS determination and pharmacokinetic studies of six compounds in rat plasma following oral administration of the single and combined extracts of *Eucommia ulmoides* and *Dipsacus asperoides* [J]. Chin J Nat Med, 2014, 12(6):469-476.
- [4] 陈海莉,张峰,徐婧,等. 杜仲叶中有效成分的闪式提取工艺优选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19):19-21.
- [5] 陆云飞,刘成,陈晓蓉,等. 消黄方对  $\alpha$ -萘异硫氰酸酯大鼠黄疸模型肝组织氧化应激的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(2):460-462.
- [6] Kim S J, Kim K M, Park J, et al. Geniposidic acid protects against D-galactosamine and lippolysaccharide induced hepatic failure in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 146(1):271-277.

[责任编辑 刘德文]