

齐墩果酸对氟伐他汀在大鼠体内药动学的影响

杨茗钊¹, 徐文炜², 程晓华^{1*} (1.南昌大学第一附属医院, 南昌 330006; 2.南昌大学临床药理研究所, 南昌 330006)

摘要: 目的 探讨齐墩果酸对氟伐他汀在大鼠体内的药动学影响。方法 将 16 只健康大鼠随机分为单药组(5.0 mg·kg⁻¹ 氟伐他汀)和联合用药组(5.0 mg·kg⁻¹ 氟伐他汀+60 mg·kg⁻¹ 齐墩果酸), 单药组和联合用药组分别灌胃空白溶剂和齐墩果酸 5 d, 每天 1 次, 第 6 天 2 组均给予氟伐他汀灌胃。给药后不同时间点采血, LC-MS 测定大鼠体内血药浓度, 比较 2 组间主要的药动学参数。结果 与单药组比较, 联合用药组氟伐他汀主要药动学参数 C_{max}、AUC_{0-t} 显著上升, 组间比较差异具有统计学意义(P<0.05)。结论 联合应用齐墩果酸可能影响大鼠体内氟伐他汀的药动学特性。

关键词: 氟伐他汀; 齐墩果酸; 药动学; 高效液相色谱质谱联用

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2017)06-0811-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.06.005

引用本文: 杨茗钊, 徐文炜, 程晓华. 齐墩果酸对氟伐他汀在大鼠体内药动学影响[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(6): 811-814.

Effect of Oleanolic Acid on the Pharmacokinetics of Fluvastatin in Rats

YANG Mingfang¹, XU Wenwei², CHENG Xiaohua^{1*} (1. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Institute of Clinical Pharmacology of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect of oleanolic acid(OA) on the metabolism of fluvastatin in rats. **METHODS** Sixteen health rats were randomly divided into two groups: the single group(fluvastatin 5.0 mg·kg⁻¹) and the combined group(fluvastatin 5.0 mg·kg⁻¹+OA 60 mg·kg⁻¹). The single group were administrated with blank solution while the combined group were administrated with the same volume of OA, the administration period of 5 d. At the sixth day, both groups were administrated with fluvastatin, plasma concentrations of fluvastatin were determined by LC-MS. The main pharmacokinetic parameters were calculated and compared. **RESULTS** The main pharmacokinetic parameters(C_{max}, AUC_{0-t}) of the combined group showed increased remarkably compared with the single group. Statistically significant difference was showed between groups(P<0.05). **CONCLUSION** OA can affect the pharmacokinetic parameters of fluvastatin in rats.

KEY WORDS: fluvastatin; oleanolic acid; pharmacokinetic; LC-MS

氟伐他汀是第一个全化学合成的 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 竞争性抑制胆固醇的生物合成, 降低肝细胞内胆固醇的含量, 加速从血浆中清除 LDL-C, 是临床常用降血脂药物。齐墩果酸为五环三萜类化合物代表药物, 以游离体和配糖体的形式广泛分布于青叶胆、女贞子等双子叶植物的 60 个科约 190 种植物中, 具有保肝抗炎、抗肿瘤、降血脂、促进神经干细胞增殖等药理学活性^[1-3]。尤其是齐墩果酸在抗动脉粥样硬化、降血脂等方面的药理作用^[4-6]以及强化阿托伐他汀对高血脂患者的降脂效果^[6], 使得联合其他化学药品用以临床心血管疾病的治疗变得日益广泛。目前, 临床合理用药和药物相互作用业已为临床和药学专家所重视, 但有关于中药活性成分对西药药动学影响相

互作用报道较少, 笔者也尚未见有关齐墩果酸对氟伐他汀药动学影响方面的研究报道。大量研究表明, 氟伐他汀在不同个体服用同等剂量时, 表现出显著的疗效差异, 而个体差异可能与转运体、细胞色素 450 酶(CYP450)以及受体的遗传多态性对其转运代谢的影响有关。为明确氟伐他汀联用齐墩果酸临床疗效和安全性, 本实验通过研究齐墩果酸对氟伐他汀大鼠体内药动学参数的影响, 探讨其是否存在药动学相互作用, 为临床合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SD 大鼠 16 只, ♂, 体质量(220±18)g, 由南昌大学医学部实验动物中心提供, 合格证号:

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2011ZX09302-007-03); 江西省青年科学基金项目(20142BAB215019); 江西省卫生计生委科技计划项目(20175136)

作者简介: 杨茗钊, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0791)88692250 E-mail: 649479518@qq.com *通信作者: 程晓华, 男, 主管药师 Tel: (0791)88695051 E-mail: cxh0204032@163.com

SCXK-2015-0002, 试验前 1 周进行适应性喂养。

1.2 试药和试剂

氟伐他汀钠胶囊(北京诺华制药有限公司, 批号: 20141022, 规格: 每粒 40 mg); 氟伐他汀对照品(批号: 1006003, 含量>99.6%); 瑞舒伐他汀对照品(批号: 20051101RS, 含量>99.5%)均购自中国药品生物制品检定所; 齐墩果酸片(浙江瑞新药业股份有限公司, 批号: 20130812, 规格: 每片 20 mg); 羧甲基纤维素(天津市光复精细化工研究所, 批号: 20130812), 甲醇(色谱纯, Merck 公司); 乙酸乙酯及其余试剂均为市售分析纯。

1.3 仪器

高效液相色谱-质谱联用仪(LC-MS-2010EV)、LCMSsolution 色谱工作站(日本岛津); XW-80A 漩涡混匀器(上海驰唐电子有限公司); Anke LXJ-II 大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂); Sigma 3K30 台式超高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); BP61S 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

1.4 方法

1.4.1 溶液和灌胃液配置 精密称取氟伐他汀和瑞舒伐他汀对照品约 20 mg, 50 mL 甲醇溶解稀释并定容, 充分摇匀, 得到浓度为 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品贮备液, 置 4°C 冰箱冷藏保存, 临用时稀释。取氟伐他汀钠胶囊去除胶囊、齐墩果酸片碾碎后用 3%羧甲基纤维素钠充分振荡溶解, 制得一定浓度的混悬液待用。

1.4.2 动物给药和采血 16 只 SD 大鼠, 称重编号, 随机分为单药组和联合用药组, 每组 8 只。单药组灌胃给予 3%羧甲基纤维素钠溶液, 每只 10 mL, 每日 1 次, 连续 5 d, 于第 6 天给予 5.0 mL 氟伐他汀钠($5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的 3%羧甲基纤维素钠溶液灌胃。联合用药组动物前给予齐墩果酸($60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的 3%羧甲基纤维素钠溶液灌胃每只 5.0 mL , 每日一次, 连续 5 d, 于第 6 天给予氟伐他汀钠($5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的 3%羧甲基纤维素钠溶液灌胃。所有动物于灌胃氟伐他汀钠的前晚禁食不禁水, 分别于给予氟伐他汀钠前和给药后 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0 和 12.0 h 大鼠眼眶采血 0.25 mL 至肝素化试管中, 以 $4500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离出血浆置 -20°C 冷冻保存备处理检测。

1.4.3 血浆样品预处理 取血浆 $100 \mu\text{L}$, 精密加入 $40 \mu\text{L}$ 内标(瑞舒伐他汀, $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)混旋, 再

加 $50 \mu\text{L}$ 冰醋酸溶液($0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)酸化混匀后加 5.0 mL 乙酸乙酯振荡, $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 4.5 mL , 50°C 干浴锅中氮气挥干, $100 \mu\text{L}$ 甲醇溶解残渣, 经 $18000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取 $10 \mu\text{L}$ 进样进行定量 LC-MS 分析。

1.4.4 色谱条件^[7-8] Shim-Pack ODS C_{18} 分析柱 ($250 \text{ mm}\times 2.0 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相: 甲醇-0.1%醋酸溶液(65 : 35), 流速: $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温: 35°C ; 选择性离子检测(SIM); 电喷雾离子化(ESI); 离子极性: 负离子; 检测对象: 氟伐他汀, m/z : 410.2; 瑞舒伐他汀, m/z : 480; 雾化气流速 $1.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$; 干燥气流速: $4.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测电压 1.60 kV ; 曲形脱溶剂装置温度: 250°C ; 加热块温度: 200°C ; 干燥气流速: $2.0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.4.5 统计学处理和药动学评价 所有计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 根据氟伐他汀血药浓度, 绘制血药浓度-时间曲线, 采用中国药理学学会数学药理专业委员会 DAS 2.0 软件进行数据处理, 计算和比较单用及其合用齐墩果酸灌胃后的药动学参数。

2 结果

2.1 专属性考察

按“1.4.3”项下方法处理血浆样品, 经进样分析结果表明, 在本实验条件下, 氟伐他汀及内标瑞舒伐他汀均有较大的质谱响应, 与血浆中内源性杂峰有良好的分离度, 不干扰样品峰的测定, 基线噪音小, 氟伐他汀和瑞舒伐他汀的保留时间分别为 9.8 和 8.4 min, 结果见图 1。

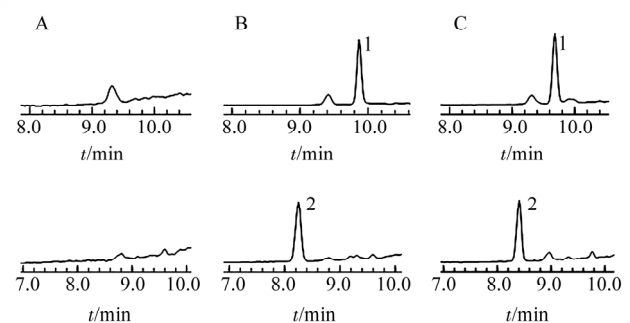


图 1 血浆色谱图

A-空白血浆; B-加入对照品的血浆; C-血浆样本; 1-氟伐他汀, 2-瑞舒伐他汀。

Fig. 1 Plasma chromatograms

A-blank plasma; B-plasma with standard substance; C-plasma sample; 1-fluvastatin; 2-rosuvastatin.

2.2 线性范围和定量限考察

取空白血浆加入内标和适量不同浓度氟伐他汀贮备液, 配制成浓度分别为 0.25, 0.5, 1.0, 2.0,

5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 ng·mL⁻¹ 血浆样本, 按“1.4.3”项下方法操作, 以氟伐他汀血浆浓度(C)对氟伐他汀与内标峰面积比(R)作线性回归计算, 氟伐他汀在 0.25~80.0 ng·mL⁻¹ 线性良好($r=0.9991$), 回归方程 $R=2.025C+0.029$, 定量下限为 0.25 ng·mL⁻¹。

2.3 基质效应考察

配制加入内标浓度分别为 0.5, 5.0, 40.0 ng·mL⁻¹ 的氟伐他汀甲醇溶液各 10 份, 氮气挥干, 取其中 5 份以流动相溶解残渣, 进样分析, 分别记录氟伐他汀和内标的峰面积(A_s)。另取 5 份以空白血浆提取后的复溶液溶解残渣, 进样分析, 记录氟伐他汀和内标的峰面积(A_x)。基质效应 $ME(\%)=A_x/A_s \times 100\%$, 实验结果显示, 氟伐他汀在低、中、高 3 种浓度水平的平均 ME 值分别为 98.5%, 101.3% 和 96.3%, 内标平均 ME 分别为 101.8%, 92.8% 和 97.4%, 表明采用本实验建立的血样测定方法, 氟伐他汀和内标的测定不受基质干扰。

2.4 回收率与精密度考察

取空白血浆 80 μ L, 分别加入 20 μ L 不同浓度的氟伐他汀对照品溶液得低、中、高浓度分别为 0.5, 5.0, 40.0 ng·mL⁻¹ 的含药血浆若干份, 按“1.4.3”项下方法对血浆样品处理。记录待测化合物峰面积计算其平均提取回收率($n=5$); 1 d 内分别测定计算日内精密度($n=5$)以及连续 3 d 测定计算日间精密度($n=5$)。测得在低、中、高血药浓度时的平均提取回收率分别为 90.24%, 101.23%, 96.23%, RSD 分别为 8.21%, 10.59%, 7.56%。日内精密度 RSD 分别为 9.52%, 5.32%, 4.26%, 日间精密度 RSD 分别为 8.24%, 7.55%, 6.53%。

2.5 稳定性考察

取空白血浆 80 μ L, 分别加入 20 μ L 不同浓度

的氟伐他汀对照品溶液, 得低、中、高浓度分别为 0.5, 5.0, 40.0 ng·mL⁻¹ 的含药血浆若干份, 分别室温下放置 4 h、-20 $^{\circ}$ C 冰箱中冷冻保存 15 d、反复冻融 3 次后, 按“1.4.3”项下方法对血浆样品处理, 考察在不同条件下保存血浆样品的稳定性。结果显示在以上设定的保存条件下其测定值的 RSD 值均 < 15%, 表明在这些条件下稳定性良好, 样品满足分析和保存要求。

2.6 药动学参数

单用组和联用组所得血药浓度数据结果经 DAS 2.0 药动学软件处理后, 主要药动学参数见表 1, 2 组 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 组间比较差异具有显著性($P < 0.05$), 同时, T_{max} 、 $t_{1/2\beta}$ 、 CL_z/F 值 2 组间比较无统计学差异。

2.7 血药浓度-时间曲线

单药和联合用药灌胃后不同时间点血浆中氟伐他汀的平均血药浓度-时间曲线, 结果见图 2。结果显示, 联用齐墩果酸可提高氟伐他汀的血浆药物浓度, 与单独用药组相比, 联合用药组氟伐他汀的 AUC_{0-t} 、 C_{max} 明显上升, 2 组比较差异有显著统计学意义($P < 0.05$)。

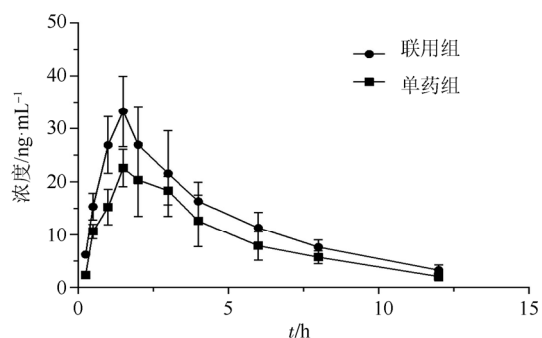


图 2 单用及联用后氟伐他汀平均血药浓度-时间曲线
Fig. 2 Mean concentration-time curve of fluvastatin after administrated with single and combine

表 1 单用和联用后氟伐他汀主要药动学参数($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Main pharmacokinetic parameters of fluvastatin after administrated with single and combine($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 主要药动学参数 | | | | | |
|-----|----------------------------|-------------|------------------|--------------------------------------|---|-------------------------|
| | $C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$ | T_{max}/h | $t_{1/2\beta}/h$ | $AUC_{0-t}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$ | $AUC_{0-\infty}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$ | $CL_z/F/L \cdot h^{-1}$ |
| 联用组 | 36.15±5.82 | 1.92±0.22 | 2.92±0.82 | 143.60±19.30 | 157.92±26.19 | 1.25±0.16 |
| 单药组 | 24.82±3.95 ¹⁾ | 2.06±0.29 | 3.15±0.59 | 94.21±13.41 ¹⁾ | 109.42±20.31 ¹⁾ | 0.98±0.18 |

注: 与联用组比较, ¹⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with combined group, ¹⁾ $P < 0.05$.

3 讨论

目前, 中药与西药联合应用在临床老年慢性病治疗中已呈现普遍化和常规化。近年来, 随着我国中医药临床研究取得的长足发展, 中西药之间相互作用的研究具有重要的学术价值, 亦对日常临床工作具有十分重要的指导意义。本研究围绕中药齐墩果酸对西药氟伐他汀在大鼠体内药动学过程和主要药动学参数影响进行初步的探索性研究。在单药组和联合用药组分别灌胃空白溶剂和齐墩果酸干预 5 d 后, 再给予氟伐他汀灌胃采集系列血样检测血药浓度, 计算 2 组主要药动学参数。研究结果显示, 单用组和联用组氟伐他汀在大鼠体内药动学过程呈现基本一致的趋势。与单药组比较, 联合用药组氟伐他汀主要药动学参数 C_{max} 、 AUC_{0-t} 参数值显著上升, 相比单药组提高了 133.56%, 141.81%, 2 组比较差异具有显著性 ($P < 0.05$); 清除率有所下降, 但无统计学意义。研究结果提示齐墩果酸可能影响氟伐他汀大鼠体内的药动学, 但其机制需进一步探讨。

大量研究表明氟伐他汀主要在肝脏发生生物转化, 有机阴离子转运多肽(OATP)、细胞色素 P450 酶(CYP450)、耐药蛋白等基因多态性均可不同程度影响氟伐他汀的转运代谢。Toda 等^[9]研究阐明了针对不同 CYP450 酶可能对氟伐他汀代谢产生不同的效应, 结果显示, 少量代谢产物 M-3 主要由 CYP3A4 代谢产生, 主要产物 M-2、M-5 经 CYP2C9 代谢形成, CYP2C9 是氟伐他汀肝脏代谢的主要代谢酶。此外, OATP1B1、OATP2B1、OATP1B3 均可影响氟伐他汀的体内转运, 以 OATP1B1 转运最为显著, 氟伐他汀是 OATP1B1 的底物^[10-11]。本研究结果表明, 齐墩果酸可对氟伐他汀大鼠体内药动学参数产生影响, 其机制是否与齐墩果酸可能抑制 CYP450 酶(CYP3A4、CYP2C9 等)或 OATP(OATP1B1 等)转运体有关, 有待进一步探讨。但有研究表明 OA 对 CYP3A4 活性的影响不甚明确, 且结果存在分歧^[12], 而 OA 对 CYP2C9 及 OATP1B1 作用的相关研究未见报道。因此, 本研究中大鼠体内齐墩果酸对氟伐他汀的药动学影响, 是否与大鼠体内 CYP450 酶或 OATP 存在相关性, 有待进行深入研究和探讨。此外, 本研究设计的样本量以及药代学参数在不同种属间差异性问题的研究, 研究所获结果仍有待进一步在人体研究中进行确证。

目前, 氟伐他汀作为临床高脂血症患者的一线治疗药物, 疗效令人鼓舞, 合理的血药浓度是保证药物产生临床疗效的关键因素。血浆浓度可能受 OATP、CYP450 及耐药蛋白等基因多态性或合并用药的影响导致治疗失败或产生不良反应。因此, 本研究以关注临床常见药物联用导致的药动学特征改变入手, 结果提示临床治疗中氟伐他汀和齐墩果酸联用, 需密切关注其药物相互作用和可能产生的不良反应, 必要时进行血药浓度监测。

REFERENCES

- [1] SUN R N, ZHANG Y N, WANG J, et al. Active components of *Ligustrum lucidum* inhibiting hepatitis C virus replicase activity [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2013, 48(9): 1390-1396.
- [2] LIU B Y, YU Y, YI J, et al. Effects of astragaloside A and oleanolic acid on the proliferation of neural stem cells and the expression of Jagged1 mRNA *in vitro* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(9): 1033-1036.
- [3] HU Y, HE S, WANG Y, et al. Progress in researches of the antibacterial effect of oleanolic acid [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2017, 26(3): 304-308.
- [4] ZHANG M F, SHEN Y Q. Research progress on lipidemic regulation and antiobesity effects of oleanolic acid and ursolic acid [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2015, 32(1): 90-97.
- [5] BUUS N H, HANSSON N C, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ R, et al. Antiatherogenic effects of oleanolic acid in apolipoprotein E knockout mice [J]. Eur J Pharmacol, 2011, 670(2-3): 519-526.
- [6] YANG H X, GONG H Q, JIANG H B. Clinical observation and preliminary mechanism of oleanolic acid strengthening atorvastatin statin lipid-lowering effect [J]. Chin J Arterioscler(中国动脉硬化杂志), 2013, 21(6): 537-540.
- [7] YANG L, DING L K, GAO X H, et al. Determination of fluvastatin in human plasma by LC-MS method [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2013, 22(2): 215-217.
- [8] FAN X X, GE Q, PENG C X, et al. Contents of ursolic acid, oleanolic acid, loganin and akebia saponin D in *Dipsacus asper* determined by HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2015, 35(10): 935-938.
- [9] TODA T, ELIASSON E, ASK B, et al. Roles of different CYP enzyme in the formation of specific fluvastatin metabolites by human liver microsomes [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2009, 105(5): 327-332.
- [10] LIU J, JIN G F, HU J F, et al. Effects of organic anion transporting polypeptide1B1 and cytochrome P2C9 genetic polymorphism on the transportation of fluvastatin [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2014, 30(9): 794-796.
- [11] LEE C K, CHOI J S, BANG J S. Effects of fluvastatin on the pharmacokinetics of repaglinide: possible role of CYP3A4 and p-glycoprotein inhibition by fluvastatin [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2013, 17(3): 245-251.
- [12] DU Y, ZHU R H, SU F Li. Effect of oleanolic acid on CYP1A2, CYP2E1 and CYP3A4 activity in healthy subjects [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2008, 43(2): 300-303.

收稿日期: 2016-11-10

(本文责编: 李艳芳)