

强度,但其对于滴丸中的药物无抑晶作用,且成型性差,药物在PEG中的溶解度也较在Poloxamer中差,需加无水乙醇助溶。根据预实验的结果,将主药质量分数控制在25%以下,并以PEG6000和Poloxamer 188的混合辅料作为固体分散体的载体。

星点设计-效应面优化法是适宜进行非线性拟合的优化法,通常在最佳条件附近,指标与影响因素之间的关系为非线性,此时不宜用线性方程进行拟合,应选用二次多项式或更高次的多项式进行拟合,以得到最佳的模型拟合度。本实验中三次多项式模型的拟合相关系数最高达0.998,模型可信度非常高,通过预测分析也证实所建立的数学模型具有极佳的预测性。曾采用该优化法对聚乳酸微球的制备工艺进行了优化^[4,5],将该法用于中药制剂尚是首次,本实验结果表明,星点设计-效应面优化法可以

较好地推广应用到中药的制剂处方与制备工艺优化中来。

References:

- [1] Yu L C, Gu C H. Advances in pharmacological effects of silymarin [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2001, 21 (8): 493-494.
- [2] Deng L, Zhou H, Jiang X T. Preparation and evaluation of silybin in solid dispersions *in vitro* [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2000, 21 (10): 961-964.
- [3] Wu W, Chui G H. Central composite design-response surface methodology and its use in pharmacy [J]. *Foreign Med Sci Sect: Pharm* (国外医学:药学分册), 2002, 27 (5): 292-298.
- [4] Wu W, Chui G H, Lu B. Optimization of multiple variables: application of central composite design and overall desirability [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2000, 35 (8): 530-532.
- [5] Lu B, Wu W. Optimization of preparation of dexamethasone acetate-loaded poly (*d, l*-lactide) microspheres by central composite design [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1999, 34 (5): 387-391.

液质联用研究麦冬皂苷肠溶微球在大鼠体内的相对生物利用度

沈 岚¹,徐德生¹,冯 怡¹,姜玲海¹,刘玉敏²,赖奕坚²

(1. 上海中医药大学 药剂教研室,上海 201203; 2. 上海交通大学 分析测试中心,上海 200030)

摘要:目的 研究单次ig麦冬皂苷肠溶微球在大鼠体内的相对生物利用度,以期提供最为直接的制剂质量评价。方法 建立HPLC-MS分析方法,以固相萃取技术(SPE)进行血样处理,测定单次ig麦冬皂苷肠溶微球(被测制剂)及混悬剂(参比制剂)后不同时间血浆中薯蓣皂苷元的质量浓度,绘制药-时曲线,计算药动学参数及相对生物利用度。结果 C_{max} 为 (637.81 ± 17.23) ng/mL, t_{max} 为 (4.0 ± 0.0) h, AUC_{0-72} 为 $7\,840.01 \pm 412.03$ 。结论 麦冬皂苷肠溶微球与普通混悬剂在ig单次给药后,大鼠体内的吸收、分布、消除性质颇为相似,其药动学参数数据也较为一致,相对生物利用度为 $(91.10 \pm 3.44)\%$ 。

关键词:麦冬皂苷肠溶微球;相对生物利用度;HPLC-MS;固相萃取

中图分类号:R283.6; R285.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)05-0683-04

Relative bioavailability of *Ophiopogon japonicus* saponin enteric microsphere in rats

SHEN Lan¹, XU De-sheng¹, FENG Yi¹, JIANG Ling-hai¹, LIU Yu-min², LAI Yi-jian²

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Center of Analysis and Measurement, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China)

Abstract: Objective To study the relative bioavailability after ig rats with *Ophiopogon japonicus* saponin enteric microsphere in single-dose so as to give directly preparation quality evaluation. **Methods** Establishing the analysis method of HPLC-MS and dealing with the blood sample by solid phase extraction. Determining the diosgenin concentration in plasma after ig *Ophiopogon japonicus* saponin enteric microsphere and the suspension as comparison in single-dose, and calculating pharmacokinetic parameters and relative bioavailability. **Results** C_{max} , t_{max} , and AUC_{0-72} were (637.81 ± 17.23) ng/mL, (4.0 ± 0.0) h, and $7\,840.01 \pm 412.03$, respectively. **Conclusion** The characteristics of absorption, distribution, and elimination are resembled in rats between two preparations by ig in single-dose. The pharmacokinetic parameters are also identical. The relative bioavailability is $(91.10 \pm 3.44)\%$.

收稿日期:2004-09-28

作者简介:沈 岚(1975—),女,上海人,博士,讲师,研究方向为中药活性成分新剂型技术研究。

Tel: (021) 51322211 E-mail: alansusu@sina.com

Key words: *Ophiopogon japonicus* saponin enteric microsphere; relative bioavailability; HPLC-MS; solid phase extraction

前期研究已证实口服麦冬抗心肌缺血的有效组分之一为麦冬总皂苷,其经肠内菌代谢后的吸收入血成分之一为薯蓣皂苷元,且尿中无原形药存在;并采用喷雾干燥技术制备了麦冬皂苷肠溶微球^[1],显著降低了皂苷成分的胃黏膜刺激性。本实验以代谢产物薯蓣皂苷元为指标,建立高灵敏度、高选择性的 HPLC-MS 分析方法,对麦冬皂苷肠溶微球与参比制剂混悬剂进行相对生物利用度研究,以期对麦冬皂苷肠溶微球提供最为直接的质量评价,并提供一种切实可行的麦冬皂苷体内代谢产物的检测手段。

1 仪器、试剂与动物

Agilent 1100 型 HPLC-MSD(安捷伦科技公司);TGL—16G 高速台式离心机(上海医用仪器厂);XW—80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);TG—332A 型微量天平(上海精密学仪器有限公司)。

薯蓣皂苷元对照品(Sigma 公司,质量分数 98.0%);麦冬皂苷肠溶微球(自制);麦冬皂苷混悬液(曙光医院制剂);固相萃取小柱(Strata C₁₈-E, 50 μm 70A, 500 mg/6 mL,美国)。乙醚、甲醇(AR 级),生理盐水(医用),高效液相用乙腈、甲醇均为色谱纯,水为双蒸水。

SD 大鼠,雄性,180~220 g(中国科学院上海动物中心,合格证号:中科动管字 005 号)。

2 方法与结果

2.1 血样处理方法的考察

2.1.1 固相萃取法:于空白血浆中加入 10.13 μg/mL 薯蓣皂苷元对照品溶液 10 μL 混匀后,加入甲醇 4 mL,混匀,3 500 r/min 离心 10 min,取上清液上样于已活化完毕的固相萃取小柱中,用 80%甲醇淋洗后,以乙醚洗脱。收集洗脱液,蒸干后用适量甲醇溶解残渣,滤过,精密吸取适量滤液,进行 HPLC 分析,计算提取率,结果见表 1。

表 1 固相萃取法与液-液萃取法结果比较 (n=3)

Table 1 Result comparison of solid phase extraction and liquid-liquid extraction (n=3)

处理方法	溶剂	提取率/%	杂质
固相萃取法	—	99.70±6.83	少,空白无干扰
液-液萃取法	乙醚	90.79±4.28	较多,空白无干扰
	正丁醇	52.59±6.35	很多,空白有少量干扰

2.1.2 液-液萃取法:于空白血浆中加入适量薯蓣皂苷元对照品溶液混匀后,分别加入水饱和正丁醇、

乙醚各萃取 3 次,分别合并有机层,水浴蒸干,用甲醇溶解残渣,滤过,精密吸取适量滤液,进行 HPLC 分析,计算提取率,结果见表 1。结果表明,固相萃取法优于液-液萃取法。

2.1.3 淋洗、洗脱溶剂和色谱柱的选择:取固相萃取新柱、旧柱(使用过 1 次,清洗后备用)各 8 支,活化后分别上样,然后分别用水、20%、40%、60%、80%、100%甲醇,乙醚,二氯甲烷 8 mL 洗脱,收集各自的洗脱液,挥干,用适量甲醇溶解残渣,滤过,精密吸取适量滤液,进行 HPLC 分析,计算提取率,结果见表 2。结果表明,对反相固相萃取小柱来说,在使用水、20%、40%、60%、80%甲醇洗脱时,均无薯蓣皂苷元被洗脱,但有不同程度的杂质清洗出柱;而使用二氯甲烷、100%甲醇、乙醚时薯蓣皂苷元均有不同程度的洗脱,其中以乙醚洗脱最为完全。因此,宜选用 80%甲醇作为淋洗液洗去大量杂质,而以乙醚为洗脱剂洗脱出所需成分。在新柱与旧柱比较时,旧柱萃取回收率明显低于新柱,可能由于血样处理量较大,影响小柱使用寿命,因此旧柱不宜重复使用。

2.1.4 洗脱剂量的考察:分别对洗脱剂乙醚的用量进行考察,结果见表 3。表明采用 5 mL 乙醚用量较为适宜。

表 2 萃取回收率结果 (% , n=3)

Table 2 Results of extracting recovery (% , n=3)

柱	水	20%甲醇	40%甲醇	60%甲醇	80%甲醇	二氯甲烷	100%甲醇	乙醚
旧柱	0	0	0	0	0	14.15±3.27	61.63±7.19	88.87±6.81
新柱	0	0	0	0	0	80.54±0.98	90.49±4.20	103.02±2.44

表 3 乙醚用量的考察 (n=3)

Table 3 Investigation of different aether doses (n=3)

乙醚用量/mL	提取率/%
3	92.71±7.27
5	99.70±6.83
8	98.52±3.70

2.1.5 血样处理方法:精密吸取血浆,按 1:4 比例加入甲醇,混匀,3 500 r/min 离心 10 min。取上清液上样于已用甲醇、水活化完毕的固相萃取小柱中,用 80%甲醇 5 mL 淋洗完毕后,1 500 r/min 离心 10 min,再用乙醚 5 mL 进行洗脱。收集洗脱液,蒸干后用适量甲醇溶解,滤过。取滤液进行 HPLC-MS 测定,计算血样中薯蓣皂苷元的质量分数。

2.2 HPLC-MS 分析方法的建立

2.2.1 HPLC-MS 条件:色谱柱:Alltech Platinum

C₁₈ 100A 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-醋酸水溶液(74 : 26, pH 3.54);体积流量:1.00 mL/min;电喷雾电离源(ESI),选择性监测质荷比为 m/z 415 带正电荷的分子离子峰;电喷雾电压:70 V;毛细管电压:3 000 V;干燥气(N₂)体积流量:10 L/min;干燥气温度:350 ℃;色谱图见图 1。

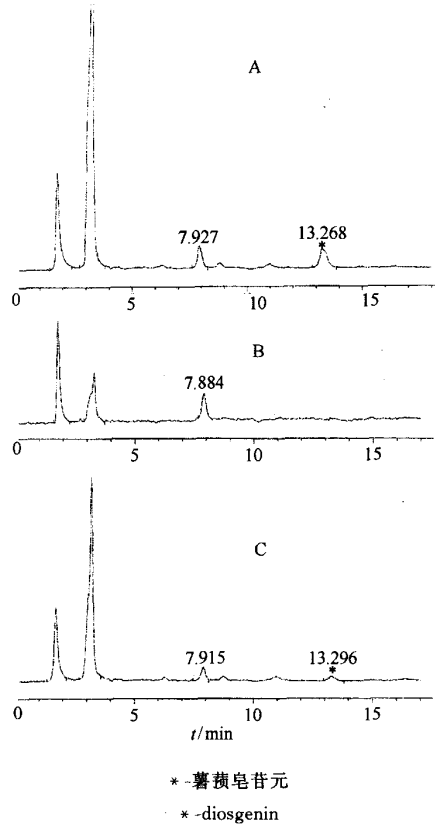


图 1 薯蓣皂苷元对照品(A)、空白血浆(B)和血样样品(C)的 HPLC-MS 色谱图

Fig. 1 HPLC-MS chromatograms of diosgenin reference substance (A), blank plasma (B), and blood sample (C)

2.2.2 标准曲线的建立:精密称取薯蓣皂苷元对照品 10.02 mg 置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并加至刻度,即得 1.002 mg/mL 对照品溶液。用甲醇逐级稀释成一系列质量浓度的对照品溶液。取空白血浆分别加入上述系列对照品溶液,按“血样处理方法”处理,进样,HPLC-MS 测定。以峰面积(A)对质量浓度(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y=0.029\ 99+0.000\ 258\ 5\ A$, $r=0.999\ 4$,线性范围为 0.05~4.0 μg/mL,最低定量限为 0.05 μg/mL。

2.2.3 萃取回收率:于空白血浆中加入适量薯蓣皂苷元对照品溶液形成高、中、低 3 个质量浓度的样品,按“血样处理方法”处理,进行 HPLC-MS 分析;

另用甲醇配制相应质量浓度的薯蓣皂苷元对照品溶液,不经萃取直接以相同量进样进行 HPCL-MS 分析。将两组峰面积进行比较,计算薯蓣皂苷元的萃取回收率。见表 4。

2.2.4 方法回收率:于空白血浆中加入适量薯蓣皂苷元对照品溶液,形成高、中、低 3 个质量浓度的样品,按“血样处理方法”处理,进行 HPLC-MS 分析,计算薯蓣皂苷元的方法回收率。见表 4。

2.2.5 精密度试验:于空白血浆中加入适量薯蓣皂苷元对照品溶液,形成高、中、低 3 个质量浓度的样品,各质量浓度日内重复测定 5 次,并连续测定 5 d,计算薯蓣皂苷元日内、日间精密度。见表 4。

表 4 薯蓣皂苷元萃取回收率、方法回收率、精密度试验结果 (n=5)

Table 4 Results of extraction and method recoveries and their precision (n=5)				
质量浓度/ (μg · mL ⁻¹)	萃取回 收率/%	方法回 收率/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
3.0	65.64±2.07	104.63±3.67	3.66	2.35
2.0	66.62±1.85	94.38±3.06	8.95	1.02
0.085	79.45±8.52	93.24±9.20	5.48	2.25

2.3 相对生物利用度的研究

2.3.1 麦冬皂苷肠溶微球的制备:称取一定量丙烯酸树脂Ⅱ为囊材,用 95%乙醇溶解并制成 2%丙烯酸树脂Ⅱ乙醇溶液。将麦冬总皂苷溶解于囊材溶液中,麦冬总皂苷和囊材按 1 : 4 比例配成待喷液,加入增塑剂蓖麻油适量,充分搅拌均匀,再加入抗黏剂微粉硅胶适量,搅拌均匀后,进行喷雾干燥。工艺条件为进风温度 90 ℃,加料速度 10 mL/min,雾化器转速 50 r/min。

2.3.2 试验方案:取大鼠,随机分成两组,于笼中饲养 3 d,待其充分适应本室环境后,禁食 12 h。微球组 ig 给予微球 9.61 g/kg(相当于给予麦冬总皂苷 600 mg/kg),混悬剂组给予等量麦冬总皂苷的混悬剂,分别于给药后 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24、36、48、72 h 腹主动脉取血。全血 4 500 r/min 离心 10 min,吸取血浆按“血样处理方法”处理后,进行 HPLC-MS 分析,评价制剂质量。结果见表 5。

2.3.3 数据处理:C_{max}、t_{max}均采用实测值。用梯形法计算 AUC_{0-t}。由药-时曲线末端相血药浓度的对数对时间 t 回归,求算消除速率常数 k_e。C_m为最末取血点血药浓度。相对生物利用度(F)按下式计算,结果见表 6。结果表明,麦冬皂苷肠溶微球与普通混悬剂在 ig 单次给药后,大鼠体内的吸收、分布、消除性质颇为相似,其药动学参数数据也较为一致, F 为

(91.10±3.44)%。

$$F = \text{AUC}_{0-t}(\text{被测试剂}) / \text{AUC}_{0-t}(\text{标准参比制剂}) \times 100\%$$

表 5 大鼠 ig 不同麦冬皂苷制剂的药时过程 (n=3)
Table 5 Drug concentration-time course of different *O. japonicus* saponin preparations after ig administration to rats

时间/h	血药浓度/(ng·mL ⁻¹)	
	混悬剂	微球
0	0	0
0.5	56.78±8.78	54.07±7.34
1	75.09±13.16	71.58±4.76
2	116.13±26.96	98.14±10.20
3	298.26±95.92	350.02±53.46
4	598.60±6.92	637.81±17.23
6	505.13±66.11	297.46±11.10
8	216.84±15.50	227.90±47.58
10	67.11±27.74	150.29±17.93
12	157.06±19.78	133.28±17.03
24	103.32±9.94	105.64±11.85
36	85.64±9.78	81.03±12.91
48	74.31±4.26	67.44±4.11
72	60.54±10.87	51.35±6.54

表 6 大鼠 ig 不同麦冬皂苷制剂的药动学参数比较 (n=3)
Table 6 Comparison of pharmacokinetic parameters of different *O. japonicus* saponin preparations after ig administration to rats (n=3)

参数	混悬剂	微球
k _e	0.011 0±0.003 9	0.014 6±0.003 5
C _{1h} /(ng·mL ⁻¹)	60.54±10.87	55.30±6.53
AUC ₀₋₇₂	8 606.11±594.51	7 840.01±412.03
C _{max} /(ng·mL ⁻¹)	598.60±6.92	637.81±17.23
t _{max} /h	4.0±0.0	4.0±0.0
F/%	91.10±3.44	

3 讨论与小结

3.1 固相萃取法与传统的液-液萃取法相比,有效地克服了乳化现象造成的样品丢失,保证了样品中超微量药的有效回收,且操作简便,节省溶剂,回收率高,有利于样品的浓集和纯化,对特征样品尤为有

效。近年来,固相萃取法与 TLC、GC-MS、HPLC-MS、CE 等技术在鉴定药、毒物方面的联合应用,更是大大降低了检出限,并使自动化、大批量的快速测定成为可能。本实验采用反相 C₁₈固相萃取小柱对血样进行处理后进行 HPLC-MS 分析,有效地除去了血浆中的杂质成分,降低了 MS 检测器被污染的可能性,满足了代谢产物薯蓣皂苷元的体内监测的需要。固相萃取法比液相萃取法更体现了“去粗存精”的原则,在生物样品的预处理中发挥很大的作用,具有广阔的发展前景。

3.2 本实验首次建立了麦冬皂苷代谢产物薯蓣皂苷元 HPLC-MS 分析方法,高、中、低浓度的平均方法回收率分别为 (104.63±3.67)%、(94.38±3.06)%、(93.24±9.20)%,平均萃取回收率均大于 65%,日内、日间精密度的均小于 10%,符合分析的要求,且方法专属性较好,为麦冬皂苷代谢产物的体内监测提供一种有效的手段。

3.3 相对生物利用度研究结果表明,两制剂 ig 单次给药后,大鼠体内的吸收、分布、消除性质颇为相似,其药动学参数数据也较为一致,F 为 (91.10±3.44)%。用 SPSS 统计软件程序对两制剂进行生物等效性的统计分析,即对两制剂各时间点血药浓度、C_{max}进行方差分析和双单侧检验。从各时间点血药浓度比较、微球与参比制剂混悬剂两种制剂间差异无显著性;从 C_{max}比较,两种制剂具有生物等效性。初步表明将麦冬总皂苷制成肠溶微球,不但可显著降低胃黏膜刺激性,提高冠心病患者顺应性,而且与混悬剂等效,有望成为一种新的中药微球制剂供治疗冠心病心绞痛临床应用。

Reference:

[1] Feng Y, Shen L, Xu D S, et al. Research on the drug content and contain ratio of ophiopogon saponin enteric microsphere [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2004, 26 (8): 611-613.

• 项目转让 •

复方灯盏花胶囊

新药类别: 中药新药六类
处方组成: 由灯盏细辛、丹参等药味组成
功能主治: 活血化瘀, 益气通脉。用于脑血管意外后遗症; 半身不遂, 言语不利, 口眼歪斜, 或有气短乏力等。
项目特点: 复方灯盏花胶囊是根据祖国医学有关脑络痹阻型中风的中医理论, 由中医专家临床实践并经现代药理学筛选而得的临床经验方。工艺稳定, 服用剂量小, 质量可控。
研究进度: 现已完成注册临床补充试验研究, 待批临床。