

莲多糖 SBP, 后两者均为中性杂多糖, 三者在单糖组成中基本相同, 但单糖的物质的量比以及相对分子质量大小均存在一定的差异。据此推测 SBPs 为半枝莲中又多糖组分。

已发现大量不同来源的多糖在各种体内、体外实验体系中均表现出良好的抗氧化作用^[7], 还可对已有多糖化合物的结构修饰提高其抗氧化活性^[8,9], 因此多糖是极具开发潜力的一类天然抗氧化剂。在研究抗氧化多糖的过程中, 不少研究提示, 多糖的抗氧化性可能是多糖抗衰老、降血糖、抗肿瘤、抗辐射、增强免疫等功效的药理基础之一。多糖的抗氧化作用与其组成和化学结构有关, 也与药物的质量分数、剂量有关, 虽然目前对多糖的抗氧化机制已有一些解释, 但仍不是很清楚。本实验提取得到的 SBPs 为一水溶性酸性杂多糖, 具较好抗氧化活性, 含糖量达 96%, 不含蛋白, Superdex 200 凝胶过滤柱色谱和聚丙烯酰胺凝胶电泳均表明 SBPs 组成均一且质量分数较高。这为进一步抗氧化机制和

构效关系的研究打下了基础。

参考文献:

- [1] 蒋小岗, 顾振纶. 半枝莲的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(1): 3-5.
- [2] 陆平成, 许益民. 半枝莲多糖对细胞免疫的调节[J]. 南京中医药大学学报, 1989(2): 32-33.
- [3] 孟延发, 李志考, 张立. 半枝莲多糖 SPS₄ 组分的纯化性质与分析[J]. 生物化学杂志, 1993, 9(2): 224-228.
- [4] 静天玉, 赵晓瑜. 用终止剂改进超氧化物歧化酶邻苯三酚测活法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(1): 84-86.
- [5] Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [6] 许益民, 郭立伟, 陈建伟. 半枝莲多糖的分离、纯化及其理化性质[J]. 天然产物研究与开发, 1992, 4(1): 1-5.
- [7] 冉靓, 杨小生, 王伯初, 等. 抗氧化多糖的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 491-496.
- [8] Qi H M, Zhang Q B, Zhao T T, *et al.* *In vitro* antioxidant activity of acetylated and benzoylester derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 2441-2445.
- [9] Yang X B, Gao X D, Han F, *et al.* Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties *in vitro* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1725: 120-127.

HPLC法测定丹皮酚制剂在犬体内血药浓度及生物利用度

智红英¹, 孙丽芳¹, 宋吉伦¹, 李桂生^{1,2*}, 刘珂^{1,2}

(1. 山东绿叶天然药物研究开发有限公司, 山东 烟台 264003; 2. 烟台大学药学院, 山东 烟台 264003)

摘要:目的 研究丹皮酚 3 种制剂在犬体内的药动学及生物利用度。方法 6 条犬采用三制剂三周期随机交叉试验设计, 分别单剂量口服对照制剂丹皮酚片(R) 40 mg; 被试制剂丹皮酚软胶囊(T₁); 被试制剂丹皮酚滴丸(T₂); HPLC 测定血药浓度。结果 T₁、T₂ 与 R 的主要药动学参数: $t_{\max}$ 分别为(1.42±0.38)、(0.96±0.10)、(1.08±0.20) h; $C_{\max}$ 分别为(2.23±0.50)、(2.56±0.58)、(1.94±0.40) $\mu\text{g/mL}$; $t_{1/2(\text{ke})}$ 分别为(3.09±0.40)、(2.88±0.51)、(2.62±0.52) h; AUC_{0-12} 分别为(11.62±1.07)、(12.57±1.80)、(10.32±1.63) $\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$; $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为(14.56±1.41)、(15.41±1.70)、(12.70±2.12) $\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 。相对生物利用度为: T₁ (114.1±14.3)% 和 (116.3±15.1)%, T₂ (122.6±12.4)% 和 (122.8±13.9)%。结论 药动学参数经多因素方差分析显示 AUC_{0-12} 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 、 $C_{\max}$ 和 $t_{\max}$ 在药物间有显著的统计学差异 ($P < 0.05$), 双单侧 t 检验表明, 两种被试制剂与参比制剂不等效。

关键词: 丹皮酚; 生物利用度; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)05-0731-04

丹皮酚是牡丹根皮和徐长卿全草的有效成分, 具有镇静、催眠、镇痛、解热、抗炎、抗过敏、抗菌、降压、止血、抑制血小板聚集等多种药理作用^[1,2]。其在小鼠、大鼠、家兔、人体内的药动学研究文献已有报道^[3-6]。为了探讨药物剂型对丹皮酚体内代谢过

程的影响, 本实验采用反相高效液相色谱法测定了丹皮酚片、丹皮酚软胶囊以及滴丸在犬体内的药-时曲线, 据此了解三者体内的药动学特征和差异, 测算丹皮酚软胶囊和滴丸的相对生物利用度。

1 仪器与材料

* 收稿日期: 2008-11-22

作者简介: 智红英(1973—), 女, 山东郓城人, 主管药师, 硕士, 从事药代和毒代方面工作。

Tel: (0535) 2128672 E-mail: zhihongying@126.com

* 通讯作者 李桂生 Tel: (0535) 2108899 E-mail: guisheng@luye-pharm.com

1.1 试验动物: 健康 Beagle 犬, 雌雄各半, 体质量 10.5~12.5 kg, 南海市科金实验动物科技有限公司, 合格证号: Scxk(粤)2003-0006。

1.2 仪器与试剂: 美国安捷伦公司生产的 Agilent 1100 高效液相色谱仪(在线脱气机, 四元泵, 自动进样器, 柱温箱, UV 检测器, Chemstations 色谱工作站), 飞鸽牌 Anke DG-6000B 低速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。丹皮酚对照品购自中国药品生物制品检定所, 批号 0708-9704; 内标: 对乙氧基苯乙酮(美国); 参比制剂丹皮酚片(批号: 030603), 广西亿康药业股份有限公司生产; 丹皮酚软胶囊(批号: 040928)、丹皮酚滴丸(批号: 040228), 山东绿叶天然药物研究开发有限公司提供; 二氯甲烷、甲醇为色谱纯; 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 给药方案: 本实验采用三制剂三周期随机交叉试验设计, 将 6 只受试动物随机分成甲、乙、丙 3 组, 每组两只, 雌雄各半, 分三期交叉给药, 每次给药间期 7 d, 给药总剂量分别为: 对照制剂丹皮酚片(R) 40 mg/只(1 片); 被试制剂丹皮酚软胶囊(T₁) 40 mg/只(2 粒); 被试制剂丹皮酚滴丸(T₂) 40 mg/只(4 粒)。

2.2 样品采集与处理: 于试验前 1 d 晚 7:00 开始禁食, 试验当日晨 7:00 空腹按规定的剂量给药, 给药 2 h 后统一给以清淡饲料, 试验期间自由饮水。于给药前及给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、

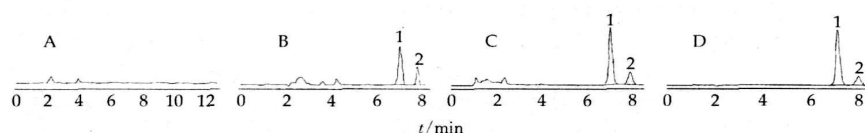
4、5、6、8、10、12 h 由犬前或后肢静脉取血 2 mL, 并立即移入经肝素处理过的离心管中, 离心 10 min (3 000 r/min) 分离血浆, 于 -20 °C 冰箱中保存待测。

血浆样品的预处理: 取肝素抗凝血浆 500 μL, 加内标溶液(对乙氧基苯乙酮的甲醇溶液 0.5 μg/mL) 100 μL, 甲醇 100 μL 和 1.0 mol/L 盐酸 100 μL, 混匀; 加入 2 mL 乙醚-二氯甲烷-异丙醇(100:50:10), 涡流混合 3 min, 往复振荡 10 min (200 次/min), 离心 10 min (4 000 r/min) 取上层有机相于另一试管中, 再加入乙醚-二氯甲烷-异丙醇(100:50:10) 1 mL 重复上述操作, 合并上层有机相并在 30 °C 水浴缓和氮气流下吹干溶剂, 残渣加入流动相 100 μL, 涡旋溶解, 离心 5 min (4 000 r/min), 吸取上清液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。

2.3 色谱条件: 色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ (150 mm × 3.9 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水-磷酸(50:50:0.2); 检测波长: 275 nm; 柱温: 35 °C; 体积流量: 0.8 mL/min。

2.4 方法专属性: 分别取 6 只受试犬的空白血浆(0 h) 500 μL, 按“血浆样品的预处理”项下方法操作, HPLC 进样 20 μL; 将一定质量浓度的丹皮酚对照品溶液和内标溶液加入空白血浆中, 依同法操作; 取受试犬给药后收集的血浆样品, 依同法操作。色谱图见图 1。结果表明, 空白血浆中的内源性物质不干扰丹皮酚与内标的测定。

2.5 标准曲线的绘制: 空白血浆 500 μL, 加入丹皮



1-丹皮酚 2-对乙氧基苯乙酮(内标)

1-paeonol 2-ethoxyacetophenone(internal standard)

图 1 空白血浆(A)、加丹皮酚和内标血浆(B)、给药丹皮酚滴丸 2 h 后取样血浆(C), 及丹皮酚与内标溶液(D)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC Chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with paeonol and 4-ethoxyacetophenone (B), a plasma sample 2 h after oral administration paeonol soft capsules (C), and paeonol and 4-ethoxyacetophenone standard solution (D)

酚系列对照品溶液 100 μL, 配制成相当于丹皮酚质量浓度为 0.05、0.1、0.25、1.0、2.5、5.0 μg/mL 的血浆样品。除不加甲醇 100 μL 外, 其他按照“血浆样品的预处理”项下方法操作, 进样 20 μL, 记录色谱图。以血浆中待测物的质量浓度为横坐标, 待测物与内标物的峰面积之比为纵坐标, 用加权($W = 1/x^2$)最小二乘法进行回归运算^[7], 求得的直线回归方程即为标准曲线, 回归方程为 $Y = 1.6925X +$

0.1617, $r > 0.9918$ 。根据标准曲线, 本方法的线性范围为 0.05~5.0 μg/mL, 定量下限为 0.05 μg/mL。

2.6 方法的准确度和精密度: 取空白血浆 500 μL, 分别取低、中、高 3 个水平(含丹皮酚质量浓度分别为 0.05、0.25、2.5 μg/mL)的样品各 6 份。按“标准曲线的绘制”项下方法操作, 连续测定 3 d, 随行标准曲线, 以当日的标准曲线计算样品的测定浓度, 与配

制质量浓度比较,求得本法的准确度和精密度,结果见表 1。

表 1 精密度和准确度试验结果

Table 1 Results of precision and accuracy

质量浓度 $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	测定值($\bar{x}+s$) $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	日内精密度 RSD/ %	日间精密度 RSD/ %	准确度 / %
0.05	0.048 0 $\pm$ 0.001 8	7.9	3.6	- 5.1
0.25	0.240 0 $\pm$ 0.011 0	1.7	12.1	- 3.5
2.5	2.490 0 $\pm$ 0.110 0	0.6	13.3	- 0.3

2.7 提取方法回收率试验:取空白血浆 500 μL ,按“标准曲线的绘制”项下方法操作,分别取低、中、高 3 个水平(含丹皮酚质量浓度分别为 0.05、0.25、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的样品各 3 份。记录被测物的峰面积,与未经处理的相同浓度的标准溶液峰面积比较,测得提取回收率分别为 81.1%、85.9%、78.5% ($n=6$)。内标物经相同提取过程处理,其回收率为 82.4%。

2.8 稳定性试验:取空白血浆 500 μL ,分别取低、中、高 3 个水平(含丹皮酚质量浓度分别为 0.05、0.25、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的样品各 2 份,按“标准曲线的绘制”项下方法操作,即时测定浓度,室温放置 10 h 后,重复测定一次,并以当日的标准曲线计算质量浓度,将两次测定结果对照,计算 RSD,分别是 3.0%、- 3.9%、2.4%,表明血浆样品经过处理后室温放置 10 h,仍可被准确测定。血浆样品在冷冻-融溶循环 3 次试验中的相对标准偏差均小于 15%。

2.9 药动学研究:采用梯形法计算 AUC_{0-12} 值,根据对数血药浓度-时间曲线末端直线部分的斜率求算消除速率常数 (K_e),消除半衰期 $t_{1/2}$ 可由 $t_{1/2}=0.693/K_e$ 计算。峰浓度 ($C_{\max}$) 和达峰时间 $t_{\max}$ 用实测值表示。6 条受试犬单剂量口服 40 mg T_1 、 T_2 、R 后的平均血药浓度-时间曲线见图 2,由血药浓度求得的主要药动学参数见表 2。

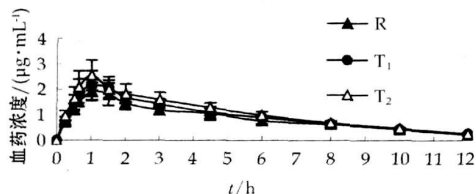


图 2 血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves

2.10 生物等效性分析

2.10.1 生物利用度:根据 AUC_{0-12} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 计算得到的 T_1 的相对生物利用度分别为 (114.1 $\pm$ 14.3)% 和 (116.3 $\pm$ 15.1)%, T_2 相对生物利用度分

表 2 单剂量给药丹皮酚后主要药动学参数 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of paeonol after a single oral dose ($\bar{x}\pm s$)

参 数	丹皮酚制剂			
	丹皮酚片	丹皮酚软胶囊	丹皮酚滴丸	
AUC_{0-12}	$\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10.32 ± 1.63	11.62 ± 1.07	12.57 ± 1.80
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	12.70 ± 2.12	14.56 ± 1.41	15.41 ± 1.70
$C_{\max}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.94 ± 0.40	2.23 ± 0.50	2.56 ± 0.58
$t_{\max}$	h	1.08 ± 0.20	1.42 ± 0.38	0.96 ± 0.10
$t_{1/2(K_e)}$	h	2.62 ± 0.51	3.09 ± 0.40	2.88 ± 0.51

别为 (122.6 $\pm$ 12.4)% 和 (122.8 $\pm$ 13.9)%。

2.10.2 方差分析:6 只受试犬单剂量随机交叉服用丹皮酚 3 种制剂后,总方差分析结果显示,3 种制剂的主要药动学参数 AUC_{0-12} 和 $\text{AUC}_{0-\infty}$, $C_{\max}$ 在制剂间和个体间有显著的统计学差异 ($P<0.05$),在给药顺序间无显著的统计学差异 ($P>0.05$); $t_{\max}$ 在制剂间有显著的统计学差异 ($P<0.05$),在个体间和在给药顺序间无显著的统计学差异 ($P<0.05$)。

2.10.3 双单侧 t 检验和 (1-2 α) 置信区间法分析: T_1 与 R 相比, T_1 的 AUC_{0-12} 的 90% 可信限为 (102.7% ~ 125.2%), $\text{AUC}_{0-\infty}$ 的 90% 可信限为 (104.5% ~ 127.7%), $C_{\max}$ 90% 可信限为 (98.5% ~ 132.7%); T_2 与 R 相比, T_2 的 AUC_{0-12} 的 90% 可信限为 (110.6% ~ 134.9%), $\text{AUC}_{0-\infty}$ 的 90% 可信限为 (110.6% ~ 134.9%), $C_{\max}$ 90% 可信限为 (113.4% ~ 152.7%), 参数均拒绝生物等效假设 ($P>0.05$),说明 T_1 与 R, T_2 与 R 不具生物等效性。由此可以看出丹皮酚滴丸、软胶囊均具有血药浓度和生物利用度高的特点。

3 讨论

国内外文献^[4-6] 均用苯乙酮 (acetophenone) 作为内标,相同色谱条件下,苯乙酮出峰快,保留时间小于丹皮酚,易受溶剂峰和内源性物质的干扰,本实验采用对乙氧基苯乙酮,避免了上述缺点。

本实验对文献报道^[3] 所考察的二氯甲烷、乙醚、乙腈和甲醇的提取效率,认真进行了考察,二氯甲烷的提取效率最高,由于二氯甲烷位于下层,操作不便,因此采用乙醚-二氯甲烷-异丙醇 (100:50:10) 作提取溶剂,结果离心后提取溶剂位于上层,操作方便,易挥发,避免了高温下挥发溶剂丹皮酚随之挥发的缺点,萃取回收率也令人满意。

本研究显示犬个体差异较大,仅为以后的临床生物利用度提供参考。

参考文献:

- [1] 李 薇,王运亮,蔡绍哲,等.丹皮酚和阿司匹林对大鼠血液流变性影响的比较[J].中草药,2000,31(1):29.
- [2] 章灵华,肖培根,黄 艺,等.丹皮酚的药理与临床研究进展[J].中国中西医结合杂志,1996,16(3):187.
- [3] 孙言才,沈玉先,孙国平,等.反相高效液相色谱法检测小鼠血清中丹皮酚浓度[J].中国医院药学杂志,2004,24(1):7.
- [4] Wu X A, Chen H L, Chen X G, *et al.* Determination of paeonol in rat plasma by high performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic studies following oral administration of Moutan cortex decoction [J]. *Biomed Chromatogr*, 2003, 16: 504-508.
- [5] 任天池.兔血浆中丹皮酚的高效液相测定[J].中成药,1989,11(12):3.
- [6] Riley C M, Ren T. Simple method for the determination of paeonol in human and rabbit plasma by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and ultraviolet detection [J]. *J Chromatogr*, 1989, 489: 432-437.
- [7] 钟大放.以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J].药物分析杂志,1996,16(5):343.

气相色谱法测定牡荆油胶丸中 β -丁香烯魏惠珍¹,陈燕军²,张红红¹,金浩鑫¹,饶 毅^{1*},杨世林¹

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,江西 南昌 330006; 2. 江西中医学院,江西 南昌 330004)

摘要:目的 建立气相色谱法测定牡荆油胶丸中 β -丁香烯的方法。方法 用气相色谱法。色谱条件:色谱柱为 HP-5 石英毛细管柱(30 0 m $\times$ 320 μ m $\times$ 0.25 μ m);进样口温度:230 $^{\circ}$ C;恒流:1 mL/min;分流比 10:1;检测口温度:260 $^{\circ}$ C;进样量 1 μ L;程序升温,起始温度 80 $^{\circ}$ C,以 8 $^{\circ}$ C/min 升至 200 $^{\circ}$ C,保持 5 min。结果 β -丁香烯在 0.002~0.16 mg/mL 呈良好的线性关系,回归方程为 $Y=0.0551X-0.008$, $r=0.9999$,平均回收率为 99.32%,RSD 为 1.56%。结论 采用气相色谱法对牡荆油胶丸中 β -丁香烯进行测定,方法简便、快速、准确、重复性好。

关键词:牡荆油胶丸; β -丁香烯;气相色谱

中图分类号:R286.02

文献标识码: B

文章编号:0253-2670(2009)05-0734-02

牡荆油胶丸是牡荆油与适量稀释剂经加工制成的胶丸^[1],临床上用于治疗慢性支气管炎,疗效确切。牡荆油主要含有 α -蒎烯、芳樟醇、 β -丁香烯和丁香烯氧化物等成分^[2],其中 β -丁香烯的量较高,是牡荆油治疗慢性支气管炎的重要成分^[3,4]。因此本研究以 β -丁香烯为指标成分,采用气相色谱法对 10 批牡荆油胶丸中的 β -丁香烯进行了测定方法学研究,证明该方法简便、准确、重现性好,可作为牡荆油胶丸的质量控制方法。

1 仪器与材料

Agilent 6890N 型气相色谱仪(美国 Agilent 公司),氢火焰离子化检测器(FID)。 β -丁香烯对照品购于 Sigma 公司,批号 1321406,质量分数 $\geq 98.5\%$ 。牡荆油胶丸为市售样品,分别来源于江西天海药业股份有限公司(批号:070121、070707、080122),广州星群(药业)股份有限公司(批号:EF50002、EF50004、EF50005、EF50007、EF50008、FF50001、FF50003),规格均为 20 mg/粒。醋酸乙酯、正十八烷等均为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱为 HP-5 石英毛细管柱(30 0 m $\times$ 320 μ m $\times$ 0.25 μ m);进样口温度:230 $^{\circ}$ C;恒流:1 mL/min;分流比 10:1;检测口温度:260 $^{\circ}$ C;进样量 1 μ L;程序升温,起始温度 80 $^{\circ}$ C,以 8 $^{\circ}$ C/min 升至 200 $^{\circ}$ C,保持 5 min。

2.2 内标溶液的制备:取内标物正十八烷溶液适量,加醋酸乙酯制成 0.15 mg/mL 的内标溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备:取胶丸内容物,约 0.1 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,用醋酸乙酯稀释至刻度,摇匀。从中精密吸取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,再精密加入内标溶液 1 mL,用醋酸乙酯稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4 对照品溶液的制备:取 β -丁香烯对照品约 20 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,用醋酸乙酯溶解稀释至刻度,摇匀。从中精密吸取 1 mL 置 10 mL 量瓶中,再精密加入内标溶液 1 mL,用醋酸乙酯稀释至刻度,摇匀,即得。

2.5 专属性试验:按牡荆油胶丸生产工艺处方比

* 收稿日期:2008-10-14

作者简介:魏惠珍(1965—),女,江西南昌人,副主任药师,主要从事药物质量控制研究工作。

Tel: (0791) 7119651 E-mail: weihuizhen101@126.com

* 通讯作者 饶 毅 Tel: (0791) 7119609 E-mail: raoyi99@126.com