

白头翁皂苷 D 固体分散体制备及体内外评价

饶小勇^{1,2}, 尹 姍³, 何明珍^{1,2}, 罗晓健^{1,2}, 谢 茵¹, 冯育林^{1,2}, 杨世林^{1,2*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

3. 南昌大学第二附属医院, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 制备白头翁皂苷 D (PSD) 固体分散体 (PSD-SD), 并评价其体内外释药行为。方法 采用溶剂法考察了不同载体材料对 PSD 溶解度的影响, 采用红外光谱法 (IR)、差示扫描量热法 (DSC) 以及 X 射线衍射法 (XRD) 表征了 PSD-SD, 采用溶出度和大鼠血药浓度变化评价了固体分散体体内外释药行为。结果 以 PEG 6000 为载体材料可使 PSD 在水中溶解度由 2.39 mg/mL 增大至 7.06 mg/mL, 制备的 PSD-PEG 6000 (1:6) PSD-SD 60 min 药物累积释放率达到了 90%, 大鼠给药 PSD-SD 后其 $AUC_{0-\infty}$ 是原料药的 2.24 倍。结论 以 PEG 6000 为载体材料制备的 PSD-SD 可以增加 PSD 溶解度, 有效地提高 PSD 溶出速率, 有利于提高 PSD 生物利用度。

关键词: 白头翁皂苷 D; 固体分散体; PEG 6000; 溶出; 药动学; 溶剂法; 红外光谱法; 差示扫描量热法; X 射线衍射法
中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)21-3179-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.21.009

Preparation and *in vivo* and *in vitro* evaluation of Pulsatilla Saponin D Solid Dispersions

RAO Xiao-yong^{1,2}, YIN Shan³, HE Ming-zhen^{1,2}, LUO Xiao-jian^{1,2}, XIE Yin¹, FENG Yu-lin^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

3. The Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Nanchang 330006, China

Abstract: Objective To prepare the solid dispersion of Pulsatilla saponin D (PSD-SD) and evaluation its *in vivo* and *in vitro* drug release behavior. **Methods** The PSD-SD was prepared by solvent method. Three carriers were used in the PSD-SD. Infrared spectroscopy (IR), differential thermal analysis (DSC), and X-ray diffraction (XRD) were used to determine the PSD-SD. Dissolution rates and pharmacokinetic parameters were evaluated *in vitro* and *in vivo* characteristics of the PSD-SD. **Results** When the PEG 6000 was used as carrier, the solubility of PSD was increased from 2.39 to 7.06 mg/mL, and the cumulative release rate of PSD reached 90% in 60 min, and the bioavailability of PSD was increased to 2.24 times. **Conclusion** The solid dispersion prepared PSD can increase the solubility, dissolution rate, and bioavailability.

Key words: Pulsatilla saponin D; solid dispersion; polyethylene glycol 6000; dissolution; pharmacokinetics; solvent method; infrared spectroscopy; differential thermal analysis; X-ray diffraction

白头翁皂苷 D (Pulsatilla saponin D, PSD) 即 3-O- α -L-吡喃鼠李糖-(1 \rightarrow 2) [β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)]- α -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷, 其来源于白头翁^[1]、毛酸浆浆果^[2]、太白银莲花^[3]、冻地银莲花^[4]等植物中, 具有较强的抗肿瘤活性^[5-8]。前期研究中发现 PSD 按生物药剂学分类系统 (biopharmaceutical

classification system, BCS) 分类属于 II 即低溶解、高透过性的药物^[9-10], 由于其溶解度低、体内吸收慢, 影响生物利用度。因此, 为了增加其成药性, 可以通过制剂手段提高其溶解度, 进而提高生物利用度。固体分散体 (solid dispersion, SD) 技术通过使药物高度分散于水溶性载体材料中, 达到改善

收稿日期: 2015-07-21

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目 (20142BAB205082, 20132BAB215031); 江西省战略新型产业重点开发项目 (2013AFC30031); 江西中医药大学重点学科青年教师培养计划 (2013jzzdk045)

作者简介: 饶小勇 (1975—), 男, 博士, 江西高安人, 研究方向为中药新技术与产业化研究。Tel: 18907086080 E-mail: rxy1014@163.com

*通信作者 杨世林 (1953—), 男, 博士生导师, 教授。Tel: (0791)87119638 E-mail: slyang3636@126.com

难溶性药物的溶解度和溶出行为,从而提高难溶性药物的生物利用度^[11]。本实验以溶解度为指标考察了不同载体材料,采用红外光谱法(IR)、差示扫描量热法(DSC)以及X射线衍射法(XRD)表征了PSD-SD的形成,并对PSD-SD进行了体内外评价,通过上述研究为PSD制剂的研究开发提供参考和支持。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪,Agilent 1260 色谱泵,二级管阵列检测器(DAD),美国安捷伦科技公司;QTRAP 4500 复合三重四极杆线性离子阱质谱,配备ESI离子源及Analyst 1.6 数据处理软件,美国AB SCIEX;KQ-4000B 型超声清洗机,巩义市予华仪器有限责任公司;ML3002E/02 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;TDL-40B 飞鸽牌台式离心机,上海安亭科学仪器厂制造;HH-4 数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;涡旋混合器,上海医科大学仪器厂;Millipore Synergy 超纯水系统,美国密理博公司;GZL-0.2 型冻干机,北京奥特佳美科技有限公司;DSC 8000,美国PerkinElmer股份有限公司;VERTEX 70 型傅里叶红外光谱分析仪,德国布鲁克公司;Dmax2400X 射线衍射仪,日本理学公司。

三七皂苷R₁(NGR₁),批号110745-20131,中国食品药品检定研究院;PSD,中药固体制剂制造技术国家工程研究中心中药化学室提供,经光谱鉴定为白头翁皂苷D,经DAD检测器面积归一法计算其质量分数为99.6%;甲醇,上海振兴化工一厂,色谱纯;泊洛沙姆188(F68),上海昌为医药辅料技术有限公司;聚乙烯吡咯烷酮(PVPk30),上海恒信化学试剂公司;聚乙二醇6000(PEG 6000),南京威尔化工有限公司;其他试剂均为分析纯。

健康SD大鼠,雌性,体质量(220±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2011-0003。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 PSD-SD 的制备 取PSD和载体材料PEG 6000按1:6质量比分别放入烧杯中,加入适量无水乙醇,超声至PSD和载体完全溶解。将溶解后的液体转移至蒸发皿中冻干,粉碎,过筛,备用。

2.1.2 物理混合物的制备 取适量PSD和载体材料PEG 6000按1:6的质量比置于研钵中,研碎,备用。

2.2 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 采用依利特Hypersil ODS₂ C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以甲醇-水-甲酸(68:32:0.1)为流动相,体积流量为1.0 mL/min,检测波长为203 nm,柱温为30 °C,进样量为10 μL。

2.2.2 线性关系考察 精密称取PSD对照品,配制成质量浓度分别为0.08、0.16、0.32、0.48、0.64、0.80 mg/mL的系列对照品溶液,进样,记录峰面积。以峰面积(Y)对药物质量浓度(X)进行线性回归,得标准曲线方程 $Y=2\ 635.5X+5.452\ 1$, $r=0.999\ 9$,结果表明样品在0.08~0.80 mg/mL呈良好线性关系。

2.2.3 精密度试验 取质量浓度分别为0.08、0.32、0.80 mg/mL的PSD对照品溶液,连续测定5次,计算精密度。结果显示高、中、低3个质量浓度的PSD对照品溶液峰面积RSD分别为0.15%、0.56%、1.14%。

2.2.4 重复性试验 精密称取PSD-SD 6份(含主药约3 mg),置10 mL量瓶中,加甲醇溶解,记录峰面积,计算PSD质量分数。结果显示RSD为0.88%。

2.2.5 稳定性试验 精密称取PSD-SD(含主药约3 mg),加甲醇溶解,分别于0、1、2、4、8、12、24 h进样测定,记录峰面积。结果RSD为0.33%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.2.6 加样回收率试验 精密称取PSD-SD 适量(含主药约3 mg),共9份,置于25 mL量瓶中,分为3组,每组按主药量的80%、100%、120%的量分别加入PSD对照品,加甲醇至刻度,制成高、中、低3个质量浓度的供试品溶液。进样检测,记录峰面积,并计算回收率。结果平均加样回收率为(97.51±0.44)%,RSD为0.66%。

2.3 不同载体的考察

取过量的PSD、PSD-PEG 6000物理混合物和PSD-SD置于具塞试管中,加水超声使其呈过饱和状态,然后在(37.0±0.5) °C水浴中平衡24 h后取出,离心,取上清液,稀释,滤过。分别精密吸取10 μL进样检测,计算溶解度,结果见表1。可知,制成SD后PSD溶解度明显有所增加,不同比例载体材料对PSD溶解度增加有所不同。以F68为载体制备的SD中,当PSD和F68比例为1:4时,溶解度达到最大值为6.75 mg/mL;以PVPk30为载体制备的SD中,当PSD和PVPk30比例为1:8时,溶解度达到最大值为6.03 mg/mL;以PEG 6000为载体制备的SD中,当PSD和PEG 6000比例为1:6时,溶解度达到最大值为7.06 mg/mL。根据溶解

表 1 不同载药材料对 PSD 溶解度的影响

样品名称	比例	溶解度/(mg·mL ⁻¹)
PSD		2.39
PSD-SD (PSD : F68)	1 : 4	6.75
	1 : 6	6.47
	1 : 8	6.21
	1 : 10	6.05
	1 : 12	4.85
PSD-SD (PSD : PVPk30)	1 : 4	4.90
	1 : 6	5.40
	1 : 8	6.03
	1 : 10	5.88
	1 : 12	4.82
PSD-SD (PSD : PEG 6000)	1 : 4	6.51
	1 : 6	7.06
	1 : 8	5.61
	1 : 10	5.11
PSD-PEG 6000 物理混合物	1 : 6	4.28

度大小关系, 最终确定载体材料为 PEG 6000, 且比例为 1 : 6。

2.4 PSD-SD 的表征

2.4.1 IR 分析 采用 KBr 压片法制备样品, 扫描范围为 400~4 000 cm⁻¹, 分辨率为 4 cm⁻¹, 分别对 PSD、PEG 6000、物理混合物及 PSD-SD 进行 IR 分析, 结果见图 1。可见, PSD 在波长 1 690.19 cm⁻¹ 和 3 418.34 cm⁻¹ 处有 2 个吸收峰, 分别是药物的 ν_{C=O} 键和 ν_{OH} 键; 在物理混合物中, PSD 和载体 PEG 6000 的吸收峰均有显现, 而 PSD-PEG 6000 (1 : 6) SD 中 PSD 于 1 690.19 cm⁻¹ 的吸收峰消失, 3 418.34 cm⁻¹ 处吸收峰变宽钝, 提示 SD 已形成, 且 PSD 与 PEG 6000 之间可能以氢键的形式结合。

2.4.2 DSC 分析 以空铝坩埚为参考池, 另一空铝坩埚中放入约 10 mg 的样品, 按程序升温加热 (升温速率 10 °C/min, 扫描范围 0~250 °C), 氮气体积流量为 40 mL/min, 分别对 PSD、载体、PSD-SD 及物理混合物样品进行分析。结果见图 2。由图 2 可以看出, PEG 6000 在 66.49 °C 有 1 个熔融峰; PSD 在 228.59 °C 有 1 个熔融峰; 物理混合物的 DSC 图中可以明显地看到 PEG 6000 的熔融峰和 PSD 的熔融峰, 但位于 227.63 °C 的特征吸热峰前移, 这可能是由于在升温过程中药物与载体之间部分形成氢键从而导致 PSD 在载体中晶形发生改变。而在 PSD-

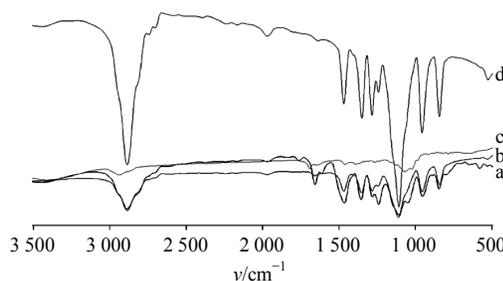


图 1 物理混合物 (a, 1 : 6)、PSD-SD (b, 1 : 6)、PSD (c) 及 PEG 6000 (d) 的 IR 图

Fig. 1 IR spectra of physical mixture (a, 1 : 6), PSD-SD (b, 1 : 6), PSD (c), and PEG 6000 (d)

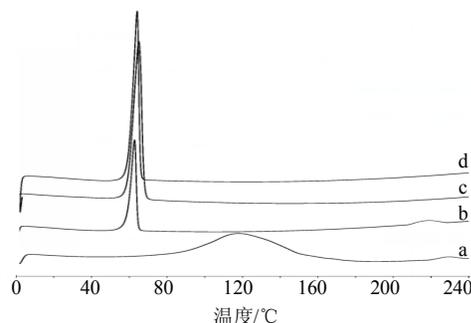


图 2 PSD (a)、物理混合物 (b, 1 : 6)、PEG 6000 (c) 及 PSD-SD (d, 1 : 6) 的 DSC 图

Fig. 2 DSC scanning of PSD (a), physical mixture (b, 1 : 6), PEG 6000 (c), and PSD-SD (d, 1 : 6)

PEG 6000 (1 : 6) SD 的 DSC 图中, PSD 的熔融峰消失, 说明共沉淀物中不存在药物结晶, PSD 以无定形状态分散于载体中。

2.4.3 XRD 将 PSD 原料药、PEG 6000、PSD-SD 及物理混合物填塞于样品皿中, 采用 Cu-Kα 靶, 40 kV 电压, 300 mA 电流, 在 5°~70°以 1.2°/min 速率进行扫描, 并绘制 XRD 图。结果见图 3。由图 3 可见, PEG 6000 在 19.065°和 23.798°处有强吸收, 物理混合物的谱线中 PSD 和 PEG 6000 的各特征峰均明显存在。而在 PSD-PEG 6000 (1 : 6) SD 的谱线中, PSD 结晶衍射峰消失, 说明 PEG 6000 能有效地抑制 PSD 形成结晶, 在 PEG 6000 载体中 PSD 以无定形状态存在。

2.5 体外溶出度的评价

参照《中国药典》2010 年版二部附录 XC 溶出度测定法中的转篮法进行测定, 分别称取 PSD 原料药、PSD-PEG 6000 (1 : 6) SD 及 PSD 与 PEG 6000 的物理混合物 (1 : 6) 适量 (符合漏槽条件), 置 6 个溶出杯中, 溶出介质为蒸馏水, 体积为 500 mL, 转速 100 r/min, 水浴温度为 (37.0±0.5) °C。以绸

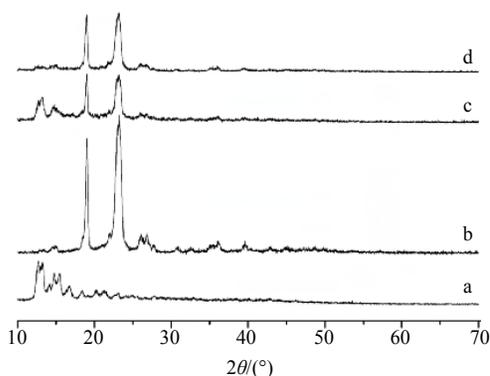


图3 PSD (a)、PEG 6000 (b)、物理混合物 (c, 1:6) 及 PSD-SD (d, 1:6) 的 XRD 图

Fig. 3 XRD of PSD (a), PEG 6000 (b), physical mixture (c, 1:6), and PSD-SD (d, 1:6)

布包裹转篮, 进行实验, 待转篮接触介质时开始计时, 分别于 5、10、15、30、45、60、90、120、180、240、300、360、420 min 取样 2 mL, 同时补充同体积同温度的新鲜溶出介质, 样品经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 计算 PSD 的质量浓度, 并求出累积释放率, 绘制溶出曲线, 结果见图 4。由图 4 可知, PSD-PEG 6000-SD 5 min 药物累积释放率达到了 32%, 而 PSD 原料与物理混合物 5 min 药物累积释放率仅为 25%, 说明制成 SD 有利于药物快速释放。60 min 时 PSD-PEG 6000-SD 的药物累积释放率达到了 90%, PSD 与物理混合物药物累积释放率达到 90% 需要 300 min。

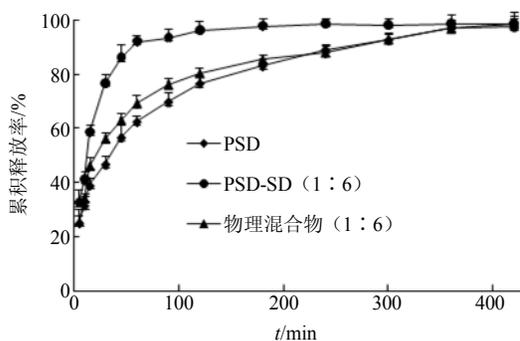


图4 PSD、PSD-SD (1:6) 与物理混合物 (1:6) 释放曲线图
Fig. 4 Dissolution curves of PSD, PSD-SD (1:6), and physical mixture (1:6)

2.6 体内药动学的评价

2.6.1 服药方案和样品采集 取 SD 大鼠 12 只, 随机分为 2 组, 每组 6 只, 正常饲养 1 周, 实验前禁食 12 h, 自由饮水。第 1 组按 100 mg/kg 的剂量 ig PSD 混悬液(取 PSD 加至 0.5% CMC-Na 水溶液中, 置研钵中研磨 30 min, 即得), 第 2 组按含 100 mg/kg PSD 的剂量 ig PSD-SD 混悬液 (同 PSD 制备法)。

分别于给药后 5、10、20、30 min 及 1、2、4、6、8、12、24、36、48、60 h 从大鼠眼眶后静脉丛取血约 300 μL, 置肝素化离心管中, 6 500 r/min 离心 5 min, 并立即离心分离血浆, 置 -20 °C 冰箱中冷冻保存, 备测。

2.6.2 血浆样品的处理 取血浆样品 100 μL 置 1.5 mL EP 管中, 加入 100 μL 内标溶液 (NGR₁, 质量浓度 80 ng/mL), 涡旋 3 min, 混合均匀, 加甲醇 600 μL, 涡旋 5 min, 离心 (15 000 r/min) 5 min, 取上清液置 1.5 mL EP 管中, 40 °C 氮吹仪吹干, 残渣加甲醇 100 μL, 超声复溶, 涡旋 3 min, 离心 (15 000 r/min) 5 min, 取 70 μL 加入内衬管中用于进样分析。

2.6.3 质谱条件 离子源为 ESI 源 (气动辅助电喷雾离子化); 离子化条件: 离子喷射电压为 -4 500 V, 离子源温度为 600 °C, 辅助气体 1 (GS1, N₂) 为 344.75 kPa, 辅助气体 2 (GS2, N₂) 为 344.75 kPa; 离子检测方式为多反应监测 (MRM); 离子极性为负离子; 检测离子: PSD 为 m/z 911.3→603.2, 去簇电压 (DP) 为 -180 V, 碰撞能量 (CE) 为 -77 V; 内标 NGR₁ 为 m/z 931.6→637.2, DP 为 -190 V, CE 为 -50 V。

2.6.4 液相条件 色谱柱为 Phenomenex C₁₈ 柱 (50 mm×2.00 mm, 4 μm); 体积流量为 0.6 mL/min; 进样量 2 μL; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-甲醇。采用梯度洗脱: 0~1.0 min, 10% 甲醇; 1.0~2.7 min, 10%~80% 甲醇; 2.7~4.0 min, 80%~90% 甲醇; 4.0~5.0 min, 90%~10% 甲醇。

2.6.5 专属性实验 取大鼠空白血浆 100 μL, 按“2.6.2”项下方法处理, 进行 LC-MS 分析, 结果表明在选定的色谱条件下, 内标和 PSD 可实现完全分离。血浆样品中的内源性物质和代谢产物不会干扰 PSD 的定量测定。色谱图见图 5。

2.6.6 标准曲线和定量下限 取大鼠空白血浆 100 μL 置 1.5 mL EP 管中, 分别加入 25 μL 质量浓度为 4、20、40、200、400、2 000、4 000 ng/mL 的 PSD 系列对照品溶液, 分别加入 100 μL 内标 (NGR₁, 质量浓度为 80 ng/mL), 按“2.6.2”项下处理, 使其最终质量浓度分别为 1、5、10、50、100、500、1 000 ng/mL, 按确定色谱条件进样分析。以样品中 PSD 的质量浓度为横坐标 (X), 以 PSD 与内标的峰面积的比值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得线性回归方程为 $Y=0.0159X+0.0714$, $r=0.9966$ 。结果表明血浆样品中 PSD 在 1~1 000 ng/mL 呈良好的线

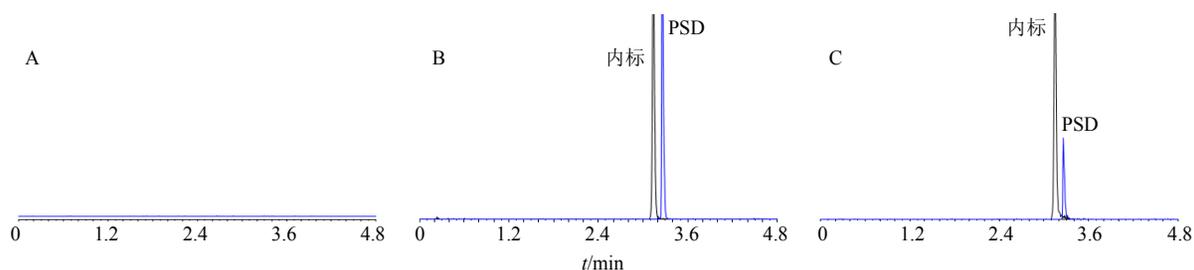


图5 空白血浆 (A)、空白血浆+PSD+内标 (B) 和给药后血浆+内标 (C) 的色谱图

Fig. 5 Chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with PSD + NGR₁ (B), and plasma sample (C)

性关系，且方法的定量下限为 1 ng/mL。

2.6.7 基质效应 取不同大鼠空白血浆共 6 份，按“2.6.2”项下方法吹干，残渣加入 100 μ L 质量浓度为 50 ng/mL PSD 和 80 ng/mL 内标溶液的混标溶液，制成样品 A。另取质量浓度 400 ng/mL PSD 对照品溶液 100 μ L，共 6 份，分别置 1.5 mL EP 管中，各加入 100 μ L 质量浓度为 800 ng/mL 内标溶液，再加入 600 μ L 甲醇，涡旋 5 min，制成样品 B。分别取样品 A、B 进样，记录各自的色谱峰面积，并计算基质效应（基质效应 = A 色谱峰面积/B 色谱峰面积）。结果表明未发现基质对 PSD 和内标有明显的离子抑制或者离子增强效应。

2.6.8 精密度和准确度的测定 取大鼠空白血浆 100 μ L 置 1.5 mL EP 管中，分别加入 4、200、2 000 ng/mL 系列 PSD 对照品溶液，按“2.6.2”项下分别制成 1、50、500 ng/mL 低、中、高 3 个质量浓度的质控样品。以当日的标准曲线计算样品中 PSD 的量，连续进样 5 次测定日内精密度。同时连续 3 d 重复操作，计算日间精密度。根据公式计算样品的准确度（准确度 = 平均测量值/真实值）。结果显示，低、中、高 3 个质量浓度质控样品日内精密度的 RSD 分别为 13.52%、2.56%、2.62%，准确度分别为 100.8%、99.4%、101%；日间精密度的 RSD 分别为 12.97%、3.00%、2.46%，准确度分别为 104.3%、99.8%、100.8%。

2.6.9 稳定性考察 取大鼠空白血浆 100 μ L 置 1.5 mL EP 管中，分别加入 4、200、2 000 ng/mL 系列 PSD 对照品溶液，按“2.6.2”项下分别制成 1、50、500 ng/mL 低、中、高 3 个质量浓度的样品。样品在室温放置 24 h 后进行 LC-MS 测定，计算 3 个质量浓度的血浆样品中 PSD 的量，并求出其相对误差，考察样品在室温放置期间的稳定性。

取大鼠空白血浆 100 μ L 置 1.5 mL EP 管中，分别加入 4、200、2 000 ng/mL 系列 PSD 对照品溶液，

加入内标溶液后室温放置 6 h，按“2.6.2”项下分别制成 1、50、500 ng/mL 低、中、高 3 个质量浓度的样品。按色谱条件进行检测，并计算 3 个质量浓度的血浆样品中 PSD 的量，求出其相对误差，考察样品与内标溶液在室温条件的稳定性。

取大鼠空白血浆 100 μ L 置 1.5 mL EP 管中，分别加入 4、200、2 000 ng/mL 系列 PSD 对照品溶液，按“2.6.2”项下分别制成 1、50、500 ng/mL 低、中、高 3 个质量浓度的样品。经反复 3 次 -20 $^{\circ}$ C 冷冻，室温融化后测定样品中 PSD 的质量浓度，考察样品在冷冻和冻融条件下的稳定性。

取大鼠空白血浆 100 μ L 置 1.5 mL EP 管中，分别加入 4、200、2 000 ng/mL 系列 PSD 对照品溶液，按“2.6.2”项下分别制成 1、50、500 ng/mL 低、中、高 3 个质量浓度的样品。-20 $^{\circ}$ C 冰箱贮藏 1 个月后测定样品质量浓度，以考察样品在冷冻贮藏期间的稳定性。

结果显示样品在室温放置期间的稳定性、样品与内标溶液在室温条件的稳定性、样品在冷冻和冻融条件下的稳定性和样品在冷冻贮藏期间的稳定性均良好。

2.6.10 回收率试验 取大鼠空白血浆 100 μ L 置于 1.5 mL EP 管中，分别加入 4、200、2 000 ng/mL 系列 PSD 对照品溶液，按“2.6.2”项下方法分别制成含 PSD 质量浓度为 1、50、500 ng/mL 低、中、高 3 个质量浓度的样品 A。另取大鼠空白血浆，按“2.6.2”项下方法吹干样品，残渣分别加入 100 μ L 质量浓度为 1、50、500 ng/mL 的 PSD 对照品溶液制成样品 B。分别取样品 A、B 进样，记录各自的色谱峰面积，并计算回收率（回收率 = A 色谱峰面积/B 色谱峰面积）。结果高、中、低 3 个质量浓度样品的提取回收率分别为 (84.9 \pm 2.08)%、(91.8 \pm 1.56)%、(87.6 \pm 1.26)%。

2.6.11 数据处理 药动学参数由软件 WinNonlin

5.2 计算得到, 结果见图 6 和表 2。从表 2 可知, 大鼠 ig 给予 PSD 后, $t_{1/2}$ 为 1 137.89 min, 达峰时间 (t_{max}) 为 30 min; 大鼠 ig 给予 PSD-SD 后, $t_{1/2}$ 为 1 169.09 min, t_{max} 为 22 min, $AUC_{0\sim\infty}$ 达到了 60 008 ng·min/mL, 是原料药 PSD $AUC_{0\sim\infty}$ 的 2.24 倍。

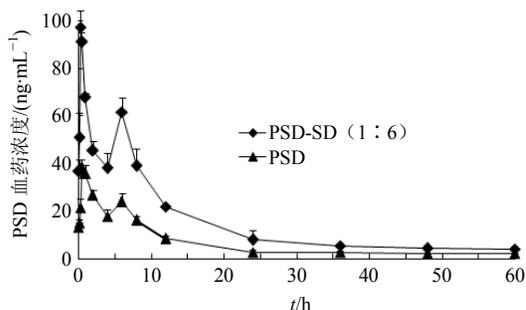


图 6 PSD-SD (1 : 6) 与 PSD 大鼠 ig 给药 (100 mg/kg) 药时曲线

Fig. 6 Drugs-time curve about PSD (1 : 6) and PSD in rats after ig administration (100 mg/kg)

表 2 PSD-SD 和 PSD 大鼠 ig 给药 (100 mg/kg) 主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of PSD and PSD-SD (100 mg/kg) in rats after ig administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	PSD-SD	PSD
$t_{1/2}$	min	1 169.09 ± 717.15	1 137.89 ± 516.98
t_{max}	min	22.00 ± 4.47*	30.00 ± 0.00
C_{max}	ng·mL ⁻¹	97.19 ± 7.03**	38.70 ± 3.39
$AUC_{0\sim\infty}$	ng·min·mL ⁻¹	60 008.00 ± 3 957.38**	26 672.14 ± 4 551.31
$MRT_{0\sim\infty}$	min	1 321.88 ± 217.59	1 501.67 ± 280.10

与 PSD 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs PSD

3 讨论

分别建立了 HPLC 法和 LC/MS 方法测定 PSD 的量, 所建立的方法专属性强、稳定、重现性好, 为 PSD 体外溶出度的测定和体内血浆样品定量测定奠定了坚实基础。

为了能够保持样品制备方法一致性, 确定了 SD 采用溶剂法。为保证反应达到完全, 或避免溶剂蒸发时由于溶解度小的问题使 PSD 单独析出从而影响产物的形成, 因此选择了无水乙醇作为 PSD-SD 反应溶剂。采用冻干法干燥制备的 SD 可以有效防止固体分散形成“胶状”物, 有利于 SD 的干燥和粉碎^[12]。采用了 IR、DSC 及 XRD 3 种方法表征了 PSD-SD 的形成, 结果表明 PSD 以非结晶态无定形存在于 PEG 6000 中, 从而大大增加了 PSD 溶解时

的表面积, 有利于药物的溶出。

体外溶出行为表明 PSD 制成 SD 后累积溶出率明显高于 PSD 和物理混合物, 说明制成 SD 后有利于加速 PSD 的溶出。大鼠 ig 给药同剂量的 PSD 及形成的 SD 药动学结果表明, 与 PSD 原料药口服同剂量给药相比较, SD 的 t_{max} 、 C_{max} 、 $AUC_{0\sim\infty}$ 均有显著差异 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 t_{max} 提前且 C_{max} 增加, 与体外溶出行为相吻合, 说明体内外相关性较好。 PSD-SD 的 $AUC_{0\sim\infty}$ 是原料药 PSD 的 2 倍多, 说明 PSD 研制成 SD 后相对生物利用度提高了 2 倍多, 进而表明增加了药物吸收。 PSD 与其 SD 体外溶出结果与体内药动学结果呈现了体内外一致性。

参考文献

- [1] Kang S S. Saponins from the roots of *Pulsatilla koreana* [J]. *Arch Pharm Res*, 1989, 12(1): 42-47.
- [2] 贾远敏. 毛酸浆浆果的化学成分研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [3] 王啸洋. 太白银莲花活性成分研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2011.
- [4] 廖 循, 陈耀祖, 丁立生, 等. 冻地银莲花的化学成分 [J]. *天然产物研究与开发*, 1999, 11(4): 1-6.
- [5] Mi K S, Kyung H J, Sang W H, *et al.* SB365, Pulsatilla saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Food Chem*, 2013, 136(1): 26-33.
- [6] Sang W H, Kyung H J, Hee S L, *et al.* SB365 inhibits angiogenesis and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma through modulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(11): 1929-1937.
- [7] Yong K, Seong C B, Ji H L, *et al.* Pulsatilla saponin D: the antitumor principle from *Pulsatilla koreana* [J]. *Arch Pharm Res*, 2004, 27(9): 915-918.
- [8] Bang S C, Lee J H, Song G Y, *et al.* Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(11): 1451-1454.
- [9] 饶小勇, 尹 姗, 张国松, 等. HPLC 测定 PSD 的油水分系数及平衡溶解度 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(9): 1593-1596.
- [10] 饶小勇, 龚 明, 尹 姗, 等. PSD 在大鼠肠道的吸收行为研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(24): 3515-3520.
- [11] 陈 超, 周福军, 刘时乔, 等. 固体分散技术在中药制剂中的应用 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(4): 279-282.
- [12] 刘 颖, 常 江, 韩美华, 等. 异烟肼缓释固体分散体的制备及其体外评价 [J]. *中国现代应用药学*, 2011, 28(2): 142-145.