

欧前胡素固体分散体凝胶骨架缓释片的制备及药动学评价

徐志杰

威海海洋职业学院, 山东 威海 264300

摘要: **目的** 制备欧前胡素固体分散体(imperatorin solid dispersion, IMP-SD)凝胶骨架缓释片(hydrogel matrix sustained-release tablets)(IMP-SD-HMSRT), 并研究口服药动学行为及体内相关性。**方法** 溶剂挥发法制备 IMP-SD。在单因素考察的基础上, 选择 HPMC K15M 用量、聚乙二醇(PEG) 400 比例和 PEG 总用量为主要影响因素, 缓释片在 2、6、12 h 累积释放率的综合评分为响应值, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法优化 IMP-SD-HMSRT 最佳处方, 并考察在家兔体内的药动学行为。利用 Loo-Rigelman 法评价其体内相关性。**结果** IMP-SD-HMSRT 最佳处方为 HPMC K15M 用量为 48 mg/片、PEG 400 比例为 58%、PEG 总量为 26.5 mg/片。HMSRT 的 12 h 累积释放率达到 95.54%。药动学结果显示 IMP-SD-HMSRT 的 C_{max} 波动小, t_{max} 延后至 (4.08 ± 0.43) h, 与欧前胡素普通片相比 IMP-SD-HMSRT 的相对生物利用度提高至 219.76%。IMP-SD-HMSRT 在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中体外释药行为与体内吸收存在相关性。**结论** IMP-SD-HMSRT 释药缓慢, 促进了药物吸收, 体内吸收与体外释药具有良好的相关性。

关键词: 欧前胡素; 固体分散体; 凝胶骨架缓释片; Box-Behnken 设计-效应面法; 药动学

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)17-5321-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.008

Preparation of imperatorin solid dispersion hydrogel matrix sustained-release tablets and pharmacokinetic evaluation

XU Zhi-jie

Weihai Ocean Vocational College, Weihai 264300, China

Abstract: **Objective** To prepare imperatorin solid dispersion (IMP-SD) hydrogel matrix sustained-release tablets (IMP-SD-HMSRT), and investigate the pharmacokinetic behavior and *in vivo-in vitro* correlation. **Methods** Solvent evaporation was used to prepare IMP-SD. On the basis of single factor investigation, HPMC K15M dose, PEG 400 proportion and amounts of PEG dose were selected as main influencing factors, composite score of cumulative rate of 2, 6, and 12 h of IMP-SD-HMSRT was used as response value, Box-Behnken design-response surface method was employed to optimize formulation of IMP-SD-HMSRT, and the pharmacokinetic behavior in rabbits was studied. Loo-Rigelman method was used for the evaluation of *in vivo* and *in vitro* correlation. **Results** The optimal formulation of IMP-SD-HMSRT: HPMC K15M dose was 48 mg/tablet, PEG 400 proportion was 58%, PEG total dose was 26.5 mg/tablet. The accumulative release of IMP-SD-HMSRT could achieve 95.54% within 12 h. Pharmacokinetic results showed that C_{max} fluctuated slightly, and t_{max} was delayed to (4.08 ± 0.43) h. The relative bioavailability of the IMP-SD-HMSRT was enhanced to 219.76% comparing to imperatorin tablets. *In vitro* release behavior of IMP-SD-HMSRT in pH 6.8 phosphate buffer saline was associated with its *in vivo* pharmacokinetics. **Conclusion** The drug release of IMP-SD-HMSRT was slowly, and promoted absorption. The correlation between the absorption *in vivo* and release *in vitro* is fine.

Key words: imperatorin; solid dispersion; hydrogel matrix sustained-release tablets; Box-Behnken design-response surface method; pharmacokinetics

欧前胡素(imperatorin)主要存在于白芷、欧前胡、防风、独活等中药植物中, 属于香豆类化合物, 研究表明它具有抗炎、抗抑郁、镇痛等作用^[1],

在心血管系统和神经系统中应用较多^[2-3]。据报道^[4], 欧前胡素脂溶性较好, 但水中溶解度仅为 2.45 $\mu\text{g/mL}$, 溶出度差, 导致药物难以吸收。尚曙玉等^[5]

收稿日期: 2022-02-17

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(51804021)

作者简介: 徐志杰(1984—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为现代给药系统与制剂新技术。Tel: (0631)7697687 E-mail: xzj18669333606@126.com

将其制备成固体分散体后口服生物利用度提高至 2.03 倍。但欧前胡素具有一定的毒性^[6], 固体分散体的快速释药使欧前胡素的血药浓度波动较大, 容易加剧毒副作用, 因此有必要进一步制备成缓释制剂。另外, 欧前胡素在胃肠道均有吸收^[7], 适合制备成缓释制剂。凝胶骨架缓释片 (hydrogel matrix sustained-release tablets, HMSRT) 具有释药变异小、制备工艺简单、适合大规模生产、辅料成本低廉等优势, 是缓释制剂研究热点之一^[8-10], 可有效抑制血药浓度波动, 减少患者服药次数、增强顺应性及药效^[11]。为解决欧前胡素固体分散体 (imperatorin solid dispersion, IMP-SD) 血药浓度波动较大缺点, 提高其安全性及有效性, 本研究采用 HPMC K15M 为凝胶骨架缓释片的缓释材料, 聚乙二醇 (PEG) 类物质 (PEG 400 和 PEG 4000 混合物) 作为释药速率调节剂, 将 IMP-SD 进一步制备成凝胶骨架缓释片 (hydrogel matrix sustained-release tablets, IMP-SD-HMSRT), 并对体内药动力学进行研究, 为欧前胡素新制剂研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Quintix125D-1CN 型电子分析天平, 赛多利斯科学仪器北京有限公司; DF-101S 磁力搅拌器, 河南天辰仪器设备有限公司; 1100 型高效液相色谱仪, 安捷伦公司; RC-6D 型药物溶出试验仪, 天津创兴电子设备有限公司; YP-1 型压片机, 宁波天辰机械设备有限公司; HB-800 型超声仪, 张家港市海博设备有限公司; RF01 型旋蒸蒸发仪, 上海况胜实业公司; YD-4 片剂硬度仪, 天津创兴电子设备有限公司。

1.2 材料

欧前胡素对照品, 批号 110826-202021, 质量分数 99.6%, 中国食品药品检定研究院; 羟丙基甲基纤维 K15M (HPMC K15M), 批号 181208, 西安天正药用辅料有限公司; 欧前胡素原料药, 批号 20191025, 质量分数为 98%, 南京春秋生物工程有限公司; 淀粉, 批号 190910, 曲阜市天利药用辅料有限公司; 聚乙二醇 400 (PEG 400), 批号 20200315, 山东瑞生药用辅料有限公司; 聚乙二醇 4000 (PEG 4000), 批号 20191224, 山东瑞生药用辅料有限公司; 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP K30), Sigma-Aldrich 公司; 硬脂酸镁, 批号 151026, 湖北兴银河化工有限公司; 甲醇, 色谱级, 德国 Merck 公司。

1.3 动物

日本大耳兔, 雌雄兼用, 体质量 1.8~2.4 kg, 购自吉林大学动物实验中心[许可证号: SCXK(吉)2016-007]。所有动物实验遵循威海海洋职业学院有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 IMP-SD-HMSRT 的制备

2.1.1 IMP-SD 的制备及晶型分析 参考文献方法^[5]制备 IMP-SD。取 10 g 欧前胡素原料药和 50 g PVP K30 置于 1000 mL 圆底烧瓶中, 加入 600 mL 无水乙醇得混悬液。置于 45 °C 水浴中磁力搅拌 5 h (转速为 800 r/min), 减压旋蒸除去有机溶剂得残留物, 收集并研磨成细粉, 即得 IMP-SD, 过 24 目筛, 置于干燥器中保存。

取欧前胡素原料药、PVP K30、物理混合物 (比例同 IMP-SD) 和 IMP-SD 粉末约 8 mg, 置于玻璃槽中, 压制平整, 进行 X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 分析。扫描条件为铜靶, 扫描速度: 5°/min, 扫描范围 (2θ): 3°~45°, 结果见图 1。欧前胡素在 3°~45° 有大量的晶型衍射峰, 在物理混合物的 XRPD 图谱中仍可观察欧前胡素原料药到在 9.6°、9.9°、16.1°、18.0°、19.8°、24.1°、35.2° 等处的特征晶型衍射峰, 说明简单混合未改变欧前胡素存在状态。在 IMP-SD 的 XRPD 图谱中欧前胡素的晶型衍射峰均消失不见, 说明欧前胡素转变成成为无定型物质, 同时也证明 IMP-SD 制备成功。

2.1.2 IMP-SD-HMSRT 的制备 IMP-SD-HMSRT 的处方工艺研究均按 200 片进行制备。保持 IMP-SD 含量为 240 mg/片 (以欧前胡素计 40 mg/片), 加入处方量的 HPMC K15M 和释药速率调节剂 (PEG 400 与 PEG 4000 混合物) 等辅料, 加入淀粉补充

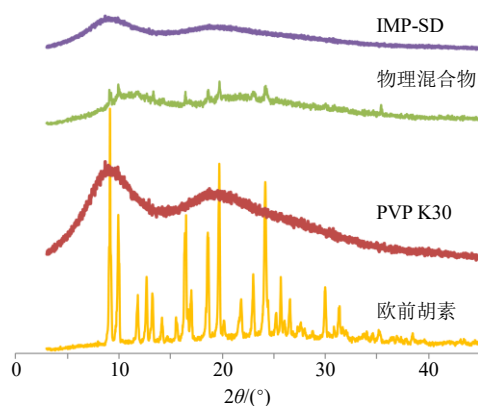


图 1 XRPD 结果

Fig. 1 Results of XRPD

片质量至 0.5 g/片, 混匀。6%淀粉浆制软材, 20 目筛制粒, 真空干燥 12 h, 20 目筛整粒, 加入 0.8% 硬脂酸镁, 混匀后压制成直径 1.1 cm 片剂, 即得 IMP-SD-HMSRT。

2.2 HPLC 法测定欧前胡素含量

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent XDB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 30 ℃; 流动相为甲醇-水 (60:40); 检测波长为 300 nm; 体积流量为 1.0 mL/min。理论塔板数以欧前胡素计不低于 8000, 色谱图见图 2, 结果表明辅料不干扰欧前胡素含量测定, 专属性高。

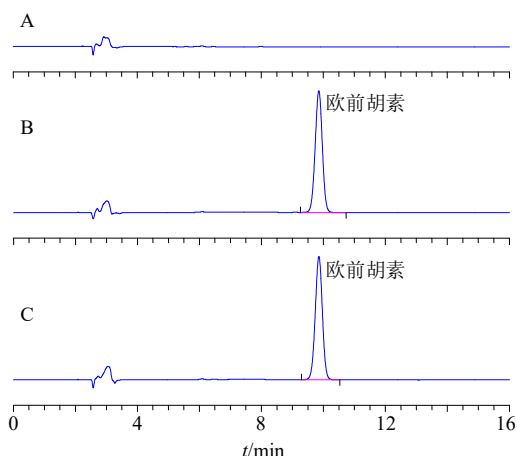


图 2 阴性溶液 (A)、欧前胡素对照品 (B) 和 IMP-SD-HMSRT 样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC of negative solution (A), imperatorin reference substance (B) and IMP-SD-HMSRT sample (C)

2.2.2 对照品溶液的配制及线性关系考察 采用甲醇配制质量浓度为 500 μg/mL 的欧前胡素对照品储备液。取适量, 流动相稀释至 20、10、5、1、0.1、0.05 μg/mL, 各质量浓度平行 3 份。进样, 记录欧前胡素各质量浓度 (X) 的峰面积 (Y), 作线性回归得回归方程 $Y=18.1065X+0.7746$, $r=0.9997$, 线性范围为 0.05~20 μg/mL。

2.2.3 供试品溶液的配制 取 10 片 IMP-SD-HMSRT, 研磨至细粉, 称取 0.5 g 置于 100 mL 量瓶中, 加入 50 mL 甲醇震荡混匀, 超声 10 min, 放置 20 min, 并用甲醇-水 (60:40) 定容。取适量过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液 0.5 mL 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇-水 (60:40) 定容, 即得 IMP-SD-HMSRT 供试品溶液。

2.2.4 重复性考察 按照“2.2.3”项下方法平行制备 6 份 IMP-SD-HMSRT 供试品溶液, 分别进 HPLC 测定欧前胡素含量, 计算其 RSD 为 1.62%, 结果表

明重复性良好。

2.2.5 精密度考察 取质量浓度为 0.05、5、20 μg/mL 的欧前胡素对照品溶液分别作为低、中、高质量浓度, 连续进样 6 次进行分析。结果显示低、中、高质量浓度的 RSD 值分别为 0.95%、0.69%、0.74%, 结果表明本实验精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 IMP-SD-HMSRT 供试品溶液置于室温, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 计算得欧前胡素质量浓度的 RSD 为 1.12%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 加样回收率考察 取 9 份 0.25 g 的 IMP-SD-HMSRT 细粉置于 100 mL 量瓶中, 分成低、中、高 3 组, 分别加入欧前胡素对照品 10、20、30 mg, 按照“2.2.3”项下所述方法分别制备 IMP-SD-HMSRT 的供试品溶液, 进样测定欧前胡素含量。结果显示, 欧前胡素平均加样回收率为 99.43%, RSD 为 1.24%。

2.3 IMP-SD-HMSRT 释放度测定方法

转篮法考察体外释药情况。设置溶出仪转速为 75 r/min, 温度为 (37.0±0.5) ℃, 取 6 片 IMP-SD-HMSRT 同时放入 900 mL 蒸馏水的溶出杯中。分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 取样 3 mL 至离心管中, 密封, 并补加 3 mL 蒸馏水 (温度为 37 ℃)。0.45 μm 微孔滤膜 (水膜) 过滤样品, 进样测定欧前胡素含量, 计算各点累积释放率, 绘制体外释药曲线。

2.4 单因素试验考察各因素对 IMP-SD-HMSRT 释药的影响

2.4.1 骨架材料型号对 IMP-SD-HMSRT 释药的影响 固定 IMP-SD 含量为 240 mg/片, 骨架材料用量为 45 mg/片, PEG 400 与 PEG 4000 用量比为 1:1, PEG 总用量为 20 mg/片等条件不变, 分别考察骨架材料型号 (HPMC K4M、HPMC K15M、HPMC K30M) 对 IMP-SD-HMSRT 体外释药的影响, 结果见图 3。HPMC K4M 相对分子质量较小, 药物释药容易, 因而体外释药相对较快; 而 HPMC K30M 相对分子质量较大, 形成的凝胶层相对较厚, 导致体外释药相对较慢。HPMC K15M 作为骨架材料时由于分子量适中, 制得的 IMP-SD-HMSRT 体外释药行为相对理想, 故后续研究均采用 HPMC K15M 作为 IMP-SD-HMSRT 的骨架材料。

2.4.2 HPMC K15M 用量的考察 固定 IMP-SD 含量为 240 mg/片, HPMC K15M 为骨架材料, PEG 400 与 PEG 4000 用量比为 1:1, PEG 总用量为 20 mg/片等条件不变, 分别考察 HPMC K15M 用量

(30、45、60 mg/片)对 IMP-SD-HMSRT 释药行为的影响,结果见图 4。当 HPMC K15M 用量为 30 mg/片时体外释药相对较快,用量为 60 mg/片时体外释药相对较慢,而用量为 45 mg/片时 IMP-SD-HMSRT 体外释药相对适中,可见其用量对 IMP-SD-HMSRT 体外释药影响较大,后续需要进一步优化。

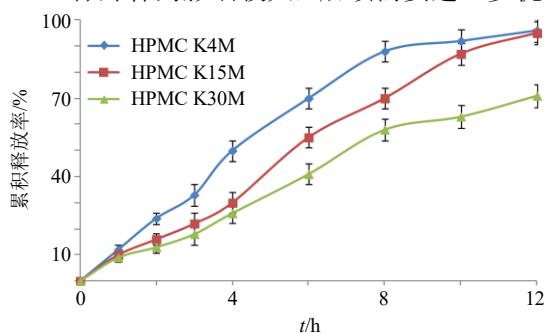


图 3 骨架材料型号的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Study of different kinds of framework materials ($\bar{x} \pm s, n=3$)

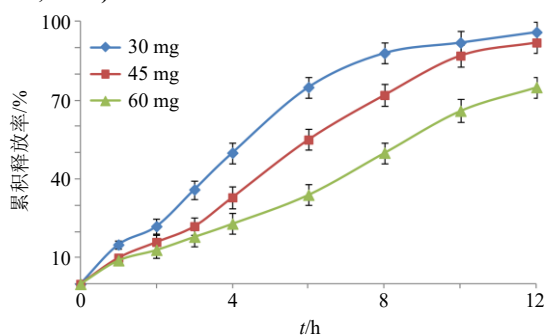


图 4 HPMC K15M 用量的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Study of HPMC K15M amounts ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.4.3 PEG 400 用量比例的考察 固定 IMP-SD 含量为 240 mg/片, HPMC K15M 为骨架材料,用量为 45 mg/片, PEG 总用量为 20 mg/片 (PEG 400 与 PEG 4000 混合物) 等条件不变,分别考察 PEG 400 所占 PEG 总用量比例(30%、50%、70%)对 IMP-SD-HMSRT 释药的影响,结果见图 5。PEG 400 和 PEG 4000 的相对分子质量不同,因而两者比例不同时对 IMP-SD-HMSRT 体外释药产生一定影响。PEG 400 用量比例相对较大时(70%)体外释药相对较快,比例相对较小时(30%)为体外释药相对较慢,当用量为 50%时 IMP-SD-HMSRT 体外释药相对适中。可见 PEG 400 用量比例对 IMP-SD-HMSRT 体外释药影响较大,后续需要进一步优化。

2.4.4 PEG 用量的考察 固定 IMP-SD 含量为 240 mg/片, HPMC 15M 为缓释材料,PEG 400 用量比例为 50%等条件不变,分别考察 PEG 总用量(30、

20、10 mg/片)对 IMP-SD-HMSRT 释药行为的影响,结果见图 6。PEG 物质在 IMP-SD-HMSRT 中起到调节释药速率的作用,当 PEG 用量较大时(30 mg/片)体外释药相对较快,比例相对较小时(10 mg/片)为体外释药相对较慢,后续需对 PEG 用量进一步优化。

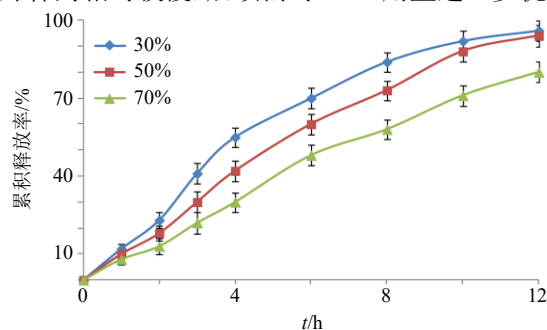


图 5 PEG 400 用量比例的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Study of PEG 400 ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

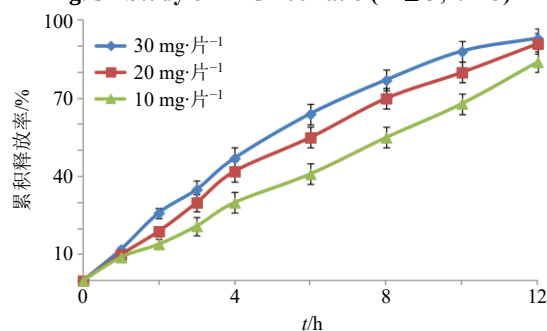


图 6 PEG 用量的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Study of PEG 400 amounts ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 Box-Behnken 响应面法优化 IMP-SD-HMSRT 处方

2.5.1 实验方案 根据单因素考察结果,选择 HPMC K15M 用量(30、45、60 mg/片, X_1)、PEG 400 所占 PEG 总用量的比例(30%、50%、70%, X_2)和 PEG 总用量(10、20、30 mg/片, X_3)作为主要影响因素,各影响因素的水平见表 1。

对于 IMP-SD-HMSRT 来讲,在 2 h 的累积释放率(L_2)应防止出现突释或迟释,6 h 的累积释放率(L_6)应防止出现释药不足或过度释药,12 h 累积释放率(L_{12})应达基本释放完毕要求。采用综合评分(Y)进行评价,公式为 $Y = |L_2 - 0.3| \times 100 + |L_6 - 0.7| \times 100 + |L_{12} - 0.95| \times 100$,以综合评分 Y 为响应值,采用 Box-Behnken 响应面法优化 IMP-SD-HMSRT 处方,根据实验组合分别制备不同处方的 IMP-SD-HMSRT,并分别测定 2、6、12 h 的累积释放率,计算 Y 值,结果见表 1。

2.5.2 模型的拟合及最佳处方 对实验数据进行拟

表 1 Box-Behnken 试验设计结果 ($n=3$)
Table 1 Experiments results of Box-Behnken ($n=3$)

序号	$X_1/(\text{mg}\cdot\text{片}^{-1})$	$X_2/\%$	$X_3/(\text{mg}\cdot\text{片}^{-1})$	$L_2/\%$	$L_6/\%$	$L_{12}/\%$	Y	序号	$X_1/(\text{mg}\cdot\text{片}^{-1})$	$X_2/\%$	$X_3/(\text{mg}\cdot\text{片}^{-1})$	$L_2/\%$	$L_6/\%$	$L_{12}/\%$	Y
1	30 (-1)	30 (-1)	20 (0)	33.7	65.4	88.2	16.1	10	45	70	10	24.7	50.4	80.2	39.7
2	45 (0)	50 (0)	20	31.4	73.2	94.4	5.3	11	45	70	30	34.6	76.2	97.1	12.9
3	45	50	20	33.6	70.7	96.5	5.9	12	60	30	20	22.7	57.8	84.6	19.9
4	60 (+1)	50	10 (-1)	15.8	53.4	75.1	50.7	13	45	50	20	30.6	73.5	97.3	6.4
5	30	70 (+1)	20	45.1	76.5	94.8	21.8	14	45	30	10	21.9	62.4	78.7	32.0
6	45	50	20	34.6	74.1	95.6	9.3	15	45	30	30	33.2	72.3	98.1	8.6
7	60	70	20	23.4	58.3	90.4	22.9	16	60	50	30	23.8	74.9	94.5	11.6
8	30	50	30 (+1)	35.8	77.6	94.3	14.1	17	45	50	20	32.7	71.6	96.2	5.5
9	30	50	10	26.2	54.8	83.4	30.6								

合, 得出 Y 的 2 次多元回归方程为 $Y=6.48+2.81X_1+2.59X_2-13.23X_3-0.68X_1X_2-5.65X_1X_3-0.85X_2X_3+8.57X_1^2+5.12X_2^2+11.70X_3^2$, 方差分析见表 2。拟合结果显示, $R^2=0.9871$, $R_{\text{adj}}^2=0.9706$, 说明拟合值与实测值相关性良好。模型 $P<0.0001$ (具极显著性意义), 失拟项的 $P=0.1483>0.05$ (无显著性意义), 说明该模型未知因素干扰小。根据方差分析结果, 方程中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 各项均具显著性或极显著意义 ($P<0.05$ 、 0.01)。

固定 HPMC K15M 用量、PEG 400 比例和 PEG 总量的某一因素, 得其他 2 因素对综合评分 Y 的三维曲面图, 见图 7。

当固定某一因素不变时, 随着其他 2 因素的增加总评分均呈现先下降后上升趋势, 总评分越小, 表明释药过程越理想。得到的 IMP-SD-HMSRT 最佳处方为 HPMC K15M 用量 48.18 mg/片, PEG 400 比例 58.26%, PEG 总量 26.62 mg/片; 预测的总评分为 4.7。

表 2 方差分析
Table 2 Analysis of variance

因素	方差	自由度	均方	F 值	P 值	因素	方差	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2 746.40	9	305.16	59.64	<0.0001	X_1^2	309.42	1	309.42	60.48	0.0001
X_1	63.28	1	63.28	12.37	0.0098	X_2^2	110.48	1	110.48	21.59	0.0024
X_2	53.56	1	53.56	10.47	0.0143	X_3^2	576.13	1	35.82	112.60	<0.0001
X_3	1 399.20	1	1399.20	273.47	<0.0001	残差	35.82	7	5.12		
X_1X_2	1.82	1	1.82	0.36	0.5694	失拟度	25.17	3	8.29	3.15	0.1483
X_1X_3	127.69	1	127.69	24.96	0.0016	纯误差	10.65	4	2.66		
X_2X_3	2.89	1	2.89	0.56	0.4768	总误差	2 782.22	16			

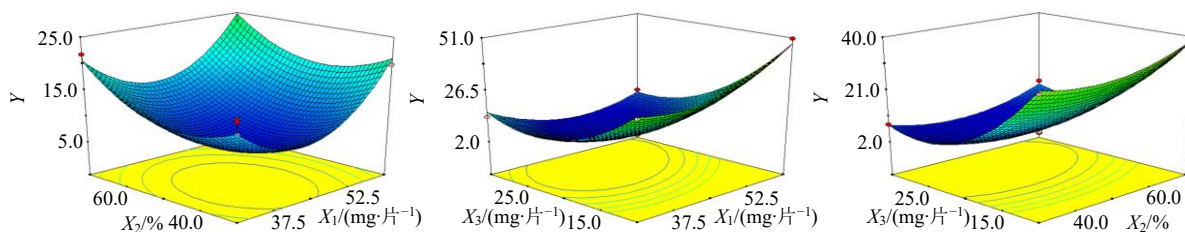


图 7 各因素与响应值的三维图

Fig. 7 Three-dimensional plot of independent factors and response values

2.6 工艺验证

为便于操作, 将 IMP-SD-HMSRT 最佳处方调整为 HPMC K15M 用量为 48 mg/片, PEG 400 比例

为 58%, PEG 总量为 26.5 mg/片。平行制备 3 批 IMP-SD-HMSRT, 分别测定 2、6、12 h 的累积释放率, 并按照“2.5.1”项下方法计算综合评分。3 批

IMP-SD-HMSRT 体外释药结果见图 8, 说明确定的最佳处方工艺重复性良好, 综合评分分别为 5.1、4.6、4.8, 均与预测值 4.7 接近, 且 12 h 平均累积释放率达到 95.54%。

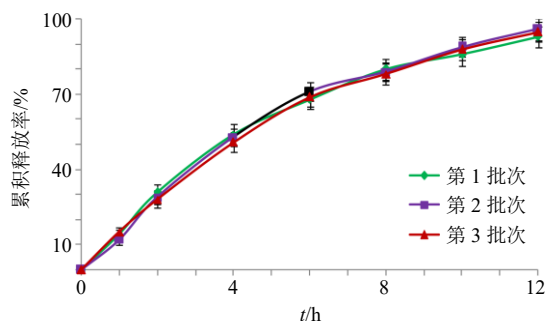


图 8 IMP-SD-HMSRT 体外释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 8 Drug release profiles *in vitro* of IMP-SD-HMSRT ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.7 欧前胡素普通片及 IMP-SD 片的制备和体外释药比较

取欧前胡素和 IMP-SD 粉末适量, 分别加入淀粉混合均匀, 6%淀粉浆制软材, 20 目筛制粒, 真空干燥 12 h, 20 目筛整粒, 加入 0.8%硬脂酸镁, 混匀后压制成直径 1.1 cm 片剂, 即得欧前胡素普通片及 IMP-SD 片。

按“2.3”项下方法比较欧前胡素普通片、IMP-SD 片和 IMP-SD-HMSRT 体外释药情况, 结果见图 9。IMP-SD 片在 0~4 h 释药速率较快, 在 4 h 基本释放完毕。将 IMP-SD 制备成 IMP-SD-HMSRT 后释药缓慢, 12 h 累积释放率为 96.07%, 而欧前胡素普通片在 12 h 累积释放率仅为 33.40%。由于 IMP-SD-HMSRT 具有明显的缓释特征, 为与后续药动力学研究保持一致, 因此增加了 18 h 取样点。

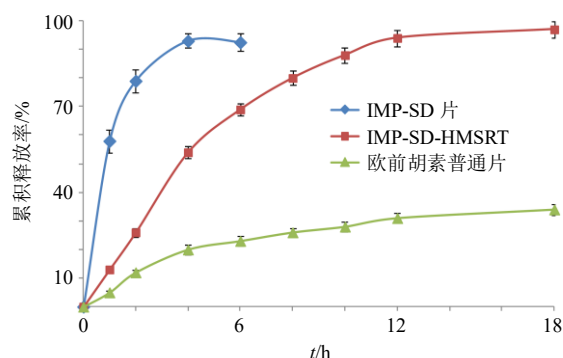


图 9 欧前胡素普通片、IMP-SD 片和 IMP-SD-HMSRT 体外释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 9 *In vitro* drug release profiles of imperatorin tablets, IMP-SD tablets and IMP-SD-HMSRT ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.8 药动力学研究

2.8.1 给药及取血方案 取 18 只健康家兔, 分为欧前胡素普通片组、IMP-SD 片组和 IMP-SD-HMSRT 组, 给药前禁食 0.5 d, 但可自由饮水。用开口器将片剂送入家兔口中, 温水送服。欧前胡素普通片组于 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8 h 于耳缘静脉处取血约 1 mL 置于肝素化离心管中。IMP-SD 片和 IMP-SD-HMSRT 组分别增加取血点至 12 h 和 18 h。血浆样品均于 3500 r/min 离心 3 min, 取血浆密封, 置于 -18 °C 冰箱保存。

2.8.2 血浆样品的处理^[5] 甲醇配制质量浓度为 800 ng/mL 的异欧前胡素作为内标溶液。常温解冻后吸取血浆样品 100 μ L 置离心管中, 加入内标溶液 40 μ L, 醋酸乙酯-石油醚 (1:1) 2 mL, 涡旋 6 min, 5000 r/min 离心 5 min。取上层有机相, 置于空白离心管中, 45 °C 的氮气缓慢吹干, 于残渣加入 100 μ L 甲醇复溶, 继续于 5000 r/min 离心 5 min 即得血浆样品, 待测。

2.8.3 溶液配制及线性曲线考察 采用甲醇稀释配制质量浓度为 1000、500、250、100、50、25 ng/mL 的欧前胡素对照品溶液, 分别取 100 μ L, 45 °C 的氮气缓慢吹干, 加入 100 μ L 空白血浆, 涡旋 6 min, 即得欧前胡素血浆对照品溶液。按照“2.8.2”项下所述方法处理样品, 进 HPLC 测定欧前胡素与内标的峰面积。欧前胡素与内标的峰面积比 (Y) 对欧前胡素质量浓度 (X) 进行线性回归后得回归方程为 $Y=1.4268X+10.2659$, $r=0.9922$, 因此, 欧前胡素血浆对照品在 20~1000 ng/mL 线性关系良好。

2.8.4 专属性考察 取空白血浆、欧前胡素+空白血浆和血浆样品分别进 HPLC, 色谱图见图 10, 可见, 血浆内源性物质不干扰欧前胡素及内标色谱峰, 因此专属性较高。

2.8.5 稳定性考察 取欧前胡素普通片给药 1.5 h 的血浆样品, 于 0、1、3、6、9、12 h 进 HPLC 测定, 计算欧前胡素与内标峰面积之比的 RSD 为 7.64%, 所以血浆样品稳定性较好。

2.8.6 精密度考察 取质量浓度为 25、250、1000 ng/mL 血浆对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算得欧前胡素与内标异欧前胡素峰面积之比的 RSD 分别为 6.35%、7.09%、5.78%, 所以日内精密度良好。取质量浓度为 25、250、1000 ng/mL 血浆对照品溶液, 每天测定 1 次, 连续测定 6 d, 计算得欧前胡素

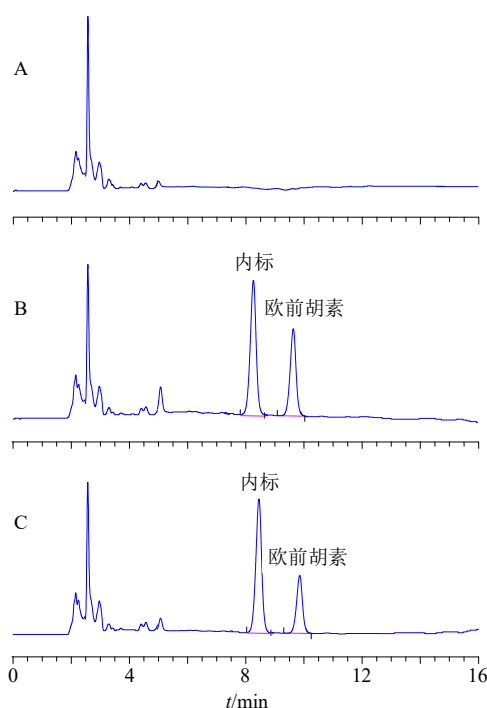


图 10 空白血浆 (A)、欧前胡素+空白血浆 (B) 和血浆样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 10 HPLC of blank plasma (A), imperatorin + blank plasma (B), and plasma sample (C)

与内标峰面积之比的 RSD 分别为 9.15%、10.26%、7.78%，所以日间精密度良好。

2.8.7 回收率考察 取质量浓度为 25、250、1000 ng/mL 的欧前胡素对照品溶液，按照“2.8.2”项下所述方法制备血浆对照品溶液，进样测定欧前胡素与内标的峰面积，计算两者峰面积比值，带入 $Y=1.4268X+10.2659$ 计算欧前胡素的测得质量浓度，并与实际质量浓度相比计算回收率。结果显示，平均回收率为 95.64%，RSD 为 7.71%。

2.8.8 药动力学结果 主要药动力学参数采用药动力学分析软件 DAS 2.0 进行拟合，结果见表 3。欧前胡素不同片剂的药-时曲线见图 11。IMP-SD 片的达峰时间 (T_{max})、达峰浓度 (C_{max})、药时曲线下面积 (AUC_{0-t}) 等与欧前胡素普通片相比具有显著性差异 ($P<0.05$ 、 0.01)，其中 t_{max} 显著性提前， C_{max} 显著性提高，波动幅度较大，相对生物利用度提高至 191.47%。IMP-SD-HMSRT 的 t_{max} 显著性延后至 (4.08 ± 0.43) h， C_{max} 降低至 (344.67 ± 43.81) ng/mL，血药浓度波动幅度明显降低，体内平均滞留时间 (MRT) 显著延长 ($P<0.01$)，与欧前胡素普通片相比相对生物利用度提高至 219.76%，其生物利用度

表 3 主要药动力学参数 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x}\pm s, n=6$)

参数	单位	欧前胡素片	IMP-SD 片	IMP-SD-HMSRT
T_{max}	h	1.53 ± 0.26	$0.94\pm0.23^*$	$4.08\pm0.43^{***}$
C_{max}	ng·mL ⁻¹	405.08 ± 57.33	$789.66\pm157.74^{**}$	$344.67\pm43.81^{***}$
$T_{1/2}$	h	4.17 ± 0.38	3.81 ± 0.33	$8.25\pm1.63^{***}$
AUC_{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	$1\,249.16\pm184.24$	$2\,391.73\pm387.09^{**}$	$2\,745.15\pm416.94^{***}$
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	$1\,302.85\pm198.61$	$2\,483.22\pm414.84^{**}$	$2\,849.18\pm427.13^{***}$
MRT	h	2.32 ± 0.31	2.71 ± 0.37	$3.54\pm0.46^{***}$
F	%	—	191.47	219.76

与欧前胡素普通片比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ；与 IMP-SD 片比较：# $P<0.05$ ### $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs imperatorin tablets；# $P<0.05$ ### $P<0.01$ vs IMP-SD tablets

提高幅度高于 IMP-SD 片。

2.9 体内外相关性评价

采用 Loo-Rigelman 法计算 IMP-SD-HMSRT 体内吸收率 (F_a) [12-13]。

$$F_a = (X_A)_t / (X_A)_\infty = [\rho_t + k_{10} \int_0^t \rho dt + (X_p)_t / V_c] / k_{10} \int_0^t \rho dt$$

式中 $(X_A)_t$ 表示 t 时间体内药量， $(X_A)_\infty$ 为体内总药量， ρ_t 表示 t 时间血药浓度， k_{10} 表示药物从中央室消除速率常数， $\int_0^t \rho dt$ 表示 t 时间内的血药浓度曲线下面积， V_c 为周边室内药物量， X_p 表示周边室药量

按此公式计算 F_a ，并作为因变量，以各时间点的累积释放率 F_t 为自变量进行线性回归，评价 IMP-SD-HMSRT 体内外相关性。结果显示 (表 4)，IMP-SD-HMSRT 在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中相关系数最高 ($r=0.9819$)，回归方程为 $F_a=2.0084 F_t-11.6973$ 。因此 IMP-SD-HMSRT 可采用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (转篮法，75 r/min) 来预测体外释放及体内吸收情况。

3 讨论

缓释材料 HPMC 型号 (K4M、K15M、K30M)

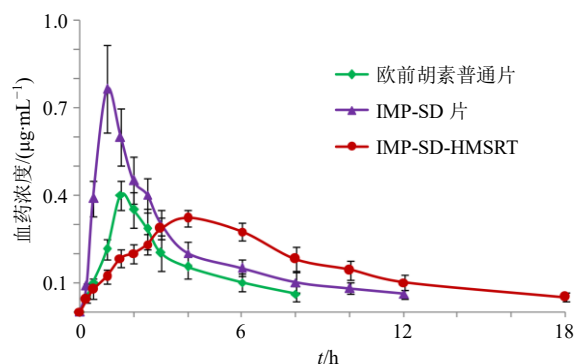


图 11 欧前胡素普通片、IMP-SD 片和 IMP-SD-HMSRT 药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 11 Plasma concentration-time profiles of imperatorin tablets, IMP-SD tablets and IMP-SD-HMSRT ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 4 IMP-SD-HMSRT 的评价结果 ($n = 6$)

Table 4 Evaluation results of IMP-SD-HMSRT ($n = 6$)

溶出介质	溶出条件	回归方程	相关系数
0.01 mol·L ⁻¹ 盐酸溶液	转篮法, 75 r·min ⁻¹	$F_a = 1.7941 F_t - 9.9715$	0.7696
pH 4.5 醋酸-醋酸钠缓冲液	转篮法, 75 r·min ⁻¹	$F_a = 2.3128 F_t - 17.2480$	0.9085
水	转篮法, 75 r·min ⁻¹	$F_a = 2.2057 F_t - 16.0784$	0.9682
pH 6.8 磷酸盐缓冲液	转篮法, 75 r·min ⁻¹	$F_a = 2.0084 F_t - 11.6973$	0.9819

400 所占比例优化范围为 30%~70%, PEG 总量优化范围为 10~30 mg/片。

制备的 IMP-SD-HMSRT 释药过程可能是: IMP-SD-HMSRT 进入水相后缓释片表层的 HPMC 高分子材料遇水发生水化, 即在缓释片表层形成凝胶层, 该凝胶层对内部药物释放起到阻滞效果。同时, IMP-SD-HMSRT 处方中释药速率调节剂 PEG 物质遇水发生溶解, 在凝胶阻滞层中留下释药通道。随着时间的延长骨架材料逐渐溶蚀, 直至药物释放完毕^[17], 体外释药示意图见图 12。

欧前胡素原料药溶解度较差, 在 8 h 后血药浓度已低于定量限。IMP-SD 在一定程度上促进了药物吸收, 但在 12 h 后血药浓度已低于定量限。而

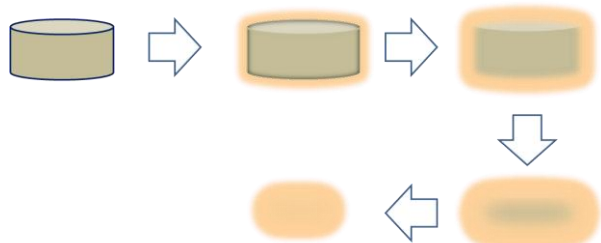


图 12 IMP-SD-HMSRT 体外变化过程

Fig. 12 In vitro change process of IMP-SD-HMSRT

对 IMP-SD-HMSRT 体外释药影响较大, 当 HPMC K4M 和 HPMC K30M 作为缓释材料时容易出现释药过快或释药过慢情况^[14-16], 可能是由于相对分子质量太大或太小时, 均影响了凝胶层的缓释效果。HPMC K15M 相对分子质量适中, 故选为缓释材料, 其用量对体外释药影响较大^[16-17], 结合单因素实验, 确定其优化范围为 30~60 mg/片。

HMSRT 一般是通过扩散及溶蚀机制释放药物, 因此, 需加入一定量的 PEG 作为释药速率调节剂^[10], PEG 型号 (PEG 400 或 PEG 4000) 对释药影响也较大, 单独采用 PEG 400 或 PEG 4000 时释药速率均不理想, 因而采用两者混合物作为释药速率调节剂^[9-10,18]。结合单因素实验结果, 确定 PEG

IMP-SD-HMSRT 增加了药物在胃肠道滞留时间, 有助于药物被充分吸收, 因而 18 h 时间点血药浓度仍在定量限之上, 为真实反映 IMP-SD-HMSRT 体内药动学行为, 故 IMP-SD-HMSRT 测定时间点设定至 18 h。

家兔口服药动学结果显示, IMP-SD 片的 T_{max} 显著性提前, C_{max} 与欧前胡素普通片相比提高了 1.95 倍, 这与 SD 提高药物溶解度、提高药物溶出速率及累积溶出度有关, 但体内血药浓度波动幅度较大, 可能会对安全性造成影响。而 IMP-SD-HMSRT 使 C_{max} 大大降低, 这是由于缓释片中的高分子材料 HPMC K15M 口服遇水后形成凝胶层, 控制了 IMP-SD 中药物的释放速率, 同时也影响了入血速度, 使 T_{max} 显著性延后^[19], C_{max} 波动幅度减小, 且 IMP-SD-HMSRT 的生物利用度提高幅度高于 IMP-SD 片, 说明 HMSRT 有助于药物被充分吸收, 提高生物利用度^[19-20]。本研究成功制备了 IMP-SD-HMSRT, 后期还需对其剂量^[20]、给药方案、质量标准以及药效学评价等继续进行研究。

志谢: 本研究由山东省职业教育梁会妮名师工作室资助 (2019)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李晓强, 谭余庆, 李慧杰, 等. 欧前胡素药理作用及机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(18): 196-201.
- [2] 于定荣, 翁小刚, 王本晓, 等. 延胡索、白芷炮制配伍对元胡止痛方中延胡索乙素、欧前胡素含量以及镇痛作用的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2306-2312.
- [3] 廖祥萍, 王怀伟, 刘南海, 等. 欧前胡素在中枢神经系统疾病治疗中的研究进展 [J]. 赣南医学院学报, 2019, 39(1): 97-100.
- [4] 祝婧云, 汤涛, 廖正根, 等. 注射用欧前胡素脂微球处方前研究 [J]. 江西中医药大学学报, 2018, 30(4): 72-75.
- [5] 尚曙玉, 张铁山, 徐凯, 等. 欧前胡素固体分散体的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2021, 43(3): 574-579.
- [6] 朱海, 孙旖, 夏振娜, 等. 欧前胡素急性毒性和安全药理学研究 [J]. 药学实践杂志, 2013, 31(6): 428-431.
- [7] 高芸, 栾立标. 白芷中 2 种有效成分在大鼠小肠的吸收特性 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(14): 1094-1098.
- [8] 孟戎茜, 王曼, 王慧芳, 等. 卡维地洛凝胶骨架缓释片的处方优选与表征 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(15): 1876-1881.
- [9] 郭留城, 杜利月, 郝海军, 等. 青藤碱固体脂质纳米粒凝胶骨架缓释片的制备及处方优化 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(18): 1893-1897.
- [10] 付金芳, 曹伶俐, 李乘欣, 等. 氢溴酸高乌甲素纳米粒缓释片的制备 [J]. 中成药, 2017, 39(5): 952-955.
- [11] 陈韡彬, 傅慧灵, 江宁宇, 等. 他克莫司缓释片的制备及体外释放度考察 [J]. 海峡药学, 2019, 31(1): 6-8.
- [12] 胡杰, 侯靖宇, 陆苑, 等. 右旋酮洛芬氨丁三醇速释缓释双层片在 Beagle 犬体内的药物动力学及生物等效性 [J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(8): 642-646.
- [13] 王维, 王博, 连潇嫣, 等. 口服缓释制剂体内相关性评价方法研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(5): 380-383.
- [14] 邓向涛, 阮晓东, 郝海军. 马钱子碱固体脂质纳米粒凝胶骨架缓释片的研制 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5298-5304.
- [15] 李宏伟, 付金芳, 范明松. 白杨素固体脂质纳米粒水凝胶骨架缓释片的制备 [J]. 中成药, 2020, 42(3): 564-569.
- [16] 邓向涛, 张文周, 张智强. 钩藤碱纳米混悬剂缓释片制备、优化与体外释放评价 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5128-5136.
- [17] 董丹丹, 郑岩, 刘会珍, 等. 田蓟苷纳米混悬剂冻干粉缓释片制备工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2841-2847.
- [18] 徐芳芳, 石伟, 张晖, 等. 穿心莲总内酯亲水凝胶骨架片的制备及体外释药机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 79-83.
- [19] Zhang R, Zhang Y, Wu Y, *et al.* Succinylated whey protein isolate as a sustained-release excipient of puerarin derivative oral tablets: Preparation, optimization and pharmacokinetics [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2018, 13(4): 383-394.
- [20] Wang L, Liu X. Sustained release technology and its application in environmental remediation: A review [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(12): 2153-2155.

[责任编辑 郑礼胜]