

GA-Me- β -CD 包合物肠溶胶囊,与 GA-Me 原药口服给药相比,口服生物利用度有增大的趋势,但没有显著增加,GA-Me 在酸性条件下含量迅速下降,可能是由于 GA-Me 大量析出与少量分解所致。制成 GA-Me- β -CD 包合物肠溶胶囊,改善了 GA-Me 的口服生物利用度^[10]。本研究为灵芝酸的临床前研究提供了实验数据。

参考文献:

- [1] Zhu M, Chang Q, Wong L K, et al. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum* [J]. *Phytother Res*, 1999, 13(6): 529-531.
- [2] Bhagwan S. Sanodiya, P. S. Bisen, et al. *Ganoderma lucidum*: A Potent Pharmacological Macrofungus [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 10: 717-742.
- [3] Chen Nianhong, Liu Jianwen, Zhong Jianjiang. Ganoderic Acid Me Inhibits Tumor Invasion Through Down-Regulating Matrix Metalloproteinases 2/9 Gene Expression [J]. *J Pharmacol Sci*,

2008, 108, 212-216.

- [4] Wang G, Liu J W, Zhong J J, et al. Enhancement of IL-2 and IFN-gamma expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(6): 864-870.
- [5] 王玉香,冯广义. 浅谈中药生物利用度的影响因素[J]. 中医药导报, 2008, 14(3): 79-80.
- [6] 王志萍,邓家刚,韦慧鲜,等. 难溶性药物增溶技术的研究进展[J]. 广西中医学院学报, 2007, 10(2): 73-77.
- [7] 陶少林,高峰. 高效液相色谱法测定大鼠全血中的灵芝酸单体 Me [J]. 现代仪器, 2009, 15(1): 26-28.
- [8] 卢文胜,危华玲. 复方黄酮胶囊稳定性研究[J]. 中成药, 2008, 30(7): 1004-1006.
- [9] 钟秀英. 药用 β -环糊精包合物制备、检验技术研究进展[J]. 中药材, 2003, 26(4): 301-305.
- [10] 恽菲,狄留庆,蔡宝昌,等. 中药制剂口服吸收生物利用度改善方法探讨[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2009, 11(6): 772-776.

松萝酸自微乳和滴丸在大鼠体内的药物动力学研究

赵颖^{1,2}, 宋丹³, 陶建生², 张彤², 王昌华³

(1. 重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 3. 重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘要:目的 对松萝酸自微乳和滴丸两种制剂的体内药物动力学进行考察。方法 建立大鼠血浆中松萝酸的 HPLC 测定方法,色谱条件为:Sepax Sapphire C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm 5 μ m);流动相 甲醇-(50 mmol KH₂PO₄:三乙胺 500:1)(70:30);柱温 40℃;体积流量 0.8 mL/min;检测波长:285 nm。测定大鼠口服两种制剂后不同时间点血浆中松萝酸的质量浓度,计算药物动力学参数。结果 血浆中松萝酸在 0.025~50 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系 $r=0.9993$ 。平均回收率在 90%~110% 之间。松萝酸自微乳、滴丸剂在大鼠体内给药后均符合单室一级吸收模型。主要药物动力学参数为: t_{max} 分别为 2.968 h 和 3.125 h; C_{max} 分别为 36.860 μ g/mL 和 42.392 μ g/mL; $AUC_{0-\infty}$ 分别为 660.934 μ g/(mL·h) 和 646.777 μ g/(mL·h)。结论 和松萝酸混悬液比较,松萝酸两种制剂的相对生物利用度均显著提高。

关键词:松萝酸;自微乳;滴丸;HPLC;药物动力学

中图分类号:R969.1

文献标志码:A

文章编号:1001-1528(2011)06-0954-04

Pharmacokinetic study on usnic acid SMEDDS and dropping pill in rat

ZHAO Ying^{1,2}, SONG Dan³, TAO Jian-sheng², ZHANG Tong², WANG Chang-hua³

(1. College of Pharmacology and Biology Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

ABSTRACT: AIM To research pharmacokinetics of two preparations of usnic acid. **METHODS** HPLC method was established for the determination of usnic acid in rats' plasma. Sepax Sapphire C₁₈ Column (250 mm×4.6

收稿日期:2010-11-13

基金项目:重庆市中药研究院开发基金项目(C-08-2)

作者简介:赵颖(1980—),女,讲师,博士,从事中药新药研究。Tel:(023)68669330 E-mail:zhy@cqut.edu.cn

mm 5 μm) was used with the mobile phase consisting of methanol-(50 mmol KH_2PO_4 : triethylamine 500:1) (70:30) and flow rate of 0.8 mL/min and the temperature at 40 $^\circ\text{C}$, the detection wavelength was set up at 285 nm. Blood samples were taken and usnic acid concentration was determined at chosen time interval, pharmacokinetic parameters were calculated. **RESULTS** The calibration curve was linear over the range from 0.025-50 $\mu\text{g/mL}$ with a correlation coefficient of 0.999 3. The mean recovery were between 90% and 110%, respectively. The pharmacokinetic result revealed it was a single-department model and the kinetic parameters were as follows: t_{max} was 2.968 h and 3.125 h; C_{max} was 36.860 $\mu\text{g/mL}$ and 42.392 $\mu\text{g/mL}$; $\text{AUC}_{0-\infty}$ was 660.934 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})$ and 646.777 $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{h})$. **CONCLUSION** As compared with usnic acid suspension, the relative bioavailability of usnic acid self-microemulsify drug delivery system and usnic acid dropping pill are improved significantly.

KEY WORDS: usnic acid; self-microemulsify drug delivery system (SMEDDS); dropping pills; HPLC; pharmacokinetics

松萝酸是目前最重要的也是分布最广的地衣酸之一,具有抗肿瘤^[1]、杀虫、抗病毒^[2]、抗炎、抗菌^[3-4]、促进皮肤创伤愈合^[5]等作用,松萝酸的药理活性较强,开发新药具有一定的价值,但松萝酸为难溶性药物,溶解度和溶出度较差,体内生物利用度不高。目前对松萝酸的新剂型及药动学方面的研究较少,本实验制备了松萝酸自微乳(Usnic Acid Self-microemulsify Drug Delivery System, UASMEDDS)和滴丸剂(Usnic acid Dropping pills),以两种制剂为研究对象,建立大鼠血浆中松萝酸的HPLC测定方法,以松萝酸混悬液为参比制剂,考察了松萝酸两种制剂口服给药后大鼠体内药动学过程。

1 材料

1.1 药品和试剂 松萝酸(usnic acid)对照品(由重庆市中药研究院药化室宋丹副研究员提供,经HPLC定量测定纯度 $\geq 99\%$);松萝酸原料药(从地茶科地茶属植物雪地茶 *Thamnia subuliformis* (Ehrh.) W. Culb. 中分离制备,批号20080325,含量 $\geq 98\%$);松萝酸自微乳(自制,批号20081225);松萝酸滴丸(自制,批号20081211);松萝酸混悬液(自制,以1% CMC-Na为溶剂)。甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,蒸馏水为重蒸水。

1.2 动物 SPF级SD大鼠,体质量220~240 g,由重庆市中药研究院动物室提供,合格证号:SCXK(渝)20020004号。

1.3 仪器 岛津LC-20A高效液相色谱仪;紫外检测器;SB2200超声清洗机(SHANGHAI BRANSON);AUW-220D电子天平(日本岛津);XW-80A型漩涡混合器(上海医科大学仪器厂);TGL-46C离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 松萝酸自微乳和滴丸的制备

2.1 松萝酸自微乳的制备 用 Maisine35-L、La-

brafac Lipophile WL 1349作为混合油相,Cremophor RH40作为表面活性剂,Transcutol P作为助表面活性剂制备自微乳。精密称取处方量的混合油相、表面活性剂和助表面活性剂置于具塞三角锥形瓶中,50 $^\circ\text{C}$ 水浴中混匀后,称取松萝酸原料药加入到三角锥形瓶中,置于37 $^\circ\text{C}$ 水浴中缓慢震荡,直至药物溶解形成透明、均一溶液,得松萝酸自微乳。

2.2 松萝酸滴丸的制备 将基质PEG 4000置水浴上加热熔化,熔化后将药物按规定的比例加入基质中,不断搅拌加热,控制温度,混合均匀,保持一定温度,置滴丸机贮液罐中。调节滴速30滴/min滴入冷凝液中,冷凝成丸。收集滴丸,吸除附于滴丸的冷凝剂,干燥即得。

3 方法

3.1 色谱条件^[6] Sepax Sapphire C₁₈色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇:(50 mmol KH_2PO_4 :三乙胺500:1)(70:30);柱温:40 $^\circ\text{C}$;体积流量:0.8 mL/min;检测波长:285 nm。

3.2 标准溶液的配制 精密称取松萝酸对照品适量,加少量三氯甲烷溶解后用甲醇稀释制成200.00 $\mu\text{g/mL}$ 的贮备溶液,备用。

3.3 血浆样品处理 取血浆样品200 μL ,加入200 μL 磷酸盐缓冲液涡旋混匀振荡提取30 s,加入600 μL 甲醇旋涡混匀1 min,静置5 min,10 000 r/min离心15 min,转移上层清液于离心管中,过0.45 μm 微孔滤膜,取滤过上清液20 μL 进样分析。

3.4 给药方案与样品采集 取SD大鼠,随机分组,每组6只。给药前禁食12 h,自由饮水。以24 mg/kg的剂量分别灌胃给予松萝酸各种制剂。松萝酸混悬液组分别于给药前及给药后1、2、4、8、12、24、36、48 h尾静脉取血0.5 mL;松萝酸滴丸组分别于给药前及给药后0.5、1、2、4、8、12、24、48 h尾静

脉取血 0.5 mL;松萝酸自微乳组分别于给药前及给药后 20、40 min、1、2、4、8、12、24 h 尾静脉取血 0.5 mL,全血置于涂有 EDTA 的抗凝管中,3 000 r/min 离心 10 min 分离血浆,−20 ℃ 保存至分析测定。测定前按 3.3 项血浆样品处理方法处理,HPLC 测定松萝酸。

3.5 数据处理 血药浓度数据由中国药学会药理

学委员会编制的 3P97 药动学程序进行处理。

4 结果

4.1 方法专属性 在本实验所采用的色谱条件下,测得松萝酸标准品溶液、大鼠空白血浆、空白血浆加一定浓度松萝酸溶液及给药后血浆样品的 HPLC 色谱图见图 1。结果表明,在上述色谱条件下,松萝酸与血浆内源性物质分离情况良好,无杂质峰干扰。

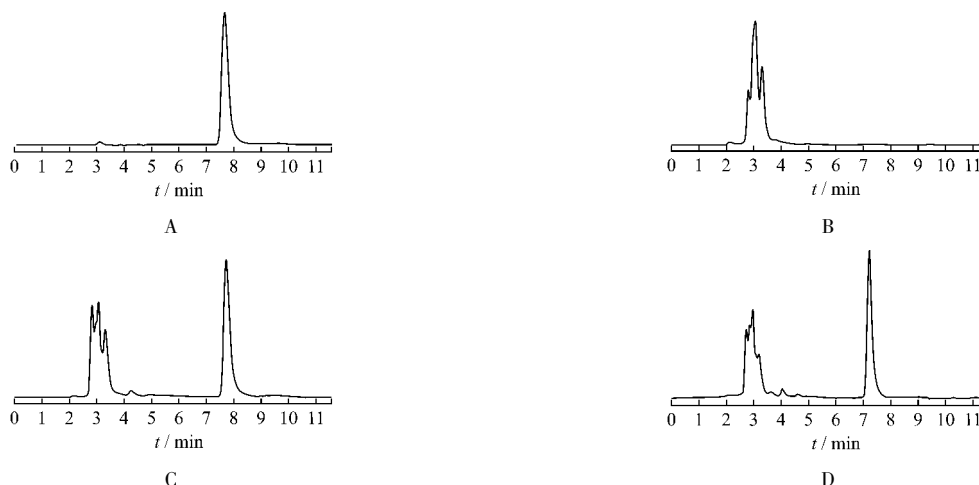


图 1 血浆中松萝酸 HPLC 色谱图

A. 松萝酸标准品 B. 空白血浆 C. 空白血浆 + 松萝酸 D. 样品

Fig. 1 Chromatograms of usnic acid in rat plasma

A. usnic acid B. blank plasma sample C. blank plasma and usnic acid D. sample

4.2 标准曲线及线性关系 取大鼠空白血浆 7 份,每份 150 μ L,精密加入稀释成不同倍数的松萝酸贮备溶液 50 μ L,配制成最终质量浓度分别为 0.025、0.25、2.5、6.25、12.5、25、50 μ g/mL 的标准含药血浆,按 3.3 项血浆样品处理方法处理,计算松萝酸的峰面积,用药物质量浓度 C 与峰面积比作线性回归,得血浆中松萝酸含量标准曲线。回归方程为 $Y = 55\,473X + 4\,878.2$, $r = 0.999\,3$,血浆中松萝酸在 0.025 ~ 50 μ g/mL 范围内呈良好的线性关系。按色谱条件测得松萝酸在大鼠血浆中的最低检测限为 0.005 μ g/mL。

4.3 方法精密性试验 取大鼠空白血浆和松萝酸标准贮备溶液,配制成最终质量浓度分别为 0.025、6.25、25 μ g/mL,各 5 份。按 3.3 项血浆样品处理方法操作,于一日内连续进行 HPLC 测定,并计算得日内差;连续测定 5 d,计算得日间差。低、中、高浓度的日内精密性 RSD 分别为 5.05%、2.23%、4.12%;5 d 的日间精密性 RSD 分别为 6.25%、3.05%、5.27%。表明该方法重现性、重复性良好,符合生物样品定量测定要求。

4.4 方法回收率 大鼠尾静脉取血 0.4 mL,全血

置于涂有 EDTA 的抗凝管中,精密加入稀释成不同倍数的松萝酸贮备溶液 100 μ L,配制成最终质量浓度为 0.025、6.25、25 μ g/mL 含松萝酸血液样品,3 000 r/min 离心 10 min 分离血浆,取含药大鼠血浆 200 μ L,按 3.3 项血浆样品处理方法处理,在上述色谱条件下,每一浓度平行操作 5 次,求得实测浓度,计算方法回收率。结果表明,低、中、高各浓度的平均回收率分别为 98.57%、98.38%、93.46%,RSD 分别为 10.10%、7.31%、6.61%。

4.5 松萝酸制剂口服给药后大鼠体内药动学研究

按 3.4 项下操作,大鼠灌胃给予松萝酸混悬液、松萝酸滴丸和松萝酸自微乳后,测定松萝酸各制剂对应时间点血浆中松萝酸峰面积,并根据回归方程计算血药浓度。松萝酸在大鼠体内的平均血药浓度-时间曲线见图 2。

结果表明,各制剂组的达峰浓度均显著高于参比制剂松萝酸混悬液,松萝酸滴丸的达峰浓度最大,松萝酸自微乳和滴丸的药-时曲线下面积明显大于混悬液。

4.6 松萝酸各制剂组药动学参数的比较 采用 3P97 药动学程序处理松萝酸混悬液和各制剂组平

均血药浓度数据,根据AIC值最小法和WSS综合判断各组隔室模型。结果表明,松萝酸混悬液和各制剂组在大鼠体内给药后均符合单室一级吸收模型,权重系数为 $1/C^2$ 。各制剂组主要药动学参数见表1。

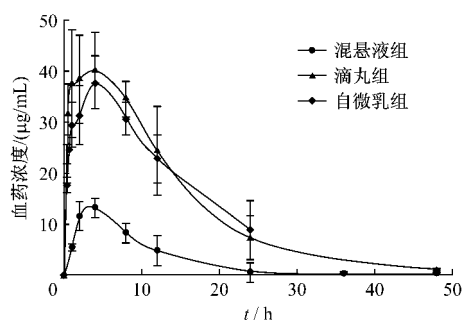


图2 松萝酸各组制剂的平均血药浓度-时间曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of usnic acid in rats after oral administration of different formulations of usnic acid ($n=6$)

表1 松萝酸各种制剂主要药动学参数

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters for usnic acid in rats after oral administration of different formulations of usnic acid

药动学参数	单位	混悬液组	滴丸组	自微乳组
A	μg/mL	19.405	63.248	48.607
k_e	1/h	0.130	0.087	0.068
k_a	1/h	0.997	0.795	0.958
lag time	h	0.643	0.033	0.022
$t_{1/2}(k_a)$	h	0.696	0.872	0.723
$t_{1/2}(k_e)$	h	5.331	7.960	10.148
T_{max}	h	2.350	3.125	2.968
C_{max}	μg/mL	12.431	42.392	36.860
AUC	μg/(mL·h)	129.783	646.777	660.934
CL/F(s)	(mg/h)/(μg/mL)	0.046	0.009	0.009
V/F(c)	mg/(μg/mL)	0.356	0.107	0.133
Fr	%	100.0	498.4	509.3

5 讨论

5.1 由全血制备血浆时,离心速度过高,血细胞易破裂而使血浆带红色,因此离心速度一般控制在3 000 r/min为宜。血浆样品处理方法和已有文献报道方法相比^[7]操作简单,药物提取率高,方法回收率好。

5.2 在测定生物样本时,需要建立适合的体内定量测定方法,并要求方法具有专属性、准确度、灵敏度。本实验建立了松萝酸动物体内血浆样品的高效液相色谱分析方法,进行方法学验证,主要考察了方法的专属性、标准曲线的制备与线性范围、精密度和方法回收率,均达到生物样品分析的要求,制定的分析方法专属性、准确度和灵敏度均较好。在此色谱条件下,松萝酸分离度良好,无干扰。

5.3 大鼠分别以24 mg/kg的剂量灌胃给予松萝酸混悬液、松萝酸自微乳和松萝酸滴丸后, T_{max} 分别为2.350 h、2.968 h和3.125 h; C_{max} 分别为12.431 μg/mL、36.860 μg/mL和42.392 μg/mL; $AUC_{0-\infty}$ 分别为129.783 μg/(mL·h)、660.934 μg/(mL·h)和646.777 μg/(mL·h)。比较松萝酸各制剂的药动学参数可以看出,各组吸收速度常数差异不大;消除速度常数混悬液组>滴丸组>自微乳组($P<0.05$);松萝酸滴丸和松萝酸自微乳的达峰时间(T_{max})和混悬液剂差异不大,峰浓度(C_{max})均显著高于混悬液剂($P<0.05$),两种制剂的药-时曲线下面积(AUC)明显大于混悬液剂($P<0.05$),松萝酸自微乳和松萝酸滴丸的消除半衰期 $t_{1/2}(k_e)$ 明显延长。和参比制剂松萝酸混悬液比较,松萝酸自微乳与松萝酸滴丸的相对生物利用度分别为509.3%、498.4%,两种制剂的相对生物利用度均显著提高。

建立了松萝酸血浆样品高效液相色谱分析方法,血浆样品稳定性、方法精密性、方法回收率符合要求。药动学数据结果表明,对照组和各制剂组在大鼠体内给药后均符合单室一级吸收模型。和参比制剂松萝酸混悬液比较,松萝酸自微乳与滴丸两种制剂的相对生物利用度均显著提高。将难溶性药物松萝酸通过制剂增溶技术制备成松萝酸自微乳和滴丸两种药物新型给药系统后,其体内生物利用度得到显著提高,剂型设计达到了预期目的。本实验可为开发松萝酸两种制剂提供体内药物动力学参考。

参考文献:

- [1] Mayer M A C, Oneil M A E, Murray K E E, et al. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties [J]. *Anti Cancer Drug*, 2005, 16(8): 805-809.
- [2] Campanella L, Delfini M, Ercole P, et al. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription [J]. *Biochimie*, 2004, 84(4): 329-334.
- [3] Lauterwein M, Oethinger M, Belsner K, et al. *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(11): 2541-2543.
- [4] Vijayakumar C S, Viswanathan. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid [J]. *Fitoterapia*, 2000, 71(5): 564-566.
- [5] 靳菊情,董亚琳,贺浪冲. 松萝酸钠促皮肤创伤愈合的实验研究[J]. *中药材*, 2005, 28(2): 109-111.
- [6] 赵颖,宋丹,钟国跃,等. HPLC法测定雪地茶中松萝酸[J]. *中草药*, 2009, 40(增刊): 281-282.
- [7] 贺浪冲,焦欣庆,白硕可,等. 反相高效液相色谱法测定血清中松萝酸浓度[J]. *分析化学*, 1996, 24(7): 858.