

文章编号: (2008)06-0392-08

复方软胶囊中齐墩果酸在大鼠体内的药动学及相对生物利用度

徐晓娣, 孙辉辉, 荣 蓉, 温 冰, 张向荣, 何仲贵

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 研究复方软胶囊中齐墩果酸在大鼠体内的药物动力学以及它与市售齐墩果酸片剂相比的相对生物利用度。**方法** 应用 HPLC-MS 法, 以市售齐墩果酸片剂为参比, 测定两种制剂灌胃给药后大鼠血浆中的药物浓度, 采用非隔室动力学理论对大鼠血药浓度-时间数据进行处理得出相应的药动学参数, 并计算相对生物利用度。**结果** 测得复方软胶囊、齐墩果酸片剂大鼠灌胃给药后齐墩果酸的 T_{max1} 分别为 (0.54 ± 0.25) h 和 (0.50 ± 0.00) h, C_{max1} 分别为 (897.28 ± 120.71) ng·mL⁻¹ 和 (521.92 ± 35.99) ng·mL⁻¹; T_{max2} 分别为 (3.92 ± 0.20) h 和 (4.33 ± 0.26) h, C_{max2} 分别为 (1259.68 ± 77.33) ng·mL⁻¹ 和 (340.52 ± 31.42) ng·mL⁻¹; 复方软胶囊和市售齐墩果酸片剂的 AUC_{0-36} 分别为 (8106.64 ± 666.55) ng·mL⁻¹·h 和 (4164.60 ± 559.32) ng·mL⁻¹·h, 相对生物利用度为 194.66%。**结论** 自制复方齐墩果酸软胶囊与市售片剂在大鼠体内的药物动力学行为存在显著性差异, 自制复方齐墩果酸软胶囊能明显提高齐墩果酸的生物利用度。

关键词: 药剂学; 软胶囊; 齐墩果酸; HPLC-MS; 药动学; 生物利用度

中图分类号: R944.9 **文献标志码:** A

齐墩果酸(oleanolic acid, OA)是五环三萜类化合物, 具有消炎、增强免疫、抑制血小板凝集、降糖等多方面的药理作用, 是治疗急性黄疸型肝炎和慢性病毒性肝炎比较理想的药物, 其毒性低, 不良反应少^[1], 但是齐墩果酸不溶于水, 吸收不好, 其片剂的生物利用度比较低^[2], 为此, 本文作者在参考相关文献的基础上, 先将齐墩果酸制成钠盐^[3-5], 再将其与水飞蓟素制成复方软胶囊, 对复方齐墩果酸软胶囊的生物利用度进行研究, 并建立了大鼠血浆中齐墩果酸的 HPLC-MS 测定方法^[6-8]。

1 仪器与材料

液质联用系统(1525 Binary HPLC PUMP, Micromass ZQ 质谱仪, MassLynx V4.0 工作站, Waters 公司); LDZ5-2 型低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂); CAY-1 型液体快速混合器(北京长安仪器厂); TGL-16 C 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂); HH-2 型数字显示恒温水浴锅(国华电器有限公司)。

齐墩果酸片(深圳海王药业有限公司, 含量 20 mg/片, 批号 20061201); 水飞蓟素原料药(江苏健佳药业有限公司, 批号 20040109); 复方齐墩果酸软胶囊(自制, 含量 20 mg/粒, 内容物每粒的质量 0.45 g); 内标甘草次酸(沈阳药科大学药物分析实验室赠送); 乙酸乙酯、甲酸(分析纯, 天津市博迪化工有限公司); 肝素钠注射液(2 mL: 1.25 万单位, 天津生物化学制药厂)。

Wistar 大鼠, 12 只, 雌性, 体质量 230~260 g, 由沈阳药科大学动物中心提供。

收稿日期: 2008-04-28

作者简介: 徐晓娣(1982-), 女(汉族), 河北衡水人, 硕士研究生, E-mail xuxiaodi_024@163.com, Tel.13514269586; 何仲贵(1965-), 男(汉族), 宁夏盐池人, 教授, 博士, 主要从事药物新剂型与制剂新技术研究, E-mail lcnhgzg@tom.com。

2 方法

2.1 灌胃用药液的配制

取适量齐墩果酸片研碎，称取相当于20片的量，加入相当于自制复方软胶囊20粒量的水飞蓟素原料药，用质量浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CMC-Na溶液超声分散即得参比制剂的药液；自制软胶囊直接用内容物给药。大鼠称量后，分别以 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃给予上述两种制剂。

2.2 实验方案

Wistar大鼠12只，随机分成两组，每组6只，分别为参比组和受试组。实验前禁食12h，实验期间自由饮水。分别按 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃给药，参比制剂灌胃体积为每只约3mL、受试制剂为每只约1.2mL，根据大鼠体质量调整。于给药后2、5、15、30min及1、1.5、3、3.5、4、4.5、5、8、12、24、36h由眼眶后静脉丛取血400 μL ，置于事先已涂过肝素的离心试管中，以转速 $5000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min，分离血浆，置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中冷冻保存，备用。

齐墩果酸的生物利用度较低，普通紫外检测器的灵敏度不能满足检测要求，故本试验选择液-质联用法测定其血药浓度。

2.3 齐墩果酸体内测定方法的建立

2.3.1 液-质法测定条件的选择

色谱条件：色谱柱为Diamonsil C_{18} 色谱柱(4.6mm \times 150mm，ID=5 μm)；流动相为甲醇-水(体积比95:5)；流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；分流比为1:3；柱温为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件：ESI离子源；负离子检测方式；选择离子监测(SIR)扫描方式。定量分析时选择离子峰分别为 m/z 455.7(齐墩果酸)和 m/z 469.7(甘草次酸)；扫描时间为0.2s；电离电压为3.0kV；锥孔电压为30V；离子源温度为 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；去溶剂气(N_2)温度为 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，其流量为 $350\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ；锥孔气流量为 $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ 。图1、图2分别给出了主药齐墩果酸、内标甘草次酸的全扫描质谱图。

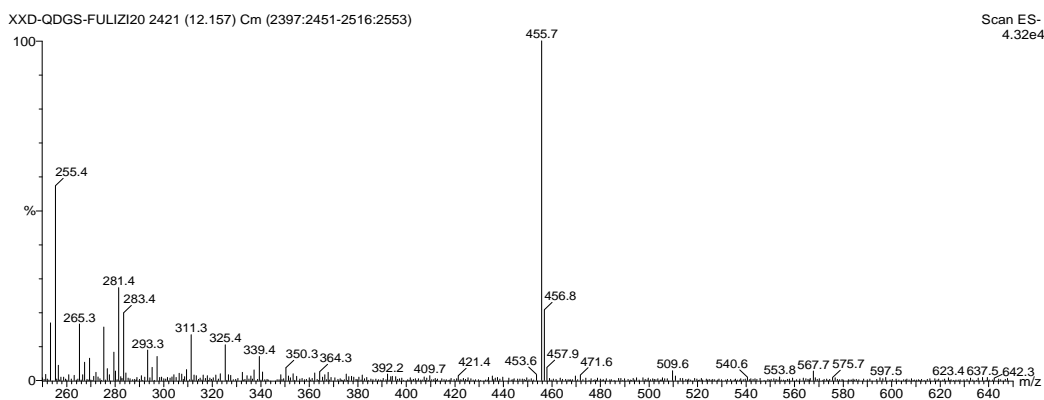


Fig. 1 Full scan MS spectrum of oleanolic acid

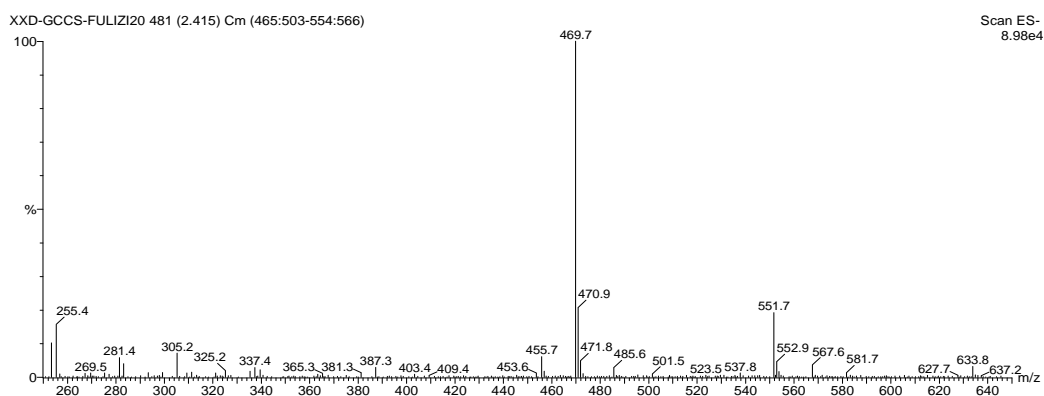


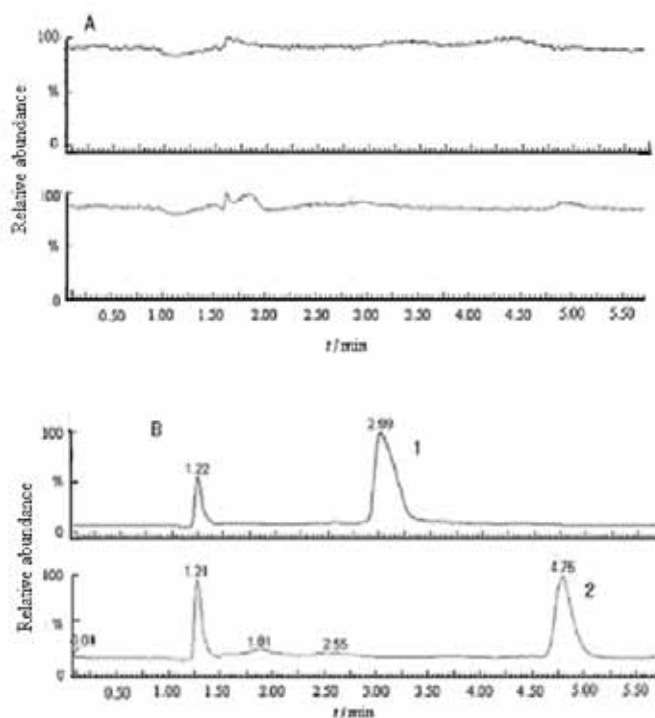
Fig. 2 Full scan MS spectrum of glycyrrhetic acid

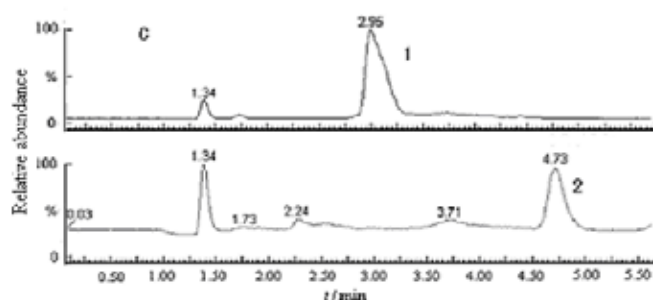
2.3.2 血浆样品的处理

取血浆 100 μL , 加入内标 100 μL (800.8 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甘草次酸的甲醇溶液) 及 100 μL 甲醇以及体积分数为 0.5% 的甲酸水溶液 400 μL , 涡旋 1 min, 加提取溶剂乙酸乙酯 3 mL, 涡旋 3 min, 以转速 3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上层有机相, 于 50 $^\circ\text{C}$ 氮气流下吹干, 残余物用 100 μL 流动相溶解, 取 10 μL 进样分析。

2.3.3 专属性考察

分别取 6 只大鼠的空白血浆 100 μL , 按“2.3.2”条的操作(不加内标)进样 10 μL , 色谱图见图 3-A; 将一定质量浓度的齐墩果酸标准品溶液(305 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)和内标溶液(800.8 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)加入空白血浆中, 依“2.3.2”条操作进行色谱分析, 色谱图见图 3-B, 测得齐墩果酸的保留时间为 4.75 min, 内标物的保留时间为 2.99 min; 取按 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量灌胃给药后 24 h 收集的大鼠血浆样品, 依“2.3.2”条操作进行色谱分析, 色谱图见图 3-C。结果表明, 空白血浆中内源性物质以及复方制剂中的水飞蓟素不干扰齐墩果酸及内标甘草次酸的测定。





peaks 1 : oleanolic acid ; peaks 2: glycyrrhetic acid

Fig. 3 Typical chromatograms of oleanolic acid and internal standard in rat plasma by SIR mode

2.3.4 标准曲线的制备

取大鼠空白血浆 100 μL ，分别加入齐墩果酸系列标准溶液 100 μL ，使相应血浆药物的质量浓度分别为 38.1、76.3、152.5、305.0、610.0、1220.0、1830.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，按“2.3.2”条操作进行测定；以待测物的质量浓度为横坐标、待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标，用加权最小二乘法进行回归运算，求得的直线回归方程即为标准曲线。线性回归方程为： $Y = 0.641 C + 57.617$ ， $r = 0.996$ ，权重系数为 $1/C^2$ 。结果表明，本方法在 38.1~1830.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好，最低定量限为 38.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.5 方法精密度、准确度考察

取空白血浆 100 μL ，按照“2.3.4”条操作分别制备齐墩果酸低、中、高 3 个质量浓度(分别为 76.3、305.0、1220.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的样品，进行 6 样本分析，重复 3 个分析批次，并与标准曲线同批测定，以当日的标准曲线计算样品的测得浓度，并与配制的浓度对照，求得本法的准确度与精密度。结果显示，3 个质量浓度的样品的日内相对标准偏差分别为 12.7%、6.8%、4.8%；日间相对标准偏差分别为 14.4%、9.6%、7.2%。由以上结果可见，3 个质量浓度的 RSD 值均 $< 15\%$ ，说明该分析方法在高、中、低 3 个浓度的精密度良好。

2.3.6 回收率实验

取空白血浆 100 μL ，按“2.3.4”条操作制备低、中、高 3 个质量浓度(相当于血药质量浓度分别为 76.3、305.0、1220.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的样品，每个质量浓度测定 6 个样品；同时另取空白血浆 100 μL ，按“2.3.2”条的方法提取，残留物用相应质量浓度的标准溶液溶解，进样分析，得到相应峰面积值。以每一质量浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率。结果表明，齐墩果酸血浆药物的质量浓度在 76.3、305.0 和 1220.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时的提取回收率分别为 79.3%、75.3% 和 86.2%。内标溶液经同法提取处理，其回收率为 88.3%。

2.3.7 稳定性实验

预处理稳定性试验：按“2.3.4”条操作，制备齐墩果酸低、中、高 3 个质量浓度(76.3、305.0、1220.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的样品，每个质量浓度 3 个样本，于 0、6、12 h 进样，测定 3 个时间点的药物浓度，与 0 时测得的结果进行比较，求得 3 个质量浓度的 RSD 值分别为 3.49%、2.12%、1.82%。

室温稳定性试验：按“2.3.4”条操作，制备齐墩果酸低、中、高 3 个质量浓度(76.3、305.0 和 1220.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的血浆样品，每个质量浓度 3 个样本，于室温放置 0、6、12 h 后按照“2.3.2”条的

操作制备待测样品, 进样, 根据标准曲线方程计算样品的质量浓度, 与 0 h 测得的结果进行比较计算标准偏差, 求得 3 个质量浓度的 RSD 值分别为 5.88%、5.62%、3.47%。

结果表明, 血浆中的齐墩果酸的测定分析方法符合有关规定要求, 可用于药物动力学试验。

3 结果

3.1 血药浓度测定结果

取血浆样品, 依法进行样品制备和 HPLC-MS 分析, 记录色谱图, 计算不同时间的血药浓度, 参比组和对照组分别取平均值, 并计算标准偏差(SD), 所得药-时曲线见图 4。

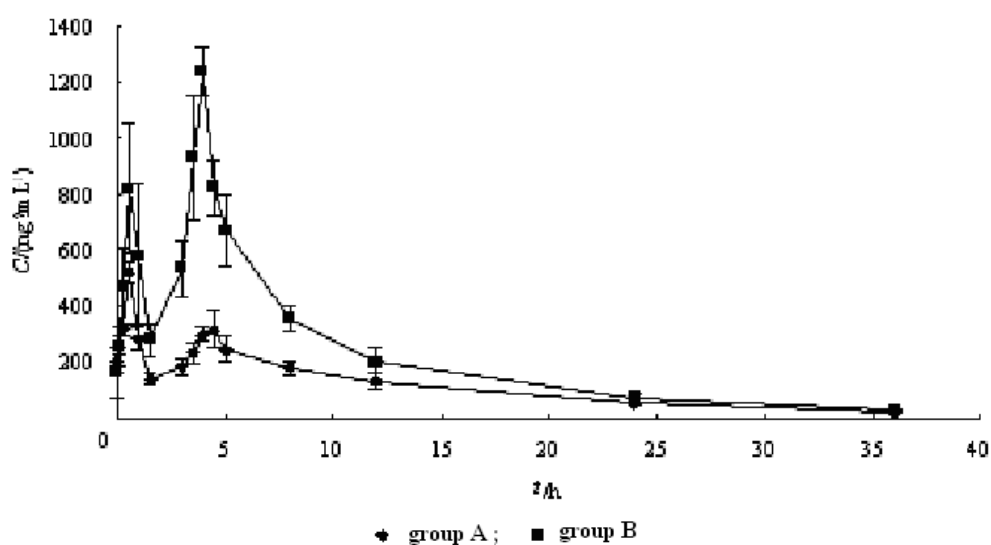


Fig. 4 Mean plasma concentration-time profiles of oleanolic acid for group A and group B following intragastric administration of 300 mg·kg⁻¹ oleanolic acid to rats (*n* = 6)

3.2 非隔室模型拟合统计结果

采用统计矩的非隔室动力学理论对 12 只大鼠血药浓度数据进行处理, 峰浓度 C_{\max} 和达峰时间 T_{\max} 为实测数据, 从药-时曲线上直接得出; 表观消除速度常数 k_e 由药-时曲线消除相末端部分的 4 个实验点的血药浓度数据的对数对时间 t 进行线性回归, 由直线斜率求得, 并求出表观消除半衰期 $t_{1/2}$; 采用梯形法计算药-时曲线下面积 AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ 的计算公式如下:

$$AUC_{0-t} = \int_0^t c dt; AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/k_e。$$

其中, C_t 为最后一个不为零的血药浓度, k_e 是表观消除速率常数。应用统计矩原理, 计算出一阶矩曲线下面积 AUMC 和平均滞留时间 MRT, 两者的计算公式如下:

$$AUMC = \int_0^{\infty} t c dt = \int_0^t t c dt + \int_t^{\infty} t c dt; MRT = AUMC/AUC。$$

计算结果分别见表 1、表 2。

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of oleanolic acid in group A after intragastric administration of 300 mg·kg⁻¹ to 6 rats

Parameter	Rat No.						Mean	SD
	1	2	3	4	5	6		
$t_{1/2}$ /h	8.88	9.37	10.13	9.90	9.55	9.29	9.52	0.45
k_e /(h ⁻¹)	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.00
T_{max1} /h	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.50	0.00
C_{max1} /(ng·mL ⁻¹)	524.39	474.80	556.21	509.54	569.79	496.80	521.92	35.99
T_{max2} /h	4	4.5	4	4.5	4.5	4.5	4.33	0.26
C_{max2} /(ng·mL ⁻¹)	295.80	359.31	325.21	362.83	321.07	378.90	340.52	31.42
AUC_{0-36} /(ng·mL ⁻¹ ·h)	3610.69	4844.69	3633.24	4758.56	3803.85	4336.55	4164.60	559.32
$AUC_{0-\infty}$ /(ng·mL ⁻¹ ·h)	3820.76	5220.47	3933.54	5179.20	4112.63	4663.69	4488.38	622.68
$AUMC_{0-\infty}$ /(ng·h ² ·mL ⁻¹)	47043.21	72364.13	53420.12	74573.52	55679.71	61100.97	60696.94	10893.99
MRT/h	12.30	13.86	13.58	14.40	13.54	13.10	13.47	0.71

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of oleanolic acid in group B after intragastric administration of 300 mg·kg⁻¹ to 6 rats

Parameter	Rat No.						Mean	SD
	1	2	3	4	5	6		
$t_{1/2}$ /h	6.89	7.25	7.76	7.56	7.96	8.27	7.61	0.50
k_e /(h ⁻¹)	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09	0.01
T_{max1} /h	0.25	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.54	0.25
C_{max1} /(ng·mL ⁻¹)	701.50	974.64	892.53	1059.30	905.39	850.32	897.28	120.71
T_{max2} /h	4	4	3.5	4	4	4	3.92	0.20
C_{max2} /(ng·mL ⁻¹)	1275.95	1313.32	1293.81	1275.94	1294.63	1104.42	1259.68	77.33
AUC_{0-36} /(ng·mL ⁻¹ ·h)	7095.84	7905.29	8460.68	8220.01	9088.80	7869.21	8106.64	666.55
$AUC_{0-\infty}$ /(ng·mL ⁻¹ ·h)	7275.51	8096.77	8782.76	8510.44	9501.19	8225.89	8398.76	742.70
$AUMC_{0-\infty}$ /(ng·h ² ·mL ⁻¹)	64012.11	69357.26	89726.87	86892.93	106581.6	88246.18	84136.16	15381.41
MRT/h	8.80	8.57	10.22	10.21	11.22	10.73	9.96	1.06

3.3 相对生物利用度

根据非隔室模型统计结果中的血药浓度-时间曲线下面积 AUC_{0-t} 数据, 求算与参比制剂同剂量的自制软胶囊的相对生物利用度 $F_r=194.66\%$ 。计算公式如下:

$$F_r = (AUC_{0-t})_T / (AUC_{0-t})_R \times 100\%$$

3.4 药动学参数 t -检验

采用 Student's test 方法, 对给药组 A 和 B 的主要药动学参数进行单尾成对 t -检验, 结果见表 3。结果显示, 两组间只有 T_{max1} 在统计学意义上没有显著性差别, T_{max2} 和 $AUMC_{0-\infty}$ 存在显著差别, 而 $t_{1/2}$ 、 k_e 、 C_{max1} 、 C_{max2} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、MRT 均存在非常显著的统计学差别。

Table 3 Main pharmacokinetic parameters of oleanolic acid and Student's test results in two groups after intragastric administration of 300 mg·kg⁻¹ to 6 rats

Parameter	Mean±SD (n=6)		Result of <i>t</i> -test
	group A	group B	<i>P</i>
<i>t</i> _{1/2} /h	9.52±0.45	7.61±0.50	3.81E-05
<i>k</i> _e /(h ⁻¹)	0.07±0.00	0.09±0.01	6.97E-05
<i>T</i> _{max1} /h	0.50±0.00	0.54±0.25	0.69
<i>C</i> _{max1} /(ng·mL ⁻¹)	521.92±35.99	897.28±120.71	2.60E-05
<i>T</i> _{max2} /h	4.33±0.26	3.92±0.20	0.011
<i>C</i> _{max2} /(ng·mL ⁻¹)	340.52±31.42	1 259.68±77.33	1.13E-10
AUC ₀₋₃₆ /(ng·mL ⁻¹ ·h)	4 164.60±559.32	8 106.64±666.55	6.07E-07
AUC _{0-∞} /(ng·mL ⁻¹ ·h)	4 488.38±622.68	8 398.76±742.70	1.77E-06
AUMC _{0-∞} /(ng·h ² ·mL ⁻¹)	60 696.94±10 893.99	84 136.16±15 381.41	0.012
MRT/h	13.47±0.71	9.96±1.06	4.61E-05

4 结论

本实验在参考文献[6-8]的基础上,建立了精密度和准确度高,重现性好的 HPLC-MS 分析方法,实现了对齐墩果酸大鼠血浆样品的快速准确分析。

两种制剂的药-时曲线均呈现双峰现象,文献[7]中的达峰时间为 30 min,与本实验测得的 *T*_{max1} 接近,但现有文献中未见有关齐墩果酸体内血药浓度曲线呈现双峰的报道。推测本研究的双峰现象可能是因为肝肠循环或胃肠蠕动导致的胃二次排空,具体原因有待进一步实验确证。通过将齐墩果酸成钠盐后,再制成软胶囊制剂,与市售片剂相比,齐墩果酸在大鼠体内的生物利用度显著提高。

参考文献:

- [1] 王立新, 韩广轩, 刘文庸, 等. 齐墩果酸的化学及药理研究[J]. 药学实践杂志, 2001, 19(2): 104-107.
- [2] 王德仁. 齐墩果酸研究新进展[J]. 天津药学, 2003, 15(3): 56-58.
- [3] 孙志勇, 张珍强, 聂永胜, 等. 齐墩果酸钠盐合成工艺及初步鉴定[J]. 遵义医学院学报, 1998, 21(4): 18-19.
- [4] 李志梅, 孙志勇, 刘华庆. 齐墩果酸钠盐对大鼠化学性肝损伤的保护作用[J]. 贵州医药, 2004, 28(7): 582-583.
- [5] 孙志勇, 邓世星, 周卿, 等. 齐墩果酸钠盐的毒理学实验[J]. 遵义医学院学报, 2001, 24(3): 222-223.
- [6] 唐芳, 郭歆, 李焕德. Beagle 犬血浆中齐墩果酸浓度的测定[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(12): 926-928.
- [7] 郭歆, 程泽能, 梁海霞, 等. 高效液相色谱-质谱联用测定大鼠血浆中齐墩果酸质量浓度[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(16): 1265-1267.
- [8] SONG Min, HANG Tai-jun, WANG Ying, et al. Determination of oleanolic acid in human plasma and study of its pharmacokinetics in Chinese healthy male volunteers by HPLC tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal,

2006, 40(1) : 190-196.

Pharmacokinetics and relative bioavailability of compound oleanolic acid soft capsules in rats

XU Xiao-di , SUN Hui-hui , RONG Rong , WEN Bing , ZHANG Xiang-rong , HE Zhong-gui
(School of Pharmacy , Shenyang Pharmaceutical University , Shenyang 110016 , China)

Abstract : Objective To determine the pharmacokinetic parameters of oleanolic acid in compound oleanolic acid soft capsules after intragastric administration in rats, and calculate the relative bioavailability compared to commercial oleanolic acid tablets. **Methods** The concentration of oleanolic acid in plasma was determined by HPLC-MS method after intragastric administration of oleanolic acid tablets and compound oleanolic acid soft capsules. The relative bioavailability and pharmacokinetic parameters of oleanolic acid were obtained by using the un-compartment dynamics theory. **Results** The pharmacokinetic parameters of the test and reference preparations after intragastric administration in rats were $T_{\max 1}$ (0.54±0.25) h and (0.50±0.00) h , $C_{\max 1}$ (897.28±120.71) ng·mL⁻¹ and (521.92±35.99) ng·mL⁻¹ , $T_{\max 2}$ (3.92±0.20) h and (4.33±0.26) h , $C_{\max 2}$ (1259.68±77.33) ng·mL⁻¹ and (340.52±31.42) ng·mL⁻¹ , AUC_{0-36} (8106.64±666.55) ng·mL⁻¹·h and (4164.60±559.32) ng·mL⁻¹·h , respectively. The relative bioavailability of the test preparation was 194.66%. **Conclusions** The pharmacokinetic parameters of the test and reference preparations differed significantly, and the test preparation improved the relative bioavailability of oleanolic acid remarkably.

Key words: pharmaceutics; soft capsule; oleanolic acid; HPLC-MS; pharmacokinetics; bioavailability

(责任编辑 秦 昕)