

688-694.

[9] weilianba Treatment of complications due to peritoneal dialysis for chronic renal failure with traditional Chinese Medicine [J]. *J Traditional Chinese Med*, 1999, 19(1): 3-9

[10] 大浦彦吉. 大黄的药理药效 [J]. 国外医学·中医中药分册, 1992, 14(3): 17

[11] 王海燕, 李惊子, 潘缙圣, 等. 中药黄芪当归合剂对肾病综合征肾损伤的保护作用及对代谢紊乱的影响 [J]. 北京大学学报 (医学版), 2002, 35(5): 542-552

[12] 黄琳, 魏连波, 耿穗娜, 等. 肾衰养真胶囊对慢性肾衰竭大鼠蛋白质营养不良及 ALB、IGF-1 基因表达的影响 [J]. 四川中医, 2004, 22(8): 13-15

水飞蓟素亚微粒胶囊体内药代动力学研究

张自然¹, 陈满仓², 何军², 陶建生^{1*}, 奉建芳²

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 上海医药工业研究院, 上海 200437)

关键词: 水飞蓟素; 亚微粒胶囊; 生物利用度; 犬

摘要: 目的: 进行了水飞蓟素亚微粒胶囊动物体内的生物利用度研究。方法: 采用液质联用法测定 Beagle 犬血浆中水飞蓟宾浓度, 在 Ultimate™ AQ-C₁₈ 柱、洗脱剂甲醇-水 (50: 50)、流速 0.8 mL/min 梯度洗脱, 通过 ESI 离子源、负离子检测, 水飞蓟素中 3 个组分的分离良好。结果: 受试制剂和益肝灵片体内药动学均符合一室模型, 以原料药为参比制剂, 水飞蓟素亚微粒胶囊的相对生物利用度均比片剂高。结论: 水飞蓟素亚微粒胶囊具有较高的生物利用度, 亚微粒是提高难溶性药物口服生物利用度的良好载体。

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-1528(2008)03-0337-03

Bioavailability of Silymarin-based Nanoparticles

ZHANG Zhi-ran¹, CHEN Man-cang², HE Jun², TAO Jian-sheng^{1*}, FENG Jian-fang²

(1. Faculty of Pharmacy, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China; 2. Pharmaceutical Division, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China)

KEY WORDS Silymarin nanoparticles bioavailability dog

ABSTRACT: **AM:** To study the oral bioavailability of Silymarin-based Nanoparticles (SM-NP). **METHODS** Beagle dogs were employed as experiment animals. Yiganling Tablet and Silymarin Extraction were used as the reference preparations. Three constituents were isolated on Ultimate™ AQ-C₁₈ column with mobile phase methanol-water (50:50) at 0.8 mL/min flow rate using gradient elution and ESI ionic source and negative ion detection. Silybin plasma concentration in rat was determined by LC-MS. **RESULTS** The pharmacokinetics of the tested preparation and Yiganling Tablet met with one-compartment model. The relative bioavailability of three components of SM-NP were higher than that of Yiganling Tablet. **CONCLUSION:** The results indicate that SM-NP has better bioavailability than the reference preparation, which confirms that nanoparticles is a good carrier for improving oral bioavailability of poorly-soluble drugs.

水飞蓟素 (silymarin, SM) 是常用的肝病治疗药物, 在体内水解成水飞蓟宾而发挥疗效。主要用于治疗慢性肝炎、各种肝损伤、肝纤维化和早期肝硬化等肝病, 国产水飞蓟素制剂为益肝灵片, 由于其难溶于水 and 一般有机溶剂, 口服吸收差, 使得益肝灵片口

服给药的生物利用度较低, 从而影响了其临床疗效。山榆酸甘油酯 (Campritol 888 ATO) 是目前研究和应用较多的脂质材料, 可用作许多口服制剂的辅料, 近年来常被用作纳米粒和亚微粒的载体材料。为提高水飞蓟素口服给药的生物利用度, 我们以山榆酸甘

收稿日期: 2007-04-04

作者简介: 张自然 (1965~), 男, 硕士生、高级工程师, 研究方向: 药物新剂型的研究; 电话: 13601860886 E-mail: ok99ok88@yahoo.com.cn

油酯为材料,制备亚微粒胶囊剂,并以原料药物和市售益肝灵片为参比制剂,对水飞蓟素亚微粒胶囊剂的药代动力学进行了研究。

1 仪器、动物与试剂

VARIAN 1200L液相色谱-质谱联用仪,包括 VARIAN ProStar 210高压泵, VARIAN ProStar 410自动进样器, VARIAN1200L Quadrupole MS/MS 仪, VARIAN MS 6 3工作站。SHIMADZU210A 高效液相色谱仪,配以 LC210ADVP泵, SIL 210AD VP自动进样器, CT0210AS VP柱温箱, SPD210A 荧光检测器, N2000色谱数据工作站, Rheodyne 7725 i六通进样阀。XW 201定时可调速旋涡混合器(上海医科大学仪器厂), 8022B台式离心机(上海安亭科学仪器厂), DHG29140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), SK7200H 超声仪(上海科导超声仪器有限公司), HA2202M 电子天平(A & D Co Ltd), H 2 tech 去离子水机(18 2M)(H 2 tech Instrument Co Ltd), 溶剂吹干装置(自制)。

水飞蓟素亚微粒胶囊(自制,批号: 060118 每粒含水飞蓟宾 38.5 mg); 益肝灵片(批号: 050611, 每片含水飞蓟宾 38.5 mg,相当于 SM101.3 mg), 水飞蓟宾(silybin)、水飞蓟宁(silydianin)对照品(Rockville MD, USA), 甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

Beagle犬,平均体重 7 kg 由上海交通大学医学院实验动物中心提供,经上海实验动物质检站检测合格。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[1] 色谱柱: Ultimate™ AQ-C₁₈ 5 μm 100 mm × 4.6 mm,柱温 30 °C;流动相: 甲醇-水(含 1% 甲酸) 50:50 采用等梯度洗脱方式,流速 0.8 mL/min,分流比 4:1;进样量 20 μL,分析时间 15 min。

2.2 质谱检测条件 采用 ESI离子源、负离子检测,选择 SM 方式进行一级质谱分析。质谱检测工作参数如下:水飞蓟素 Q1(Mass) 481; Scan time 1.0 s; SM width 0.7, Q1 peak width 1.5; Needle-4500 V, 12 uA; Shield-600 V, 55 psi; Dry Gas 380 °C, 21 psi; Capillary-40 V, Q0 0.9 V, L4 1.0 V, Q1 0.75 V; Negative Detection 1290 V。

在上述 LC/MS条件下测得空白血浆、空白血浆添加标准品、受试制剂血浆样品如图 1、图 2、图 3 所示,水飞蓟宾、异水飞蓟宾及水飞蓟宁的出峰时间分别为 7.8、9.0、11.7 min。

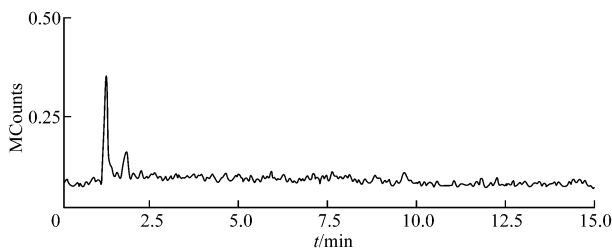


图 1 空白血浆样品色谱图

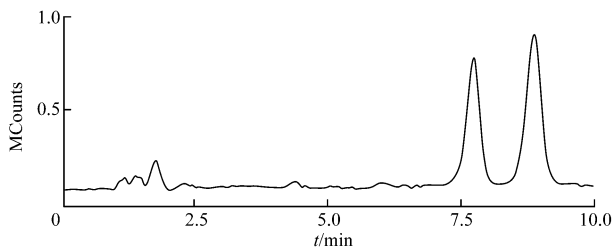


图 2 水飞蓟宾标准血浆样品色谱图

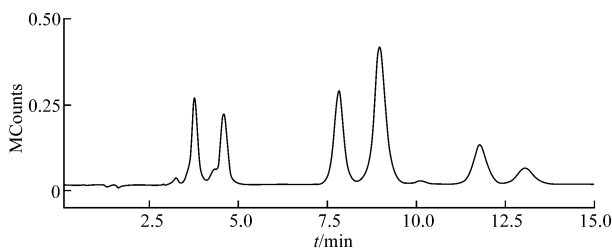


图 3 受试制剂血浆样品色谱图

2.3 实验设计 采用随机交叉试验方式,将 6 只受试 Beagle 犬,随机分为 3 组。禁食 12 h,次日按 5.5 mg/kg(以水飞蓟宾和异水飞蓟宾总量计算)给药(胶囊、片剂、原料药均以口服形式给药),于 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、9、12 h 于下肢静脉取血 5.0 mL,间隔一周后,交叉服药,同时间点采血,血样用肝素抗凝,离心分离血浆,于 -20 °C 保存样品,试验期间统一进食,同上操作,重复 3 次,即每个时间点有 6 个数据。

2.4 血浆处理 静脉血样置于 10.0 mL 玻璃离心管中(加肝素抗凝),3500 r/min 离心 5 min 分离血浆。精密量取血浆 1.0 mL 置于 10 mL 玻璃离心管中,加 0.1 mol/L 磷酸氢二钠 100 μL,涡旋 30 s 混匀,加醋酸乙酯 5.0 mL,涡旋振荡 3 min,于 3500 r/min 离心 10 min,分取有机层 4 mL,在 45 °C 水浴下通氮气挥干,加流动相 100 μL 溶解,吸取复溶液约 90 μL 置于 0.5 mL 塑料离心管中,于 12000 r/min 高速离心 5 min,吸取上清液 60 μL,自动进样 20 μL 进行 LC/MS 分析,峰面积外标法定量检测。

2.5 方法学考察

2.5.1 标准曲线

精密吸取血浆 0.9 mL, 置于 10 mL 塑料离心管中, 分别加入不同浓度对照品溶液 0.1 mL, 涡旋使成系列浓度, 照血浆样品处理方法操作, 在上述色谱条件下, 进样进行测定, 以对照品溶液浓度为纵坐标、进样量为横坐标绘制标准曲线, 得标准方程见表 1。

表 1 各对照品溶液标准曲线

| 对照品溶液 | 标准曲线方程 | 相关系数 | 线性范围 (μg/mL) |
|-------|--------------------------|---------|-----------------|
| 水飞蓟宾 | $Y = 162.468X - 93.059$ | 0.999 0 | 0.053 1 - 2.124 |
| 异水飞蓟宾 | $Y = 1.185762X + 34.678$ | 0.999 2 | 0.049 3 - 1.974 |
| 水飞蓟宁 | $Y = 775.684X + 627$ | 0.999 3 | 0.058 2 - 1.165 |

2.5.2 精密度、稳定性试验

精密吸取血浆 0.9 mL, 置于 10 mL 塑料离心管中, 分别加入不同浓度 (0.053 1、1.062、2.124 μg/mL 水飞蓟宾; 0.049 3、0.987、1.974 μg/mL 异水飞蓟宾; 0.058 2、0.582、1.165 μg/mL 水飞蓟宁) 对照品溶液 0.1 mL, 每个浓度做 5 份, 涡旋使成系列浓度, 照血浆样品处理方法操作, 测定峰面积, 计算日内标准偏差 (RSD), 结果显示水飞蓟宾、异水飞蓟宾及水飞蓟宁的 RSD 分别为 5.36%、4.52% 和 6.85%。

于 -20℃ 条件下保存的同一份血浆样品 (含药), 于不同的时间取出后解冻, 精密量取 1.0 mL 进行含量测定, 结果表明样品在第 10 天仍然是稳定的, 3 种成分的 RSD 分别为 3.28%、3.68%、4.98%。

2.5.3 回收率试验

取空白血浆样品 6 份, 分别加入一定量的 3 种对照品溶液, 按血浆样品处理方法操作, 依法进样、测定。结果见表 2。

表 2 回收率结果

| 加入对照品 | 加入量 /μg | 测得量 /μg | 回收率 (x ± S) % |
|-------|---------|-------------------|---------------|
| 水飞蓟宾 | 0.106 2 | 0.101 3 ± 0.002 1 | 95.36 ± 2.1 |
| 异水飞蓟宾 | 0.098 7 | 0.096 9 ± 0.001 8 | 98.21 ± 1.9 |
| 水飞蓟宁 | 0.116 5 | 0.113 4 ± 0.001 7 | 97.32 ± 1.5 |

2.6 数据处理

2.6.1 药动学参数计算

以水飞蓟素中的主要有效成分水飞蓟宾为指标, 采用 3p97 计算药动学参数, 受试制剂与益肝灵参比药动学参数比较。结果, 受试制剂与益肝灵在体内符合一室模型, 权重选择 1/C/C。主要药动学参数见表 3。3 个组分的药时曲线见图 4。

2.6.2 相对生物利用度

以上述药代动力学数据, 以原料药为参比制剂,

表 3 主要药代动力学参数 (n = 6)

| 主要参数 | 单位 | 亚微粒胶囊 | 益肝灵片剂 |
|--------------------------|---------------|-----------|-----------|
| Ke | 1/hr | 0.289 1 | 0.137 8 |
| Ka | 1/hr | 55.323 5 | 149.678 2 |
| Lag time | hr | 0.151 5 | 0.130 9 |
| t _{1/2} (Ka) | hr | 0.067 8 | 0.003 69 |
| t _{1/2} (Ke) | hr | 4.897 6 | 4.086 7 |
| T (peak) | hr | 1.565 3 | 1.389 1 |
| C (max) | ng/mL | 34.056 3 | 22.869.9 |
| AUC | (ng/mL)* hr | 296.930 1 | 103.459.8 |
| CL/F | mg/hr/(ng/mL) | 0.008 76 | 0.016 7 |
| V/F (c) | (mL)/(ng/mL) | 0.056 3 | 0.162 5 |
| MRT(0-∞) | hr | 7.125 3 | 3.986 2 |
| MRT(0-T _{1/2}) | hr | 22.121 4 | 4.562 1 |

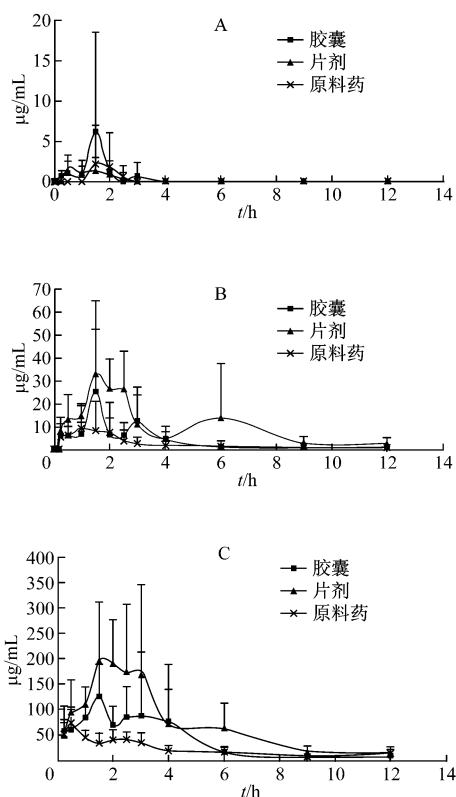


图 4 两种制剂及原料药的药时曲线 (A 水飞蓟宁, B 水飞蓟宾, C 异水飞蓟宾)

按下式计算水飞蓟素亚微粒胶囊和益肝灵片剂的相对生物利用度 (以益肝灵片为参比制剂): $F = (AUC_{\text{试}} / AUC_{\text{参}}) \times 100\%$ 。结果见表 4。

表 4 3 种不同组分两制剂的相对生物利用度 ((ng/mL)* hr) (n = 6)

| 样品 | 水飞蓟宁 | 水飞蓟宾 | 异水飞蓟宾 |
|-----------|------|------|-------|
| 水飞蓟素亚微粒胶囊 | 189% | 358% | 289% |
| 益肝灵片 | 87% | 125% | 156% |

实验结果表明, 3 个组份的水飞蓟素亚微粒胶

囊的生物利用度均比片剂高,明显提高了水飞蓟素在体内的生物利用度,到达了实验设计预期的目的。

3 结果及讨论

3.1 水飞蓟素生物样品分析方法。由于生物样品中水飞蓟素的含量很低,尤其是片剂和原料药,因为吸收差的原因,一般时候的血药浓度为几十 ng/mL,采用普通的液相色谱法难以准确测定。因此,本文采用液质联用法对水飞蓟素中三种不同组分的含量进行同时测定。经方法学试验结果表明,该方法具有良好的线性和精密度及较高的回收率,能保证制剂的药代动力学研究。

3.2 水飞蓟素亚微粒口服给药的相对生物利用度。实验结果表明,以水飞蓟素原粒药为参比制剂,三个组分亚微粒胶囊的相对生物利用度均明显高于片剂,说明亚微粒载体系统能显著提高难溶性药物水

飞蓟素口服给药的生物利用度。药代动力学参数结果表明,两制剂的处置均符合一室模型,亚微粒胶囊达峰时间比益肝灵片要晚一些,而且其 MRT 为片剂的近 5 倍,表明水飞蓟素亚微粒胶囊可能提高了药物在附着面积,并能在小肠缓慢释入药物,使得亚微粒载体在提高药物的生物利用度的同时,延长了药物的作用时间,达到了本实验设计预期的目的。关于亚微粒载体提高水飞蓟素口服给药的机制,我们将在以后的实验中进一步考察。

参考文献:

[1] Ding TM, Tian SJ, Zheng-xing Zhang et al. Determination of active component in silimarin by RP-LC and LC-MS[J]. *J Pharm Biomed Anal* 2001, 26: 155-161

清肠栓对大鼠溃疡性结肠炎 caspase-3 影响的研究

谢建群¹, 张涛², 郑昱¹, 马贵同¹, 陆雄¹, 薛筠¹, 施斌¹, 徐海珍¹, 袁建业¹
(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 201203; 2. 浙江省中西医结合医院, 浙江 杭州 310003)

关键词: 清肠栓; 溃疡性结肠炎; 结肠黏膜固有层淋巴细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸酶-3

摘要: 目的: 观察大鼠溃疡性结肠炎结肠黏膜固有层淋巴细胞凋亡及其凋亡调控关键酶 caspase-3 的表达以及清肠栓对相关表达的影响, 探讨清肠栓(马齿苋、青黛、三七、五倍子)治疗溃疡病性结肠炎的作用机制。方法: 64 只 SD 大鼠随机分为 4 组, 分别为正常组、模型组、SASP 组、清肠栓组, 每组各 16 只。除正常组外, 其余大鼠用 5% 2,4,6-三硝基苯磺酸 100 mg/kg 灌肠建立大鼠溃疡性结肠炎模型后, 分别予 0.9% 生理盐水、SASP、清肠栓处理 7 d 后, 处死大鼠。运用电镜、免疫组化染色、RT-PCR、Western-blot 等技术, 分别检测溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜固有层淋巴细胞凋亡及固有层淋巴细胞 caspase-3 的表达。结果: 清肠栓组结肠黏膜固有层淋巴细胞凋亡呈上升趋势; 其结肠黏膜固有层淋巴细胞上 caspase-3 的表达率上升, 与模型组相比 ($P < 0.01$)。结论: 清肠栓可能增加结肠黏膜淋巴细胞凋亡效应酶 caspase-3 表达, 诱导结肠黏膜固有层淋巴细胞凋亡, 降低淋巴细胞毒作用, 缓解大鼠溃疡性结肠炎效应。

中图分类号: R944.2⁺7 文献标识码: A 文章编号: 1001-1528(2008)03-0340-03

Effect of Qingchang Suppository on the expression of caspase-3 in an experimental model of ulcerative colitis

XIE Jian-qun¹, ZHANG Tao², ZHENG Yu¹, MA Gu-tong¹, LU Xiong¹, XUE Yun¹, SHI Bin¹, XU Hai-zhen¹, YUAN Jian-ye¹

(1. Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China; 2. Zhejiang Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hangzhou 310003, China)

收稿日期: 2007-05-10

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30772801)

作者简介: 谢建群 (1953~), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 主要从事中医药治疗消化系统疾病研究。E-mail: Xiejianqun530305@yahoo.com.cn