

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000170

水飞蓟宾生物黏附微球的生物利用度

唐直捷, 周定利, 柯玲玲, 张 梦, 尚京川

(重庆医科大学药学院药物分析教研室、重庆市生物化学和分子药理重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:建立兔血浆中水飞蓟宾生物黏附微球浓度的反相高效液相色谱测定方法, 研究水飞蓟宾生物黏附微球的代谢动力学及相对生物利用度。**方法:**色谱柱, Agilent Zorbax C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A, 20 mmol/L KH₂PO₄ 缓冲溶液 (pH 3.0); 流动相 B, 甲醇 (A:B=55:45, V/V)。12 只健康大白兔进行随机交叉实验, 给药剂量为 20 mg/kg。**结果:**生物黏附微球和混悬液的主要药动学参数: 峰浓度 C_{max} 分别为 (905.94 ± 230.16) ng/ml 和 (321.32 ± 86.65) ng/ml; 达峰时间 T_(peak) 分别为 (4.70 ± 1.02) h 和 (1.66 ± 1.00) h; 半衰期 t_{1/2} 分别为 (4.07 ± 0.12) h 和 (1.64 ± 0.09) h; 药物曲线下面积 AUC₀₋₂₄ 分别为 (11 841.35 ± 579.58) ng·h/ml 和 (1 537.34 ± 156.43) ng·h/ml。由 2 种制剂的 AUC₀₋₂₄ 计算, 生物黏附微球的相对生物利用度为 (770.2 ± 370.5)%。**结论:**水飞蓟宾生物黏附微球的生物利用度是速释制剂混悬液的 7.7 倍, 明显提高了水飞蓟宾在体内的吸收。

【关键词】水飞蓟宾; 反相高效液相色谱法; 相对生物利用度

【中图分类号】R917

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-10

Bioavailability of bioadhesive microspheres of silybin

Tang Zhijie, Zhou Dingli, Ke Lingling, Zhang Meng, Shang Jingchuan

(Teaching and Research Section of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To establish reversed phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) for the determination of silybin in rabbit plasma and to provide a method for studying pharmacokinetics and relative bioavailability of bioadhesive microspheres of silybin. **Methods:** Separation was achieved using an Agilent Zorbax C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm). The mobile phase were: A, 20 mmol/L KH₂PO₄ buffer, pH=3.0; B, methanol (A:B=55:45, V/V). A randomized cross-over design was performed on 12 healthy rabbits. **Results:** Main pharmacokinetic parameters of bioadhesive microspheres and suspensions: C_{max} (905.94 ± 230.16) ng/ml and (321.32 ± 86.65) ng/ml; T_(peak) (4.70 ± 1.02) h and (1.66 ± 1.00) h; t_{1/2} (4.07 ± 0.12) h and (1.64 ± 0.09) h; AUC₀₋₂₄ (11 841.35 ± 579.58) (ng·h)/ml and (1 537.34 ± 156.43) (ng·h)/ml, respectively. Relative bioavailability of the bioadhesive microspheres to suspensions was (770.2 ± 370.5)%. **Conclusion:** Relative bioavailability of bioadhesive microspheres is 770% to suspensions of silybin and bioadhesive microspheres promote the absorption of silybin.

【Key words】 silybin; reversed phase-high performance liquid chromatography; relative bioavailability

水飞蓟宾是植物水飞蓟果实的主要有效成分之一。药效实验证明水飞蓟宾具有明显的保护及稳定肝细胞膜、清除自由基等作用, 对异烟肼、四氯化碳等肝脏毒物引起的各种肝损伤具有不同程度的保护和治疗作用^[1-2]。但是水飞蓟宾的水溶性和脂溶性低, 口服效果不好, 生物利用度低。目前临床使用的水飞蓟宾葡甲胺片只是改善其水溶性, 而其在小肠吸收部位的渗透性仍然未得到改善。其它新剂型

如脂质体^[3]、纳米胶束^[4]等在不同程度上都提高了生物利用度, 但是它们制备方法复杂, 制备过程中都使用了有机溶剂, 对药物制剂的安全性有影响。生物黏附微球是指药物与黏附材料分散在载体中或黏附材料包裹药物形成直径为 1~1 000 μm, 除具有一般微球的靶向和控释作用外, 还具有高的表面积比。因而给药后微球能更紧密的黏附在组织黏膜表面, 从而延长药物在吸收部位的停留和释放时间, 促进药物的吸收, 提高生物利用度^[5-6]。本实验采用海藻酸钠为黏附材料以离子交联法制备的水飞蓟宾生物黏附微球, 研究水飞蓟宾生物黏附微球的代谢动力学及相对生物利用度。

作者介绍: 唐直捷, Email: hntzj@126.com,

研究方向: 药物分析。

通信作者: 尚京川, Email: sjc20@126.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000170.html>

1 材料与方法

1.1 研究材料

水飞蓟宾(中国北京中国食品药品检定研究院,批号:0752-9806,纯度 99.8%)。

动物:雄性新西兰大白兔 12 只,体质量 2~2.5 kg[重庆医科大学实验动物中心证号 SCXK-(渝)2007-0001]。

1.2 仪器和试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),BS210S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),SK-1 型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂),KQ-3200E 型超声仪(江苏省金坛市医疗仪器厂),BF2000 型氮气吹干仪(北京八方世纪科技有限公司),SK 型低温离心机(美国 SIGMA 公司),LD-50G-D 型超纯水处理器(重庆利迪实验仪器设备有限公司)。

甲醇(江苏省淮安市汉邦科技有限公司,色谱纯), β -葡萄糖苷酶(美国 SIGMA 公司),实验用水为纯化水。

1.3 溶液配制

水飞蓟宾储备液:精密称取水飞蓟宾标准品 4 mg,用纯化水溶解并定容至 1 000 ml 容量瓶中,配制成浓度为 4 μ g/ml 的标准储备液,保存于 4 $^{\circ}$ C。

1.4 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax C18 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相 A:20 mmol/L KH_2PO_4 缓冲溶液(pH 3.0);流动相 B:甲醇(A:B=55:45, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:288 nm;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样体积:50 μ l。

1.5 生物黏附微球的制备

称取 3 g 1.5%海藻酸钠溶于 200 ml 水中,加入 3 g 水飞

蓟宾搅拌分散成黏稠混悬液,用 7 号针头逐滴加该混悬液于 300 ml 0.1% CaCl_2 溶液中胶凝 10 min,过滤,蒸馏水洗涤后,40 $^{\circ}$ C 干燥。

1.6 混悬液的制备

称取羧甲基纤维素 0.1 g,加入蒸馏水研成溶液后,加入水飞蓟宾细粉 0.3 g,研成糊状,再加蒸馏水研匀,稀释并转移至 20 ml 刻度试管中,加蒸馏水至刻度。

1.7 动物实验设计

成年健康大白兔 12 只,随机分为 2 组,每组 6 只,1 组为样品组,1 组为对照组。禁食 12 h 后,按 20 mg/kg 剂量灌胃给药,分别在给药前和给药后 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24 h 于耳缘静脉采血 1 ml,置加有肝素的 EP 管内。

1.8 血浆样品的处理方法

将采得的全血 5 000 r/min 离心 5 min,精密量取上层血浆 0.5 ml 置 10 ml 试管中,加入 0.5 ml 醋酸钠缓冲溶液(pH=5.6)和 30 单位酶溶液,混匀,于 37 $^{\circ}$ C 水浴中培育 16 h。再加入 1.0 ml 硼酸缓冲液(pH=8.4),6.0 ml 乙醚。涡旋混合 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上层乙醚 5.0 ml,氮气吹干,再加 0.25 ml 流动相涡旋混合 1 min 溶解,12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,按“1.4”色谱条件测定。

2 结果

2.1 方法专属性

在“1.4”色谱条件下测定,所得空白血浆、水飞蓟宾标准品溶液、加入水飞蓟宾标准品的空白血浆、血浆样品色谱图见图 1。由图可见,血浆中其它内源性物质不干扰样品测定。表明该方法具有良好的专属性。

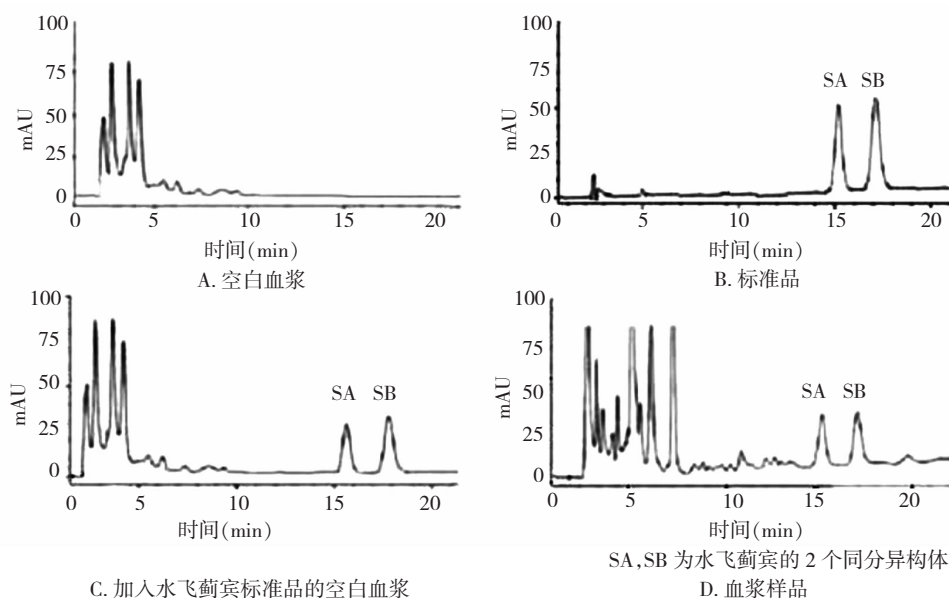


图 1 高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms

2.2 线性关系考察

精密量取空白血浆 0.5 ml 置 10 ml 试管中,加 0.5 ml 不同浓度的水飞蓟宾标准品溶液,配制成 50、100、250、500、1 000、2 000 ng/ml 的水飞蓟宾血浆。按“1.7”项下方法处理样品,再按“1.4”项下色谱条件进样测定。以样品浓度 C (ng/ml) 为横坐标,色谱峰面积 A 为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $A=0.437\ 7C-0.105\ 7$ ($r=0.999\ 1, n=5$),结果表明水飞蓟宾在 50~2 000 ng/ml 范围内线性关系良好。检测限为 50 ng/ml ($S/N=3$)。

2.3 精密度的实验

按照“2.2”配制浓度为 50、500、2 000 ng/ml 的质量控制样品,在“1.4”色谱条件下进样分析,各连续进样 5 次,结果显示低、中、高 3 个水平的峰面积相对标准偏差 $RSD \leq 3.6\%$ 。表明仪器具有良好的精密度。

2.4 稳定性实验

按照“2.2”配制浓度为 50、500、2 000 ng/ml 的质量控制样品,于 4℃ 保存,在“1.4”色谱条件下,于 1、3、5、7、12、24 h 分别测定,结果显示低、中、高浓度水飞蓟宾的 $RSD \leq 3.6\%$ 。表明血浆样品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 重复性实验

按照“2.2”项下制备 50、500、2 000 ng/ml 3 个水平质量控制样品各 5 份,在“1.4”色谱条件下进样分析,结果显示低、中、高 3 个水平的峰面积 $RSD \leq 4.8\%$ 。表明方法的重复性良好。

2.6 回收率实验

按照“2.2”项下制备 50、500、2 000 ng/ml 3 个水平质量控制样品各 5 份,在“1.4”色谱条件下进样分析。以外标定量法计算添加回收率,结果见表 1。3 个水平的回收率为 86.7%~89.2%, $RSD \leq 5.1\%$ 。

表 1 血浆中水飞蓟宾的回收率结果 ($n=5$)

Tab.1 Sample recovery of silybin in plasma ($n=5$)

添加量 (ng/ml)	测定结果 (ng/ml)	平均回收率 (%)	RSD (%)
50	43.4 ± 0.04	86.7	5.1
500	443.5 ± 8.00	88.7	4.0
2 000	1 784.0 ± 7.10	89.2	3.7

3 药代动力学

取“1.6”项下的血浆样品,按“1.7”项下处理,在“1.4”色谱条件下测定。药时曲线见图 2。采用 3p97 程序计算药动学参数^[7],微球和混悬液均符合一室模型,药动学参数见表 2。生物利用度按下式计算: $F = \text{微球 } AUC_{0-24} / \text{混悬液 } AUC_{0-24} \times 100\%$ 。

结果显示,生物黏附微球和混悬液的 $C_{\max}$ 分别为 (905.94 ± 230.16) ng/ml 和 (321.32 ± 86.65) ng/ml; $T_{(\text{peak})}$ 分别为 (4.70 ± 1.02) h 和 (1.66 ± 1.00) h; $t_{1/2}$ 分别为 (4.07 ± 0.12) h 和 (1.64 ±

0.09) h; AUC_{0-24} 分别为 (11 841.35 ± 579.58) (ng·h)/ml 和 (1 537.34 ± 156.43) (ng·h)/ml。与混悬液相比,生物黏附微球的 $C_{\max}$ 和 AUC_{0-24} 明显增大, $T_{(\text{peak})}$ 和 $t_{1/2}$ 明显延迟。以上述药代动力学数据,计算水飞蓟宾生物黏附微球的生物利用度是速释制剂混悬液的 (770.2 ± 370.5)%。

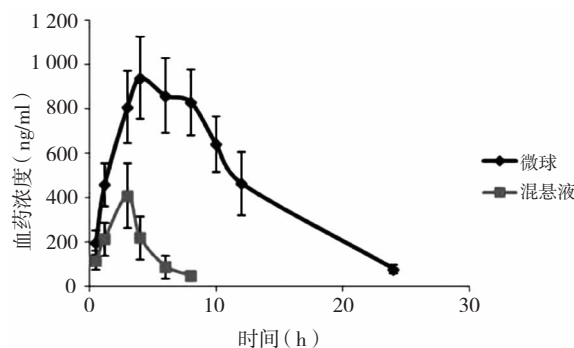


图 2 水飞蓟宾微球和混悬液的兔血浆药时曲线

Fig.2 Concentration-time profiles of microspheres and suspensions of silybin in plasma of rabbit

表 2 水飞蓟宾生物黏附微球与混悬液药动学参数 ($n=6$)

Tab.2 Pharmacokinetic parameters of bioadhesive microspheres and suspensions of silybin ($n=6$)

参数	微球	混悬液
A	5 740.89 ± 301.36	1 332.67 ± 120.45
Ka (1/h)	0.26 ± 0.05	0.82 ± 0.02
$t_{1/2}$ (h)	4.07 ± 0.12	1.64 ± 0.09
$T_{(\text{peak})}$ (h)	4.70 ± 1.02	1.66 ± 1.00
$C_{(\text{max})}$ (ng/ml)	905.94 ± 230.16	321.32 ± 86.65
AUC_{0-24} (ng·h/ml)	11 841.35 ± 579.58	1 537.34 ± 156.43

4 讨论

水飞蓟宾进入体内后,大部分与葡萄糖醛酸结合,加入 β -葡萄糖苷酸酶水解后再测定,可以测得水飞蓟宾的总量。生物样本成分复杂,水飞蓟宾容易受到样品基质的干扰,影响测定结果的准确度。采用 Agilent Zorbax C18 色谱柱,当 20 mmol/L KH_2PO_4 (pH=3.0):甲醇(V/V) 为 55:45 时,水飞蓟宾方可与血浆中其他干扰组分完全分离。对于水飞蓟宾,由于吸收后大部分与血浆蛋白结合,本实验通过测定血药总浓度评价水飞蓟宾生物黏附微球的生物利用度^[8]。本实验首次将水飞蓟宾制成生物黏附微球,使微球黏附在小肠黏膜上,从而增加水飞蓟宾在小肠吸收部位的滞留时间,缩短水飞蓟宾从释放部位到达小肠黏膜吸收部位的距离,提高了水飞蓟宾生物利用度。

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000231

替比夫定治疗活动性乙型肝炎肝硬化的临床研究

江宇杰, 黄 成, 石小枫

(重庆医科大学附属第二医院感染科, 重庆 400010)

【摘要】目的:观察替比夫定治疗乙型肝炎肝硬化的临床疗效。**方法:**43 例 HBV DNA 定量大于 1×10^5 拷贝/ml 的乙型肝炎肝硬化患者入选此研究, 23 例予替比夫定 600 mg/d; 每 3 个月检测肝脏功能及 HBV DNA 的变化, 同时与 20 例未抗病毒治疗病例进行比较。**结果:**随着治疗时间的延长, 替比夫定治疗组患者各指标较治疗前及对照组均有明显的改善: HBV DNA 在第 4 周降至 4.83 ± 0.70 , 天冬氨酸转氨酶、总胆红素和 Child-pugh 评分在第 12 周分别降至 (55.19 ± 22.48) U/L、 (36.81 ± 22.11) $\mu\text{mol/L}$ 、 (6.65 ± 1.94) 分, 丙氨酸转氨酶在第 24 周降至 (63.67 ± 19.52) U/L, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但白蛋白改善不明显, 替比夫定组治疗 2 例病例于治疗的 24 周和 36 周出现病毒学突破, 经检测为 rtM204I 突变, 给予阿德福韦酯联合治疗。**结论:**替比夫定在改善乙型肝炎肝硬化患者肝脏功能及降低 HBV DNA 方面具有良好的临床疗效, 但仍有较高的病毒耐药突变。

【关键词】替比夫定; 乙型病毒性肝炎; 肝硬化**【中图分类号】**R575.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-02-22

Telbivudine in the treatment of patients with hepatitis B virus-related cirrhosis

Jiang Yujie, Huang Cheng, Shi Xiaofeng

(Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To evaluate the clinical efficacy of telbivudine (LdT) in the treatment of patients with hepatitis B virus-related cirrhosis. **Methods:** A total of 43 patients with HBV DNA level more than 5 log₁₀ copies/ml were enrolled in this study; 23 patients received LdT 600 mg orally daily (LdT group) and 20 patients received no antiviral treatment (control group). Liver function and serum HBV DNA level were assessed every 3 months. **Results:** The parameters of liver function (alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), Child-pugh score) and serum HBV DNA level were significantly improved in LdT group compared with those in control group with the extension of the treatment (HBV DNA level was reduced to 4.83 ± 0.70 at the 4th week; AST, TBIL and Child-pugh score were reduced to (55.19 ± 22.48) U/L, (36.81 ± 22.11) $\mu\text{mol/L}$, 6.65 ± 1.94 respec-

tively at the 12th week; ALT was reduced to (63.67 ± 19.52) U/L at the 24th week) ($P < 0.05$). The serum ALB level showed no remarkable change in LdT group than in control group. Two patients in LdT group experienced virological breakthrough after 24 and 36 weeks (rtM204 mutations) and were salvaged treat-

作者介绍:江宇杰, Email: 358288634@qq.com,

研究方向: 病毒性肝炎的免疫发病机理及治疗。

通信作者:石小枫, Email: sxf7776@163.com。**基金项目:**国家自然科学基金资助项目 (编号: 81270503)。**优先出版:** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000231.html>

参 考 文 献

- [1] 薛洪源, 候艳宁, 刘会臣, 等. 水飞蓟宾胶囊对异烟肼和利福平肝损害小鼠的保护作用[J]. 中成药, 2003, 25(4): 307-310.
- [2] 陈正跃, 吴子钊, 许建文, 等. 水飞蓟宾-磷脂酰胆碱复合物与水飞蓟宾对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤保护作用的对比[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(4): 221-223.
- [3] El-Samaliy MS, Afifi NN, Mahmoud EA. Evaluation of hybrid liposomes-encapsulated silymarin regarding physical stability and in vivo performance[J]. Int J Pharm, 2006, 319(1-2): 121-129.
- [4] 徐希明, 朱 源, 李 强, 等. 水飞蓟宾纳米胶束的制备及其鼠体

内药物动力学研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(24): 1874-1876.

- [5] Genta I, Conti B, Perugini P, et al. Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir[J]. J Pharm. Pharmacol, 1997, 49(8): 737-742.

- [6] Bogataj M, Mrhar A, Korosec L. Influence of physicochemical and biological parameters on drug release from microspheres adhered on vesical and intestinal mucosa[J]. Int. Pharm, 1999, 177(2): 211-220.

- [7] 江 波, 印春华. 水飞蓟素磷脂复合物家兔体内生物利用度的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 22(12): 598-600.

- [8] 史向国, 钟大放, 张逸凡, 等. 反相高效液相色谱法测定大鼠血浆中水飞蓟宾的浓度[J]. 沈阳药科大学学报, 2001, 18(2): 113-115.

(责任编辑: 冉明会)