

柠檬烯胶囊在人体内的相对生物利用度

赖艳, 蒋学华*, 王凌, 刘芳, 黄桦, 李雪

(四川大学华西药学院, 四川成都 610041)

摘要: 目的 研究柠檬烯胶囊在正常人体内的药物动力学, 评价两种制剂的生物等效性。方法 采用双交叉设计, 24名健康志愿者交叉口服 0.3 g 柠檬烯供试制剂与参比制剂。采用 GC-MS 法测定柠檬烯的血药浓度。用 DAS 药动学程序处理试验数据, 并对试验结果进行方差分析和双单侧 *t* 检验。结果 柠檬烯的相对生物利用度为 105.8% ± 5.2%; 两种制剂的 AUC_0-t 分别为: 350.08 ± 138.59、362.78 ± 127.96 ng·h·mL⁻¹; $AUC_0-\infty$ 分别为: 394.74 ± 143.73、395.60 ± 139.60 ng·h·mL⁻¹; C_{max} 分别为: 124.04 ± 73.63、116.21 ± 64.03 ng·mL⁻¹; T_{max} 分别为: 1.97 ± 0.80、2.03 ± 1.24 h。结论 对空腹口服两种制剂后的 $\ln AUC_0-t$ 、 $\ln AUC_0-\infty$ 、 $\ln C_{max}$ 经双单侧 *t* 检验, T_{max} 经秩和检验, 表明二者为生物等效性制剂。

关键词: 柠檬烯; 生物利用度; 生物等效性; 气相色谱-质谱联用

中图分类号: R969

文献标识码: A

文章编号: 1006-0103(2009)02-0165-03

Relative bioavailability of Limonene capsules in healthy volunteers

LAI Yan, JANG Xue-hua*, WANG Ling, LIU Fang, HUANG Hua, LI Xue

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan, 610041 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate the pharmacokinetics and bioequivalence of Limonene capsules in healthy volunteers. **METHODS** A randomized crossover design was performed in 24 healthy male volunteers. In the two study periods, a single 0.3 g dose of either test or reference preparation was administered to each volunteer. Limonene concentration in plasma was detected by GC-MS. The experiment data were calculated by DAS program. The results were analyzed by ANOVA and two one-way test. **RESULTS** The relative bioavailability of Limonene in the test was 105.8% ± 5.2%. AUC_{0-t} of Limonene of test and reference preparations were 394.74 ± 143.73 ng·h·mL⁻¹, 395.60 ± 139.60 ng·h·mL⁻¹. $AUC_{0-\infty}$ were 394.74 ± 143.73, 395.60 ± 139.60 ng·h·mL⁻¹. T_{max} were 1.97 ± 0.80, 2.03 ± 1.24 h. C_{max} were 124.04 ± 73.63, 116.21 ± 64.03 ng·mL⁻¹. **CONCLUSION** Bioequivalent evaluation of two preparations by analyzing with two one-way test and rank sum test shows that the two preparations are bioequivalent.

Key words: Limonene; Bioavailability; GC-MS

CLC number: R969

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2009)02-0165-03

柠檬烯为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 湿皮经冷榨精制而成的挥发油, 主要成分为 1-甲基-4-(1-甲基乙烯基)环己烯 (C₁₀H₁₆), 用于治疗胆囊炎、胆管炎、胆结石、胆道术后综合症以及消化不良、气管炎等^[1,2]。现采用 GC-MS 法测定受试者口服柠檬烯后血浆中的柠檬烯, 并评价其相对生物利用度。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent Technologies 7683 series 色谱系统 (美国安捷伦公司); 柠檬烯胶囊供试制剂 (成都天台山制药有限公司, 批号: 070501); 柠檬烯胶囊参比制剂 (四川华新制药有限公司, 批号: 20070303); 柠檬烯对照品 (东京化成工业株式会社, 批号: 6-15-9); 十氢萘 (成都市联合化工试剂研究所, 批号:

060329); 乙腈、正己烷为色谱纯; 代血浆 (菲克血浓聚明胶注射液, 武汉华龙生物制药有限公司, 批号: 070513132); 水为纯净水; 其余试剂为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 受试者的选择 24名健康男性, 18~27岁, 体重指数 19~24, 自愿签署“志愿受试者知情同意书”本人及家族无过敏体质, 受试者无肝、肾功能及心脏功能异常, 近两周未使用过任何药物。

1.2.2 试验设计 采用随机自身对照双交叉试验设计, 计算机产生随机数字表。24名受试者随机均分为 A、B 两组。受试者于试验前 6 天开始控制饮食, 清洗期及试验期间, 进食统一标准餐 (不含柑橘类水果、薄荷、柠檬、葡萄柚、紫苏、花椒等), 试验前日晚 7 时后禁食, 次日晨分别口服 0.3 g 供试制剂 (T) 和参比制剂 (R), 给药前取空白血, 给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12 h, 由肘

作者简介: 赖艳 (1983-), 女, 正攻读临床药学专业硕士学位。Email: laiyan_blue@163.com

* 通讯作者 (Correspondent author), Email: jxh1013@vip.163.com

静脉取约 4 ml 血,离心分离血浆,置 -24 保存。间隔一周后,交换用药,相同时间点肘静脉取血。期间禁用一切非试验药物,禁止剧烈活动,禁烟、酒及含酒精、咖啡因类饮料。服药后 2 h 进统一食谱的早餐;服药后 5 h 进统一食谱的标准午餐;服药后 10 h 进统一食谱的标准晚餐。

1.2.3 色谱条件 色谱柱为 HP-5MS 柱 (30 m × 250 μm × 0.25 μm);柱温为 50,保留 2 min,以 45 ·min⁻¹速度升至 150,保留 3 min;流速 0.8 ml·min⁻¹;未分流;离子源温度 250;选择监测离子:柠檬烯 $m/z=93$,十氢萘 $m/z=138$ 。

1.2.4 血浆样品的处理和测定 精密量取 0.5 ml 血浆样品,置 10 ml 具塞玻璃离心管中,分别加入 25 μl 正己烷、内标工作溶液 (十氢萘),混匀后加入 1 ml 乙腈,涡旋振荡混合 3 min,3.5 × 10³ r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清液,于 10 ml 具塞玻璃离心管中,加入 0.5 ml 正己烷,涡旋混合 5 min 后,3.5 × 10³ r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清液置进样瓶中,置自动进样器样品盘中,进样 1 μl,在“1.2.3 项色谱条件下分离测定。记录柠檬烯峰面积 (A_s) 与内标峰面积 (A_{IS}),按内标加权回归法计算柠檬烯的浓度。

1.2.5 方法的专属性 按“1.2.3 项色谱条件,测得柠檬烯、十氢萘质谱扫描图及空白人血浆、空白代血浆图谱、柠檬烯 (内标 (十氢萘) 加入代血浆、样品) 色谱图见图 1、2 图。由图可见,内标与柠檬烯间无干扰,使用代血浆建立方法可排除人血浆中内源性 (或食源性) 柠檬烯的干扰。

1.2.6 药动学数据计算及统计分析 血浆中柠檬烯的峰浓度 C_{max} 、达峰时间 T_{max} 由实验数据直接读出; AUC 用梯形面积法计算;其他药物动力学参数由 DAS 分析软件计算。峰浓度与药时曲线下面积经对数转换后,采用方差分析、置信区间法和双侧 t 检验法进行生物等效性评价; T_{max} 经非参数检验法进行差别检验。

1.2.7 标准曲线制备 分别称取适量柠檬烯

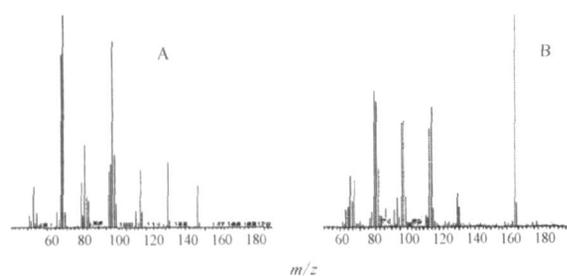


图 1 柠檬烯 (A) 和十氢萘 (B) 的质谱扫描图

Fig 1 The mass spectra of limonene (A) and decahydronaphthalene (B)

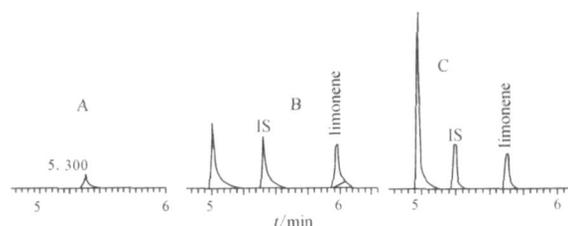


图 2 空白人血浆 (A)、柠檬烯 + 十氢萘加入代血浆 (B) 和样品 (C) 的色谱图

Fig 2 Chromatograms of blank (A), limonene + decahydronaphthalene + blank vicarious plasma solution (B) and sample solution (C)

对照品和十氢萘于 100 ml 量瓶中,精密称定,用正己烷配成 510.6 μg·ml⁻¹ 的对照品溶液和 1.525 μg·ml⁻¹ 的内标溶液 (-20 下保存)。取对照品溶液,用正己烷稀释,得 8 种不同浓度的工作溶液。取 8 只 10 ml 具塞玻璃离心管,分别加入 0.5 ml 空白代血浆,再分别加入 25 μl 8 种工作溶液后混匀,使代血浆中柠檬烯的浓度分别为 2.091、5.229、13.071、32.678、81.697、202.24、382.959、510.600 ng·ml⁻¹。按“1.2.4 项方法处理,测定,制备标准曲线。以 A_s/A_{IS} 为纵坐标,血浆中柠檬烯浓度 C 为横坐标,采用 SPSS 软件对与 A_s/A_{IS} 与 C 进行加权回归,选择拟合优度最佳的权重作为标准曲线回归方程。回归方程为: $A_s/A_{IS} = 0.02582 C + 0.02$ ($r = 0.998$),权重为 2.0。代血浆中,柠檬烯 2.091 ~ 510.600 ng·ml⁻¹ 与 A_s/A_{IS} 具有良好的线性关系,最低定量浓度为 2.091 ng·ml⁻¹。

1.2.8 萃取回收率试验 分别加入 25 μl 高、中、次低、低 4 种不同浓度的柠檬烯对照品工作溶液,再加入 25 μl 内标工作溶液,加入 0.5 ml 正己烷混匀后进样 1 μl 分析,记录柠檬烯峰面积与内标峰面积 (未经萃取)。分别于 0.5 ml 代血浆中加入 25 μl 高、中、次低、低 4 种不同浓度的柠檬烯对照品工作溶液,得到 382.959、32.678、13.071、5.229 ng·ml⁻¹ 4 种已知浓度的柠檬烯血浆样品,自“加入内标工作溶液 25 μl 起,按“1.2.4 项下处理并测定,记录柠檬烯峰面积与内标峰面积 (经萃取)。用萃取样品色谱峰面积与未萃取样品峰面积的比值计算萃取回收率。柠檬烯的平均萃取回收率为 78.4%,十氢萘的平均萃取回收率 83.3%。

1.2.9 方法回收率和精密度试验 分别于 0.5 ml 空白代血浆中加入高、中、次低、低 4 种浓度的柠檬烯对照品工作溶液,混匀,得到高、中、次低、低浓度的柠檬烯血浆样品。按“1.2.4 项下方法测定,计算出血浆中柠檬烯的浓度,以测得值与加入值之比计算回收率,计算日内与日间精密度。柠檬烯的高、

中、次低、低浓度的回收率分别为 $102.1\% \pm 4.2\%$ 、 $102.9\% \pm 2.6\%$ 、 $99.7\% \pm 4.6\%$ 、 $105.5\% \pm 13.2\%$ 。日内 RSD 分别为 4.2% 、 11.0% 、 2.6% 、 6.8% ，日间 RSD 分别为 7.2% 、 10.2% 、 7.0% 、 9.8% ($n=5$)

1.2.10 稳定性考察 取已知浓度的柠檬烯血浆样品数份,分别在室温、冰冻、冻融下预处理样品后存放不同时间后,按“1.2.4 项方法操作,测定柠檬烯的浓度,考察血浆样品的稳定性。结果表明,含药的血浆样品在室温下 12 h 基本稳定,在冰冻下 (-20) 至少能稳定 14 d,血浆样品至少可冻融 3 次,仍保持稳定,样品预处理后室温下 12 h 内能保持稳定。

1.2.11 实验室内的质控 按“1.2.7 项分别配制高、中、低 3 种浓度的含药血浆样品,按“1.2.4 项测定,用标准曲线计算样品中的柠檬烯。26 批质控样品中,低浓度点偏差均小于 18.64% ,其余浓度的质控样品测定结果的偏差均小于 14.73% 。

1.2.12 药物动力学研究 空腹口服给药后,柠檬烯供试与参比制剂的平均血药浓度-时间曲线见图 3。供试制剂相对生物利用度为 $105.8\% \pm 52.8\%$ 。用 DAS 程序计算 24 名健康受试者服用供试和参比制剂后的主要药动学参数 (表 1)。对 T_{max} 进行秩和检验;对 $\ln AUC_{0-t}$ 、 $\ln AUC_{0-\infty}$ 、 $\ln C_{max}$ 进行方差分析,两制剂间无显著性差异 ($P > 0.05$)。由表 2 可知,两种制剂的 T_{max} 无显著性差异 ($P > 0.05$);表明二者为生物等效制剂。

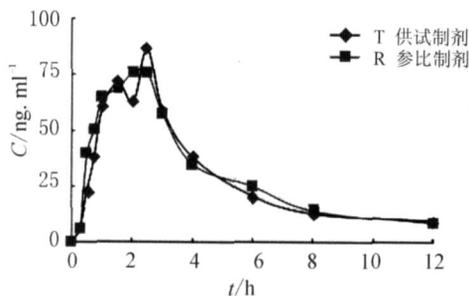


图 3 柠檬烯供试制剂与参比制剂的平均血药浓度-时间图

Table 3 Plasma concentration - time relationship curves of limonene observed after administration

表 1 单剂量给予两种制剂后柠檬烯的主要药动学参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters of the two preparations

Preparations	$C_{max}/ng \cdot ml^{-1}$	T_{max}/h	$AUC_{0-t}/ng \cdot h \cdot ml^{-1}$	$AUC_{0-\infty}/ng \cdot h \cdot ml^{-1}$
Test	124.04 ± 73.63	1.97 ± 0.80	350.08 ± 138.59	394.74 ± 143.73
Reference	116.21 ± 64.03	2.03 ± 1.24	362.78 ± 127.96	395.60 ± 139.60

表 2 口服两种制剂的等效性检验结果

Table 2 Bioequivalent consequence of the two preparations

检验量	$\ln AUC_{0-T}$	$\ln AUC_{0-\infty}$	$\ln C_{max}$
t_{01}	1.726	2.236	2.787
t_{02}	2.813	2.452	2.17
90%置信区间	80.1%	84.1%	81.8%
90%置信区间	112.2%	116.6%	134.9%
结论	生物等效	生物等效	生物等效

2 讨论

柠檬烯存在于多种食物中,控制饮食消除内源性柠檬烯的影响十分重要。经控制受试者的饮食,受试者不服药的情况下其体内柠檬烯浓度可在试验时间内保持基础水平,浓度均在本项目所建立的人血浆中的最低定量浓度以下,食物摄入的柠檬烯基本不会影响试验。因此,受试者于试验前 6 天开始控制饮食。清洗期及试验期间,进食统一标准餐 (不含柑橘类水果、薄荷、柠檬、葡萄柚、紫苏、花椒等)。为消除人血浆中柠檬烯本底造成的干扰,采用代血浆 (菲克血浓聚明胶肽注射液) 代替血浆建立检测方法。试验采用正己烷作为萃取溶剂,但正己烷对塑料制品有溶解作用,其溶解物对测定有干扰。因此,处理样品均采用玻璃器皿。另外,柠檬烯和十氢萘在玻璃器皿中有吸附和残留,并不易洗涤。故选用洗涤剂 and 清水洗涤后,置洗液中浸泡 4 h,再在高于柠檬烯的沸点温度 (300) 上置马氟炉中高温烘烤 10 h,才能完全除去玻璃器皿中的残留。

参考文献:

- [1] 王伟江. 天然活性单萜—柠檬烯的研究进展 [J]. 食品添加剂, 2005, 1: 33 - 35.
- [2] 方修贵, 黄振东. 柑橘柠檬烯 (D - limonene) 的应用及提取 [J]. 浙江柑橘, 2007, 24 (4): 34 - 36.

收稿日期: 2008 - 07