

文章编号: 1006-2858(2011)09-0732-04

灯盏花素分散片在健康人体内的 相对生物利用度研究

杨铁耀¹, 吴小明¹, 李焕明², 李清³, 毕开顺³

(1. 深圳清华大学研究院 中药及天然药物研究中心, 广东 深圳 518057; 2. 天津市第四中心医院 心内科, 天津 300140;
3. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 研究灯盏花素分散片与灯盏花素片在健康男性志愿者体内的相对生物利用度。方法 采用随机双周期自身交叉对照试验设计, 18 名健康男性受试者分别经口给予受试制剂灯盏花素分散片和参比制剂灯盏花素片 80 mg 采用 LC-MS/MS 法测定给药后不同时间异灯盏乙素的血药质量浓度。利用 DAS 软件计算药动学参数和进行统计分析, 通过方差分析和双侧 t 检验及 90% 置信区间法进行生物利用度评价。结果 受试制剂与参比制剂中异灯盏乙素的 ρ_{\max} 为 (75.81 ± 23.24) 、 $(62.17 \pm 17.82) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, t_{\max} 为 (6.50 ± 1.34) 、 $(7.78 \pm 1.52) \text{h}$ AUC_{0-t} 为 (454.1 ± 194.7) 、 $(403.9 \pm 133.3) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为 (460.1 ± 199.8) 、 $(410.3 \pm 137.1) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 受试制剂 ρ_{\max} 比参比制剂大, 疗效更高; 受试制剂 t_{\max} 比参比制剂小, 起效更快; 受试制剂对参比制剂的相对生物利用度 (F , 以 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 作为评价依据) 为 $(116.5 \pm 43.5)\%$, 灯盏花素分散片生物利用度较普通片高。

关键词: 灯盏花素; 高效液相色谱串联质谱法; 生物利用度; 分散片
中图分类号: R 97 **文献标志码:** A

灯盏花素系菊科植物灯盏细辛 (*Erigeron breviscapus*) 中提取的灯盏甲素、灯盏乙素混合物, 其主要成分为灯盏乙素。灯盏花素具有活血化瘀、通络止痛的作用, 现代药理学研究表明, 灯盏花素具有扩张脑血管, 降低脑血管阻力, 增加脑血流量, 改善微循环, 抑制血管增生, 抗血小板聚集的作用。临床适应症为中风后遗症、冠心病、心绞痛, 对治疗急性脑梗死、急性心肌梗死、闭塞性动脉硬化、肺源性心脏病、糖尿病周围神经病变、肾病综合征、突发性耳聋、皮质盲、后天性麻痹性斜视、股骨头缺血性坏死、类风湿关节炎等具有实用性价值。动物静注给药体内消除迅速^[1], 经口给药的绝对生物利用度很低, 犬经口给予灯盏乙素, 其绝对生物利用度仅为 0.4%, 几乎不吸收^[2]。提示口服剂型的开发应以增加吸收为主要目标。居文政等^[3]建立了 LC-MS 法测定血浆中灯盏乙素总苷元, 并研究灯盏花素片在我国健康志愿者体内的药代动力学。有关灯盏花素分散片人体生物利用度研究尚无文献报道, 作者在对灯盏乙素进行人体药动力学研究时发现, 经口给予灯盏花素

分散片后血浆中灯盏乙素质量浓度很低, 但存在一代代谢产物, 经结构确认为其同分异构体, 即异灯盏乙素, 与文献报道一致^[4-5]。因此, 作者建立了 LC-MS/MS 法测定血浆中异灯盏乙素质量浓度的方法, 对灯盏花素分散片进行生物利用度评价, 为其临床合理用药提供依据。

1 仪器与材料

Quattro Micro 三重四极杆质谱仪 (配有电喷雾离子源 (ESI 源)), Waters 2695 液相色谱系统 (配有四元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱)、MassLynx 4.0 软件 (美国 Waters 公司)。

异灯盏乙素对照品 (自制, 含量质量分数 93.8%), 黄芩苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110715-200815), 灯盏花素分散片 (受试制剂, 批号 090801, 每片含灯盏花素 20 mg 漯河南街村全威制药股份有限公司), 灯盏花素片 (参比制剂, 批号 20090603, 每片含灯盏花素 20 mg 昆明兴中制药有限责任公司), 甲醇 (色谱纯, 市售), 水为纯净水。

收稿日期: 2010-12-06

作者简介: 杨铁耀 (1966-), 男 (汉族), 广东深圳人, 副主任药师, 主要从事药剂学和中药现代化研究, Tel 0755-82418090 E-mail yangtieyao@163.com。

2 方法与结果

2.1 试验对象

共筛选了 24 位男性受试者, 18 位入选, 年龄 21~26 岁, 体质量 50~75 kg, 身高 157~175 cm, 无烟嗜好。经体检合格后, 签署知情同意书, 并经伦理委员会审批同意。试验前经病史询问、体格检查和实验室检查未发现有临床意义的异常指标。受试者无药物过敏史和药物依赖史, 无精神病史以及其他慢性病史。试验前 2 周内未服任何药物, 受试期间统一清淡饮食。

2.2 试验方法

采用开放、随机、双交叉、两周期、单剂量口服的单中心试验设计。18 名受试者随机等分为 A、B 两组, 每组受试者每次试验分别服用受试制剂或参比制剂。受试者于试验前 1 d 晚餐后, 禁食不禁水 12 h, 次日清晨空腹分别单次经口给予含灯盏花素 80 mg 的受试制剂或参比制剂, 以 200 mL 温开水送服, 并作记录。服药 2 h 后进统一标准早餐, 可自由饮水。试验期间由医护人员进行监护。间隔 1 周后交叉给药, 重复上述试验。分别于给药前 (0 h) 和给药后 1、2、3、4、5、6、8、10、12、16、24 h 从臂静脉取血 4 mL, 立即移入肝素试管中, $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 分离血浆 1.5 mL, 加 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸 150 μL , 混匀, 立即冷冻于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.3 血样测定方法

2.3.1 色谱、质谱条件

色谱柱: Zorbax SB C_{18} 柱 (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水-甲酸 (体积比 65:35:0.5); 流速: $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量: 20 μL ; 柱温: 室温。

离子源: ESI 源; 加热毛细管温度: $320\text{ }^{\circ}\text{C}$; 锥孔气体流速: $50\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$; 去溶剂气体流速: $450\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$; Multiplier 700 V; LM1 和 LM2 分辨率均为 11, 离子能 1 电压: 0.5 V; 离子能 2 电压: 3 V; 碰撞气压: 37.72 Pa 正离子方式检测; 扫描方式为选择反应监测 (SRM), 用于定量分析的离子反应分别为 $m/z\ 463\rightarrow m/z\ 287$ (异灯盏乙素) 和 $m/z\ 447\rightarrow m/z\ 271$ (黄芩苷); 扫描时间为 0.3 s。

2.3.2 血浆样品处理

取血浆 0.5 mL, 加入体积分数 1% 甲酸甲醇溶液 100 μL , 质量浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩苷内标溶液 100 μL , 水 200 μL ; 加乙酸乙酯 3 mL, 涡旋萃

取 1 min, $3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液于另一试管中, 于氮气流下吹干, 残留物加入流动相 150 μL 溶解, 混匀, 取 20 μL 进样分析。

2.3.3 专属性考察

分别取受试者空白血浆、加入一定质量浓度异灯盏乙素标准溶液与内标溶液的空白血浆及给药后收集的血浆各 0.5 mL, 按“2.3.2”条方法操作, 进样 20 μL , 得色谱图见图 1, 异灯盏乙素和内标的保留时间分别为 7.50 min 和 5.50 min, 结果表明, 空白血浆中的内源性物质不干扰异灯盏乙素和内标黄芩苷的测定。

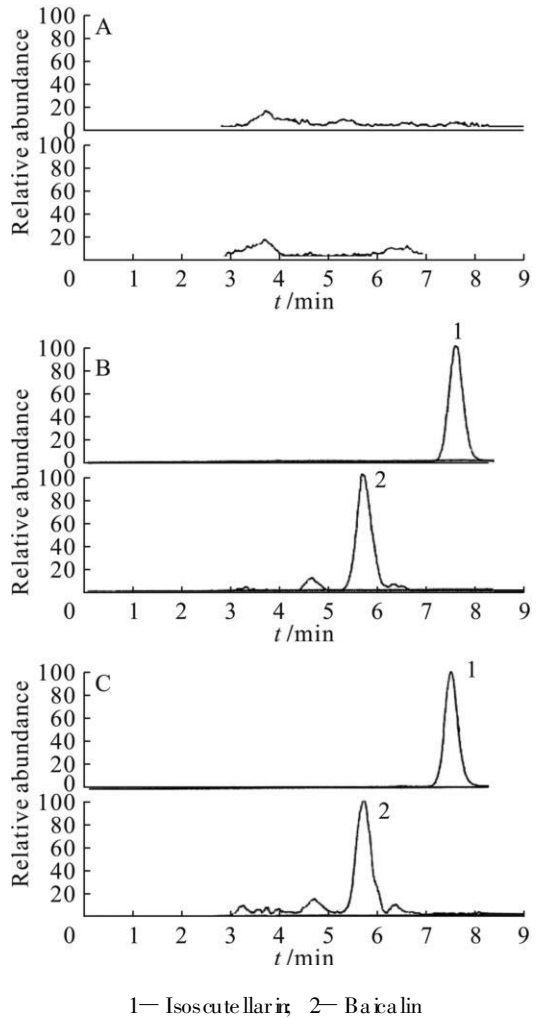
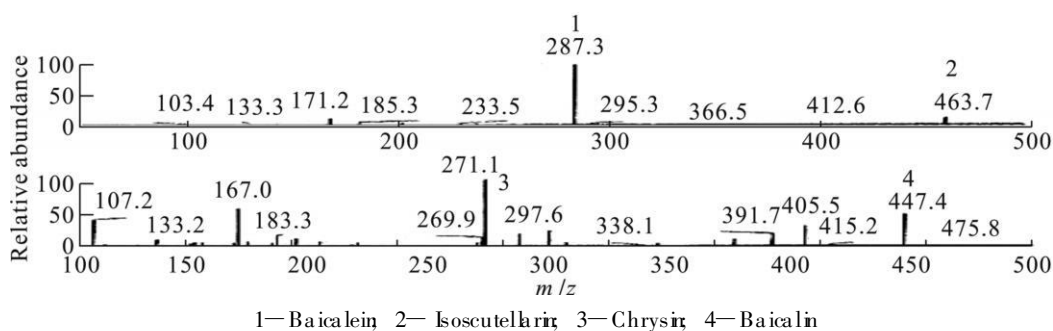


Fig 1 Mass spectrogram chromatograms of blank plasma (A), blank plasma spiked with isoscutellarin ($50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and IS (baicalin $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (B), plasma sample obtained from a volunteer after an oral dose of 80 mg breviscapine for 7 h and IS (baicalin $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (C)

2.3.4 质谱特征离子图

异灯盏乙素、内标的离子图见图 2。



1—Baicalin 2—Isoscutellarin 3—Chrysin 4—Baicalin

Fig 2 Two full-scan mass spectra of isoscutellarin(m/z 50 \rightarrow m/z 500) and internal standard baicalin(m/z 100 \rightarrow m/z 500)

2.3.5 标准曲线与定量下限

用空白血浆将异灯盏乙素标准储备液稀释为 0.5~400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列质量浓度溶液,按“2.3.2”条方法操作,以异灯盏乙素与内标的峰面积比(A)对样品质量浓度(ρ , $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)进行线性回归。标准曲线方程为: $A = 2.617 \times 10^{-3} \rho - 3.548 \times 10^{-4}$ ($r = 0.9997$)。线性范围为 0.5~400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 定量下限为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3.6 提取回收率

取空白血浆及对照溶液,按“2.3.2”条方法制备异灯盏乙素质量浓度为 2.0, 20.0, 360 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 低、中、高 3 个质量浓度的样品,每个质量浓度平行制备 5 份。同时,另取空白血浆,除不加对照溶液,按“2.3.2”条方法测定,以每一浓度两种处理方法的峰面积比值计算提取回收率,低、中、高 3 个质量浓度样品的提取回收率在 43.2%~50.1% 内。

Table 1 Main pharmacokinetic parameters for 18 healthy volunteers after administration of test or reference preparations

Item	$\rho_{\max}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	t_{\max}/h	$t_{1/2}/\text{h}$	$\text{AUC}_{0-t}/(\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1})$	$\text{AUC}_{0-\infty}/(\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1})$	$F/\%$
Breviscapine dispersible tablet	75.81 ± 23.24	6.50 ± 1.34	2.77 ± 0.70	454.05 ± 194.72	460.09 ± 199.80	116.5 ± 43.5
Breviscapine tablet	62.17 ± 17.82	7.78 ± 1.52	2.82 ± 0.84	403.87 ± 133.28	410.34 ± 137.09	

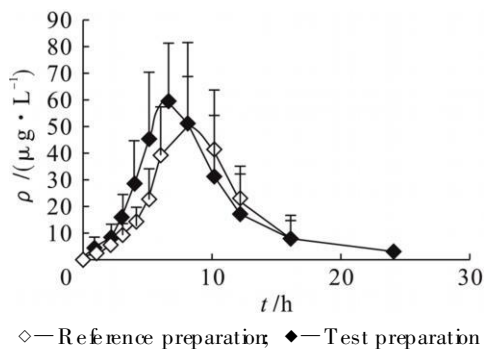


Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of breviscapine from subjects after oral administration of reference or test preparations

2.3.7 稳定性考察

用空白血浆配制相当于异灯盏乙素质量浓度为 2.0, 360 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的样品分别于室温条件下放置 0, 12 h, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻条件下放置 0, 30 d, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻后室温融化, 反复 3 次; 按“2.3.2”条方法进行血药质量浓度测定。结果显示, 室温放置稳定性、冻存稳定性和冻融稳定性试验的测定值与添加值的相对偏差 (RE) 均 < 12%, 结果表明分析测试过程中的样品较为稳定。

2.4 数据处理及等效评价标准

利用 DAS 2.0 统计软件计算药动学参数。 ρ_{\max} , AUC 经对数转换后进行方差分析及单侧 t 检验考察。

2.5 药动学参数与药时曲线

18 名健康受试者经口给予灯盏花素片参比制剂和灯盏花素分散片受试制剂后的主要药动学参数见表 1 平均血药质量浓度-时间曲线见图 3。

2.6 生物利用度评价

受试制剂与参比制剂中灯盏花素的 ρ_{\max} 分别为 (75.81 ± 23.24) 和 (62.17 ± 17.82) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; t_{\max} 分别为 (6.50 ± 1.34) 和 (7.78 ± 1.52) h; AUC_{0-t} 分别为 (454.1 ± 194.7) 和 (403.9 ± 133.3) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别为 (460.1 ± 199.8) 和 (410.3 ± 137.1) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 。受试制剂 ρ_{\max} 比参比制剂大, 疗效更高; 受试制剂 t_{\max} 比参比制剂小, 起效更快; 受试制剂对参比制剂的相对生物利用度 (F , 以 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 作为评价依据) 为 (116.5 ± 43.5)%, 灯盏花素分散片的生物利用

度较普通片高。

3 讨论与结论

a. 作者建立了测定血浆中异灯盏乙素的 LC-MS/MS 法, 此方法操作简便快速、灵敏度高、精密度好, 适用于灯盏花素制剂的人体药动学和生物利用度研究。

b. 本试验得到的药动学参数, 经生物利用度评价, 受试制剂灯盏花素分散片与参比制剂灯盏花素的 ρ_{\max} 、 t_{\max} 、 AUC_{0-1} 和 $AUC_{0-\infty}$ 均具有显著性差异。分散片是指在水中能迅速崩解并均匀分散的片剂, 具有速崩、速效、服用方便等特点。分散片在 19~21℃ 水中一般 3 min 内完全崩解, 可改善某些药物的吸收度, 并可使药物的峰浓度增加, 达峰时间缩短; 分散片放入水中可分散成均匀的混悬液, 服用方便, 特别适于老、幼和有吞咽功能障碍的患者。分散片的这些特点使它与普通片剂相比具有临床疗效及应用上的优势, 是一种符合临床需求、有广阔发展前景的新剂型。试验中的受试制剂灯盏花素分散片与参比制剂灯盏花素片相比, 在体内能迅速崩解并均匀分散, 使吸收加

快, 达峰时间缩短, 因此受试制剂 t_{\max} 比参比制剂小, ρ_{\max} 比参比制剂高, 疗效更高, 起效更快。结果表明灯盏花素分散片比灯盏花素片生物利用度高, 且灯盏花素分散片具有速效的优点, 为灯盏花素分散片的临床应用提供了参考依据。

参考文献:

- [1] 蒋学华, 李素华, 兰轲, 等. 灯盏花素在家犬体内的药代动力学 [J]. 药学学报, 2003, 38(5): 371-373.
- [2] 葛庆华, 周臻, 支晓瑾, 等. 灯盏花素在犬体内的药动学和绝对生物利用度研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(12): 618-620, 632.
- [3] 居文政, 张军, 谈恒山, 等. 高效液相-质谱联用法 (HPLC-MS) 测定灯盏乙素血药浓度及其临床药代动力学研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(3): 298-301.
- [4] 王健康, 董晓莉, 杨汉煜, 等. 用灯盏乙素定量人血浆中异灯盏乙素的 LC-MS/MS 方法探讨 [J]. 空军总医院学报, 2007, 23(2): 83-87.
- [5] 高慧敏, 王智民, 田娟. 灯盏花素在正常和模型大鼠中的药代动力学及代谢物研究 [J]. 药学学报, 2005, 40(11): 1024-1027.

Bioequivalence of breviscapine dispersible tablets in healthy volunteers

YANG Tie-yao¹, WU Xiaoming¹, LI Huanming², LI Qing³, BIK Aishun³

(1 TCM & Natural Product Research Center, Shenzhen Research Institute of Tsinghua University, Shenzhen 518057, China; 2 Cardiology, Tianjin the Fourth Center Hospital, Tianjin 300140, China; 3 School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract Objective To evaluate the bioequivalence of breviscapine dispersible tablets and breviscapine tablets. **Methods** A randomized crossover study was conducted in 18 healthy volunteers. After a single dose of test and reference preparations (containing 80 mg breviscapine), the plasma drug levels were determined by LC-MS/MS. The related pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.0 and the bioavailability of the two preparations was evaluated by variance analysis and two-sided t tests by 90% confidence interval method. **Results** The main pharmacokinetic parameters of the test and reference preparations were as follows: ρ_{\max} was (75.81 ± 23.24) and (62.17 ± 17.82) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; t_{\max} was (6.50 ± 1.34) and (7.78 ± 1.52) h; AUC_{0-1} was (454.1 ± 194.7) and (403.9 ± 133.3) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$; $AUC_{0-\infty}$ was (460.1 ± 199.8) and (410.3 ± 137.1) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$. The relative bioavailability of breviscapine dispersible tablets was (116.5 ± 43.5)% as against the reference preparation. **Conclusions** The two formulations are non-bioequivalent.

Key words breviscapine; LC-MS/MS; bioavailability; dispersible tablet