

灯盏花素微丸胶囊在大鼠体内相对生物利用度研究*

李 聪¹, 高 晶², 刘红斌¹, 杨坤芬¹, 曾 勇², 孙 敏¹, 刘昌孝², 王京昆^{1△}

(1. 云南省药物研究所, 云南昆明 650111; 2. 天津药物研究院, 天津 300193)

〔摘 要〕目的: 探讨灯盏花素微丸在大鼠体内药动学规律, 并进行相对生物利用度研究。方法: 采用大鼠双周期交叉试验设计, 对大鼠口服灯盏花素微丸胶囊和灯盏花素片的动力学参数进行比较。结果: 灯盏花素微丸胶囊和灯盏花素片的主要药代参数: T_{peak} 分别为 (5.50 ± 1.05) h 和 (4.17 ± 0.41) h; $t_{1/2ke}$ 分别为 (2.97 ± 0.17) h 和 (2.04 ± 0.74) h; C_{max} 分别为 (1.50 ± 0.52) $\mu\text{g/mL}$ 和 (0.48 ± 0.18) $\mu\text{g/mL}$; AUC_{0-1} 分别为 (6.09 ± 0.80) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 和 (2.00 ± 0.40) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$ 。灯盏花素微丸胶囊和灯盏花素片的 T_{peak} 和 $t_{1/2ke}$ 具有明显统计学差异 ($P < 0.05$), 灯盏花素微丸胶囊相对于灯盏花素片的生物利用度为 303.92%。结论 灯盏花素微丸胶囊的相对生物利用度明显高于灯盏花素片。

〔关键词〕灯盏花素; 灯盏乙素; 相对生物利用度; 药代动力学; 高效液相色谱法

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2010)06—0055—03

灯盏花类制剂早在 70 年代初期开始应用于临床, 对原发性高血压、脑出血、脑血栓形成, 脑栓塞、多发性神经炎、慢性脊髓蛛网膜炎及其后遗症具有较好疗效, 并对风湿病、冠心病也有一定疗效^[1]。大量文献报道, 灯盏花素是灯盏花甲素和灯盏花乙素 (又称野黄芩苷 scutellarin) 的混合物, 其主要活性成分为灯盏花乙素, 约占灯盏花素的 95% 以上。其化学名为 4', 5, 6-三羟基黄酮-7-葡萄糖醛酸苷。尽管灯盏花类药物应用临床较早, 但都普遍存在着吸收差、半衰期短、生物利用度低等现象^[2]。为了解决吸收差、生物利用度低等问题, 云南省药物研究所将灯盏花素制剂开发成微丸胶囊, 目的是希望能够增加吸收, 提高生物利用度。该微丸含灯盏花素 40mg, 胶囊每粒装量约 300mg, 成丸材料为微晶纤维素、乳糖、淀粉、吐温 80 等, 丸径大小在 20 ~ 40 目之间, 约 0.8mm。

1 实验部分

1.1 试剂、仪器和实验动物

灯盏花素微丸胶囊 (云南省药物研究所, 40mg/粒, 批号: 20041215); 灯盏花素片 (云南

植物药业有限公司, 20mg/片, 批号: 20041101); 灯盏花乙素对照品 (中国药品生物制品检定所, 含量 97.1%, 批号: 110842-200403); 甲醇为色谱纯; 醋酸为分析纯; 水为超纯水。

美国 SSI P4000 高压液相泵, 岛津 SPD-10A UV 检测器, LabAlliance AS3000 自动进样器, ANASTAR 色谱数据工作站; Sartorius BS 系列电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); TGL-16C 台式高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); LD5-2A 低速离心机 (北京医用离心机厂); H-1 旋涡混合器 (上海沪西分析仪器厂)。

Wistar 大鼠 12 只 (雌雄兼用, 军事医学科学院卫生环境医学研究所实验中心, 医动字第 005 号, 体重 $195\text{g} \pm 15\text{g}$)。

1.2 方法与结果

1.2.1 对照品溶液的配制

取灯盏花乙素对照品适量, 加甲醇溶解并稀释成浓度为 $1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为标准储备液, 将标准储备液以流动相逐级稀释成 1, 5, 10, 30, 100 和 300 $\mu\text{g/mL}$ 的灯盏花乙素的系列标准溶液, 置冰箱 4℃ 避光保存备用。

* 基金项目: 云南省科技厅新药研究开发专项计划资助项目 (2000XY10)

收稿日期: 2010—03—15 修回日期: 2010—11—16

作者简介: 李聪 (1979 ~), 男, 云南昆明人, 工程师, 主要从事药理学研究工作。△通讯作者: Tel: 0871-8411937-8003, Fax: 0871-8417776, E-mail: wjkyimm@163.com

1.2.2 血样处理方法及测定

取血清 500 μ L，加1 000 μ L 甲醇，振摇 30 秒，放置 30min，离心（12 000r/min）5min，取上清液进样测定。记录灯盏花乙素峰面积，外标法计算血样中灯盏花乙素的浓度。

1.2.3 色谱条件

DiamonsilTM C18 色谱柱（250mm $\times$ 4.6mm，5 μ m，迪马公司）；流动相为甲醇：水：醋酸（40：60：1），脱气后经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过；

流速 1mL/min；检测波长 334nm；检测灵敏度 0.005AUFS；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样量 20 μ L。

1.2.4 专属性试验

在上述色谱条件下，空白血浆（A）、空白血浆中加入灯盏花乙素对照品（B）及大鼠灌胃灯盏花素微丸胶囊后 6h 的实际样品（C）按 1.2.2 处理后的溶液色谱图见图 1。由图可见，在上述色谱条件下，分离效果良好，灯盏花乙素的保留时间约为 10.1min。内源性物质无干扰。

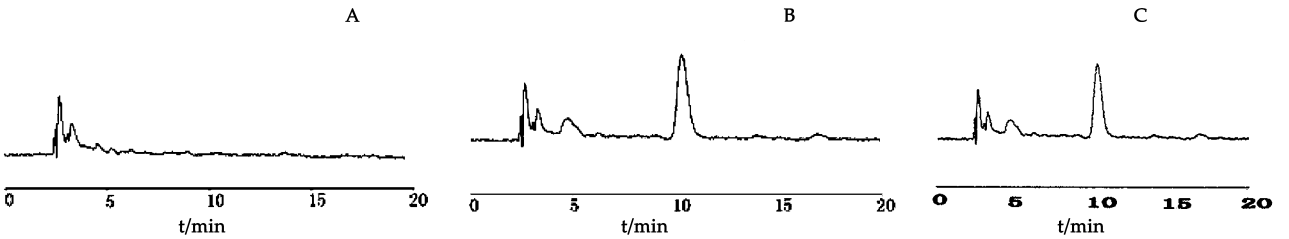


图 1 大鼠血样 HPLC 色谱图

1.2.5 方法学研究

1.2.5.1 标准曲线的制备

取大鼠空白血清 450 μ L，依次加入 1.2.1 中所述灯盏花乙素标准系列溶液各 50 μ L，配制成相当于血清灯盏花乙素浓度为 0.1、0.5、1.0、3.0、10.0 和 30.0 μ g/mL 的标准血清样品，按“1.2.2”项下的方法处理后测定峰面积，以灯盏花乙素浓度为横坐标，灯盏花乙素的峰面积为纵坐标，建立标准曲线，用加权（1/C²）最小二乘法进行回归运算，求其回归方程为 $Y = 2998.0999X - 169.4623$ ；相关系数 $r = 0.9999$ ；线性范围 0.1 ~ 30 μ g/mL，最低检测限为 0.1 μ g/mL。

1.2.5.2 方法回收率试验

按标准曲线操作法配制终浓度分别为 0.5、3 和 30 μ g/mL 的血清样品，每个浓度配制 5 份样品，按“1.2.2”项下的方法处理后测定峰面积，计算浓度，以已知浓度的灯盏花乙素标准溶液为 100%，计算其回收率结果见表 1。结果表明本法测定准确性高。

1.2.5.3 方法的精密度

在空白血浆中精密加入灯盏花乙素标准液，使其浓度分别为 0.5、3.0 和 30.0 μ g/mL，每个浓度 5 个样本，按“1.2.2”项下方法操作处理血样后测定，分别于同日内测定及连续 3d 内测定 5 次，计算日内精密度和日间精密度，结果见表 2。结果表明本法重复性好。

表 2 灯盏花乙素在血样中的精密度（ $n=5$ ， $\bar{x} \pm s$ ）

加入量 / (μ g/mL)	日内		日间	
	测得值 / (μ g/mL)	RSD /%	测得值 / (μ g/mL)	RSD /%
0.5	0.65 $\pm$ 0.04	6.15	0.63 $\pm$ 0.06	9.52
3	3.05 $\pm$ 0.28	9.18	2.87 $\pm$ 0.08	2.79
30	30.06 $\pm$ 1.33	4.42	31.13 $\pm$ 1.65	5.30

1.2.5.4 稳定性考察

在空白血清中精密加入灯盏花乙素标准液，使其浓度分别为 0.5、3 和 30 μ g/mL，每个浓度 3 个样本。将处理后血样分别于室温和 4 $^{\circ}$ C 存放 72h；未处理血样分别于室温、4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C 存放 24h、冻-融化循环 3 次和 -20 $^{\circ}$ C 存放 5d，按“1.2.2”项下方法操作处理血样后测定，其含量变化均小于

表 1 灯盏花乙素在血样中的回收率（ $n=5$ ， $\bar{x} \pm s$ ）

加入量/ (μ g/mL)	回收率/%	RSD/%
0.5	107.25 $\pm$ 2.40	2.24
3	100.87 $\pm$ 1.10	1.09
30	101.97 $\pm$ 3.56	3.49

10%, 说明灯盏花乙素在此条件下稳定。

1.2.6 给药方法和样品采集

将灯盏花素微丸胶囊的内容物颗粒倒出, 放入注射器内, 以少量水将胶囊颗粒灌入大鼠胃内, 再灌入少量水, 剂量为 100mg/kg (以灯盏花乙素计), 以同等剂量的灯盏花素片作参比对照。分别于灌胃后 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 和 10 h 静脉取血 0.5 mL, 分离血清, 按“1.2.2”项下方法操作处理血样后测定血药浓度。

1.2.7 血药浓度测定结果

按“1.2.2”项下方法操作处理血样后测定, 以不同时间的血清灯盏花乙素浓度, 绘制平均血药浓度-时间曲线。

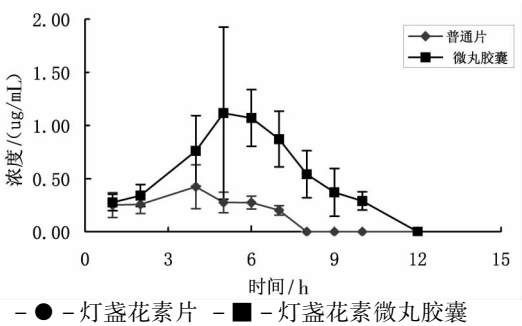


图2 大鼠口服灯盏花制剂的平均血药浓度-时间曲线

1.2.8 药动学参数的处理

采用中国药理学学会 3P97 实用药代计算程序计算药代参数, 根据血药浓度-时间数据, 采用梯形法计算 AUC 值, 以半对数作图法, 由消除相末端的浓度点计算 $t_{1/2}$ 。用 t 检验法对主要药代参数进行显著性检验, 结果见表 3。

表3 大鼠口服灯盏花素微丸胶囊和灯盏花素片后的主要药代参数比较 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

	$t_{1/2ke}/h$	T_{peak}/h	$C_{max}/(\mu g/mL)$	$AUC_{0-1}/(\mu g \cdot h/mL)$
灯盏花素片	2.04 ± 0.74	4.17 ± 0.41	0.48 ± 0.18	2.00 ± 0.40
灯盏花素微丸	2.97 ± 0.17	5.50 ± 1.05	1.50 ± 0.52	6.09 ± 0.80
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

1.2.9 相对生物利用度计算

根据灯盏花素微丸和灯盏花素片的 AUC_{0-1} , 按下列公式计算灯盏花素微丸相对于灯盏花素片的相对生物利用度 ($F_{0-1}\%$)。

$$F_{0-1}\% = \text{受试制剂 } AUC_{0-1} / \text{参比制剂 } AUC_{0-1} \times 100\%$$

计算得灯盏花素微丸相对于灯盏花素片的生物利用度为 303.92%。

2 讨论

大鼠口服给予灯盏花素缓释胶囊 100mg/kg 后, 与同等剂量的灯盏花素片相比血药浓度明显提高, 生物利用度提高 3 倍; 药代参数计算结果表明灯盏花素微丸胶囊组的峰浓度 (C_{max})、血药浓度-时间曲线下面积 (AUC) 与灯盏花素片组相比明显提高 ($P < 0.05$), 达峰时间 (T_{peak})、表观消除半衰期 ($t_{1/2}$) 比灯盏花素片组明显延长 ($P < 0.05$), 说明达到了剂型改进的预期效果, 弥补了灯盏花素普通片的不足, 另外该微丸胶囊还具有一定程度的缓释作用。

灯盏花素的口服吸收利用度一直偏低, 注射剂的使用还是存在安全性的问题, 如何找到更佳的给药途径, 是将灯盏花这一云南民族医药瑰宝推向更广阔市场的关键因素。

[参考文献]

[1] 云南省药物研究所. 灯盏细辛化学成分的研究 [J]. 中草药通讯. 1976, 11: 11-14.

[2] 蒋学华. 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.

[3] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题 [J]. 药物分析杂志. 1996, 16: 343-346.

[4] 葛庆华. 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, 84 (12): 618-632.

(编辑: 迟 越)
(英文摘要见第 65 页)