

灯盏花素磷脂复合物自微乳 在 Beagle 犬体内药代动力学及生物利用度

陈小新¹, 肖日平², 周晓丽¹, 廖小英¹, 李耿², 龙超峰^{1*}

(1. 广东华南药业集团有限公司, 广东 东莞 523325; 2. 广州中医药大学, 广州 510405)

[摘要] 目的: 建立 Beagle 犬血浆中灯盏乙素的定量分析方法, 测定灯盏乙素在 Beagle 犬体内血药浓度经时过程, 评价灯盏花素磷脂复合物自微乳的药代动力学及相对生物利用度。方法: 单剂量分别灌胃给予 Beagle 犬灯盏花素磷脂复合物自微乳及灯盏花素片, 采用 HPLC 测定血浆中灯盏乙素的浓度, 流动相甲醇-0.2% 磷酸水 (45:55), 检测波长 335 nm。运用 DAS2.1.1 软件程序拟合药物浓度-时间曲线, 计算药代动力学参数和生物利用度。结果: 灯盏花素磷脂复合物自微乳、灯盏花素片灌胃 Beagle 犬后灯盏乙素药-时曲线均符合二室模型, 主要药代动力学参数 T_{max} 分别为 190 min 和 160 min, C_{max} 分别为 $78.98 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $33.63 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, AUC_{0-t} 分别为 $18\,674.619 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$ 和 $9\,132.475 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$; 相对生物利用度 204.49%。结论: 灯盏花素磷脂复合物自微乳较灯盏花素片能显著提高灯盏乙素在 Beagle 犬体内的生物利用度, 为灯盏花素口服制剂的开发提供新方向。

[关键词] 灯盏花素; 磷脂复合物; 自微乳; 药代动力学; 灯盏乙素; 生物利用度; 原儿茶醛

[中图分类号] R283.6; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0132-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014210132

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.0953.006.html>

[网络出版时间] 2014-10-10 9:53:45

Pharmacokinetics and Bioavailability of Breviscapine Phospholipid Complex Self-microemulsions in Beagle Dogs

CHEN Xiao-xin¹, XIAO Ri-ping², ZHOU Xiao-li¹, LIAO Xiao-ying¹, LI Geng², LONG Chao-feng^{1*}

(1. Guangdong Huanan Pharmaceutical Group Co. Ltd, Dongguan 523325, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative analysis method for pharmacokinetics and bioavailability of breviscapine phospholipid complex self-microemulsions in Beagle dogs. **Method:** Beagle dogs were administered with breviscapine phospholipid complex self-microemulsions and breviscapine tablets at single dose, respectively. HPLC was adopted to determine the concentration of scutellarin in plasma with mobile phase of methanol-0.2% phosphoric acid solution (45:55) and detection wavelength at 335 nm. Pharmacokinetics parameters and bioavailability was calculated by DAS2.1.1 software program. **Result:** Plasma concentration-time profiles of scutellarin in these two preparations were fitted to double-compartment model, T_{max} of breviscapine phospholipid complex self-microemulsions and breviscapine tablets were 190 min and 160 min, C_{max} were $78.98 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $33.63 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, AUC_{0-t} were $18\,674.619 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$ and $9\,132.475 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$, respectively. Relative bioavailability of self-microemulsions relative to tablets was 204.49%. **Conclusion:** Breviscapine phospholipid complex self-microemulsions can significantly improve bioavailability of scutellarin in Beagle dogs,

[收稿日期] 20140620(012)

[基金项目] 广东省民营科技企业自主创新试点项目(2009B070400002)

[第一作者] 陈小新, 博士, 高级工程师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:0769-86100111, E-mail: chenzy2000@aliyun.com

[通讯作者] *龙超峰, 硕士, 高级工程师, 从事新药研究与开发, Tel:0769-86100111, E-mail: longcf88@sina.com

which provides a new direction for development of oral preparations of breviscapine.

[**Key words**] breviscapine; phospholipid complex; self-microemulsions; pharmacokinetics; scutellarin; bioavailability; protocatechualdehyde

灯盏花素是从菊科植物短葶飞蓬中提取分离得到的一类黄酮类物质,主要成分为灯盏乙素,另含有少量灯盏甲素及其他黄酮类成分^[1]。药效学研究表明灯盏花素具有扩张脑血管、改善微循环、改善血液流变性、缩小心肌梗塞范围、提高机体耐缺氧等作用^[2-6],广泛用于治疗脑血栓形成、脑梗塞及缺血性心血管疾病等。但灯盏花素为水不溶、脂不溶性药物^[7-8],口服生物利用度极低^[9],影响了其口服制剂的临床效果,导致临床应用受到极大限制。磷脂复合物-自微乳给药系统能提高难溶性药物的溶解度,改善药物的透膜性,从而显著提高药物的生物利用度^[10-12]。在前期研究已制备了灯盏花素磷脂复合物自微乳的基础上,本实验建立 HPLC 测定 Beagle 犬血浆中灯盏乙素血药浓度的方法,以市售灯盏花素片为参比制剂,分析灯盏花素磷脂复合物自微乳在 Beagle 犬体内的药代动力学性质并进行了生物利用度比较,为该自微乳口服制剂的开发提供实验依据。

1 材料

P580 型高效液相色谱仪(美国戴安公司),CP225D 型 1/10 万电子分析天平(德国赛多利斯集团),TDL-5-A 型离心机(上海安亭科学仪器厂),XW-80A 型旋涡混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

灯盏花素片(广东彼迪药业有限公司,批号 121001,20 mg/片),灯盏花素磷脂复合物自微乳(广东华南药业集团有限公司,批号 13092901,含药量 30 mg·g⁻¹),灯盏乙素、原儿茶醛对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110842-200605,110810-201007),甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

Beagle 犬 3 只(雄性 2 只,雌性 1 只),体重(20±2.5) kg,由广东省高要市康达实验动物科技有限公司提供,动物合格证号 SCXK(粤)2009-0009。

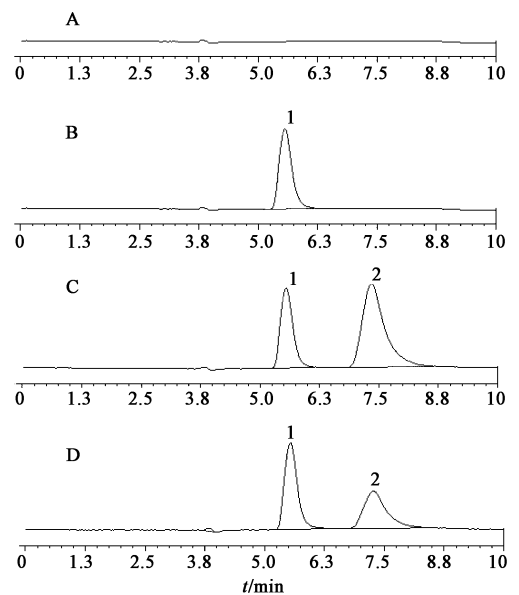
2 方法和结果

2.1 溶液的配制 精密称取灯盏乙素对照品 10 mg,加甲醇溶解并稀释成 1 g·L⁻¹的对照品储备液。精密称取原儿茶醛 2 mg,加甲醇溶解并稀释至 200 mg·L⁻¹,作为内标溶液。以上溶液均置于 4 ℃

冰箱中冷藏保存,备用。

2.2 血浆样品处理 精密吸取血浆样品 0.5 mL,精密加入甲醇 1 mL 和内标溶液 20 μL,涡旋混合 5 min,于 5 000 r·min⁻¹离心 5 min,精密吸取上清液 20 μL 进样分析。

2.3 色谱条件及专属性试验 Phenomenex-ODS 色谱柱(4.0 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.2%磷酸水(45:55),检测波长 335 nm,进样量 20 μL。取空白血浆、空白血浆加灯盏乙素对照品及 Beagle 犬灌胃给药后血浆样品,按上述色谱条件进行测定,见图 1。表明犬血浆中内源性杂质不干扰灯盏乙素和原儿茶醛的测定,灯盏乙素和原儿茶醛峰形良好,二者色谱峰的分离度 2.8,符合血浆样品测定要求。



A. 空白血浆;B. 空白血浆+原儿茶醛;
C. 空白血浆+原儿茶醛+对照品;D. 供试品+原儿茶醛;
1. 原儿茶醛;2. 灯盏乙素

图 1 灯盏花素磷脂复合物自微乳灌胃
Beagle 犬后血浆样品 HPLC

2.4 线性关系考察 取 Beagle 犬空白血浆 500 μL,加入适量对照品储备液,用流动相逐级稀释成 5, 10, 20, 30, 45, 100, 140 mg·L⁻¹ 的系列对照品溶液,按 2.2 项下方法处理,制成含不同浓度灯盏乙素的血浆供试品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,灯盏乙素与原儿茶醛的峰面积比值

为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.0453X - 0.1858$ ($r = 0.9987$),线性范围 $5 \sim 140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5 回收率试验 配制 $5, 45, 140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的灯盏乙素血浆样品各 5 份,按 2.2 项下方法处理,按 2.3 项下色谱条件测定,结果测得量分别为 (5.85 ± 0.24) , (45.27 ± 0.48) , $(139.10 \pm 1.71) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,计算平均回收率依次为 116.91% , 100.59% , 99.36% ,RSD 分别为 4.18% , 1.01% , 1.23% ,符合生物样品分析要求。

2.6 精密度试验 配制 $5, 45, 140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的灯盏乙素血浆样品各 5 份,按 2.2 项下方法处理,按 2.3 项下色谱条件于 1 d 内和不同日各连续测定 5 次,

结果低、中、高质量浓度的灯盏乙素血浆样品日内精密 RSD 分别为 4.04% , 1.22% , 1.42% ,日间精密 RSD 分别为 5.20% , 1.51% , 1.17% ,说明本方法精密良好。

2.7 稳定性试验 配制 $5, 45, 140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的灯盏乙素血浆样品各 5 份,分别置于室温、反复冻融及 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰冻条件下,按 2.2 项下方法处理,按 2.3 项下色谱条件测定,计算血浆样品中灯盏乙素含量,见表 1。结果表明灯盏乙素血浆样品在室温下放置 8 h、冻融 3 次及冰冻放置 24 h 条件下含量测定结果的 RSD 均 $\leq 4.35\%$,表明这些条件下血浆样品的稳定性良好。

表 1 灯盏花素磷脂复合物自微乳灌胃给药后血浆样品的稳定性试验 ($n = 5$)

质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	室温		冻融 3 次		$-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻 24 h	
	测得值/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	测得值/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%	测得值/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	RSD/%
5	5.72 ± 0.13	2.3	5.80 ± 0.16	2.72	5.70 ± 0.25	4.35
45	45.21 ± 0.30	0.66	45.41 ± 0.55	1.20	45.01 ± 0.38	0.85
140	139.02 ± 1.18	0.85	139.55 ± 0.72	0.51	139.13 ± 1.77	1.27

2.8 试验方案与血样采集 Beagle 犬试验前 12 h 禁食不禁水,分别按剂量 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以灯盏乙素计)灌胃灯盏花素片,2 周清洗期后给予灯盏花素磷脂复合物自微乳,分别于给药后 10, 20, 30, 60, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 480, 720 min 前肢静脉取血 2 mL,置于含肝素钠离心管中,于 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液,置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,备用。按 2.2 项下方法处理,按 2.3 项下色谱条件测定各时间点血浆样品中灯盏乙素含量,绘制药-时曲线,见图 2。

物利用度 204.49% 。

表 2 Beagle 犬灌胃灯盏花素磷脂复合物自微乳和灯盏花素片的药动学参数 ($n = 3$)

参数	灯盏花素磷脂复合物自微乳	灯盏花素片
$t_{1/2ka}/\text{min}$	24.77	55.88
$\text{AUC}_{(0-t)}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$	18 674.619	9 132.475
$\text{AUC}_{(0-\infty)}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}$	19 950.70	10 997.21
$\text{MRT}_{(0-t)}/\text{min}$	261.01	284.38
$\text{MRT}_{(0-\infty)}/\text{min}$	308.65	421.10
$C_{\text{max}}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	78.98	33.63
$T_{\text{max}}/\text{min}$	190	160

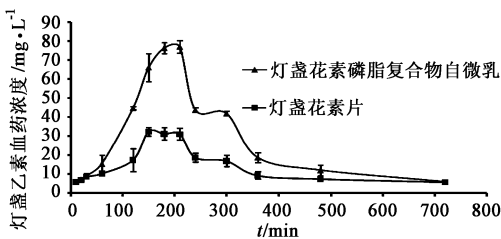


图 2 灯盏花素不同制剂灌胃给药后不同时间点血浆样品药-时曲线

采用 DAS2.1.1 药动学智能分析软件处理试验数据,经软件拟合,确定灯盏花素磷脂复合物自微乳及灯盏花素片灌胃 Beagle 犬后灯盏乙素在其体内符合双室模型,主要药动学参数见表 2。结果表明 Beagle 犬灌胃灯盏花素磷脂复合物自微乳后达峰质量浓度 (C_{max}) 为灌胃灯盏花素片的 2.35 倍,相对生

3 讨论

灯盏花素因其毒性低、疗效好而成为临床心脑血管疾病应用较多的药物,但其注射液不良反应严重,口服制剂由于水溶性差而导致口服生物利用度低,故影响了其临床疗效的发挥,临床应用受到较大限制。灯盏花素属于生物药剂学分类系统^[13]中第 IV 类药物,即低溶解度和低通透性的药物,提高其口服生物利用度的关键在于提高溶解度和细胞膜的通透性。

近年关于提高灯盏花素生物利用度的研究较多,如灯盏花素前体脂质体^[14]、灯盏花素 PAMAM 树状聚合物^[15]、灯盏花素环糊精包合物^[16]等。前

期研究创造性地结合磷脂复合物及自微乳给药系统的优点并互相弥补了二者在灯盏花素载药制剂上的缺点,制备了灯盏花素磷脂复合物自微乳,通过药动学研究发现,灯盏花素磷脂复合物自微乳能显著提高灯盏花素在 Beagle 犬体内生物利用度。原因可能在于以下几个方面:①灯盏花素脂溶性较差,细胞膜通透性不佳,影响了灯盏花素的吸收,磷脂复合物改善了灯盏花素与磷脂双分子构成的细胞膜的亲和性,从而改善了灯盏花素肠黏膜通透性;②灯盏花素为水难溶性化合物,水中低溶解度限制了灯盏花素的吸收,而自微乳能显著提高灯盏花素的溶解度;同时灯盏花素磷脂复合物自微乳在生理液体的稀释下,能快速形成 10~100 nm 的微乳,改善了磷脂复合物的分布、分散状态,增大药物与胃肠道的接触面积和穿透生物膜的能力,使药物生物利用度得到显著提高,促进了药物的吸收;③灯盏花素为弱酸性药物,在胃肠道由于 pH 的影响而稳定性较差,同时灯盏花素容易被胃肠道内的酶所酶解,导致口服吸收较差。磷脂复合物改善了灯盏花素的理化性质,减小了 pH 对灯盏花素的影响,同时自微乳给药系统将灯盏花素包封于内油相及表面活性剂层中,可保护灯盏花素免于被胃肠道中酸和酶所降解;④多药耐药相关蛋白 2 对灯盏花素的外排作用是该成分吸收差的重要原因之一^[17],自微乳处方中包含的多种表面活性剂或助表面活性剂如聚乙二醇 400 和聚氧乙烯氢化蓖麻油等不仅可以改变细胞膜流动性,提高药物膜渗透性,还可抑制肠道上皮细胞膜上外排蛋白对灯盏花素的外排作用,提高其吸收转运的作用^[18-20],从而提高了灯盏花素口服生物利用度。

[参考文献]

- [1] 张卫东,陈万生,王永红,等. 灯盏花黄酮苷化学成分的研究[J]. 中草药,2000,31(8):565.
- [2] 丁钰熊,王守峰,龙楚瑜,等. 灯盏花素对老年大鼠功能影响的实验研究[J]. 中成药,1996,18(7):46.
- [3] 王影,杨祥良,刘宏,等. 灯盏花素抗凝血作用的研究[J]. 中药材,2003,26(9):656.
- [4] 李玲,陈必义,吴婉玲,等. 灯盏花总黄酮抗大鼠心肌缺血及对正常大鼠血流动力学的影响[J]. 昆明医学院学报,1995,16(3):45.
- [5] 王雪松,阮旭中,刘买利. 灯盏花素对缺血再灌注鼠脑损伤的脑保护作用研究[J]. 中成药,2002,24(12):947.
- [6] 宋明海,张流忠,安华,等. 灯盏花素对急性脑梗塞病人血液流变学的影响[J]. 遵义医学院学报,2002,25(1):72.

- [7] 石森林,徐莲英,毛展凯,等. 灯盏花素理化性质及其稳定性影响因素研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(7):843.
- [8] 卢秀霞,何琳,陈莉,等. 灯盏花素溶解度及油水分配系数的测定[J]. 广东药学院学报,2011,27(1):1.
- [9] 葛庆华,周臻,王晓瑾,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.
- [10] Wu Z B, Guo D, Deng L, et al. Preparation and evaluation of a self-emulsifying drug delivery system of etoposid-phospholipid complex [J]. Drug Dev Ind Pharm,2011,37(1):103.
- [11] Cao F H, OuYang W Q, Wang Y P, et al. A combination of a microemulsion and a phospholipid complex for topical delivery of oxymatrine [J]. Arch Pharm Res, 2011,34(4):551.
- [12] 王亚静,轩肖玉,张伟玲,等. 磷脂复合物自微乳给药系统对芒果苷药动学性质的改善作用[J]. 中药材,2014,37(1):108.
- [13] Food and drug administration center for drug evaluation and research. Guidance for industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system[Z]. 2000.
- [14] 李文秀,邓英杰,魏伟,等. 灯盏花素前体脂质体胶囊突释的评价方法[J]. 中国医药导报,2008,5(8):34.
- [15] 陆珺珺,吴正红,平其能. 聚酰胺-胺 PAMAM 树状聚合物对灯盏花素的溶解性及其药代动力学的影响[J]. 药学学报,2009,44(2):197.
- [16] 张海燕,平其能,郭健新,等. 灯盏花素及其 β -环糊精包合物在大鼠体内的药代动力学[J]. 药学学报,2005,40(6):563.
- [17] 谭建玲,洪正飞,林宁. 灯盏花素小肠吸收影响因素的研究[J]. 湖北中医药大学学报,2013,15(6):25.
- [18] Rege B D, Kao J P Y, Polli J E. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers[J]. Eur J Pharm Sci,2002,16(4/5):237.
- [19] Nerurkar M M, Burton P S, Borchardt R T. The use of surfactants to enhance the permeability of peptides through Caco-2 cells by inhibition of an apically polarized efflux system [J]. Pharm Res, 1996, 13(4):528.
- [20] Nerurkar M M, Vidmar T J, Burton P S, et al. Mechanistic roles of neural surfactants on concurrent polarized and passive membrane transport of a model peptide in Caco-2 cells [J]. J Pharm Sci, 1997, 86(7):813.

[责任编辑 刘德文]