

文章编号: 1671- 7554(2007) 07- 0726- 04

HPLC 法测定丹皮酚血浓度及其胶囊与片剂 人体生物等效性研究

武 静, 王本杰, 魏春敏, 孔祥麟, 郭瑞臣

(山东大学齐鲁医院临床药理研究所, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 法测定人血浆中丹皮酚的浓度, 进行丹皮酚胶囊和片剂生物等效性研究。方法: 采用双周期双交叉试验设计, 20 名健康男性志愿者随机单剂量口服丹皮酚胶囊或片剂 160 mg, 按设定时间采集肘静脉血, 经乙晴萃取处理, 以 XB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱为固定相, 四氢呋喃-甲醇-水-磷酸 (6:60:34:0.1, V:V) 为流动相测定丹皮酚血浆浓度。采用 DAS 2.0 软件计算丹皮酚主要药代动力学参数, 评价丹皮酚胶囊和片剂的生物等效性。结果: HPLC 法测定血浆中丹皮酚的最低检测限为 10 ng/ml, 在 10~500 ng/ml 范围内线性关系良好 ($r = 0.9998$), 日内、日间 RSD 均小于 13.72%。丹皮酚胶囊和片剂主要药代动力学参数 $t_{1/2}$ 为 (1.03 ± 0.35) h 和 (1.09 ± 0.62) h, T_{max} 为 (1.02 ± 0.13) h 和 (1.03 ± 0.15) h, C_{max} 为 (116.39 ± 45.57) ng/ml 和 (111.16 ± 41.24) ng/ml, AUC_{0-3} 为 (173.91 ± 45.41) ng·h/ml 和 (171.26 ± 42.63) ng·h/ml, $AUC_{0-∞}$ 为 (217.13 ± 56.55) ng·h/ml 和 (220.27 ± 67.24) ng·h/ml。丹皮酚胶囊相对生物利用度 F 为 (101.56 ± 9.31)%。结论: 建立的 HPLC 方法特异性强、灵敏度高, 可用于丹皮酚血浓度测定和人体药动学研究。丹皮酚片剂、胶囊剂的主要药代动力学参数差异无统计学意义, 符合生物等效性的假设, 为生物等效制剂。

[关键词] 丹皮酚; 胶囊; 片剂; 色谱法, 高压液相

[中图分类号] R917 [文献标识码] A

Pharmacokinetics and bioequivalence of paeonol capsules and tablets by the HPLC method

WU Jing, WANG Ben-jie, WEI Chun-min, KONG Xiang-lin, GUO Rui-chen

(Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish the HPLC method for determination of paeonol in human plasma and to evaluate the pharmacokinetic parameters and the bioequivalence of its capsules and tablets in healthy Chinese volunteers. **Methods:** A liquor of plasma was collected at scheduled time points before and after a single dose of 160mg paeonol was orally given to 20 healthy volunteers in a two-way cross-over design test. The plasma samples were extracted with 300 μl acetonitrile. The paeonol concentration in plasma was determined by HPLC method using a XB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column as a stationary phase, and THF-methanol-water-phosphonic acid (6:60:34:0.1, V:V) as a mobile phase. The pharmacokinetic parameters were determined and the bioequivalence of paeonol capsules and tablets was evaluated with DAS 2.0. **Results:** The limit of detection for paeonol was 10 ng/ml, and a linearity obtained in the range of 10~500 ng/ml was excellent ($r = 0.9998$). The relative standard deviations of intra-day and inter-day determination were less than 13.72%. The main pharmacokinetic parameters of paeonol after a single oral dose of 160 mg paeonol capsules and tablets were as follows: $t_{1/2}$ (h) 1.03 ± 0.35 and 1.09 ± 0.62, T_{max} (h) 1.02 ± 0.13 and 1.03 ± 0.15, C_{max} (ng/ml)

[作者简介] 武静 (1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 临床药理学。E-mail: wujing19830603@126.com

[通讯作者] 郭瑞臣。Tel: (0531) 82169636; E-mail: grc7636@126.com

116.39 ± 45.57 and 111.16 ± 41.24, AUC₀₋₃ (ng·h/ml) 173.91 ± 45.41 and 1.26 ± 42.63, AUC_{0-∞} (ng·h/ml) 217.13 ± 56.55 and 220.27 ± 67.24, respectively. The relative bioavailability of paeonol capsules was (101.56 ± 9.31)%. **Conclusion:** The established HPLC method is highly sensitive and accurate, and can be successfully used in the determination of plasma paeonol and its pharmacokinetics studies. The pharmacokinetic parameter of paeonol shows no significant differences between capsules and tablets. The two preparations are bioequivalent.

[KEY WORDS] Paeonol; Capsules; Tablets; Chromatography, High pressure liquid

丹皮酚(paeonol)是中药牡丹皮和徐长卿的主要活性成份,化学结构为2-羟基-4-甲氧基乙酰苯,其熔点为51~52℃,正常状态下为白色针状晶体。微溶于水,能随水蒸气挥发,溶于乙醇、氯仿、苯等有机溶剂。丹皮酚药理活性广泛,具有解热镇痛、抗炎、抗过敏、抗肿瘤、免疫调节以及改变血液流变学^[1]等作用,而无镇痛依赖性和耐受性,毒副作用小。

以往薄层色谱法^[2]、毛细管电泳法^[3]、毛细管气相色谱法^[4]、HPLC法^[5]多用于含丹皮酚药材及其制剂的丹皮酚含量测定,或采用HPLC法测定大鼠或家兔体内血浓度^[6,8],进行丹皮酚的动物药代动力学研究,或用稳定同位素法^[9]进行人体丹皮酚体内处置过程或药代动力学研究。本研究建立了灵敏高效的HPLC法测定人体丹皮酚血浓度,并用于丹皮酚口服制剂的人体药代动力学及生物等效性评价研究,报告如下。

1 材料与方法

1.1 志愿者选择 20名健康男性志愿者,20~26岁,平均(23.71 ± 1.27)岁,体重(67.75 ± 4.57)kg,试验前行体格检查,血、尿常规及肝、肾功能等实验室检查正常,无急、慢性疾病及家族遗传病史,试验前2周无用药史,试验期内禁烟酒及其他药物。为避免食物可能对试验造成的影响,志愿者需空腹服药且于服药4h后进食统一的低脂肪饮食。

1.2 药品与试剂 丹皮酚软胶囊系山东绿叶天然药物研究开发有限公司提供,20mg/粒,批号051115。丹皮酚片系广西柳州制药有限责任公司生产,40mg/片,批号050113。丹皮酚对照品由山东绿叶天然药物研究开发有限公司提供,纯度99.97%。

甲醇为色谱纯(J.T BaKer, LOTC03E47);乙腈为色谱纯(J.T BaKer, LOTC01827);四氢呋喃为色谱纯(TEDIA, USA, LOT408100);磷酸为分析纯(天津市申泰化学试剂有限公司,批号20050504);氯化钠(威海亚太药业有限公司,批号20050609),娃哈哈纯净水(市售品,批号20060320)。

1.3 仪器 Waters515 高效液相色谱仪,2487 紫外检测器,717 自动进样器(美国沃特斯公司);XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司);PROINO 离心机(美国科峻仪器公司);PK514BP 超声清洗器(德国 BANDEL);AX2 梅特勒-托利多 AX205 Delta Range 电子天平(瑞士梅特勒公司)。

1.4 给药方法及样品采集 20名健康志愿者按体重随机分组,采用自身交叉对照设计,空腹口服丹皮酚胶囊或丹皮酚片剂160mg,于服药前及服药后0.25,0.5,0.75,1,1.25,1.5,1.75,2,2.25,2.5,2.75,3h取肘静脉血4ml至肝素化的试管中,3500r/min离心15min,取血浆分双份于-20℃保存备用。周期间清洗期为1周。

1.5 标准溶液配制 精密称取丹皮酚标准品0.01019g,以流动相为溶剂配成1mg/ml,再用流动相逐级稀释成10μg/ml和1μg/ml储备液,4℃冷藏备用。

1.6 色谱条件 色谱柱为XB-C₁₈(250mm × 4.6mm, 5μm);流动相为四氢呋喃-甲醇-水-磷酸(6:60:34:0.1,V:V);流速为1ml/min;检测波长为274nm;进样量为50μl。

1.7 样品处理 取血浆0.5ml,加入300μl乙腈,涡旋,10080r/min离心5min,上清液转入含50~60mg NaCl 1.5ml离心管,涡旋,室温放置10min,10080r/min离心5min,取上清液100μl,50μl进样测定。

1.8 数据处理 C_{max}和T_{max}为实测值。采用DAS 2.0计算丹皮酚主要药代动力学参数,评价其胶囊和片剂的生物等效性。

2 结果

2.1 方法专属性 取空白血浆0.5ml,按“样品处理”项提取后进样分析,得空白血浆色谱图(A);取1μg/ml丹皮酚标准溶液50μl进样,得丹皮酚标准品(B);取1μg/ml丹皮酚标准溶液50μl,加450μl空白血浆,使配成100ng/ml的血浆样品,同法操作,得血

浆提取后标准品色谱图(C);取志愿者血浆样品,同法

操作,得志愿者血浆样品色谱图(D),如图1所示。

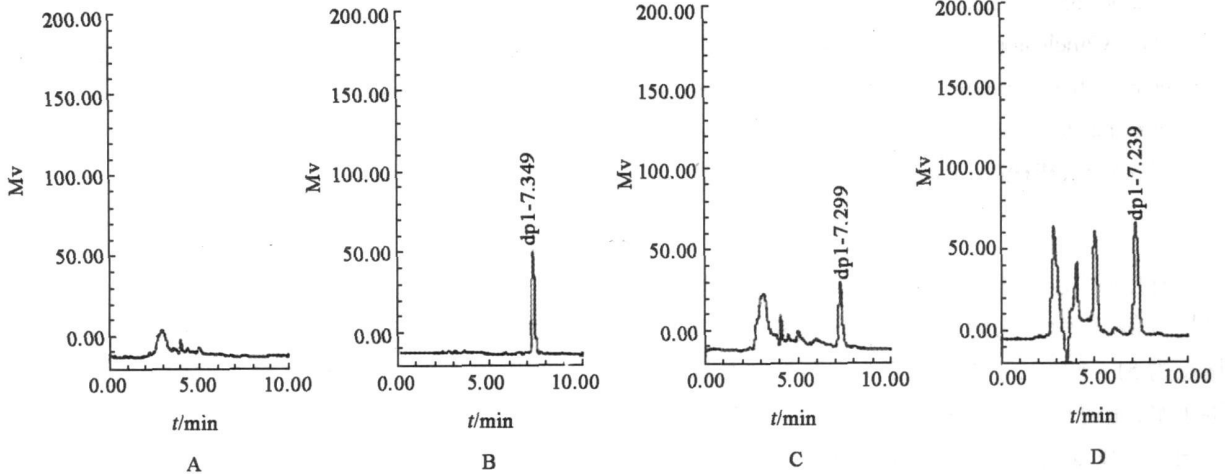


图1 空白血浆(A)、丹皮酚标准溶液(B)、空白血浆加丹皮酚标准溶液(C)、志愿者(9)口服丹皮酚0.5h后(D)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of the blank plasma(A), the paeonol standard(B), the blank plasma spiked with paeonol standard(C) and the plasma samples 0.5 h after a oral administration of paeonol(D)

2.2 线性关系 取适量标准溶液,以空白血浆配制成10,25,50,100,250,500 ng/ml的标准空白血浆系列溶液。按“样品处理”方法提取并进样测定,每个浓度测定5次。将测得峰面积对浓度进行直线回归,得丹皮酚标准曲线,其回归方程为 $Y = -11\ 652\ 366\ 07 + 5\ 207.715\ 72X$ ($r = 0.999\ 8$)。

丹皮酚在10~500 ng/ml线性范围内关系良好,本方法最低检测限为10 ng/ml($S/N = 2$)。

2.3 精密度及回收率 以空白血浆配制高、中、低(25、100、400 ng/ml)三个浓度的丹皮酚标准系列,按“样品处理”项下操作,根据加样提取后峰面积和相应标准溶液峰面积,计算提取回收率;根据测定浓度和加入浓度,计算相对回收率;每个浓度于1日内测定5次和每天测定1次,连续测定5日计算日内、日间RSD,评价方法的精密度。测定结果见表1。

表1 回收率与精密度($n = 5, x \pm s$)

浓度($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	提取回收率(%)	相对回收率(%)	日内精密度($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	日间精密度($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
25	69.44 ± 8.71	92.28 ± 5.90	24.97 ± 1.14	23.79 ± 3.26
100	84.08 ± 2.55	97.44 ± 3.46	97.06 ± 1.17	91.59 ± 3.29
400	85.48 ± 6.18	97.34 ± 3.05	359.43 ± 8.41	353.21 ± 13.3

2.4 各志愿者丹皮酚血浓度 取志愿者血浆样品0.5 ml,依前述处理方法提取测定。丹皮酚胶囊和片剂丹皮酚经时血浓度均值-时间曲线见图2。

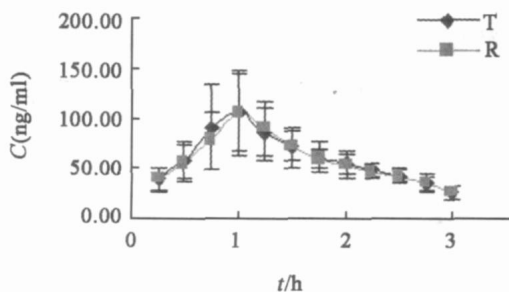


图2 20名健康志愿者单剂量口服丹皮酚胶囊(T)和片剂(R)的平均药时曲线

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of paeonol after 160 mg paeonol capsules(T) and tablets(R)

2.5 药代动力学参数 丹皮酚血浓度经 DAS 2.0

处理,得丹皮酚主要药代动力学参数。 F 为根据 $AUC_{0-3}(\text{胶囊})/AUC_{0-3}(\text{片剂}) \times 100\%$ 计算所得值,见表2。

表2 志愿者口服160 mg丹皮酚胶囊或片剂丹皮酚主要药代动力学参数($x \pm s, n = 20$)

药代动力学参数	胶囊	片剂
T_1/h	1.03 ± 0.35	1.00 ± 0.60
$C_{\text{max}}(\text{ng/ml})$	116.39 ± 45.57	111.16 ± 41.24
$T_{\text{max}}(\text{h})$	116.39 ± 45.57	1.03 ± 0.15
$AUC_{0-3}(\text{ng} \cdot \text{h/ml})$	173.91 ± 45.41	171.26 ± 42.63
$AUC_{0-\infty}(\text{ng} \cdot \text{h/ml})$	217.13 ± 56.55	220.27 ± 67.24
$F(\%)$	101.50 ± 9.31	

2.6 生物等效性评价 采用 DAS 2.0对丹皮酚胶囊或片剂丹皮酚主要药代动力学参数进行方差分析、双单侧 t 检验和 $(1-2\alpha)$ 置信区间分析,评价两制剂的生物等效性。结果显示, AUC_{0-3} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 T_{max} 、

C_{max} 90% 置信区间均在规定的 80%~125% 范围内, 符合生物等效的假设, 为生物等效制剂, 见表 3。

表 3 双单侧 t 检验结果($t_{0.05} = 1.746$)

参数	AUC_{0-3}	$AUC_{0-\infty}$	C_{max}
T_1	12.271	5.673	10.880
T_2	11.087	6.002	8.677
90% 可信限	97.9%~104.4%	93.2%~106.0%	98.0%~110.8%

3 讨论

乙腈可使血浆蛋白变性, 常规情况下, 以 2~3 倍血样体积的乙腈沉淀蛋白, 而后氮气吹干, 复溶后适量进样。但丹皮酚熔点较低, 易挥发, 氮气吹干可导致损失。本研究在参考文献的基础上, 对方法进行改进。取 0.5 ml 血样加入 300 μ l 乙腈萃取, 而后加入 50~60 mg 氯化钠, 可使丹皮酚在有机相中有效富集, 提高灵敏度和提取回收率, 满足人体药代动力学研究的需要。

16.6 mg/kg 14 C 标记丹皮酚大鼠灌胃的研究结果^[10]显示, 丹皮酚易吸收, 20 min 在血中达到峰浓度, 而后急剧下降。给药 3 小时后, 体内分布以肝脏最多, 次为肾、脾、肺等。以大鼠 50 mg/kg 丹皮酚灌胃给药^[7], HPLC 法测出尿中含有丹皮酚及其可能具有生物活性的 5 种代谢物, 主要代谢物亦出现于胆汁, 提示丹皮酚存在肝肠循环。丹皮酚及其代谢物主要以葡萄糖醛酸络合物、硫化物和酶抗结合物形式排泄, 但结合物的形成并非酶作用的结果。提示丹皮酚代谢酶的影响甚少。丹皮酚亦可能从结合物中游离出来, 而使其 $t_{1/2}$ 延长。以家兔 30 mg/kg 丹皮酚灌胃和静脉注射给药^[8], 灌胃家兔血浆中不能测出丹皮酚, 提示丹皮酚口服生物利用度较低, 可能与其快速完全的首过消除作用有关, 也可能与胃液破坏, 食物影响等因素有关。本研究结果表明, 20 例志愿者空腹口服丹皮酚 160 mg, 在 0.25、0.5 小时等时间点均可检测到丹皮酚, 1 小时左右达峰浓度, 3

小时后仍有丹皮酚测出。其他 4 名进食后服用相同剂量丹皮酚志愿者, 相同时间点血中不能测出丹皮酚, 提示饮食影响丹皮酚吸收, 但尚需更大样本量测定结果的支持, 其作用机制有待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] 刘长清, 谭诗云, 计春燕, 等. 丹皮酚对大肠癌 HT-29 细胞的增殖抑制作用及其机制的探讨[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(10): 1 251-1 254.
- [2] 刘义梅. 薄层色谱法测定知柏地黄丸中丹皮酚的含量[J]. 湖北中医杂志, 2005, 27(7): 52-53.
- [3] 翟海云, 谭学才, 陈瓚光, 等. 毛细管电泳-高频电导法快速测定丹皮中的丹皮酚[J]. 色谱, 2005, 23(2): 212.
- [4] 完茂林, 张继传. 毛细管气相色谱法测定六味地黄丸中丹皮酚的含量[J]. 安徽中医学院学报, 2004, 23(6): 38-39.
- [5] 周静安. 高效液相色谱法测定黄芩中药牙膏中的黄芩苷与丹皮酚的含量[J]. 中医药学杂志, 2006, 24(1): 169-171.
- [6] Wu X, Chen H, Chen X, et al. Determination of paeonol in rat plasma by high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic studies following oral administration of Moutan cortex decoction[J]. Biomed Chromatogr, 2003, 17(8): 504-508.
- [7] Yasuda T, Kon R, Nakazawa T, et al. Metabolism of paeonol in rats[J]. Nat Prod, 1999, 62(8): 1 142-1 144.
- [8] Riley CM, Ren TC. Simple method for the determination of paeonol in human and rabbit plasma by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and ultraviolet detection[J]. J Chromatogr, 1989, 489(2): 432-437.
- [9] Mimura K, Baba S. Determination of paeonol metabolites in man by the use of stable isotopes[J]. Chem Pharmacol Bull, 1981, 29(7): 2 043-2 050.
- [10] 季宇彬. 中药有效成份药理与应用[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 2004. 334-336.

[收稿日期 2006-10-27]

(编辑: 孙玉芝)