

利用 MMDL 评价尼麦角林胶囊人体生物利用度

周彦彬, 田娟, 冉黎灵, 左英, 胡高云, 劲松* (中南大学药学院, 长沙 410013)

摘要: 目的 建立测定人血浆中 1-甲基-10 α -甲氧基-9, 10-二氢麦角醇 (MMDL) 浓度的高效液相色谱法, 并以 MMDL 体内的水平为指标研究尼麦角林胶囊的人体生物利用度。方法 以二氯甲烷-异丙醇 (9:1) 为萃取液, 美索巴莫为内标, 血浆样品经液-液萃取浓缩后, 经 Diamonsil C₁₈ 柱分离, 以乙腈-20 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (22:78) 为流动相, 在 225 nm 波长处检测。18 名健康男性志愿者采用随机交叉给药方案, 分别单剂量 po 60 mg 受试制剂或参比制剂, 不同时间点采血, 用 HPLC 测定血浆中 MMDL, 比较二者生物利用度。结果 MMDL 和内标分离良好, 内源性杂质不干扰测定, 在浓度为 1.7~207 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内, MMDL 浓度与峰面积比线性关系良好, 方法回收率为 91.7%~101.8%, 日内、日间 RSD 分别小于 9.7% ($n=5$)、11.6% ($n=15$)。单剂量 po 受试制剂或参比制剂 60 mg 后, MMDL 的 ρ_{max} 分别为 (97.9 \pm 54.6) 和 (103.0 \pm 60.5) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; t_{max} 分别为 (1.2 \pm 0.4) 和 (1.2 \pm 0.4) h; $t_{1/2}$ 分别为 (3.7 \pm 2.6) 和 (4.4 \pm 3.0) h; $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$ 分别为 (283.7 \pm 218.4) 和 (305.3 \pm 244.6) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 。相对生物利用度为 (93.8 \pm 6.4)%。结论 此方法灵敏、简便、准确度高, 可用于尼麦角林体内过程研究。国产尼麦角林和国外产品的体内过程无显著性差别, 两者为生物等效性制剂。

关键词: 1-甲基-10 α -甲氧基-9, 10-二氢麦角醇; 尼麦角林; 高效液相色谱法; 生物等效性

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494(2008)22-1740-04

Study on Relative Bioavailability of Nicergoline Capsules in Healthy Volunteers by the Determination of MMDL

ZHOU Yan-bin, TIAN Juan, RAN Li-ling, ZUO Ying, HU Gao-yun, DING Jin-song* (School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To establish a HPLC method for the determination of MMDL (1-methyl-10 α -methoxy-9, 10-dihydrolysergol) in plasma and study the relative bioavailability of domestic and imported nicergoline capsules. **METHODS** MMDL were extracted from plasma sample with dichloromethane (including 10% isopropanol) and separated on a Diamonsil C₁₈ column (4.6 mm \times 200 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile-20 mmol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate (22:78), the flow rate was 1 mL·min⁻¹, and methocarbamol was used as the internal standard. A single dose of 60 mg of domestic or imported capsules was given to 18 healthy volunteers in a randomized crossover study. MMDL concentrations in plasma was determined by the developed HPLC method and then the pharmacokinetics and bioavailability were studied. **RESULTS** MMDL was separated well from other metabolites and endogenous substance, the standard curve was linear ($r=0.9997$) within the range of 1.7 to 207 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for MMDL. The main parameters for MMDL were as follows: ρ_{max} (97.9 \pm 54.6) and (103.0 \pm 60.5) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, t_{max} (1.2 \pm 0.4) and (1.2 \pm 0.4) h, $t_{1/2}$ (3.7 \pm 2.6) and (4.4 \pm 3.0) h, $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$ (283.7 \pm 218.4) and (305.3 \pm 244.6) $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively. The relative bioavailability of domestic to imported capsules was (93.8 \pm 6.4)%. **CONCLUSION** The established HPLC method was accuracy and sensitive for assay of plasma MMDL concentration. And the concentrations of MMDL in plasma were suitable for the bioavailability evaluation of nicergoline capsules. The results of statistics showed there were no significant differences between two preparations and bioequivalence was observed.

KEY WORDS 1-methyl-10 α -methoxy-9, 10-dihydrolysergol; nicergoline; HPLC; bioavailability

尼麦角林 (nicergoline) 为二氢麦角碱衍生物, 具有 α 受体阻滞作用, 对血管扩张作用较强, 可预防脑及周围血管缺血性疾病, 延缓衰老和保持老年人智能和体力的良好状态。尼麦角林经 po 后体内迅速代谢, 血浆中几乎检测不到原型药物, 其主

要代谢产物为 1-甲基-10 α -甲氧基-9, 10-二氢麦角醇 (MMDL, 代谢产物 I) 和 10 α -甲氧基-9, 10-二氢麦角醇 (MDL, 代谢产物 II), 二者均具有药理活性^[1]。尼麦角林给药后, 血浆中 MDL 和 MMDL 在不同时间段出现峰浓度^[2-4], 目前已有的

作者简介: 周彦彬, 女, 实验师 * 通讯作者: 丁劲松, 男, 讲师 Tel: (0731) 2650367 E-mail: dingj022@163.com

文献报道均以 MDL 的体内水平来评价尼麦角林的药动学及生物利用度。本试验建立了测定血浆中 MMDL 的高效液相色谱 (HPLC) 法, 并将 MMDL 作为标志物用于尼麦角林制剂的生物利用度研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与药品

LC-2010C HPLC 系统, SPA-10AVP UV/VIS 检测器 (日本, 岛津); TGL16M 台式高速冷冻离心机 (长沙英泰仪器有限公司); WH-2 微量旋涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂); METTLER TOMLEDO AG285 天平。

MMDL 对照品 (中南大学药学院药物化学系制备, 含量为 99.13%); 受试制剂 (T): 尼麦角林胶囊, 每粒 30 mg 海南通用三洋药业有限公司, 批号: 060501, 尼麦角林胶囊 R (参比制剂, 每粒 30 mg 商品名: 凯尔, 法国爱的发制药厂, 批号: 060702)。美索巴莫对照品 (内标, 天津市汉康医药生物技术有限公司, 含量为 99.7%); 乙腈为色谱纯; 水为超纯水。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 贮备液的配制

MMDL 贮备液: 精密称取 MMDL 对照品适量置 100 mL 量瓶中, 用甲醇制成质量浓度为 $0.217 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮备液, 置 4°C 冰箱中保存备用, 使用时用水稀释至所需浓度。

内标贮备液: 精密称取美索巴莫对照品 50 mg 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇制成质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮备液, 置 4°C 冰箱中保存备用, 使用时用水稀释至所需浓度。

1.3 色谱条件

色谱柱: 迪马 Diamonsil C_{18} 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 柱温: 35°C ; 流动相: 乙腈-磷酸盐缓冲液 ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸二氢钾溶液) 为 22:78 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 225 nm 。

1.4 血浆样品的处理

精密吸取血浆 1 mL, 置 10 mL 具塞尖底玻璃离心管中, 分别加入内标溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 美索巴莫) 50 μL , 饱和氨水溶液 100 μL , 漩涡振荡 30 s, 加入萃取液 (二氯甲烷-异丙醇 = 9:1) 5 mL, 漩涡 2 min, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取下清液, 转移到另一支干燥的 10 mL 具塞尖底玻璃离心管中, 45°C 水浴氮气吹干, 残渣用 200 μL 流动相复溶, 进样 40 μL 。

1.5 给药与血样采集

试验经中南大学药学院伦理委员会批准, 18

名男性健康志愿者, 年龄 20~31 岁, 体重 55~74 kg 在签署知情同意书和体检合格后纳入试验, 志愿者随机等分为两组, 禁食 12 h 后, 于清晨 po 尼麦角林受试制剂或参比制剂 60 mg 在服药前 (0 h) 和服药后 0.333, 0.667, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 24.0 h 抽静脉血 5 mL, 一周后交叉服药后取血, 方法和时间相同。采集的血样标本置于肝素化试管中。离心分取血浆, -20°C 保存至测定。

1.6 药动学参数的求算及统计学处理

受试者的 ρ_{max} , t_{max} 由血药数据直接读取。 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 以梯形面积法计算, 消除速率常数 K 以血药浓度-时间曲线尾部数据回归计算。采用 SPSS 统计分析软件分别对药动学参数 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 和 ρ_{max} 经对数转换后进行药物间、周期间、个体间的三因素方差分析, 再以双单侧 t 检验进行生物等效性判断。 t_{max} 采用原值进行非参数检验。

2 结果

2.1 色谱行为

在“1.3”色谱条件下, MMDL 与内标及血浆中内源性杂质分离良好, MMDL 保留时间约为 7.1 min, 内标的保留时间约为 9.1 min, 空白血浆、MMDL 与内标对照品色谱图、MMDL 加入空白血浆中的色谱图、受试者血浆色谱图, 见图 1。

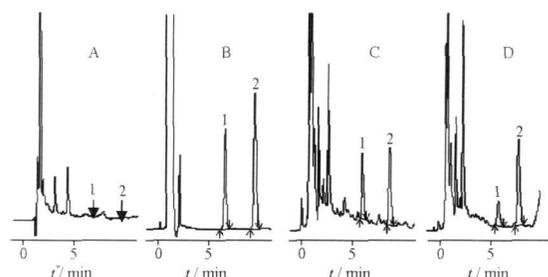


图 1 空白血浆 (A)、MMDL 对照品及内标 (B, $54.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、志愿者空白血浆中加入 MMDL 及内标 (C, $52.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、志愿者服药后血浆中 MMDL 及内标 (D, $31.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 色谱图

1-甲基-10 α -甲氧基-9, 10-二氢麦角醇; 2-内标

Fig 1 Chromatograms of blank plasma (A), MMDL and internal standard (B, $54.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), MMDL and internal standard added in human plasma (C, $52.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), and volunteers plasma after a single dose of 60 mg nicergoline (D, $31.9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

1-MMDL ($t_{\text{R}}=7.1 \text{ min}$); 2-internal standard ($t_{\text{R}}=9.1 \text{ min}$)

2.2 标准曲线与最低定量限

精密吸取空白血浆 900 μL , 置 10 mL 具塞尖底玻璃离心管中, 分别加入 MMDL 贮备液 100 μL , 漩涡振荡混匀, 稀释成 217.0, 108.5, 54.3, 27.1, 13.6, 6.8, 3.4, 1.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列浓度, 照“1.4”项操作并测定, 记录色谱图。以 MMDL 与内标的峰面积比 (Y) 与质量浓度 (ρ) 进行线性回归, 回归方程为: $Y = 0.0136\rho + 0.0619$ ($r = 0.9997$)。血浆中 MMDL 在 1.7 ~ 217 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内与峰面积比线性关系良好, 血浆中 MMDL 的最低定量浓度为 1.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 萃取回收率

取质量浓度为 108.5, 54.3, 3.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高、中、低 3 个浓度的 MMDL 甲醇液各 1 mL, 各加 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的美索巴莫甲醇液 50 μL , 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干, 加流动相 200 μL 溶解, 制得对照品液, 取 40 μL 进样, 记录 MMDL 和内标的峰面积; 另用空白血浆配制相当于尼麦角林为 108.5, 54.3, 3.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高、中、低 3 个浓度的血样, 按“1.4”项下平行操作, 进样 40 μL , 记录 MMDL 和内标的峰面积, 以血浆样品测定的峰面积除以同浓度对照品的峰面积所得的百分率计算萃取回收率。结果高、中、低浓度的绝对回收率分别为: (71.9 \pm 2.6)% ($n = 5$), (69.0 \pm 3.7)% ($n = 5$), (69.6 \pm 4.7)% ($n = 5$), 内标的绝对回收率为 (75.4 \pm 1.6)% ($n = 5$)。

2.4 方法回收率及精密度

用空白血浆配制相当于 MMDL 为 108.5, 54.3, 3.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高、中、低 3 个质量浓度的血样, 按“1.4”项下平行操作, 进样 40 μL , 记录 MMDL 和内标的峰面积比, 按回归方程计算浓度, 以测得量与加入量的比值计算相对回收率并计算日内 RSD, 上述方法连续操作 3 d 计算日间 RSD。结果 MMDL 高、中、低 3 个质量浓度的相对回收率分别为 (100.3 \pm 2.9)% ($n = 5$), (101.8 \pm 2.0)% ($n = 5$), (91.6 \pm 8.9)% ($n = 5$), 日内 RSD 小于 9.7% ($n = 5$), 日间 RSD 小于 11.6% ($n = 15$)。

2.5 样品稳定性试验

用空白血浆配制相当于 MMDL 为 108.5, 54.3, 3.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高、中、低 3 个浓度的血样, 分别室温条件下放置, 在 0, 4, 8 h 取样测定; 在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻后取出, 室温融化, 重复 2 次, 分次测定; 在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置, 分别在 0, 5, 15 d 取样测定, 计算 MMDL 的浓度。结果显示, MMDL 血浆样品在室温放置 8 h, 冻融 2 次, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 15 d 均稳定。

2.6 方法学质控

用空白血浆配制相当于 MMDL 浓度为 108.5, 54.3, 3.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高、中、低 3 个质量浓度的血样, 按“1.4”项下操作, 均匀分布在未知样品测试顺序中随行测定, 计算 MMDL 的浓度, 结果测定值均落在靶值的 -20% 内。

2.7 2 种尼麦角林胶囊的相对生物利用度

志愿者单次 po 60 mg 尼麦角林胶囊后的药-时曲线见图 2。试验制剂与参比制剂的药动参数见表 1。方差分析结果表明, 试验制剂与参比制剂的主要药动学参数之间无明显差异, 非参数检验未发现试验制剂的 t_{max} 与参比制剂的 t_{max} 之间有显著性差异。双单侧 t 检验结果表明, 试验制剂与参比制剂为生物等效制剂。试验制剂的 ρ_{max} 均值落在参比制剂的 ρ_{max} 均值的 87.1% ~ 107.2% 之间, AUC_{0-12} 的均值落在参比制剂 AUC_{0-12} 均值 87.9% ~ 99.7% 之间。

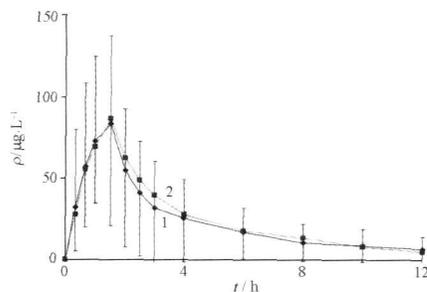


图 2 18 例志愿者 po 尼麦角林试验制剂和参比制剂 60 mg 后 MMDL 平均血药浓度-时间曲线

1- 试验制剂; 2- 参比制剂

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curve of MMDL in 18 healthy male volunteers after a single oral dose of 60 mg Nicergoline capsules T or capsule R

1- test formulation; 2- reference formulation

表 1 18 例志愿者 po 尼麦角林试验制剂和参比制剂 60 mg 后药动学参数, $n = 18$, $\bar{x} \pm s$

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters of MMDL after a single oral dose of 60 mg Nicergoline capsule 1 or capsule 2. $n = 18$, $\bar{x} \pm s$

Parameters	Capsule 1	Capsule 2
$\text{AUC}_{0-12}/\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	283.7 \pm 218.4	305.3 \pm 244.6
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	334.1 \pm 274.9	358.7 \pm 308.4
$\rho_{\text{max}}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	97.9 \pm 54.6	103.0 \pm 60.5
t_{max}/h	1.2 \pm 0.4	1.2 \pm 0.4
$t_{1/2}/\text{h}$	3.7 \pm 2.6	4.4 \pm 3.0
F1/%	93.8 \pm 6.4	

3 讨论与结论

3.1 尼麦角林 po 给药吸收后, 在血液中依次生成 3 种代谢物, 其中尼麦角林迅速水解成 MMDL, 随

反相高效液相色谱法同时测定人血浆中磷苯妥英、苯妥英及其主要代谢产物 4'-羟苯妥英的浓度

马春来¹, 焦正^{*}, 应寅清², 施孝金¹ (1. 复旦大学附属华山医院临床药理学室, 上海 200040; 2. 上海卫生学校, 上海 200237)

摘要: 目的 建立同时测定人血浆中抗癫痫药物磷苯妥英 (FOS)、苯妥英 (PHT) 及其主要代谢产物 4'-羟苯妥英 (4'-HPPH) 浓度的高效液相色谱法。方法 以盐酸普萘洛尔为内标, 血浆样品 100 μ L 经 20% 磷酸酸化后以乙酸乙酯 1 mL 萃取, 提取后氮气吹干, 加入流动相 100 μ L 复溶, 取 20 μ L 进样测定。色谱柱采用 Agilent RX-C₈ 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流动相为甲醇-乙腈-0.1% 三氟乙酸水溶液 (23: 17: 60), 流速为 1.5 mL \cdot min⁻¹, 紫外检测波长 210 nm。结果 血浆内源性杂质和常用合并用药对样品测定无干扰, 色谱峰分离良好。FOS、PHT、4'-HPPH 的线性范围分别是 1~400、0.5~50 和 0.5~10 mg \cdot L⁻¹, 相关系数 (r) 均大于 0.999。平均方法回收率为 92.79%~107.90%。各组分的日内、日间 RSD 均小于 8%。结论 该方法具有良好的准确性、精密性和灵敏性, 且操作快速、简便, 各组分之间分离良好, 适用于临床血药浓度的监测。

关键词: 磷苯妥英; 苯妥英; 4'-羟苯妥英; 高效液相色谱法

中图分类号: R969 文献标识码: A 文章编号: 1001-2494 (2008) 22-1743-04

Simultaneous Rapid Separation and Determination of Fosphenytoin Phenytoin and Their Main Metabolite 4'-Hydroxyphenytoin in Human Plasma Using Reversed-Phase HPLC

MA Chun-lai¹, JIAO Zheng^{*}, YING Yin-qing², SHI Xiao-Jin¹ (1. Clinical Pharmacy Laboratory, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040 China; 2. Shanghai Municipal Health School, Shanghai 200237 China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a simple reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the

后以相对缓慢的速度降解为 MDL。单剂量 *po* 尼麦角林后, 血浆中可同时检测到 MMDL 和 MDL 两种代谢物^[5]。因此, MMDL 和 MDL 均能反应尼麦角林吸收速度和吸收程度, 可作为标志物研究尼麦角林制剂的体内过程, 但由于 MDL 不容易获得, 本试验自制了 MMDL 对照品, 并用 MMDL 作为测定目标研究了两种尼麦角林胶囊的相对生物利用度。

3.2 试验发现, 试验制剂和参比制剂的 MMDL 平均峰浓度分别为 (97.9 \pm 54.6), (103.0 \pm 60.5) μ g \cdot L⁻¹, 与文献报道接近^[5]。但血浆中 MMDL 的 ρ_{\max} 个体差异大 (ρ_{\max} : 30.7 ~ 215 μ g \cdot L⁻¹), 这种差异的原因主要与尼麦角林在体内存在快、慢两种代谢方式有关^[1], 属于快代谢者体内 MMDL 的水平远大于 MDL 体内水平, 而后种代谢方式, 体内 MDL 水平大于 MMDL, 本试验未对志愿者进行代谢分型。

3.3 本试验采用 20 mmol \cdot L⁻¹ 的磷酸缓冲盐与乙腈为分离体系, 系统平衡快, MMDL 与内标较好的分离, 血浆中内源性物质无干扰。血浆样品处理

时, 在二氯甲烷中加少量的异丙醇, 克服了萃取时易乳化的缺点, 单次萃取回收率高且稳定, 操作简单。该法简便、重现性好, 最低定量浓度达到 1.7 μ g \cdot L⁻¹, 符合血药浓度的测定要求。

REFERENCES

- [1] SIOUF A, SANDRENAN N, GOBILLON J *et al*. Determination of 10 α -methoxy-9, 10-dihydrolysergol, a nicergoline metabolite, in human urine by high performance liquid chromatography [J]. *Bimed Chromatogr*, 1992, 6(1): 9-11.
- [2] YU J, DU C B. Determination of 10 α -methoxy-9, 10-dihydrolysergol (a Nicergoline Metabolite) in human plasma by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18(2): 78-80.
- [3] BANNO K, HORIMOTO S. Separation and quantitation of nicergoline and related substances by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry [J]. *Chromatograph*, 1991, 31(1/2): 50-54.
- [4] EZAN E, DELESTRE F, LEGENDRE S, *et al*. Immunoassays for the detection of nicergoline and its metabolites in human plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 25(1): 123-130.
- [5] BOTTGER Y, DOSTERT P, STROLM B M, *et al*. Involvement of CYP2D6 but not CYP2C19 in nicergoline metabolism in humans [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1996, 42(6): 707-711.

(收稿日期: 2007-08-03)

作者简介: 马春来, 女, 硕士, 药师 * 通讯作者: 焦正, 男, 副主任药师, 博士 Tel: (021) 52889999 E-mail: jiaozhen@online.sh.cn