

国产与进口银杏叶片萜类内酯 Beagle 犬生物利用度的比较

柴战欣¹, 宋 英^{2,3}, 高彩芳^{2,4}, 王建新^{2*}

1. 洛阳新春都生物制药有限公司, 河南 洛阳 471001

2. 复旦大学药学院 智能化递药教育部重点实验室, 上海 201203

3. 上海医药集团中央研究院, 上海 201203

4. 上海医药工业研究院, 上海 201203

摘要: **目的** 比较国产与进口银杏叶片在 Beagle 犬体内的药动学参数和生物利用度。**方法** Beagle 犬分别 ig 国产与进口银杏叶片后, 取血测定。采用 LC-MS 检测 Beagle 犬血浆中银杏叶片萜类内酯(银杏内酯 A、银杏内酯 B 和白果内酯)的含量, 绘制血药浓度-时间曲线, 采用 DAS 软件计算药动学参数。**结果** Beagle 犬 ig 国产银杏叶片(80 mg/kg)后银杏内酯 A、银杏内酯 B 和白果内酯的药-时曲线下面积(AUC_{0-t})分别为 51.64、19.86 和 72.90 ng·h/mL, 而 ig 进口银杏叶片(80 mg/kg)后三者的药-时曲线下面积(AUC_{0-t})分别为 69.98、24.35 和 169.60 ng·h/mL。根据 2 种制剂中 3 种成分的含量, 国产银杏叶片中银杏内酯 A、银杏内酯 B、白果内酯的相对生物利用度分别为 37.77%、33.70%和 95.98%。**结论** Beagle 犬 ig 国产银杏叶片后的萜类内酯生物利用度显著低于进口银杏叶片。

关键词: 银杏叶片; 生物利用度; 一致性评价; 银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 白果内酯

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)12-2840-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.016

Relative bioavailability of terpene lactones in Beagle dogs after ig administration of domestic and imported Ginkgo Leaf Tablets

CHAI Zhan-xin¹, SONG Ying^{2,3}, GAO Cai-fang^{2,4}, WANG Jian-xin²

1. Luoyang Xinchundu Biopharmaceutical Co., Ltd., Luoyang 471001, China

2. Key Laboratory of Smart Drug Delivery, Ministry of Education, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

3. Central Institute of Shanghai Pharmaceutical Group, Shanghai 201203, China

4. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To compare the pharmacokinetic parameters and bioavailability of terpene lactones in Beagle dogs between domestic and imported Ginkgo Leaf Tablets. **Methods** Beagle dogs were ig administrated domestic and imported Ginkgo Leaf Tablets, and then the plasma of Beagle dogs were detected. LC-MS was used to determine the contents of terpene lactones (including ginkgolide A, ginkgolide B, and ginkgo lactone) in plasma of Beagle dogs. Plasma concentration-time curves were drawn and analyzed by DAS software to obtain pharmacokinetics parameter. **Results** The area under curve (AUC_{0-t}) of GA, GB, and BB in Beagle dogs after ig administration domestic Ginkgo Leaf Tablets was 51.64, 19.86, and 72.90 ng·h/mL, while it was 69.98, 24.35, and 169.60 ng·h/mL after ig administration imported *G. biloba* leaf extract tablets, respectively. According to the contents of three components in two preparations, the relative bioavailability of GA, GB, and BB of domestic Ginkgo Leaf Tablets respectively was 37.77%, 33.70%, and 95.98%. **Conclusion** The oral bioavailability of the terpene lactones in imported Ginkgo Leaf Tablets was significantly higher than that of domestic tablets.

Key words: Ginkgo Leaf Tablets; bioavailability; consistency evaluation; ginkgolide A; ginkgolide B; ginkgo lactone

银杏叶是银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的干燥叶, 具有活血化瘀、通络止痛、敛肺平喘、化浊降脂等功能, 用于瘀血阻络、胸痹心痛、中风偏瘫、肺虚咳喘、高脂血症等^[1], 是我国特产的珍贵药

材, 具有悠久的药用历史。银杏叶片是银杏叶经提取后制成的片剂, 用于冠心病、心绞痛、高血压等疾病的治疗, 由于其疗效确切、有效成分明确, 化学结构稳定、服用方便等特点在临床上广泛使用^[2-3]。

收稿日期: 2018-05-21

作者简介: 柴战欣, 男, 工程师, 从事药品与食品工程研究。Tel: (0379)62317945 E-mail: yychzx@sina.com

*通信作者 王建新, 男, 教授, 研究方向为新型给药系统。Tel: (021)51980088 E-mail: jxwang@shmu.edu.cn

银杏叶片中萜类内酯是其主要的活性成分,根据质量标准,银杏叶提取物中萜类内酯的量不得低于 6.0%。但对于口服固体制剂而言,控制其有效成分的溶出度是保证口服生物利用度和疗效的重要因素。因此,在前期工作中,课题组比较了不同来源银杏叶片黄酮类成分的溶出度,发现不同厂家生产的银杏叶片的溶出度差别很大^[4]。本研究在此基础上,选择了一种溶出曲线与进口原研制剂最相似的国产银杏叶片,测定了其进口银杏叶片 Beagle 犬口服给药后萜类内酯(包括银杏内酯 A、银杏内酯 B 和白果内酯)的血药浓度,并计算生物利用度,以进一步比较国产银杏叶片与原研制剂的质量与疗效。

1 材料与仪器

1.1 动物

Beagle 犬,普通级,雄性,体质量(11.0±1.5) kg,由金山卫生中心实验动物中心提供。

1.2 试剂

进口银杏叶片 Tebonin(薄膜衣片,德国 Schwabe 制药集团,批号 9091106);国产银杏叶片(薄膜衣片,上海某药业有限公司,批号 20151023);银杏内酯 A(GA,批号 110862-200608)、银杏内酯 B(GB,批号 110863-200508)、银杏内酯 C(GC,批号 10864-200906)和白果内酯(BB,批号 200906、110865-200404)、大豆苷元(DG,批号 111502-200101)对照品均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(色谱纯,TEEDIA 公司);乙醚(分析纯,中友科技上海有限公司);二氯甲烷(分析纯,中友科技上海有限公司);异丙醇(Sigma 公司);四氢呋喃(Sigma 公司);正丙醇(国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 仪器

Agilent 1100 型液相色谱仪和 Agilent 1946D 质谱仪(美国安捷伦公司);Waters e2695/2998(Waters 公司);BS 224S 电子分析天平(德国赛多利斯公司);XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂);TGL-16C 台式离心机(上海离心机研究所)。

2 方法

2.1 银杏叶片中萜类内酯的含量测定

按《中国药典》2015 年版一部中银杏叶片萜类内酯的含量测定法进行^[1],测定 2 种银杏叶片中 GA、GB、GC 和 BB 的含量。XTerra@MS-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm);流动相为正丙醇-四氢呋喃-水(1:15:84);蒸发光散射检测器^[5-7]。

2.2 LC-MS 测定 Beagle 犬血药浓度方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 phenomenex C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.0 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水,采用梯度洗脱方式,前 6 min 甲醇-水比例为 30:70,后线性增加到 62:48,分析时间为 16 min;体积流量 0.35 mL/min;柱温 45 °C;进样量 20 μL。

2.2.2 质谱条件 EI 离子源;检测方式为负离子检测;干燥气体积流量及温度:10.0 L/min、350 °C;雾化气压力:276 kPa(40 psi);BB、GA、GB、DG 的 *m/z* 分别为 325、407、423、253;BB、GA、GB、DG 各通道的碎片电压分别为 100、120、180、120 V。

2.2.3 血浆样品处理 取血浆 300 μL 置于 5 mL 离心管中,加入甲醇-水(60:40)混合溶液 100 μL,内标溶液 20 μL[约 60 ng/mL DG,甲醇-水(60:40)混合溶液配制],加入提取溶剂乙醚-二氯甲烷-异丙醇(6:3:1) 3 mL,旋涡混合 3 min,10 000 r/min 离心 15 min,取上层有机相于 5 mL 离心管中 40 °C 氮气流下吹干,残余物于 80 μL 甲醇-水(60:40)混合溶液中溶解,10 000 r/min 离心 10 min,取 20 μL 进样测定。

2.2.4 对照品储备液的制备 取 GA、GB 和 BB 对照品适量,加甲醇制成质量浓度分别为 500 μg/mL 的混合溶液,作为对照品储备液。

2.2.5 专属性试验 取 Beagle 犬空白血浆 300 μL,将一定质量浓度的对照品溶液和内标溶液加入空白血浆;取 Beagle 犬给药后不同时间点收集的血浆样品,均按照“2.2.3”项下方法操作。分别进样 20 μL,考察是否有物质干扰各组分的测定。

2.2.6 标准曲线的绘制 精密称取 GA、GB 和 BB 对照品适量,加甲醇配成 500 μg/mL 的储备液,用甲醇-水(60:40)混合溶液稀释成系列浓度的对照品溶液。精密吸取系列溶液 100 μL,加至 300 μL Beagle 犬空白血浆中,按“2.2.3”项下方法操作。

2.2.7 精密度与提取回收率考察 取健康 Beagle 犬的空白血浆 300 μL,加入不同体积的对照品储备液,配制高、中、低 3 种不同质量浓度(22.50、45.00 和 90.00 ng/mL)的样本溶液,连续测定 3 d。计算每个样本的日内和日间精密度的 RSD。取上述质量浓度的银杏内酯对照品溶液,分别进样 20 μL,将所测到的质控样本峰面积与对照品溶液峰面积相比,计算提取回收率。

2.2.8 给药方案 取健康 Beagle 犬 12 只,随机分

为 2 组, 每组 6 只。实验前禁食 12 h, 给药后 6 h 进食, 整个实验过程中自由饮水。按约 80 mg/kg 银杏叶提取物计, 分别 ig 给予 Tebonin 银杏叶片 (1 片, 120 mg 提取物/片) 和国产银杏叶片 2 片 (40 mg 提取物/片), 给药后即刻给 50 mL 水。于给药前和给药后不同时间点 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2、2.5、3、4、6、8 h, 从股静脉取血 3 mL, 按“2.2.3”项下方法进行处理和测定。

2.2.9 统计方法 采用中国药理学学会药理学委员会编制的 DAS 2.0 药动学软件对血药浓度数据进行处理和统计。

3 结果

3.1 国产和进口银杏叶片萜类内酯的含量

用外标两点法对数方程分别计算 GA、GB、GC 和 BB 的质量分数, 结果见表 1。进口与国产银杏叶片中 4 种萜类内酯的含量存在较大差别, 进

表 1 不同来源银杏叶片萜类内酯的质量分数

Table 1 Content of terpene lactones in Ginkgo Leaf Tablets from different sources

银杏 叶片	萜类内酯/(mg·g ⁻¹)			
	GA	GB	GC	BB
进口	1.61	0.81	10.83	31.91
国内	4.73	2.95	25.45	21.44

口银杏叶片中 BB 的含量远高于国内市售银杏叶片, 而其 GA 和 GB 含量却远低于国内市售银杏叶片。

3.2 银杏叶片 Beagle 犬体内血药浓度

3.2.1 专属性 空白血浆、空白血浆加入一定质量浓度的对照品溶液和内标 (DG) 溶液及 Beagle 犬给药后的血浆样品的色谱图见图 1。其中 BB 的保留时间为 4.08 min, GA、GB 的保留时间为 8.00、8.51 min, DG 的保留时间为 11.94 min, 结果表明血浆中内源性物质不干扰待测组分的测定。

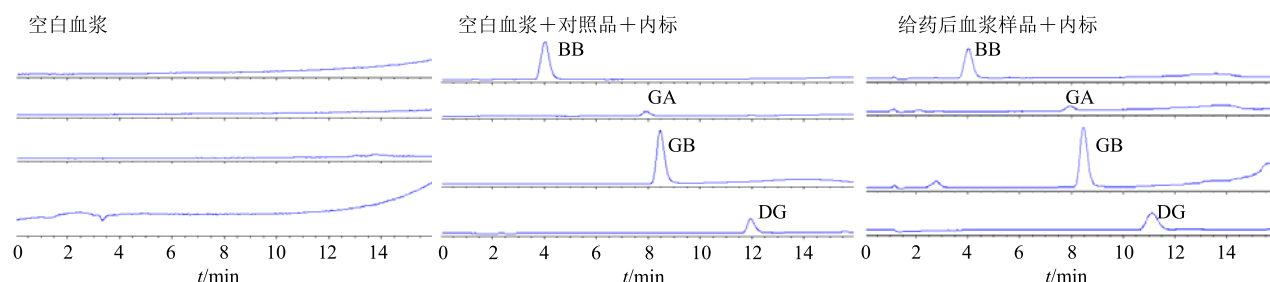


图 1 血浆中 GA、GB 和 BB 的 LC-MS 色谱图

Fig. 1 LC-MS chromatogram of GA, GB, and BB in plasma

3.2.2 标准曲线 以待测物的峰面积与内标的峰面积比为横坐标 (X), 以血浆中待测物的质量浓度为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 求得直线的回归方程, 结果见表 2, 所测定的 r 均 > 0.990 , BB、GA 和 GB 的定量限均为 6.00 ng/mL。

3.2.3 精密度与提取回收率结果 精密度和准确度结果显示, 日内和日间精密度 RSD 均 $< 10\%$ 。提取回收率 BB 为 $(69.4 \pm 5.5)\%$, GA 为 $(71.6 \pm 4.7)\%$, GB 为 $(74.8 \pm 7.9)\%$, 内标为 $(73.2 \pm 8.0)\%$ 。结果

表 2 GA、GB 和 BB 的回归方程及线性范围

Table 2 Regression equation and linear range of GA, GB, and BB

萜类内酯	回归方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)
GA	$Y=106.78 X-1.25$	0.999 4	6.25~250.00
GB	$Y=8.79 X+0.59$	0.998 9	6.25~250.00
BB	$Y=13.13 X+2.88$	0.999 3	6.25~250.00

表明, 本方法适于银杏叶片犬体内药动学研究。

3.2.4 萜类内酯血药浓度测定结果 Beagle 犬 ig 国内和进口银杏叶片后 GA、GB 和 BB 的血药浓度-时间曲线见图 2。采用 DAS 药动学软件对血药浓度-时间的实验数据进行统计分析, GA、GB 和 BB 的药动学行为均符合一级吸收一室模型。

3.2.5 2 种制剂的药动学参数 国产与进口银杏叶片中 3 种成分的药动学参数见表 3~5。以血药浓度-时间曲线下面积 (AUC_{0-t}) 求算相对生物利用度 (F), 其中 3 种成分的剂量分别折算为 80 mg 提取物中三者相应的含量。

结果表明, 与国产银杏叶片相比, 进口银杏叶片中 GA 和 GB 的达峰时间 (t_{max}) 均明显增加, $AUC_{0-\infty}$ 均明显提高。考虑到二者中 GA 和 GB 含量的差异, 国产银杏叶片以 GA 和 GB 计算的生物利用度分别为 37.77% 和 33.70%。进口银杏叶片 GA 峰浓度 (C_{max}) 大于国产银杏叶片; 2 种制剂 GB 的

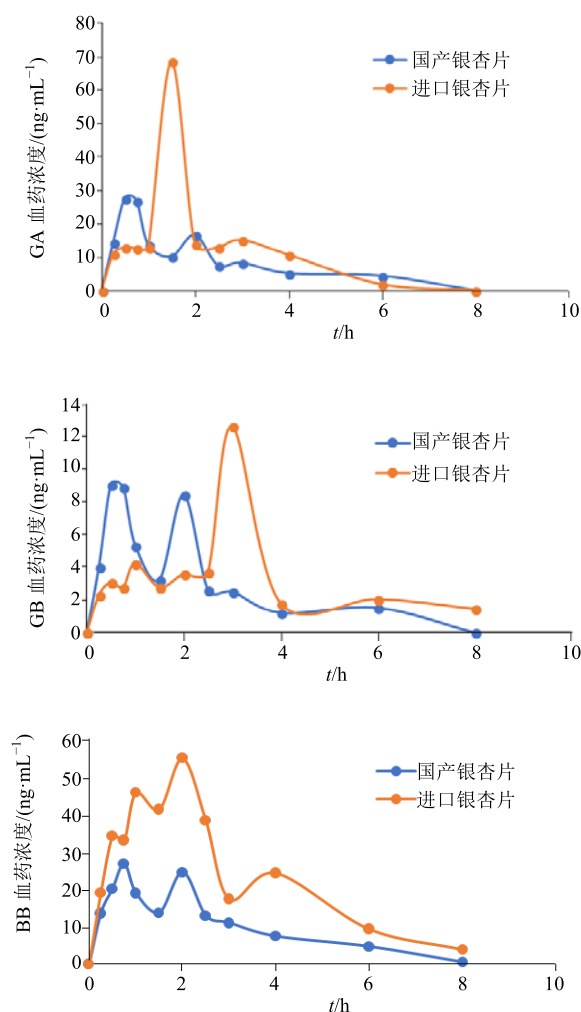


图 2 GA、GB、BB 的平均血浆药物浓度-时间曲线 ($n = 6$)
Fig. 2 Mean plasma drug concentration-time curve of GA, GB, and BB ($n = 6$)

表 3 GA 主要药动学参数

Table 3 Main pharmacokinetic parameters of GA

参数	单位	国产银杏叶片	进口银杏叶片
$C_{\max}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	44.01 ± 18.80	65.24 ± 39.76
$t_{\max}$	h	0.75 ± 0.63	2.58 ± 1.39
$AUC_{0 \sim t}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	51.64 ± 22.32	69.98 ± 39.86
$AUC_{0 \sim \infty}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	69.80 ± 52.48	72.63 ± 40.52
MRT	h	1.62 ± 0.38	2.22 ± 0.41
F	%	37.77	

$C_{\max}$ 值相似。以 BB 计算经剂量与含量折算后的国产银杏叶片的相对生物利用度为 95.98%。

4 讨论

银杏俗称白果,在我国和西方国家将银杏提取

表 4 GB 主要药动学参数

Table 4 Main pharmacokinetic parameters of GB

参数	单位	国产银杏叶片	进口银杏叶片
$C_{\max}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	16.23 ± 8.39	14.35 ± 9.34
$t_{\max}$	h	0.25 ± 0.37	1.50 ± 1.19
$AUC_{0 \sim t}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	19.86 ± 6.33	24.35 ± 16.61
$AUC_{0 \sim \infty}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	20.49 ± 6.26	34.93 ± 21.68
MRT	h	2.03 ± 0.26	3.01 ± 0.36
F	%	33.70	

表 5 BB 主要药动学参数

Table 5 Main pharmacokinetic parameters of BB

参数	单位	国产银杏叶片	进口银杏叶片
$C_{\max}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	41.37 ± 24.30	90.42 ± 30.61
$t_{\max}$	h	0.92 ± 0.68	1.25 ± 0.81
$AUC_{0 \sim t}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	72.90 ± 24.88	169.60 ± 36.70
$AUC_{0 \sim \infty}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	80.29 ± 25.09	190.30 ± 46.61
MRT	h	2.43 ± 0.35	2.65 ± 0.49
F	%	95.98	

物制成多种制剂,其活性成分主要为总黄酮醇苷和银杏内酯,通过抑制血小板聚集、清除自由基、降低全血黏度、增加对缺血组织的氧气和葡萄糖供应量等药理作用而改善脑部和周边血液循环。萜类内酯是银杏叶提取物制剂的关键活性成分,其含量与溶出度对其口服生物利用度和疗效的发挥至关重要。因此,本研究首先测定并比较了国产与进口 2 种银杏叶片所含萜类内酯的含量,之后又考察了这 2 种银杏叶片口服给药后,萜类内酯在 Beagle 犬体内的药动学特性。

银杏叶萜类内酯成分只具有微弱的紫外吸收,有研究者曾用抑制血小板激活因子(PAF)与受体结合的方法测定萜类内酯的药动学参数,也有研究者采用 GC-MS 进行测定^[8]。LC-MS 能有效分离组成复杂的无紫外吸收的物质^[9-13],研究显示,该方法能有效分离测定 GA、GB、BB。GC 未能检测,该现象与其他文献报道一致,具体原因未见报道,推测可能与其体内吸收差或者是在体内迅速进行生物转换有关。

从上述血药浓度-时间曲线结果分析,GA、GB 和 BB 3 种成分均出现了双峰现象,关于药-时曲线双峰现象,文献报道可以分为以下 2 种情况讨论。如果是口服给药,出现双峰现象^[9-10]的原因:(1)由于胃按一定时间排空的原因,药物分成 2 次到达

小肠,造成药物 2 次入血,出现双峰;(2)药物在胃肠道的 2 个不同部位吸收,有快有慢,因而出现双峰;(3)肝肠循环;(4)制剂原因,如含有速释成分和缓释成分;(5)脂溶性药物吸收后,迅速分布到组织中,在血液中药代谢到一定程度后,又出现 2 次释放入血;(6)中药原料的来源不统一以及没有统一的提取物质量标准导致制剂之间的质量差异,从而引起体内的吸收情况不一致。基于上述 6 种原因,对于成分比较复杂的中药制剂的生物利用度更应该引起重视。

根据研究结果,发现主要活性成分 GA、GB 和 BB 的含量不同,国产银杏叶片中萜类内酯的 Beagle 犬的体内吸收也显著低于进口片剂。含量和体内生物利用度研究说明提取物中萜类内酯成分的含量与比例、制剂的制备工艺、辅料的种类和批次等都对制剂的质量有明显的影响。本研究结果可为银杏叶片制备工艺的升级换代提供参考依据,同时也为提高中药制剂的质量评价提供了一种研究思路和技术手段。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 曹京梅. 银杏叶片的药理及临床应用研究概况 [J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(23): 3171-3172.
- [3] 商 丹, 彭 飞, 赵艳芳. 银杏叶片临床应用研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(14): 1584-1585.
- [4] 宋 英, 康 毅, 程 耀, 等. 不同来源银杏叶片的溶出度比较 [J]. 华西药学杂志, 2012, 27(1): 77-79.
- [5] 肖 飞, 谭永霞, 王永平, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定银杏叶片中 4 种萜类内酯含量 [J]. 医药导报, 2010, 29(5): 675-677.
- [6] He X, Bernart M W, Nolan G S, *et al.* High-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry study of ginkgolic acid in the leaves and fruits of the ginkgo tree (*Ginkgo biloba*) [J]. *J Chromatogr Sci*, 2000, 38(4): 169-173.
- [7] Chen W D, Liang Y, Xie L, *et al.* Pharmacokinetics of the ginkgo B following intravenous administration of ginkgo B emulsion in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(1): 1-5.
- [8] Biber A, Koch E. Bioavailability of ginkgolides and bilobalide from extracts of ginkgo biloba using GC/MS [J]. *Planta Med*, 1999, 65(2): 192-193.
- [9] Lang Q, Kwang Y H, Wai C M. Selective dissolution and one step separation of terpene trilactones in ginkgo leaf extracts for GC-FID determination [J]. *Talanta*, 2001, 54(4): 673-680.
- [10] Beek T A V, Veldhuizen A V, Lelyveld G P, *et al.* Quantitation of bilobalide and ginkgolides A, B, C and J by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Phytochem Anal*, 1993, 4(6): 261-268.
- [11] Wang W P, Liu N, Kang Q, *et al.* Simultaneous determination by UPLC-MS/MS of seven bioactive compounds in rat plasma after oral administration of Ginkgo biloba, tablets: application to a pharmacokinetic study [J]. *J Zhejiang Univ: Sci B*, 2014, 15(11): 929-939.
- [12] Berezhkovskiy L M. Prediction of the possibility of the second peak of drug plasma concentration time curve after iv bolus administration from the standpoint of the traditional multi-compartmental linear pharmacokinetics [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97(6): 2385-2393.
- [13] Ma Y M, Sun R Y. Second peak of plasma diazepam concentration and enterogastric circulation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1993, 14(3): 218-221.