

中药 0 期临床药代动力学试验探索^{*}

于雪峰,李国信^{**},梁丽喆^{**},李丁蕾

(辽宁中医药大学附属第二医院 沈阳 110034)

摘 要:目的:以舒血宁注射液为示范,探索中药进行 0 期临床药代动力学试验的可行性。方法:检测健康受试者在静脉滴注微量舒血宁注射液后的血药浓度;按照倍数分布关系,以单次给药爬坡的方式摸索血药浓度的最小检测剂量,计算药动学参数;以临床用药剂量为对照,考察药动学规律。结果:在舒血宁注射液微量组的药动学检测中,血药浓度低于检测下限;单次给药爬坡组在相当于临床给药剂量的 1/25 以上时,可以检测到血药浓度。结论:与临床给药剂量组相比,低剂量给药具有大致相同的药物代谢趋势,0 期临床药代动力学试验。

关键词:中药 0 期临床试验 药代动力学 舒血宁注射液

doi:10.11842/wst.2019.04.018

中图分类号:R965

文献标识码:A

0 期临床试验,又称探索性新药临床研究(exploratory investigational new drug, eIND)或探索性临床试验(Exploratory Clinical Trial),是指在临床前实验结束,对动物身上检测到、尚不充分的实验数据,以短时间、小样本、小剂量的方式,在人体进行未上市新药的临床验证旨在考察临床前数据的人体药代/药效学参数重现性,为药物研发的进一步取舍提供依据^[1-3]。

结合中药“多组分、多靶点”的自身特点,本研究在药物选择和实验设计上较西药 0 期临床试验均做出相应调整,选择舒血宁注射液进行中药 0 期临床试验的方法学探索。舒血宁注射液是从银杏叶中提取并制备的灭菌水溶液,具有改善微循环、扩张血管等作用,临床常用于缺血性心脑血管疾病。舒血宁注射液成分包括银杏内酯 A、B、C,白果内酯和黄酮类,但在前期的药物成分含量检测中,除银杏内酯 A、B、C 外,其他成分均低于检测下限。本文以舒血宁注射液的 0 期临床药代动力学示范研究,探索中药在临床评价中进行 0 期临床药代动力学试验的可行性,对所建立试验方法进

行验证^[6]。

1 实验材料

1.1 药品试剂

舒血宁注射液(黑龙江珍宝岛药业股份有限公司,规格:5 mL:17.5 mg,批号:B20140907);对照品均购于中国食品药品检定研究院,其中银杏内酯 A(批号:110862-201310,含量:98.9%);银杏内酯 B(批号:100861-201310,含量:98.9%);银杏内酯 C(批号:10081-201408,含量:98.9%);甲醇(色谱纯,德国默克公司,批号:1503907 940),甲酸(色谱纯,迪马科技有限公司,批号:4293980),乙酸乙酯为(化学纯,国药集团化学试剂有限公司,批号:20160105)。

1.2 仪器

LC-MS/MS 联用仪(美国安捷伦公司,型号:6410 型),Quantitative Analysis version B.01.04 数据处理系统,ESI 离子源;微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂,型号:XW-80A);分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,型号:XS-105);低温高速离心机(德国 SIGMA 公司,型号:SIGMA3-18A)。

收稿日期:2018-02-13

修回日期:2018-03-11

^{*} 国家科技部“十二五”重大新药创制项目(2012ZX09303-017):中药新药临床评价研究技术,负责人:李国信;辽宁省科技厅科学技术计划项目(2015225015):肺系重大疾病中医转化医学规范化研究,负责人:李国信。

^{**} 通讯作者:李国信,博士生导师,主要研究方向:中药新药研究;梁丽喆,主治医师,主要研究方向:中药临床药理研究。

2 实验方法

2.1 试验设计

分为微剂量试验(10人),单剂量爬坡试验(每剂量组2人,共5组),低剂量试验组(血药浓度最小检测值剂量10人)和临床剂量对照组(10人),以此考察微剂量、低剂量与临床剂量给药间的药代动力学规律。

2.2 受试者选择

32名健康志愿者,男女各半,年龄20~45岁,体重指数19~24;心电图、血尿常规、凝血、肝肾功能等检查指标均在正常范围值区间;无烟、酒嗜好;获取知情同意并志愿受试者。

2.3 给药方法及血样采集

给药方法:受试者随机分至各剂量组。微剂量组给药参照FDA标准,予100 μg 药物进行试验^[5-8];单剂量爬坡组根据倍数分布,设立参考剂量70 mg的1/100, 1/50, 1/25, 1/12.5, 1/6.25即0.7 mg, 1.4 mg, 2.8 mg, 5.6 mg和11.2 mg共5个剂量进行试验给药^[9];低剂量试验组剂量以单剂量爬坡组检测结果为参考;临床剂量对照组以70 mg进行相同溶液剂量(100 mL)给药。

血样采集:受试者于试验当天早晨用药前1小时统一进食,随后开始试验,将配制好的100 mL溶液,按一定滴速静脉滴注,30 min静点完毕。于给药前(0 h)、滴注开始后5 min、10 min、30 min、45 min、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h、10 h从肘静脉取血,每次5 mL,采血后将血液样品置于肝素化试管中,离心(4℃, 4000 rpm, 10 min),分离得血浆,于-70℃冰箱贮存至测定^[10]。

2.4 色谱与质谱条件

色谱条件:色谱柱:Agilent Poroshell 120 SB-C18, 4.6 mm×75 mm, 2.7 μm ;流动相:乙腈:水(含0.1%甲酸)为50:50,流速0.3 mL·min⁻¹;柱温40℃;进样量为10 μL 。

质谱条件:ESI离子源:载气流速9 L/min,载气温度300℃,雾化气压力40 psi,毛细管电压4000 V;选择多反应监测(MRM)方式,正离子模式检测,用于定量的离子分别为:银杏内酯A m/z:409.1→345.0,诱导电压195 V,碰撞能19 V;银杏内酯B m/z:425.0→361.2,诱导电压180 V,碰撞能17 V;银杏内酯C m/z:441.1→325.0,诱导电压190 V,碰撞能19 V;200 ms扫描时间。

2.5 血浆样品处理:

精密量取500 μL 血浆,离心管涡旋30 s,精密加入

1 mL乙酸乙酯,涡旋2 min后,14 000 rpm·min⁻¹离心10 min,取800 μL 上清液,40℃水浴氮气吹干,80 μL 流动相溶解残渣,10 μL 进样。

2.6 数据处理

采用WinNonlin 6.3软件对受试者体内的药时曲线进行非房室模型拟合,采用SPSS软件对舒血宁注射液不同剂量组之间的药动学进行比较。

3 实验结果

3.1 方法学考察与评价

经方法学考察,血浆内源性杂质不干扰样品的测定,银杏内酯A、银杏内酯B、银杏内酯C在选定的色谱和质谱条件下专属性良好;银杏内酯A、银杏内酯B、银杏内酯C线性范围分别为1.0017~40.0680 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r=0.9921$), 1.0200~40.7992 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r=0.9957$), 0.4740~14.2192 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r=0.9923$),定量下限分别为1.0017、1.0200、0.4740 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N>10$);日间和日内精密度RSD值均小于15% ($n=6\times 3$);基质效应均在85%~115%之间 ($RSD<15\%$);经室温放置24 h,反复冻融、长期冷冻30 d稳定性考察,样品均能保持稳定 ($RSD<15\%$),符合生物样品分析方法要求,结果(见表1,表2)。

3.2 微剂量与单剂量爬坡组药动学结果

受试者注射不同剂量舒血宁注射液后的血浆样品中银杏内酯A、B、C的血药浓度-时间曲线(如图1)所示,经计算机拟合,药代动力学参数统计(见表3~表5)。

3.3 低剂量试验组与临床剂量对照组药动学比较结果

根据单剂量爬坡剂量组结果,选取银杏内酯A、B、C检测均超过9个时间点的剂量组(11.2 mg)作为低剂量试验组给药剂量,与临床剂量对照组比较如表6;低剂量试验组与临床剂量对照组分别对 $AUC_{(0-\infty)}$, $C_{\max}$, $t_{1/2}$ 和 $MRT_{(0-\infty)}$ 药动学参数比较,结果(见图2)。

低剂量试验组与临床剂量对照组相比,舒血宁注射液的 $t_{1/2}$, $T_{\max}$ 和 MRT 相近,不随剂量的改变而变化; AUC_{0-1} , $AUC_{0-\infty}$ 和 $C_{\max}$ 均与剂量呈正相关,提示在此剂量范围,舒血宁注射液在健康受试者体内呈线性药代动力学特征,低剂量试验能够一定程度上反应临床给药剂量在人体内的代谢规律。

4 讨论

0期临床试验在国外的应用并不普遍,中药0期的开展在文献中尚未见明确报道。相较于西药采用探针

表1 精密度和回收率试验结果 ($\bar{x} \pm SD, n = 6 \times 3$)

分析物	浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	精密度		回收率		基质效应	
		检测浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/%	检测浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/%	基质效应/%	RSD/%
银杏内酯 A	2.00	2.21 $\pm$ 0.06	2.86	95.16 $\pm$ 2.72	0.03	101.64 $\pm$ 6.96	0.07
	20.03	18.54 $\pm$ 1.33	7.17	92.75 $\pm$ 6.65	0.07	87.92 $\pm$ 2.80	0.03
	32.05	32.33 $\pm$ 1.63	5.07	89.08 $\pm$ 4.51	0.05	104.73 $\pm$ 6.29	0.06
银杏内酯 B	2.04	2.06 $\pm$ 0.28	13.46	91.96 $\pm$ 12.37	0.13	93.38 $\pm$ 6.07	0.07
	20.40	19.68 $\pm$ 1.91	9.70	93.91 $\pm$ 9.11	0.10	93.70 $\pm$ 6.16	0.07
	32.64	34.53 $\pm$ 1.67	4.83	97.02 $\pm$ 4.69	0.05	91.98 $\pm$ 4.08	0.04
银杏内酯 C	0.95	0.95 $\pm$ 0.06	6.40	89.35 $\pm$ 5.72	0.06	95.22 $\pm$ 4.80	0.05
	4.74	4.55 $\pm$ 0.30	6.63	104.47 $\pm$ 6.93	0.07	103.04 $\pm$ 4.48	0.04
	11.38	11.17 $\pm$ 0.76	6.80	98.45 $\pm$ 6.70	0.07	105.55 $\pm$ 5.09	0.05

表2 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm SD, n = 6 \times 3$)

分析物	浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	室温放置 24 h		反复冻融三次		长期冷冻	
		检测浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/%	检测浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/%	检测浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	RSD/%
银杏内酯 A	2.00	2.04 $\pm$ 0.14	6.89	1.98 $\pm$ 0.20	9.92	2.08 $\pm$ 0.10	4.95
	32.05	30.60 $\pm$ 1.85	6.05	30.42 $\pm$ 2.11	6.94	30.79 $\pm$ 1.71	5.55
银杏内酯 B	2.04	2.03 $\pm$ 0.17	8.44	1.94 $\pm$ 0.22	11.10	2.04 $\pm$ 0.18	8.88
	32.64	32.76 $\pm$ 1.30	3.97	32.57 $\pm$ 1.73	5.30	32.63 $\pm$ 1.52	4.67
银杏内酯 C	0.95	1.00 $\pm$ 0.07	6.97	0.94 $\pm$ 0.05	5.60	0.98 $\pm$ 0.05	5.53
	11.38	11.26 $\pm$ 0.57	5.10	11.21 $\pm$ 0.75	6.71	111.21 $\pm$ 0.41	3.68

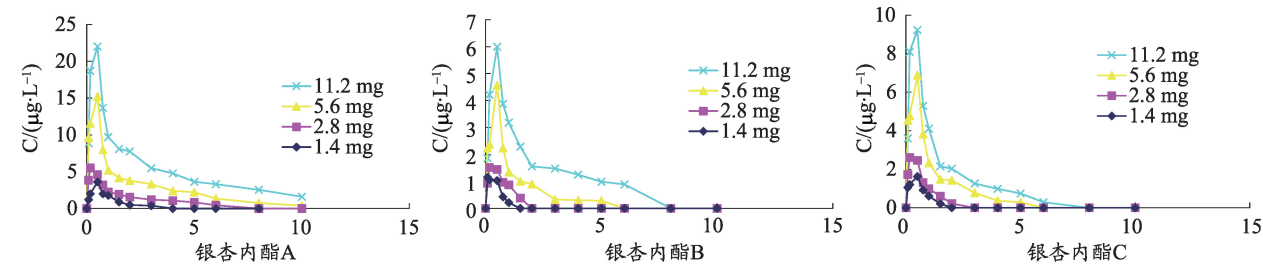


图1 血药浓度-时间曲线

表3 银杏内酯 A 药动学参数 ($\bar{x} \pm SD, n = 2$)

参数	单剂量爬坡组			
	1.4 mg 组	2.8 mg 组	5.6 mg 组	11.2 mg 组
AUC _(0-t) mg/L·h	0.004 $\pm$ 0.001	0.010 $\pm$ 0.004	0.029 $\pm$ 0.015	0.054 $\pm$ 0.016
AUC _(0-∞) mg/L·h mg/L·h mg/L·h	0.006 $\pm$ 0.004	0.018 $\pm$ 0.001	0.031 $\pm$ 0.016	0.075 $\pm$ 0.001
MRT _(0-t) h	0.897 $\pm$ 0.384	1.850 $\pm$ 0.201	2.332 $\pm$ 0.769	3.154 $\pm$ 0.169
MRT _(0-∞) h	2.610 $\pm$ 2.547	4.484 $\pm$ 0.006	2.973 $\pm$ 0.953	3.956 $\pm$ 0.549
t _{1/2 z}	1.948 $\pm$ 2.170	3.372 $\pm$ 0.371	2.174 $\pm$ 0.662	2.918 $\pm$ 0.630
T _{max} h	0.500 $\pm$ 0.000	0.333 $\pm$ 0.236	0.500 $\pm$ 0.000	0.500 $\pm$ 0.000
V _z L	547.850 $\pm$ 433.938	1 561.722 $\pm$ 1 020.424	607.018 $\pm$ 137.464	590.550 $\pm$ 204.936
CL _z L/h	287.224 $\pm$ 165.620	159.210 $\pm$ 1.417	209.857 $\pm$ 107.671	150.186 $\pm$ 2.857

或荧光显影技术对药物进行生物标记来检测药物在体内分布,多组分多靶点的中药进行0期临床评价显得尤为困难。药物选择方面:本研究在西药0期临床试验药物

表4 银杏内酯B药动学参数 ($\bar{x} \pm SD, n=2$)

参数	单剂量爬坡组			
	1.4 mg 组	2.8 mg 组	5.6 mg 组	11.2 mg 组
AUC _(0-∞) mg/L* ^h mg/L* ^h mg/L* ^h	0.001±0.001	0.002±0.001	0.005±0.003	0.012±0.001
MRT _(0-∞) h	0.001±0.001	0.003±0.001	0.009±0.007	0.016±0.004
MRT _(0-∞) h	0.223±0.315	0.569±0.198	1.137±0.546	2.095±0.251
t _{1/2} z	0.288±0.407	1.611±0.852	1.554±0.144	4.717±2.111
T _{max} h	0.137±0.193	1.08±0.583	1.173±0.235	3.664±1.546
V _z L	0.25±0.354	0.333±0.236	0.500±0.000	0.500±0.000
CL _z L/h	217.799±308.014	1 604.007±344.004	3 853.995±1 913.650	3 600.566±682.186
C _{max} mg/L	552.207±780.939	1 135.719±392.739	840.424±641.610	717.773±173.982

表5 银杏内酯C药动学参数 ($\bar{x} \pm SD, n=2$)

参数	单剂量爬坡组			
	1.4 mg 组	2.8 mg 组	5.6 mg 组	11.2 mg 组
AUC _(0-∞) mg/L* ^h mg/L* ^h mg/L* ^h	0.002±0.001	0.003±0.001	0.008±0.003	0.013±0.006
MRT _(0-∞) h	0.002±0.001	0.003±0.001	0.01±0.003	0.016±0.005
MRT _(0-∞) h	0.528±0.060	0.621±0.173	1.157±0.247	1.547±0.033
t _{1/2} z	0.688±0.004	0.848±0.334	1.892±0.265	2.969±1.17
T _{max} h	0.353±0.0300	0.551±0.223	1.572±0.323	2.688±1.061
V _z L	0.500±0.000	0.333±0.236	0.292±0.295	0.500±0.000
CL _z L/h	488.902±86.027	794.488±215.302	1 328.954±152.174	3 061.813±1 972.564
C _{max} mg/L	454.469±478.777	1 030.212±145.572	605.738±191.827	747.214±213.689

表6 低剂量试验组与临床剂量对照组药动学参数 ($\bar{x} \pm SD, n=10$)

参数	低剂量试验组	对照低剂量组	对照高剂量组	临床剂量对照组		
	银杏内酯A	银杏内酯B	银杏内酯C	银杏内酯A	银杏内酯B	银杏内酯C
AUC _(0-∞) mg/L* ^h mg/L* ^h mg/L* ^h	0.054±0.016	0.012±0.001	0.013±0.006	0.125±0.000	0.016±0.000	0.024±0
MRT _(0-∞) h	0.075±0.001	0.016±0.004	0.016±0.005	0.158±0.008	0.036±0.020	0.028±0
MRT _(0-∞) h	3.154±0.169	2.095±0.251	1.547±0.033	1.968±0.125	2.181±0.132	1.832±0.071
t _{1/2} z	3.956±0.549	4.717±2.111	2.969±1.170	3.649±0.528	4.55±0.357	2.81±0.12
T _{max} h	2.918±0.630	3.664±1.546	2.688±1.061	2.943±0.301	3.298±0.043	2.332±0.094
V _z L	0.500±0.000	0.500±0.000	0.500±0.000	0.500±0.000	0.500±0.000	0.5±0.00
CL _z L/h	0.022±0.010	0.006±0.002	0.009±0.005	0.080±0.015	0.009±0.001	0.017±0.002

选择的基础上,选择成分种类分明(如各种黄酮、内酯类等)、生物标记物相对确切(抗氧化、抗血小板聚集等)、代谢途径相对单一的静脉给药中药注射剂进行试验,现代药理研究比较简单。

实验设计方面:本研究在西药0期临床微剂量给药的基础上,以《0期临床试验与中药注射剂上市后临床安全性再评价》单次给药方式为依据,在规定的临床

剂量比值(1/6.25)范围内,根据倍数分布关系,按照临床给药剂量的1/100、1/50、1/25、1/12.5、1/6.25,依次进行剂量爬坡试验,以能检测到的较为完整血药浓度的剂量,探究药代动力学参数。并采用已上市中药舒血宁注射液,开设临床给药剂量对照组,以此种方法摸索中药的最低药理学剂量,为中药进行早期临床评价奠定基础。

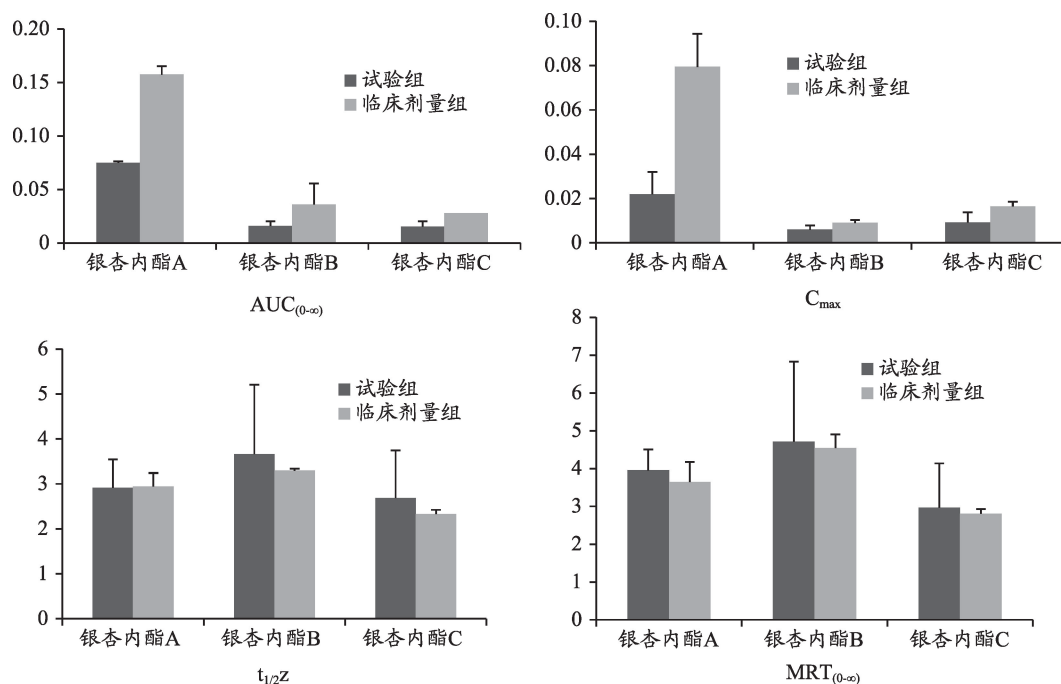


图2 试验低剂量组与临床剂量组中3种成分药动参数比较

参考文献

- Kinders R, Parchment R E, Ji J, *et al.* Phase 0 clinical trials in cancer drug development: from FDA guidance to clinical practice. *Mol Interv*, 2007, 7(6): 325-334.
- Cho D Y, Bae, Soo H, Shon J H, *et al.* High-sensitive LC-MS/MS method for the simultaneous determination of mirodenafil and its major metabolite, SK-3541, in human plasma: Application to microdose clinical trials of mirodenafil. *J Sep Sci*, 2013, 36(5): 840-848.
- Pasqualetti G, Gori G C, *et al.* Healthy volunteers and early phases of clinical experimentation. *Eur J Clin Pharmacol*, 2010, 66(7): 647-653.
- Faunce T A, Faunce T A. Global clinical trials: effective implementation and management. *JAMA*, 2012, 307(307): 2105.
- Marchetti S, Schellens J H. The impact of FDA and EMEA guidelines on drug development in relation to Phase 0 trials. *Br J Cancer*, 2007, 97(5): 577-581.
- Donawho C K, Luo Y, Luo Y, *et al.* ABT-888, an orally active poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(9): 2728-37.
- Arrowsmith J, Miller P. Trial Watch: Phase II and Phase III attrition rates 2011-2012. *Nat Rev Drug discov*, 2013, 12(8): 569.
- Yang B, Meng Z Y, Yan L P, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of 1,5- dicaffeoylquinic acid in rats following a single intravenous administration. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40(2): 417-422.
- 谢雁鸣, 魏戎, 张占军, 等. 0期临床试验与中药注射剂上市后临床安全性再评价. *中国中药杂志*, 2011, 36(20): 2874-2876.
- 任艳萍. 中药矮地茶质量控制与体内代谢及舒血宁注射液的多组分测定与药动学研究. 石家庄: 河北医科大学. 2013.

Exploration on Phase 0 Clinical Pharmacokinetics Trial in Traditional Chinese Medicine

Yu Xuefeng, Li Guoxin, Liang Lizhe, Li Dinglei

(The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China)

Abstract: This paper was aimed to explore the possibility for pharmacokinetics experiment of phase 0 clinical trial in traditional Chinese medicine (TCM). The plasma concentration of volunteers after being injected with micro-dose Shuxuening Injection was tested. According to multiple distributions, the minimum detectable dose was explored by

increasing single dose, in order to calculate the pharmacokinetics parameters and to find out the law in the pharmacokinetics experiment by comparing with the clinical dosage. The results showed that in the micro-dose group, concentrations cannot be detected. In the single-dose climbing group, the concentration was tested out above 1/25 of clinical dosage. It was concluded that compared with the clinical group, low-dose has similar metabolic tendency of drugs. It is possible to conduct pharmacokinetics experiment of phase 0 clinical trial in TCM.

Keywords: Traditional Chinese medicine, phase 0 clinical trial, pharmacokinetics experiment, Shuxuening Injection

(责任编辑:陈 宁,责任译审:王 晶)