

粉防己碱温敏性缓释原位凝胶的大鼠体内药代动力学分析

高秀蓉^{*}, 许小红, 杨洋, 王凤玲, 张燕, 李泽民
(成都医学院药学院, 成都 610083)

[摘要] 目的:采用 LC-MS/MS 测定静脉注射、灌胃粉防己碱原料药与皮下注射粉防己碱凝胶剂的血药浓度,计算粉防己碱凝胶剂的生物利用度。方法:建立血浆中粉防己碱含量的检测方法。通过颈静脉注射粉防己碱原料药、灌胃原料药、皮下注射凝胶剂后采血,采用 LC-MS/MS 检测大鼠血浆中药物浓度,流动相 0.1% 甲酸水溶液-乙腈梯度洗脱,流速 0.4 mL·min⁻¹;采用电喷雾电离,正离子检测模式,粉防己碱和蝙蝠葛碱(内标)的 m/z 分别为 623.1 ~ 176.0, 625.1 ~ 206.0。利用 DAS 3.0 软件计算药动学参数并绘制药-时曲线,计算口服和皮下注射方式的绝对生物利用度。结果:建立的 LC-MS/MS 精密度、稳定性良好(RSD 均 < 11.0%),萃取回收率 81.36% ~ 97.14%。灌胃给予粉防己碱与皮下注射粉防己碱凝胶剂的绝对生物利用度分别为 42.76% 和 85.44%。结论:粉防己碱凝胶剂的生物利用度较灌胃给予原料药大大提高,且具有缓释效果,具有一定的开发前景。

[关键词] 粉防己碱; 凝胶剂; 蝙蝠葛碱; 生物利用度; 皮下注射; 灌胃给药

[中图分类号] R969.1; R284.1; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0098-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230098

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0908.004.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:08

Pharmacokinetic Analysis of Tetrandrine Sustained-release Thermosensitive *in situ* Gel in Rats

GAO Xiu-rong^{*}, XU Xiao-hong, YANG Yang, WANG Feng-ling, ZHANG Yan, LI Ze-min
(School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

[Abstract] **Objective:** LC-MS/MS was employed to determine blood concentration after intravenous, intragastric administration of tetrandrine powder and subcutaneous injection of tetrandrine gel, and calculated the bioavailability of tetrandrine gel. **Method:** Determination of tetrandrine in plasma was established. After intravenous, intragastric administration of tetrandrine powder and subcutaneous injection of tetrandrine gel, LC-MS/MS was adopted to determine blood concentration of tetrandrine, detection ion for tetrandrine was m/z 623.1-176.0, detection ion for dauricine (the internal standard) was m/z 625.1-206.0, DAS 3.0 software was used to calculate pharmacokinetic parameters and the absolute bioavailability. **Result:** This established LC-MS/MS had good stability and precision, extraction recovery was 81.36% -97.14%. Absolute bioavailabilities of intragastric administration of tetrandrine powder and subcutaneous injection of tetrandrine gel were 42.76% and 85.44%, respectively. **Conclusion:** The absolute bioavailability of tetrandrine gel is improved greatly by compared with intragastric administration of tetrandrine powder, tetrandrine gel has a sustained-release effect.

[Key words] tetrandrine; gel; dauricine; bioavailability; subcutaneous injection; intragastric administration

[收稿日期] 20151113(005)

[基金项目] 四川省教育厅自然科学基金项目(11ZB202);成都医学院大学生创新性实验项目(CX201225)

[通讯作者] ^{*}高秀蓉, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事药物新剂型设计及药物动力学研究, Tel: 13678011025, E-mail: gaomuxouzi@126.com

粉防己碱又名汉防己甲素,是中药粉防己的主要活性成分,属于双苄基异喹啉生物碱,具有消炎、降血糖、抗肿瘤、抗心率失常等药理作用^[1],尤其在心血管、免疫系统及抗肿瘤等领域的疗效引人注目,是目前治疗高血压急、重症的主要中药有效成分。但粉防己碱难溶于水,透膜吸收能力和口服生物利用度差^[2],无法满足临床需要。注射用缓控释给药系统主要通过局部注射途径给药,由于绕开了胃肠道屏障,所以生物利用度大大提高,同时由于具有缓控释特点,给药次数减少,避免峰谷波动,病人依从性得到提高^[3-4]。注射用缓释原位凝胶制剂是将药物和高分子材料溶于适宜的溶剂中,局部注射后聚合物在给药部位的生理条件下凝固而形成凝胶型半固体药物贮库^[5-7]。本课题组前期已成功制备了粉防己碱温敏性缓释原位凝胶。本实验采用大鼠静脉注射粉防己碱原料药、灌胃粉防己碱原料药和皮下注射凝胶剂,通过 LC-MS/MS 测定血浆中药物浓度,比较灌胃原料药和皮下注射凝胶剂的绝对生物利用度,为粉防己碱温敏性凝胶的制剂开发提供基础数据。

1 材料

6410 型三重四级杆质谱仪系统(美国 Agilent 公司),MTN-2800D 型氮气吹干仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),XW-80A 型漩涡混合仪(上海青浦沪西仪器厂),TGL-16G 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),BP211D 型 1/10 万电子分析天平(德国赛多利斯公司),85-2 型磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司)。

粉防己碱对照品(西安开来生物工程有限公司,批号 k130927,纯度 99.0%),蝙蝠葛碱对照品(内标,深圳市维琪生物科技有限公司,纯度 > 99.0%),肝素钠(上海惠世生化试剂有限公司),乌拉坦(成都科龙化工试剂厂),泊洛沙姆 407(P407,湖北恒硕化工有限公司),羟丙基甲基纤维素[陶氏化学(中国)有限公司],水为超纯水,甲酸、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

清洁级雄性 SD 大鼠,体重(200 ± 20) g,实验前禁食过夜并自由饮水,未使用任何药物,由成都达硕实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(川)2013-24。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Eclipse SB-C₁₈ 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 2 min, 20% B; 2 ~ 5 min, 20% ~

50% B; 5 ~ 10 min, 50% ~ 95% B; 10 ~ 10.1 min, 95% ~ 20% B),柱温 30 °C,流速 0.4 mL · min⁻¹,进样量 5 μL。

2.2 质谱离子源结构参数和样品分子离子峰 采用电喷雾电离(ESI),正离子检测模式,喷雾电压 3.5 kV,雾化气压 0.28 MPa,干燥气流量 9 L · min⁻¹,毛细管温度 350 °C,粉防己碱裂解电压 110 V,蝙蝠葛碱裂解电压 90 V,粉防己碱碰撞能量 40 V,蝙蝠葛碱碰撞能量 60 V,粉防己碱检测离子 *m/z* 623.1 ~ 176.0,蝙蝠葛碱检测离子 *m/z* 625.1 ~ 206.0。粉防己碱和内标蝙蝠葛碱在正离子模式下被离子化,二者分子离子峰见图 1。

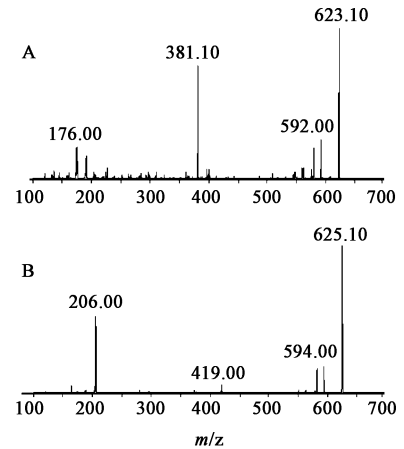


图 1 粉防己碱(A)和内标(B)质谱分析

Fig. 1 Product ion spectra of tetrandrine (A) and dauricine (B)

2.3 方法学考察

2.3.1 溶液的制备 精密称定粉防己碱对照品 2.0 mg 于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,得 80.0 mg · L⁻¹ 储备液。精密吸取 80.0 mg · L⁻¹ 储备液至 10 mL 量瓶,加甲醇定容,得 8.0 mg · L⁻¹ 粉防己碱工作液。精密量取该工作液 5 mL 至 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇定容,按此法依次稀释,得系列标准曲线工作液。精密称定蝙蝠葛碱对照品 2.5 mg 于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容,得 0.1 g · L⁻¹ 内标储备液,加甲醇稀释,得 0.25 mg · L⁻¹ 内标液。分别将系列标准曲线工作液 25 μL 加至 75 μL 空白大鼠血浆中,得系列标准曲线溶液。配制方法同标准曲线溶液,得质量浓度分别为 0.01, 0.20, 1.00 mg · L⁻¹ 的质控样品溶液。

2.3.2 血浆样品的处理与测定 精密吸取血浆样品 100 μL,加入内标液 25 μL,旋涡混旋 30 s,加入乙酸乙酯 2 mL,旋涡混匀 5 min,离心(12 000 r · min⁻¹, 10 min, 下同),尽可能取净上清液,氮气挥干,加流动相 100 μL 复溶,离心,取上清液进样分

析。取空白血浆、粉防己碱 + 内标 + 空白血浆、血浆样品,按 2.1 和 2.2 项下条件测定,见图 2。结果显示血浆中其他物质不干扰内标与粉防己碱的测定。

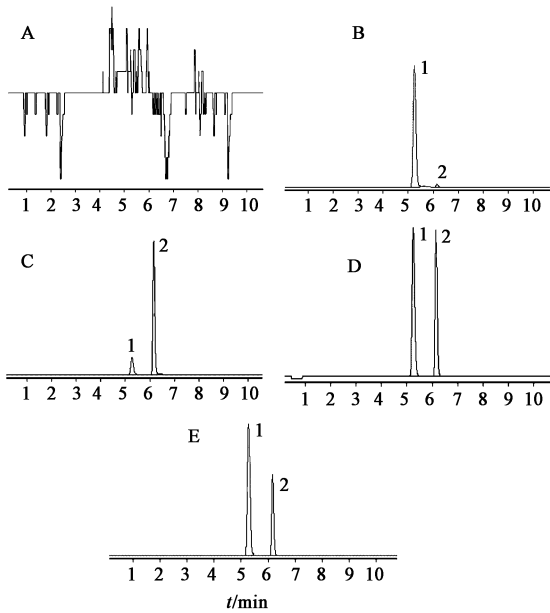


图 2 不同方式给药后粉防己碱在大鼠血浆中的 HPLC
A. 空白血浆; B. 空白血浆 + 对照品 + 内标; C. 静注后 5 min 血浆样品; D. 口服后 4 h 血浆样品; E. 皮下注射后 6 h 血浆样品; 1. 蝙蝠葛碱(内标); 2. 粉防己碱

图 2 不同方式给药后粉防己碱在大鼠血浆中的 HPLC

Fig. 2 HPLC of tetrandrine in rat plasma after administration

2.3.3 标准曲线与最低定量限 取 2.3.1 项下配制的标准曲线溶液,按 2.3.2 项下方法处理,以粉防己碱与内标的峰面积比值为纵坐标,粉防己碱质量浓度为横坐标,采用最小二乘法进行加权(权重 $1/C^2$)回归,得标准曲线 $Y = 0.9794X + 8.9538$ ($r = 0.9948$),线性范围 $0.001 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,最低定量限(LLOQ) $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.4 萃取回收率考察 取高、中、低质量浓度 ($1.0, 0.2, 0.003 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的质控样品溶液,按 2.3.2 项下方法处理后测定,得萃取峰面积。同时取空白血浆 $100 \mu\text{L}$,按 2.3.2 项下方法处理,加流动相 $50 \mu\text{L}$ 复溶,加入高、中、低质量浓度的粉防己碱对照品溶液 $25 \mu\text{L}$,各加入内标液 $25 \mu\text{L}$,测定,得未萃取峰面积。计算高、中、低质量浓度粉防己碱的萃取回收率分别为 $(81.36 \pm 5.5)\%$, $(85.25 \pm 6.2)\%$, $(97.14 \pm 6.1)\%$, RSD 分别为 6.2% , 4.1% , 7.4% ,蝙蝠葛碱的萃取回收率 $(80.12 \pm 3.6)\%$, RSD 5.2% 。

2.3.5 精密度和准确度 取 2.3.4 项下的质控样品溶液,加入内标液 $25 \mu\text{L}$,按 2.3.2 项下方法处理后测定,1 d 内高、中、低质量浓度的样品各平行测

定 6 次,计算日内精密度 RSD 分别为 4.9% , 5.2% , 6.1% ;准确度分别为 96.6% , 100.3% , 98.4% 。连续测定 3 d,计算日间精密度 RSD 依次为 3.8% , 5.6% , 7.6% ;准确度分别为 96.5% , 98.8% , 99.8% 。

2.3.6 稳定性考察 取 2.3.4 项下的质控样品溶液,考察其在不同条件下的稳定性,包括室温 ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) 放置 6 h,反复冻融 3 次, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置 2 周,样品处理后在 HPLC 自动进样架上放置 12 h ($15 \text{ }^\circ\text{C}$)。结果 RSD $3.6\% \sim 10.3\%$,表明样品在各条件下基本稳定。

2.4 药代动力学研究

2.4.1 试药的配制 称取一定量粉防己碱,加适量 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶解,用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠调节 pH $6 \sim 7$,用生理盐水定容至所需浓度,得供试液。称取一定量乌拉坦,加水溶解并定容,配成 20% 乌拉坦溶液。取等量 20% 泊洛沙姆溶液与等量 20% 羟丙基甲基纤维素使二者终质量分数均为 10%,用玻璃棒缓慢搅拌使之混匀,加入一定浓度的粉防己碱溶液,得含药凝胶,使粉防己碱质量浓度达 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,辅料泊洛沙姆和羟丙基甲基纤维素终质量分数均为 8%,得粉防己碱温敏性缓释原位凝胶。

2.4.2 静脉注射 6 只雄性 SD 大鼠,实验前禁食过夜(自由饮水),实验前称重并计算给药体积。实验前腹腔注射一定量 20% 乌拉坦溶液麻醉,暴露双侧颈静脉,用生理盐水润湿的纱布覆盖伤口,用针管采集空白血液 0.3 mL ,以恒定速度按剂量 $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 颈静脉注射粉防己碱供试液,注射时间控制在 30 s 左右,注射完后立即开始计时。于给药后 0.05, 0.083, 0.133, 0.2, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 5, 10, 15, 24, 36 h 不同时间点颈静脉取血约 0.3 mL ,置于 0.5 mL 肝素化离心管中,轻轻摇匀,离心,精密吸取血浆样品 $100 \mu\text{L}$,按 2.3.2 项下方法处理,待测。

2.4.3 灌胃给药 6 只雄性 SD 大鼠,实验前禁食过夜(自由饮水),实验前称重并计算给药体积。实验前尾静脉采集空白血液 0.3 mL ,以恒定速度按剂量 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予粉防己碱供试液,灌胃体积 1 mL ,灌胃后立即开始计时,分别于给药后 0.083, 0.166, 0.33, 0.75, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48 h 尾静脉取血约 0.3 mL ,后续按 2.4.2 项下方法处理。

2.4.4 皮下注射 6 只雄性 SD 大鼠,实验前禁食过夜(自由饮水),实验前称重并计算给药体积。实

验前尾静脉采集空白血液 0.3 mL,以恒定速度按剂量 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 皮下注射粉防己碱温敏性缓释原位凝胶,注射完后立即开始计时,分别于给药后 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2.5, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120 h 尾静脉取血约 0.3 mL,后续按 2.4.2 项下方法处理。

2.4.5 数据分析 将血药浓度数据输入 DAS 3.0 药动学软件,采用统计矩方法计算药代动力学参数,得药-时曲线,见图 3 和表 1。结果显示粉防己碱凝胶剂和灌胃给予原料药的达峰时间 (t_{\max}) 分别为 (10.40 ± 1.67) , (7.60 ± 0.89) h,二者具有显著性差异,说明凝胶剂的达峰时间较原料药灌胃方式显著延长;二者的药峰浓度 (C_{\max}) 亦有显著性差异。表明粉防己碱凝胶剂皮下注射有一定的缓释效果。计算灌胃给予原料药和皮下注射凝胶剂的绝对生物利用度 (F)。 $F = (\text{AUC}_{0-t} \times D_{iv}) / (\text{AUC}_{0-t,iv} \times D) \times 100\%$, 式中 F 为灌胃或皮下注射给药方式的绝对生物利用度, AUC_{0-t} 为灌胃或皮下注射给药后药-时曲线下面积, AUC_{iv} 为静脉给药后药-时间曲线下面积, D 为灌胃或皮下注射的给药剂量, D_{iv} 为静脉注射的给药剂量。结果灌胃给予原料药和皮下注射凝胶剂的 F 分别为 42.76%, 85.44%, 说明皮下注射凝胶剂较灌胃给予原料药 F 大大提高。

3 讨论

文献多采用常规 HPLC 检测粉防己碱血药浓度^[8-10],预试验选择 HPLC 作为血药浓度检测方法,发现由于粉防己碱在体内血药浓度较低,以至于常规的 HPLC 无法满足检测要求,而 LC-MS/MS 不仅能提高分析速度,还可提高分析的灵敏度和准确度。

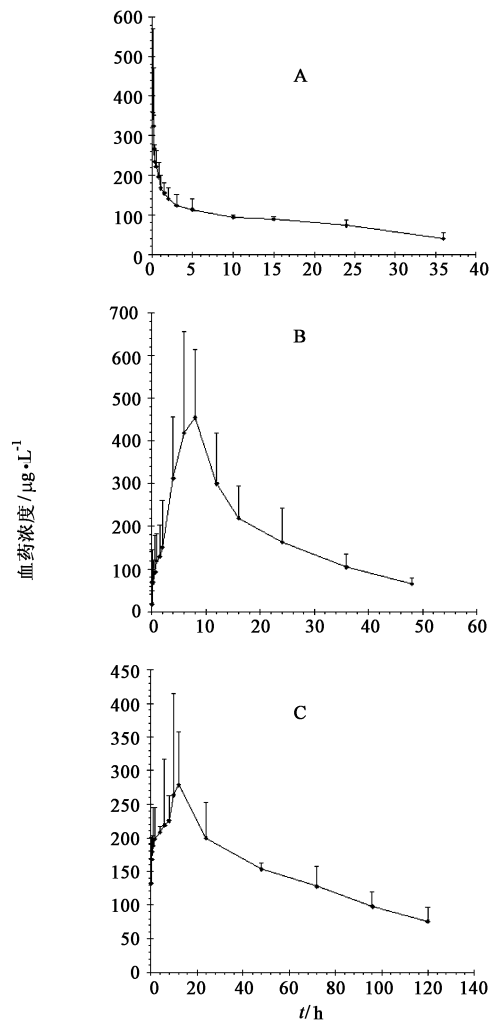


图 3 大鼠静脉注射 (A),灌胃 (B) 和皮下注射 (C) 给药后粉防己碱的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Plasma concentration-time curves of tetrandrine after intravenous (A), intragastric administration (B) and subcutaneous injection (C) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 大鼠静脉注射、灌胃和皮下注射给药后粉防己碱的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Pharmacokinetic parameters of tetrandrine after administration ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数/单位	静脉注射	灌胃	皮下注射
$\text{AUC}_{0-t} / \text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$3\ 147.23 \pm 204.01$	$8\ 971.32 \pm 3\ 468.09$	$17\ 926.38 \pm 1\ 966.51$
$\text{AUC}_{0-\infty} / \text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$8\ 159.84 \pm 3\ 621.58$	$10\ 694.61 \pm 3\ 498.97$	$31\ 211.95 \pm 16\ 420.14$
$\text{MRT}_{0-t} / \text{h}$	14.07 ± 1.65	17.76 ± 1.28	47.83 ± 4.23
$\text{MRT}_{0-\infty} / \text{h}$	72.62 ± 41.42	28.00 ± 5.95	155.04 ± 145.98
$t_{1/2\alpha} / \text{h}$	50.84 ± 29.21	18.77 ± 3.91	109.55 ± 118.46
t_{\max} / h	0.11 ± 0.05	7.60 ± 0.89	$10.40 \pm 1.67^{1)}$
$V_z / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	62.38 ± 18.88	0.54 ± 0.27	211.25 ± 114.18
$\text{CL}_z / \text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	1.14 ± 0.63	7.54 ± 2.53	1.87 ± 0.66
$C_{\max} / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	482.67 ± 159.34	459.46 ± 410.06	$279.23 \pm 86.07^{1)}$

注:与灌胃给药组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

鉴于此,本文采用 LC-MS/MS 研究粉防己碱在大鼠体内的药动学过程。目前,生物样品的预处理方法主要有蛋白沉淀法、有机溶剂萃取法和固相萃取法等。本文采用了有机溶剂萃取法,该方法较蛋白沉淀法更费时,但处理后的样品杂质更少,大大降低了对检测成分的干扰,延长了色谱柱寿命。

本文采用大鼠静脉注射原料药、灌胃原料药和皮下注射缓释原位凝胶 3 种给药途径,其中静脉注射为血管内给药,灌胃和皮下注射均为血管外给药,后两者分别以静脉注射为参比制剂计算绝对生物利用度,结果显示皮下注射凝胶剂较灌胃给予原料药生物利用度大大提高。从大鼠体内药动学参数可知,与灌胃给药相比,凝胶剂的 t_{max} 延长,凝胶剂的 C_{max} 降低,说明皮下注射凝胶剂在大鼠体内有一定缓释效果;同样,与灌胃给药相比,皮下注射凝胶剂的 AUC 和 F 均有所提高,作用时间大大延长,具有一定的开发前景。后续将对粉防己碱温敏性缓释原位凝胶的质量控制、稳定性及其在动物体内的药动学过程等进行分析,为该制剂的研发和生产提供参考。

[参考文献]

[1] 王辉,罗顺德. 粉防己碱的药理学研究进展[J]. 中国药学杂志,2000,35(12):800-802.

[2] 梁琦,闫润红,王永辉,等. 粉防己与其主要组分粉防己碱效、毒作用及关系初探[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(7):163-166.

[3] 任瑾,周建平,姚静,等. 注射型缓控释制剂的研究进展[J]. 药学进展,2010,34(6):264-271.

[4] 陆伟根,任德权,王培全,等. 注射用缓控释给药系统的研究进展[J]. 中国新药杂志,2007,16(11):840-843.

[5] 项佳音,杨洪军,熊欣,等. 常见温度敏感型原位凝胶载体的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(2):252-257.

[6] 赵欢喆,王婷,廖旋彦,等. 甲氨蝶呤皮下注射用原位凝胶的研制[J]. 中国医药工业杂志,2014,45(4):339-343.

[7] 朱全刚,周芷筠,张迪,等. 复方盐酸利多卡因温敏凝胶的制备和含量测定[J]. 药学服务与研究,2013,13(6):456-459.

[8] 马燕,李卫中. RP-HPLC 法测定犬血浆中粉防己碱的血药浓度[J]. 中药材,2008,31(9):1426-1427.

[9] 田卫,张海霞,黄华宇,等. 高效液相色谱法测定大鼠血浆中防己诺林碱和粉防己碱[J]. 分析测试技术与仪器,2007,13(1):60-63.

[10] 李凤前,陆彬,陈文彬,等. 肺靶向汉防己甲素缓释微囊的小鼠体内分布[J]. 中国医院药学杂志,2001,21(5):259-261.

[责任编辑 刘德文]