

· 工艺与制剂 ·

小檗碱的油水分配系数 及其在体肠循环灌注模型中的肠吸收特性

张玉玲^{1,2}, 陈健龙², 王虑虎³, 孙丽玲², 张诗航², 李超英^{2*}, 崔翰明^{1*}

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 长春中医药大学, 长春 130117;
3. 广州中一药业有限公司, 广州 510140)

[摘要] **目的:**测定小檗碱和黄连总生物碱中小檗碱的油水分配系数,并研究小檗碱、黄连总生物碱和清热通腑片中小檗碱在大鼠空肠和回肠的吸收特性,同时比较两者的相关性。**方法:**采用摇瓶法测定小檗碱在正辛醇-水中的表观油水分配系数,采用大鼠在体肠循环灌注模型研究小檗碱的吸收特性,UPLC 测定小檗碱质量浓度,计算小檗碱的油水分配系数、肠吸收速度常数(Ka)表观渗透系数(P_{app})。**结果:**小檗碱和黄连总生物碱在肠液/正辛醇中油水分配系数分别为 0.213 5,0.175 7。小檗碱在空肠中 $Ka = 0.046 6$, $P_{app} = 4.88 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,回肠中 $Ka = 0.034 9$, $P_{app} = 4.13 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$;黄连总生物碱在空肠中 $Ka = 0.035 1$, $P_{app} = 3.92 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,回肠中 $Ka = 0.026 6$, $P_{app} = 3.21 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$;清热通腑片在空肠中 $Ka = 0.028 3$, $P_{app} = 3.11 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$,回肠中 $Ka = 0.018 1$, $P_{app} = 2.23 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 。**结论:**小檗碱在空肠和回肠中均有吸收,且吸收速率较慢,但空肠吸收速率大于回肠,具有显著性差异;小檗碱的吸收快慢为小檗碱对照品 > 黄连生物碱物 > 清热通腑片,小檗碱油水分配系数的预测结果与肠吸收结果基本一致。

[关键词] 小檗碱; 油水分配系数; 在体肠循环灌注模型; UPLC; 肠吸收

[中图分类号] R945, R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0001-05

[doi] 10.11653/syjf2013160001

Investigation of Apparent Oil/Water Partition Coefficients of Berberine and Its Absorption Characteristics in *in situ* Intestinal Perfusion Model

ZHANG Yu-ling^{1,2}, CHEN Jian-long², WANG Lv-hu³, SUN Li-ling²,
ZHANG Shi-hang³, LI Chao-ying^{2*}, CUI Han-ming^{1*}

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;
2. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;
3. Guangzhou Zhongyi Pharmaceutical Company Limited, Guangzhou 510140, China)

[Abstract] **Objective:** To determine apparent oil-water partition coefficient of berberine monomer and berberine in coptis total alkaloids, investigate absorption kinetics of berberine at jejunum and ileum of rats from berberine monomer and coptis total alkaloids and Qingre Tongfu tablets, then compare correlation between apparent oil-water partition coefficient and absorption kinetics. **Method:** Apparent octanol-water partition coefficient of berberine was determined by shake-flask method, *in situ* intestinal recirculating perfusion model of berberine was performed to study its absorption at different intestinal regions. The concentrations of berberine were analyzed by UPLC. Calculated berberine intestinal absorption rate constant (Ka) and apparent permeability coefficient (P_{app})

[收稿日期] 20121227(029)

[基金项目] 国家重大新药创制专项(2011ZX09102-011-08)

[第一作者] 张玉玲, 硕士, 从事药剂学研究, Tel:13596060782, E-mail: zhangyuling995@126.com

[通讯作者] * 李超英, 教授, 从事药物新型给药系统研究, Tel:13504417829, E-mail: chaoying_li@126.com;

* 崔翰明, 副研究员, 从事中药药效物质、质量分析和新制剂研究, Tel:010-88001470, E-mail: cui-yaoshi@163.com

in different intestinal regions of rats. **Result:** Oil-water partition coefficient of berberine and coptis total alkaloids were 0.213 5 and 0.175 7, respectively. K_a of berberine were 0.046 6 and 0.034 9 in jejunum and ileum, respectively; While P_{app} were 4.88×10^{-6} , $4.13 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively. K_a of berberine in coptis total alkaloids were 0.035 1 and 0.026 6 in jejunum and ileum, respectively; While P_{app} were 3.92×10^{-6} , $3.21 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively. K_a of berberine in Qingre Tongfu tablets were 0.028 3 and 0.018 1 in jejunum and ileum, respectively; While P_{app} were 3.11×10^{-6} and $2.23 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively ($n = 6$). **Conclusion:** Berberine had absorption in jejunum and ileum with slow absorption rate, but the former was greater than the latter with a significant difference; Absorption rate of berberine was in order of berberine reference standard > coptis total alkaloids > Qingre Tongfu tablets, the predicted results of oil-water partition coefficient of berberine were basically the same with intestinal absorption results.

[**Key words**] berberine; oil-water partition coefficient; *in situ* intestinal recirculating perfusion model; UPLC; intestinal absorption

黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎^[1],小檗碱为黄连含量最高的主要活性成分,具有广谱抗菌、抗肿瘤、调节血脂和降低血糖等生理活性^[2-3]。药物吸收的前提条件是在该部位溶出,由于生物膜相当于类脂屏障,该屏障强弱与被转运分子的亲脂性有关,亲脂性药物一般容易穿过类脂屏障,利于吸收,相反则不利于吸收。目前,临床上小檗碱的给药方式主要以口服为主,由小肠吸收,其口服吸收较差,生物利用度较低。本实验拟通过研究小檗碱在胃肠道的吸收机制和吸收部位为其口服剂型设计提供依据,利用摇瓶法测定油水分配系数,采用大鼠在体肠循环灌流模型,UPLC 测定灌流池中小檗碱含量,研究小檗碱、黄连总生物碱、清热通腑片中小檗碱在不同肠段、不同复方中吸收情况,同时比较二者的相关性。

1 材料

H-class 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),UV-2012 PC 型紫外-可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司),HZS-H 型恒温水浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司),BQ060142 型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司),MSU225S-000-DU 型 1/100 万电子分析天平(德国塞多利股份公司),Q-POD 型纯水机(MILLIPORE 公司)。

盐酸小檗碱对照品(中国食品药品检验院,批号 110713-200609),黄连总生物碱(由中国中医科学院广安门医院自制),清热通腑片(自制,批号 20120314),酚红(北京益利精细化学品有限公司,批号 20050530),乙腈、甲醇、甲酸、乙酸铵为色谱纯,水为高纯水,其他试剂均为分析纯。

人工肠液配制 称取磷酸二氢钾 1.36 g 至 200 mL 量瓶中,加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NaOH 溶液 79 mL,用高纯水定容至刻度,即得。

Krebs-Ringer 液配制 称取 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl_2 0.37 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.32 g, 葡萄糖 1.4 g, MgCl_2 0.02 g, NaHCO_3 1.37 g, 加水定容至 1 L, 即得。

雄性 SD 大鼠,体重 300 ~ 320 g,购自北京华康生物科技股份有限公司,许可证号 SCXK2009-0007。

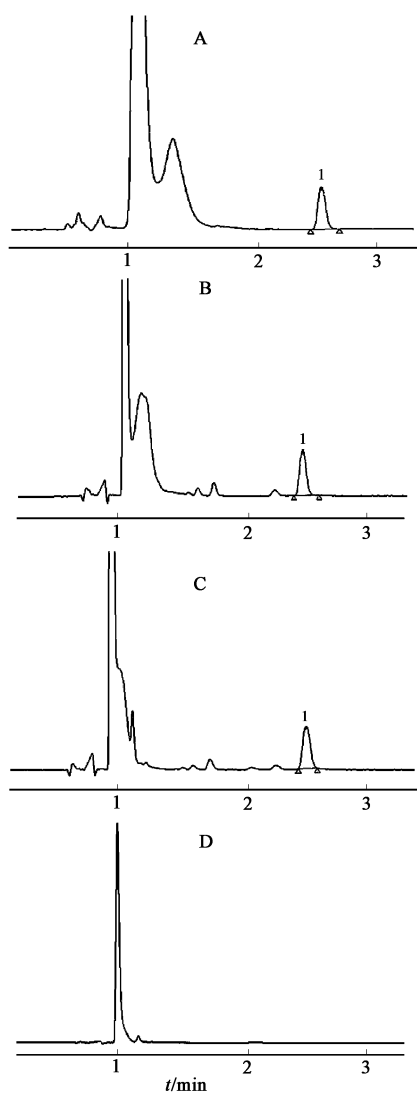
2 方法与结果

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈-水(2 mmol/L 乙酸铵和 0.05% 甲酸, pH 3.20)(30:70),流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,柱温 30 $^\circ\text{C}$,检测波长 345 nm,进样量 5 μL ,见图 1。

2.2 小檗碱标准曲线的绘制 精密称取小檗碱适量,用 Krebs-Ringer 液分别配制成 20, 50, 100, 200, 500, 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,按 2.1 项下色谱方法测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 62.417X - 412.77$ ($r = 0.9999$),线性范围 19.74 ~ 987 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 精密度试验 取高、中、低 3 个质量浓度的小檗碱对照品溶液,各连续进样 6 次,记录峰面积,计算 RSD 分别为 4.02%, 2.45%, 0.59%,表明仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验 取 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱对照品溶液适量,分别在 0, 1, 2, 4, 8, 24 h 测定,记录峰面积,计算小檗碱含量的 RSD 2.96%。另取空白肠灌流液配制小檗碱质量浓度 200 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的供试品溶液,于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中孵育,分别在 0, 1, 2, 4, 8, 24 h 测



A. 对照品; B. 黄连总生物碱; C. 清热通腑片;
D. Krebs-Rings 灌流液; 1. 小檗碱

图1 小檗碱灌流液 UPLC

定,记录峰面积,计算小檗碱含量的 RSD 3.07%,表明小檗碱在 Krebs-Rings 液中 24 h 内基本稳定。

2.5 回收率试验 称取小檗碱适量,用 Krebs-Ringer 液配制成 $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的小檗碱溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积,计算小檗碱的平均回收率 96.71%,RSD3.79%。

2.6 酚红标准曲线的绘制 精密称取酚红 5 mg,用 Krebs-Ringer 液稀释成 60, 50, 40, 30, 20, 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,于 559 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.015X + 0.0419$ ($r = 0.9994$),线性范围 10.12 ~ 60.72 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。精密度和稳定性试验中 A 的 RSD 均 < 5%,能满足肠灌流液中苯酚红的测定要求。

2.7 小檗碱表观油水分分配系数确定^[4] 将正辛醇

与人工肠液各 200 mL 分别置于分液漏斗中,摇匀,放置,待自然分层后,分装锥形瓶中,上层为油相,下层为水相,各吸出 10 mL 置于锥形瓶中,分别加入小檗碱和总生物碱适量,放在具塞锥形瓶中,37 °C 水浴振荡 24 h,静止 5 min,上、下层溶液各取 1 mL, N_2 吹干,用流动相复溶,按 2.1 项下色谱条件测定,结果小檗碱和黄连总生物碱在肠液/正辛醇中油水分分配系数分别为 0.213 5, 0.175 7 ($n = 3$)。

$$\text{油水分分配系数} = C_{\text{油相}}/C_{\text{水相}}$$

2.8 小檗碱大鼠在体肠吸收试验

2.8.1 灌流液的配置 称取盐酸小檗碱对照品适量,用 Krebs-Ringer 液配置 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的小檗碱灌流液 50 mL,备用。精密称取黄连总生物碱适量,用 Krebs-Ringer 液稀释成小檗碱质量浓度 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的总生物碱灌流液 50 mL,备用。取清热通腑片 10 片,研细,混匀,精密称取适量,用 Krebs-Ringer 液配制成小檗碱质量浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的清热通腑方制剂灌流液 50 mL,备用。

2.8.2 小檗碱在大鼠不同肠段的吸收 试验前将大鼠禁食 12 h,自由饮水,腹腔注射 20% 乌拉坦溶液 ($5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) 麻醉,固定,沿腹中线打开腹腔,分别分离出空肠或回肠。空肠自幽门开始向下量 10 cm 作为起点,再向下量取 10 cm,分别切一小口,两端插聚乙烯管,用灭菌的手术线结扎^[5]。回肠自回盲端向上量 10 cm 作为终点,再向上量取 10 cm,分别切一小口,在回肠两端插聚乙烯管,用灭菌的手术线结扎。用预热至 37 °C 等渗生理盐水冲洗肠内容物,待内容物冲洗干净后,排净生理盐水^[6]。换上预热至 37 °C 的灌流液,将进口管和出口管与贮药池相连,用蠕动泵以 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速循环灌流。分别于 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 h 取灌流液 0.6 mL,其中 0.5 mL 用于酚红的检测,0.1 mL 用于小檗碱检测,同时补加相同体积的空白 Krebs-Rings 液。灌流后测定小肠内径 (R),计算灌流肠段表面积 (A)。

采用酚红质量浓度变化校正灌流液体积,以灌流池中剩余药量的对数对取样时间进行线性回归,得回归方程,根据回归方程的斜率求算吸收速率常数 (Ka),按公式 (1) 和 (2) 计算小檗碱的表观渗透系数 (P_{app})。结果小檗碱在空肠中 $Ka = 0.0466$, $P_{\text{app}} = 4.88 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$,回肠中 $Ka = 0.0349$, $P_{\text{app}} = 4.13 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$;黄连总生物碱在空肠中 $Ka = 0.0351$, $P_{\text{app}} = 3.92 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$,回肠中 $Ka = 0.0266$, $P_{\text{app}} = 3.21 \times 10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$;清热通腑片在空

肠中 $Ka = 0.0283$, $P_{app} = 3.11 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, 回肠中 $Ka = 0.0181$, $P_{app} = 2.23 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ($n = 6$)。

$$C_{\text{out}}(\text{corrected}) = C_{\text{out}} \times PR_{\text{in}} / PR_{\text{in}} \quad (1)$$

$$P_{\text{app}} = \frac{Q \times L \ln\left(\frac{C_{\text{in}}}{C_{\text{out}}(\text{corrected})}\right)}{2\pi r l} \quad (2)$$

式中 $C_{\text{out}}(\text{corrected})$ 和 C_{out} 分别为出口处经校正后的小檗碱质量浓度和实际测得的小檗碱质量浓度, C_{in} 为灌流液中小檗碱质量浓度, PR_{in} 和 PR_{out} 分别为入口处和出口处酚红质量浓度, Q 为肠道灌流液的流速 ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), l 和 r 分别为被灌流肠段的长度和内径^[7]。利用统计分析软件 SPSS 16.0 对不同部位和不同药物间进行方差分析。结果小檗碱在大鼠空肠和回肠均有吸收, 但吸收速率空肠大于回肠, 具显著性差异 ($P < 0.05$), 表明小檗碱在空肠吸收较好。小檗碱的吸收快慢为小檗碱 > 总生物碱 > 清热通腑片。

3 讨论

在体大鼠肠循环灌流模型不会切断血管及神经, 既保证了肠道神经及内分泌输入的完整, 又保证了血液及淋巴液的供应, 提高了生物活性, 同时避免了胃内容物及消化道固有运动的生理影响, 能较真实地反映药物的小肠吸收情况^[8]。在体肠灌流进行肠吸收研究时, 大鼠小肠不仅吸收药物, 也能吸收水分, 导致灌流液体积变化, 因此需采用不被小肠吸收的酚红校正灌流液体积的变化^[9]。先以较高流速 ($2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 循环 10 min, 排净肠段的空气, 保证灌流液与肠段接触面积不变, 可减少试验误差, 试验开始时将多余的肠段放回到大鼠体内减少热量的散失, 并用等渗生理盐水浸渍的纱布覆盖于肠组织表面保湿, 用白炽灯维持大鼠体温, 防止大鼠在试验中死亡。

药物的表观油水分配系数反映药物的亲水亲油性, 是用于预测药物跨膜转运的重要参数。正辛醇的溶度参数与生物膜的溶度参数一致, 可较好模拟肠上皮的脂屏障。小檗碱油水分配系数试验与肠灌流试验所得结果一致, 给药的成分越多, 小檗碱的油水分配系数和吸收速率越小。药物的相互作用会改变药物的吸收、分布、排泄和生物转化过程, 导致产生药理效应的可利用药量的增减变化, 从而影响药物效应。研究发现的小檗碱与复方中其他成分吸收特性的相互作用是由于肠道黏膜通透性的改变, 还是竞争性地作用于转运载体, 抑或使肠道细胞结构或分泌功能发生了改变还不得而知, 值得进一步研究。

文献报道大鼠肠循环的 $P_{app} < 3 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$

和 $P_{app} > 2 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ 分别表示药物难以吸收和易于吸收^[10]。小檗碱介于二者之间, 为吸收中等的药物, 复方给药时小檗碱的油水分配系数发生了改变, 同时由 Caco-2 细胞试验证明小檗碱是 P-gp 的底物, 这可能是导致小檗碱口服吸收差, 生物利用度低的原因。

现代药理研究发现, 小檗碱发挥药效具有双动力学特征, 即血浆药理学 (药物吸收入血, 主要发挥调脂、降糖、抗心律失常及抗炎等作用) 和药物胃肠动力学特征 (药物在消化道内, 主要发挥抑菌作用)。进一步了解小檗碱在胃肠道的吸收特性可减少剂型设计的盲目性^[11]。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 285.
- [2] 王红, 师凌云, 尹华峰, 等. 小檗碱的调脂作用与 CPT1A 基因表达的关系研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2715.
- [3] 吴柯, 杨俊霞, 周岐新. 小檗碱对实验性大鼠结肠癌的防治作用与环氧化酶 2 关系的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(20): 2768.
- [4] LU X X, HE L, CHEN L, et al. Determination of equilibrium solubility and oil-water partition coefficient of scutellarin[J]. Acad J Guangdong Coll Pharm, 2011, 27(1): 1.
- [5] 苏红, 黄用生, 陈文, 等. 单向灌流法研究紫草素的大鼠在体肠吸收[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 190.
- [6] 邹丽娟, 陈颖, 杨庆, 等. 吴茱萸对黄连生物碱在大鼠肠道吸收中的影响研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 147.
- [7] 张英丰, 李玉洁, 杨庆, 等. 大鼠在体单向肠灌流法进行丹参素丹酚酸 B 的肠吸收研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 17(11): 96.
- [8] Salphati L, Childers K, Pan L, et al. Evaluation of a single-pass intestinal-perfusion method in rat for the prediction of absorption in man[J]. J Pharm Pharmacol, 2001, 53(7): 1007.
- [9] 陈新民, 李俊松, 李文, 等. 五味子有效成分的大鼠在体单向灌流肠吸收[J]. 药学杂志, 2010, 45(5): 652.
- [10] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum[J]. Pharm Res, 1996, 13(9): 1336.
- [11] 谭晓梅, 郭友立, 钟玉飞. 黄连提取物中盐酸小檗碱及药根碱大鼠在体肠吸收特征的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 755.

[责任编辑 全燕]