

· 药物代谢 ·

复方盐酸小檗碱结肠定位片在大鼠体内的释药行为研究

邹海艳¹, 李朝霞¹, 王玉蓉^{2*}, 王地¹

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] **目的:**研究复方盐酸小檗碱结肠定位片在大鼠体内的释药行为,评价其结肠定位释药特性。**方法:**分别将复方盐酸小檗碱结肠定位片($\Phi=3\text{ mm}$)和盐酸小檗碱混悬液大鼠灌胃给药,以巴马汀为内标,采用HPLC分别测定大鼠血浆和胃肠道组织中盐酸小檗碱的含量,分析22 h内各时间点药物在胃肠道组织中的分布和血浆药物浓度,计算药物的相对靶向释药指数(DDI)。**结果:**盐酸小檗碱在血浆和胃肠道组织中的线性范围分别为 $0.02\sim 0.40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r>0.998$)和 $0.05\sim 10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r>0.999$);复方结肠定位片组药物释放行为具有明显的时滞,药物主要分布于大鼠盲肠和结肠组织,结肠组织的 C_{\max} 和 $AUC_{0-22\text{ h}}$ 分别为混悬液组的3.1,3.6倍,大鼠胃、近端小肠、远端小肠、盲肠和结肠组织的DDI值依次为0.00,0.23,1.17,2.36,8.55。**结论:**复方盐酸小檗碱结肠定位片具有较好的结肠定位释药特性。

[关键词] 复方结肠定位片; 盐酸小檗碱; 组织分布; 相对靶向释药指数

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0132-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.1111.011.html>

[网络出版时间] 2012-07-31 11:11

Study on Release Characteristics of Compound Berberine Hydrochloride Colon Specific Tablets in Rats

ZOU Hai-yan¹, LI Zhao-xia¹, WANG Yu-rong^{2*}, WANG Di¹

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the release characteristics of compound berberine hydrochloride colon specific tablets in rats. **Method:** The rats were administrated orally with the colon-specific tablets of diameter 3 mm and berberine hydrochloride (BH) suspension respectively. After administration, the rat's plasma and gastrointestinal tissues were collected at different time points within 22 h. The berberine in biosamples was determined by HPLC, using palmatine as internal standard. Drug delivery index (DDI) was calculated. **Result:** BH in plasma and gastrointestinal tissues showed good linear relationship in the range of $0.02\sim 0.40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r>0.998$) and $0.05\sim 10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($r>0.999$) respectively. The release of BH in tablets mainly distributed in rat's caecum and colon and showed an obvious lag time. The value of C_{\max} and $AUC_{0-22\text{ h}}$ in rat's colon were 3.1 times and 3.6 times of BH suspension group respectively. The DDI of the tablets was 0.00, 0.23, 1.17, 2.36, 8.55 in the rats' gastric, proximal and distal small intestinal, caecal, colonic tissue, respectively. **Conclusion:** The compound berberine hydrochloride tablet is a carrier for targeting the drug to the colon.

[Key words] compound colon specific tablets; berberine hydrochloride; tissue distribution; drug delivery index

[收稿日期] 20120408(007)

[基金项目] 国家“十一”五科技支撑计划项目(2006BAI09B08-14)

[第一作者] 邹海艳,博士,讲师,从事中药质量控制的研究, Tel:010-83911671, E-mail: bwzhy@sina.com

[通讯作者] *王玉蓉,教授,博导,从事中药新剂型与新技术的研究, Tel:010-84738607, E-mail: yurong.wang@163.com

慢性溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 又称非特异慢性溃疡性结肠炎,是一种炎症性肠病,具有病变范围广泛、病情反复发作、迁延不愈,癌变可能性大等特点,已被世界卫生组织列为现代难治病之一。我国 UC 的发病率逐年增加,研究抗 UC 的新药也成为热点^[1-2]。本课题前期采用乙酸和三硝基苯磺酸/乙醇所致的 UC 模型大鼠,将盐酸小檗碱和木香水提物灌肠给药,发现其在改善由腹泻状态和大便隐血、修复结肠组织和抑制结肠炎症因子等方面的药效优于口服给药^[3-4]。

课题组前期以盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride, BH) 和木香水提物为模型药物,果胶、瓜耳豆胶为酶触骨架材料,制粒压制成片芯,采用 Eudragit L100 和 Eudragit S100 (1:4) 包肠溶衣制备了复方盐酸小檗碱 pH-菌群触发型结肠定位片 ($\Phi = 6 \text{ mm}$)^[5]。由于药片体积较大在大鼠体内评价困难,根据大片的工艺制备了直径 3 mm 的复方盐酸小檗碱结肠定位小片,并完成了体外释药行为的研究。本实验以上述小片为模型药物,采用盐酸小檗碱混悬液为对照,对大鼠灌胃后,22 h 内血药浓度及药物在大鼠胃肠道组织的结肠定位释药行为进行了研究。

1 材料

1.1 仪器 岛津高效液相色谱仪 (LC-20AT 四元泵、CTO-10ASVP 柱温箱、SPD-20A 紫外检测器),赛多利斯 BT25S 型 1/10 万电子分析天平, pH S-3C 精密酸度计 (上海伟业仪器厂), G16 型医用高速离心机 (白洋离心机厂), Sigma 1-15P 小型台式离心机, S10 型高速匀浆机 (天津汇科仪器设备有限公司)。

1.2 试药 复方盐酸小檗碱结肠定位片 ($\Phi = 3 \text{ mm}$, 自制), 盐酸小檗碱 (四川省什邡鸿运生物化工有限公司), 盐酸小檗碱对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 0713-200107), 盐酸巴马汀对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110732-200907), 乙腈 (色谱纯, Fisher Scientific), 娃哈哈纯净水, 其余试剂均为分析纯。

1.3 动物 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 (300 ± 20) g, 合格证号 SCXK (京) 2006-0009, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.033 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ (血浆样品 29:71, 组织样品 28:72), H₃PO₄ 调 pH 3.0, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长

345 nm。

2.2 对照品及内标溶液的配制 精密称取 BH 和盐酸巴马汀 (内标) 对照品各 10.0 mg, 分别置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 400.0 mg·L⁻¹ 的储备液。将 BH 储备液用甲醇稀释配制成一系列质量浓度的标准溶液。盐酸巴马汀贮备液用甲醇稀释配制成质量浓度分别为 20.0, 2.0 mg·L⁻¹ 的内标工作溶液。

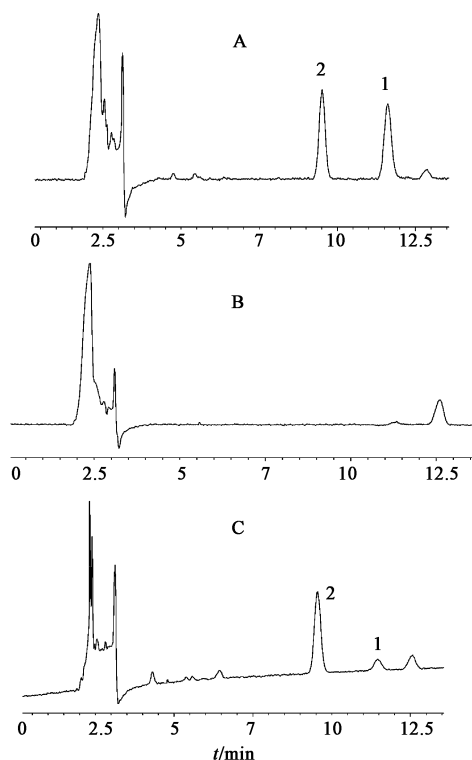
2.3 样品的制备

2.3.1 血浆样品预处理 取 2.0 mg·L⁻¹ 的内标工作液 10 μL , 置于 5 mL 离心管中, 挥干, 加入大鼠血浆样品 2.0 mL, 涡旋 30 s, 加入 5% 异丙醇-二氯甲烷 2.0 mL 萃取, 反复振摇, -20 °C 冷冻 12 h, 取出, 室温下解冻, 3 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分取有机相置离心管中, 40 °C 减压挥干, 加入 200 μL 甲醇复溶, 取 20 μL 进样。

2.3.2 组织样品预处理 取 20.0 mg·L⁻¹ 的内标工作液 10 μL , 置于 0.5 mL 离心管中, 挥干。分别取上述大鼠胃、近端小肠、远端小肠、盲肠和结肠组织于室温下解冻, 剪碎, 加 5 倍量生理盐水匀浆, 4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 100 μL 加至上述离心管中, 加入 300 μL 甲醇, 涡旋混合 30 s, -20 °C 冷冻 12 h 沉淀蛋白, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液 10 μL 进行 HPLC 分析。

2.4 动物分组与给药 Wistar 大鼠 48 只, 雄性, 随机分成 2 组, 每组 24 只, 给药前禁食不禁水 12 h。BH 组大鼠灌胃给予盐酸小檗碱混悬液, 每只 1.5 mL (含 BH 6.7 mg); 复方结肠定位片组大鼠乙醚轻度麻醉后, 聚乙烯插管灌胃给药, 每只 1 片。各组大鼠分别于给药后 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 22 h 用 10% 水合氯醛麻醉, 剪开腹腔, 腹主动脉取血, 血浆置肝素化采血管中, 振摇, 迅速离心 (3 500 r·min⁻¹, 10 min), 取上清液, -20 °C 冷冻, 备用。取血后将大鼠胃肠道分为胃、近端小肠 (小肠上 2/3 段, PSI)、远端小肠 (小肠下 1/3 段, DSI)、盲肠和结肠 5 段, 分别取出, 用润湿的剪刀剪开, 生理盐水清洗后, 滤纸吸干, 称重, 置冻存管中 -20 °C 冷冻, 备用。

2.5 专属性试验 取大鼠血浆和各组织样品, 分别按 2.3.1 和 2.3.2 项下处理, HPLC 检测。对照品及内标溶液、大鼠空白和给药后血浆和各组织的色谱图分别见图 1, 2。由图可知大鼠血浆和各组织中的内源性物质对小檗碱和内标物的色谱峰无干扰。



A. 空白血浆加 BH 对照品和内标(1-BH 2-巴马汀);
B. 空白血浆样品; C. 给药后血浆样品

图 1 大鼠血浆 HPLC

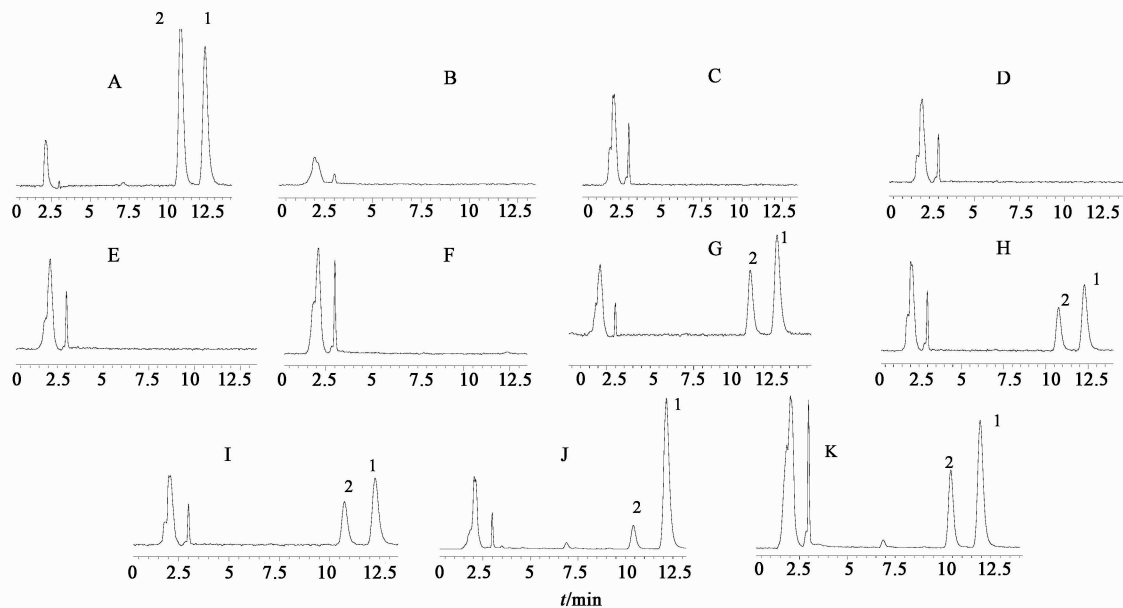
2.6 标准曲线 精密量取 BH 系列标准溶液各 10 μL , 置于 0.5 mL 离心管中, 加入内标工作液 10 μL , 挥去溶剂。取大鼠空白血浆 2.0 mL、胃肠道各空白组织匀浆 0.1 mL, 分别按 2.3.1 和 2.3.2 项下操作, 制成 6 个质量浓度的样品, 每个质量浓度进行 3 样本分析, 以小檗碱峰面积 A_s 与内标峰面积 A_i 之比 $Y(A_s/A_i)$ 对待测物浓度 C 进行回归, 得各生物样品的标准曲线方程和相关系数。结果见表 1。本方法中各生物样品的定量限为 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 大鼠各生物样品中 BH 测定的标准曲线和相关系数 ($n=3$)

| 生物样品 | 线性范围 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 回归方程 | r |
|--------|--|------------------------|--------|
| 血浆 | 0.02 ~ 0.40 | $Y = 8.7249C - 0.0332$ | 0.9988 |
| 胃组织 | 0.05 ~ 10.0 | $Y = 2.0043C - 0.0836$ | 0.9999 |
| 近端小肠组织 | 0.05 ~ 10.0 | $Y = 1.9520C - 0.1041$ | 0.9999 |
| 远端小肠组织 | 0.05 ~ 10.0 | $Y = 2.0095C - 0.1296$ | 0.9999 |
| 盲肠组织 | 0.05 ~ 10.0 | $Y = 1.9176C - 0.0653$ | 1 |
| 结肠组织 | 0.05 ~ 10.0 | $Y = 2.0541C - 0.0464$ | 0.9997 |

2.7 回收率和精密度

2.7.1 血浆样品 取大鼠空白血浆 2.0 mL, 按 2.3.1 项下制备 QC 样品, 低、中、高质量浓度分别为



A. 内标和 BH 对照品(1-BH 2-巴马汀); B. 空白胃组织; C. 空白近端小肠组织; D. 空白远端小肠组织; E. 空白盲肠组织;
F. 空白结肠组织; G. 胃组织样品; H. 小肠上组织样品; I. 远端小肠组织样品; J. 盲肠组织样品; K. 结肠组织样品

图 2 大鼠胃肠道组织 HPLC

0.02, 0.10, 0.40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每个浓度进行 5 样本分析, 连续 3 d, 根据当日的标准曲线计算方法的回收率与精密度 (RSD), 结果为 3 个质量浓度的血浆样

品日内 RSD 3.2% ~ 8.0%; 日间 RSD 1.4% ~ 5.8%; 方法回收率 100.0% ~ 101.6%。

2.7.2 组织样品 取大鼠各段空白胃肠道组织的

匀浆液 0.1 mL,按 2.3.2 项下分别制备 3 个质量浓度的质控样品(BH 的质量浓度分别为 0.05, 0.50, 10.00 mg·L⁻¹)的质控(QC)样品。每个浓度进行 5 样本分析,连续 3 d,根据当日的标准曲线计算 QC 样品的测得浓度,进行方差分析,求得本方法的回收率与精密性(RSD),结果表明 3 个质量浓度的各组织样品日内 RSD 0.4% ~ 9.3%;日间 RSD 1.3% ~ 7.9%;方法回收率为 92.4% ~ 109.0%。

2.8 稳定性试验 考察了各生物样品,低、中、高 3 个浓度 1 个月内经过 2 次反复冻融,以及样品处理后室温放置 24 h 的稳定性,每个浓度进行 5 个样本分析,室温稳定性 RSD 1.1% ~ 10.6%;冻融稳定性 RSD 1.3% ~ 11.9%。

2.9 数据处理 采用相对靶向释药指数(drug delivery index, DDI)^[6],以 BH 组为对照,计算复方结肠定位片组大鼠胃、近端小肠、远端小肠、盲肠和结肠组织的 DDI,对复方结肠定位片的定位释药特性进行评价。

$$DDI = \frac{AUC_1/AUC_2}{AUC_3/AUC_4}$$

其中 AUC₁ 和 AUC₂ 分别为复方结肠定位片组和 BH 组大鼠各组织中药物浓度-时间曲线下面积, AUC₃ 和 AUC₄ 分别为复方结肠定位片组和 BH 组大鼠血药浓度-时间曲线下面积。AUC_{0-22 h} 采用梯形法求算, C_{max} 和 T_{max} 为实测值。

3 结果

3.1 胃肠道组织中的药物分布 大鼠分别给予盐酸小檗碱混悬液和复方结肠定位片后,22 h 内各时间点胃肠道组织中小檗碱的分布分别见图 3,4。与 BH 组相比,复方结肠定位片组药物在大鼠胃肠道组织的分布情况有所不同:①复方结肠定位片组 2 h 于大鼠胃肠道各组织中未检测到小檗碱,药物分布存在明显的时滞;②复方结肠定位片组各时间点大鼠胃和近端小肠组织基本无小檗碱的分布,药物主要分布于大鼠盲肠和结肠;③复方结肠定位片组在大鼠结肠组织中小檗碱高于 BH 组,其 C_{max} 和 AUC_{0-22 h} 分别为 BH 组的 3.1,3.6 倍。说明复方结肠定位片在大鼠胃、近端小肠不释放,片剂转运至盲、结肠部位后,大量释放药物。

3.2 血浆中药物浓度的变化 BH 混悬液和复方盐酸小檗碱结肠定位片经大鼠口服给药后血药浓度-时间曲线见图 5。复方结肠定位片给药后,2 h 大鼠血浆中未检测到小檗碱, T_{max} 为 6 h,具有明显的时滞, C_{max} 为 (0.25 ± 0.01) mg·L⁻¹, AUC_{0-22 h} 为

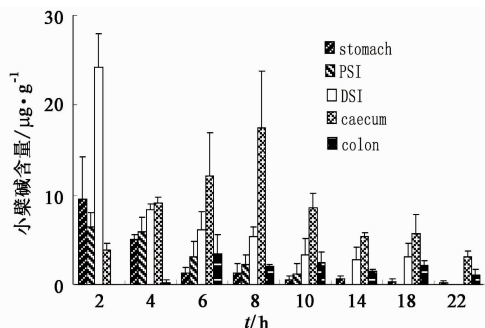


图 3 BH 组大鼠胃肠道组织中小檗碱的分布 ($\bar{x} \pm s_e, n = 3$)

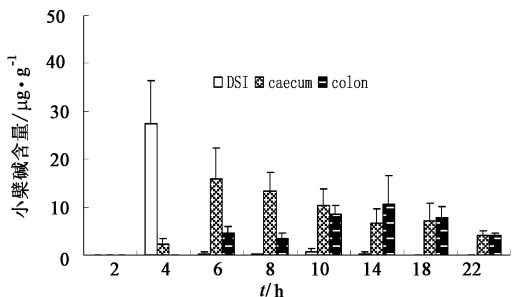


图 4 复方结肠定位片组大鼠胃肠道组织中小檗碱的分布 ($\bar{x} \pm s_e, n = 3$)

4.16 mg·h⁻¹·L⁻¹,明显低于 BH 组 [C_{max} = (1.13 ± 0.01) mg·L⁻¹, AUC_{0-22 h} = 10.00 mg·h⁻¹·L⁻¹]; 与 BH 组相比,复方结肠定位片组大鼠血药浓度相对较恒定, T_{max} 延长, C_{max} 降低,其药代动力学行为具有缓控释制剂的释药特点。

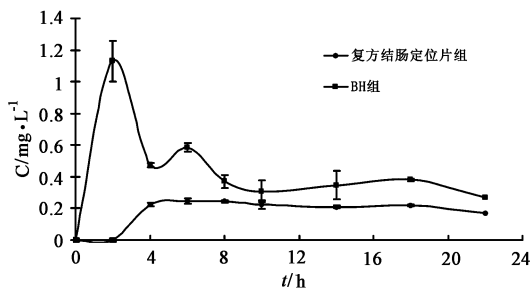


图 5 各组大鼠给药后的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s_e, n = 3$)

3.3 相对靶向释药指数的计算 与 BH 组比较,复方结肠定位片组大鼠胃、近端小肠、远端小肠、盲肠和结肠组织的 DDI 值依次为 0.00, 0.23, 1.17, 2.36, 8.55。结肠组织的 DDI 值分别是远端小肠和盲肠的 7.3, 3.6 倍,表明复方盐酸小檗碱结肠定位片具有较好的结肠定位释药特性。

4 讨论

4.1 口服结肠定位给药系统(OCDDS)的体内评价 须整体给药,使用小型动物给药困难,因此 OCDDS 的体内研究多选择犬作动物模型。因盐酸小檗碱在犬体内吸收差,较大剂量有毒副作用^[7],而大鼠是

与人体消化道的解剖结构、生化环境比较接近、廉价的动物,因此本实验选择大鼠进行体内研究。为便于给药,将直径 6 mm 的大片改为直径 3 mm 的小片,可通过聚乙烯插管顺利灌胃给药。

4.2 复方盐酸小檗碱结肠定位片结合了 pH 控制型和菌群触发型 OCDDS 的释药机制,盐酸小檗碱及其复方结肠定位片均采用 Eudragit L100 和 Eudragit S100(1:4)包肠溶衣,衣膜在酸性条件下不溶解,可使药片顺利通过胃,而不受胃排空时间的影响,且具有延迟释药特性。复方结肠定位片组给药后 2~4 h,在大鼠胃和小肠内可见变形的药片,药片吸水膨胀成球形。当片剂到达小肠时,pH 升高,衣膜逐渐溶解开始释药。

4.3 曾测定了各组大鼠给药后,胃、近端小肠、远端小肠、盲肠和结肠内容物中药量-时间曲线,并进行了相关的方法学考察^[8]。结果显示 BH 组大鼠给药后胃和小肠内容物中的药量逐渐减少,4 h 在盲肠和结肠内容物中开始检测到小檗碱的分布;而复方结肠定位片组大鼠各内容物中 2 h 未检出小檗碱,4 h 于远端小肠开始检出,6 h 在大鼠结肠内容物中检测到小檗碱的分布;复方结肠定位片组 22 h 内结肠内容物中的分布量为 BH 组的 3.9 倍,也证实了该片剂的药物释放具有明显的时滞,于小肠末端开始释药,主要释放大鼠盲肠和结肠。

4.4 小檗碱口服后的血药浓度较低,本实验采用萃取法富集样品,曾采用 9% SDS-氯仿,20% 氨水-氯仿、20% 氨水-乙醚,氯仿、1% NaOH-氯仿、5% 异丙醇-二氯甲烷等溶剂萃取,用含氯仿的溶剂萃取时,乳化现象严重,通过比较最终确定采用 5% 异丙醇-二氯甲烷,萃取比例为 1:1,并采用 -20 ℃ 冷冻 12 h,室温下解冻后离心(3 500 r·min⁻¹,5 min),发现破乳效果较好,冷冻前后样品稳定性无明显变化,低、中、高浓度 BH 的血浆萃取回收率分别为

(86.9 ± 9.2)%, (98.1 ± 5.9)%, (99.3 ± 3.1)%, 符合相关要求。

4.5 选择巴马汀为内标,一方面由于巴马汀和小檗碱的结构相近,在常用溶剂中具有相似的溶解性。在萃取过程中能较好的跟踪待测成分,降低试验误差。此外,根据文献和化学结构分析小檗碱在生物体内不能代谢生成该化合物。采用 5% 异丙醇-二氯甲烷(1:1)萃取时,巴马汀的萃取回收率为(89.5 ± 1.9)% (n = 5),RSD 2.0 %,符合相关要求。

[参考文献]

- [1] 江学良,崔慧斐. 溃疡性结肠炎治疗的新思路[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(4): 319.
- [2] 殷胜骏,韩涛,薛新丽,等. 溃疡性结肠炎临床用药聚类分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(6):77.
- [3] 于海食,洪纓,王玉蓉,等. 肠安康新组方结肠定位给药治疗溃疡性结肠炎的适应性研究[J]. 中国药理学通报,2009,25(增刊):275.
- [4] 于海食,洪纓,王玉蓉,等. 肠安康新方胃肠分解给药对大鼠乙酸性结肠炎的影响[J]. 北京中医药大学学报,2010,29(6):385.
- [5] 肖尧,王玉蓉,马劲,等. 盐酸小檗碱酶触型结肠定位片的制备[J]. 北京中医药大学学报,2008,31(12): 847.
- [6] Richard N F, Barbara H, Lonmei R, et al. Colonic delivery of dexamethasone from a prodrug accelerates healing of colitis in rats without adrenal suppression[J]. Gastroenterology, 1995,108(6):1688.
- [7] 盛美萍,孙洪,王宏. 盐酸小檗碱在 Beagle 狗静脉注射和口服药动学研究[J]. 中国药理学通报,1993,9(1):64.

[责任编辑 邹晓翠]