

## pH 敏感双层型苦参结肠靶向微丸在大鼠体内的药代动力学研究

谢兴亮<sup>1</sup>, 杨明<sup>2\*</sup>, 韩丽<sup>3</sup>

(1. 成都医学院药学院, 成都 610083; 2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;  
3. 成都中医药大学药学院, 成都 611137)

**[摘要]** 目的: 比较苦参结肠靶向微丸与苦参溶液中苦参碱的药动学行为差异, 以明确该靶向制剂在体内的药动学特征。  
**方法:** 采用反相高效液相色谱法, 检测给药后血浆、结肠内容物中苦参碱含量; 用 DAS 药动学软件统计程序处理, 提取 PK 参数。  
**结果:** 微丸与溶液中苦参碱在血浆及结肠内容物中  $t_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC$  等参数均有明显差异, 微丸中苦参碱吸收存在明显的迟滞效应, 且大部分未被吸收进入体循环, 而在结肠中显示出高浓度分布。  
**结论:** 制备的苦参微丸具有良好结肠靶向分布特征, 达到了预期设计目标。

**[关键词]** pH 敏感双层型结肠靶向微丸; 苦参碱; 药代动力学

**[中图分类号]** R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0128-04

## Pharmacokinetic Study in Rats on pH-triggered Double Layer Colon Target Pellets of Sophora Flavescens

XIE Xing-liang<sup>1</sup>, YANG Ming<sup>2\*</sup>, HAN Li<sup>3</sup>

(1. Pharmaceutical College, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China;

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Key Lab. of Modern

Preparation of Tradition Chinese Medicine, Ministry of Education, Nanchang 330004, China;

3. Pharmaceutical College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan 611173, China)

**[收稿日期]** 20110112(004)

**[基金项目]** 重大新药创制项目(2009ZX09103-307)

**[第一作者]** 谢兴亮, 博士, 讲师, 研究方向: 中药学及中药新制剂, Tel: 028-68289192, E-mail: xiexing-liang1@sina.com

**[通讯作者]** \* 杨明, 教授, 博士生导师, Tel: 0791-7118658, E-mail: yangming16@126.com

通过以上研究, 我们认为黄连解毒汤抗火热证脑缺血的疗效发挥与其指标性成分的血药浓度相关。黄连解毒汤对火热证脑缺血的保护作用机制可能与其抗炎作用相关, 与传统中医上认为的黄连解毒汤有清热解毒的功效相一致。

### [参考文献]

- [1] 付晓春, 王敏伟, 彭亮. 黄连解毒胶囊防治脑缺血的药理学[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(1): 41.
- [2] 关少侠, 谌剑飞, 马雅玲. 急性脑梗塞始发状态火热证与免疫细胞因子的关系研究[J]. 放射免疫学杂志, 2000, 13(6): 331.
- [3] 梁月华. 寒热本质研究的进展[J]. 中医杂志, 1988(2): 63.
- [4] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible

middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84.

- [5] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 1995, 26(9): 1037.
- [6] Bederson J B, Pittis L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the mode and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472.
- [7] Vasthare U S, Heinel L A, Rosenwasser R H, et al. Leukocyte involvement in cerebral ischemia and reperfusion injury[J]. Surg Neurol, 1990, 33(4): 261.
- [8] 刘孟元. 细胞因子在神经内分泌免疫调节网络中的作用[J]. 国外医学·免疫学分册, 1993, 6(5): 239.

[责任编辑 邹晓翠]

**[ Abstract ] Objective:** To compare pharmacokinetics of matrine between colon target pellets of *Sophora Flavescens* and solution, make clear the pharmacokinetic character of the targeted agents *in vivo*. **Method:** RP-HPLC was applied to determine the content of matrine in plasma and colon contents after the administration and DAS pharmacokinetic software was used for calculating the acquired PK parameters. **Result:** The parameters of matrine contained in pellets in plasma and colon contents were all differed from those in solution, such as  $t_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $AUC$  ad. There was obviously delay effect on absorbability of matrine in pellet, and most of that was not absorbed into systemic circulation, and then high concentration distribution was found in colon. **Conclusion:** The pellets of *Sophora Flavescens* prepared show good colon-specific distribution characteristics, and achieve the expected design goal.

**[ Key words ]** pH-triggered double layer colon target pellets; matrine; pharmacokinetic

pH敏感双层型苦参结肠靶向微丸为笔者前期研究制备而得,该制剂是以苦参中治疗结肠炎的药效成分苦参碱、氧化苦参碱为原料,制备素微丸,内层以 Eudragit E100 包衣,外层再包 Eudragit L100 而制得,体外释放度研究结果表明,外层衣膜保护微丸通过胃部后在小肠溶解,内层衣膜在小肠弱碱性环境下不溶解,可保护微丸抵到结肠,在结肠炎酸性结肠环境下溶解<sup>[1]</sup>。本文对其体内药动学过程进行研究,以明确其药动学特征,全面评价其体内的结肠靶向性能。

## 1 材料

**1.1 仪器** 高效液相色谱仪(DIONEX, P680 HPLC Pump, UVD170U), HGC-12A 型氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司), TGL-16C 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂), SK-1 型快速混匀器(江苏金坛市鸿科仪器厂), DY89-I 型匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

**1.2 药品与试剂** pH敏感双层型苦参结肠靶向微丸(实验室自制,下文简称包衣微丸,苦参碱与氧化苦参碱总含量为  $130 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 苦参碱提取物(98%, 西安中鑫生物技术有限责任公司, 批号 M-071201), 氧化苦参碱提取物(98%, 西安中鑫生物技术有限责任公司, 批号 O-071201), 苦参碱对照品(含量测定用, 中国药品生物制品检定所, 110805-200804), 氧化苦参碱对照品(含量测定用, 中国药品生物制品检定所, 110780-200806), 乙腈为色谱纯, 水为双蒸纯净水, 其余均为国产分析纯。

**1.3 实验动物** SD 大鼠, 雄性, 体重  $220 \sim 250 \text{ g}$ , 成都中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(川)2004-11。

## 2 方法

**2.1 给药及采样** 取大鼠 54 只, 随机分成 2 组, 一

组为微丸组, 一组为溶液组, 每组各 27 只, 各组再随机分成 9 小组, 每组 3 只, 适应饲养 3d。给药前禁食 12 h, 不禁水, 按苦参碱  $20.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、氧化苦参碱  $55.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量, 灌胃给予混合溶液, 胃插管(内径 2.0 mm, 外径 3.0 mm) 给予包衣微丸, 然后分别在溶液给药后 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12, 16 h, 微丸给药后 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24 h 经股动脉取血约 5 mL, 置于肝素化试管中, 以  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上层血浆,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存待测。打开动物腹腔, 取出结肠, 剖开肠道, 收集全结肠内容物, 并用适量冰生理盐水洗涤肠腔, 洗涤液合并, 加蒸馏水定容至 25 mL, 超声振荡 5 min,  $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 精密移取上清液 5 mL,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存待测。

**2.2 血浆、结肠内容物样品的处理及对照品液的配制** 取 0.5 mL 血浆于 10 mL 的离心管中, 加入 4.5 mL 甲醇沉淀蛋白, 漩涡振荡混和 3 min 后, 静置 10 min, 以  $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 上清液于  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴  $\text{N}_2$  吹干, 残渣用 0.5 mL 甲醇溶解,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 得血浆样品液, 另取空白血浆 0.5 mL 同法处理得血浆空白液。取全结肠内容物, 加蒸馏水定容至 25 mL, 超声振荡 5 min,  $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 精密移取上清液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中加甲醇定容至刻度, 混匀,  $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 于  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴  $\text{N}_2$  吹干, 残渣用 5 mL 甲醇溶解,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 得结肠内容物样品液, 另取未给药结肠内容物, 加蒸馏水 25 mL, 同上处理得结肠内容物空白液。另精密称取苦参碱对照品适量, 加甲醇溶解配制成浓度为  $47.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液。

**2.3 色谱条件** Chromasil  $\text{C}_{18}$  色谱柱 ( $0.46 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), 流动相乙腈-pH 3.0 的磷酸缓冲液(水-三乙胺-磷酸 500:1:1) 5:95; 流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;

柱温 40 ℃; 检测波长 205 nm, 进样 10 ~ 20 μL, 灵敏度 0.01 AUFS, 采用外标法计算血浆及结肠内容物中苦参碱质量浓度, 色谱图见图 1, 2, 结果表明, 在该条件下, 各样品中苦参碱色谱峰分离良好, 空白基本无干扰。

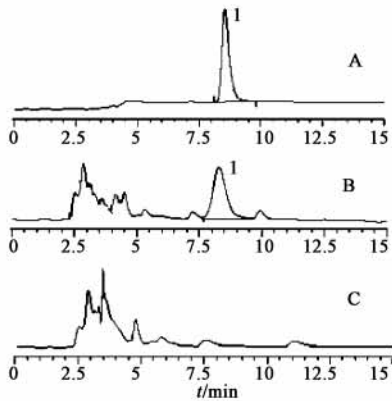


图 1 血浆样品苦参碱 HPLC  
A. 对照品; B. 血浆样品; C. 空白血浆样品; 1. 苦参碱

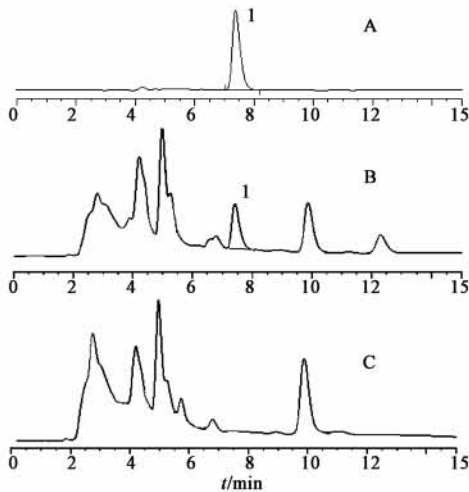


图 2 结肠内容物样品苦参碱 HPLC  
A. 对照品; B. 结肠内容物样品;  
C. 结肠内容物空白样品; 1. 苦参碱

**2.4 线性范围及定量限的确定** 精密吸取 0.95 mg·L<sup>-1</sup> 苦参碱溶液 10, 20 μL 进样, 另取, 47.5 mg·L<sup>-1</sup> 苦参碱溶液 2, 10, 20 μL 进样。记录峰面积, 以峰面积为横坐标, 质量浓度为纵坐标进行线性回归, 回归方程为  $A = 55.96C + 0.2398$  ( $r = 0.9982$ ), 表明苦参碱在 0.0095 ~ 0.95 μg 线性关系良好, 结果见表 1。定量限考察结果表明, 在标准曲线下限进样量 9.5 ng 时, 其峰高信噪比为 10.7, 为该方法的定量限。

**2.5 回收率和精密度** 精密吸取一定量苦参碱对照品溶液加入上述血浆、结肠内容物中, 各 6 份, 按

表 1 回收率与精密度

样品	回收率	日内平均偏差	日间平均偏差
	/ % ( $\bar{x} \pm s$ )	/ %	/ %
血浆	70.46 ± 1.78	5.4	8.7
结肠内容物	87.78 ± 2.51	4.6	7.1

**2.2** 项下方法处理后, 测定色谱峰面积  $A_1$ , 取等浓度苦参碱对照品液测定色谱峰面积  $A_0$ , 按公式  $H = (A_1/A_0) \times 100\%$ , 计算得回收率, 以该样品分别在日内测定 5 次, 计算日内精密度, 并于 5 d 日内每天分别测定, 计算日间精密度, 结果见表 1。

**2.6 药动学研究** 以 DAS 药动学软件统计程序拟合血浆及结肠内容物药代动力学模型, 提取药动学参数, 并对 2 组参数进行对比。

### 3 结果

**3.1 血浆药物浓度检测及药动学参数** 大鼠灌胃混合溶液和包衣微丸后, 其药时曲线见图 3, 2 种剂型中苦参碱在大鼠体内药动学过程分别用二室和一室模型 (权重分别为  $1/C^2, 1/C$ ) 拟合比较合适, 主要药动学参数见表 2, 结果表明, 包衣微丸  $t_{max}$ , MRT 为混合溶液的 8.3.6 倍,  $C_{max}$ , AUC 分别约为普通溶液的 1/24, 1/7, 与混合溶液口服给药相比, 包衣微丸体内释药存在明显的迟滞效应, 且大部分药物未被肠道吸收进入体循环。

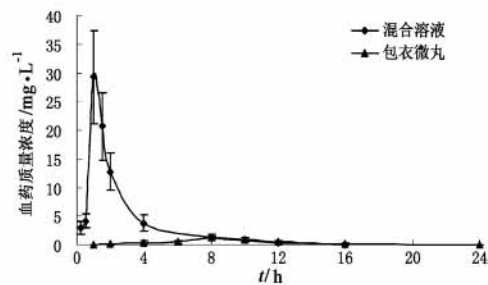


图 3 2 种剂型的血浆平均药时曲线

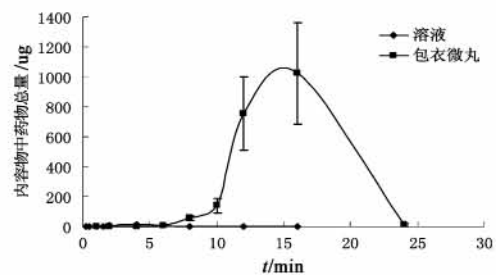


图 4 2 种剂型的结肠内容物药时曲线

### 3.2 结肠内容物中药物浓度检测及药动学参数

大鼠灌胃混合溶液和包衣微丸后,其结肠内容物中药物时曲线见图 4,由于有较多时间点未检测到苦参碱,未能进行房室模型拟合。就两种剂型的药时曲线进行直接对比,包衣微丸结肠内容药物的  $t_{max}$  为混

合溶液口服给药的 4 倍,而  $C_{max}$  约为混合溶液的 84 倍,这表明微丸中药物在结肠中有高浓度分布,且能明确检测到药物的时间范围明显更长,该微丸具有明确的结肠定位分布特征。

表 2 单剂量给予 2 种剂型的房室模型参数及统计矩参数

房室参数	混合溶液	包衣微丸	统计矩参数	混合溶液	包衣微丸
$t_{1/2\beta}/h$	2.12	13.87	$AUC_{0 \rightarrow t_1}/\mu g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	62.13	8.33
$V/F/L \cdot kg^{-1}$	1 291 191.5	0.05	$AUC_{0 \rightarrow \infty}/\mu g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	62.36	9.59
$CL/F/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	439 492.01	50 659 625.6	$MRT_{0 \rightarrow t_1}/h$	2.85	8.83
$AUC_{0 \rightarrow t_1}/\mu g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	44.87	2 531 180.96	$MRT_{0 \rightarrow \infty}/h$	2.91	10.42
$AUC_{0 \rightarrow \infty}/\mu g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	45.51	6.19	$VRT_{0 \rightarrow t_1}/h^2$	6.98	9.95
$K_{10}/h^{-1}$	0.34	7.90	$VRT_{0 \rightarrow \infty}/h^2$	7.94	28.59
$K_a/h^{-1}$	1.306	1.60	$t_{max}/h$	1	8
$t_{1/2Ka}/h$	0.531	0.43	$C_{max}/\mu g \cdot L$	29.27	1.23
$t_{lag}/h$	0.1	1.90			

#### 4 讨论

本研究苦参结肠靶向微丸中原料为苦参碱、氧化苦参碱,后者含量更高,以氧化苦参碱为指标更合理,但在预研中发现,溶液、微丸给药后在血浆与结肠内容物中几乎难以检测到氧化苦参碱,而苦参碱有较高响应。同时,进一步将氧化苦参碱与结肠内容物体外混合孵育后,检测发现其峰面积显著降低,而在苦参碱对应位置出现较高色谱峰,表明该成分在体内会被代谢转化成苦参碱,与文献报道一致<sup>[2]</sup>,因此,本次实验以苦参碱为指标进行药代动力学研究。考虑到与人体消化道生理的相似性,选择了大鼠为实验动物,受检测方法灵敏度、血量限制,在同一动物身上连续取血较难实施,因此,本次实验采用了不同动物取血,但受该批动物数限制,各时间点仅设了三只动物,误差较大,后续可改用 HPLC-MS 等高灵敏技术检测则所耗血量较少,有望在同一动物身上实现连续取血,改进研究结果。

由于苦参碱在不同 pH 水溶液中均有良好的溶解性能<sup>[1]</sup>,采用碱化三氯甲烷萃取存在提取不完全

的问题,本实验以甲醇为沉淀剂,对血浆、结肠内容物中蛋白进行了处理,样品回收率分别为 70.46%, 87.78%,同时,实验前对试验动物禁食 12 h,大大降低了食物对结肠内容物中成分检测的干扰,在拟定色谱条件下苦参碱峰与其他杂质能实现分离,空白无干扰,达到体内药物分析要求。

研究表明,2 种剂型中苦参碱在血浆、结肠内容物中药动学行为均存在显著差异,提示与混合溶液相比,苦参结肠靶向微丸中苦参碱在体内释药存在明显的滞后效应,且大部分被递送到结肠,并在结肠内容物中呈现长时间的高浓度分布,具有显著的结肠段定位分布特征,达到了预期设计目的。

#### [参考文献]

- [1] 谢兴亮. 愈肠宁复方释药制剂的研究[D]. 成都:成都中医药大学,2009:57,26,82.
- [2] 宋磊,王鲁萍,何仲海,等. 苦参碱的利尿作用与药代动力学之间的关系[J]. 河北医药,2001,17(8):210.

[责任编辑 全燕]