

· 药物代谢 ·

小檗碱在大鼠小肠及胆汁中药代动力学研究

王明玮¹, 王雪莉², 邢东明², 雷帆², 杜力军^{2*}

(1. 新疆军区西安第二干休所医务室, 陕西 西安 710100;

2. 清华大学生物科学与技术系 药物药理研究室, 北京 100084)

[摘要] **目的:**研究大鼠静脉注射黄连生物碱提取物后,小檗碱在大鼠小肠和胆汁中的药代动力学特性。**方法:**用高效液相色谱(HPLC)检测大鼠小肠和胆汁样品中小檗碱的浓度。**结果:**黄连生物碱中小檗碱在静脉给药后0.25~4 h,B/P(胆汁中浓度/血浆中浓度)为69.1~497.9,属于胆汁清除率高的药物。胆汁引流实验表明,小肠中绝大部分的小檗碱来自胆汁。引流胆汁后,给大鼠静脉给药,在小肠中仍能检测到小檗碱,推测这一部分小檗碱来自于血浆中的小檗碱,其转运方向是从侧底膜(basolateral membrane)向顶侧膜(apical membrane)转运至小肠中。**结论:**实验从整体动物水平上证明了小檗碱在血液中可以逆向转运至小肠中,其转运机理涉及P-糖蛋白(P-glycoprotein,P-gp)。

[关键词] 小檗碱;小肠;胆汁;转运

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0046-05

Pharmacokinetics of Berberine in Rat Intestinal and Bile Following Intravenous Administration of *Coptidis Rhizoma* Extract

WANG Ming-wei¹, WANG Xue-li², XING Dong-ming², LEI Fan², DU Li-jun^{2*}

(1. Medical Service, Xi'an the Second Sanatorium, Xinjiang Province, Xi'an, Shanxi Province, 710100;

2. Laboratory of Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the pharmacokinetics of berberine in *Coptidis Rhizoma* extract in rat intestinal and bile. **Method:** A simple and accurate high-performance liquid chromatography method was used to determine the concentration of berberine in the rat intestinal and bile samples. **Result:** Following the intravenous administration of *Coptidis Rhizoma* extract, B/P (concentration in the bile/concentration in the plasma) of berberine was determined to be 69.1~497.9 from 0.25 h to 4 h. Bile excretion was one of the main excretion ways for rats to eliminate berberine of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. Most of berberine in the intestinal was from the bile. While bile was discharged from rats, berberine still could be determined in the intestinal. **Conclusion:** The results proved that berberine could be transported from blood to intestinal in the animal model with a direction from basolateral membrane to apical membrane. P-glycoprotein is involved in the transport mechanism.

[Key words] berberine; intestinal; bile; transport

黄连具有清热燥湿、泻火解毒的功效,主要化学成分为多种生物碱,包括小檗碱、巴马汀、药根碱、表

[收稿日期] 2009-04-08

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(90713043,30801523)

[通讯作者] *杜力军, Tel: (010)62773630; E-mail: lijundu@mail.tsinghua.edu.cn

小檗碱和黄连碱,小檗碱的含量远高于其它生物碱^[1]。小檗碱(berberine)是异喹啉型生物碱,是一种抗菌消炎^[2-3]的常用药。近年来,随着研究的深入,小檗碱越来越多的活性被人们所认识。临床应用中小檗碱以口服给药为主,给药后小檗碱的吸收程度是其能否发挥疗效的重要前提。而小檗碱的吸收很有限,小檗碱通过小肠组织时,表观渗透系数(P_{app})为 10^{-7} cm/s,属于典型的吸收差的物质,也导致小檗碱在体内生物利用度低^[4]。因此,小檗碱的转运机制以及如何提高小檗碱的口服吸收,成为研究的热点。本文通过研究小檗碱在大鼠小肠和胆汁中的药代动力学特性,来研究小檗碱在整体动物模型中的透过特性。

1 材料

1.1 药品与试剂 黄连生物碱(本室自制,批号031126,小檗碱含量为29.4%);盐酸小檗碱对照品,购自中国药品生物制品检定所(批号0713-9906);乙腈为色谱纯,购自Fisher Scientific;水为重蒸水,其它试剂均为分析纯。

1.2 动物 雄性Wistar大鼠60只,(202 ± 7)g;雌性Wistar大鼠5只,(306 ± 30)g;雄性Wistar大鼠15只,(229 ± 34)g,购自中国医学科学院实验动物研究所,合格证号:SCXK11-00-0006。

1.3 仪器 Waters 600 高效液相色谱仪(7725i 手动进样器,996 型二极管阵列检测器,515 泵,Millennium32 色谱工作站);色谱柱为Hypersil C_{18} (5 μ m; 4.6 mm \times 150 mm),保护柱为北京分析仪器公司的 C_{18} 柱(5 μ m; 4 mm \times 15 mm);1/100 000 Mettler AE240 电子天平(美国 Mettler-Toledo Instruments Co. Ltd);KQ3200 超声波清洗仪(昆山市超声波仪器厂)。台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 实验方法

2.1 给药和采样 大鼠60只按体重随机分组,按时间点分成12组,每组5只。禁食不禁水12 h后,按 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量ip 10%乌拉坦麻醉。黄连生物碱用生理盐水配制,以 $10.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量iv。分别在给药后0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 和 48 h,将大鼠的十二指肠至盲肠部分用棉线结扎取出,在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 贮存备用。

另取大鼠5只,禁食不禁水12 h后,10%乌拉坦ip 麻醉。固定,插胆管后引流胆汁,黄连生物碱用生

理盐水配制,以 $10.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量iv 给药。药后0.25,1,2,4,8,和24 h 收集胆汁,记录该时间段内胆汁量,并测定胆汁中小檗碱的含量,计算每个时间段胆汁内小檗碱累积量。

另取大鼠15只,按时间点分成3组,每组5只,麻醉、插管引流胆汁、给药同上。药后0.25,1,4 h 将大鼠的十二指肠至盲肠部分用棉线结扎取出,在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 贮存备用。

2.2 空白小肠样品的制备 大鼠,12 h 禁食不禁水,麻醉,iv 生理盐水,取出小肠,用生理盐水清洗小肠3次,每次4 mL,然后用甲醇清洗小肠3次,每次4 mL。合并洗出液,56 $^\circ\text{C}$ 水浴挥干。残渣用甲醇转移至小瓶中,水浴挥干,200 μ L 甲醇定容,取20 μ L 注入HPLC,测定,作为空白小肠样品。进行方法学考察时,空白小肠中分别加入小檗碱对照品溶液200 μ L。

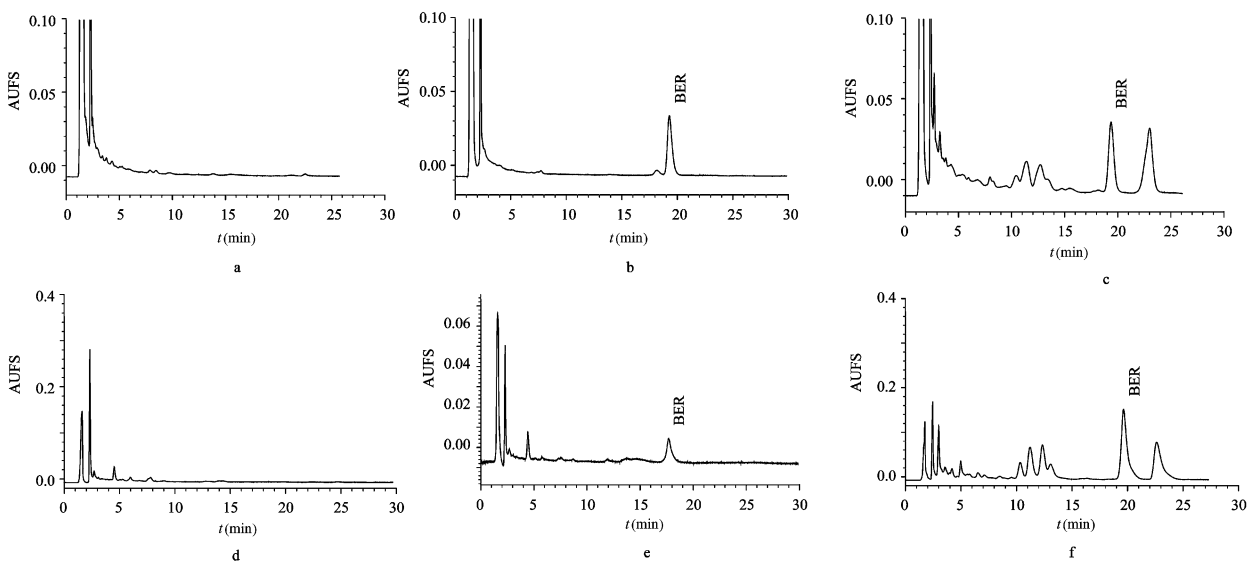
2.3 空白胆汁样品的制备 大鼠,12 h 禁食不禁水,麻醉,插胆管引流胆汁,iv 生理盐水,收集胆汁。取0.5 mL 空白胆汁,加入0.5 mL 0.4 M 高氯酸(HClO_4)溶液,混匀,再加入0.5 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 溶液,混匀,加入甲醇4 mL,振荡混匀,2 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,上清置蒸发皿,56 $^\circ\text{C}$ 水浴挥干。沉淀加入4 mL 乙腈,混匀,离心,合并上清。残渣用甲醇转移至小瓶中,100 μ L 定容,取10 μ L 注入HPLC,测定,作为空白胆汁样品。进行方法学考察时,空白胆汁中分别加入小檗碱对照品溶液100 μ L,混匀。

2.4 色谱条件 流动相为乙腈:0.05 M 磷酸二氢钾缓冲液(含0.5% 三乙胺,磷酸调节pH 3.0)(22:78);流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温为室温;检测波长为347 nm。流动相在使用前通过0.45 μ m 的滤膜进行脱气处理。

2.5 标准曲线 小檗碱对照品精密称重,溶解在甲醇中得到储备液。用甲醇稀释储备液得到一系列不同浓度的小檗碱溶液0.675,1.35,6.75,13.5,67.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

空白小肠中分别加入小檗碱对照品溶液0.675,1.35,6.75,13.5,67.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 各200 μ L,制备小肠样品,用HPLC测定小檗碱峰面积,以小檗碱的质量对峰面积回归绘制标准曲线。

空白胆汁中分别加入小檗碱对照品溶液0.675,1.35,6.75,13.5,67.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 各100 μ L,



注:a:空白小肠样品;b:空白小肠样品加入小檗碱对照品($13.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); c:大鼠 iv $10.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 黄连生物碱 1 h 后小肠样品;d:空白胆汁样品; e:空白胆汁样品加入小檗碱对照品($6.75 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); f:大鼠 iv $10.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 黄连生物碱 15 min 后胆汁样品;流动相为乙腈: 0.05 M 磷酸二氢钾缓冲液(含 0.5% 三乙胺,磷酸调节 pH 3.0)22: 78。

图1 HPLC 色谱图

制备胆汁样品,用 HPLC 测定小檗碱峰面积,以小檗碱的浓度对峰面积回归绘制标准曲线。

2.6 回收率和精密度 将含有小檗碱 $0.675, 6.75, 67.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的空白小肠样品和空白胆汁样品,分别与同样浓度的甲醇溶液相比较,得到样品回收率。将含有小檗碱 $0.675, 6.75, 67.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的空白小肠样品和空白胆汁样品,在同天内测定 5 次,得到日内平均标准偏差;连续测定 5 d,得到日间平均标准偏差。

2.7 数据处理 实验数据用 EXCEL 软件进行统计学处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。药动学参数使用 3p97 软件处理。

3 实验结果

3.1 方法的特异性 空白小肠和空白胆汁样品中,在小檗碱出峰的位置无杂质干扰,见图 1,小檗碱的保留时间约为 19 min。

3.2 标准曲线 在大鼠空白小肠中,小檗碱的量在 $0.0135 \sim 1.35 \mu\text{g}$ 范围内,小檗碱的质量与峰面积呈线性关系。回归方程为 $Y = 2.6 \times 10^3 X + 1.42 \times 10^5$ ($r = 0.9987$)。小檗碱在小肠中最低检测限为 13.5 ng 。

在大鼠空白胆汁中,小檗碱的浓度在 $0.675 \sim 67.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,小檗碱的浓度与峰面积呈线性关系。回归方程为 $Y = 2.61 \times 10^5 X + 1.44 \times 10^5$ ($r = 0.9991$)。小檗碱在胆汁中最低检测限为 0.675

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 回收率和精密度 在大鼠空白小肠样品中,小檗碱在 $0.675, 6.75, 67.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度水平时,回收率分别为 $69.7\%, 76.7\%$ 和 77.4% 。在大鼠空白胆汁样品中,小檗碱在 $0.675, 6.75, 67.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度水平时,回收率分别为 $76.7\%, 83.8\%$ 和 83.0% 。

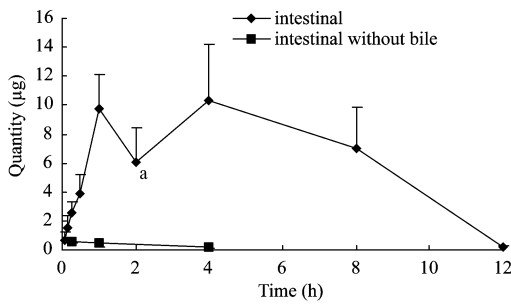
在大鼠空白小肠样品中,小檗碱在 $0.675, 6.75, 67.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度水平时,日内精密性分别为 $6.16\%, 3.98\%$ 和 2.64% ,日间精密性分别为 $9.34\%, 6.61\%$ 和 4.52% 。在大鼠空白胆汁样品中,小檗碱在 $0.675, 6.75, 67.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度水平时,日内精密性分别为 $4.72\%, 2.70\%$ 和 2.34% ,日间精密性分别为 $7.31\%, 4.32\%$ 和 3.20% 。

3.4 药代动力学分析 大鼠 iv $10.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 黄连生物碱后,小檗碱在小肠和胆汁中的药时曲线分别见图 2~4。

胆汁清除率 = 胆汁流量 \times 胆汁中药物浓度 / 血浆中药物浓度。黄连生物碱中小檗碱在大鼠体内胆汁清除率见图 5。

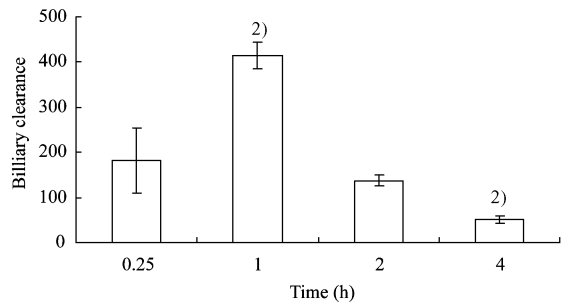
4 讨论

胆汁排泄是药物排泄的重要途径。药物在胆汁中浓度(B)与血浆中浓度(P)之比如果大于 1,在 $10 \sim 1000$ 范围,该药物属于胆汁清除率较高的药物。



注: a: 与 1 h 相比, $P=0.13$; 与 4 h 相比, $P=0.18$

图 2 大鼠 iv $10.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 黄连生物碱后小檗碱在小肠内药时曲线 ($n=5$)



注: 与 0.25 h 相比较, $^2) P < 0.01$

图 5 大鼠 iv $10.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 黄连生物碱后小檗碱体内胆汁清除率 ($n=5$)

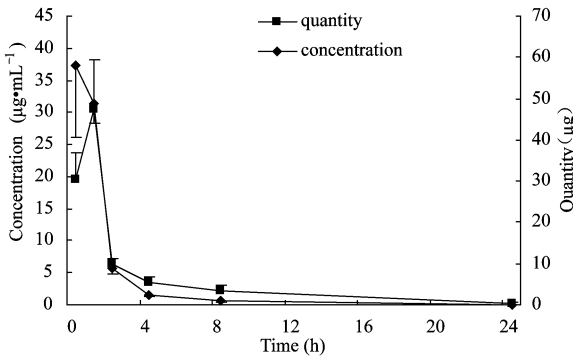
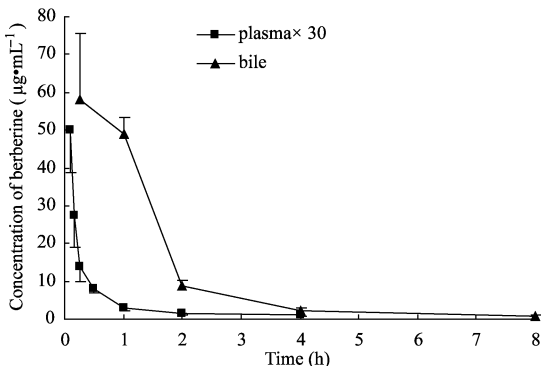


图 3 大鼠 iv $10.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 黄连生物碱后小檗碱在胆汁内药时曲线 ($n=5$)



注: plasma 浓度 = 实际浓度 × 30

图 4 大鼠 iv $10.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 黄连生物碱后小檗碱在血浆^[5]和胆汁内药时曲线 ($n=5$)

本实验中黄连生物碱中小檗碱 iv 后 0.25 ~ 4 h, B/P 为 69.1 ~ 497.9, 因此, 小檗碱也属于胆汁清除率高的药物, 这与文献报道的结果相符^[6~7]。胆汁引流实验表明, 小肠中绝大部分的小檗碱来自胆汁。小肠中小檗碱在 4 h 出现 2 次峰, 文献报道^[6]小檗碱在大鼠体内存在肠肝循环, 而本实验中 2 h 的浓度与 1 h 和 4 h 相比, P 值分别为 0.13 和 0.18, 有降低的趋势, 没有显著性差异 (见图 2)。提示引起 4 h 的峰浓度有两个原因: (1) 可能存在肠肝循环; (2) 可

能是个体差异所导致。血浆和胆汁中小檗碱的变化趋势是一致的。我们更感兴趣的结果在于, 引流胆汁后, 给大鼠 iv 给药, 在小肠中仍能检测到小檗碱, 推测这一部分小檗碱来自于血浆中的小檗碱, 其转运方式可能是从侧底膜 (basolateral membrane) 向顶侧膜 (apical membrane) 转运至小肠中。药物吸收的过程也是一个膜转运的过程, 上皮细胞在形态学上具有明显的不对称性, 使上皮细胞具有单向转运功能。人结肠腺癌细胞系 (Caco2 细胞系) 源自人结肠腺癌细胞, 容易在体外培育, 稳定性好, 保持了 P-gp 的高表达的特征, 广泛应用于药物转运机制的研究^[8]。有文献报道, 在 Caco-2 细胞模型中, P-gp 介导小檗碱的外排, 小檗碱是 P-gp 的一个底物和抑制剂^[9~10]。我们已经通过实验证明^[11], 在原代神经元细胞模型中, 小檗碱由 P-gp 介导排出胞外。本实验结果与文献报道的结果相符, 从整体动物水平上证明了小檗碱在血液中可以逆向转运至小肠中, 其转运机理涉及 P-gp。

[参考文献]

- [1] 濮社班, 许翔鸿, 张宇和, 等. 黄连生长状况及生物碱含量的个体差异[J]. 中草药, 1999, 30(5): 375-377.
- [2] 陈波华, 刑洪君, 张影, 等. 浅谈黄连等中药抑制幽门螺杆菌生长的实验研究[J]. 黑龙江医药, 1996, 9(2): 115-116.
- [3] 常明向, 严劲松, 刘小平, 等. 香连丸组方抗菌作用研究[J]. 时珍国药研究, 1999, 10(1): 7-8.
- [4] Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelia cells [J]. Biochem. Biophys. Acta, 1991, 175: 880-885.
- [5] Xueli Wang, Rufeng Wang, Dongming Xing, et al. Kinetic difference of berberine between hippocampus and

- plasma in rat after intravenous administration of Coptidis Rhizoma extract [J]. *Life Sciences*, 2005, 77: 3058-3067.
- [6] 熊程亿, 施绪保, 代宗顺, 等. 3H-小檗碱在家兔及小鼠体内的药代动力学研究 [J]. *中国药理学通报*, 1989, 5(5): 293-296.
- [7] Tsai P L, Tsai T H. Simultaneous determination of berberine in rat blood, liver and bile using microdialysis coupled to high-performance liquid chromatography [J]. *J. Chromatogra. A*, 2002, 961: 125-130.
- [8] 吴笑春, 辛华雯, 余爱荣, 等. 药物处置的体外模型-Caco2 细胞系 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2003, 19(3): 230-232.
- [9] Pan J F, Yu C, Zhu D Y, *et al.* Identification of three sulfate-conjugated metabolites of berberine chloride in healthy volunteers' urine after oral administration [J]. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2002, 23(1): 77-82.
- [10] Maeng H J, Yoo H J, Kim I W, *et al.* P-glycoprotein-mediated transport of berberine across Caco-2 cell monolayers [J]. *J. Pharm. Sci.*, 2002, 91(12): 2614-2621.
- [11] Chen Y Y, Wang X L, Sun H, *et al.* Characterization of the transportation of berberine in Coptidis rhizoma extract through rat primary cultured cortical neurons [J]. *Biomed. Chromatogr.*, 2008, 22:28-33.