

月桂酸小檗碱肠道给药的相对生物利用度研究

田非非¹, 江东波¹, 刘真君¹, 李风云², 翁伟宇^{1*} (1.华东理工大学药学院, 上海 200237; 2.湖北省通城县特产局, 湖北 通城 437400)

摘要: 目的 以硫酸小檗碱(BS)为参照, 研究月桂酸小檗碱(BL)大鼠腹腔注射和肠道给药后的药动学特征和相对生物利用度。方法 采用 BS 与月桂酸钾反应生成 BL, 用质谱、氢谱等手段确证结构。以高效液相色谱法测定血浆中小檗碱母核的浓度。结果 腹腔注射后, BL 和 BS 的体内过程均符合二室模型。以 BS 为参照, BL 肠道给药的相对生物利用度为 224.32%; 可达腹腔注射的 27.66%。结论 脂溶性的脂肪酸小檗碱有利于肠道吸收, 值得进一步研究。

关键词: 月桂酸小檗碱; 肠道给药; 相对生物利用度

中图分类号: R945.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)12-1117-05

Relative Bioavailability of Berberine Laurate Following Intestinal Administration

TIAN Feifei¹, JIANG Dongbo¹, LIU Zhenjun¹, LI Fengyun², WENG Weiyu^{1*} (1.School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2.Tongcheng County Special Products Bureau of Hubei Province, Tongcheng 437400, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the pharmacokinetic characteristics and relative bioavailability of berberine laurate (BL) following intraperitoneal injection and intestinal administration using berberine sulfate (BS) as a reference. **METHODS** BL was synthesized by the reaction between BS and potassium laurate. MS and ¹H-NMR were used to confirm the structure. The plasma concentrations in rats were measured by HPLC. **RESULTS** After intraperitoneal injection, the pharmacokinetics of BL and BS in rats were best described by a two-compartment model. After intestinal administration, the relative bioavailability of BL vs BS was 224.32%. Compared with intraperitoneal injection, the relative bioavailability of BL following intestinal administration was 27.66%. **CONCLUSION** The oral bioavailability of berberine can be increased by improving its lipophilicity. Fatty acid salts of berberine might be potential candidates for further research.

KEY WORDS: berberine laurate; intestinal administration; relative bioavailability

作者简介: 田非非, 女, 硕士生 Tel: (021)64250187
Tel: (021)64250187

E-mail: 84381288@163.com

*通信作者: 翁伟宇, 男, 博士, 副教授

E-mail: wyweng@ecust.edu.cn

小檗碱(berberine)又称黄连素,系从黄连等植物中分离得到的一类异喹啉类生物碱。近年来随着研究的深入,小檗碱的新药理活性和临床适应症不断被发现,如可用于糖尿病、肿瘤、阿尔茨海默病、高血脂等症,重新引起了人们的重视^[1]。然而小檗碱的口服生物利用度极低^[2],严重制约其进一步开发应用。

小檗碱的化学结构上具有强亲水性的季铵基团,属于高溶解、低渗透的药物,而被动扩散为其肠吸收的主要机制^[3-4],故吸收势必较差。对于强亲水性药物而言,通过结构修饰适当增加脂溶性,有利于药物的口服吸收^[5]。笔者在大量预实验的基础上,首次将小檗碱制成脂肪酸盐,可以明显提高脂溶性。其中月桂酸小檗碱(berberine laurate, BL)的脂水分配系数约为 0.63,显著高于硫酸小檗碱(berberine sulfate, BS),且在水和有机溶剂中均有一定的溶解度。本试验以 BS 为参照,研究 BL 腹腔注射和肠道给药后的药动学特征及相对生物利用度。

1 材料与仪器

硫酸小檗碱(南京泽朗医药科技有限公司,批号:ZL100324,纯度 $\geq 98\%$);月桂酸钾(上海厚诚精细化工有限公司);聚乙二醇 400(PEG 400)、肝素钠(国药集团化学试剂有限公司);辛酸/癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol,嘉法狮贸易有限公司);乙酸乙酯、乙醇、磷酸、三乙胺均为分析纯,甲醇、乙腈均为色谱纯。

LC-10AD 岛津高效液相色谱系统(日本岛津,SPD-10Avp 紫外检测器,LC-10ADvp 泵,SCL-10Avp 系统控制器);AL104 分析天平(瑞士 Mettler Toledo);恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司);循环水式真空泵(上海豫华仪器有限公司);真空干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);台式高速离心机(上海医疗器械有限公司手术器械厂);超导傅立叶变换核磁共振波谱仪(AVANCE 500,德国 BRUKER 公司);气相色谱-飞行时间质谱联用仪(英国 Micromass 公司);WRS-1B 数字熔点仪(上海精密科学仪器有限公司);AA-800 原子吸收分光光度计(美国 PE 公司)。

SD 大鼠,♂,体重(220 $\pm$ 20)g,购自复旦大学实验动物科学部。实验动物合格证号:SCXK(沪)2009-0019。

2 方法和结果

2.1 BL 的制备

称取等摩尔的 BS 和月桂酸钾,加水 80 $^{\circ}\text{C}$ 回流 60 min,用乙酸乙酯提取产物。取乙酸乙酯溶液冷存,使充分析出沉淀,抽滤,取滤渣 70 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥,得粗品,为黄色粉末。

取粗品,加 4 倍量乙酸乙酯,混合均匀,滴加乙醇至大部分溶解,抽滤,滤液中加入 2 倍量乙酸乙酯,冷存使充分析出沉淀,抽滤,取滤渣 70 $^{\circ}\text{C}$ 减压干燥,得精制品,为黄色片状结晶。

2.2 BL 的结构鉴定

用质谱、氢谱确证产物的结构,用原子吸收分光光度法测定产物中钾元素的含量,用数字熔点仪测定产物的熔点。元素分析由中国科学院上海有机化学研究所完成。

2.3 药动学研究

2.3.1 供试品配制

2.3.1.1 腹腔注射供试品 取油酸 1 份、Labrasol 9 份,混匀,加入 BL 或 BS,搅拌溶解,最后按(Labrasol-油酸):水=1:9 的比例加入水,混匀,得供试品溶液,其中小檗碱母核的浓度均为 12.15 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.1.2 肠道给药供试品 同“2.3.1.1”项下方法配制,控制供试品中小檗碱母核的浓度均为 24.31 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.2 给药及取血方案

2.3.2.1 腹腔注射(IG) 取 SD 大鼠(禁食 18 h,自由饮水),腹腔注射 BL 或 BS 55.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以小檗碱母核计),于给药后 0.08, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10 h 自尾静脉取血 0.3 mL,置装有肝素的离心管中,混匀,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取血浆,用 HPLC 测定其中小檗碱母核的浓度。

2.3.2.2 肠道给药(IA) 取 SD 大鼠(禁食 18 h,自由饮水),腹腔注射 20%乌拉坦溶液(4 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉。打开腹腔,自幽门下 1 cm、十二指肠处切口,插入注射器,结扎。通过注射器缓慢推入 BL 或 BS 221.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以小檗碱母核计),于给药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 和 10 h 自尾静脉取血 0.3 mL,置装有肝素的离心管中,混匀,同法离心,分离血浆待测。

2.3.3 药动学参数计算 达峰时间(T_{max})、峰浓度(C_{max})采用实测数据,药时曲线下面积(AUC_{0-t})采用梯形法计算,腹腔注射后的其他药动学参数采用 3P87 软件拟合。

2.4 血样测定方法

采用 HPLC^[6-7]测定大鼠血浆样品中小檗碱母核的摩尔浓度。

2.4.1 血样前处理方法 取血浆 100 μL , 加入 200 μL 乙腈, 涡旋 30 s, 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 即得。

2.4.2 色谱条件 色谱柱为 Gemini C₁₈(150 mm $\times$ 4.60 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-磷酸盐缓冲液(0.2%三乙胺溶液用磷酸调节 pH 值至 3.0 ± 0.05)=62:38; 流速 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 345 nm; 进样 20 μL ; 理论板数以小檗碱计应 $>3\ 000$ 。

2.4.3 专属性试验 空白血浆、血浆标样及服药后血浆的 HPLC 色谱图见图 1。结果表明, 不论是 BL, 还是 BS, 其血样中小檗碱母核的色谱行为不存在差异; 服药后的色谱图中可见代谢物, 但代谢物和血浆内源性物质均不干扰小檗碱母核的分析, 方法专属性良好。

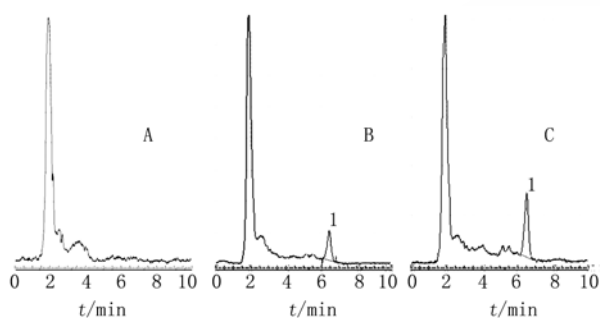


图 1 高效液相色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆加小檗碱($0.06\ \text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-服药后血样(BL, IA 10 h)

Fig 1 HPLC chromatogram

A-blank plasma; B-blank plasma+berberine ($0.06\ \text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-plasma sample (BL, IA 10 h)

2.4.4 标准曲线 精密称取 BS 12 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得浓度为 $0.12\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液。分别精密量取储备液 0.01, 0.02, 0.05, 0.2, 0.5, 1, 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 得浓度分别为 0.12, 0.24, 0.6, 2.4, 6, 12, 24 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 精密量取各浓度溶液 10 μL , 加空白血浆 90 μL , 涡旋混匀, 得浓度分别为 0.012, 0.024, 0.06, 0.12, 0.24, 0.6, 1.2, 2.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆标准品, 分别对应于小檗碱母核摩尔浓度为 0.03, 0.06, 0.15, 0.58, 1.46, 2.92, 5.83 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。按“2.4.1”项

下方法处理, 取上清液, 用 HPLC 测定峰面积。以峰面积(Y)对小檗碱母核摩尔浓度(X)进行加权线性回归得, $Y=5\ 497.5X+351.0$, $r=0.996$, 权重系数=1.5。线性范围 $0.03\sim 5.83\ \text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$, 定量限 $0.03\ \text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=5$, $\text{RSD}=10.33\%$)。

2.4.5 精密度和准确度 配制小檗碱母核摩尔浓度为 0.06, 0.58, 5.83 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆标样, 按“2.4.1”项下方法处理, 取上清液进行 HPLC 测定。各浓度日内测定 5 份, 日间测定 5 份, 计算 RSD 和方法回收率。结果日内 RSD 分别为 4.12%, 3.72%, 2.83%; 日间 RSD 分别为 3.99%, 3.81%, 2.19%; 各浓度日内、日间的方法回收率均落在 92.4%~118.8%的范围内, 符合相关要求。

2.4.6 提取回收率 配制母核摩尔浓度为 0.02, 0.19, 1.94 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的小檗碱水溶液, 进样分析, 记录色谱峰面积($A_{\text{水标}}$)。另用空白血浆配制浓度为 0.06, 0.58, 5.83 $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血浆标样, 加入 2 倍量乙腈沉淀蛋白, 离心取上清液进样分析, 记录峰面积($A_{\text{血标}}$)。提取回收率= $A_{\text{血标}}/A_{\text{水标}}$ 。结果低、中、高 3 个浓度的提取回收率分别为 80.17%, 81.03%和 80.81%, 符合相关要求。

2.5 BL 的结构鉴定结果

mp 117.2~119.6 $^{\circ}\text{C}$ 。ESI-MS(m/z)正离子模式: 336 [$\text{M}_{\text{小檗碱}}^+$]/负离子模式: 199 [$\text{M}_{\text{月桂酸根}}^-$]。¹H-NMR (CD_3OD , 500 MHz) δ : 9.75(1H, s, H-8), 8.70(1H, s, H-13), 8.10(1H, d, $J=9.1\ \text{Hz}$, H-11), 7.90(1H, d, $J=9.1\ \text{Hz}$, H-12), 7.67(1H, s, H-1), 6.95(1H, s, H-4), 6.10(2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 4.91(2H, t, $J=6.4\ \text{Hz}$, H-6), 4.20(3H, s, 9- OCH_3), 4.09(3H, s, 10- OCH_3), 3.22(2H, t, $J=6.4\ \text{Hz}$, H-5), 2.13(2H, t, $J=7.2\ \text{Hz}$, $-\text{COCH}_2-$), 1.58(2H, m, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$), 1.35[16H, m, $-(\text{CH}_2)_8-$], 0.89(3H, t, $J=6.8\ \text{Hz}$, $-\text{CH}_3$)。以上光谱数据与文献报道小檗碱^[8]和月桂酸^[9-10]的数据基本一致, 故鉴定该产物中含有小檗碱母核及月桂酸根的结构。

元素测定结果表明, 产物中钾元素含量 $<0.000\ 5\%$ 。说明不含未反应的月桂酸钾。经计算, 等摩尔月桂酸钾与 BS 物理混合物中的钾元素含量约为 1.2%, 说明产物不是物理混合物。

因此, 产物中含有小檗碱母核及月桂酸根的结构, 非反应物的物理混合物, 熔程较小, 熔点低于月桂酸钾和文献报道的盐酸小檗碱^[8], 据此判定该产物确为 BL。

2.6 BL 相对生物利用度研究

BL 和 BS 腹腔注射后的药时曲线见图 2, 药动学参数见表 1。二者腹腔注射后的药时曲线特征均符合二室模型, 吸收极为迅速, 在第一个取血时间点(5 min)即达到峰值、随后快速向外周分布, 从体内消除的过程则较缓慢。

BL和BS肠道给药后的药时曲线见图2, 药动学参数见表1。与BS比较, BL的 $T_{\max}$ 延迟、但 $C_{\max}$ 和 AUC_{0-t} 增大, 说明其具有吸收缓慢, 吸收程度增加的特点。以BS为参照, 计算BL的相对生物利用度为224.32%。以腹腔注射为对照, 经剂量校正后, 计算BS、BL肠道给药的相对生物利用度分别为6.58%和27.66%。表明BL的肠吸收确实优于BS。

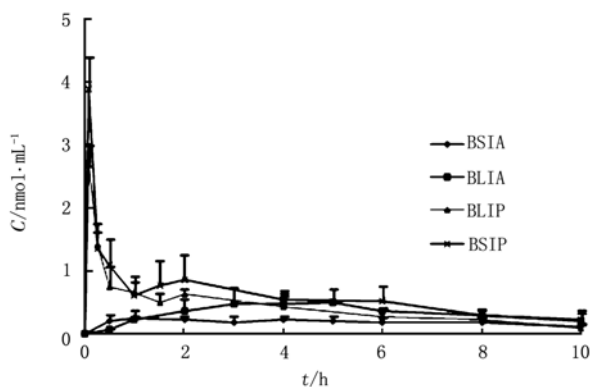


图2 BL和BS腹腔注射(IP, $55.2 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)和肠道给药(IA, $221.0 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)的平均药时曲线($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Fig 2 Average plasma concentration-time profiles of BL and BS following intraperitoneal injection (IP, $55.2 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) and intestinal administration (IA, $221.0 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

表1 BL和BS腹腔注射($55.2 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)和肠道给药($221.0 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$)后的药动学参数($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of BL and BS following intraperitoneal injection ($55.2 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) and intestinal administration ($221.0 \mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$) ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

药动学参数	腹腔注射		肠道给药	
	BS	BL	BS	BL
$T_{\max}/\text{h}^{-1}$	0.08 ¹⁾	0.08 ¹⁾	1.5 ± 0.5	5.6 ± 1.0
$C_{\max}/\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$	3.9 ± 0.5	2.7 ± 0.3	0.25 ± 0.12	0.61 ± 0.16
$AUC_{0-t}/\text{nmol}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	7.7 ± 1.5	4.2 ± 0.8	1.5 ± 0.5	3.3 ± 0.5
α/h^{-1}	9.5 ± 2.5	10.7 ± 1.2		
β/h^{-1}	0.17 ± 0.04	0.16 ± 0.03		
K_{21}/h^{-1}	2.6 ± 0.9	1.3 ± 0.4		
K_{10}/h^{-1}	0.63 ± 0.18	1.28 ± 0.20		
K_{12}/h^{-1}	6.4 ± 1.0	8.2 ± 2.9		

注: ¹⁾因腹腔注射时所有受试动物的达峰时间均0.08 h, 故未计算SD
Note: ¹⁾Since the $T_{\max}$ values of all rats following intraperitoneal injection were 0.08 h, SD were not calculated

3 讨论

本试验考察了BS和BL腹腔注射和十二指肠给药后的药动学特征和相对生物利用度。结果表明, 脂溶性的BL确实有利于肠吸收。相同母核剂量下小肠给药时, BL较BS的相对生物利用度为224.32%, 达到BL腹腔注射的27.66%。说明从提高脂溶性的角度制备衍生物, 以此增加小檗碱的口服吸收是可行的, 值得进一步深入研究。

BL的水溶性较差, 无法直接配成水溶液用于药动学研究。为此, 笔者曾尝试了多种供试品的配制方法, 包括采用混合溶剂、使用增溶剂等, 但效果都不理想, 用水稀释均会产生沉淀。在对BL溶解度做系统研究后, 发现其易溶于油酸。因此本试验将BL溶解于油酸中, 再加入表面活性剂使其高度分散于水中, 得到类似于微乳的半透明体系, 用水任意稀释均可保持稳定, 且不析出药物, 为后续的药动学研究提供了良好的供试品。

生物利用度包括绝对生物利用度和相对生物利用度, 其中绝对生物利用度直接反映药物的口服吸收程度。研究过程中曾尝试尾静脉注射, 希望能提供绝对生物利用度数据。结果发现动物大量死亡。分析原因可能有二: ①药物自身的不良反应。小檗碱静注有严重的心脏毒性, 推测BL可能同样具有这一毒理特点; ②供试品中其它成分的不良反应。供试品中含有大量的油酸和表面活性剂, 可能引起一定的不良反应。通常情况下, 认为腹腔注射与静注的吸收程度相当, 因此本试验在无法进行静注的情况下, 选择腹腔注射作为参照。腹腔注射时大鼠未见明显的不良反应。

将供试品直接注入肠道是为避免胃中酸性环境引起脂肪酸盐分解。在前期研究中发现, BL在 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸中很快有油滴析出, 说明BL已分解产生脂肪酸。失去脂肪酸盐的整体结构, 也就无法提高脂溶性, 增加口服吸收。少量预试发现, BL灌胃给药与BS没有差异。故而本试验直接将BL注入十二指肠, 发现可以提高口服吸收。此结果提示BL口服给药时需制成肠溶制剂。

本试验为制备高口服生物利用度的小檗碱衍生物提供了一条新思路, 即制备脂溶性的小檗碱脂肪酸盐。其优势表现在两个方面: ①保持小檗碱的母核结构不变, 对活性的影响可能较小; ②提高了脂溶性, 有利于药物以被动扩散的形式被吸收。本试验所制备的BL虽提高了肠吸收, 但其

生物利用度仍不令人满意。相信随着研究的不断深入,通过广泛筛选配对的脂肪酸根,调节脂肪酸盐的脂、水溶解度,并辅以适当的药剂学手段,有望进一步提高小檗碱的口服生物利用度。

REFERENCES

- [1] LI B, ZHU W L, CHEN K X. Advances in the study of berberine and its derivatives [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2008, 43(8): 773-787.
- [2] YU C, ZHANG H, HONG Y C, et al. Determination and preliminary studies of metabolism of berberine in human urine after oral administration [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2000, 16(1): 36-39.
- [3] ZHANG Y Q, YANG Z L, LI P. Study on absorption of berberine of different concentrations and purities in rats intestine [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med(山东中医药大学学报), 2008, 32(6): 506-509.
- [4] MA L, YANG X W. Absorption of coptisine chloride and berberrubine across human intestinal epithelial by using human Caco-2 cell monolayers [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2007, 32(23): 2523-2527.
- [5] CAO F, PING Q N, CHEN J. Research of oral prodrugs: opportunities and challenges [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2008, 43(4): 343-349.
- [6] WAN L L, ZHANG Z Q, LIU W J, et al. Pharmacokinetic study on berberine in the extract of Rhizoma Coptidis-Radix Aucklandiae drug-pair in Rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(6): 443-445.
- [7] XIAO P, LI W S. Determination of berberine hydrochloride in mixture for Burn and Scald by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(5): 439-441.
- [8] HE M S, XU H X, CHEN K L. Studies on the alkaloid constituents of *Berberis triacanthophora* Fedde [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2010, 33(9): 1420-1421.
- [9] LIU S W, FU H Z, LIN W H. Studies on the chemical constituents of *Shady jerusalemsage* (*Phlomis umbrosa*) (I) [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1999, 30(3): 161-164.
- [10] LIN C, CAO P X, LIANG G Y. Studies on chemical constituents of *Kalimeris indica* [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2006, 41(4): 251-253.

收稿日期: 2011-03-07