

# 蝙蝠葛碱自微乳化释药系统在大鼠体内的生物利用度研究<sup>Δ</sup>

张亚红\*, 张如超, 王丽娟, 甘淋玲, 兰作平<sup>#</sup>(重庆医药高等专科学校药学院/重庆市药物制剂工程技术研究中心, 重庆 401331)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)16-2207-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.16.14

**摘要** 目的:研究蝙蝠葛碱自微乳化释药系统(SMEDDS)在大鼠体内的相对生物利用度。方法:12只大鼠随机分为蝙蝠葛碱 SMEDDS组(20 mg/kg)和蝙蝠葛碱溶液组(50 mg/kg),每组6只,ig相应药物。分别于给药前和给药后0.167、0.333、0.5、0.75、1、2、4、8、12、24、36 h由眼眶后静脉丛取血约0.3 ml,采用高效液相色谱-串联质谱法测定血浆中蝙蝠葛碱浓度,采用DAS 3.0软件计算药动学参数,评价蝙蝠葛碱 SMEDDS给药后蝙蝠葛碱的相对生物利用度。结果:大鼠血浆中蝙蝠葛碱质量浓度的线性范围为2.12~424 ng/ml( $r=0.999\ 9$ ),日内、日间RSD均小于10%。蝙蝠葛碱溶液和蝙蝠葛碱 SMEDDS组大鼠药动学参数 $c_{\max}$ 分别为(126.3±37.4)、(179.6±51.5) ng/ml, $t_{1/2}$ 分别为(11.48±4.58)、(21.79±6.59) h, $AUC_{0-7}$ 分别为(1 963.5±638.3)、(2 535.8±739.5) ng·h/ml, $AUC_{0-\infty}$ 分别为(2 256.3±703.5)、(2 854.6±768.7) ng·h/ml;分别以 $AUC_{0-7}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 计算,蝙蝠葛碱 SMEDDS的相对生物利用度分别为323%和316%。结论:ig蝙蝠葛碱 SMEDDS后可以显著提高蝙蝠葛碱的相对生物利用度。

**关键词** 蝙蝠葛碱;自微乳化释药系统;灌胃;相对生物利用度;大鼠

**Study on the Bioavailability Improvement of Dauricine Self-microemulsifying Drug Delivery System in Rats**  
ZHANG Yahong, ZHANG Ruchao, WANG Lijuan, GAN Linling, LAN Zuoping (Pharmacy College, Chongqing Medical and Pharmaceutical College/Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Sciences, Chongqing 401331, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study relative bioavailability of dauricine self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) in rats. METHODS: 12 rats were randomly divided into dauricine SMEDDS group (20 mg/kg) and dauricine solution group (50 mg/kg), 6 rats in each group. They were given relevant medicine intragastrically. Then, 0.3 ml plasma was collected from orbital venous plexus before medication and 0.167, 0.333, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36 h after medication. The plasma concentration of dauricine was determined by HPLC-MS/MS, and DAS 3.0 was used to calculate pharmacokinetic parameters and evaluate the relative bioavailability of dauricine with dauricine SMEDDS. RESULTS: The linear range of dauricine in plasma were 2.12-424 ng/ml ( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of intra-day and inter-day were all lower than 10%. Pharmacokinetic parameters of dauricine solution and dauricine SMEDDS were that  $c_{\max}$  were (126.3±37.4) ng/ml and (179.6±51.5) ng/ml;  $t_{1/2}$  were (11.48±4.58) and (21.79±6.59) h;  $AUC_{0-7}$  were (1 963.5±638.3) ng·h/ml and (2 535.8±739.5) ng·h/ml;  $AUC_{0-\infty}$  were (2 256.3±703.5) ng·h/ml and (2 854.6±768.7) ng·h/ml, respectively. The relative bioavailability of dauricine SMEDDS were 323% and 316% by calculating with  $AUC_{0-7}$  and  $AUC_{0-\infty}$ , respectively. CONCLUSIONS: Intragastric administration of dauricine SMEDDS can improve relative bioavailability of dauricine significantly.

**KEYWORDS** Dauricine; Self-microemulsifying drug delivery system; Intragastric administration; Relative bioavailability; Rat

蝙蝠葛碱(Dauricine)是从防己科植物蝙蝠葛的地下茎中分离得到的一种双苄基异喹啉生物碱,已有研究表明其具有抗心律失常和抗炎的作用<sup>[1-2]</sup>。此外,近年来新的研究还表明其具有抗癌效应,包括抑制肿瘤细胞生长、减轻耐药作用和促进癌细胞的凋亡等<sup>[3]</sup>。目前,国内外关于蝙蝠葛碱药动学的相关研究较少,但已有的研究显示,蝙蝠葛碱ig给药后在大鼠体内的绝对生物利用度低于20%<sup>[4]</sup>。因此,通过合理的剂型设计改善其口服吸收情况,对于其临床应用具有重要意义。

由于自微乳化释药系统(Self-microemulsifying drug delivery systems, SMEDDS)能有效促进水溶性差的药物的口服吸收,近年来得到了广泛的研究。SMEDDS由油相、表面活性剂和助表面活性剂组成,分散于水介质中形成直径小于100 nm的水包油型微乳液滴,从而提高药物的水溶性<sup>[5]</sup>。此外,SMEDDS

有利于保护化学性质不稳定的药物,控制药物的释放,在胃里快速自乳化促进药物在胃肠道的分散和快速吸收。SMEDDS还可通过不同途径给药<sup>[6]</sup>。目前,已有多个研究采用SMEDDS的剂型设计,有效提高了难溶性药物和口服生物利用度较低的药物的绝对生物利用度<sup>[7-8]</sup>。为提高蝙蝠葛碱的口服生物利用度,本课题组前期制备了蝙蝠葛碱 SMEDDS,本研究在此基础上采用大鼠ig给予蝙蝠葛碱溶液和蝙蝠葛碱 SMEDDS,以评价 SMEDDS对于提高其相对生物利用度的作用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Quattro Premier XE MircoMass 高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)仪(美国 Waters 公司); CP225D 电子天平(德国 Sartorius 公司);离心机(上海市安亭科技仪器厂);HGC-36A 氮吹仪(上海泉岛科贸有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

蝙蝠葛碱原料药(自制,批号:20140618,纯度:≥98%);蝙蝠葛碱对照品(深圳市维琪生物科技有限公司,批号:20120625,纯度:99.6%);粉防己碱对照品(内标,中国食品药品检定研究院,批号:110711-201001;纯度:99.7%);乙酸乙

<sup>Δ</sup> 基金项目:重庆医药高等专科学校科研计划项目(No.ygz-2015108)

\* 副教授,硕士。研究方向:药物新剂型、药物分析。电话:023-61969189。E-mail:ya1234001@126.com

<sup>#</sup> 通信作者:副教授,博士。研究方向:新药设计、天然产物的研究与开发。电话:023-61969051。E-mail:lanzuop@126.com

酯、甲酸铵(色谱纯,美国天地有限公司);乙腈、甲醇(色谱纯,美国Fisher公司);水为自制去离子水,其余试剂为分析纯。

### 1.3 动物

健康SD大鼠,12只,♂,体质量(186±21)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号为SCXK(渝)2014-0002。

## 2 方法与结果

### 2.1 蝙蝠葛碱溶液和蝙蝠葛碱SMEDDS的制备

2.1.1 蝙蝠葛碱溶液 精密称取蝙蝠葛碱原料药适量,加入适量0.1 mol/L的NaOH溶液溶解,并用0.5 mol/L的HCl调节溶液pH为6~7,用生理盐水定容,使蝙蝠葛碱终质量浓度为20 mg/ml,即得。

2.1.2 蝙蝠葛碱SMEDDS 按照前期研究所得处方<sup>[9]</sup>,制备蝙蝠葛碱SMEDDS。制得的蝙蝠葛碱SMEDDS平均粒径为(58.3±9.21) nm,载药量约为49.46 mg/g。

### 2.2 动物实验

取12只大鼠随机分为A、B两组,每组6只。禁食12 h后,A组大鼠ig蝙蝠葛碱溶液50 mg/kg,B组大鼠ig蝙蝠葛碱SMEDDS 20 mg/kg。分别于给药前和给药后0.167、0.333、0.5、0.75、1、2、4、8、12、24、36 h由眼眶后静脉丛取血约0.3 ml于肝素化离心管中,离心并分离血浆,置于一70℃超低温冰箱中保存,待测。

### 2.3 色谱和质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为Waters xTerra MS C<sub>18</sub>(150 mm×2.1 mm,5 μm);流动相为乙腈(含2 mmol/L甲酸铵)-2 mmol/L甲酸铵水溶液(65:35),流速为0.2 ml/min;柱温为30℃;进样量为10 μl。

2.3.2 质谱条件 质谱监测方式为多离子反应监测(MRM);检测离子为阳离子模式(蝙蝠葛碱,[M+H]<sup>+</sup>离子,m/z 625→206;粉防己碱(内标),[M+H]<sup>+</sup>离子,m/z 623→174)。采用电喷雾离子源(ESI),毛细管电压为3.5 kV,锥孔电压为35 V,离子源温度为110℃,脱溶剂气(N<sub>2</sub>)流量为500 L/h,脱溶剂气温度为350℃。

### 2.4 溶液的制备

2.4.1 蝙蝠葛碱和内标贮备液 分别取蝙蝠葛碱和内标对照品(粉防己碱)各约10 mg,以甲醇溶解定容至10 ml,得相应贮备液,于0~4℃冰箱中保存。

2.4.2 蝙蝠葛碱和内标工作液 取“2.4.1”项下贮备液,分别以甲醇稀释成蝙蝠葛碱质量浓度为8 480、4 240、2 120、1 060、424、106、42.4 ng/ml,内标质量浓度为2 036 ng/ml的工作液,于0~4℃冰箱中保存。

### 2.5 血浆样品处理

精密量取大鼠血浆0.1 ml,加入甲醇5 μl、内标5 μl,混合10 s后,加入萃取剂乙酸乙酯1 ml,涡旋混合萃取3 min。以离心半径为15 cm、1.3×10<sup>4</sup> r/min离心5 min,取上清液,40℃条件下氮气吹干。残渣以50 μl流动相复溶,进样10 μl测定。

### 2.6 方法专属性考察

按“2.3”项下条件测定的蝙蝠葛碱和内标质谱图见图1,大鼠空白血浆、大鼠空白血浆+蝙蝠葛碱+内标、大鼠给药1 h后血浆+内标色谱图见图2。由图2可见,蝙蝠葛碱和内标的保留时间分别约为1.9、2.5 min,血浆内源性物质不影响蝙蝠葛碱与内标的测定,本方法满足生物样品测定专属性要求。

### 2.7 标准曲线的制备

制备蝙蝠葛碱质量浓度分别为424、212、106、53、21.20、5.30、2.12 ng/ml的大鼠血浆样品各0.1 ml,照“2.5”项下血浆样品处理方法操作后按“2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以蝙蝠葛碱与内标峰面积比值为纵坐标(y)、蝙蝠葛碱质量浓度

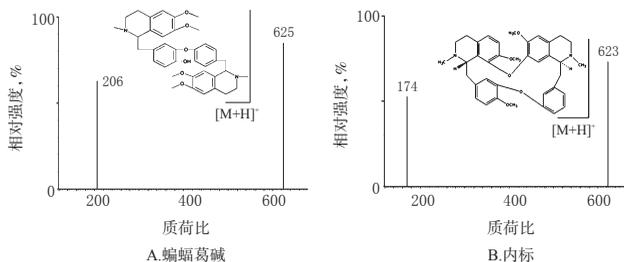


图1 质谱图

Fig 1 Mass spectrograms

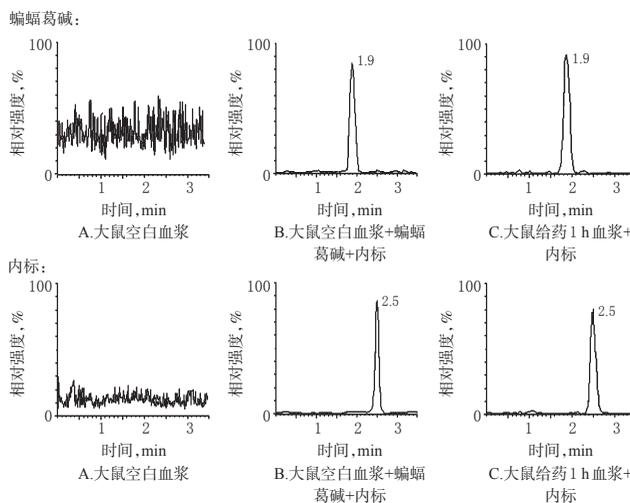


图2 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig 2 HPLC-MS/MS chromatograms

为横坐标( $c$ , ng/ml),采用加权最小二乘法(加权系数 $W=1/c^2$ )进行线性回归,得回归方程为 $y=0.0788c+0.0056$ ( $r=0.9999$ )。大鼠血浆样品中蝙蝠葛碱质量浓度的线性范围为2.12~424 ng/ml,定量下限为2.12 ng/ml(RSD=11.22%, $n=5$ )。

### 2.8 方法回收率与精密度试验

制备蝙蝠葛碱质量浓度分别为5.30、53、212 ng/ml的血浆样品,按“2.5”项下方法处理后按“2.3”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以测得值除以真实值计算方法回收率。同日内连续测定5次,考察日内精密度;每天测定1次,连续测定3 d,考察日间精密度。方法回收率与精密度试验结果见表1。

表1 方法回收率与精密度试验结果

Table 1 Results of recovery and precision tests

真实值, ng/ml	测得值, ng/ml (n=5)	方法回收率, % (n=5)	日内RSD, % (n=5)	日间RSD, % (n=3)
5.30	5.17±0.49	97.55	9.47	8.28
53	51±3.00	96.22	5.88	7.69
212	208±7.00	98.11	3.36	4.35

### 2.9 提取回收率及基质效应试验

按文献[10]中方法进行试验。结果,质量浓度为5.30、53、212 ng/ml的大鼠血浆样品中蝙蝠葛碱的平均提取回收率为(70.62±6.47)%( $n=5$ ),内标提取回收率为(65.48±4.38)%( $n=5$ );蝙蝠葛碱基质效应为(98.87±6.34)%( $n=5$ ),内标基质效应为(97.55±4.38)%( $n=5$ )。

### 2.10 稳定性试验

采用质量浓度为5.30、53、212 ng/ml的血浆样品进行稳定性考察,考察项目包括样品处理后的稳定性、室温稳定性、冻融3次稳定性和长期冷冻(-20℃)稳定性。结果表明,样品至少能在处理后8 h内保持稳定,室温放置6 h内能保持稳定,冻融3次以内保持稳定,长期冷冻5 d内保持稳定。稳定性试

验结果RSD均在9.39%以内。

### 2.11 药动学参数及相对生物利用度计算

大鼠按“2.2”项下方法分组、给药、取血后,采用DAS 3.0软件计算药动学参数。采用SPSS 20.0软件对两种剂型蝙蝠葛碱给药后 $c_{max}/c$ 和 $AUC/c$ 取对数后的值以及 $t_{1/2}$ 进行独立样本 $t$ 检验,对 $t_{max}$ 进行秩和检验,评价剂型的改变对蝙蝠葛碱体内药动学过程的影响。单剂量ig给药后大鼠体内蝙蝠葛碱的平均血药浓度-时间曲线见图3、药动学参数测定结果见表2。

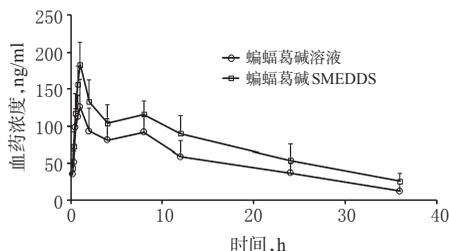


图3 单剂量ig给药后大鼠体内蝙蝠葛碱的平均血药浓度-时间曲线

Fig 3 Mean plasma concentration-time curves of dauricine in rats after single dose of intragastric administration

表2 单剂量ig给药后大鼠的药动学参数( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 2 Pharmacokinetic parameters in rats after single dose of intragastric administration ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

参数	蝙蝠葛碱溶液	蝙蝠葛碱SMEDDS
$t_{max}, h$	$2.5 \pm 1.2$	$2.7 \pm 1.6$
$c_{max}, ng/ml$	$126.3 \pm 37.4$	$179.6 \pm 51.5^*$
$t_{1/2}, h$	$11.48 \pm 4.58$	$21.79 \pm 6.59^*$
$AUC_{0-t}, ng \cdot h/ml$	$1963.5 \pm 638.3$	$2535.8 \pm 739.5^*$
$AUC_{0-\infty}, ng \cdot h/ml$	$2256.3 \pm 703.5$	$2854.6 \pm 768.7^*$
$MRT_{0-t}, h$	$14.76 \pm 3.28$	$21.37 \pm 6.38^*$
$MRT_{0-\infty}, h$	$22.48 \pm 4.57$	$27.38 \pm 7.47^*$
$V/F, L/kg$	$157.30 \pm 15.70$	$88.39 \pm 12.97$
$CL/F, L/(h \cdot kg)$	$7.93 \pm 1.55$	$1.06 \pm 0.30$
FT, %	100	323/316

注:与蝙蝠葛碱溶液比较, \* $P < 0.05$

Note: vs. dauricine solution, \* $P < 0.05$

由表3可以看出,将蝙蝠葛碱制备成SMEDDS后, $c_{max}$ 和AUC显著增加( $P < 0.05$ ),平均滞留时间(MRT)延长( $P < 0.05$ ),表观清除率(CL/F)降低。分别以 $AUC_{0-t}$ 和 $AUC_{0-\infty}$ 计算,蝙蝠葛碱SMEDDS的相对生物利用度(FT)分别为323%和316%。与蝙蝠葛碱溶液比较,采用SMEDDS给药后口服大鼠体内生物利用度提高了2倍以上。

### 3 讨论

已有的有关蝙蝠葛碱体内药动学的研究文献中,蝙蝠葛碱对大鼠ig给药的剂量为50~150 mg/kg<sup>[3,11]</sup>,但是由于本研究采用了灵敏度较好的HPLC-MS/MS法,因此设置蝙蝠葛碱溶液ig给药的剂量为50 mg/kg。此外,SMEDDS处方不同对于提高药物生物利用度的效能也不同。本研究前期通过预试验估算了以SMEDDS给药时大鼠体内血浆药物浓度水平,在前期结果基础上,为保持血药浓度在本检测方法的线性范围内,本研究设置蝙蝠葛碱SMEDDS的给药剂量为20 mg/kg。从本研究结果看,计算所得蝙蝠葛碱溶液大鼠ig给药时的药动学参数与已有的研究报道<sup>[9]</sup>基本一致。

据已有研究显示,蝙蝠葛碱的主要吸收途径为跨细胞通道转运,并且有主动转运机制存在<sup>[12]</sup>;此外,蝙蝠葛碱为P糖蛋白底物,P糖蛋白对蝙蝠葛碱的肠吸收有外排作用<sup>[13]</sup>。SMEDDS

有利于改善细胞膜通透性,增加药物在细胞间的转运,并可减轻或抑制P糖蛋白的外排作用<sup>[14]</sup>,从而大大改善药物的口服生物利用度。本研究结果证明了蝙蝠葛碱SMEDDS可以显著提高蝙蝠葛碱的口服生物利用度,可进一步进行该制剂的研究和开发。

### 参考文献

- [1] Zhao J, Lian Y, Lu C, et al. Inhibitory effects of a bisbenzylisoquinoline alkaloid dauricine on HERG potassium channels[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(2):685.
- [2] Yang XY, Liu QN, Zhang L, et al. Neuroprotective effect of dauricine after transient middle cerebral artery occlusion in rats: involvement of Bcl-2 family proteins[J]. *Am J Chinese Med*, 2010, 38(2):307.
- [3] Wang J, Li Y, Zu XB, et al. Dauricine can inhibit the activity of proliferation of urinary tract tumor cells[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2012, 5(12):973.
- [4] Gao X, Jiang X, Wang L. Using LC-MS/MS to study dauricine pharmacokinetics and determine its bioavailability following administration in different routes[J]. *Acta Chromatogr*, 2013, 25(2):241.
- [5] Chen ZQ, Liu Y, Zhao JH, et al. Improved oral bioavailability of poorly water-soluble indirubin by a supersaturable self-microemulsifying drug delivery system[J]. *Int J Nanomed*, 2012, doi:10.2147/IJN.S28761.
- [6] Wu X, Xu J, Huang X, et al. Self-microemulsifying drug delivery system improves curcumin dissolution and bioavailability[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011, 37(1):15.
- [7] Hintzen F, Perera G, Hauptstein S, et al. In vivo evaluation of an oral self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for leuprorelin[J]. *Int J Pharm*, 2014, 472(1):20.
- [8] Sha X, Wu J, Chen Y, et al. Self-microemulsifying drug-delivery system for improved oral bioavailability of probucol: preparation and evaluation[J]. *Int J Nanomed*, 2012, doi:10.2147/IJN.S28052.
- [9] 张亚红,王娟,甘淋玲,等.蝙蝠葛碱自微乳释药系统的制备及质量评价[J].*中国药房*, 2015, 26(16):2269.
- [10] 张亚红,唐倩,刘耀,等.自微乳给药系统提高蒿甲醚大鼠的口服生物利用度[J].*第三军医大学学报*, 2014, 36(14):1481.
- [11] 陈淑娟,庞雪冰.蝙蝠葛碱大鼠体内药物代谢动力学研究[J].*中国药理学通报*, 2001, 17(2):225.
- [12] 高秀蓉,蒋学华,杜青青.基于Caco-2细胞模型研究蝙蝠葛碱的跨膜吸收机制[J].*中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(15):139.
- [13] 高秀蓉,蒋学华,王凌,等.基于大鼠在体单向肠灌注模型研究P糖蛋白抑制剂对蝙蝠葛碱肠吸收的影响[J].*中国医院药学杂志*, 2012, 32(13):1016.
- [14] Zvonar A, Berginc K, Kristl A, et al. Microencapsulation of self-microemulsifying system: improving solubility and permeability of furosemide[J]. *Int J Pharm*, 2010, 388(1):151.

(收稿日期:2015-12-21 修回日期:2016-03-07)

(编辑:林静)