

· 药物制剂与药品质量控制 ·

小檗碱及 8-羟基二氢小檗碱溶出性能比较*

魏世超¹, 张晨宇¹, 徐丽君²

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 1. 药学部; 2. 中西医结合研究所, 武汉 430030)

摘要 目的 比较小檗碱(Ber)及 8-羟基二氢小檗碱(Hdber)的溶出性能。方法 采用高效液相色谱法测定含量, 色谱柱为 C₁₈ 柱, 流动相为水-乙腈-磷酸二氢钾-十二烷基硫酸钠(500 mL: 500 mL: 3.4 g: 1.7 g)(三乙胺或磷酸调节 pH 至 5.4), 检测波长 356 nm; 采用桨法考察体外溶出情况。结果 37 ℃, Ber 在水中达溶解平衡时间约 30 min, Hdber 为 90 min; 达溶解平衡时, Ber 浓度约 45 μmol · L⁻¹, Hdber 为 0.35 μmol · L⁻¹。结论 该方法简便、稳定、可靠, Hdber 在水溶液中的溶解速率及溶出度远小于 Ber。

关键词 小檗碱; 8-羟基二氢小檗碱; 溶出度; 色谱法, 高效液相

中图分类号 R286; R927.1 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)08-1052-03

Comparative Study on the Dissolution Character between Berberine and 8-hydroxy Dihydroberberine

WEI Shi-chao¹, ZHANG Chen-yu¹, XU Li-jun² (1. Department of Pharmacy; 2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To compare the dissolution character of berberine (Ber) and 8-hydroxy dihydroberberine (Hdber). **Methods** An high performance liquid chromatography (HPLC) method was established for determination of Ber and Hdber with C₁₈ column. The mobile phase was cyanides-water-lauryl sodium sulfate- KH₂ PO₄ (500 mL-500 mL-3.4 g -1.7 g), adjusted to pH 5.4 with phosphoric acid or triethylamine, and the detection wave length was set at 365 nm. A paddle method was used to investigate their dissolution character. **Results** The dissolution equilibrium time of Ber was 30 min at 37 ℃, while Hdber needed 90 min. When reached the dissolved equilibrium, the concentrations of Ber and Hdber were 45 μmol · L⁻¹ and 0.35 μmol · L⁻¹, respectively. **Conclusion** The method is convenient, stable and reliable, and the dissolution rate of Hdber is significantly lower than that of Ber.

KEY WORDS Berberine; 8-hydroxy dihydroberberine; Dissolution; High performance liquid chromatography

小檗碱(berberine, Ber)又称黄连素,微溶于水,具有广泛的药理作用,临床主要治疗胃肠炎及细菌性痢疾^[1]。近年来,大量研究结果表明, Ber 可显著减轻 2 型糖尿病患者症状。但 Ber 用于降血糖时口服剂量高^[2], 动物实验所用剂量也相当高^[3-4]。8-羟基二氢小檗碱(Hdber)是 Ber 的结构修饰物。实验研究显示, Hdber 亦具有优良的治疗 2 型糖尿病作用,且疗效强,使用剂量较 Ber 大幅下降^[5-6]。研究表明, Ber 生物利用度较低,且在肠道几乎不被吸收(吸收率 < 5%)^[7-8]。现有实验表明, Hdber 肠吸收好,肠道吸收可

达 70%, 生物利用度较 Ber 大幅提高。药物溶解性及溶出特性等性质是影响药物生物利用度的重要因素, 笔者在本实验中参考《中华人民共和国药典》2010 年版溶出度测定法, 于 37 ℃ 考察了 Ber 与 Hdber 在水溶液中的溶解及溶出性能, 以期为该新化合物的肠道吸收机制研究及进一步开发研制提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 BT25-型 1/10 万电子天平(日本岛津公司), ZRS-8G 型溶出度仪(天大天发科技有限公司), 超声波清洗器(上海科技超声仪器有限公司), 加样器(法国 Gilson 公司), Waters 600ec 高效液相色谱仪, VF 型纯水装置(美国)。

1.2 试药 Ber 原料药(四川彭州西郊植物提取厂, 纯度: 97.4%, 批号: 060208), Hdber 原料药(华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所提供, 纯度 > 99%, 批号: 070809), Ber 对照品(购于中国药品生物制品检定所, 批号: 110713-20020), Hdber 对

收稿日期 2011-12-22 修回日期 2012-01-08

基金项目 * 国家自然科学基金资助项目(81173370)

作者简介 魏世超(1966-), 男, 湖北麻城人, 副主任药师, 硕士, 从事医院药学工作。电话: 027-83624090, E-mail: weik66@sina.com。

通讯作者 徐丽君(1966-), 女, 湖北黄陂人, 副主任药师, 学士, 从事中药药理工作。电话: 027-83663660, E-mail: xulijunwxr@sina.com。

照品(华中科技大学同济医学院附属同济医院中西医结合研究所研制,批号:0700925),十二烷基硫酸钠、磷酸二氢钾等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Waters Atlantis C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水-乙腈-磷酸二氢钾-十二烷基硫酸钠(500 mL-500 mL-3.4 g-1.7 g), 用三乙胺或磷酸调节 pH 至 5.4, 超声脱气后使用; 检测波长: 356 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 20 μL; 流速: 1 mL·min⁻¹。在以上色谱条件下, Ber 和 Hdber 的保留时间分别约为 8 和 10 min。

2.2 对照品溶液的制备 分别取 Ber、Hdber 对照品 25 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成每毫升含 Ber、Hdber 0.5 mg 的储备液, 将储备液用甲醇稀释成浓度为 12 μg·mL⁻¹ 对照品溶液, 即得。

2.3 线性关系考察 分别精密移取上述储备液 0.2, 1, 2, 4, 6, 8 mL, 置 10 mL 量瓶, 加甲醇至刻度, 摇匀, 再分别精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶, 加甲醇至刻度, 摇匀, 分别精密吸取样品溶液 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定。以峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归, 得 Ber 与 Hdber 的回归方程分别为: $A_{Ber} = 2\ 673.1C + 724.4$, $R^2 = 0.999\ 8$; $A_{Hdber} = 7\ 158C + 9\ 906.5$, $R^2 = 0.999\ 7$ 。结果显示, Ber 与 Hdber 在 1~40 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.4 精密度实验 分别精密量取 Ber、Hdber 储备液, 加甲醇稀释, 制成 10 μg·mL⁻¹ 供试液。分别连续进样 5 次及连续 5 d 进行测定(供试液密封, 常温保存), 计算日内差、日间差。Ber 和 Hdber 的日内 RSD 分别为 0.21% 和 0.14%, 日间 RSD 分别为 1.17% 和 1.54%。说明测定溶液在 5 d 内较稳定。

2.5 回收率实验 分别精密称取不同量 Ber、Hdber, 按“2.3”项方法测定, 并计算 Ber、Hdber 回收率, 结果见表 1。Ber 平均回收率 99.77%, RSD = 1.03%; Hdber 平均回收率 99.71%, RSD = 0.88%。

2.6 实验方案与结果 参照《中华人民共和国药典》2010 年版溶出度测定法浆法^[9], 以水 1 000 mL 为溶出介质, 调节温度(37.0±0.2) °C, 转速 120 r·min⁻¹。精密称取 Ber、Hdber 20 mg 各 3 份, 分别置各溶出杯内, 依法操作, 分别于 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 取样 2 mL, 并补充相应体积同温度水, 立即用孔径 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液适量, 用甲醇稀释至适当浓度, 测定, 计算药物溶出量。结果见图 1, 2。

表 1 Ber 和 Hdber 回收率实验结果

Tab. 1 Results recovery tests of Ber and Hdber

样品组	实际量	测定量	回收率/ %
	mg		
Ber	5.1	5.07	99.41
	5.2	5.12	98.46
	4.9	4.98	101.63
	10.1	10.02	99.21
	9.9	10.02	101.21
	10.2	10.05	98.53
	20.1	20.01	99.55
	19.9	19.94	100.20
	20.1	20.05	99.75
	Hdber	5.2	5.11
5.1		5.13	100.59
4.9		4.94	100.82
10.2		10.03	98.33
10.1		10.05	99.50
9.9		9.97	100.71
20.2		20.12	99.60
20.1		20.06	99.80
20.1		20.05	99.75

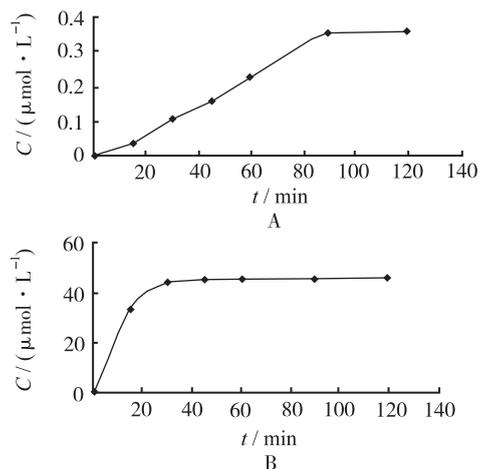


图 1 Hdber(A) 与 Ber(B) 溶解速率曲线图

Fig. 1 Curve of dissolution rate of Hdber(A) and Ber(B)

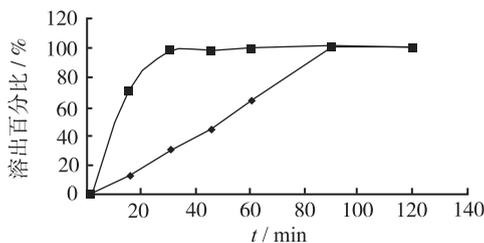


图 2 体外累积溶出曲线

—■— Ber; —●— Hdber

Fig. 2 Cumulative dissolution profile in vitro

—■— Ber; —●— Hdber

由图可知, Ber 在水中溶解速率远大于 Hdber, 37 °C, Ber 30 min 达到溶解平衡; Hdber 于 90 min 达平衡。而且达溶解平衡时 Ber 浓度约 $45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Hdber 在 $0.35 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。提示 Hdber 极难溶于水。

3 讨论

笔者在本实验中建立了 Ber 和 Hdber 高效液相色谱测定方法, 该方法简便、灵敏、可靠, 专属性良好, 色谱条件可实现良好的分离分析, 两种化合物的峰面积与浓度线性关系良好, 精密度与准确度均符合定量分析的要求。

药物的吸收及转运等药动学性质由物理化学性质决定, 溶解性差是难溶性药物口服吸收差的主要原因之一^[10]。Ber 是难溶性药物。Hdber 是在 Ber 结构中引入了羟基的结构修饰物, 由于较 Ber 易于吸收, Hdber 通常被误认为溶解性能较 Ber 好, 生物利用度增加。本实验采用浆法测定并评价 Ber 及 Hdber 在水溶液中的溶解性。结果证明, Hdber 溶解度及溶出度较 Ber 低, 提示导致 Hdber 肠道吸收较 Ber 大幅增加的机制并非其溶解性改善, 极有可能存在其他因素导致 Hdber 生物利用度提高。

药物在肠道内吸收和代谢行为是决定生物利用度的主要因素。口服药物在胃肠道的吸收不是简单的被动扩散, 而是通过肠道黏膜吸收上皮中的各种转运蛋白实现。因此, 转运蛋白在药物的吸收和分布过程中起着非常重要的作用。介导药物在肠道吸收和分布的转运蛋白主要有: 三磷酸腺苷结合的盒式膜转运蛋白家族、肽转运蛋白 (peptide transporters, PEPT)、有机离子转运蛋白超家族如 OCT、OAT 转运蛋白等^[11]。P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是一种相对分子质量为 1.7×10^5 的 ATP 能量依赖型的外排蛋白^[12], 与底物结合后将其从细胞质中排出细胞, 故常导致药物吸收减少, 生物利用率降低。已知 Ber 是 P-gp 的底物, Ber 与 P-gp 结合被其从细胞质中排出肠腔, 这是其吸收差的主要原因^[7]。Hdber 化合物为 Ber 羟基取代物, 虽然二者分子结构母体相同, 结构的改变是否导致与 P-gp 蛋白亲和力发生改变尚不得而知。本实验明确了 Hdber 生物利用度提高并非其溶解性能得到改善。因此, 进一步比较研究二者与肠道转运蛋白特别是与 P-gp 结合

状况显得尤为重要。本实验含量测定方法及实验结果为下一步研究奠定了基础, 并指明了方向, 同时为 Hdber 开发利用提供良好基础依据。

参考文献

- [1] 张洁, 王琴. 黄连素治疗糖尿病的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管杂志, 2003, 1(3): 160.
- [2] 江明性. 新编实用药理学[M]. 北京: 科技出版社, 2006: 611-612.
- [3] LENG S H, LU F E, XU L J. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(4): 496-502.
- [4] YI P, LU F E, XU L J, et al. Berberine reverses free-fatty-acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes through targeting Ikk β [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(6): 876-883.
- [5] 徐丽君, 陆付耳, 魏世超, 等. 8-羟基二氢小檗碱与盐酸小檗碱治疗大鼠 2 型糖尿病的对比较研究[J]. 中西医结合研究, 2009, 1(4): 173-176.
- [6] 徐丽君, 陆付耳, 易屏, 等. 8-羟基二氢小檗碱改善高 FFA 和高糖诱导的 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗的作用[J]. 药学报, 2009, 44(11): 1304-1308.
- [7] PAN G Y, WANG G J, LIU X D, et al. The involvement of P-glycoprotein in berberine absorption [J]. Pharmacol Toxicol, 2002, 91(4): 193-197.
- [8] 潘国宇, 孙建国. 小檗碱对葡萄糖吸收的抑制作用[J]. 药学报, 2003, 38(12): 911-914.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 X C.
- [10] 李萍. 高效液相色谱法测定丹皮酚的溶解度[J]. 中国医药指南, 2008, 6(14): 66-68.
- [11] ARIMA H, YUNOMAE K, MORIKAWA T. Contribution of cholesterol and phospholipids to inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on efflux function of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 in vinblastine-resistant Caco-2 cell monolayers [J]. Pharm Res, 2004, 21(4): 625-634.
- [12] SHIMIZU K, SATO M, ZHANG Y, et al. Molecular size of collagen peptide reverses the permeability of Caco-2 cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2010, 20(7): 848-856.

DOI 10.3870/yydb.2012.08.028