·实验研究·

黄连素衍生物 WZX20 在大鼠体内的药动学研究

朱高峰[1,2],陈　瑞[2],张倚鸣[3],朱开红[3],王建塔[3],汤　磊[2]
(1 贵州医科大学基础医学院,贵阳 550025;2 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心,贵阳 550025;3 贵州医科大学药学院,贵阳 550025)

[摘要] **目的**:考察黄连素衍生物 WZX20 在大鼠体内的药动学特征。**方法**:将 SD 大鼠分别灌胃和尾静脉注射 WZX20,采集不同时间点血样,LC-MS 测定 WZX20 浓度,用 DAS 2.0 软件进行药动学分析。**结果**:WZX20 灌胃药动学参数:$AUC_{0\to t}$ 为(596.46 ± 22.22) ng·h·mL^{-1},$AUC_{0-\infty}$ 为(607.59 ± 23.51) ng·h·mL^{-1},$t_{1/2}$ 为(1.76 ± 0.15) h,CL 为(32.96 ± 1.3) L·h·kg^{-1},Vd 为(83.62 ± 7.54) L·kg^{-1},C_{max} 为(172.98 ± 13.51) ng·mL^{-1},T_{max} 为 0.5 h,F 为 33.19%;WZX20 静脉注射药动学参数:$AUC_{0\to t}$ 为(177.61 ± 30.52) ng·h·mL^{-1},$AUC_{0\to\infty}$ 为(183.08 ± 30.90) ng·h·mL^{-1},$t_{1/2}$ 为(1.74 ± 0.17) h,CL 为(11.23 ± 2.18) L·h·kg^{-1},Vd 为(25.17 ± 6.81) L·kg^{-1}。**结论**:本实验建立的检测方法专属性强、灵敏度高、准确度好,适用于 WZX20 血药浓度的测定。WZX20 在大鼠体内的药-时曲线特征符合血管外给药一级吸收二室模型。WZX20 的药动学参数为其成药性评价研究奠定了基础。

[关键词] 黄连素;衍生物;药动学;生物利用度;液质联用
[中图分类号] R917　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003 - 3734(2021)18 - 1703 - 06

Pharmacokinetic investigation of berberine dernivative WZX20 in rats

ZHU Gao-feng[1,2], CHEN Rui[2], ZHANG Yi-ming[3], ZHU Kai-hong[3], WANG Jian-ta[3], TANG Lei[2]
(1 *School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang* 550025, *China*; 2 *Guizhou Provincial Engineering Technology Research Center for Chemical Drug R&D, Guiyang* 550025, *China*; 3 *School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang* 550025, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study the pharmacokinetics of berberine dernivative WZX20 in rats. **Methods**: SD rats were intragastrically (*ig*) or intravenously (*iv*) given WZX20, and plasma were collected after injection. WZX20 components in plasma were determined by LC-MS. Pharmacokinetic parameters were determined from the plasma concentration-time data with DAS software package. **Results**: The pharmacokinetic parameters after gastric lavage were as follows: $AUC_{0\to t}$ (596.46 ± 22.22) ng·h·mL^{-1}; $AUC_{0-\infty}$ (607.59 ± 23.51) ng·h·mL^{-1}; $t_{1/2}$ (1.76 ± 0.15) h; CL (32.96 ± 1.3) L·h·kg^{-1}; Vd (83.62 ± 7.54) L·kg^{-1}; C_{max} (172.98 ± 13.51) ng·mL^{-1}; T_{max} (0.5) h; F = 33.19%. The intravenous pharmacokinetics parameters were as follows: $AUC_{0\to t}$ (177.61 ± 30.52) ng·h·mL^{-1}; $AUC_{0\to\infty}$ (183.08 ± 30.90) ng·h·mL^{-1}; $t_{1/2}$ (1.74 ± 0.17) h; CL (11.23 ± 2.18) L·h·kg^{-1}; Vd (25.17 ± 6.81) L·kg^{-1}. **Conclusion**: The established LC-Ms method is accurate, sensitive and rapid, and can be used for the blood concentration determination of WZX20. The pharmacokinetic parameters of WZX20 provide a good foundation for the study on the druggability of WZX20.

[**Key words**] berberine; derivatives; pharmacokinetics; bioavailability; LC-MS

[基金项目] 贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心平台项目(黔科合[2016]平台人才 5402)

[作者简介] 朱高峰,男,博士,主要从事药物合成与药物分析。E-mail:zgf-gy@126.com。
[通讯作者] 汤磊,男,教授,博士生导师,主要从事药物化学研究。联系电话:(0851)86908318,E-mail:tl1974@163.com。

黄连素为异喹啉类生物碱,也称为小檗碱(berberine Ber),为黄色针状结晶[1]。主要存在于毛茛科、小檗科、芸香科、防己科、罂粟科、鼠李科等植物中[2]。临床上主要用于细菌感染所引起的胃肠道疾病。同时具有治疗肿瘤、糖尿病、高血脂、细菌和病毒感染、骨质疏松、心血管疾病、改善多囊卵巢综合征症状及妇科疾病等药理作用[3-7]。

药物代谢动力学研究对于新药的研究和开发具有重要的意义,可以为新药设计提供新的研究方向,加快新药的研究过程。有统计数据表明,药物研究过程中只有 10% 的新药候选物可进入市场,而其中大约 40% 的药物由于无体内活性或药动学参数不理想而被淘汰。所以在药物设计及新药开发早期就进行药物代谢研究可以更快捷地获得安全有效的治疗药物,降低候选药物的淘汰率,提高成为新药的概率。本课题组在前期研究基础上,发现所合成的黄连素衍生物 WZX20 具有很好的降糖活性(见图 1)。在体外降糖实验中,WZX20 对人肝癌 HepG2 细胞葡萄糖消耗活性数据明显优于黄连素和二甲双胍。基于此,有必要对化合物 WZX20 进行大鼠体内药动学及生物利用度研究,为其深入的体内药效学评价奠定基础。黄连素在实验动物及人体内的药动学研究已有不少的报道[8-10],本文通过研究黄连素衍生物 WZX20 的生物利用度与文献报道的黄连素生物利用度进行比较,从药动学角度评估黄连素衍生物 WZX20 的成药性。

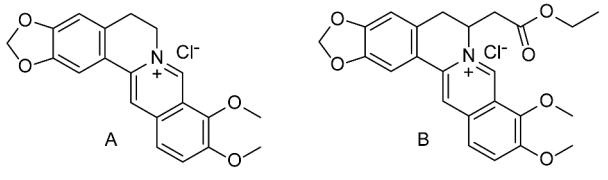


图 1 黄连素(A)和 WZX20(B)化学结构式

目前,随着药物分析技术与其他学科新技术相结合,色谱技术在进样方式、分离模式、检测技术及适用对象等方面发展迅速。液相色谱-质谱联用技术由于具有快速、专属、灵敏等优点,现今已被广泛应用于药学研究,已成为药物多组分分析及药动学研究中不可或缺的重要工具[11-17]。本实验采用 UPLC-MS 方法测定 WZX20 在大鼠血浆中的药物浓度,运用 DAS 2.0 软件进行动力学分析,计算出黄连素衍生物 WZX20 在大鼠体内的药动学与生物利用度,为开展 WZX20 成药性研究提供了参考依据。

材　料

1　药物

黄连素衍生物 WZX20(贵州医科大学药物化学重点实验室制备,核磁共振确证结构,HPLC 纯度大于 98%);葛根素(购自中国食品药品检定研究院,批号 181105-201303,纯度≥98%)。

2　仪器与试剂

超高效液相色谱(Waters ACQUITY UPLC H-Class),高分辨质谱(Waters G2-XSQTOF),漩涡混合器(江苏康健医疗用品有限公司,XH－B 型),氮气吹扫仪(苏州吉米诺仪器有限公司,型号 JN300－2),高速离心机(Gene Company Limited,型号 X1),超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,型号 KH－600E),电子天平(上海菁海仪器有限公司,型号 FA505N)。

甲酸(美国 Fisher,质谱纯),甲醇、乙腈(Merck 试剂公司,色谱纯),蒸馏水(屈臣氏);其余试剂均为分析纯。

3　动物

SD 大鼠 12 只,雌雄各半,体重为 190 ~ 220 g,购自重庆腾鑫生物技术有限公司,合格证号:SCXK(渝)2012-0011。

方法与结果

1　样品的制备

WZX20 贮备液的配制(10 μg·mL^{-1}):精密称取 WZX20 原料药 0.002 5 g,置 250 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,置于 4 ℃冰箱保存待用。内标葛根素贮备液的配制(10 μg·mL^{-1}):精密称取葛根素 0.002 5 g,置 250 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,置于 4 ℃冰箱保存待用。

2　血浆样品的处理

取 100 μL 血浆样品,加入内标 100 μL(葛根素 2 μg·mL^{-1})、HCl 50 μL(0.5 mol·L^{-1})和乙酸乙酯 800 μL,涡旋混合 10 min,超声 1 min,离心 10 min(13 000 r·min^{-1})。吸取上层清液,37 ℃氮气吹干,残渣加入 100 μL 甲醇溶解,离心 10 min(13 000 r·min^{-1}),取其上清液待测。

3　检测条件与专属性试验液相条件

液相条件:色谱柱 Waters BEH C_{18} 柱(50 mm × 2.1 mm,1.7 μm),流速 0.35 mL·min^{-1},柱温:40 ℃,进样盘:4 ℃。流动相:0.1% 甲酸水(A)-乙腈

(B),梯度洗脱 0→0.2 min,90% A;0.2→3.0 min,35% A;3.0→3.5 min,2% A;3.5→4.0 min,2% A;4.0→5.0 min,90% A。进样量:2 μL;单次样品检测时间:5.0 min。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI);正源模式采集(positive mode);毛细管电压 1 kV,离子源 120 ℃,脱溶剂气温度 400 ℃,脱溶剂气流量 800 L·h^{-1},锥孔气流量 50 L·h^{-1};质谱数据采集及处理软件 MassLynx V4.1 工作站,扫描方式 Mse 模式。葛根素和 WZX20 质谱图见图 2。

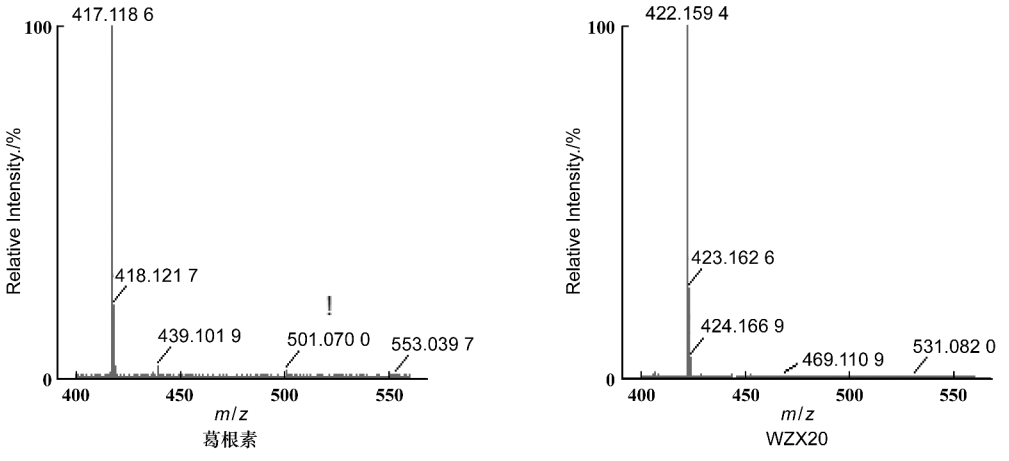
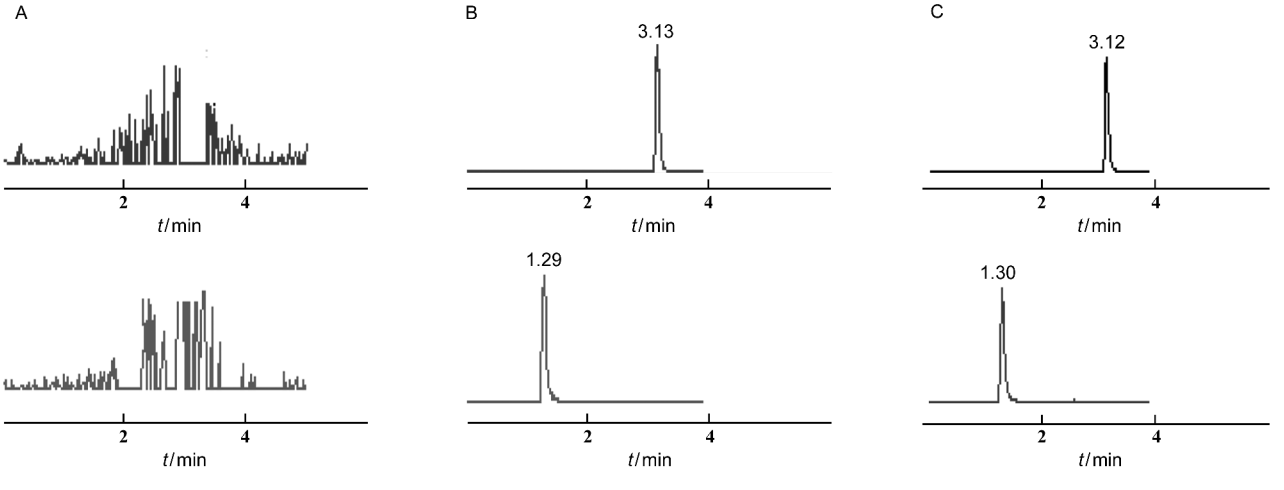


图 2 葛根素和 WZX20 的质谱图

专属性实验:取空白大鼠血浆,按"**2**"项下的方法操作,加入标准对照品。将空白样品、加对照品样品以及给药后的样品进行比较,在本色谱条件下,内标葛根素和 WZX20 出峰时间分别为 1.30 和 3.12 min,其峰形良好,并且与大鼠血浆中的内源性物质达到完全分离,结果见图 3,证明本方法具有较好的专属性。



A:空白血浆;B:空白血浆 + WZX20 + 内标;C:WZX20 血浆样品 + 内标

图 3 空白血浆及 WZX20 样品液相色谱图

4 标准曲线的制备

取 WZX20 贮备液稀释成 1,5,20,40,80,200,400 ng·mL^{-1}的系列标准液。取空白血浆 100 μL,置于 2 mL Ep 管中,依次加入上述标准液 100 μL,按"**2**"项下方法处理,进样测定,记录色谱图。以质量浓度(C)为横坐标、WZX20 与内标峰面积比(y)为纵坐标,用加权最小二乘法进行线性回归,权重系数为 $1/C$,绘制标准曲线,得标准曲线方程为 $y = 0.012\,6C - 0.032\,1$ ($r^2 = 0.999\,6$)。结果表明,WZX20 检测质量浓度的线性范围为 1 ~ 400 ng·mL^{-1}。以 3 倍信噪

比为检出下限，定量下限为 0.3 ng·mL^{-1}，10 倍信噪比为定量下限，定量下限为 1 ng·mL^{-1}。

5 基质效应与提取回收率考察

取空白血浆 100 μL，置于离心管内，按“**2**”项下方法处理，氮气吹干后，分别用质量浓度为 5，80，400 ng·mL^{-1}（低、中、高）的 WZX20 标准液 100 μL 复溶，每个浓度平行 5 份，计算 WZX20 与内标峰面积比值（Ⅰ）与同样浓度的 WZX20 标准液直接进样获得的峰面积（Ⅱ）的比值，考察基质效应。在血浆中加入低、中、高的 WZX20 标准液 100 μL 按“**1**”项下方法处理，计算血浆样品中 WZX20 与内标峰面积比值（Ⅲ），以Ⅲ/Ⅰ×100% 计算提取回收率，见表 1。

表 1 WZX20 的提取回收率和基质效应 $n=5$

检测物	低、中、高 QC 样品浓度/ng·mL^{-1}	提取回收率/%	RSD/%	基质效应/%	RSD/%
WZX20	5	84.86 ± 5.46	6.43	90.8 ± 5.28	5.8
	40	90.87 ± 4.39	4.83	91.7 ± 4.15	4.53
	400	81.13 ± 5.28	6.51	98.1 ± 4.2	4.28

6 准确度和精密度考察

WZX20 的质控浓度（QC）的血浆样品，各 5 份，按“**1**”项下方法处理，进样测定，连续进样 3 d，考察日内精密度和日间精密度。结果表明 WZX20 的准确度范围 92.61% ~ 112.3%，日内和日间精密度 RSD（%）均小于 10.0%，表示该方法准确、可靠、重现性好，结果见表 2。

表 2 WZX20 的准确度、日内和日间精密度 $n=5$

检测物	低、中、高 QC 样品浓度/ng·mL^{-1}	$\bar{x} \pm s$/ng·mL^{-1}	准确度/%	日内精度 RSD/%	日间精密度 RSD/%
WZX20	5	4.86 ± 0.23	112.3 ± 10.24	9.12	1.81
	40	48.87 ± 9.79	101.24 ± 2.19	2.4	0.4
	400	395.13 ± 31.68	92.61 ± 9.08	9.81	2.15

7 样品稳定性考察

按“**1**”项下方法处理配制 WZX20 质量浓度为低、中、高的质控（QC）样品，每一浓度平行 5 份，各浓度下的样品在室温下放置 6 h，4 ℃下冷藏 12 h，反复冻融 3 次以及自动进样器放置 6 h 后，稳定性考察结果见表 3。

表 3 WZX20 的稳定性 $n=5$

检测物	低、中、高 QC 样品浓度/ng·mL^{-1}	进样器 6 h RSD/%	室温 6 h RSD/%	冷藏 12 h RSD/%	反复冻融 3 次 RSD/%
WZX20	5	6.87	6.94	7.43	9.31
	40	3.72	3.43	6.12	6.55
	400	3.35	8.62	4.45	7.67

8 药动学研究

8.1 WZX20 灌胃溶液及静脉注射液的制备

WZX20 灌胃溶液的制备（5 mg·mL^{-1}）：精密称取 WZX20 30 mg 溶于 6 mL 0.9% NaCl 生理盐水中，待用。WZX20 静脉注射液的制备（1 mg·mL^{-1}）：精密称取 WZX20 8 mg 溶于 8 mL 0.9% NaCl 生理盐水中，待用。

8.2 实验方法 取大鼠 12 只随机分为灌胃组和尾静脉注射组，每组 6 只，雌雄各半，体质量 200 ~ 230 g，实验前禁食 12 h，正常饮水。大鼠称重后，按 20 mg·kg^{-1} 灌胃化合物 WZX20 溶液，后分别于 0.15，0.25，0.5，1，1.5，2，4，6，8，10，12 h 断尾取血 0.3 mL，置于肝素化 1.5 mL 离心管中，在 3 500 r·min^{-1} 离心 10 min，按“**1**”项下方法处理，进样测定血药浓度。静脉注射剂量 2 mg·kg^{-1} 给药后，分别于 0.05，0.25，0.5，1，1.5，2，4，6，8，10，12 h 断尾取血 0.3 mL，置于肝素化 1.5 mL 离心管中，在 3 500 r·min^{-1} 离心 10 min，按“**2**”项下方法处理，进样测定血药浓度。采用 DAS 2.0 药动学软件进行拟合，计算 WZX20 在大鼠体内的药动学参数及其绝对生物利用度。

9 结果

WZX20 静脉注射和灌胃的药时曲线如图 4 所示，药动学参数如表 4 所示。

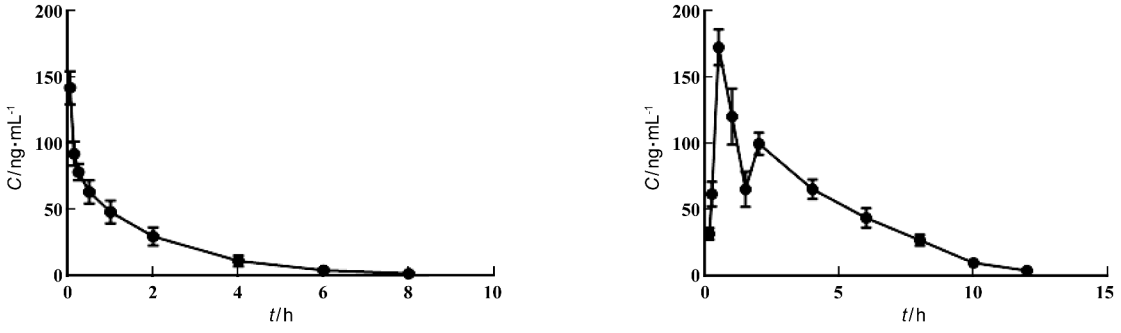


图 4 WZX20 静脉注射及灌胃药-时曲线

表 4 2 种给药途径给予 WZX20 的药动学参数

$\bar{x} \pm s, n = 6$

药动学参数	*iv*（2 mg·kg^{-1}）	*ig*（20 mg·kg^{-1}）
$AUC_{0\to t}$/ng· h·mL^{-1}	177.61 ±30.52	596.46 ±22.22
$AUC_{0\to\infty}$/ng· h·mL^{-1}	183.08 ±30.90	607.59 ±23.51
$t_{1/2}$/h	1.74 ±0.17	1.76 ±0.15
Cl/L·h^{-1}·kg^{-1}	11.23 ±2.18	32.96 ±1.3
Vd/L·kg^{-1}	25.17 ±6.81	83.62 ±7.54
C_{max}/ng·mL^{-1}	—	172.98 ±13.51
T_{max}/h	—	0.5
F/%	—	33.19

讨　论

1 样品处理和检测方法的建立

黄连素含量测定多采用高效液相色谱法，但黄连素及其衍生物 WZX20 在体内的入血浓度低，以往高效液相法达不到足够高的灵敏度，故本实验采用灵敏度相对较高的液质联用方法进行检测。黄连素和 WZX20 溶解性实验显示，这 2 个化合物在甲醇和乙醇中的溶解性较好，所以在配制标准溶液时以甲醇为溶剂。处理血浆样品时，开始用 400 μL 乙腈处理，实验结果并不理想，色谱图峰形不好，杂质峰多，回收率低。经过多次实验后，确定以血浆样品中加入 50 μL 0.5 mol·L^{-1} HCl、800 μL 乙酸乙酯来处理样品。HCl 处理本实验生物样品后，能减少色谱图中杂质，且对样品中的成分无明显影响。结果显示血样中杂质影响较小，提取回收率较高。

2 UPLC-MS 检测 WZX20 优点

采用 UPLC-MS 测定 WZX20 血药浓度，具有较高的灵敏度及较强的专属性，缩短了样品检测时间。本检测方法专属性强、灵敏度高、准确度好，可用于黄连素衍生物 WZX20 的药动学研究。

3 WZX20 成药性研究

本课题组前期主要研究黄连素衍生物降糖活性，二甲双胍、黄连素和 WZX20 对人肝癌 HepG2 细胞葡萄糖消耗活性数据见表 5。

表 5 二甲双胍、黄连素和 WZX20 对人肝癌 HepG2 细胞葡萄糖消耗活性数据

化合物	终浓度/mol·L^{-1}	样品对细胞活力的抑制率/%	GC/%	样品促进葡萄糖消耗率/%
WZX20	1×10^{-4}	0	35.10 ±7.23	13.60 ±4.54
黄连素	1×10^{-5}	0	37.44 ±8.21	16.75 ±6.02
	1×10^{-6}	0	37.37 ±9.15	16.70 ±7.28
	1×10^{-4}	20.08 ±2.76	—	—
	1×10^{-5}	0	34.97 ±5.88	13.36 ±2.72
	1×10^{-6}	0	28.80 ±6.57	5.16 ±3.16
二甲双胍	1×10^{-6}	0	35.46 ±7.56	12.71 ±4.28

从表 5 中可以看出 WZX20 对人肝癌 HepG2 细胞葡萄糖消耗活性数据明显优于黄连素和二甲双胍。

黄连素口服后肠道吸收差、生物利用度低,经结构修饰为 WZX20 后绝对生物利用度提高到 33%,与华长龙[18]报道黄连素的绝对生物利用度(2.5%)相比有显著提高。WZX20 比黄连素具有更好的生物利用度,在体内能更好地发挥药理活性,并能降低毒副作用,具有较好的成药性。

[参 考 文 献]

[1] 华雯妍, 张全英, 丁黎, 等. LC-MS 法研究健康人体盐酸小檗碱片的药代动力学[J]. 药学与临床研究, 2009, 17(6): 465 – 468.

[2] 李波, 朱维良, 陈凯先. 小檗碱及其衍生物的研究进展[J]. 药学学报, 2008, 43(8): 773 – 787.

[3] 郑慧颖, 吴献群, 林丽琴, 等. 黄连素治疗妇科疾病的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(11): 2751 – 2753.

[4] 刘永贵, 解学星, 吴疆, 等. 治疗 2 型糖尿病的新靶点药物研究进展[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(2): 222 – 227.

[5] 安思芹. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征在 2 型糖尿病患者中的患病率及其对糖尿病脂代谢的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2014.

[6] 左茹, 曹雪滨, 张文生. 黄连素药理作用研究进展[J]. 环球中医药, 2014, 7(7): 568 – 572.

[7] 成晓玲,马洁,王晓玲,等. 儿童再生障碍性贫血免疫治疗中联用盐酸小檗碱对环孢素 A 血药浓度的影响分析[J]. 世界临床药物,2019,40(12):840 – 844.

[8] 高海鹏, 肖飞, 马红伟, 等. 盐酸小檗碱在鸡体内的药动学研究[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(3): 31 – 34.

[9] 陈伟, 孟令阔, 樊冬娇, 等. 盐酸小檗碱单次和多次给药在 beagle 犬体内的药动学[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(7): 512 – 516, 554.

[10] 王静, 袁子民, 张振秋. 黄连、吴茱萸药对中盐酸小檗碱在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(5): 755 – 759.

[11] 武丽南, 陆榕, 谷元, 等. 梓醇在大鼠体内的药代动力学和生物利用度研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(2): 126 – 130.

[12] 晏肃霜, 梁小明. 五味子与抗抑郁药舍曲林药代动力学相互作用研究[J]. 江西中医学院学报, 2010, 22(3): 57 – 59.

[13] 黄静, 陆苑, 饶光玲, 等. 新型胰岛素增敏剂 2-甲基-1(-4-氯苯甲酰基)-5-苄氧基-1H-吲哚-3-乙酸在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国药房, 2013, 24(25): 2314 – 2316.

[14] 吴恒, 陈礼明, 张善堂. 葛根素在大鼠体内的药动学研究[J]. 安徽医药, 2010, 14(2): 139 – 141.

[15] 相妍笑, 刘沙, 魏春敏, 等. 乙酰葛根素在大鼠体内的药动学研究[J]. 中草药, 2012, 43(11): 2247 – 2249.

[16] 关彩华,招志辉,张韵. 大鼠体内的葛根素浓度及药代动力学[J]. 世界中医药,2019,14(10):2609 – 2612,2617.

[17] 白俊其,黄娟,徐文,等. LC-MS/MS 法测定石斛碱在大鼠体内药代动力学研究[J]. 世界中医药,2019,14(9):2272 – 2275.

[18] 华长龙. 胆酸偶联小檗碱衍生物 A4,B4 的药代动力学研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2014.

编辑:杨青/接受日期:2021 – 02 – 24