文章编号:1000-5404(2010)06-0529-04

论著

苦参碱遥控释药胶囊近端小肠定点释放的药代动力学研究

郑小林[1,2],刘洪英[1],唐 伟[3],皮喜田[1,2],侯文生[1],周承文[1] (400030 重庆,重庆大学:生物工程学院生物医学工程系[1],微系统研究中心[2]; 400038 重庆,第三军医大学西南医院设备科[3])

[摘要] **目的** 研究苦参碱在健康志愿者近端小肠内定点释放后的药代动力学特征。**方法** 用自主研制的遥控释药胶囊系统,将200 mg苦参碱定位释放于志愿者的近端小肠内。用高效液相色谱法,以槐果碱为内标,甲醇-水-乙二胺(70∶30∶0.02)为流动相,测定志愿者血浆中苦参碱的含量。采用3p87程序计算药代动力学参数。**结果** 近端小肠定点释放苦参碱的药代动力学符合二室开放模型,C_{max}为10.52 μg/ml,T_{max}为2.08 h,$T_{1/2\alpha}$和$T_{1/2\beta}$分别为0.90 h和9.02 h,$AUC_{(0-t)}$为91.90 μg·h/ml。**结论** 苦参碱在健康人近端小肠段定位释放后,小肠对苦参碱有明显的吸收且吸收过程呈二室模型分布。

[关键词] 缓释制剂;苦参碱;投药, 局部;药代动力学;色谱法;高效液相
[中图法分类号] R282.71;R944.9;R969.1 **[文献标志码]** A

Pharmacokinetics of matrine in proximal small intestine based on remote controlled capsule

Zheng Xiaolin[1,2], Liu Hongying[1], Tang Wei[3], Pi Xitian[1,2], Hou Wensheng[1], Zhou Chengwen[1] ([1]College of Bioengineering, [2]Microsystem Research Center, Chongqing University, Chongqing, 400030; [3]Department of Equipment, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the pharmacokinetics of remote controlled capsule for matrine in the proximal small intestine of healthy volunteers and obtain the standard pharmacokinetic parameters. **Methods** A total of 200 mg matrine was delivered in the proximal small intestine of 12 healthy male volunteers by remote controlled capsule system, which made by our work group. Blood sample of 3 ml for each time was harvested respectively in 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 16.0, 24.0, 30.0 and 36.0 h after the matrine was released when the capsule entered into the proximal small intestine. HPLC-UV was used to measure matrine concentrations in the plasma by adding an internal standard (sophocarpine). Methanol-water-ethylenediamine (70∶30∶0.02) was used as the mobile phase. The main parameters were calculated by 3p87 pharmacokinetic program. **Results** The martine pharmacokinetics conforms to a two-compartment open model after a single delivery of martine at a dose of 200 mg in upper small intestine of healthy volunteers. The main parameters were as follows: C_{max} was 10.52 μg/ml, T_{max} was 2.08 h, $T_{1/2\alpha}$ was 0.90 h, $T_{1/2\beta}$ was 9.02 h, K_{12} was 0.21 h, K_{21} was 0.53 h, K_{10} was 0.12 h, $MRT_{(0-t)}$ was 11.56 h and $AUC_{(0-t)}$ was 91.90 μg·h/ml. **Conclusion** There is an effective absorption when matrine is site-specific delivered in the proximal small intestine. The process *in vivo* fits well to two compartment open model.

[Key words] sustained-release preparations; administration, topical; matrine; pharmacokinetics; chromatography, high performance liquid

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2004AA404012), the National Natural Science Foundation of China (30700160), the China Postdoctoral Science Foundation (20070420718) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2006BA5005). Corresponding author: Liu Hongying, Tel: 86-23-65111931; E-mail: liu_hongying@163.com

苦参碱是从常见中草药苦参的根、苦豆子以及广豆子中分离提取的生物碱。多年的药理及临床研究发现苦参碱具有强心、降压、抗心律失常、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性[1-3]。目前,该药临床使用的剂型主要

[基金项目] 国家自然科学基金(30700160);国家高技术研究发展计划(863计划,2004AA404012);中国博士后科学基金(20070420718);重庆市自然科学基金(CSTC2006BA5005)
[通信作者] 刘洪英,电话:(023)65111931;E-mail: liu_hongying@163.com

为注射剂,给治疗和患者带来许多不便。为了减少患者的服药次数,提高患者的顺从性并降低药物的毒副反应,苦参碱口服缓控释制剂的研发方兴未艾[4,5],但都处于实验室研究阶段。最优化的口服制剂的设计往往需要药物在胃肠道内的吸收特征数据。插管或灌注是研究药物胃肠道局部吸收(regional drug absorption, RDA)特征的传统方法[6-7],但这些方法均会给志愿者带来强烈的不舒适感甚至创伤,更重要的是导管的介入改变了胃肠道的内环境,通过插管或者灌注获得的数据的正确性得到了质疑[8]。

遥控释药胶囊(remote controlled capsule, RCC)技术是近年来国际制药领域开展 RDA 研究的一项新技术[9-11]。RCC 通过体外遥控实现消化道内精确、无创的定点药物释放,从而实现在完全正常的生理状态下研究药物在胃肠道各部位的吸收特征。国内对 RCC 的研究起步较晚,2002 年,在国家 863 项目支持下,重庆大学开始对 RCC 进行研究。截至 2005 年底,率先开发出国内第一套具有自主知识产权的[12-13]、可以用于 RDA 研究的 RCC 系统,并获得医疗器械准产注册(注册号:渝食药监械(准)字 2005 第 2210031 号)。本实验利用该 RCC 系统,首次将中药有效成分苦参碱定位释放于志愿者的近端小肠内,在完全正常的生理状态下研究苦参碱于志愿者近端小肠无创定点释放后吸收的血药浓度经时过程,并对其药代动力学进行了研究,为优化的苦参碱口服缓控释制剂的开发及临床合理用药提供参考依据,同时为中药有效成分胃肠吸收研究提供新的方法和手段。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苦参碱(批号 110805-200306)和槐果碱(内标,批号 111652-200301)均购于中国药品生物制品检定所。甲醇、乙二胺为色谱纯,乙醚、NaOH 为分析纯,水为超纯水。

LC-10AT 高效液相色谱系统(日本岛津公司);TGL-16C 台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂);XW-80 型漩涡混合器(上海第一医学院仪器厂)。RCC 系统(重庆大学维多生物工程研究所,XDZ-A 型)包括 RCC、RCC 磁定位跟踪系统、遥控 RCC 释放药物的遥控系统 3 部分,为 1 个 10 mm×30 mm 的微电子胶囊,包括释药驱动机构和药仓(装载各种剂型的待研究药物)两部分[14]。载药的 RCC 经志愿者口服进入体内后,在胃肠道内的位置由磁定位跟踪系统跟踪确定[15]。当 RCC 到达消化道的指定位置时,经体外遥控系统遥控触发释药驱动机构,将药仓中的药物释放在肠道内。RCC 释药完成后随胃肠道蠕动继续前行最终排出体外。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Extend-C_{18} 柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm);流动相为甲醇-水-乙二胺(70∶30∶0.02);紫外检测波长:220 nm;流速:1.0 ml/min^{-1};柱温 25 ℃;进样量:20 μl;检测灵敏度:0.02AUFS。

1.2.2 血浆样品处理 于塑料离心管中精密加入血浆 1.0 ml,槐果碱储备液 50 μl (100 μg/ml, 内标),加水 1 ml, 20% NaOH 溶液 0.5 ml,涡旋混匀,加入乙醚 3 ml,漩涡混旋器混旋 30 s,离心 5 min (6 000 r/min),吸取乙醚层于另一离心管中,于 45 ℃水浴氮气吹干。残渣用 100 μl 流动相复溶,混匀离心 5 min,取上清液 20 μl 进样。记录色谱峰面积,用药物峰与内标峰的峰面积比值进行定量分析。

1.2.3 受试者准备 通过西南医院临床试验基地招募 12 名男性健康志愿者,年龄(20.6±1.8)岁,身高(167.7±3.2)cm,体质量(62.1±7.2) kg,体质量指数(22.1±2.5)。行常规体检,血、尿常规、血压、肝、肾功能及心电图均正常。经全消钡餐检查无消化道憩室、溃疡及其他消化道病变。并经探路胶囊探测[16],确定胃肠道可以顺利通过电子胶囊者入组试验,每位志愿者均自愿参加试验并在试验前签署知情同意书。试验期间禁烟、酒。试验前 2 周及试验期间禁服其他药物。

1.2.4 定位释药及血样采集 12 名志愿者试验前禁食 12 h,试验当天早晨 8:00 空腹用 200 ml 温开水送服含苦参碱(200 mg) 的电子胶囊。服用电子胶囊 4 h 和 10 h 后分别统一进食午餐和晚餐。志愿者口服电子胶囊后,电子胶囊磁定位跟踪系统开始跟踪胶囊在消化道的具体位置[14]。当磁定位跟踪系统发现电子胶囊从胃中排空,进入近端小肠后,经体外遥控装置发射释药信号,体内电子胶囊接收到释药信号后,自动打开药物释放驱动机构,将药仓中的苦参碱释放在近端小肠内。并在以下时间点经肘静脉采集血样(约 3 ml/次):0(遥控释药前)、0.5、1、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、12.0、16、24.0、30、36 h(遥控释药后);将血液置于肝素化试管中,3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,-40 ℃避光保存待测。

2 结果

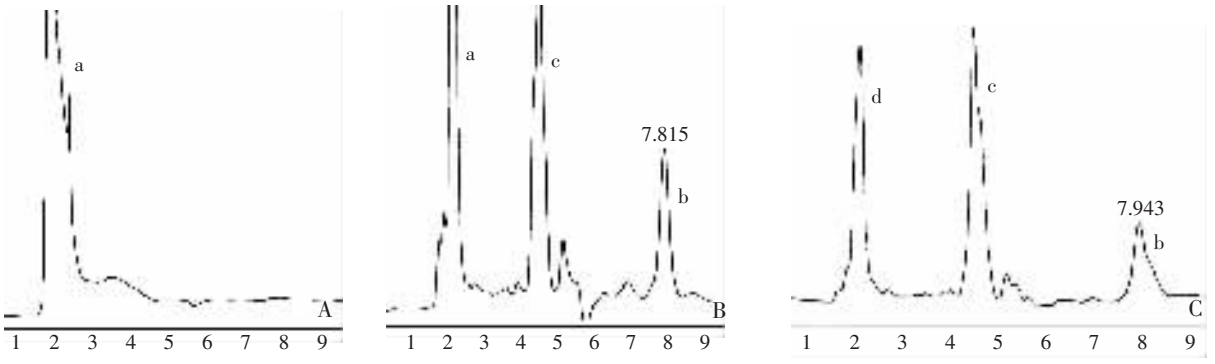
2.1 测定方法专属性

在本实验所选定的色谱条件下,苦参碱的保留时间在 7.8 min 左右,内标的保留时间在 5.0 min 左右,色谱分离情况见图 1。苦参碱和内标的峰形均良好,无杂峰干扰测定。

2.2 标准曲线的制备

精密称取苦参碱及槐果碱 10 mg 分别置于 100 ml 容量瓶中,用蒸馏水溶解并稀释至刻度,配置成 100 μg/ml 储备液。贮存于 4 ℃冰箱中备用。

精密量取人空白血浆 1.0 ml 于试管中,加入稀释的苦参碱工作标准溶液,使其终质量浓度分别为 0.625、1.25、2.5、5.0、10.0、20.0、30.0 μg/ml,精密加入内标槐果碱储备液 50 μl,混匀,按 1.2.2 项下操作,得苦参碱与内标峰面积之比(Y)与苦参碱的血药浓度(X)的回归方程:Y = 0.066 23X + 0.053 24, r = 0.999 8。在 0.625 ~ 30.0 μg/ml 的浓度范围内,苦参碱的峰面积与其浓度成良好的线性关系,最低检测限为 0.03 μg/ml。



a:空白血浆; b:苦参碱; c:槐果碱; d:志愿者服药后血浆
A:空白血浆; B:空白血浆+苦参碱+槐果碱; C:志愿者服药后血浆+槐果碱

图1 苦参碱色谱图

2.3 精密度及回收率

分别取人空白血浆1.0 ml,加入稀释的苦参碱工作标准溶液,使其质量浓度分别为0.625、5.0和30.0 μg/ml。按1.2.2项下操作,测定药品与内标的峰面积比值,代入标准曲线,计算苦参碱质量浓度。以测定值与实际值之比计算回收率。3个浓度的平均相对回收率分别为105.3%、101.6%和98.1%;本法的日内精密度分别为2.1%、1.4%和0.9%;5 d的日间精密度分别为3.2%、2.3%和1.7%。另外用流动相配制0.625、5.0和30.0 μg/ml的苦参碱标准溶液,直接进样分析。将血浆样品测得峰面积比与相应浓度的苦参碱标准溶液测得峰面积比相比,得提取回收率分别为88.5%、87.4%、86.9%,精密度和回收率均符合生物样品分析要求。

2.4 实验安全性

参加试验的12名成年健康男性志愿者在试验期间均无不良反应发生,对试验药物耐受良好。并于(22.7±6.2)h(从吞服至排出时间)内顺利地回收到遥控释药胶囊。

2.5 药代动力学

采用3p87(中国药理学会数学专业委员会编制)程序计算主要药代动力学参数,T_{max}、C_{max}为实测值。根据*F*检验和拟合优度判断,曲线拟合均以二室模型为最好,权重系数$1/C^2$。12名健康志愿者单剂量近端小肠定点释放200 mg苦参碱后不同时间的平均血药浓度-时间曲线见图2。C_{max}为(10.52±2.37)μg/ml,T_{max}为(2.08±1.26)h,$T_{1/2\alpha}$和$T_{1/2\beta}$分别为(0.90±0.26)μg/ml和(9.02±2.6)h,K_{12}和K_{21}分别为(0.21±0.07)/h和(0.53±0.03)/h,$AUC_{(0-t)}$为(91.90±6.7)μg/(h·ml)。

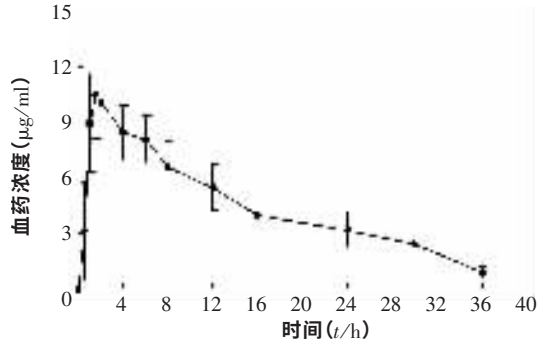


图2 12名健康志愿者单剂量小肠定位释放苦参碱200 mg后平均血药浓度-时间曲线 ($n=12$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

由于苦参碱的诸多药理活性和临床功用,在医用方面已出现方兴未艾的局面。但是,苦参碱作为常用中药苦参的有效单体之一,文献除报道动物口服给药药代动力学研究[15,16]和志愿者静脉注射给药药代动力学研究[17,18]外,其药代动力学研究甚少。

本实验利用自主研制的RCC系统对传统中药单体的体内定点吸收特性进行了探索性的研究。药代动力学结果表明:志愿者近端小肠定点释放苦参碱后的药代动力学过程选择权重系数为$1/C^2$,开放的二室模型较为合理。于近端小肠定点释放200 mg苦参碱后2 h左右达血药浓度峰值,AUC值为91.9 μg/(h·ml),具有较大的曲线下面积。$T_{1/2\beta}$远大于$T_{1/2\alpha}$,说明苦参碱在志愿者体内分布较快,主要以消除过程为主。K_{12}约为K_{21}的4倍,提示苦参碱从中央室向外周室转运速率快于药物从外周室向中央室转运速率。本实验结果表明苦参碱在志愿者近端小肠定点释放后的体内过程呈二室模型分布,小肠明显的吸收过程为苦参碱口服制剂的开发提供了理论依据。

本实验为中药单体的体内吸收药代动力学研究提供了一种新的研究手段,所建立的测定志愿者血浆中苦参碱浓度的HPLC-UV方法操作简单,分离效果良好,血浆中内源性杂志无干扰,灵敏度较高,且具有较高的重现性和专属性,适用于苦参碱血药浓度的测定及药代动力学研究。

参考文献:

[1] Ai J, Gao H H, He S Z, *et al*. Effects of matrine, artemisinin, tetrandrine on cytosolic $[Ca^{2+}]_i$ in guinea pig ventricular myocytes [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(6): 512-515.

[2] 司维柯, 李鹏, 姚婕, 等. 苦参碱对HepG2细胞代谢水平和基因水平的影响[J], 第三军医大学学报, 2002, 24(11): 1346-

1349.
[3] 戴碧涛, 徐酉华. 苦参碱对白血病细胞作用的研究进展[J]. 儿科药学杂志, 2006, 12(4): 57-61.
[4] 李晏, 吴学孔, 杨延莉, 等. 苦参碱缓释片的研制及体外释放特性研究[J]. 解放军药学学报, 2003, 19(4): 274-277.
[5] 李晏, 曹蔚蔚, 杨延莉, 等. 苦参碱缓释片、胶囊、注射液的药代动力学及生物利用度比较研究[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(6): 681-683.
[6] Barr W H, Zola E M, Candler E L, *et al*. Differential absorption of amoxicillin from the human small and large intestine[J]. Clin Pharmacol Ther, 1994, 56(3): 279-285.
[7] Rouge N, Buri P, Doelker E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery[J]. Int J Pharm, 1996, 136(1-2): 117-139.
[8] Read N W, Al-Janabi M N, Bates T E, *et al*. The effect of gastrointestinal intubation on the passage of a solid meal through the stomach and small intestine in humans[J]. Gastroenterology, 1983, 84(6): 1568-1572.
[9] Wilding I, Connor A, Carpenter P, *et al*. Assessment of lumiracoxib bioavailability from targeted sites in the human intestine using remotely activated capsules and gamma scintigraphy[J]. Pharm Res, 2004, 21(3): 443-446.
[10] McGirr M E, McAllister S M, Peters E E, *et al*. The use of the InteliSite Companion device to deliver mucoadhesive polymers to the dog colon[J]. Eur J Pharm Sci, 2009, 36(4-5): 386-391.
[11] Connor A, Evans P, Doto J, *et al*. An oral human drug absorption study to assess the impact of site of delivery on the bioavailability of bevirimat[J]. J Clin Pharmacol, 2009, 49(5): 606-612.
[12] Pi X, Liu H, Wei K, *et al*. A novel remote controlled capsule for site-specific drug delivery in human GI tract[J]. Int J Pharm, 2009, 382(1-2): 160-164.
[13] Wu X D, Hou W S, Peng C L, *et al*. Wearable magnetic locating and tracking system for MEMS medical capsule[J]. Sens Actuators A Phys, 2008, 141(2): 432-439.
[14] 皮喜田, 郑小林, 刘洪英, 等. 用于消化道排空检测缓释片的骨架片芯及其制备工艺: 中国, ZL200510057396.4[P]. 2007-12-12.
[15] 罗学娅, 夏炳南. 苦参碱的代谢动力学研究[J]. 贵阳医学院学报, 1991, 16(2): 180-183.
[16] 庞志功, 汪宝琪, 王翔. 口服苦参碱的药代动力学研究[J]. 西安医科大学学报, 1998, 19(2): 201-203.
[17] 王平全, 陆国红, 周贤飚, 等, 苦参碱的人体药代动力学[J]. 药学学报, 1994, 29(5): 326-329.
[18] 王毅, 孟根达莱, 郑文艳, 等, 氧化苦参碱注射液的人体药代动力学[J]. 中国临床药理学杂志, 2003, 19(4): 301-302, 305.

(收稿:2009-09-08;修回:2009-12-01)
(编辑 吴培红)

(上接524页)

2 U,日胰岛素总量减少了58.54%,复查GHbA1c为7.7%。复查馒头餐试验,血糖分别为7.9、7.61、9.65、17.20、16.13 mmol/L;胰岛素分别为2.9、2.22、3.35、10.83、9.52 μU/ml;C-肽分别为1.73、1.60、1.84、3.51、4.2 ng/ml。

2 讨论

目前糖尿病已成为继心血管疾病、肿瘤后第三位威胁人类健康的疾病,糖尿病治疗成为目前亟待解决的医疗和社会问题。胰腺及胰岛细胞移植经证实是有效的治疗方法,但由于分离与储存技术难度较大、代价昂贵、供体短缺及免疫排斥反应等问题,限制了其应用[1]。与胚胎干细胞不同,骨髓干细胞具有来源丰富、易于采集、不涉及伦理问题及免疫排斥反应等优点,因此骨髓干细胞移植治疗糖尿病逐渐研究者关注的焦点[2]。无论是体内或体外细胞培养研究均已证实,骨髓干细胞在胰腺微环境或模拟胰腺微环境下均可诱导分化为胰岛素分泌细胞[3]。另一方面,植入胰腺局部的骨髓干细胞可刺激周围胰岛细胞的自我修复,Hess等[4]提出植入胰腺的骨髓干细胞除了直接分化为胰岛素分泌细胞,还能分化成血管内皮细胞遍布于胰岛周围,分泌一些与生长及分化有关的因子,诱导了胰腺血管新生,为胰岛细胞提供了复制信息,促进胰岛细胞自我复制,产生新的β细胞。此外,由于骨髓干细胞中的间充质干细胞不表达或低表达HLA-2抗原,并且缺乏共刺激分子表达,使其具有免疫调控特性,大量实验证实了骨髓干细胞在治疗Ⅰ型糖尿病中的免疫调节机制[5]。

目前,自体骨髓干细胞移植治疗糖尿病在国内外均有报道。巴西圣保罗大学以该法治疗15例1型糖尿病患者,结果14例停用胰岛素,虽然其中2例在1年后恢复胰岛素治疗,但胰岛素用量仍显著降低[6]。国内目前也有数家综合性医院开展,均取得较理想疗效。我科在西南地区首家采用自体骨髓干细胞胰腺定向移植治疗糖尿病,该患者为接受该方法治疗的第1例,其术后3个月内胰岛素剂量大幅度减少了58.54%,有望完全停用胰岛素。

参考文献:

[1] Sa J R, Gonzalez A M, Melaragno C S, *et al*. Pancreas and islet transplantation in patients with diabetes mellitus[J]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2008, 52(2): 355-366.
[2] Vija L, Farge D, Gautier J F, *et al*. Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes[J]. Diabetes Metab, 2009, 35(2): 85-93.
[3] Tang D Q, Cao L Z, Burkhardt B R, *et al*. *In vivo* and *in vitro* characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow[J]. Diabetes, 2004, 53(7): 1721-1732.
[4] Hess D, Li L, Martin M, *et al*. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(7): 763-770.
[5] Abdi R, Fiorina P, Adra C N, *et al*. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes[J]. Diabetes, 2008, 57(7): 1759-1767.
[6] Voltarelli J C, Couri C E, Stracieri A B, *et al*. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus J]. JAMA, 2007, 297(14): 1568-1576.

(收稿:2009-09-10;修回:2009-11-05)
(编辑 栾嘉)