

溃结康结肠靶向微丸中黄芩苷在大鼠体内血药浓度测定

张亚军¹, 郑杭生², 李江英³, 徐莲英²

(1 西北大学生命科学学院, 西安 710069, 2 上海中医药大学, 上海 201203 3 西安市中医医院, 西安 710001)

摘要 目的: 建立大鼠血浆中黄芩苷浓度测定方法, 并考察溃结康结肠靶向微丸的靶向性能。方法: 采用乙腈沉淀蛋白进行血浆预处理, 以 HPLC 法测定给药后大鼠血浆中黄芩苷的浓度。色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm), 流动相为甲醇-乙腈-水-磷酸 (20: 20: 60: 0.15), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长: 280 nm, 柱温, 25 °C。比较溃结康结肠靶向微丸组和普通微丸组大鼠中黄芩苷血药浓度曲线的差异。结果: 黄芩苷在 0.104~8.346 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r = 0.9972$), 绝对回收率为 74.3%~84.7%, 相对回收率为 88.9%~97.6%, 日内和日间精密度 RSD 均小于 15%。普通微丸组大鼠中黄芩苷血药浓度曲线存在双峰, t_{max1} 和 t_{max2} 分别为 (20.0 ± 7.0) min 和 (6.4 ± 0.9) h; 靶向微丸组血药浓度曲线为单峰, 给药后 3 h 内未检测到黄芩苷。结论: 本法可以准确、灵敏地测定大鼠血浆中黄芩苷的浓度。溃结康结肠靶向微丸中黄芩苷有明显的释放迟滞, 初步验证了制剂的靶向释药性能。

关键词: 溃结康结肠靶向微丸; 黄芩苷; 大鼠; 血浆; 靶向性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0062-04

Determination of baicalin from Kuijiekang colon targeting pellets in rat plasma

ZHANG Ya-jun¹, ZHENG Hang-sheng², LI Jiang-ying³, XU Lian-ying²

(1 Northwest University, Xi'an 710069, China 2 Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Shanghai 201203 China

3 Xi'an Hospital of Traditional Chinese Medicine Xi'an 710001, China)

Abstract Objective To establish a method for the determination of baicalin in rat plasma and evaluate targeting characteristic of Kuijiekang colon targeting pellets (KCP). **Methods** Protein precipitation method with acetonitrile was applied to purify plasma samples before analysis. The content of baicalin in rat plasma was detected by HPLC. The separation and determination was achieved on a Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm). The mobile phase consisted of methanol, acetonitrile, water and phosphoric acid solution (20: 20: 60: 0.15). The flow rate was 1 mL · min⁻¹ and the column temperature was 25 °C. The detection wavelength was 280 nm. **Results** The standard curve was linear over the range of 0.104~8.346 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9972$); The absolute recovery was 74.3% to 84.7%, and the assay recovery was 88.9% to 97.6%; The intra- and inter-day precision RSDs were less than 15%. The exist double peaks were demonstrated in concentration-time curves of baicalin after ig Kuijiekang conventional pellets, t_{max1} and t_{max2} were (20.0 ± 7.0) min and (6.4 ± 0.9) h respectively. For KCP, concentration-time curves of baicalin had one peak, and no baicalin was detected in the plasma for 3 h after oral administration. **Conclusions** The method is accurate and sensitive for the determination of baicalin in rat plasma. The concentration-time curves of baicalin indicated that release of KCP have obvious lag time, comparing with that of conventional pellets. It is evident that KCP provides colon targeting delivery.

Key words Kuijiekang colon targeting pellets; baicalin; rat plasma; targeting property

溃结康结肠靶向微丸 (KCP) 是用于治疗溃疡性结肠炎的口服结肠靶向制剂。处方由黄芩、白芍和甘草组成, 经提取纯化得到有效组分, 与辅料微晶纤

维素、交联聚维酮等混合, 采用挤出滚圆法制成素丸, 外包衣膜 Eudragit S 制备而成。其中, 黄芩苷为主要有效成分, 也是含量最高的药物成分。在体考

察黄芩苷的血药浓度经时变化规律, 是本制剂开发研究的重要内容。

结肠靶向给药制剂与常规的药物制剂不同, 不是吸收进入循环系统后发挥作用, 而是在结肠腔内通过与粘膜接触局部产生作用, 理想的结肠靶向口服制剂应该在体内吸收很少^[1]。因此, 可以通过测定制剂中药物的血药浓度, 探知制剂的体内吸收情况, 从而评价制剂的质量^[2]。本文进行血药浓度测定研究, 一方面揭示靶向药物的体内药动学过程, 反映 KCP 中黄芩苷在机体的吸收和代谢特点, 这也是靶向给药制剂必不可少的研究内容; 另一方面可以通过普通制剂与靶向制剂血药浓度-时间曲线对比, 评价 KCP 的靶向性能。

1 材料

1.1 仪器 HPLC 系统: 天美 LC-2130 输液泵, 天美 LC-2030 紫外检测器; TGL-16B 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); FA1004N 电子天平 (上海医科大学仪器厂); XW 80-2 涡旋混合器 (上海医科大学仪器厂)。

1.2 药品与试剂 溃结康靶向微丸 (上海中医药大学制备, 规格: 含黄芩苷 $0.18 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$); 溃结康普通微丸 (上海中医药大学制备, 规格: 含黄芩苷 $0.20 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$); 黄芩苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110715-200514); 肝素注射剂 (河北常山生化药业有限公司, 规格: 每支 2 mL: 1.25 万 IU); 磷酸二氢钾 (国药集团化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其他化学试剂均为分析纯。

1.3 动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠 10 只, 体重 (250 ± 20) g 由中国科学院上海实验动物中心提供, 合格证: 中科动管 003 号。

2 色谱条件

色谱柱: Kromasil C_{18} 柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5.0 \mu\text{m}$); 流动相: 甲醇-乙腈-水-磷酸 ($20:20:60:0.15$); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 280 nm ; 柱温: 25°C 。进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

3 血浆样品采集及处理

大鼠禁食不禁水 12 h 后, 插管灌胃 (ig) 分别给予 KCP 和溃结康普通微丸 111, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于黄芩苷 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 给药溶媒为水。普通微丸组大鼠分别于给药前和给药后 0.167, 0.333, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18 h 于眼底静脉丛取血 0.3 mL, KCP 组大鼠分别于给药前和给药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20 h 于眼底静脉丛取血

0.3 mL, 置肝素处理的 Eppendorf 管中, $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 分离血浆, 取 0.1 mL, 置 -20°C 冰箱保存。用前融化, 加入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾溶液 $50 \mu\text{L}$, 涡旋混匀; 加入乙腈 $150 \mu\text{L}$ 涡旋 2 min, 2 次离心 ($12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 取上清 $20 \mu\text{L}$ 进样分析。

4 方法专属性考察

取空白血浆, 给药 8 h 后血浆各 0.1 mL; 另取 1 份空白血浆, 加入“5.1”项下黄芩苷对照品溶液 $50 \mu\text{L}$, 配制浓度为 $0.522 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品血浆。按“3”项下方法进行处理, 进样, 所得色谱图见图 1。结果表明, 在本实验条件下, 黄芩苷色谱峰峰形好, 柱效高, 血浆中杂质峰和代谢物峰不干扰样品的测定, 基线噪音小, 黄芩苷的出峰时间为 8.99 min, 本方法专属性良好。

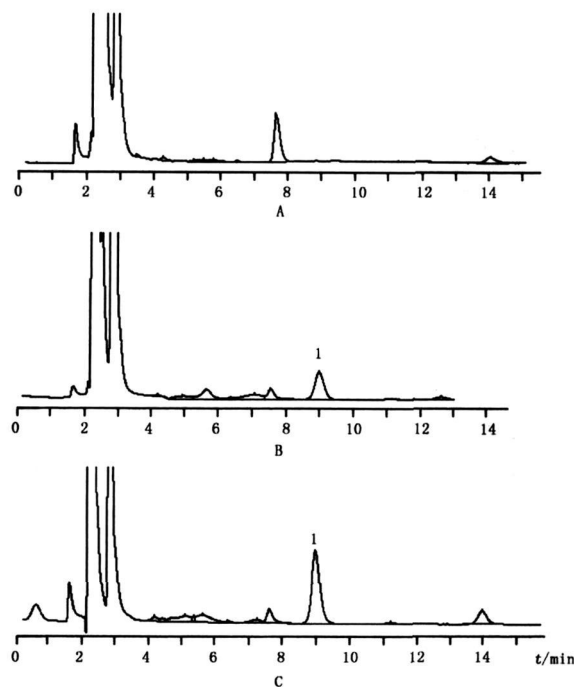


图 1 大鼠空白血浆 (A)、空白血浆加入黄芩苷对照品 (B) 和给药 8 h 后血浆样品 ($1.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of rat blank plasma (A), rat blank plasma spiked with baicalin (B), rat plasma sample ($1.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) of 8 h after ig KCP (C)

1. 黄芩苷 (baicalin)

5 标准曲线

5.1 对照品溶液的配制 精密称取黄芩苷对照品 10.14 mg 用甲醇溶解, 制成 $50.07 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄芩苷对照品储备液。用甲醇稀释储备液, 配成 0.624 , 1.566 , 3.132 , 6.258 , 12.52 , 25.04 , $50.07 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品系列溶液。

5.2 标准曲线的制备 取大鼠空白血浆 0.1 mL, 精密加入不同浓度的对照品溶液 50 μL , 使其分别含黄芩苷: 0.104, 0.261, 0.522, 1.043, 2.087, 4.173, 8.346 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 按“3”项下方法操作, 进样分析。以浓度 (X) 对峰面积 (Y) 作直线回归, 得回归方程:

$$Y = 80.0X - 1.5 \quad r = 0.9972$$

结果表明黄芩苷在 0.104~8.346 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性良好。

6 回收率与精密度试验

取空白血浆 0.1 mL, 分别加入浓度为 0.696

表 1 黄芩苷的绝对回收率、相对回收率和精密度

Tab 1 Absolute recovery assay recovery and assay precision of baicalin

理论浓度 (theoretical concentration) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	绝对回收率 (absolute recovery, $n=5$)		相对回收率 (assay recovery, $n=5$)		精密度 (precision), RSD /%	
	平均值 (mean) /%	RSD /%	平均值 (mean) /%	RSD /%	日内 (intra-day, $n=5$)	日间 (inter-day, $n=3$)
0.116	74.3	6.5	88.9	7.9	12.3	10.7
1.116	78.4	6.2	86.0	4.6	5.5	7.4
5.8	87.7	4.1	97.6	3.2	6.2	8.6

7 定量限和检测限

按信噪比 $S/N=3$ 确定黄芩苷的检测限为 9.8 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 按 $S/N=10$ 确定其定量限为 53.1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

8 稳定性考察

将黄芩苷对照品储备液置冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放, 加入黄芩苷对照品的大鼠血浆置冰箱 -20 $^{\circ}\text{C}$ 和室温分别存放, 定期取样测定, 以考察药物的稳定性。结果对照品储备液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 7 d 稳定; 血浆样品在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 15 d 基本稳定, 在室温下放置 12 h 基本稳定。另将低、中、高 3 个浓度 (0.116, 1.116, 5.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的对照品血浆各 3 份, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 24 h, 取出待完全融化后, 按“3”项下方法处理并进样分析, 反复冻融 3 次, 与未冻融前相比求得浓度的偏差分别为 4.8%, 4.0%, 3.3%, 表明血样反复冻融不影响其稳定性^[3]。

9 大鼠 ig 溃结康普通微丸和 KCP 后黄芩苷血药浓度测定

10 只 Wistar 大鼠, 5 只灌胃给予普通微丸, 5 只给予 KCP, 取血, 按“3”项下方法处理, 进样分析。二者的黄芩苷血药浓度-时间曲线见图 2。用矩量法求得黄芩苷药动学参数。结果表明, 大鼠 ig 普通微丸后, 黄芩苷的体内过程有明显的双峰现象, $t_{\text{max}1}$ 为 (20.0 $\pm$ 7.0) min, $t_{\text{max}2}$ 为 (6.4 $\pm$ 0.9) h, AUC_{0-1} 为 (12.9 $\pm$ 1.7) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为 (14.6 $\pm$ 1.4) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; 而大鼠 ig KCP 后黄芩苷的体内过程为单峰, t_{max} 为 (9.6 $\pm$

6.96 $\pm$ 34.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 黄芩苷对照品溶液 50 μL , 制备黄芩苷的质控 (QC) 样品, 用随行标准曲线测定 QC 样品浓度, 每个浓度 5 个样本, 连续进行 3 d 计算日内、日间精密度和相对回收率 (见表 1)。另取超纯水 0.1 mL, 加入不同浓度黄芩苷对照品溶液, 使其质量浓度与 QC 样品相同, 按“3”项下操作, 从而求得血浆中黄芩苷绝对回收率 (见表 1)。结果表明, 本方法的回收率与精密度良好, 可以用于黄芩苷的血药浓度测定。

1.6) h, AUC_{0-1} 为 (11.5 $\pm$ 0.8) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 为 (12.3 $\pm$ 0.9) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。KCP 给药 3 h 内血浆中未测到黄芩苷, 表明该制剂在大鼠胃肠道内有明显的释放时滞。

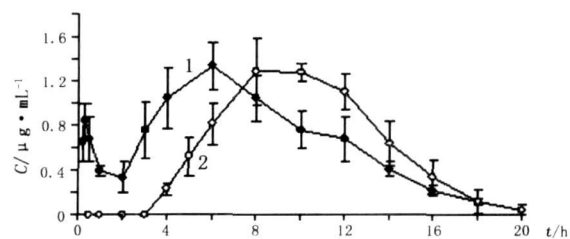


图 2 大鼠给药后黄芩苷血药浓度-时间曲线 (mean $\pm$ SD, $n=5$)

Fig 2 Blood concentration-time curves of baicalin in plasma of rats after ig KCP and Kujiiekang conventional pellets

1. 溃结康普通微丸 (Kujiiekang conventional pellets) 2. KCP

10 讨论

本文建立了 HPLC 法测定血浆中黄芩苷含量的方法, 该法专属性好, 样品处理方法简便, 提取回收率高, 线性关系与准确度良好。文中使用的 Kromasil C_{18} 色谱柱, 曾参考中国药典 2005 年版一部黄芩项下测定黄芩苷的方法, 以甲醇-水-磷酸 (47: 53: 0.2) 为流动相^[4], 对照品溶液进样 10 μL , 峰形很好, 但若进样 20 μL , 则峰形呈现明显的前沿峰。由于血浆中黄芩苷的浓度较低, 较大的进样量有利于实验测定, 故经优化, 以甲醇-乙腈-水-磷酸 (20: 20: 60: 0.15) 为流动相, 取得满意效果。

当大鼠给予溃结康普通微丸后, 黄芩苷的血药浓度-时间曲线出现明显的双峰现象, 在 10~30 min 迅速出现第 1 个峰。当黄芩苷通过胃、十二指肠后吸收减少, 在小肠转运过程中血药浓度又逐渐上升, 到达结肠部位再次呈现吸收高峰, 大概在 6~8 h 出现第 2 个峰, 这与文献^[5]一致。当给予靶向微丸后, 3 h 内未测到黄芩苷, 此后血浆样品中黄芩苷出现, 并且血药浓度逐渐升高, 在 8~10 h 达峰。两者相比较, 靶向微丸表现出明显的释药迟滞, 一定程度上反映了该微丸的结肠靶向释药性能。另一方面, 无论是普通制剂还是靶向制剂, 黄芩苷的生物利用度都较低, AUC 没有体现出制剂的结肠靶向特性。当然, 仅靠血药浓度测定尚不能准确评价制剂的靶向性质, 比如药物在肠道释放的部位等, 有待其

他实验进一步佐证。

参考文献

- 1 Friend DR. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease *Adv Drug Deliv Rev*, 2005, 57(2): 247
- 2 Van den Mooter G. Colon drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2006, 3(1): 111
- 3 ZOU Ji-hong(邹继红), ZHAO Chun-jie(赵春杰), DAI Xue-wei(戴学伟). RP-HPLC determination of indapamide concentration in human plasma(吲哚帕胺血药浓度测定及药动学研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(1): 69
- 4 ChP(中国药典). 2005 Vol II (一部): 211
- 5 Lai MY, Hsiu SL, Tsai SY, et al. Comparison of metabolic pharmacokinetics of baicalin and baicalein in rats *Pharm Pharmacol*, 2003, 55: 205

(本文于 2007 年 11 月 1 日收到)

中检所在京召开《药品标准物质供应管理规范》讨论会

为进一步规范药品标准物质供应工作, 2008 年 12 月 16 日, 我所组织召开了《药品标准物质供应管理规范》讨论会。会议由常务副所长金少鸿主持, 所长助理刘桂芬、标准物质管理处处长马双成以及黑龙江、上海、江苏、江西、广东、四川、陕西等 7 个药检所主管药品标准物质供应工作的领导参加了会议。



金少鸿总结了药品标准物质供应工作的情况, 指出药品标准物质供应是保障全国药品生产、检验、科研的重要环节, 中检所经过内部整顿、资源整合, 建立了标准物质体系, 对进一步规范药品标准物质供应工作起到重要作用。刘桂芬强调了药品标准物质研制、供应工作可持续发展的重要性, 希望各所支持中检所的工作, 齐心协力做好药品标准物质供应工作。马双成介绍了标准物质体系的运行情况和今后的努力方向。

与会代表讨论并原则通过了《药品标准物质供应管理规范》, 并希望该规范能尽早实施。

(中国药品生物制品检定所标准物质管理处供稿)