

克癌素结肠包衣滴丸中姜黄素在家兔体内的药动学研究

张晓燕, 于莹, 刘磊, 董培良

黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 评价克癌素结肠定位包衣滴丸有效成分姜黄素在家兔体内的药动学。方法 6只家兔随机等分成两组: 受试制剂和参比制剂组, 受试制剂组给予克癌素结肠定位包衣滴丸, 参比制剂组给予滴丸丸芯, 两组均按单剂量 ig 给药 120 丸 (每丸含姜黄素 1.5 mg), 于给药后不同时间颈动脉取血。建立血浆中姜黄素检测的高效液相色谱 (HPLC) 法, 并进行方法学验证; 测定各时间点家兔体内姜黄素血药浓度, 绘制药时曲线, DAS 2.1 软件计算主要药动学参数, 根据药动学参数计算受试制剂的相对利用度 (Fr)。结果 建立的 HPLC 法的方法学试验均符合检测要求; 药时曲线显示, 参比制剂丸芯符合双室模型, 无滞后时间, 而受试制剂符合一室模型, 有滞后时间; 药动学参数显示, 与参比制剂比较, 受试制剂的统计矩参数药时曲线下面积 ($AUC_{0-\infty}$) 显著增大、延迟时间 (t_{lag}) 为 5.307 h, 显著延长 ($P < 0.05$), 参比制剂的达峰时间 (t_{max}) 为 3 h, 受试制剂 t_{max} 为 16 h, 两组差异显著 ($P < 0.05$)。受试制剂的 Fr 为 74.0%, 其 C_{max} 为参比制剂的 62.6%, 二者间均不具生物等效性。结论 克癌素结肠定位包衣滴丸具有典型的缓(控)释特征, 姜黄素成分结肠段蓄积, 具有良好的靶向结肠定位效果。

关键词: 克癌素; 包衣滴丸; 结肠靶向; 药动学; 高效液相色谱 (HPLC) 法

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)01-0085-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.015

Study on pharmacokinetics of quercetin of anti-cancer factor on colon coating dropping pills in rabbits

ZHANG Xiaoyan, YU Ying, LIU Lei, DONG Peiliang

Heilongjiang University of Chinese Medicine, Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To evaluate the pharmacokinetics of quercetin of anti-cancer factor on colon-targeting coating dropping pills in rabbit model *in vivo*. **Methods** Totally six rabbits were randomly divided into two groups: test preparation group and reference preparation group. Rabbits in test preparation group were ig administered with anti-cancer factor colon-targeting coating dropping pills, and rabbits in reference preparation group were ig administered with core of dropping pills, each group with a single dose of 120 pills (1.5 mg curcumin per pill). Blood was taken from the carotid artery at different time after administration. A high performance liquid chromatography (HPLC) method was established for detection of curcumin in plasma for further verification of methodology. The blood concentration of curcumin at different time points was determined, and the time curve was drawn. The main pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.1 software, and the relative availability (Fr) of the test preparations was calculated according to the pharmacokinetic parameters. **Results** The established HPLC method meets the detection requirements. The drug time curve showed that the reference preparation conformed to the double chamber model and had no lag time, but the test preparation conformed to the one room model and had the lag time. The pharmacokinetic parameters showed that, compared with reference preparation, the area under the curve ($AUC_{0-\infty}$) of test preparation increased significantly ($P < 0.05$), and the delay time (T_{lag}) prolonged significantly ($P < 0.05$), which was 5.307 h. Moreover, there was a significance difference between the time to peak (T_{max}) of reference preparation and test preparation ($P < 0.05$), which is 3 h and 16 h respectively. The Fr of test preparation was 74%, and its C_{max} was 62.6% of that of reference preparation, and no bioequivalence was found between the two. **Conclusion** Anti-cancer factor on colon-targeting coating dropping pills possess typical slow and controlled releasing characteristic. The

收稿日期: 2017-07-21

基金项目: 黑龙江中医药大学博士创新基金项目 (B201006); 黑龙江中医药大学优秀青年教师科技创新人才支持计划 (051241)

第一作者: 张晓燕, 女, 副研究员, 中药学博士, 主要从事中药药效物质基础及新型给药系统开发研究。Tel: (0451)87267072 E-mail:

12zhangxiaoyan@163.com

accumulation of curcumin in the colon segment has good colon-targeting effect. Thereby improving the efficacy, reduce toxicity, with a good targeting colon positioning effect.

Key words: anti-cancer factor; coating dropping pills; colon-targeting; pharmacokinetics; high performance liquid chromatography (HPLC) method

克癌素结肠定位包衣滴丸是以姜黄中的姜黄素、槐米中的槲皮素为原料药, 根据 pH 敏感-时间控释双重机理制备的新型中药结肠靶向给药系统^[1], 提高结肠病变部位药物浓度, 有利于结肠癌的治疗^[2-3]。本文主要对克癌素结肠定位包衣滴丸在生物体内的释药特征作出评价, 通过受试制剂和参比制剂在药时曲线上的差异来间接反映 pH 依赖-时间控释型结肠定位包衣滴丸的结肠定位效率。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

受试制剂: 克癌素结肠定位包衣滴丸, 自制, 制备方法见参考文献^[1], 规格 55 mg/丸; 参比制剂: 滴丸丸芯, 自制, 制备方法见参考文献^[2], 规格 42 mg/丸; 两种制剂均每丸含姜黄素 1.5 mg、槲皮素 4.4 mg。姜黄素对照品 (批号 110823-200603, 质量分数 98.8%, 供含量测定用)、槲皮素对照品 (批号 100081-200406, 质量分数 99.0%, 供含量测定用), 均由中国食品药品检定研究院提供; 乌拉坦, 又名氨基甲酸乙酯 (上海山浦化工有限公司); 甲醇、高氯酸、三乙胺、磷酸、磷酸二氢钾均为分析纯, 南京化学试剂厂生产; 甲醇 (DikmaPure, 色谱醇)。

1.2 实验动物

新西兰大耳白兔, 6 只, 雌雄各半, 体质量 2.5~3.2 kg, 由黑龙江中医药大学 GLP 实验动物中心提供, 动物生产许可证号 SCXK (黑) 2013-004。

1.3 主要仪器

Waters2695 型高效液相色谱仪 (上海大龙医疗设备有限公司); Waters 2998 型二极管阵列检测器 (PDA)、AG-135 型电子分析天平 (瑞士 METTLER-TOLEPO 公司); EmpowerTM 色谱工作站数据处理系统; KQ-300VDE 型双频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); KDC-160HR 高速冷冻离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司); Spectrum 756pc 型紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); XW-80A 漩涡混合器 (江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

2 方法与结果

2.1 动物分组给药及采血

将 6 只家兔随机等分成两组: 受试制剂和参比制剂组, 每组 3 只, 两组均按单剂量给药 120 丸。

受试家兔给药前禁食 12 h, 自由饮水。按照给药方案设计, 次日清晨分别单次 ig 受试制剂和参比制剂, 服药时用约 50 mL 水送服。给药后按照所需采样时间颈动脉取血 2.5 mL, 方便而准确。受试制剂组: 给药后在 0、1.0、3.0、5.0、5.5、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、11.5、12.0、14.0、16.0、18.0、20.0、22.0、24.0 h 采血。参比制剂组: 给药后在 0、0.25、0.50、0.75、1.00、3.00、3.50、4.00、5.00、7.00、8.00、9.00、10.00、12.00 h 采血。

2.2 血浆样品处理

所采血样置于肝素钠处理过的负压玻璃管中, 胶塞密封, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血浆, 移取血浆约 1.0 至 1.5 mL 离心管中, 标注试验号及采血时间, 用 4.0 μg/mL 高氯酸沉淀血浆样品中蛋白, 离心后取上清, 浓缩蒸干, 加甲醇溶解定容, 经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤。

2.3 标准溶液的制备

精密称取姜黄素对照品 2.00 mg, 置于 100 mL 的量瓶中, 加甲醇溶解定容至刻度, 作为贮备液 (20 μg/mL)。精密吸取姜黄素贮备液 1 mL, 以甲醇定量稀释配成 2.0 μg/mL 的姜黄素标准溶液, 置于 4 °C 冰箱中避光冷藏备用。

2.4 姜黄素含量分析方法的建立

2.4.1 高效液相色谱 (HPLC) 条件 大连 Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm×200 mm, 5 μm), 填充剂为十八烷基硅烷键合硅胶; 流动相为乙腈: 4%冰醋酸 (48: 52); 柱温为室温; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 430 nm; 进样量 25.0 μL。

2.4.2 检测方法的专属性考察 空白血浆 80 μL、空白血浆加入姜黄素对照品、受试制剂组给药后 16 h 血样, 按“2.2”项下方法进行处理; 取姜黄素标准溶液; HPLC 测定分析。

如图 1 所示, 姜黄素的保留时间均为 16 min, 样品中姜黄素呈正态分布, 分离度良好, 达到了基

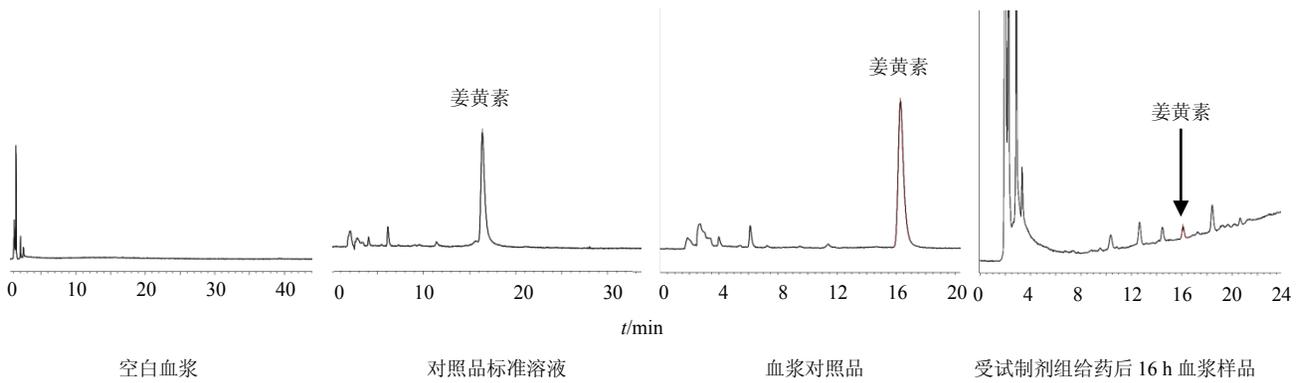


图 1 方法专属性色谱图

Fig. 1 Specificity of chromatogram for test method

线分离, 没有内源性物质干扰待测物姜黄素的测定。说明检测方法具有良好的专属性。

2.4.3 标准曲线的制备 空白血浆中加入姜黄素对照品, 涡旋混合 1 min, 配制成姜黄素质量浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆标准品溶液, 按“2.2”项下方法处理后, 进样测试, 以血药浓度为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标进行线性回归, 得标准曲线, 回归方程为 $Y=502\ 237X+0.312\ 6$, 相关系数 $r=0.999\ 87$, 表明姜黄素在 0.2~4.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。信噪比 1:3 时, 定量下限浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4.4 加样回收率

(1) 相对回收率

取含质量浓度为 2.0、4.0、8.0 $\mu\text{g/mL}$ 的姜黄素血浆溶液, 按“2.2”项方法处理后, 平行操作 5 次,

HPLC 法测试进样分析, 通过当日标准曲线方程计算出姜黄素浓度, 测定浓度与加入浓度比值为相对回收率, 结果见表 1, 相对回收率均在 80% 以上, 符合检测要求。

(2) 绝对回收率

取(1)中姜黄素血浆样品, 将 HPLC 测定峰面积与同等浓度的姜黄素对照品直接进样分析测得的峰面积相比, 比值为绝对回收率, 绝对回收率均在 75% 以上, 符合检测要求, 结果见表 1。

2.4.5 日内、日间精密度试验 取“2.4.4”项(1)中姜黄素血浆样品, 按“2.2”项下方法进行处理, 1 日内重复 5 次进样分析、同一批样品溶液连续测定 5 d, 计算日内、日间精密度, RSD 值在 5% 以下, 说明精密度良好, 符合检测要求, 结果见表 1。

表 1 回收率及精密度数据表 (n = 5)

Table 1 Recovery and precision data sheet (n = 5)

| 姜黄素质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | 相对回收率/% | 绝对回收率/% | 精密度 RSD% | |
|---|----------|----------|----------|------|
| | | | 日内 | 日间 |
| 2.0 | 85.8±1.9 | 78.3±3.4 | 3.26 | 4.98 |
| 4.0 | 86.2±1.5 | 78.7±2.3 | 2.33 | 3.46 |
| 8.0 | 86.9±2.6 | 76.1±2.7 | 2.67 | 2.73 |

2.4.6 稳定性试验 取姜黄素血浆样品, 在 48 h 之内的不同时间点进样分析, 姜黄素峰面积的 RSD 值为 3.89%, 表明在 48 h 内血浆样品是稳定的。

2.5 受试制剂与参比制剂的药时曲线

参比制剂丸芯符合双室模型, 无滞后时间, 而受试制剂符合一室模型, 有滞后时间。家兔单剂量

ig 未包衣丸芯的姜黄素血药质量浓度显示, 药物不经历体内时滞, 而且血药质量浓度上升很快, 3 h 就达到了最高血药浓度水平。而当家兔单剂量 ig 等量的结肠定位包衣滴丸后, 药物的体内时滞约 5 h, 明显延长, 同样达峰时间也有显著性延迟, 为 16 h, 表明两种制剂在家兔体内药动学行为具有极为显著性差异。结果见图 2。

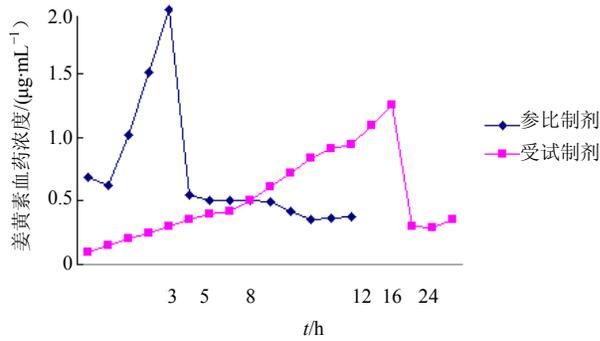


图2 受试制剂与参比制剂的药时曲线图

Fig. 2 Drug time curve of test preparation and reference preparation

2.6 药动学参数

根据6只家兔分别口服克癌素结肠定位包衣滴丸和未包衣丸芯后的血药浓度数据,采用DAS 2.1软件计算主要药动学参数。体内延迟时间(*in vivo* t_{lag}),峰浓度(C_{max})和达峰时间(t_{max})由实测值计算,药时曲线下面积(AUC)采用线性梯形面积法求算。各药动学参数经配对 *t* 检验进行统计学分析(SPSS 17.0 软件),结果见表2、3。

以上结果可以看出,与参比制剂比较,受试制剂的药时曲线下面积($AUC_{0-\infty}$)显著增大、 t_{lag} 显著延长,差异具有统计学意义($P < 0.05$);两制剂 t_{max}

表2 受试制剂和参比制剂药动学参数

Table 2 Test preparation and reference preparation pharmacokinetic parameter

| | | 受试制剂 | | | | 参比制剂 | | | | | |
|------------------|--------------------------------|---------|-------------------|---------------------------|---------|------------------|--------------------------------|----------|-------------------|---------------------------|---------|
| 房室参数 | 单位 | 参数值 | 统计矩参数 | 单位 | 参数值 | 房室参数 | 单位 | 参数值 | 统计矩参数 | 单位 | 参数值 |
| $t_{1/2}$ | h | 12.382 | AUC_{0-t} | $mg \cdot L^{-1} \cdot h$ | 17.426 | $t_{1/2\alpha}$ | h | 2.165 | AUC_{0-t} | $mg \cdot L^{-1} \cdot h$ | 6.159 |
| K_e | h^{-1} | 0.056 | $AUC_{0-\infty}$ | $mg \cdot L^{-1} \cdot h$ | 17.903 | $t_{1/2\beta}$ | h | 140 | $AUC_{0-\infty}$ | $mg \cdot L^{-1} \cdot h$ | 9.241 |
| V_1/F | $L \cdot kg^{-1}$ | 158.114 | $AUMC_{0-t}$ | | 228.852 | V_1/F | $L \cdot kg^{-1}$ | 2962.685 | $AUMC_{0-t}$ | | 32.913 |
| CL/F | $L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ | 8.851 | $AUMC_{0-\infty}$ | | 241.861 | CL/F | $L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ | 343.229 | $AUMC_{0-\infty}$ | | 104.938 |
| AUC_{0-t} | $mg \cdot L^{-1} \cdot h$ | 6.485 | MRT_{0-t} | h | 13.133 | AUC_{0-t} | $mg \cdot L^{-1} \cdot h$ | 11.682 | MRT_{0-t} | h | 5.344 |
| $AUC_{0-\infty}$ | $mg \cdot L^{-1} \cdot h$ | 10.197 | $MRT_{0-\infty}$ | h | 13.51 | $AUC_{0-\infty}$ | $mg \cdot L^{-1} \cdot h$ | 13.784 | $MRT_{0-\infty}$ | h | 11.356 |
| K_a | h^{-1} | 3.427 | VRT_{0-t} | h^2 | 21.526 | K_{10} | h^{-1} | 0.116 | VRT_{0-t} | h^2 | 10.812 |
| $t_{1/2Ka}$ | h | 0.202 | $VRT_{0-\infty}$ | h^2 | 26.414 | K_{12} | h^{-1} | 0.136 | $VRT_{0-\infty}$ | h^2 | 122.54 |
| t_{lag} | h | 5.307 | Zeta | h^{-1} | 0.307 | K_{21} | h^{-1} | 0.068 | Zeta | h^{-1} | 0.088 |
| $t_{1/2z}$ | h | 2.26 | Zeta 回归尾点 | | 245 | K_a | h^{-1} | 0.379 | Zeta 回归尾点 | | 245 |
| V_z/F | $L \cdot kg^{-1}$ | 22.226 | C_z (尾点回归值) | $mg \cdot L^{-1}$ | 0.146 | $t_{1/2Ka}$ | h | 1.827 | C_z (尾点回归值) | $mg \cdot L^{-1}$ | 0.271 |
| CL_z/F | $L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$ | 6.815 | t_{max} | h | 16 | t_{lag} | h | 0 | $t_{1/2z}$ | h | 7.879 |
| | | | C_{max} | $mg \cdot L^{-1}$ | 1.2499 | V_z/F | $L \cdot kg^{-1}$ | 4 | t_{max} | h | 3 |
| | | | | | | | | 306.245 | | | |

表3 受试制剂与参比制剂主要药动学参数比较

Table 3 Comparison of main pharmacokinetic parameters of test preparation and reference preparation

| 药动学参数 | 单位 | 参比制剂 | 受试制剂 |
|------------------|---------------------------|--------|---------|
| $AUC_{0-\infty}$ | $mg \cdot L^{-1} \cdot h$ | 9.241 | 17.903* |
| t_{lag} | h | 0 | 5.307* |
| t_{max} | h | 3 | 16** |
| C_{max} | $mg \cdot L^{-1}$ | 1.9965 | 1.2499 |

比较,具有极显著差异($P < 0.01$),参比制剂的 t_{max} 为 3 h,而受试制剂释放时滞明显延迟, t_{max} 为 16 h。5 h 后包衣滴丸很可能已在回肠末端或进入结肠,说明 pH 敏感-时间控释包衣滴丸的结肠定位功能可以有效地将药物输送到结肠部位,并恒速释放药物。

2.7 受试制剂与参比制剂的相对生物利用度研究

$$F_r = AUC_{0-\infty (T)} / AUC_{0-\infty (R)}$$

F_r 为相对生物利用度; $AUC_{0-\infty (T)}$ 、 $AUC_{0-\infty (R)}$ 分别为受试制剂和参比制剂的房室参数 $AUC_{0-\infty}$ 。

计算结肠定位包衣滴丸的 AUC 仅为普通滴丸的 74.0% (Fr), 其 C_{\max} 仅为丸芯的 62.6%; 表明姜黄素成分在结肠部位吸收进入血液循环的程度很小, 大部分在结肠段高度浓集, 显示出理想的结肠定位能力, 有利于结肠局部病变部位及结肠癌的治疗^[4]。

3 讨论

参比制剂丸芯的血药浓度数据符合双室模型, 无滞后时间, 权重系数为 1; 而受试制剂符合一室模型, 有滞后时间, 权重系数为 $1/C^2$, 二者进行拟合结果较好。

家兔单剂量口服参比制剂姜黄素血药浓度数据显示, 药物血药浓度上升很快, 不经历体内时滞, (t_{\max} , 3 h) 就达到了最高血药浓度水平; 而家兔单剂量口服等量的受试制剂后, 达峰时间 (t_{\max} , 16 h) 也有显著性延迟, 药物的体内时滞 (t_{lag} , 5.307 h)

明显延长, 这与体外时滞 5 h 后开始释放药物相比略有延迟。表明两种制剂在家兔体内药动学行为具有极为显著性差异。制备的结肠定位滴丸具有典型的缓(控)释特征, 姜黄素成分结肠段蓄积, 有利于结肠局部病变、结肠癌的治疗, 这为今后开展和研究中药结肠靶向给药系统具有指导意义。

参考文献

- [1] 徐惠南. 缓释包衣与小丸成型技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998.
- [2] 孟德胜, 汪仕良. 槲皮素的抗癌作用 [J]. 中草药, 2001, 32(2): 186-188.
- [3] 于冬青, 邓华聪. 姜黄素的药理作用研究进展 [J]. 山东医药, 2005, 45(2): 72-73.
- [4] 张晓燕, 徐增荣, 胡红伟, 等. 结肠靶向定位滴丸克癌素抗肿瘤作用研究 [J]. 中国医药导刊, 2010, 12(3): 459-460.