

# 黄连生物碱在正常和慢性内脏高敏感肠易激综合征大鼠体内的药代动力学研究

巩仔鹏<sup>1,2,4,5</sup>, 陈颖<sup>2</sup>, 张瑞杰<sup>2</sup>, 董宇<sup>3</sup>, 王娅杰<sup>2</sup>, 李玉洁<sup>2</sup>,  
杨庆<sup>2</sup>, 翁小刚<sup>2</sup>, 李琦<sup>2</sup>, 强伟杰<sup>2</sup>, 朱晓新<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004; <sup>2</sup>中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;

<sup>3</sup>中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; <sup>4</sup>贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心;

<sup>5</sup>国家苗药工程研究中心, 贵阳 550004

**摘要:**本研究旨在比较黄连生物碱(小檗碱和巴马汀)在正常和慢性内脏高敏感肠易激综合征(Chronic Visceral Hypersensitivity Irritable Bowel Syndrome rats, CVH-IBS)大鼠体内的药代动力学行为特征。首先采用乳鼠结肠 PTCA 球囊刺激的方法建立 CVH-IBS 大鼠模型。待模型成功后, 分别研究灌胃给予黄连提取物(96 mg/kg, 分别相当于小檗碱 22 mg/kg 和巴马汀 5.3 mg/kg)后黄连生物碱(小檗碱和巴马汀)在正常大鼠和 CVH-IBS 模型大鼠体内的药代动力学行为特征。采用已建立的 UPLC-MS/MS 法测定大鼠血浆中小檗碱和巴马汀的含量, 并采用 WinNonlin 软件计算其主要的药代参数, 比较小檗碱和巴马汀在正常大鼠和 CVH-IBS 模型大鼠体内的药代动力学差异。结果发现灌胃黄连提取物后, 小檗碱在 CVH-IBS 大鼠体内的  $T_{1/2}$ 、 $T_{max}$  和  $AUC_{0-t}$  显著增加,  $V_d/F$  和  $Cl/F$  显著降低, 而巴马汀的药代参数未见显著差异。该研究结果提示 CVH-IBS 的病理状态能够显著改变小檗碱的药代动力学特征, 而对巴马汀的药代动力学行为无明显影响, 其具体的原因有待进一步研究。

**关键词:** 黄连生物碱; 小檗碱; 巴马汀; 药代动力学; 肠易激综合征

中图分类号: R284.1; Q946.91

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.S.008

## Comparative pharmacokinetics of Rhizoma Coptidis alkaloids between Normal and Chronic Visceral Hypersensitivity Irritable Bowel Syndrome rats

GONG Zi-peng<sup>1,2,4,5</sup>, CHEN Ying<sup>2</sup>, ZHANG Rui-jie<sup>2</sup>, DONG Yu<sup>3</sup>, WANG Ya-jie<sup>2</sup>, LI Yu-jie<sup>2</sup>,  
YANG Qing<sup>2</sup>, WENG Xiao-gang<sup>2</sup>, LI Qi<sup>2</sup>, QIANG Wei-jie<sup>2</sup>, ZHU Xiao-xin<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

<sup>2</sup>Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

<sup>3</sup>Guang'an men hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;

<sup>4</sup>Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University; <sup>5</sup>National Engineering Research Center of Miao's Medicines, Guiyang 550004, China

**Abstract:** The aim of this study was to compare the pharmacokinetic characteristics of berberine and palmatine in normal and chronic visceral hypersensitivity irritable bowel syndrome (CVH-IBS) rats. Firstly, CVH-IBS rat model was established by PTCA balloon stimulation. After the success of the model, Rhizoma Coptidis extract (96 mg/kg, respectively, the equivalent of berberine 22 mg/kg and palmatine 5.3 mg/kg) after Coptis alkaloids (berberine and palmatine) in the Pharmacokinetic behavior of normal rats and CVH-IBS rats. The contents of berberine and palmatine in rat plasma were determined by established UPLC-MS/MS method. WinNonlin software was used to calculate the main pharmacokinetic parameters. PK parameters of berberine and palmatine were compared between normal rats and CVH-IBS models. The results showed that the contents of  $T_{1/2}$ ,  $T_{max}$  and  $AUC_{0-t}$  of berberine in CVH-IBS rats were significantly increased and  $V_d/F$  and  $Cl/F$  decreased significantly after administration of Rhizoma Coptidis extract. The pharmacokinetic

parameters of palmatine had no significant difference. The results suggest that CVH-IBS can significantly alter the pharmacokinetic properties of berberine, but not the pharmacokinetic properties of palmatine, and its specific reason remains

收稿日期: 2017-08-07 接收日期: 2017-11-20

基金项目: 国家自然科学基金(30930114, 81403171, 81001684; 81573649); 中国中医科学院自主选题项目(ZZ20090101)

\* 通信作者 Tel: 86-10-64056154; Email: zhuxx@icmm.ac.cn

to be further studied.

**Key words:** Rhizoma Coptidis alkaloids; Berberine; palmatine; pharmacokinetics; irritable bowel syndrome

肠易激综合征 (Irritable Bowel Syndrome, IBS) 是一种在消化科中最常见的肠道功能紊乱的疾病,其临床特点主要表现为腹痛或腹部不适、大便习惯和(或)大便性状的改变,而且无特异性的生化或组织病理学异常<sup>[1-5]</sup>。由于该病发病率相当高,每年耗费大量的医药资源,而且发病原因及发病机制尚不明确,治疗仅限于对症,效果欠佳,因此,严重影响广大群众的工作和生活,寻找治疗 IBS 的药物成为目前研究的热点。

黄连来源于为毛茛科植物黄连 (*Coptis chinensis* Franch.) 的干燥根茎,收载于中华人民共和国 2015 版的药典之中。研究表明,黄连单用或与其他药物合用在治疗 IBS 的临床疗效显著<sup>[6]</sup>。众所周知,药物是用于治疗疾病,而病人是药物的最终消费者,因此,研究疾病状态下的中药药代动力学较正常机体更重要,且与临床更相关。尽管 IBS 的发病机制尚不清楚,临床发现其主要病理特征是结肠运动障碍和慢性内脏高敏感。在前期的研究中,我们发现黄连生物碱的药代动力学行为能够被以结肠运动障碍为主要特征的炎症后肠易激综合征的病理状态所改变<sup>[7]</sup>,而其是否也能够被以慢性内脏高敏感为主要特征的 CVH-IBS 所改变,目前仍不清楚。因此,本研究旨在比较黄连生物碱(小檗碱和巴马汀)在正常大鼠和 CVH-IBS 大鼠体内的药代动力学行为特征是否具有差异,为黄连用于 CVH-IBS 的治疗,提供一定的理论依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Waters Xevo TQ 型超高效液相色谱-质谱联用仪 (Waters Xevo TQ MS-Acquity UPLC System, Masslynx V4.1 工作站), 美国 Waters 公司; MSU225S-000-DU 型十万分之一电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; VX-III 型多管涡旋振荡器, 北京踏锦科技有限公司; NA-5L 型氮空一体机, 北京中兴汇利科技发展有限公司; 微量移液器, 德国 Eppendorf 公司; Centrifuge 5424R 型低温高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; Milli-Q Advantage A10 超纯水仪, 美国 Millipore 公司; 动脉成形术 (PTCA) 球囊, CorDis, 球囊规格 (3.0 × 20); 8F 导尿管, 北京万东库利艾特医用制品有限

公司; 大鼠固定器, 北京华美有机玻璃厂定做。

### 1.2 材料

盐酸小檗碱 (批号 110713-201212, 纯度 86.7%)、盐酸巴马汀 (批号 110732-201108, 纯度 86.7%) 以及盐酸苯海拉明 (批号 100066-200807, 纯度 99.9%) 均购自中国食品药品检定研究院。乙腈、甲醇、甲酸购自美国 Fisher 公司, 色谱纯; 超纯水经 Milli-Q 系统纯化制备。黄连饮片, 为毛茛科植物黄连 (*Coptischinensis* Franch.) 的干燥根茎, 产地四川, 由中国中医科学院中药研究所郝近大研究员鉴定。黄连提取物, 由中日友好医院药剂室提取, 为水提取后真空干燥制备的固体粉末, 得率为 19.33%, 其中小檗碱含量为 7.93%, 巴马汀含量为 2.29%。黄连提取物的配制: 用纯净水, 超声助溶, 配制成 9.6 mg/mL 的溶液。

### 1.3 实验动物

SD 雄性乳大鼠 20 只, 5 日龄, 清洁级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: SCXK(京)2012-0001。每 10 只与母鼠一起喂养, 食水自取, 自然光照, 饲养至第 25 天后脱离母乳, 以后每 5 只一笼饲养。

## 2 方法

### 2.1 血浆样品的处理

取血浆 100  $\mu$ L, 加入内标溶液 20  $\mu$ L, 涡旋, 加入 360  $\mu$ L 乙腈沉淀蛋白, 涡旋 5 min 后, 13000 rpm/min 离心 15 min, 取上清液在氮吹仪上吹干, 残渣用 200  $\mu$ L 流动相 (50% 乙腈) 复溶, 涡旋混匀 5 min, 13000 rpm/min, 4  $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清 180  $\mu$ L 进样, UPLC-MS/MS 仪测定分析

### 2.2 慢性内脏高敏感 IBS 动物模型的建立及评价

采用乳鼠结肠 PTCA 球囊刺激法建立慢性内脏高敏感 IBS 动物模型, 其建立过程简述如下: 8 日龄雄性乳鼠, 以温生理盐水擦拭肛周后, 以涂有液体石蜡的 PTCA 球囊自肛门插入, PTCA 球囊通过三通管分别与压力表和注射器相连, 然后向球囊内注入空气, 使压力缓慢上升到 60 mmHg, 每天 2 次, 每次持续 1 分钟, 2 次之间间隔 30 min, 共持续 2 周, 每次刺激结束后, 均分别以酒精和生理盐水擦拭 PTCA 球囊。正常组每天温柔抓起, 抚摸会阴部 1 分钟。

每天实验均从早上 8:00 开始,以排除生理节律的影响。每次乳鼠完成结肠 PTCA 球囊刺激后,放回鼠笼中与母鼠一起饲养,直到第 25 d,与母鼠分开,单独饲养,每笼 5 只,每周记录一次体重。

至第 8 周末,禁食 24 h,成年大鼠固定于有机玻璃定做的大鼠固定器(20 × 6 × 9 cm)中,以涂有液体石蜡的导尿管自肛门插入,直至球囊末端距肛门 2 cm,用医用胶布将导尿管固定于大鼠尾巴根部,球囊另一端与充有温生理盐水(37 °C ± 0.5 °C)的注射器相连,待大鼠适应环境 30 分钟后,向导尿管注入生理盐水,观察其腹部抬起(腹部距水平面 0.2 cm)及弓背抬高(腹部距水平面 1 cm)阈值。每只大鼠均测量 3 次,每次持续 10 s,每次之间间隔 30 min,结果以均值计。并取远端结肠切片进行 HE 染色和免疫组化(检测结肠中 *c-fos* 的表达),近端结肠切片行甲苯胺蓝染色,用以进行病理形态观察及肥大细胞计数。

### 2.3 给药方法及血浆样品的采集

待模型成功后,给正常大鼠和模型大鼠施行颈静脉插管手术。取施行过颈静脉插管手术并恢复 12 h 以上的大鼠,灌胃黄连提取物 1 mL/100 g (96 mg/kg,相当于小檗碱 22 mg/kg 和巴马汀 5.3 mg/kg),于给药前和给药后 5、15、30 min、1 h、1.5、2、3、4、6、8、10、12、24 和 36 h 从颈静脉插管处采血 200 μL 放入肝素化的 EP 管中,同时从插管处补充 200 μL 肝素溶液(50IU/mL)到大鼠的颈静脉内。3500 rpm 离心 15 min,取血浆 100 μL, -80 °C 保存。采用本课题组前期建立的 UPLC-MS/MS 法测定血浆中小檗碱和巴马汀的含量<sup>[7]</sup>。

表 1 灌胃黄连提取物后小檗碱和巴马汀在正常和 CVH-IBS 模型大鼠体内的药代动力学参数( $n = 5$ )

Table 1 Pharmacokinetic parameters of berberine and palmatine in rat after oral administration of Rhizoma Coptidis Extract ( $n = 5$ )

参数 Parameters	小檗碱 Berberine		巴马汀 Palmatine	
	正常组 Normal	模型组 Model	正常组 Normal	模型组 Model
$T_{1/2,\alpha z}$ (min)	412.1 ± 177.8	946.7 ± 401.9 * *	745.8 ± 479.5	824.6 ± 155.5
$T_{max}$ (min)	39.0 ± 20.1	105.0 ± 57.4 *	55.0 ± 12.2	48.8 ± 22.5
$C_{max}$ (ng/mL)	18.6 ± 8.2	22.4 ± 9.1	8.1 ± 2.8	6.0 ± 2.4
$AUC_{0-t}$ (min·ng/mL)	2860.4 ± 802.5	12932 ± 3488.6 * *	2276.4 ± 1040.7	2915.7 ± 536.3
$V_d/F_{,\alpha z}$ (L/kg)	3060.2 ± 1321.7	1747.9 ± 552.7 *	1359.7 ± 864.7	1875.0 ± 457.7
CL/F (L/h/kg)	336.4 ± 127.1	85.8 ± 24.9 * *	137.4 ± 73.2	94.7 ± 16.8

注:与正常组比较, \* \*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ 。

Note: \* \*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$  compared with normal group.

### 2.4 数据处理

用药代动力学软件 WinNonlin6. 3 (Phoenix, 美国 Pharsight 公司),绘制平均血药浓度—时间曲线。采用非房室模型计算小檗碱和巴马汀的药代动力学参数,包括  $T_{max}$ 、 $C_{max}$ 、 $T_{1/2}$ 、 $AUC_{0-t}$ 、 $V_d/F$  和  $CL/F$ 。所有数据用均数 ± 标准差表示。应用 SPSS17.0 统计软件进行 t 检验,比较两组之间的平均数,以  $P < 0.05$  为差异显著性标准。

## 3 结果

本实验采用乳鼠结肠 PTCA 球囊刺激的方法建立的 CVH-IBS 大鼠模型表现出了内脏痛觉超敏、肥大细胞显著增多,而且原癌基因 *c-fos* 的表达显著升高<sup>[8]</sup>,进一步佐证了内脏超敏的原因。因此,该模型可以作为 CVH-IBS 的动物模型用于科学研究。

灌胃黄连提取物后小檗碱和巴马汀的平均血药浓度曲线如 Figure 1 所示,其药代动力学参数见表 1。结果表明灌胃黄连提取物后,模型组大鼠体内的小檗碱的半衰期和曲线下面积显著高于正常组大鼠,而表观分布容积和清除率显著低于正常组,达峰浓度未见明显差异。而对于巴马汀,在正常大鼠和模型大鼠体内的药代动力学行为相似,各药代动力学参数均未见明显差异。此外,对于小檗碱和巴马汀,在正常组大鼠和模型组大鼠均出现多峰。

## 4 讨论

黄连在临床上治疗肠易激综合征的常用方剂中的常用中药之一,包括以内脏高敏感(腹痛)为主要特征的 CVH-IBS,表现出较好的镇痛作用。关于

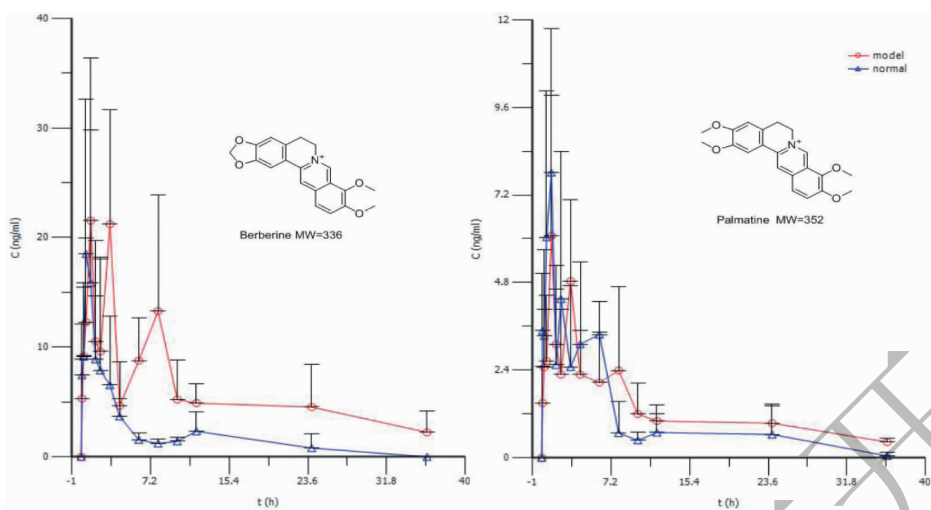


图1 灌胃黄连提取物后小檗碱和巴马汀在正常和 CVH-IBS 模型大鼠体内的药时曲线 ( $n=5$ )

Fig. 1 The mean plasma concentration (ng/mL) of berberine and palmatine vs time (h) profiles after oral administration of RhizomaCoptidis Extract in normal control and chronic visceral hypersensitivity irritable bowel syndrome rats (CVH-IBS) model rats ( $n=5$ )

黄连的药理作用和化学成分的研究较多。然而,关于黄连生物碱在慢性内脏高敏感肠易激综合征体内的药代动力学的研究较少。更为重要的是,药物是用于治疗疾病,而病人是药物的最终消费者。近年来,越来越多的研究表明中药的药代动力学特征能够被疾病状态所影响,生理及病理的变化在一定程度上会影响机体内的药物代谢酶、转运蛋白、细胞膜的通透性以及微生物菌群的改变,从而改变中药在机体内的吸收、分布、代谢和排泄过程,进而引起中药的药代动力学参数的改变。鉴于中药主要是用于病理状态的机体内,故研究机体病理状态下的药动学参数较正常状态下更有意义且与临床更相关。

基于此,在本研究中,作者比较了灌胃黄连提取物后小檗碱和巴马汀在正常大鼠和 CVH-IBS 模型大鼠之间的药代动力学。结果发现,灌胃黄连提取物后,与正常组相比,小檗碱在模型大鼠体内的吸收增加,消除减慢。而对于巴马汀,在正常大鼠和模型大鼠体内的药代动力学未见明显差异。值得注意的是,小檗碱和巴马汀同属于黄连生物碱,而本研究的结果仅表明小檗碱的药代动力学行为能够被 CVH-IBS 的病理状态所改变,关于这种改变的机制还需要后续实验进一步研究。

#### 参考文献

1 AlChaer ED, Kawasaki M, Pasricha PJ. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology*,

2000, 119:1276-1285.

- Coutinho SV, Plotsky PM, Sablad M, et al. Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282:G307-316.
- Miampamba M, Million M, Tache Y. Brain-gut interactions between central vagal activation and abdominal surgery to influence gastric myenteric ganglia c-fos expression in rats. *Peptides*, 2011, 32:1078-1082.
- Zhang R, Zou N, Li J, et al. Elevated expression of c-fos in central nervous system correlates with visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome (IBS): a new target for IBS treatment. *Int J Colorectal Dis*, 2011, 26:1035-1044.
- Nakagawa T, Katsuya A, Tanimoto S, et al. Differential patterns of c-fos mRNA expression in the amygdaloid nuclei induced by chemical somatic and visceral noxious stimuli in rats. *Neurosci Lett*, 2003, 344:197-200.
- Tjong Y, Ip S, Lao L, et al. Analgesic effect of Coptis chinensis rhizomes (Coptidis Rhizoma) extract on rat model of irritable bowel syndrome. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135:754-761.
- Gong Z, Chen Y, Zhang R, et al. Pharmacokinetics of two Alkaloids after Oral Administration of Rhizoma Coptidis Extract in Normal Rats and Irritable Bowel Syndrome Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, doi: 10. 1155/2014/845048.
- Gong Z, Chen Y, Zhang R, et al. Pharmacokinetic Difference of Berberine between Normal and Chronic Visceral Hypersensitivity Irritable Bowel Syndrome Rats and its mechanism. *Arch Pharm Res*, 2015, 38:1888-1896.