

低相对分子质量壳聚糖及其纳米粒对三七总皂苷肠道渗透性的影响

谢 振¹, 徐 彭², 资鹏鹏¹, 徐贤柱¹, 游清徽¹, 王曼莹^{1,2}, 蔡险峰^{1*}

1. 江西师范大学 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西 南昌 330022

2. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 利用人结直肠腺癌细胞 Caco-2 细胞模型, 考察低相对分子质量壳聚糖 (LMW-CTS) 及其纳米粒 (LMW-CTS-NPs) 对三七总皂苷 (PNS) 肠道渗透性的影响。方法 采用固相化壳聚糖酶解结合超滤分离技术制备 LMW-CTS, 渗透凝胶色谱法 (GPC) 测定其相对分子质量 (M_w)。离子凝胶法制备 LMW-CTS-NPs, 并通过扫描电镜、纳米粒度分析和红外光谱进行表征。建立并验证 Caco-2 细胞模型, 评价 LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 对 PNS 渗透性的影响。结果 LMW-CTS 平均相对分子质量为 5 760, 多分散系数为 1.42。LMW-CTS-NPs 形貌圆整, 粒度分布窄, 平均粒径为 115.5 nm, Zeta 电位为 +37.1 mV。PNS 原料药各组分的表观渗透系数 (P_{app} , AP→BL) 均小于 1×10^{-6} cm/s; LMW-CTS 组中, 三七皂苷 R₁ (R₁) 和人参皂苷 Rg₁ (Rg₁) 的 P_{app} 分别提高 17.83% 和 20.29%, 其他组分则无明显提升; 而 LMW-CTS-NPs 组 R₁、Rg₁、人参皂苷 Re (Re)、人参皂苷 Rb₁ (Rb₁) 和人参皂苷 Rd (Rd) 的 P_{app} 比对照组分别提高 35.66%、23.28%、29.41%、37.99% 和 36.00%。结论 LMW-CTS 可明显促进 R₁ 和 Rg₁ 的肠道渗透性, 但对 Re、Rb₁ 和 Rd 无明显促进作用; 而 LMW-CTS-NPs 显著提高 PNS 中主要单体皂苷组分的渗透性, 进一步改善 PNS 的肠道通透性。

关键词: 低相对分子质量壳聚糖; 离子凝胶法; 壳聚糖纳米粒; 三七总皂苷; Caco-2 细胞模型; 渗透性; 超滤分离; 渗透凝胶色谱法; 表观渗透系数; 三七皂苷 R₁; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rb₁; 人参皂苷 Rd

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)13-3424-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.009

Effects of low molecular weight chitosan and its nanoparticles on intestinal permeability of *Panax notoginseng* saponins

XIE Zhen¹, XU Peng², ZI Peng-peng¹, XU Xian-zhu¹, YOU Qing-hui¹, WANG Man-ying^{1,2}, CAI Xian-feng¹

1. Jiangxi Provincial Key Lab of Protection and Utilization of Subtropical Plant Resources, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

2. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of low molecular weight chitosan (LMW-CTS) and its nanoparticles (LMW-CTS-NPs) on the intestinal permeability of *Panax notoginseng* saponins (PNS) by using Caco-2 cell model. **Methods** LMW-CTS was prepared by combining chitosanase hydrolysis combined with ultrafiltration separation technology, and molecular weight of LMW-CTS was determined by using permeation gel chromatography (GPC). LMW-CTS-NPs were prepared by ionic gel method, and characterized by scanning electron microscopy, nano particle sizer, and fourier transformation infrared spectroscopy. Caco-2 cell model was established and validated to evaluate the effects of LMW-CTS and LMW-CTS-NPs on the intestinal permeability of PNS. **Results** LMW-CTS has a molecular weight of 5 760 and a polydispersity coefficient of 1.42. LMW-CTS-NPs have a round shape and narrow particle size distribution, with an average particle size of 115.5 nm and zeta potential of +37.1 mV. The apparent permeability coefficients (P_{app} , AB→BL) of PNS was less than 1×10^{-6} cm/s, indicating a poor permeability. In LMW-CTS group, the P_{app} of R₁ and Rg₁ was increased by 17.83% and 20.29%, respectively, but no significant effect of promotion was observed on other components. However, the P_{app} of R₁, Rg₁, Re, Rb₁, and Rd in LMW-CTS-NPs group was increased by 35.66%, 23.28%, 29.41%, 37.99%, and 36.00%, respectively, compared to the control group. **Conclusion** LMW-CTS can significantly promote the

收稿日期: 2020-02-05

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2018ZX09721002-008); 教育厅成果落地重点项目 (GJJ10006)

作者简介: 谢 振 (1995-) 男, 硕士, 从事壳聚糖清洁生产与应用研究。Tel: 18942356796 E-mail: 18942356796@163.com

*通信作者 蔡险峰, 硕士生导师, 副教授, 从事壳聚糖清洁生产与应用研究。Tel: 18970059440 E-mail: jxcxf68@126.com

intestinal mucosal permeability of R₁ and Rg₁ in PNS, but has no significant effect on Re, Rb₁, and Rd. LMW-CTS-NPs significantly increased the permeability of the major monomer saponin components in PNS. Namely, the intestinal permeability of PNS can be further improved by transforming LMW-CTS into LMW-CTS-NPs.

Key words: low molecular weight chitosan; ionic gel method; chitosan nanoparticles; *Panax notoginseng* saponins; Caco-2 cell model; permeability; ultrafiltration separation; gel permeation chromatography; apparent permeability coefficients; notoginsenoside R₁; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rd

三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥主根和根茎, 是中国传统药源植物之一^[1]。三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 是三七的主要活性成分, 其主要单体皂苷包括人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Rd、Re (Rb₁、Rg₁、Rd、Re) 以及三七皂苷 R₁ (R₁)、K 等^[2-4]。PNS 不仅具有抗氧化、抗衰老、抗炎、抗肿瘤等药理作用^[5-7], 而且可扩张血管、改善微循环, 因而被广泛应用于心脑血管系统疾病的治疗^[8-10]。但 PNS 中主要单体皂苷成分为相对分子质量 (molecular weight, MW) 相对较大的水溶性成分, 肠道渗透性差, 导致 PNS 口服生物利用度低^[11-14]。而临床常用的 PNS 注射剂虽然可以提高生物利用度, 但有报道存在安全问题^[15], 且长期注射给药患者依从性差。因此, 通过改善 PNS 肠道渗透性以促进其肠道吸收对 PNS 经口生物利用度的提高具有重要意义。

壳聚糖 (chitosan, CTS) 是带正电荷的天然氨基多糖, 具有良好的生物黏附性、可降解性和生物相容性, 在药用辅料领域引起广泛关注^[16]。文献报道^[17-18], CTS 因其正电属性可与带负电荷的生物黏膜类脂层发生静电吸附作用, 诱导与细胞紧密连接相关的肌动蛋白微丝和胞质紧密粘连蛋白 1 (ZO-1) 重排, 可逆地打开紧密连接, 促进药物的细胞旁路吸收。天然壳聚糖的相对分子质量通常较大, 黏度高且水溶性低, 限制其应用; 而低相对分子质量壳聚糖 (low molecular weight chitosan, LMW-CTS) 不仅溶解性好, 而且表现出抗炎、抗菌、抗癌等生物学活性^[19]; 此外, LMW-CTS 表现出更强的诱导磷脂层重排能力^[20]。因此, 本研究选用低值市售高分子壳聚糖为原料, 通过酶法降解结合超滤膜分离技术制备 LMW-CTS, 并以离子凝胶法制备低相对分子质量壳聚糖纳米粒 (low molecular weight chitosan nanoparticles, LMW-CTS-NPs), 考察 LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 对 PNS 渗透性的影响, 以期为提高 PNS 口服制剂吸收处方设计提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Miroza MF/UF PX-02001 小膜超滤系统, 日本旭化成株式会社; Spectrum One 傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Perkin Elmer 公司; S-3400N 扫描电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; Zetasizer Nano ZS 纳米激光粒度仪, 美国 Malvern 公司; Costar 3401 Transwell 小室, 美国 Corning 公司; Millicell ERS-2 跨膜电阻仪, 美国 Millipore 公司; Nexera X2 UPLC 系统, 配备 LC-30AD 泵, 日本岛津公司。

1.2 材料

高相对分子质量壳聚糖原料 (黏度 200~800 mPa·s, 脱乙酰度>92%), 浙江金壳生物化学有限公司; 固定化内切壳聚糖酶, 汇龙集团 (泉州) 实业投资有限公司; 葡聚糖标准品 (相对分子质量 4 440、9 890、21 400、43 500、66 700), 美国 Sigma 公司; PNS, 皂苷总质量分数>75%, 云南三七科技药业有限公司; 对照品 R₁ (批号 110745-201619, 质量分数 95.0%)、Rg₁ (批号 110703-201731, 质量分数 93.6%)、Re (批号 110754-201626, 质量分数 97.4%)、Rb₁ (批号 110704-201726, 质量分数 91.1%)、Rd (批号 111818-201603, 质量分数 92.1%), 中国食品药品检定研究院; DMEM 高糖培养基, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 胎牛血清, 美国 RMBIO 公司; 乳酸脱氢酶 (LDH) 释放检测试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; 碱性磷酸酶 (ALP) 测定试剂盒 (微板法), 南京建成生物工程研究所。人结直肠腺癌细胞 Caco-2 细胞株购于中国典型培养物保藏中心。

2 方法与结果

2.1 LMW-CTS 及其纳米粒 LMW-CTS-NPs 的制备与表征

2.1.1 LMW-CTS 的制备与相对分子质量测定 将市售高相对分子质量壳聚糖溶于 1%冰醋酸溶液配成 3%壳聚糖溶液, 调节 pH 值至 5.0, 加入适量固定化内切壳聚糖酶酶解 4 h。酶解液经尼龙纱布滤过回收固定化酶, 滤液经超滤膜截留, 冻干即得

LMW-CTS, 其相对分子质量由渗透凝胶色谱法(GPC)测定。

GPC 色谱条件如下: Tsk gel G4000PWxl (300 mm×7.8 mm) 与 Tsk gel G3000PWxl 串联 (300 mm×7.8 mm) 色谱柱, 流动相为 0.2 mol/L 乙酸-0.1 mol/L 乙酸钠 (pH 值 4.4), 体积流量 0.5 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 25 μL。

(1) 标准曲线绘制: 葡聚糖标准品 (相对分子质量 4 440、9 890、21 400、43 500、66 700) 溶于流动相配成 1 mg/mL 标准工作液, 按上述色谱条件进样分析。数据经 Chromeleon 色谱工作站 7.0 处理, 以葡聚糖标准品相对分子质量的对数对保留时间作图, 经线性拟合即得标准曲线: $Y=9.2942-0.1670X$, $r^2=0.9983$, 见图 1。

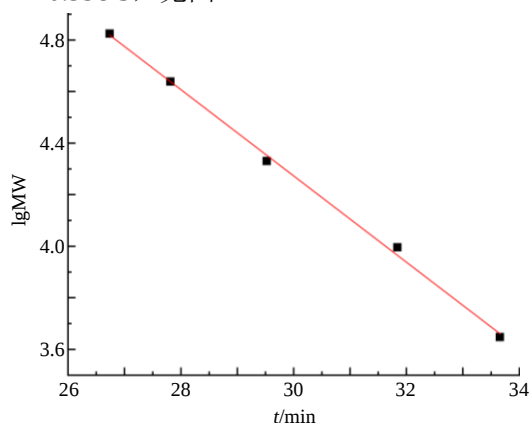


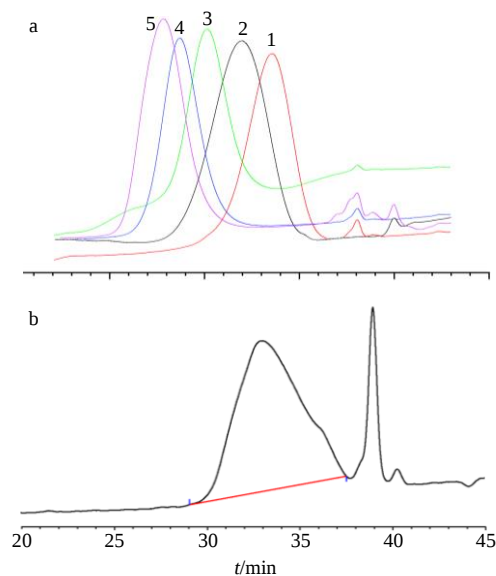
图1 葡聚糖标准曲线

Fig. 1 Standard curve of dextran

(2) 样品测定: 待测样品处理方法与标准品一致, 结果如图 2, 峰顶保留时间为 33.033 min, 软件计算得样品重均相对分子质量为 5 760, 多分散指数为 1.42。结果表明, 所得 LMW-CTS 相对分子质量较低, 相对分子质量分布窄。

2.1.2 LMW-CTS-NPs 的制备及表征 LMW-CTS-NPs 参考文献方法^[21-22]制备: 称取 LMW-CTS 适量, 溶于 0.003% 波洛沙姆 188 的水溶液, 配成 1 mg/mL 的 CTS 溶液, 调节 pH 至 4.0, 经 0.45 μm 混合玻璃纤维滤膜滤过, 备用。磁力搅拌条件下, 用恒流泵缓慢滴加一定量 1 mg/mL 的三聚磷酸钠 (TPP) 溶液, 搅拌 1 h 即得淡蓝色 LMW-CTS-NPs 胶体溶液。所得胶体溶液经 Microza 超滤系统纯化并浓缩后冻干得 LMW-CTS-NPs 冻干粉。

LMW-CTS-NPs 的微观形貌通过扫描电子显微镜 (SEM) 观测。制样方法参考 Nallamuthu 等^[23]报道的文献, 扫描电镜结果如图 3 所示, LMW-CTS-



1-葡聚糖 (4 440) 2-葡聚糖 (9 890) 3-葡聚糖 (21 400) 4-葡聚糖 (43 500) 5-葡聚糖 (66 700)
1-Dextran (4 440) 2-Dextran (9 890) 3-Dextran (21 400) 4-Dextran (43 500) 5-Dextran (66 700)

图2 葡聚糖系列标准品 (a) 与 LMW-CTS (b) 的 GPC 色谱图

Fig. 2 GPC chromatogram of Dextran series standard (a) and LMW-CTS (b)

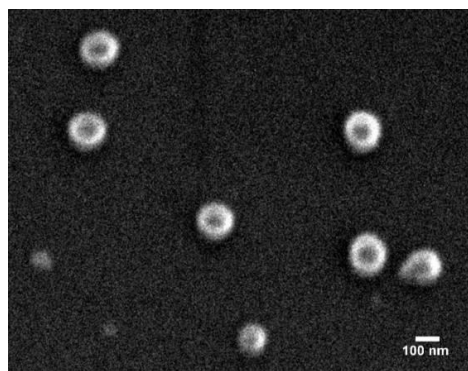


图3 LMW-CTS-NPs 的扫描电子显微镜图 (×50 000)

Fig. 3 SEM image of LMW-CTS-NPs (×50 000)

NPs 呈球形, 形貌圆整, 大小均匀, 粒径约为 130 nm。

LMW-CTS-NPs 的粒径分布和电位分析。取适量新制 LMW-CTS-NPs 胶体溶液, 经 Malvern 纳米粒度仪分析其粒度和电位, 结果如图 4 所示, 平均粒径为 $(115.5 \pm 8.7) \text{ nm}$, 粒径分布集中于 147.2 nm, 因纳米粒度仪所测为水合粒径, 所以比 SEM 观测结果略大; 多分散系数为 0.221 ± 0.009 , 表明所制备的 LMW-CTS-NPs 粒度分布均匀性好。Zeta 电位达到 $(37.1 \pm 0.4) \text{ mV}$, 表明 LMW-CTS-NPs 表面带有正电荷。通常认为, Zeta 电位绝对值高于 30 mV 则分散体系状态稳定^[24]。

LMW-CTS-NPs 的红外分析。根据文献方法^[25]采集 LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 4 000~400 cm^{-1} 范围红外图谱,结果如图 5。其中,TPP 的红外光谱在 1 217 cm^{-1} 和 896 cm^{-1} 分别为 P=O 和 P-O-P 的伸缩振动吸收峰;LMW-CTS 的 3 个特征吸收峰分别为 2 929 cm^{-1} 处 C-H 伸缩振动吸收峰、1 640 cm^{-1} 处酰胺 I 谱带的 C=O 拉伸振动峰和 1 560 cm^{-1} 处酰胺 II 谱带的 N-H 的弯曲振动吸收峰;LMW-CTS-NPs 红外图谱与 LMW-CTS 的相似,出现 LMW-CTS 和 TPP 的特征峰,且 P=O 特征峰偏移至 1 240 cm^{-1} , N-H 吸收峰偏移至 1 540 cm^{-1} 处,表明 LMW-CTS 和 TPP 间形成离子键。

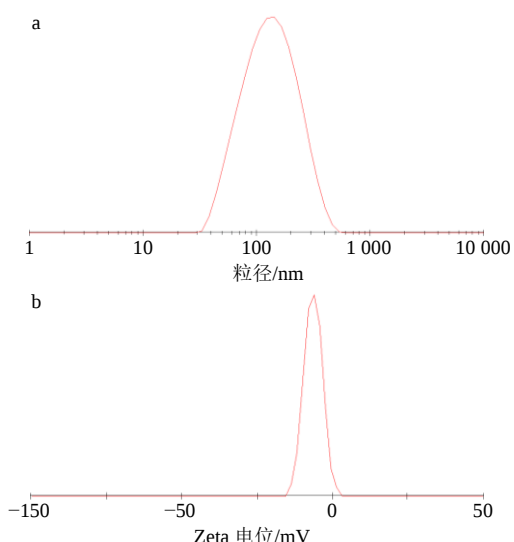


图 4 LMW-CTS-NPs 的粒度分布 (a) 及 Zeta 电位图 (b)
Fig. 4 Distribution of particle size (a) and Zeta potentials (b) of LMW-CTS-NPs

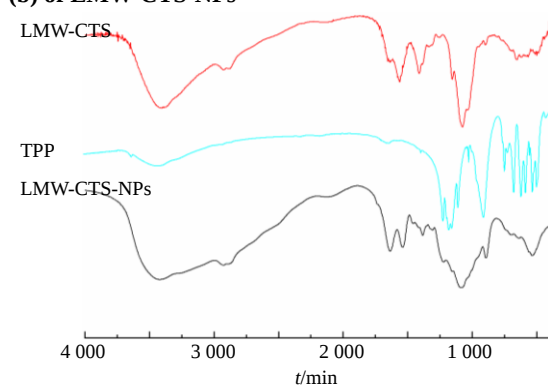


图 5 TPP、LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 的红外光谱图
Fig. 5 IR spectra of TPP, LMW-CTS and LMW-CTS-NPs

2.2 药物质量浓度的筛选

2.2.1 Caco-2 细胞的培养 Caco-2 细胞以 DMEM 高糖培养基 (含 20% 胎牛血清, 1% 非必需氨基酸, 1% 双抗) 培养, 接种于细胞培养皿, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$,

5% CO_2 , 饱和湿度条件培养^[26]。细胞贴壁生长后, 隔天换液, 培养至融合度 85%~90%, 用 EDTA-胰蛋白酶消化传代。

2.2.2 MTT 毒性实验 通过 MTT 毒性实验评估 LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 对 Caco-2 细胞活力的影响, 筛选适宜的给药质量浓度。收集培养至对数生长期的 Caco-2 细胞, 消化成单细胞悬液, 调整浓度至 1×10^5 个/mL, 以每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 培养 24 h 后移除培养基, 各孔分别加入 200 μL 含药物的 Hank's 平衡盐溶液 (HBSS, pH 6.5), 使 LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 质量浓度分别为 25、50、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$; 另设空白 HBSS 组为阴性对照组。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 2 h, 移除 HBSS 液, PBS 洗涤细胞。加入 200 μL 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液, 孵育 4 h, 吸弃上清, 加入 200 μL DMSO 溶解结晶, 用酶标仪检测 490 nm 处的 A 值, 计算相对存活率。

$$\text{细胞相对存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 对 Caco-2 细胞毒性结果见图 6, 细胞相对存活率随着药物质量浓度升高而呈现降低趋势。当药物质量浓度高于 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, LMW-CTS 与 LMW-CTS-NPs 组细胞相对活力均低于 90%, 表现出明显的细胞毒性 ($P < 0.05$), 因此给药安全质量浓度范围为 0~25 $\mu\text{g/mL}$ 。结果显示, LMW-CTS-NPs 对 Caco-2 细胞毒性明显低于 LMW-CTS。

2.2.3 LDH 释放检测 为进一步验证 LMW-CTS 和

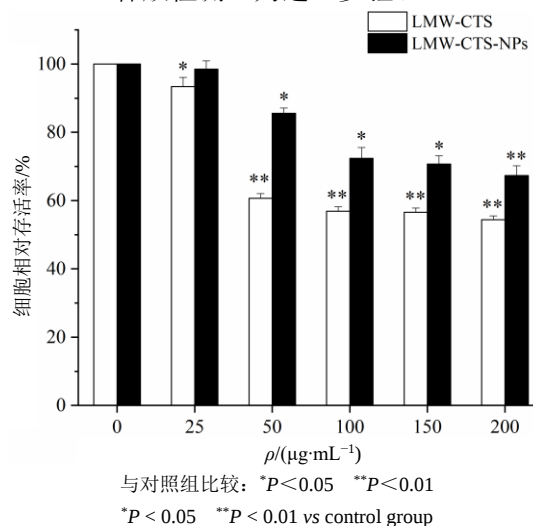


图 6 LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 对 HBSS 中 Caco-2 细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of LMW-CTS and LMW-CTS-NPs on Caco-2 cytotoxicity in HBSS ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

LMW-CTS-NPs 对 Caco-2 细胞膜完整性的影响, 进行 LDH 释放检测。Caco-2 细胞铺板方法同“2.2.2”项所述, 实验步骤参照 LDH 释放检测试剂盒(微板法)说明, 相对 LDH 释放量计算公式如下。

$$\text{相对 LDH 释放量} = (A_x - A_c) / (A_m - A_c)$$

A_x 为样品处理组, A_c 为样品对照组, A_m 为 LDH 最大释放组

结果如图 7 所示, 在 25 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, LMW-CTS 组和 LMW-CTS-NPs 组相比于对照组 LDH 释放量分别增加 2.2% 和 2.8%, 二者间不存在显著性差异 ($P > 0.05$), 但均与对照组差异显著 ($P < 0.05$); 随着药物质量浓度增加, LDH 相对释放量上升, 当药物质量浓度高于 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 组相对 LDH 释放量均超过 10%, 表现出明显的细胞毒性。综合 MTT 毒性实验和 LDH 释放检测实验结果, 选择药物质量浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 。

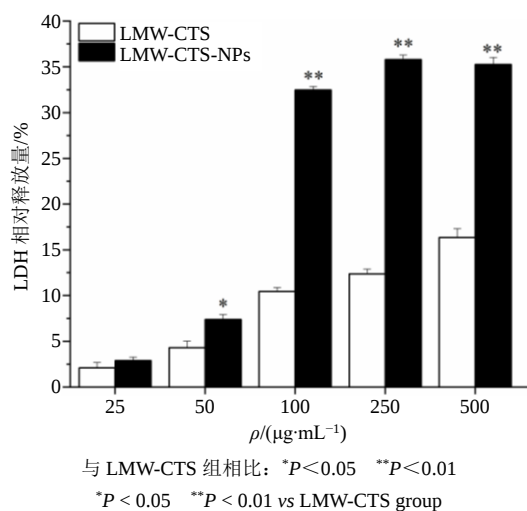


图 7 LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 对 Caco-2 细胞 LDH 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effect of LMW-CTS and LMW-CTS-NPs on LDH release of Caco-2 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.3 Caco-2 细胞模型的建立与表征

收集对数生长期的 Caco-2 细胞, 制备单细胞悬液并调整浓度至 1×10^5 个/mL, 以每孔 0.5 mL 接种于 12 孔 Transwell 小室顶端 (AP) 侧, 基底 (BL) 侧加入 1.5 mL DMEM 完全培养基, 模型示意图如图 8。隔天更换 AP 侧和 BL 侧培养基, 7 d 后每天换液, 培养至 21 d。分别在培养的第 3、6、9、11、15、18、21 天测定细胞跨膜电阻以检测细胞膜完整性和致密性; 同时, 通过碱性磷酸酶 (ALP) 试剂盒检测两侧 ALP 酶活性, 判断 Caco-2 细胞的生长分化状态^[27-29]。

结果 (图 9、10) 显示, 细胞跨膜电阻 (TEER) 在 9~15 d 内迅速增加至 (646.20 ± 40.16) $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ($> 500 \Omega \cdot \text{cm}^2$), 在 15 d 后趋于平稳, 表明 Caco-2 细胞单层膜致密性良好; BL 侧 ALP 活力随培养时

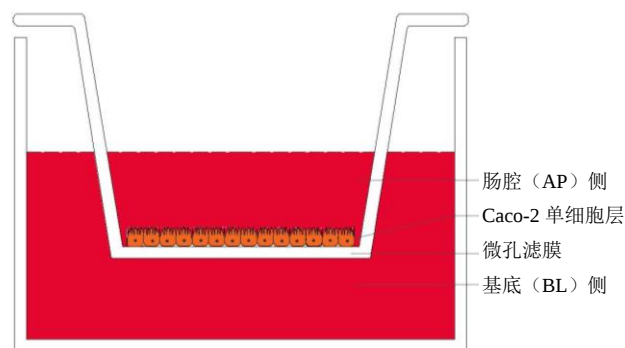


图 8 Caco-2 细胞模型示意图

Fig. 8 Schematic diagram of Caco-2 cell model

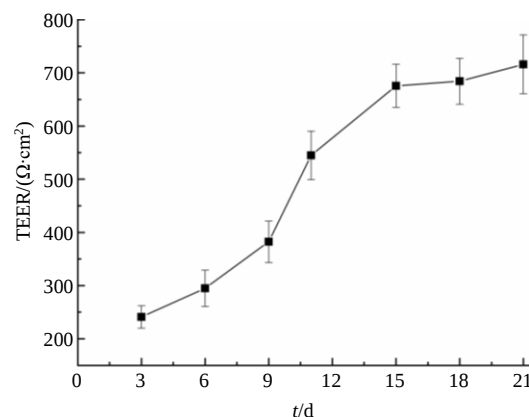


图 9 Caco-2 细胞单层 TEER 随培养时间变化趋势 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Change trend of Caco-2 monolayers over culture time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

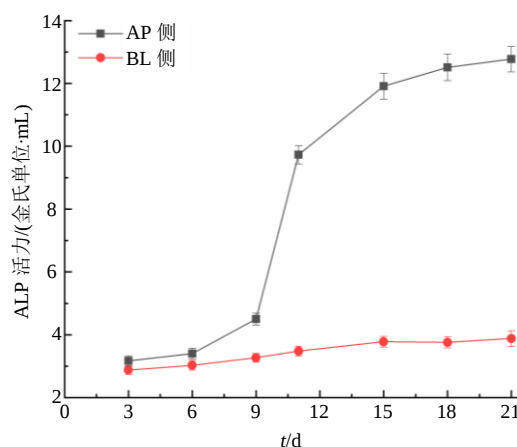


图 10 AP 侧和 BL 侧 ALP 活力随时间变化趋势 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Change trend of ALP activity of AP side and BL side ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

间变化平缓,而 AP 侧 ALP 活力呈现明显上升趋势,其中,9~15 d 内上升速度最快,15 d 后趋于平缓,培养至 21 d 时 ALP 活力比 (AP/BL) 达 3.29,表现出极性特征,符合 Caco-2 细胞模型建立要求。

2.4 PNS 含量测定

2.4.1 色谱条件 色谱条件参照文献方法^[30]进行优化,优化后条件如下:色谱柱为 Welch Ultimate UHPLC XB-C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相,梯度洗脱: 0.01~0.5 min, 5% 乙腈; 0.5~1 min, 5%~45% 乙腈; 1~2 min, 45%~95% 乙腈; 2~2.5 min, 95% 乙腈; 2.5~2.6 min, 95%~5% 乙腈; 2.6~5 min, 5% 乙腈; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 3 μL。

2.4.2 质谱条件 质谱系统为 AB Sciex QTRAP 4500 复合三重四极杆线性离子阱质谱,配 ESI 离子源和 Analyst 1.6 数据处理软件。负离子模式检测,扫描方式为多反应离子监测 (MRM); 电喷雾电压 -4 500 eV, 离子源温度 550 °C, 气帘气 172.369 kPa (25 psi), 雾化气和辅助气为 344.738 kPa (50 psi), PNS 中 5 种皂苷成分和内标洋地黄毒苷 (IS) 的 MRM 监测条件见表 1, 空白 HBSS 液及 PNS 中各成分对照品 XIC 图见图 11, 表明空白基质对目标分析物干扰低。

表 1 R₁、Rg₁、Re、Rb₁、Rd 和洋地黄毒苷的质谱条件
Table 1 Mass spectrometry conditions for R₁, Rg₁, Re, Rb₁, Rd and digitoxin

组分	离子对 (m/z)	去簇电压/eV	碰撞电压/eV
R ₁	931.0→637.4	-222	-51
Rg ₁	845.1→637.3	-190	-45
Re	945.1→783.1	-220	-55
Rb ₁	1 107.1→945.4	-250	-63
Rd	945.1→783.2	-220	-53
IS	809.2→633.5	-180	-47

2.4.3 样品处理 将冻存的样品于室温融化并混匀后取 100 μL, 加入 10 μL 内标工作液 (洋地黄毒苷, 500 ng/mL) 混匀, 加入 400 μL 甲醇涡旋混合 5 min, 于 4 °C 条件 13 000 r/min 离心 10 min, 取 200 μL 上清, 氮气吹干, 加入 200 μL 甲醇复溶, 再次离心后取 3 μL 进样。

2.4.4 线性关系考察 对照品溶液制备: 分别精密称取 R₁、Rg₁、Re、Rb₁、Rd 适量, 溶于甲醇配制质量浓度分别为 370、1 315、370、1 385、380 μg/mL

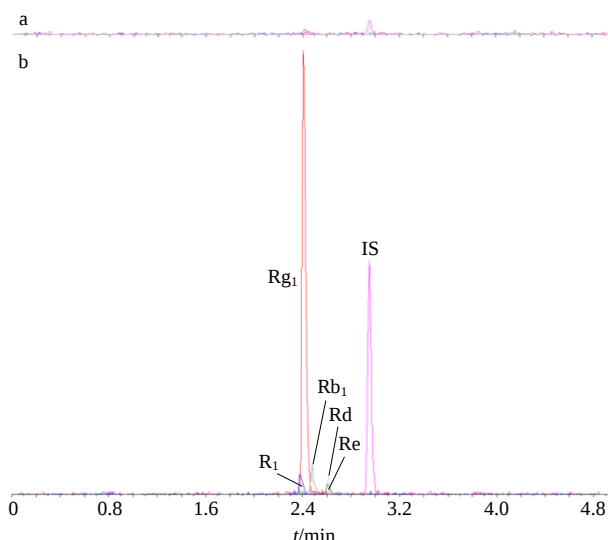


图 11 空白 HBSS 液 (a) 和 R₁、Rg₁、Re、Rb₁、Rd (b) 的提取离子流色谱图

Fig. 11 XIC of blank HBSS (a) and R₁, Rg₁, Re, Rb₁, Rd (b) 的混合对照品储备液。精密吸取混合对照品储备液用空白 HBSS 液配成质量浓度分别为 R₁ 1.85、3.7、7.4、18.5、37、55.5、74、148 ng/mL, Rg₁ 6.575、13.15、26.3、65.75、131.5、197.25、263、526 ng/mL, Re 1.85、3.7、7.4、18.5、27.75、37、74、148 ng/mL, Rb₁ 6.925、13.85、27.7、69.25、138.5、207.75、277、554 ng/mL 及 Rd 1.9、3.8、7.6、19、38、57、76、152 ng/mL 的系列混合对照品溶液。

内标溶液: 精密称取洋地黄毒苷适量, 甲醇溶解并定容, 配制 100 μg/mL 内标储备液。精密吸取内标储备液适量, 用甲醇梯度稀释成 500 ng/mL 工作液。

按照“2.4.3”项下样品处理方法制样用于 UPLC-MS/MS 检测。以待测物和内标的峰面积比值为纵坐标, 待测物质量浓度为横坐标, 通过加权最小二乘法回归拟合, 得标准曲线和线性范围, 结果分别为 R₁ $Y=0.013\ 20\ X-0.004\ 66$, $r^2=0.998\ 8$, 线性范围 1.85~148 ng/mL; Rg₁ $Y=0.069\ 55\ X-0.095\ 30$, $r^2=0.994\ 8$, 线性范围 6.575~526 ng/mL; Re $Y=0.011\ 85\ X-0.000\ 23$, $r^2=0.996\ 8$, 线性范围 1.85~148 ng/mL; Rb₁ $Y=0.005\ 56\ X-0.005\ 27$, $r^2=0.999\ 0$, 线性范围 6.925~554 ng/mL; Rd $Y=0.011\ 14\ X-0.002\ 04$, $r^2=0.998\ 1$, 线性范围 1.9~152 ng/mL; 各组分在其相应定量范围内线性关系良好 ($r^2>0.99$)。

2.5 Caco-2 细胞转运实验

选取构建成功的 Caco-2 模型进行转运实验。在

转运实验前, 移除 DMEM 培养液, 用预热的 PBS 洗涤单层细胞 2 次; AP 侧加入 0.5 mL pH 6.5 的 HBSS 液, BL 侧加入 1.5 mL pH 7.4 的 HBSS 液, 置于培养箱平衡 30 min, 平衡结束后用供试液替换 AP 侧空白平衡液。供试液分组如下: 空白 HBSS 液、200 $\mu\text{g/mL}$ PNS 溶液、200 $\mu\text{g/mL}$ PNS+25 $\mu\text{g/mL}$ LMW-CTS 溶液、200 $\mu\text{g/mL}$ PNS+25 $\mu\text{g/mL}$ LMW-CTS-NPs 溶液, BL 侧均加入 1.5 mL 空白 HBSS 液作为接收池。

经上述处理后将 Transwell 置于细胞培养箱, 分别于 30、60、90、120 min 从 BL 侧取样 100 μL , 并补充等体积空白 HBSS 液。所取样中 PNS 含量由 UPLC-MS/MS 测得, PNS 透过率以表观渗透系数 (P_{app}) 表示, 计算公式如下:

$$P_{\text{app}} = \Delta Q / (\Delta t A C_0)$$

$\Delta Q / \Delta t$ 为渗透速率, A 为 Transwell 小室有效膜面积, C_0 为 PNS 初始质量浓度

PNS 跨膜转运结果如图 12 所示, R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 、 R_d 的 AP $\rightarrow$ BL 的 P_{app} 分别为 $(6.56 \pm 0.48) \times 10^{-7}$ 、 $(9.06 \pm 0.46) \times 10^{-7}$ 、 $(1.96 \pm 0.33) \times 10^{-7}$ 、 $(3.21 \pm 0.19) \times 10^{-7}$ 、 $(2.62 \pm 0.27) \times 10^{-7}$ cm/s, 均小于 1×10^{-6} cm/s, 提示原料药较差的黏膜透过性。LMW-CTS 组 R_1 和 R_{g1} 的 P_{app} 分别为 $(7.73 \pm 0.37) \times 10^{-7}$ 、 $(10.89 \pm 0.63) \times 10^{-7}$ cm/s, 相比于原料药分别增加 17.83% 和 20.29%, 促进效果显著 ($P < 0.05$); R_1 、 R_{b1} 及 R_{b1} 的 P_{app} 稍有增加, 但结果与对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。LMW-CTS-NPs 组 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 和 R_d 的 P_{app} 分别为

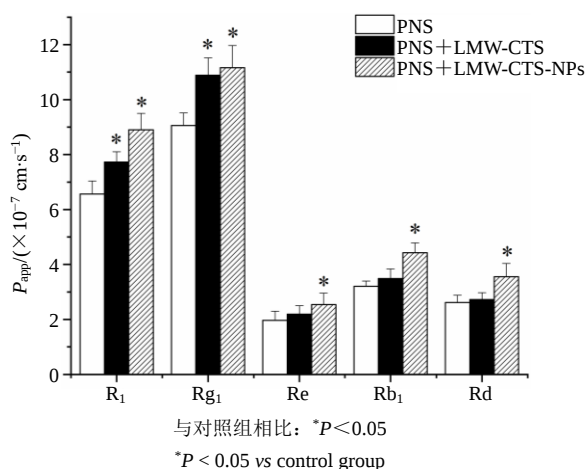


图 12 LMW-CTS 和 LMW-CTS-NPs 对 R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 及 R_d 的 P_{app} 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Effect of LMW-CTS and LMW-CTS-NPs on P_{app} of R_1 , R_{g1} , R_e , R_{b1} , and R_d ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

$(8.90 \pm 0.59) \times 10^{-7}$ 、 $(11.16 \pm 0.80) \times 10^{-7}$ 、 $(2.54 \pm 0.41) \times 10^{-7}$ 、 $(4.43 \pm 0.36) \times 10^{-7}$ 、 $(3.56 \pm 0.48) \times 10^{-7}$ cm/s, 比对照组分别提高 35.66%、23.28%、29.41%、37.99% 和 36.00%, 各组分 P_{app} 显著增加 ($P < 0.05$)。

2.6 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 SPSS 25 软件单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

3 讨论

PNS 水溶性好, 其单体皂苷组分相对分子质量较大, 口服后主要通过细胞旁路被动转运途径吸收, 导致低肠黏膜透过性成为其口服吸收效果差的主要因素^[31]。因此, 改善 PNS 肠黏膜透过性是提高其口服吸收的重要途径。CTS 具有大量游离-NH₂, 在酸性条件下易质子化带上正电荷, 具生物黏附性, 能可逆性地打开细胞间紧密连接, 且该功能与其相对分子质量、脱乙酰度、盐形式等因素相关^[32-33]。高相对分子质量的 CTS 通常水溶性极差, 需以稀的盐酸、甲酸或乙酸等溶解, 但溶解后黏度大, 流动性差, 不适用于肠道中性或偏酸性的环境。因此, 本研究考察 LMW-CTS 与 LMW-CTS-NPs 对 PNS 肠黏膜透过性的影响。

Caco-2 细胞模型转运实验结果表明 PNS 原料药本身黏膜透过性差, P_{app} (AP $\rightarrow$ BL) 均在 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-6}$ cm/s。LMW-CTS 显示出对 PNS 单体皂苷成分肠黏膜透过性不同程度的改善, 其中, R_1 和 R_{g1} 分别提高 17.83% 和 20.29%; 但对 R_e 、 R_{b1} 和 R_d 提高效果较小, 与原料药相比不具有统计学差异 ($P > 0.05$), 该结果可能与 PNS 不同组分的相对分子质量和结构相关。LMW-CTS-NPs 与 LMW-CTS 组相比, R_1 、 R_{g1} 、 R_e 、 R_{b1} 和 R_d 的 P_{app} 提高幅度分别增加了 1.0、0.2、1.5、3.4、8.0 倍, 即 LMW-CTS 制备成纳米粒后, 对 PNS 表现出更强的吸收促进效果。

文献报道^[18]指出, 壳聚糖盐酸盐 (相对分子质量为 113 000, 脱乙酰度为 86%) 制成纳米粒 (平均粒径 339 nm, Zeta 电位 +11.3 mV) 后, 对药物的渗透性促进效果并未得到提高。本研究中 LMW-CTS-NPs 则对 PNS 的渗透性改善效果明显优于 LMW-CTS, 推测与所用 CTS 相对分子质量、纳米粒粒径大小、Zeta 电位高低等因素有关。首先, 本研究所制 LMW-CTS-NPs 的 Zeta 电位高达 +37 mV (大于 +11.3 mV), 而 CTS 的生物黏附性和打开

紧密连接的功能均依赖于其带正电荷性质,可能因此与报道产生差异。其次,本实验所用 LMW-CTS 相对分子质量较低,离子交联过程中 LMW-CTS 分子交缠聚集形成 LMW-CTS-NPs 形态,可理解为相对分子质量的增加。据文献报道^[33],在相对分子质量 20 000~460 000,CTS 对药物的渗透性提高效果与相对分子质量的增加呈正相关,因而 LMW-CTS-NPs 可能表现出对 PNS 更强的肠吸收促进效果,其具体机制有待进一步研究。

本研究表明,LMW-CTS 经离子凝胶法制成纳米粒后,对 PNS 肠道渗透性的改善效果提高。因此,对于 PNS 口服制剂处方,可考虑通过 LMW-CTS-NPs 进行包封,虽不能达到很高的包封率,但制剂时无须分离游离药物。一方面,LMW-CTS-NPs 本身可促进游离 PNS 的细胞旁路通透性,促进 PNS 吸收;同时,PNS 因部分包封存在缓释效果,可延长用药间隔,增加患者顺应性。另一方面,纳米粒可经集合淋巴结的微褶皱细胞吞噬^[34],被纳米粒包载的 PNS 可随着进入体循环。

志谢:江西中医药大学药学院欧阳辉副教授及陈芳对本研究在质谱检测方面的大力支持。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 夏鹏国,张顺仓,梁宗锁,等.三七化学成分的研究历程和概况 [J]. 中草药,2014,45(17): 2564-2570.
- [3] 龚云麒,高宏涛,王乙鸿,等.超高效液相色谱法测定三七总皂苷中三七皂苷 K [J]. 现代药物与临床,2015,30(9): 1072-1074.
- [4] 李存玉,支兴蕾,牛学玉,等.基于成分状态分析溶液环境对三七总皂苷超滤分离行为的影响 [J]. 中草药,2019,50(21): 5246-5252.
- [5] 卢晓燕,王 琰,陈旻静,等.三七总皂苷抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖的作用及机制研究 [J]. 中药材,2017,40(5): 1199-1202.
- [6] 王 莹,褚 扬,李 伟,等.三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. 中草药,2015,46(9): 1381-1392.
- [7] 冯晓异,赵 微,何朋伦,等.三七总皂苷调节 iNOS-NO-NF- κ B 信号通路抑制 LPS 诱导的 RAW246.7 细胞炎症研究 [J]. 药物评价研究,2020,43(4): 670-675.
- [8] 王 楠,万建波,李铭源,等.三七治疗动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 中草药,2008,39(5): 787-790.
- [9] Yang X, Xiong X, Wang H, et al. Protective effects of

- Panax Notoginseng* saponins on cardiovascular diseases: A comprehensive overview of experimental studies [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2014, 2014: 1-13.
- [10] 贺 旭,刘英飞,王 伟,等.三七总皂苷对全脑缺血大鼠学习记忆的影响及其作用机制研究 [J]. 中草药,2019,50(22): 5521-5526.
- [11] 赖 玲.三七总皂苷口服肠溶制剂的研究 [D]. 南宁:广西医科大学,2011.
- [12] Joo K, Lee J, Jeon H, et al. Pharmacokinetic study of ginsenoside Re with pure ginsenoside Re and ginseng berry extracts in mouse using ultra performance liquid chromatography/mass spectrometric method [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2010, 51(1): 278-283.
- [13] Xu Q F, Fang X L, Chen D F. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb₁ and Rg₁ from *Panax notoginseng* in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 84(2/3): 187-192.
- [14] Li X, Wang G, Sun J, et al. Pharmacokinetic and absolute bioavailability study of total *Panax* notoginsenoside, a typical multiple constituent traditional chinese medicine (TCM) in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(5): 847-851.
- [15] 王陈翔,周子晔,叶其蓁.57 例血栓通注射液所致不良反应分析 [J]. 药学实践杂志,2009,27(4): 313-314.
- [16] 王玉蓉,冯 斌,巨 佳,等.羧甲基化白及多糖-壳聚糖载姜黄素聚电解质复合膜的制备及其表征 [J]. 中草药,2020,51(4): 978-985.
- [17] Schipper N G, Olsson S, Hoogstraate J A, et al. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: Mechanism of absorption enhancement [J]. *Pharm Res-Dordr*, 1997, 14(7): 923-929.
- [18] Vllasaliu D, Exposito-Harris R, Heras A, et al. Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution [J]. *Int J Pharm*, 2010, 400(1/2): 183-193.
- [19] Qin C, Du Y, Xiao L, et al. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity [J]. *Int J Biol Macromol*, 2002, 31(1-3): 111-117.
- [20] Pavinatto A, Pavinatto F J, Delezuk J A D M, et al. Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants [J]. *Colloids Surf B: Biointerf*, 2013, 104: 48-53.
- [21] 何黎黎,邓 黎,林芸竹.红景天苷壳聚糖纳米粒的制备及其体外释放性能研究 [J]. 中草药,2013,44(5): 552-556.
- [22] Wu J, Wang Y, Yang H, et al. Preparation and biological activity studies of resveratrol loaded ionically cross-linked chitosan-TPP nanoparticles [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 175: 170-177.

- [23] Nallamuthu I, Devi A, Khanum F. Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2015, 10(3): 203-211.
- [24] 陈立亚, 于宝珠, 赵慧芳. Zeta 电位及其在药学分散体系研究中的应用 [J]. *药物分析杂志*, 2006, 26(2): 281-285.
- [25] Pozzo L D, Conceicao T F, Spinelli A, *et al.* Chitosan coatings crosslinked with genipin for corrosion protection of AZ31 magnesium alloy sheets [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 181: 71-77.
- [26] 莫李立, 王素军, 杨本坤. 阿魏酸在 Caco-2 细胞模型的通透性及其在大鼠体内吸收特性研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(5): 947-951.
- [27] 吕晓君, 曹易丹, 何开勇. Caco-2 细胞体外吸收模型的建立及验证 [J]. *医药导报*, 2018, 37(11): 1311-1315.
- [28] Hubatsch I, Ragnarsson E G E, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(9): 2111-2119.
- [29] 谭梅娥, 姜雯, 曾诚, 等. 田蓟苷固体脂质纳米粒的优化及其在 Caco-2 细胞模型中的吸收和转运研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(10): 2051-2060.
- [30] Chen X, Li D, Yu G, *et al.* Pharmacokinetics of Panax notoginseng saponins in adhesive and normal preparation of Fufang Danshen [J]. *Eur J Drug Metab Ph*, 2018, 43(2): 215-225.
- [31] 杨琄琄. 复方丹参制剂有效组分促吸收方法的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2012.
- [32] Schipper N G M, Vårum K M, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(11): 1686-1692.
- [33] Opanasopit P, Aumklad P, Kowapradit J, *et al.* Effect of salt forms and molecular weight of chitosans on *in vitro* permeability enhancement in intestinal epithelial cells (Caco-2) [J]. *Pharm Dev Technol*, 2008, 12(5): 447-455.
- [34] Florence A T. Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting [J]. *J Drug Target*, 2008, 12(2): 65-70.