

原人参二醇纳米混悬剂的大鼠在体肠吸收研究

李之韬^{1,2}, 王向涛^{1,2}, 郑欢^{1,2}, 韩美华^{2*}

1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 北京协和医学院药用植物研究所 制剂室, 北京 100193

摘要: **目的** 考察原人参二醇纳米混悬剂的在体肠吸收特征。**方法** 采用溶剂蒸发法, 以白蛋白作为稳定剂制备原人参二醇纳米混悬剂。以酚红为标示物, 采用大鼠在体单向肠灌注法评价原人参二醇纳米混悬剂的大鼠在体肠吸收特性。**结果** Zetasizer nano ZS 仪测得原人参二醇纳米混悬剂平均粒径为 (220 ± 10) nm, Zeta 电位为 (-28 ± 0.2) mV。肠吸收实验表明, 原人参二醇纳米混悬剂在整个肠段都有吸收, 且吸收速率常数 (K_a) 与渗透系数 (P_{eff}) 均大于原人参二醇原药 ($P < 0.05$), 原人参二醇纳米混悬剂在小肠段(十二指肠、空肠和回肠)的 K_a 与 P_{eff} 均大于结肠 ($P < 0.05$)。**结论** 原人参二醇纳米混悬剂能够有效促进原人参二醇的大鼠在体肠吸收, 其转运机制可能为主动转运或促进扩散。

关键词: 原人参二醇; 纳米混悬剂; 肠吸收; 大鼠在体单向肠灌注

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)02-0175-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.02.012

Intestinal absorption of protopanaxadiol nanosuspension *in situ* of rats

LI Zhi-tao^{1,2}, WANG Xiang-tao^{1,2}, ZHENG Huan^{1,2}, HAN Mei-hua²

1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Manufacturing Laboratory, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** To investigate the rat intestinal absorption characters of protopanaxadiol (PPD) nanosuspensions (NPS). **Methods** PPD-NPS were made by using solvent evaporation method with bovine serum albumin as carrier. The absorption of PPD-NPS were evaluated with phenol red as the marker by *in situ* single-pass perfusion model of rats. **Results** The mean diameter of the particle (220 ± 10) nm and the Zeta potential (-28 ± 0.2) mV were studied using Zetasizer nano ZS instrument. The result of rat intestinal absorption indicated that the absorption of PPD-NPS was observed in the whole intestinal tract. The absorption constant (K_a) and the effective absorption coefficient (P_{eff}) of PPD-NPS were higher than those of the bulk drug ($P < 0.05$), the K_a and P_{eff} of PPD-NPS at small intestine (duodenum, jejunum, and ileum) were higher than those at colon ($P < 0.05$). **Conclusion** PPD-NPS can improve the absorption of PPD in rat intestine. The transport mechanism may be active transport or facilitated diffusion.

Key words: protopanaxadiol; nanosuspensions; intestinal absorption; *in situ* rat single-pass intestinal perfusion

20 (S)-原人参二醇 (20 (S)-protopanaxadiol) 是从西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的茎叶中提取、分离、转化而得到的天然抗癌新药, 具有十分广泛的抗肿瘤作用^[1], 结构式见图 1。但是由于原人参二醇水溶性低, 口服后生物利用度极差, 因此无法直接口服给药, 很大程度上限制了它的临床应用和疗效的发挥。纳米混悬剂作为药物制剂新技术, 是近乎“纯药物”的纳米级颗粒^[2-3], 具有最大限度的载

药量和药物传输效率。本文选用白蛋白作为稳定剂, 制备了原人参二醇纳米混悬剂, 研究了制得的纳米混悬剂的粒径、Zeta 电位、在肠灌液中的稳定性等性质, 并对原人参二醇纳米混悬剂和微米混悬剂大鼠在体肠吸收特性进行了比较研究。为纳米混悬剂作为促进原人参二醇口服吸收的药物载体的可行性及原人参二醇新型给药系统的口服制剂的设计提供科学依据。

收稿日期: 2014-10-28

基金项目: 国家自然科学基金 (NO 81102813); 黑龙江中医药大学重点实验室开放课题 (2013kf05)

作者简介: 李之韬 (1989—), 女, 硕士研究生, 专业方向为药物新剂型。E-mail: lizhitaojiayou@163.com

*通信作者 韩美华 (1975—), 女, 山西朔州人, 副研究员, 博士, 主要从事改善难溶性药物溶解度、提高生物利用度等研究。

Tel: (010) 57833266 E-mail: hanmeihua727@163.com

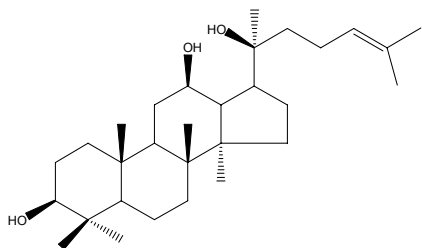


图1 20 (S)-原人参二醇的结构式

Fig. 1 Chemical structure of 20 (S)-protopanaxadiol

1 仪器和材料

AL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司), KQ3200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), RE 52CS 旋转蒸发仪(上海振捷实验设备有限公司), Zetasizer-nano-zs90 纳米粒度及 zeta 电位分析仪(马尔文仪器有限公司), UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津), DIONEXU3000 高效液相色谱仪(戴安中国有限公司), ES-53 真空冷冻干燥机(VirTis wizard2.0), 恒温蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

20 (S)-原人参二醇(上海中药创新研究中心, 质量分数>99%), 牛血清白蛋白 V(批号 20120310, 北京冬歌生物科技有限公司, 分析纯), 乌拉坦(批号 20210317, 国药集团化学试剂有限公司, 分析纯), Krebs-Ringer 试液(1 000 mL 内含 NaCl 7.5 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.37 g, NaHCO₃ 1.37 g, NaH₂PO₄ 0.32 g, MgCl₂ 0.02 g, 葡萄糖 1.4 g), 羧甲基纤维素钠(批号 120305-3, 国药集团化学试剂有限公司, 分析纯), 甲醇(批号 A452-4, Fisher, 色谱纯), 水为高纯水, 其他试剂均为分析纯。

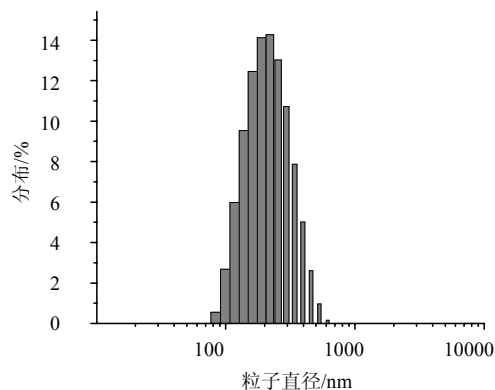
健康雄性 SD 大鼠(200±20) g, SPF 级, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证编号 11400700006035, 许可证号 SCXK(京) 2012-0001。

2 方法与结果

2.1 原人参二醇纳米混悬剂的制备及粒径、Zeta 电位的测定

精密称取 200.0 mg 原人参二醇于西林瓶中加丙酮溶解, 再精密称取牛血清白蛋白 V 200.0 mg 于烧杯中加 20 mL 水溶解。在室温、250 W 超声匀浆搅拌(300 r/min)的条件下将原人参二醇的丙酮溶液慢速注入牛血清白蛋白 V 水溶液中, 然后 40 °C 的条件下旋转蒸发除去丙酮, 即得原人参二醇纳米混悬剂^[4-5]。按上述方法制备 3 批原人参二醇纳米混悬剂, 分别吸取适量于测量池中, 利用 Zetasizer nano

ZS 型纳米粒度仪来测定原人参二醇纳米混悬剂的粒径和电位值。经测定, 原人参二醇纳米混悬剂平均粒径为 (220.6 ± 10) nm, PDI 为 0.129 ± 0.009 , 呈单分布状态, 粒度分布见图 2, 由图 2 可知原人参二醇纳米混悬剂粒度分布较窄。Zeta 电位仪测得原人参二醇纳米混悬剂带负电荷, Zeta 电位为 (-28.0 ± 0.5) mV ($n=3$)。

图2 原人参二醇纳米混悬剂粒径分布曲线 ($n=3$)Fig. 2 Diameter distribution of PPD-NPS ($n=3$)

2.2 供试液的配制

2.2.1 原人参二醇对照品溶液^[6-7]的配制 精密称取羧甲基纤维素钠 2.0 g 于 500 mL 量瓶中, 然后加入适量 Korbs-Ringer 试液 60 °C 加热溶胀后冷却到室温, 再加入原人参二醇原粉 25.0 mg, 牛血清白蛋白 V 25.0 mg, 酚红 10.0 mg, 最后用 Korbs-Ringer 试液定容到 500 mL, 并借助超声将原人参二醇分散均匀。

2.2.2 原人参二醇纳米混悬剂供试液的配制 精密称取原人参二醇纳米混悬剂 50.0 mg, 酚红 10.0 mg 于 500 mL 量瓶中, 然后加入 Korbs-Ringer 缓冲液(pH 7.4)定容, 摇匀即得。

2.3 肠灌流液中原人参二醇的测定

2.3.1 色谱条件^[8] 色谱柱为 COSMOSIL 5 C₁₈-MS-II 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(95:5); 柱温为 25 °C; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长 203 nm; 进样量 20 μL; 在 203 nm 处吸收最强。

2.3.2 方法专属性 按照“2.3.1”项下色谱条件, 取只加入酚红的肠灌流液和加入原人参二醇与酚红的灌流液进行冻干, 冻干后的样品加入一定量的色谱甲醇超声破坏, 将上清过 0.22 μm 有机微孔滤膜, 取续滤液进高效液相色谱仪进行测定, 色谱图见图 3^[9]。

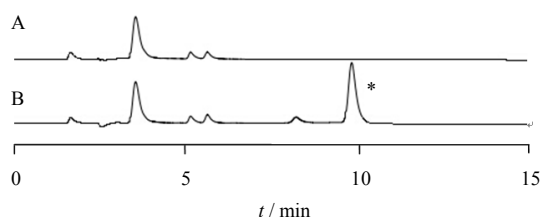


图3 空白肠灌流液(A)、原人参二醇的肠循环灌流液(B)的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC of blank perfusate (A), PPD intestinal recirculating perfusate (B)

从图3可以看出,原人参二醇的保留时间为9.893 min,与空白肠灌流液中的物质峰分离良好,可见空白肠灌流液对原人参二醇的含量测定没有干扰,色谱峰形良好。

2.3.3 标准曲线的绘制 精密吸取原人参二醇对照品储备液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL分别置于100 mL量瓶中,以适量Korbs-Ringer缓冲液将其分别稀释为0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL,吸取各质量浓度溶液20 μ L各测定3次,在“2.3.1”色谱条件下以峰面积对质量浓度进行线性回归,求得标准曲线方程为 $A=380.21C+0.2585$, $r=0.9991$ ($n=3$),表明原人参二醇在0.10~0.02 mg/mL线性关系良好,平均回收率为101.04%,RSD为1.45%。

2.3.4 准确度及精密度试验 精密吸取原人参二醇对照品溶液适量,用空白肠灌流液配制高、中、低(9.738、6.492、3.246 μ g/mL)3个浓度的溶液,按“2.3.2”项下方法进行处理测定,记录峰面积。以上述低、中、高3个质量浓度求算法日内、日间的精密度与准确度。计算得原人参二醇低、中、高3个浓度的相对回收率分别为(104.21 $\pm$ 1.8)%、(99.12 $\pm$ 4.2)%、(108.9 $\pm$ 2.6)%,日内与日间RSD均小于2.5%。结果表明,本法可用于肠循环液中原人参二醇的测定。

2.4 肠灌流液中酚红的测定

2.4.1 酚红标准曲线的制备 精密吸取用K-R试液配制的质量浓度分别为10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μ g/mL的酚红标准溶液各0.5 mL,加入0.2 mol/L NaOH溶液5 mL,混合均匀,以0.2 mol/L NaOH溶液为参比溶液,在558 nm处测吸光度,以吸光度对酚红质量浓度进行线性回归,得标准曲线方程为: $A=0.0899C+0.0091$, $r^2=0.9996$ ($n=3$),线性范围为10.0~100.0 μ g/mL。平均回收

率为99.21%,RSD为1.28%。

2.4.2 肠灌流液中酚红的测定 精密吸取肠灌流液0.5 mL,加入0.2 mol/L NaOH 5 mL,以0.2 mol/L NaOH为空白,在558 nm处测吸光度,由标准曲线方程求得酚红质量浓度^[9]。

2.5 原人参二醇和酚红在灌流液中的稳定性考察

将原人参二醇原粉肠灌流液和原人参二醇纳米混悬剂肠灌流液分别置37 $^{\circ}$ C循环4 h,分别于0 h和4 h取样,比较循环前后粒径变化并测定灌流液中原人参二醇和酚红的质量浓度,以0 h质量浓度为100%,计算4 h后原人参二醇和酚红的剩余百分比,考察原人参二醇和酚红在灌流液中的稳定性。

经测定,37 $^{\circ}$ C循环4 h后,其粒径均无明显变化。原人参二醇肠灌流液中的原人参二醇和酚红质量浓度分别为初始浓度的(99.62 $\pm$ 0.89)%和(99.11 $\pm$ 0.55)% ($n=3$);原人参二醇纳米混悬剂肠灌流液中的原人参二醇和酚红浓度分别为初始浓度的(99.26 $\pm$ 0.39)%和(99.39 $\pm$ 0.44)% ($n=3$),结果表明原人参二醇和酚红在灌流液中有较好的化学稳定性。

2.6 大鼠肠壁及灌流管对药物吸附的考察

2.6.1 大鼠肠壁对药物吸附的考察 剪取用Korbs-Ringer (pH=7.4)试剂清洗干净的大鼠肠段约10 cm,分别置于一定量已知浓度的原人参二醇肠灌流液和原人参二醇纳米混悬剂肠灌流液中,恒温(37 $^{\circ}$ C)水浴中孵育,分别于0 h和4 h取样0.1 mL,以零时间点药物量为100%,计算孵育后原人参二醇和酚红的剩余率^[9]。

经测定,孵育4 h后,原人参二醇肠灌流液中的原人参二醇和酚红的剩余率分别为(99.65 $\pm$ 0.22)%和(99.43 $\pm$ 0.88)% ($n=3$);原人参二醇纳米混悬剂肠灌流液中的原人参二醇和酚红的剩余率分别为(98.85 $\pm$ 0.24)%和(99.56 $\pm$ 0.58)% ($n=3$);可认为大鼠肠壁对原人参二醇和酚红基本无物理吸附。

2.6.2 灌流管对药物吸附的考察 剪取与灌流实验相同长度的输液管,其余操作同“大鼠肠壁对药物吸附的考察”方法,考察PVC材质的输液管对药物是否有物理吸附作用^[9]。

经液相测得,加入硅胶管孵育后的原人参二醇浓度为原药液浓度的(99.12 $\pm$ 0.89)% ($n=3$),可认为灌流用硅胶管对原人参二醇基本无吸附。

2.7 大鼠在体肠循环灌流实验

2.7.1 方法 取自然饮水条件下禁食 24 h 的健康雄性 SD 大鼠 10 只, 随机分为两组, 实验前将大鼠禁食 24 h (可自由饮水), ip 乌拉坦生理盐水溶液 (1.0 g/kg), 麻醉后背位固定。腹部用红外灯维持体温 (37 ± 0.5) °C, 延腹中线切开腹部 (约 4 cm), 分别于十二指肠、空肠、回肠、结肠 4 个肠段插入导管, 用线结扎固定, 插管后将小肠部分小心放回肠腔, 尽可能避免扭结和卷曲。切口用浸润等渗生理盐水的纱布覆盖以保湿, 用 37 °C 恒温生理盐水以 5 mL/min 的体积流量冲净肠内容物, 然后用空气将生理盐水排净。实验时分别将恒温 (37 ± 0.5) °C 的 100 mL 原人参二醇原料药供试液和原人参二醇纳米混悬剂供试液 (原人参二醇质量浓度均为 50 $\mu\text{g/mL}$), 以 5 mL/min 流速循环 15 min 以达到平衡, 然后从供试液烧杯中取样两份分别用于测定药物和酚红 0 h 的浓度, 并补加 2 mL 酚红溶液 (质量浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$), 之后将流速调至 2.5 mL/min, 按此法分别于 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 h 分段吸取回流液 2 mL (同时补加等量的酚红补液), 按 2.3 项下“肠灌流液中原人参二醇的测定”方法, 分别计算各时间点药物的质量浓度^[10-11]。剩余样品按 2.4 项下“肠灌流液中酚红的测定”方法, 计算得出酚红的质量浓度, 即各时间点供试液的体积。

2.7.2 灌流液体积的校正及数据处理 肠道在吸收药物的过程中, 也会吸收水分, 导致灌流液的体积发生变化, 因此须对其体积变化进行校正。由于酚红在肠道生理条件下不被吸收, 故本实验利用酚红浓度的变化来校正不同时刻供试液体积^[9]。在体大鼠单向肠灌流实验中所测得出口处的样品浓度 [$C_{\text{out (corrected)}}$], 用公式 (1) 校正, 药物 P_{eff} 可以用公式 (2) 计算, 吸收速率常数 (K_a) 用公式 (3)

计算。

$$C_{\text{out (corrected)}} = \frac{C_{\text{out}} PR_{\text{in}}}{PR_{\text{out}}} \quad (1)$$

$$P_{\text{eff}} = \frac{Q \ln(C_{\text{in}}/C_{\text{out (corrected)}})}{2\pi r L} \quad (2)$$

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{\text{out (corrected)}}}{C_{\text{in}}} \right) Q / \pi r^2 L \quad (3)$$

式中 $C_{\text{out (corrected)}}$ 和 C_{out} 分别为出口处经校正后的原人参二醇的浓度和实际测得的原人参二醇的浓度; C_{in} 为灌流液中原人参二醇的浓度; PR_{in} 、 PR_{out} 分别为入口处和出口处酚红的浓度; Q 为肠道灌流液的流速 (2.5 mL/min); L 和 r 分别为被灌流液肠段的长度和内径 (cm)。

利用统计学分析软件 SPSS 19 处理数据, 组间比较采用 t 检验。

2.7.3 结果 本实验分别考察原人参二醇原料药和原人参二醇纳米混悬剂不同肠段的肠吸收情况, 结果见表 2。与原人参二醇相比, 原人参二醇纳米混悬剂在各肠道吸收较多, 说明制成纳米混悬剂能显著改善原人参二醇的肠道吸收。

根据文献报道^[12], 有效渗透系数 (P_{eff}) $< 0.03 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ 和 $> 0.2 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ 分别表示药物难以吸收和易于吸收, 而原人参二醇与原人参二醇纳米混悬剂在 4 个肠段的 P_{eff} 值均大于 $0.2 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$, 表明原人参二醇与原人参二醇纳米混悬剂在各肠段吸收良好, 且各段的 P_{eff} 值按大小依次为十二指肠、空肠、回肠、结肠。而其在小肠各肠段与结肠的 P_{eff} 值存在差异, 可能是由于结肠表面没有微绒毛, 其有效吸收面积较小肠小, 故表现出药物在结肠的吸收较小肠差, 所以小肠为原人参二醇的主要吸收部位。

表 2 原人参二醇纳米混悬剂与原人参二醇溶液的大鼠在体肠吸收参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Absorption parameters of PPD-NPS and PPD solution in rat intestines *in situ*

肠段	原人参二醇		原人参二醇纳米混悬剂	
	$K_a / (\times 10^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$P_{\text{eff}} / (\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$	$K_a / (\times 10^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$P_{\text{eff}} / (\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$
十二指肠	0.52±0.12	6.24±1.49	1.67±0.64**	16.51±2.66**
空肠	0.31±0.21	4.92±1.37	1.01±0.29**	10.32±1.98*
回肠	0.27±0.14	3.21±1.98	0.53±0.21*	6.64±1.33*
结肠	0.16±0.23	2.37±1.66	0.35±0.26*	5.57±1.36*

与原人参二醇溶液组相比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PPD solution

3 讨论

本实验采用大鼠在体肠灌流模型,以 2.5 mL/min 的体积流量对大鼠四个肠段进行灌流,考察药物与制剂在不同肠段的吸收情况,该方法既保证了正常肠道神经、血液和淋巴液的供应,又与口服给药后药物接触的肠道环境较接近,因此可以较好的模拟人体肠道吸收情况,与人体肠道吸收有良好的相关性^[13]。

与原人参二醇原料药相比,制备的原人参二醇纳米混悬剂显著提高了原人参二醇在肠道的吸收,分析其原因是本实验制备所得的原人参二醇纳米混悬剂粒径在 220.6 nm 左右且表面包裹着牛血清白蛋白 V,使得纳米粒易于与胃肠黏膜上皮细胞接触,相对于原料药而言,更容易透过肠道的黏液层,更易被肠道上皮细胞及小肠壁的集合淋巴结(Peyer's)中的 M 细胞摄取转运^[14],故显著提高了口服难吸收药物原人参二醇的在体肠吸收,具有良好的应用潜能。

参考文献

- [1] 范继业. 20 (S)-原人参二醇抑制小细胞肺癌 A549 细胞增殖的研究 [J]. 中草药, 2008, 39(12): 1838-1841.
- [2] Rao GC, Kumar MS, Mathivanan N, *et al.* Nanosuspensions as the most promising approach in nanoparticulate drug delivery systems [J]. *Pharmazie*, 2004, 59(1): 5-9.
- [3] Patravale VB, Date AA, Kulkarni RM. Nanosuspensions: a promising drug delivery strategy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(7): 827-840.
- [4] 韩美华, 陈 婧, 王向涛. 20 (S) 原人参二醇药质体的制备及体外评价 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 7-11.
- [5] 韩美华, 陈 婧, 王向涛. 氢化磷脂制备原人参二醇药质体及体外评价 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(10): 5-8.
- [6] 李金明, 林东海, 李延团. 黄芩苷固体脂质纳米粒的制备及大鼠在体肠吸收研究 [J]. 烟台大学学报, 2011, 24(1): 54-58.
- [7] 张 燕, 朱华旭, 郭立玮. 在体单向肠灌流模型研究小檗碱及其在复方配伍环境中的大鼠肠吸收特性 [J]. 药学报, 2012, 47(2): 233-238.
- [8] 陈 婧, 韩美华, 王 键, 等. 20(S)-原人参二醇 4 种剂型在体透皮实验的初步研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(6): 354-358.
- [9] 李草草, 张振海, 张银龙, 等. 穿膜肽修饰紫杉醇固体脂质纳米粒的大鼠在体肠吸收研究 [J]. 药学报, 2013, 48(1): 131-137.
- [10] 张 艳, 王 平, 王进荣, 等. 在体单向肠灌流模型研究大黄素的大鼠肠吸收特性 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 286-290.
- [11] Caroline M, Ulla M, Andreas R, *et al.* Regional absorption of fexofenadine in rat intestine [J]. *Eur J Pharmaceut Sci*, 2010, 41: 670-674.
- [12] Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(9): 1336-1342.
- [13] 赵艳红, 贾晓斌, 陈 彦, 等. 淫羊藿黄酮类化合物的大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(3): 188-191.
- [14] 沈 凯, 王景田. 药物肠吸收实验研究方法进展 [J]. 中国新药杂志, 2003, 12(12): 988.