

## 阿苯达唑-胆酸衍生物的制备、表征、跨膜转运及降解评价

唐世珍<sup>1</sup>, 郭志梅<sup>1</sup>, 聂开立<sup>2</sup>, 刘敬帅<sup>2</sup>, 胡春晖<sup>1, 3\*</sup>

1. 青海大学 医学部, 青海 西宁 810001

2. 北京化学技术大学 生命科学与技术学院, 北京 100086

3. 三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016

**摘要:** 目的 基于顶端钠依赖性胆盐转运体 (ASBT) 对胆酸 (BA) 的特异性识别, 为提高阿苯达唑 (ABZ) 的跨膜转运效率, 制备阿苯达唑-胆酸衍生物 (ABZ-C6O2-BA), 并对其固态性质、跨膜转运行为和降解机制进行评价。方法 以6-氨基-1-羟基-二己脂作为 Linker 连接 ABZ 与 BA, 合成 ABZ-C6O2-BA; 使用核磁共振氢谱 (<sup>1</sup>H-NMR) 和傅里叶红外技术 (FT-IR) 对 ABZ-C6O2-BA 进行验证; 通过粉末 X 射线衍射 (PXRD) 法、差示扫描量热 (DSC) 法和扫描电子显微镜 (SEM) 法进行固态性质的表征; 建立 Caco-2 单层细胞模型在体外对 ABZ-C6O2-BA 进行跨膜转运研究; 进行 ABZ-C6O2-BA 体外羧酸酯酶 (CES) 水解反应, 通过超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS) 定性分析 ABZ-C6O2-BA 水解产物。结果 <sup>1</sup>H-NMR 和 FT-IR 结果显示特征峰的偏移, 证实 ABZ-C6O2-BA 制备成功; PXRD、DSC 和 SEM 结果显示 ABZ-C6O2-BA 为无定型形态, 且微观结构较 ABZ 有明显不同; 体外跨膜转运实验结果显示高质量浓度的 ABZ-C6O2-BA 跨膜转运表现渗透系数 ( $P_{app}$ ) 显著高于高浓度的 ABZ ( $P < 0.05$ ), 中、低质量浓度的 ABZ-C6O2-BA  $P_{app}$  相等于 ABZ; ABZ-C6O2-BA 在 72 h 时降解率 > 92.8%, 代谢良好; 通过 UPLC-MS 定性分析 ABZ-C6O2-BA 水解产物为 ABZ-Linker, 即 CES 水解了酯键, 使得 BA 与 ABZ 分开。结论 所制备的 ABZ-C6O2-BA 以无定型态存在, 跨膜转运效率在一定浓度下较 ABZ 显著增加, 且与浓度不相关, 推测跨膜方式为主动转运, 连接的 BA 可被体内的酶水解。

**关键词:** 阿苯达唑; 胆酸; 顶端钠依赖性胆盐转运体 (ASBT); Caco-2 细胞; 跨膜转运; 降解

中图分类号: R943 文献标志码: 文章编号: 1674-6376 (2024) 08-1860-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.019

## Preparation, characterization, transmembrane transport, and degradation evaluation of albendazole cholic acid derivatives

TANG Shizhen<sup>1</sup>, GUO Zhimei<sup>1</sup>, NIE Kaili<sup>2</sup>, LIU Jingshuai<sup>2</sup>, HU Chunhui<sup>1,3</sup>

1. Department of Medicine, Qinghai University, Xining 810001, China

2. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical of Technology, Beijing 100086, China

3. Sanjiangyuan State Key Laboratory of Ecology and Plateau Agriculture and Animal Husbandry, Xining 810016, China

**Abstract: Objective** To improve the transcellular transport efficiency of albendazole (ABZ) by preparing a novel compound, ABZ-C6O2-BA, based on the specific recognition of the apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) for bile acid (BA). The solid state properties, transcellular transport behavior, and degradation mechanism of ABZ-C6O2-BA were evaluated. **Method** ABZ-C6O2-BA was synthesized by linking ABZ with BA using 6-aminodihydroxy-dipentyl glycerol as the linker. The synthesized ABZ-C6O2-BA was verified by <sup>1</sup>H-NMR and FT-IR. The solid state properties were characterized by powder X-ray diffraction (PXRD), differential scanning calorimetry (DSC), and scanning electron microscopy (SEM). The transcellular transport behavior of ABZ-C6O2-BA was studied *in vitro* using a Caco-2 monolayer cell model. The degradation mechanism of ABZ-C6O2-BA was evaluated by *in vitro* carboxylesterase (CES) hydrolysis, and the hydrolysis products were quantitatively analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS). **Results** The <sup>1</sup>H-NMR and FT-IR results showed a shift in characteristic peaks, confirming the successful synthesis of ABZ-C6O2-BA. The PXRD, DSC, and SEM results showed that ABZ-C6O2-BA was amorphous in form, and its microstructure was significantly different from that of ABZ. The *in vitro* transcellular transport

收稿日期: 2024-01-30

基金项目: 2022年青海省科技厅科技援青合作专项(2022-QY-201)

第一作者: 唐世珍, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物制剂研发。E-mail: tangshizhen199805@163.com

\*通信作者: 胡春晖, 男, 副教授/博士生导师, 研究方向为抗寄生虫病的药物研发。E-mail: chunhuihu@hotmail.com

experiment results showed that the apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ ) of high-quality ABZ-C6O2-BA across the membrane was significantly higher than that of high-concentration ABZ ( $P < 0.05$ ), and the  $P_{app}$  of medium- and low-quality ABZ-C6O2-BA was similar to that of ABZ. The degradation rate of ABZ-C6O2-BA was  $> 92.8\%$  at 72 h. By UPLC-MS qualitative analysis, the hydrolysis product of ABZ-C6O2-BA was identified as ABZ-Linker, indicating that the CES hydrolyzed the ester bond, separating BA from ABZ. **Conclusion** The ABZ-C6O2-BA prepared in this study exists in an amorphous state, and its transmembrane transport efficiency is significantly increased at certain concentrations, which is independent of the concentration, suggesting that the transmembrane mode is active transport. The connected BA can be hydrolyzed by enzymes in the body.

**Key words:** albendazole; cholic acid; apical sodium-dependent bile salt transporter (ASBT); Caco-2 cells; transmembrane transport; degradation

棘球蚴病俗称包虫病,是由棘球绦虫的幼虫感染所致的人畜共患寄生虫病<sup>[1-2]</sup>。据世界卫生组织2021年统计,全世界每年有100多万人受到包虫病的影响,给人类造成严重的健康与经济负担<sup>[3]</sup>。阿苯达唑(ABZ)作为目前公认的治疗棘球蚴病的唯一有效的药物,自1973年由葛兰素史克(GSK)推出上市以来备受关注<sup>[4]</sup>。ABZ在临床应用过程中,低溶解度是导致其血药浓度低,临床疗效不稳定的主要原因<sup>[5]</sup>。因此提高ABZ的溶解度对其临床应用非常重要,一些药剂学技术被用来尝试提高ABZ的水溶性<sup>[6]</sup>,包括固体分散体<sup>[7]</sup>、纳米晶体<sup>[8]</sup>、脂质体<sup>[9]</sup>、包合物<sup>[10]</sup>等。但由于载药效率较低、表面活性剂用量过多、制备工艺复杂、稳定性未知等原因,限制了药物制剂的进一步应用或工业化生产。因此,研发有效、稳定、患者顺应性好及可生产市售的ABZ新剂型成为目前包虫病治疗的迫切需要。

顶端钠依赖性胆盐转运体(ASBT)是在回肠末端上皮细胞的顶端刷状缘膜中高度表达的一种膜转运蛋白<sup>[11-12]</sup>,属于转运蛋白的溶质载体家族(SLC),是一种高效、高容量的转运体,和回肠上皮细胞细胞质的胆酸结合蛋白结合,负责胆酸(BA)向小肠细胞转运,是表达于小肠的重要载体蛋白。ASBT因在回肠的高水平表达、高底物特异性和高

转运能力,使其成为一个潜在的输送靶点<sup>[13-14]</sup>,以提高许多药物的口服生物利用度。根据文献报道<sup>[15]</sup>,设计药物分子与天然BA或BA衍生物通过化学偶联而成的BA-药物偶联物可能被ASBT识别为底物,从而转运到肠上皮细胞。如有研究发现BA配合阿昔洛韦<sup>[16]</sup>、加巴喷丁<sup>[17]</sup>、阿糖胞苷<sup>[18]</sup>和喜树碱<sup>[19]</sup>等药物,可提高药物体外渗透性和体内口服生物利用度。

本课题组的前期研究发现ASBT在肝泡型包虫病原位大鼠模型回肠组织较正常大鼠表达明显升高,且以4-氨基-1-丁醇作为Linker的ABZ-C4-BA在大鼠体内的生物利用度较ABZ提高近40倍<sup>[20]</sup>。基于此,本研究改变了连接ABZ与胆酸的Linker,以6-氨基-1-羟基-二己脂作为Linker制备阿苯达唑-胆酸衍生物(ABZ-C6O2-BA),与ABZ-C4-BA相比,烷基构成的Linker会导致ABZ的脂溶性增加。本研究通过化学合成的方法制备ABZ-C6O2-BA(图1),使用核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)、傅里叶红外技术(FT-IR)、粉末X射线衍射(PXRD)、差示扫描量热法(DSC)和电子扫描显微镜(SEM)等多种方法对ABZ-C6O2-BA进行表征。通过Caco-2转运实验研究了不同浓度的ABZ及ABZ-C6O2-BA的跨膜转运行为,并进行ABZ-C6O2-BA体外酶水解反应,通

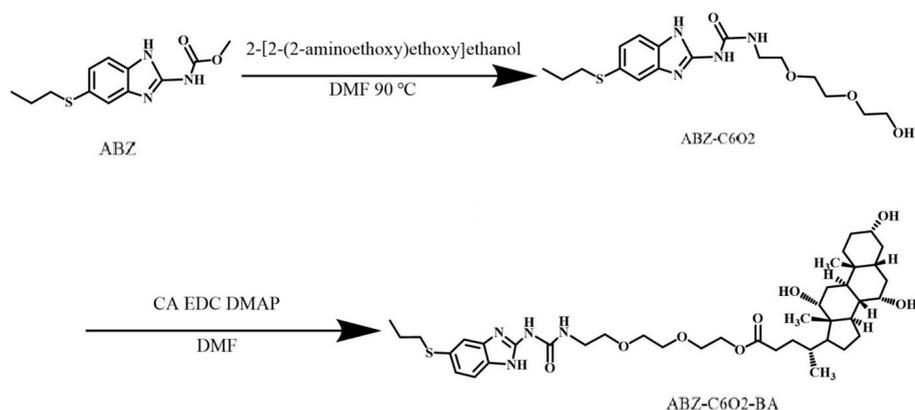


图1 ABZ-C6O2-BA的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of ABZ-C6O2-BA

过超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS)定性分析ABZ-C6O2-BA能否被水解,为后续ABZ-C6O2-BA体内代谢过程的研究提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

AVANCE NEO 600 核磁共振光谱仪(德国Bruker公司);Tensor II傅里叶红外光谱仪(赛默飞世尔科技公司);D-max2500PC射线衍射仪(日本理学株式会社);NETZSCH同步热分析仪(STA449 F3,德国耐驰仪器制造有限公司);Agilent 1260 Series 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);DHG-9070A恒温箱(上海一恒科技仪器有限公司);Dionex UltiMate 3000 傅里叶变换超高分辨液质联用仪(赛默飞世尔科技公司)。

### 1.2 主要试剂

ABZ购自北京偶合科技有限公司,批号C10080946,质量分数98%,规格A822534-5 g;游离胆汁酸胆酸(BAs)购自MACKLIN公司;*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、二环己基碳二亚胺(DCC)和4-二甲氨基吡啶(DMAP)均购自Sigma-Aldrich公司;羧酸酯酶(CES)购自上海润叶生物科技有限公司;甲醇(分析级)购自天津市大茂化学试剂厂。

人结肠腺癌细胞系Caco-2细胞购自赛百慷生物技术股份有限公司。

## 2 方法

### 2.1 ABZ-C6O2-BA的制备

(1)ABZ与6-氨基-1-羟基-二己脂连接得到中间体:称取ABZ(5.0 g、18.9 mmol)与5.6 mL的6-氨基-1-羟基-二己脂溶于15 mL的DMF中,加入磁子,水浴温度95 °C、转速500 r·min<sup>-1</sup>,反应24 h,反应结束后,将水分多次加入到反应液中并搅拌直至有大量沉淀析出,放入冰浴中静置沉淀2 h,经抽滤、烘干得到待分离产物,柱色谱分离使用200~300目硅胶

装柱,以甲醇-二氯甲烷(1:17)展开剂洗脱,以甲醇-二氯甲烷(1:17)(1%乙酸)展开剂经薄层色谱(TLC)展板收集溶有新产物样液。

(2)中间体与胆酸连接:将称取分离得到的中间体与胆酸(1.3 g、3.0 mmol)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)(0.8 g)、DMAP(0.08 g),溶于6 mL DMF,温度25 °C、转速500 r·min<sup>-1</sup>,反应24 h。反应结束后,将水分多次加入到反应液中并搅拌直至有大量沉淀析出,放入冰浴中静置沉淀2 h,经抽滤、烘干得到待分离产物,柱色谱分离使用200~300目硅胶装柱,以甲醇-二氯甲烷(1:17)展开剂洗脱,以甲醇-二氯甲烷(1:17)(1%乙酸)展开剂经TLC展板收集溶有新产物样液。

### 2.2 ABZ-C6O2-BA的表征

**2.2.1 <sup>1</sup>H-NMR法** <sup>1</sup>H-NMR光谱仪工作频率为600 MHz。将固体样品完全溶解于氘代二甲基亚砷(DMSO)中,在25 °C下对制备好的样品进行分析。

纯药物和ABZ-C6O2-BA的NMR谱图如图2-A所示,ABZ的各个质子峰归属情况如下:<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, DMSO), δ 11.96 (s, 1H, NH), 7.23 (d, 1H, *J*=15.34 Hz, Ph-4H), 7.26 (d, 1H, *J*=18.88 Hz, Ph-3H), 7.25 (s, 1H, Ph-2H), 0.98 (d, 3H, *J*=9.48 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.61 (d, 2H, *J*=7.26 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.98 (t, 2H, CH<sub>2</sub>)。ABZ-C6O2-BA的各个质子峰归属情况如下:<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, DMSO), δ 11.79 (s, 1H, NH), 7.23 (d, 1H, *J*=7.86 Hz, Ph-4H), 7.26 (d, 1H, *J*=7.92 Hz, Ph-3H), 7.25 (s, 1H, Ph-2H), 0.98 (d, 3H, *J*=12 Hz, CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.61 (d, 2H, *J*=13.38 Hz, CH<sub>2</sub>), 2.98 (t, 2H, CH<sub>2</sub>)。ABZ结构中的酰胺质子是可能的相互作用位点,ABZ在 $1.196 \times 10^{-5}$ 出现酰胺基峰,而ABZ-C6O2-BA的酰

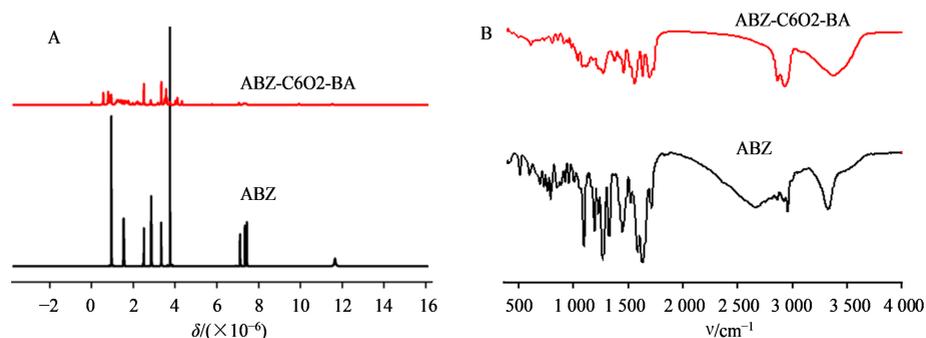


图2 ABZ-C6O2-BA的<sup>1</sup>H-NMR(A)和FT-IR(B)图  
Fig. 2 <sup>1</sup>H-NMR (A) and FT-IR (B) of ABZ-C6O2-BA

胺基峰在  $1.179 \times 10^{-5}$  处,较ABZ偏移了  $1.7 \times 10^{-7}$ 。<sup>1</sup>H-NMR 所得的结果验证了ABZ-C6O2-BA的形成。

**2.2.2 FT-IR法** 取适量待测样品与干燥KBr进行混合,研磨均匀后压成透明薄片,采用Tensor II傅里叶红外光谱仪对待测样品进行检测,扫描范围为  $400 \sim 4\,000\text{ cm}^{-1}$ ,分辨率为  $4\text{ cm}^{-1}$ 。

因为合成ABZ-C6O2-BA后某些特征振动状态可能会受到影响,所以红外特征峰的移动、消失或变化都代表分子间的相互作用<sup>[21]</sup>,通过FT-IR分析ABZ-C6O2-BA有关的结构变化。如图2-B所示,纯ABZ主要显示  $3\,330.6\text{ cm}^{-1}$  处的N-H振动宽峰、 $1\,710.5\text{ cm}^{-1}$  处的C=O峰和  $1\,635\text{ cm}^{-1}$  处的芳香环振动峰。合成的ABZ-C6O2-BA与纯ABZ相比,  $3\,330.6\text{ cm}^{-1}$  处的N-H振动峰都发生红移,红移到  $3\,390.6\text{ cm}^{-1}$ ,而  $1\,710.5\text{ cm}^{-1}$  处的C=O峰发生蓝移,蓝移到  $1\,700.6\text{ cm}^{-1}$ 。这些红外特征峰的移动可能是由于ABZ的苯并咪唑基团发生了质子化,酰胺和

羰基发生了相互作用,质子发生了转移,证明了ABZ-C6O2-BA的形成。FT-IR研究的结果与<sup>1</sup>H-NMR结果相对应,进一步验证了ABZ-C6O2-BA的形成。

**2.2.3 PXRD法** PXRD可进一步证实ABZ和胆酸反应是否形成新晶相<sup>[22-23]</sup>,从而研究分子的结晶或无定形性质。称取适量样品,采用Cu-K $\alpha$ 靶测定 [ $\lambda = 0.154\text{ nm}(1.54\text{ \AA})$ ],扫描范围  $2\theta = 5^\circ \sim 35^\circ$ ,扫描步长  $0.01^\circ$ ,扫描速度  $1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ ,电压  $40\text{ kV}$ ,电流  $200\text{ mA}$ 。

图3-A显示了ABZ和ABZ-C6O2-BA的PXRD图谱,由谱图可知,ABZ的主要  $2\theta$  特征衍射峰分别位于  $6.28^\circ$ 、 $11.77^\circ$ 、 $18.26^\circ$ 、 $24.93^\circ$  和  $27.53^\circ$ ,而ABZ-C6O2-BA的衍射图谱为无特征衍射峰的不规则图形。结果表明,ABZ为晶型,ABZ-C6O2-BA为无定型,即BA的介入可完全打破ABZ的晶体结构,使药物分子以短程无序的状态排列<sup>[24]</sup>。

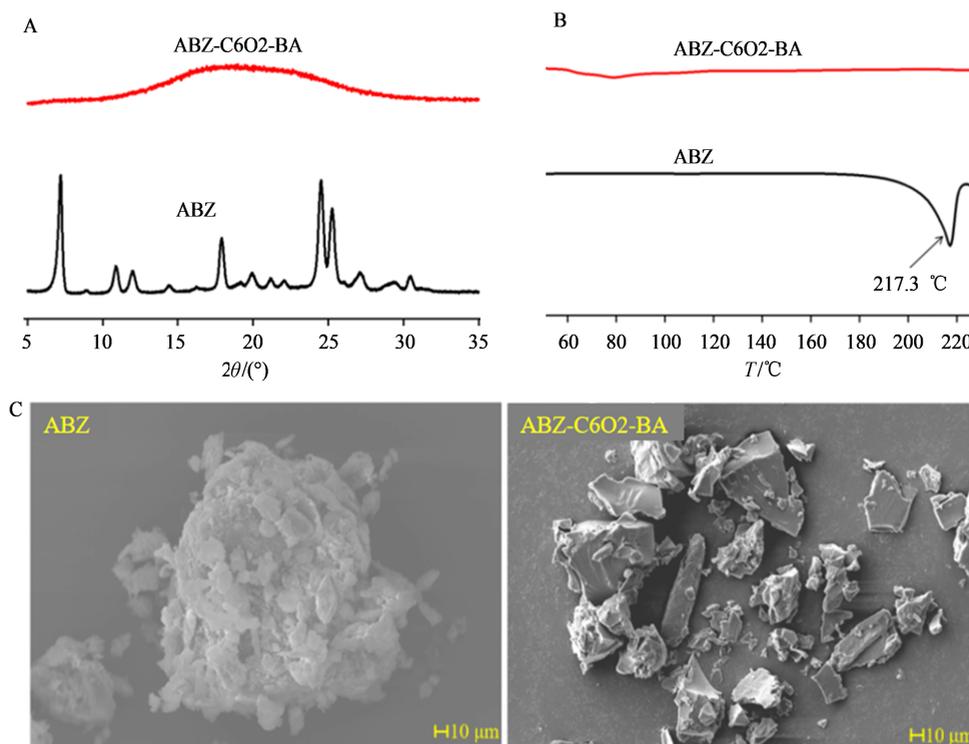


图3 ABZ-C6O2-BA的固态PXRD(A)、DSC(B)、SEM(C)表征图

Fig. 3 Characterization of solid state PXRD (A), DSC (B), and SEM (C) of ABZ-C6O2-BA

**2.2.4 DSC法** 采用天平称量  $5 \sim 10\text{ mg}$  样品,装入铝盘中,在同步热分析仪中进行分析,从  $30\text{ }^\circ\text{C}$  开始以  $10\text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$  的速率升温至  $250\text{ }^\circ\text{C}$ 。

晶体药物存在明显的熔点,而非晶药物只有玻璃转变温度,而无熔点峰<sup>[25]</sup>,基于以上理论,本研究采用DSC成功测定ABZ的熔点,即图3-B显示的吸

热峰,数值为  $217.3\text{ }^\circ\text{C}$ ;而ABZ-C6O2-BA无吸热峰出现,同样表明ABZ-C6O2-BA为无定型态。

**2.2.5 SEM法** 将ABZ与ABZ-C6O2-BA分别黏附在铜台上,镀铂  $180\text{ s}$  后置于SEM,以  $15\text{ kV}$  的操作电压进行观察。

SEM可直观地观察药物的形貌和微观结构,而

固体的微观形态为形成不同的固相提供了证据支持。如图3-C显示,ABZ及ABZ-C6O2-BA的初级颗粒直径在10  $\mu\text{m}$ 的条件下,ABZ为聚拢状片晶,而ABZ-C6O2-BA为不规则片状体。明显可见,ABZ-C6O2-BA较ABZ改变了晶体结构。

### 2.3 高效液相色谱(HPLC)法测定 ABZ、ABZ-C6O2-BA 浓度

**2.3.1 对照品溶液的配制** 精密称取1 mg ABZ至10 mL量瓶中,甲醇定容得到质量浓度为100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,过0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液备用。

**2.3.2 供试品溶液的配制** 称取适量的ABZ-C6O2-BA至10 mL量瓶中,甲醇定容,配制ABZ-C6O2-BA质量浓度为100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,过0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液备用。

**2.3.3 色谱条件** 流动相为甲醇-水(80:20),十八烷基硅烷色谱柱(Diamonsil C<sub>18</sub>, 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )作为固定相,紫外波长295 nm,体积流量1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温箱温度30  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量20  $\mu\text{L}$ 。专属图谱见图4,峰形良好。

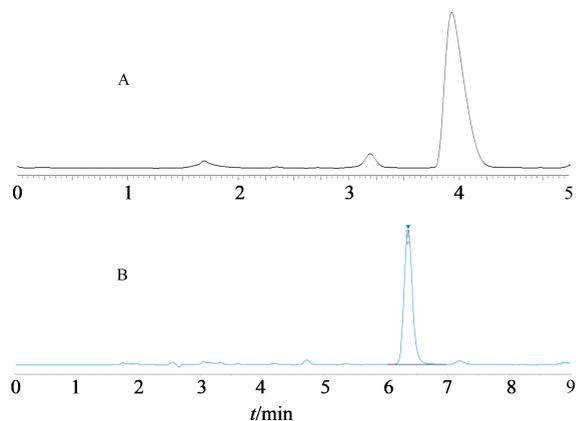


图4 ABZ(A)和ABZ-C6O2-BA(B)的液相图谱

Fig. 4 Liquid-phase profiles of ABZ (A) and ABZ-C6O2-BA (B)

**2.3.4 标准曲线制备** 分别精密称取1.00 mg ABZ和ABZ-C6O2-BA于10 mL量瓶中,甲醇定容得到质量浓度为100.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液。将储备液分别用甲醇稀释2.5、10、20、50、100、200倍,得到质量浓度为50.00、25.00、12.50、6.25、3.12、1.56、0.78  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,按“2.4.3”项下色谱条件进样。标准曲线线性良好,见表1。

**2.3.5 精密度试验** 选取低、中、高(0.78、12.50、100.00  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )3个质量浓度的ABZ和ABZ-C6O2-BA甲醇溶液,按“2.4.3”项下色谱条件进样,重复进样6次,连续测定3 d,计算ABZ和ABZ-C6O2-BA

表1 ABZ-C6O2-BA与ABZ的线性回归方程及相关系数  
Table 1 Linear regression equation and correlation coefficient of ABZ-C6O2-BA and ABZ

分析物	回归方程	$R^2$
ABZ	$Y=36\ 591 X+7\ 671.6$	0.999 9
ABZ-C6O2-BA	$Y=3.847\ 3 X+1.395\ 8$	0.999 8

峰面积的RSD,考察日内精密度和日间精密度。

低、中、高质量浓度的ABZ日内精密度RSD为0.69%、1.21%、1.67%( $n=6$ ),低、中、高质量浓度的ABZ-C6O2-BA日内精密度RSD为0.68%、1.91%、1.36%( $n=6$ );低、中、高质量浓度的ABZ日间精密度RSD分别为0.87%、1.89%、0.55%( $n=6$ ),低、中、高质量浓度的ABZ-C6O2-BA日间精密度RSD分别为0.89%、1.62%、0.56%( $n=6$ )。结果表明该方法精密度良好。

**2.3.6 重复性试验** 平行制备6份供试品溶液,按“2.4.3”项下色谱条件进样测定,记录ABZ和ABZ-C6O2-BA的峰面积并计算RSD。ABZ峰面积RSD为1.34%( $n=6$ ),ABZ-C6O2-BA峰面积RSD为1.68%( $n=6$ ),表明方法的重复性良好。

**2.3.7 稳定性试验** 平行制备6份供试品溶液,室温放置,于0、1、3、6、12、24、48 h取样,按“2.4.3”项下色谱条件进行测定,记录ABZ和ABZ-C6O2-BA的峰面积并计算RSD。ABZ峰面积RSD为1.74%( $n=6$ ),ABZ-C6O2-BA峰面积RSD为1.82%( $n=6$ ),表明供试品溶液在48 h内保持稳定。

**2.3.8 加样回收率** 分别平行取6份供试品溶液与ABZ对照品混合,按“2.4.3”项下色谱条件进行测定,得到ABZ和ABZ-C6O2-BA的含量后计算回收率。ABZ的加样回收率为98.13%,RSD为1.79%( $n=6$ ),ABZ-C6O2-BA的加样回收率为96.61%,RSD为1.62%( $n=6$ ),表明建立的方法符合实验要求。

### 2.4 ABZ-C6O2-BA跨膜转运研究

取对数生长期Caco-2细胞用0.25%胰蛋白酶消化,用完全培养基配成单个细胞悬液,以每孔 $2\times 10^5$ 个细胞接种于12孔Transwell培养板,其中Transwell板的顶侧(AP侧)加入0.5 mL的细胞混悬液,Transwell板的基底侧(BL侧)加入1.5 mL的完全培养基。将培养液板移入培养箱中,在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 及饱和湿度条件下培养21 d,并对建立的Caco-2单层细胞进行完整性、极性以及跨膜转运表观渗透系数( $P_{\text{app}}$ )的评估<sup>[26]</sup>。完整性、极性验证结果见图

5,第21天时,细胞电阻都达到了200 Ω 以上,说明细胞完整性良好,且AP侧的碱性磷酸酶活力远高于BL侧,说明细胞分化完成。表2为细胞第21天时的 $P_{app}$ 结果, $P_{app}$ 都小于透过性实验规定的 $1 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ,说明细胞透过率良好,上述结果说明成功建立Caco-2单层细胞模型,可以进行跨膜转运实验。

在成功制备Caco-2单层细胞模型的基础上,将22、15、5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的ABZ和ABZ-C6O2-BA分别加到Transwell板的AP侧,依次在培养30、60、90、

120 min后从Transwell板的BL侧取样,进行HPLC检测;根据公式计算2种药物的 $P_{app}$ 。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析。

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{A \cdot C_0}$$

$dQ/dt$ 为单位时间药物转运量( $\mu\text{g} \cdot \text{s}^{-1}$ ); $A$ 为转运膜有效面积 $1.12 \text{ cm}^2$ ; $C_0$ 为药物初始浓度

高、中、低质量浓度的ABZ和ABZ-C6O2-BA从Caco-2细胞的AP侧至BL侧的跨膜浓度分别如图6所示,表3为不同质量浓度的ABZ和ABZ-C6O2-BA的 $P_{app}$ ,结果显示高质量浓度的ABZ-C6O2-BA  $P_{app}$ 显著高于高浓度的ABZ组( $P < 0.05$ ),达到了 $7.530 \times 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ,中、低质量浓度的ABZ-C6O2-BA  $P_{app}$ 相接近于ABZ。结果说明ABZ-C6O2-BA的跨膜转运不与浓度相关,推测ABZ-C6O2-BA的跨膜方式为主动转运。

表2 Caco-2细胞第21天时的荧光黄 $P_{app}$   
Table 2 Fluorescent yellow  $P_{app}$  of Caco-2 cells on day 21

板数	$P_{app}/(\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$
1	$(1.63 \pm 0.26) \times 10^{-7}$
2	$(3.28 \pm 0.10) \times 10^{-7}$
3	$(4.62 \pm 0.09) \times 10^{-7}$

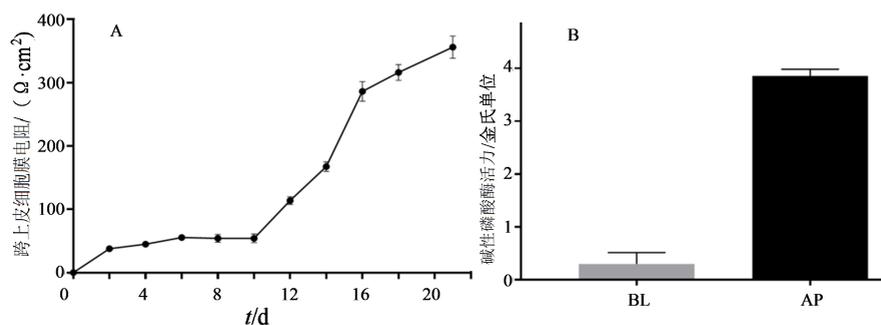
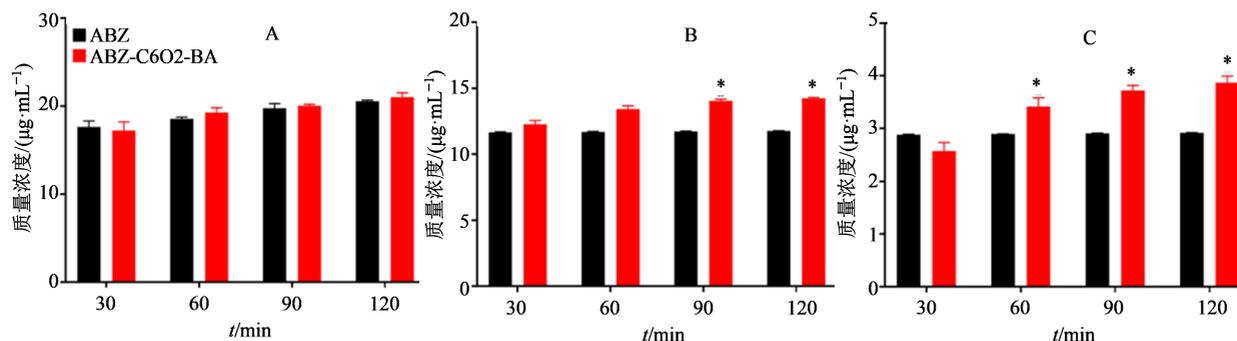


图5 Caco-2细胞第21天时的电阻(A)和碱性磷酸酶活力(B)

Fig. 5 Resistance (A) and alkaline phosphatase activity (B) of Caco-2 cells on day 21



与ABZ组比较: \* $P < 0.01$ 。

\* $P < 0.01$  vs ABZ group.

图6 5 (A)、15 (B)、22 (C)  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的ABZ、ABZ-C6O2-BA的跨膜转运结果

Fig. 6 Transmembrane transport results of ABZ and ABZ-C6O2-BA of 5 (A), 15 (B), and 22 (C)  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

## 2.5 ABZ-C6O2-BA降解研究

为探究ABZ-C6O2-BA中的胆酸能否被体内参与药物代谢的酶水解,进行ABZ-C6O2-BA降解研究。在现已知人类与啮齿类哺乳动物的药物代谢酶中,CES是体内一种重要的药物代谢酶,控制多

种药物代谢和解毒,在肝脏、肠道、脑、肾脏、肺等组织中有表达,其中肝脏最多<sup>[27]</sup>。本研究采用CES<sup>[28-29]</sup>确定ABZ-C6O2-BA连接的CA能否在体外完成水解。

称取2份1 mg ABZ-C6O2-BA溶于20  $\mu\text{L}$

表3 ABZ和ABZ-C6O2-BA的跨膜渗透率

Table 3 Transmembrane permeability of ABZ and ABZ-C6O2-BA

药物	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$P_{\text{app}}/$ ( $\times 10^{-4} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ )
ABZ	22	4.537±0.061
ABZ	15	4.865±0.003
ABZ	5	4.862±0.002
ABZ-C6O2-BA	22	7.530±0.003*
ABZ-C6O2-BA	15	4.619±0.004
ABZ-C6O2-BA	5	4.347±0.066

与ABZ组比较: \* $P < 0.01$ 。

\* $P < 0.01$  vs ABZ group.

DMSO, 分别加入 2 mL 37 °C 预热好的磷酸盐缓冲液(PBS)和 5、10 mg 肝 CES, 将样品振荡混匀 30 s, 于 0、1、2、4、8、24、48、72 h 取 100  $\mu\text{L}$ , 迅速加 10 倍甲醇使酶失活, 根据“2.4.3”项条件进行 HPLC 检测。数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用单因素方差分析。

如图 7 所示, 10 mg 组中, ABZ-C6O2-BA 在第 72 h 时降解率为 92.8%, 而 5 mg 组在第 72 h 时降解

率为 97.8%。说明 72 h 代谢情况良好。

将 ABZ-C6O2-BA 与 CES 37 °C 孵育 72 h 后, 将样品进行 UPLC-MS 检测, 色谱条件同“2.4.3”项, 质谱条件: 采用 ESI 离子源, 于 Full MS-ddMS2 模式下对样品进行正、负离子切换扫描, 采集一级和二级质谱数据。优化后的质谱参数如下: 鞘气体积流量为 13.5  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 辅助气流量为 4.5  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 毛细管温度 320 °C; MS1 分辨率为 70 000; MS/MS 分辨率为 17 500; 电压为 3.8 kV(正模式)或 -3.1 kV(负模式)。根据质谱结果, 推测产物可能的结构。UPLC-MS 结果如图 8 所示, 产物的相对分子质量为 383.18, 分析结构如图 9 所示, 推测水解产物可能为 ABZ-Linker, 也就是说, CES 水解了酯键, 使得 BA 与 ABZ 分开。因此, ABZ-C6O2-BA 可被用于药物分解的酶水解, 为后续体内药物释放与代谢研究提供可实施基础。

### 3 讨论

本课题组前期将 ABZ 与 BA 通过 4-氨基-1-丁醇作为 Linker 制备 ABZ-C4-BA, 发现 ASBT 在肝泡型包虫病原位大鼠模型回肠组织较正常大鼠表达明显升高, 且以 4-氨基-1-丁醇作为 Linker 的 ABZ-

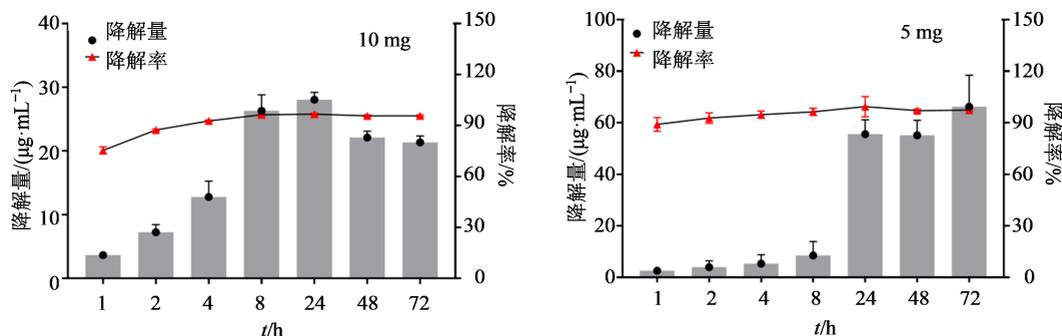


图7 CES作用下ABZ-C6O2-BA的降解速率

Fig. 7 Degradation of ABZ-C6O2-BA by CES

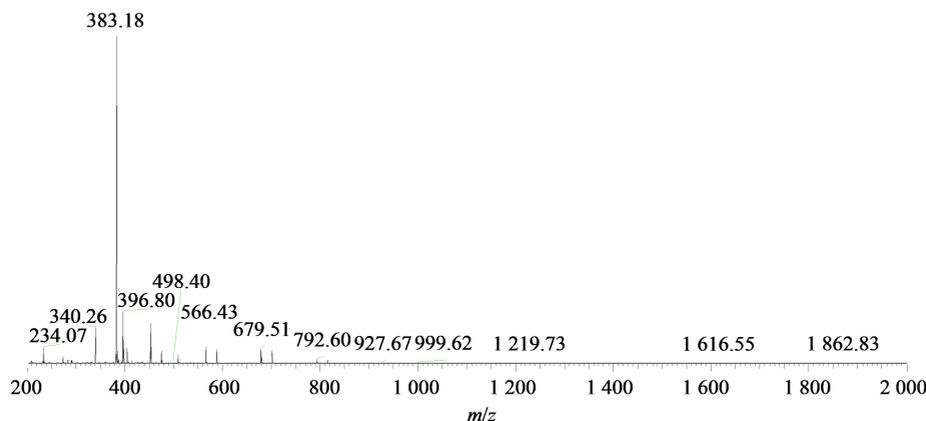


图8 ABZ-C6O2-BA体外酶水解产物UPLC-MS谱图

Fig. 8 UPLC-MS spectra of enzyme hydrolysates of ABZ-C6O2-BA in vitro

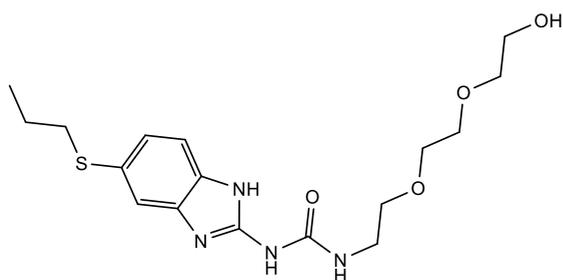


图9 ABZ-C6O2-BA体外酶水解产物结构预测  
Fig. 9 Structure prediction of enzyme hydrolysates of ABZ-C6O2-BA *in vitro*

C4-BA在大鼠体内的生物利用度较ABZ提高近40倍。在此结论的基础上,本研究改变了连接ABZ与胆酸的Linker(由4-氨基-1-丁醇改为6-氨基-1-羟基-二己脂),通过引入氧原子改变整个Linker的理化性质,探讨这类Linker对ABZ或ABZ-C4-BA的跨膜转运效率和机制的影响。

首先,本研究使用化学合成的方法成功制备了ABZ-C6O2-BA,并通过多种技术进行了广泛的表征,提供了有关ABZ-C6O2-BA固体形式的详细数据。在<sup>1</sup>H-NMR和FT-IR结果中发现了特征峰的偏移,证实了ABZ-C6O2-BA的形成。PXRD、DSC和SEM确定了ABZ-C6O2-BA的结晶性质、热力学性质和微观结构。推测ABZ-C6O2-BA为无定型形态,且微观结构较ABZ有明显不同。这与本课题组前期研究的ABZ-C4-BA结果显示一致,原因是通过引入BA和Linker打破了ABZ的分子间紧密堆积和 $\pi$ - $\pi$ 作用,降低药物的结晶趋势,使ABC以无定型态存在。

其次,本研究所合成的ABZ-C6O2-BA一方面由于引入烷基构成的Linker导致ABZ的脂溶性增加;另一方面基于ASBT对胆酸的特异性识别和ABZ脂溶性的增加,使ABZ-C6O2-BA的跨膜转运效率( $P_{app}$ )一定浓度下较ABZ显著增加,且跨膜转运方式为主动转运。

最后,通过体外水解实验发现,CES可以水解ABZ-C6O2-BA酯键,使得BA与ABZ分开,为后续体内药物释放与代谢研究提供可实施基础。

将ABZ制备成胆酸偶联为提高ABZ的口服生物利用度提供了有用的信息,而且为下一阶段药物制剂的开发提供了选择。同时说明,ASBT可作新型的口服转运体,在抗包虫病的药物开发中也能起到增加药物跨膜转运效率的作用,为后续药物新剂型的研发提供了可实施基础。本研究在前期设计的直链型Linker的基础上构建了引入氧原子的

嵌入型Linker,用于评价对ABZ跨膜转运效率的影响,为阿苯达唑-胆酸偶联物的设计和制备提供新的实验数据支持。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Baumann S, Shi R, Liu W, et al. Worldwide literature on epidemiology of human alveolar echinococcosis: A systematic review of research published in the twenty-first century [J]. *Infection*, 2019, 47(5): 703-727.
- [1] Baumann S, Shi R, Liu W Y, et al. Worldwide literature on epidemiology of human alveolar echinococcosis: A systematic review of research published in the twenty-first century [J]. *Infection*, 2019, 47(5): 703-727.
- [2] Woolsey I D, Miller A L. *Echinococcus granulosus sensu lato and Echinococcus multilocularis: A review* [J]. *Res Vet Sci*, 2021, 135: 517-522.
- [3] Fakhar M, Keighobadi M, Hezarjaribi H Z, et al. Two decades of echinococcosis/hydatidosis research: Bibliometric analysis based on the web of science core collection databases (2000-2019) [J]. *Food Waterborne Parasitol*, 2021, 25: e00137.
- [4] Movahedi F, Li L, Gu W Y, et al. Nanoformulations of albendazole as effective anticancer and antiparasite agents [J]. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2017, 12 (20): 2555-2574.
- [5] Aahin M A, Güler A, Doanci S, et al. Cardiac cyst hydatid located in interventricular septum: Analyses of two cases [J]. *Turkiye Klinikleri Cardiovascular Sciences*, 2010, 22(2): 262-265.
- [6] 钟雪萍, 章勇, 郭宇斐, 等. 阿苯达唑-盐酸盐的制备、表征及口服生物利用度的评价 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(3): 557-565.  
Zhong X P, Zhang Y, Guo Y F, et al. Preparation, characterization and evaluation of oral bioavailability of albendazole hydrochloride [J]. *Drug Res Eval*, 2024, 47 (3): 557-565.
- [7] Kawakami K. Supersaturation and crystallization: Non-equilibrium dynamics of amorphous solid dispersions for oral drug delivery [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2017, 14 (6): 735-743.
- [8] Fateh R, Norouzi R, Mirzaei E, et al. *In vitro* evaluation of albendazole nanocrystals against *Echinococcus granulosus* protoscolices [J]. *Ann Parasitol*, 2021, 67(2): 203-212.
- [9] Castro Alpizar J A, Pacheco M J, Vargas M R, et al. Development of novel microstructured lipid carriers for dissolution rate enhancement of albendazole [J]. *Int J App Pharm*, 2020: 173-178.

- [10] Pacheco P A, Rodrigues L N C, Ferreira J F S, et al. Inclusion complex and nanoclusters of cyclodextrin to increase the solubility and efficacy of albendazole [J]. *Parasitol Res*, 2018, 117(3): 705-712.
- [11] Li M, Wang Q, Li Y, et al. Apical sodium-dependent bile acid transporter, drug target for bile acid related diseases and delivery target for prodrugs: Current and future challenges [J]. *Pharmacol Ther*, 2020, 212: 107539.
- [12] Xue Y R, Ma C H, Hanna I, et al. Intestinal transporter-associated drug absorption and toxicity [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1141: 361-405.
- [13] Han X P, Sun J, Wang Y J, et al. PepT1, ASBT-linked prodrug strategy to improve oral bioavailability and tissue targeting distribution [J]. *Curr Drug Metab*, 2015, 16(1): 71-83.
- [14] Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Đanić M, et al. Bile acids and their derivatives as potential modifiers of drug release and pharmacokinetic profiles [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1283.
- [15] Balakrishnan A, Polli J E. Apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT, SLC10A2): A potential prodrug target [J]. *Mol Pharm*, 2006, 3(3): 223-230.
- [16] Tolle-Sander S, Lentz K A, Maeda D Y, et al. Increased acyclovir oral bioavailability via a bile acid conjugate [J]. *Mol Pharm*, 2004, 1(1): 40-48.
- [17] Rais R, Fletcher S, Polli J E. Synthesis and *in vitro* evaluation of gabapentin prodrugs that target the human apical sodium-dependent bile acid transporter (hASBT) [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(3): 1184-1195.
- [18] Zhang D, Li D P, Shang L, et al. Transporter-targeted cholic acid-cytarabine conjugates for improved oral absorption [J]. *Int J Pharm*, 2016, 511(1): 161-169.
- [19] Xiao L X, Zhou Y Q, Zhang X L, et al. Transporter-targeted bile acid-camptothecin conjugate for improved oral absorption [J]. *Chem Pharm Bull*, 2019, 67(10): 1082-1087.
- [20] 高瑞雪. 阿苯达唑-胆酸衍生物的设计及其增溶效果研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2021.  
Gao R X. Design of albendazole-cholic acid derivatives and their solubilization effects [D]. Xining: Qinghai University, 2021.
- [21] Chen D H, Ju H Y, Hseu K C. Simple Fourier Transform (FT)-IR and Reverse-Phase HPLC Identification Methods of Commercial Ganoderma Products [J]. *J Chin Chemical Soc*, 2001, 48(6B): 1207-1210.
- [22] Saladi V N, Kammari B R, Mandad P R, et al. Novel pharmaceutical cocrystal of apalutamide, a nonsteroidal antiandrogen drug: Synthesis, crystal structure, dissolution, stress, and excipient compatibility [J]. *Cryst Growth Des*, 2022, 22(2): 1130-1142.
- [23] Ray S, Roy N, Barman B K, et al. Synthesis and characterization of an inclusion complex of dl-aminoglutethimide with  $\beta$ -cyclodextrin and its innovative application in a biological system: Computational and experimental investigations [J]. *ACS Omega*, 2022, 7(13): 11208-11216.
- [24] Alghanmi R M, Basha M T, Habeeb M M, et al. Physicochemical studies on proton transfer reaction between methyl [5-(propylthio)-1H-benzimidazole-2-yl] carbamate (albendazole, ABZ) with 2, 4, 6-trinitrophenol (picric acid, PA) in chloroform [J]. *J Mol Struct*, 2019, 1176: 825-837.
- [25] Surov A O, Vasilev N A, Vener M V, et al. Pharmaceutical salts of fenbendazole with organic counterions: Structural analysis and solubility performance [J]. *Cryst Growth Des*, 2021, 21(8): 4516-4530.
- [26] 蒋学华, 贾运涛, 袁媛, 等. Caco-2细胞模型在口服药物吸收过程研究中的应用 [J]. *中国药理学杂志*, 2002, 37(5): 325-327.  
Jiang X H, Jia Y T, Yuan Y, et al. Application of Caco-2 cell model in the study of oral drug absorption process [J]. *Chin Pharm J*, 2002, 37(5): 325-327.
- [27] 闫慧平. 猪肝羧酸酯酶1水解磺胺类药物的特性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.  
Yan H P. Study on the characteristics of sulfanilamide hydrolysis by porcine liver carboxylesterase 1 [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014.
- [28] Chen F, Zhang B, Parker R B, et al. Clinical implications of genetic variation in carboxylesterase drug metabolism [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2018, 14(2): 131-142.
- [29] Zhou Q Q, Xiao Q L, Zhang Y L, et al. Pig liver esterases PLE1 and PLE6: Heterologous expression, hydrolysis of common antibiotics and pharmacological consequences [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15564.

[责任编辑 兰新新]