

去甲基斑蝥素纳米粒肠道吸收的体内外相关性研究

陈晓艳¹, 刘 扬¹, 张 玮¹, 贝永燕¹, 许静玉¹, 王文娟¹, 张学农^{1,2*}

(1. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州利元医药科技有限公司, 江苏 苏州 215022)

摘要:目的 考察去甲基斑蝥素壳聚糖纳米粒(NCTD-CS-NP)的体外释放以及其在体、离体肠吸收特征,并建立三者之间的相关性。方法 采用离子诱导交联法制备NCTD-CS-NP,动态透析法考察其体外释药动力学;以去甲基斑蝥素(NCTD)水溶液为对照,采用大鼠离体外翻肠法与在体回流法研究纳米粒制剂在大鼠小肠区段内的吸收规律;并对体外释放、离体及在体肠吸收进行相关性研究。结果 NCTD与NCTD-CS-NP在大鼠小肠部位的吸收速率常数(K_a)依次为:十二指肠>空肠>回肠>结肠;两种剂型在十二指肠的 K_a 分别为15.69、29.16 h⁻¹,纳米粒制剂的吸收显著好于水溶液;同一剂型,不同质量浓度药物的大鼠小肠部位的吸收速率之间无显著影响($P>0.05$),均符合一级吸收动力学过程;离体小肠外翻吸收的趋势与在体吸收一致,仅 K_a 稍有降低,二者呈现良好的相关性($r=0.9994$)。结论 壳聚糖纳米粒有利于药物释放,可有效促进NCTD在肠黏膜的吸收;NCTD在肠道中上部吸收明显,药物质量浓度对吸收速率无显著影响;NCTD体外释药、在体、离体肠吸收三者之间相关性良好。

关键词:去甲基斑蝥素;纳米粒;药物累积释放;吸收动力学

中图分类号:R285.61

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)12-1930-06

Intestinal absorption mechanism and *in vitro-in vivo* correlation of norcantharidin nanoparticlesCHEN Xiao-yan¹, LIU Yang¹, ZHANG Wei¹, BEI Yong-yan¹, XU Jing-yu¹,WANG Wen-juan¹, ZHANG Xue-nong^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Suzhou University, Suzhou 215123, China; 2. Suzhou Liyuan Medical Technology Co., Ltd., Suzhou 215002, China)

Abstract: **Objective** To study the accumulative release of norcantharidin chitosan nanoparticles (NCTD-CS-NP) *in vitro*, investigate its properties and absorption characters in rat intestine *in vivo* and *in vitro*, and evaluate the correlation among the release *in vitro*, the absorption in rat intestine *in vivo* and *in vitro*. **Methods** NCTD-CS-NP was prepared by ionic cross-linkage process, dynamic dialysis was used to study the release dynamics of NCTD-CS-NP *in vitro*. The intestine in rats was cannulated for *in vivo* recirculation and everted gut sac *in vitro*. The absorption character and regularity were studied at various intestine segments and at different concentration. **Results** The absorption rate constants (K_a) of NCTD and NCTD-CS-NP in various segments were duodenum > jejunum > ileum > colon. At the duodenum, the K_a of NCTD and NCTD-CS-NP were 15.69 and 29.16 h⁻¹, respectively. The concentration had no distinctive effect on the absorption kinetics ($P > 0.05$). The absorption of NCTD was a first-order process with passive diffusion mechanism. The absorption law *in vivo* was the same as *in vitro*, the correlation coefficient between them was 0.9994. **Conclusion** NCTD-CS-NP could improve the absorption of NCTD in rat small intestine. NCTD is well absorbed at the superior and middle segments of intestine. The concentration of NCTD has no distinctive effect on the absorption kinetics. The release of drug *in vitro* and its uptake is well correlated.

Key words: norcantharidin; nanoparticle; accumulation release; absorption kinetics

去甲基斑蝥素(norcantharidin, NCTD)为斑蝥素的合成衍生物,是由我国首先研发的治疗肝癌

的新药,主要用于原发性肝癌的治疗^[1],目前主要以片剂和注射剂应用于临床。其iv给药体内消除较

收稿日期:2009-01-22

基金项目:国家科技支撑计划课题资助(2006BAI09B00);国家科技部科技型中小企业技术创新基金(07C26223201333);江苏省“六大人才高峰”资助项目;江苏省卫生厅招标项目(H200630);国家大学生创新基金(57315924)

作者简介:陈晓艳(1985—),女,江苏丹阳人,药剂学硕士研究生。Tel: (0512) 65884309 E-mail: cxy0125@163.com

*通讯作者 张学农 Tel/Fax: (0512) 65882087 E-mail: zhangxuenong@163.com

快,6 h后药物浓度明显降低,24 h后大部分被消除,在临床应用时泌尿系统毒性较大,因而对其临床最大用药剂量有严格限制。因此,制备高效低毒的去甲基斑蝥素新剂型已成为目前的研究热点^[2,3]。本研究采用生物相容性好、黏附性好、可降解的壳聚糖(chitosan, CS)为载体材料,离子诱导交联法制备去甲基斑蝥素纳米粒制剂(NCTD-CS-NP),对其体外释药性质进行了考察;以NCTD原料药为对照,在体回流法和离体外翻肠法分别考察了NCTD-CS-NP在大鼠体内不同肠段的吸收特性;研究了体外释放、离体肠吸收、在体肠吸收三者之间的相关性,为进一步深入研究提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器:LC—10A 高效液相色谱系统(SPD—M10A 紫外检测器,SCL—10A 系统控制器,CTO—10AS 恒温箱,CR—10A 数据处理机,日本岛津公司);色谱柱:ODS-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm,大连依利特科学仪器有限公司);ME2155 型分析天平(德国 Starorinous 公司);UV—2401 PC 型紫外分光光度计(日本岛津公司);HL—1 型恒流泵(上海青浦沪西仪器厂);超声波细胞粉碎机(JY92—II 型,宁波新芝生物科技股份有限公司);透析袋(相对分子质量 8 000~14 000,上海国药化学试剂有限公司);SHZ-82 型恒温振荡箱(江苏富华仪器公司)。

1.2 试药与药物:NCTD 原料药(苏州市苏瑞医药化工有限公司,批号 20060508);酚红(苯酚红,北京清大天一生物技术有限公司,批号 061207);三聚磷酸钠(TPP,国药集团化学试剂有限公司);壳聚糖(相对分子质量 8 000~10 000,脱乙酰度:91.2%,黏度:2.95 mPa·s);泊洛沙姆 F₆₈(化学纯,国药集团化学试剂有限公司);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所);其他试剂均为分析纯。Kreb-Ringer's 营养液(简称 K 氏液)处方组成:氯化钠 7.8 g、氯化钾 0.35 g、碳酸氢钠 1.37 g、氯化镁 0.22 g、氯化钙 0.37 g、磷酸二氢钠 0.22 g、葡萄糖 1.4 g 加水至 1 000 mL。

1.3 动物:清洁级 SD 大鼠,体质量 230~270 g,雄性,苏州大学医学部实验动物中心提供,许可证号:SYXK(苏)2007-0035。

2 方法

2.1 试液的配制

2.1.1 酚红补液:精密称取 20 mg 酚红,加蒸馏水定容至 100 mL,即得 0.2 mg/mL 酚红储备液,取

10 mL 加 K 氏液定容至 100 mL,即得 20 μg/mL 的酚红补液。

2.1.2 NCTD 供试液:精密称取 100 mg NCTD,加蒸馏水定容至 100 mL,配制 1 mg/mL NCTD 储备液。精密量取 NCTD 储备液与酚红储备液适量, K 氏液定容,得药物质量浓度分别为 140、160、180 μg/mL,酚红质量浓度为 20 μg/mL 的 NCTD 供试液,离体肠吸收则不加酚红。

2.1.3 NCTD-CS-NP 贮备液:按照文献方法^[4],采用离子诱导交联法制备 NCTD-CS-NP。即将 CS 适量溶解于 0.2% 醋酸水溶液中制得 2 mg/L 的 CS 高分子溶液,再加入 0.02 g NCTD,40 ℃ 水浴下搅拌溶解;另取 1.2 mg/mL 三聚磷酸钠(TPP)水溶液 20 mL,以约 0.5 滴/s 的速度逐滴滴入上述溶液中,搅拌 10 min,即得质量浓度为 0.40 mg/mL 的纳米粒胶体。包封率与载药量分别为 45.12%、7.3%,平均粒径分布为(131±11) nm。

2.1.4 NCTD-CS-NP 供试液:精密量取 NCTD-CS-NP 储备液与酚红储备液适量, K 氏液定容,得药物质量浓度分别为 140、160、180 μg/mL,酚红质量浓度为 20 μg/mL 的 NCTD-CS-NP 供试液,离体肠吸收则不加酚红。

2.2 NCTD 测定方法的建立

2.2.1 酚红标准曲线的建立:将 K 氏液进行大鼠在体小肠循环 2 h,得到空白小肠液。精密吸取酚红储备液适量,加入空白肠液定容,配成一系列质量浓度的酚红供试品。各取 0.5 mL,加 1 mol/L NaOH 5 mL,摇匀后以 1 mol/L NaOH 为空白,在 559 nm 处测定吸光度值(Y),对质量浓度(X)回归。

2.2.2 药物体外释放标准曲线的制备:精密配制一系列质量浓度的 NCTD 水溶液,取 20 μL 注入 HPLC 色谱仪,以药物峰面积(Y)对样品质量浓度(X)回归。色谱条件为:ODS-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm,大连依利特科学仪器有限公司),流动相:乙腈-水(磷酸调节至 pH 3.1)(10:90),体积流量:0.8 mL/min,柱温:25 ℃,检测波长:210 nm。

2.2.3 药物肠吸收标准曲线的制备:取 NCTD 储备液适量,用空白肠液定容,配成一系列质量浓度的标准溶液,按“小肠样品的处理”项下处理,取 20 μL 注入 HPLC 色谱仪,以峰面积(Y)对质量浓度(X)回归,色谱条件同 2.2.2 项。

2.2.4 小肠样品的处理:取肠吸收样品 0.5 mL 于 Ep 管中,加 88% 甲酸 0.33 mL,置于超声波细胞

粉碎机(400 W)超声消解,取出后于4 000 r/min离心10 min,取上清液200 μ L加入等量甲醇,涡旋3 min,离心(10 000 r/min)3 min,取上清液20 μ L注入HPLC色谱仪。NCTD水溶液肠吸收样品,则无须消解步骤。

2.2.5 方法回收率与精密度考察:精密量取NCTD储备液适量,用空白肠液定容,按“小肠样品的处理”项下处理,得质量浓度为低、中、高(40、70、100 μ g/mL)的药物肠溶液,取上清液20 μ L进样,记录峰面积。将上述3种质量浓度的溶液连续进样5次,计算RSD,得日内精密度,连续进样5 d,得日间精密度。

2.2.6 稳定性考察:用空白肠液配制160 μ g/mL NCTD溶液,置(37 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C恒温水浴中保温,分别于0、1、2、4、6、8、20 h取样,按“小肠样品的处理”项下处理、测定,观察其峰面积的变化,计算RSD。

2.3 纳米粒的体外释放:取NCTD-CS-NP储备液6 mL置透析袋中,扎紧,投入装有30 mL蒸馏水的圆底烧瓶中。将其放入恒温振荡箱中于37 $^{\circ}$ C恒温振荡,分别于5、10、15、20、30、50、60、70、120、160、180 min取透析液0.5 mL,同时补加蒸馏水0.5 mL。取各时间点样品20 μ L,进样测定。同时取相同量的壳聚糖与泊洛沙姆188组成的NCTD水溶液作为参比制剂,与纳米粒制剂的释放平行操作进行测定,绘制累积释放率曲线。

2.4 大鼠在体肠吸收:取自由饮水条件下禁食12~18 h的大鼠,ip 3%戊巴比妥溶液(30 mg/kg)麻醉。背位固定于操作台上,沿腹中线切开腹部约3 cm,伤口处用浸有生理盐水的脱脂棉覆盖保湿,红外灯照射保持体温。对相应肠段,在两端剪切后插管,结扎,用生理盐水及K氏液将肠段冲洗干净,接着用100 mL NCTD或NCTD-CS-NP供试液以1.5 mL/min的流速循环回流,分别于0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6 h吸取回流液1 mL(同时补加等量的酚红补液),按2.2.4项下“小肠样品的处理”处理,计算得各时间点药物质量浓度。剩余样品按2.2.1项下“加1 mol/L NaOH 5 mL……”处理,计算得酚红质量浓度,即各时间点供试液体积。求出各时间点的剩余药量(X),以 $\ln X$ 对时间 t 作图,所得直线斜率可求得吸收速率常数(K_a)。

本实验分别考察NCTD水溶液和NCTD-CS-NP两种制剂不同肠段及不同药物质量浓度下的肠吸收动力学。

2.5 大鼠离体肠吸收:大鼠用3%戊巴比妥ip麻

醉(30 mg/kg)。沿腹中线打开腹腔后,迅速剪取所要考察肠段,置K氏液中,去除肠系膜,K氏液冲洗,除去肌肉、脂肪。将肠段翻转,将其中一端结扎,向肠内注入约0.5 mL K氏液后将另一端扎紧,垂直放入含50 mL供试液的烧杯中,在烧杯中通入氧气,放置于37 $^{\circ}$ C恒温水浴中,分别于20、30、45、60、75、90、105、120 min从肠囊外取样0.5 mL,同时补充同体积的空白K氏液。按2.2.4项下“小肠样品的处理”处理,计算得各时间点药物质量浓度,求出各时间点的剩余药量(X),以 $\ln X$ 对时间 t 作图,所得直线斜率可求得 K_a 。同时,分别考察NCTD水溶液和NCTD-CS-NP两种制剂在不同肠段及不同药物质量浓度下的肠吸收动力学。

2.6 肠细胞活性的评价:利用细胞受损伤时可释放出LDH原理,通过测定营养液中LDH的量能够准确反映细胞活性。按离体肠吸收实验操作,定时从肠内取出200 μ L溶液,采用LDH试剂盒进行测定,考察肠细胞的活性。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 酚红标准曲线:酚红在10.0~60.0 μ g/mL内,吸光度值(Y)与质量浓度(X)呈良好的线性关系,标准曲线方程为: $Y=0.0149X-0.0272$ ($r=0.9997$)。

3.1.2 药物体外释放标准曲线:药物体外在0.025~1.0 mg/mL内,峰面积(Y)与质量浓度(X)呈良好的线性关系,标准曲线方程为: $Y=925.374X-1778.8$ ($r=0.9999$)。

3.1.3 药物肠吸收标准曲线:药物浓度在20~100 μ g/mL内,峰面积(Y)与质量浓度(X, μ g/mL)呈良好的线性关系,标准曲线方程: $Y=920.57X+696.56$ ($r=0.9972$)。

3.1.4 回收率与精密度:药物低、中、高质量浓度方法回收率分别为(100.58 $\pm$ 1.89)%、(98.81 $\pm$ 1.31)%、(108.51 $\pm$ 1.40)% ($n=5$),日内RSD分别为1.52%、1.61%、1.82% ($n=5$),日间RSD分别为1.76%、1.41%、1.78% ($n=5$)。

3.1.5 NCTD在肠液中的稳定性:20 h内各时间点药物峰面积基本保持不变(RSD=1.05%),表明药物在空白循环液中20 h内稳定。

3.2 纳米粒体外释放:NCTD-CS-NP和NCTD水溶液的体外释放试验结果见图1。可见,70 min时,二者的体外释放均达到平衡。根据Weibull概率函数进行拟合,以两种制剂的累积释放率对时间 t 回归,

释放曲线符合该模型,并计算 t_d (释药 63.2% 所需时间)、 t_{50} (释药 50% 所需时间) 等参数,结果见表 1。

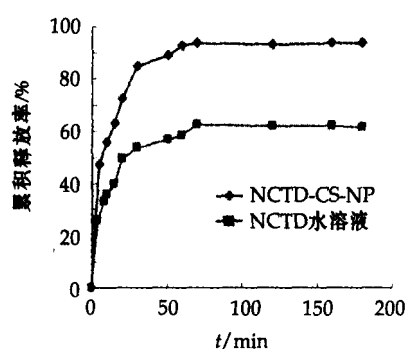


图 1 NCTD-CS-NP 与 NCTD 体外释放曲线

Fig. 1 Accumulating released curves *in vitro* of NCTD-CS-NP and NCTD solution

表 1 NCTD-CS-NP 与 NCTD 溶出方程和参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 1 Soluble equation and parameters of NCTD-CS-NP and NCTD ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

试样	Weibull 方程	r	t_d/min	t_{50}/min
NCTD-CS-NP	$\ln[1/(1-F(t))] = 0.532 \ln - 1.333$	0.973 79	$12.25 \pm 0.3^{**}$	$6.15 \pm 0.2^{**}$
NCTD	$\ln[1/(1-F(t))] = 0.370 \ln - 1.641$	0.975 28	84.33 ± 0.7	31.35 ± 0.6

与 NCTD 比较: $^{**} P < 0.01$

$^{**} P < 0.0$ vs NCTD

经分析,两种制剂的溶出参数 t_d 、 t_{50} 有显著性差异 ($P < 0.01$)。其中,NCTD-CS-NP 明显小于 NCTD 水溶液,说明相比之下纳米粒更有利于

NCTD 的释放。这可能是因为 NCTD 的水解产物去甲斑蝥酸在蒸馏水中大部分以带负电荷的酸根形式存在,而纳米粒中的带正电荷的壳聚糖氨基相当一部分为 TPP 所占据,这样就减弱了对药物的静电吸附,仅靠物理包裹作用阻滞药物释放,与此同时,NCTD 水溶液中壳聚糖由于存在较多的游离氨基,因此释放较慢,而且释放也不完全。结果提示,纳米粒更有利于药物释放。

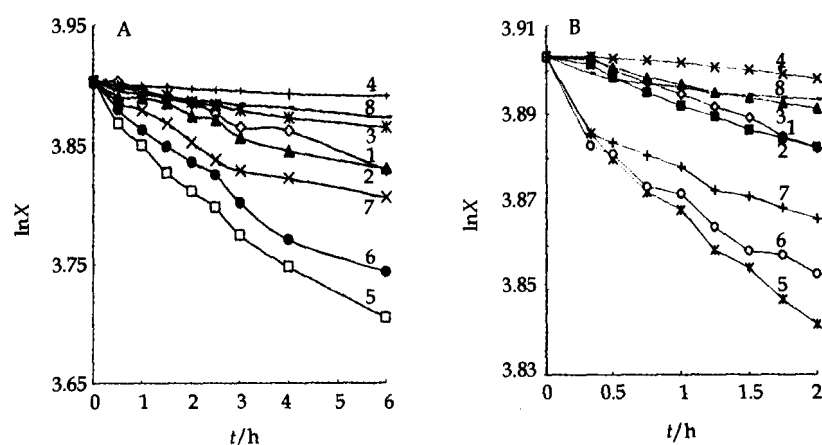
3.3 肠细胞活性的评价:离体大鼠肠囊实验 4 h 其营养液中 LDH 的活性见表 2。结果表明,在 2 h 内细胞活性无显著变化,但随着时间的进一步延长,各肠段营养液中 LDH 的活性显著增加,表明大鼠离体肠试验 2 h 内可以基本保持肠黏膜的活性。

表 2 肠液中 LDH 的活性 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 2 Activity of LDH in intestinal solution ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

肠段	LDH/(U · L ⁻¹)				
	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min
十二指肠	178 ± 56	213 ± 76	221 ± 32	312 ± 21	410 ± 65
空肠	214 ± 38	221 ± 45	215 ± 67	321 ± 54	431 ± 48
回肠	198 ± 55	208 ± 87	211 ± 32	352 ± 47	432 ± 67
结肠	175 ± 85	182 ± 49	189 ± 43	289 ± 51	398 ± 62

3.4 大鼠肠吸收:对 NCTD 及 NCTD-CS-NP 进行相同质量浓度、不同肠段的在体、离体吸收考察,结果及相关参数见图 2、表 3。



A-在体肠吸收 B-离体肠吸收 1-NCTD 十二指肠 2-NCTD 空肠段 3-NCTD 回肠段 4-NCTD 结肠段

5-NCTD-CS-NP 十二指肠 6-NCTD-CS-NP 空肠段 7-NCTD-CS-NP 回肠段 8-NCTD-CS-NP 结肠段

A-*in vivo* B-*in vitro* 1-NCTD (duodenum) 2-NCTD (jejunum) 3-NCTD (ileum) 4-NCTD (colon)

5-NCTD-CS-NP (duodenum) 6-NCTD-CS-NP (jejunum) 7-NCTD-CS-NP (ileum) 8-NCTD-CS-NP (colon)

图 2 NCTD-CS-NP 与 NCTD 水溶液大鼠不同肠段的吸收曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 2 Absorption curves of NCTD-CS-NP and NCTD solution in various intestine segments ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

表 3 NCTD-CS-NP 和 NCTD 水溶液大鼠不同肠段的吸收参数 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Absorption parameters of NCTD-CS-NP and NCTD solution in various intestine segments ($\bar{x}\pm s, n=5$)

肠段	药物	$P_A/\%$		$K_a\times 100/h^{-1}$		$t_{1/2a}/h$	
		在体 (6 h)	离体 (2 h)	在体	离体	在体	离体
十二指肠	NCTD	15.69±1.12	4.76±0.22	3.06±0.33	2.81±0.21	22.67±2.44	24.70±1.85
	NCTD-CS-NP	29.16±1.87	13.21±1.13	6.89±0.21	5.98±0.37	10.06±0.31	11.59±0.72
空肠	NCTD	12.49±0.89	4.70±0.15	2.78±0.26	2.60±0.13	24.93±2.33	26.61±1.33
	NCTD-CS-NP	24.34±1.01	10.88±0.34	5.92±0.35	4624±0.23	11.71±0.69	16.36±0.89
回肠	NCTD	7.73±0.25	2.76±0.12	1.51±0.14	1.54±0.17	45.89±4.25	44.90±4.96
	NCTD-CS-NP	13.98±0.97	8.20±0.27	3.53±0.17	2.76±0.07	19.63±0.95	25.13±0.64
结肠	NCTD	2.20±0.33	1.18±0.08	0.44±0.01	0.71±0.02	15.75±3.58	97.54±2.75
	NCTD-CS-NP	3.54±1.23	2.28±0.06	0.95±0.01	0.80±0.01	72.95±0.78	86.59±1.08

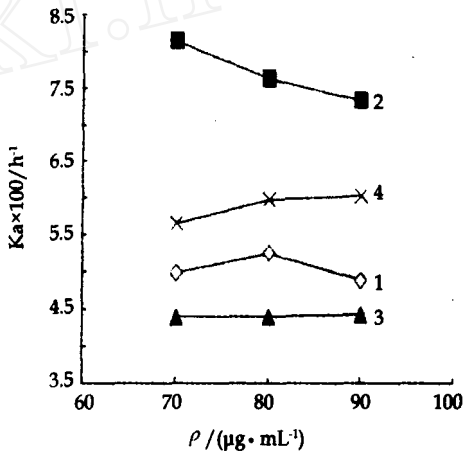
参数对比表明,两种制剂在大鼠肠道的中上部(十二指肠、空肠、回肠)有吸收,而结肠段几乎无吸收, K_a 按十二指肠、空肠、回肠、结肠顺序下降;其中,十二指肠段吸收最为显著,纳米粒制剂在体吸收百分率(P_A)几乎为原料药的 2 倍;无论在体、离体条件下,壳聚糖纳米粒制剂相对于药物水溶液而言, P_A 和 K_a 都有显著提高;各肠段的吸收均符合一级动力学;但离体状态下的 K_a 比在体明显减小,这可能是由于离体实验切断肠系膜而致。

对 NCTD 水溶液及 NCTD-CS-NP 进行大鼠相同肠段(十二指肠)、不同质量浓度下的在体、离体吸收考察,结果及相关参数见图 3、表 4。

参数对比表明,两种制剂不同质量浓度给药量之间皆无明显差异。壳聚糖纳米粒制剂相对于药物水溶液而言,无论是 P_A 还是 K_a 都有显著提高, $t_{1/2a}$ 明显缩短。提示纳米粒制剂有利于药物的胃肠道吸收,且这种吸收无剂量依赖性。

3.5 体外释药与在体、离体肠吸收相关性分析:将 NCTD-CS-NP 体外累积释放百分率(F_R),与其对应时间内大鼠小肠内药物的在体吸收百分率(P_{A1})

及离体吸收百分率(P_{A2})进行对照,结果见表 5。



1-NCTD 在体 2-NCTD-CS-NP 在体
3-NCTD 离体 4-NCTD-CS-NP 离体
1-NCTD (in vivo) 2-NCTD-CS-NP (in vivo)
3-NCTD (in vitro) 4-NCTD-CS-NP (in vitro)

图 3 NCTD-CS-NP 及 NCTD 水溶液不同质量浓度的吸收曲线 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig. 3 Absorption curves of NCTD-CS-NP and NCTD solution at different concentration ($\bar{x}\pm s, n=5$)

表 4 NCTD-CS-NP 和 NCTD 水溶液不同质量浓度的吸收参数 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Absorption parameters of NCTD-CS-NP and NCTD solution at different concentration ($\bar{x}\pm s, n=5$)

$\rho/(\mu g\cdot mL^{-1})$	药物	$P_A/\%$		$K_a\times 100/h^{-1}$		$t_{1/2a}/h$	
		在体 (6 h)	离体 (2 h)	在体	离体	在体	离体
70	NCTD	23.38±0.55	9.46±0.31	4.99±0.10	4.40±0.88	13.88±0.28	15.76±0.29
	NCTD-CS-NP	42.11±1.11	17.79±1.01	8.15±0.22	5.65±0.15	8.51±0.23	12.26±0.33
80	NCTD	23.89±1.23	9.76±0.22	5.25±0.14	4.41±0.10	13.20±0.35	15.73±0.36
	NCTD-CS-NP	39.47±0.81	13.21±0.87	7.64±0.32	6.02±0.21	9.07±0.38	11.59±0.40
90	NCTD	22.41±1.17	9.76±0.35	4.89±0.21	4.43±0.29	14.17±0.61	15.65±1.02
	NCTD-CS-NP	39.72±0.93	12.28±1.17	7.34±0.17	5.98±0.33	9.44±0.22	11.49±0.63

表 5 NCTD-CS-NP 的体外释药与在体、离体吸收相关性

Table 5 Correlation of accumulating release of NCTD-CS-NP in vitro and absorption in vivo and in vitro

参数/%	t					
	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	2.5 h	3 h
F_R	84.98±1.01	89.90±1.32	90.12±0.77	92.57±0.67	93.90±1.26	94.62±1.51
P_{A1}	5.91±0.31	8.61±0.21	11.10±0.51	13.71±0.23	18.09±0.37	22.80±0.45
P_{A2}	5.25±0.23	7.78±0.37	10.59±0.31	13.21±0.57	—	—

以 NCTD-CS-NP 的体外累积溶出度 (F_R) 与对应的在体小肠吸收 P_{A1} 和离体小肠吸收 P_{A2} 数据进行回归, 体内外相关方程为: $P_{A1} = 1.6157 F_R - 133.6800$, $r = 0.9130$; $P_{A2} = 1.0036 F_R - 80.5040$, $r = 0.9263$; $P_{A1} = 0.9694 \times P_{A2} + 0.9068$, $r = 0.9994$ 。可见, 壳聚糖纳米粒制剂的 F_R 与体内、体外肠吸收之间具有良好的线性相关性。

4 讨论

研究表明去甲斑蝥素在胃肠液中以去甲斑蝥酸的形式存在, 去甲斑蝥酸具有过高的水溶性, 不利于药物的胃肠道吸收^[5]。因此, 将药物包载于壳聚糖纳米粒中, 以望能达到促进药物吸收的目的。

对壳聚糖纳米粒进行大鼠在体、离体肠循环实验, 并与原料药水溶液进行对比。实验结果表明, 药物在大鼠肠道的中上部有吸收, 而结肠段几乎无吸收, k_a 按十二指肠、空肠、回肠、结肠顺序下降; 其中, 十二指肠段吸收最为显著; 而两种制剂不同质量浓度给药量之间皆无明显差异; 壳聚糖纳米粒具有明显的促进药物胃肠道黏膜转运的功能。这与相关文献报道^[6]一致。壳聚糖带有游离氨基, 是一种带正电荷的碱性多糖, 能够破坏带负电荷的磷脂双分子

层的规整排列, 从而打开黏膜上皮细胞的紧密排列。采用离子诱导法制备的壳聚糖纳米粒, 由于表面游离氨基的存在, 依然具有壳聚糖的上述特性, 故能促进所包载药物的黏膜透过。

对药物体外释放及肠吸收进行相关性分析表明: 药物的累积释药与在体、离体肠吸收均相关性良好。并且, 在体吸收与离体吸收也有显著的相关性。

壳聚糖纳米粒的应用正成为国内外探讨的热点, 但是, 其促进药物黏膜吸收的机制尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Stewart S G, Hill T A, Gilbert J, et al. Synthesis and biological evaluation of norcantharidin analogues: Towards PP1 selectivity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(23): 7301-7310.
- [2] 刘建宇, 赵绪元. 去甲基斑蝥素抗肿瘤作用及其靶向给药系统的研究进展 [J]. *中南药学*, 2007, 5(4): 355-358.
- [3] 田海燕, 翟光喜. 去甲基斑蝥素固体脂质纳米粒的制备及其理化性质研究 [J]. *中药材*, 2007, 30(9): 1146-1148.
- [4] 张 玮, 刘 扬, 张学农, 等. 去甲基斑蝥素低分子量壳聚糖纳米粒的制备表征及其体外释放研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(10): 4-9.
- [5] 王广生, 李荣昌, 窦培延. 去甲斑蝥素在胃肠液中的存在状态 [J]. *药学通报*, 1984, 19(8): 24-26.
- [6] Janes K A, Calvo P, Alonso M J. Polysaccharide colloidal particles as delivery system for macromolecules [J]. *Adv Drug Del Rev*, 2001, 47: 83-97.

Caco-2 细胞单层模型中熊果酸摄取转运机制的研究

程晓华^{1,2}, 熊玉卿^{2*}

(1. 南昌大学第一附属医院, 江西 南昌 330006; 2. 南昌大学医学院 临床药理研究所, 江西 南昌 330006)

摘 要:目的 研究熊果酸在 Caco-2 细胞单层模型中的吸收转运机制。方法 利用人源结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞单层模型研究熊果酸在有或无 P-糖蛋白专属性抑制剂维拉帕米存在时, 评价其双向转运特征, 并考察时间、药物浓度、体系温度以及培养介质 pH 值对 Caco-2 细胞摄取熊果酸的影响。采用高效液相色谱-紫外检测法对熊果酸进行定量分析, 计算其表现渗透系数 (P_{app})。结果 浓度在 10~40 $\mu\text{mol/L}$ 内, Caco-2 细胞对熊果酸摄取量呈线性增加。双向转运研究发现加入 P-糖蛋白专属性抑制剂维拉帕米后, 其 P_{app} 发生显著改变, 表现渗透率由 3.445 下降至 1.386。结论 熊果酸在 Caco-2 细胞模型的吸收转运机制以被动转运为主, P-糖蛋白参与主动转运的过程。

关键词:熊果酸; Caco-2 细胞单层; 吸收; 转运

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)12-1935-05

Absorption and transport mechanism of ursolic acid across Caco-2 monolayer model

CHENG Xiao-hua^{1,2}, XIONG Yu-qing²

(1. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Institute of Clinical Pharmacology, Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objective To study the absorption and transport mechanism of ursolic acid (UA) by using Caco-2 monolayer model. **Methods** Evaluating the transport characteristic through studying whether

收稿日期: 2009-03-12

作者简介: 程晓华(1981—), 男, 江西余干人, 药师, 研究方向为药物代谢及药动学。Tel: (0791) 8692713

* 通讯作者 熊玉卿 Tel: (0791) 6360654 E-mail: xyq1126@yahoo.com.cn