

• 药理与临床 •

姜黄素磷脂复合物壳聚糖微球在大鼠体内药动学研究

唐 勤, 顾 勇, 李 纳, 郭 倩, 徐晓玉, 张继芬*

西南大学药学院 重庆市药效评价工程技术研究中心, 重庆 400715

摘要: 目的 比较姜黄素磷脂复合物壳聚糖微球、姜黄素磷脂复合物、姜黄素壳聚糖微球、姜黄素原料药的药动学特征, 探讨磷脂复合物壳聚糖微球药物载体的优势。方法 SD大鼠 ig给予4种姜黄素制剂100 mg/kg (以姜黄素计)后, 定时取血, 以大黄素为内标, 乙腈-2%醋酸水溶液(55:45)为流动相, HPLC法检测姜黄素血药浓度, 绘制药-时曲线, DAS程序计算药动学参数。结果 姜黄素磷脂复合物壳聚糖微球的 $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 分别为2.0、3.2 h, 较原料药(0.6、1.2 h)、壳聚糖微球(1.4、2.3 h)、磷脂复合物(1.2、1.7 h)均有所延长; 曲线下面积(AUC)分别为原料药、壳聚糖微球、磷脂复合物的7.49、2.07、2.67倍。结论 磷脂复合物壳聚糖微球较单一的磷脂复合物或壳聚糖微球更能延缓药物释放, 促进药物吸收, 是半衰期短、溶解度低药物的优良口服给药载体。

关键词: 姜黄素; 磷脂复合物壳聚糖微球; 磷脂复合物; 壳聚糖微球; 药动学

中图分类号: R943; R969.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)14-1939-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.14.014

In vivo pharmacokinetics of curcumin-phospholipid complex-chitosan microspheres in rats

TANG Qin, GU Yong, LI Na, GUO Qian, XU Xiao-yu, ZHANG Ji-fen

The Engineering and Technology Center of Efficacy Evaluation, College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: **Objective** To compare the *in vivo* pharmacokinetics of curcumin-phospholipid complex-chitosan microspheres (Cur-PLC-CM), Cur-PLC, Cur-CM, and crude drug of Cur, and to discuss the advantage of PLC-CM as carrier. **Methods** SD rats were ig administered with the above four preparations 100 mg/kg (corresponding to Cur), respectively. Then blood samples were obtained at certain time points. The concentration of Cur in blood was analyzed by HPLC method using emodin as internal standard. The mobile phase was acetonitrile-2% acetic acid (55:45). Concentration-time curve was drawn and the data were analyzed by DAS program. **Results** The $t_{\max}$ and $t_{1/2}$ of Cur-PLC-CM were 2.0 and 3.2 h, respectively, which were much longer than those of crude drug (0.6 and 1.2 h), Cur-CM (1.4 and 2.3 h), and Cur-PLC (1.2 and 1.7 h). The AUC of Cur-PLC-CM was 7.49, 2.07, and 2.67 times as those of crude drug, Cur-CM, and Cur-PLC. **Conclusion** The PLC-CM have better sustained-releasing and absorption property than CM and PLC, which may have a great potential to be used as oral delivery system for the low solubility and short half-life drug.

Key words: curcumin; phospholipid complex-chitosan microspheres; phospholipid complex; chitosan microspheres; pharmacokinetics

姜黄素(curcumin, Cur)是从姜科植物姜黄 *Curcuma Longae Rhizoma*、莪术 *Curcuma Rhizoma*、郁金 *Curcuma Radix*等药材中提取的一种多酚类物质, 具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理作用, 其安全性高、不良反应少^[1-3]。然而姜黄素水溶性极

差, 生物利用度不足1%, 且代谢快、半衰期短^[4], 使其临床应用受到限制。为克服姜黄素的这些不足, 研究了其多种载体和制剂技术, 如固体分散体、包合物、聚合物胶束、微球、脂质体、固体脂质纳米粒等。然而, 这些单一技术不能同时解决姜黄素的

收稿日期: 2012-09-25

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(csc2011jj10010); 重庆市卫生局中医药科技研究计划项目(2010-2-144)

作者简介: 唐 勤(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药研发。E-mail: tangqin2010@yeah.net

*通信作者 张继芬 E-mail: zhjf@swu.edu.cn

不足,如磷脂复合物可将姜黄素经口给予大鼠后的曲线下面积(AUC)提高3.37倍,却只能将半衰期从1.5 h延长至2.0 h^[5]。将不同载体组合形成的新载体,可使新载体能兼具其中各载体的优点,弥补彼此的不足^[6-8]。如将脂质体包载于壳聚糖微球中形成的脂质体壳聚糖微球,就融合了磷脂和壳聚糖的双重促吸收优点,且能更好地延长药物的半衰期^[9]。但由于脂质体载药量较高,使得脂质体壳聚糖微球载药量较小。笔者将姜黄素磷脂复合物与壳聚糖微球结合,制备一种载药量较高的磷脂复合物-壳聚糖微球载体^[10],以期能更好地提高姜黄素的口服生物利用度,延长半衰期。在此基础上,本实验对大鼠ig给予姜黄素、姜黄素磷脂复合物(Cur-PLC)、姜黄素壳聚糖微球(Cur-CM)、姜黄素磷脂复合物壳聚糖微球(Cur-PLC-CM)后的体内药动学进行了考察,以期能为开发姜黄素优良的口服给药新载体提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

姜黄素对照品,质量分数>98%,中国药品生物制品检定所,批号110752-201005;姜黄素原料药(批号090317),西安融升生物技术有限公司,质量分数>98%;大黄素(内标),天津市科曼思特有限公司,批号20120301,质量分数>98%;甲醇、乙腈,均为色谱纯,Fisher公司;醋酸,色谱纯,成都市科龙化工试剂厂;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

高效液相色谱仪,日本日立公司;H16502W台式微量高速离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;XW-80A微型涡旋混合仪,海门市其林贝雨仪器制造有限公司;EL2046型电子天平,上海梅特勒-托利多有限公司;KL512氮吹仪,北京康林科技有限公司。

1.3 动物

SD大鼠,雌雄兼用,体质量为(340±17)g,购于重庆市中药研究院实验动物研究所,生产许可证号:SCXD(渝)2007-0006;饲养于西南大学药学院实验动物中心,实验动物使用许可证号:SYXK(渝)2009-0002。

2 方法与结果

2.1 药品制备

参照文献方法^[10],制备Cur-PLC、Cur-CM和Cur-PLC-CM。所得Cur-PLC的复合率为92.34%,

Cur-CM和Cur-PLC壳聚糖微球的载药量分别为5.41%、2.95%。

2.2 分组、给药与血样采集

将20只大鼠随机分为4组,每组5只,禁食不禁水12 h后,分别按100 mg/kg(以姜黄素计)^[5]ig给予姜黄素、Cur-PLC、Cur-CM和Cur-PLC-CM。于给药后15、30、45 min,1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、8、10、12 h大鼠眼眶取血,5 000 r/min离心10 min,取上层血浆样品备用。

2.3 血浆样品的处理^[11]

取“2.2”项下血浆样品200 μL,置1.5 mL离心管中,精密加入大黄素甲醇溶液(2.450 μg/mL)25 μL、醋酸乙酯500 μL,涡旋混合3 min,10 000 r/min离心10 min,取上清液,沉淀加醋酸乙酯500 μL,涡旋混合3 min,10 000 r/min离心10 min,合并上清液,氮气吹干,残渣用100 μL甲醇复溶,涡旋混合3 min,15 000 r/min离心10 min,取上清液用于HPLC检测。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取姜黄素对照品2.20 mg,甲醇定容至25 mL,精密吸取1 mL,甲醇定容至10 mL,得质量浓度为8.8 μg/mL的姜黄素对照品贮备液。

2.5 大鼠血浆中姜黄素的测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱为Agilent SB-C₁₈ ODS(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相为乙腈-2%醋酸水溶液(55:45);体积流量1.0 mL/min;柱温30℃;进样量20 μL,检测波长420 nm。

2.5.2 方法学考察

(1) 专属性试验:取大鼠空白血浆、空白血浆+姜黄素对照品+大黄素、大鼠ig姜黄素原料药15 min后血浆样品+大黄素、大鼠ig Cur-PLC 30 min后血浆样品+大黄素、大鼠ig Cur-CM 30 min后血浆样品+大黄素、大鼠ig Cur-PLC-CM 30 min后血浆样品+大黄素6个预处理后的样品,照“2.5.1”项下色谱条件进样分析,各样品的色谱图见图1。结果表明在选定的色谱条件下,姜黄素和大黄素的保留时间各为6.79、10.82 min,空白血浆在相应保留时间处均无干扰,说明内标物选择合适,色谱条件的专属性强。

(2) 标准曲线绘制:精密吸取姜黄素对照品贮备液0.05、0.1、0.4、1、4 mL,甲醇定容至10 mL,得质量浓度为0.044、0.088、0.352、0.880、3.520 μg/mL的姜黄素对照品溶液。精密吸取姜黄素对照

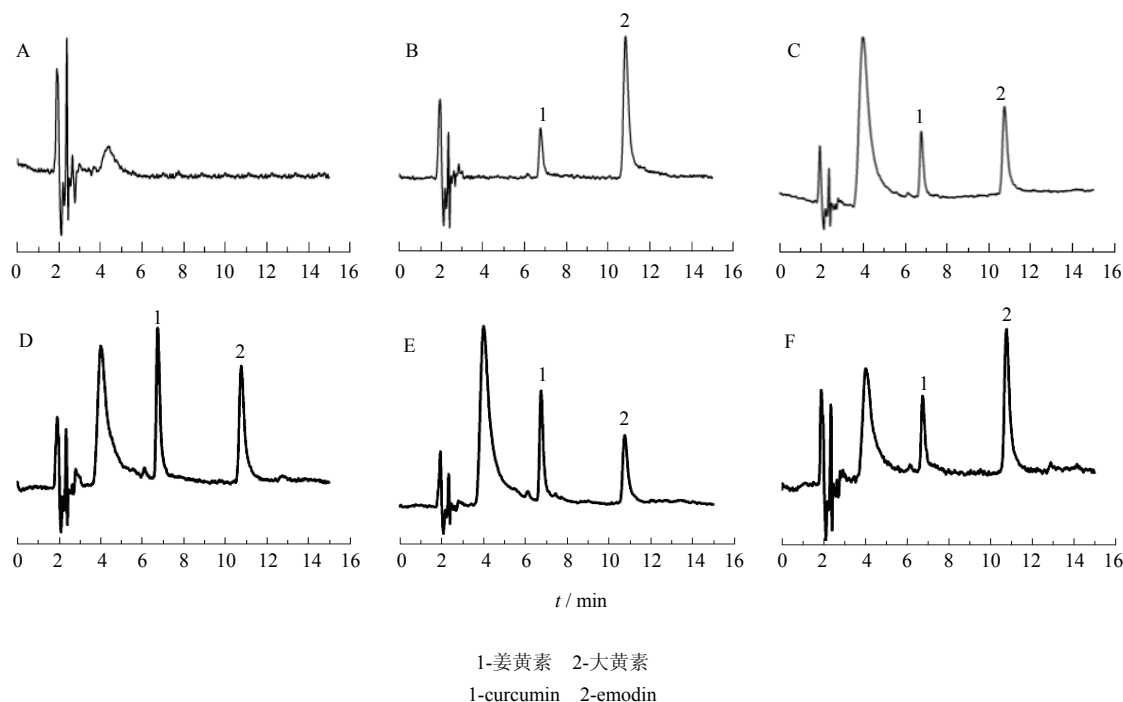


图1 空白血浆 (A)、空白血浆+姜黄素+大黄素 (B)、姜黄素给药后血浆样品+大黄素 (C)、Cur-PLC 给药后血浆样品+大黄素 (D)、Cur-CM 给药后血浆样品+大黄素 (E)、Cur-PLC-CM 给药后血浆样品+大黄素 (F) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), blank plasma + Cur + emodin (B), plasma sample with Cur + emodin (C), plasma sample with Cur-PLC + emodin (D), plasma sample with Cur-CM + emodin (E), plasma sample with Cur-PLC-CM + emodin (F)

品溶液 25 μL 置 1.5 mL 离心管中, 氮气吹干, 分别加入大鼠空白血浆 200 μL , 涡旋混合 3 min, 得质量浓度分别为 5.5、11、44、110、440 ng/mL 的姜黄素血浆溶液, 按“2.3”项下方法处理, “2.4”项下色谱条件进样检测。以姜黄素和大黄素的峰面积之比为纵坐标 (Y), 血浆中的姜黄素质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线。结果显示, 血浆样品中姜黄素质量浓度在 5.5~440 ng/mL 时, 姜黄素和大黄素的峰面积之比与姜黄素质量浓度之间具有良好的线性关系, 回归方程为 $Y=0.010\ 8\ X+0.040\ 8$ ($r=0.999\ 8$)。

(3) 精密度试验: 取质量浓度为 0.022、0.176、0.880 $\mu\text{g/mL}$ 的姜黄素对照品溶液 25 μL , 置于 1.5 mL 离心管中 (每个质量浓度 3 份样品), 氮气吹干, 加入空白血浆样品 200 μL , 涡旋混合 3 min, 按“2.3”项下的方法制备样品溶液, HPLC 检测。1 d 内测定 3 次, 结果日内精密度 RSD 分别为 3.84%、2.81%、2.06%; 连续 3 d 进样检测, 日间精密度 RSD 分别为 7.45%、5.47%、4.06%。

(4) 重复性试验: 大鼠 ig 给予一定剂量的姜黄素原料药, 15 min 后眼眶取血, 制备血浆, 备用。取血浆样品 5 份, 按“2.3”项下方法处理, 连续进样, 测得血浆中姜黄素的量为 (53.71 ± 4.39) ng/mL, RSD 为 8.17%。

(5) 加样回收率试验: 将质量浓度为 0.022、0.176、0.880 $\mu\text{g/mL}$ 的姜黄素对照品溶液 25 μL 置于 1.5 mL 离心管中, 每个质量浓度 3 份样品, 氮气吹干, 分别加入 (3) 项中姜黄素对照品血浆溶液 200 μL , 涡旋混合 3 min, 按“2.3”项下方法制备样品, HPLC 检测, 结果高、中、低 3 个质量浓度的平均加样回收率分别为 107.17%、96.96%、94.41%, RSD 分别为 9.59%、7.44%、8.02%。

(6) 萃取回收率试验: 精密吸取 0.022、0.176、0.880 $\mu\text{g/mL}$ 的姜黄素对照品溶液 25 μL 于离心管中 (分为 A、B 两管), 氮气吹干, A 管直接加 100 μL 甲醇, 涡旋混合 3 min 后 15 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 HPLC 检测, 记录色谱峰面积 (A_a)。B 管中精密加入 200 μL 空白血浆样品, 涡旋混匀, 按

“2.3”项下方法制备待测样品, HPLC 分析, 记录色谱峰面积 (A_b), 计算萃取回收率。

$$\text{萃取回收率} = A_b / A_a$$

结果含姜黄素高、中、低 3 个质量浓度的大鼠血浆样品溶液的萃取回收率分别为 79.85%、84.60%、82.30%, RSD 分别为 8.73%、6.44%、7.01%。

(7) 稳定性试验: 取 (4) 项下血浆样品, 置于进样池中 24 h, 测定姜黄素的量为 (55.40 ± 4.14) ng/mL, RSD 为 7.47 %。将 (4) 项下血浆样品于 -20°C 放置 3 d, 测定血浆样品中的姜黄素为 (57.47 ± 5.36) ng/mL, RSD 为 9.33 %。表明姜黄素在两种条件下保持相对稳定。

2.6 药动学研究

将 ig 给药后的各组大鼠血浆按“2.3”项下方法处理, “2.4”项下色谱条件检测姜黄素的量。用 SPSS 11.0 统计软件对各时间点的血药浓度进行计算, 绘制血药浓度-时间曲线, 结果见图 2。各组血药浓度-时间曲线用 DAS 药动学程序进行房室模型模拟, 计算主要的药动学参数, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 结果见表 1。磷脂复合物、壳聚糖微球和磷脂复合物壳聚糖微球对姜黄素的吸收均有促进作用,

且磷脂复合物壳聚糖微球的促吸收作用强于单一的磷脂复合物和壳聚糖微球。大鼠 ig 给予姜黄素后, 0.5 h 内血药浓度达峰值, 6 h 后血液中的姜黄素微不可测; 给予 Cur-PLC、Cur-CM 后, 血药浓度均在 1.5 h 内达峰值, 姜黄素可测时间分别延长至 8、10 h; ig 给予 Cur-PLC-CM 后, 血药浓度在 2 h 达峰值, 12 h 后仍可检测到少量姜黄素。

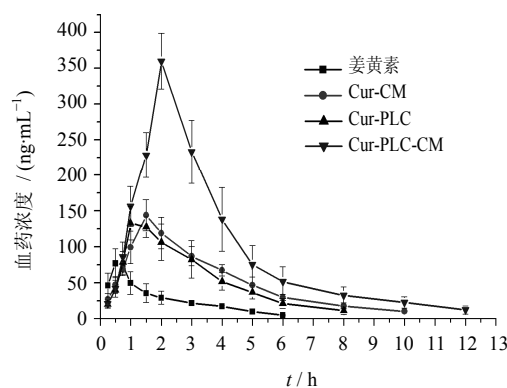


图2 4种姜黄素制剂ig给药后姜黄素的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Concentration-time curves of Cur after ig administration of four Cur preparations ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表1 4种姜黄素制剂ig给药后在大鼠体内的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Main pharmacokinetic parameters after ig administration of four Cur preparations in rats ($\bar{x} \pm s, n=5$)

参数	单位	姜黄素	Cur-PLC	Cur-CM	Cur-PLC-CM
$t_{\max}$	h	0.60 ± 0.1	1.20 ± 0.3	1.40 ± 0.2	2.00 ± 0
$C_{\max}$	ng·L ⁻¹	86.55 ± 9.55	$142.61 \pm 15.34^{**}$	$146.59 \pm 16.31^{**}$	$359.67 \pm 39.25^{**\Delta\Delta\Delta}$
$t_{1/2}$	h	1.20 ± 0.2	1.70 ± 0.4	2.30 ± 0.3	3.20 ± 0.5
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	ng·L ⁻¹ ·h ⁻¹	158.03 ± 18.05	$442.53 \pm 91.89^{**}$	$572.08 \pm 27.86^{**\Delta}$	$1184.21 \pm 221.07^{**\Delta\Delta\Delta}$

与姜黄素比较: $^{**}P < 0.01$; 与 Cur-PLC 比较: $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$; 与 Cur-CM 比较: $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs Cur; $^{\Delta}P < 0.05$ $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs Cur-PLC; $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.01$ vs Cur-CM

3 讨论

姜黄素的酚羟基可与磷脂的 P=O 以共价键结合, 形成复合物, 其磷脂部分能促进姜黄素更好地从亲水环境转移至亲脂环境的肠上皮细胞膜^[12]。壳聚糖的正电荷可与生物膜的负电荷结合, 打开消化道上皮间的紧密连接, 促进药物的吸收; 壳聚糖微球的亲水凝胶骨架结构可延缓药物的释放, 具有较好的缓释效应; 同时壳聚糖还具有一定的生物黏附性, 可延长药物在吸收部位的滞留时间, 由此延长药物的吸收时间^[13-14]。本实验结果证实, 磷脂复合物与壳聚糖微球均可促进姜黄素的口服吸收, 延长半衰期; 两者复合而成的磷脂复合物

壳聚糖微球则具有更好地促吸收作用和缓释作用, 较单一的磷脂复合物和壳聚糖微球更能减慢姜黄素在体内的释放, 延长其药效。体内释药速率结果与体外药物释放^[10]相吻合, 间接验证了 Cur-PLC-CM 的结构和体外释放机制, 即姜黄素先与磷脂复合, 形成的复合物再完整地分布在壳聚糖微球中; 微球接触到体液后, 壳聚糖溶胀形成网状结构, Cur-PLC 先从壳聚糖微球中释放, 姜黄素再从磷脂复合物中释放出来^[10]。可见, 磷脂复合物壳聚糖微球结合了磷脂复合物与壳聚糖微球的双重优势, 适用于溶解度低、半衰期短的药物口服给药。

参考文献

- [1] Srivastava R M, Singh S, Dubey S K, *et al.* Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(3): 331-341.
- [2] Sharma R A, Euden S A, Platton S L, *et al.* Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(4): 6847-6854.
- [3] 罗廷顺, 李洪文, 刘正文, 等. 姜黄素的提取、分离与药理作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(2): 102-107.
- [4] Yang K Y, Lin L C, Tseng T Y, *et al.* Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 853(1/2): 183-189.
- [5] Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, *et al.* Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats [J]. *Int J Pharm*, 2007, 330(1/2): 155-163.
- [6] Feng S S, Ruan G, Li Q T. Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes in microsphere (LIM) [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(21): 5181-5189.
- [7] Cai X, Luan Y, Jiang Y, *et al.* Huperzine a phospholipid complex-loaded biodegradable thermosensitive polymer gel for controlled drug release [J]. *Int J Pharm*, 2012, 433(1/2): 102-111.
- [8] Peng Q, Zhang Z R, Gong T, *et al.* A rapid-acting, long-acting insulin formulation based on a phospholipid complex loaded PHBHHx nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(5): 1583-1588.
- [9] 张继芬, 王 琴, 贾 兰, 等. 阿魏酸在脂质体壳聚糖缓释微球的制备及体外释放研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(22): 2972-2975.
- [10] 唐 勤, 孙晓辉, 陈 毫, 等. 制备方法和工艺对姜黄素-磷脂复合物-壳聚糖微球体外性质的影响 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2377-2385.
- [11] 顾吉晋, 邓英杰, 王 浩, 等. RP-HPLC 法测定大鼠血浆中姜黄素含量 [J]. *成都医学院学报*, 2009, 4(4): 241-244.
- [12] 张继芬, 唐 勤, 莫 婷, 等. 姜黄素磷脂载体的表征及肠吸收研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2012, 47(21): 1736-1740.
- [13] Thanou M, Verhoef J C, Junginger H E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 52(2): 117-126.
- [14] 周闻舞, 顾海铮. 壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(4): 290-295.