

• 药剂与工艺 •

左旋肉碱修饰的壳聚糖-硬脂酸协载槲皮素口服紫杉醇纳米胶束的制备、表征及在体肠循环研究

张倩¹, 杨坛¹, 黎桦坪¹, 奉建芳², 林世源¹, 陈卉¹, 吴卫¹, 张玮^{1*}

1. 桂林医学院, 广西 桂林 541004

2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200

摘要: **目的** 制备左旋肉碱修饰的壳聚糖-硬脂酸 (LC-SA/CS-SA) 纳米胶束, 包载紫杉醇 (PTX) 且协载槲皮素, 考察胶束特性, 并以大鼠在体肠循环评估给药系统对 PTX 口服吸收的促进作用。 **方法** 将硬脂酸 (SA) 通过酰胺化反应接枝于壳聚糖 (CS), 形成共聚物 CS-SA; 采用核磁共振 H 谱、红外光谱鉴定产物结构; 以 PTX 为主药, 槲皮素为辅药, 采用激光粒径分析、Zeta 电位分析和 HPLC 分析分别考察了胶束的粒径、Zeta 电位、载药量、包封率; 透射电子显微镜观察胶束形貌; 荧光探针法测定 LC-SA/CS-SA 胶束的临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC); 透析袋法考察胶束的体外释放行为; 大鼠在体肠吸收实验评估载药胶束的促吸收作用。 **结果** 红外与核磁结果表明 SA 通过酰胺键接枝于 CS; 协载槲皮素的 LC-SA/CS-SA 载 PTX 胶束呈类球形, 粒径为 (148.3 ± 1.7) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.16 ± 0.07 , Zeta 电位为 (24.600 ± 0.167) mV, CMC 为 $14.31 \mu\text{g/mL}$; 体外释放结果表明, 与市售紫杉醇注射剂相比, 协载槲皮素的 LC-SA/CS-SA 载 PTX 胶束、LC-SA/CS-SA 载 PTX 胶束具有明显缓释效应; 大鼠在体肠吸收实验表明, 协载槲皮素的 LC-SA/CS-SA 胶束对载药 PTX 的胃肠吸收具有显著促进作用。 **结论** 构建的协载槲皮素的 LC-SA/CS-SA 载 PTX 胶束性能优良, 促进了 PTX 的大鼠肠吸收, 具有增强药物口服吸收潜力。

关键词: 壳聚糖-硬脂酸; 左旋肉碱; 紫杉醇; 槲皮素; 在体肠吸收; 协载; 纳米胶束; 在体肠循环

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5440-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.007

Study on *L*-carnitine modified quercetin-coloading chitosan-stearic acid nanomicelles as oral paclitaxel delivery system: Preparation, characterization and *in vivo* intestine absorption in rats

ZHANG Qian¹, YANG Tan¹, LI Ping-ping¹, FENG Jian-fang², LIN Shi-yuan¹, CHEN Hui¹, WU Wei¹, ZHANG Wei¹

1. Guilin Medical University, Guilin 541004, China

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: **Objective** To prepare a drug delivery system based on *L*-carnitine modified and quercetin (QUE)-coloading chitosan-stearic acid (LC-SA/CS-SA) nanomicelles, investigate the properties of micelles, and evaluate the enhanced absorption effect of the micelles by *in vivo* intestinal absorption in rats. **Methods** The CS-SA copolymer was synthesized by the amidation of free amino groups on CS. The chemical structure of CS-SA was characterized by Fourier transform-infrared spectroscopy (FT-IR) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Taking PTX was the main drug and quercetin as the auxiliary drug, the particle size distribution, Zeta potential, drug loading and entrapment efficiency of the micelles were investigated. The micromorphology of the micelles was observed by transmission electron microscope (TEM). The critical micelle concentration (CMC) of LC-SA/CS-SA

收稿日期: 2020-05-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760718); 广西自然科学基金资助项目 (2018GXNSFBA281044); 广西科技基地和人才专项 (桂科 AD19110070); 广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划

作者简介: 张倩, 女, 在读硕士研究生, 从事药剂学研究。Tel: 18934772260 E-mail: 1484571475@qq.com

*通信作者 张玮, 副教授, 硕士研究生导师, 从事药剂学研究。Tel: 13557330014 E-mail: 22437564@qq.com

micelles was measured by fluorescent probe method. The *in vitro* release of paclitaxel from polymeric micelles was evaluated by dialysis method. The absorption rate coefficient (K_a) of paclitaxel (PTX)-loaded micelles was assessed by *in vivo* intestine absorption in rats. **Results** The results of FT-IR and ^1H NMR indicated that the copolymer (CS-SA) was synthesized. The LC-SA/CS-SA@QUE+PTX micelles showed regular spherical shapes with particle size of (148.3 ± 1.7) nm, PDI of 0.16 ± 0.07 , Zeta potential of (24.600 ± 0.167) mV and CMC of $14.31 \mu\text{g/mL}$. Compared to the commercial formulation of PTX, LC-SA/CS-SA@QUE+PTX micelles and LC-SA/CS-SA@PTX micelles showed significantly sustained release behaviors. The enhanced absorption effect of PTX in the micelle system was confirmed by intestine absorption test in rats. **Conclusion** The LC-SA/CS-SA@QUE+PTX micelles, as a potential oral absorption promoter, enhanced the intestinal absorption of PTX in rats.

Key words: chitosan-stearic acid; L-carnitine; paclitaxel; quercetin; *in vivo* intestinal absorption; synergistic drug delivery; nanomicelles; intestinal circulation *in vivo*

聚合物纳米胶束是由两亲性聚合物组成的热力学稳定体系,其疏水内核可负载难溶性药物,作为提高难溶药物口服吸收的有效途径^[1-6]。壳聚糖(chitosan, CS)作为自然界中广泛存在的天然阳离子多糖,具有良好的黏膜附着性和生物相容性,故其载药系统具有较高的药物递送效率^[7-9]。低相对分子质量壳聚糖与硬脂酸(stearic acid, SA)共价结合可得到两亲性聚合物,在水溶液中可自组装成胶束^[10]。由于壳聚糖具有可修饰性,壳聚糖衍生物胶束逐渐成为研究热点。

药物口服吸收的一条重要通道是小肠上皮细胞中的各种转运体,药物肠道转运体主要有寡肽转运体(H^+ /peptide cotransporter, PEPT1)、ATP结合盒式膜转运体家族(ABC转运体)、有机阳离子转运体等^[11-12]。其中,有机阳离子/肉碱转运体(organic cation/carnitine transporter, OCTN)是位于小肠上皮细胞的肠道转运体,OCTN2对左旋肉碱具有高度亲和性^[13-15]。Kou等^[16]将左旋肉碱与聚乳酸-乙醇酸(PLGA)结合制备纳米粒,左旋肉碱偶联于PLGA纳米粒表面,显著增强了载药的细胞吸收和肠道吸收。槲皮素(quercetin, Que)是一种天然的植物黄酮类化合物,且是肠道上皮细胞外排转运体P-糖蛋白(P-gp)和细胞色素P450代谢酶系(CYP3A)的双重抑制剂^[17-19]。Liu等^[20]以油酸-壳聚糖(OA-CS)为载体,采用离子交联法制备了负载紫杉醇(paclitaxel, PTX)与Que的肺吸入式的纳米粒聚合微球,体内药代动力学和生物分布研究表明,负载了PTX与Que的纳米粒聚合微球具有较长的循环时间和较高的肺蓄积能力。

本课题以PTX为主药,Que为促吸收辅药,以左旋肉碱的脂肪酸衍生物硬脂酰左旋肉碱(LA-SA)“插入”修饰壳聚糖-硬脂酸(CS-SA)胶束,制备了一种协载Que的PTX口服胶束LC-SA/CS-SA@

Que+PTX,并评估其促吸收效能。该研究未见报道,因而,有望为促进难溶性药物口服吸收提供有价值的参考。

1 仪器与试药

1.1 主要仪器

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,上海邦西仪器科技有限公司;RE52CS-1 旋转蒸发器、BZF-30 真空干燥箱,上海博迅实业公司;LC-10N-50A 真空冷冻干燥机,上海力辰邦西仪器科技有限公司;GL-88B 涡旋混合器,其林贝尔仪器制造有限公司;Nano ZS90 纳米粒度及Zeta电位仪,英国马尔文公司;ES-A 电子天平,天津德安特有限公司;SCIENTZ-IIID 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;LC-10AT 高效液相色谱仪,岛津企业管理(中国)有限公司;索氏提取器,上海力辰邦西仪器科技有限公司;H-600 透射电子显微镜,日本Hitachi公司。

1.2 试剂与药品

硬脂酸(分析纯)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC,分析纯)、Que(质量分数>95%)购于阿拉丁试剂有限公司;无水乙醇(分析纯)、无水甲醇(分析纯)购于西陇化工股份有限公司;LC-SA(质量分数>98%)、上海绿箴生物科技有限公司;PTX(HPLC测定质量分数99%),西安天宝生物科技有限公司;透析管,截留相对分子质量8 000~10 000,仕必纯贸易(上海)有限公司;Sprague Dawley (SD)大鼠,雌性,12只,湖南史莱克景达实验动物有限公司,体质量180~220 g,许可证号SCXK(湘)2019-0004。

2 方法与结果

2.1 CS-SA的合成^[21]

称取硬脂酸0.7 g和EDC 4.71 g(硬脂酸与EDC物质的量比为1:10)溶解于80 mL无水乙醇中,

60 °C 搅拌反应 30 min, 得反应液 A。将壳聚糖 (相对分子质量 3 000~6 000) 1 g 溶于 120 mL 纯水中, 升温至 80 °C, 得反应液 B。将反应液 A 缓缓加入反应液 B 中, 搅拌, 持续反应 6 h。反应完成后, 旋蒸除去乙醇, 纯化水透析 48 h, 除去未反应的 EDC 及其它水溶性副产物。收集透析产物, 冷冻干燥得固体。乙醇洗涤, 以除去未反应的硬脂酸。挥干乙醇, 加入纯水中复溶, 再次冻干, 置于干燥器中储存备用。

2.2 CS-SA 的表征

2.2.1 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 分析 称取样品 (SA、CS、CS-SA 聚合物) 以质量比为 1:200 的比例分别与溴化钾粉末混合均匀, 玛瑙研钵研细后压片。在波长 4 000~400 cm^{-1} 扫描并记录 FTIR 数据, 判断目标产物的生成。SA、CS、CS-SA 的 FTIR 图谱见图 1。谱图中, 3 750~3 000 cm^{-1} 处为羟基上 O-H 和氨基上 N-H 的伸缩振动峰。对比各图谱中该区段峰可见, CS-SA 相较于 CS 的伸缩振动峰明显减弱, 提示 CS 上的 -OH 或者 -NH₂ 被取代; 1 590 cm^{-1} 附近 CS 游离氨基上的 N-H 面内弯曲振动吸收峰, 以及 1 710 cm^{-1} 处 SA 羧基中 C=O 的伸缩振动峰, 都在 CS-SA 中明显减弱, 说明反应主要发生在壳聚糖的 -NH₂ 上, 形成了酰胺键, 证实壳聚糖与硬脂酸成功接枝。

2.2.2 核磁共振氢谱 (¹H-NMR) 分析 称取 CS、SA、CS-SA 适量, 分别溶解于氘代氯仿 (CDCl_3)、氘代重水 (D_2O)、氘代三氟乙酸 (CF_3COOD) (5:1) 中, 加入到核磁管内约 4 cm 的高度, 进行 500 MHz 核磁共振波谱扫描。SA、CS、CS-SA 的 ¹H-NMR 图谱见图 2。SA 中 δ 0.86 (1) 处为碳链端-CH₃ 上 H 信号峰, δ 1.66 (2) 处为碳链亚甲基 H 信号峰, δ 2.37 (3) 处为与-COOH 相连的 α -CH₂ 的 H 信号

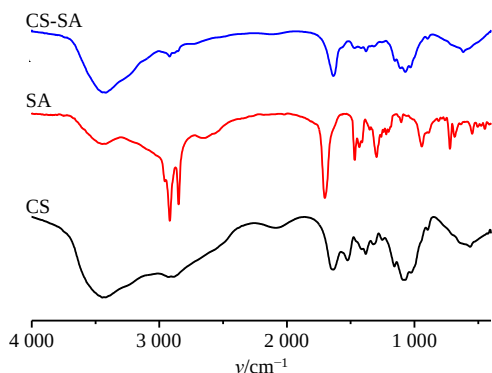


图 1 CS-SA、SA 和 CS 的 FTIR 图谱
Fig. 1 FTIR spectra of CS-SA, SA, and CS

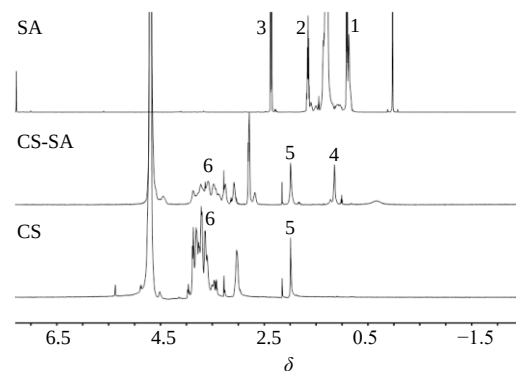


图 2 SA、CS-SA 和 CS 的 ¹H-NMR
Fig. 2 ¹H-NMR of SA, CS-SA and CS

峰; 在 CS 谱图中, δ 3.50~3.99 (5) 处为氨基葡萄糖环上 C-3、C-4、C-5、C-6 次甲基上 H 信号峰; CS-SA 图谱 (4) 附近, δ 0.996 的峰可归于 SA 碳链端-CH₃ 上的 H 峰, δ 1.15 的峰可归于 SA 中-CH₂-的 H 峰。SA 和 CS 中的其他信号峰也可在 CS-SA 图谱中找到归属, 说明 SA 已经成功接枝到 CS 上。

2.3 LC-SA/CS-SA@Que+PTX 胶束的制备

载药胶束的制备采用薄膜乳化法。称取 PTX 2 mg 与 Que 0.5 mg 于圆底烧瓶中, 加入 10 mL 无水乙醇, 超声溶解, 45 °C 旋转蒸发除去无水乙醇, 形成药物的混合薄膜, 真空干燥去除残留有机溶剂, 得干燥药膜。精密称取 CS-SA 19 mg 和 LC-SA 2 mg 溶于 30 mL 的纯水中, 超声溶解, 并用细胞破碎仪乳化 7 min (功率 250 W, 工作 3 s, 间歇 2 s)。将上述胶束溶液倒入覆盖有混合药膜的圆底烧瓶中超声, 水合脱膜, 并用细胞破碎仪乳化 10 min (功率为 250 W, 工作 3 s, 间歇 2 s), 所得液体通过 0.45 μm 的微孔滤膜, 即得。胶束液外观见图 3, 可见溶液呈淡黄色, 澄清透明, 并泛乳光。该胶束液室温放置一周以上未见外观发生明显变化, 提示稳定性良好。

2.4 LC-SA/CS-SA@Que+PTX 胶束的表征

2.4.1 粒径分析 取 LC-SA/CS-SA@Que+PTX 胶



图 3 LC-SA/CS-SA@QUE+PTX 胶束溶液
Fig. 3 LC-SA/CS-SA@QUE+PTX micelles

束溶液 5 mL, 适当稀释, 采用 Nano ZS90 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定胶束的粒径、聚合物分散性指数(PDI)及 Zeta 电位(图 4)。LC-SA/CS-SA@Que+PTX 胶束平均 Zeta 电位为 (24.6 ± 0.167) mV, 平均粒径为 (148.3 ± 1.7) nm, PDI 为 0.16 ± 0.07 。结果表明, 胶束带正电荷, 且粒径分布均匀。

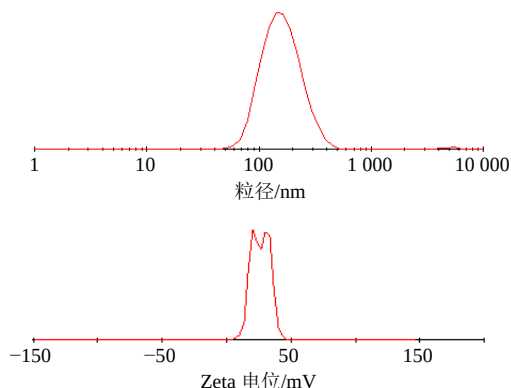


图 4 载药胶束粒径与 Zeta 电位分布图

Fig. 4 Particle size distribution and Zeta potential of drug-loading micelles

2.4.2 包封率和载药量测定 采用 HPLC 法测定 LC-SA/CS-SA@Que+PTX 双载药胶束中 PTX 与 Que 的含量。

测定 PTX 的色谱条件: 色谱柱为 Wondasil™ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (75:25); 检测波长 229 nm; 进样量 20 μL; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 °C。

测定 Que 的色谱条件: 色谱柱为 Wondasil™ C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.2% 磷酸水溶液 (60:40); 检测波长 360 nm; 进样量 20 μL; 体积流量 1 mL/min; 柱温 25 °C。

精密吸取 LC-SA/CS-SA@Que+PTX 胶束 1 mL, 加入无水甲醇 9 mL, 细胞破碎仪超声 2 min (功率 200 W, 工作 1 s, 间歇 1 s) 以使胶束解聚完全。吸取胶束破乳甲醇溶液 1 mL, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液注入 HPLC, 测定胶束中 PTX 与 Que 含量, 按下述公式分别计算包封率与载药量。LC-SA/CS-SA 载药胶束中 PTX 的包封率为 84.6%, 载药量为 7.05%, Que 的包封率为 63.8%, 载药量为 1.32%。

包封率 = 胶束中 PTX 或 Que 的质量 / 加入 PTX 或 Que 的质量

载药量 = 胶束中 PTX 或 Que 质量 / 胶束的质量

2.4.3 微观形态观察 采用透射电子显微镜

(TEM) 观察胶束粒子的形态。将 LC-SA/CS-SA@Que+PTX 胶束溶液用水稀释后, 滴至表面有支持膜的铜网上, 自然晾干后, 用 1% 磷钨酸染色, 自然晾干后, TEM 观察。由图 5 可见, 载药胶束形状规整呈球形, 无聚集, 且粒径分布均一。

2.4.4 临界胶束浓度 (CMC) 的测定 采用芘荧光探针法测定聚合物胶束的 CMC。配制一系列不同胶束材料质量浓度 (0.001~0.500 mg/mL) 的胶束溶液, 并分别在胶束溶液中加入 1 mL 芘丙酮溶液 (芘的浓度为 0.6 μmol/L), 置于室温下放置过夜。以 337 nm 为发射波长, 测定各溶液在 373、384 nm 处的激发光强度。以 373、384 nm 处的激发光强度比值对胶束溶液浓度的对数值作图 (图 6)。2 条回归线的交点处对应的溶液质量浓度即是该聚合物的 CMC, 测得的 CMC 值为 14.31 μg/mL, 较低的 CMC 值提示胶束耐受胃肠液稀释。

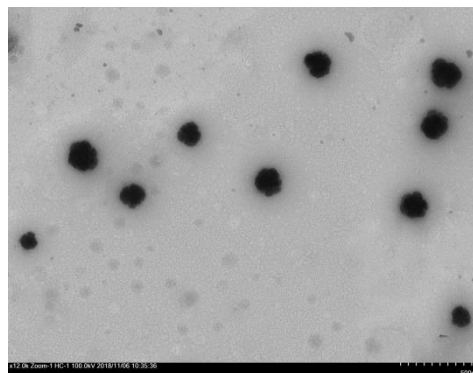


图 5 载药胶束 TEM 图

Fig. 5 TEM image of drug-loading micelles

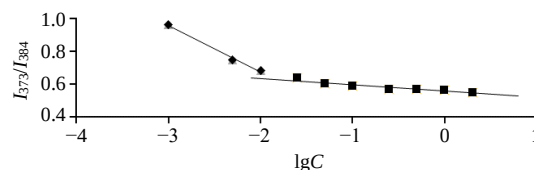


图 6 LC-SA/CS-SA 胶束的 CMC

Fig. 6 CMC of LC-SA/CS-SA micelles

2.5 体外释放研究

由于 PTX 是难溶性药物, 为达到漏槽条件, 本实验以含有 20% 乙醇的 0.8 mol/L 水杨酸溶液为释放介质, 采用透析法进行胶束的体外释放研究。配制含有 1 mg/mL PTX 当量的 LC-SA/CS-SA@PTX、LC-SA/CS-SA@Que+PTX 胶束溶液各 5 mL。分别取 2 mL 的 1 mg/mL PTX 对照制剂 (溶剂按照市售 Taxol™ 处方: Cremophor EL 与无水乙醇比例 50.3:49.7)、LC-SA/CS-SA@PTX、LC-SA/CS-SA@Que+PTX 载药胶束置于透析管 (截留相对分子质量为

8 000~10 000) 中, 于装有 100 mL 释放介质的锥形瓶中考察释放行为。将锥形瓶置水浴摇床中震荡 (37 °C, 100 r/min), 分别于 0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、10、12、24、48、60、72、84 h 取样 1 mL, 并补充同温度的释放介质 1 mL。按照“2.2.2”下色谱条件, 采用 HPLC 测定 PTX 质量浓度, 以累积释药率 (Q) 对时间 (t) 作图, 绘制胶束体外累积释药曲线 (图 7)。

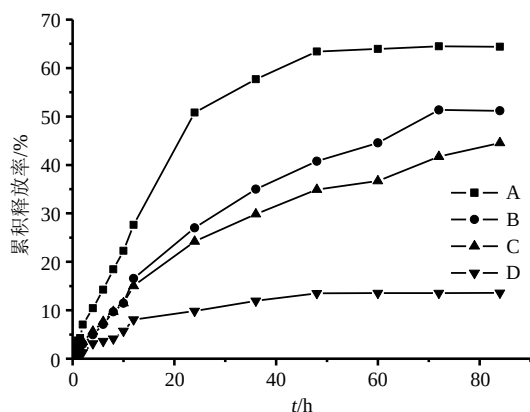


图 7 PTX 对照制剂 (A)、LC-SA/CS-SA@Que+PTX 胶束中 PTX (B)、LC-SA/CS-SA@PTX 胶束中 PTX (C) 和 LC-SA/CS-SA@Que+PTX 胶束中 Que (D) 的体外释放曲线
Fig. 7 In vitro release curves of PTX control formulation (A), PTX in LC-SA/CS-SA@Que+PTX micelles (B), PTX in LC-SA/CS-SA@PTX micelles (C) and Que in LC-SA/CS-SA@Que+PTX micelles (D)

结果显示, 在 36 h, PTX 注射剂释放达到最大 64%, 载 PTX 与 Que 胶束中 PTX 在 72 h 处释放达到最大 51%, 载 PTX 胶束中 PTX 在 84 h 处释放达到 46%, 后两者显示出更明显的缓释效应。这种缓释作用是由载体材料对释放的阻碍造成, 也间接保证了药物不至于在胃肠液中发生严重渗漏, 利于药物吸收。相较于 PTX, Que 在胶束中的释放更为缓慢, 在 84 h 处的体外释放仅 10%, 说明载体对 Que 的释放同样具有阻碍作用, 这可能与 Que 相对较低的载药量有关。Que 作为 P-gp 和 CYP3A 的双重抑制剂, 作用位点在细胞内, 具有促进 PTX 吸收的作用, 因此, 其在胃肠道中的低释放量 (或不释放) 更利于其效应的发挥。

2.6 在体肠循环实验^[22-23]

2.6.1 溶液配制 10%水合氯醛 0.1 g/mL、酚红 Kerbs-Ringer 试剂 (含酚红 20 μg/mL)、PTX 对照制剂供试液、LC-SA/CS-SA@Que+PTX 胶束供试液、LC-SA/CS-SA@PTX 胶束供试液、CS-SA@PTX

胶束供试液。后 3 种供试液均用酚红 Kerbs-Ringer 试剂溶解, 含 PTX 当量 20 μg/mL。

2.6.2 HPLC 法测定样品中 PTX 含量 色谱条件同“2.2.2”项下。样品预处理: 甲醇超声破乳稀释, 过 0.22 μm 的微孔滤膜后 HPLC 法测定。

2.6.3 紫外分光光度法测定酚红含量 精密称取酚红 25 mg, 置 250 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别量取 1、2、3、4、5、6 mL 置 6 个 10 mL 量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度。再分别量取 0.5 mL, 置 10 mL 具塞试管中, 加 0.2 mol/L NaOH 溶液 5 mL, 在 555 nm 波长处测定吸光度 (A) 值, 得酚红标准曲线方程。取 0.5 mL 样品溶液, 置 15 mL 离心管中, 加 0.2 mol/L NaOH 溶液 5 mL, 摇匀, 同法测定 A 值, 计算含量。

2.6.4 在体肠吸收实验 调节蠕动泵体积流量为 5、2.5 mL/min, 并将恒温水浴锅水浴温度调节为 (37.0±0.5) °C, 取 100 mL 供试液, 置锥形瓶中, 置恒温水浴中预热至 (37.0±0.5) °C; 选择健康雌性大鼠, 实验前禁食 12 h (可自由饮水), 称体质量后, 用 10%水合氯醛溶液以 0.003 mL/g 的用量作腹腔注射麻醉, 固定, 在腹腔中下部沿腹中线剪开约 3 cm 的开口, 打开腹腔取出肠段, 在肠段两端 (十二指肠上端及回肠下端) 切口, 在切口处分别插入玻璃管 (直径约为 0.5 cm) 并用手术线结扎。肠内容物用 37 °C 生理盐水冲洗干净, 再将生理盐水排净, 两端的玻璃管与蠕动泵及供试液连接, 形成回路。将伤口用浸有生理盐水的纱布覆盖保湿, 并随时补充纱布上的生理盐水, 打开蠕动泵, 以 5 mL/min 的体积流量循环 10 min 后, 将体积流量调整为 2.5 mL/min, 立即自锥形瓶中取样 2 份 (各 1 mL), 分别作为供试液和酚红液零时间点样本, 同时向锥形瓶中补加酚红 Krebs-Ringer 溶液 2 mL, 其后, 每隔 15 min 按同法取样并补加酚红液, 2 h 后停止循环。实验后处死大鼠, 分别测定样品中 PTX 和酚红的质量浓度。

2.6.5 吸收速率常数计算 以肠灌流液中剩余药量的对数 $\ln X$ 对取样时间 t 进行线性回归, 得回归方程 $\ln X = \ln X_0 - K_a t$ (X 为肠灌流液中剩余药量, X_0 为肠灌流液中起始药量, K_a 为吸收速率常数, t 为时间)。由表 1 可知, LC-SA/CS-SA@PTX、LC-SA/CS-SA@Que+PTX、CS-SA/PTX 的 K_a 均大于 PTX 对照制剂 (control formulation of PTX), 且 K_a (LC-SA/CS-SA@Que+PTX) > K_a (LC-SA/CS-SA@PTX) > K_a (CS-SA@PTX)。

表1 CS-SA@PTX、LC-SA/CS-SA@PTX、LC-SA/CS-SA@Que+PTX 和 PTX 参比制剂的 K_a 值

Table 1 K_a value comparison of CS-SA@PTX, LC-SA/CS-SA@PTX, LC-SA/CS-SA@Que+PTX and control formulation of PTX

制剂	K_a 值
PTX 对照制剂	0.021
CS-SA@PTX	0.036
LC-SA/CS-SA@PTX	0.086
LC-SA/CS-SA@Que+PTX	0.091

显而易见,胶束载体经 OCTN2 配体 LC 修饰后,由于具有转运体靶向,经 OCTN2 介导,增强了载药的胃肠道吸收;载药系统协载 Que 后,借助 Que 对 P-gp 和 CYP4A 的双重抑制作用,再进一步增强了载药 PTX 的肠道吸收。回顾“2.5”项中体外释放的结果,载药胶束体外释放缓慢但胃肠吸收却显著提高,这种现象提示该载药胶束可能以完整形式被胃肠壁细胞摄取吸收,而非传统的药物先胃肠道释放再吸收途径。因此,该载药系统的释药机制值得进一步研究,并为难溶性药物口服吸收提供有价值的参考。

3 讨论

该载药系统以 CS-SA 为胶束骨架,并采用 LC-SA “插入”修饰胶束。疏水的 SA 基团将锚于胶束疏水内核而亲水的 LC 暴露于胶束亲水性表面。暴露胶束表面的 LC 配体利于靶向 OCTN2 转运体,从而发挥转运体介导的促载药吸收作用。协同包载的 Que 具有 P-gp 和 CYP4A 的双重抑制,进一步促进载药口服吸收。

该载药胶束并不能通过简单的自组装形成,需借助超声,使载体材料高分子链舒展,载药通过疏水作用吸附于材料疏水段后,再缔合形成胶束,将药物包载其中,并进一步发生链间纠缠,稳固结构。制得的胶束成规整球状,粒径小且分布均匀,CMC 低,载药量高,且释药缓慢。

实验采用透析袋法考察了胶束的体外释放行为。PTX 是短叶红豆杉树皮中提取的天然产物,几乎不溶于水^[24],难以达到释放的漏槽条件,经查阅文献^[25-27]及实验考察,选择含 20%乙醇的 0.8 mol/L 水杨酸溶液为释放介质。该介质满足漏槽条件,虽不能完全模拟胃肠液,但其对药物的溶解性明显高于胃肠液。该释放介质中胶束的缓慢释药意味着在胃肠液中几乎不释药,结合在体肠循环实验证实的

胶束促吸收效应,提示胶束可能以完整胶束形式被胃肠壁细胞摄取从而增强药物吸收。

PTX 作为一线抗癌药,抗癌谱广且效果显著,但药物的难溶性限制了该药的口服吸收,只能注射给药。众多其它抗癌药也面临类似问题。因此,胶束载药系统的研究为促进难溶性抗癌药的口服吸收提供了有价值的参考。

参考文献

- [1] 李文渊,童丽,热增才旦. 纳米胶束作为药物载体的研究进展 [J]. 中国执业药师, 2009, 6(12): 36-40.
- [2] 朱君君,沈成英,王镜,等. 甘草酸-F127/TPGS 混合纳米胶束的制备及其大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1845-1851.
- [3] 侯天宇,赖芳芳,李青山. 载药纳米聚合物研究进展 [J]. 江西化工, 2011(2): 12-15.
- [4] Gulbake A, Jain S K. Chitosan: A potential polymer for colon-specific drug delivery system [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(6): 713-729.
- [5] Tonglairoum P, Woraphatphadung T, Ngawhirunpat T, et al. Development and evaluation of N-naphthyl-N, O-succinyl chitosan micelles containing clotrimazole for oral candidiasis treatment [J]. *Pharm Dev Technol*, 2017, 22(2): 184-190.
- [6] 康宁,周东升,李燕杰,等. 线粒体靶向的载紫杉醇 TPP-PEG-PE 纳米胶束的体外评价及促肿瘤细胞凋亡研究 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5554-5560.
- [7] Thotakura N, Dadarwal M, Kumar P, et al. Chitosan-stearic acid based polymeric micelles for the effective delivery of tamoxifen: Cytotoxic and pharmacokinetic evaluation [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2017, 18(3): 759-768.
- [8] Elgadir M A, Uddin M S, Ferdosh S, et al. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review [J]. *J Food Drug Anal*, 2015, 23(4): 619-629.
- [9] 颜洁,关志宇,朱卫丰,等. Box-Behnken 效应面法优化自组装法制备葛根素壳聚糖/海藻酸钠口服纳米粒的处方与工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5706-5713.
- [10] 朱运. 壳聚糖嫁接物药物递释系统增强瘤内渗透的肿瘤治疗及机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [11] 刘志浩,刘克辛. 肠道药物转运体及其研究方法 [J]. 药学报, 2011, 46(4): 370-376.
- [12] Giacomini K M, Huang S M, Donald J T, et al. Membrane transporters in drug development [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(3): 215-36.
- [13] 陈佳音,卢杨,赵娣,等. 肉碱/有机阳离子转运体

- (OCTNs) 的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(10): 1185-1190.
- [14] Tamai I. Pharmacological and pathophysiological roles of carnitine/organic cation transporters (OCTNs: SLC22A4, SLC22A5 and Slc22a21) [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2013, 34(1): 29-44.
- [15] Nicola L, Marta F, Marzia P. Carnitine transport and fatty acid oxidation [J]. *BBA-Mol Cell Res*, 2016, 1863(10): 2422-2435.
- [16] Kou L F, Yao Q, Sun M C, *et al.* Cotransporting ion is a trigger for cellular endocytosis of transporter-targeting nanoparticles: A case study of high-efficiency SLC22A5 (OCTN₂)-mediated carnitine-conjugated nanoparticles for oral delivery of therapeutic drugs [J]. *Adv Healthc Mater*, 2017, 6(17): 1-10.
- [17] 左彦珍, 李宝群, 周 健. 槲皮素对 P-糖蛋白转录调控机制的研究 [J]. 承德医学院学报, 2011, 28(3): 243-245.
- [18] Wang Y H, Chao P D, Hsiu S L, *et al.* Lethal quercetin-digoxin interaction in pigs [J]. *Life Sci*, 2004, 74(10): 1191-1197.
- [19] Sarkar M A. Quercetin not only inhibits P-glycoprotein efflux activity but also inhibits CYP3A isozymes [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1995, 36(5): 448-450.
- [20] Liu K, Chen W J, Yang T T, *et al.* Paclitaxel and quercetin nanoparticles co-loaded in microspheres to prolong retention time for pulmonary drug delivery [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 8239-8255.
- [21] Yang T, Feng J F, Zhang Q, *et al.* l-Carnitine conjugated chitosan-stearic acid polymeric micelles for improving the oral bioavailability of paclitaxel [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 575-584.
- [22] 孙慧园, 陈 浩, 梅朝叶, 等. 白及醇提物中 5 种主要活性成分的在体肠吸收特征研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(6): 757-764.
- [23] 涂 星, 王利胜, 陈 豆. 在体肠循环法研究川芎嗪自微乳的大鼠肠吸收 [J]. 中国医药指南, 2012, 10(9): 1-2.
- [24] 黄晓妍, 师以康. 抗肿瘤药物紫杉醇结构修饰的研究进展 [J]. 山东医药, 2019, 59(15): 95-100.
- [25] Huh K M, Lee S C, Cho Y W, *et al.* Hydrotropic polymer micelle system for delivery of paclitaxel [J]. *J Control Release*, 2005, 101(1/2/3): 59-68.
- [26] 关吉斌. GAPDH siRNA 与紫杉醇共载于内含正电荷的长循环脂质体中协同治疗低氧耐药肿瘤细胞 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2017.
- [27] 张 栋. 内源性白蛋白结合型紫杉醇前药纳米粒的构建与评价 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2018.