

蝙蝠葛碱复合纳米胶束的制备及大鼠体内药动学研究

张 菊¹, 魏 丹¹, 张 雪², 赵江丽³, 贾东升^{4*}

1. 河北经贸大学 生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050072

2. 河北医科大学第四医院 肿瘤内科, 河北 石家庄 050000

3. 河北省农林科学院 遗传生理研究所, 河北 石家庄 050050

4. 河北省农林科学院 经济作物研究所, 河北 石家庄 050061

摘要: 目的 使用聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物 (Soluplus[®]) 和 *D*- α -维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS) 作为载体材料制备蝙蝠葛碱复合纳米胶束 (dauricine composite nanomicelles, Dau-CNMs), 并通过大鼠 ig 给药评价其药动学情况。方法 采用溶剂蒸发-薄膜分散法制备 Dau-CNMs, 通过单因素实验筛选了 Dau-CNMs 处方中 Soluplus[®] 与 TPGS 用量配比; 分别考察了 Dau-CNMs 和蝙蝠葛碱单纯纳米胶束 (dauricine single nanomicelles, Dau-SNMs) 的微观形态、粒径分布、Zeta 电位等理化性质; 并通过 MTT 法评估了 Dau-CNMs 的细胞毒性, 采用 Caco-2 细胞单层模型评价了蝙蝠葛碱原料药、Dau-SNMs 和 Dau-CNMs 的细胞跨膜转运性质; 通过大鼠 ig 给药比较蝙蝠葛碱混悬液、Dau-SNMs 和 Dau-CNMs 的体内药动学特征。结果 经实验筛选得到 Dau-CNMs 的最优处方: Soluplus[®] 与 TPGS 用量比为 7:1; 在透射电子显微镜下可观察到 Dau-SNMs 和 Dau-CNMs 均呈圆整球状分布; Dau-CNMs 的细胞毒性较低, 且能够有效提高药物的跨膜转运能力; 与蝙蝠葛碱混悬液组和 Dau-SNMs 组比较, Dau-CNMs 组大鼠 ig 给药显著提高了药物达峰浓度和口服生物利用度。结论 以 Soluplus[®] 与 TPGS 作为载体材料, 将蝙蝠葛碱制备成复合纳米胶束, 能够显著增加药物生物利用度。

关键词: 蝙蝠葛碱; 复合纳米胶束; 溶剂蒸发-薄膜分散法; 药动学; 生物利用度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)08-2276-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.010

Preparation and pharmacokinetic evaluation of dauricine composite nanomicelles in rats

ZHANG Ju¹, WEI Dan¹, ZHANG Xue², ZHAO Jiang-li³, JIA Dong-sheng⁴

1. College of Biology Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050072, China

2. Department of Medical Oncology, Hebei Medical University Fourth Affiliated Hospital, Shijiazhuang 050000, China

3. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050050, China

4. Institute of Cash Crop, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050061, China

Abstract: Objective To prepare dauricine composite nanomicelles (Dau-CNMs) using polyethylene caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer (Soluplus[®]) and *D*- α -tocopherol polyethylene glycol succinate (TPGS) as carrier materials and evaluate its pharmacokinetics in rats. **Methods** The Dau-CNMs were prepared by solvent evaporation-film dispersion method. The amount ratio of Soluplus[®] and TPGS in the Dau-CNMs formulation was screened by single factor experiment. The microscopic morphology, particle size distribution, Zeta potential of Dau-CNMs and dauricine single nanomicelles (Dau-SNMs) were investigated, respectively. The cytotoxicity of Dau-CNMs was evaluated by MTT method. The Caco-2 cell monolayer model was used to evaluate the transmembrane transport properties of dauricine, Dau-SNMs and Dau-CNMs. The *in vivo* pharmacokinetic characteristics of dauricine suspension, Dau-SNMs and Dau-CNMs after intragastric administration in rats were compared. **Results** The optimal formulation of Dau-CNMs as followed: The dosage ratio of Soluplus[®] and TPGS was 7:1. It could be observed under the

收稿日期: 2020-12-01

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (H2020207002); 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2018013); 河北经贸大学科研基金重点项目 (2017KYZ05)

作者简介: 张 菊 (1987—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药活性成分的药理学及药动学。

*通信作者: 贾东升 (1982—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事药用植物加工及开发研究。Tel: (0311)87652129 E-mail: jiadsl@163.com

transmission electron microscope that Dau-CNMs and Dau-SNMs are distributed in a round spherical shape. Dau-CNMs had low cytotoxicity and could effectively improve the dauricine transmembrane transport ability. Compared with dauricine suspension and Dau-SNMs, Dau-CNMs significantly improved the peak concentration and bioavailability of dauricine. **Conclusion** This study uses Soluplus[®] and TPGS as carrier materials to prepare dauricine composite nanomicelles, which could significantly increase the bioavailability of dauricine.

Key words: dauricine; composite nanomicelles; solvent evaporation-film dispersion method; pharmacokinetics; bioavailability

蝙蝠葛碱 (dauricine, Dau) 是从防己科植物蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* DC. 的根茎中提取分离而得到的一种双苄基四氢异喹啉生物碱, 具有广谱的抗心律失常活性, 临床上用于治疗快速型心律失常^[1]。然而, 蝙蝠葛碱为弱碱性药物^[2], 其溶解性具有 pH 依赖性, 在酸性环境中药物以离子化形式存在, 溶解性较好, 但是在中性或弱碱性环境中溶解度较低, 这会导致原本已经溶解在胃液中的蝙蝠葛碱随着胃排空作用在进入小肠时沉淀析出^[3], 另外, 蝙蝠葛碱是 P-糖蛋白 (P-gp) 底物^[4-6], 肠道吸收后存在外排作用, 口服生物利用度较低 (15%~19%)^[7], 生物变异性较大, 临床疗效不确切。

由高分子聚合物和/或表面活性剂形成的胶束可以抑制药物在进入小肠后成核和晶体生长, 保持稳定的过饱和状态, 防止药物析出沉淀^[8-9], 在改善弱碱性药物的体外溶出度和增强其生物利用度方面显示出巨大潜力^[10-11]。聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物 (Soluplus[®]) 是巴斯夫公司开发出的一种非离子型高分子型聚合物载体, 其溶解性不随胃肠道 pH 值而改变, 且 Soluplus[®] 具有一定的表面活性剂作用, 可提高难溶性药物的溶解度^[12-13]; D- α -维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS) 属于非离子表面活性剂, 文献报道^[14-15] TPGS 能够抑制 P-gp 对底物的外排作用, 改变生物膜的流动性, 提高药物生物利用度, 作为一种安全的药用辅料已被 FDA 批准用于药品中, 而以 Soluplus[®]/TPGS 形成的复合胶束能够显著改善难溶性弱碱性药物的口服生物利用度和治疗效果^[16]。为此, 本研究以 Soluplus[®] 与 TPGS 作为载体材料, 将蝙蝠葛碱制备成复合纳米胶束 (Dau-CNMs), 并通过大鼠体内药动学评估药物生物利用度, 为蝙蝠葛碱的口服新剂型研究提供依据。

1 仪器与材料

RIGOL L-3000 高效液相色谱系统, 苏州普源精电科技有限公司; AE523 电子天平, 上海恒平科学仪器有限公司; DF-101T-予华集热式恒温加热磁力搅拌器大容量, 巩义市予华仪器有限责任公司;

RE-52CS 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; Zetasizer Nano ZSE 纳米粒度仪, 英国马尔文公司; HT7700 型透射电子显微镜 (SEM), 日本 Hitachi 公司; GL-25MS 超速冷冻离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; LHS-150SC 恒温恒湿箱, 上海康路仪器设备有限公司。

蝙蝠葛碱原料药, 上海信裕生物科技有限公司, 质量分数为 99.1%, 批号 SBJ180712; 蝙蝠葛碱对照品, 中国食品药品检定研究院, 质量分数为 98.5%, 批号 111867-201804; 聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物 (Soluplus[®]), 德国巴斯夫公司, 批号 23597797V0; TPGS, 嘉法狮上海贸易有限公司, 批号 T110277; 二氯甲烷, 百灵威化学试剂公司, 批号 SA2SF11714; 四甲基偶氮唑盐 (MTT), 百灵威化学试剂公司, 批号 A100793-0001。

Caco-2 细胞, 河北医科大学细胞实验室提供; Wistar 大鼠, 体质量为 (220 \pm 20) g, 雌雄各半, SPF 级, 河北医科大学动物实验中心, 合格证号 1910017, 许可证号 SCXK (冀) 2019-1-003。所有动物实验遵循河北医科大学有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 Dau-CNMs 和 Dau-SNMs 的制备

本研究通过溶剂蒸发-薄膜分散法制备 Dau-CNMs 或 Dau-SNMs, 按照一定质量比例称取 Soluplus[®] 和/或 TPGS 至 100 mL 梨形瓶中, 加入 10 mL 二氯甲烷溶解, 再称取处方量的蝙蝠葛碱加入到上述溶液中溶解, 将梨形瓶固定到旋转蒸发仪上, 在一定水浴温度下旋蒸挥干二氯甲烷, 在瓶壁内侧形成一层透明薄膜, 减压干燥 1 h, 放入到真空烘箱中过夜; 加入去离子水 50 mL 水化薄膜, 并保持外界水浴温度与内水相温度一致, 同时进行磁力搅拌, 速率为 500 r/min, 持续水化搅拌 30 min, 即形成淡蓝色溶液, 样品溶液经 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 并加入去离子水至体积为 50 mL, 即得到 Dau-CNMs (加 TPGS) 或 Dau-SNMs (不加 TPGS)。

2.2 包封率测定

取 Dau-CNMs 或 Dau-SNMs 2.0 mL 加入到截留相对分子质量为 10 000 的超滤离心管上端，密封，放入到离心机中，在 5000 r/min 下离心 20 min，收集离心管底端中超滤液置 10 mL 量瓶中，加入流动相定容 ($W_{\text{游离}}$)；另取 Dau-CNMs 或 Dau-SNMs 1.0 mL 置 50 mL 量瓶中，加入乙腈 5 mL，水浴超声 5 min，加入流动相定容 ($W_{\text{总}}$)。检测上述 2 种溶液中的药物含量，并计算药物包封率：

$$\text{包封率} = 1 - W_{\text{游离}}/W_{\text{总}}$$

2.3 Dau-CNMs 处方筛选

2.3.1 临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC) 测定

聚合物在溶液中的浓度只有超过 CMC 值才能形成胶束，而具有较低 CMC 值的聚合物其形成的胶束在进入体内后可避免由于体液稀释而破坏其完整性^[17]，因此，CMC 成为评估胶束稳定性的重要参数。

本研究采用苾荧光光谱法测定单一或复合聚合物的 CMC 值^[18]。具体操作如下：配制浓度为 6 $\mu\text{mol/L}$ 苾的丙酮溶液，精密移取 0.1~10 mL 棕色量瓶中，氮气吹干丙酮，平行制备 7 份样品；另按照表 1 的处方配比配制一系列质量浓度的单一或复合聚合物溶液，加入到上述含苾的量瓶中，定容，使苾在各聚合物样品中的浓度为 0.06 $\mu\text{mol/L}$ ，每个量瓶中放入一个磁力搅拌子，持续搅拌 48 h 确保平衡，分别取样测定各样品溶液进行荧光光谱法扫描，记录第 1 特征峰 373 nm 与第 3 特征峰 384 nm 的荧光强度 (I) 之比 (I_{373}/I_{384})，聚合物的 CMC 值由荧光强度比 (I_{373}/I_{384}) 与聚合物质量浓度对数值 ($\lg C$) 的关系图中的交叉点确定，不同配比 Soluplus[®] 与 TPGS 形成的 CMC 值见表 1。

表 1 不同配比 Soluplus[®] 与 TPGS 的 CMC 测定结果

Table 1 CMC measurement results of Soluplus[®] and TPGS in different ratios

Soluplus [®] 与 TPGS 配比	CMC/(mg·mL ⁻¹)
单独 TPGS	0.215
1 : 3	0.114
1 : 1	0.084
3 : 1	0.041
5 : 1	0.016
7 : 1	0.009
9 : 1	0.008
单独 Soluplus [®]	0.007

从实验结果可知，TPGS 具有较高的 CMC 值，为 0.215 mg/mL，形成胶束需要 TPGS 质量浓度较大；而 Soluplus[®] 具有极低的 CMC 值，为 0.007 mg/mL；另外，随着 Soluplus[®] 与 TPGS 的配比由 1 : 3 增加到 9 : 1，形成的复合纳米胶束的 CMC 值逐渐降低，说明其形成胶束逐渐具有了较强的抗稀释能力和稳定性。

2.3.2 纳米胶束制剂性质研究

胶束具有极小的粒径分布，可显著提高难溶性药物溶解度，并容易透过细胞膜，是提高生物利用度极具前途的口服给药系统^[19]。按照“2.1”项下方法制备 Soluplus[®] 与 TPGS 不同配比的蝙蝠葛碱纳米胶束，并评价制剂学性质，结果见表 2。

由实验结果可知，单独以 TPGS 制备的胶束 (Dau-SNMs) 粒径较大，这是由于 TPGS 的 CMC 值较高，溶液中需要较高质量浓度的 TPGS 才能形成胶束，因此，TPGS 形成的纳米胶束粒径较大^[20]；而相反，Soluplus[®] 具有极低的 CMC 值，在较低的质量浓度下即可形成纳米胶束 (Dau-SNMs)，因此

表 2 Soluplus[®] 与 TPGS 不同配比对复合纳米胶束制剂性质影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of Soluplus[®] and TPGS in different ratios on properties of Dau-CNMs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Soluplus [®] 与 TPGS 配比	粒径大小/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%
单独 TPGS	186.1 ± 19.8	0.235 ± 0.017	1.13 ± 0.23	85.1 ± 0.9
1 : 3	151.4 ± 10.4	0.211 ± 0.021	2.34 ± 0.31	84.5 ± 1.8
1 : 1	123.2 ± 11.5	0.194 ± 0.011	1.92 ± 0.39	87.8 ± 2.5
3 : 1	103.4 ± 6.6	0.161 ± 0.017	3.44 ± 0.27	90.4 ± 1.4
5 : 1	96.7 ± 6.3	0.165 ± 0.019	2.62 ± 0.28	91.9 ± 1.7
7 : 1	72.5 ± 5.1	0.104 ± 0.015	2.66 ± 0.37	93.8 ± 1.1
9 : 1	77.1 ± 4.3	0.113 ± 0.017	3.73 ± 0.32	94.7 ± 0.9
单独 Soluplus [®]	72.9 ± 5.8	0.106 ± 0.021	2.67 ± 0.43	94.9 ± 0.6

Soluplus[®]形成的纳米胶束粒径较小^[21]；Soluplus[®]与TPGS的配比由1:3增加到9:1，形成的Dau-CNMs的粒径和PDI均呈减小趋势，在Soluplus[®]与TPGS配比为7:1时制备的复合纳米胶束粒径较小，而包封率随着Soluplus[®]与TPGS的配比的增加而增大；Soluplus[®]与TPGS的对比对复合纳米胶束的Zeta电位影响较小。

2.3.3 药物泄漏率测定 胶束在进入体内被体液稀释后药物可能会发生泄漏，尤其是对于弱碱性药物，泄漏的药物在进入肠道中有可能析出药物沉淀，不利于药物吸收，影响药物生物利用度^[8]。为了考察Dau-CNMs和Dau-SNMs在胃肠道环境中的药物泄漏率，分别选择pH 1.2盐酸溶液和pH 6.8磷酸盐缓冲液作为模拟介质进行药物泄漏率考察，具体操作如下：取不同配比Soluplus[®]与TPGS形成的Dau-CNMs以及Dau-SNMs各5 mL，分别加入到pH 1.2盐酸溶液和pH 6.8磷酸盐缓冲液介质中，体积均为50 mL，放置在37℃水浴中持续振荡。在pH 1.2盐酸溶液介质中的样品振荡2 h后取样，经超滤离心，取超滤液测定游离药物含量^[22]；而在pH 6.8磷酸盐缓冲液介质中的样品振荡24 h后取样，在转速为5000 r/min下离心20 min，取上清液1 mL加入到10 mL量瓶中，乙腈破乳并定容，检测药物含量，计算药物泄漏率^[22]，结果见表3。

表3 不同配比Soluplus[®]与TPGS形成胶束的药物泄漏率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Results of leakage rate of micelles formed by Soluplus[®] and TPGS in different ratios ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Soluplus [®] 与 TPGS 配比	药物泄漏率/%	
	pH 1.2 盐酸溶液	pH 6.8 磷酸盐缓冲液
TPGS	71.4 ± 2.1	87.3 ± 1.8
1 : 3	63.3 ± 1.4	76.4 ± 0.8
1 : 1	59.7 ± 0.8	69.2 ± 1.1
3 : 1	46.2 ± 1.6	9.6 ± 0.3
5 : 1	39.3 ± 0.7	5.7 ± 0.5
7 : 1	25.9 ± 1.0	4.4 ± 0.3
9 : 1	26.1 ± 0.9	4.3 ± 0.4
Soluplus [®]	25.3 ± 0.5	3.9 ± 0.3

通过实验结果可知，在pH 6.8磷酸盐缓冲液中不同配比的Dau-CNMs的药物泄漏率随着Soluplus[®]与TPGS配比的增加而降低，即Soluplus[®]与TPGS的配比由1:3增加到9:1时，Dau-CNMs

中药物泄漏量由(76.4 ± 0.8)%降低到(4.3 ± 0.4)%，这主要是由于药物在中性环境中溶解度较低所致；而在pH 1.2盐酸溶液中，随着Soluplus[®]与TPGS配比的增大，可以有效地减少药物在酸性环境中的泄漏，这可能是由于药物的非极性烃链和Soluplus[®]的疏水链之间的相互作用增加了药物与Soluplus[®]之间的亲和力，使药物更倾向于被包裹在胶束中，从而抑制了药物的泄漏。

2.3.4 体外药物沉淀率研究 由于蝙蝠葛碱在低pH环境中溶解度较高，而在中性环境中溶解度迅速降低，因此Dau-CNMs在pH值较低的胃液环境药物发生泄漏，泄露的药物在进入肠道时容易析出沉淀，不利于药物吸收，因此，通过体外模拟实验考察了Dau-CNMs中的药物沉淀现象，实验操作如下：取700 mL pH 1.2盐酸溶液加入到溶出杯中，搅拌速度调至50 r/min，水浴温度为37℃，分别取不同配比Soluplus[®]与TPGS制备Dau-CNMs以及Dau-SNMs各5 mL加入到溶出杯中，持续搅拌2 h后，取同温度下浓度为0.2 mol/L磷酸钠溶液快速加入到溶出杯中，并调节pH值至6.8，并继续搅拌3 h，且在预定的时间间隔(15、120、150、180、240、300 min)取样5 mL(同时补加同温同体积pH 1.2盐酸溶液或pH 6.8磷酸盐缓冲液)，经0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液1 mL加入到10 mL量瓶中，乙腈破乳并定容，检测药物含量^[22]，计算药物沉积率，结果见图1。

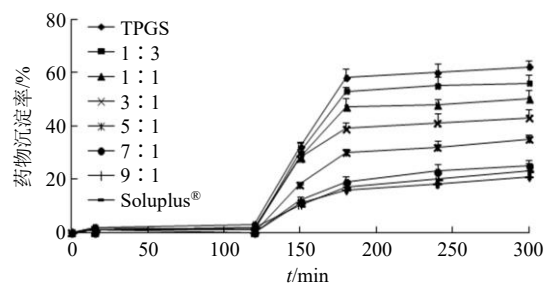


图1 蝙蝠葛碱原料药、不同配比Dau-CNMs以及Dau-SNMs的沉淀率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Comparison of the precipitation rate of dauricine bulk drugs, Dau-CNMs, and Dau-SNMs with different ratios ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

实验结果显示，蝙蝠葛碱原料药及所有的Dau-CNMs和Dau-SNMs在pH 1.2盐酸溶液中放置2 h，均无药物沉淀析出；而在溶出介质pH值调节到6.8后，不同配比的Dau-CNMs中的药物析出沉淀量具有一定的差异性，当Soluplus[®]与TPGS的比例为7:

1、9:1 以及采用单独 Soluplus® 的处方, 药物析出沉淀量最小, 且在 300 min 后两者的药物的沉淀量无显著差异, 这可能由于 Soluplus® 的 CMC 较低, 当溶出介质 pH 值增加到 6.8 后, Soluplus® 仍以胶束形式存在, 可溶解部分药物, 避免药物因溶解度变低析出沉淀, 或者是由于药物中的氨基和 Soluplus® 中的羟基形成了共价键, 可以进一步抑制药物沉淀。

根据上述研究结果, 同时考虑到需要提高处方中 TPGS 的比例以抑制 P-gp 对药物的外排作用, 因此, 本研究确定 Soluplus® 与 TPGS 的比例为 7:1 作为最终处方制备 Dau-CNMs 的处方组成。

2.4 Dau-CNMs 胶束粒径和 Zeta 电位测定

使用 Zetasizer Nano ZS 动态激光散射仪测定 Dau-CNMs 和 Dau-SNMs 的粒径分布、多聚分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位。经测定 Dau-CNMs 的平均粒径为 (73.9 ± 6.2) nm, PDI 为 0.104 ± 0.013 , 其 Zeta 电位为 (2.01 ± 0.23) mV, 表面电荷近似于电中性, 这有助于胶束直接穿过胃肠道的黏液层, 促进药物跨膜转运与吸收^[23]; 另外, Dau-SNMs 的粒径为 (76.3 ± 4.8) nm, PDI 为 0.116 ± 0.012 , Zeta 电位为 (2.32 ± 0.46) mV, 说明 TPGS 的加入对胶束的粒径和表面电荷没有明显影响。

2.5 TEM 观察

TEM 观察了 Dau-CNMs 和 Dau-SNMs 的微观形态。取少量上述 2 种胶束溶液, 分别用去离子水稀释, 各取少量溶液置于涂膜的铜网上, 挥干水分, 将铜网浸入到质量浓度为 0.5 mg/mL 的磷钨酸溶液中, 负染 10 min, 取出后自然晾干, 在 TEM 观察 Dau-CNMs 和 Dau-SNMs 的微观形态, 结果见图 2。

在 TEM 下可观察到 Dau-CNMs 和 Dau-SNMs

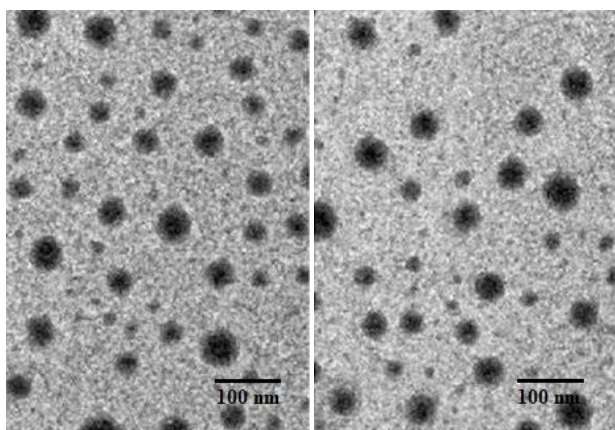


图 2 Dau-CNMs (A) 和 Dau-SNMs (B) 的 TEM 照片
Fig. 2 TEM of Dau-CNMs (A) and Dau-SNMs (B)

均为球形, 粒径大部分在 30~60 nm, 说明 TPGS 的加入对胶束的形态没有明显影响; 此外, 在 TEM 下粒径分布偏小, 这可能是由于胶束干燥失水导致的^[24]。

2.6 细胞毒性评价

通过 MTT 法评价了蝙蝠葛碱原料药、Dau-SNMs 和 Dau-CNMs 对 Caco-2 细胞的安全质量浓度范围。取 Caco-2 细胞在含有 20% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 链霉素的培养基中孵育。取 96 孔板每个孔加入 Caco-2 细胞约为 5×10^4 个, 并在 37 °C, 5% CO₂ 下孵育 24 h, 向 96 孔板细胞中分别加入 DMSO 溶液 (作为对照)、蝙蝠葛碱 DMSO 溶液、Dau-SNMs 和 Dau-CNMs, 使药物质量浓度为 1、5、10、50、100 μg/mL, 每个药物质量浓度设置 3 个重复孔, 继续在 37 °C 下孵育 24 h, 吸取培养基, 每孔加入 50 μL MTT 溶液 (质量浓度为 0.5 mg/mL) 和 80 μL 新鲜培养基, 37 °C 下孵育 4 h, 弃去含有 MTT 的培养基, 并向每个孔中加入 150 μL DMSO 以溶解甲臞沉淀, 使用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔的吸光度 (A) 值, 并根据 A 值计算细胞存活率, 结果见图 3。

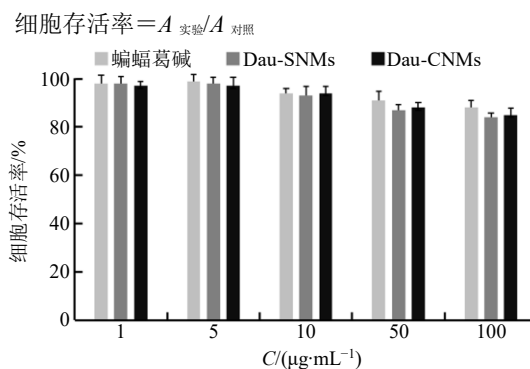


图 3 蝙蝠葛碱原料药、Dau-SNMs 和 Dau-CNMs 对 Caco-2 细胞的毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Toxicity of dauricine bulk drugs, Dau-SNMs, and Dau-CNMs to Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

实验结果显示, 蝙蝠葛碱原料药、Dau-SNMs 和 Dau-CNMs 对 Caco-2 细胞的毒性均表现出质量浓度相关性, 细胞活性与质量浓度呈负相关, 但是在实验的药物质量浓度范围内, 细胞活性均高于 80%, 表明蝙蝠葛碱原料药、Dau-SNMs 和 Dau-CNMs 在此质量浓度范围内具有良好的生物相容性。

2.7 细胞转运研究

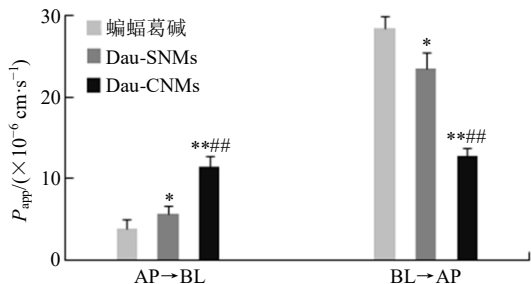
Caco-2 细胞单层是细胞转运实验中最广泛的

模型, 用于评估 P-gp 的外排作用。Caco-2 细胞经孵育 3 周后, 测得跨上皮细胞电阻值为 $(345.4 \pm 31.8) \Omega/\text{cm}^2$, 表明已成功构建了致密的 Caco-2 单层细胞模型^[25], 可用于评价 Dau-CNMs 从顶端到基底外侧 (AP→BL) 和基底外侧到顶端 (BL→AP) 的转运实验。配制含有不同质量浓度的蝙蝠葛碱原料药、Dau-SNMs 和 Dau-CNMs 的汉克平衡盐溶液 (HBSS) 作为供试液, 分别取各组溶液 1.0 mL 加入到 Caco-2 单层细胞的 AP 侧 (或 BL 侧), 并向 BL 侧 (AP 侧) 加入 2.5 mL 空白 HBSS 作为接收液, 以固定的时间间隔内从 BL 侧 (AP 侧) 取 0.3 mL 接收液 (同时补加同体积空白 HBSS)。样品经 HPLC 法测定药物含量, 按照公式计算表观渗透系数 (P_{app}) 和外排比 (ER)。结果见图 4。

$$P_{\text{app}} = dQ / (AC_0 dt)$$

$$ER = P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP)}} / P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL)}}$$

dQ/dt 是接收液中蝙蝠葛碱的稳态透过率, C_0 是供试液中蝙蝠葛碱的初始质量浓度, A 是 Caco-2 单层细胞面积, $P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP)}}$ 是蝙蝠葛碱从 BL 端转运到 AP 端的 P_{app} 值, $P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL)}}$ 是蝙蝠葛碱从 AP 端转运到 BL 端的 P_{app} 值



与蝙蝠葛碱原料药比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Dau-SNMs 比较: ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs dauricine bulk drugs; ## $P < 0.01$ vs Dau-SNMs

图 4 蝙蝠葛碱原料药、Dau-SNMs 和 Dau-CNMs 在 Caco-2 细胞单层中的渗透性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Permeability of dauricine bulk drugs, Dau-SNMs, and Dau-CNMs in Caco-2 cell monolayer ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

ER 值通常用于评估 P-gp 的抑制作用, 如果药物的 ER 值大于 2, 说明该药物很可能是 P-gp 的底物^[26]。本实验结果显示, 蝙蝠葛碱原料药组从基底外侧到顶端 (BL→AP) 的 $P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP)}}$ 值为 $(28.5 \pm 0.9) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 而从顶端到基底外侧 (AP→BL) 的 $P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL)}}$ 值为 $(3.8 \pm 0.7) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, ER 值为 7.5, 该结果与文献报道一致^[27], 说明蝙蝠葛碱是 P-gp 底物, 蝙蝠葛碱被肠细胞吸收后又会泵送肠道内; 与蝙蝠葛碱原料药组相比, Dau-SNMs 组的

$P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP)}}$ 值出明显的降低趋势, 从 $(28.5 \pm 0.9) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 降至 $(23.8 \pm 1.5) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 而 $P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL)}}$ 值则出明显的增加趋势, 从 $(3.8 \pm 0.7) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 增加到 $(5.7 \pm 0.8) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 其 ER 值为 4.2, 与蝙蝠葛碱原料药组相比降低了 1.8 倍, 说明 Dau-SNMs 抑制了 P-gp 的外排作用, 这可能是由于 Dau-SNMs 的粒径较小, 可通过细胞内吞作用穿过生物膜^[28], 降低了 P-gp 对药物的识别能力, 从而抑制了 P-gp 对药物的外排作用; Dau-CNMs 组的 $P_{\text{app(BL} \rightarrow \text{AP)}}$ 和 $P_{\text{app(AP} \rightarrow \text{BL)}}$ 值分别为 $(12.7 \pm 1.1) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ 和 $(11.4 \pm 1.4) \times 10^{-6} \text{ cm/s}$, 其 ER 值为 1.1, 分别比蝙蝠葛碱原料药组和 Dau-SNMs 组降低了 6.8 倍和 3.8 倍, 这是由于处方中加入 TPGS, 能够显著抑制了 P-gp 的活性, 降低了 P-gp 对蝙蝠葛碱的外排作用^[29], 另外 Dau-CNMs 通过细胞内吞作用进入细胞内, 其包裹的蝙蝠葛碱不会被 P-gp 识别, 进一步降低 P-gp 对蝙蝠葛碱的外排作用。

2.8 大鼠体内药动学研究

2.8.1 色谱和质谱条件^[30] 色谱柱为 Waters Xterra MS C₁₈ (150 mm × 3.9 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-2 mmol/L 甲酸铵溶液 (65 : 35), 体积流量为 0.2 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL; 离子源为电喷雾离子源 (ESI), 离子源温度为 110 °C, 电压为 3500 V, 离子源气体 (N₂) 压力为 413.685 kPa (60 psi), 碰撞气体压力为 34.474 kPa (5 psi), 扫描方式为多离子反应监测, 用于定量分析的离子反应为质荷比, m/z 625 → 206 (蝙蝠葛碱, 待测物), m/z 623 → 174 (粉防己碱, 内标)。

2.8.2 血浆样品前处理 精密量取大鼠血浆 0.1 mL, 加入质量浓度为 3.000 μg/mL 的粉防己碱甲醇溶液 5 μL 作为内标, 涡旋复合, 加入醋酸乙酯 1.0 mL, 涡旋复合, 萃取药物, 离心, 取上清液, 氮气吹干, 残渣用 100 μL 流动相复溶, 按照“2.8.1”项下色谱条件检测药物含量, 计算药物质量浓度。

2.8.3 标准曲线及方法学验证 精密量取大鼠空白血浆 0.1 mL, 加入系列质量浓度的蝙蝠葛碱甲醇溶液各 5 μL, 涡旋复合, 配制成含有蝙蝠葛碱质量浓度为 5、10、25、50、100、250、500 ng/mL, 加入内标溶液, 涡旋复合, 按照“2.8.1”项下方法操作, 进样检测, 以主药峰面积 (A_s) 与内标物峰面积 (A_i) 之比作为纵坐标, 以主药质量浓度 (C) 为横坐标, 得到线性回归方程为 $A_s/A_i = 0.0679 C - 0.0046$, $r = 0.9997$, 线性关系良好。

另配制蝙蝠葛碱甲醇溶液质量浓度分别为 5、50、500 ng/mL 血浆样品, 每个质量浓度样品重复制备 6 份, 均加入内标溶液, 涡旋复合, 按照“2.8.2”项下方法操作, 进样检测, 考察方法精密度和提取回收率。结果显示, 低、中、高 3 种质量浓度样品的精密度 RSD 分别为 7.9%、8.2%、6.7%, 提取回收率分别为 86.4%、93.7%、95.1%, 说明本方法重现性好, 提取回收率高。

2.8.4 动物实验 取 Wistar 大鼠 18 只, 体质量为 (220±20) g, 雌雄各半, 禁食过夜, 可自由饮水。

将大鼠随机分为 A、B、C 3 组, A 组大鼠经喂食针给予蝙蝠葛碱混悬液 (分散介质为 0.25% 羧甲基纤维素钠), B 组大鼠给予 Dau-SNMs, C 组大鼠给予 Dau-CNMs, 给药剂量均为 50 mg/kg, 并在 0、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、10、24 h 通过眼眶后神经丛采集血样 0.5 mL, 离心, 收集上层血浆于 -20 °C 下冷冻保存, 测定前室温解冻, 按照“2.8.2”项下方法操作, 进样检测药物含量, WinNonlin 软件计算药动学参数 (表 4), 并绘制血药浓度-时间曲线图 (图 5)。

表 4 大鼠药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Pharmacokinetic parameters in rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药动学参数	单位	蝙蝠葛碱混悬液	Dau-SNMs	Dau-CNMs
T_{max}	h	2.4±0.9	3.6±1.1 [#]	3.7±0.3 [#]
C_{max}	ng·mL ⁻¹	134.7±26.9	265.4±34.8 [#]	394.3±38.1 ^{#Δ}
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	2 358.3±618.6	4 235.8±824.3 [#]	6 487.1±961.7 ^{#Δ}
$T_{1/2}$	h	10.6±3.1	12.6±3.3 [#]	12.5±2.6 [#]

与蝙蝠葛碱混悬液组比较: [#] $P < 0.05$; 与 Dau-SNMs 组比较: ^Δ $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs dauricine suspension group; ^Δ $P < 0.05$ vs Dau-SNMs group

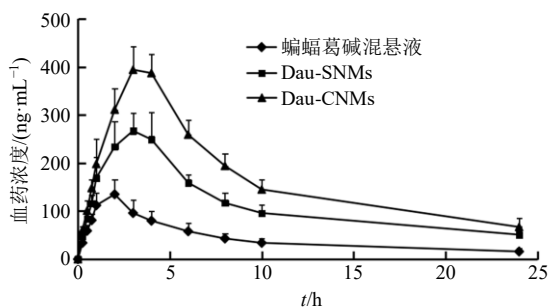


图 5 血药浓度-时间曲线图 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Curve of plasma drug concentration-time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

大鼠体内药动学结果显示, 与蝙蝠葛碱混悬液组相比, Dau-SNMs 组和 Dau-CNMs 组的血药浓度曲线下面积 ($AUC_{0-\infty}$) 均显著提高, 分别是蝙蝠葛碱混悬剂组的 1.79 倍和 2.75 倍, 说明 Dau-SNMs 和 Dau-CNMs 均可以显著提高了蝙蝠葛碱的口服生物利用度; 且 Dau-SNMs 组和 Dau-CNMs 组的血药峰浓度 (C_{max}) 分别是蝙蝠葛碱混悬剂组的 1.97 倍和 2.93 倍, 2 种纳米胶束也均提高了蝙蝠葛碱的达峰浓度。

另外, Dau-CNMs 组的 $AUC_{0-\infty}$ 与 C_{max} 分别是 Dau-SNMs 组的 1.53 倍和 1.49 倍, 说明 Dau-CNMs 提高蝙蝠葛碱的口服生物利用度更为显著, 这归因

于 Dau-CNMs 的处方中的 TPGS, 有效抑制了肠上皮细胞膜中的 P-gp 的活性, 降低了对蝙蝠葛碱的外排作用, 提高了药物生物利用度。

3 讨论

Caco-2 细胞在形态上与小肠上皮细胞相似, 并且包含与小肠刷状缘上皮细胞相关的酶, 因此 Caco-2 单层细胞模型被认为是体外模拟人类肠道吸收的可靠模型。P-gp 是 Caco-2 细胞膜中的主要转运蛋白, 其正常表达可有效保护人体免受外源有害物质的侵害, P-gp 参与药物的肠道吸收, 并表现出显著的剂量和部位的吸收相关性。然而 P-gp 过表达时会诱导反向转运, 从而影响药物的吸收, 分布, 代谢和消除过程, TPGS 是一种安全的表面活性剂, 它不仅可以促进内吞作用, 而且有效抑制 P-gp 的外排泵作用。本研究中, 在 Dau-CNMs 中加入 TPGS, 其目的是以减少 P-gp 对蝙蝠葛碱的外排作用, 促进药物吸收。

影响药物口服生物利用度的 2 个关键参数是药物在胃肠道中的溶解度和药物通过肠膜的渗透性, 生物利用度低, 说明该药物不能被吸收到血液中, 导致疗效差。本研究以 Soluplus[®]与 TPGS 作为载体材料, 将蝙蝠葛碱制备成复合纳米胶束, 一方面, 处方中的 Soluplus[®]能够有效抑制因 pH 值环境变化

导致药物沉淀析出,另一方面,处方中的TPGS能够抑制P-gp对药物的外排作用,提高了药物的渗透性,最终通过体内药动学实验证实Dau-CNMs能够有效提高药物生物利用度。本研究为改善蝙蝠葛碱的生物利用度提供一种有效的解决方案,也对同类型药物的二次开发起到一定的借鉴作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 边文山,张英博,张朝颖,等.蝙蝠葛碱药理作用的研究现状[J].黑龙江科学,2014,5(7):10-11.
- [2] 高秀蓉,蒋学华,王婷.高效液相色谱法测定蝙蝠葛碱的平衡溶解度和油水分配系数[J].中国新药杂志,2012,21(14):1672-1675.
- [3] 张亚红,张如超,王丽娟,等.蝙蝠葛碱自微乳化释药系统在大鼠体内的生物利用度研究[J].中国药房,2016,27(16):2207-2209.
- [4] 高秀蓉,蒋学华,杜青青,等.P-糖蛋白抑制剂对蝙蝠葛碱跨膜转运的影响[J].华西药学杂志,2013,28(2):135-139.
- [5] 王德娟,王栋.北豆根中蝙蝠葛碱在人源肠Caco-2细胞单层模型中的吸收转运研究[J].中医药学报,2013,41(2):22-25.
- [6] 高秀蓉,蒋学华,王凌,等.基于大鼠在体单向肠灌流模型研究P-糖蛋白抑制剂对蝙蝠葛碱肠吸收的影响[J].中国医院药学杂志,2012,32(13):1016-1021.
- [7] Gao X, Jiang X, Wang L. Using LC-MS/MS to study dauricine pharmacokinetics and determine its bioavailability following administration in different routes [J]. *Acta Chromatogr*, 2013, 25(2): 241-256.
- [8] Mitra A, Fadda H M. Effect of surfactants, gastric emptying, and dosage form on supersaturation of dipyridamole in an *in vitro* model simulating the stomach and duodenum [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(8): 2835-2844.
- [9] Li S, Pollock-Dove C, Dong L C, *et al.* Enhanced bioavailability of a poorly water-soluble weakly basic compound using a combination approach of solubilization agents and precipitation inhibitors: A case study [J]. *Mol Pharm*, 2012, 9(5): 1100-1108.
- [10] Han H, Li Y, Peng Z, *et al.* A Soluplus/Poloxamer 407-based self-nanoemulsifying drug delivery system for the weakly basic drug carvedilol to improve its bioavailability [J]. *Nanomedicine*, 2020, 27: 102199.
- [11] Patel S, Zhu W, Xia B F, *et al.* Integration of precipitation kinetics from an *in vitro*, multicompartiment transfer system and mechanistic oral absorption modeling for pharmacokinetic prediction of weakly basic drugs [J]. *J Pharm Sci*, 2019, 108(1): 574-583.
- [12] Li G Y, Lu Y T, Fan Y C, *et al.* Enhanced oral bioavailability of magnolol via mixed micelles and nanosuspensions based on Soluplus®-Poloxamer 188 [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 1010-1017.
- [13] Zhang Z H, Cui C C, Wei F, *et al.* Improved solubility and oral bioavailability of apigenin via Soluplus/Pluronic F127 binary mixed micelles system [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(8): 1276-1282.
- [14] 闫方,斯陆勤,黄建耿,等.肠道P-糖蛋白辅料抑制剂的研究进展[J].药学学报,2008,43(11):1071-1076.
- [15] Guo Y, Luo J, Tan S, *et al.* The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 49(2): 175-186.
- [16] Hu M, Zhang J, Ding R, *et al.* Improved oral bioavailability and therapeutic efficacy of dabigatran etexilate via Soluplus-TPGS binary mixed micelles system [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(4): 687-697.
- [17] Parikh V, Gumaste S G, Phadke S. Effect of the interaction between an ionic surfactant and polymer on the dissolution of a poorly soluble drug [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19(7): 3040-3047.
- [18] 任霞,王珏,孙会敏,等.表面活性剂临界胶束浓度测定方法的建立和比较[J].中国药事,2020,34(8):916-924.
- [19] Shen C Y, Zhu J J, Song J W, *et al.* Formulation of pluronic F127/TPGS mixed micelles to improve the oral absorption of glycyrrhizic acid [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2020, 46(7): 1100-1107.
- [20] Mahajan H S, Patil P H. Central composite design-based optimization of lopinavir vitamin E-TPGS micelle: *In vitro* characterization and *in vivo* pharmacokinetic study [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 194: 111149.
- [21] Jin I S, Jo M J, Park C W, *et al.* Physicochemical, pharmacokinetic, and toxicity evaluation of Soluplus® polymeric micelles encapsulating fenbendazole [J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(10): E1000.
- [22] 杜憬生,杜楚玲,邵长丽,等.HPLC测定不同产地北豆根中蝙蝠葛碱含量[J].中国中医药信息杂志,2017,24(6):68-70.
- [23] Lai S K, O'Hanlon D E, Harrold S, *et al.* Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(5): 1482-1487.
- [24] Li M, Lv L, Guo A J, *et al.* Copolymeric micelles loading curcumin: Preparation, characterization and *in vitro* evaluation [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2018, 18(3): 1585-1593.
- [25] 孙旭,罗余萍.Caco-2细胞单层模型的建立及其评估

- [J]. 药品评价, 2015, 12(14): 33-35,39.
- [26] Ishiguro N, Kishimoto W, Volz A, *et al.* Impact of endogenous esterase activity on *in vitro* p-glycoprotein profiling of dabigatran etexilate in Caco-2 monolayers [J]. *Drug Metab Dispos: Biol Fate Chem*, 2014, 42(2): 250-256.
- [27] 高秀蓉, 蒋学华, 杜青青. 基于 Caco-2 细胞模型研究蝙蝠葛碱的跨膜吸收机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 139-143.
- [28] Mathot F, des Rieux A, Ariën A, *et al.* Transport mechanisms of mmePEG750P(CL-co-TMC) polymeric micelles across the intestinal barrier [J]. *J Control Release*, 2007, 124(3): 134-143.
- [29] Collnot E M, Baldes C, Wempe M F, *et al.* Mechanism of inhibition of P-glycoprotein mediated efflux by vitamin E TPGS: Influence on ATPase activity and membrane fluidity [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(3): 465-474.
- [30] 张亚红, 张如超, 王丽娟, 等. 蝙蝠葛碱自微乳释药系统在大鼠体内的生物利用度研究 [J]. 中国药房, 2016, 27(16): 2207-2209.

[责任编辑 郑礼胜]