

姜黄素固体脂质纳米粒在大鼠体肠中吸收的研究

李万玉¹, 晏子俊^{1,2}, 孙立力¹, 万坤¹, 罗见春¹, 张景劼^{*1}

(1. 重庆医科大学 药物高校工程研究中心, 重庆 400016; 2. 攀枝花市中心医院 药学部, 四川 攀枝花 617067)

摘要: 采用乳化-超声法制得姜黄素固体脂质纳米粒 (Curcumin solid lipid nanoparticles, CNSLN), 比较游离姜黄素 (Curcumin, CRM) 和 CNSLN 在体肠中吸收情况。选用大鼠在体单向肠灌注模型 (Single-pass intestinal perfusion model, SPIP), 以紫外分光光度法测定游离 CRM 和 CNSLN 通过肠液后 CRM 的减少量来确定药物的吸收。结果: 透射电镜下观察到 CNSLN 成圆形或椭圆形, 平均粒径为 (120.7 ± 5.4) nm, 平均 Zeta 电位为 (-41.90 ± 1.81) mV, 平均包封率为 $(91.12 \pm 0.42)\%$ 。游离 CRM 和 CNSLN 在十二指肠、空肠、回肠和结肠 4 段的吸收速率常数 (K_a)、有效渗透率 (P_{eff}) 和百分吸收率 (W) 均存在显著性差异 ($P < 0.01$), CNSLN 比游离 CRM 均提高了 2 倍以上, 且 CNSLN 的最大吸收部位在结肠。在体肠吸收结果显示, CNSLN 的肠吸收比游离 CRM 高, CNSLN 能明显的提高大鼠对游离 CRM 的肠吸收。

关键词: 姜黄素; 固体脂质纳米粒; 在体单向肠灌注模型; 肠吸收

中图分类号: R 91 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2017)07-0733-05

Intestinal Absorption of Curcumin Solid Lipid Nanoparticles in Rats

LI Wanyu¹, YAN Zijun^{1,2}, SUN Lili¹, WAN Kun¹, LUO Jianchun¹, ZHANG Jingjie^{*1}

(1. Engineering Research Center in University, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Pharmacy of Panzhihua Central Hospital, Panzhihua 617067, China)

Abstract: To prepare the curcumin solid lipid nanoparticles (CNSLN) with emulsion-ultrasonic and compare the intestinal absorption of free curcumin (CRM) and CNSLN. Single-pass intestinal perfusion (SPIP) model was used to study the intestinal absorption and Ultraviolet spectrometric assay was used to determine the content of CRM. The CNSLN presented as small round or oval under transmission electron microscope (TEM) with the diameter of about (120.7 ± 5.4) nm, zeta potential was (-41.90 ± 1.81) mV, average entrapment efficiency was $(91.12 \pm 0.42)\%$. The absorption rate constant (K_a), effective permeability (P_{eff}), percent absorption rate $W(\%)$ of CRM and CNSLN in duodenum, jejunum, ileum and colon both were significant difference ($P < 0.01$), and CNSLN was more than 2 times as much as CRM. The maximum segments of CNSLN absorption was colon. The results indicated that the absorption of CNSLN in rats is better than CRM, and CNSLN could obviously enhance the absorption of CRM in rats.

Keywords: curcumin, solid lipid nanoparticles, SPIP, intestinal absorption

收稿日期: 2015-06-23

基金项目: 重庆市科委重点项目 (CSTC2012JJB10027)。

作者简介: 李万玉 (1960—), 女, 重庆人, 副教授, 主要从事药物新剂型与新技术研究。E-mail: 627332357@qq.com

* 通信作者: 张景劼 (1973—), 女, 重庆人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事药物新剂型与新技术研究。E-mail: zjqrae01@163.com

引用本文: 李万玉, 晏子俊, 孙立力, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒在大鼠体肠中吸收的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(07): 733-737.

姜黄素(Curcumin, CRM)是我国传统中药材姜科植物姜黄的有效成分^[1]。研究表明 CRM 有抗肿瘤、抗氧化、降低胆固醇、抑菌、抗炎和保护心肌等多种药理作用。但研究中发现 CRM 存在不易溶于水、抗肿瘤活性低、口服生物利用度较低和代谢过快等缺点,限制了其临床应用^[2-3]。

近来, Ghadiri 等^[4]和 Suresh 等^[5]报道的固体脂质纳米粒(Solid lipid nanoparticles, SLN)作为新型的药物载体,其结合了纳米乳^[6]和脂质体的优点。Ghadiri 等将 SLN 作为亲水性药物的载体,增加了亲水性药物的稳定性;Suresh 等将 SLN 作为洛伐他汀的载体,并由其体内外研究结果可知,SLN 可增加洛伐他汀体外的亲水性、稳定性、延长洛伐他汀在体内的生物半衰期和提高洛伐他汀的生物利用度。因此,SLN 具有增加载带药物的亲水性、稳定性、延长生物半衰期、提高生物利用度和定位释药等特点。

作者依据上述思路,以 SLN 为 CRM 的载体,制备得到姜黄素固体脂质纳米粒(Curcumin solid lipid nanoparticles, CNSLN),以增加 CRM 的水溶性,提高 CRM 的吸收率和生物利用度。作者选用在体单向肠灌注模型(Single-pass intestinal perfusion model, SPIP),研究比较游离 CRM 和 CNSLN 在十二指肠、空肠、回肠和结肠的吸收情况。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 主要材料、试剂 CRM:西安帅诺生物科技有限公司产品;CNSLN 制剂:作者所在实验室自制,批号:130527,130529。

1.1.2 主要仪器与动物 AB 205 电子分析天平:瑞士 Mettler Toledo 仪器科技有限公司产品;UV-VIS 3160 型紫外-可见分光光度计:日本岛津(中国)有限公司产品;H-7700 型透射电子显微镜:日本日立科技公司产品;ZS90 纳米粒度电位仪:英国马尔文(中国)公司产品;88-2 型恒温磁力搅拌器:上海司乐仪器制造有限公司产品;KB 2300 A 型超声波清洗器:北京超声仪器制造有限公司产品。

健康雄性清洁级 SD 大鼠:体重 250 ± 20 g,试验前未使用过其他药物,购自重庆医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK-(渝)2014-0001。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液配制

1) Krebs-Ringer 营养液的配制 1 000 mL 蒸馏水中含 KH_2PO_4 0.16 g, CaCl_2 0.35 g, NaHCO_3 2.1 g, KCl 0.35 g, NaCl 6.92 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g, 右旋葡萄糖 2.0 g, 即得 Krebs-Ringer 营养液。

2) 生理盐水的配制 质量分数 0.9% 的生理盐水溶液。

3) CRM 溶液的配制 精密称取适量 CRM, 加入棕色容量瓶内, 无水乙醇定容, 即得 CRM 溶液。

4) CNSLN 溶液的配制 精密量取适量 CNSLN, 超声(8 min), 移至棕色容量瓶, 无水乙醇定容, 摇匀, 即得 CNSLN 溶液。

5) 空白固体脂质纳米粒溶液(KNSLN)的配制按 CNSLN 溶液的配制方法配制。

1.2.2 透射电镜的测定 吸取 CNSLN 适量, 用适量蒸馏水稀释后, 于透射电镜下观察 CNSLN 的形态。

1.2.3 粒径和 Zeta 电位的测定 吸取 CNSLN 适量, 用适量蒸馏水稀释后, 于粒径电位仪下测定 CNSLN 平均粒径和 Zeta 电位。

1.2.4 含量测定方法建立

1) 检测波长的确定 将配制好的 KNSLN 溶液、CNSLN 溶液和 CRM 溶液, 以无水乙醇为空白, 在 200~800 nm 范围内扫描。

2) 标准曲线的制备 精密称取 CRM 10.5 mg, 加于 100 mL 棕色容量瓶内, 无水乙醇溶解后, 定容, 摇匀, 即得 0.105 mg/mL 的 CRM 对照品溶液。精密量取 CRM 对照品溶液 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 μL 于 10 mL 棕色量瓶中, 加无水乙醇稀释, 定容, 摇匀, 即得 1.05、2.10、3.15、4.20、5.25、6.30、7.35 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液。无水乙醇为空白对照, 分别于 432 nm 处测定吸光度, 以吸光度(A)对浓度(C)进行线性回归。

3) 精密度的测定 分别配制低、中、高 3 种质量浓度(1.05、2.10、3.15 $\mu\text{g/mL}$)的对照品溶液, 每个质量浓度取 5 份, 于一日内测定 5 次, 计算 3 种质量浓度的日内精密度; 同样条件下, 连续测定 5 d, 计算 3 种浓度的日间精密度。

4) 回收率的测定 分别配制低、中、高 3 种质量浓度(1.05、2.10、3.15 $\mu\text{g/mL}$)的 CRM 对照品溶液各 5 份。分别在 432 nm 处测定吸光度后, 计算出回

收率。

1.2.5 包封率的测定 参照文献^[7]的方法测定 CNSLN 的包封率。

$$\text{包封率}(\%) = \left(\frac{X_A}{X_B} \right) \times 100\%$$

式中: X_A 为 CNSLN 中 CRM 的质量; X_B 为 CNSLN 中 CRM 的投药总质量。

1.2.6 肠吸收

1) 大鼠在体肠吸收 SD 雄性大鼠, 禁食 12 h 后, 腹腔注射体积分数 3% 水合氯醛, 麻醉后固定, 沿腹中线剪开腹腔, 在十二指肠、空肠、回肠、结肠两端插管, 用生理盐水脱脂棉覆盖保湿伤口, 用红外灯进行保温, 先用 37 °C 生理盐水灌洗肠内容物, 空气排空肠内生理盐水。再用 37 °C 恒温的 Krebs-Ringer 液以 0.4 mL/min 流速循环 15 min, 平衡后将其排空。最后将 4 段进口分别放入装有水浴恒温至 37 °C 的 15 mL 游离 CRM 循环液或 CNSLN 中, 各出口处分别用 25 mL 的容量瓶接收流出液体, 60 min 后用 Krebs-Ringer 液洗涤各肠段内残留药液, 将灌流后流出液、冲洗液和剩余灌流液合并后, 用营养液定容, 实验结束后处死大鼠, 剪下各肠段, 测量其肠段内径(r)与长度(L)^[8-10]。

2) 数据处理 根据以下公式计算药物有效渗透率(P_{eff})、吸收速率常数(K_a)和吸收百分率(W)。计算公式如下:

$$\text{有效渗透率}(P_{\text{eff}}): P_{\text{eff}} = Q \times \ln(X_{\text{in}}/X_{\text{out}}) / 2\pi rL$$

$$\text{吸收速率常数}(K_a): K_a = (X_0 - X_t) / C_0 VT$$

$$\text{百分吸收率}(W(\%)): W = (X_0 - X_t) / X_0 \times 100\%$$

式中: T 为灌注时间 (min); V 为灌注药物体积 (mL); X_0 为 0 时药物量 (μg); X_t 为灌流液中剩余药物量 (μg); Q 为流速 (mL/min); X_{out} 和 X_{in} 分别为流出和流入的药物量 (μg); L 和 r 分别为灌流肠段的内径和长度。数据以 Excel 2010 软件进行单因素方差分析^[11]。

2 结果与讨论

2.1 透射电镜下的形态

CNSLN 在透射电镜下观察到的形态见图 1, 所制得的 CNSLN 在电镜下为呈圆形或椭圆形。

2.2 粒径和 Zeta 电位

马尔文激光粒度电位仪测得 CNSLN 平均粒径为 $(120.7 \pm 5.4) \text{ nm}$, Zeta 电位为 $(-41.90 \pm 1.81) \text{ mV}$ 。

2.3 测定方法

2.3.1 检测波长的确定 紫外吸收光谱显示, CRM 的最大吸收波长为 432 nm, 且 432 nm 波长处时, CNSLN 没有吸收。说明, 可用紫外分光光度法测定肠液中的 CRM, 检测波长为 432 nm。

2.3.2 标准曲线和线性范围 在 1.05~7.35 $\mu\text{g/mL}$ 范围内, CRM 的吸光度与质量浓度呈良好的线性关系, 回归方程为: $Y = 0.132 0X + 0.031 0$, $r = 0.999 3$ 。

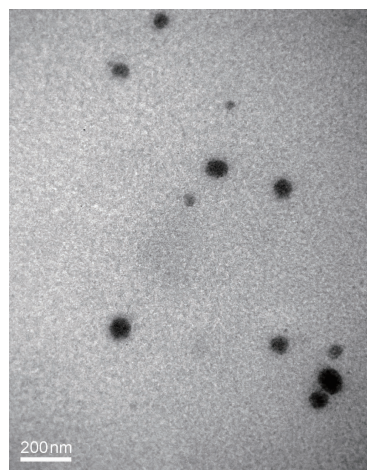


图 1 CNSLN 的透射电镜图

Fig. 1 Transmission electron microscopy image of CNSLN under TEM

2.3.3 精密度的测定 低 (1.05 $\mu\text{g/mL}$)、中 (2.10 $\mu\text{g/mL}$)、高 (3.15 $\mu\text{g/mL}$) 3 种质量浓度的日内精密密度 RSD ($n=5$) 值分别为 0.69%、1.02%、0.95%; 低 (1.05 $\mu\text{g/mL}$)、中 (2.10 $\mu\text{g/mL}$)、高 (3.15 $\mu\text{g/mL}$) 3 种质量浓度的日间精密密度 RSD ($n=5$) 值分别为 0.89%、0.64%、0.97%。表明该测定方法的日内精密密度及日间精密密度良好, 均符合测定要求。

2.3.4 回收率的测定 低 (1.05 $\mu\text{g/mL}$)、中 (2.10 $\mu\text{g/mL}$)、高 (3.15 $\mu\text{g/mL}$) 3 种质量浓度测定的平均回收率 ($n=5$) 分别为 98.18%、100.27%、99.29%, RSD 分别为 0.54%、0.39%、0.78%。

2.4 包封率的测定

用 excel 2010 进行数据统计, 统计结果用均值 $\pm$ 标准差表示。经计算, CNSLN 的平均包封率为 $(91.12 \pm 0.42)\%$ ($n=3$)。

2.5 在体肠吸收结果

游离药 CRM 和制剂 CNSLN 在各被考察肠段内的吸收速率常数 (K_a), 如图 2 所示; 有效渗透率 (P_{eff}), 如图 3 所示; 吸收百分率 $W(\%)$ 如图 4 所示。

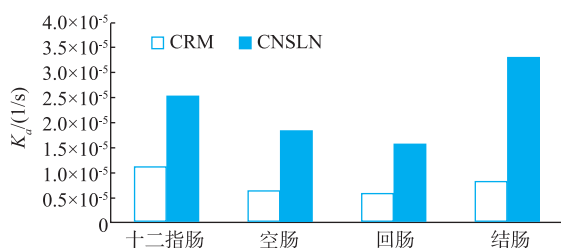


图2 CRM 以及 CNSLN 的吸收速率常数 (K_a) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Intestinal absorption rate constant (K_a) of CRM、CNSLN ($\bar{x} \pm s, n=6$)

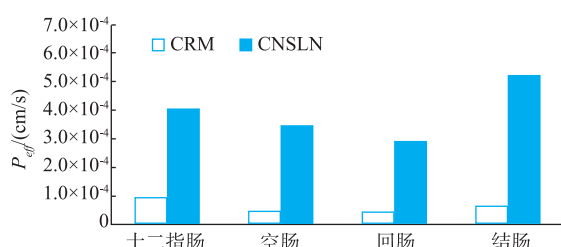


图3 CRM 以及 CNSLN 的有效渗透率 (P_{eff}) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effective permeability (P_{eff}) of CRM、CNSLN ($\bar{x} \pm s, n=6$)

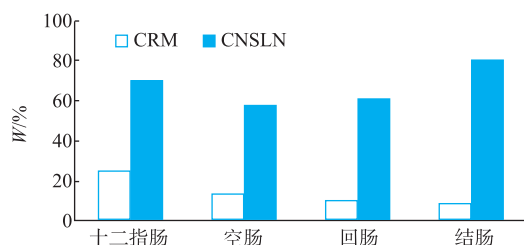


图4 CRM 以及 CNSLN 的吸收百分率 W (%) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Intestinal absorption percentage W (%) of CRM、CNSLN ($\bar{x} \pm s, n=6$)

由图3-5可知, CNSLN的 K_a 、 P_{eff} 大小顺序为: 结肠>十二指肠>空肠>回肠, 与 K_a 、 P_{eff} 相比, W (%) 在回肠和空肠部位有所不同, 其顺序为: 回肠>空肠; CRM的 K_a 、 P_{eff} 大小顺序为: 十二指肠>结肠>空肠>回肠, 而 W (%)则为: 十二指肠>空肠>回肠>结肠, 以上结果说明 CNSLN的最大吸收部位在结肠, CRM则在十二指肠。由图3-5也可知, CNSLN与CRM在十二指肠、空肠、回肠和结肠的 K_a 、 P_{eff} 、 W (%)均存在显著性差异 ($P<0.01$), 且 CNSLN均为CRM的2倍以上。可见, CNSLN能明显的提高CRM在大鼠小肠的吸收。

3 结语

CRM ($C_{21}H_{20}O_6$) 是分子质量小且略带酸性的黄色多酚类化合物, 其水溶性和口服吸收均较差, 使CRM不能很好发挥药理活性^[12]。选用乳化-超声法制备得到的 CNSLN^[13-14], 其采用单硬脂酸甘油酯和卵磷脂为载体, 将CRM包裹于类脂核中, 使CNSLN结合了纳米乳和脂质体的优点, 而CNSLN可增加CRM在肠部的吸收, 原因可能主要有: CRM须经过黏膜细胞才可被小肠吸收, 而SLN的结构与黏膜细胞的磷脂双分子层结构较相似, 扰乱了脂质双分子层的正常排列, 从而增加并提高了CRM通透性和吸收率^[15]; 表面张力较低的微乳容易透过肠壁的水化层, 使载带的CRM能直接接触肠道上皮细胞, 从而增加了CRM的吸收^[16]。

由于灌流方式的差异, 常见的在体肠灌流模型方法, 可以分为: 在体循环灌流、在体振动灌流和SPIP等。SPIP的实验条件与口服药物后的肠环境较相似, 具有稳定的吸收速率和很好的相关性。因此, 国外现已多采用SPIP, 且SPIP是FDA认同的研究吸收代谢的模型^[12]。

作者在此基础上选用SPIP, 对游离CRM和CNSLN的小肠吸收进行研究比较, 并采用紫外分光光度法测定样品中CRM的含量, 此法重现性好, 简便易行, 结果准确可靠。游离CRM和CNSLN的 K_a 、 P_{eff} 和 W 进行比较, 均表明CNSLN能显著增加CRM的小肠吸收, 与张继芬等^[15]研究的CRM脂质体相比较, 作者制备的CNSLN在大鼠肠中各段均有很好的吸收, 其中结肠吸收最好。可见, SLN较脂质体能显著提高CRM在肠中的吸收, 特别是结肠。而大鼠口服给予本试验制备的CNSLN后的药时曲线下面积 (Area under concentration-time curve, AUC_{0-t}) 为 $(798.00 \pm 64.44) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 药时曲线下总面积 (Total area under concentration-time curve, $AUC_{0-\infty}$) 为 $(939.49 \pm 114.18) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, 峰浓度 (Peak concentration, C_{max}) 为 $(93.84 \pm 5.66) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和达峰时间 (Peak time, T_{max}) 为 $(0.75 \pm 0.00) \text{h}$, AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 C_{max} 和 T_{max} 分别是游离CRM的7.34、7.40、1.30和3.00倍^[13]。由大鼠口服CNSLN后血药动力学数据可知, CNSLN能明显提高CRM在大鼠体内的生物利用度^[13-14], CNSLN的大鼠肠吸收情况和药动学情况均显示了SLN作为难溶性药物给药载体的优越性。

参考文献:

- [1] ZHANG Mi,SUN LiLi,WANG Hong,et al. Determination of the content of curcumin in solid dispersions [J]. **Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory**,2013,30(4):1867-1870.(in Chinese)
- [2] YALLAPU M M,JAGGI M,CHAUHAN S C. Curcumin nanoformulations;a future nanomedicine for cancer [J]. **Drug Discovery Today**,2012,7(1-2):71-80.
- [3] HOSSAIN DM,BHATTACHARYYA S,DAS T,et al. Curcumin;the multi-targeted therapy for cancer regression [J]. **Front Biosci(Schol Ed)**,2012,4:335-55.
- [4] GHADIRI M,FATEMI S,VATANARA A,et al. Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles;Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size[J]. **International Journal of Pharmaceutics**,2012,424(1-2):128-137.
- [5] SURESH G,MANJUNATH K,VENKATESWARLU V,et al. characterization,and in vitro and in vivo evaluation of lovastatin solid lipid nanoparticles[J]. **AAPS Pharm Sci Tech**,2007,8(1):24.
- [6] LIANG Rong,MA Jianguo,ZHONG Fang. Research progress of nanoemulsion delivery system in functional food [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(6):561-568.(in Chinese)
- [7] YAN Zijun,LI Wanyu,WAN Kun,et al. Determination of entrapment efficiency of curcumin solid lipid nanoparticles by ultraviolet spectrophotometry[J]. **Laser Journal**,2014,35(12):158-160.(in Chinese)
- [8] NAI Yan,WANG Ling,WEN Yun,et al. Intestinal absorption of tenofovir in rats [J]. **Chin Hosp Pharm J**,2011,31(23):1980-1981.(in Chinese)
- [9] YOU Bengang,YANG Mingshi,FAN Yuling,et al. Studies on the intestinal absorption kinetics of nitrendipine in rats [J]. **Chin Pharm J**,2004,39(3):214-217.(in Chinese)
- [10] TAN Q Y,HU N N,LIU G D,et al. Role of a novel pyridostigmine bromide -phospholipid nanocomplex in improving oral bioavailability[J]. **Archives of Pharmacal Research**,2012,35(3):499-508.
- [11] ZHONG Meng,YANG Lin,YANG Mei,et al. Single-pass intestinal perfusion for studying intestinal absorption of azithromycin niosomes in rats[J]. **Academic Journal of Second Military Medical University**,2014,4(35):419-422. (in Chinese)
- [12] YAN Wenli,HUANG Zhaosheng,ZHAO Ziming,et al. Research on intestinal absorption characteristics of curcumin in rats[J]. **Pharmacy Today**,2012,22(3):137-141.(in Chinese)
- [13] YAN Zijun,LI Wanyu,HU Xueyuan,et al. Oral pharmacokinetics of solid curcumin lipid nanoparticles in rats [J]. **Chin Hosp Pharm J**,2015,35(4):300-303.(in Chinese)
- [14] YAN Zijun,LI Wanyu,SUN Lili,et al. Pharmacokinetics study of curcumin solid lipid nanoparticles by intravenous injection in rats[J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**,2014,37(7):1234-1236.(in Chinese)
- [15] ZHANG Jifen,TANG Qin,MO Ting,et al. The characteristics and in situ intestine absorption of curcumin complex and curcumin liposomes using phospholipid as vehicles[J]. **Chin Pharm J**,2012,47(21):1736-1740.(in Chinese)
- [16] ZHANG Z Q,LU B. Advance in microemulsions as a vehicle of drug delivery system[J]. **Chinese Journal of Pharmaceutics**,2001,32(3):139-142.