

水飞蓟素-两亲性壳聚糖胶束的制备及其大鼠在体肠吸收

吴益平, 霍美蓉, 周建平*

(中国药科大学药剂学教研室, 江苏 南京 210009)

摘要: 制备水飞蓟素-两亲性壳聚糖胶束 (SM-OGC), 以提高水飞蓟素口服生物利用度, 并研究其在大鼠小肠各部位的吸收情况。采用透析法制备 SM-OGC, 测定载药胶束的粒径、zeta 电位等理化参数; 并以水飞蓟素混悬液为对照, 运用大鼠在体单向灌流模型, 考察 SM-OGC 的口服吸收。结果表明, SM-OGC 平均粒径为 (162.4 ± 3.0) nm, zeta 电位为 $(+32.6 \pm 0.98)$ mV, 包封率为 (39.17 ± 0.98) %, 载药量达到 (28.15 ± 0.43) %。SM-OGC 在各个肠段吸收皆显著高于水飞蓟素混悬液对照组 ($P < 0.05$), 且十二指肠吸收最好, 结肠、空肠和回肠吸收相近。OGC 胶束对水飞蓟素在大鼠小肠的吸收有明显的促进作用。

关键词: 水飞蓟素; 两亲性壳聚糖胶束; 在体单向肠灌流模型; 吸收

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 06-0651-07

Preparation of silymarin-loaded amphiphilic chitosan micelle and its *in situ* absorption in rat intestine

WU Yi-ping, HUO Mei-rong, ZHOU Jian-ping*

(Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: To improve the oral bioavailability of silymarin, the silymarin-loaded amphiphilic chitosan micelles (SM-OGC) were prepared. The absorption of SM-OGC in rat intestine was investigated. SM-OGC was prepared by dialysis method. The size and zeta potential of SM-OGC were investigated. Compared to silymarin suspension, the absorption of SM-OGC was investigated using *in situ* single pass perfusion model. The diameters and zeta potential SM-OGC were (162.4 ± 3.0) nm and $(+32.6 \pm 0.98)$ mV, respectively. The encapsulation efficiency was (39.17 ± 0.98) % and the drug loading of SM-OGC was (28.15 ± 0.43) %. The absorption of SM-OGC at different segments of intestine was significantly higher than that of silymarin suspension ($P < 0.05$). The apparent absorption rate (K_a) and effective permeation coefficient (P_{eff}) at the duodenum were the largest. K_a and P_{eff} had no significant difference between jejunum, ileum and colon. OGC micelles might significantly promote the absorption of silymarin in the intestine tract.

Key words: silymarin; amphiphilic chitosan micelle; *in situ* single pass intestine perfusion model; absorption

水飞蓟素 (silymarin, SM) 是菊科植物水飞蓟种子的提取物, 包括水飞蓟宾 (silybin, SLB)、水飞蓟宁 (silydianin)、水飞蓟亭 (silychristin) 和异水飞蓟宾 (istrosilybin) 等, 其中最主要的活性成分是水飞蓟宾, 具保肝作用, 临床上主要用于治疗慢性肝炎,

也用于治疗酒精性肝损伤、药物性肝病。近年来药理学研究表明, 水飞蓟素具有抗自由基活性、抗脂质过氧化、抗脂氧酶、抗肿瘤和降血脂、治疗肺损伤和心肌细胞损伤等作用^[1,2]。但由于水飞蓟素难溶于水 (溶解度仅为 $52.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 口服生物利用度低。近年来, 提高水飞蓟素生物利用度的制剂研究较多, 如水飞蓟素环糊精包合物、水飞蓟素固体分散体、水飞蓟素自微乳、水飞蓟素固体脂质纳米粒和前体脂质体等, 但载药量较低 (报道最大载药量为 12.5%)^[3,4]。

收稿日期: 2008-11-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472105); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2007173).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271272, Fax: 86-25-83301606,

E-mail: zhoujianp60@163.com

聚合物胶束用于载药时,疏水性的药物能被包裹到疏水的内核中,以远大于药物在水中的浓度的方式运载,而亲水性链段形成的紧密外壳可以保护核中药物避免其水解和酶解,并避免人体的网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES)的识别和捕获,起到“隐形”作用,延长了药物在血液系统中的循环时间,提高了药物的生物利用度。壳聚糖(chitosan, CS)是一类带正电荷直链共聚物,为天然多糖中唯一的碱性多糖,具有无毒、来源丰富、良好的生物相容性和生物可降解性等优点^[5]。通过对CS进行结构修饰,制备成两亲性壳聚糖,可作为疏水性药物的增溶载体,在水性介质中自发形成胶束^[6,7]。同时,壳聚糖也是一种较好的口服吸收促进剂,大量实验证明壳聚糖具有黏膜黏附性,并对上皮细胞的紧密连接有调节作用,对药物跨上皮黏膜细胞的透过能力有很强的促进作用^[8]。而目前国内外报道的两亲性壳聚糖衍生物有聚-(L-乳酸)壳聚糖、*N*-2(3)-(2'-十二烯-1'-基)琥珀酰壳聚糖、*N*-辛基-*O*-硫酸酯-壳聚糖、PEG-壳聚糖和*N*-邻苯二甲酰氯壳聚糖-甲基-聚乙二醇等,多作为难溶性药物的载体制备胶束,用于注射给药,未见口服胃肠道吸收情况的相关报道。

本文以CS为原料,合成了新型的两亲性壳聚糖*N*-辛基-*O*,*N*-羟乙基壳聚糖(*N*-octyl-*O*,*N*-glycol chitosan, OGC)(图1),制备水飞蓟素壳聚糖聚合物胶束(SM-OGC),考察了其理化性质,并以水飞蓟素混悬液为对照,运用大鼠在体肠灌流模型对其肠吸收进行考察。

材料与方法

仪器 Zetasizer 3000HS 粒径仪(英国 Malvern 公司); H-7650 透射电镜(日本日立公司); LC-2010C 高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

药品与试剂 水飞蓟素(silymarin, SM, 佳木斯三江水飞蓟素制品公司); 水飞蓟宾对照品(silybin, SLB, 中国药品生物制品检定所提供); 壳聚糖(分子量 100 kD, 脱乙酰度 90%, 浙江金壳生物技术有限公司); 正辛醛(南京开元嘉禾香精香料有限公司); 甲醇(色谱纯, 江苏汉邦科技有限公司); 透析袋(上

海绿鸟科技发展有限公司, MWCO = 12 000~14 000), 酚红(phenol red, 国药集团化学试剂有限公司)。

Krebs-Ringer's 液(K-R 液)的配制: NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, CaCl₂ 0.37 g, MgCl₂ 0.22 g, NaH₂PO₄ 0.22 g, NaHCO₃ 1.37 g, *D*-葡萄糖 1.4 g, 加蒸馏水定容至 1 L。

动物 雄性 SD 大鼠, 体重(250 ± 30) g(中国药科大学实验动物中心)。

两亲性壳聚糖的合成 取壳聚糖 2 g, 醋酸水溶液溶解, 正辛醛反应一定时间, NaOH 溶液调节 pH 至 4~5。加入硼氢化钠氢化, NaOH 溶液调节 pH 至 10。抽滤, 滤饼用水、醇交替洗涤, 滤饼真空干燥, 得白色细腻粉末 1.6 g, 即为 *N*-辛基壳聚糖衍生物(*N*-octyl chitosan, OC)。取 OC 1 g, 混悬于醋酸溶液, 滴加 NaOH, 水浴碱化。冰浴下加入环氧乙烷反应一段时间。反应液用 HCl 调节 pH 至中性, 于透析袋中透析 72 h, 透析液冻干即得 *N*-辛基-*O*,*N*-羟乙基壳聚糖聚合物 0.5 g。元素分析测得 OGC 的羟乙基取代度 100%, 辛基取代度 50%~60%。采用稳态荧光探针法测得其临界胶束浓度为 5.34 mg·L⁻¹。

SM-OGC 的制备 取 OGC 20 mg, 加水 3 mL, 室温搅拌溶胀过夜, 滴加 15 mg·mL⁻¹ 水飞蓟素的乙醇溶液 1 mL, 冰浴下探头超声分散。胶束溶液透析 8 h, 过 0.45 μm 滤膜, 即得载药胶束(SM-OGC)溶液。

包封率和载药量测定 精密量取 SM-OGC 溶液 50 μL 于 5 mL 量瓶, 流动相稀释定容至刻度, 振摇混匀, 测定胶束溶液中水飞蓟宾浓度, 按下式计算包封率和载药量^[9,10]:

$$\text{包封率} = \frac{\text{载入胶束的药物量}}{\text{投入药物量}} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \frac{\text{胶束中的药物量}}{(\text{胶束中药物量} + \text{载体量})} \times 100\%$$

由于水飞蓟素水溶性很小(52.4 μg·mL⁻¹), 与载入聚合物胶束中的水飞蓟素量(>1 mg·mL⁻¹)相比可以忽略不计, 所以聚合物胶束溶液中的游离水飞蓟素含量在计算载药量时可忽略不计。

粒径和 zeta 电位测定 将 SM-OGC 胶束溶液稀释至 SM 浓度 0.5 mg·mL⁻¹, 测定其粒径及 zeta 电位。

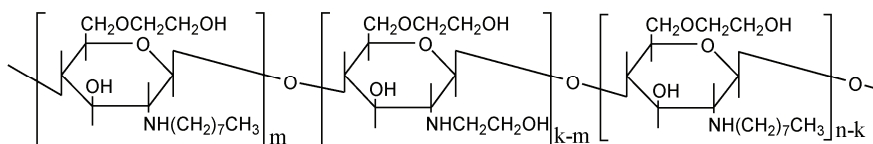


Figure 1 The chemical constitution of *N*-octyl-*O*, *N*-glycol chitosan (OGC)

TEM 图谱 取 SM-OGC 胶束溶液稀释至 SM 浓度 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 磷钨酸负染法染色, 取 1 滴于瓷板的凹槽内, 并将喷碳铜网放于试液上, 1~2 min 后取出铜网, 用滤纸小片从铜网边缘吸去残余液体; 将该铜网放在染液滴 (4% 磷钨酸溶液, pH 7.0) 上约 30 s, 吸干多余染液、干燥, 采用日立 H-7650 透射电镜观察形态。

含药灌流液的配制 ① 水飞蓟素混悬液的配制: 称取一定量水飞蓟素, 加入酚红储备液 5 mL, 以空白 K-R 液配制成 $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (以 SLB 计算) 的混悬液, 加入 5% Tween 80 和 10% 聚维酮助悬。② SM-OGC 胶束灌流液的配制: 取制备好的胶束溶液一定量, 加入酚红储备液 5 mL, 以空白 K-R 液配制成 $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (以 SLB 计算) 的溶液。

大鼠在体吸收实验 取自然饮水条件下禁食 12 h 的 SD 大鼠, 腹腔注射 20% 乌拉坦 $1.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 背位固定。沿腹中线打开腹腔。大鼠肠段分为 4 段: 自幽门以下 2 cm 处向下取 10 cm 为十二指肠段; 幽门以下 15 cm 向下取 10 cm 为空肠段; 盲肠上端 2 cm 向上取 10 cm 为回肠段; 盲肠以下 10 cm 为结肠段。在各肠段始端和末端插管, 结扎。以 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温的生理盐水缓慢清洗肠管, 直至流出液干净为止, 排空生理盐水。接恒流泵, 以 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速, 用空白 K-R 液饱和整个管路 30 min 后, 排空液体。接含药灌流液开始单向灌流实验, 流速 $0.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 以充满整个管路后流出的第 1 滴药液开始计时, 平衡 1 h 后开始接液, 于 75、90、105、120、135、150、165 和 180 min 收集药液, 测定 SLB 和酚红的浓度。

色谱条件的建立 ① 吸收波长的选择 取酚红水溶液和水飞蓟素的甲醇溶液, 按分光光度法在 200~700 nm 内扫描, 水飞蓟素在 288 nm 有最大的吸收, 酚红在整个波长范围内都有吸收, 故采用 288 nm 作为液相检测波长, 同时测定样品中水飞蓟素及酚红含量; ② 色谱条件 色谱柱为 Lichrospher C₁₈ ($4.6 \text{ mm}\times 150 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$); 流动相为甲醇- $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾水溶液 (50:50); 流速为 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: $40 \text{ }^\circ\text{C}$; 检测波长 288 nm; 进样体积 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 。

酚红标准曲线的制备 精密称取酚红 20 mg 置 50 mL 量瓶, 以 K-R 液溶解并定容, 作为储备液。精密量取储备液, 以流动相定容至 5 mL, 质量浓度依次为 0.204 4、0.511 0、1.022、2.044、5.110、10.22 和 $20.44 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液, 在上述色谱条件下进样 $20 \text{ }\mu\text{L}$, 记录峰面积, 以峰面积 (A) 对浓度 (C , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行线性回归, 得标准曲线。

水飞蓟素标准曲线的制备 精密量取 SLB 标准品 10 mg, 以甲醇定容至 100 mL, 作为储备液。精密量取储备液, 以流动相定容至 10 mL, 质量浓度依次为 0.406、1.015、2.030、4.060、10.15、20.30 和 $40.60 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准溶液, 在上述色谱条件下进样 $20 \text{ }\mu\text{L}$, 记录峰面积。以水飞蓟素和异水飞蓟素两个峰的峰面积之和 (A) 对浓度 (C , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作线性回归, 得标准曲线。

水飞蓟素和酚红的精密度、回收率测定 按标准曲线下制备方法, 配制 $40 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酚红储备液, $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SLB 储备液, 分别取 0.05、0.3 和 0.5 mL 至 5 mL 量瓶, 以流动相定容, 配制成酚红质量浓度为 0.4、2.4 和 $4.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, SLB 质量浓度为 1.0、6.0 和 $10.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 个样品 ($n=3$), 分别测定 SLB 和酚红的回收率, 并考察精密度。

方法选择性研究 对大鼠十二指肠、空肠、回肠和结肠分别插管, 用空白灌流液灌流 4 h, 流出液用 HPLC 方法检测对药物和酚红的测定有无干扰。

大鼠在体肠吸收的影响因素 ① SM-OGC 胶束稳定性考察 将含药灌流液样品置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中孵育 3 h, 取孵育前后的样品各 5 mL, 3000 min^{-1} 离心 10 min, 取上清液过 $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜, 测定药物浓度的变化。② 肠壁对载药胶束吸附的影响 剪取清洗后的十二指肠、空肠、回肠和结肠各 10 cm, 置于一定量已知浓度的灌流药液中, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温水浴中孵育 3 h, 孵育液以 $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 测定孵育前后药物浓度。③ 管路物理吸附的影响 剪取与灌流实验相同长度的输液管, 中间缺少肠道, 其余操作同在体肠灌流实验方法。于不同时间点测定药液浓度。

灌流液中 SLB 浓度和酚红浓度的测定 按大鼠在体吸收实验方法, 取收集的灌流液 0.5 mL, 以流动相定容至 5 mL。 10000 min^{-1} 离心 10 min, 取上清液, 在上述色谱条件下进样 $20 \text{ }\mu\text{L}$, 分别记录酚红和 SLB 的峰面积, 代入各自标准曲线计算浓度。

数据处理 按文献[11~13]方法利用不同时间酚红浓度的变化校正供试液的体积, 并计算各肠段的表观吸收速率常数 (K_a), 其公式为:

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \times \frac{\text{PR}_{\text{in}}}{\text{PR}_{\text{out}}}\right) \times \frac{Q}{\pi R^2 l}$$

有效通透系数 (P_{eff}) 可利用以下公式计算:

$$P_{\text{eff}} = -\frac{Q}{2\pi R l} \ln \frac{C_{\text{out}}}{C_0}$$

上式中的 PR_{in} 和 PR_{out} 分别表示进出肠管的灌流液中

酚红的质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C_{in} 和 C_{out} 分别表示进出肠管的灌流液中药物的质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); Q 表示灌流液的体积流速 ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$); l 表示被灌流的肠管的长度 (cm); R 表示肠段内径 (cm)。

结果

1 SM-OGC 胶束制备及其理化性质

本实验制备的 SM-OGC 胶束为淡黄色溶液, SM 的包封率为 $(39.17 \pm 0.98)\%$, 载药量达到 $(28.15 \pm 0.43)\%$ ($n=3$)。OGC 空白胶束及载药胶束粒径、多分散指数、zeta 电位如表 1 所示, 透射电镜图见图 2。

2 灌流液中 SLB 和酚红浓度测定方法学的建立

SLB 和酚红 3 个峰能完全分离, 空白肠灌流液中的物质对药物的测定无干扰, 说明方法选择性好 (图 3)。

SLB 在 $0.2044 \sim 20.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 回归方程为 $A = 45433C - 2756.9$, $R^2 = 0.9999$ 。其低、中、高 3 个浓度的回收率分别为 103.7%、97.6% 和 100.3%, 日内 RSD 为 1.06%, 日间 RSD 为 1.75%。酚红在 $0.406 \sim 4.06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 回归方程为 $A = 424439C + 1182.9$, $R^2 = 0.9999$ 。其低、中、高 3 个浓度的回收率分别为 96.9%、99.1% 和 101.5%, 日内 RSD 为 1.24%, 日间 RSD 为 1.68%。均符合浓度测定要求。

Table 1 The size, polydispersity and zeta potential of blank OGC and silymarin-loaded amphiphilic chitosan micelles (SM-OGC) ($n=3$)

Parameter	Size / nm	μ_2 / r^2	ζ / mV
OGC	190.2 ± 3.4	0.17 ± 0.03	$+20.7 \pm 0.69$
SM-OGC	162.4 ± 3.0	0.12 ± 0.02	$+32.6 \pm 0.98$

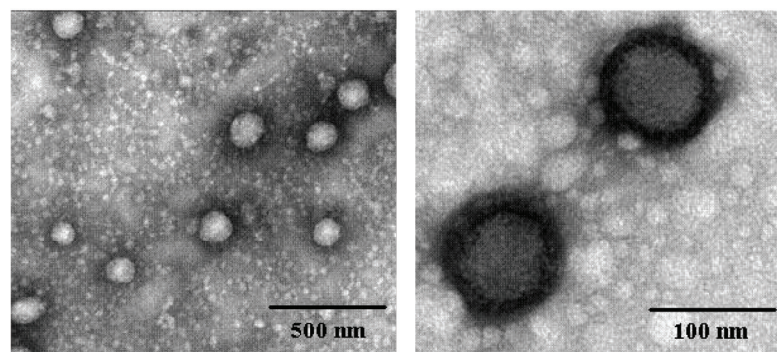


Figure 2 TEM image of aqueous solution of silymarin-loaded chitosan micelles

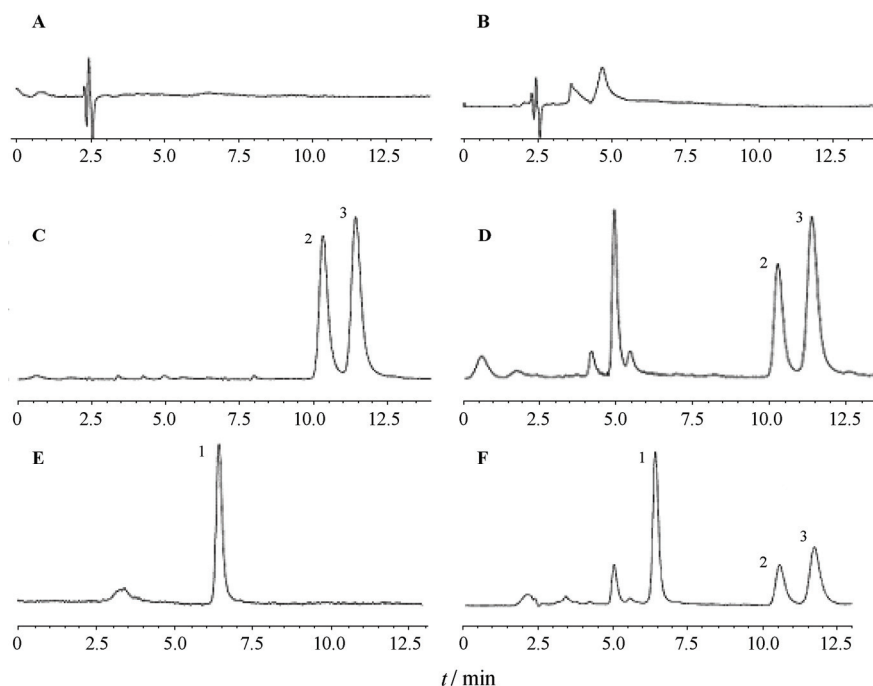


Figure 3 HPLC chromatograms of K-R buffer (A); perfusate contained blank OGC micelle (B); perfusate added silybin (C); perfusate added silymarin (D); perfusate added phenol red (E); sample (F). 1: Phenol red; 2, 3: Silybin

3 大鼠在体肠吸收的影响因素

含药灌流液在 3 h 后的浓度为 0 h 的 100.7%, SM-OGC 胶束在灌流液中稳定。空白肠段的孵育液中 3 h 后药物浓度为 0 h 时的 100.1%, 因此, 肠壁黏膜对胶束没有物理吸附作用。空白管路的流出液在 0~3 h 内, 流出药液的浓度基本不变, 认为流通管路对胶束没有吸附作用。

4 不同肠段对 SM-OGC 胶束和 SM 混悬液的吸收比较

按人体给药剂量换算成大鼠给药剂量 ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以 SLB 计算), 在不同肠段对 SM-OGC 胶束和 SM 混悬液的吸收, 其 K_a (s^{-1})、 P_{eff} ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) 结果见图 4 ($n=6$)。

由此可见, SM-OGC 胶束和 SM 在整个肠段都有吸收。SM-OGC 胶束和 SM 混悬液有类似结果, 在十二指肠都有最大的吸收, SM-OGC 胶束的 K_a 为 $(1.92 \pm$

$0.21) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, P_{eff} 为 $(0.583 \pm 0.075) \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$; SM 混悬液的 K_a 为 $(0.622 \pm 0.075) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, P_{eff} 为 $(0.352 \pm 0.024) \times 10^{-3} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$ 。与空肠、回肠和结肠相比都有显著性差异 ($P < 0.05$); 而空肠、回肠和结肠之间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。但 SM-OGC 胶束在各个肠段的 K_a 和 P_{eff} 都大于 SM 混悬液, 两者之间有显著性差异 ($P < 0.05$), 提示将 SM 制备成胶束可以明显提高肠道对 SM 的吸收。

5 浓度对肠道吸收的影响

以 K-R 液配制不同质量浓度的胶束灌流液 50、100、200 和 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (以 SLB 计算), 按“大鼠在体肠吸收实验”方法进行考察。不同肠段的累计吸收药物量 (图 5)。由图可知, 不同浓度的胶束溶液在不同的肠段, 药物的吸收量均近似满足于一种线性状态, 说明肠道对 SM-OGC 胶束溶液在上述范围内的吸收存在浓度依赖性, 吸收的机制是以被动扩散为主。

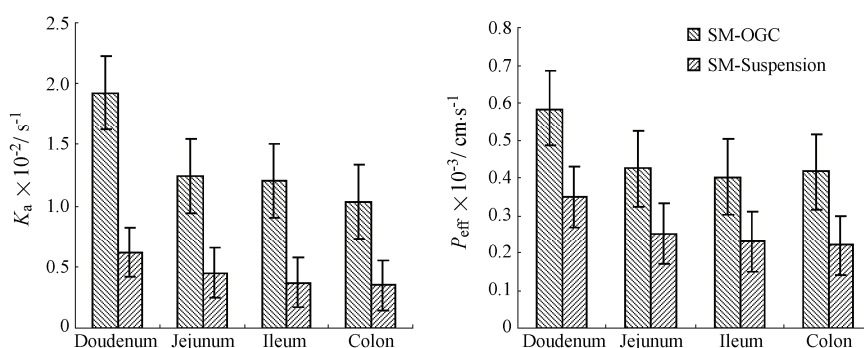


Figure 4 The apparent absorption rate and effective permeation coefficient of different regions of intestine ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

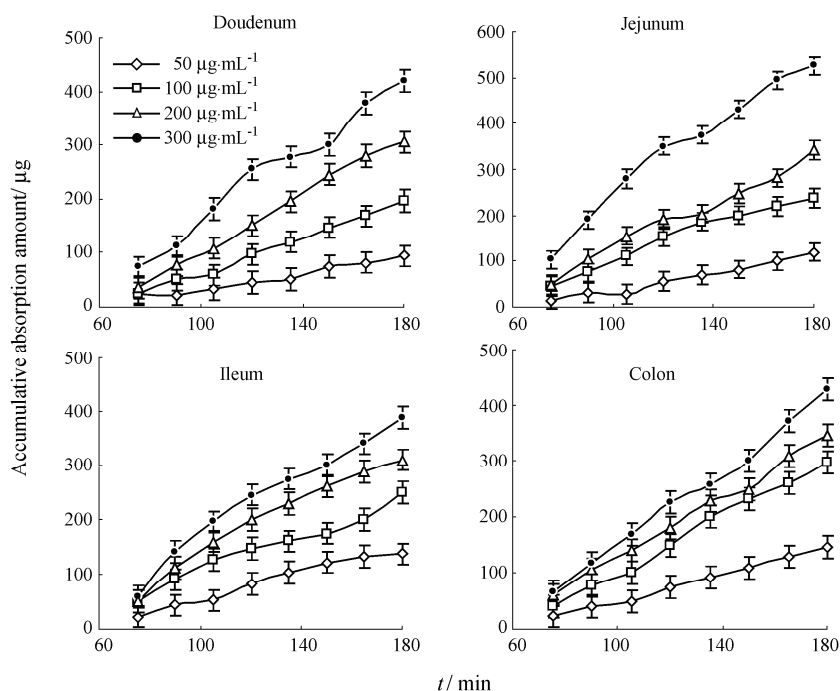


Figure 5 Accumulative absorption amount of drug in various segments with different concentrations

Table 2 Effect of the concentrations on their absorption parameters using rat single pass intestine perfusion ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Intestine segment	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
$K_a \times 10^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$	Duodenum	2.13 \pm 0.42	1.92 \pm 0.37	1.61 \pm 0.33	1.12 \pm 0.19
	Jejunum	1.57 \pm 0.31	1.24 \pm 0.28	0.93 \pm 0.18	0.40 \pm 0.10
	Ileum	1.38 \pm 0.28	1.20 \pm 0.19	1.12 \pm 0.32	0.61 \pm 0.10
	Colon	1.26 \pm 0.19	1.03 \pm 0.15	0.83 \pm 0.24	0.23 \pm 0.05
$P_{\text{eff}} \times 10^{-4}\text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$	Duodenum	8.76 \pm 1.32	5.83 \pm 0.78	2.45 \pm 0.43	2.30 \pm 0.41
	Jejunum	4.25 \pm 0.75	4.25 \pm 0.53	1.18 \pm 0.27	1.61 \pm 0.35
	Ileum	3.79 \pm 0.63	4.01 \pm 0.61	1.15 \pm 0.25	1.09 \pm 0.20
	Colon	4.17 \pm 0.59	4.17 \pm 0.58	1.14 \pm 0.28	1.08 \pm 0.18

以不同质量浓度的灌流液 50、100、200 和 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (SLB 计算) 在各个肠段的吸收参数 (表 2) 可见,随着浓度增大,各个肠段的 P_{eff} 和 K_a 均有下降。且 P_{eff} 的差异比 K_a 更明显。总体而言,浓度低时 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 肠壁通透性高,甚至是高浓度 (300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 4 或 5 倍 (如结肠),说明载药胶束在肠道的吸收可能存在被动扩散以外的吸收,但在本文的考察范围内以被动扩散占主要优势。

讨论

黄酮类药物的口服吸收差,一直是广泛关注的问题。水飞蓟素属难溶性药物,因此,本文将其制成壳聚糖聚合物胶束,以提高其水溶性及口服生物利用度。

OGC 对 SM 具有优越的负载性能,载药量高达 (28.15 \pm 0.43) %,高于其他文献报道。药物与胶束疏水性内核的相容性是影响胶束对药物增溶的主要原因,相容性好则载药量高^[14-16]。OGC 对 SM 较大的载药量可能是由于 OGC 的疏水性辛基链对药物有较好的相容性。

粒径测定结果表明,SM-OGC 胶束粒径分布窄,较均匀,比空白胶束粒径小,可能由于载体疏水基和疏水性药物之间的相互作用,使疏水基聚集得更紧密所致^[17,18]。透射电镜下胶束呈球形,大小均匀,并可见明显的壳核结构,粒径约 100 nm,较光谱仪测得粒径小,可能因为电镜实验下水被蒸发,胶束呈干态,没有水合层,故粒径变小。SM-OGC 胶束 zeta 电位显著高于空白胶束,可能是大量药物载入引起载体微观构象的变化,使表面暴露的正电荷增多。一般而言,zeta 电位绝对值越高 (>30 mV),则粒子间的静电斥力越大,体系越不容易发生聚集。SM-OGC 载药胶束 zeta 电位为 +32.6 mV,表明其表面带有大量的正电荷,预示该分散体系可能具有较好的稳定性。

小肠在吸收药物的过程中,也会吸收水分,导致

供试液体积减少,因此不能用直接测定药物浓度的方法来计算剩余药量,由于酚红不被肠道吸收,故可利用酚红浓度的变化来校正不同时刻供试液体积。在体肠循环和在体肠单向灌流是常见的两种研究药物口服吸收的方法。在体肠循环由于其较快的灌流速度 (2.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 及较长的回流时间 (3~6 h),易造成肠黏膜的破损,通透性增加,而造成酚红的肠道吸收,难以起到准确的体积标识作用,而在体肠单向灌流可采用较低的灌流速度 (0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) 及较短的回流时间 (2~3 h),可避免肠道损伤^[19],故本文以酚红为体积标识物,采用在体肠单向灌流研究 SM 肠道吸收。

水飞蓟素为黄酮类难溶性药物,本文将其制成壳聚糖聚合物胶束,从单向灌流实验结果可见,与 SM 混悬液相比,SM-OGC 胶束在肠道吸收显著提高。这可能是由于壳聚糖本身的生物黏附性能使载药微粒较长时间地滞留在胃肠道中,且壳聚糖骨架上残留的氨基带有正电荷,可与细胞膜蛋白质中带负电荷的丝氨酸基团相互作用,可逆地打开紧密连接,改变细胞骨架,增强膜通透性,从而增强黏膜对药物的吸收,提高药物口服的生物利用度^[20]。但 OGC 胶束的促吸收机制还有待于进一步证实。

本文以两亲性壳聚糖衍生物 OGC 为载体,对黄酮类药物 SM 具有较好的增溶效果,并可显著提高肠道对其吸收,具有良好应用前景。

References

- [1] Yu CL, Gu CH. Progress of legalon and its pharmacological effects [J]. World Pharm (国外医药), 2000, 21: 201-203.
- [2] Zhou B, Wu LJ, Tashiro SI. Protective effect of silibin in against isoproterenol-induced injury to cardiac myocytes and its mechanism [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 263-268.
- [3] Qin FH, Hu QH, Liang WQ, et al. Preparation of silymarin self-microemulsifying capsules and its pharmacokinetic study

- in rats [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2007, 42: 1551-1555.
- [4] He J. Study on Silymarin-loaded Solid Lipid Nanoparticles: Preparation, Oral Bioavailability and Targeting Effect on Liver [D]. Sichuan: Sichuan University, 2005.
- [5] Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery [J]. *J Control Release*, 2004, 100: 5-28.
- [6] Zhu X, Zhang C, Wu X, et al. Preparation, physical properties, and stability of gambogic acid-loaded micelles based on chitosan derivatives [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2008, 34: 2-9.
- [7] Lu Y, Liu L, Guo S. Novel amphiphilic ternary polysaccharide derivatives chitosan-g-PCL-b-MPEG: synthesis, characterization, and aggregation in aqueous solution [J]. *Biopolymers*, 2007, 86: 403-408.
- [8] Kang A, Liang Y, Hao HP, et al. Advances in study of novel absorption enhancers based on tight junctions [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 1122-1128.
- [9] Huo MR, Zhang Y, Zhou JP, et al. Solubilizing and sustained-releasing abilities and safety preliminary evaluation for paclitaxel based on *N*-octyl-*O,N*-carboxymethyl chitosan polymeric micelles [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 855-861.
- [10] HUO MR, Zhou JP, Wei Y, et al. Preparation of paclitaxel-loaded cationic chitosan micelles and study of its biodistribution in mice [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2006, 37: 132-136.
- [11] Sutton CS, Rinaldi TS, Vukovinsky KE, et al. Comparison of the gravimetric, phenol red, and 14C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model [J]. *AAPS Pharm Sci*, 2001, 3: E25.
- [12] Luan LB, Zhao N. The absorption characteristics of silybin in small intestinal of rat [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 138-141.
- [13] WU Y, Luan LB. *In situ* rats single pass perfusion intestinal absorption of the effective components in Radix Angelicae Pubescentis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 102-107.
- [14] Dong Y, Feng SS. Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs [J]. *Biomaterials*, 2004, 25: 2843-2849.
- [15] Park EK, Lee SB, Lee YM. Preparation and characterization of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) amphiphilic block copolymeric nanospheres for tumor-specific folate-mediated targeting of anticancer drugs [J]. *Biomaterials*, 2005, 26: 1053-1061.
- [16] Huh KM, Lee SC, Cho YW, et al. Hydrotropic polymer micelle system for delivery of paclitaxel [J]. *J Control Release*, 2005, 101: 59-68.
- [17] Yea YQ, Yanga FL, Hub FQ, et al. Core-modified chitosan-based polymeric micelles for controlled release of doxorubicin [J]. *Int J Pharm*, 2008, 352: 294-301.
- [18] Hu FQ, Rena GF, Hong YA, et al. Shell cross-linked stearic acid grafted chitosan oligosaccharide self-aggregated micelles for controlled release of paclitaxel [J]. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 2006, 50: 97-103.
- [19] Hu YQ, Zheng LY, Qian CQ. Small intestinal absorption study of phenol red as an ionic drug [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 1996, 27: 355-359.
- [20] Rinaldi G, Marigliano I, Verpignani I, et al. The effect of chitosan and other polycations on tight junction permeability in the human intestinal Caco-2 cell line [J]. *J Nutr Biochem*, 2002, 13: 157-167.