

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.02.0247

• 短篇论著 •

去甲氧基姜黄素羟丙基-β-环糊精在体肠吸收特征

罗见春, 何丹, 杨梅, 吴建勇, 张景勍*

重庆医科大学重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016

[摘要] **目的** 研究去甲氧基姜黄素羟丙基-β-环糊精(DECED)及去甲氧基姜黄素(DE)的在体肠吸收情况。**方法** 使用DE以环糊精包合技术制备DECED,光谱法测定其理化性质,显微照相观察其形态,马尔文粒径测定仪测定DECED的zeta电位。采用大鼠在体肠段单向灌注模型,并建立紫外分光光度法测定DECED及DE在大鼠体内各肠段的吸收速率常数(K_a)、表观渗透系数(P_{app})和吸收百分率。**结果** 成功制得DECED,其溶解度为2.30 g/L,是DE的38.33倍;zeta电位为-32.2 mV。在体肠吸收实验显示DECED的 K_a 及 P_{app} 皆为回肠>十二指肠>空肠>结肠,且其 K_a 、 P_{app} 与吸收百分率较DE均有所提高。**结论** DECED能够明显改善DE在大鼠小肠内的吸收情况。

[关键词] 去甲氧基姜黄素;去甲氧基姜黄素羟丙基-β-环糊精;肠吸收;紫外分光光度法

[中图分类号] R 965.3

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)02-0247-04

Intestinal absorption characteristics of demethoxycurcumin hydroxypropyl-β-cyclodextrin in rats

LUO Jian-chun, HE Dan, YANG Mei, WU Jian-yong, ZHANG Jing-qing*

Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To study the intestinal absorption characteristics of demethoxycurcumin hydroxypropyl-β-cyclodextrin (DECED) and demethoxycurcumin (DE) in rats. **Methods** DECED was prepared by cyclodextrin inclusion technique and characterized by spectroscopic method. The morphology of DECED was observed by microphotograph and zeta potential was examined by Malvern laser particle sizer. *In vivo* single-pass intestinal perfusion rat model was adopted; the absorption rate constant (K_a), effective permeability (P_{app}) and percent absorption of DECED and DE were determined using the ultraviolet spectrophotometry. **Results** DECED was successfully prepared, with a solubility of 2.30 g/L, which was 38.33 times that of DE. Zeta potential of DECED was -32.2 mV. The results of intestinal absorption experiment showed that the K_a and P_{app} values of DECED decreased in order in the ileum, duodenum, jejunum, and colon. In addition, the K_a , P_{app} values and percent absorption of DECED were higher than that of DE. **Conclusion** DECED can markedly improve the intestinal absorption of DE in rats.

[Key words] demethoxycurcumin; demethoxycurcumin hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion; intestinal absorption; ultraviolet spectrophotometry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(2):247-250]

总姜黄素主要来源于天然中药姜黄,为黄色酚类物质,具有广泛的药理作用,如抑菌、抗病毒、抗氧化、抗癌、抗艾滋病毒等^[1-2]。传统中药及印度还有将总姜黄素用于治疗糖尿病的记载^[3]。总姜黄素能抑制肺癌、胆囊乳头状腺癌、直肠癌等肿瘤细胞的增殖并促进肿瘤细胞的凋亡^[4]。但是由于总姜黄素具有的酚类结构使其在碱性条件下易降解,对光、热、强酸及强碱均呈现不稳定性^[5],并且总姜黄素水溶性极低,导致其药理活性受到限制^[6]。

总姜黄素主要包括姜黄素、去甲氧基姜黄素(demethoxycurcumin, DE)、二去甲氧基姜黄素,结构

式如图1所示。虽然姜黄素是总姜黄素的主要成分^[2,7],但研究表明DE也有广泛的药理作用,甚至某些活性明显高于姜黄素,显示了广泛的药用前景^[8]。本课题将以总姜黄素中分离出的DE单体作为考察对象,通过与羟丙基-β-环糊精(hydroxypropyl-β-cyclodextrin, HPCD)络合,制备成去甲氧基姜黄素羟丙基-β-环糊精包合物(demethoxycurcumin hydroxypropyl-β-cyclodextrin, DECED),采用紫外分光光度法测定了以DECED为模型药物在大鼠在体肠单向灌注实验中各肠段的吸收情况,为其临床研究提供理论基础和方法。

[收稿日期] 2015-04-21 **[接受日期]** 2015-07-12

[作者简介] 罗见春, 硕士生, E-mail: luojianchuner@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485161, E-mail: zjqrae01@163.com

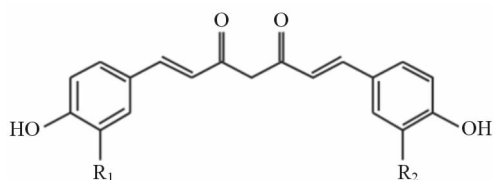


图1 总姜黄素中3种化合物的结构式

$R_1=R_2=OCH_3$, 姜黄素; $R_1=OCH_3, R_2=H$, 去甲氧基姜黄素;
 $R_1=R_2=H$, 二去甲氧基姜黄素

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 FA1004A 电子天平(上海精天电子仪器有限公司); DZF-6020 真空干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); KQ-2200B 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BCD-649WE 冰箱(青岛海尔股份有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司); HHS-4S 电子不锈钢恒温水浴锅(上海康路仪器有限公司); UV-7504 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); HL-1 恒流泵(上海青浦沪西仪器厂); 白金硫化硅胶管(兰格恒流泵有限公司); Zetasizer Nano 激光粒度仪(英国 Malvern 公司)。

DE (>99%, 自制); Lipoid S 75 (PC, 德国 Lipoid 公司); 羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 上海时代生物科技有限公司); 超纯水; Krebs-Ringer 缓冲液^[9](自配, 1 000 mL 内含氯化钠 7.80 g, 氯化钾 0.35 g, 氯化钙 0.37 g, 碳酸氢钠 1.37 g, 磷酸二氢钠 0.32 g, 氯化镁 20 mg, 葡萄糖 1.40 g, HCl 和 NaOH 调节 pH 为 6.5); 其余试剂为分析纯。

1.2 DE 检测波长及含量测定 取 DE 乙醇溶液、HPCD 乙醇溶液, 以无水乙醇为空白, 在 200~800 nm 范围内全波段扫描, 确定 DE 的检测波长。精密称取 DE 适量, 无水乙醇溶解后定容, 摇匀, 作为贮备液。精密吸取上述贮备液用 Krebs-Ringer 液稀释得 DE 质量浓度分别为 1.03、2.06、3.09、4.12、5.15、6.18 $\mu\text{g/mL}$ 的标准品溶液。以 Krebs-Ringer 液为空白, 在 420 nm 下测定其光密度(D)值, 以 D 值对浓度进行线性回归。

1.3 DECD 的制备 称取适量的 HPCD 后加入少量超纯水, 研磨均匀, 再缓慢加入一定量的 DE(DE 与 HPCD 的物质的量比为 1:1), 边加边研磨 1 h, 真空干燥 2 h, 研细即得 DECD^[8,10], 备用。

1.4 DECD 的理化性质测定 取适量 DE、HPCD、DECD 和 DE+HPCD 物理混合物, 分别进行红外光谱(IR)分析和差示扫描量热法(DSC)分析。IR 采集条件为室温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 扫描范围 4 000~400 cm^{-1} 。DSC 以 Al_2O_3 实验条件为参比, 温度为 $-20\sim 350^{\circ}\text{C}$, 升温速率为 10 K/min, 量程为 $-25\sim 25$ V, 气体为氮

气, 流速为 20 mL/min, 取样量为 3~5 mg。另称取过量 DECD 和 DE, 分别加入超纯水形成过饱和水溶液, (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 24 h 后取 1 mL 样品, 6 375 $\times g$ 离心 10 min, 取适量上清液, 无水乙醇稀释, 于 420 nm 处测定 D 值, 计算 DECD 和 DE 的溶解度。

1.5 DECD 的形态及 zeta 电位测定 取适量 DE、HPCD、DECD 和 DE+HPCD 物理混合物, 显微照相观察形态。另取 6 mg DECD, 加入无水乙醇少许, 后再加入 10 mL 0.5% 的 CMC-Na 溶液, 超声使 DECD 分散混匀, 配制成 DECD 质量浓度为 0.6 mg/mL 的混悬液。混悬液用蒸馏水稀释 10 倍后, 采用马尔文粒径测定仪测定 DECD 的 zeta 电位。同法测定 DE 的 zeta 电位。

1.6 大鼠在体肠吸收评价^[9] 清洁级健康雄性 SD 大鼠 12 只, 体质量(250 ± 20)g, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 许可证号: CQLA-2012-100。将 12 只 SD 大鼠随机分为 DECD 组和 DE 组($n=6$)。大鼠使用前未用过其他药物, 禁食不禁水 12 h, 3.5% 水合氯醛 10 mL/kg 腹腔注射麻醉并固定于实验台。沿腹中线打开腹腔, 在需要测定的肠段上端和下端分别剪开一个小口, 然后插管结扎稳固, 先用 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温的生理盐水将肠内容物冲洗干净, 排出生理盐水, 用空白 Krebs-Ringer 循环液循环 15 min, 流速 0.2 mL/min, 然后更换含药循环液(DECD 溶液或 DE 混悬液, 相当于含 DE 60 $\mu\text{g/mL}$), 以流速为 0.2 mL/min 进行灌注, 计时 1 h。四段出口处分别用 25 mL 容量瓶接流出液体。实验后取下容量瓶用 Krebs-Ringer 循环液稀释至刻度。剪下肠段, 测量其长度(l)和内径(r)。根据下列公式计算其结果:

$$K_a = (X_0 - X_t) / C_0 t$$

$$P_{\text{app}} = Q \times \ln(X_{\text{in}} / X_{\text{out}}) / 2\pi r l$$

$$P(\%) = (X_0 - X_t) / X_0$$

式中: K_a 为吸收速率常数, P_{app} 为表观渗透系数, P 为吸收百分率, X_0 为药物的初始质量, X_t 为时间 t 时药物灌流液中剩余的药物的质量, C_0 表示药物初始浓度, t 为灌注时间, Q 为流速, X_{in} 和 X_{out} 分别表示流入和流出的药物量, l 和 r 分别为被灌流肠段的长度和横截面半径。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 组间比较采用 t 检验, 检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 DE 检测波长及含量测定结果 DE 的最大吸收波长为 420 nm, 且在 420 nm 波长处 HPCD 没有吸收, 故以 420 nm 为 DE 的检测波长。检测结果表

明,DE在1.03~6.18 μg/mL浓度范围内与D值呈良好的线性关系。以紫外分光光度法测定DE的含量,日内精密性及日间精密性良好,稳定性实验能满足测定需要,平均加样回收率为99.95%,RSD为0.18%(n=3),符合分析要求。

2.2 DECD的理化表征

2.2.1 IR分析

DE的特征吸收峰:1 624.52 cm⁻¹代表C=O的吸收峰,1 574.93 cm⁻¹和1 509.19 cm⁻¹、1 137.30 cm⁻¹及1 167.86 cm⁻¹代表-OH的吸收峰,1 281.60 cm⁻¹、1 235.23 cm⁻¹代表双键上氢的吸收峰。DECD在IR图谱中药物特征吸收峰1 261.70 cm⁻¹峰(代表双键上的氢)消失,而1 574.93 cm⁻¹和1 509.19 cm⁻¹吸收峰强度明显减弱,1 281.60、1 235.23 cm⁻¹、1 137.30 cm⁻¹及1 167.86 cm⁻¹吸收峰消失。DE的特征吸收峰1 624.52 cm⁻¹吸收强度明显减弱,表明DE被部分或全部包合进了HPCD的空穴中。而HPCD的特征吸收峰是1 653 cm⁻¹,DECD在1 653 cm⁻¹处有吸收峰。DE+HPCD物理混合物图谱中药物特征吸收峰1 574.93 cm⁻¹峰消失,1 509.19 cm⁻¹吸收峰减弱,但是DECD减弱程度明显强于物理混合物,表明DECD已形成(图2)。

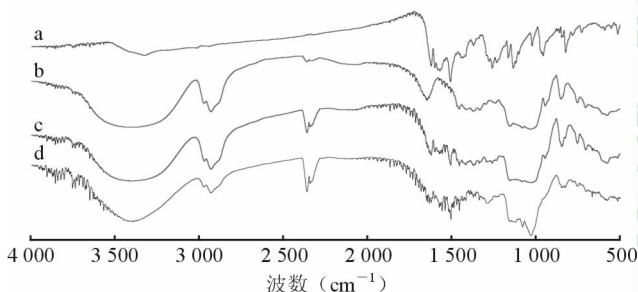


图2 DECD系列红外(IR)扫描结果图

a: DE; b: HPCD; c: DE+HPCD物理混合物; d: DECD. DE: 去甲氧基姜黄素; HPCD: 羟丙基-β-环糊精; DECD: 去甲氧基姜黄素羟丙基-β-环糊精

2.2.2 DSC分析

DE在30.3℃和174.8℃分别有一个吸热峰,为DE的熔融峰。HPCD在29.1℃有一个吸热峰。DE+HPCD物理混合物在30.4℃及172.9℃分别有一个吸热峰;而DECD在33.2℃有吸收峰,其在174.8℃没有吸收峰出现,表明成功制备了DECD(图3)。

2.2.3 溶解度

DECD的平均溶解度为2.30 g/L,是游离药物DE的38.33倍,结果表明将DE制备成DECD后,溶解度得到了很大的改善。

2.3 DECD的形态及zeta电位

DE在显微镜下为红棕色的块状物质,HPCD呈现为均匀的灰色球

状固体,DE+HPCD物理混合物为红棕色的块状物质和灰色球状固体的物理混合状态,而DECD呈现为深棕色的不规则状态,和DE、HPCD及DE+HPCD物理混合物的显微形态有明显区别,辅助说明DECD初步包合成功(图4)。采用马尔文粒径测定仪测得DECD的zeta电位为-32.2 mV,而DE的Zeta电位为-59.1 mV。

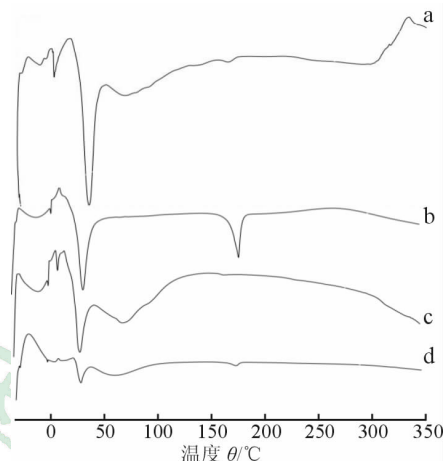


图3 DECD系列差示扫描量热法分析结果图

a: DECD; b: DE; c: HPCD; d: DE+HPCD物理混合物. DE: 去甲氧基姜黄素; DECD: 去甲氧基姜黄素羟丙基-β-环糊精; HPCD: 羟丙基-β-环糊精

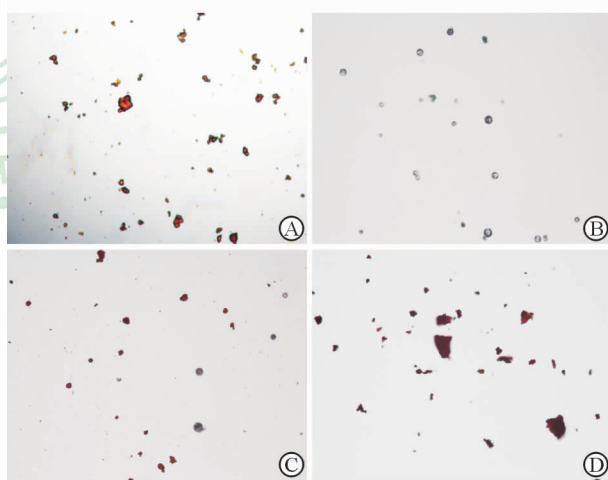


图4 DECD系列的显微形态

A: DE; B: HPCD; C: DE+HPCD物理混合物; D: DECD. DE: 去甲氧基姜黄素; HPCD: 羟丙基-β-环糊精; DECD: 去甲氧基姜黄素羟丙基-β-环糊精. Original magnification: ×200

2.4 DECD的大鼠在体肠吸收评价

各个肠段吸收情况如图5所示。DECD在各肠段的平均K_a为(176.76±72.20)×10⁻⁵ s⁻¹,是DE的180.88%;平均P_{app}为(19.28±7.46)×10⁻⁵ cm/s,较DE提高了171.97%;平均P为(46.49±5.29)%,是DE的158.96%,表明DECD能明显增加DE在大鼠各肠段的吸收,改善其在大鼠各肠段内的吸收动力学特征。

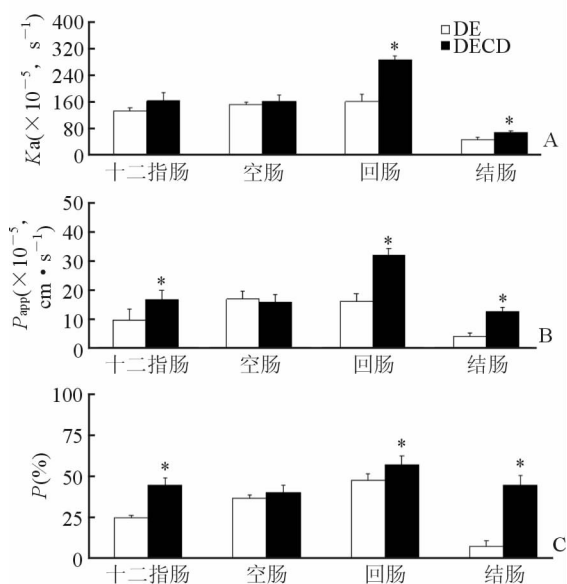


图5 DECD和DE在不同胃肠段的吸收情况

A: 吸收速率常数(Ka); B: 表观渗透系数(P_{app}); C: 吸收百分率(P)。DE: 去甲氧基姜黄素; DECD: 去甲氧基姜黄素羟丙基-β-环糊精。* P<0.05与DE比较。n=6, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

环糊精是由淀粉经酶解环合得到的6~8个葡萄糖分子以α-1,4苷键连接的环状低聚物,可在分子水平上包含各种活性成分并赋予新的理化特性,是目前最简单的包合材料^[10-11]。HPCD是β-环糊精类包合材料中应用最广泛的药用辅料^[10],相对β-环糊精和其他环糊精而言具有更好的生物相容性和水溶性,是被美国食品药品监督管理局(FDA)批准的可用于注射的药用辅料。有研究表明无论是难溶性的抗癌药还是非抗癌药,与HPCD络合形成包合物后,其水溶性、物理化学性质以及药代动力学/药效学性质都有明显改善^[10]。本研究通过环糊精包合技术将DE制备成DECD包合物,明显改善了DE的溶解度。DE在碱性环境不稳定易变质,故本研究在进行在体肠吸收实验过程中,选择pH 6.5的Krebs-Ringer液作为循环液,并且在前期实验中考察了DE和DECD在肠道灌流液中的稳定性,发现DE和DECD在37℃的肠道灌流液中能稳定放置180 min。

本研究将单体DE作为考察对象,成功制备得DECD,通过单向灌流法考察了DECD和DE在大鼠小肠内的吸收情况,结果表明DECD比DE具有更好的P值,并且Ka和P_{app}都有一定程度的改善,其中在回肠有显著性改善。根据P_{app}可将吸收性能分为3类:P_{app}<0.03×10⁻⁴ cm/s,吸收差;P_{app}>0.2×10⁻⁴

cm/s,吸收完全,介于两者之间的为中等吸收^[9],本实验结果表明DECD在大鼠肠段的吸收完全。

本研究通过紫外分光光度法测定DE含量及DECD在大鼠肠段的吸收情况,灵敏度高,操作简单,而制备的DECD在大鼠肠段的吸收良好,有望为DE新的制剂设计和临床合理用药提供参考。

[参考文献]

- [1] Lin C C, Lin H Y, Chi M H, Shen C M, Chen H W, Yang W J, et al. Preparation of curcumin microemulsions with food-grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the HepG2 cell line[J]. Food Chem, 2014, 154: 282-290.
- [2] 赵会娟,刘红星,黄初升,黄克立. 姜黄色素3种主要成分的分纯化研究进展[J]. 化工技术与开发, 2012, 41: 41-46.
- [3] Zhang D W, Fu M, Gao S H, Liu J L. Curcumin and diabetes; a systematic review [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 636053.
- [4] Zhang W, Bai W, Zhang W. MiR-21 suppresses the anticancer activities of curcumin by targeting PTEN gene in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. Clin Transl Oncol, 2014, 16: 708-713.
- [5] 张继芬,唐勤,莫婷,谢小芳,徐晓玉. 姜黄素磷脂载体的表征及肠吸收研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 47: 1736-1740.
- [6] Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha B P, Mukherjee P K. Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats [J]. Int J Pharm, 2007, 330: 155-163.
- [7] 李立,国大亮,朱晓薇,朱彩芳,何灵通. 姜黄素类物的提取分离及精制[J]. 天津中医药, 2010, 27: 509-511.
- [8] 农克良,韦良兴,慕光杉,农容丰,石郦. 姜黄色素的简易提取与柱色谱分离研究[J]. 化工技术与开发, 2006, 35: 3-5.
- [9] 钟萌,杨林,杨梅,胡雪原,张景劼. 单向灌流法研究阿奇霉素泡囊的大鼠在体肠吸收[J]. 第二军医大学学报, 2014, 4: 419-422.
- [10] ZHONG M, YANG L, YANG M, HU X Y, ZHANG J Q. Single-pass intestinal perfusion for studying intestinal absorption of azithromycin niosomes in rats [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 4: 419-422.
- [11] Tan Q, Wu J, Li Y, Mei H, Zhao C, Zhang J. A supermolecular curcumin for enhanced antiproliferative and proapoptotic activities: molecular characteristics, computer modeling and in vivo pharmacokinetics [J]. Nanotechnology, 2013, 24: 035102.
- [11] 宋玉英,于玲,李彦艳,付鑫. 羟丙基-β-环糊精在药剂学中的应用进展[J]. 医药导报, 2010, 29: 1314-1317.