

双去甲氧基姜黄素与姜黄素纳米乳 药代动力学的比较研究

陈 静¹, 杨 梅^{1,2}, 张景勍¹, 蒋心惠¹, 胡雪原^{*1}

(1. 重庆医科大学 药物高校工程研究中心,重庆 400016;2. 重庆市长寿区中医院,重庆 401220)

摘要: 制备并考察双去甲氧基姜黄素纳米乳和单体姜黄素纳米乳的药代动力学特征。雄性 SD 大鼠口服灌胃分别给予双去甲氧基姜黄素纳米乳和单体姜黄素纳米乳后,于大鼠眼底静脉丛取血,采用 HPLC 法测定血浆中单体双去甲氧基姜黄素和姜黄素的浓度,DAS 2.1.1 药动学软件计算药动学参数。得到双去甲氧基姜黄素纳米乳和单体姜黄素纳米乳主要药动学参数 $T_{\max}$ 为 1.50 h 和 1.00 h; $C_{\max}$ 为 (85.87 ± 2.53) 和 (85.60 ± 2.30) $\mu\text{g/L}$; $\text{AUC}_{0-72\text{ h}}$ 为 (788.23 ± 52.04) 和 $(1\ 345.50 \pm 64.88)$ $\mu\text{g/L} \cdot \text{h}$ 。表明姜黄素纳米乳的口服生物利用度比双去甲氧基姜黄素纳米乳更好。

关键词: 双去甲氧基姜黄素;姜黄素;纳米乳;药代动力学

中图分类号:TS 202.3 文献标志码:A 文章编号:1673-1689(2017)04-0420-05

Comparative Pharmacokinetic Study of BCNE and CCNE

CHEN Jing¹, YANG Mei^{1,2}, ZHANG Jingqing¹, JIANG Xinhui¹, HU Xueyuan^{*1}

(1. Medicine Engineering Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Chongqing Changshou Medicine Hospital, Chongqing 401220, China)

Abstract: Bisdemethoxycurcumin nanoemulsion (BCNE) and curcumin nanoemulsion (CCNE) were prepared and their pharmacokinetics was evaluated. Plasma samples were collected from the retinal venous plexus of SD rats after oral administration of BCNE and CCNE. The concentration of BC in plasma was determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters of BCNE and CCNE were calculated with DAS2.1.1 pharmacokinetic program. $T_{\max}$ of BCNE and CCNE were 1.50 h and 1.00 h, while $C_{\max}$ were 85.87 ± 2.53 $\mu\text{g/L}$ and 85.60 ± 2.29 $\mu\text{g/L}$. $\text{AUC}_{0-72\text{ h}}$ for BCNE and CCNE were 788.23 ± 52.04 $\mu\text{g/L} \cdot \text{h}$ and 1345.50 ± 64.88 $\mu\text{g/L} \cdot \text{h}$, respectively. The oral bioavailability of CCNE exhibited better performance than that of BCNE.

Keywords: bisdemethoxycurcumin, curcumin, nanoemulsion, pharmacokinetics

收稿日期: 2015-05-11

基金项目: 重庆市自然科学基金重点项目(CSCT2012JJB10027);重庆市教委科研项目(KJ120321)。

* 通信作者: 胡雪原(1971—),女,重庆人,副教授,硕士研究生导师,主要从事新药研究与开发。E-mail: xueyuanhu96@126.com

引用本文: 陈静,杨梅,张景勍,等. 双去甲氧基姜黄素与姜黄素纳米乳药代动力学的比较研究[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(04): 420-424.

姜黄素是从姜科植物姜黄的根茎中提取得到的一种天然的可食用黄色素,已成为国内外广泛使用的7个天然色素品种之一,是联合国粮农组织(FAO)专家委员会和世界卫生组织(WHO)批准的一种食品添加剂,广泛应用于食品加工领域^[1]。姜黄素具有广泛的药理作用,主要有抗癌^[2]、抗氧化^[3]、抗炎等活性。双去甲氧基姜黄素(bisdemethoxy-curcumin, BC)是姜黄素(curcumin, CC)的天然衍生物,与CC具有相同的母核结构,唯一的区别在于BC的两个甲氧基被取代^[4],两者具有多种相似的药理活性。相较于CC、去甲氧基姜黄素(demethoxycurcumin, DC),双去甲氧基姜黄素是对人类醛-酮还原酶1B10(AKR1B10)选择性最高、效力最强的竞争性抑制剂^[5],同时据报道,相较于姜黄素,双去甲氧基姜黄素能提高核细胞摄取和增加稳定性^[6],表明双去甲氧基姜黄素是一种有良好发展前景的抗癌药物,其水溶性差,生物利用度低^[7-8]。

纳米乳(nanoemulsion, NE)又称微乳,作为一种新型的药物载体,它具有以下优点:毒性小、安全性高、制备简单,可增大难溶于水药物的溶解性^[9-10],将BC和CC分别制成纳米乳以克服其水溶性差、生物利用度低的缺点。目前对单体BC和CC纳米乳制剂的文献报道甚少,因此作者将单体BC和CC分别制成纳米乳,并对两者的理化性质、体外释放行为、药代动力学特征进行对比研究,为临床药效学的深入研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与设备 Agilent 1100液相色谱仪:美国Agilent公司产品;Hypersil ODS色谱柱:大连依利特分析仪器有限公司产品;TGL-16G高速台式离心机:上海安亭科学仪器厂产品;分析电子天平:AB204-E,瑞士Mettler Toledo公司产品;漩涡混合器:QL-901,海门其林贝尔仪器公司产品;RE-52AA型旋转蒸发仪:上海亚荣生化仪器厂产品;激光粒度仪:英国Malvern公司产品;Milli-Q Biocel A-10超纯水制备系统:美国Millipore公司产品。

1.1.2 药品与试剂 双去甲氧基姜黄素(纯度>99%):实验室自制;姜黄素(纯度>99%):实验室自制;尼群地平(纯度99.5%):陕西师诺生物科技有限公司产品;油酸乙酯(AR):上海化学试剂二厂产品;

聚氧乙烯蓖麻油(AR):德国BASF公司产品;聚乙二醇(AR):天津精细化工有限公司产品;维生素E聚乙二醇琥珀酸酯(AR):成都艾科试剂化学技术有限公司产品;乙腈为色谱纯;乙醇、乙酸乙酯、冰醋酸等均为分析纯。

1.1.3 实验动物 雄性健康SD大鼠12只,体重(250±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号:CQLA(渝)2012-1003。

1.2 方法

1.2.1 BCNE和CCNE的制备 分别精密称取处方量的油酸乙酯、聚氧乙烯蓖麻油、聚乙二醇、维生素E聚乙二醇琥珀酸酯,于恒温40℃搅拌溶解后,加入BC 25 mg,待药物溶解后,将处方量的水缓慢滴加油相中并维持恒速搅拌,即制备得澄清透明淡黄色的BCNE。同法制备CCNE。

1.2.2 BCNE和CCNE的理化性质 采用马尔文粒径测定仪测定BCNE和CCNE的平均粒径和Zeta电位,并用葡聚糖凝胶法测定BCNE和CCNE的包封率。

1.2.3 BCNE,CCNE体外释放行为的考察 采用动态透析法考察BCNE,CCNE的体外释药行为,分别以含体积分数20%乙醇和质量分数0.5% SDS的pH1.2的HCl溶液(0.1 mol/mL)和pH6.8的磷酸盐缓冲液为释放介质,释放介质体积为100 mL,分别取BCNE和CCNE置于透析袋中,密闭置于恒温水浴振荡器中,在37℃下,以100 r/min的速度搅拌。分别于1、2、4、6、8、10、12、24、48、72、96、120、144、168 h取出1 mL释放介质,同时补充等温等体积的释放介质。测定所取样品的BC和CC质量分数。

1.2.4 血浆样品的采集 取健康雄性SD大鼠12只,体重(250±20)g,随机分为两组,每组6只,分别灌胃给予BCNE和CCNE混悬液(相当于给药量BC与CC 50 mg/kg)。给药前禁食12 h,自由饮水。分别在给药后5、10、15、30、45 min,1 h,1.5 h等时间点于大鼠眼底静脉丛取血,肝素化后6 000 g离心10 min,吸取上清液,置于-20℃冰箱冷藏保存备用。

1.2.5 色谱条件^[11] BC色谱条件:Hypersil ODS色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:V(乙腈):V(体积分数5%冰醋酸溶液)=45:55,流量:1 mL/min,柱温:30℃,测定波长:417 nm,内标:尼群地平,进样量:20 μL。

CC 色谱条件: Hypersil ODS 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: V(乙腈):V(体积分数 5% 冰醋酸溶液)=45:55, 流量: 1 mL/min, 柱温: 30 °C, 测定波长: 426 nm, 内标: 尼群地平, 进样量: 20 μL。

1.2.6 血浆样品预处理 取血浆样品 200 μL 于 2 mL 离心管, 加入内标尼群地平工作液 100 μL, 再加入乙酸乙酯 1.0 mL, 漩涡 2 min 后, 12 000 g 离心 10 min, 转移上层有机相于另一离心管中, 用氮气吹干仪吹干。最后用 100 μL 流动相复溶, 取复溶液 20 μL 进样检测。

1.2.7 方法学考察

1) 方法专属性 在此样品处理方法和色谱条件下, 测定空白血浆、空白血浆+对照品+内标、血浆样品, 考察方法专属性。

2) 标准曲线的建立 分别精密称取 BC 10.0 mg、CC 10.0 mg、内标尼群地平 (NT) 5.0 mg, 用少量甲醇溶解后, 转移移至 100 mL 棕色容量瓶中定容, 摇匀即得 BC 工作溶液 100 μg/mL、CC 工作溶液 100 μg/mL、尼群地平内标工作液 100 μg/mL, 于 4 °C 冰箱保存。临用时吸取 BC、CC 工作溶液适量用甲醇稀释成质量浓度为 0.5 μg/mL 对照品溶液。

取 200 μL 空白血浆于 2 mL 离心管中, 加入适量 BC (500 ng/mL) 对照品溶液, 再加入 100 μL 尼群地平工作液, 制备 BC 质量浓度为 15, 70, 105, 140, 175, 210, 245 ng/mL 的标准系血浆样品。按照“1.2.6”项下处理后进样分析, 得 BC 的标准曲线。同法操作得到 CC 的标准曲线。

3) 精密度实验 取 200 μL 空白血浆, 分别精密加入 BC 或 CC 对照溶液使其配成 70、140、210 ng/mL 的低、中、高 3 种质量浓度的标准血浆样品各 5 份, 按“1.2.6”项下样品预处理方法, 在“1.2.5”项色谱条件下, 于一日内各测定 5 次, 计算 3 种浓度的日内精密度; 同一条件下每日测定一次, 连续测定 5 天, 计算 3 种浓度的日间精密度。

4) 回收率实验: 取 200 μL 空白血浆, 分别精密加 BC 或 CC 对照溶液配制质量浓度为 70、140、210 ng/mL 的标准血浆样品各 3 份, 按“1.2.6”项下处理后进样分析。按标准曲线计算血浆中 BC 或 CC 的质量浓度, 以测定浓度与实际浓度的比求平均回收率。

1.2.8 数据处理方法 采用 DAS2.1.1 软件对 CCNE 和 BCNE 血药浓度-时间曲线进行非室模型 (统计矩) 拟合, 得到药代动力学参数。其中 C_{max} 为给

药后的最大血药浓度, T_{max} 为给药后血药浓度达峰时间, MRT 为体内平均滞留时间, CL 为清除率, 血药浓度-时间曲线下面积 $AUC_{(0-t)}$ 由梯形法计算得到。

2 结果与分析

2.1 BCNE、CCNE 粒径、Zeta 电、包封率测定结果

通过马尔文粒径测定仪测定 BCNE 和 CCNE 的平均粒径、Zeta 电位、包封率分别为 35.2 nm 和 32.37 nm, -2.39 mV 和 -6.0 mV, 91.39% 和 91.25%。

2.2 BCNE、CCNE 体外释放行为结果

由图 1 可知, BCNE 与 CCNE 有相似的体外释放曲线。

相似因子 f_2 由 Moore 和 Flanner 首先提出^[12], 被 FDA 推荐为比较两条溶出曲线相似性的首选方法^[13], 其数学表达式为:

$$f_2 = 50 \lg \left\{ \left(1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n W_i (\bar{X}_i - \bar{X}_n)^2 \right)^{-1/2} \times 100 \right\}$$

式中 f_2 为相似因子; $\bar{X}_i$ 为 t 时间参比制剂的累积释放百分率; $\bar{X}_n$ 为 t 时间时受试制剂累积释放百分率; n 为有效取样点个数, 为权重, 作者设为 1。当 f_2 值介于 0~50 之间时, 即可认为两条曲线有显著性差异; 介于 50~100 之间时, 即说明两条曲线为无显著性差异; f_2 值越接近 100, 相似程度也就越高。将实验得到的释放曲线使用上述公式进行两两拟合, 计算得到相似因子 f_2 , 结果见表 1。在不同 pH 时, BCNE 与 CCNE 释放曲线之间的相似因子均大于 50, 说明 BCNE 与 CCNE 体外释放曲线无显著性差别。

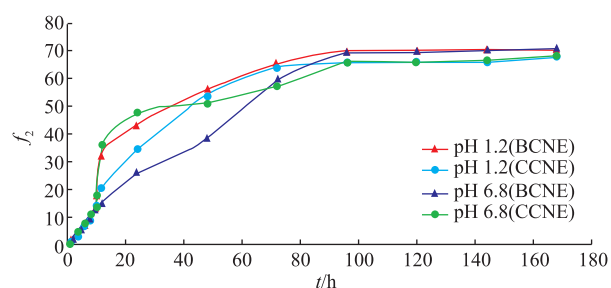


图 1 BCNE 和 CCNE 在释放介质为 pH 1.2 及 pH 6.8 时的体外释放行为

Fig. 1 Release of BCNE and CCNE in release medium of pH 1.2 and pH 6.8

表 1 BCNE 和 CCNE 释药曲线拟合方程

Table 1 Release patterns of sustained release BCNE and CCNE

释放曲线 1		释放曲线 2		f_2
制剂	释放介质	制剂	释放介质	
BCNE	pH 1.2 HCl solution	CCNE	pH 1.2 HCl solution	66.52
BCNE	pH 6.8 PBS	CCNE	pH 6.8 PBS	51.76
BCNE	pH 1.2 HCl solution	BCNE	pH 6.8 PBS	53.62
CCNE	pH 1.2 HCl solution	CCNE	pH 6.8 PBS	61.47

2.3 方法学考察

2.3.1 方法专属性 在此样品处理方法和色谱条件下,分别测定空白血浆、空白血浆+对照品+内标、血浆样品,测定得到 CC 和内标 NT 的保留时间分别为 9.35 min 和 11.84 min,BC 和内标 NT 的保留时间分别为 5.51 min 和 9.24 min,CC 和内标 NT 与 BC 和内标 NT 具有良好的分离效果,血浆中的内源性物质在 CC、BC、NT 的出峰位置无干扰。

2.3.2 标准曲线的建立 以 BC 与尼群地平的峰面积比(Y)对 BC 浓度(C)线性回归,得回归方程为: $Y=0.012\ 8X+0.211$ ($r=0.999\ 6$)。同理可得 CC 的线性回归方程为: $Y=0.022\ 5X+0.006\ 2$ ($r=0.999\ 8$)。BC 和 CC 质量浓度在 15~245 ng/mL 范围内与峰面积的线性关系良好。

2.3.3 精密度实验 测定得到 CC 的日内精密度的 RSD 分别为 1.73%,1.51%,1.42%($n=5$),BC 的日内精密度的 RSD 分别为 2.14%,1.86%,1.28%($n=5$);CC 的日间精密度的 RSD 分别为 2.46%,1.95%,1.76%($n=5$),BC 的日间精密度的 RSD 分别为 1.97%,2.26%,1.64%($n=5$)。符合生物样品分析方法

的测定要求。

2.3.4 回收率实验 测定得到 CC 的平均回收率分别为:99.37%、99.75%和 99.84%,BC 的平均回收率分别为:99.22%、99.75%和 99.84%,表明本方法回收率符合含量测定方法要求。

2.4 血药浓度和药动学参数

分别以 BC 和 CC 的血药浓度为纵坐标,时间 t 为横坐标作图,得到血药浓度-时间曲线,大鼠灌服 BCNE 和 CCNE 的平均血药浓度-时间曲线见图 2。药动学数据采用 DAS2.1.1 软件对所得实验数据进行非房室模型(统计矩)拟合,BCNE 和 CCNE 主要药动学参数见表 2。由表 2 可知,CCNE 与 BCNE 的 $AUC_{0-72\ h}$ 分别为 (1345.50 ± 64.88) 和 (788.23 ± 52.04) $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$,CCNE 的 $AUC_{0-72\ h}$ 是 BCNE 的 1.71 倍;CCNE 与 BCNE 的 $T_{\max}$ 分别为 1.00 h 和 1.50 h,CCNE 的 $T_{\max}$ 是 BCNE 的 0.67 倍;两者的 $C_{\max}$ 分别为 (85.60 ± 2.29) 和 (85.87 ± 2.53) $\mu\text{g/L}$,经 t 检验无统计学差异。

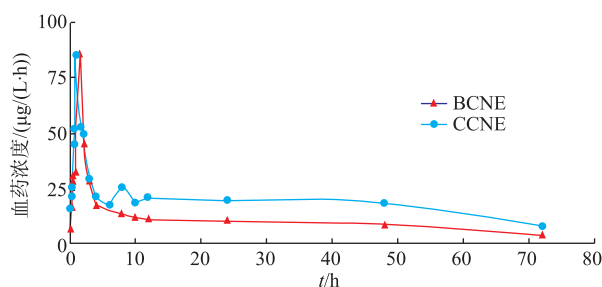


图 2 大鼠灌胃 BCNE 和 CCNE 后的血药浓度曲线($n=6$)
Fig. 2 Mean plasma concentration-time profiles of BCNE and CCNE after oral administration in rats($n=6$)

表 2 SD 大鼠口服 BCNE 和 CCNE 混悬液的主要药动学参数

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of SD rats after oral administration of BCNE and CCNE suspensions

类别	$C_{\max}/(\mu\text{g/L})$	$T_{\max}/\text{h}$	$AUC_{0-72\ \text{h}}/(\mu\text{g/L}\cdot\text{h})$	$MRT_{0-72\ \text{h}}/\text{h}$	$CL/(\text{L}/(\text{h}\cdot\text{kg}))$
BCNE	85.87 ± 2.53	1.50 ± 0.00	788.23 ± 52.04	25.89 ± 1.12	49.26 ± 1.49
CCNE	85.60 ± 2.29	1.00 ± 0.00	1345.50 ± 64.88	29.43 ± 0.33	19.10 ± 12.02

3 结 语

姜黄色素在水中的溶解度低,血浆半衰期很短,口服不易吸收,生物利用度低,张立康经实验证实了口服姜黄素生物利用度低^[14]。针对药物的难溶性,有相关文献报:Francis 等将 BC 模拟纳米粒增加其抗癌和抗氧化活性^[15];朱光宇将 BC 制备成滴丸

提高其生物利用度^[16];尤佳等将 CC 制备成循环脂质体延长其在体内的作用时间^[17]。作者将 BC 和 CC 制备成纳米乳,提高药物的口服吸收率及生物利用度。

药动学结果表明,CCNE 的 $T_{\max}$ 、 $MRT_{0-72\ \text{h}}$ 、 CL 分别是 BCNE 的 0.67 倍、1.14 倍、0.39 倍,说明 CCNE 较 BCNE 的达峰时间短,体内吸收快,清除率低,药

物在体内循环的时间更长。CCNE 的 AUC_{0-72h} 分别是 BCNE 的 1.71 倍,表明 CCNE 较 BCNE 有更高的生物利用度,而较钟荣玲课题组按 300 mg/kg 灌胃给予姜黄素纳米乳混悬剂的 AUC_{0-4} ($5\ 050.26 \pm 3\ 290.9$) $\mu\text{g/L} \cdot \text{h}$ 有较大的提高^[18],可能是单体姜黄素

较总姜黄素有更高的生物利用度,具体机制还有待进一步考察。将 BC 和 CC 制备成纳米乳,CCNE 较 BCNE 的体内吸收快,清除率低,药物在体内作用的时间更长,生物利用度更高。

参考文献:

- [1] WANG Tian,ZHANG Jingfe. Curcumin:bioavailability,antioxidant fuction and application in broiler chickens production[J]. **Chinese Journal of Animal Nutritio**,2014,26(10):3101-3107.(in Chinese)
- [2] JIA Shujie,LIU Qinghuan,WANG Wentong,et,al. Preparation of curcumin,demethoxycurcumin,and bisdemethoxycurcuminreference substances and preliminary study on curcumin cytotoxicity[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**,2012,43(6):1118-1121.(in Chinese)
- [3] SOMPARN P,PHISALAPHONG C,NAKORNCHAI S,et,al. Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives[J]. **Biol Pharm Bull**,2007,30(1):74-78.
- [4] YAO Yin,HUANG Yanfen. Effect of B Isdemethoxycurcumin on Caspase-3 of HepG2 in vitro [J]. **Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine**,2014,32(3):493-495.(in Chinese)
- [5] MATSUNAGA T,ENDO S,SODA M,et al. Potent and selective inhibition of the tumor marker AKR1B10 by bisdemethoxycurcumin:Probing the active site of the enzyme with molecular modeling and site-directed mutagenesis [J]. **Biochem Biophys Res Commun**,2009,389(1):128-132.
- [6] BASILE V,FERRARI E,LAZZARI S,et al. Curcumin derivatives;molecular basis of their anti-cancer activity [J]. **Biochem Pharmacol**,2009,78(10):1305-1315.
- [7] ZHAO Y Z,LU C T,ZHANG Y,et,al. Selection of high efficient transdermal lipid vesicle for curcumin skin delivery [J]. **Int J Pharm**,2013,454(1):302-309.
- [8] MADHAVI M,MADHAVI K,JITHAN AV. Preparation and in vitro/in vivo characterization of curcumin microspheres intended to treat colon cancer[J]. **J Pharm Bioallied Sci**, 2012,4(2):164-171.
- [9] LI Y,ZHENG J,XIAO H,et,al. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds:Influence of formulationparameters on Polymethoxyflavone crystallization[J]. **Food Hydrocoll**, 2012,27(2):517-528.
- [10] 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)
- [11] LI Yi,YANG Lin,ZHAO Chunjing,et,al. Pharmacokinetic behavior of a curcumin inclusion [J]. **Chinese Traditional Patent Medicine**,2013,35(12):2631-2634.(in Chinese)
- [12] JEFFREY W,MOORE H H,FLANNER. Mathematical comparison of dissolution profiles[J]. **Pharm Tech**,1996,5(6):64.
- [13] XIE Mufeng. Evaluation methods of comparability of dissolution curve [J]. **Chinese Journal of Pharmaceuticals**,2009,40(4):308-311.(in Chinese)
- [14] ZHANG Likang,WANG Xiaozhen,LI Wanshu,et al. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of curcumin in rats [J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**,2011,27(10):1458-1462.(in Chinese)
- [15] FRANCIS A P,MURTHY P B,DEVAS T. Bis-demethoxy curcumin analog nanoparticles:synthesis,characterization,and anticancer activity in vitro[J]. **J Nanosci Nanotechnol**,2014,14(7):4865-4873.
- [16] ZHU Guangyu. Preparation of dripping pills of bisdemethoxycurcumin and the determination of in vitro dissolution [J]. **Anhui Medical and Pharmaceutical Journal**,2012,16(11):1587-1589.(in Chinese)
- [17] YOU Jia,DAI Dongbo,HE Wenjie,et,al. Preparation of curcumin-loaded long-circulating liposomes and its pharmacokinetics in rats[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**,2012,16(11):1587-1589.(in Chinese)
- [18] ZHONG Rongling,XIA Zhi,WU Jie,et al. In vivo pharmacokinetics investigation of curcumin nanosuspensions in rats [J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**,2013,19(20):137-139.(in Chinese)