·论　著·

双烟酸姜黄素酯纳米粒与双烟酸姜黄素酯体内转运动力学特性研究

陈光宇[1,2,3]，何群[1,4]，廖扬振[1]，庹勤慧[1]，夏伯候[1]，廖端芳[1,4*](1.湖南中医药大学，长沙 410208；2.湖南省药食同源功能性食品工程技术研究中心，长沙 410208；3.湖南中医药大学中医诊断研究所，长沙 410208；4.湖南省药学“十二五”重点学科，长沙 410208)

摘要：目的　提高双烟酸姜黄素酯的生物利用度，考察双烟酸姜黄素酯是否代谢为姜黄素。**方法**　以新西兰家兔为试验对象，采用口服给予双烟酸姜黄素酯纳米粒与双烟酸姜黄素酯原料药后，在不同时间点采血，HPLC 测定血中双烟酸姜黄素酯、姜黄素等成分含量，计算体内药物转运动力学参数 AUC，比较两者的差别。**结果**　采用统计矩法中的零阶矩法计算 AUC，原料药的 AUC 平均值为(354.835±8.660)μg·L^{-1}·h，而纳米粒的 AUC 平均值为(883.335±16.37) μg·L^{-1}·h。纳米粒的 AUC 是原料药 AUC 的 2.486 倍。可知纳米粒与原料药相比显著提高了生物利用度；血中未检测到姜黄素。**结论**　双烟酸姜黄素酯制成纳米粒可显著提高双烟酸姜黄素酯的生物利用度；双烟酸姜黄素酯在体内没有代谢为姜黄素。

关键词：双烟酸姜黄素酯纳米粒；双烟酸姜黄素酯；姜黄素；生物利用度；纳米粒

中图分类号：R969.1　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2019)02-0133-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.001

引用本文：陈光宇, 何群, 廖扬振, 等. 双烟酸姜黄素酯纳米粒与双烟酸姜黄素酯体内转运动力学特性研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 133-137.

Study on the Transport Kinetics Character *in Vivo* of Double Nicotinate-curcumin Ester Nanoparticles and Nicotinate-curcumin Ester

CHEN Guangyu[1,2,3], HE Qun[1,4], LIAO Yangzhen[1], TUO Qinhui[1], XIA Bohou[1], LIAO Duanfang[1,4*](*1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2.Engineering Center of Medicinal and Edible Functional Food, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 3.Institute of TCM Diagnostics, Changsha 410208, China; 4.Hunan Province Pharmacy “Twelve Five” Key Disciplines, Changsha 410208, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE　To evaluate bioavailability and whether dual nicotinate-curcumin ester is metabolized to curcumin of this nanoparticles in comparison with dual nicotinate-curcumin ester. **METHODS**　New Zealand rabbits were selected as experiment object, blood samples were collected at different intervals after the dual nicotinate-curcumin ester nanoparticles and dual nicotinate-curcumin ester crude drug was given. The content of dual nicotinate-curcumin ester, curcumin in the blood were detected by HPLC. The AUC of transport kinetics character *in vivo* was calculated. The difference between nanoparticles and crude drug was compared. **RESULTS**　The AUC was calculated by zeroth moment in the rosenblueth method, the AUC average value of crude drug was (354.835±8.660)μg·L^{-1}·h while the nanoparticles was (883.335±16.37) μg·L^{-1}·h. The value of nanoparticles was 2.486 times of crude drug. It was obvious that bioavailability could be improved by nanoparticles compared to crude drug. Curcumin in the blood were not detected. **CONCLUSION**　The bioavailability of dual nicotinate-curcumin ester crude drug can be improved by made into nanoparticles. Dual nicotinate-curcumin ester is not metabolized to curcumin *in vivo*.

KEYWORDS: dual nicotinate-curcumin ester nanoparticles; nicotinate-curcumin ester; HPLC; curcumin; bioavailability; nanoparticles

双烟酸姜黄素酯由姜黄素和烟酸合成而得，是一种新型调脂抗炎的化合物，既发挥姜黄素的抗炎、抗氧化、降血脂的作用，又发挥烟酸增加高密度脂蛋白胆固醇浓度(HDL)，改善相关内皮功能的作用[1-6]，且避免了姜黄素在体内活性偏低、吸收少、代谢过快和生物利用度低等缺点。但双烟酸姜黄素酯溶解度低，肝靶向性差，故本课题组将其制成双烟酸姜黄素酯纳米粒以提高生物利用度。目前国内外未见有对双烟酸姜黄素酯纳米粒兔体内转运特性的研究报道[7-10]，本研究采用家

基金项目：国家自然科学基金项目(81673722)；湖南省教育厅科学研究项目(16A156)

作者简介：陈光宇，男，硕士　Tel: 15873195094　E-mail: chengguangyu58@126.com　***通信作者：**廖端芳，男，博士，教授　Tel: (0731)88458000　E-mail: dfliao@hnctcm.edu.cn

兔为研究对象，研究双烟酸姜黄素酯原料药和纳米粒的体内转运动力学特性，从而比较两者的生物利用度差异，以评价双烟酸姜黄素酯纳米粒是否达到提高生物利用度的研究目标。

1 仪器与材料

1.1 试药

双烟酸姜黄素酯对照品(由湖南中医药大学药学基础实验教学中心合成并按照新药开发对照品研究技术指导原则研制而成，批号分别为20151103，20151217，20160109，纯度分别为99.00%，99.02%，99.01%，符合相关规定)；双烟酸姜黄素酯(批号：20160326；纯度：96%)、姜黄素(批号：20160315，纯度：98.8%)均由湖南中医药大学基础实验教学中心提供；双烟酸姜黄素酯纳米粒(自制)；重蒸馏水(自制)；硬脂酸(药用，湖南尔康制药有限公司)；吐温-80(药用，天津市科密欧化学试剂有限公司，批号：20140426)；卵磷脂(药用，国药集团化学试剂有限公司，批号：20130321)；二氯甲烷溶剂(分析纯，天津市彪仕奇科技发展有限公司，批号：Dich 200406280305)；冰醋酸(色谱纯，天津市光复精细化工艺研究所)；乙腈(色谱纯，Sigma 公司)；氯仿(色谱纯，天津市光复精细化工艺研究所)。

1.2 仪器

液相色谱系统：Agilent Technologies 1260 Infinity 双高压溶剂泵，在线真空脱气机，带恒温单元的自动进样器，内置柱切换阀的柱温箱，光二极管阵列检测器(美国 Agilent)；RE-52AA 旋转蒸发仪(上海雅荣生化仪器设备有限公司)；BC-50/H 容声冰箱(海信容声冰箱有限公司)；AR124CN 电子天平(精度：0.01 mg；奥豪斯仪器有限公司)；SB-5200 DTD 超声波清洗机(宁波新芝生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 双烟酸姜黄素酯体内分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Welch ultimate×B-C_{18} (250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相为乙腈-0.5%酸水(65∶35)；流速 1.0 mL·min^{-1}；检测波长：280 nm；柱温：30 ℃。

2.1.2 对照品贮备液的制备 取双烟酸姜黄素酯对照品约 0.010 4 g，精密称定，加 2 mL 氯仿溶解，再加入乙腈定容至 100 mL，即得 0.104 mg·mL^{-1} 的对照品储备液，过 0.45 μm 的微孔滤膜后置于进样小瓶中，备用。

2.1.3 配制双烟酸姜黄素酯血浆标准溶液 精密称取双烟酸姜黄素酯 0.010 5 g，加蒸馏水研磨称混悬液，转移至 10 mL 量瓶中，加蒸馏水定容至刻度，即得 1.05 mg·mL^{-1}的对照品混悬液，加入空白血浆和蒸馏水分别配制成 0.084，0.42，2.1，10.5，52.5，131.2，262.5，525 μg·mL^{-1} 8 个不同浓度的样品。

2.1.4 双烟酸姜黄素酯纳米粒样品的制备 采用薄膜-超声法制备双烟酸姜黄素固体脂质纳米粒。精密称取一定量双烟酸姜黄素酯溶于适量的二氯甲烷中，超声使之溶解；再称取一定量的硬脂酸和卵磷脂溶于一定量的二氯甲烷中，与前者混匀，转移至 40 ℃恒温水浴中以 40 r·min^{-1}的转速旋转蒸发除去有机溶剂，则瓶壁可形成均匀的薄膜，加入一定量的吐温-80，超声 40 min 可得双烟酸姜黄素酯固体脂质纳米粒混悬体系，冷藏保存备用(约 2 ℃)。

2.1.5 供试品溶液的制备 精密移取 100 mL 正辛醇置于 250 mL 具塞锥形瓶中，加水 100 mL，放入磁力搅拌器中，搅拌 24 h，制成正辛醇水饱和溶液，静置，备用。取过量双烟酸姜黄素酯于 25 mL 量瓶中，加入适量正辛醇水饱和溶液超声溶解，定容至刻度，离心，制成供试品储备液备用。

2.1.6 标准曲线的绘制 精密吸取“2.1.3”项下 8 个不同浓度的双烟酸姜黄素酯对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪，测定后以峰面积积分值为纵坐标(Y)，双烟酸姜黄素酯浓度(μg·mL^{-1})为横坐标(X)绘制标准曲线，结果回归方程为 Y=50.377+2.138 3X，r=0.997，结果表明，双烟酸姜黄素酯在 0.084~525 μg·mL^{-1}内线性关系良好。

2.1.7 方法专属性考察 分别精密吸取对照品储备液、血浆标准溶液样品、空白血浆样品溶液、以及纳米粒及原料药供试品溶液 20 μL，注入高效液相色谱仪，按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积积分值，色谱图见图 1。由图 1 可知，双烟酸姜黄素酯的保留时间约为 13 min，且在此色谱条件下峰形良好。阴性供试品溶液对试验无干扰，因此该方法专属性好，可用于双烟酸姜黄素酯纳米粒及其原料血浆样品的含量测定。

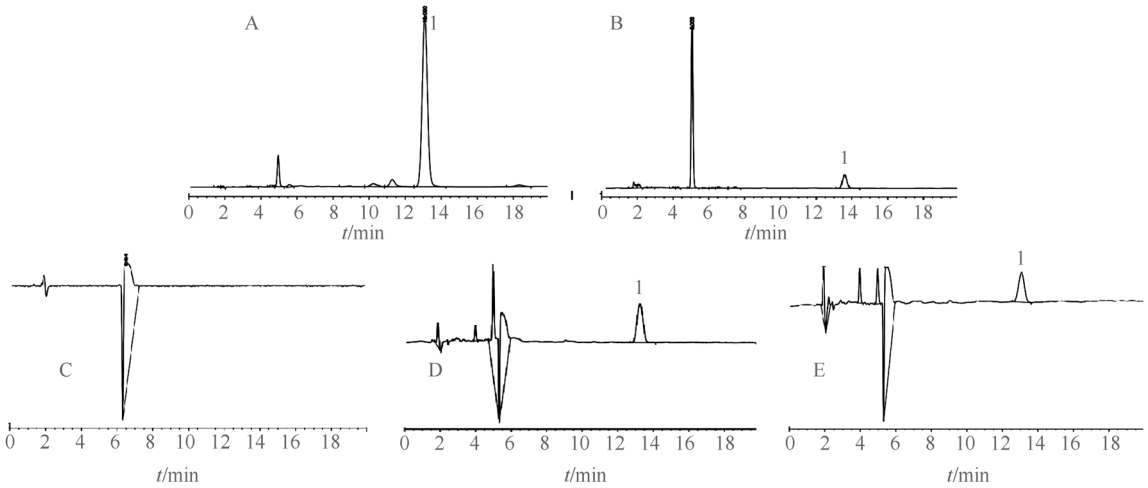

图 1 高效液相色谱图

A–双烟酸姜黄素酯对照品；B–标准血浆样品溶液；C–空白血浆；D–双烟酸姜黄素酯纳米粒组样品；E–双烟酸姜黄素酯原料药组样品；1–双烟酸姜黄素酯。

Fig. 1 High performance liquid chromatography

A–reference substance of dual nicotinate-curcumin ester; B–reference substance of plasma sample; C–blank of plasma sample; D–nanoparticles of dual nicotinate-curcumin ester; 1–dual nicotinate–curcumin ester; E–crude drug of dual nicotinate-curcumin ester; 1–dual nicotinate curcumin ester.

2.1.8 检测限及定量限浓度 取 0.084 μg·mL^{-1}双烟酸姜黄素酯血浆标准溶液，按倍数稀释成 0.04，0.02 μg·mL^{-1}，按 20，10，5 μL 依次进样，测得双烟酸姜黄素酯检测限为 0.025 21 μg·mL^{-1}，定量限为 0.084 μg·mL^{-1}。

2.1.9 仪器精密度考察 分别取 0.02，0.084，10.5，262.5 μg·mL^{-1}的双烟酸姜黄素酯血浆标准溶液，按“2.1.1”项下条件进样测定，各浓度血浆标准溶液的 RSD(n=6)分别为 6.63%，4.75%，3.60%，5.87%，均<10%，表明该仪器精密度良好。

2.1.10 稳定性试验 取 10.5 μg·mL^{-1}的双烟酸姜黄素酯血浆标准溶液和供试品溶液，按“2.1.1”项下条件进样测定，于 0，6，8，12，24，48 h 分别进样计算双烟酸姜黄素酯峰面积积分值的 RSD 分别为 2.72%和 2.89%，表明血浆标准溶液在 48 h 内稳定。

2.1.11 相对回收率试验 分别取 0.02，0.084，10.5，262.5 μg·mL^{-1}的双烟酸姜黄素酯血浆标准溶液，按“2.1.1”项下条件进样测量，每个浓度测定 6 次，带入标准方程计算测定值，计算测定值与真实值的比值为相对回收率。结果 0.02，0.084，10.5，262.5 μg·mL^{-1}的双烟酸姜黄素酯血浆标准溶液的相对回收率分别为 91.95%，100.3%，92.07%，110.2%，表明该方法回收率良好。

2.2 双烟酸姜黄素酯原料药及纳米粒在家兔体内经时血药浓度的比较研究

2.2.1 给药方案与血样采集 将体质量(2.7±0.2)kg 的 6 只家兔于试验前 1 d 晚上 8:00 开始禁食不禁水，试验当日早晨 8:00 给药。随机分成 2 组。将双烟酸姜黄素酯原料药用 0.5% CMC-Na 配制成浓度为 40 mg·mL^{-1} 的双烟酸姜黄素酯 CMC-Na 混悬液，在 0 时刻起灌胃 45 mL 作为对照组；烟酸姜黄素酯纳米粒混悬液作为实验组，浓度为 25 mg·mL^{-1}，在 0 时刻起灌胃 65 mL。2 组分别在 0.25，0.5，0.75，1.0，1.25，1.5，1.75，2.0，2.5，3.0，4.0，5.0，6.0 h 时间点采血。

2.2.2 血浆样品的处理 按照采血时间每次采血 3 mL 至真空采血管中，4 000 r·min^{-1}离心 15 min。取上层血浆 0.8 mL，用氯仿萃取 3 次，每次 1 mL，合并氯仿液至蒸发皿中，在通风橱中自然挥干，残渣用 2 mL 3∶22 氯仿-乙腈混合溶液分 6 次溶解，用 0.45 μm 滤膜过滤至进样小瓶中。取 0 时刻按上述方法处理做空白血浆样品，按“2.1.1”项下条件进样。

2.2.3 家兔体内双烟酸姜黄素酯血药浓度的测定结果 将双烟酸姜黄素酯原料药及其纳米粒在家兔体内换算成相同的单位质量浓度后，以时间为横坐标，以血药浓度平均值为纵坐标绘图，见图 2~3。

2.2.4 双烟酸姜黄素酯的原料药和纳米粒药时曲线分析及数据处理 从双烟酸姜黄素酯的原料药和纳米粒的药时曲线图可知，在消除项血药浓度再次上升形成第 2 个血药浓度峰，表明双烟酸姜黄素酯在体内存在肠肝循环。由于取点数总计为 14 个点，若按房室模型处理数据，则无法建立第

1 个及第 2 个血药浓度峰消除项的回归方程，无法用传统的残数法建立药动学模型。只能采用统计矩法中的零阶矩计算 AUC。

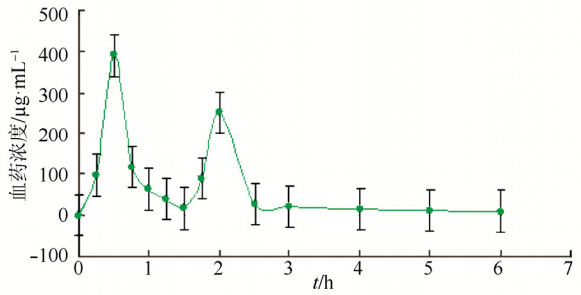

图 2 双烟酸姜黄素酯原料混悬液在家兔体内的经时血药浓度曲线

Fig. 2 Time-dependent behavior curves of blood concentration of crude suspension of dual nicotinate-curcumin ester in rabbits

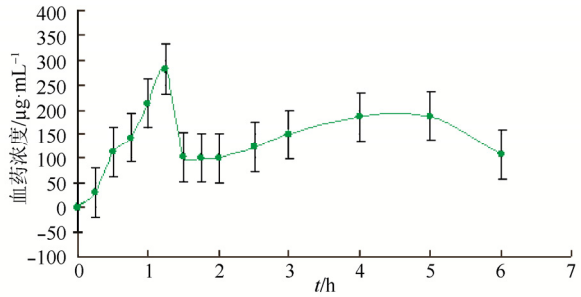

图 3 双烟酸姜黄素酯纳米粒在家兔体内的经时血药浓度曲线

Fig. 3 Time-dependent behavior curves of blood concentration of nanoparticles sample of dual nicotinate-curcumin ester in rabbits

曲线由 0 到 T^* AUC 用梯形法求出，见式 1。

$$AUC_{0-T^*}=\sum_{i=1}^{n}\frac{c_i+c_{i-1}}{2}(t_i-t_{i-1}) \quad (1)$$

将图 2~3 所示数据代入式 1 中，计算 AUC，见表 1~2。

由表 1 结果可知，第 1 个血药浓度峰值 95%置信区间未重叠，差别具有统计意义，双烟酸姜黄素酯原料药浓度高于纳米粒；第 2 个血药浓度峰值 95%置信区间重叠，差别无统计意义，双烟酸姜黄素酯原料药浓度等同于纳米粒。说明双烟酸姜黄素酯制成纳米粒具有缓释性。

由表 2 结果可知，AUC 值 95%置信区间未重叠，差别具有统计意义，双烟酸姜黄素酯纳米粒 AUC 大于原料药，双烟酸姜黄素酯纳米粒 AUC 平均值是原料 AUC 平均值的 2.49 倍。本实验结果说明双烟酸姜黄素酯制成纳米粒可显著提高双烟酸姜黄素酯的生物利用度。

表 1 双烟酸姜黄素酯原料药与纳米粒达峰浓度比较表

Tab. 1 Comparative statement of measured maximal concentration of nicotinate-curcumin ester between crude drug and nanoparticles sample μg·mL^{-1}

样品	C^1_{max}	95%置信区间	C^2_{max}	95%置信区间
原料药	390.4±9.610	366.5~414.3	251.4±8.06	231.4~271.4
纳米粒	282.7±16.20	242.4~323.0	187.1±24.9	125.1~249.2

表 2 双烟酸姜黄素酯原料药与纳米粒 AUC 比较表

Tab. 2 Comparative statement of AUC of nicotinate-curcumin ester between crude drug and nanoparticles sample μg·L^{-1}·h

时间/h	AUC-1	AUC-2	AUC-3	$\overline{AUC}\pm s$	AUC_{0-6} 95%置信区间
原料药	345.3	357.0	362.17	354.835±8.660	333.3~376.4
纳米粒	869.3	879.4	901.325	883.335±16.37	842.7~924.0

2.3 双烟酸姜黄素酯代谢产物姜黄素的检测

为了探索双烟酸姜黄素酯在体内是否代谢为姜黄素和烟酸而发挥作用，还是以双烟酸姜黄素酯原型而发挥作用。故对每个时间下血药浓度经时变化检测双烟酸姜黄素酯的样品再进行姜黄素含量测定。

2.3.1 姜黄素的 HPLC 测定色谱条件 色谱柱 Welch ultimate×B-C_{18}(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相为乙腈-0.5%酸水(60∶40)，流速 1.0 mL·min^{-1}；检测波长：425 nm；柱温：30℃；理论板数>4 000；分离度>1.5；对称因子 0.96~1.03；进样量：20 μL。

2.3.2 姜黄素对照品溶液的制备 精密称定 0.011 7 g 姜黄素，用氯仿乙腈以 3∶22 的比例定容至 100 mL 量瓶中，再吸取 1 mL 用溶剂定容至 10 mL 量瓶中。用 0.45 μm 滤膜过滤至进样小瓶中备用。

2.3.3 血浆样品的处理 按“2.2.2”项下方法采血，每次采血 3 mL 至真空采血管中，4 000 r·min^{-1} 离心 15 min。取上层血浆 0.8 mL，用氯仿萃取 3 次，每次 1 mL，合并氯仿液至蒸发皿中，在通风橱中自然挥干，残渣用 2 mL 3∶22 氯仿-乙腈混合溶液充分溶解，用 0.45 μm 滤膜过滤至进样小瓶中。按“2.3.1”项下条件进样。

2.3.4 姜黄素色谱分析结果 姜黄素对照品 HPLC 色谱图、空白血浆样品 HPLC 图谱、双烟酸姜黄素酯原料药组和纳米粒组各时间点血药浓度经时变化的样品图谱见图 4。由图 4 可知，该 HPLC 含量测定方法在 6 min 出现姜黄素峰。空白血浆样品的 HPLC 显示无干扰。双烟酸姜黄素酯原料药和纳米粒各时间点血药浓度经时变化的样品中，皆未见姜黄素特征峰出现。

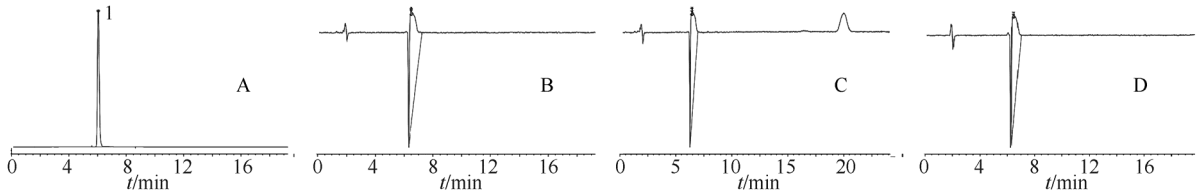

图 4 高效液相色谱图

A–姜黄素对照品；B–空白血浆样品；C–双烟酸姜黄素酯原料药组体内转运(代谢)；D–双烟酸姜黄素酯纳米粒组体内转运(代谢)；1–姜黄素。

Fig. 4 High performance liquid chromatography

A–reference substance of curcumin; B–blank of plasma sample; C–transporters (metabolizing) in rabbits of dual nicotinate-curcumin ester crude drug; D–transporters (metabolizing) atlas in rabbits of dual nicotinate-curcumin ester nanoparticles; 1–curcumin.

2.3.5 姜黄素检测结果分析　由结果可知，每个时间点血药浓度经时变化取样测定均检测不出姜黄素色谱峰，说明双烟酸姜黄素酯原料药及其纳米粒在体内转运过程中皆未代谢成姜黄素或同条件下代谢产物非常少，检测不出。

3 讨论

双烟酸姜黄素酯的原料药和纳米粒在家兔体内的吸收特点为均有双峰，皆存在肠肝循环。药物的肠肝循环是药物排泄和重吸收的一种形式，能增加药物在体内的存留时间。肠肝循环可保证药物在作用部位(或靶器官)有较高的浓度，它对维持有效血药浓度，提高疗效有一定临床意义。但第 2 部分实验结果显示双烟酸姜黄素酯纳米粒提高了溶出速度，但是在体内却延缓了药物吸收的时间，因此有待进一步的研究和论证。

采用统计矩法中的零阶矩法计算 AUC，原料药的 AUC 平均值为(354.835±8.660)μg·L^{-1}·h 而纳米粒的 AUC 平均值为(883.335±16.37)μg·L^{-1}·h。纳米粒的 AUC 是原料药 AUC 的 2.486 倍。可知纳米粒与原料药相比显著提高了生物利用度。

本实验预试开始时采用大鼠进行药动学实验，但没有在血浆及肝脏中检测到双烟酸姜黄素酯。后选用体质量>2.5 kg 的家兔才能检测到血药浓度。于是选用家兔作为试验对象，进行药动学实验，正式试验选用的家兔质量为 2.7 kg 左右。

双烟酸姜黄素酯原料药及其纳米粒在体内转运过程中皆未代谢成姜黄素，说明发挥作用的成分是双烟酸姜黄素酯。

REFERENCES

[1] SUN J, ZHANG X F, CHEN Y, et al. Preparation and pharmacokinetics of vinpocetine solid lipid nanoparticles in rats [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2014, 45(9): 845-848.

[2] ZHAO Y J, LYU S W, GU L C, et al. Study of pharmacokinetics about brucine solid lipid nanoparticles [J]. J Harbin Univ Commer(Nat Sci Ed)（哈尔滨商业大学学报: 自然科学版), 2014(3): 260-263.

[3] ZHANG W W, ZHANG G X, SUN K X. Preparation and pharmacokinetic evaluation of curcumin-loaded nanoparticles [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报), 2015(4): 388-391

[4] WANG K, SUN L L, HU X Y, et al. Pharmacokinetics of curcumin nanostructured lipid carriers in rats' plasma [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2014, 36(12): 2503-2507.

[5] 边俊杰. 脑靶向聚乳酸载药纳米粒鼻腔给药系统研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.

[6] 程纯. 黄褐毛忍冬总皂苷脂质体在动物体内的分布及初步药效学研究[D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2013.

[7] 郭静一, 汪鹏, 胡曼, 等. 薄膜-超声法制备双烟酸姜黄素酯纳米粒的辅料配比研究[J]. 中国药学杂志, 2017, 52(6): 462-467.

[8] GUO J Y, HU M, WANG P, et al. Determination of nicotinate-curcumin ester and its nanoparticles by HPLC [J]. China Pharm(中国药师), 2017, 20(7): 1181-1184.

[9] TAO C H, ZHEN H Y, YAO W T, et al. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of angiopep-2 modifying neurotoxin loaded phospholipidfu [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(4): 467-471.

[10] CHEN B H, YANG S L, WU S X. Progress in new carriers for topical medication of dermatology [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(4): 615-621.

收稿日期：2018-06-12

(本文责编：曹粤锋)