

响应面法优化西罗莫司胶束及其促小肠吸收作用

陈燕¹, 张雅雯², 周云琍¹, 陈晓晓¹, 王胜浩^{3*}, 尹丽娜^{2*} (1.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2.杭州医学院药物研究所, 杭州 310013; 3.浙江中肽生化有限公司, 杭州 310018)

摘要: 目的 制备和优化西罗莫司(sirolimus, SRL)聚合物胶束, 考察其对大鼠在体肠吸收动力学的影响。方法 以去氧胆酸修饰的壳聚糖(deoxycholic acid grafted chitosan, CS-DCA)为载体, 采用溶剂蒸发法制备 SRL CS-DCA 胶束。以包封率、载药量、粒径和电位作为考察指标, 结合星点设计-效应面法优化处方。建立大鼠在体单向肠灌注模型, 并通过肠腔有效吸收系数(P_{eff})、吸收速率常数(K_a)和药物吸收剂量分数(f_a)研究不同浓度 SRL CS-DCA 的肠吸收特性。结果 SRL CS-DCA 最优处方: 载体浓度(CS-DCA)为 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 药物与载体质量比为 20%, 该条件下制备得到的 SRL CS-DCA 带正电荷(37.0 ± 2.7)mV, 粒径(182.2 ± 5.7)nm, 包封率 $>90\%$, 载药量(15.8 ± 0.5)%。SRL CS-DCA 经大鼠全肠后, 反映药物肠吸收程度的评价指标 P_{eff} 、 K_a 和 f_a 均较 SRL 有显著提高($P<0.05$); 不同浓度的 SRL CS-DCA 在大鼠全肠段的 P_{eff} 、 K_a 、 f_a 值无显著性差异, 提示胶束在 $10\sim 100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 吸收无浓度抑制, 吸收特征为被动转运的线性动力学过程, 推测其可能的吸收机制为被动扩散。结论 SRL 制备成聚合物胶束后, 对其在大鼠小肠的吸收具有明显的促进作用, 从侧面证明 SRL CS-DCA 能有效改善 SRL 口服生物利用度。

关键词: 西罗莫司; 壳聚糖; 聚合物胶束; 星点设计-效应面法; 在体单向肠灌注

中图分类号: R944.4

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)08-0939-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.08.008

引用本文: 陈燕, 张雅雯, 周云琍, 等. 响应面法优化西罗莫司胶束及其促小肠吸收作用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 939-944.

Optimization of Sirolimus Micelles by Response Surface Methodology and Its Effect on Small Intestinal Absorption

CHEN Yan¹, ZHANG Yawen², ZHOU Yunli¹, CHEN Xiaoxiao¹, WANG Shenghao^{3*}, YIN Lina^{2*} (1.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Institute of Materia Medica, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China; 3.Zhejiang Peptide Company, Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare sirolimus(SRL) polymer micelles and investigate its effects on the absorption kinetics of rat intestine. **METHODS** The SRL CS-DCA micelles were prepared by solvent evaporation using deoxycholic acid grafted chitosan(CS-DCA) as carrier. The encapsulation efficiency, drug loading, particle size and potential were taken as the evaluation indexes, and the formulation was optimized by the central composite design-response surface optimization method. In situ single pass perfusion model of rat was set up to investigate intestinal absorption characteristics of SRL CS-DCA micelles with different concentrations. Meanwhile, the intestinal absorption coefficient(P_{eff}), absorption rate constant(K_a) and the dose fraction(f_a) were used to evaluate drug absorption. **RESULTS** The optimum formulation of SRL CS-DCA micelles was as follows: the concentration of CS-DCA was $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the mass ratio of drug to carrier was 20%. Under this condition, the system had the positive charge of $(37.0\pm 2.7)\text{mV}$, particle size of $(182.2\pm 5.7)\text{nm}$, the encapsulation efficiency greater than 90%, and the drug loading of $(15.80\pm 0.5)\%$. After the SRL CS-DCA micelles passed through the rat intestine, the P_{eff} , K_a and f_a were significantly higher than those of SRL($P<0.05$). There was no significant difference in the P_{eff} , K_a and f_a values of SRL CS-DCA micelles with different concentration in the whole intestine of rats, suggesting that the micelles had no concentration inhibition at $10\sim 100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the absorption characteristics were linear dynamics of passive transport. It was speculated that its possible absorption mechanism was passive diffusion. **CONCLUSION** The SRL CS-DCA micelles can enhance effect on intestine absorption of SRL monomer, which proves that SRL CS-DCA can effectively improve the oral bioavailability of sirolimus.

KEYWORDS: sirolimus; chitosan; micelle; central composite design-response surface method; in situ single pass perfusion model

西罗莫司(sirolimus, SRL)为大环内酯类强效免疫抑制剂, 其肾毒性低, 免疫抑制活性为环孢菌素的 50~100 倍^[1], 临床上已广泛用于器官移植

手术, 如心脏、肾脏等。SRL 属于生物药剂学分类系统(biopharmaceutics classification system, BCS) II 类药物, 其水溶性较差, 在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时溶解度仅为

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQY18H300002)

作者简介: 陈燕, 女, 硕士生 Tel: 15700067224 E-mail: yanchen2167059@126.com *通信作者: 王胜浩, 男, 博士, 研究员 Tel: 13757170150 E-mail: wshenghao@163.com 尹丽娜, 女, 助理研究员 Tel: (0571)88215622 E-mail: yln23@163.com

中国现代应用药学 2020 年 4 月第 37 卷第 8 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2020 April, Vol.37 No.8

• 939 •

2.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。目前国内外上市 SRL 剂型主要有片剂和溶液剂 2 种, 人体生物利用度很低(14%~31%), 并且治疗窗窄导致不良反应严重^[2]。因此提高 SRL 溶解度从而改善其生物利用度对临床的应用尤为重要。

聚合物胶束(polymeric micelles, PMs)是近年来研究十分活跃的药物传递系统, 通常由具有两亲性或带有反向电荷的共聚物在水中聚集而成, 具有疏水性内核和亲水性外壳的核-壳结构。PMs 作为药物载体具有独特的优势: 较低的临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC)可使胶束具有很强的抗稀释能力, 并在血液中稳定; 疏水内核可以提高难溶性药物的稳定性, 具有良好的载药以及控制药物释放能力; 亲水外壳可保护药物免受人体内网状内皮组织系统非特异性摄取, 延长血液循环中的滞留时间, 改善药物的体内药动学行为; 还具有肿瘤细胞靶向、改变药物细胞摄取途径, 以降低 P-gp 外排以及亚细胞定位等^[3]。将聚合物胶束开发为口服给药系统有助于改善药物溶解性, 增加吸收部位的药物浓度, 进而提高药物生物利用度。

壳聚糖(chitosan, CS)是一种天然药物载体材料, 具有良好的生物相容性和生物可降解性。利用 CS 上的氨基或羟基嫁接疏水基团得到的两亲性载体, 能在水中自组装成聚合物胶束, 可作为难溶性药物或者蛋白类、多肽类药物的载体^[4]。经修饰后的 CS 具有一定的生物黏附性, 可增强膜通透性, 从而更好地起到促进药物吸收的作用^[5]。本研究采用去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)修饰的 CS(CS-DCA)为载体, 通过采用乳化溶剂蒸发法制备 SRL 胶束(SRL CS-DCA)。运用星点设计-效应面法进行处方优化, 并对 SRL CS-DCA 在大鼠体内肠道吸收作用进行评价, 为 SRL CS-DCA 给药系统的开发提供依据。

1 材料

LC-20AD 高效液相色谱仪, SPD-20A 紫外检测器, SIL-20A 全自动进样器(日本 Shimadzu); Nano-ZS90 粒径与表面电位分析仪(Malvern Instruments Ltd., UK); BT00-100M 蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司); AL104 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; HWCL-1 水浴锅、85-2 型磁力搅拌器、R-1001VN 旋转蒸发仪、SHB-III 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); Anke TGL-16C 离心机(上海安高科学仪

器厂); LGJ-10D 冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司)。

CS-DCA(实验室自制, 分子量 126 kDa, 氨基取代度 17.6%, 批号: 180622); SRL(浙江海正药业股份有限公司, 批号: 1080501; 质量分数>98.0%); 乌拉坦(Hangzhou Lanbo Industrial Co); Krebs-Ringer's 试剂(K-R 试剂, 自制, 每 1 L 中含有 NaCl 7.8 g, KCl 0.35 g, NaHCO₃ 1.37 g, NaH₂PO₄ 0.32 g, MgCl₂ 0.02 g, 葡萄糖 1.40 g); 乙腈(色谱纯, 浙江省临海市浙东特种试剂厂); 甲醇(色谱纯, 浙江省临海市浙东特种试剂厂); 其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠, ♂, 体质量 180~220 g, 浙江省动物中心提供, 生产许可证号: SCXK(浙)2014-0001。

2 方法和结果

2.1 SRL CS-DCA 的制备

称取 CS-DCA 适量, 加去离子水溶解。在室温搅拌条件下, 按一定的比例投药量加入 SRL、甲醇溶液, 探头超声(工作 2 s, 停顿 3 s, 400 W, 3 min), 旋转蒸发除去甲醇, 5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液冷冻干燥即得 SRL CS-DCA。

2.2 SRL CS-DCA 的理化性质评价

2.2.1 粒径大小与表面电位 取 SRL CS-DCA, 以水为分散介质超声分散, 用 Nano-ZS90 粒径与表面电位分析仪测定粒径和表面电位。

2.2.2 SRL CS-DCA 包封率与载药量的测定

2.2.2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A 为甲醇-乙腈(30:40), 流动相 B 为纯水; A:B=87:23; 流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 277 nm; 进样体积 20 μL 。

2.2.2.2 包封率与载药量的测定 精密称取 SRL CS-DCA 适量(相当于含药物量 2 mg)至 20 mL 量瓶中, 加水分散, 得 SRL CS-DCA 分散液。5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取清液 1 mL 至 10 mL 量瓶, 加甲醇至近刻度, 超声, 甲醇定容。0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取上清液, 按“2.2.2.1”项下色谱条件进样测定 SRL CS-DCA 中 SRL 的浓度。按下述公式计算得到 SRL CS-DCA 的包封率和载药量。

$$\text{包封率}(\%) = \frac{W_{\text{胶束药物量}}}{W_{\text{投药量}}} \times 100\%$$

$$\text{载药量}(\%) = \frac{W_{\text{胶束药物量}}}{W_{\text{投药量}} + W_{\text{载体质量}}} \times 100\%$$

2.3 处方优化

2.3.1 星点设计^[6-8] 在单因素考察的基础上, 采用

星点设计,以药物与载体质量比(X_1)、载体浓度(X_2)为考察因素,以粒径(Y_1)、电位(Y_2)、包封率(Y_3)和载药量(Y_4)为指标,按“2.1”项下方法制备 SRL CS-DCA,旨在获得体系稳定、粒径较小、包封率和载药量适宜的胶束给药系统。各因素水平见表1,结果见表2。

表1 因素水平表

Tab. 1 Table of factors and levels

水平代码	$X_1/\%$ 药物/载体	$X_2/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 载体浓度
-1.414	1.89	8.96
-1	5	10
0	12.5	12.5
1	20	15
1.414	23.11	16.04

表2 星点设计试验结果

Tab. 2 Results of central composite design

No.	Y_1/nm	Y_2/mV	$Y_3/\%$	$Y_4/\%$
1	244.2	38.0	86.09	16.19
2	182.3	38.2	85.23	9.40
3	326.6	36.4	93.46	1.73
4	197.4	35.1	57.99	6.41
5	219.6	43.1	94.42	15.43
6	197.4	35.1	57.99	6.41
7	197.4	35.1	57.99	6.41
8	178.2	37.0	92.87	15.80
9	192.9	43.3	70.90	3.35
10	197.4	35.1	57.99	6.41
11	197.4	35.1	57.99	6.41
12	220.8	41.7	65.44	7.02
13	281.6	33.2	80.22	3.74

2.3.2 模拟拟合 采用 Design-Expert 8.0.5b 软件对各因素水平进行多元线性回归和二项式拟合。选择有较大相关系数(r)的拟合方程,并以方程的 $P<0.05$ 作为显著标准进行优化。二项式拟合结果较好,相关系数均 >0.9 。4个拟合方程如下:

$$Y_1=197.40-29.13X_1+13.61X_2-11.83X_1X_2+37.65X_1^2-4.28X_2^2+18.91X_1^2X_2+9.96X_1X_2^2(r=0.9417, P<0.05)$$

$$Y_2=35.10+0.57X_1+1.24X_2+4.05X_1X_2+1.19X_1^2+2.57X_2^2-2.24X_1^2X_2+0.33X_1X_2^2(r=0.9950, P<0.05)$$

$$Y_3=57.99-2.61X_1-7X_2-1.94X_1X_2+16.40X_1^2+9.18X_2^2+9.71X_1^2X_2+11.65X_1X_2^2(r=0.9970, P<0.05)$$

$$Y_4=6.41+5.11X_1-0.84X_2-0.19X_1X_2+1.52X_1^2+1.15X_2^2+$$

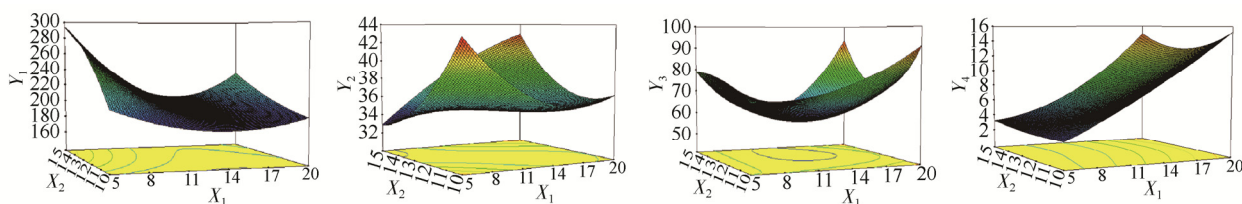


图1 因素与指标之间的响应面和等高线图

Fig. 1 Response surfaces and contour plots between indexes and factors

$$0.85X_1^2X_2+0.92X_1X_2^2(r=0.9929, P<0.05)$$

根据二项式拟合方程绘制因素对各指标影响趋势的三维效应面与等高线图,结果见图1。

由三维效应图可见, Y_2 和 Y_3 受 X_1 和 X_2 交互作用明显。当 X_2 取值较大时, Y_1 也随之增大, X_2 较 X_1 对 Y_1 响应值影响更为显著;随着 X_2 取较小值时, Y_2 效应面曲线较陡,等高线密度较大,而对于 X_1 值的增加, Y_2 基本变化不大; Y_3 随 X_1 值增大,曲面呈先高后低再高的走势; Y_4 的效应面为一坡面,与 X_1 呈正相关,受 X_2 影响小。经 Design-Expert 8.0.5b 软件处理,确定 X_1 和 X_2 的理想取值分别为 18.87%~20.00%和 10~15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。选择各自的中间值,同时结合方便投料,确定待验证最优条件 X_1 (药物与载体质量比)为 20%, X_2 (载体浓度)为 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3.3 验证 SRL CS-DCA 的最优处方药物与载体质量比为 20%,载体浓度为 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。照此处方制备 3 批胶束进行验证,结果显示该处方下制备的胶束粒径为 $(182.2\pm5.7)\text{nm}$,体系稳定,包封率 $>90\%$,载药量为 15.8%。预测值和实验值的偏差绝对值均 $<5\%$ 。结果表明,所建立的数学模型具有良好的预测性,优化后处方重复性较好,结果见表3。

表3 预测值与实际值的比较($n=3$)

Tab. 3 Comparison between predicted and actual values ($n=3$)

指标	预测值	实际值	偏差/%
Y_1/nm	190.9	182.2 ± 5.7	4.6
Y_2/mV	36.7	37.0 ± 2.7	-0.8
$Y_3/\%$	91.6	92.9 ± 4.3	-1.1
$Y_4/\%$	15.3	15.8 ± 0.5	-3.2

注:偏差=(预测值-实测值)/预测值 $\times 100\%$ 。

Note: deviation=(prediction value-measured value)/prediction value $\times 100\%$.

2.4 SRL CS-DCA 在体肠吸收评价

2.4.1 溶液配制 Krebs-Ringer's 试剂(K-R 试剂,临用前添加),用 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸调节 pH 至 6.8。

酚红溶液:称取酚红 20 mg ,精密称定,溶于 1 L K-R 试剂中,混匀即得浓度为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 酚红储备液。

SRL 储备液: 取 SRL 10 mg, 精密称定, 甲醇溶解, 定容至 10 mL 量瓶, 即得 SRL 储备液(浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

空白肠灌流液: 取酚红溶液(不含药物)经肠循环后, 即得空白肠灌流液。

原料肠灌流液: 精密称取 SRL 适量, 配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 乙醇溶液, 取 1 mL 于 100 mL 量瓶中, 用酚红溶液定容, 配制成 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置, 供大鼠在体肠灌流试验备用。

SRL CS-DCA 肠灌流液: 精密称取 SRL CS-DCA 适量, 用酚红溶液定容, 分别配制药物浓度 10, $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放置备用。

2.4.2 HPLC 测定灌流液 SRL 的含量

2.4.2.1 色谱条件 同“2.2.2.1”项下。

2.4.2.2 专属性试验 取空白肠灌流液, $10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液, 按“2.2.2.1”项下色谱条件测定, 同时与 SRL 标准溶液(SRL 储备液用含 80% 甲醇-酚红溶液的混合溶媒逐级稀释为 $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)及按“2.4.3”项下 90→105 min 收集的 SRL CS-DCA 肠灌流液样品进行比较。结果显示, SRL 峰保留时间约在 7.8 min, 空白肠灌流液无干扰, 方法专属性高。结果见图 2。

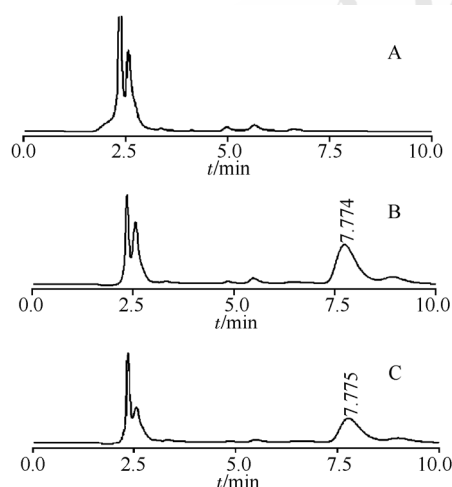


图 2 高效液相色谱图

A-空白肠灌流液; B-SRL 标准溶液($5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C-SRL CS-DCA 肠灌流液样品($100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 90→105 min)。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-blank intestinal circulation fluid; B-SRL standard solution($5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); C-sample of SRL CS-DCA intestinal circulation fluid($100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 90→105 min).

2.4.2.3 线性关系考察 精密移取 SRL 储备液适量, 分别用混合溶媒(80% 甲醇-酚红溶液)稀释成 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列浓度, $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 按“2.2.2.1”

项下色谱条件测定, 以 SRL 峰面积 Y 对药物浓度 $X(\text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 进行线性回归。得回归方程 $Y=39\ 505X-108.93$, $r=0.999\ 5$, 提示 SRL 浓度在 $0.1 \sim 20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.4.2.4 检测限和定量限 取标准曲线最低浓度($0.1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 用混合溶媒反复稀释, 进样检测。当信噪比(S/N)为 2~3 倍时, 确定方法的检测限为 $0.04 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。当 S/N 为 10 倍时, 定量限为 $0.10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n=3$, $\text{RSD}=0.28\%$)。

2.4.2.5 准确度和精密度 按“2.4.2.3”项下方法配制 0.5, 5, $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 SRL 溶液($n=5$), 按“2.2.2.1”项下色谱条件测定, 通过比较标准曲线计算所得浓度与实际配制浓度得到准确度数据。同时以 0.5, 5, $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液连续测定 3 d, 考察日内、日间精密度。结果显示低、中、高浓度的方法回收率分别为($103.5 \pm 0.8\%$), ($100.7 \pm 0.9\%$), ($98.7 \pm 1.5\%$), 日内、日间精密度均 $<4\%$ 。表明仪器精密度、方法准确度良好。结果见表 4。

表 4 准确度和日内、日间精密度($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 4 Accuracy and intra-day and inter-day precision ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率/%	精密度/%	
		日内	日间
0.5	103.5 ± 0.8	0.7	3.1
5.0	100.7 ± 0.9	0.9	1.3
10.0	98.7 ± 1.5	1.5	0.7

2.4.2.6 溶液稳定性 取已知浓度的灌流液(10, $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 置室温条件下, 于 0, 4, 8, 12, 24 h 取样, 按“2.2.2.1”项下色谱条件测定, 考察药物溶液的稳定性。SRL 灌流液在 24 h 内峰面积 RSD 分别为 0.84% 和 0.26%, 表明灌流液在 24 h 内稳定。

2.4.3 大鼠在体肠灌流试验^[9-11] 取自然饮水条件禁食 24 h 的 SD 大鼠 20 只, 腹腔注射 20% 乌拉坦($1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体质量)麻醉, 背部固定, 沿腹腔中线剪开约 3 cm, 小心分离出全肠段。取幽门以下 2 cm 处切口, 插管并结扎, 并与盲肠上端 2 cm 处切口, 用预热的生理盐水将肠内容物冲洗干净, 再用空气将生理盐水排空结扎, 接蠕动泵。将肠灌流液(预热至 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$), 以 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速冲洗 50 min 后, 将流速调整为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 开始计时 0→15, 15→30, 30→45, 45→60, 60→75, 75→90, 90→105, 105→120, 120→135, 135→150 min, 收集肠灌流液, 其中 0→15 min 为不经肠的原灌流液, 经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过后, 按“2.2.2.1”项下色谱

条件测定各时间点的 SRL 浓度(参比溶液酚红采用分光光度法测定)。待样品收集完后, 取下灌流肠管, 沿肠系膜打开肠管, 将其平铺测量其长度和周长, 并计算药物有效吸收系数(P_{eff})、吸收速率常数(K_a)和药物吸收剂量分数(f_a), 计算公式如下。

$$P_{\text{eff}} = \frac{Q_{\text{in}} \ln(\frac{C_{\text{in}}}{C_{\text{out}}'})}{2\pi r L}, \quad K_a = (\frac{C_{\text{in}}}{C_{\text{out}}'} - 1) \times \frac{Q_{\text{in}}}{V}$$

$$f_a = 1 - e^{-2 \times \frac{3.6 P_{\text{eff}} + 0.03}{10000} \times \frac{t_{\text{res}}}{r} \times 2.8}$$

以上公式 Q_{in} 为灌流速度($0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), L 为被灌流肠段的长度(cm), t_{res} 为灌流时间, r 为灌流肠段横截面半径(cm), V 为灌流肠段的体积($\pi r^2 L$), C_{in} 、 C_{out} 为进、出口灌流液中 SRL 浓度, C_{out}' 为用酚红矫正后出口灌流液中 SRL 浓度^[12]。

2.4.4 SRL CS-DCA 在体小肠吸收特性

2.4.4.1 SRL CS-DCA 的小肠吸收 在体肠吸收试验表明, SRL CS-DCA 的 P_{eff} 和 K_a 较 SRL 原料对照均显著提高($P < 0.05$), 提示 SRL CS-DCA 的吸收性能和吸收速度明显上升, 结果见表 5。 f_a 可直接反映药物在肠道的吸收程度, 与口服药物生物利用度密切相关^[13]。其中 SRL CS-DCA 的 f_a 较 SRL 原料对照显著提高($P < 0.05$)。图 3 显示, SRL 及 SRL CS-DCA 在小肠随时间的累积吸收量近似于线性状态, SRL CS-DCA 的累积吸收量高于 SRL; 图 4 为各时间点药物在小肠中的即时吸收百分率, 由图可见, SRL CS-DCA 比 SRL 则明显提高了 29.15%, 同样提示胶束可提高药物的吸收。

表 5 SRL 及 SRL CS-DCA 的肠吸收参数($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Tab. 5 Intestinal absorption parameters of SRL and SRL CS-DCA($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	有效吸收系数/ $\times 10^{-4} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	吸收速率常 数/ $\times 10^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$	吸收剂量 分数/%
SRL 组	10	0.38 ± 0.05	0.23 ± 0.03	38.41 ± 4.66
SRL CS-DCA 组	10	$0.87 \pm 0.04^{(1)}$	$0.35 \pm 0.07^{(1)}$	$68.83 \pm 3.76^{(1)}$
SRL CS-DCA 组	100	$0.84 \pm 0.04^{(1)}$	$0.30 \pm 0.04^{(1)}$	$63.24 \pm 3.45^{(1)}$

注: 与 SRL 原料组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with SRL group, ⁽¹⁾ $P < 0.05$.

2.4.4.2 药物浓度对小肠吸收的影响 药物累积吸收量随着胶束灌流液药物浓度的增加而提高, 药物的吸收曲线近似线性状态, 未显示吸收饱和现象, 提示肠道对药物的吸收无浓度抑制, 结果见图 3。表 5 可得不同浓度的 SRL CS-DCA 在大鼠全肠段的 P_{eff} 、 K_a 、 f_a 值无显著性差异, 提示胶

束在 $10 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 吸收不存在浓度依赖性, 推测其可能的吸收为被动转运吸收机制。

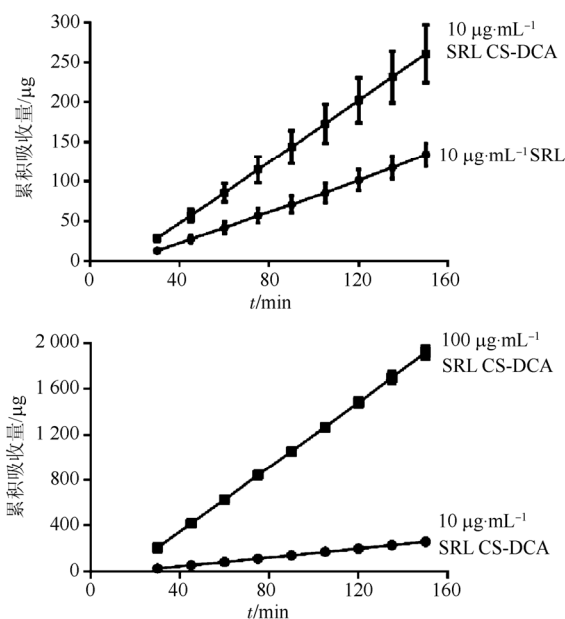


图 3 SRL 和 SRL CS-DCA 累积吸收量-时间曲线($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 3 Cumulative absorption-time curves of SRL and SRL CS-DCA($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

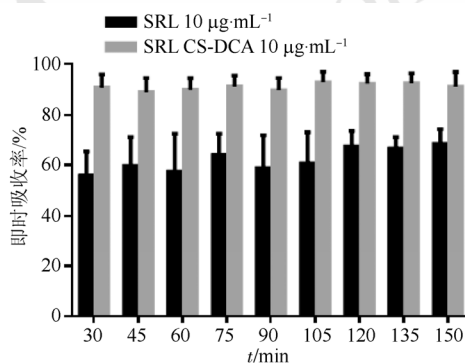


图 4 SRL 和 SRL CS-DCA 肠道即时吸收百分率-时间曲线

Fig. 4 Immediate intestinal absorption percentage-time curve of SRL and SRL CS-DCA

3 讨论

SRL 为难溶性药物, 在体内传递过程中存在生物利用度低等问题, 解决该问题的有效方法是将药物包裹在两亲性聚合物形成的胶束的疏水内核中, 使其分散在水溶液里, 使药物起到增溶的作用。因此, 本研究将 SRL 制成 CS 聚合物胶束。CS-DCA 含有亲水亲油基, 在水中可自组装成胶束, 其疏水嵌段自聚成疏水内核, 包载疏水性药物, 亲水嵌段构成胶束外壳, 有利于胶束的稳定和体内长循环。CS 的自由氨基在水性介质中质子化, 可使胶束带正电荷。SRL CS-DCA 的 Zeta 电

位绝对值均 $>30\text{ mV}$ ，表明溶液处于稳定状态。

在体单向肠灌流法具有不损伤血管及神经的特点，可避免消化道固有的生理运动产生影响^[14]。在进行肠吸收研究时，由于肠道能吸收水分，易导致灌流液体积发生变化，而酚红在肠道生理条件下不会被吸收，因此采用酚红法以校正灌流液的体积。灌流实验在采集样品前先用高流速($1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)灌流 50 min，再以低流速($0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)灌流 15 min，使从管路流出的灌流液能达到一个稳态，充分保证实验数据的可靠性。当 SRL CS-DCA 低浓度灌流液流经管路后，其稳态时净水流量为 $(-0.41\pm 0.40)\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ，高浓度组也有类似的结果，提示小肠不仅吸收药物，而且吸收水分。

从单向灌流试验结果可见，与 SRL 原料相比，SRL CS-DCA 胶束在肠道吸收显著提高，这可能是由于药物可以通过形成的胶束等结构直接或间接地与小肠上皮细胞接触，同时，药物以纳米结构的形式存在，这两方面都有利于载体携带药物穿过静态水层到达肠上皮细胞，从而促进药物在静态水层的吸收^[15]。另外，药物载体材料中 CS 含有的亲水性基团，可以与生物组织(主要是上皮细胞和黏膜)中的羟基、羧基和氨基形成非共价键，本身具有生物黏附性，增加药物在胃肠黏膜上的滞留时间。且 CS 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，增强膜通透性^[16-17]，从而增强黏膜对药物的吸收，提高药物口服的生物利用度。其次，P-糖蛋白(P-gp)是重要的药物外排泵，对药物的吸收和生物利用度产生重要影响^[18]。由于 SRL 是 P-gp 底物，可能受到 P-gp 的外排作用，加之其分子质量较大，跨膜较困难，使得 SRL 原料在小肠吸收过程中受限。然而，对 SRL CS-DCA 胶束的促吸收机制还有待于进一步证实。

本研究采用星点设计-效应面优化法优选 SRL CS-DCA 的处方。以 SRL 原料为对照，建立大鼠低速单向肠灌流模型，对 SRL CS-DCA 在大鼠小肠进行吸收动力学考察。SRL CS-DCA 较 SRL 更能提高药物在胃肠道的吸收，具有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] MARTEL R R, KLICIUS J, GALET S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1977, 55(1): 48-51.
- [2] EMAMI S, VALIZADEH H, ISLAMBUCHILAR Z, et al. Development and physicochemical characterization of

- sirolimus solid dispersions prepared by solvent evaporation method [J]. *Adv Pharm Bull*, 2014, 4(4): 369-376.
- [3] MIKHAIL A S, ALLEN C. Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: Transport at the whole body, tissue and cellular levels [J]. *J Control Release*, 2009, 138(3): 214-223.
- [4] HAMMAN J H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems [J]. *Marine Drugs*, 2010, 8(4): 1305-1322.
- [5] GUO F, ZHANG M, GAO Y, et al. Modified nanoparticles with cell-penetrating peptide and amphipathic chitosan derivative for enhanced oral colon absorption of insulin: preparation and evaluation [J]. *Drug Deliv*, 2015, 23(6): 2003-2014.
- [6] HUANG X Y, ZHANG Y W, YIN L N, et al. Response surface method for optimization of asiatic acid nanoparticles modified with PEG and its enhancing effects on intestinal absorption [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2016, 41(17): 3239-3243.
- [7] LV Z Y, YANG Y W, WANG J, et al. Optimization of the preparation conditions of borneol-modified ginkgolide liposomes by response surface methodology and study of their blood brain barrier permeability [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 303-318.
- [8] TAN Z E, ZENG P Q, TUO H Y, et al. Optimization of processing technology for compound metformin hydrochloride by central composite design-response surface methodology [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2019, 28(12): 1490-1499.
- [9] ZHAO Y H, JIA X B, CHEN Y, et al. Studies on rat intestinal absorption of the total flavones of epimedium in situ [J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 2008, 43(3): 188-191.
- [10] LI Y M, ZHAO Y L, LI L B, et al. Preparation of paclitaxel-loaded mixed micelles and its in situ absorption in rat intestine [J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 2013, 48(13): 1076-1082.
- [11] WANG T T, LI W, YUAN Y, et al. Study on intestinal absorption of tilianin in rats of single-pass perfusion model [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2013, 38(7): 1079-1082.
- [12] PERSSON E M, NORDGREN A, FORSELL P, et al. Improved understanding of the effect of food on drug absorption and bioavailability for lipophilic compounds using an intestinal pig perfusion model [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 34(1): 22-29.
- [13] SUN Y H, HE X, YANG X L, et al. Absorption characteristics of the total alkaloids from *Mahonia bealei* in an in situ single-pass intestinal perfusion assay [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(7): 554-560.
- [14] FAGERHOLM M, JOHANSSON M, LENNERNAS H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(9): 1336-1342.
- [15] THOMSON A B, SCHOELLER C, KEELAN M, et al. Lipid absorption: passing through the unstirred layers, brush-border membrane, and beyond [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1993, 71(8): 531-555.
- [16] RANALDI 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(3): 157-167.
- [17] SOARES P I, SOUSA A I, SILVA J C, et al. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: optimization and modelling [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 147(20): 304-312.
- [18] MITRA P, AUDUS K, WILLIAMS G, et al. A comprehensive study demonstrating that p-glycoprotein function is directly affected by changes in pH: Implications for intestinal pH and effects on drug absorption [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(10): 4258-4268.

收稿日期: 2019-04-07

(本文责编: 蔡珊珊)