

姜黄素纳米混悬剂在大鼠体内药代动力学考察

钟荣玲,夏智,武洁,宋捷,王大为,黄厚才*
(江苏省中医药研究院,南京 210028)

[摘要] 目的:探讨姜黄素纳米混悬剂在大鼠体内的药代动力学过程。方法:将同等剂量的姜黄素原料药与姜黄素纳米混悬剂分别灌胃给 2 组大鼠,于灌胃后 20,40 min 和 1,2,4,6,8,12,24 h 眼底静脉丛取血,采用 HPLC 测定血浆姜黄素含量,Xterra C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),C₁₈ 预柱(4.0 mm×2.0 mm),柱温 35 ℃,流动相甲醇-1% 乙酸水溶液(78:22),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL,计算姜黄素最低定量限,同时测定血浆中姜黄素原料药与姜黄素纳米混悬剂的药代动力学参数。结果:血浆中姜黄素的定量限 15 μg·L⁻¹(S/N>10),低、中、高质量浓度的提取回收率($\bar{x} \pm s, n = 5$)分别为(91.3 ± 5.7)%, (93.0 ± 4.1)%, (93.3 ± 5.2)%。姜黄素纳米混悬剂的 C_{max} 和 AUC 均显著高于姜黄素原料, C_{max} 分别为(863.1 ± 390.4), (91.8 ± 22.9) μg·L⁻¹;原料药和混悬剂的 T_{max} 分别为(4.4 ± 2.2), (4.8 ± 4.4) h, t_{1/2} 分别为(4.6 ± 3.2), (5.4 ± 3.7) h,均无显著性变化。结论:建立的 HPLC 分析条件稳定可靠,纳米混悬剂能明显促进姜黄素的吸收,提高其生物利用度,但吸收和代谢速度无明显差异。

[关键词] 姜黄素; 纳米混悬剂; 药代动力学; 方法学考察; 高效液相色谱; 胡椒碱; 药时曲线

[中图分类号] R283.6; R945 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0137-03

[doi] 10.11653/syfy2013200137

In vivo Pharmacokinetics Investigation of
Curcumin Nanosuspensions in Rats

ZHONG Rong-ling, XIA Zhi, WU Jie, SONG Jie, WANG Da-wei, HUANG Hou-cai*
(Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate *in vivo* pharmacokinetics and oral bioavailability of curcumin nanosuspensions in rats. **Method:** The same dose of curcumin bulk drugs and curcumin nanosuspensions were orally administered to two groups of rats, After gavage 20, 40 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h, 0.3 mL blood from retinal venous plexus was obtained to measure plasma curcumin concentration ny HPLC analysis, Xterra C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), C₁₈ pre-column (4.0 mm×2.0 mm), column temperature 35 ℃, mobile phase of methanol-1% acetic acid aqueous solution (78:22), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, injection volume 20 μL. The lowest limit of quantitation of curcumin and other pharmacokinetic parameters of curcumin and curcumin nanosuspensions were determined. **Result:** Quantification limit of curcumin in plasma was 15 μg·L⁻¹ (S/N>10), extraction recoveries of low, medium and high concentration were (91.3 ± 5.7)%, (93.0 ± 4.1)%, (93.3 ± 5.2)%, respectively. C_{max} and AUC of curcumin nanosuspensions were higher than that of curcumin bulk drugs, C_{max} were (863.1 ± 390.4), (91.8 ± 22.9) μg·L⁻¹; T_{max} of curcumin bulk drugs and curcumin nanosuspensions were (4.4 ± 2.2) h and (4.8 ± 4.4) h, t_{1/2} were (4.6 ± 3.2) h and (5.4 ± 3.7) h, there was no significant change of these two parameters. **Conclusion:** Established HPLC analysis was reliable and stable, curcumin nanosuspensions could significantly promote absorption of curcumin and improve its bioavailability, but

[收稿日期] 20130109(002)
[基金项目] 江苏省中医药研究院项目(BK201023126)
[第一作者] 钟荣玲,助理畜牧员,从事实验动物管理与动物实验研究,Tel:13770848185,E-mail:wency@163.com
[通讯作者] * 黄厚才,硕士,研究员,从事实验动物管理与动物实验研究,Tel:13372018795,E-mail:huanghoucai@sina.com

no significant differences were found in both absorption and metabolic.

[**Key words**] curcumin; nanosuspensions; pharmacokinetic; methodological study; HPLC; piperine; concentration-time curve

姜黄为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的干燥根茎,其主要活性成分之一姜黄素已被广泛用作色素、食品添加剂及调味品,该成分药理作用广、毒性低,具有广阔的应用前景。但稳定性差、溶解度小、口服生物利用度极低的特性,极大地限制了姜黄素的推广使用^[1-3]。本实验将姜黄素与胡椒碱-玉米醇溶蛋白按质量比(5:3:1)制成姜黄素纳米混悬剂,探讨姜黄素药代动力学指标和口服生物利用度的变化。

1 材料

2695 型高效液相色谱(美国 Waters 公司),1/10 万电子天平(梅特勒-托利多公司),Milli-Q 型纯水器(美国 Millipore 公司),Allegra™ 64R Centrifuge 型台式高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司),WH-3 型涡旋混合器(上海沪西分析仪器厂),SPD2010 型真空浓缩仪(美国 Thermo 公司),BYZr-3L 型纳米研磨机(深圳博亿研磨制备)。

姜黄素原料药(南京泽郎医药科技有限公司,批号 ZL20120523JHS),胡椒碱、玉米醇(Hyclone 公司,批号分别为 20120312,20120508),姜黄素对照品(中国药品生物制品检定所,批号 130593-200901),姜黄素纳米混悬剂(将姜黄素、胡椒碱和玉米醇溶蛋白按质量比 5:3:1 加入适量水中,用纳米研磨机研磨至粒径约 150 nm,喷雾干燥,即得。由本院中药制剂室提供,临用前 0.5% 羧甲基纤维素钠溶解,使姜黄素质量浓度 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),甲醇为色谱纯,水为自制双蒸水,其余试剂均为市售分析纯。

SD 大鼠,体重约 250 g,雄性,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2008-0016。

2 方法与结果

2.1 对照品储备液的配制 精密称取姜黄素对照品 10.0 mg,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,即得,临用时用甲醇稀释至相应质量浓度。

2.2 色谱条件 Xterra C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),C₁₈ 预柱(4.0 mm × 2.0 mm),柱温 35 ℃,流动相甲醇-1% 乙酸水溶液(78:22),流速 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 20 μL,见图 1。

2.3 血浆样品的处理 取 150 μL 大鼠血浆至 1.5 mL 的 Eppendorf 试管中,加入乙酸乙酯 0.6 mL,涡旋提取 2 min,于 $14\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清

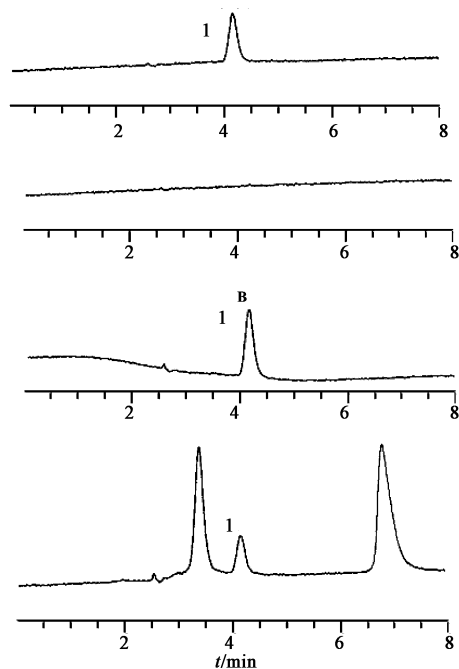


图 1 大鼠给予姜黄素纳米混悬剂 40 min 后血浆样品 HPLC

液 0.6 mL 于 45 ℃ 真空浓缩至干,残渣加 100 μL 流动相溶解,振荡 2 min,于 $14\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液进行 HPLC 分析。

2.4 标准曲线及最低定量限 向大鼠空白血浆 150 μL 中加入不同质量浓度的姜黄素对照品溶液 15 μL,使血浆中姜黄素质量浓度分别为 15,30,50,100,200,500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,按 2.3 项下方法处理,测定,以姜黄素质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 133.41X + 1\,447.6$ ($r = 0.999\,7$),线性范围 15 ~ 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,确定血浆中姜黄素的定量限 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($S/N > 10$)。

2.5 提取回收率试验 取 15 支洁净 Eppendorf 管,等分成 3 组,分别加入空白血浆 150 μL,分别加入不同质量浓度的对照品溶液 15 μL,使姜黄素质量浓度分别为 30,100,500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,按 2.3 项下方法处理,按 2.2 项下方法测定,记录峰面积,另取 15 支洁净 Eppendorf 管作为空白对照,计算 3 组血浆中姜黄素的提取回收率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$) 分别为 $(91.3 \pm 5.7)\%$, $(93.0 \pm 4.1)\%$, $(93.3 \pm 5.2)\%$,RSD 分别为 6.3%,4.4%,5.6%。

2.6 精密度试验 配制姜黄素质量浓度分别为

30,100,500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品 ($n = 15$), 按 2.3 项下方法处理, 每个质量浓度于 1 d 内测定 5 次, 考察批内精密密度 RSD 分别为 8.0% ,8.5% ,2.7% ; 连续 3 d 测定考察批间精密密度 RSD 分别为 11.1% ,8.7% ,2.7% 。

2.7 稳定性考察 配制姜黄素质量浓度分别为 30,100,500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的血浆样品, 考察室温放置 12 h 下稳定性, 结果低、中、高质量浓度样品的 RSD ($n = 5$) 分别为 2.5% ,3.4% ,1.4% ; 血浆经提取、干燥后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存 48 h 的 RSD 分别为 4.9% ,9.1% ,5.1% , -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存 7 d 的 RSD 分别为 10.2% ,5.7% ,2.6% ; 7 d 内反复冻融 3 次的 RSD 分别为 2.8% ,1.3% ,7.4% ($n = 5$) 。

2.8 药代动力学考察 取大鼠 10 只, 等分为 2 组, 分别按 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给予姜黄素原料药和姜黄素纳米混悬剂, 分别于给药后 20,40 min 和 1,2,4,6,8,12,24 h 眼底静脉丛取血 0.3 mL, 每次取血后给大鼠补充等量生理盐水, 分离血浆, 冷冻, 备用。按 2.3 项下方法处理, 进行 HPLC 测定, 采用 DAS 2.0 软件以统计矩方法求算药动学参数, 结果见表 1, 平均血药浓度-时间曲线见图 2。

表 1 姜黄素的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

药动学参数	原料药	纳米混悬剂
$C_{\max}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	91.8 $\pm$ 22.9	863.1 $\pm$ 390.4 ¹⁾
$T_{\max}/\text{h}$	4.4 $\pm$ 2.2	4.8 $\pm$ 4.4
MRT/h	5.9 $\pm$ 2.1	6.7 $\pm$ 2.2
$t_{1/2}/\text{h}$	4.6 $\pm$ 3.2	5.4 $\pm$ 3.7
$\text{AUC}_{0\rightarrow t}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	464.5 $\pm$ 102.1	5 050.2 $\pm$ 3 290.9 ¹⁾
$\text{AUC}_{0\rightarrow\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	880.3 $\pm$ 276.0	6 660.6 $\pm$ 4 669.8 ¹⁾

注:与原料药比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

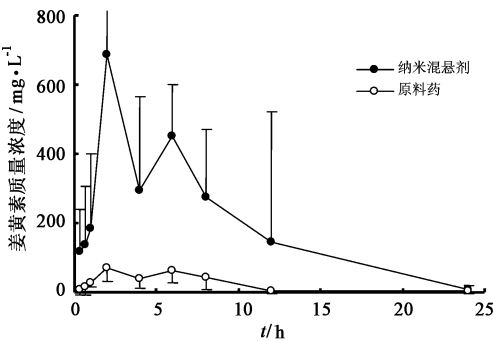


图 2 大鼠口服姜黄素原料药及纳米混悬剂后姜黄素的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s$)

由图 2 可知,姜黄素纳米混悬剂药时曲线出现双峰现象,且血药浓度显著高于姜黄素原料药。由

表 1 可知,姜黄素纳米混悬剂的 $C_{\max}$ 和 AUC 明显高于姜黄素原料,说明纳米混悬剂能明显促进姜黄素的吸收,提高其生物利用度。 $T_{\max}$ 和 $t_{1/2}$ 无显著性变化,说明纳米混悬剂与原料药的吸收和代谢速度无明显差异。

3 讨论

纳米混悬剂中药物处于固体状态,可制成高剂量的难溶性药物制剂,因此特别适于水中溶解度极底或在水和油中均不溶的药物。在纳米混悬剂给药系统中,由于药物粒子粒径大大降低,粒子总表面积显著增加,从而加快药物溶出速率与溶解度;胡椒碱是一种安全的代谢抑制剂,制成纳米混悬剂后,姜黄素与胡椒碱能迅速溶出和吸收,同时胡椒碱能抑制姜黄素在体内的代谢,从而提高生物利用度。

姜黄素纳米混悬剂药时曲线出现双峰现象,原因可能为肝肠循环所致。姜黄素在血浆中主要代谢产物为姜黄素的葡萄糖醛酸结合物和磺酸盐,推测姜黄素在肝内与葡萄糖醛酸结合后,水溶性增高,分泌入胆汁,排入肠道,在肠道细菌酶作用下水解释放出原型药物,又被肠道吸收进入肝脏,形成肝肠循环,从而呈现双峰现象,与文献报道一致^[4,6]。

姜黄素、姜黄素纳米混悬剂的药代动力学均为非线性过程,血浆色谱图中在 3.4,6.6 min 处出现了 2 个色谱峰,猜测是姜黄素在大鼠体内的代谢产物,结构有待于进一步确证。

[参考文献]

[1] HUANG M T, LOU Y R, MA W, et al. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal and colon ccarcinogenesis in mice [J]. Cancer Res, 1994, 54 (22) :5841.

[2] Toshihiko K, Ronald L, Vernon S E, et al. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer [J]. Cancer Res, 1999, 59 (3) :597.

[3] Selvam R, Subramanian L, Gayathri R, et al. The anti-oxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*) [J]. J Ethnopharmacol, 1995, 47 (2) :59.

[4] 顾吉晋, 邓英杰. 口服姜黄素脂质体制备及其大鼠体内药动学考察 [J]. 成都医学院学报, 2010, 5 (2) :97.

[5] 朱庆华, 刘彩霞, 陈婧, 等. 总姜黄素在大鼠体内的药动学研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2008, 27 (4) :266.

[6] 许汉林, 孙芸, 邵继征, 等. 姜黄素脂质体在大鼠体内药代动力学研究 [J]. 湖北中医学院学报, 2007, 9 (1) :42.

[责任编辑 全燕]