

[制 剂]

姜黄素-PLGA 纳米粒的制备与药效学评价

朱志新, 钱颖, 曹青日, 杨世林, 崔京浩*
(苏州大学医学部药学院, 江苏 苏州 215123)

摘要:目的 制备和考察姜黄素-聚乳酸/羟基乙酸纳米粒(Cur-PLGA NPs)对小鼠溃疡性结肠炎的影响。方法 乳化-溶剂挥发法制备 Cur-PLGA NPs,透射电镜观察外观形态,动态激光粒度分析仪分析微粒大小及分布,测定载药量。通过自由饮用5%硫酸葡聚糖钠(DSS)溶液7 d,诱导小鼠溃疡性结肠炎,考察 Cur-PLGA NPs对模型动物疾病活动指数(DAI)的影响。结果 姜黄素 PLGA 纳米粒的平均大小为(419±12)nm,载药量为(15.8±1.0)%。小鼠 DAI(第7天)从小到大顺序依次为:正常组<纳米粒高剂量组<5-氨基水杨酸组<混悬液组<纳米粒中剂量组<纳米粒低剂量组<阴性对照组。结论 姜黄素 PLGA 纳米粒对溃疡性结肠炎小鼠具有较好防治作用。

关键词:姜黄素;PLGA;纳米粒;溃疡性结肠炎;疾病活动指数;小鼠

中图分类号:R944

文献标志码:A

文章编号:1001-528(2011)05-0776-04

Preparation and pharmacodynamic evaluation of curcumin-PLGA nanoparticles

ZHU Zhi-xin, QIAN Ying, CAO Qing-ri, YANG Shi-lin, CUI Jing-hao*

(School of Pharmacy, Medical College of Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare and investigate curcumin loaded PLGA nanoparticles (Cur-PLGA NPs) on the ulcerative colitis (UC) in mouse. **METHODS** Cur-PLGA-NPs were prepared by modified emulsion-solvent evaporation method. The shape and size of Cur-PLGA-NPs were observed by TEM and dynamic laser scattering analyzer, respectively. Loading capacity of drug in nanoparticles was determined. UC model mice were induced by oral administration of 5% sodium dextran sulfate (DSS) for 7 days, the pharmacodynamic effect of Cur-PLGA NPs was investigated in terms of disease active index (DAI). **RESULTS** The average particle size and drug loading of nanoparticles were (419±12) nm and (15.8±1.0)%, respectively. The order of DAI on the 7th day from low to high was as follows, normal < Cur-PLGA NPs-High dose < 5-ASA < Cur suspension < Cur-PLGA NPs-Middle dose < Cur-PLGA NPs-Low dose < control group. **CONCLUSION** Curcumin-PLGA nanoparticles displayed therapeutic and prevent effect on UC in mouse.

KEY WORDS: curcumin; PLGA; nanoparticles; ulcerative colitis; disease active index; mouse

姜黄素(curcumin)为姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L. 的主要成分,是植物界很稀少的二酮类化合物(见图1),主要应用于食品染色剂及调味品等。在我国,姜黄应用于胸胁刺痛、闭经、风湿肩臂疼痛、跌打肿痛等症的中医治疗^[1]。目前,对姜黄素抗炎、抗氧化^[2]、保肝、抗肿瘤^[3-4]和抗溃疡性结肠炎(UC)^[5-6]等生理活性的现代研究非常活跃。但是,由于姜黄素存在难溶于水和稳定性差等性质,口服

不易吸收,其临床有效应用受到一定的限制。

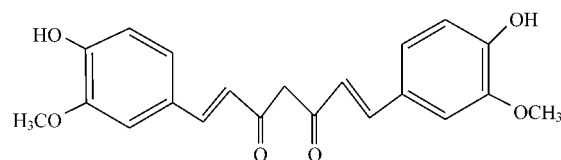


图1 姜黄素的结构式

Fig.1 The structure of curcumin

为了改善姜黄素的溶解度及稳定性,提高其生

收稿日期:2010-04-20

基金项目:科技部国际科技合作项目(2009DFA31330) 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-009)

作者简介:朱志新(1984—),女,硕士生,研究方向:药物新剂型与新技术。

* 通信作者:崔京浩(1966—),男,博士,教授,研究方向:药物新剂型与新技术。Tel:(0512)65882077, E-mail: jhcui@suda.edu.cn

物利用度,研究人员分别制备了姜黄素的羟丙基- β -环糊精包合物^[7]、自乳化微乳^[8]和固体分散体^[9]等。此外,因为UC部位黏液质分泌增加,免疫相关细胞数量的上升及消化道屏障的破坏与炎症组织膜通透性增加等因素,导致纳米粒对UC具有较好的定位聚集与靶向作用^[10]。本实验以生物可降解性高分子材料聚乳酸/羟基乙酸共聚物[poly(lactide-co-glycolide), PLGA]为载体材料,制备了姜黄素纳米粒(Cur-PLGA NPs),并考察了对硫酸葡聚糖钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导小鼠UC防治的影响。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(LC-20AD,日本岛津公司);透射电镜(TecnaiG220,美国FEI公司);激光粒度分析仪(HPP 5001,英国马尔文公司);分散机(IKA® T18,广州仪科实验室技术有限公司);冷冻干燥机(AIPHA I-4/LSC,德国CHRIST);涡旋器(MS2,广州仪科实验室技术有限公司)。

姜黄素(分析纯级,国药集团化学试剂有限公司);姜黄素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:200202);PLGA(MW = 22 000, LA/GA = 50/50,济南岱罡生物技术有限公司);PVA(17-88,化学纯,苏州市中远化工供销有限公司);吐温80(化学纯级,国药集团化学试剂有限公司);葡聚糖硫酸钠(DSS, MW 5000, Seebio Biotechnology);5-氨基水杨酸组(5-ASA, 楷洋生物有限公司)。

健康昆明种小鼠70只,体质量18~22g,雌雄各半,苏州大学实验动物中心提供(许可证号:SYXK-苏2007-0035)。

2 方法与结果

2.1 Cur-PLGA-NPs的制备

采用改良乳化-溶剂挥发法制备纳米粒^[11]。将处方量PLGA和Cur(5:1)共溶于二氯甲烷溶液中,作为有机相;PVA溶液(3% w/v, pH1.2)作为水相。有机相加至水相后,利用分散机高速搅拌(15 000 r/min, 3 min),再用探头超声仪处理,形成乳浊状分散体系,室温条件下磁力搅拌至挥发有机溶剂。低温高速离心(18 000 r/min, 20 min, 4℃),收集纳米粒,蒸馏水洗涤,冷冻干燥,则得Cur-PLGA-NPs。

2.2 姜黄素测定

2.2.1 标准曲线 精密量取适量姜黄素对照品丙酮溶液至10 mL的量瓶中,丙酮稀释至刻度,得1.0、3.0、5.0、10.0、15.0 mg/L系列质量浓度,在425 nm

波长处测定吸光度。以吸光度对药物浓度作图,得到回归曲线方程 $A = 0.1585C + 0.0181$ ($R^2 = 0.9999$, $n = 5$),可见姜黄素在1.0~15.0 mg/L范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.2.2 方法回收率 量取姜黄素供试品溶液,分别加入高、中、低3个浓度的姜黄素供试品溶液(1.0、5、10 mg/L)各3份,在425 nm波长处测定吸光度。测得3个浓度的姜黄素平均回收率分别为98.36%、100.90%、98.90%,RSD分别为3.61%、2.73%、2.13%。

2.3 Cur-PLGA-NPs的制剂学评价

2.3.1 外观形态 取1滴Cur-PLGA-NPs胶体溶液置于覆有支撑膜的铜网上,固定2~3 min后用滤纸小片从铜网边缘吸干多余的液体,经2%的磷钨酸液染色2~3 min,吸干多余染液,干燥,置于透射电镜下观察其形态(见图2)。Cur-PLGA-NPs呈圆形或椭圆形,大小均匀,无明显黏连现象。

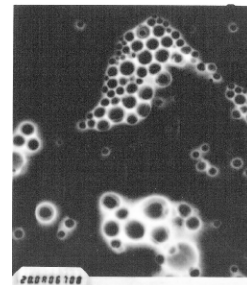


图2 Cur-PLGA-NPs透射电镜照片
Fig.2 TEM photo of Cur-PLGA-NPs

2.3.2 粒度分布 取适量Cur-PLGA-NPs胶体溶液,蒸馏水稀释,动态激光粒度分析仪测定其粒径大小及分布。结果显示,Cur-PLGA-NPs的平均粒径为(419 ± 12) nm,多分散系数为(0.29 ± 0.07)(见图3)。

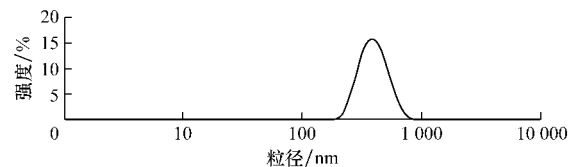


图3 Cur-PLGA-NPs的粒径分布
Fig.3 Size distribution of Cur-PLGA-NPs

2.3.3 载药量 精密称取约10 mg Cur-PLGA-NPs置于10 mL量瓶,加入丙酮,超声使其全部溶解,定容至刻度,稀释至适宜浓度,测定吸光度值,计算姜黄素的质量分数和载药量。测定结果,3批样品的平均载药量为(15.8 ± 1.0)%。

2.4 Cur-PLGA-NPs的药效学评价

将小鼠随机分为7组,每组10只,正常组服用蒸馏水,实验组自由饮用5% DSS溶液7d,形成溃疡性结肠炎模型^[12]。分组及给药剂量:阴性对照组(生理盐水) 阳性对照组:5-ASA,100 mg/(kg·d), Cur混悬液组:Cur-susp,100 mg/(kg·d), Cur-PLGA-NPs组-H:Cur-NPs-H,100 mg/(kg·d), Cur-PLGA-NPs组-M:Cur-NPs-M,50 mg/(kg·d), Cur-PLGA-NPs组-L:Cur-NPs-L,30 mg/(kg·d)。造模第2天开始,按照上述剂量每天灌胃给药一次^[6],测量小鼠体质量,仔细观察粪便状态及隐血情况。

根据表1标准进行评分,得出每组小鼠的疾病活动指数(Disease active index,DAI),以评价不同实验组内小鼠的疾病活动情况^[5]。

表1 DAI评分标准
Tab.1 The standard of DAI score

评分	体质量减少/%	粪便黏度	粪便隐血
0	—	正常	阴性
1	1~5	—	—
2	6~10	中等黏度	少量
3	11~15	—	—
4	>15	低黏度	明显

如表2所示,小鼠饮用DSS后,DAI值呈明显上升趋势。灌胃给药二次后(第4天),DAI值开始出现不同程度的下降。自第5天开始,服用5-氨基水杨酸组和高剂量纳米粒组对UC的防治效果较为明显。小鼠DAI(第7天)从小到大顺序如下,正常组<纳米粒高剂量组<5-氨基水杨酸组<混悬液组<纳米粒中剂量组<纳米粒低剂量组<阴性对照组。实验结果表明,纳米粒高剂量组的治疗效果优于等剂量姜黄素混悬液。

表2 药效学评价实验结果
Tab.2 The results of pharmacodynamic test

组别	时间/d						
	1	2	3	4	5	6	7
正常组	0.0	0.1	0.7	0.1	0.6	0.1	0.0
疾病模型组	1.3	2.1	4.9	5.7	6.7	7.0	7.1
5-氨基水杨酸	1.1	2.3	5.6	5.3	4.5	3.8	3.6
姜黄素混悬液	1.1	2.4	5.5	5.4	5.3	4.3	4.1
姜黄素纳米粒高剂量	1.0	2.1	5.4	4.9	4.2	3.0	3.0
姜黄素纳米粒中剂量	0.9	2.7	5.3	6.0	5.7	5.2	5.4
姜黄素纳米粒低剂量	1.0	2.5	5.3	5.6	5.5	6.4	6.8

3 讨论

本研究采用乳化-溶剂挥发法制备了姜黄素-PLGA纳米粒,其大小均匀,载药量较高。姜黄素的稳定性受环境pH值的影响,在低pH值条件下相对

稳定,随着pH值的上升,其降解速度明显加快^[13]。故制备姜黄素-PLGA纳米粒时采用了pH 1.2的PVA溶液。另一方面,也提示姜黄素口服制剂的研制应考虑其在消化道内的稳定性。

采用DSS诱导小鼠溃疡性结肠炎,与人类溃疡性结肠炎相对较接近,可作为研究致炎机理和抗炎药物筛选的模型,也可作为免疫机理和遗传学研究的模型^[14]。实验中发现,DSS诱导疾病模型速度快,造模成功率高,且对治疗药物的响应较敏感。姜黄素对UC具有较好的治疗效果,其机制可能与抗氧化、清除氧自由基,以及调控炎症因子IL-1 β mRNA和IL-10mRNA的表达等相关^[5-6]。初步药效学实验结果表明姜黄素纳米粒的治疗效果明显优于等剂量姜黄素混悬液组和5-ASA组,表明姜黄素纳米粒对炎症部位具有一定的选择性聚集即靶向作用。

参考文献:

- [1] 刘安昌, 姜红祥, 赵丽霞. 姜黄素药理活性及体内代谢[J]. 国外医药·植物药分册, 2004, 19(1):1-5.
- [2] 洪行球, 黄燕. 姜黄素结构修饰物调血脂与抗脂质过氧化作用研究[J]. 中国药理学杂志, 2007, 42(10):737-739.
- [3] Appiah-Opong R, Commandeur J, van Vugt-Lussenburg B, et al. Inhibition of human recombinant cytochrome P450s by curcumin and curcumin decomposition products [J]. *Toxicology*, 2007, 235(1-2): 83-91.
- [4] Miguel L. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: Considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(1): S103-S127.
- [5] 夏剑, 邓长生, 张明, 等. 姜黄素对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜内NF- κ B及TNF- α 表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(2):255-257.
- [6] 张明, 邓长生, 郑家驹, 等. 姜黄素对三硝基苯磺酸诱导的结肠炎模型细胞因子的影响[J]. 中华消化杂志, 2006, 26(11):731-734.
- [7] 高振坤, 王兰. 姜黄素-羟丙级- β -环糊精包合物的制备及其理化性质研究[J]. 中国药房, 2007, 18(13):999-1000.
- [8] Cui J, Yu B, Zhao Y, et al. Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems [J]. *Int J Pharm*, 2009, 371(1-2):148-55.
- [9] 韩刚, 王传胜, 张永, 等. 固体分散体提高姜黄素溶出度的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(7): 637-638.
- [10] Lamprecht A, Yamamoto H, Takeuchi H, et al. A pH-sensitive microsphere system for the colon delivery of tacrolimus containing nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2005, 104(2):337-346.
- [11] Budhian A, Siegel S, Winey K. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content [J]. *Int J Pharm*, 2007, 336(2):367-375.

- [12] Kwon K, Murakami A, Tanaka T, *et al.* Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 10 (15): 395-406.
- [13] 韩 刚, 崔静静, 毕 瑞, 等. 姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素稳定性研究[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33 (22): 2611-2614.
- [14] Dieleman L, Palmen M, Akol H, *et al.* Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium is characterized by Th1 and Th2 cytokines [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, 114 (3): 385-391.

不同相对截留分子量聚醚砜超滤膜精制黄连解毒汤效果的研究

须明玉, 彭稳稳, 钱智磊, 董 洁, 郭立玮*

(南京中医药大学中药复方分离工程重点实验室, 江苏 南京 210029)

摘要:目的 以黄连解毒汤(黄连、黄柏、黄芩和栀子)为研究对象,探讨采用不同相对截留分子量聚醚砜超滤膜处理后高分子物质和指标性成分变化规律以及药理作用差异,为优选黄连解毒汤超滤工艺研究提供依据。方法 逐级用 pes-5w、pes-3w、pes-2w、pes-6k 的超滤膜处理黄连解毒汤离心液,测定不同膜处理后渗透液和离心液中高分子物质(果胶和蛋白质)和药用指标性成分(栀子苷、黄芩苷、巴马汀和小檗碱)的质量分数及其对嗜铬细胞瘤(PC-12 细胞)缺血缺氧的保护和改善作用。结果 随着膜相对截留分子量的降低,各级渗透液的高分子物质的质量分数不同程度地降低;指标性成分的质量分数除黄芩苷逐级降低外,其他都呈升高趋势;pes-3w 的综合指标性成分质量分数最高;药理实验证明 pes-5w 渗透液对 PC-12 细胞缺氧缺血有很好的改善作用。结论 pes-5w 超滤膜既能有效去除非药用成分或药用性较差的物质,又能保留有效成分,适合于黄连解毒汤的精制。

关键词:黄连解毒汤;超滤;高分子物质;指标性成分;PC12 细胞

中图分类号:R284.2

文献标志码:A

文章编号:1001-1528(2011)05-0779-05

Study on refining Huanlian Jiedu Decoction with different relative molecular weight cutoff polyethersulfone ultrafiltration membranes

XU Ming-yu, PENG Wen-wen, QIAN Zhi-lei, DONG Jie, GUO Li-wei

(Key Laboratory of Separation Engineering for Chinese Medicine Compound, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effect of polyethersulfone ultrafiltration membranes with relative entrapping molecular weights on the refinement of Huanlian Jiedu Decoction (*Coptidis Rhizome*, *Phellodendri chinensis Cortex*, *Scutellariae Radix* and *Gardeniae Fructus*). **METHODS** The centrifugated extract of Huanglian Jiedu Decoction was tackled by different membranes including pes-5w, pes-3w, pes-2w, pes-6k in turn. The contents of polymeride matter (pectin and protein) and medicinal ingredients (gardsoside, scutellarin, palmatine and berberine) were used as markers. Besides, the protective effect against ischemia hypoxia was carried out on pheochromocytoma (PC12 cell line). **RESULTS** With the relative entrapping molecular weight membrane decreasing, the contents of polymeride decreased gradually. Meanwhile, the contents of medicinal ingredients increased except baicalin content and the filtrate of pes-3w was one of the best membrane for comprehensive analysis. The experiment of in vitro PC-12 cell showed that pes-5w had better protective effect against ischemia and hypoxia. **CONCLUSION** Ultrafiltration membrane of pes-5w can not only remove non-medicinal ingredients effectively, but also retain the active ingredi-

收稿日期:2010-07-08

基金项目:南京中医药大学基础科研项目(08XYC05);国家自然科学基金项目(30873450);江苏省教育厅青蓝工程资助项目

作者简介:须明玉(1985—),女,硕士生,主要从事生物药剂学和中药新药方面的研究。E-mail:xumingyubernadat@163.com

* 通信作者:郭立玮(1948—),男,教授,博士生导师,研究方向:中药制备高新技术,中药生物药剂学。E-mail:guoliwei815@yahoo.com.cn