

核细胞等产生细胞因子、促进杀灭肿瘤细胞等功能^[9]。TNF- α 的抗肿瘤机制是多方面的,目前发现主要有诱导凋亡、影响肿瘤血管系统和增强宿主免疫力3个方面^[11]。本研究发现鲜铁皮石斛生物碱、多糖提取物均可提高荷瘤小鼠血清中TNF- α 水平,提示其可能通过激活T细胞和刺激B细胞产生抗体,增强宿主免疫力而发挥抗肿瘤作用。数据显示,生物碱高剂量组、多糖高、中剂量组IL-2、TNF- α 水平与模型组比较,差异显著($P<0.05$),说明鲜石斛多糖类、生物碱类均有较强的细胞免疫功能。

表2中数据显示,鲜铁皮石斛多糖高剂量组、生物碱高、中剂量组的抑瘤效果显著,其中多糖高剂量组的抑瘤率最高,为33.4%。结合上述机制研究表明,鲜铁皮石斛生物碱、多糖提取物均可不同程度的抑制肿瘤细胞的生长,其中生物碱类主要通过调节机体的细胞免疫发挥抗癌作用,而多糖类则可通过对细胞免疫和体液免疫的双重调节发挥抗癌作用,因此作用效果更为显著。综上,鲜铁皮石斛提取物抗Lewis肺癌的机制,可能与2类成分共同作用机体,同时增强机体体液免疫与细胞免疫有关。

REFERENCES

[1] HAO J, CHEN W Q, MAO W M, et al. 2012 Chinese Cancer

- Registration Report(2012 中国肿瘤登记年报) [M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2012: 5-9.
- [2] MAO X L. Diagnose and treat by syndrome differentiation in traditional Chinese medicine to lung cancer [J]. Tradit Chin Med Today(现代中医药), 2012, 3: 28-34.
- [3] LI Y Y, JIA X W, GUO L Z. Exploration on pathological factors of lung cancer [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med (辽宁中医药大学学报), 2012, 14(2): 92-93.
- [4] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 265-266
- [5] JIANG Y L, LUO J P. Advances on pharmacological activities and chemical structures of polysaccharides from medicinal *Dendrobium* species [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2011, 22(12): 2986-2988.
- [6] XU Q, CHEN S H, LV G Y. Chemical components and the related pharmacological research progress in 3 different species of *Dendrobium* [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2010, 6(4): 117-118.
- [7] HE X Y, SHEN X R, LIU Q, et al. Antitumor effect of extracts from Compound Fomes fomentarius *in vivo* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(15): 170-173.
- [8] LIANG B B, LIU H G, CAO J T. Antitumor effect of polysaccharides from Cactus Pear Fruit in S₁₈₀-bearing mice [J]. Chin J Cancer(癌症), 2008, 27(6): 584-586.
- [9] ZHANG Y, RUAN L. Effects of cellular immunity, IL-2 and TNF- α from opioid drugs on hepatic cancer mice [J]. Cancer Res Prev Treatment(肿瘤防治研究), 39(12): 1433-1436.
- [10] RONG W. The research review in antitumor mechanism and clinical supervision of IL-2 [J]. J Liaoning Coll Tradit Chin Med(辽宁中医学院学报), 2006, 8(1): 99-100.
- [11] XIANG C Y, HE X Y, LI Z B, et al. Recent advance in the role of TNF- α in cancer [J]. Chin Bul Life Sci(生命科学), 2012, 24(3): 251-254.

收稿日期: 2013-09-18

三维有序大孔壳聚糖/尼莫地平固体分散体的研究

李传筠^{1,3}, 黄敏霞², 闫占宽¹, 张帆¹, 姜同英^{3*} (1.江苏恒瑞医药股份有限公司, 江苏 连云港 222047; 2.浙江海正药业股份有限公司, 浙江 台州 318000; 3.沈阳药科大学, 沈阳 110016)

摘要: 目的 制备孔径为 470 nm 的三维有序大孔壳聚糖/尼莫地平的固体分散体, 研究其释药特点、稳定性和药动学。方法 利用溶剂蒸发法制备固体分散体, 通过药物释放试验考察固体分散体在模拟胃肠液介质中的释放行为; 通过含量测定、X-射线衍射和溶出试验检查固体分散体的稳定性; 大鼠分别给予自制固体分散体和市售片粉末, 测定血药浓度。结果 固体分散体在 pH 6.8 的介质中的溶出度明显比 pH 1.2 和 pH 4.5 介质中高, 在梯度 pH 介质中的释药曲线类似阶梯型; 结晶度和溶出度在考察时间内基本无变化; 自制固体分散体的 AUC_{0-12h} 是市售制剂的 1.91 倍, 具有长效作用。结论 自制固体分散体稳定性良好, 能够提高尼莫地平的大鼠口服生物利用度。

关键词: 三维有序大孔壳聚糖; 固体分散体; 溶出; 稳定性; 尼莫地平

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)08-0957-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.012

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2009CB930300); 辽宁省教育厅重点实验室项目(LS2010161)

作者简介: 李传筠, 男, 工程师 Tel: 18036617868 E-mail: lichuanjun@hrs.com.cn *通信作者: 姜同英, 女, 博士, 副教授 Tel: (024)23986346 Email: tongyingjiangsy@163.com

Dissolution, Stability and Pharmacokinetics of Solid Dispersions Made from Three Dimensionally Ordered Macroporous Chitosan Matrix and Nimodipine

LI Chuanjun^{1,3}, HUANG Minxia², YAN Zhankuan¹, ZHANG Fan¹, JIANG Tongying^{3*} (1.Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd., Lianyungang 222047, China; 2.Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000, China; 3.Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare solid dispersions containing chitosan matrix with three dimensionally ordered 470 nm macroporous and nimodipine (3D-CS/NMDP), investigate the drug release, stability and pharmacokinetics. **METHODS** The solid dispersions were prepared by solvent evaporating method. The drug release behaviors of the 3D-CS/NMDP solid dispersions in artificial gastrointestinal fluid were examined by dissolution experiments. The chemical, crystal and dissolution stability was determined by X-ray diffraction method and dissolution method respectively. After orally administrating the 3D-CS/NMDP solid dispersions and commercial preparations, the plasma drug concentration of rat was measured. **RESULTS** The dissolution of the solid dispersion in pH 6.8 medium was largely higher than that in pH 1.2 and pH 4.5 medium. Drug release curve in gradient pH media expressed Ladder type. The crystallinity and dissolution of the solid dispersion hardly changed in test period. The 3D-CS/NMDP solid dispersions had 1.91 times AUC_{0-12h} of commercial preparations, and possessed prolonged action. **CONCLUSION** The self-made 3D-CS/NMDP solid dispersions have good stability, can markedly improve the bioavailability in rat after oral administration.

KEY WORDS: three dimensionally ordered macroporous chitosan; solid dispersion; dissolution; stability; nimodipine

三维有序大孔 (three-dimensionally ordered macroporous, 3DOM)材料, 是一类孔径 >50 nm 的新型的有序多孔材料, 其孔道排列整齐、有序, 孔径均一, 大小可在亚微米范围内调控^[1]。其相互连通的大孔孔道结构有利于物质从各个方向进入孔内, 降低物质扩散阻力, 促进物质的扩散。该结构特点使 3DOM 材料易于装载生物活性分子, 并且提供其向外扩散的孔道。迄今为止, 利用多糖类天然聚合物制备的三维有序大孔材料鲜有报道^[2]。与无机材料和合成材料相比, 天然聚合物在药物传递系统方面更具优势。如壳聚糖除具有易得性, 可降解性, 生物相容性等特点, 还具有良好的润湿性、生物膜黏附性、打开上皮细胞之间的紧密连接而增强药物的黏膜渗透作用等特点^[3-5], 该特点能促进药物的溶出和吸收。本研究以三维有序大孔(470 nm)壳聚糖(3D-CS)为载体, 以难溶性药物尼莫地平(nimodipine, NMDP)为模型药物, 将 NMDP 分散于载体的大孔孔道中, 期望该体系能提高药物的生物利用度, 同时还能使药物长期保持稳定。

1 仪器材料

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市子华仪器有限公司); JSM-6700 场发射扫描电子显微镜(日本电子株式会社); P/max-2500/PC X 射线衍射仪(日本 Rigaku Geigerflex); UV-2000 紫外-可见分光光度计(美国 UNICO 公司); RC-8D

型智能溶出测定仪(天津国铭医药设备有限公司)。

壳聚糖(玉环县海洋生物化学有限公司, 分子量: 13.44×10^4 , 脱乙酰度: 95%); 氢氧化钠、磷酸二氢钠、冰醋酸、醋酸钠、盐酸、十二烷基硫酸钠均为分析纯, 购自山东禹王试剂公司; $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜(上海亚东核级树脂有限公司); NMDP(浙江温州清明化工厂); 市售 NMDP 片(德国拜耳集团, 批号: 101185, 规格: 30 mg)。

SD 大鼠 12 只, δ , 体质量(250 ± 20)g, 由沈阳药科大学动物中心提供, 试验动物生产许可证号: SCXK-(京)-2009-0004。

2 方法与结果

2.1 3D-CS/NMDP 固体分散体的制备

按照文献[6]的方法制备孔径为 470 nm 的 3D-CS 载体。在乳钵中研磨载体, 筛分, 得到中位径(D_{50})为 $80 \mu\text{m}$ 的载体颗粒。将适量 NMDP 溶解于无水甲醇中, 使溶液最终浓度为 $50 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入适量 3D-CS(使 NMDP 和 3D-CS 的重量比为 1 : 0.5), 超声 10 min, 使混合物分散均匀。在室温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 和密闭条件下, $800 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 磁力搅拌混合物 10 h。然后 $200 \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌挥发除去甲醇, 即得 NMDP/3D-CS 固体分散体。将研磨过筛处理的 NMDP 原料药、3D-CS 载体和 NMDP/3D-CS 固体分散体粘到导电胶上, 喷金后通过扫描电子显微镜观察形貌, 结果见图 1。

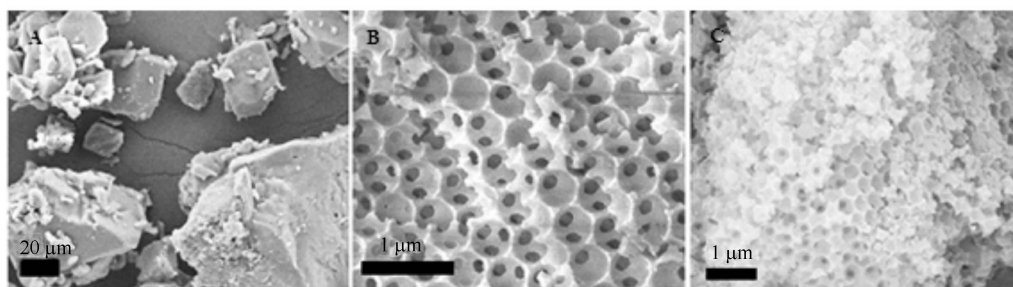


图1 NMDP原料药、3D-CS载体和NMDP/3D-CS固体分散体的扫描电镜照片
A-NMDP原料药; B-3D-CS载体; C-NMDP/3D-CS固体分散体。

Fig. 1 SEM images of crude NMDP, 3D-CS matrices and NMDP/3D-CS dispersions
A-crude NMDP; B-3D-CS matrices; C-NMDP/3D-CS.

2.2 药物释放研究

取相当于NMDP 20 mg的固体分散体和原料药,参照中国药典2010版二部附录XC第二法溶出度的测定方法操作,分别以含有0.3% SDS的pH 6.8、pH 4.5磷酸盐缓冲液和pH 1.2稀盐酸为溶出介质(900 mL),温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,转速为 $100 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,分别于5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min取溶出介质5 mL,立即补加等量等温的空白介质。溶出介质过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜,弃去初滤液,取续滤液,适当稀释,采用紫外分光光度法测定溶出介质的吸光度,按照标准曲线法计算药物含量。NMDP/3D-CS在不同介质中的释放曲线见图2。在pH 6.8介质中,NMDP溶出度可以达到90%,在pH 1.2和pH 4.5介质中的溶出速率明显慢于pH 6.8。而市售片剂粉末在中国药典2010版中规定:pH 4.5介质中45 min溶出90%药物。考察NMDP/3D-CS在模拟胃肠道pH值梯度变化的介质中的释药情况,释放曲线见图3。

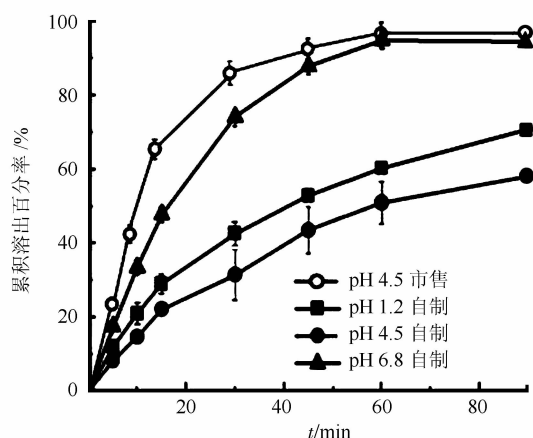


图2 自制NMDP/3D-CS固体分散体和市售片剂粉末在不同介质中的溶出曲线($n=3$)

Fig. 2 Drug dissolution curves of NMDP/3D-CS dispersions and commercial tablets powder in different media($n=3$)

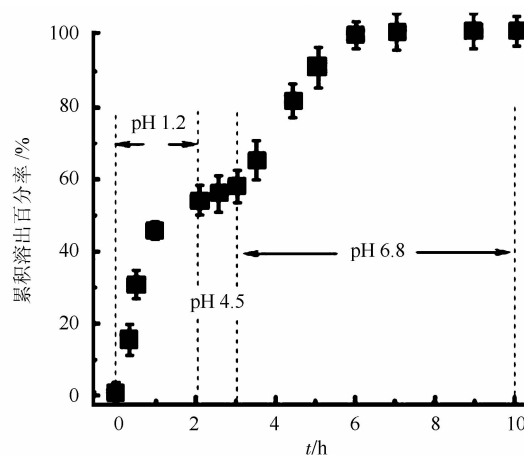


图3 NMDP/3D-CS固体分散体在模拟胃肠道pH值梯度变化介质中的释放曲线($n=3$)

Fig. 3 Drug release curves of NMDP/3D-CS dispersions in the release media of different pH values simulating the conditions all through the gastrointestinal environment($n=3$)

2.3 NMDP/3D-CS的稳定性考察

将适量NMDP/3D-CS粉末平铺于表面皿中,置于干燥器内,室温条件下避光放置。分别于第0, 3, 6, 12月取样,采用紫外分光光度法测定样品含量,0月时,NMDP/3D-CS固体分散体颜色为白色,含量为67.3%,与之相比,储存12月期间,固体分散体含量几乎无变化。采用“2.2”项下方法考察各样品在含0.3% SDS的pH 6.8磷酸盐缓冲液中的溶出度,结果见图4。

采用X-射线衍射法考察各样品的结晶度,X射线粉末衍射的工作条件:X射线衍射仪采用Cu-K α 靶,扫描速度为 $4\cdot\text{min}^{-1}$, 2θ 为 $5^\circ\sim 45^\circ$,加速电压为30 kV,管电流为30 mA,结果见图5。通过Jade 5.0软件计算药物的结晶度和晶粒大小,0月时,原料药的结晶度为92.92%,晶粒大小为29 nm,而NMDP/3D-CS的结晶度为50.97%,晶粒大小为14 nm。储存12月的NMDP/3D-CS的

X-射线粉末衍射图谱与 0 月时的相比, NMDP 的特征衍射峰($2\theta=10.4^\circ$)的强度无明显变化, 这表明 NMDP/3D-CS 固体分散体中药物结晶度和晶粒没有明显变化。

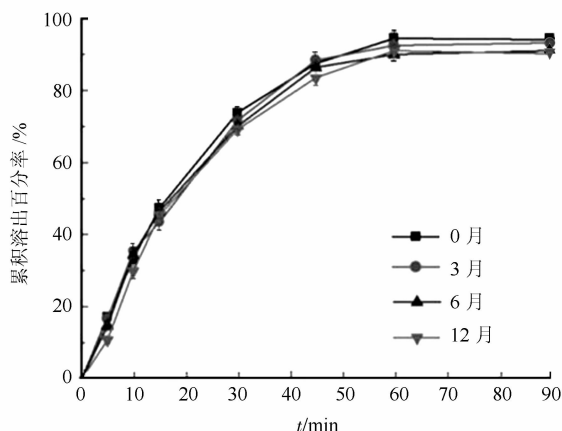


图 4 NMDP/3D-CS 固体分散体溶出曲线图
Fig. 4 Drug dissolution changes of NMDP/3D-CS dispersions

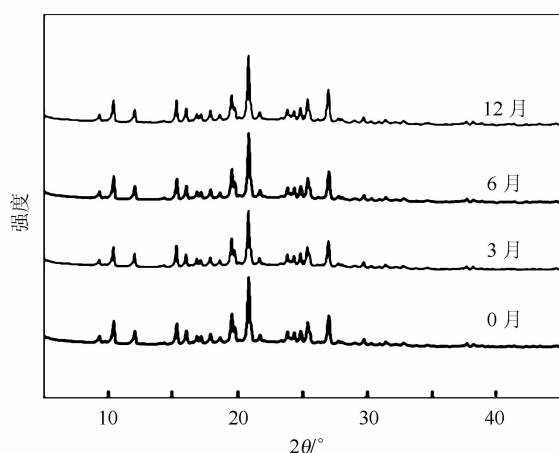


图 5 NMDP/3D-CS 固体分散体 XRD 图谱
Fig. 5 XRD patterns of NMDP/3D-CS dispersions

2.4 NMDP/3D-CS 体内药动学

健康 SD 大鼠 12 只(200~220 g), 随机分成 2 组。给药前 24 h 禁食, 自由饮水, 给药 8 h 后统一进食标准餐。分别灌胃给予 NMDP/3D-CS 固体分散体和 NMDP 市售制剂(尼莫同)粉末的混悬液, 给药剂量为 $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。给药后分别于 0, 0.1, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 眼眶静脉丛取血 0.3 mL, $4\,500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 分离上层血浆于 -20°C 冰箱保存备用。吸取 SD 大鼠血浆 0.1 mL, 加入 0.01 mL 内标溶液(以流动相配置的 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的尼莫地平溶液), 加入碱化液(pH 12 的氢氧化钠溶液)0.01 mL, 混匀, 加入有机溶剂(正己烷:乙醚=1:1)1 mL, 涡旋振荡 2 min,

$4\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上层有机相 0.8 mL, 避光下氮气吹干, 残留物用 $50 \mu\text{L}$ 甲醇溶解, 吸取 $20 \mu\text{L}$ 上清液, 注入高效液相色谱仪, 按照内标法测定血药浓度。色谱条件: 色谱柱为 Kromasil C_{18} (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(68:32); 流速为 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温为 40°C ; 检测波长为 236 nm; 进样量为 $20 \mu\text{L}$ 。大鼠口服市售尼莫同和自制尼莫地平固体分散体后各时间点所测得的峰面积代入标准曲线计算血药浓度, 平均血药浓度-时间曲线见图 6。

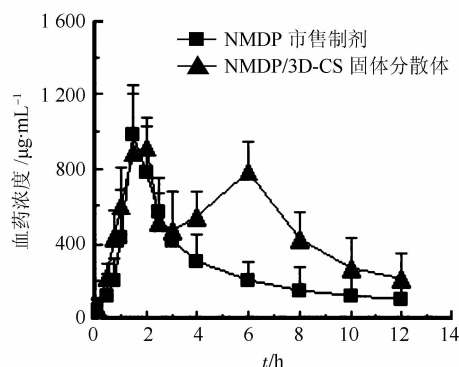


图 6 大鼠体内平均药时曲线图($n=6$)
Fig. 6 Mean plasma drug concentration-time curves after oral administration of NMDP/3D-CS and NMDP commercial preparations($n=6$)

主要药动学参数采用非隔室模型统计矩方法计算, 结果见表 2。NMDP/3D-CS 的 $\text{AUC}_{0-12 \text{ h}}$ 是市售尼莫同片的 1.91 倍, 有显著性差异($P<0.05$)。

表 2 主要药动学参数($n=6$)

参数	固体分散体	市售制剂
T_{max}/h	2.00 ± 0.10	0.96 ± 0.11
$C_{\text{max}}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	914.34 ± 113.43	980.32 ± 268.81
$\text{AUC}_{0-12 \text{ h}}/\text{h}\cdot\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$13\,467.41\pm 689.23$	$7\,051.09\pm 801.12$

3 讨论

固体分散体的扫描电镜照片显示, 只有少量药物晶体分布在骨架的表面。载药前载体的比表面积为 $95.72 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, 载药后变为 $20.98 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, 说明药物占据内部孔道而使其比表面积减小。吸附在骨架载体表面和浅层孔道的药物扩散路径短, 溶出迅速, 这是导致药物初期快速释放的原因。而在孔道深层的药物释放受到孔道大小、介质黏度、骨架溶蚀等因素的综合影响。

在 pH 1.2 介质中, 壳聚糖能够快速吸水, 溶胀成凝胶, 并伴随迅速的溶蚀过程^[7], 使孔道中的

介质黏度增大,阻碍药物的扩散。在 pH 4.5 条件下,部分壳聚糖凝胶化,凝胶层阻碍水分渗入^[8],壳聚糖溶胀也会使孔道变得狭小,不利于药物分子扩散,此双重因素导致药物释放最慢。壳聚糖在 pH 6.8 溶液中释药最快,溶出度达 90%以上。这是由于在此 pH 介质中,壳聚糖溶胀度小,网络较疏松,水力学体积较大,有更多的亲水性基团与水形成氢键,所以分子链能够吸收更多的水分子^[8],润湿作用明显,壳聚糖的孔道结构也没有明显变化(曾做过电镜表征),因此更利于药物溶解和扩散。药物在不同 pH 介质中的释放说明该固体分散体具有 pH 依赖性。在模拟胃肠道液的梯度 pH 介质中的释药显示,在模拟胃液 pH 1.2 介质中 2 h 释放 53%,主要是吸附在载体表面和接近载体表面孔道中的药物的释放,当 pH 调至 6.8 后,药物释放又开始加快,这主要是在此条件下,壳聚糖溶解度小,溶解或溶蚀的壳聚糖将会析出,狭小的孔道因凝胶化壳聚糖脱水皱缩也会变大,这两方面均有利于水分深入和药物分子扩散,导致药物释放加快。

XRD 结果表明药物被包载入 3D-CS 的亚微米孔道以后,其结晶度和药物晶粒大小比原料药晶体明显变小。可能是药物粒子被限制在载体的纳米孔道之中时,药物粒子的生长和聚集被阻滞。当药物的结晶度较低时,在放置过程中,药物结晶度可能会变大,晶粒也容易长大,进而影响制剂溶出或者释放稳定性。所以有必要考察 NMDP/3D-CS 固体分散体的稳定性。在考察期内,固体分散体的溶出稳定性和结晶稳定性良好,这主要归功于 3D-CS 纳米孔道对药物结晶的抑制,另一方面 3D-CS 与 NMDP 间形成的氢键也可以有效地抑制 NMDP 晶体的长大^[9]。

NMDP/3D-CS 的 AUC_{0-12h} 是 NMDP 市售片的 1.91 倍。NMDP/3D-CS 显著提高 NMDP 生物利用度的原因:壳聚糖的生物膜粘附性,使 NMDP 能够在胃肠道膜表面保持较高浓度,并且能够打开相邻上皮细胞之间的紧密连接;NMDP 除了以分子状态从载体中释放出来,在胃中 3D-CS 的溶蚀,部分 NMDP 有可能以纳米粒子形式释放。有研究表明,NMDP 纳米粒吸收进入肠上皮细胞的主要途径是通过大胞饮和小窝蛋白介导的内吞途径,能够显著提高生物利用度^[10]。这些都可以有效的促进药物在胃肠道的吸收。

通常,生理因素如不规则胃排空时间、肝肠循环和胃肠道中的多部位吸收可能是双峰现象的原因。NMDP/3D-CS 固体分散体的血药浓度-时间曲线呈现双吸收峰的原因:固体分散体进入胃液,壳聚糖被溶蚀,导致分布在外部孔道中和骨架表面的药物以分子和纳米粒形式快速释放而被胃肠道吸收产生 1 个吸收峰;而载药体进入肠道后,因 pH 升高,凝胶态壳聚糖因脱水而皱缩,致使 3D-CS 载体孔径重新变大,药物分子溶出阻力减小,致使载体内部的药物快速释放,从而产生第 2 个吸收峰。

REFERENCES

- [1] WU Q Z, SHEN Y, LIAO J F, et al. Synthesis and characterization of three-dimensionally ordered macroporous rare earth oxides [J]. *Mater Lett*, 2004, 58(21): 2688-2691.
- [2] ZHU Y, CAO H, TANG L, et al. Immobilization of horseradish peroxidase in three-dimensional macroporous TiO₂ matrices for biosensor applications [J]. *Electrochimica Acta*, 2009, 54(1): 2823-2827.
- [3] SCHIPPER N G, OLSSON S, HOOGSTRAATE J A, et al. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 2: Mechanism of absorption enhancement [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(7): 923-929.
- [4] MUTALIK S, ANJU P, MANOJ K, et al. Enhancement of dissolution rate and bioavailability of aceclofenac: A chitosan-based solvent change approach [J]. *Int J Pharm*, 2008, 350(1/2): 279-290.
- [5] LUESSEN H L, DE LEEUW B J, LANGEMEYER M W, et al. Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin *in vivo* [J]. *Pharm Res*, 1996, 13(11): 1668-1672.
- [6] XIE Y L, LIU Y L, WANG Y, et al. Chitosan matrix with three dimensionally ordered macroporous structure for nimodipine release [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(4): 1648-1655.
- [7] SOPPIMATH K S, KULKARNI A R, AMINABHAVI T M. Chemically modified polyacrylamide-g-guar gum-based crosslinked anionic microgels as pH-sensitive drug delivery systems: preparation and characterization [J]. *J Control Release*, 2001, 75(3): 331-345.
- [8] HUANBUTTA K, SRIAMORNSAK P, LIMMATVAPIRAT S, et al. Swelling kinetics of spray-dried chitosan acetate assessed by magnetic resonance imaging and their relation to drug release kinetics of chitosan matrix tablets [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 77(2): 320-326.
- [9] PAPAGEORGIOU G Z, BIKIARIS D, KARAVAS E, et al. Effect of physical state and particle size distribution on dissolution enhancement of nimodipine/PEG solid dispersions prepared by melt mixing and solvent evaporation [J]. *AAPS J*, 2006, 8(4): 623-631.
- [10] FU Q, KOU L, GONG C, LI M, et al. Relationship between dissolution and bioavailability for nimodipine colloidal dispersion: The critical size in improving bioavailability [J]. *Int J Pharm*, 2012, 427(2): 358-364.

收稿日期: 2013-12-12