

天然乳化剂阿拉伯胶对绿原酸自微乳体内外性能的影响^Δ

陈 莉*,侯成贤,杨燕飞(遵义医学院药学院,贵州 遵义 563003)

中图分类号 R945 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)25-3502-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.25.13

摘要 目的:研究天然乳化剂阿拉伯胶对绿原酸自微乳体内外性能的影响。方法:以阿拉伯胶逐步取代含非离子型乳化剂的绿原酸自微乳(简称“传统绿原酸自微乳”)中的聚山梨酯80制成含阿拉伯胶的绿原酸自微乳(简称“新型绿原酸自微乳”),评价两种自微乳的外观、乳滴形态、粒径、电导率、pH值、稳定性、体外释放度和肠吸收动力学指标。结果:新型绿原酸自微乳采用阿拉伯胶取代了聚山梨酯80处方量的50%。传统和新型绿原酸自微乳的微乳液外观澄清,乳滴为近似球形,粒径分别为(24.53±3.03)、(35.51±5.91) nm,电导率分别为(195.6±0.3)、(189.5±0.4) μs/cm,pH分别为3.87±0.02、4.08±0.03($n=3$)。与传统绿原酸自微乳比较,新型绿原酸自微乳在十二指肠、空肠、回肠中的吸收速率常数、有效渗透系数和吸收量均略有增加($P>0.05$),在结肠中的上述指标均明显降低($P<0.05$)。结论:新型绿原酸自微乳可保持传统绿原酸自微乳的性能,并能增加绿原酸在小肠的吸收。
关键词 阿拉伯胶;绿原酸;自微乳;粒径;体外释放度

Effect of Natural Emulsifier Acacia Senegal on *in vivo* and *in vitro* Performance of Chlorogenic Acid Self-microemulsion

CHEN Li, HOU Chengxian, YANG Yanfei (School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Guizhou Zunyi 563003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of natural emulsifier acacia senegal on *in vivo* and *in vitro* performance of chlorogenic acid self-microemulsion. METHODS: Chlorogenic acid self-microemulsion containing acacia senegal (“new chlorogenic acid self-microemulsion”) was prepared by using acacia senegal to gradually replace polysorbate 80 in chlorogenic acid self-microemulsion containing nonionic emulsifier (“traditional chlorogenic acid self-microemulsion”). The appearance, morphology, particle size, conductivity, pH value, stability, *in vitro* release and intestinal absorption kinetics of the 2 kinds self-microemulsions were evaluated. RESULTS: 50% of polysorbate 80 was replaced by acacia senegal in new chlorogenic acid self-microemulsion. The traditional and new chlorogenic acid self-microemulsions had clear appearance, and approximately spherical drops. Particle sizes were (24.53±3.03), (35.51±5.91) nm; dectrical conductivities were (195.6±0.3), (189.5±0.4) μs/cm; and pH were 3.87±0.02, 4.08±0.03 ($n=3$), respectively. Compared with traditional chlorogenic acid self-microemulsion, the absorption rate constant, effective permeability coefficient and absorption amount of the new one in duodenum, jejunum, ileum were increased a little ($P>0.05$); the above indexes in colon were obviously decreased ($P<0.05$). CONCLUSIONS: The new chlorogenic acid self-microemulsion can maintain the performance of traditional one, and increase absorption of chlorogenic acid in small intestine.
KEYWORDS Acacia senegal; Chlorogenic acid; Self-microemulsion; Particle size; *in vitro* release

绿原酸(Chlorogenic acid)又名咖啡鞣酸,具有抗菌、抗病毒、增加白血球、抗肿瘤、降血压、降血脂、清除自由基和兴奋中枢神经系统等作用^[1]。然而绿原酸存在结构不稳定、外排转运较强、动物体内代谢消除快(半衰期为0.2 h)等缺陷,导致其口服吸收差^[2-3],限制了其临床应用。为了提高绿原酸口服生物利用度,笔者前期研究中以非离子型表面活性剂(Non-ionic surfactant, NS)聚山梨酯80为乳化剂成功制备了自微乳给药系统(Self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS),所得含非离子型乳化剂的绿原酸自微乳(简称“传统绿原酸自微乳”)具有良好的自微乳特性,可促进绿原酸在小鼠

体内的吸收并改变其在组织中的分布^[2]。

在此基础上,笔者希望通过减少聚山梨酯80的用量来降低其可能引起的胃肠道毒性,故采用天然乳化剂(Natural emulsifying agent)阿拉伯胶替代聚山梨酯80制备了含阿拉伯胶的绿原酸自微乳(简称“新型绿原酸自微乳”)。本文主要考察阿拉伯胶对新型绿原酸自微乳体内外性能的影响,以期制备出高效、低毒的SMEDDS制剂。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); T9CS 双光束紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司); ZRS-8LD 智能溶出度测试仪(天津市天大天发科技有限公司); H-7650 透射电镜(日本日立公司); 90Plus 激光粒度仪(美国布鲁克海文仪器公司);

^Δ 基金项目:贵州省科学技术基金项目(No.黔科合J字 LKZ [2013]26号)

* 讲师,硕士。研究方向:药物新剂型与新制剂。电话:0851-28642515。E-mail:zmcccl@126.com

Spectra Max Plus384 全波长酶标仪(哈尔滨德远科技开发有限公司)。

1.2 药品与试剂

绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110753-200413,纯度:98%);绿原酸原料药(南京泽朗医药科技有限公司,批号:ZL131106582,纯度:96%);油酸乙酯(上海阿拉丁试剂公司,批号:B1626080,纯度:75%);聚山梨酯80(重庆川江化学试剂厂,批号:20160513,分析纯);丙三醇(成都市科龙化工试剂厂,批号:2014071601,分析纯);阿拉伯胶(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20130110,分析纯);Kcrebs-Ringer液(蒸馏水配制,1 L含NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、CaCl₂ 0.37 g、NaHCO₃ 0.22 g、MgCl₂ 0.22 g、葡萄糖 3.00 g,pH 7.4。其中CaCl₂单独溶解后逐滴加入,葡萄糖临用前加入);甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康SD大鼠,SPF级,♂,体质量(250±20)g,购自重庆第三军医大学医学实验中心,许可证号为SCXK(渝)2012-0005。大鼠实验前先适应性饲养1周。本实验已通过遵义医学院实验动物伦理委员会伦理审批。

2 方法与结果

2.1 绿原酸自微乳的制备

2.1.1 传统绿原酸自微乳的制备 参考文献[2]中的处方比例[油酸乙酯-聚山梨酯80-甘油(1:3:6,m/m/m)]称取油酸乙酯、聚山梨酯80和甘油适量,置于37℃水浴中混匀,于基质中加入适量绿原酸原料药(基质-绿原酸之比为1g:60mg)搅拌溶解即得传统绿原酸自微乳的预微乳。取预微乳1.0g滴入100mL37℃纯水中,于50r/min下温和搅拌得传统绿原酸自微乳液。

2.1.2 新型绿原酸自微乳的制备 在传统绿原酸自微乳的处方基础上,固定乳化剂总量不变,用阿拉伯胶逐渐取代聚山梨酯80的量(聚山梨酯80-阿拉伯胶之比为0.30:0、0.25:0.05、0.20:0.10、0.15:0.15、0.10:0.20、0.05:0.25、0:0.30),按“2.1.1”项下方法制得新型绿原酸自微乳液。以700nm波长处测定的透光率、体系中是否有油滴和10000r/min(离心半径6cm)离心10min后是否有沉淀为指标考察阿拉伯胶用量对新型绿原酸自微乳乳化性能的影响,从而确定阿拉伯胶的用量。阿拉伯胶用量对新型绿原酸自微乳乳化性能的影响结果见表1。

表1 阿拉伯胶用量对新型绿原酸自微乳乳化性能的影响

Tab 1 Effect of acacia senegal amount on emulsifying property of chlorogenic acid self-microemulsion					
处方编号	聚山梨酯80用量,g	阿拉伯胶用量,g	透光率,%	油滴	沉淀
1	0.30	0	98.8	无	无
2	0.25	0.05	96.6	无	无
3	0.20	0.10	96.0	无	无
4	0.15	0.15	95.2	无	无
5	0.10	0.20	84.3	无	无
6	0.05	0.25	75.4	有	少许
7	0.00	0.30	70.2	有	少许

由表1显示,随着阿拉伯胶用量的增加,新型绿原酸自微乳的透光率降低、稳定性也变差。为了尽可能减少聚山梨酯80的用量同时又能保证乳化剂的乳化能力,最终确定阿拉伯胶取代聚山梨酯80处方量的50%,即新型绿原酸自微乳处方比例为油酸乙酯-聚山梨酯80-阿拉伯胶-甘油(1:1.5:1.5:6,m/m/m)。

2.2 体外评价

2.2.1 形态、粒径、电导率及pH值 取“2.1.1”“2.1.2”项下传统绿原酸自微乳液和新型绿原酸自微乳液适量,采用透射电镜^[4]、激光粒度仪、电导仪及pH计检测两种微乳液的外观、乳滴形态、粒径大小、电导率和pH值。结果显示,两种绿原酸自微乳液外观澄清,乳滴为近似球形;粒径均呈正态分布,其中传统绿原酸自微乳的粒径为(24.53±3.03)nm、电导率为(195.6±0.3)μs/cm、pH为3.87±0.02,而新型绿原酸自微乳的粒径为(35.51±5.91)nm、电导率为(189.5±0.4)μs/cm、pH为4.08±0.03(n=3)。与传统绿原酸自微乳比较,新型绿原酸自微乳的淡蓝色乳光更加明显,粒径明显增大(经配对t检验,P<0.05),但电导率及pH无明显变化。两种绿原酸自微乳的外观和透射电镜图见图1。

外观:

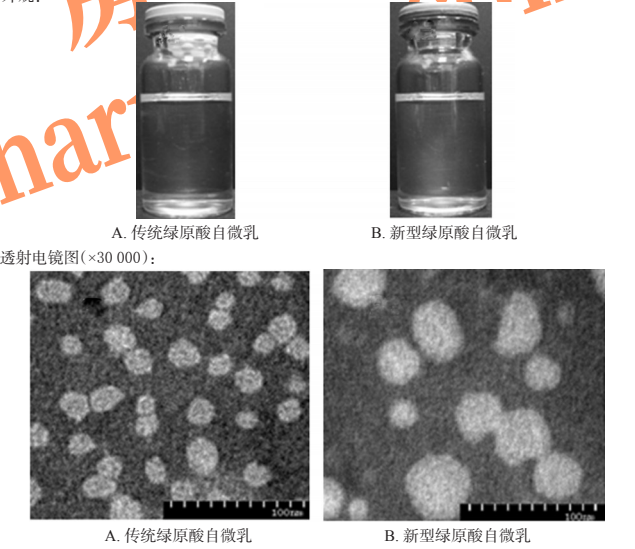


图1 两种绿原酸自微乳的外观和透射电镜图
Fig 1 Appearance and transmission electron microscopy of 2 kinds of chlorogenic acid self-microemulsions

2.2.2 稳定性 取“2.1.1”“2.1.2”项下传统绿原酸自微乳和新型绿原酸自微乳的预微乳,密封储存于4、25、37℃下,分别于0、10、20、30d各取1.0g,按“2.1.1”项下方法制成自微乳液。观察自微乳液是否澄清,有无沉淀、分层,含量是否有变化,以判断绿原酸预微乳的稳定性。结果显示,密封储存于不同温度、不同时间的两种预微乳制备成微乳液后,均未见沉淀、分层现象发生,药液澄清均一、显淡蓝色乳光,绿原酸含量未出现明显下降(RSD<3.42%,n=4),表明两种绿原酸预微乳于30d

内稳定性良好。

2.2.3 体外释放度 将内含 5 mL 释放介质(纯水、pH 1.2 盐酸溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液)的透析袋(截留分子量:8 000~14 000)完全浸入释放介质中,平衡 12 h。取传统绿原酸自微乳和新型绿原酸自微乳的预微乳各 1.0 g 加至透析袋中,置于 37 ℃ 1 000 mL 释放介质中,设转速为 100 r/min。分别于 10、20、30、60、120、240、480、600 min,取透析袋外释放介质 5.0 mL(每次取样后补充相应体积的新鲜释放介质),经 0.22 μm 滤膜过滤后,以紫外分光光度法于 327 nm 波长处测定绿原酸的吸光度,计算绿原酸含量,绘制释放曲线^[5]。结果显示,在不同介质中,两种绿原酸自微乳的释放均不受释放介质 pH 的影响;而在相同介质中,传统绿原酸自微乳的释放整体快于新型绿原酸自微乳,表明阿拉伯胶取代 50% 的聚山梨酯 80 后能够延缓绿原酸的释放,延长药物的作用时间。两种绿原酸自微乳的体外释放曲线见图 2。

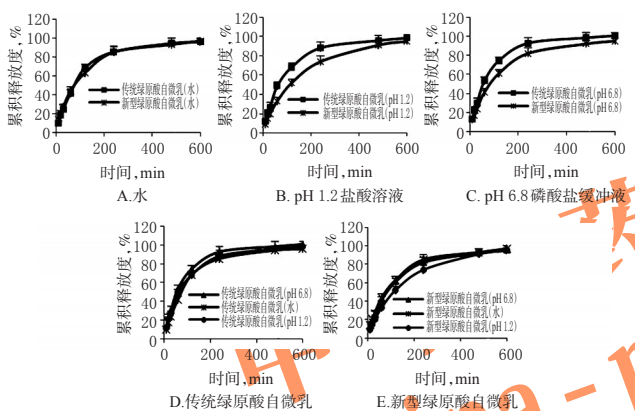


图2 两种绿原酸自微乳的体外释放曲线

Fig 2 *in vitro* release curves of 2 kinds of chlorogenic acid self-microemulsions

2.3 在体肠吸收评价

2.3.1 色谱条件 DIKMA Platisil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.4%磷酸(15:85, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:327 nm;柱温:25 ℃;进样量:20 μL。

2.3.2 方法学考察 以空白 Kcrebs-Ringer 液进行肠灌流得空白肠液,分别取空白肠液、绿原酸对照品溶液及大鼠肠灌流样品经 0.22 μm 滤膜过滤后取续滤液 20 μL 进样分析。结果显示,绿原酸的保留时间为 8.5 min,空白肠液及肠道分泌物对绿原酸的测定无干扰;以绿原酸的质量浓度(x)对其峰面积(y)进行回归分析,回归方程为 $y=56.301x-5.186$ ($R^2=0.999\ 1$),绿原酸检测质量浓度的线性范围为 5.60~16.80 μg/mL;平均回收率为 94.64% (RSD=4.83%, $n=3$);日内 RSD 为 5.09% ($n=5$),日间 RSD 为 5.89% ($n=3$),稳定性试验 RSD 为 4.64% ($n=5$)。

2.3.3 供试液的制备 取传统绿原酸自微乳和新型绿原酸自微乳的预微乳适量,在 37 ℃ 搅拌条件下分别缓

慢滴入 Kcrebs-Ringer 液中使乳化完全,即得相应自微乳的灌流液(绿原酸质量浓度为 56.60 μg/mL)。

2.3.4 大鼠在体单向肠灌流模型制备 大鼠禁食过夜,自由饮水,按 1.4 g/kg ip 1% 戊巴比妥钠溶液(40 mg/kg)麻醉,于胸骨下 1.5 cm 左右沿腹中线打开腹腔约 5 cm,找出十二指肠、空肠、回肠和结肠段,各肠段约取 10 cm,均两端作切口,先近胃端插管结扎,用适量 37 ℃ 的生理盐水将肠内容物冲洗干净后,再于远胃端插管,结扎。将肠管摆成“U”型,尽可能避免卷曲和扭结,用生理盐水润湿过的纱布覆盖肠管以保湿,于红外灯下保温。

2.3.5 大鼠在体单向肠灌流实验 利用“2.3.4”项下制备的大鼠在体单向肠灌流模型,采用改良重量法^[6]检测大鼠肠吸收动力学指标。灌流液置于 37 ℃ 恒温水浴,先以 1.0 mL/min 灌流 10 min,再调整流速至 0.2 mL/min 平衡 30 min,然后进口处换成装有灌流液的已知质量的瓶子进行灌流。出口处用已知质量的空瓶收集样品,每隔 20 min 同时迅速更换下一对小瓶,共收集 120 min。称取进口瓶和出口瓶的最终质量,计算灌入和收集的药液质量,再从上述两种药液中各吸取 0.5 mL,称质量,计算药液密度。取样结束后剪开肠管测量其长度和宽度。所收集样品经 10 000 r/min(离心半径为 6 cm)离心 10 min,测定上清液中绿原酸的质量浓度。

2.3.6 数据分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。按公式计算绿原酸的吸收速率常数(K_a)、有效渗透系数(P_{eff})和吸收量(M_a), $C_{\text{out}}(\text{corrected})=C_{\text{out}}V_{\text{out}}/V_{\text{in}}$, $K_a=Q(1-C_{\text{out}}(\text{corrected})/C_{\text{in}})/\pi r^2$, $P_{\text{eff}}=Q\ln[(C_{\text{in}}/C_{\text{out}}(\text{corrected}))]/2\pi r l$, $M_a=20Q(C_{\text{in}}-C_{\text{out}})/2\pi r l$, 式中: V_{in} 、 V_{out} 分别为肠道进出口灌流液的体积(mL); M_{in} 、 M_{out} 分别为肠道进出口灌流液的质量(g); ρ_{in} 、 ρ_{out} 分别为肠道进出口灌流液的密度(g/mL); $C_{\text{out}}(\text{corrected})$ 和 C_{out} 分别为出口处绿原酸经校正后的质量浓度和实测质量浓度(μg/mL); C_{in} 为灌流液中绿原酸的质量浓度(μg/mL); Q 为肠灌流速度 0.2 mL/min; l 和 r 分别为被灌流肠段的长度和内径(cm)。两种绿原酸自微乳在不同肠段的吸收参数结果见表 2。

表2 两种绿原酸自微乳在不同肠段的吸收参数结果 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 2 Absorption parameters of 2 kinds of chlorogenic acid self-microemulsions in different intestinal segments ($\bar{x}\pm s, n=6$)

样品	参数	十二指肠	空肠	回肠	结肠
传统绿原酸自微乳 (56.60 μg/mL)	$K_a, \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	2.50±1.05	1.87±0.67	3.53±1.25	4.41±2.01
	$P_{\text{eff}}, \times 10^{-3} \text{ cm/min}$	2.89±0.87	1.79±0.75	3.59±1.16	5.77±1.99
	$M_a, \text{mg/cm}^2$	2.79±1.24	2.09±0.69	3.86±1.13	6.24±2.34
新型绿原酸自微乳 (56.60 μg/mL)	$K_a, \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$	4.01±2.04	3.15±1.27	4.75±1.71	1.92±0.84*
	$P_{\text{eff}}, \times 10^{-3} \text{ cm/min}$	4.38±1.94	2.82±0.84	4.66±2.04	2.28±0.77*
	$M_a, \text{mg/cm}^2$	3.40±1.55	2.67±0.97	4.22±1.12	2.28±1.14*

注:与传统绿原酸自微乳比较, * $P<0.05$

Note: vs. traditional chlorogenic acid self-microemulsion, * $P<0.05$

由表2可知,两种绿原酸自微乳在各个肠段均有吸收,其中传统绿原酸自微乳的吸收结果排序为结肠>回肠>十二指肠>空肠,而新型绿原酸自微乳的吸收结果排序为回肠>十二指肠>空肠>结肠。结果表明,新型绿原酸自微乳能够提高药物在小肠的吸收,但其在结肠的 K_a 、 P_{eff} 、 M_a 则明显低于传统绿原酸自微乳($P<0.05$)。

3 讨论

SMEDDS中高浓度乳化剂(30%~60%)引起的毒性是限制其应用的主要因素之一。为了解决这一关键问题,有学者提出采用安全无毒的天然乳化剂来全部或者部分替代合成乳化剂的思路^[5,7],研究表明,该思路具有一定的可行性。阿拉伯胶是常用的天然乳化剂之一,能吸附在油/水界膜上形成一层强亲水性多分子乳化膜,不仅能阻止乳滴的合并,而且能增加分散介质的黏度,使乳剂更稳定^[8]。因此笔者采用阿拉伯胶逐步取代传统绿原酸自微乳中的聚山梨酯80。结果表明,阿拉伯胶的乳化能力较弱,混合乳化剂的乳化能力会随着阿拉伯胶用量的增加而下降,同时亦会导致新型绿原酸自微乳的粒径增大、比表面积减小,使得药物释放速度降低^[5]。为了保证混合乳化剂的乳化性能,最终采用阿拉伯胶取代50%聚山梨酯80的用量。

本实验采用的大鼠在体单向肠灌流模型是美国FDA认可的研究药物吸收代谢的两大模型之一^[9]。相关文献提出,大鼠对药物吸收的 $P_{eff}<1.8\times10^{-4}$ cm/min时表示药物难以被吸收, $P_{eff}>1.2\times10^{-3}$ cm/min时表示药物易于吸收^[9-10]。本研究所得4个肠段的 P_{eff} 均大于 1.2×10^{-3} cm/min,因此可认为传统绿原酸自微乳和新型绿原酸自微乳中的绿原酸在4个肠段均易于吸收。与传统绿原酸自微乳比较,新型绿原酸自微乳在小肠的吸收有所提高,这与体外释放结果不一致,其原因可能如下:(1)阿拉伯胶可使乳滴更易被吸附于肠黏膜,使药物较快通过肠黏膜水化层,进而与肠黏膜接触并促使其吸收^[6],有效克服了绿原酸因难以快速分布到小肠刷状缘膜上^[11]而影响其吸收;(2)新型绿原酸自微乳乳滴粒径增大,可促使其向淋巴系统转运;(3)聚山梨酯80乳化能力强,能够通过调节混合乳化剂的水油度(HLB值)、抑制P糖蛋白外排、改变细胞膜的微黏度和破坏膜蛋白的二、三级结构^[12]等方式,促进药物的跨膜转运,与阿拉伯胶发挥协同促渗透作用;(4)肠道内环境较体外释放介质更为复杂,如肠道pH、菌群和酶等都可能影响药物的释放与吸收,从而造成体内结果不一致。具体的促吸收机制仍有待进一步考察。

综上所述,本试验成功制备了新型绿原酸自微乳,该处方中阿拉伯胶与聚山梨酯80复配既能增强阿拉伯胶的乳化性能,降低聚山梨酯80的细胞毒性,亦能促进绿原酸的吸收,为突破SMEDDS的难题并促进其开发应用提供了有利依据。乳化剂的复配,为提高药品质量、满足市场需求,也为乳化剂在制药工业中的广泛应用提供了新思路

参考文献

- [1] 毕肖林,李瑶瑶,杜秋,等.绿原酸表观油水分配系数测定及在体肠吸收动力学研究[J].南京中医药大学学报,2013,29(6):572-575.
- [2] Chen L, Liu CS, Chen QZ, et al. Characterization, pharmacokinetics and tissue distribution of chlorogenic acid-loaded self-microemulsifying drug delivery system[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, doi: 10.1016/j.ejps.2017.01.011.
- [3] Jung JW, Kim JM, Jeong JS, et al. Pharmacokinetics of chlorogenic acid and corydiline in DA-9701, a new botanical gastroprokinetic agent, in rats[J]. *Xenobiotica*, 2014, 44(7):635-643.
- [4] 李蓉蓉,王小利,郭申娥,等.坎地沙坦酯自微乳的制备及其体外评价[J].中国新药杂志,2012,21(2):170-174.
- [5] 黄嗣航,龙晓英,袁飞,等.含天然乳化剂的盐酸小檗碱自微乳的制备与体内外性能评价[J].中国新药杂志,2012,21(23):2794-2799.
- [6] 黄嗣航,龙晓英,袁飞,等.酚红法和改良重量法分别研究葛根素的大鼠在体肠吸收机制[J].广东药学院学报,2012,28(6):603-607.
- [7] 黄嗣航,龙晓英,袁飞,等.含天然乳化剂的新型葛根素自微乳与传统自微乳体内外性能的对比研究[J].中国药理学杂志,2014,49(17):1530-1534.
- [8] 方亮.药剂学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2016:122.
- [9] 黄立华,王建,张璐,等.远志水解产物的大鼠肠吸收特性和机制研究[J].中药材,2015,38(3):556-561.
- [10] 张洪敏,莫舒,韩馥蔓,等.在体单向灌流法研究ZYS-01的大鼠肠吸收特性[J].中国药理学杂志,2016,51(13):1143-1147.
- [11] 任静,邓盛齐,蒋学华,等.吸收促进剂对绿原酸的跨膜转运影响[J].药学学报,2014,49(2):252-255.
- [12] 陈莉,周鑫,申登峰,等.绿原酸自微乳给药系统的处方设计与体外评价[J].遵义医学院学报,2015,38(4):387-391.

(收稿日期:2017-03-12 修回日期:2017-05-16)

(编辑:邹丽娟)