

· 药剂与炮制 ·

左旋棉酚在模拟人体胃肠道环境及生物样品中的稳定性考察

吴冰冰, 唐辉*, 张博, 冯荣

(石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆石河子 832000)

[摘要] 目的:考察左旋棉酚在不同生理 pH 及不同生物介质中的体外稳定性,为该药物的制剂开发提供参考。方法:取左旋棉酚分别在不同生理(pH 1.2~8.0)的缓冲液、人工胃肠液、离体生物介质中进行孵育,利用 HPLC 测定不同介质中左旋棉酚的含量变化,流动相乙腈-0.3% 甲酸水溶液(80:20),检测波长 234 nm,考察左旋棉酚的降解情况及酶稳定性,建立其降解速率方程。结果:左旋棉酚在 pH 1.2 盐酸溶液、模拟人工胃液及大鼠离体胃内容物中未出现明显降解,孵育 12 h 后降解率均 <10%,左旋棉酚孵育 12 h 后在 pH 6.8,7.4,8.0 磷酸盐缓冲液中的降解率分别为 64.7%,78.6%,84.4%,且在离体大鼠小肠、大肠内容物及肝组织匀浆中极不稳定,发生了较大程度降解,8 h 后分别降解 81.3%,96.9%,97.3%。降解特征类似于其在不同生理 pH 的缓冲液中。结论:左旋棉酚在碱性环境中明显降解而在酸性环境中不易降解;在大鼠胃内容物中较稳定,而在小肠、大肠菌群及肝脏中极易降解。

[关键词] 左旋棉酚;生物样品;稳定性;磷酸盐缓冲液;人工胃液

[中图分类号] R283.6;R284.1;R945;V216.1+3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0001-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016180001

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160727.1606.016.html>

[网络出版时间] 2016-07-27 16:06

Stability of (–)-Gossypol in Simulated Conditions of Human Stomach, Intestines and in Biological Fluids *in Vitro*

WU Bing-bing, TANG Hui*, ZHANG Bo, FENG Rong

(Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education, College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the *in vitro* stability of (–)-gossypol in different physiological pH and biological sample. **Method:** (–)-Gossypol was incubated in different phosphate buffer solutions with pH of 1.2-8.0, artificial gastrointestinal fluid and isolated biological media. The concentration of (–)-gossypol was determined by HPLC to investigate the degradation kinetics and the enzymatic stabilities of (–)-gossypol. **Result:** (–)-Gossypol was stable in pH 1.2 dilute hydrochloric acid solution, artificial gastric juice and ingastric contents, after 12 h of incubation, degradation rate of (–)-gossypol was less than 10%. (–)-Gossypol was unstable in phosphate buffer solutions at pH 6.8, 7.4 and 8.0 after 12 h of incubation. The degradation rates of (–)-gossypol in small intestinal contents, large intestine contents and liver homogenates were 81.3%, 96.9% and 97.3% after 8 h, degradation profiles of (–)-gossypol in gastric contents, small intestinal contents, large intestine contents and liver homogenates were similar to that in the aqueous buffer. **Conclusion:** (–)-Gossypol is stable in acid environment, but it is unstable in phosphate buffer solutions at

[收稿日期] 20151020(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260627);新疆生产建设兵团博士基金项目(2009JC14)

[第一作者] 吴冰冰,在读硕士,从事药物分析及新药研究,Tel:15609937008,E-mail:331626496@qq.com

[通讯作者] *唐辉,博士,教授,从事药物分析及新药研究,Tel:0993-2057878,E-mail:Th_pha@shzu.edu.cn

different pH. (-)-Gossypol is stable in gastric contents, but it is unstable in liver homogenate, small intestine and large intestine bacteria.

[**Key words**] (-)-gossypol; biological samples; stability; phosphate buffer; simulated gastric fluid

棉酚是一种黄色多酚羟基双萜醛类化合物,存在于锦葵科棉属植物中^[1],在抗肿瘤、抗炎、抗病毒等方面具有较强的生物活性,临床用于治疗前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌等^[2-3]。近年来棉酚的抗肿瘤作用成为了研究热点。天然棉酚一般以外消旋体棉酚形式存在,消旋棉酚存在 2 种光学活性异构体,分别为左旋棉酚和右旋棉酚。研究揭示右旋棉酚无生物活性;左旋棉酚才是对细胞杀伤作用的真正活性物质,具有广谱的抗肿瘤活性^[4]。虽然左旋棉酚在体内外药理活性方面已有较多报道,但关于其临床应用方面的报道较少。由于左旋棉酚结构中存在酚羟基等不稳定的官能团,易氧化且可能被酸、碱或酶降解,且水溶性差,这都限制了其在临床上的应用。本实验通过考察左旋棉酚在不同 pH 体液环境,模拟人工胃肠液,大鼠离体胃、小肠、大肠及肝脏组织匀浆中的代谢降解情况,阐明影响其体内稳定性的因素,揭示该成分在体内的可能代谢部位,为左旋棉酚体内处置过程提供一定基础性依据,并对其剂型选择和生物利用度改善有重要指导意义。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), TGL-16G 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂), 5430R 型台式高速冷冻离心机(德国艾本德公司), FSH-2 型可调高速匀浆机(江苏金坛市环宇科学仪器厂), HGC-24A 型氮气吹干仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。左旋棉酚(自制,批号 20141009,纯度 >95%),胃蛋白酶、胰蛋白酶(北京博奥拓达科技有限公司),二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(南京建成生物工程研究所),甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

清洁级 SD 大鼠,雄性,体重(250 ± 10) g,新疆医科大学实验动物中心提供,合格证号新医动字第 2014-0001 号。

2 方法与结果

2.1 人工胃、肠液和空白生物样品的制备

2.1.1 人工胃液 取稀盐酸(取盐酸 234 mL,加水稀释到 1 L)16.4 mL,加水约 800 mL,取胃蛋白酶 10 g,摇匀后加水稀释至 1 L,即得^[5]。

2.1.2 人工肠液 取磷酸二氢钾 6.8 g,加水 500 mL 使溶解,用 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH

6.8;另取胰酶 10 g,加水适量使溶解;将两溶液混合后加水稀释至 1 L,即得^[6]。

2.1.3 空白生物样品^[7-8] 取 SD 大鼠禁食不禁水 12 h 以上,乙醚麻醉,经腹腔主动脉取血处死,迅速取出胃、小肠、大肠和肝脏至冰浴中备用。分别用适量冰冷的 pH 1.2 盐酸溶液, pH 6.8 和 8.0 磷酸盐缓冲液冲洗大鼠胃、小肠及大肠,收集内容物及黏膜组织。将上述内容物及组织匀浆于 4 ℃ 冷冻离心(5 000 r·min⁻¹, 15 min,下同),取上清液,采用 BCA 试剂盒测定蛋白含量,分别用相应 pH 的溶液调节蛋白质质量浓度至 1.2 g·L⁻¹,作为空白生物样品。用注射器吸取冰浴冷却的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液,经门静脉注入肝脏,灌流,除去肝中血液。用冰浴冷却的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液洗净,滤纸吸干外部水分,剪碎称重,加入 10 倍量冰浴冷却的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液,冰浴条件下制备组织匀浆。4 ℃ 冷冻离心,取上清液,得空白大鼠肝组织匀浆。所有空白生物样品临用前新鲜制备,所有实验操作均在 < 4 ℃ 条件下进行。

2.2 样品的处理 取孵育样品 0.2 mL,立即加入冰冷乙腈 0.6 mL 终止反应,漩涡 5 min,4 ℃ 冷冻离心(1 万 r·min⁻¹, 15 min)后,过 0.22 μm 微孔滤膜,立即取上清液进样分析。

2.3 左旋棉酚的含量测定

2.3.1 色谱条件 XBridge Shield RP18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.3% 甲酸水(80:20),进样量 20 μL,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 ℃,检测波长 234 nm。

2.3.2 标准曲线的绘制 精密称取适量左旋棉酚对照品,配制系列质量浓度的对照品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 183\ 607 X - 907\ 980$ ($R^2 = 0.999\ 5$),线性范围 3.50 ~ 224 mg·L⁻¹。

2.3.3 专属性考察 分别对空白人工胃液、空白人工肠液、空白大鼠胃内容物、空白大鼠小肠内容物、空白大鼠大肠内容物及空白肝组织匀浆中待测成分的色谱专属性进行分析,结果表明左旋棉酚出峰时间约 10.9 min,各生物介质不干扰该成分的测定。

2.3.4 精密度考察 取高、中、低质量浓度的左旋棉酚对照品溶液(0.112, 0.028, 0.007 g·L⁻¹),按

2.3.1 项下色谱条件重复进样 6 次。计算峰面积的 RSD 分别为 0.2% ,0.4% ,0.3% 。表明仪器精密良好。

2.3.5 回收率考察 精密吸取 9 份含药样品 (45.43 mg·L⁻¹左旋棉酚)400 μL,分别加入左旋棉酚对照品溶液 (36.34,45.43,54.52 mg·L⁻¹)400 μL,按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算平均回收率 100.5% ,RSD 2.4% ,表明该方法符合测定要求。

2.4 左旋棉酚在不同生理 pH 缓冲液中的稳定性试验 精密称取左旋棉酚 50 mg,置于 5 mL 量瓶中,加乙腈溶解并定容至刻度,摇匀,得左旋棉酚储备液。吸取左旋棉酚储备液 500 μL 于 50 mL 量瓶中,分别加入 37 °C 预温孵的 pH 1.2 盐酸溶液和 pH 6.8,7.4,8.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS),摇匀后各吸取 1 mL 至 8 个具塞试管中,置于 37 °C 恒温振荡水浴中温育,分别于反应 0,1,2,3,4,6,9,12 h 定时取出试管。左旋棉酚在模拟体内不同部位消化道的 pH 环境中降解曲线见图 1。结果发现左旋棉酚降解速率随时间延长明显升高,经零级或一级速率方程模拟其降解过程表现为一级动力学过程,其降

解常数及半衰期见表 1。37 °C 水浴温孵 12 h 后,左旋棉酚在 pH 1.2 的盐酸溶液中相对稳定,降解率 < 10% ,而在不同 pH 的 PBS 中的降解率分别为 64.7% ,78.6% ,84.4% ,左旋棉酚降解速率在不同 pH 溶液中的排序为 pH 8.0 PBS > pH 7.4 PBS > pH 6.8 PBS > pH 1.2 盐酸。左旋棉酚总体表现呈 pH 依赖性,在偏酸性环境中降解不明显,而在碱性环境中较大程度的降解,且随着 pH 升高其降解加快。

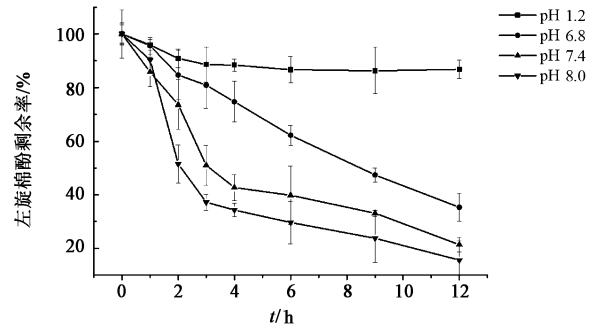


图 1 左旋棉酚在不同 pH 磷酸盐缓冲液及稀盐酸中的降解曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Degradation curves of (-)-gossypol in phosphate buffer solutions and diluted hydrochloric acid with different pH ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表 1 左旋棉酚在不同 pH 溶液及不同生物样品中的降解参数 ($n=3$)

Table 1 Degradation parameters of (-)-gossypol of in phosphate buffer solutions with different pH and different biological sample of rats ($n=3$)

孵育液	一级降解速率方程	r	降解常数 ($\bar{x} \pm s$)	$t_{1/2} (\bar{x} \pm s) / h$
pH 6.8 PBS	$\ln C = -0.103 2t + 1.700 8$	0.958 2	$0.095 8 \pm 0.231 7$	7.23 ± 0.15
pH 7.4 PBS	$\ln C = -0.178 8t + 1.038 5$	0.897 2	$0.116 3 \pm 0.096 2$	5.96 ± 0.12
pH 8.0 PBS	$\ln C = -0.169 4t + 1.952 8$	0.932 8	$0.172 8 \pm 0.139 7$	4.01 ± 0.45
人工肠液	$\ln C = -0.172 5t + 1.363 4$	0.924 5	$0.182 2 \pm 0.100 8$	3.80 ± 0.22
小肠内容物	$\ln C = -0.228 8t + 1.571 1$	0.958 1	$0.228 4 \pm 0.101 0$	3.03 ± 0.91
大肠内容物	$\ln C = -0.471 9t + 1.405 5$	0.883 5	$0.480 1 \pm 0.083 6$	1.44 ± 0.10
肝组织匀浆	$\ln C = -0.717 6t + 1.697 2$	0.954 1	$0.718 1 \pm 0.021 0$	0.97 ± 0.45

2.5 左旋棉酚在人工肠、胃液中的稳定性试验 吸取左旋棉酚储备液 500 μL,分别与预热温孵至 37 °C 的人工胃、肠液 10 mL 混合,置于 37 °C 恒温振荡水浴中,平行制备 3 份。分别于反应 0,1,2,3,4,6,9,12 h 定时取样。计算不同时间点左旋棉酚的平均剩余率。结果表明左旋棉酚在人工胃液中降解相对稳定,12 h 后未发生明显降解;在人工肠液中的降解程度随时间的延长明显升高,通过零级或一级速率方程模拟,阐明其降解过程属于一级动力学过程,见表 1。比较 pH 6.8 PBS 和人工肠液的试验数据,说明胰蛋白酶对左旋棉酚稳定性影响较小。

2.6 左旋棉酚在大鼠离体生物样品中的稳定性试验 取左旋棉酚储备液 500 μL 于 50 mL 量瓶中,分

别与预温孵至 37 °C 的人工胃液、空白胃内容物、人工肠液、空白小肠、大肠内容物及空白大鼠肝组织匀浆液混匀至刻度,置于 37 °C 恒温振荡水浴中孵育。胃内容物、小肠内容物和肝组织匀浆的取样时间点为 0,0.5,1,2,4,6,8 h;大肠内容物的取样时间点为 1,2,4,8,12,24 h。以 0 h 测得的左旋棉酚浓度计为 100% ,计算不同时间点左旋棉酚的剩余率。结果表明左旋棉酚在大鼠离体胃、小肠、大肠等不同部位存在不同程度的差异,在胃中稳定性相对较好,37 °C 孵育 8 h 后,左旋棉酚的剩余率 > 95.0% ,说明胃蛋白酶对左旋棉酚的影响不大。左旋棉酚在大肠与小肠内容物中的吸附、降解情况相似,降解量均较高,其中大肠尤为显著,左旋棉酚与大肠、小肠液共存 8

h 后,降解率分别为 96.9% 和 81.3%;通过零级或一级速率方程模拟,阐明其降解过程均属于一级动力学过程,见表 1。提示左旋棉酚在小肠、大肠菌群的作用下极易降解。左旋棉酚在肝脏组织匀浆中吸附、代谢或降解较明显,孵育 8 h 后,左旋棉酚仅剩下 2.7%;通过零级或一级速率方程模拟,阐明其降解过程属于一级动力学过程,见表 1。提示肝微粒体酶对该成分有一定影响,与文献[9]报道一致。

3 讨论

左旋棉酚作为一种妇科疾病用药及新一代抗肿瘤药已进入临床 II/III 期,体内外活性研究均表明其具有较强的抗肿瘤活性^[10-11]。药动学研究表明左旋棉酚的口服生物利用度较低,可能与其胃肠道稳定性及肝脏首过效应有关。一般药物口服吸收部位为人体胃和小肠部位,但关于左旋棉酚胃肠液稳定性等体内过程的研究报道较少。因此,本文拟最大程度地模拟药物进入体内后在消化道内的运行停留情况,以阐明左旋棉酚在体内处置过程的主要代谢、降解部位和影响其稳定性的因素^[9,12]。

由于左旋棉酚水溶性较差,左旋棉酚样品制备时溶媒的选择对其在孵育体系中的溶解度影响较大。在预试验中采用甲醇、乙腈为溶媒,结果发现乙腈为溶媒时,可使左旋棉酚在孵育体系中完全溶解,且对测定结果无干扰。从化学结构分析,左旋棉酚中含有多个酚羟基,因此在碱性环境中易发生变化,其降解原因可能是因为该成分呈弱酸性^[13]。研究表明左旋棉酚在胃液环境中几乎不发生降解,然而在肠液环境及肝脏组织匀浆中左旋棉酚浓度却发生了较大变化,并且出现新的小分子物质,推测左旋棉酚主要是受胃肠道酸碱环境的影响,并且该成分能较稳定地存在于酸性环境中。至于在肠液环境及肝组织匀浆中,左旋棉酚浓度降低、新的小分子物质出现是否因为溶液 pH 升高而发生了结构转化,或肝脏内、小肠上皮中存在的酶系统会影响了左旋棉酚的稳定性,这均有待进一步研究证实,同时降解产物也需经过进一步的结构鉴定。

药物在胃肠道环境下稳定性测定是药物发现和开发过程中非常必要的研究步骤,特别是口服药物在胃肠道的稳定性,将会直接影响到药物在胃肠道吸收进入血液循环的有效性^[14]。本文研究结果提示左旋棉酚可能是一个对酸碱环境极为敏感的药物,因此,在口服给药剂型设计时应考虑肠道碱性环境对其稳定性的影响,应避免对该成分结构的破坏,确保其生物活性。

[参考文献]

- [1] Kenar J A. Reaction chemistry of gossypol and its derivatives[J]. J Am Oil Chem Soc, 2006, 83(4): 269-302.
- [2] Van Poznak C, Seidman A D, Reidenberg M M, et al. Oral gossypol in the treatment of patient with refractory metastatic breast cancer; a phase I/II clinical trial[J]. Breast Cancer Res Treat, 2001, 66(3): 239-248.
- [3] Pang X F, Wu Y Y, Wu Y G, et al. (-)-Gossypol suppresses the growth of human prostate cancer xenografts via modulating VEGF signaling-mediated angiogenesis [J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(5): 795-805.
- [4] Dodou K, Anderson R J, Small D A, et al. Investigations on gossypol: past and present developments[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2005, 14(11): 1419-1434.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 203, 附录 XII A.
- [6] 盛华刚, 朱立俏, 张津萌. 金荞麦中原花青素 B₂ 和表儿茶素在人工胃肠液中的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 77-80.
- [7] Krondahl E, von Euler-Chelpin H, Orzechowski A, et al. *In vitro* metabolism of opioid tetrapeptide agonists in various tissues and subcellular fraction from rats[J]. Peptides, 2001, 22(4): 613-621.
- [8] Sun Y M, Chen X Y, Xu H Y, et al. Stability of glufosfamide in phosphate buffers and in biological samples[J]. J Chromatogr B, 2006, 832(2): 224-230.
- [9] Liu H M, Sun H, Lu D Y, et al. Identification of glucuronidation and biliary excretion as the main mechanisms for gossypol clearance; *in vivo* and *in vitro* evidence[J]. Xenobiotica, 2014, 44(8): 696-707.
- [10] Heist R S, Fain J, Chinnasami B, et al. Phase I/II study of AT-101 with topotecan in relapsed and refractory small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(10): 1637-1643.
- [11] Bagstrom M Q, Qi Y, Koczywas M, et al. A phase II study of AT-101 (gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive stage small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2011, 6(10): 1757-1760.
- [12] Yang S T, Ying X, Tang H, et al. Intestinal absorption, pharmacokinetics and tissue distribution of gossypol nanosuspensions [J]. Adv Mater Res, 2014, 1015: 708-712.
- [13] 郑多楷, 司伊康, 孟佳克, 等. 消旋棉酚拆分的研究——II. 手性 α -甲基苯乙胺及 α -甲基苯胺为拆分剂[J]. 药学学报, 1990, 25(6): 417-422.
- [14] 郭宗儒. 药物分子设计的策略: 药理活性与成药性[J]. 药学学报, 2010, 45(5): 539-547.

[责任编辑 刘德文]