

高乌甲素磷脂复合物纳米粒的制备、表征及药动学研究

徐凯^{1*}, 魏永鸽²¹黄河科技学院, 郑州 450005; ²郑州铁路职业技术学院, 郑州 450052

摘要: 采用溶剂挥发法制备高乌甲素磷脂复合物, 薄膜超声法制备高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒, 并考察基本理化性质。SD 大鼠分别灌胃给予高乌甲素及其磷脂复合物固体脂质纳米粒, 比较药动学特征及生物利用度。结果表明, 高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒平均粒径为 (224.37 ± 1.93) nm, Zeta 电位为 (-6.14 ± 0.09) mV, 包封率为 $(85.08 \pm 1.84)\%$ 。体外释药符合 Weibull 模型。药动学结果显示, T_{max} , C_{max} , AUC_{0-t} 和 AUC_{0-} 均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 口服吸收生物利用度提高了 2.58 倍。因此, 高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒可有效提高高乌甲素的口服吸收生物利用度。

关键词: 高乌甲素; 包封率; 固体脂质纳米粒; 生物利用度

中图分类号: R944.9

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.5.022

Lappaconitine Phospholipids Complex Nanoparticles: Preparation, Characterization and Pharmacokinetic Study

XU Kai^{1*}, WEI Yong-ge²¹Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450005, China;²Zhengzhou Railway Vocational & Technical College, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Solvent evaporation method was adopted to prepare lappaconitine phospholipids complex, and thin-film ultrasonic method was used to prepare its solid lipid nanoparticles. The basic physicochemical properties of lappaconitine phospholipids complex solid lipid nanoparticles were also studied. The pharmacokinetics and bioavailability were compared after oral administration of lappaconitine and its phospholipids complex solid lipid nanoparticles. The results showed that particle size, zeta potential and encapsulation efficiency of lappaconitine phospholipids complex solid lipid nanoparticles were (224.37 ± 1.93) nm, (-6.14 ± 0.09) mV and $(85.08 \pm 1.84)\%$, respectively. The pharmacokinetic results showed that T_{max} , C_{max} , AUC_{0-t} and AUC_{0-} had statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the bioavailability was enhanced by 2.58 times. Therefore, lappaconitine phospholipids complex solid lipid nanoparticles could enhance the bioavailability significantly.

Key words: Lappaconitine; encapsulation efficiency; solid lipid nanoparticles; bioavailability

高乌甲素 (lappaconitine) 又称拉巴乌头碱, 是从毛茛科乌头属植物高乌头 (*Aconitum Sinomontanum* Nakai) 根中提取的一种生物碱, 主要用于抗肿瘤、癌痛、手术疼痛, 牙痛, 痛经等中度以上的疼痛^[1]。但高乌甲素脂溶性及水溶性均较差, 导致口服吸收生物利用度较低^[2,3], 限制了其在临床上的应用。

磷脂复合物 (phospholipids complex) 技术可同时增加药物的脂溶性和水溶性, 增加进入体循环的量, 提高药物的生物利用度。但药物制备成磷脂复合物后往往黏性大、疏水性强、分散性很差, 因而不

利于药物快速溶出。固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticles, SLN)^[4,5] 系采用生理相容性较好的固体脂质材料将药物包裹于类脂核中或吸附于纳米粒表面形成的固体胶粒给药系统。固体脂质纳米粒技术有效改善药物分散性, 提高溶出速率, 增加药物与胃肠道接触面积, 提高药物进入体循环的量, 进而增加药效。本研究在成功制备高乌甲素磷脂复合物的基础上进一步制备成固体脂质纳米粒, 以改善高乌甲素磷脂复合物的分散性, 提高药物溶出速率, 并进行初步药动学研究, 为高乌甲素制剂革新提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-10A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司); HWS-12 型智能水浴锅(上海一恒科技有限公司); ZRS-8 型智能溶出试验仪(天津大学无线电厂); BP 210D 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); JY92-II 型探头超声仪(上海净信实业发展有限公司); Nanosep[®] 超滤离心管(截留相对分子质量 10 000, 美国 PALL 公司); Nano ZS90 型纳米粒度仪(英国 Malvern 公司); 旋转蒸发仪(艾卡仪器设备有限公司); DZF-6050 型真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂); XW-80A 型漩涡混合器(上海医科大学仪器厂); MD200-2 型氮气吹扫仪(杭州奥威仪器有限公司)等。

1.2 材料

高乌甲素原料药(陕西大河药业有限责任公司, 批号 20080201, 纯度: 96.8%); 高乌甲素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 100289-200902); 延胡索乙素对照品(北京中科仪友化工技术研究院, 批号: PCS0603); 磷脂酰胆碱(纯度 > 95%, 上海艾韦特医药科技有限公司); 单硬脂酸甘油酯、氢氧化钠、磷酸二氢钠(国药集团化学试剂有限公司); 肝素(南京新百药业有限公司); 其他试剂均为色谱纯或分析纯。

1.3 动物

SD 大鼠, 雌雄兼用, 体质量为(300 ± 20) g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 生产许可证号为 SCXK(沪)2003-0003。

2 方法与结果

2.1 高乌甲素磷脂复合物的制备^[6]

采用溶剂挥发法制备高乌甲素磷脂酰胆碱复合物。按摩尔比(1:1.5)分别称取高乌甲素原料药和磷脂酰胆碱, 加入四氢呋喃于 45 °C 条件下恒温搅拌 2.5 h 至澄清。减压旋蒸除去四氢呋喃后, 加入三氯甲烷振摇, 溶解、过滤, 取续滤液减压旋蒸除去有机溶剂, 于真空干燥箱中干燥 24 h, 即得高乌甲素磷脂复合物, 敞口置于干燥器中备用。

2.2 高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒的制备

取高乌甲素磷脂复合物 30 mg 和单硬脂酸甘油酯 300 mg, 置于圆底烧瓶中, 加入无水乙醇溶解, 减压旋蒸成膜。加入 25 mL 泊洛沙姆水溶液(2.0 mg/

mL), 水化后将圆底烧瓶置于冰水混合物器皿中进行超声破碎 8 min(100 W, 超声 5 s, 停 3 s), 迅速放入 -20 °C 冰箱固化即得高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒。

2.3 包封率的测定

量取 1.0 mL 高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒水分散液, 置于超滤离心管中($M_w = 10\ 000$)进行超滤, 弃去初滤液, 收集续滤液。精密量取续滤液 0.5 mL, 置于 10 mL 容量瓶中, 加入无水乙醇定容至刻度线, 0.45 μm 微孔滤膜过滤后测定游离药物含量(W_1)。精密量取 0.5 mL 高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒水分散液, 加入无水乙醇破乳后定容至 10 mL, 0.45 μm 微孔滤膜过滤后测定总药物含量(W_0), 并计算包封率。包封率% = $(W_0 - W_1) / W_0 \times 100\%$ 。

结果显示, 制备 3 批高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒的包封率为 $(85.08 \pm 1.84)\%$ ($n = 3$)。

2.4 高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒粒度分布及 Zeta 电位

取高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒水分散液适当稀释后加入到比色皿中, 测定其粒径分布及 Zeta 电位。结果显示, 高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒的平均粒径为 (224.37 ± 1.93) nm, PDI 为 0.111 ± 0.019 (见图 1)。Zeta 电位为 (-6.14 ± 0.09) mV。

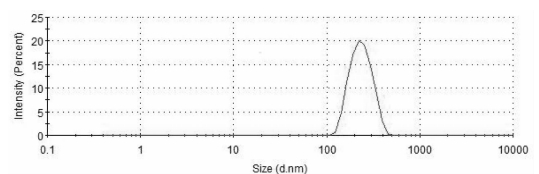


图 1 高乌甲素磷脂复合物的固体脂质纳米粒的粒度分布
Fig. 1 The size distribution of lappaconitine phospholipids complex solid lipid nanoparticles

2.5 体外释放研究

取高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒混悬液 2 mL, 置于处理好的透析袋中, 两端扎紧。取适量高乌甲素原料药加入磷酸盐缓冲液(pH = 7.4)制备混悬液, 扎紧。分别加入到含 50 mL 磷酸盐缓冲液的具塞锥形瓶中, 并置于恒温振荡器中进行体外释放研究(37 °C, 100 rpm)。分别于不同时间点取样 2 mL, 且补进同体积、同温度的释放介质。测定释放介质中药物含量, 并计算累积释放率, 绘制释放曲线。

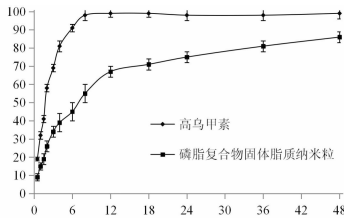


图2 高乌甲素及其磷脂复合物固体脂质纳米粒体外释药曲线

Fig.2 The dissolution profiles of lappaconitine and its phospholipids complex solid lipid nanoparticles

由结果可知(图2),高乌甲素原料药在8 h内基本释放完全。而其磷脂复合物固体脂质纳米粒在12 h累积释放度为67.81%,随后磷脂复合物固体

表1 高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒的药物释放模型

Table 1 Fitting release model of lappaconitine phospholipids complex solid lipid nanoparticles

模型 Model	方程 Equation	相关系数 Correlation coefficient(<i>r</i>)
一级模型 First-order model	$\ln(1-Q) = -0.017t - 0.1347$	0.9562
Higuchi 模型 Higuchi model	$Q = 12.714t^{1/2} + 9.8131$	0.9564
Weibull 模型 Weibull model	$\ln[-\ln(1-Q)] = 0.6651 \ln t - 1.1164$	0.9919

2.7 药动学研究

2.7.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);柱温为 30 °C;检测波长为 252.2 nm;流速为 0.8 mL/min;流动相为甲醇:0.1 mol/L 的 KH₂PO₄ 溶液(三乙胺稀溶液调 pH 至 4.0) = 43:57 (v/v)。在该色谱条件下,血浆内源性物质不干扰高乌甲素和内标测定,专属性良好。

2.7.2 对照品及内标溶液的配制

精密称取高乌甲素对照品 9.86 mg,置于 100 mL 容量瓶中,甲醇溶解定容后作为储备液。取适量储备液进一步稀释至浓度为 0.25、0.99、2.46、4.93、9.86 μg/mL 系列对照品溶液,备用。精密称延胡索乙素 9.94 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加入 0.5 mL DMSO 溶解后,甲醇定容作为内标溶液储备液。进一步稀释至 9.94 μg/mL 作为延胡索乙素内标溶液,备用。

2.7.3 血浆样品处理方法

血浆样品解冻后,精密吸取 100 μL 于离心管中,加入内标溶液 50 μL,同时加入 150 μL 氢氧化

脂质纳米粒中的药物处于缓慢释放期,48 h 内药物累积释放度达到 86.78%。0~12 h 可能是纳米粒外层药物的释放期,产生释放曲线的突释现象;而 12~48 h 可能是药物从纳米粒的固体骨架中缓慢扩散出去,因而表现出缓慢性、持续性的特点。

2.6 高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒释药模型拟合

高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒中药物释放曲线分别采用一级释放模型、Higuchi 模型和 Weibull 模型进行拟合,得出相关模型方程及相关系数 *r*,拟合优度以 *r* 进行判断。结果表明(见表 1),高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒体外释放行为符合 Weibull 方程: $\ln[-\ln(1-Q)] = 0.6651 \ln t - 1.1164$, $r = 0.9919$ 。

钠溶液(0.5 mol/L)。混匀后再加入提取液(正己烷-乙酸乙酯-异丙醇 = 95:10:5, v/v) 3 mL,涡旋混匀。6 000 rpm 离心 5 min,移取上层有机相,40 °C 水浴氮气吹干。残渣用 100 μL 流动相复溶,进样 20 μL 进行含量测定。

2.7.4 标准曲线的制备和定量限、检测线考察

于 100 μL 空白大鼠血浆中加入高乌甲素的系列对照品溶液各 100 μL,分别加入内标溶液 50 μL,按照“2.7.3”方法处理,HPLC 进样测定。以高乌甲素峰面积(*A_s*)与内标延胡索乙素峰面积(*A_i*)之比对浓度(*C*)进行线性回归。得回归方程为 $C = 201.84 A_s/A_i - 1.95$, $R^2 = 0.9938$;线性范围为 0.25~9.86 μg/mL。在该色谱条件下,定量限为 50 ng/mL,检测限为 3.0 ng/mL。

2.7.5 方法学验证

分别取低、中、高(0.246、2.465、9.86 μg/mL)3 个质量浓度的血浆样品,加入到 100 μL 空白血浆中,按照“2.7.3”方法处理,“2.7.1”项下方法测定高乌甲素含量,计算回收率。结果显示低、中、高 3 个质量浓度平均回收率分别为 91.38%、93.19%、94.81% ($n = 3$)。取高乌甲素低、中、高(0.246、

2.465、9.86 $\mu\text{g}/\text{mL}$)3 个质量浓度的血浆样品,各质量浓度在 24 h 内连续测定 6 次,计算日内精密密度。低、中、高质量浓度日内精密密度 RSD 分别为 6.26%、5.03%、3.95% ($n=3$)。各质量浓度连续测定 3 d,每天两次,得日间精密密度。低、中、高质量浓度日间精密密度 RSD 分别为 7.73%、7.92%、6.86% ($n=3$)。取低、中、高 3 个质量浓度的血浆样品放置于进样器中(室温),分别于 0,4,8,12,24,36 h 进样测定含量。低、中、高 3 个质量浓度的血浆样品 RSD 分别为 4.77%、3.98%、4.84% ($n=3$),表明血浆样品在 36 h 内基本稳定。

2.7.6 药动学研究

随机取 SD 大鼠,雌雄兼用,并随机分为 3 组,每组 6 只,实验之前 24 h 自由饮水。分别灌胃(intragastric administration, ig)给予高乌甲素原料药混悬液(以 0.5% 的 CMC-Na 溶液配制)和高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒,给药剂量以高乌甲素计为 5 mg/kg。高乌甲素原料药混悬液分别于 0.133、0.25、0.33、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、3.0、5.0、8.0、10 h 眼眶取血 0.4 mL,置于肝素化离心管中;而其磷脂复合物固体脂质纳米粒增设 12 h 取血点。以 3000 r/min 离心 3 min。按照“2.7.3”方法处理并 HPLC 进样测定血药浓度,绘制血药浓度-时间曲线

(见图 3)。主要药动学参数采用 3P97 程序统计矩模型进行计算,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果见表 2。

由结果可知,SD 大鼠 ig 给予高乌甲素混悬液后, T_{max} 为 (0.92 ± 0.17) h, C_{max} 为 (3.22 ± 0.60) $\mu\text{g}/\text{mL}$, AUC_{0-1} 为 (7.49 ± 1.75) $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$ 。ig 给予高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒后 T_{max} , C_{max} , AUC_{0-1} 和 $AUC_{0-\infty}$ 均具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中,磷脂复合物固体脂质纳米粒的 AUC_{0-1} 是高乌甲素原料药 AUC_{0-1} 的 2.58 倍。结果表明,制备的高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒改善了高乌甲素的药动学行为,大大提高了其口服吸收生物利用度。

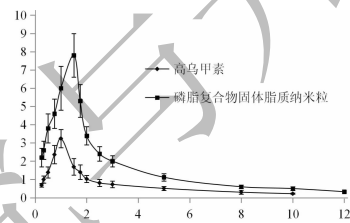


图 3 高乌甲素及其磷脂复合物固体脂质纳米粒灌胃给药药时曲线 ($n=6$)

Fig. 3 Profiles of plasma concentration-time of lappaconitine and its phospholipids complex solid lipid nanoparticles ($n=6$)

表 2 高乌甲素及其磷脂复合物固体脂质纳米粒灌胃给药后在大鼠体内的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of lappaconitine and its phospholipids complex solid lipid nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数 Parameter	高乌甲素 Lappaconitine	磷脂复合物固体脂质纳米粒 Phospholipids complex solid lipid nanoparticles
T_{max} (h)	0.92 ± 0.17	$1.55 \pm 0.26^*$
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.22 ± 0.66	$7.81 \pm 1.32^*$
AUC_{0-1} ($\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$)	7.49 ± 1.75	$19.38 \pm 3.13^{**}$
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$)	8.66 ± 1.82	$22.06 \pm 3.46^{**}$

注:与高乌甲素相比: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

Note: Compare with lappaconitine, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3 讨论

已报道的高乌甲素纳米粒包封率并不太理想^[4,5]。这可能是由于高乌甲素脂溶性较差,导致药物与纳米载体材料亲和性不好,使脂质材料不能有效地包裹高乌甲素,最终导致纳米粒包封率较低。本研究首先采用磷脂复合物技术提高高乌甲素的脂溶性,增加药物与纳米载体材料的亲和性,进而制备成固体脂质纳米粒。结果显示,基于磷脂复合物技术制备的固体脂质纳米粒包封率可达 $(85.08 \pm 1.$

84)%。

将磷脂复合物进一步制备成固体脂质纳米粒,不但增加了磷脂复合物的给药便捷性,对包裹于其中的磷脂复合物提供保护,减少磷脂复合物的解离,增加磷脂复合物的稳定性,还有助于进一步提高生物利用度^[8-12]。药动学结果显示,高乌甲素磷脂复合物固体脂质纳米粒的 T_{max} , C_{max} , AUC_{0-1} 和 $AUC_{0-\infty}$ 与高乌甲素混悬液相比均具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。另外,本研究也为提高药物固体脂质纳米粒的包封率提供了新的策略。但基于磷

脂复合物技术制备的高乌甲素固体脂质纳米粒, *Zeta* 电位为 (-6.14 ± 0.09) mV, 绝对值比较小, 因此制剂稳定性的提高还有待于进一步研究。

参考文献

- Ameri A. The effects of aconitum alkaloids on the central nervous system [J]. *Prog Neurobiol*, 1998, 56: 211-235.
 - Xu Y (许颖), Ni JM (倪京满), Ma ZJ (马子娇), et al. Absorption kinetics of lappaconite hydrobromide in rat stomachs and small intestines [J]. *Chin New Drug J* (中国新药杂志), 2010, 19: 1995-2000.
 - Yu JZ (于基志), Zhang BJ (张白晶), Jiang XT (蒋雪涛). Clinical application of lappaconitine hydrobromide [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2005, 26: 822-824.
 - Chen TK (陈桐楷), Li Y (李园), Lin HQ (林华庆), et al. Preparation of solid lipid nanoparticles loading lappaconitine hydrobromide by high pressure homogenization [J]. *Chin J Pharm* (中国药学杂志), 2010, 45: 440-443.
 - Ma JY (马君义), Chen XL (陈香玲), Sheng AX (盛爱霞), et al. Preparation of chitosan nanoparticles loaded with lappaconitine and their characteristics of *in vitro* release [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2016, 38: 533-538.
 - Sun WX (孙文霞), Zhong JL (钟家亮), Wang GD (王广东), et al. Investigation of the property of *Lappaconitine-phosphatidylcholine* Complex [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2017, 48: 78-81.
 - Wang Q, Li ZJ, Sun L, et al. Pharmacokinetic study of lappaconitine hydrobromide in mice by LC-MS [J]. *Acta Pharm Sinica*, 2011, 46: 432-437.
 - Hao HJ, Jia YZ, Han R. Phytosomes; an effective approach to enhance the oral bioavailability of active constituents extracted from plants [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2013, 22: 385-392.
 - Zhang Z, Huang Y, Gao F, et al. Daidzein-phospholipid complex loaded lipid nanocarriers improved oral absorption: *in vitro* characteristics and *in vivo* behavior in rats [J]. *Nanoscale*, 2011, 3: 1780-1787.
 - Cui FD, Shi K. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin phospholipid complex for oral delivery: preparation, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation [J]. *J Control Release*, 2006, 114: 242-250.
 - Cao FH, Ouyang WQ, Wang YP, et al. A combination of a microemulsion and a phospholipid complex for topical delivery of oxymatrine [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34: 551-562.
 - Yin HF (尹华峰), Tan QY (谭群友), Chen XL (陈学梁), et al. Evaluation of the release of pyridostigmine bromide phospholipid complex nanoparticle *in vitro* [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2012, 32: 501-504.
 - Yao QE (姚秋娥), Shi SJ (石三军), Zhou M (周敏), et al. Preparation, characterization and *in vitro* antitumor activity of vitamin C phospholipid complex and its nanoparticles [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2016, 47: 1408-1413.
- (上接第 906 页)
- Zhou Q, et al. Differential expression of genes in purple-shoot tea tender leaves and mature leaves during leaf growth [J]. *J Sci Food Agr*, 2016, 96: 1982-1989.
 - Chen LB (陈林波), et al. Analysis on transcriptome sequenced for tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz] [J]. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2015, 10: 2250-2255.
 - Li J (李健). Transcriptome analysis reveals the accumulation mechanism of anthocyanins in 'Zijuan' Tea (*Camellia siuensis* var. *assamica* (Masters) kitamura) leaves [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (福建农林大学), 2016.
 - Wang LY (王丽鸳), et al. Characterization of micorsatellites in tea (*Camellia sinensis*) floral transcriptome [J]. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2014, 1: 80-85.
 - Li M (李梅), et al. Digital gene expression analysis of tea flowers without pistil at three development stages [J]. *J Tea Sci* (茶叶科学), 2017, 1: 97-107.
 - Wei K, et al. Transcriptome analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation in nodal cuttings of *Camellia sinensis* (L.) [J]. *Plos One*, 2014, 9: e107201.
 - Thirugnanasambantham K, et al. Analysis of dormant bud (Banjhi) specific transcriptome of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) from cDNA library revealed dormancy-related genes [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 169: 1405-1417.
 - Xia EH, et al. The tea tree genome provides insights into tea flavor and independent evolution of caffeine biosynthesis [J]. *Mol Plant*, 2017, 10: 866.
 - Yang F (杨帆), et al. High-throughput transcriptome sequencing technology and its applications in Lepidoptera [J]. *Acta Entomol Sin* (昆虫学报), 2014, 57: 991-1000.