

· 药物代谢 ·

延胡索乙素多囊脂质体的制备及其大鼠体内药代动力学分析

刘建明^{1*}, 王芳¹, 叶颖俊¹, 方义湖¹, 胥彦琪¹, 刘芬²

(1. 江西医学高等专科学校, 江西 上饶 334000; 2. 南昌大学医学院, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 制备延胡索乙素多囊脂质体, 考察其体外释放情况和在大鼠体内的药代动力学特性。方法: 采用 HPLC 测定延胡索乙素血药浓度, 流动相甲醇-(KH₂PO₄-NaOH 缓冲盐, pH 6.0) (45:55), 流速 0.9 mL·min⁻¹, 检测波长 280 nm。利用复乳法制备延胡索乙素多囊脂质体, 考察其形状、粒径及体外释放特性, 以延胡索乙素注射剂为参比制剂进行大鼠肌肉注射的药动学研究。结果: 延胡索乙素多囊脂质体粒径均一, 80% 分布在 15.0~30.0 μm, 封装率 88.47%, 72 h 体外累积释放率 82.3%。延胡索乙素注射剂和多囊脂质体经肌肉注射给药后, *t*_{1/2} 分别为 (3.09 ± 0.37), (33.97 ± 4.78) h, *C*_{max} 分别为 (289.05 ± 30.37), (68.34 ± 8.72) μg·L⁻¹, *T*_{max} 分别为 (0.93 ± 0.15), (3.92 ± 0.43) h, 均存在显著性差异。结论: 复乳法制备的延胡索乙素多囊脂质体的工艺可行且重复性好, 在大鼠肌肉注射后缓释效果良好。

[关键词] 延胡索乙素; 多囊脂质体; 缓释特性; 药代动力学; 复乳法

[中图分类号] R945; R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0124-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190124

Preparation and Pharmacokinetics in Rats of *dl*-Tetrahydropalmatine Multivesicular Liposomes

LIU Jian-ming^{1*}, WANG Fang¹, YE Ying-jun¹, FANG Yi-hu¹, XU Yan-qi¹, LIU Fen²

(1. Jiangxi Medical College, Shangrao 334000, China;

2. Medical College of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare *dl*-tetrahydropalmatine multivesicular liposomes, investigate its *in vitro* release property and pharmacokinetics in rats. **Method:** HPLC was adopted to determine the plasma concentration of *dl*-tetrahydropalmatine with mobile phase of methanol- (KH₂PO₄-NaOH buffer salts, pH 6.0) (45:55), flow rate of 0.9 mL·min⁻¹ and detection wavelength at 280 nm. *dl*-Tetrahydropalmatine multivesicular liposomes were prepared by multiple emulsion method, its shape, particle size and *in vitro* release characteristics were evaluated. Pharmacokinetics were evaluated in rats following intramuscular injection of *dl*-tetrahydropalmatine multivesicular liposomes or the reference drug of *dl*-tetrahydropalmatine injections. **Result:** Particle sizes of these prepared multivesicular liposomes were even and 80% of them were well-distributed in the range of 15.0-30.0 μm. Encapsulation efficiency was more than 88.47%, *in vitro* cumulative release was more than 80% in 72 h. Main pharmacokinetic parameters of *dl*-tetrahydropalmatine injections and multivesicular liposomes were as follows: *t*_{1/2} of (3.09 ± 0.37) h and (33.97 ± 4.78) h, *C*_{max} of (289.05 ± 30.37) μg·L⁻¹ and (68.34 ± 8.72) μg·L⁻¹, *T*_{max} of (0.93 ± 0.15) h and (3.92 ± 0.43) h; the same parameter of these two preparation had significant differences by intercomparison. **Conclusion:** This optimized preparation technology is feasible with good reproducibility, *dl*-tetrahydropalmatine multivesicular liposomes shows a significant sustained-release property.

[Key words] *dl*-tetrahydropalmatine; multivesicular liposome; sustained-release; pharmacokinetics; multiple emulsion method

[收稿日期] 20140120(010)

[基金项目] 江西省自然科学基金项目(2009GZY0114)

[通讯作者] * 刘建明, 硕士, 讲师, 从事新剂型开发及药代动力学研究, Tel:13767331322, E-mail:liujianming390@163.com

延胡索乙素又称四氢巴马汀,是从延胡索中提取的生物碱类成分,属于非麻醉性镇痛药,具有毒性低、安全性高、无成瘾性等优点^[1-2]。其镇痛强度比吗啡弱,但比一般解热镇痛药强,对慢性持续性疼痛效果较好。近年来发现延胡索乙素还具有肝脏保护作用、抗血栓及抑制胃酸分泌等作用,常用于治疗中风偏瘫、风湿关节痛等慢性疾病,但这些疾病均需要长时间治疗^[3]。目前国内延胡索乙素的系列剂型包括片剂、胶囊、注射液及外用制剂等,因半衰期短,给药频率均较大。为了减少给药次数,延长药物在体内作用时间和药效,提高患者的顺应性,拟将延胡索乙素改制成缓控释制剂。多囊脂质体是采用贮库泡沫技术的一种新型脂质体,主要用于运载亲水性药物,弥补了普通脂质体对亲水性药物包封率低的不足,且当单个囊泡破损时,其他囊泡不受影响,具备很好的缓释性,多用于局部注射给药^[4-5]。本实验以多囊脂质体作为载体,制备延胡索乙素多囊脂质体,考察该制剂的基本理化性质及其在大鼠体内的药代动力学特性,为延胡索乙素的临床推广提供参考。

1 材料

LC-10ATvp 型高效液相色谱系统(日本岛津公司),T18 型高速分散器(德国 IKA 公司),TDL-4ZA 型台式低速自动平衡离心机(常州恒隆仪器有限公司),XW-80A 型旋涡混合器(上海精科实业有限公司)。

延胡索乙素原料(陕西永健制药有限公司,纯度 98%,批号 402081),延胡索乙素对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 98%,批号 110726-201010),硫酸延胡索乙素注射液(广东新峰药业股份有限公司,批号 11022012),多潘立酮(西安杨森制药有限公司,批号 051214609),三油酸甘油酯(北京金龙化学试剂有限公司),三辛酸甘油酯(上海晶纯试剂有限公司),胆固醇(上海瀚思化工有限公司),卵磷脂(德国 Degussa 公司),磷脂酰丝氨酸(美国 Gagill 公司),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

健康 SD 大鼠,雄性,体重(220 ± 20)g,南昌大学医学院实验动物中心提供,生产合格证号 SCXK(赣)2006-0001。

2 方法与结果

2.1 处方工艺优化 选择药物与磷脂、磷脂与三油酸甘油酯、磷脂与磷脂酰丝氨酸、磷脂与胆固醇的质量比为考察因素,每个因素选取 3 个水平,采用

$L_9(3^4)$ 正交表安排试验,以脂质体的包封率为评价指标,得最佳处方为磷脂-药物(10:2),磷脂-三油酸甘油酯(3:1),磷脂-磷脂酰丝氨酸(4:3),磷脂-胆固醇(1:2.5)。

2.2 延胡索乙素多囊脂质体的制备 按优选的处方称取胆固醇、三油酸甘油酯、卵磷脂、磷脂酰丝氨酸,加入三氯甲烷-乙醚(1:1)混合液完全溶解后,缓慢加入含延胡索乙素和 40 mmol·L⁻¹ L-精氨酸的 0.3 mol·L⁻¹ 蔗糖溶液(第一水相),于 30 ℃ 水浴条件下,采用高速分散器于 12 000 r·min⁻¹ 剪切 8 min,形成 W/O 型初乳。将此初乳注入含有 50 mmol·L⁻¹ L-赖氨酸的 4% 葡萄糖溶液(第二水相)内,采用高速分散器于 4 000 r·min⁻¹ 剪切 1 min,使之形成 W/O/W 型复乳,迅速将复乳倒入一定量的第二水相中,通入氮气,挥干有机溶剂,即得延胡索乙素多囊脂质体混悬液。

2.3 包封率的测定

2.3.1 色谱条件 Shimadzu Pack VP-ODS C₁₈ 色谱柱(2.0 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-(KH₂PO₄-NaOH 缓冲盐, pH 6.0)(45:55),流速 0.9 mL·min⁻¹,检测波长 280 nm,进样量 20 μL。

2.3.2 标准曲线的制备 精密称取延胡索乙素对照品适量,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇超声定容,分别配制成 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80 mg·L⁻¹ 的系列溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 185\ 745X - 40\ 027$ ($R^2 = 0.999\ 8$),线性范围 1 ~ 80 mg·L⁻¹。

2.3.3 样品测定 取多囊脂质体混悬液 0.5 mL,加入 0.9% 氯化钠溶液 1 mL,混匀,于 2 500 r·min⁻¹ 离心 8 min;取上清液 0.5 mL,加入甲醇 1 mL,混匀,过滤,按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算未包封的延胡索乙素含量。另取等量多囊脂质体混悬液,加入 0.9% 氯化钠溶液 1 mL,混匀,量取该溶液 0.5 mL,加入甲醇 1 mL,混匀,过滤,按 2.3.1 项下色谱条件测定延胡索乙素含量,计算包封率。取 3 批延胡索乙素多囊脂质体,按上述方法计算平均包封率 88.47%,RSD 1.04%,表明该处方工艺重复性好。

2.4 粒径及形态考察 取制备的延胡索乙素多囊脂质体,通过光学显微镜观察其呈完整球状体,内有很多小囊堆叠。计数 500 个多囊脂质体,测得粒径最大值 46 μm,最小值 12 μm。运用 SPSS 16.0 软件分析,计算平均粒径 21.0 μm,80% 分布在 15.0 ~ 30.0 μm,见图 1 ~ 2。

2.5 体外释放情况考察 以 PBS(pH 7.4)为释放

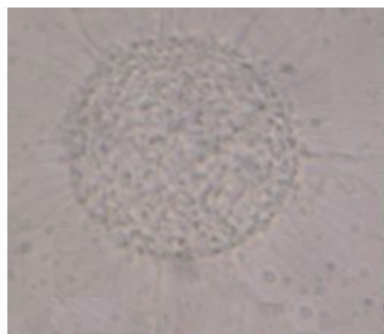


图 1 延胡索乙素多囊脂质体显微镜(100×100)

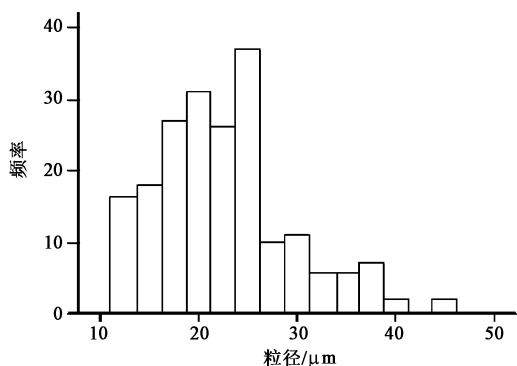


图 2 延胡索乙素多囊脂质体粒径分布

介质,用等量 PBS 稀释多囊脂质体溶液,加入已处理好的筒状透析袋中,将透析袋两端扎紧,悬置于装有 PBS 1 L 的锥形瓶中,于 37 °C 水浴中磁力搅拌,分别于 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 h 取一定量透析外液,同时补充等量新鲜 PBS,按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算延胡索乙素释放率,发现在 PBS 中释放缓慢且平稳,开始释放较快,12 h 时释放率达 21%,之后释放减慢,72 h 时累积释放率达 82.3%,说明延胡索乙素多囊脂质体在 PBS 中具有缓释作用。

2.6 大鼠体内药代动力学

2.6.1 血浆样品处理 取大鼠血浆 200 μL ,加入 0.05 mol·L⁻¹ Na₂CO₃ 溶液和 9.0 mg·L⁻¹ 多潘立酮溶液(内标)各 20 μL ,混匀后加入乙酸乙酯 4 mL,振荡 5 min,于 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 3 mL 注入 10 mL 玻璃离心管中,氮气挥干,加入 2.3.1 项下流动相 100 μL ,振摇,于 15 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,按 2.3.1 项下色谱条件测定。

2.6.2 血浆标准曲线的制备 精密称取 SD 大鼠空白血浆,各加入不同质量浓度的延胡索乙素对照品溶液,得质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg·L⁻¹ 的血浆样品,按 2.6.1 项下方法处理,以

峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 93\ 642X - 21\ 206$ ($r = 0.999\ 6$),线性范围 0.1 ~ 10 mg·L⁻¹,最低定量限 0.1 mg·L⁻¹。

2.6.3 回收率与精密度的试验 分别配制延胡索乙素质量浓度为 0.1, 1, 10 mg·L⁻¹ 的血浆样品,按 2.6.1 项下方法处理,以相应质量浓度直接配制的未经萃取处理的内标溶液和延胡索乙素溶液作为对照,重复 5 次,计算萃取回收率平均值 97.87%,RSD 1.02%。取延胡索乙素质量浓度为 0.1, 1, 10 mg·L⁻¹ 的血浆样品,按 2.6.1 项下方法处理,计算日内精密度和日间精密度的 RSD 均 < 10%,符合生物样品的分析要求。

2.6.4 药动学参数测定 取健康雄性 SD 大鼠 12 只,禁食 > 12 h,随机分成对照组及试验组,每组 6 只。对照组腿部肌内注射硫酸延胡索乙素注射液,试验组腿部肌内注射延胡索乙素多囊脂质体注射液,剂量均为 10 mg·kg⁻¹,对照组在 0, 0.08, 0.17, 0.33, 0.5, 1, 2, 4, 6, 9, 15 h 时间点眼底静脉丛各采血 0.3 mL,试验组在 0, 0.17, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 60 h 时间点眼底静脉丛各采血 0.3 mL,置于肝素化塑料离心管,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液置于 -20 °C 冰箱存放备用。按 2.6.1 项下方法处理,绘制药时曲线,见图 3,计算药动学参数,见表 1。结果表明,硫酸延胡索乙素注射液肌内注射后迅速达到峰浓度并很快被消除,15 h 时血药浓度已经低于定量下限;而延胡索乙素多囊脂质体肌内注射后,血药浓度相对较为稳定, C_{max} 较注射液明显降低,60 h 后血药浓度仍在定量下限内,说明该制剂具有缓释作用。

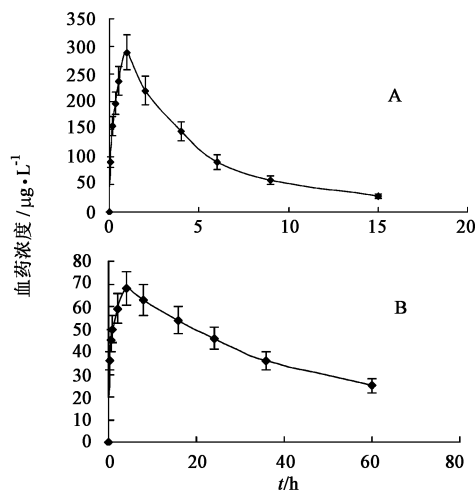


图 3 大鼠肌内注射硫酸延胡索乙素注射液(A)和多囊脂质体(B)的药时曲线($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表1 硫酸延胡索乙素注射液和多囊脂质体
在大鼠体内的药动学参数比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	硫酸延胡索	延胡索乙素
		注射液	多囊脂质体
$t_{1/2}$	h	3.09 ± 0.37	33.97 ± 4.78
T_{max}	h	0.93 ± 0.15	3.92 ± 0.43
C_{max}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	289.05 ± 30.37	68.34 ± 8.72
AUC_{0-t}	$\mu\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$	8 042.43 ± 170.14	12 671.29 ± 1 617.26

3 讨论

脂质体的制备方法包括薄膜分散法、逆向蒸发法、复乳法等,其中只有复乳法可用于制备多囊脂质体。另外脂质成分中必须含有中性脂质是制备多囊脂质体的一个必要条件,因为多囊脂质体内含有许多非同心囊泡,这一特性需要中性脂质的存在,否则只能形成单室脂质体或多室脂质体^[6]。在制备过程中,影响延胡索乙素包封率和释放速率的主要原因为复乳的破裂、聚合物膜的致密性等。此外,内水相的pH对膜稳定性和包封率也具有一定影响,pH较高时所得多囊脂质体更稳定,包封率更高,这可能与pH影响药物的跨膜转运及膜的荷电性有关^[7];膜材的组成会影响膜的刚性,若刚性不足,膜容易破裂,不能得到稳定的多囊脂质体;此外,多囊脂质体粒径大时较易发生机械损伤、挤压破损等,采用低速离心能方便有效地达到分离的目的,与文献^[6]报道一致。

取不同摩尔比的三油酸甘油酯和三辛酸甘油酯(二者总摩尔数恒定)制备的延胡索乙素多囊脂质体混悬液,经离心洗涤去除外水相药物,沉降的延胡索乙素多囊脂质体颗粒用0.9%氯化钠溶液稀释至10 mL后加入透析袋,放入装有0.9%氯化钠溶液100 mL的烧杯中,置于37℃恒温水浴振荡器中,分别于0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h取样,经0.45 μm微孔滤膜滤过,按2.3.1项下色谱条件测定,计算各时间点延胡索乙素的累积释药率。结果发现当三油酸甘油酯-三辛酸甘油酯(0:10)时,延胡索乙素12 h内释放了80%,随着三油酸甘油酯比例

的增加,多囊脂质体中药物释放速率减慢,当三油酸甘油酯-三辛酸甘油酯(10:0)时,药物在12 h内累积释药率约60%,符合试验要求,故选择三油酸甘油酯-三辛酸甘油酯(10:0),48 h的累积释药率80%。

本文建立了以多潘立酮为内标测定大鼠血浆中延胡索乙素含量的方法,通过方法学考察证明该方法准确、稳定、可靠,可用于制剂的药动学研究。肌肉注射硫酸延胡索乙素注射剂和延胡索乙素多囊脂质体的 C_{max} 差异显著,原因可能是注射剂给药后,药物被迅速吸收,而多囊脂质体则起到药物储库的作用,肌肉注射相同剂量的多囊脂质体后,药物缓慢从多囊中释放,相同时间较注射剂进入血液循环的药量少,故多囊脂质体组的药物浓度能维持更长的时间,在给药后60 h内仍能保持一定血药浓度, $t_{1/2}$ 较注射剂延长了10.99倍,具有良好的缓释作用。

[参考文献]

- [1] 范卓文,武斌,刘国臣,等.延胡索药理研究及临床应用进展[J].黑龙江医药,2007,20(5):522.
- [2] 黄锦焯,方敏,马勇全,等.延胡索在三叉神经痛大鼠模型中的镇痛作用研究[J].南方医科大学学报,2010,30(9):2161.
- [3] 张仲苗,耿宝琴,雍定国,等.dl-四氢巴马汀抗大鼠胃溃疡作用[J].中国药学杂志,2005,40(12):902.
- [4] 焦玉焕,孙考祥,慕宏杰,等.胸腺五肽缓释多囊脂质体的制备及大鼠药物代谢动力学的初步研究[J].药科学报,2008,43(7):756.
- [5] 王晓梅,唐星,何海冰,等.多囊脂质体的研究进展[J].中国新药杂志,2006,15(15):1243.
- [6] 姜素芳,姚瑶,陶昱斐,等.盐酸青藤碱多囊脂质体的制备及其释放特性研究[J].中草药,2008,39(8):1158.
- [7] Zhang J A, Pawelchak J. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions[J]. Eur J Pharm Biopharm,2000,50(3):357.

[责任编辑 刘德文]