

齐墩果酸纳米脂质体的制备及其大鼠体内药动学

许伯慧¹, 李晓霞^{2*}, 柴劲³, 单玉梅¹, 谈群¹

(1. 南通大学医学院药理学系, 江苏 南通 226001;

2. 如皋市人民医院, 江苏 如皋 226500; 3. 吉林大学第二医院, 长春 130041)

[摘要] **目的:** 制备齐墩果酸纳米脂质体, 初步考察其在大鼠体内的药动学行为。**方法:** 采用逆相蒸发法制备齐墩果酸纳米脂质体并对其进行表征, 采用葡聚糖凝胶柱色谱法测定包封率。大鼠尾静脉注射齐墩果酸纳米脂质体和自制齐墩果酸溶液, 以原人参二醇为内标物, 采用 HPLC 测定不同时间血浆中齐墩果酸含量, 采用 PK-Solver2.0 药动学软件进行非房室模型处理, 并将药动学参数进行统计学分析。**结果:** 制得的脂质体为圆形或类圆形的小囊泡, 平均粒径 (98.11 ± 0.32) nm, 包封率 $(81.2 \pm 1.21)\%$ 。与齐墩果酸溶液相比, 齐墩果酸纳米脂质体静脉注射后, 其 $t_{1/2}$ 和 MRT 延长, AUC_{0-1} 提高, CL_{obs} 降低。**结论:** 制备的齐墩果酸纳米脂质体具有较小粒径和较高包封率, 显著提高了齐墩果酸的生物利用度, 延长了其在体内的滞留时间。

[关键词] 齐墩果酸; 纳米脂质体; 药动学行为; 粒径; 包封率

[中图分类号] R283.6; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0170-05

[doi] 10.11653/syfy2013210170

Preparation of Oleanolic Acid Nanoliposomes and Its Pharmacokinetics Investigation in Rats

XU Bo-hui¹, LI Xiao-xia^{2*}, CHAI Jing³, SHAN Yu-mei¹, TAN Qun¹

(1. Department of Pharmacy, Medical School of Nantong University, Nantong 226001, China;

2. The People's Hospital of Rugao, Rugao 226500, China;

3. The Secone Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare oleanolic acid nanoliposomes and investigate its *in vivo* pharmacokinetics behavior in rats. **Method:** Oleanolic acid nanoliposomes were prepared by reverse-phase evaporation and characterized, entrapment efficiency was determined by sephadex column chromatography. Rats were injected with oleanolic acid nanoliposomes and oleanolic acid solution prepared by ourselves via the tail, respectively. The plasma concentrations of oleanolic acid from samples were determined by HPLC, with protopanaxadiol as internal standard. Pharmacokinetic parameters and non-compartment models were analyzed by *t*-test and PK-Slover 2.0 software, respectively. **Result:** Oleanolic acid nanoliposomes were round or oval vesicles with the mean diametre of (98.11 ± 0.32) nm and encapsulation efficiency of $(81.2 \pm 1.21)\%$. The plasma concentration-time curves of the nanoliposomes and solution conformed to non-compartmental model. By comparing with oleanolic acid solution, $t_{1/2}$ and MRT of oleanolic acid nanoliposomes extended, AUC_{0-1} increased and CL_{obs} decreased. **Conclusion:** Oleanolic acid nanoliposomes with high entrapment efficiency and small particle size had significantly improved bioavailability of oleanolic acid and prolonged its *in vivo* retention time.

[Key words] oleanolic acid; nanoliposomes; pharmacokinetics; particle size; encapsulation efficiency

[收稿日期] 20130503(017)

[基金项目] 江苏省教育厅高校自然科学研究面上项目(11KJB350004);南通市科技计划(指导性)项目(AS11910);如皋市科技计划项目(rg201154);江苏省高校优势学科建设工程项目{(PAPD)苏政办发[2011]6号};南通大学校级课题(11Z006)

[第一作者] 许伯慧, 硕士, 讲师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel:0513-85051749, E-mail: xu21_2001@163.com

[通讯作者] * 李晓霞, 本科, 主管药师, 从事医院制剂管理研究, Tel:0513-87512315, E-mail: xuzi_2001@ntu.edu.cn

齐墩果酸属于齐墩果烷型五环三萜类化合物,分布形式很广,一般以游离体和配糖体的形式分布于女贞子、青叶胆、枇杷叶、夏枯草等植物中,具有抗炎、降脂、免疫调节、抑制变态反应等药理作用^[1]。齐墩果酸对肝脏具有良好的生物活性,临床主要用于急性病毒性肝炎、慢性肝炎、抗结核药物肝损害的预防及癌症的辅助治疗,具有疗效稳定、毒性低、副作用小等优势,开发前景广阔^[2]。但齐墩果酸水溶性差,在口服过程中往往出现吸收不完全、生物利用度低等系列问题,临床应用受到一定限制^[3]。为提高齐墩果酸的治疗效果,本实验尝试采用静脉途径给药,拟制备齐墩果酸纳米脂质体,并对其在大鼠体内的药动学行为进行初步研究,为齐墩果酸的进一步研究开发提供实验依据。

1 材料

BS124S型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司),HWCL-3型恒温磁力搅拌浴(郑州长城科工贸有限公司),JY92-II型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科技股份有限公司),LC-20AD型高效液相色谱仪(日本岛津),XW-80A型涡旋混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),TGL-16B型离心机(上海安亭科学仪器厂),R-1002N型旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司),Zetasizer nano zs型激光粒度分析仪(Malvern公司),diNanoScope V型原子力显微镜(美国Veeco公司)。

齐墩果酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号110709-200505),原人参二醇对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号must-0911311),齐墩果酸原料药(南京都莱生物科技有限公司),注射用大豆磷脂(上海东尚生物科技有限公司),胆固醇(中国惠兴生化试剂有限公司),葡聚糖凝胶G-50(Sephadex G-50,Pharmacia分装),甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

SD大鼠,雌雄各半,体重180~220g,由南通大学实验动物中心提供,合格证号SYXK(苏)2012-0031。

2 方法与结果

2.1 齐墩果酸纳米脂质体的制备 采用逆相蒸发法。称取处方量齐墩果酸、磷脂和胆固醇,加入适量乙醚中,搅拌至完全溶解得类脂质溶液。于40℃恒温磁力搅拌的条件下,将适量pH 7.4磷酸盐缓冲液缓慢滴入类脂质溶液中,继续搅拌使之形成稳定的乳剂。将乳剂于40℃旋转蒸发,发生转相后继续减压蒸发至乙醚除尽,用pH 7.4磷酸盐缓冲液定容至

处方量。用超声细胞粉碎仪于600W超声均化50次,经0.22μm微孔滤膜滤过,即得略带乳光的齐墩果酸纳米脂质体混悬液。

2.2 包封率的测定 采用葡聚糖凝胶柱色谱法测定。精密吸取齐墩果酸纳米脂质体混悬液0.2mL,置于Sephadex-G50(20mm×350mm)柱上,用50mL水洗脱脂质体,用0.5%十二烷基硫酸钠洗脱游离药物,收集游离药物流出液,用甲醇稀释并定容,进行HPLC检测,根据标准曲线 $Y = 6\ 916X + 237.9$ ($r = 0.999\ 9$)计算游离药物含量($W_{\text{游离}}$)。另取齐墩果酸纳米脂质体0.2mL,用甲醇破乳稀释后进行HPLC检测,计算脂质体中药物总量($W_{\text{总}}$),计算包封率^[4] $(81.2 \pm 1.21)\%$ ($n = 3$),符合2010年版《中国药典》要求。

$$\text{包封率} = (1 - W_{\text{游离}}/W_{\text{总}}) \times 100\%$$

2.3 粒径及Zeta电位的测定 采用激光粒度分析仪测定齐墩果酸纳米脂质体的平均粒径(98.11 ± 0.32)nm,多分散指数(0.350 ± 0.02),Zeta电位 $-(0.104 \pm 0.001)$ mV($n = 3$)。

2.4 原子力显微镜(AFM)分析脂质体形态 取齐墩果酸纳米脂质体,用pH 7.4磷酸盐缓冲液稀释至适宜浓度,取适量稀释液滴于洁净盖玻片,于净化工作台内自然干燥。使用AFM观察到齐墩果酸纳米脂质体结构呈类球状或椭球状,形态较均一,见图1。

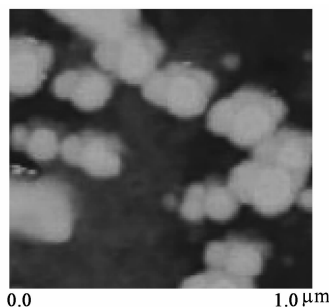


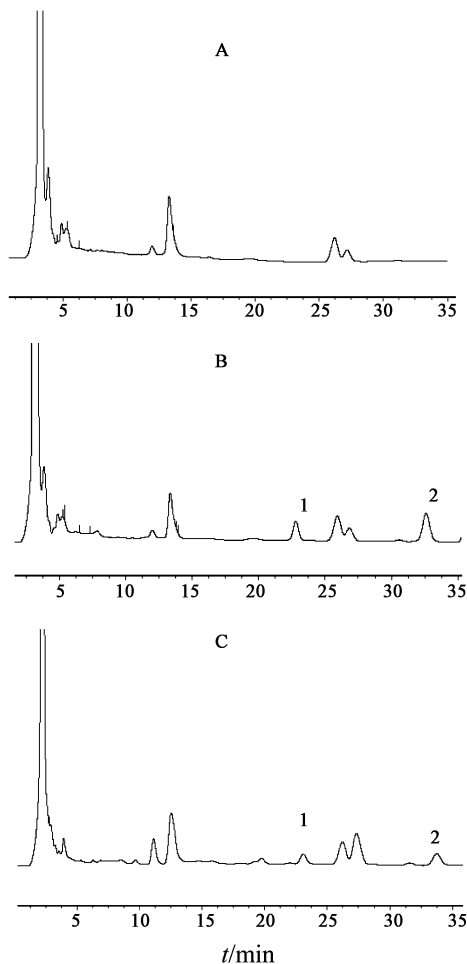
图1 齐墩果酸纳米脂质体的AFM

2.5 血浆样品处理 将全血置离心机中4000r·min⁻¹离心10min,精密移取上层血浆样品200μL,加入原人参二醇甲醇溶液($370\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)20μL作为内标,加入10%磷酸10μL和乙腈400μL,涡旋震荡3min至蛋白完全沉淀,置于高速离心机中15000r·min⁻¹离心10min,取出上清液,氮气吹干,加入甲醇100μL充分溶解,经0.45μm微孔滤膜滤过,备用。

2.6 方法学考察

2.6.1 色谱条件 YMC-Pack Pro C₁₈色谱柱

(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.1% 乙酸 (88:12), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 206 nm, 柱温 40 °C, 进样量 20 μL, 见图 2。



A. 空白血浆; B. 空白血浆加入药物和内标物;
C. 给药 5 min 后大鼠血浆; 1. 齐墩果酸; 2. 原人参二醇

图 2 齐墩果酸纳米脂质体 HPLC

2.6.2 标准曲线的制备 精密称取齐墩果酸对照品 11.5 mg 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 得对照品储备液。精密吸取该储备液 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 得系列对照品溶液。分别移取上述对照品溶液和储备液 4 μL 至 196 μL 空白血浆中, 得齐墩果酸血药质量浓度分别为 0.23, 0.46, 1.15, 2.3, 4.6, 11.5, 2.3 mg·L⁻¹ 的血浆样品, 按 2.5 项下方法处理, 按 2.6.1 项下色谱条件测定, 以齐墩果酸和原人参二醇的峰面积比为纵坐标, 血浆中齐墩果酸质量浓度为横坐标, 得线性方程 $Y = 0.043X - 0.0103 (r = 0.9998)$, 线性范围 0.23 ~ 23 mg·L⁻¹。

2.6.3 绝对回收率试验 配制齐墩果酸质量浓度

分别为 0.46 (低), 2.3 (中), 11.5 (高) mg·L⁻¹ 的血浆样品 ($n = 6$), 按 2.5 项下方法处理, 按 2.6.1 项下色谱条件测定峰面积 (A_1); 分别配制质量浓度为 0.46, 2.3, 11.5 mg·L⁻¹ 的齐墩果酸溶液直接进样, 记录齐墩果酸峰面积 (A_2)。另配制质量浓度 37 mg·L⁻¹ 的内标 (原人参二醇) 血样, 操作同上, 分别记录内标的峰面积 A_1 和 A_2 , 计算低、中、高质量浓度齐墩果酸血浆样品的绝对回收率分别为 71.23%, 75.02%, 73.71%, RSD 分别为 2.12%, 1.69%, 1.05%, 内标的绝对回收率 79.76%, RSD 1.45%。

$$\text{绝对回收率} = A_1/A_2 \times 100\%$$

2.6.4 方法回收率试验 配制齐墩果酸质量浓度分别为 0.46, 2.3, 11.5 mg·L⁻¹ 的血浆样品 ($n = 6$), 按 2.5 项下方法处理, 按 2.6.1 项下色谱条件测定, 记录峰面积比值, 计算低、中、高质量浓度的齐墩果酸血浆样品的方法回收率分别为 96.71%, 97.18%, 102.91%, RSD 分别为 2.98%, 3.12%, 2.53%。

2.6.5 精密度试验 配制齐墩果酸低、中、高 3 个质量浓度 (0.46, 2.3, 11.5 mg·L⁻¹) 的血浆样品, 按 2.5 项下方法处理, 分别于 1 d 和 1 w 内进样 6 次, 测定日内与日间精密度, 结果日内精密度 RSD 分别为 3.15%, 2.28%, 2.73%, 日间精密度 RSD 分别为 4.24%, 2.75%, 3.08%。

2.6.6 稳定性试验 配制齐墩果酸质量浓度分别为 0.46, 2.3, 11.5 mg·L⁻¹ 的血浆样品 ($n = 6$)。于 -20 °C 贮存, 24 h 后取出, 反复冻融 3 次, 室温融化, 按 2.5 项下方法处理, 按 2.6.1 项下色谱条件测定, 结果峰面积的 RSD 分别为 4.82%, 3.77%, 3.49%。分别于室温放置 0, 2, 4, 8, 12 h 取样, 按 2.5 项下方法处理, 测定, 结果峰面积的 RSD 分别为 3.92%, 1.71%, 2.06%。于 -20 °C 冰箱中冷冻放置 0, 7, 14, 28 d 后取样, 按 2.5 项下方法处理, 测定, 结果峰面积 RSD 分别为 4.93%, 3.47%, 3.12%, 表明样品的反复冻融稳定性、室温放置稳定性和冷冻放置稳定性较好。

2.7 大鼠药代动力学研究 将 12 只大鼠随机分成 2 组, 每组 6 只。第 1 组尾静脉注射齐墩果酸纳米脂质体, 第 2 组尾静脉注射自制的齐墩果酸溶液 (将齐墩果酸的乙醇溶液缓慢注入 1% 聚氧乙烯蓖麻油 (Cremophor) ELP 中, 过滤, 即得), 分别于给药后 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180 min 取样, 按 2.5 项下方法处理, 按 2.6.1 项下色谱条件测定, 记录齐墩果

酸和内标物的峰面积比,计算各时间点的齐墩果酸含量,结果见图3。

采用PK-Solver 2.0药动学软件^[5]进行非房室模型处理并计算药动学参数,利用SPSS 11.5软件对各药动学参数进行*t*检验,结果见表1。

由表1可知,齐墩果酸纳米脂质体延长了齐墩果酸的半衰期和体内平均滞留时间,使齐墩果酸在体内的AUC提高,消除减慢。齐墩果酸纳米脂质体的表观分布容积比溶液剂稍大,提示脂质体可能在一定程度上趋向于分布于组织中。

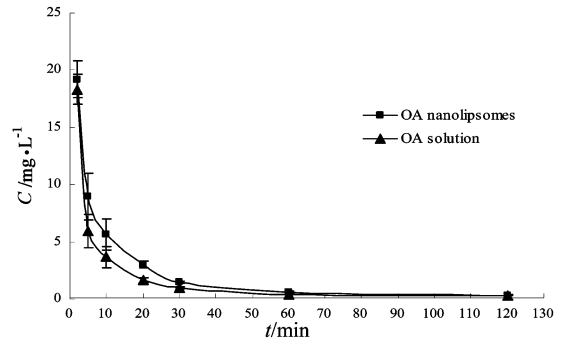


图3 齐墩果酸溶液和齐墩果酸纳米脂质体大鼠静脉给药后的药时曲线($n=6$)

表1 齐墩果酸溶液和齐墩果酸纳米脂质体大鼠体内的药动学参数($n=6$)

参数	单位	齐墩果酸溶液组	齐墩果酸纳米脂质体组
$t_{1/2}$	min	29.79 ± 2.08	$41.82 \pm 0.35^{2)}$
T_{max}	min	2.00 ± 0	2.00 ± 0
C_{max}	$mg \cdot L^{-1}$	18.32 ± 1.33	19.17 ± 1.61
C_0	$mg \cdot L^{-1}$	39.33 ± 2.61	32.09 ± 2.21
AUC_{0-t}	$mg \cdot L^{-1} \cdot min$	200.05 ± 16.53	$254.14 \pm 26^{1)}$
AUC_{0-inf_obs}	$mg \cdot L^{-1} \cdot min$	214.06 ± 17.47	$272.50 \pm 26.65^{1)}$
$AUMC_{0-inf_obs}$	$mg \cdot L^{-1} \cdot min^2$	$5\,922.01 \pm 649.14$	$8\,224.35 \pm 442.38^{1)}$
MRT_{0-inf_obs}	min	27.67 ± 2.14	$30.28 \pm 1.70^{1)}$
Vz_{obs}	$L \cdot kg^{-1}$	$0.605\,8 \pm 0.076\,2$	$0.668\,5 \pm 0.064\,3$
CL_{obs}	$L \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$	$0.014\,1 \pm 0.001\,1$	$0.011\,1 \pm 0.001\,1^{2)}$

注:与齐墩果酸溶液组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

齐墩果酸脂质体的制备方法一般包括薄膜超声分散法^[6]、乙醇注入法^[7]、前体脂质体制备法^[8]等。预试验曾采用薄膜超声分散法、乙醇注入法和乙醚注入法制备齐墩果酸纳米脂质体,所制备的脂质体粒径较大,且沉降迅速,物理稳定性及粒径均难以符合要求。磷脂的纯度与荷电性对沉降稳定性具有一定影响,通过改变外水相磷酸盐浓度可改善脂质体的沉降稳定性。采用逆相蒸发法制备的齐墩果酸纳米脂质体形态、粒径、包封率均较佳。脂质体静注后进入体内,由于单核巨噬系统的调理作用会使其在体内快速消除,减小粒径是其避免吞噬的方法之一^[9],而50~100 nm的粒径更有利于其进入肝实质细胞中^[10]。故在制备过程中将粒径控制在100 nm左右,主要目的是减缓药物在体内的消除,提高治疗效果。

由于目前市场上尚无齐墩果酸的注射剂型,故自制了齐墩果酸溶液作为脂质体的参比制剂。由于齐墩果酸的强疏水性,其在纯水中几乎不溶,很难配制至相应浓度。选用10%乙醇和1% Cremophor

ELP的混合溶液体系溶解药物,使药物的溶解度达 $0.994\,g \cdot L^{-1}$,显著提高了齐墩果酸的溶解度,但增溶原理及齐墩果酸在该体系中分散状态还需进一步研究。

齐墩果酸的检测波长206 nm属于末端吸收,吸收响应值偏低。以信噪比(S/N) ≥ 3 计,最低检测限 $100\,\mu g \cdot L^{-1}$,故血浆的处理采用蛋白沉淀提取药物后吹干浓缩的方法。该方法能检测到的最低质量浓度 $< 5\% C_{max}$,且线性、精密性、稳定性均符合体内样品分析的要求^[11]。采用内标法进行测定,避免了样品处理过程及仪器不稳定造成的误差,与文献^[12-13]采用的外标法相比,具有一定优势。

国内的药动学处理方法均采用房室模型,但房室模型并不是药物固有的药代动力学指标,同一种药物常常不只表现为一种房室模型,在一些人体内可呈现二房室模型,而在另一些人体内可能呈现一房室或三房室模型^[14]。目前,体内数据解析中非房室模型已成为主流处理方法,各国药品评审当局均推荐采用^[15]。非房室模型不受经典房室模型的限制,适用于任何隔室模型,而房室模型带有较多理论

假设,且在确定最佳模型时常不可避免地带有随意性,当模型选择有差别时,得出的药动学参数差异很大^[16]。曾尝试采用房室模型进行处理,发现脂质体组用三室模型拟合较好,而溶液组个别数据并不适合任一房室模型,综合考虑,本实验采用非房室模型处理药动学参数,得到较为理想的数据,但纳米粒径的微粒载体在体内的分布消除行为需进一步确认。

齐墩果酸由于溶解度极差、生物利用度较低,目前仅作为肝病及癌症的辅助治疗药物。现代药理学研究表明齐墩果酸具有较好的抗癌、抗炎、抗病毒等活性^[17],而注射剂型的开发可改善其吸收和生物利用度,具备广阔的应用前景。纳米脂质体作为药物传递系统的转载体,可避免表面活性剂增溶体系带来的毒性,提高用药安全性。纳米脂质体在体内组织间的穿透和滞留能力增加,消除减慢,更有利于其分布到靶组织靶器官,起到长效、靶向作用。

[致谢]复旦大学戚建平老师和中国药科大学沈雁老师在粒径测定及原子力显微镜观测试验工作中提供帮助。

[参考文献]

[1] 王奇,卢柏震. 齐墩果酸的研究进展[J]. 中国药房, 2008,19(9):711.
[2] 胡华杰. 齐墩果酸药理作用与临床应用研究进展[J]. 海峡药学,2012,24(3):92.
[3] 王德仁. 齐墩果酸研究新进展[J]. 天津药学,2003, 15(3):57.
[4] 许伯慧,李晓霞,孟璐,等. 齐墩果酸脂质体包封率的测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):86.
[5] ZHANG Y, HUO M, ZHOU J, et al. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data

analysis in Microsoft Excel [J]. Comput Methods Programs Biomed,2010,99(3):306.
[6] 来海中,马龙. 齐墩果酸脂质体的制备研究[J]. 新疆医科大学学报,2007,30(6):581.
[7] 代现平,张光辉. 正交试验优选齐墩果酸脂质体制备工艺[J]. 中国生化药物杂志,2011,32(1):10.
[8] 牟林. 齐墩果酸新型前体脂质体的制备和包封率考察[J]. 军医进修学院学报,2011,32(9):970.
[9] 孙聚魁,邓英杰,曹金娜. 纳米脂质体研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2010,27(12):993.
[10] 梅兴国. 微载体药物递送系统[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2009:2.
[11] 李好枝. 体内药物分析[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:55.
[12] 陈洪轩,和平,徐志杰,等. 齐墩果酸静脉注射乳剂的制备及大鼠体内药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2011,46(13):1023.
[13] 陈洪轩,牛江秀,肖衍宇,等. 齐墩果酸脂质体在大鼠体内药代动力学的研究[J]. 中成药,2010, 32(4):569.
[14] 秦建民,杨林,撒忠秋,等. 马钱子碱免疫纳米微粒的研制及药代动力学特点[J]. 中国组织工程研究, 2012,16(29):5331.
[15] 刘晓燕,王本杰,魏春敏,等. 淫羊藿苷单体及淫羊藿总黄酮提取物大鼠药动学特征比较[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(22):1858.
[16] 王广基. 药物代谢动力学[M]. 北京:化学工业出版社,2005:88.
[17] 昌盛,李龙. 齐墩果酸药理作用研究进展[J]. 广州化工,2011,39(14):30.

[责任编辑 全燕]