

尼莫地平纳米结构脂质载体的制备及大鼠体内药动学

王宏媛¹, 刘强², 张云杰¹, 王莹¹, 周泯江¹, 杨春荣^{1*}

(1. 黑龙江省生物药制剂重点实验室, 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007;
2. 力品药业有限公司, 福建 厦门 361000)

[摘要] 目的: 制备尼莫地平纳米结构脂质载体, 考察其性质及大鼠体内药代动力学。方法: 采用熔融-超声法制备经甲氧基聚乙二醇磷脂酰乙醇胺修饰的尼莫地平纳米结构脂质载体(mPEG2000-DSPE-NMD-NLC), 通过透射电镜观察形态, 测定粒径、包封率、载药量和 Zeta 电位, 考察体外释药特性。采用 HPLC 测定不同时间点大鼠血浆中尼莫地平质量浓度, 以尼莫地平注射液为对照, 计算 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 在大鼠体内的药代动力学参数。结果: 制备的 mPEG₂₀₀₀-DSPE-NMD-NLC 形态呈类球形, 大小均匀, 表面圆整; 粒径约 85 nm, Zeta 电位(-12.77 ± 0.15) mV, 包封率和载药量分别为(97.66 ± 0.45)%, (1.46 ± 0.05)%; 在 0~6 h 累计释放率 20.03%, 24 h 则为 43.06%; 药代动力学参数为 $t_{1/2} = 21.65$ h, MRT = 21.09 h, CL = 557.30 mL·h⁻¹·kg⁻¹, AUC_(0-t) = 6 411.96 μg·h²·L⁻¹。结论: mPEG₂₀₀₀-DSPE-NMD-NLC 的粒径分布均匀, 体内外缓释效果明显, 体内循环时间明显延长, 为改善尼莫地平的临床疗效提供参考。

[关键词] 尼莫地平; 纳米结构脂质载体; 熔融-超声法; 体外释放; 药代动力学

[中图分类号] R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0178-05

[doi] 10.11653/syjf2013160178

[收稿日期] 20130522(008)

[基金项目] 黑龙江省研究生创新科研项目(YJSCX2012-363HLJ); 黑龙江省自然科学基金项目(D201158); 黑龙江省卫生厅项目(2011-451); 黑龙江省中医管理局项目(ZHY12-Z197)

[第一作者] 王宏媛, 在读硕士, 从事药剂学研究, Tel: 18714543711, E-mail: wanghongyuanka@sina.com

[通讯作者] * 杨春荣, 博士, 副教授, 从事脑靶向给药系统研究, Tel: 0454-8610920, E-mail: yangchunrong98@yahoo.com.cn

代谢较柚皮苷显著, 可为柚皮苷和柚皮素的药物代谢动力学特征研究及新药开发应用提供参考。

[参考文献]

[1] 袁旭江, 林励, 陈志霞. 化橘红中酚性成分的研究[J]. 中草药, 2004, 35(5): 499.
[2] 杜勇, 李琰, 张小茜. 蜜橘橘红痰咳胶囊质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(10): 14.
[3] 汪兰芳, 方优妮, 韩建伟, 等. 正交试验优选橘红贴膏的乙醇渗漉提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 38.
[4] 杨娟, 周向东. 柚皮素对炎症性气道黏液高分泌的作用[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(5): 726.
[5] 李秀娟, 周志钦. 柑桔柚皮苷抗癌活性研究进展[J]. 中国果业信息, 2011, 28(1): 28.
[6] 韩小芬. 柚皮素抗纤维化、抗肿瘤作用的研究[D]. 郑

州: 河南大学, 2008.

[7] 冯颖倩, 左学兰, 李瑞芳, 等. 柚皮素对阿霉素损伤的正常血细胞的保护作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(4): 790.
[8] 周燕文, 时雪峰. 柚皮苷对四氧嘧啶致糖尿病小鼠的降糖与抗氧化作用[J]. 中国药师, 2012, 15(3): 293.
[9] 张甘良, 汪钊, 朱国孟. 柑桔生物类黄酮柚皮苷生物活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(B06): 117.
[10] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2004: 2.
[11] 夏宗玲, 陈荣, 邹素兰, 等. HPLC 法测定大鼠肝微粒体中鞣酐的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(37): 3483.
[12] 杨本坤, 王素军, 莫李立, 等. 药物代谢体外模型的研究进展[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(6): 649.

[责任编辑 全燕]

Preparation and *in vivo* Pharmacokinetics in Rats of Nimodipine Nanostructured Lipid Carriers

WANG Hong-yuan¹, LIU Qiang², ZHANG Yun-jie¹, WANG Ying¹, ZHOU Min-jing¹, YANG Chun-rong^{1*}

(1. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Biological Medicine Preparations, School of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 2. Lipin Pharmaceutical Co. Ltd, Xiamen 361000, China)

[Abstract] Objective: To prepare nanostructured lipid carriers modified with mPEG₂₀₀₀-DSPE (mPEG2000-DSPE-NMD-NLC) and investigate its properties and *in vivo* pharmacokinetics in rats. **Method:** mPEG2000-DSPE-NMD-NLC were prepared by melt ultrasonication method, morphology was observed by TEM, particle size, entrapment efficiency, drug loading and Zeta potential were determined, *in vitro* release was examined. Plasma concentrations of nimodipine at different time point in rats were determined by HPLC, with nimodipine injection as control, pharmacokinetics parameters of mPEG2000-DSPE-NMD-NLC in rats were calculated. **Result:** Prepared mPEG2000-DSPE-NMD-NLC showed spherical with uniform size and rounded surface; Particle size was about 85 nm, Zeta potential was (-12.77 ± 0.15) mV, entrapment efficiency and drug loading were (97.66 ± 0.45)% and (3.36 ± 1.53)%, respectively; Cumulative release of mPEG2000-DSPE-NMD-NLC was 20.03% within 0-6 h, and 43.06% at 24 h. Pharmacokinetic parameters were as follows: $t_{1/2} = 21.65$ h, $MRT = 21.09$ h, $CL = 557.30$ mL·h⁻¹·kg⁻¹, $AUC_{(0-t)} = 6411.96$ μg·h²·L⁻¹. **Conclusion:** Particle size distribution of mPEG2000-DSPE-NMD-NLC was uniform, its showed obvious *in vitro* and *in vivo* sustained-release characteristic. This study could lay foundation for improving clinical efficacy of nimodipine.

[Key words] nimodipine; nanostructured lipid carriers; melt ultrasonication method; *in vitro* release; pharmacokinetics

尼莫地平(NMD)为第二代1,4-双氢吡啶类钙离子通道阻滞剂^[1],具有高脂溶性、易通过血脑屏障等优点,临床用于各种蛛网膜下腔出血引起的脑血管痉挛、脑卒中、老年性痴呆、突发性耳聋等症^[2-8]。但NMD溶解度小,半衰期短,对血管刺激性大,存在安全性隐患。纳米结构脂质载体(NLC)是采用纳米技术制备的可负载活性成分的新型脂质纳米粒,具有毒性低、可控释药物、靶向性好、载药量大、避免药物的降解与泄漏等特点。本实验采用熔融-超声法制备尼莫地平长循环纳米结构脂质载体(mPEG2000-DSPE-NMD-NLC),并考察其理化性质、体外释放度及大鼠体内药代动力学,为尼莫地平新型制剂的开发提供实验依据。

1 材料

FA1104型电子天平(上海民侨精密科学仪器有限公司),JY92-2D型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所),DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪华仪器厂),JEM-1200EX型透射电子显微镜(日本JEOL公司),Nano-ZS90型激光粒度仪(英国马尔文公司)。

尼莫地平原料(纯度98.9%,宁波市中药制药有限公司),尼莫地平、尼群地平对照品(上海江莱生物科技有限公司,批号分别为20110719,2012518),山嵛酸甘油酯(Compritol 888 ATO,法国Gattefossé公司),棕榈酸棕榈酯(CP,日本东京化学工业株式会社),辛酸/癸酸甘油酯(Miglyol® 812,德国SASOL公司),聚氧乙烯660-12羟基硬脂酸酯(Solutol HS15®,德国BASF公司),甲氧基聚乙二醇磷脂酰乙醇胺(mPEG2000-DSPE,上海西宝生物科技有限公司),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SD种大鼠,体重(220 ± 20)g,雌雄兼有,均购自大连实验动物研究中心,生产许可证号SCXK(辽)-2008-0002。

2 方法与结果

2.1 NMD-NLC和mPEG2000-DSPE-NMD-NLC的制备

2.1.1 NMD-NLC普通纳米粒的制备

在避光条件下,分别称取NMD(液体脂质),CP(固体脂质),Miglyol® 812(液体脂质)8.22,200,50mg,混合均

匀,水浴加热熔融作为油相,温度控制在 $(65 \pm 5)^\circ\text{C}$,使药物和脂质混合熔融。分别精密称取卵磷脂和 Solutol HS15[®] 116.7,233.3 mg,加至 10 mL 注射用水中,超声均匀分散,磁力搅拌下将同温度的水相滴加入油相中分散成初乳。滴加速度 $10\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,搅拌 5 min,将初乳于 600 W 超声 8 min,加室温水冷却固化,经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得。

2.1.2 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 的制备 分别精密称取卵磷脂, Solutol HS15[®], mPEG2000-DSPE 116.6,240.6,12.3 mg,加至 10 mL 注射用水中,超声均匀分散,磁力搅拌下将同温度的水相滴加入油相中分散成初乳。余下操作同 2.1.1 项,即得。

2.2 形态观察 取 NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 用水稀释一定倍数滴在喷碳铜网表面,使液体尽量铺满整个铜网,以 2.0% 磷钨酸染色 3 min 后,用滤纸吸走多余的液体,自然干燥后置于透射电镜下观察形态,结果表明 mPEG₂₀₀₀-DSPE-NMD-NLC 形态呈类球形,大小均匀,表面圆整,见图 1。

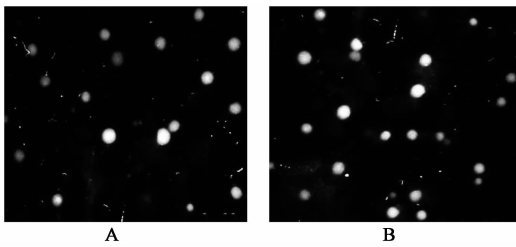


图 1 NMD-NLC(A)和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC(B)透射电镜

2.3 Zeta 电位测定 通过 Zeta 电位仪测定纳米粒的 Zeta 电位,结果表明 NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 的 Zeta 电位分别为 (-11.73 ± 0.21) , $(-12.77 \pm 0.15)\text{ mV}$ 。

2.4 粒径测定 取 NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 混悬液,水稀释至适当质量浓度,用激光粒度仪测定 NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 的粒径,见图 2,结果表明二者的粒度分布呈单峰,粒径分别约 78,85 nm,粒径分布指数(PDI)分别为 0.274,0.254。

2.5 包封率及载药量测定 取 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 适量,置超滤离心管上端,于 $3\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,滤液置于 5 mL 量瓶中,用甲醇超声定容至刻度。另取适量 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 置于 5 mL 量瓶中,加甲醇超声定容至刻度,超声破乳,静置。取上清液于 355 nm 处进行紫外扫描,计算包封率(EE)和载药量(DL)^[9]。

$$EE = (1 - C_{\text{游离}} / C_{\text{总}}) \times 100\% ;$$

$$DL = W_{\text{药物}} / W_{\text{脂质}} \times 100\%$$

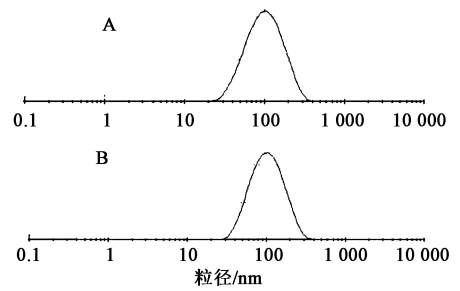


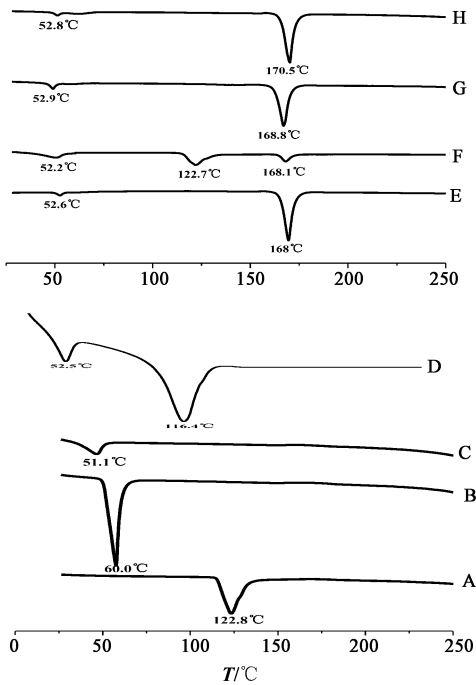
图 2 NMD-NLC(A)和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC(B)的粒度分布

式中 $C_{\text{游离}}$ 为游离 NMD 质量浓度, $C_{\text{总}}$ 为混悬液中 NMD 总质量浓度, $W_{\text{药物}}$ 为纳米粒中封装的药物量, $W_{\text{脂质}}$ 为处方中混合脂质重量,结果 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 的包封率和载药量分别为 $(97.66 \pm 0.45)\%$, $(1.46 \pm 0.05)\%$ ($n=3$)。

2.6 DSC 分析 将处方量的 NMD 原料药、固体脂质、固体与液体混合脂质、物理混合物(NMD, CP, Miglyol[®] 812)、空白 NLC、NLC + NMD、NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 的冻干样品进行 DSC 分析,见图 3。结果 NMD 的特征吸收峰 122.8°C , 固体脂质材料的特征吸收峰 60.0°C , 而液体脂质的加入使脂质材料的特征吸收峰减弱到 51.1°C , 说明液体脂质材料的加入使原有的晶格结构发生了改变。物理混合物中 NMD 的特征吸收峰减弱至 116.4°C , NMD-NLC 冻干样品中 NMD 的特征吸收峰已消失,说明 NMD 以无定形存在于纳米结构脂质载体中,纳米粒成功封装 NMD。

2.7 体外释放考察^[10] 量取 NMD 溶液、NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 适量,分别平行 3 份,置于透析袋(相对分子质量 8 000 ~ 14 000)内,扎紧后缚于溶出仪浆叶的底部。量取适量 pH 7.4 PBS(含 0.5% 聚山梨酯-80)溶出介质 6 份,置于溶出杯内,恒温 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,转速 $50\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,预定时间吸取透析液,同时补加同温等体积的释放介质。取出的释放介质用 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,采用紫外分光光度法测定 NMD 含量,计算游离药物的累计释放率,见图 4。结果表明 NMD 溶液在 12 h 释放 99%; NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 在 0 ~ 6 h 累计释放率分别为 20.77%, 20.03%, 24 h 累计释放率分别为 61.02%, 43.06%, 说明 NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 在体外呈缓释,与普通剂型组相比,在血液中循环时间更长。

2.8 大鼠体内药物动力学试验^[11-12]



A. NMD; B. CP; C. 固体与液体混合脂质; D. 物理混合物;
E. NLC; F. NLC + NMD; G. NMD-NLC;
H. mPEG2000-DSPE-NMD-NLC

图3 各样品 DSC 分析

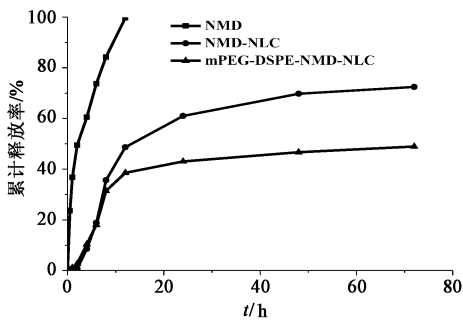
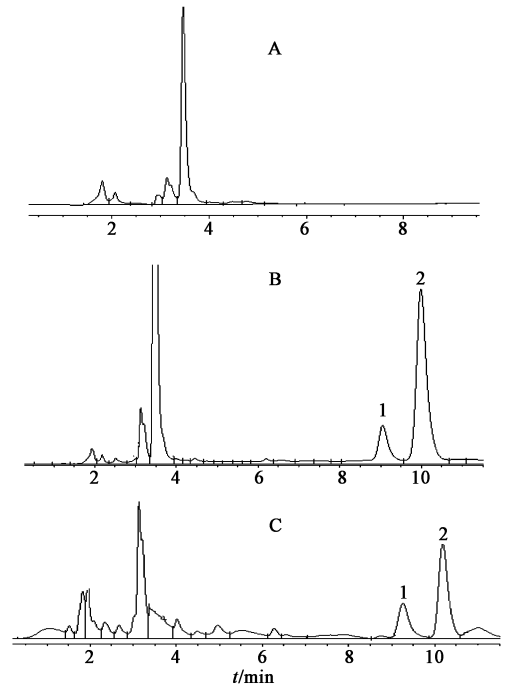


图4 NMD,NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 的体外释放考察

2.8.1 色谱条件 ODS HYPERSIL 色谱柱 (2.6 mm × 250 mm, 10 μm), 流动相甲醇-水 (70:30), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 237 nm, 柱温室温, 进样量 20 μL, 见图 5。

2.8.2 大鼠血浆样品的预处理 取空白血浆 200 μL, 置 4.5 mL 具塞离心管中, 加入 10 mg·L⁻¹ 的尼群地平 20 μL, 涡旋混合, 加入碱化液 (pH 12 的 NaOH 溶液) 200 μL, 涡旋 30 s, 加乙醚-正己烷 (1:1) 3 mL, 涡旋震荡 5 min, 于 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min。分离有机层至另一个圆底离心管中, 于 40 °C 水浴中氮气吹干, 残留物用 50 μL 流动相溶解, 超声 10 min, 得血浆样品。

2.8.3 方法学考察 取大鼠空白血浆 200 μL, 加



A. 空白血浆样品; B. 含药空白血浆样品; C. 给药后血浆样品; 1. 尼群地平; 2. 尼莫地平

图5 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 的 HPLC

入尼莫地平对照品溶液, 配制 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 mg·L⁻¹ 的尼莫地平血浆样品, 各加入内标尼群地平 20 μL。按 2.8.2 项下方法处理, 进样, 以尼莫地平与尼群地平的峰面积比值为纵坐标, 尼莫地平质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 1.955X + 0.107$ ($r = 0.9970$), 测得低、中、高 3 个质量浓度方法回收率和提取回收率均在 80% ~ 100%, 该方法的日内和日间精密度 RSD 均 < 10%。

2.8.4 大鼠药代动力学试验 取健康 SD 大鼠 15 只, 随机分为 3 组, 每组 5 只, 按 4.56 mg·kg⁻¹ 剂量分别尾静脉注射 NMD 注射剂、NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC。于给药后 2, 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 720, 1 440 min, 眼眶取血置含有肝素钠的离心管中, 进样, 检测, 绘制血药浓度-时间曲线, 见图 6。

由图 6 可知, NMD 注射液的消除最快, 在 240 min 几乎检测不到色谱峰。mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 与 NMD-NLC 比较, NMD 的消除要缓慢得多, 半衰期 ($t_{1/2}$) 是直接注射 NMD 注射液的 4 ~ 6 倍, 表现出更好的长循环效果, 可能是由于 mPEG2000-DSPE 对纳米结构脂质载体表面修饰时, 吸附大量的水分子, 更能持久地延长在血液的驻留时间, 提高药物在体内的治疗效果^[13]。药代动力学参数见表 1, 表明与 NMD 注射液相比, mPEG2000-DSPE-NMD-

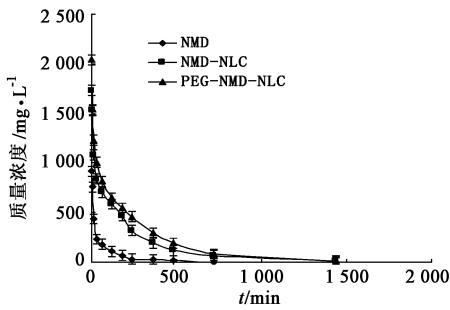


图 6 NMD 注射液, NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-

NMD-NLC 的血药浓度-时间曲线

NLC 与 NMD-NLC 组的 AUC 值显著增大, 平均滞留时间(MRT)和 $t_{1/2}$ 延长。而 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 的 MRT 显著长于 NMD-NLC, 证明 mPEG2000-DSPE 能增加 NMD 体内的循环时间。

表 1 NMD 注射液, NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 的 药代动力学参数 (n = 5)

参数	NMD 注射液	NMD-NLC	mPEG2000-DSPE-NMD-NLC
$t_{1/2}/h$	3.95	13.23	21.65
$AUC_{(0-t)}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	730.14	4 339.42	6 411.96
$AUC_{(0-\infty)}/\mu g \cdot h \cdot L^{-1}$	826.79	5 062.77	8 182.25
$AUMC_{(0-t)}/\mu g \cdot h^2 \cdot L^{-1}$	1 284.16	22 197.32	55 485.93
$AUMC_{(0-\infty)}/\mu g \cdot h^2 \cdot L^{-1}$	2 609.49	53 834.86	174 538.62
MRT/h	3.61	10.47	21.09
$CL/mL \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	5 515.33	808.48	557.30

3 讨论

NLC 是在固体脂质纳米粒的基础上发展起来的新型给药系统, 由于液态脂质引入, 使载体系统可变形增加, 形成一些含纳米隔室的脂质骨架, 避免储存过程中药物被排挤。液态脂质的类型或含量不同, 均会使粒径、多分散性和释放行为发生改变。

通过熔融-超声法制备的尼莫地平长循环纳米结构脂质载体包封率高, 粒径小, 通过透射电子显微镜观察纳米粒呈类球形, 结构完整, 体外释放缓释效果明显。建立了 HPLC 测定大鼠血浆中 NMD 质量浓度的方法, 该方法专属性强、灵敏度高。以尾静脉注射给药途径考察 NMD-NLC 和 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 在大鼠体内的药代动力学差异, 发现 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 的 $t_{1/2}$ 显著延长, AUC 显著增加, CL 显著减少。延长了 NMD 在循环系统内的滞留时间, 使 NMD 在血浆中浓度能维持较长时间, 从而提高 NMD 的疗效。

[参考文献]

[1] ZHAO W J, WU C H. Nimodipine attenuation of early

brain dysfunctions is partially related to its inverting acute vasospasm in a cisterna magna subarachnoid hemorrhage model in rats[J]. *Int J Neurosci*, 2012, 122(10):611.

[2] Giannakou S A, Dallas P P, Rekkas D M, et al. *In vitro* evaluation of nimodipine permeation through human epidermis using response surface methodology[J]. *Int J Pharm*, 2002, 241(1):27.

[3] 韩威, 野向春, 孟昭杰, 等. 尼莫地平对大鼠急性脑缺血再灌注损伤早期保护作用的研究[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2012, 29(6):543.

[4] Balaev A N, Osipov V N, Fedorow V E. Development of nimodipine production technology[J]. *Pharm Chem J*, 2012, 46(5):285.

[5] HU F Q, JIANG S P, DU Y Z, et al. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers[J]. *Int J Pharm*, 2006, 314(1):83.

[6] HAN F, LI S M, YIN R, et al. Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers[J]. *Colloid Surface A: Physicochem Eng Aspects*, 2008, 315(1/3):210.

[7] Praveen S, Brahmanand D, Krutika S. Development and evaluation of nanostructured lipid carriers of cytarabine for treatment of meningeal leukemia [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2011, 11(8):6676.

[8] D. YJZ, YZ, L, et al. Preparation, characterization, and pharmacokinetics of sterically stabilized nimodipine-containing liposomes[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2006, 32(2):219.

[9] 黄霞, 陈卫东. 固体脂质纳米粒和纳米结构脂质载体二类脂质纳米给药系统的比较[J]. *中国新药杂志*, 2012, 47(17):1350.

[10] 蒋楠, 孙雯, 李晔, 等. 葛根素微乳凝胶的制备及体外释放考察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(21):34.

[11] 胡楠, 梁日欣, 王岚, 等. 延胡索提取物在大鼠血浆中的药代动力学研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(4):186.

[12] 魏崇武, 王智民, 仝燕, 等. 穿琥宁凝胶直肠给药的药代动力学及生物利用度研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2004, 10(4):47.

[13] JIA L J, SHEN J Y, ZHANG D R, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of oridonin-loaded long circulating nanostructured lipid carriers[J]. *Int J Biol Macromol*, 2012, 50(3):523.

[责任编辑 仝燕]