

[制 剂]

辣椒碱磷脂复合凝胶的制备及其药动学行为

徐子金, 杨章坚*, 陈 慧, 叶颖俊
(江西医学高等专科学校药理学系, 江西 上饶 334000)

摘要: **目的** 制备辣椒碱磷脂复合凝胶, 并考察其药动学行为。**方法** 溶剂挥发法制备磷脂复合物, 再将其 PBS 溶液倒入卡波姆 940 溶液中以制备凝胶。在单因素试验基础上, 以投料比 (磷脂-辣椒碱)、辣椒碱质量浓度、反应时间为影响因素, 磷脂复合物复合率为评价指标, 星点设计-响应面法优化制备工艺。家兔分别经皮给药磷脂复合凝胶、普通凝胶后, LC-MS/MS 法测定血浆中辣椒碱含量, 再绘制 2 种凝胶的药-时曲线, 计算其药动学参数。**结果** 最佳条件为投料比 2.3 : 1, 辣椒碱质量浓度 16 mg/mL, 反应时间 2 h, 反应温度 55 ℃, 复合率 97.84%。与普通凝胶相比, 磷脂复合凝胶的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 更高, $t_{\max}$ 更低。**结论** 辣椒碱制备成磷脂复合凝胶后, 可显著增加其生物利用度, 并促进药物经皮吸收。

关键词: 辣椒碱; 磷脂复合凝胶; 制备; 药动学行为; 家兔; 星点设计-响应面法

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)12-2497-06
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.12.010

Preparation of capsaicin phospholipid complex gel and its pharmacokinetic behaviors

XU Zi-jin, YANG Zhang-jian*, CHEN Hui, YE Ying-jun
(Department of Pharmacy, Jiangxi Medical College, Shangrao 334000, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare capsaicin phospholipid complex gel and to investigate its pharmacokinetic behaviors. **METHODS** Phospholipid complex was prepared by solvent evaporation method, whose PBS solution was then poured into Carbopol 940 solution to prepare gel. With feed ratio (phospholipid-capsaicin), capsaicin concentration and reaction time as influencing factors, phospholipid complex's recombination rate as an evaluation index, the preparation was optimized by central composite design-response surface method on the basis of single factor experiment. Rabbits were percutaneously administered with phospholipid complex gel and ordinary gel, respectively, after which LC-MS/MS was adopted in the content determination of capsaicin in plasma. Then the drug concentration-time curves for two gels were drawn, followed by the calculation of their pharmacokinetic parameters. **RESULTS** The optimal conditions were determined to be 2.3 : 1 for feed ratio, 16 mg/mL for capsaicin concentration, 2 h for reaction time, and 55 ℃ for reaction temperature, the recombination rate was 97.84%. The phospholipid complex gel demonstrated its superiority to the ordinary gel with higher $C_{\max}$, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, and lower $t_{\max}$. **CONCLUSION** Capsaicin prepared into phospholipid complex gel has obviously increased bioavailability and improved percutaneous absorption.

KEY WORDS: capsaicin; phospholipid complex gel; preparation; pharmacokinetic behaviors; rabbits; central composite design-response surface method

收稿日期: 2017-08-08

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ151341)

作者简介: 徐子金 (1987—), 男, 硕士, 助教, 从事药物新剂型研究。Tel: 13879319782, E-mail: cczyyxzj@163.com

* 通信作者: 杨章坚 (1989—), 男, 硕士, 助教, 从事基础药理学研究。Tel: 15779397901, E-mail: 495266114@163.com

辣椒碱是从茄科植物辣椒的成熟果实中提取得到的一种极其辛辣的香草酰胺类生物碱^[1], 其低纯度产品作为添加剂广泛应用于食品工业。其进一步纯化后的辣椒碱素具有许多生理活性, 对某些含 P-物质的感觉神经系统、心血管、肺功能、体温调节、胃肠机能有显著影响, 具有镇痛消炎、促进脂肪代谢、催泪催涕的作用^[2], 做成软膏时, 对慢性风湿性关节炎^[3]、带状疱疹后神经痛^[4-5]、糖尿病性神经痛^[6]、三叉神经痛^[7]有显著疗效, 对乳腺癌具有一定治疗作用^[8]; 与吗啡合用时, 能减轻吗啡类药物的戒断综合症, 减少成瘾性^[9]。

由于辣椒碱口服具有难以耐受的刺激性, 因此国内外均采用经皮给药的形式, 《美国药典》收载了辣椒碱及其软膏制剂, 在国内主要以软膏和凝胶剂型上市。皮肤作为限制体外物质吸收进入人体内的生理屏障, 对大多数药物的透过率较低, 而在整个透过程中, 含有类脂质的角质层起着主要屏蔽作用, 故药物脂溶性越高, 越易于透过皮肤^[10]。研究表明, 辣椒碱脂溶性较低, 为了达到有效浓度, 在 1 d 内需频繁给药, 从而增加了皮肤的刺激性。本实验采用星点设计-响应面法优化辣椒碱磷脂复合物的处方工艺, 并进一步制备成凝胶剂, 以期改善其脂溶性, 提高经皮给药生物利用度。

1 材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司); API 4000 型质谱仪 (美国应用生物系统公司); AL204 电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; ZNCL-BS 数显恒温磁力搅拌器 (上海越众仪器设备有限公司); RE100 - Pro 数控旋转蒸发仪 (大龙兴创实验仪器有限公司); DZF-6092 真空干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); TDL80-2B 低速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); NDK200-1A 氮吹仪 (上海上天精密仪器有限公司); SZ-1 型快速混匀器 (江苏金坛江南仪器厂)。辣椒碱 (批号 110839-201205, 含有量 97.5%)、格列本脲 (批号 100135-201105) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 辣椒碱 (美国 Sigma 公司, 含有量 $\geq 98\%$); 大豆磷脂 (上海艾维特医药科技有限公司); 卡波姆 940 (CP940, 北京奥利化学试剂有限公司)。丙二醇、丙三醇、NaOH、尼泊金乙酯、磷酸均购自国药集团化学试剂有限公司, 均为药用级; 乙腈、异丙醇为色谱纯 (美国 Sigma 公司); 乙酸乙酯、四氢呋喃、无水乙醇、二氯甲烷、甲酸均为分析纯。健康雄性新西兰家兔

(南昌大学医学部实验动物中心), 体质量 1.5 ~ 2.5 kg, 动物许可证号 SCXK (赣) 2010-0001。

2 方法与结果

2.1 磷脂复合物制备 将磷脂溶于反应溶剂中, 加入适量辣椒碱, 在一定温度下搅拌反应一段时间后, 减压除去溶剂, 残留物加入适量二氯甲烷, 充分溶解后过滤, 少量二氯甲烷冲洗沉淀物, 合并滤液及洗液, 回收二氯甲烷, 剩余物减压干燥, 即得辣椒碱磷脂复合物。

2.2 复合率测定 由于辣椒碱不溶于二氯甲烷, 而磷脂和磷脂复合物均可溶, 故采用二氯甲烷将未复合的辣椒碱沉淀, 复合率计算公式为复合率 = $[(M_1 - M_0) / M_1] \times 100\%$, 其中 M_1 为辣椒碱初始投料量, M_0 为沉淀量。

2.3 单因素试验

2.3.1 反应溶剂 固定磷脂投料量为辣椒碱的 3 倍, 辣椒碱质量浓度 15 mg/mL, 反应温度 50 ℃, 反应时间 2 h, 选择乙酸乙酯、四氢呋喃、甲醇、无水乙醇作为反应溶剂制备复合物, 测得复合率分别为 57.52%、84.25%、62.16%、74.45%, 故选择四氢呋喃作为反应溶剂。

2.3.2 投料比 (磷脂-辣椒碱) 固定反应溶剂为四氢呋喃, 辣椒碱质量浓度 15 mg/mL, 反应温度 50 ℃, 反应时间 2 h, 设定磷脂投料量为辣椒碱的 1、2、3、4 倍, 制备复合物, 测得复合率分别为 35.44%、76.37%、84.25%、86.64%。由此可知, 随着磷脂比例增高, 复合率逐渐增大; 当投料比超过 1:3 时, 复合率增长不明显, 而且过量磷脂会影响复合物的干燥效率, 故确定磷脂投料量应不超过辣椒碱的 3 倍。

2.3.3 反应温度 固定反应溶剂为四氢呋喃, 磷脂投料量为辣椒碱的 3 倍, 辣椒碱质量浓度 15 mg/mL, 反应时间 2 h, 设定反应温度 30、35、40、45、50、55、60 ℃, 制备复合物, 测得复合率分别为 80.24%、82.87%、83.58%、84.36%、84.25%、86.80%、81.78%。由此可知, 随着反应温度升高, 复合率略有增加; 当温度超过 45 ℃ 时, 复合率增长不明显; 当温度达到 60 ℃ 时, 复合率略有降低, 可能是温度过高导致磷脂氧化加速, 故选择 55 ℃ 作为反应温度。

2.3.4 反应时间 固定反应溶剂为四氢呋喃, 磷脂投料量为辣椒碱的 3 倍, 辣椒碱质量浓度 15 mg/mL, 反应温度 55 ℃, 设定反应时间为 0.5、1、1.5、2、2.5、3 h, 制备复合物, 测得复合率

分别为 52.98%、63.52%、79.77%、86.80%、87.26%、86.94%。由此可知,随着反应时间增加,复合率逐渐增加;当时间超过 2 h 时,复合率增长不明显;时间进一步延长时,不仅增加能耗,还可能影响药物的稳定性,故确定反应时间在 3 h 以内。

2.3.5 辣椒碱质量浓度 固定反应溶剂为四氢呋喃,磷脂投料量为辣椒碱的 3 倍,反应温度 55 ℃,反应时间 2 h,设定辣椒碱质量浓度为 5、10、15、20、25、30 mg/mL,制备复合物,测得复合率分别为 66.75%、78.83%、86.80%、90.20%、76.17%、62.39%。由此可知,随着质量浓度增加,复合率逐渐提高;当质量浓度超过 20 mg/mL 时,辣椒碱溶解不完全,复合率反而下降,故确定辣椒碱质量浓度在 20 mg/mL 以内。

2.4 星点设计-响应面法优化

2.4.1 试验设计 根据单因素试验结果,选取对复合率影响较大的投料比(X_1)、辣椒碱质量浓度(X_2)和反应时间(X_3)作为考察因素,以复合物复合率(Y)为评价指标,进一步优化制备工艺,因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

表 1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

因素	水平				
	-1.732	-1	0	1	1.732
X_1 投料比	1.00 : 1	1.42 : 1	1.50 : 1	2.58 : 1	3.00 : 1
X_2 辣椒碱/(mg · mL ⁻¹)	5.00	8.17	12.50	16.83	20.00
X_3 反应时间/h	0.50	1.03	1.75	2.47	3.00

表 2 试验设计及结果

Tab. 2 Design and results of tests

序号	X_1	X_2	X_3	Y 复合率/%
1	-1	-1	-1	64.50
2	1	-1	-1	84.12
3	-1	1	-1	83.36
4	1	1	-1	96.37
5	-1	-1	1	72.28
6	1	-1	1	87.42
7	-1	1	1	88.13
8	1	1	1	95.55
9	-1.732	0	0	58.29
10	1.732	0	0	90.86
11	0	-1.732	0	61.90
12	0	1.732	0	93.62
13	0	0	-1.732	66.92
14	0	0	1.732	85.32
15~20	0	0	0	80.15

注:15~20 为重复试验,用平均值表示

2.4.2 模型拟合 采用 SPSS17.0 统计软件进行多

元线性拟合,得方程 $Y = 25.835 + 13.049X_1 + 1.185X_2 + 4.651X_3$ ($r=0.932\ 8$, $P<0.01$);以复合率为指标对各因素进行二次多项式拟合,得方程 $Y = -88.304 + 99.989X_1 + 4.832X_2 + 25.618X_3 - 17.032X_1^2 - 0.794X_1X_2 - 4.584X_1X_3 - 0.044X_2^2 - 0.286X_2X_3 - 2.631X_3^2$ ($r=0.991\ 4$, $P<0.01$)。由此可知,后者拟合结果优于前者,可信度高,相关系数显著性检验结果见表 3,可知 $X_1 \sim X_3$ 均有显著性差异 ($P<0.05$)。

表 3 相关系数显著性检验结果

Tab. 3 Results of significance tests for correlation coefficients

指标	预测值	标准差	t 值	P 值
常量	-88.304	29.607	-2.983	0.031
X_1	99.989	18.669	5.356	0.003
X_2	4.832	1.726	2.799	0.038
X_3	25.618	9.367	2.735	0.041
X_1^2	-17.032	4.418	-3.856	0.012
X_1X_2	-0.794	0.341	-2.331	0.067
X_1X_3	-4.584	2.048	-2.238	0.075
X_2^2	-0.044	0.060	-0.728	0.499
X_2X_3	-0.286	0.315	-0.907	0.406
X_3^2	-2.631	2.172	-1.212	0.280

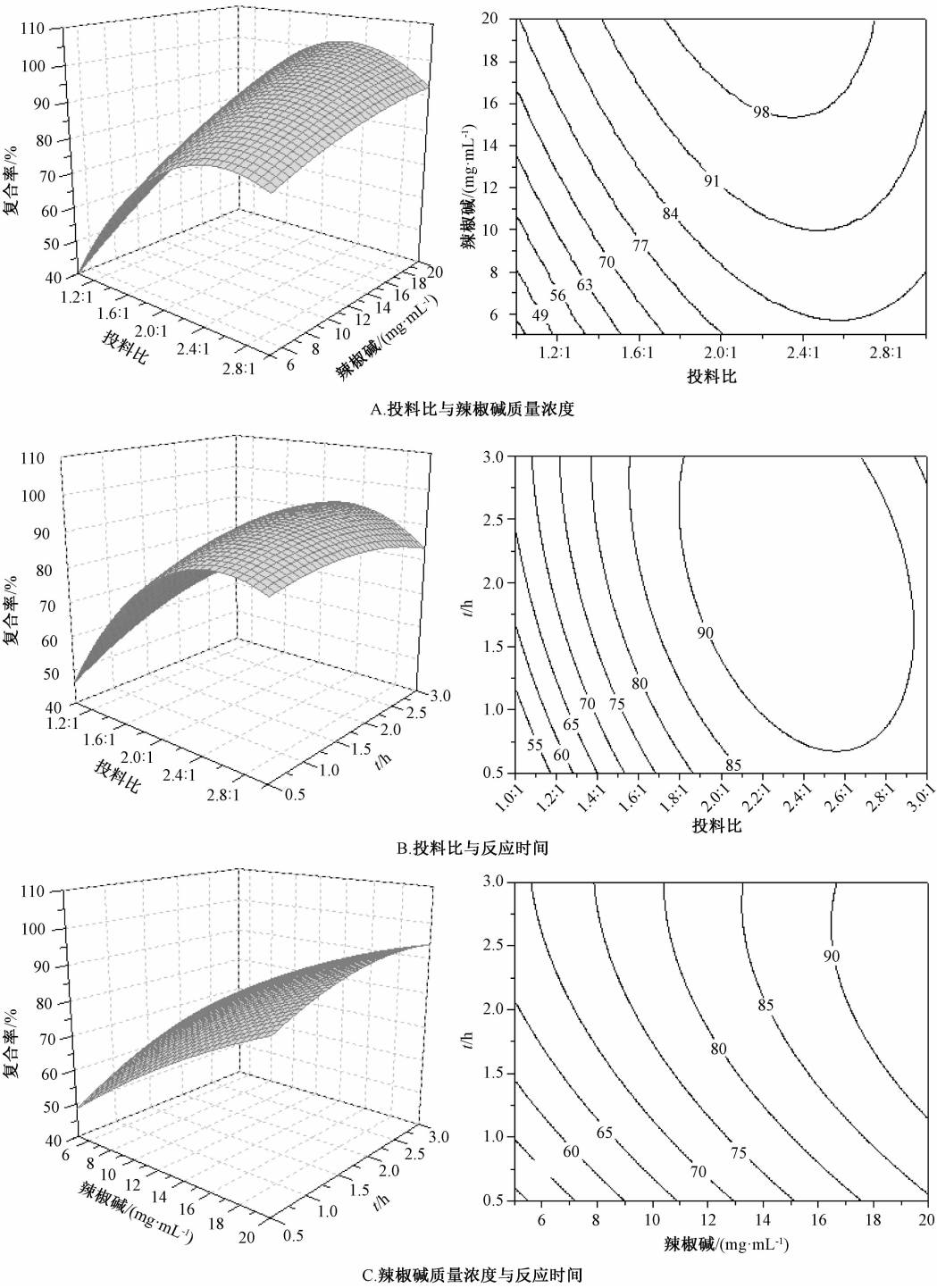
2.4.3 响应面优化 见图 1,确定最优工艺为投料比 2.3 : 1,辣椒碱质量浓度 16 mg/mL,反应时间 2 h,理论复合率为 98.87%。

2.4.4 验证试验 根据最优工艺,即以四氢呋喃为溶剂,反应温度 55 ℃,投料比 2.3 : 1,辣椒碱质量浓度 16 mg/mL,反应时间 2 h,重复 3 次,测得平均复合率为 97.84%,与预测值为 98.87% 相近,表明该模型预测性良好,结果可靠。

2.5 复合凝胶制备 精密称取一定量卡波姆 940 置于烧杯中,加适量水溶胀,再精密称取一定量“2.1”项下磷脂复合物,PBS 溶解后倒入卡波姆溶液中,加水至全量,持续搅拌直至形成凝胶。该凝胶中卡波姆 940 含有量为 0.5%,复合物规格为 20 g : 15 mg。

2.6 药动学行为评价

2.6.1 试验设计及样品采集 将 12 只家兔随机分为磷脂复合凝胶组和普通凝胶组,给药前禁食 12 h。给药前 1 d,背部以 8% Na₂S 脱毛,面积 5 cm × 10 cm,并确保皮肤完整无破损,将 2 种凝胶分别涂抹在皮肤上,给药量均为 7.5 mg (以辣椒碱计),涂抹面积约为 20 cm²,位置尽可能一致,厚度约为 1 ~ 2 mm。在给药前和给药后 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、



注：左图为响应面图，右图为等高线图
图 1 各因素响应面图

Fig. 1 Response surface plots for various factors

12.0、16.0、24.0 h，经耳缘静脉采血约 1 mL，置于含肝素钠的一次性真空采血管内，血样置于冰上，30 min 内离心（2 200 × g、2 ~ 8 ℃）10 min，分离血浆，-80 ℃ 保存。

2.6.2 分析方法^[11]

2.6.2.1 LC-MS/MS 条件 色谱：Agilent Extend C₁₈

色谱柱（2.1 mm × 150 mm，5 μm）；流动相乙腈-0.1% 甲酸（70 : 30）；体积流量 300 μL/min；柱温 25 ℃；进样量 20 μL，内标格列本脲（2 500 ng/mL）。

质谱：电喷雾离子源（ESI），正离子模式；辅助气（Gas1、2）550.25 kPa；气帘气（CUR）120.35 kPa；碰撞气（CAD）6 unit；喷射气压

5.5 kV；源温度 450 ℃；扫描方式为多反应监测（MRM）。辣椒碱 Q1 m/z 306.4，Q3 m/z 137.3；驻留时间（DT）150 ms；去簇电压（DP）55 V；射入电压（EP）10.0 V；碰撞电压（CE）18 V。格列本脲 Q1 m/z 494.0，Q3 m/z 369.1；DT 150 ms；DP 120 V；EP 10.0 V；CE 22 V。

2.6.2.2 血样预处理 取血样 100 μL ，置于 10 mL 带塞玻璃试管中，依次加入 70% 乙腈、内标溶液各 10 μL ，提取溶剂（正己烷-二氯甲烷-异丙醇 = 100 : 50 : 5）1 mL，涡旋混合 3 min，离心（2 200 $\times g$ ）10 min，分取上层有机相，于 40 ℃ 下氮气吹干，残余物以 150 μL 流动相溶解后，吸取 20 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.6.2.3 方法学评价 专属性试验：在不同个体空白基质样品的色谱图中，辣椒碱和格列本脲出峰处无干扰峰，药物干扰峰小于最低检测限（LOQ）响应的 20%，内标干扰峰小于内标响应的 5%，表明该方法专属性良好。色谱图见图 2。

线性关系考察：以辣椒碱质量浓度为横坐标（ X ），辣椒碱与内标峰面积之比为纵坐标（ Y ）进行回归，得回归方程为 $Y = 0.147X + 2.14 \times 10^{-3}$ （ $r = 0.997\ 1$ ），LOQ 0.25 ng/mL，在 0.25 ~ 16.03 ng/mL 范围内线性关系良好。

精密度和准确度试验：低、中、高质量浓度（0.50、4.0、12.0 ng/mL，下同）样品的日内 RSD 均小于 4.5%，日间 RSD 均小于 7.4%，准确度为 -0.8% ~ 1.6%，符合生物样本测定的要求。

稳定性试验：分别对实验台稳定性（6 h）、自动进样器内稳定性（24 h）、冻融稳定性（-80 ℃，3 个周期）、短期稳定性（-80 ℃，1 周）进行考察，发现各条件下稳定性均良好，RSD 均小于 10.0%。

提取回收率试验：低、中、高质量浓度样品的提取回收率分别为 85.7%、87.5%、88.4%，RSD 分别为 5.8%、6.9% 和 6.1%；内标提取回收率为 87.7%，表明不同质量浓度的提取回收率基本一致。

2.6.2.4 结果 药-时曲线见图 3，再应用 Win-Nonlin 5.2 药动学软件中的非房室模型，计算辣椒碱药动学参数，结果见表 4。由此可知，磷脂复合凝胶相对于普通凝胶，血药浓度达峰时间较短，生物利用度明显增高。

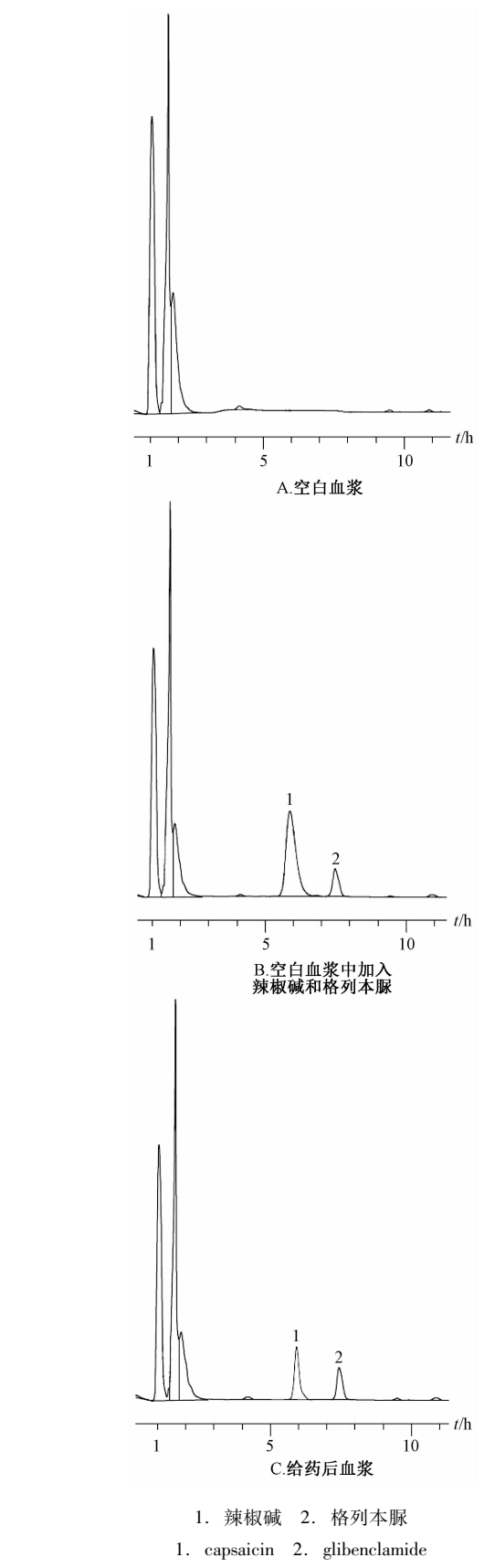


图 2 各成分 LC-MS/MS 色谱图

Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms of various constituents

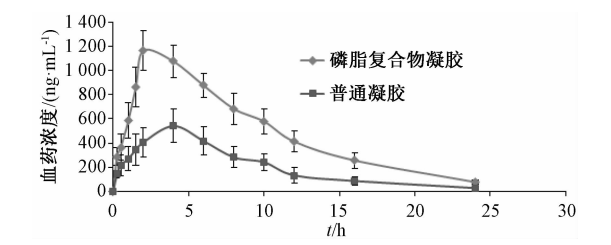


图 3 2 种凝胶药-时曲线

Fig. 3 Concentration-time curves for two gels

表 4 2 种凝胶药动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Tab. 4 Pharmacokinetic parameters for two gels ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	磷脂复合凝胶	普通凝胶
$t_{1/2}$	h	27.3 ± 19.4	16.1 ± 11.7
t_{max}	h	2.3 ± 1.5	4.2 ± 2.1
C_{max}	pg·mL ⁻¹	1 276.9 ± 223.8	552.5 ± 124.1
$AUC_{0 \rightarrow t}$	pg·mL ⁻¹ ·h	42 713.8 ± 3 576.3	25 568.2 ± 4 012.6
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$	pg·mL ⁻¹ ·h	46 218.4 ± 4 518.7	27 416.5 ± 3 827.4

3 讨论

药物磷脂复合物在经皮给药过程中具有高渗透性、缓释可控、刺激性小等优点，其结构与人类皮肤或黏膜有高度相似性，并具有优良的体内生物降解性，使得其在经皮给药途径中有广阔的应用前景^[12]。由于辣椒碱刺激性强，故经皮给药成为其最常见的给药方式，但其脂溶性低的特点又限制了经皮吸收，因此将该成分开发成磷脂复合物具有一定理论和实践意义。磷脂复合物在制备过程中的影响因素较多，如反应溶剂、投料比、温度、时间、浓度等，而且交互作用明显，故采用星点设计-响应面法可以显著降低试验次数，从而得到最优工艺。

药动力学试验结果表明，辣椒碱磷脂复合凝胶的生物利用度明显高于普通凝胶，表明磷脂复合物能

够显著增加药物经皮吸收。但本实验发现，2 组的组内差异均较大，其原因可能是试验例数较少，以及动物在给药后活动过程中造成的药物损失，目前仅处于小试阶段。因此，下一步拟进行放大工艺研究，而且磷脂复合物在制备过程中有机试剂用量较大，故需通过适当手段对溶剂残留进行控制，同时建立相关质量标准。

参考文献：

[1] 席改卿, 王建森, 王胜利, 等. 辣椒碱的提取及其应用研究进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(6): 222-226.

[2] 王荣雁, 陈朝军, 武世奎, 等. 辣椒碱药理作用的分子机制研究进展[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(1): 108-110.

[3] 王建明, 王政超. 抗风湿涂膜剂的制剂研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2011, 27(5): 662-666.

[4] 李 鑫, 马斌强, 胡晓娟, 等. 辣椒素的提取与分析工艺研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(3): 139-141, 143.

[5] 艾秀珍, 沈 波, 危 凤, 等. 萃取-结晶法制备辣椒碱类化合物工艺研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(1): 150-153.

[6] 李 鑫, 吴莉莉, 袁 超, 等. 辣椒素提取方法的比较研究[J]. 河南农业大学学报, 2008, 5(2): 231-235.

[7] 周雯雯, 李湘洲. 辣椒碱的提取和应用现状[J]. 食品工程, 2007 (1): 22-23.

[8] 李伯和, 袁 磊. 辣椒碱对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的抑制作用及其机制[J]. 生理学报, 2017, 69(2): 183-188.

[9] 张 俐, 吴艳艳. HPLC 法测定辣椒浸出物中辣椒素的含量[J]. 药学与临床研究, 2007, 4(2): 158-160.

[10] 刘桂廷, 朱庆文, 李海燕, 等. 中药经皮给药的促透方法研究进展[J]. 中医外治杂志, 2016, 25(4): 43-45.

[11] 王迪敏, 孟繁华, 刘金艳, 等. LC-MS/MS 法测定兔血浆和组织中辣椒碱和二氢辣椒碱的浓度[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(24): 2866-2871, 2901.

[12] 张红芹, 郝海军, 樊敏伟, 等. 磷脂复合物在经皮及黏膜给药系统中的应用[J]. 中成药, 2014, 36(1): 153-157.