

隐丹参酮纳米结构脂质载体的制备及药动学研究

郝海军, 屈战果, 范明松*

(上海雷允上药业有限公司技术中心, 上海 201401)

摘要: 目的 制备隐丹参酮纳米结构脂质载体, 并研究其药动学。方法 高压均质法制备纳米结构脂质载体后, 测定粒径、Zeta 电位、包封率、载药量、体外释药。大鼠分别灌胃给予隐丹参酮及其纳米结构脂质载体混悬液 (15 mg/kg), HPLC 法测定隐丹参酮含量, 计算主要药动学参数, 绘制血药浓度-时间曲线。结果 所得隐丹参酮纳米结构脂质载体平均粒径为 (175.26±6.07) nm, PDI 为 0.068±0.009, Zeta 电位为 (-34.2±3.4) mV, 包封率为 (87.69±1.97)%, 载药量为 (3.75±0.38)%, 36 h 内累积释放度为 64.13%。与隐丹参酮比较, 其纳米结构脂质载体 t_{\max} 、 $t_{1/2}$ 、 C_{\max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 相对生物利用度增加到 226.06%。结论 隐丹参酮纳米结构脂质载体具有明显的缓释特征, 口服吸收生物利用度有所改善。

关键词: 隐丹参酮; 纳米结构脂质载体; 制备; 药动学; 高压均质法; HPLC

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)04-0831-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.04.002

Preparation and pharmacokinetics for nanostructured lipid carriers of cryptotanshinone

HAO Hai-jun, QU Zhan-guo, FAN Ming-song*

(Technical Center, Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201401, China)

ABSTRACT: AIM To prepare the nanostructured lipid carriers of cryptotanshinone and to study their pharmacokinetics. **METHODS** For the nanostructured lipid carriers prepared by high pressure homogenization method, particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading and *in vitro* drug release were determined. Rats were given intragastric administration of the suspensions of cryptotanshinone and its nanostructured lipid carriers (15 mg/kg), respectively, after which HPLC was adopted in the content determination of cryptotanshinone, main pharmacokinetic parameters were calculated, and plasma concentration-time curves were drawn. **RESULTS** The obtained nanostructured lipid carriers of cryptotanshinone demonstrated the average particle size of (175.26±6.07) nm, PDI of 0.068±0.009, Zeta potential of (-34.2±3.4) mV, encapsulation efficiency of (87.69±1.97)%, drug loading of (3.75±0.38)% and accumulative release rate within 36 h of 64.13%. Compared with cryptotanshinone, the nanostructured lipid carriers of cryptotanshinone demonstrated elevated t_{\max} , $t_{1/2}$, C_{\max} , AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ ($P<0.05$, $P<0.01$), and relative bioavailability was increased to 226.06%. **CONCLUSION** The cryptotanshinone nanostructured lipid carriers exhibit obvious sustained-release characteristics, along with improved bioavailability of oral absorption.

KEY WORDS: cryptotanshinone; nanostructured lipid carriers; preparation; pharmacokinetics; high pressure homogenization method; HPLC

收稿日期: 2019-09-16

作者简介: 郝海军 (1981—), 男, 硕士, 助理研究员, 从事中药新型给药系统研究。Tel: (021) 51583466, E-mail: haohj2007@126.com

* 通信作者: 范明松 (1973—), 男, 博士, 高级工程师, 从事药物研发工作。Tel: (021) 51583466, E-mail: msfan007@163.com

隐丹参酮是从唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 根及根茎中提取得到的一种脂溶性成分,属于二萜醌类化合物,具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤等活性^[1-2],对神经系统疾病也有很好的疗效^[3],但其体内吸收较差^[4],不利于药效发挥。目前,有大量关于固体分散体^[5]、微乳^[6]、固体脂质纳米粒^[7]、脂质体^[8]等新制剂技术的报道,其中纳米结构脂质载体是从固体脂质纳米粒改良而来,具有较高的包封率及稳定性,可增加药物体内吸收及靶向性,延长药物体内滞留时间,提高药物生物利用度及药效^[9]。本实验制备了隐丹参酮纳米结构脂质载体,并对其粒径、Zeta 电位、包封率、载药量、体外溶出、药动学进行了考察,以期对相关研究提供更全面的数据。

1 材料

QUINTX224-1CM 型电子天平 [赛多利斯 (上海) 贸易有限公司]; Agilent 1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); XW-80A 型涡旋混合器 (安徽精科检测技术有限公司); WY-265G 型温控磁力搅拌器 (杭州精卓设备有限责任公司); Master-sizer 型粒度分析仪 (英国马尔文仪器有限公司); RCZ-8RCZ8 型智能溶出仪 (上海五久自动化设备有限公司); FD10-QX 型真空冻干机 (上海精密科学仪器有限公司); JXDC-400 型氮气吹扫仪 [拓赫机电科技 (上海) 有限公司]; JY92-III 型超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技有限公司); Nanosep[®] 超滤离心管 (相对分子质量 10 000, 美国 Pall 公司)。

隐丹参酮 (批号 110867-201607, 纯度 99.5%)、克拉霉素 (批号 1303056-201404, 纯度 99.6%) 对照品 (中国食品药品检定研究院); 隐丹参酮对照品 (批号 170216S, 纯度 >98%, 上海源叶生物科技有限公司); 中链脂肪酸 (批号 B50845)、大豆卵磷脂 (批号 W171124S) (上海辅必成医药科技有限公司); 山嵛酸甘油酯 (批号 158855, 上海嘉法狮贸易有限公司); 泊洛沙姆 188 (批号 WPE1566D, 德国巴斯夫公司)。

清洁级 SD 大鼠, 体质量 (300±20) g, 购自河南省实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (豫) 2016-0001。

2 方法与结果

2.1 隐丹参酮纳米结构脂质载体制备 采用高压均质法。称取山嵛酸甘油酯 1.2 g、中链脂肪酸 0.4 g 于圆底烧瓶中, 75 °C 下加热至熔融状态, 加

入 75 mg 隐丹参酮后磁力搅拌 (1 000 r/min) 至全部溶解, 作为油相; 称取 PVP K30 0.3 g、大豆磷脂 0.2 g, 溶于 50 mL 蒸馏水中, 加热至 75 °C, 作为水相。在 1 000 r/min 搅拌速度下将水相匀速滴入油相中, 滴加完毕后继续搅拌浓缩 60 min 形成初乳 (体积约为 40 mL), 在 80 MPa 压力下循环均质 8 次后立即低温固化, 即得。同法制备不含隐丹参酮的空白纳米结构脂质载体。

2.2 粒径、Zeta 电位测定 取隐丹参酮纳米结构脂质载体 0.1 mL, 加入 5 mL 超纯水稀释, 取适量测定粒径、Zeta 电位, 结果见图 1~2, 可知平均粒径为 (175.26±6.07) nm, PDI 为 0.068±0.009, Zeta 电位为 (-34.2±3.4) mV。

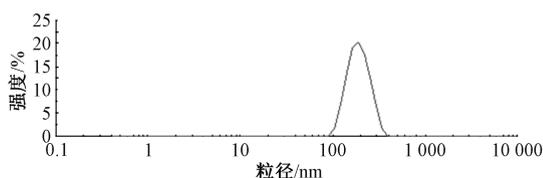


图 1 隐丹参酮纳米结构脂质载体粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of nanostructured lipid carriers of cryptotanshinone

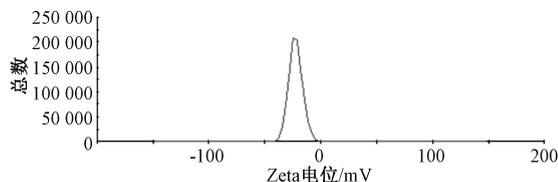


图 2 隐丹参酮纳米结构脂质载体 Zeta 电位

Fig. 2 Zeta potential of nanostructured lipid carriers of cryptotanshinone

2.3 隐丹参酮含量测定

2.3.1 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.6% 甲酸 (70 : 30); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 271 nm; 进样量 20 μL。

2.3.2 线性关系考察 精密称取 48.80 mg 隐丹参酮对照品, 溶于 25 mL 乙腈中, 得 1.952 mg/mL 贮备液, 精密量取 1.0 mL 至 20 mL 量瓶中, 流动相定容至 97.6 μg/mL 后逐步稀释至 0.488、0.976、9.76、24.4、48.8、97.6 μg/mL, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 得方程为 $Y=0.5306X-0.4814$ ($r=0.9999$), 在 0.488~97.6 μg/mL 范围内线性关系较好。

2.3.3 供试品溶液制备 取 2.0 mL 隐丹参酮纳米

结构脂质载体至 25 mL 量瓶中，甲醇超声处理后定容，8 000 r/min 离心 30 min，取 2.5 mL 上清液至 5 mL 量瓶中，流动相定容至刻度，即得。

2.3.4 方法学考察

2.3.4.1 精密度试验 取 0.488、24.4、97.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，测得 3 种质量浓度溶液中隐丹参酮峰面积 RSD 分别为 0.82%、0.61%、0.18%，表明仪器精密度良好。

2.3.4.2 重复性试验 取同一批隐丹参酮纳米结构脂质载体混悬液，按“2.3.2”项下方法处理后平行制备 6 份供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，测得隐丹参酮峰面积 RSD 为 0.66%，表明该方法重复性较好。

2.3.4.3 稳定性试验 取同一批隐丹参酮纳米结构脂质载体混悬液，按“2.3.2”项下方法处理后制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24、48 h 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，测得隐丹参酮峰面积 RSD 为 0.83%，表明溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.3.4.4 加样回收率试验 取 1.952 mg/mL 隐丹参酮对照品溶液 9.0 mL 至 10 mL 量瓶中，流动相定容至 1.757 mg/mL。取 9 份空白纳米结构脂质载体混悬液，每份 2.0 mL，置于 9 个 25 mL 量瓶中，加入上述 1.757 mg/mL 溶液 1.0、2.0、3.0 mL，平行 3 份，甲醇超声处理后定容，8 000 r/min 离心 30 min，取 2.5 mL 上清液至 5 mL 量瓶中，流动相定容至刻度，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，隐丹参酮平均加样回收率分别为 98.81%、97.19%、98.05%，RSD 分别为 0.69%、0.93%、0.67%。

2.4 载药量、包封率测定 采用低温超滤离心法。按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，计算隐丹参酮总含量 ($m_{\text{总}}$)；精密量取 2.0 mL 隐丹参酮纳米结构脂质载体混悬液至超滤离心管中，平行制备 2 份，12 500 r/min 离心 60 min，合并续滤液后精密量取 2 mL 至 50 mL 量瓶中，流动相定容至刻度，在“2.3.1”项色谱条件下进样测定，计算游离隐丹参酮含量 ($m_{\text{游离}}$)，再测定载药量、包封率，公式分别为载药量 = $[(m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / (m_{\text{总}} + m_{\text{脂质}})] \times 100\%$ 、包封率 = $[(m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{总}}] \times 100\%$ ($m_{\text{脂质}}$ 为隐丹参酮脂质总用量)。结果，3 批隐丹参酮纳米结构脂质载体平均包封率为 $(87.69 \pm 1.97)\%$ ，

载药量为 $(3.75 \pm 0.38)\%$ 。

2.5 体外释药研究 采用透析袋法。量取隐丹参酮纳米结构脂质载体、隐丹参酮原料药 (空白溶出介质配制，含有量与纳米结构脂质载体相同，均为 9.1 mg) 各 5 mL，置于透析袋中 (截留分子量 8 000 ~ 14 000 Da)，两端扎紧，设定转速 100 r/min，温度 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ，溶出介质 1.0% SDS 溶液，于 0、0.25、0.5、0.75、1、2、4、8、12、18、24、30、36 h 各取样 2 mL，并及时补充等量溶出介质，按 1:1 比例加入甲醇破乳后 HPLC 法测定隐丹参酮含量，绘制释药曲线，结果见图 3。由此可知，在释药初期隐丹参酮纳米结构脂质载体有一定突释现象，之后是缓慢释药期；36 h 内累积释药度为 64.13%，与原料药相比具有明显缓释特征。

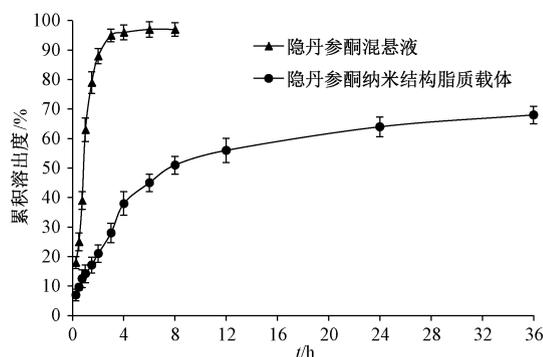


图3 样品体外释药曲线

Fig. 3 *In vitro* drug release curves for samples

2.6 体内药动学研究

2.6.1 灌胃液质量浓度确定 经测定，隐丹参酮纳米混悬剂质量浓度为 1.82 mg/mL。因此，本实验另选空白纳米混悬剂，制成相同质量浓度的混悬液。

2.6.2 分组、给药及血浆样品采集 取清洁级 SD 大鼠 12 只，随机分为隐丹参酮组和隐丹参酮纳米结构脂质载体组，灌胃给药，剂量以隐丹参酮计为 15 mg/kg。大鼠乙醚麻醉后，于 0.167、0.5、1、1.25、1.5、2、2.5、3、4、8、12 h 眼眶后静脉丛采血各约 0.3 mL，引流至肝素化的离心管中，眼眶棉球止血，血样 2 500 r/min 离心 2 min，200 μL 移液枪分离上层血浆，置于 -20°C 冰箱中。

2.6.3 血浆样品处理 参考文献 [10] 报道方法。取内标溶液 40 μL 、血浆样品 100 μL 、甲醇 3 mL 至离心管中，涡旋混匀 3 min 后 5 000 r/min 离心 10 min，分离上层有机相至空白离心管中，调节氮气体积流量，在 45°C 下缓慢吹除提取液中的

有机溶剂, 100 μL 流动相复溶残渣, 5 000 r/min 离心 5 min。

2.6.4 线性关系考察 取“2.3.2”项下贮备液, 甲醇依次稀释至 24.4、48.8、122.0、244.0、488.0、976.0 $\mu\text{g/L}$, 作为对照品溶液, 各精密量取 0.5 mL, 45 $^{\circ}\text{C}$ 下缓慢吹干, 加入 0.5 mL SD 大鼠空白血浆溶解; 精密称取克拉霉素对照品 10 mg, 溶于 10 mL 甲醇中 (1.0 mg/mL), 甲醇稀释至 100 $\mu\text{g/L}$, 作为内标溶液, 按“2.6.3”项下方法处理, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定。以隐丹参酮与内标峰面积之比为纵坐标 (Y), 溶液质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 得方程为 $Y = 0.060 1X + 0.005 2$ ($r = 0.991 9$), 在 24.4 ~ 976.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系较好。

2.6.5 方法学考察 取空白血浆、空白血浆加对照品与内标、给药后血浆样品与内标, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定, 发现内源性物质不干扰隐丹参酮、内标测定, 两者保留时间分别为 6.6、7.8 min, 表明该方法专属性良好。取 24.4、244.0、976.0 $\mu\text{g/L}$ 血浆对照品溶液, 同一天内在“2.3.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得隐丹参酮峰面积 RSD 分别为 2.14%、1.53%、0.98%, 表明该方法日内精密度良好; 取上述相同质量浓度血浆对照品溶液, 每天测定 1 次, 连续 6 d, 测得隐丹参酮峰面积 RSD 分别为 10.53%、4.69%、4.04%, 表明该方法日间精密度良好。取

隐丹参酮给药 1.0 h 时血药样品, 室温下放置 72 h, 测得隐丹参酮峰面积 RSD 为 10.86%, 表明血浆样品在 72 h 内稳定性良好。取“2.6.4”项下 24.4、244.0、976.0 $\mu\text{g/L}$ 对照品溶液各 1.0 mL, 氮气吹干得残渣, 加入 1.0 mL 空白血浆重新溶解, 按“2.6.3”项下方法处理, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定, 测得隐丹参酮加样回收率为 83.44%~92.68%。

2.6.6 分析结果 以取血时间为横坐标, 血药浓度为纵坐标, 绘制血药浓度-时间曲线, 结果见图 4; 通过 DAS2.0 软件计算主要药动学参数, 体内过程按照二室开放模型计算, 结果见表 1。由此可知, 隐丹参酮制成纳米结构脂质载体后可延长 t_{max} 、 $t_{1/2}$ ($P < 0.05$), 升高 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ ($P < 0.01$), 相对生物利用提高到 226.06%。

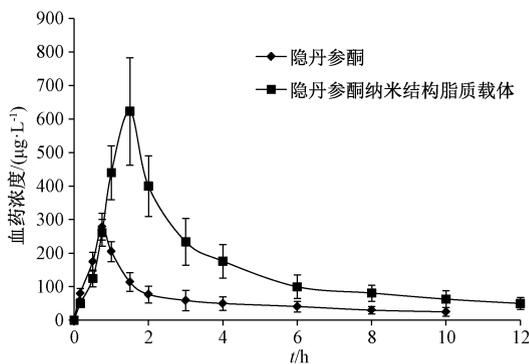


图 4 样品血药浓度-时间曲线

Fig. 4 Plasma concentration-time curves for samples

表 1 样品主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 1 Main pharmacokinetic parameters for samples ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

参数	单位	隐丹参酮	隐丹参酮纳米结构脂质载体
t_{max}	h	0.76±0.19	1.63±0.31*
$t_{1/2}$	h	4.48±1.31	6.32±1.73*
C_{max}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	281.67±67.09	633.74±143.56**
AUC_{0-t}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	847.90±116.43	1 916.78±279.58**
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	1 075.65±124.82	2 349.60±302.71**

注: 与隐丹参酮比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

将游离药物与纳米药物分开的难度较大, 而且两者之间存在动态平衡, 分离前者时可能会造成后者不稳定^[10], 故本实验未对其进行分离。隐丹参酮纳米结构脂质载体在体外释药初期具有突释现象, 一方面是由于存在游离药物, 另一方面也与吸附在其表面的药物有关。有报道^[9]认为, 部分纳米结构脂质载体低温固化时固态脂质先形成内核, 而溶有药物的液态脂质包裹在内核外部, 从而导致突释。另外, 体外释药过程的缓释特征可能是由于

溶有药物的液态脂质打乱了固体脂质的晶格, 使包裹于后者的药物溶出受阻。

隐丹参酮生物利用度较低, 除了水溶性较差的原因外^[5], 还与透膜吸收能力有限^[11]、存在肝脏首过效应^[4]等因素有关。药动学研究显示, 将隐丹参酮制成纳米结构脂质载体后 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 均显著升高, 相对生物利用提高到 226.06%, 可有助于降低给药量, 提高药效, 其中 t_{max} 延后, 可能与纳米结构脂质载体缓释特征有关; $t_{1/2}$ 延长, 表明纳米结构脂质载体可增加药

物体内滞留时间; C_{max} 提高, 说明纳米结构脂质载体可促进药物体内吸收^[12-13]。由于药物体内滞留时间延长, 纳米级以下粒径的药物与胃肠道的接触面积也大幅增加, 有利于纳米结构脂质载体经细胞间转运、淋巴转运等途径进入血液循环, 降低首过效应, 提高生物利用度^[13-15]。

此外, 纳米结构脂质载体中的脂质可抑制 P 糖蛋白等介导的药物外排作用^[16], 促进乳糜微粒产生, 从而增加淋巴转运途径。上官明珠^[16]报道, 部分纳米结构脂质载体进入肠道后, 被胰酶降解成甘油酯和脂肪酸, 并释放出药物, 随后降解产物、内源性胆盐、药物等重新形成混合胶束或胶束, 从而更容易通过小肠上皮静态水层, 促进药物经小肠吸收。但纳米药物口服后, 经胃肠道吸收进入血液循环的过程受到纳米制剂稳定性、胃肠壁亲水性黏液层阻挡、网状内皮系统中单核巨噬细胞吞噬等因素的影响^[17], 最终使其生物利用度提高程度受到一定限制, 而且差别也较大^[18]。今后, 可考虑对隐丹参酮纳米结构脂质载体进行表面修饰等方面的研究^[17], 以期进一步提高生物利用度。

参考文献:

[1] 曾 金, 张志荣, 缪 萍, 等. 隐丹参酮的药理作用研究进展[J]. 中成药, 2015, 37(6): 1309-1313.
[2] 贾田芊, 王 媚, 崔春丽, 等. 超高效液相色谱指纹图谱快速测定复方丹参片与复方丹参滴丸活性成分[J]. 医药导报, 2018, 37(10): 1241-1246.
[3] Mei Z R, Zhang F Y, Tao L, et al. Cryptotanshinone, a compound from *Salvia miltiorrhiza* modulates amyloid precursor protein metabolism and attenuates β -amyloid deposition through up-regulating α -secretase *in vivo* and *in vitro* [J]. *Neurosci Lett*, 2009, 452(2): 90-95.
[4] 宋 敏, 杭太俊, 张正行. 隐丹参酮及丹参酮提取物在大

鼠体内药动学比较研究[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(1): 51-54.
[5] 何 丹, 杨 林, 杨广德. 隐丹参酮固体分散体的制备及溶出度研究[J]. 中成药, 2007, 29(6): 912-914.
[6] 林跃虹, 杨惊宇, 刘西京, 等. 隐丹参酮微乳的制备与质量评价[J]. 新中医, 2009, 41(5): 100-102.
[7] 高秀容, 许小红, 杨恒博, 等. 丹参提取物中脂溶性成分检测及体外溶出行为考察[J]. 医药导报, 2019, 38(1): 79-83.
[8] 彭国文, 柳 超, 时晓静, 等. 隐丹参酮固体脂质纳米粒的制备及药动学研究[J]. 中药材, 2019, 42(3): 626-629.
[9] 杨宁辉, 曹伶俐, 付国辉, 等. 蛇床子素纳米结构脂质载体的制备及其体内药动学行为[J]. 中成药, 2019, 41(6): 1205-1209.
[10] 李超英, 侯世祥, 阳长明, 等. 葫芦素皂微粒冻干针剂的研究[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(5): 315-317.
[11] 孙 静, 史亚军, 张小飞, 等. 丹参片提取物磷脂复合物的制备及初步吸收评价[J]. 中药材, 2017, 40(1): 164-166.
[12] 刘 丹, 于丽红, 李 磊. 提高白藜芦醇生物利用度的制剂策略[J]. 医药导报, 2018, 37(3): 333-337.
[13] 李月灵, 王丽华, 周 竞. 青藤碱磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备、表征及药动学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(4): 669-674.
[14] 盛剑勇, 杨晓宇, 陈佑棠, 等. 胰岛素口服纳米给药系统研究进展[J]. 医药导报, 2018, 37(6): 703-707.
[15] 饶 荣, 杨祥良, 刘 卫, 等. 多肽蛋白质药物口服纳米载药系统研究进展[J]. 医药导报, 2018, 37(6): 697-702.
[16] 上官明珠. 纳米结构脂质载体促进水飞蓟素口服吸收的研究[D]. 上海: 复旦大学, 2014.
[17] 邓艾平, 王 奕, 刘 珏, 等. 叶酸壳寡糖修饰的聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒对耐紫杉醇人卵巢癌细胞增殖的影响[J]. 医药导报, 2018, 37(6): 662-666.
[18] Wang Y Y, Lai S K, Soo J S, et al. Addressing the PEG mucosal adhesion paradox to engineer nanoparticles that "slip" through the human mucus barrier[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2008, 47(50): 9726-9729.