

南五味子总木脂素肠溶纳米粒的制备和药代动力学初步研究

黄雅洁^{1,2}, 李雅彬¹, 袁海龙^{1*}, 黄雪^{1,2}, 王琪¹, 肖小河^{1*}

(1. 解放军第三〇二医院解放军中药研究所, 北京 100039; 2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611730)

摘要: 本文研究了南五味子总木脂素肠溶 (SLE) 纳米粒的制备工艺, 并进行大鼠体内药代动力学评价。采用改良乳化溶剂扩散法制备南五味子总木脂素肠溶纳米粒, 并考察载药纳米粒的形态及粒径分布。以五味子甲素 (QS) 和五味子酯甲 (SA) 为指标成分, 用 HPLC 法测定药物的包封率和经大鼠灌胃给药的血药浓度, 用 3p97 程序计算药代动力学参数。制得的纳米粒在透射电镜下均成圆球形, 平均粒径为 (36.7 ± 4.4) nm、多分散度指数为 0.231 ± 0.031 , QS 和 SA 包封率分别为 $(97.5 \pm 0.7)\%$ 和 $(91.3 \pm 0.8)\%$ 。大鼠血药浓度曲线经 3p97 程序拟合, 确定 QS 和 SA 在大鼠体内的药代动力学过程为一室模型。其中 QS 的 AUC 为 $75.65 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$, SA 的 AUC 为 $109.32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$, 分别是对照组的 2.3 倍和 5.8 倍。改良乳化溶剂扩散法制备 SLE 纳米粒工艺可行, 且包封率高, 大鼠体内药代动力学结果表明 SLE 纳米粒能提高药物生物利用度。

关键词: 肠溶纳米粒; 药代动力学; 南五味子总木脂素

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 08-1046-05

Preparation of enteric nanoparticles of *Schisandra* total lignanoids and preliminary study on its pharmacokinetics

HUANG Ya-jie^{1,2}, LI Ya-bin¹, YUAN Hai-long^{1*}, HUANG Xue^{1,2}, WANG Qi¹, XIAO Xiao-he^{1*}

(1. China Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China;
2. School of Pharmaceutical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611730, China)

Abstract: To study the preparation method of *Schisandra* total lignanoids enteric (SLE) nanoparticles and evaluate its pharmacokinetics in rats, SLE nanoparticles were prepared by modified emulsion solvent diffusion method. The properties of SLE nanoparticles were evaluated of morphology, mean diameter and entrapment efficiency. An HPLC method was employed to determine the concentration of deoxyschisandrin (QS) and schisantherin A (SA) in plasma, which were used as an index of *Schisandra* total lignanoids, and the bioavailability of the nanoparticles was compared with the reference group by oral administration using SD rats. The nanoparticles observed by transmission electronmicroscopy were round, and the mean particle sizes of SLE were (36.7 ± 4.4) nm. Entrapment efficiency of QS and SA were $(97.5 \pm 0.7)\%$ and $(91.3 \pm 0.8)\%$, respectively. Its pharmacokinetic process calculated with 3p97 software was fitted to a one-compartment model. The pharmacokinetic parameters showed sustained-release property. Compared with reference formulation, the AUCs of SLE nanoparticles were 2.3 and 5.8 times separately. These results suggested that the incorporation into Eudragit S100 of *Schisandra* total lignanoids can improve the bioavailability.

Key words: enteric nanoparticle; pharmacokinetics; *Schisandra* total lignanoids

南五味子是木兰科植物华中五味子 (*Schisandra*

sphenanthera Rehd. Et Wils.) 的干燥果实。化学和药理学研究表明, 南五味子的主要活性成分包括五味子甲素 (deoxyschisandrin, QS)、五味子酯甲 (schisantherin A, SA)、五味子酯乙等联苯环辛烯类木脂素, 并以五味子甲素、酯甲为主^[1], 对肝炎有较好的降低

收稿日期: 2009-03-09.

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7072076).

*通讯作者 Tel: 86-10-66933324, E-mail: yhlpharm@126.com,

Tel: 86-10-66933322, E-mail: pharmacy302@126.com

血清谷丙转氨酶作用, 临床应用广泛。但南五味子木脂素类为难溶性组分, 口服生物利用度低, 提高难溶性药物生物利用度已经成为国际上研究的热点^[2-6]。

载药纳米粒是利用天然高分子或合成的化学物质为载体, 将药物包埋或溶解在纳米粒中或吸附在其表面制成。本实验以南五味子总木脂素为模型药, pH 依赖型聚合物 Eudragit S100 为载体制备肠溶纳米粒, 可避免药物被胃酸和胃蛋白酶降解, 并且药物在小肠的转运是一个相对稳定的过程, 不受食物、剂型及生理因素等影响发生显著变化, 粒径小于 100 nm 的粒子被肠道 PP (Peyer's Patches) 所捕获的数量明显高于其他粒径的粒子^[7], 有利于药物的吸收, 提高生物利用度, 改善药物口服吸收。

材料与方法

仪器 Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (G1311A 四元泵, G1315B DAD 检测器), HP-chemstation 色谱工作站; 透射电镜 (JEM1230, JEOL, 日本); NanoZS90 粒径分析仪 (Malvern 公司)。

药品与试剂 南五味子提取物 (自制, 总木脂素 80%, 批号 070703), 对照品五味子甲素 (批号: 110764-200107)、五味子酯甲 (批号: 111529-200302), 购自中国药品生物制品检定所; Eudragit S100 (OMEGA 公司); Pluronic F68 (Sigma 公司); 乙腈、甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

实验动物 Sprague-Dawley 大鼠, 雌雄各半, 体重 (200 ± 10) g, SPF 级, 由军事医学科学院实验动物中心提供 (许可证号 SCXK-2002-001)。

南五味子总木脂素肠溶 (SLE) 纳米粒的制备 采用改良乳化-溶剂扩散法制备 SLE 纳米粒 (*Schisandra total lignanoids enteric nanoparticles*)。在室温条件下, 称取南五味子提取物 0.16 g, Eudragit S100 0.45 g 加入无水乙醇 75 mL 中, 搅拌溶解作为有机相; 另取 Pluronic F68 0.45 g 溶于蒸馏水 200 mL 中作为水相; 在冰水浴中, 将有机相用骨髓穿刺针头迅速注入 500 r·min⁻¹ 搅拌的水相中。注射完毕, 继续搅拌 10 min, 形成 O/W 乳滴, 然后移至 60 °C 水浴中, 连续搅拌 4 h, 挥干有机溶剂, 即得 SLE 纳米粒溶液。

SLE 纳米形态学考察和粒径分析 取 SLE 纳米粒溶液加适量蒸馏水稀释后, 取适量滴至铜筛网上, 1.5% 磷钨酸负染, 于透射电子显微镜 (TEM) 观察其形态并拍摄照片。取 SLE 纳米粒溶液适量分散至蒸馏水中, 采用 Malvern 粒径测定仪测粒径。

SLE 纳米粒包封率测定 精密吸取 SLE 纳米粒

溶液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇-水 (75 : 25) 稀释至刻度, 混匀, 超声 5 min, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液 10 μL 注入高效液相色谱仪测定药物含量。另取等量 SLE 纳米粒溶液于超滤管, 离心 (6 000 r·min⁻¹) 15 min 以除去可能游离的药物, 同法测定溶液中的 QS 和 SA 含量, 按下列公式计算纳米粒的包封率。

$$\text{SA/QS 包封率 (\%)} = \frac{\text{载入纳米粒药物含量}}{\text{药物含量}} \times 100\%$$

体内样品色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm); 流动相为甲醇-水 (75 : 25); 流速为 1 mL·min⁻¹; 柱温: 室温; 紫外检测波长: 250 nm; 进样量: 20 μL。

方法的专属性 取 QS 和 SA 对照品溶液、“血浆样品的处理”项下的大鼠空白血浆、加入 QS 和 SA 对照品的空白血浆、灌胃给药后血浆样品, 按照色谱条件注入高效液相色谱仪, 记录色谱图。

标准曲线 精密称取对照品适量, 甲醇溶解定容, 得 QS 和 SA 对照品的混合对照品储备液 (含 QS 0.065 4 mg·mL⁻¹, SA 0.065 1 mg·mL⁻¹) 并稀释成系列溶液备用。取空白血浆 0.2 mL, 精密加入不同浓度的混合对照品适量, 混匀, 使血浆中 QS 的浓度依次为 0.654、3.401、6.278、9.156 和 12.034 μg·mL⁻¹, SA 的浓度依次为 0.651、3.385、6.250、9.114 和 11.978 μg·mL⁻¹, 按照“血浆样品处理”方法操作与测定, 以药物浓度 (x) 对峰面积 (Y) 作线性回归, 分别得到 QS 和 SA 回归方程。

方法精密度与回收率 制备 QS 质量浓度为 3.401、6.278 和 9.156 μg·mL⁻¹, SA 质量浓度为 3.385、6.250 和 9.114 μg·mL⁻¹ 血浆样品, 按“血浆样品处理”操作, 批内平行 5 份, 计算日内精密度; 连续测定 3 天, 计算日间精密度。另取超纯水加入 QS 和 SA, 使其浓度与血浆样品相同, 按“血浆样品处理”操作, 得到标准品峰面积, 求得高、中、低 3 个浓度血浆萃取回收率。

给药方法与样品采集 大鼠 16 只, 给药前禁食 12 h, 不禁水, 随机分为 2 组, 分别口服灌胃 SLE 纳米粒和参比制剂南五味子提取物 (extract of *Schisandra total lignanoids enteric*, ESL), 给药剂量均为 0.69 g·kg⁻¹ (以五味子总木脂素计算)。分别于一定的时间间隔由眼眶后静脉丛取血约 1 mL, 血样经肝素抗凝后分取血浆, 冷藏, 备用。

血浆样品的处理与测定 精密移取血浆样品 200 μL 置于具塞离心管中, 以 1 : 4 加入甲醇沉淀蛋

白, 涡旋混合 3 min, 离心 ($8\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 5 min, 取上清液于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 用氮气流吹干, 残渣加甲醇 $100\text{ }\mu\text{L}$ 溶解, 充分涡旋振荡, 离心 ($10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min, 取上清液 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进样。

数据分析 血药浓度用 3P97 实用药理学软件计算药代动力学参数。

结果

1 SLE 纳米粒性质

以改良乳化溶剂扩散法制备 SLE 纳米粒, 其平均粒径为 $(36.7 \pm 4.4)\text{ nm}$ 、多分散度指数为 0.231 ± 0.031 , QS 和 SA 包封率分别为 $(97.5 \pm 0.7)\%$ 和 $(91.3 \pm 0.8)\%$ 。在透射电镜下观察 SLE 纳米粒其外形圆整, 大小较均一 (图 1、2)。

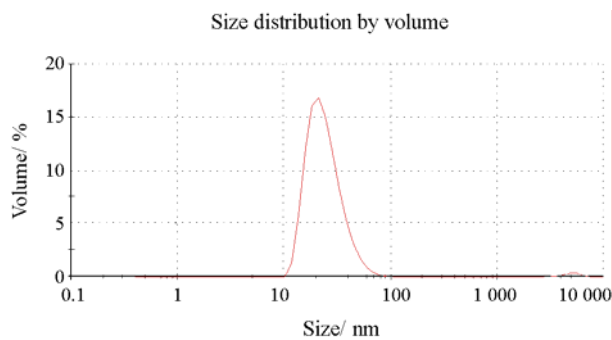


Figure 1 Particle sizes of *Schisandra* total lignanoids enteric (SLE) nanoparticles

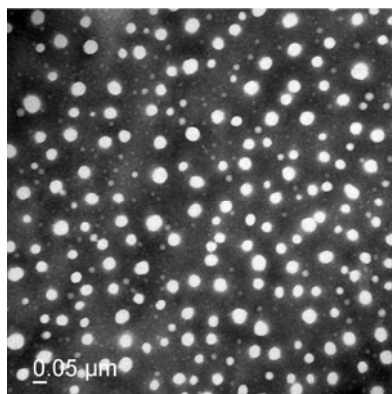


Figure 2 Transmission electron microscopy of SLE nanoparticles

2 方法专属性图谱

从图 3 可以看出该法分离效果好, 专属性强, 血浆中杂质或内源性物质均不干扰测定。

3 标准曲线

血浆中 QS 和 SA 的线性范围、线性方程和最低检测限见表 1。

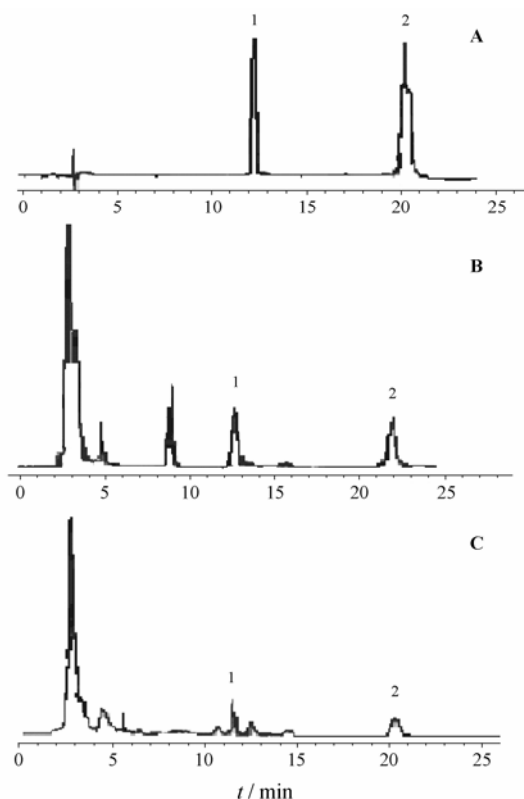


Figure 3 Chromatograms of dexschisandrin (QS) and schisantherin A (SA) standard (A); Blood samples added QS and SA standard (B); QS and SA in the blood of SD rats (C); 1: QS; 2: SA

Table 1 The regression equations of QA and SA in plasma of rats

Sample	Linear range $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Regression equation	Correlation coefficient	Lower limit of detection $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
QS	0.654-12.034	$Y = 106.150x - 8.272$	0.998 1	0.654
SA	0.651-11.979	$Y = 75.535x + 0.666$	0.998 3	0.651

4 方法精密度与回收率

高、中、低浓度血浆中 QA 和 SA 的萃取回收率均 $> 68\%$, 方法平均回收率 QA 为 $99.1\% \sim 103.8\%$, $\text{RSD} < 5.9\%$, SA 为 $94.8\% \sim 106\%$, $\text{RSD} < 3.8\%$ 。血浆中 QA 和 SA 日内平均精密度 $\text{RSD} < 7.5\%$ ($n = 5$), 日间平均精密度 $\text{RSD} < 11.0\%$ ($n = 3$)。

5 大鼠体内药代动力学

大鼠血浆样品中的 QS 和 SA 平均血药浓度-时间曲线见图 4。QS 和 SA 在大鼠体内的主要药代动力学参数见表 2, 药时曲线经拟合显示 QS 和 SA 在大鼠体内动力学行为均符合一室模型。

从图 4 可以看出, SLE 中 QS 和 SA 在相同时间点的血药浓度较参比制剂均有较大提高, SA 尤为明显, 6 h 后药时曲线呈缓慢下降趋势。提取物中二者在体内峰浓度相近, 药时曲线极为一致, 说明 QS 和 SA 在

Table 2 Pharmacokinetic parameters of SLE or ESL after oral administration to rats ($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

Parameter	Test		Reference	
	QS	SA	QS	SA
K_e / h^{-1}	0.053 ± 0.016	0.054 ± 0.009	0.084 ± 0.014	0.152 ± 0.091
K_a / h^{-1}	0.843 ± 0.010	1.076 ± 0.062	0.369 ± 0.047	$1.038 \pm 0.190^{**}$
$T(\text{peak}) / h$	3.491 ± 0.296	2.936 ± 0.079	5.202 ± 0.171	2.165 ± 0.161
$C_{\max} / \mu g \cdot h^{-1}$	3.227 ± 0.263	4.996 ± 0.129	1.746 ± 0.084	2.049 ± 0.136
$AUC / \mu g \cdot mL^{-1} \cdot h$	$72.652 \pm 6.483^*$	$109.32 \pm 8.301^*$	$32.229 \pm 0.295^{**}$	$18.674 \pm 1.198^{**}$

*AUC from zero to 13 h; **AUC from zero to 8 h; [#] $P < 0.01$ vs QS of reference

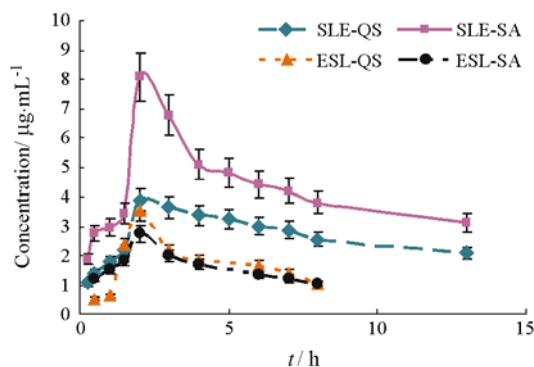


Figure 4 Mean plasma concentration-time curve of SLE nanoparticles after oral administration. SLE: *Schisandra* total lignanoids enteric nanoparticles; ESL: Extract of *Schisandra* total lignanoids enteric

体内吸收程度相近,但在 10 h 后血中药物浓度已低于定量限而无法检测。

讨论

本文采用改良乳化溶剂扩散法^[8]制备 pH 型肠溶纳米粒,方法简便,纳米粒粒径小,分布范围窄。这是因为在搅拌浆剪切力作用下,有机相以微射流方式注入水相中,使其易于形成直径很小的液滴,均匀分散于水相中,同时在低温状态下制备纳米粒也有利于减小粒子粒径。

表 2 药动学参数显示, QS 和 SA 在参比制剂中的吸收速率不同,但制成纳米粒后 QS 的 K_a 值明显提高,且两者无显著性差异 ($P > 0.05$)。这可能与纳米粒在胃肠道中的吸收机制有关。纳米粒存在粒径依赖性吸收,粒径是纳米粒胃肠道吸收的重要影响因素,小于 100 nm 的纳米粒可通过细胞内途径吸收到达循环系统。纳米粒口服后其主要吸收部位在小肠内 PP,功能细胞为 M 细胞。纳米粒被吞噬后,通过囊性转运方式转运到 M 细胞基底面凹腔释放出来,此时纳米粒或以游离状态,或以巨噬细胞吞噬的状态,随淋巴细胞通过淋巴管从淋巴循环进入血液循环,再分布到各组织器官而发挥疗效^[9]。在纳米制剂中,五味

子甲素和酯甲均吸附或包裹于纳米粒中,依赖于纳米载体被肠道吸收,因此显示出吸收系数一致性。

SA 的血中药物浓度比 QS 大很多,这可能与 QS 和 SA 结构差异造成与辅料的结合力有关。肠溶载体依靠与药物的功能团形成氢键,使药物以分子形态分布于肠溶载体,提高药物在纳米粒中的稳定性。由于 SA 的 C4、C5 位上连接亚甲二氧基,并在联苯与侧链环合成的八元环上的 C'7 位置酯化形成酰基,导致 SA 比 QS 的 H 原子数量少,故 SA 没有 QS 与 Eudragit S100 结合牢固。因此,纳米粒与介质接触后 SA 较 QS 释放速度更快,小肠吸收度更高,这与测定 QS 和 SA 的包封率和体外释药曲线结果比较一致^[10]。

有实验结果显示,五味子甲素口服灌胃后不论剂量高低,其绝对生物利用度大约为 50%,据分析是因为胃肠道内吸收不完全或存在较为明显的肝脏首过效应^[11]。而在本实验中大鼠药动参数结果显示,五味子甲素 $AUC_{0-\infty}$ 曲线下面积约为参比制剂的 2.3 倍,五味子酯甲约为 5.8 倍,相对生物利用度均有较大提高。原因可能有以下几点:① Eudragit S100 为 pH 敏感性阴离子聚合物,能在 pH 高于 7.0 的水溶液中溶解,用其制备的肠溶纳米粒达到小肠部位后局部快速释放,避免胃蛋白酶对药物的破坏和肝脏首过效应。② 药物以纳米粒为载体改善了药物的可润湿性、溶解性;③ 纳米粒粒径小,比表面积大,增加与吸收面的接触机会,使机体有更充分的时间吸收药物;④ 纳米粒易被生物黏膜黏附并且对 M 细胞有更强的亲和力,易于被细胞摄取^[12, 13]。

本文对肠溶纳米粒在体内药代动力学初步研究结果表明肠溶纳米粒可以作为提高口服难溶性中药有效部位生物利用度的有效途径之一,增强药物临床疗效。

References

- [1] Gao JP, Wang YQ, Yu YQ, et al. Determination by HPLC and variation regularity of Lignan constituents in Chinese crude

- drug Fructus Schisandrae Sphenantherae [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2003, 1: 89-93.
- [2] Dong W, Bodmeier R. Encapsulation of lipophilic drugs within enteric microparticles by a novel coacervation method [J]. Int J Pharm, 2006, 326: 128-138.
- [3] Li HF, Liu MX, Luo GA, et al. Preparation of pharmacokinetics of breviscapine-loaded poly(D,L-lactic acid) nanoparticles [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2007, 16: 614-618.
- [4] Nazzari S, Guven N, Reddy IK, et al. Preparation and characterization of coenzyme Q10-Eudragit solid dispersion [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2002, 28: 49-57.
- [5] Pinnamaneni S, Das NG, Das SK. Formulation approaches for orally administered poorly soluble drugs [J]. Pharmazie, 2002, 57: 291-300.
- [6] Zaghoul AA, Vaithiyalingam SR, Faltinek J, et al. Response surface methodology to obtain naproxen controlled release tablets from its microspheres with Eudragit® L100-55 [J]. J Microencap, 2001, 18: 651-662.
- [7] Chen GG, Zhou BQ, Li XM, et al. Preparation and release characteristics of 5-fluorouracil loaded PLGA-nanoparticles [J]. J Chin Pharm Univ (中国药科大学学报), 2006, 37: 423-427.
- [8] Wang XQ, Dai XD, Zhen C, et al. Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine A loaded pH-sensitive nanoparticles for oral administration [J]. J Control Release, 2004, 97: 421-429.
- [9] Mao J, He Y. Development of oral nanoparticles absorbed mechanism in gastrointestinal tract [J]. China Pharm (中国药房), 2006, 17: 1426-1429.
- [10] Huang YJ, Wang Q, Li XY, et al. In vitro release evaluation of Schisandra total lignanoids enteric nanoparticles [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2008, 30: 50-53.
- [11] Du YF. Determination of deoxyschizandrin and schizandrin B in *Fructus Schisandra Chinensis* and its preparations with RP-HPLC (五味子及其制剂中五味子甲素和五味子乙素含量测定及药代动力学研究) [D]. Shijiazhuang Hebei Medical University, 2004.
- [12] Qu JB, Chu LY, Chen WM, et al. Progress of pH-responsive drug delivery systems [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2004, 35: 757-760.
- [13] He L, Wang GL, Zhang Q. Studies on hypersensitivity and pharmacokinetics of paclitaxel microemulsion [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2003, 38: 227-230.

欢迎订阅《中国现代应用药学》杂志

《中国现代应用药学》杂志是由中国药学会主办、中国科协主管、国内外公开发行的全国性科技期刊。本刊为中国科技论文统计源期刊、《中文核心期刊要目总览》药学类核心期刊，并被美国《化学文摘》(CA)、《剑桥科学文摘 (自然科学)》(CSA (Nat Sci))、《国际药学文摘》(IPA)、《乌利希期刊指南》(Ulrich PD)、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JST) 等国际重要检索系统收录。

本刊面向医药、卫生界的医院、企业、药检所、院校、科研、生产、经营单位的高、中、初级医药卫生科技人员。栏目设有论著、综述、专栏，专栏包括中药与天然药、药物化学、药剂、药物分析与检验、医院药学、不良反应、信息等。

本刊为月刊，每月 28 日出刊，大 16 开本，铜版纸精美印刷，每期订价 15.00 元，全年 180 元，国内统一刊号: CN 33-1210/R，国际标准出版物编号: ISSN 1007-7693，邮发代号: 32-67，国外发行: 中国国际图书贸易总公司 (北京 399 信箱, 100044)，欢迎广大读者通过当地邮局或直接向本刊编辑部订阅。

编辑部地址: 杭州市中河中路 250 号改革月报大楼 10 楼，邮编: 310003，电话: 0571-87297398，传真: 0571-87245809，E-mail: XDYD@chinajournal.net.cn，网址: <http://www.chinajmap.com>。