

川陈皮素自组装前体脂质体的制备及其大鼠体内药代动力学研究

林 薇, 姚 静, 周建平*

(中国药科大学, 江苏 南京 210009)

摘要: 本文研制川陈皮素自组装前体脂质体, 并以混悬剂为对照考察其经大鼠灌胃给药后的药代动力学行为。采用一种新型前体脂质体法制备川陈皮素自组装前体脂质体, 考察其水合后粒径、包封率和稳定性等理化性质; 大鼠分别灌胃给予川陈皮素混悬剂和水合后的脂质体, 以尼莫地平为内标, 采用 HPLC 法测定血浆中药物浓度, 用 Kinetica 4.4 程序计算药代动力学参数。制得的川陈皮素前体脂质体经水合后包封率可达 80% 以上, 平均粒径为 212.1 nm, 稳定性好; 药代动力学研究显示, 与混悬剂相比川陈皮素脂质体在体内吸收较快, 相对生物利用度为 264.3%, MRT 增加。结果表明, 川陈皮素自组装前体脂质体制备工艺简单可行; 川陈皮素制成自组装前体脂质体后, 大鼠口服吸收显著增加。

关键词: 川陈皮素; 自组装前体脂质体; 药代动力学

中图分类号: R943.4

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 02-0192-05

Preparation of self-assemble nobiletin proliposomes and its pharmacokinetics in rats

LIN Wei, YAO Jing, ZHOU Jian-ping*

(China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: To prepare self-assemble nobiletin proliposomes and study its pharmacokinetic behavior in rats after ig administration, and nobiletin suspension was used as control, self-assemble nobiletin proliposomes were prepared by a new proliposome preparation method, their physicochemical properties including encapsulation efficiency, particle size and stability of formed liposome were determined. Plasma concentration of nobiletin was determined by HPLC taking nimodipine as internal standard. The pharmacokinetic parameters were calculated by Kinetica 4.4 software. The encapsulation efficiency of nobiletin liposomes was more than 80%, with an average particle size of 212.1 nm and very good stability. Compared to nobiletin suspension, nobiletin liposomes possessed higher absorptive rate and longer MRT, and the relative bioavailability was 264.3% in rats. It could be concluded that self-assemble nobiletin proliposome was a simple and feasible preparation, and showed greater absorption compared with nobiletin suspension.

Key words: nobiletin; self-assemble proliposome; pharmacokinetics

川陈皮素 (nobiletin) 是从橘柑类植物中提取的多甲氧基黄酮类化合物, 具有抗炎^[1]、抗癌^[2, 3]等多种药理作用。目前国内外对川陈皮素的研究主要集中在药理方面, 制剂学研究仅见有微乳报道^[4]。川陈皮素

脂溶性差且难溶于水, 口服生物利用度低。脂质体作为新型的载体给药系统, 具有生物膜特性和药物传输能力, 将难溶性药物包裹在脂质双分子层中, 使其具有较强的两亲性, 可以显著提高药物的口服跨膜吸收及体内生物利用度^[5, 6]。本研究将川陈皮素制成口服给药的川陈皮素自组装前体脂质体 (nobiletin self-assemble proliposomes), 克服了普通脂质体在贮

收稿日期: 2008-09-18.

*通讯作者 Tel: 86-25-83271272, Fax: 86-25-83301606,

E-mail: zhousjpcpu@126.com

存期间易发生聚集、融合及药物渗漏, 磷脂易氧化和水解等稳定性问题。川陈皮素自组装前体脂质体制备工艺简单, 易于扩大化生产, 省去了粉体状前体脂质体除去有机溶剂的步骤, 解决了其水合过程中客观存在的水合速度较慢、局部溶解不完全、分散不均匀等问题。同时, 本文对其在大鼠体内的药代动力学进行了研究, 考察了脂质体对川陈皮素口服生物利用度的影响。

材料与方法

试剂 川陈皮素 (南京神州佳美药物研究公司, 97.12%); 尼莫地平 (中国药品生物制品检定所, 批号 100270-200002); 大豆磷脂 (上海太伟制药); 甲醇、乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

仪器 LC-2010 型高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 岛津制作所); 日立 H-7650 透射电镜 (日本日立公司); Zetasizer 3000 激光粒子测定仪 (英国马尔文公司)。

动物 健康雄性 SD 大鼠, 体重 (200 ± 20) g, 由中国药科大学实验动物部提供。

川陈皮素自组装前体脂质体的制备 大豆磷脂为膜材, 胆固醇为稳定剂, 无水乙醇为分散介质, 以水合后川陈皮素脂质体的稳定时间和外观为指标, 比较了几种常用的修饰剂如去氧胆酸钠、油酸和修饰剂 A (含聚乙二醇亲水基的两亲性化合物) 等的作用效果, 筛选结果确定以磷脂、修饰剂 A 组方为佳。以水合后川陈皮素脂质体平均粒径和包封率为指标, 采用不同载药量、药脂比和修饰剂 A 用量优化川陈皮素自组装前体脂质体处方, 最终确定载药量为 7.5 mg·mL⁻¹, 药脂比为 1 : 20, 修饰剂 A 量与磷脂量比为 1 : 2。

将处方量川陈皮素直接溶解在含有大豆磷脂、修饰剂 A 的无水乙醇溶液中, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 灌封于充氮容器中, 即制成川陈皮素自组装前体脂质体。将该前体脂质体直接注入适宜的水合介质中, 即可快速自组装成纳米级川陈皮素脂质体 (nobiletin liposomes)。

含量测定方法的建立 ① 检测波长的选择: 分别称取川陈皮素和空白辅料适量, 溶于乙醇中, 在 200~400 nm 波长范围内进行扫描, 确定最大吸收波长。结果表明川陈皮素在 332 nm 处有最大吸收, 且辅料无干扰。② 标准曲线: 精密称取干燥至恒重的川陈皮素药物适量于量瓶中, 经乙醇定容后稀释到质量浓度为 100 μg·mL⁻¹ 的储备液。精密吸取储备

液适量至 10 mL 量瓶中, 分别用无水乙醇稀释至刻度, 摇匀即得 2、4、6、8、10、12 μg·mL⁻¹ 的川陈皮素溶液, 以无水乙醇空白作对照, 分别于 332 nm 处测定吸收度值, 以吸收度值 (A) 对浓度 (C) 线性回归得标准方程。川陈皮素含量的线性回归方程为: $A = 0.0643C + 0.0063$, $r = 0.9999$, 线性范围 2~12 μg·mL⁻¹。高、中、低 3 个浓度的平均回收率为 99.92%、99.54% 及 99.59%, 日内及日间精密密度 RSD 均 < 2%, 均符合要求。

包封率的测定 将川陈皮素自组装前体脂质体 0.5 mL 注入 4.5 mL 水合介质中水合, 精密移取水合后的脂质体用乙醇稀释 100 倍定容, 332 nm 处测定吸收度值, 所得吸收度值代入标准曲线计算浓度 (C₁), 同时取重组后的脂质体过 0.45 μm 的微孔滤膜, 精密移取滤液用乙醇稀释 100 倍定容, 332 nm 处测定吸收度值, 所得吸收度值代入标准曲线计算浓度 (C₂)。计算包封率 (EE) = $C_2 / C_1 \times 100\%$, C₁ 代表总的川陈皮素含量, C₂ 代表脂质体中川陈皮素含量。

川陈皮素脂质体的粒径及其分布和形态观察

① 脂质体粒径及分布的测定: 取经水合后的川陈皮素脂质体适量, 稀释若干倍后, 采用马尔文激光粒度测定仪测定重组后的川陈皮素脂质体的粒径及其分布。② 脂质体形态的观察: 将川陈皮素脂质体点样于铜网上, 用 1% 磷钨酸负染后, 滤纸吸干染液, 然后用日立 H-7650 透射电镜观察。

脂质体的稳定性考察 ① 离心加速实验^[7]: 将水合后的川陈皮素脂质体进行离心加速试验 (10 000 r·min⁻¹, 30 min), 用分光光度法测定脂质体离心前后 500 nm 处吸收度的变化。根据公式 $K_e = (A_0 - A) / A_0$ 计算稳定性参数, (式中 A₀ 为离心前脂质体的吸收度值, A 为离心后脂质体的吸收度值)。② 加速稳定性: 将制得的川陈皮素自组装前体脂质体密封后, 放置于 40 °C 及相对湿度 75% 条件下, 于 0, 1, 2, 3 个月取样, 测定水合后脂质体的含量、粒径和包封率, 考察川陈皮素自组装前体脂质体的稳定性。

血浆中川陈皮素的测定方法 ① 色谱条件: 色谱柱: Shimadzu ODS (4.6 mm × 250 mm); 流动相: 甲醇-水 (体积比, 70 : 30); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 紫外检测波长: 332 nm; 柱温: 28 °C; 进样体积: 20 μL, 尼莫地平为内标。② 方法专属性考察: 取空白大鼠血浆 100 μL, 按以下“血浆样品处理”项操作, 分别进样空白血浆、空白血浆加内标和药物及大鼠灌胃给药后的血浆样品。③ 标准曲线的制备: 取带塞离心管, 精密加入不同质量浓度的川陈皮素标准品溶液 25 μL

及 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 尼莫地平内标液 $20 \mu\text{L}$, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴下 N_2 挥干, 加入大鼠空白血浆 $100 \mu\text{L}$, 使血浆中川陈皮素的质量浓度分别为 10、20、50、100、200、500、1 000 和 $2\ 000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 随后按“血浆样品处理”项下操作, 以血浆中样品的浓度 (C) 为横坐标, 样品峰面积与内标峰的比值 (A_i / A_s) 为纵坐标作线性回归, 得拟生物样品标准曲线方程。④ 回收率及精密度: 配制川陈皮素质量浓度为 20、200 和 $2\ 000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 种不同浓度的血浆样品, 按“血浆样品处理”项下操作后进行分析, 考察回收率及精密度。⑤ 定量限: 以信噪比为 10:1 时样品溶液浓度作为定量限。

血浆样品处理 取 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 尼莫地平内标液 $20 \mu\text{L}$ 于离心管中, $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴下 N_2 挥干, 加入大鼠血浆 $100 \mu\text{L}$, 涡旋振荡 1 min, 加入乙腈 0.5 mL , 涡旋振荡 30 s, 再加入乙酸乙酯 1.5 mL , 涡旋振荡 5 min, $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 1.5 mL 在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴下 N_2 挥干。然后用流动相 $100 \mu\text{L}$ 复溶, 涡旋振荡 2 min 后, $10\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液 $20 \mu\text{L}$ 进样, 用内标法进行色谱分析。

给药方案及样品采集 取大鼠 10 只禁食 12 h 后随机均分为两组, 以 $10.8 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 分别大鼠灌胃给予水合后的川陈皮素脂质体及 5% CMC-Na 混悬剂, 于给药后 0.083、0.167、0.25、0.333、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8 和 12 h 毛细管眼底取血, 分离血浆后按“血浆样品处理”项下操作, 将所得样品峰面积与内标峰的比值 (A_i / A_s) 代入标准曲线方程求算样品血浆浓度。

数据处理 血药浓度-时间数据用 Kinetica 4.4 药动学程序对血药浓度数据进行药动学解析, 并对两种制剂的主要药代动力学参数进行 t 检验。

结果

1 川陈皮素脂质体的理化性质

经测定川陈皮素脂质体包封率为 $(85.3 \pm 2.8)\%$ 。川陈皮素自组装前体脂质体水合后, 脂质体的平均粒径为 212.1 nm , 多分散指数为 0.23。在透射电镜下可以观察到, 水合后的脂质体基本上呈类球形 (图 1)。

2 稳定性试验

通过离心加速实验, 测得 $A_0 = 0.261$, $A = 0.247$, 计算得 $K_e = 0.054$ 。可见, 离心前后吸收度变化很小。样品放置 3 个月后, 未发现沉淀, 仍为淡黄色澄清溶液。0、1、2 和 3 个月取样的川陈皮素自组装前体脂质体水合后测得药物含量分别为 94.6%、95.3%、

93.1% 和 92.7%, 平均粒径分别为 194.2、209.9、214.3 和 216.0 nm , 包封率分别为 86.0%、84.3%、82.4% 和 83.2%, 表明川陈皮素自组装前体脂质体具有良好的稳定性。

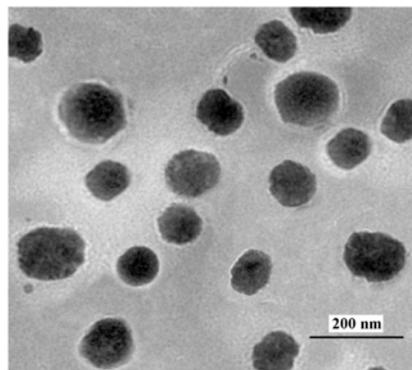


Figure 1 Transmission electron micrograph of nobiletin liposomes

3 大鼠体内药物浓度测定方法的建立

3.1 方法专属性考察 图 2 为本实验色谱条件下所得色谱图。结果表明血浆中的内源性杂质不干扰川陈皮素和尼莫地平的测定, 且内标与药物分离完全, 峰形良好。川陈皮素和尼莫地平保留时间分别为 12.2 min 和 16.2 min。

3.2 标准曲线的制备及最低定量限 川陈皮素的标准曲线为 $A_i / A_s = 0.002\ 2\ C - 0.002\ 4$, $r = 0.999\ 9$, 线性范围为 $10 \sim 2\ 000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 信噪比 $S / N = 10$ 时定量限为 $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.3 回收率与精密度 血浆中 20、200 和 $2\ 000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 3 种不同浓度的川陈皮素的回收率分别为 $(104.28 \pm 5.96)\%$ 、 $(98.70 \pm 1.71)\%$ 和 $(93.81 \pm 3.13)\%$ 。日内 RSD 分别为 4.28%、1.83% 和 2.52%; 日间 RSD 分别为 7.85%、3.73% 和 2.35%, 均符合生物样品测定要求。

4 血药浓度经时曲线及药代动力学参数

大鼠灌胃给予川陈皮素混悬剂和脂质体后的平均血药浓度-时间曲线见图 3, 用 Kinetica 4.4 软件对其进行房室模型拟合, 以 AIC 为判据, 表明川陈皮素及其脂质体在大鼠体内的药代动力学过程均符合一室模型, 主要药代动力学参数见表 1, 同时对数据进行非房室模型拟合计算 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 及 MRT。

与混悬剂相比, 川陈皮素脂质体在大鼠体内的峰浓度 C_{max} 、药-时曲线下面积 AUC_{0-t} 及 $AUC_{0-\infty}$ 均有显著提高, 达峰时间 t_{max} 显著缩短, 吸收速度 K_a 显著增加 ($P < 0.05$), 相对生物利用度为 264.3%。川陈

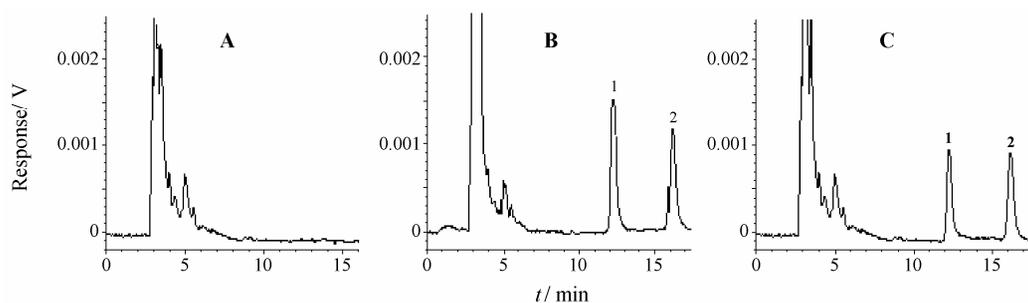


Figure 2 HPLC chromatograms of blank plasma (A); blank plasma with $500 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ nobiletin and internal standard (nimodipine) were added (B); a plasma sample (C). Peak 1: Nobiletin; Peak 2: Nimodipine

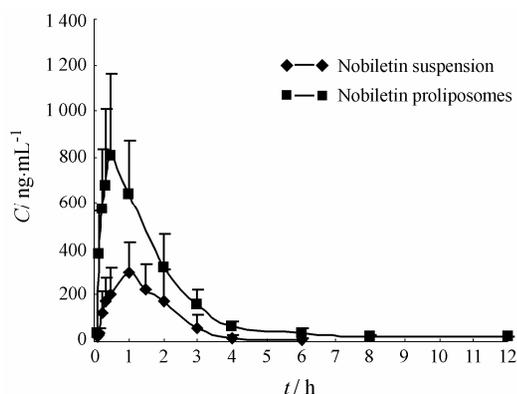


Figure 3 Mean plasma concentration-time curve of nobiletin in rats after oral administration of nobiletin suspension and nobiletin proliposomes at single dose

Table 1 Pharmacokinetic parameters of nobiletin suspension and nobiletin liposomes ($n = 5$)

Parameter	Nobiletin suspension	Nobiletin liposome
$C_{\max} / \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	297 ± 133	$806 \pm 354^*$
t_{\max} / h	1	0.5^*
K_a / h^{-1}	1.12 ± 0.13	$1.86 \pm 0.56^*$
K_e / h^{-1}	1.26 ± 0.24	1.09 ± 0.20
$t_{1/2} / \text{h}$	0.57 ± 0.12	0.65 ± 0.12
$\text{AUC}_{0-7} / \text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	562 ± 317	$1454 \pm 564^*$
$\text{AUC}_{0-\infty} / \text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	569 ± 325	$1504 \pm 544^*$
$\text{CL} / \text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$	5585 ± 3525	1800 ± 766
MRT / h	1.60 ± 0.23	$2.61 \pm 0.81^*$

* $P < 0.05$ vs nobiletin suspension

皮素脂质体在体内的CL下降,说明脂质体可以延缓川陈皮素口服后的体内清除率,平均滞留时间(MRT)是混悬剂的1.63倍。

结果表明,将难溶性药物川陈皮素制成自组装前体脂质体后,能显著加快药物的吸收,增加吸收量,提高生物利用度。

讨论

川陈皮素的亲脂性和亲水性均不佳,采用常规的脂质体制备方法如薄膜分散法、乙醇注入法和逆相蒸发法等均存在去除有机溶剂后药物大量析出的问题,包封率低(约10%)。故本文采用液晶前体脂质体法^[8],即将脂质体膜材和药物以一定比例溶于分散介质中得澄清溶液,加水或缓冲液稀释至一定程度后自发形成脂质体混悬液,不除去有机溶剂,解决了析出的问题,并简化了制备过程。所得前体脂质体水合后包封率高,粒径分布均匀。此制备方法不需专用设备,只需混合过程即可制成自组装前体脂质体,十分简便,且该自组装前体脂质体在贮存过程中为无水状态的澄清液体,是一种动力学稳定体系,有效解决了脂质体的稳定性问题。

测定脂质体包封率时,川陈皮素自组装脂质体水合后,未包封的药物以沉淀析出,过滤除去沉淀,滤液中即为包裹了川陈皮素的脂质体。因为川陈皮素在水中的溶解度低($19.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),可以忽略不计,所以测定滤液中川陈皮素的含量即可计算脂质体的包封率^[6]。

川陈皮素生物利用低的可能原因是水溶性和脂溶性均不佳,与肠壁的亲性和不好,包裹于脂质体后不但改善了其两亲性,且因纳米级脂质体的黏附性,增加了药物与肠壁的接触面积和接触时间,因而,吸收较快,达峰时间提前,最大血药浓度大大提高。川陈皮素口服跨膜吸收的增加还利于磷脂本身具有促进黄酮类药物的肠道吸收的能力^[9],修饰剂的加入又增加了脂质体的可变形性,使药物更易穿过细胞屏障^[10]。此外,磷脂对黄酮类药物的主要代谢酶细胞色素 P450 (CYP450) 有抑制作用^[11, 12],这可能是川陈皮素制成脂质体后,生物利用度和 MRT 显著增加的另一个原因。

川陈皮素及其脂质体口服给药后 AUC 和 CL 的个体差异较大,除了动物个体间的胃肠道生理状态存在差异及药物受肠道内的酶及细菌等代谢的影响外,因黄酮类药物是多种肝代谢酶的重要底物,而多种 CYP450 由于遗传多态性存在强或弱代谢型,且黄酮类药物本身对 CYP450 活性的诱导或抑制作用^[13]使其代谢过程更为复杂,这些吸收和消除过程的差异都可能导致 AUC 和 CL 个体之间的差异。但川陈皮素口服给药后个体差异大的机制还有待进一步探讨和验证。

本文制备的口服川陈皮素自组装前体脂质体与川陈皮素静脉注射微乳^[4]给药后,与对照组相比 AUC 均显著增加,即两种新型载体对改善川陈皮素的体内行为、提高其生物利用度均具有突出优势,而脂质体体系在组织亲和性和生物相容性方面更具优势,经口服给药,胃肠道刺激性较小。

本文制备了稳定的、包封率较高的川陈皮素自组装前体脂质体,且制备工艺简单,易于工业化生产;川陈皮素脂质体大鼠灌胃给药后,加快了吸收,大大提高了生物利用度。

References

- [1] Wu YQ, Zhou CH, Tao J, et al. Antagonistic effects of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, on eosinophilic airway inflammation of asthmatic rats and relevant mechanisms [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 2689–2696.
- [2] Miyata Y, Sato T, Imada K, et al. A citrus polymethoxyflavonoid, nobiletin, is a novel MEK inhibitor that exhibits antitumor metastasis in human fibrosarcoma HT-1080 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 366: 168–173.
- [3] Wang GF, Wang XC, Xiao L, et al. Anti-tumor effects of citrus flavonoid nobiletin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2007, 38: 1694–1697.
- [4] Yao J, Zhou JP, Ping QN. Characteristics of nobiletin-loaded nanoemulsion and its *in vivo* distribution in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 663–668.
- [5] Tian YY, Ge L, Duan XL, et al. Lycopene liposomes: lycopene release *in vitro* and pharmaceutical behaviors and antioxidation *in vivo* [J]. *Acta Pharma Sin (药学报)*, 2007, 42: 1107–1111.
- [6] Xiao YY, Song YM, Chen ZP, et al. Preparation of silymarin proliposomes and its pharmacokinetics in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 758–763.
- [7] Zhang Q, Deng YJ. The preparation of 5-FU liposome by a freeze-thawing method and the study on its stability [J]. *J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报)*, 2000, 17: 87–89.
- [8] Wang J, Li MX. Progresses of proliposomes [J]. *Chin J Pharm (中国医药工业杂志)*, 2005, 36: 707–711.
- [9] Ding JS, Zhang JS. Absorption of breviscapine in small intestine of rat [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2003, 34: 65–69.
- [10] Deshmukha DD, Ravis WR, Betageri GV. Improved delivery of cromolyn from oral proliposomal beads [J]. *Int J Pharm*, 2008, 358: 128–136.
- [11] Pei LK, Guo BL. Progresses in absorption and metabolism of flavonoids [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2006, 41: 568–572.
- [12] Ren X, Mao X, Si L, et al. Pharmaceutical excipients inhibit cytochrome P450 activity in cell free systems and after systemic administration [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 70: 279–288.
- [13] Zheng J, Zhou HH. Effects of the flavonoids on cytochrome P-450 CYP1, 2E1, 3A4 and 19 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 8–12.