

[科研报道]

根皮素磷脂复合物的制备及其体内药动学研究

马记平¹, 刘丹花¹, 郝海军², 李晓蒙¹, 王利¹, 范明松^{2*}

(1. 郑州澍青医学高等专科学校, 河南郑州 450064; 2. 上海雷允上药业有限公司技术中心, 上海 201401)

摘要: 目的 制备根皮素磷脂复合物, 并研究其体内药动学行为。方法 以大豆磷脂用量、制备温度、制备时间、溶剂(四氢呋喃)体积为影响因素, 磷脂复合物复合率为评价指标, 单因素试验优化处方。XRPD分析根皮素在磷脂复合物中的存在状态, 测定磷脂复合物在水或正辛醇中的表观溶解度。大鼠灌胃给予磷脂复合物 CMC-Na 混悬液(100 mg/kg)后, HPLC 法测定血药浓度, 计算主要药动学参数。结果 最优处方为大豆磷脂用量 160 mg, 制备温度 55 ℃, 制备时间 4 h, 溶剂体积 40 mL, 复合率达到 99.57%。根皮素形成磷脂复合物后, 由结晶态转变为无定型态, 在水、正辛醇中表观溶解度升高($P<0.01$), 相对生物利用度提高至 2.29 倍。结论 磷脂复合物可提高皮素在水、正辛醇中的表观溶解度, 并促进其体内吸收。

关键词: 根皮素; 磷脂复合物; 制备; 体内药动学; 单因素试验; HPLC

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2020)06-1577-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.035

根皮素是一种含有二氢查尔酮结构的黄酮类植物多酚, 主要存在于蔬菜及梨、苹果等水果的根茎中, 具有抗菌、抗糖尿病、抗氧化、抗肿瘤、雌激素样作用等多种药理活性^[1-3], 此外还具有美白肌肤、延缓衰老、祛除粉刺等多种美容功效^[4]。但该成分溶解度很差^[5], 口服给药后很难被吸收^[6], 目前已有固体分散体^[7]、包合物^[8]等制剂学方面的研究, 但尚无磷脂复合物制剂技术的报道。

磷脂复合物是药物分子和磷脂或磷脂酰胆碱分子之间通过氢键、范德华力等作用力而形成的一种复合物^[9-12], 其基本理化性质不同于原型药物, 可改变药物晶型状态^[13], 增加其溶解度, 促进其口服吸收。本实验采用单因素试验优化根皮素磷脂复合物处方, 对其进行表征, 并考察其生物利用度。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 配置 DAD 检测器、自动进样器(美国 Agilent 公司); MSE125P-CE 型电子天平(德国 Sartorius 公司); CJ-78-1A 型磁力搅拌器(上海跃进医疗器械厂); D8 型 X 射线粉末衍射仪(瑞士 Bruker 公司); THZ-92A 型恒温振荡器(上海翠柳实验仪器有限公司); QT-2A 型旋涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司); KL152 型氮气吹扫仪(滁州精鑫实验仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 根皮素对照品(批号 P7912, 纯度 99.9%, 美国 Sigma 公司); 岩白菜素对照品(批号 477-90-7,

纯度 99.2%, 上海源叶生物科技有限公司); 卵磷脂(批号 PC-98T, 上海辅必成医药科技有限公司)。四氢呋喃为色谱纯(批号 C10303495, 德国 Merck 公司); 正辛醇(国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 动物 SD 大鼠, 雌雄兼用, 体质量(300±20) g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 动物生产许可证号 SCXK(沪)2013-0016。

2 方法与结果

2.1 根皮素含有量测定

2.1.1 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 氨水(35:75); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 ℃; 检测波长 285 nm; 进样量 20 μL。

2.1.2 供试品溶液制备 取根皮素磷脂复合物 10 mg, 加入 10 mL 石油醚溶解, 过 0.22 μm 微孔滤膜后挥去石油醚, 加入 50 mL 乙腈重新溶解, 即得。

2.1.3 方法学考察 称取根皮素对照品 20.0 mg, 溶于 100.0 mL 乙腈中, 得 200.0 μg/mL 贮备液, 精密量取 5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 乙腈-0.1% 氨水混合液(35:75)定容至刻度, 得到 100.0 μg/mL 溶液, 进一步稀释成 1.0、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 μg/mL, 在“2.1.1”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 $Y = 1.355 \times 10^4 + 4.0138$ ($r=0.9999$), 在 1.0~100.0 μg/mL 范围内线性

收稿日期: 2019-08-15

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(16210231003); 河南省科技发展计划(172102350425)

作者简介: 马记平(1987—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为基础医学。Tel: (0371) 7166170, E-mail: majiping007@126.com

*通信作者: 范明松(1973—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为药物研发。Tel: (021) 51801316, E-mail: fanmingsong007@163.com

关系良好。

取 100.0、50.0、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液, 同一天在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得日内精密度 RSD 分别为 0.13%、0.09%、0.19%; 每天进样测定 1 次, 共 6 d, 测得日间精密度 RSD 分别为 0.24%、0.19%、0.75%。取“2.1.2”项下供试品溶液, 于 0、4、8、12、24、48 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 测得根皮素含有量 RSD 为 0.79%, 表明溶液在 48 h 内稳定性良好。取大豆磷脂约 7.5 mg, 按“2.1.2”项下方法平行制备供试品溶液 9 份, 分为 3 组, 分别加入标示量 80%、100%、120% 水平的对照品溶液, 每个水平平行 3 份, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 测得根皮素平均加样回收率为 99.53%, RSD 为 1.60%。

2.2 磷脂复合物制备 称取处方量大豆卵磷脂、50 mg 根皮素 (45 ℃ 下真空干燥 12 h) 置于圆底烧瓶中, 加入 50 mL 四氢呋喃后得混悬液, 恒温搅拌一定时间后减压旋蒸除去四氢呋喃, 收集残留物, 45 ℃ 下真空干燥 12 h, 即得。

2.3 复合率测定 取根皮素 (总量 m_0) 与适量大豆卵磷脂制成磷脂复合物, 加入 10 mL 石油醚溶解, 过 0.22 μm 微孔滤膜除去游离药物, 挥去石油醚, 加 10 mL 乙腈重新溶解, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 测得形成磷脂复合物所需药量 (m_1), 计算复合率, 公式为复合率 = $(m_1/m_0) \times 100\%$ 。

2.4 制备工艺优化

2.4.1 大豆磷脂用量 固定根皮素用量为 50 mg, 四氢呋喃用量为 40 mL, 制备温度为 45 ℃, 制备时间为 4 h, 考察大豆磷脂用量 130、140、150、160、170 mg 对复合率的影响, 结果见图 1。由此可知, 随着大豆磷脂用量逐渐增加, 复合率也逐渐升高, 在 160 mg 时最大 (93.17%), 故确定为 160 mg。

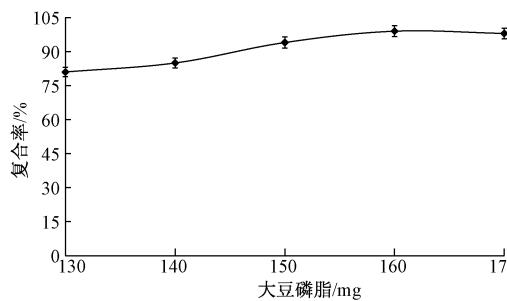


图 1 大豆磷脂用量对复合率的影响

2.4.2 制备温度 固定根皮素用量为 50 mg, 四氢呋喃用量为 40 mL, 制备时间为 4 h, 大豆磷脂用量为 160 mg, 考察制备温度 25、35、45、55、65 ℃ 对复合率的影响, 结果见图 2。由此可知, 随着制备温度逐渐升高, 复合率也逐渐升高, 但在 65 ℃ 时反而下降, 可能是由于大豆磷脂在温度较高时氧化变质所致, 故确定为 55 ℃。

2.4.3 制备时间 固定根皮素用量为 50 mg, 四氢呋喃用量为 40 mL, 制备温度为 55 ℃, 大豆磷脂用量为 160 mg,

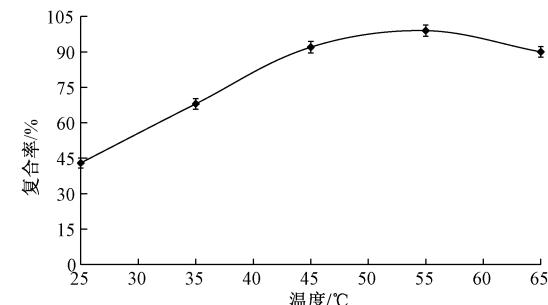


图 2 制备温度对复合率的影响

考察制备时间 2.5、3、3.5、4、4.5、5 h 对复合率的影响, 结果见图 3。由此可知, 随着制备时间延长, 复合率也逐渐升高, 但在 4 h 后有所下降, 可能与时间过长导致大豆磷脂氧化变质有关, 故确定为 4 h。

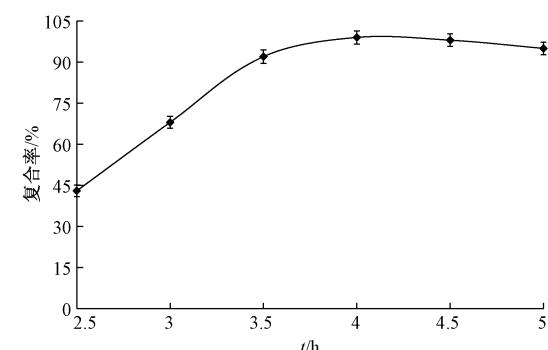


图 3 制备时间对复合率的影响

2.4.4 溶剂体积 固定根皮素用量为 50 mg, 制备时间为 4 h, 制备温度为 55 ℃, 大豆磷脂用量为 160 mg, 考察溶剂 (四氢呋喃) 体积 20、25、30、35、40、45 mL 对复合率的影响, 结果见图 4。由此可知, 随着溶剂体积逐渐增加, 复合率也逐渐升高, 在 40 mL 时最大, 可能是因为此时药物、磷脂浓度下降, 有利于增加 2 种分子结合的机会, 故确定为 40 mL。

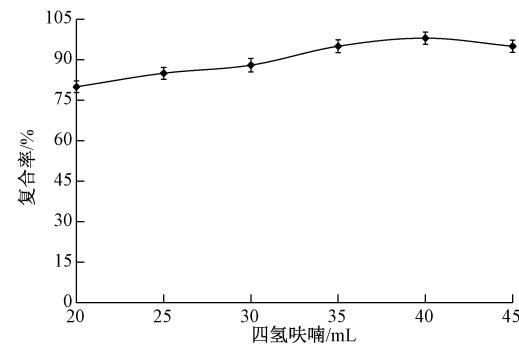
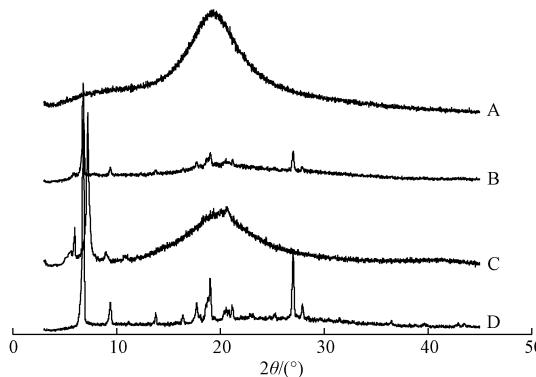


图 4 溶剂体积对复合率的影响

2.5 存在状态研究 采用 XRPD 对根皮素在磷脂复合物中的存在状态进行研究, 扫描范围 (2θ) $3^\circ \sim 45^\circ$, 扫描速度 $8^\circ/\text{min}$, 电流 40 mA, Cu-K α 靶, 结果见图 5。由此可知, 根皮素在 $3^\circ \sim 30^\circ$ 范围内有多处典型晶型峰, 它与大豆卵磷脂简单制备的物理混合物中可见其晶型峰, 磷脂复合物中

两者特征晶型峰均消失，可能是因为它们形成磷脂复合物后各自极性端发生某种定性结合所致，同时也证明磷脂复合物并不是简单的物理混合。另外，由于大豆磷脂 XRPD 峰强度远远低于根皮素，两者制成物理混合物后后者 XRPD 特征峰掩盖了前者，导致物理混合物中几乎未体现磷脂特征峰。



注：A~D 分别为磷脂复合物、物理混合物、大豆卵磷脂、根皮素。

图 5 各样品 XRD 图谱

2.6 溶解性能分析 取根皮素、物理混合物、磷脂复合物，加入蒸馏水（经正辛醇饱和）或正辛醇（经蒸馏水饱和），25 °C、800 r/min 磁力搅拌 48 h，取适量混悬液 8 000 r/min 离心 15 min，取上清液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，计算表观溶解度，结果见表 1。由此可知，磷脂复合物在正辛醇、水中的表观溶解度分别较原料药提高 4.74、2.62 倍，差异有统计学意义 ($P<0.01$)，与磷脂复合物技术可同时改善难溶性药物脂溶性、水溶性的报道相符。

表 1 各样品表观溶解度测定结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

样品	水/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	正辛醇/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
根皮素	26.51 ± 0.17	534.07 ± 1.27
物理混合物	27.69 ± 0.14	535.43 ± 1.16
磷脂复合物	$69.37\pm0.31^{**}$	$2531.82\pm3.21^{**}$

注：与根皮素比较， $^{**} P<0.01$ 。

2.7 体内药动学研究

2.7.1 灌胃供试液制备 取根皮素、物理混合物、磷脂复合物适量，置于 0.5% CMC-Na 溶液中，超声分散，即得 (15 mg/mL，以根皮素含有量计)。

2.7.2 给药及取血 取 Wistar 大鼠 18 只，自然昼夜光线照明，随机分为 3 组，灌胃给药前禁食 12 h，不禁水。各组大鼠均按 100 mg/kg 剂量灌胃给予根皮素、物理混合物、磷脂复合物 0.5% CMC-Na 混悬液，于 0.167、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12 h 各取血约 0.3 mL，保存于肝素浸润的离心管中，2 500 r/min 离心 3 min，上清液保存于冰箱冷冻室中。

2.7.3 样品处理 取血浆、内标溶液 (400 ng/mL) 各 100 μL ，混匀后加入 1.5 mL 乙酸乙酯，涡旋混匀 3 min，10 000 r/min 离心 8 min，上清液于 50 °C 氮气中吹干，

100 μL 乙腈复溶，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。

2.7.4 线性关系考察 称取岩白菜素对照品 10.0 mg，溶于 50 mL 乙腈中，得 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 贮备液，精密量取 1.0 mL 于 100 mL 量瓶中，乙腈定容至 2 000 ng/mL，精密量取 2.0 mL 于 10 mL 量瓶中，乙腈定容，得 400 ng/mL 内标溶液。

取上述贮备液，乙腈逐步稀释成 1 500、750、500、100、50、20 ng/mL，各取 500 μL ，加入 500 μL 内标溶液，50 °C 氮气缓慢吹干后加入 500 μL 空白血浆，按“2.7.3”项下方法处理。以溶液质量浓度为横坐标 (X)，根皮素与内标峰面积比值为纵坐标 (Y) 进行回归，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，得方程为 $Y = 1.3684X + 9.7451$ ($r=0.9923$)，在 20~1 500 ng/mL 范围内线性关系良好，定量限 ($S/N=10$) 为 8.0 ng/mL，检测限 ($S/N=3$) 为 3.5 ng/mL。

2.7.5 方法学考察 取空白血浆、血浆对照品溶液（加根皮素对照品、内标）、血浆样品（加内标），按“2.6.3”项下方法处理，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，发现内源性物质不干扰根皮素、内标测定，表明该方法专属性良好。取 20、750、1 500 ng/mL 血浆对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得峰面积 RSD 分别为 3.11%、3.92%、2.88%，表明该方法重复性良好。每天在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 1 次，连续 6 d，测得峰面积 RSD 分别为 11.06%、6.75%、4.01%，表明仪器精密度良好。取磷脂复合物灌胃给药 1 h 的血浆样品，于 0、2、4、8、12、24、48 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得峰面积 RSD 为 8.69%，表明溶液在 48 h 内稳定性良好。取上述 3 种质量浓度血浆对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得平均加样回收率分别为 91.01%、88.74%、97.05%，RSD 均小于 6.96%。

2.7.6 实验结果 图 6、表 2 显示，原料药、物理混合物之间药动学参数比较，差异均无统计学意义 ($P>0.05$)；与原料药、物理混合物比较，磷脂复合物 C_{\max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 升高 ($P<0.01$)， t_{\max} 有所延长，但差异无统计学意义 ($P>0.05$)；与原料药比较，磷脂复合物的相对生物利用度提高至 2.29 倍。

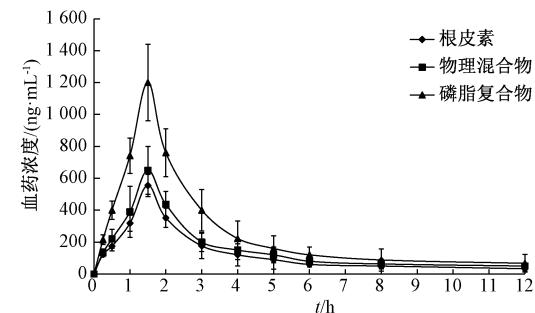


图 6 各样品血药浓度-时间曲线

3 讨论

本实验通过单因素实验，确定根皮素磷脂复合物最优

表2 各样品主要药动学参数 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

参数	单位	根皮素	物理混合物	磷脂复合物
t_{max}	h	1.55±0.24	1.44±0.27	1.61±0.36
C_{max}	ng·mL ⁻¹	571.41±74.85	650.94±86.07	1 284.43±217.65 ^{##△△}
AUC_{0-t}	ng·mL ⁻¹ ·h	1 483.38±217.09	1 514.24±243.47	3 404.17±416.58 ^{##△△}
$AUC_{0-\infty}$	ng·mL ⁻¹ ·h	1 713.77±243.81	1 812.52±262.04	3 814.73±479.90 ^{##△△}

注:与根皮素比较,^{##}P<0.01;与物理混合物比较,^{△△}P<0.01。

处方为根皮素用量 50 mg, 大豆磷脂用量 160 mg, 制备时间 4 h, 制备温度 55 ℃, 四氢呋喃体积 40 mL, 其中根皮素与大豆磷脂比例为 1:1.19。课题组前期曾以大豆磷脂用量(150、160、170 mg)、制备时间(3.5、4、4.5 h)、制备温度(50、55、60 ℃)、四氢呋喃体积(35、40、45 mL)为影响因素设计正交试验作进一步优化, 发现所得最优工艺与单因素试验一致(限于篇幅, 不再展示相关数据), 但方差分析显示制备时间有极显著差异($P<0.01$)。

难溶性药物分子与磷脂分子形成磷脂复合物后, 前者水溶性和脂溶性均得到提高, 以脂溶性更明显, 有利于其穿透过胃肠道黏膜。由于磷脂复合物中磷脂与胃肠道黏膜的高亲和性, 在磷脂转换蛋白的协助下药物分子与细胞膜结合、交换而顺利进入机体血液循环^[14-15], 最终提高难溶性药物口服吸收生物利用度。药动学研究结果表明, 根皮素磷脂复合物 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 与原料药混悬液相比差异均具有统计学意义($P<0.01$), 相对生物利用度提高至 2.29 倍; 物理混合物三者有所升高, 可能与磷脂本身具有一定的促吸收作用有关, 但药动学参数无明显差异($P>0.05$)。

由于根皮素在化妆品领域也具有较好的应用前景, 今后可对其透皮吸收进行研究^[16-17]。大量研究结果显示, 磷脂复合物可作为制剂中间体(如磷脂复合物固体分散体^[18]、磷脂复合物固体脂质纳米粒^[19]、磷脂复合物纳米结构脂质载体^[20]等), 而本实验制备的根皮素磷脂复合物也可为后续研究奠定基础^[21]。

参考文献:

- [1] 冯甜, 王力彬, 周楠, 等. 根皮素的研究进展[J]. 转化医学杂志, 2017, 6(1): 42-46.
- [2] 陆晓宇, 曾耀英, 叶燕霞, 等. 根皮素的抗炎和免疫抑制作用(英文)[J]. 药学学报, 2009, 44(5): 480-485.
- [3] 王会, 刘政, 吴汉东. 根皮素对肝癌细胞 HepG-2 增殖和凋亡的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(7): 39-42; 46.
- [4] 崔树梅, 曹孟岑, 杨雪晨, 等. 根皮素在化妆品中的应用[J]. 日用化学工业, 2018, 48(2): 113-118.
- [5] 畅敏, 王庆伟, 刘新友, 等. 反相高效液相色谱法测定根皮素溶解度[J]. 中国医药导报, 2011, 8(32): 33-34.
- [6] 韩雷. 水溶性根皮素的制备及生物利用效应研究[D]. 江门: 五邑大学, 2016.
- [7] 韩雷, 马诗经, 江森, 等. 根皮素固体分散体的制备和表征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24): 10-13.
- [8] 李姝静, 周自若, 周威, 等. 根皮素与两种β-环糊精衍生物的包合作用及性质[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 11-16.
- [9] 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.
- [10] Wu X C, Hao H J, Liu Y X, et al. Bioavailability of 10-hydroxycamptothecin-phospholipid complex loaded by solid dispersion and lipid-based formulations[J]. J Chin Pharm Sci, 2015, 24(12): 780-788.
- [11] 吴先闯, 郝海军, 张永州, 等. 姜黄素磷脂复合物不同制剂对 SD 大鼠口服生物利用度的影响[J]. 中成药, 2015, 37(10): 2163-2166.
- [12] 李阳杰, 周敬. 木犀草素磷脂复合物的制备、表征及体内药动学行为[J]. 中成药, 2019, 41(6): 1381-1384.
- [13] 袁鹏辉, 杨德智, 胡堃, 等. 心脑血管疾病治疗药物共晶研究进展[J]. 医药导报, 2019, 38(2): 187-192.
- [14] 徐艳艳, 丁佳圣, 翁金燕, 等. 4 种磷脂囊泡的细胞毒性及促胰岛素细胞内转运的研究[J]. 医药导报, 2018, 37(8): 943-947.
- [15] 金琪雯, 张峻颖, 吴春勇, 等. 皮肤中转运蛋白对药物透皮吸收的作用[J]. 医药导报, 2018, 37(7): 794-799.
- [16] 魏永鸽, 徐凯. 青藤碱磷脂复合物的制备、表征及体外透皮研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(8): 1449-1453.
- [17] 张瑞涛, 吴振刚, 赵军, 等. 厚朴酚与厚朴酚透皮吸收的差异性[J]. 医药导报, 2018, 37(6): 654-658.
- [18] 刘蒸生, 郝海军, 马进安. 高乌甲素磷脂复合物及其固体分散体在大鼠体内的药动学[J]. 医药导报, 2018, 37(4): 449-452.
- [19] 徐凯, 魏永鸽. 高乌甲素磷脂复合物纳米粒的制备、表征及药动学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 870-874.
- [20] 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.
- [21] 陈丹, 石丛姣, 许琦, 等. 皮肤功效成分纳米载体研究进展[J]. 医药导报, 2018, 37(6): 673-678.