

辛伐他汀固体脂质纳米粒的制备及在大鼠体内的药动学研究

刘艳明¹ 王雪芳² 王东³ (1. 解放军 251 医院心内科 河北张家口 075000; 2. 河北北方学院医学院生理教研室; 3. 天津中医药大学药学院)

摘要 目的: 制备辛伐他汀固体脂质纳米粒, 并研究其经灌胃给药后在大鼠体内的药动学特征。**方法:** 采用热熔乳化超声-低温固化法制备辛伐他汀固体脂质纳米粒, 考察辛伐他汀固体脂质纳米粒的粒径分布、Zeta 电位、包封率、微观形态及体外药物释放特性。研究辛伐他汀固体脂质纳米粒经灌胃给药后在大鼠体内的药动学特征。**结果:** 辛伐他汀固体脂质纳米粒平均粒径为 (242.5 ± 62.1) nm, 多聚分散系数为 0.225 ± 0.031 , Zeta 电位为 (-32.1 ± 4.2) mV, 包封率为 $(95.7 \pm 2.6)\%$, 在 24 h 内平稳缓慢释药。辛伐他汀固体脂质纳米粒在大鼠体内的 C_{max} 和 AUC_{0-4} 分别为辛伐他汀混悬液的 2.89 倍和 1.83 倍。**结论:** 辛伐他汀固体脂质纳米粒在大鼠体内能快速吸收, 显著提高了药物在大鼠体内的生物利用度。

关键词 辛伐他汀固体脂质纳米粒; 热熔乳化超声-低温固化法; 药动学; 生物利用度

中图分类号: R944.9, R969.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-049X(2016)01-0050-04

Preparation and Pharmacokinetics in Rats of Simvastatin Solid Lipid Nanoparticles

Liu Yanming¹, Wang Xuefang², Wang Dong³ (1. Department of Cardiology, No. 251 Hospital of PLA, Hebei Zhangjiakou 075000, China; 2. Department of Physiology, Hebei North University; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective: To prepare simvastatin solid lipid nanoparticles and evaluate its characteristics of pharmacokinetics in rats after oral administration. **Methods:** Simvastatin solid lipid nanoparticles were prepared by a melt-emulsion ultrasonication and low temperature-solidification method. The physicochemical properties of simvastatin solid lipid nanoparticles were studied, such as particle diameter, zeta potential, particle shape, encapsulation efficiency and *in vitro* release. The characteristics of pharmacokinetics in rats after oral administration of simvastatin solid lipid nanoparticles were studied. **Results:** For simvastatin solid lipid nanoparticles, the particle size was (242.5 ± 62.1) nm with the polydispersity index of (0.225 ± 0.031) , zeta potential was (-32.1 ± 4.2) mV, and the encapsulation efficiency was $(95.7 \pm 2.6)\%$. The *in vitro* release was proved that the drug release from the formula was steady during 24 h. C_{max} and AUC_{0-4} of simvastatin solid lipid nanoparticles respectively was 2.89 and 1.83 times higher than that of simvastatin suspension. **Conclusion:** Simvastatin solid lipid nanoparticles can promote the absorption of simvastatin and increase bioavailability in rats remarkably.

KEY WORDS Simvastatin solid lipid nanoparticles; Melt-emulsion ultrasonication and low temperature-solidification method; Pharmacokinetics; Bioavailability

辛伐他汀(simvastatin)属于羟甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制药, 抑制内源性胆固醇的合成, 从而控制血液中胆固醇含量, 预防心血管疾病。但辛伐他汀在水中的溶解度仅为 $1.4 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 其片剂口服生物利用度为 5%^[1], 限制了其在临床上的应用。

固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)是继传统给药系统(如微乳、脂质体、胶束)后在纳米制剂领域研究较为活跃的新剂型。该剂型不仅具备物理稳定性高、载药量大、毒性低等优点, 还可以提高药物的生物利用度、降低药物用药剂量以及具有靶向性作用^[2~6], 是近年来极具发展潜力的新型给药系统。本研究采用热熔乳化超声-低温固化法将辛伐他汀制备成固体脂质纳米粒, 并进行大鼠体内药动学研究, 达到了提高辛伐他汀生物利用度的目的。

1 材料

1.1 仪器

L-2000 高效液相色谱仪(日本日立高新技术公司); JY92-2D 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂); RC-806 溶出试验仪(天津天大天发科技有限公司); ME104 电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); ZetaSizer 2000HS 激光粒度测定仪(英国 Malvern 公司); JEM-1200EX 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司); SLG-1000 台型台式离心机(常州市凯航仪器有限公司); 透析袋(截留分子量: 12 000 道尔顿, 北京瑞达恒辉科技发展有限公司); 10K 超滤离心管(美国 pall 公司)。

1.2 试药

辛伐他汀对照品(中国食品药品检定研究院, 批

通讯作者: 王雪芳 Tel: 15904255246 E-mail: wxfailym@163.com

号:100601-201003,含量99.5%);辛伐他汀原料药(江苏联环药业股份有限公司,批号 20130512-A,含量 > 99.5%);洛伐他汀(中国食品药品检定研究院,批号:100600-201003,含量99.5%);山嵛酸甘油酯(Compritol-888 ATO,德国巴斯夫公司);注射用大豆磷脂(上海太伟药业有限公司);泊洛沙姆 188(Fluronic F-68,德国巴斯夫公司);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,6~8 周龄,体质量 220~250 g,由北京军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号:BJJK(京)-2012-008。

2 方法与结果

2.1 辛伐他汀固体脂质纳米粒处方信息

辛伐他汀固体脂质纳米粒的处方信息如表 1 所示。

表 1 辛伐他汀固体脂质纳米粒处方

名称	用量	作用
辛伐他汀	0.5 g	活性成分
山嵛酸甘油酯	8.0 g	油相
大豆磷脂	6.0 g	乳化剂
泊洛沙姆 188	1.5 g	助乳化剂
注射用水	100 ml	水相

2.2 辛伐他汀固体脂质纳米粒的制备方法

采用热熔乳化超声-低温固化法制备辛伐他汀固体脂质纳米粒^[7]。按照表 1 处方比例称取处方量的大豆磷脂和泊洛沙姆 188 置于 20 ml 纯化水中,在(75±1)℃恒温水浴条件下分散均匀,形成水相;同时,称取处方量的辛伐他汀和山嵛酸甘油酯,置于 2 ml 无水乙醇中,在(75±1)℃恒温水浴磁力搅拌下溶解,形成油相;在高速磁力搅拌下(3 000 rpm),将水相缓慢滴加到油相中,(75±1)℃恒温持续搅拌 15 min,挥干乙醇,制得初乳。将初乳在保温条件下用超声波细胞粉碎机超声(超声 2.0 s,间歇 3.0 s,功率 800 W)10 min,得到淡蓝色透明的胶体溶液。采用冰水浴迅速将辛伐他汀固体脂质纳米粒充分冷却,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil ODS-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:25 mmol·L⁻¹磷酸二氢钠溶液-乙腈(60:40);流速:1.0 ml·min⁻¹;柱温:室温;进样量:20 μl;检测波长:238 nm。

2.3.2 标准曲线 称取 10 mg 辛伐他汀对照品置于 100 ml 棕色量瓶中,加入少量乙腈振摇溶解,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液(浓度为 100 μg·ml⁻¹)。精密量取对照品贮备液用流动相稀释成浓度为 0.5,1.0,2.0,5.0,10.0,20.0 μg·ml⁻¹ 的系列标准溶液,摇匀,滤过,精密吸取 20 μl,按“2.3.1”色谱条件测定,以辛伐他汀浓度(C,μg·ml⁻¹)对峰面积(A)作线性回归,得回归方程为:A=43 217C-889.9(r=0.999 9)。结果表明:辛伐他汀在 0.5~

20.0 μg·ml⁻¹ 浓度范围内线性关系良好。

2.3.3 回收率试验 按制剂处方量主药的 80%、100% 和 120% 比例精密称取辛伐他汀对照品,每个水平称取 3 份,并按处方量加入辅料,制成低、中、高三个不同浓度的溶液,进样测定,计算辛伐他汀的回收率,结果,低、中、高 3 个浓度水平的平均回收率为 100.24%,RSD 1.09%(n=9),回收率良好。

2.4 离心超滤法测定包封率

采用离心超滤法测定辛伐他汀固体脂质纳米粒中药物的包封率^[8]。取 1.0 ml 辛伐他汀固体脂质纳米粒溶液置于超滤离心管(截留分子量:10 000 道尔顿)上端,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,收集所有滤液至 10 ml 量瓶中,加入甲醇溶解,定容;另取 1.0 ml 辛伐他汀固体脂质纳米粒溶液,至 10 ml 量瓶中,加入甲醇溶解,定容。分别取上述两种溶液续滤液进行 HPLC 测定,计算包封率。包封率计算公式如下:EE(%)=(1-W_{游离}/W_总)×100%。式中:W_{游离} 为辛伐他汀固体脂质纳米粒溶液中未被包封的辛伐他汀浓度,W_总 为辛伐他汀固体脂质纳米粒溶液中辛伐他汀的总浓度。

经测定,辛伐他汀固体脂质纳米粒溶液中药物包封率为(95.7±2.6)%。

2.5 辛伐他汀固体脂质纳米粒粒径分布及 Zeta 电位测定

取辛伐他汀固体脂质纳米粒溶液适量,用蒸馏水稀释适量倍数,采用 ZetaSizer 2000HS 激光粒度测定仪测定辛伐他汀固体脂质纳米粒溶液的粒径分布和 Zeta 电位,结果见图 1。

由图 1 可见,辛伐他汀固体脂质纳米粒溶液平均粒径为(242.5±62.1) nm,多聚分散系数(Polydispersit Index, Pdl)为 0.225±0.031,Zeta 电位为(-32.1±4.2) mV。

2.6 辛伐他汀固体脂质纳米粒微观形态

取辛伐他汀固体脂质纳米粒溶液少量,滴加于有支持膜的铜网上,用滤纸吸去部分水分,滴加含有 2% 的磷钨酸水溶液,负染 10 min,再次用滤纸吸去铜网边缘多余的水分,待液体稍干后,将铜网取出,用透射电镜观察辛伐他汀固体脂质纳米粒的表面形态与结构,结果见图 2。

由图 2 可见,辛伐他汀固体脂质纳米粒大小均匀,成圆整、规则球形,大部分粒子的粒径在 200 nm 左右,未见到过大或过小的纳米粒,也未见到药物颗粒。

2.7 辛伐他汀固体脂质纳米粒体外释放行为考察

采用透析法考察辛伐他汀固体脂质纳米粒在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Solution, PBS)中的释放行为。另外释放介质中加入 0.5% 十二烷基硫酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)可以保

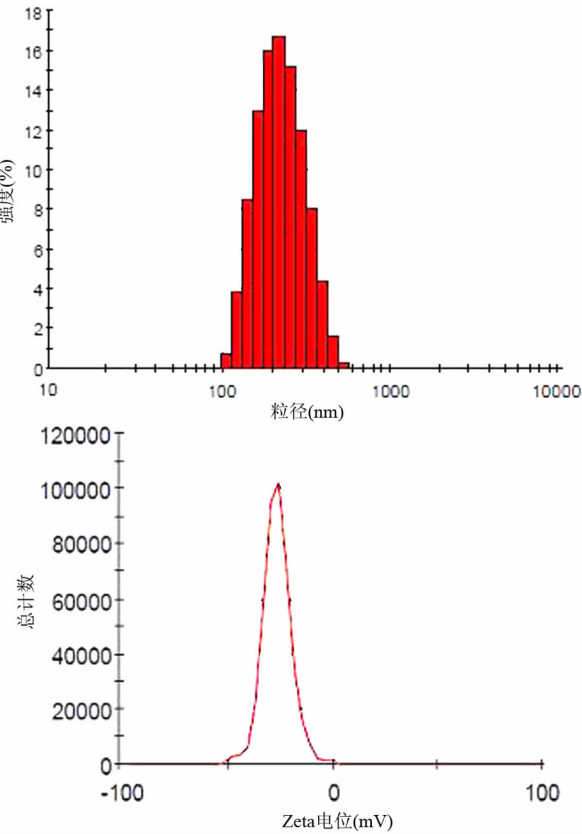


图1 辛伐他汀固体脂质纳米粒粒径分布和 Zeta 电位

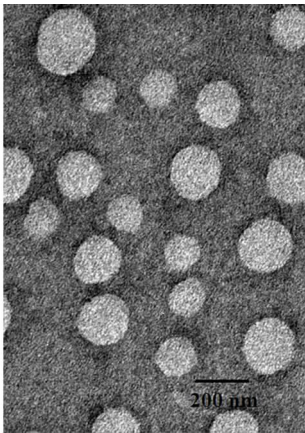


图2 辛伐他汀固体脂质纳米粒透射电镜

证药物释放在漏槽状态下进行。精密吸取2.0 ml辛伐他汀固体脂质纳米粒溶液(辛伐他汀浓度5.0 mg·ml⁻¹)3份,分别置于处理好的透析袋(截留分子量:12,000 道尔顿)内,扎紧后置于溶出仪的浆叶底部。分别移取50 ml释放介质放入250 ml溶出杯中,保持恒温(37±0.5)℃,转速为50 r·min⁻¹,分别于0.25,0.5,1,2,4,6,8,12,16,24 h吸取1 ml释放溶液(同时补加等量、同温介质)。取出的溶液用0.45 μm微孔滤膜过滤,采用“2.3.1”项下HPLC法测定辛伐他汀含量,计算辛伐他汀的累积释放度。另取2 ml辛伐他汀混悬剂(取0.1 g辛伐他汀在磁力搅拌条件下均匀分散到20 ml 0.5%聚维酮溶液

中,即得,浓度为5.0 mg·ml⁻¹)置于透析袋内,同上进行释放度试验,计算辛伐他汀的累积释放度,释放曲线见图3。

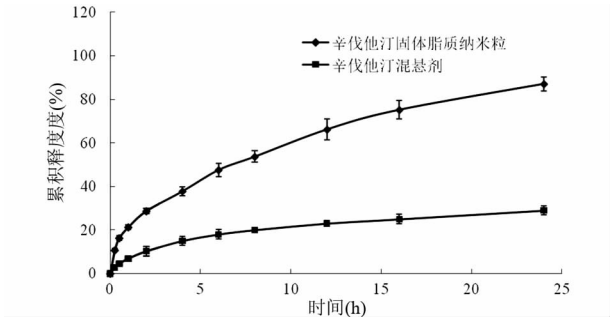


图3 辛伐他汀固体脂质纳米粒与辛伐他汀混悬剂体外释放曲线(n=6)

体外释放研究结果表明,辛伐他汀混悬剂的释放较辛伐他汀固体脂质纳米粒慢,辛伐他汀混悬剂在24 h时累积释药率仅为28.5%,而辛伐他汀固体脂质纳米粒在24 h内保持持续缓慢释放,24 h时的累积释药率可达到87.1%,说明固体脂质纳米粒可以提高辛伐他汀的体外释放速率。

2.8 药动学研究

2.8.1 血浆中药物的提取与处理 取大鼠全血约500 μl置肝素化试管中,4 000 r·min⁻¹离心10 min,取血浆200 μl置5.0 ml的具塞玻璃管中,分别加入100 μl甲醇和20 μl浓度为5 μg·ml⁻¹的洛伐他汀内标溶液,涡旋振荡2 min后,加提取溶剂乙醚3 ml,涡旋5 min,4 000 r·min⁻¹离心5 min,取上清液于45℃氮气流下吹干,残余物用100 μl甲醇溶解,涡旋1 min,4 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清20 μl进样分析。

2.8.2 标准曲线的制备 取大鼠空白血浆,分别精密加入浓度为20.0 μg·ml⁻¹辛伐他汀标准溶液1.0,2.0,5.0,10.0,20.0,50.0,100.0 μl,配制成浓度分别为0.1,0.2,0.5,1.0,2.0,5.0,10.0 μg·ml⁻¹的血浆样品。血浆样品按“2.8.1”项下处理,在“2.3.1”项色谱条件下进行测定。记录辛伐他汀峰面积(As)和内标峰面积(Ai),计算As与Ai的比值,以药物浓度(C)与该比值作线性回归,得回归方程为:As/Ai=11.125C-0.151(r=0.9984)。结果表明:辛伐他汀在0.1~10.0 μg·ml⁻¹血浆浓度范围内线性关系良好。

2.8.3 精密度和提取回收率测定 取大鼠空白血浆200 μl,配制低、中、高3个辛伐他汀标准品质量浓度血浆样品^[8],按“2.8.1”项下进行处理,考察该提取方法的精密度及回收率。结果显示:血浆样品测定方法精密度RSD≤9.2%(n=5),低、中、高3个质量浓度血浆样品中辛伐他汀的绝对回收率在84.9%~94.1%之间,符合生物样品分析方法指导

原则的有关规定,该方法可用于大鼠血浆中辛伐他汀的含量测定。

2.8.4 药动学测定 取12只SD大鼠,雌雄各半,体质量200~220 g,随机分为A、B组,每组6只。A组大鼠采用辛伐他汀混悬液灌胃给药;B组大鼠采用辛伐他汀固体脂质纳米粒灌胃给药,A、B组大鼠灌胃给药剂量均为 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。灌胃后,分别于0.25,0.5,1,1.5,2,3,4,5,6,8,10 h眼眶取血0.5 ml,以 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度离心10 min,分离血浆,血浆样品按“2.8.1”项下方法进行处理,在“2.3.1”项色谱条件下进行测定,并计算样品中辛伐他汀质量浓度。血中药物浓度测定结果采用3P97实用药代动力学计算程序处理后,根据Akaike信息量准则(Akaike Information Criterion, AIC)值最小法判断辛伐他汀混悬剂和辛伐他汀固体脂质纳米粒的隔室模型。结果表明,辛伐他汀混悬剂和辛伐他汀固体脂质纳米粒在大鼠体内均符合单室一级吸收模型,各项药动学参数均由3P97计算,结果见表2,药-时曲线见图4。

表2 辛伐他汀在大鼠体内药动学参数($n=6$)

参数	单位	辛伐他汀混悬液	辛伐他汀固体脂质纳米粒
$T_{\max}$	h	1.83 ± 0.48	1.22 ± 0.52^a
$C_{\max}$	$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	1.76 ± 0.58	5.08 ± 0.77^b
$T_{1/2}$	h	3.27 ± 0.31	3.09 ± 0.22
AUC_{0-t}	$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$	8.94 ± 0.83	16.37 ± 1.07^b
$AUC_{0-\infty}$	$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}$	9.24 ± 0.99	17.16 ± 1.37^b

注:与辛伐他汀混悬液组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

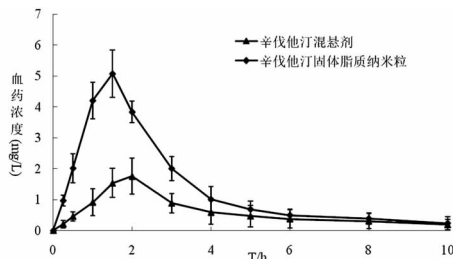


图4 辛伐他汀在大鼠体内药-时曲线($n=6$)

表2和图4结果可知,辛伐他汀固体脂质纳米粒的 $T_{\max}$ 为1.22 h,而辛伐他汀混悬剂的 $T_{\max}$ 为1.83 h;固体脂质纳米粒的 $C_{\max}$ 为 $5.08\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,混悬剂的 $C_{\max}$ 为 $1.76\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,与辛伐他汀混悬剂相比,辛伐他汀固体脂质纳米粒的 $T_{\max}$ 提前, $C_{\max}$ 明显增大。

根据表2平均血药浓度-时间曲线下面积(AUC)数据,计算辛伐他汀固体脂质纳米粒对相同剂量的辛伐他汀混悬剂的相对生物利用度(Fr), Fr 计算公式: $Fr=AUC(\text{test})/AUC(\text{reference})\times100\%$ 。

将辛伐他汀固体脂质纳米粒和辛伐他汀混悬剂的 AUC_{0-t} 带入公式计算相对生物利用度: $Fr=16.37/8.94\times100\%=183.1\%$,表明将辛伐他汀制备成固体脂质纳米粒后与混悬剂相比较,生物利用度有了较大的提高。

3 讨论

文献报道^[9]固体脂质纳米粒包封率的测定方法有超滤法、透析法、超速离心法和凝胶柱层析法等,其中超滤法在常温下进行,无相变化且设备简单,易于操作。因此,本试验综合考虑各方法的优劣及辛伐他汀固体脂质纳米粒的性质,最终选择超滤法分离辛伐他汀固体脂质纳米粒和游离药物,可以快速、准确测定辛伐他汀固体脂质纳米粒的包封率。

Zeta电位测定的结果可以用来预测纳米粒的储存稳定性。纳米粒表面的电荷主要由纳米粒的吸附、解离以及制作过程中相对电子亲和力的不同等引起。Zeta电位(绝对值)越高,粒子间的斥力就越大,体系越不容易发生聚集,胶体就可保持稳定。本文辛伐他汀固体脂质纳米粒体系的Zeta电位测定结果表明,其电位较高(-32.1 ± 4.2) mV,说明体系较稳定。

大鼠体内药动学研究结果表明,辛伐他汀固体脂质纳米粒的 $T_{\max}$ 和 $C_{\max}$ 与辛伐他汀混悬剂相比较,辛伐他汀固体脂质纳米粒的 $T_{\max}$ 提前, $C_{\max}$ 明显增大。表明固体脂质纳米粒可以加快辛伐他汀的达峰时间,显著提高辛伐他汀的达峰浓度;辛伐他汀固体脂质纳米粒的相对生物利用度是辛伐他汀混悬剂的183.1%,表明将辛伐他汀制备成固体脂质纳米粒后与混悬剂相比较,可快速有效地促进体内辛伐他汀的吸收,显著提高其生物利用度,固体脂质纳米粒可以作为提高辛伐他汀生物利用度的理想载体。

参 考 文 献

- Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins; an update[J]. *Fundam Clin pharmacol*, 2005, 19(1): 117-125
- Jose S, Anju SS, Cinu TA, et al. In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery[J]. *Int J Pharm*, 2014, 474(1-2): 6-13
- Tran TH, Ramasamy T, Cho HJ, et al. Formulation and optimization of raloxifene-loaded solid lipid nanoparticles to enhance oral bioavailability[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, 14(7): 4820-4831
- Dwivedi P, Khatik R, Khandelwal K, et al. Pharmacokinetics study of arteether loaded solid lipid nanoparticles: an improved oral bioavailability in rats[J]. *Int J Pharm*, 2014, 466(1-2): 321-327
- 晏子俊, 李万玉, 胡雪原, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒在大鼠体内的药动学[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(4): 300-303
- 王敏, 谢鹏, 杨益民, 等. 塞来昔布固体脂质纳米粒的制备及其在大鼠体内的药动学[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(1): 31-35
- Omwoyo WN, Ogutu B, Oloo F, et al. Preparation, characterization, and optimization of primaquine-loaded solid lipid nanoparticles[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 24(9): 3865-3874
- Shah M, Chuttani K, Mishra AK, et al. Oral solid compritol 888 ATO nanosuspension of simvastatin: optimization and biodistribution studies[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011, 37(5): 526-537
- 李淑斌, 刘丹, 宁红, 等. 紫杉醇固体脂质纳米粒包封率的测定[J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(21): 1665-1668

(2015-06-02 收稿 2015-08-27 修回)