

PELGE-克班宁纳米粒在家兔体内的药动学研究[△]

孔淑君^{1,2*}, 蔡俊飞³, 孙杏倩³, 刘云宽³, 马云淑^{1,4#}(1.云南中医药大学中药学院, 昆明 650500; 2.迪沙药业集团有限公司, 山东威海 264200; 3.云南省高校芳香药重点实验室, 昆明 650500; 4.云南省高校外用给药系统与制剂技术重点实验室, 昆明 650500)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)07-0778-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.07.03

摘要 目的:研究聚乙二醇-(聚乳酸-羟基乙酸)-聚乙二醇三嵌段共聚物(PELGE)-克班宁纳米粒(PELGE-Cre-NPs)在家兔体内的药动学。方法:取6只家兔,耳缘静脉注射PELGE-Cre-NPs(3.5 mg/kg),分别于给药后5、15、30、60、90、120、150、180、240、300 min时,于其耳缘静脉采血1 mL。分离血浆,用乙酸乙酯萃取Cre,并采用高效液相色谱法,以盐酸维拉帕米为内标,测定Cre的血药浓度,然后采用DAS 2.0软件绘制血药浓度-时间曲线并计算药动学参数。色谱条件采用色谱柱为Agilent ZORBAX Extend-C₁₈,流动相为甲醇-0.01%三乙胺溶液(75:25, V/V),流速为1 mL/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μL。结果:Cre检测血药浓度的线性范围为45.0~3 600 μg/L($R^2=0.999 9$),日内、日间精密密度试验和稳定性试验的RSD均小于5%($n=6$ 或 $n=12$),准确度为(97.44±2.41)%~(98.45±3.87)%($n=6$)。PELGE-Cre-NPs在家兔体内分布符合二室模型;主要药动学参数 $t_{1/2}$ 为(109.357±33.917)min,CL为(0.016±0.001) L/(min·kg),MRT为(76.733±7.502) min, c_{max} 为(3 699.458±287.713) μg/L。结论:PELGE-Cre-NPs在家兔体内的半衰期较Cre注射剂长,滞留时间延长,有缓释效果。

关键词 聚乙二醇-(聚乳酸-羟基乙酸)-聚乙二醇三嵌段共聚物-克班宁纳米粒;药动学;家兔;血药浓度

Pharmacokinetics Study of PELGE-crebanine Nanoparticles in Rabbits

KONG Shujun^{1, 2}, CAI Junfei³, SUN Xingqian³, LIU Yunkuan³, MA Yunshu^{1, 4} (1.College of TCM, Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China; 2.Disha Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shandong Weihai 264200, China; 3.Yunnan Key Laboratory of Aromatic Drugs in Universities, Kunming 650500, China; 4. Yunnan Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology in Universities, Kunming 650500, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pharmacokinetics of PELGE-crebanine nanoparticles (PELGE-Cre-NPs) in rabbits. METHODS: Totally 6 rabbits were collected, and injected with PELGE-Cre-NPs (3.5 mg/kg) via ear vein. 1 mL of blood samples were collected at 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 min after administration from the ear vein. After the plasma were isolated and Cre were extracted with ethyl acetate, HPLC method was adopted to determine the plasma concentration of Cre by using verapamil hydrochloride as internal standard. The plasma concentration-time curve was drawn and pharmacokinetic parameters were calculated by using DAS 2.0 software. Chromatographic conditions such as the chromatographic column was Agilent ZORBAX Extend-C₁₈; the mobile phase consisted of methanol-0.01% triethylamine solution (75:25, V/V); the flow rate was 1 mL/min; the detection wavelength was 280 nm; the column temperature was 30 ℃; the injection volume was 20 μL. RESULTS: The linear range of Cre were 45.0-3 600 μg/L($R^2=0.999 9$). RSDs of inter-day and intra-day precision and stability tests were all lower than 5% ($n=6$ or $n=12$); the accuracies were (97.44±2.41)%-(98.45±3.87)% ($n=6$). PELGE-Cre-NPs was in a two-compartment model in rabbits. Main pharmacokinetic parameters included that $t_{1/2}$ was (109.357±33.917) min; CL was (0.016±0.001) L/(min·kg); MRT was (76.733±7.502) min; c_{max} was (3 699.458±287.713) μg/L. CONCLUSIONS: The half-life period of PELGE-Cre-NPs in rabbits is longer than that of Cre injection; its retention time in the body is prolonged, and sustained-release effect is obvious.

KEYWORDS PELGE-crebanine nanoparticles; Pharmacokinetics; Rabbit; Plasma concentration

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81673682, No.81260651);云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项重点项目(No.2018FF001008)

* 硕士。研究方向:中药药剂学。E-mail:1150198416@qq.com
通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:药剂学。E-mail:yunshuma2@126.com

克班宁(Crebanine, Cre)是从防己科千金藤属云南地不容(*Stephania yunnanensis* H.S.Lo)及其同属植物的块茎中提取的一种异喹啉阿朴菲型生物碱^[1-2]。实验研究证明,Cre对多种实验性心律失常具有较强的抑制作

用,且作用迅速^[3-5],其小鼠静脉注射的药效剂量为2.5~5 mg/kg,半数致死量(LD₅₀)为9.382 mg/kg^[6],由此可见其抗心律失常的治疗范围较窄,剂量不当常会导致中毒,甚至死亡。同时,Cre的药动学数据显示,其半衰期较短^[7-8]。因此,Cre作为活性显著的心律失常先导化合物,其毒性较大、半衰期较短的问题亟待解决。本课题组前期将Cre分别制备成了脂质体、纳米粒与经皮贴剂以期达到减毒、保效的作用^[9-13],结果显示,以聚乙二醇-(聚乳酸-羟基乙酸)-聚乙二醇三嵌段共聚物(PELGE)载体材料制备的Cre纳米粒(PELGE-Cre-NPs)的载药量较高、稳定性较好。在前期研究的基础上,本研究主要考察PELGE-Cre-NPs在家兔体内的药动学特征,旨在延长Cre的半衰期,达到保效的目的。

1 材料

1.1 仪器

1260 Infinity 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);T-1000 型电子天平[美国双杰兄弟(集团)有限公司];HSC-12A 型氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司);XHF-1 型内切式匀浆机(宁波新芝生物科技有限公司);TGL-16G 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);XK96-A 型快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司)。

1.2 药品与试剂

PELGE-Cre-NPs(云南中医学院药剂实验室自制,批号:2016011003,Cre含量:1.5 mg/mL,包封率:90.32%);Cre对照品[云南中医学院药剂实验室自制,提取自云南地不容(*S. yunnanensis* H.S.Lo),批号:20141101,纯度:99.2%];盐酸维拉帕米对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100223-200102,供含量测定使用);氯化钠注射液(昆明南疆制药有限公司,批号:20150917);甲醇为色谱纯,乙酸乙酯等其余试剂为分析纯,水为纯化水。

1.3 动物

SPF级家兔6只,雌雄各半,体质量为2~2.5 kg,购自成都达硕生物科技有限公司,生产许可证号:SCXK(川)2013-24。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液 取Cre对照品,精密称定,用甲醇溶解定量稀释制成150 μg/mL的对照品溶液。分别精密量取该溶液适量,用甲醇稀释制成合适的系列标准溶液。

2.1.2 内标溶液 取盐酸维拉帕米对照品,精密称定,用水溶解稀释制成质量浓度为4 000 μg/L的内标溶液。

2.2 家兔血浆的处理

参考文献方法^[14-15],精密量取家兔血浆样品0.5 mL,置于离心管内,加入盐酸维拉帕米内标溶液(4 000 μg/L)

10 μL,加入乙酸乙酯3 mL,涡旋萃取3 min,以4 000 r/min离心10 min;吸取上层有机相2.4 mL,置于5 mL离心管内,并于50 ℃水浴中以氮气流吹干,残渣加入200 μL甲醇复溶,涡旋1.5 min,经0.22 μm微孔滤头过滤,取续滤液,备测。

2.3 Cre的血药浓度测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX Extend-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.01%三乙胺溶液(75:25, V/V);流速:1 mL/min;检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.3.2 专属性 取空白血浆、给药1 h后的含药血浆+内标、空白血浆+Cre对照品+内标,各0.5 mL,分别置于离心管内,按“2.2”项下方法,从“加入乙酸乙酯3 mL”开始处理样品。精密量取续滤液20 μL,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。

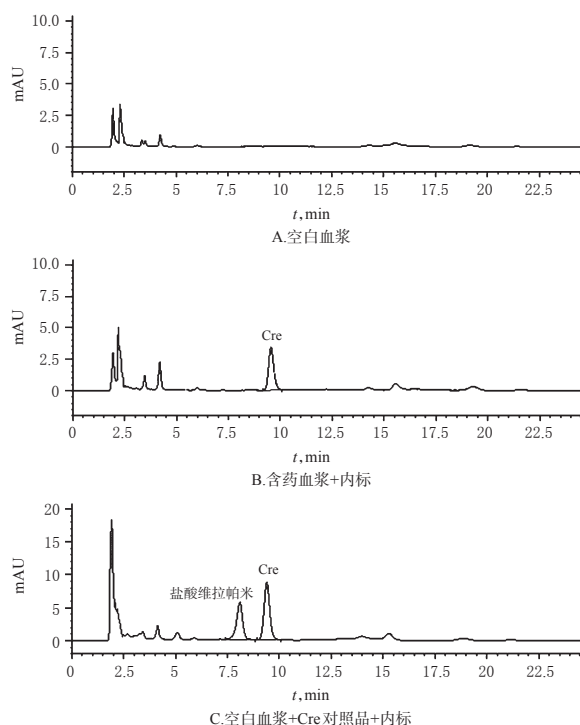


图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

由图1显示,空白血浆对检测无干扰;内标盐酸维拉帕米、Cre的出峰时间依次为8.095、9.399 min,分离度大于1.5,拖尾因子均在0.95~1.05之间,峰形对称性良好,理论板数以Cre或盐酸维拉帕米计均不低于2 000。这表明该色谱条件专属性良好。

2.3.3 线性关系与定量限考察 精密量取空白血浆0.5 mL,置于10 mL离心管内,分别加入“2.1.1”项下的系列标准溶液各20 μL,配制成Cre质量浓度分别为45.0、90.0、180.0、450.0、900.0、1 800.0、3 600.0 μg/L的系列血浆样品。按“2.2”项下方法处理上述血浆样品后,精密量

取续滤液 20 μL ,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以 Cre 质量浓度为横坐标(x)、Cre 与内标峰面积的比值为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程为 $y=0.0010x-0.0229$ ($R^2=0.9999$)。结果表明,Cre 检测质量浓度的线性范围为 45.0~3 600 $\mu\text{g/L}$,定量限为 45.0 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3.4 精密度与准确度试验 分别按“2.3.3”项下的方法配制高、中、低质量浓度(75.0、1 800.0、2 700.0 $\mu\text{g/L}$)的血浆样品,各平行 6 份,按“2.2”项下的方法处理后,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,考察日内精密度;连续测定 2 d,考察日间精密度;以测得血药浓度与理论血药浓度比较考察准确度。结果表明,该方法精密度和准确度均良好,详见表 1。

表 1 精密度与准确度试验结果

Tab 1 Results of precision and accuracy tests

质量浓度, $\mu\text{g/L}$	日内($n=6$)			日间($n=12$)		
	测得浓度($\bar{x}\pm s$), $\mu\text{g/L}$	RSD, %	准确度($\bar{x}\pm s$), %	测得浓度($\bar{x}\pm s$), $\mu\text{g/L}$	RSD, %	准确度($\bar{x}\pm s$), %
75.0	73.84 \pm 2.90	3.93	98.45 \pm 3.87	72.39 \pm 2.82	3.84	97.77 \pm 3.76
1 800.0	1 753.92 \pm 43.29	2.47	97.44 \pm 2.41	1 759.55 \pm 40.09	2.29	97.40 \pm 2.23
2 700.0	2 653.51 \pm 94.73	3.57	98.28 \pm 3.51	2 623.01 \pm 78.30	2.97	97.76 \pm 2.90

2.3.5 萃取回收率试验 分别按“2.3.3”项下的方法配制高、中、低质量浓度(75.0、1 800.0、2 700.0 $\mu\text{g/L}$)的血浆样品,各平行 6 份,再按“2.2”项下方法,从“加入乙酸乙酯 3 mL”开始进行样品处理。精密量取续滤液 20 μL ,按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积(A_1)。另将上述相应质量浓度的 Cre 对照品溶液各稀释 10 倍,进样 20 μL ,记录峰面积(A_0)。以 $A_1/A_0\times 100\%$ 计算萃取回收率。结果表明,该方法萃取效果良好,详见表 2。

表 2 萃取回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of extraction recovery tests($n=6$)

质量浓度, $\mu\text{g/L}$	萃取回收率($\bar{x}\pm s$),%	平均萃取回收率, %	RSD, %
75.0	79.06 \pm 1.62		
1 800.0	85.77 \pm 0.94	81.98	4.19
2 700.0	81.12 \pm 3.15		

2.3.6 稳定性试验 分别按“2.3.3”项下的方法配制高、中、低质量浓度(75.0、1 800.0、2 700.0 $\mu\text{g/L}$)的血浆样品,各平行 6 份,共平行制备 3 组。分别于室温放置 24 h、-4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 48 h、-20 $^{\circ}\text{C}$ -室温冻融 1 次,再按“2.2”项下方法处理后,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果表明,在上述条件下血浆样品稳定性均良好,详见表 3。

2.4 家兔药动学试验

取家兔 6 只,雌雄各半,禁食、不禁水 24 h 后,于耳缘静脉单次注射 PELGE-Cre-NPs,给药剂量为 3.5 mg/kg ^[14]。

表 3 稳定性试验结果($n=6$)

Tab 3 Results of stability tests($n=6$)

考察条件	质量浓度, $\mu\text{g/L}$	RSD, %
室温放置 24 h	75.0	4.23
	1 800.0	1.97
	2 700.0	4.43
-4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 48 h	75.0	2.10
	1 800.0	3.28
	2 700.0	4.88
-20 $^{\circ}\text{C}$ -室温冻融 1 次	75.0	3.23
	1 800.0	2.03
	2 700.0	1.87

分别于给药后 5、15、30、60、90、120、150、180、240、300 min 时,在兔耳缘静脉取血 1 mL 于抗凝管中,以 10 000 r/min 离心 10 min,分离上层血浆。按“2.2”项下的方法处理后,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。采用内标法,使用标准曲线计算 Cre 的血药浓度,使用 DAS 2.0 软件绘制平均血药浓度-时间曲线,同时计算主要药动学参数。PELGE-Cre-NPs 在家兔体内的平均血药浓度-时间曲线详见图 2,主要药动学参数结果详见表 4。

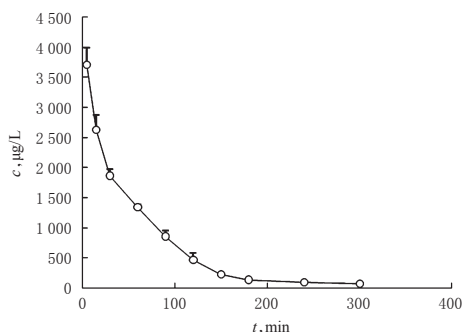


图 2 PELGE-Cre-NPs 在家兔体内的平均血药浓度-时间曲线

Fig 2 Mean plasma concentration-time curve of PELGE-Cre-NPs in rabbits

表 4 PELGE-Cre-NPs 在家兔体内的主要药动学参数($n=6$)

Tab 4 Main pharmacokinetic parameters of PELGE-Cre-NPs in rabbits($n=6$)

参数	$\bar{x}\pm s$
$AUC_{0-300\text{min}}$, $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$	211 952.689 \pm 5 503.231
$AUC_{0-\infty}$, $\mu\text{g}\cdot\text{min/L}$	221 862.246 \pm 8 923.235
$AUMC_{0-300\text{min}}$, $\mu\text{g}\cdot\text{min}^2/\text{L}$	12 188 022.000 \pm 989 501.609
$AUMC_{0-\infty}$, $\mu\text{g}\cdot\text{min}^2/\text{L}$	17 077 406.590 \pm 2 270 686.226
MRT, min	57.448 \pm 3.460
$t_{1/2}$, min	109.357 \pm 33.917
CL, L/(min \cdot kg)	0.016 \pm 0.001
c_{max} , $\mu\text{g/mL}$	3 699.458 \pm 287.713

由图 2 与表 4 可知,家兔单次静脉注射 PELGE-Cre-NPs 后的平均血药浓度-时间曲线符合二室模型。

3 讨论

3.1 血浆样品萃取溶剂的筛选

在家兔血浆样品处理方法的筛选过程中,参考文献研究^[8,14]方法,分别尝试以乙酸乙酯、三氯甲烷、甲醇作为萃取溶剂进行样品提取。结果显示,甲醇处理家兔血清样品,虽具有较好的蛋白沉淀效果,但对检测有干扰;用三氯甲烷作萃取溶剂,其沉淀蛋白效果较差,容易污染堵塞检测系统;以乙酸乙酯萃取,能够较好地沉淀蛋白,萃取回收率高而稳定,萃取的空白血浆对检测无干扰,主峰及内标峰的峰形良好,可满足血浆样品的检测需求,故最终选择乙酸乙酯作为萃取溶剂。

3.2 药动学研究结果分析

PELGE-Cre-NPs 在家兔体内的药动学参数测定结果显示, $t_{1/2}$ 为 (109.357 ± 33.917) min, CL 为 (0.016 ± 0.001) L/(min·kg), MRT 为 (57.448 ± 3.460) min; 其中, $t_{1/2}$ 比 MRT 大,说明纳米粒的末端消除较缓慢。本课题组前期对 Cre 注射剂在家兔体内的药动学进行了研究^[7,14],结果显示,Cre 注射剂在家兔体内符合二室开放模型特征,各项药动学参数表明,Cre 注射剂静脉注射给药后的代谢、消除较快,在家兔体内为超速处置类($t_{1/2} < 1$ h)药物; $t_{1/2\alpha}$ 、 $t_{1/2\beta}$ 、CL 的数据显示,其在家兔体内的分布迅速、广泛,维持有效血药浓度的时间较短;雌、雄家兔各药动学参数的差异没有统计学意义,其中 $t_{1/2\beta}$ 为 (36.67 ± 5.52) min, CL 为 (0.051 ± 0.003) L/(min·kg), MRT 为 (37.34 ± 4.52) min。结合本研究结果可知,将 Cre 制备成 PELGE 纳米粒后,与 Cre 注射剂相比,在家兔体内的 $t_{1/2}$ 延长了约 3 倍, MRT 延长了约 1.5 倍, CL 下降了 70%。

综上所述,将 Cre 制备成 PELGE-Cre-NPs 后,相较于普通的注射剂而言, $t_{1/2}$ 、MRT 显著延长,末端消除明显变缓,在体内初步实现了长循环,达到了一定的缓释、保效作用。但本研究所建的 HPLC 法存在分离时间较长的问题,有待进一步开发更加高效、节约成本的分析方法。

参考文献

- [1] 彭扶云. 云南地不容的化学成分研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2014.
- [2] 汪波. 云南地不容化学成分及阿朴菲型生物碱抗心律失常构效关系初步研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2013.
- [3] 林青, 杨莲, 段小花, 等. 克班宁的镇痛作用部位及作用机制探讨[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(2): 341-344.
- [4] 淤泽溥, 马云淑, 赵子仙, 等. 克班宁的抗心律失常作用[J]. 中国中药杂志, 1992, 17(11): 685-687, 704.
- [5] 汪红梅, 马云淑, 黄秋艳, 等. 克班宁灌胃给药抗心律失常作用的研究[J]. 西北药学杂志, 2017, 32(1): 51-54.
- [6] 马云淑, 武鸿萍, 张壮丽. 克班宁急性毒性与抗心律失常活性的初步研究[J]. 中国现代应用药学, 2005, 22(5): 18-19.
- [7] 商庆节. 克班宁注射剂的非临床药物动力学研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2006.
- [8] 马云淑, 商庆节, 白一岑, 等. 克班宁在大鼠体内的药动学[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(10): 819-821.
- [9] 李婧瑜, 马云淑, 杨子贤, 等. 克班宁透皮贴剂的制备及其体外经皮渗透实验研究[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(21): 2584-2589.
- [10] 刘娜, 陈凌云, 马云淑, 等. 克班宁长循环脂质体的制备工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(12): 1076-1079.
- [11] 刘娜, 王琪蕾, 陈凌云, 等. 克班宁长循环脂质体的包封率、体外释放和稳定性研究[J]. 中国医药导报, 2017, 14(31): 4-8.
- [12] 陈玲玲, 马云淑, 晏菲, 等. 克班宁脂质体抗心律失常作用的研究[J]. 中国现代应用药学, 2016, 33(11): 1359-1361.
- [13] 程欣, 孔淑君, 王辉, 等. PLGA-克班宁纳米粒的制备、表征及体外释药规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(9): 9-14.
- [14] 马云淑, 商庆节, 白一岑, 等. 克班宁注射剂在家兔体内的药动学研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(7): 630-632.
- [15] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 386-389.

(收稿日期: 2019-12-03 修回日期: 2020-02-24)

(编辑: 邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅