延胡索乙素磷脂复合物及其固体分散体、油制剂、纳米混悬剂的制备及药动学研究

李君霞[1]，曹亚蕊[1]，王金涛[2*]，方晓东[3]

1. 河南省胸科医院，河南 郑州 450000
2. 郑州大学材料学院，河南 郑州 450000
3. 河南大学药学院，河南 郑州 475001

摘 要：目的 制备延胡索乙素磷脂复合物（tetrahydropalmatine phospholipids complex，THP-PC）、延胡索乙素磷脂复合物固体分散体（THP-PC solid dispersion，THP-PC-SD）、延胡索乙素磷脂复合物油制剂（THP-PC oil preparation，THP-PC-OP）和延胡索乙素磷脂复合物纳米混悬剂（THP-PC nanosuspensions，THP-PC-NPs），并分别比较其在 SD 大鼠体内的药动学行为。**方法** 溶剂挥发法分别制备 THP-PC 和 THP-PC-SD，采用 X 射线粉末衍射（X-ray powder diffraction，XRPD）技术分析 THP 的存在状态。高压均质法制备 THP-PC-NPs，测定粒径及 ζ 电位。以 THP 混悬液为参考，分别比较 THP-PC、THP-PC-SD 和 THP-PC-NPs 体外溶出情况。SD 大鼠分别 ig 给予 THP、THP-PC、THP-PC-SD、THP-PC-OP 和 THP-PC-NPs，HPLC 法测定 THP 血药浓度，计算主要药动学参数。**结果** THP 在 THP-PC、THP-PC-SD 中均以无定型状态存在。THP-PC-NPs 平均粒径为（184.57±10.41）nm，ζ 电位为（−31.26±1.93）mV。THP-PC、THP-PC-SD 和 THP-PC-NPs 均在不同程度上提高了 THP 的溶出度。与 THP-PC 相比，THP-PC 相对生物利用度提高至 1.70 倍，而 THP-PC-SD、THP-PC-NPs 和 THP-PC-OP 的相对生物利用度分别进一步提高至 4.11、4.86、4.22 倍。**结论** THP-PC-SD、THP-PC-NPs 和 THP-PC-OP 均可进一步提高 THP-PC 的生物利用度。

关键词：延胡索乙素；磷脂复合物；固体分散体；油制剂；纳米混悬剂；溶出度；生物利用度；药动学；溶剂挥发法；X 射线粉末衍射；高压均质法

中图分类号：R283.6 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2022)14 - 4307 - 10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.010

Preparation and pharmacokinetics of tetrahydropalmatine phospholipid complex, and its solid dispersion, oil preparation and nanosuspension

LI Jun-xia[1], CAO Ya-rui[1], WANG Jin-tao[2], FANG Xiao-dong[3]

1. Henan Provincial Chest Hospital, Zhengzhou 450000, China
2. School of Materials, Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China
3. School of Pharmacy, Henan University, Zhengzhou 475001, China

Abstract: Objective To prepare tetrahydropalmatine phospholipids complex (THP-PC), THP-PC solid dispersion (THP-PC-SD), THP-PC oil preparation (THP-PC-OP), and tetrahydropalmatine phospholipids complex nanosuspensions (THP-PC-NPs), and then compare their pharmacokinetics behavior in SD rats. **Methods** THP-PC and THP-PC-SD were prepared by solvent volatilization. X-ray power diffraction (XRPD) was employed to study the presence of THP. THP-PC-NPs were prepared by high pressure homogenization method, particle size and ζ potential were also determined. Dissolution *in vitro* of THP-PC, THP-PC-SD and THP-PC-NPs were compared to THP suspension. SD rats in each group were administered intragastrically with THP, THP-PC, THP-PC-SD, THP-PC-OP and THP-PC-NPs, respectively. Plasma concentration of THP was determined by HPLC, and the main pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** The results of XRPD indicated that THP was changed into an amorphous state in THP-PC and THP-PC-SD. Particle size and ζ potential of THP-PC-NPs were (184.57 ± 10.41) nm and (−31.26 ± 1.93) mV,

收稿日期：2022-01-25

基金项目：2018 年度河南省科技攻关计划项目（2018020561）

作者简介：李君霞（1975—），本科，副主任药师，研究方向为医院临床药学。Tel: (0371)65662768 E-mail: lijunxia_henan@126.com

***通信作者：**王金涛（1969—），博士，副研究员，研究方向为中药新型给药系统。Tel: (0371)67766820 E-mail: jtwangphd@163.com

respectively. The dissolution of THP was improved by THP-PC, THP-PC-SD and THP-PC-NPs in different degrees. Compared with raw medicine, relative bioavailability of THP-PC was increased to 1.70 times. The relative bioavailability of THP-PC-SD, THP-PC-OP and THP-PC-NPs were enhanced to 4.11, 4.86 and 4.22 times, respectively. **Conlusion** THP-PC-SD, THP-PC-OP and THP-PC-NPs could enhance the oral bioavailability of THP-PC in further.

Key words: tetrahydropalmatine; phospholipids complex; solid dispersion; oil preparation; nanosuspensions; dissolution rate; bioavailability; pharmacokinetics; solvent volatilization; X-ray power diffraction; high pressure homogenization

延胡索乙素（tetrahydropalmatine，THP）是一种生物碱，又称四氢巴马汀，主要从罂粟科紫堇属植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎中提取得到[1-2]，在我国有近千年的入药历史。研究显示，THP 具有镇静、镇痛、抗心肌缺血、抗肿瘤、抗血栓、抑制胃酸分泌、抗心律失常、心肌缺血/坏死保护等药理活性[2-4]，研究开发价值较高。但 THP 水溶性较差[5-6]，溶出度低，体内易被代谢[7]，口服吸收生物利用度仅为 6.59%[8]，势必影响 THP 药效发挥及其临床应用。THP 新制剂研究有自微乳[6]、纳米结构脂质载体[9]、脂质体[10]等制剂新技术的报道。

磷脂复合物（phospholipids complex，PC）是难溶性药物与磷脂在非质子溶剂中通过某种作用力（如氢键、范德华力等）结合在一起而形成的一种复合物。该复合物继承了磷脂的亲水亲油特点，使药物的水溶性和脂溶性均可达到提高[11-15]，为促进吸收奠定基础。但磷脂复合物是一种黏性物质，体外溶出较慢，影响生物利用度提升幅度[16-18]。固体分散体（solid dispersion，SD）和油制剂（oil preparation，OP）在常规制剂中制备工艺相对简单可靠，故本研究将延胡索乙素磷脂复合物（THP-PC）进一步制备成延胡索乙素磷脂复合物固体分散体（THP-PC-SD）[19-20]和延胡索乙素磷脂复合物油制剂（THP-PC-OP）。纳米混悬剂（nanosuspensions，NPs）在纳米制剂中载药量较高，工艺相对简单，所以本研究进一步将 THP-PC 制备成延胡索乙素磷脂复合物纳米混悬剂（THP-PC-NPs）[21-22]，并比较其体外溶出情况及体内口服药动学行为，为 THP 新制剂研发提供新策略。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1100 型高效液相仪器，配置 DAD 检测器，温控进样盘，美国安捷伦公司；BP-210D 型电子分析天平，赛多利斯科学仪器北京有限公司；D8 型 X 射线粉末衍射仪，瑞士布鲁克公司；R2000 型旋转蒸发仪，艾卡仪器设备公司；DZF-6020 型台式真空干燥箱，郑州生化仪器有限公司；MS-1 型磁力搅拌器，上海尚普仪器公司；GJB300 型均质机，常州均质机械设备公司；Nano ZS90 型纳米粒度仪，英国 Malvern 公司；RC-6D 型溶出仪，天津创兴电子设备制造公司；HX-10-50D 型冻干机，上海沪析冷冻干燥机设备公司；SZ-24 氮气吹扫仪，上海舜制仪器公司。

1.2 材料

THP 原料药，批号 20180915，质量分数 97.6%，西安瑞盈生物科技有限公司；THP 对照品，批号 110726-201812，质量分数 99.8%，中国食品药品检定研究院；聚乙烯吡咯烷酮 K30（PVP K30），批号 201748T234，德国 BASF 公司；白屈菜红碱对照品，批号 MUST-18252556，质量分数 98.7%，成都曼斯特生物科技有限公司；大豆磷脂，型号 PC98T，批号 20191125，上海辅必成生物科技公司；四氢呋喃，色谱纯，批号 59162526，Merck 公司。

SD 大鼠，清洁级，购自河南省动物实验中心，许可证编号：SCXK-2016-0001，实验室饲养至体质量为（220±20）g，进行药动学实验前禁食 12 h，自由饮水。所有动物实验遵循河南省胸科医院有关实验动物管理和使用的规定，均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定 THP 含量

2.1.1 对照品溶液的制备 称取 THP 对照品 20 mg 置于 50 mL 量瓶中，加入甲醇超声溶解并定容，即得 THP 对照品储备液（400 μg/mL）。

2.1.2 供试品溶液的制备 取 THP、THP-PC、THP-PC-SD、THP-PC-OP 及 THP-PC-NPs 粉末适量（THP 含有量均约为 5 mg），置于 100 mL 量瓶中，加入 50 mL 甲醇超声溶解，放置至室温后甲醇定容，过 0.45 μm 微孔滤膜，精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中，流动相定容即得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Waters-C_{18} 柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；柱温为 30 ℃；流动相为甲醇-0.3%醋酸水溶液（45∶55）；检测波长为 281 nm；体积流量为 1.0 mL/min；进样量 10 μL。取磷脂、

PVP K30 等辅料制备空白辅料样品，另取 THP-PC、THP-PC-SD、THP-PC-OP 及 THP-PC-NPs 进样，色谱图见图 1，制剂中辅料不干扰 THP 含量测定，理论塔板数不低于 6500。

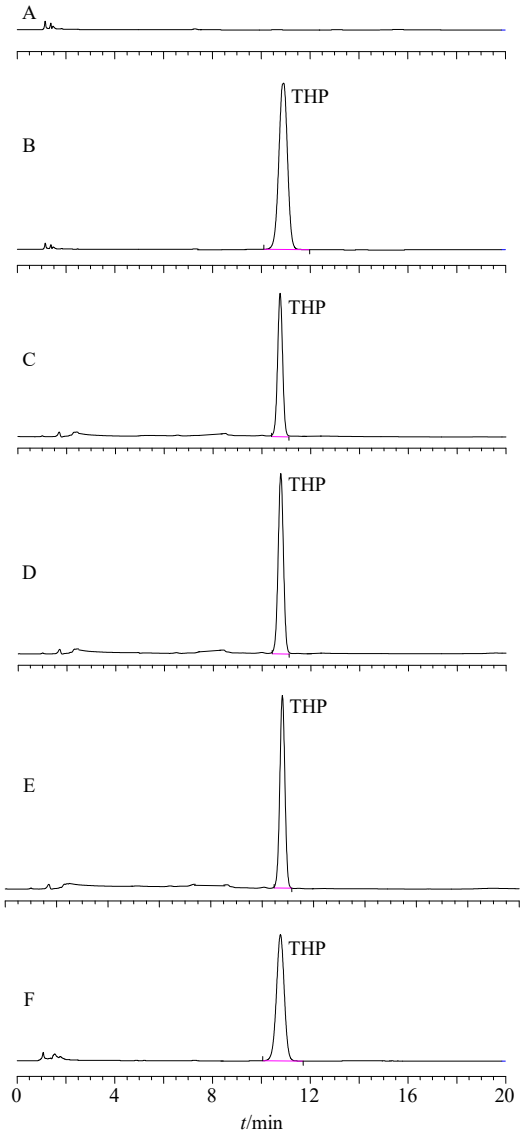

图 1 空白辅料 (A)、THP 对照品 (B) 和 THP-PC (C)、THP-PC-SD (D)、THP-PC-OP (E) 和 THP-PC-NPs 样品溶液 (F) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of blank excipients (A), THP reference substance (B), THP-PC (C), THP-PC-SD (D), THP-PC-OP (E) and THP-PC-NPs (F) sample solution

2.1.4 线性关系考察 取 THP 对照品适量，采用流动相配制成 20、10、1、0.5、0.1、0.05 μg/mL 的 THP 对照品溶液，分别进样。以 THP 质量浓度（X）与峰面积（Y）作线性回归得方程 Y=24.155 2 X−0.746 9，r=0.999 7，结果表明 THP 在 0.05～20 μg/mL 线性关系良好。

2.1.5 精密度考察 取各样品的供试品溶液，分别连续进样 6 次，计算 THP 峰面积的 RSD。结果显示，THP-PC、THP-PC-SD、THP-PC-OP、THP-PC-NPs 中的 THP 峰面积的 RSD 分别为 0.46%、0.92%、0.73%、0.58%，所以精密度良好。

2.1.6 稳定性考察 取各样品的供试品溶液，分别于 0、3、6、9、12、18、24 h 进样，HPLC 测定。结果显示，THP-PC、THP-PC-SD、THP-PC-OP、THP-PC-NPs 中的 THP 峰面积的 RSD 分别为 1.43%、0.90%、1.13%、1.29%，结果表明各供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性考察 取各个样品，分别平行制备 6 份供试品溶液，HPLC 测定。结果显示，THP-PC、THP-PC-SD、THP-PC-OP、THP-PC-NPs 中的 THP 峰面积的 RSD 分别为 1.15%、1.39%、1.64%、1.87%，结果表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率考察 取各个样品适量（THP 含有量均约为 2.5 mg），分别置于 9 个 100 mL 量瓶中，分为低、中、高 3 组，加入样品中 THP 含量 50%、100%、150%的 THP 对照品溶液，加入 50 mL 甲醇超声溶解，过 0.45 μm 微孔滤膜，精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中，流动相定容。THP-PC、THP-PC-SD、THP-PC-OP 及 THP-PC-NPs 同法操作，分别进样测定 THP 含量并计算加样回收率。结果显示，THP- PC、THP-PC-SD、THP-PC-OP、THP-PC-NPs 的平均回收率在分别为 99.04%、99.97%、100.89%、101.53%，RSD 分别为 1.74%、0.85%、1.18%、1.60%，结果表明本实验回收率较高。

2.2 复合率的测定

取 70 mg 的 THP 和适量磷脂置于三角烧瓶中，加入四氢呋喃 40 mL 的混悬液，于一定温度的水浴中磁力搅拌一定时间至澄清。45 ℃减压旋蒸 10 min 除去有机溶剂，即得 THP-PC，该复合物为褐黄色黏稠状物质。THP 不溶于石油醚，但 THP-PC 在石油醚中易溶。称取 THP（X_0）制备 THP-PC，加入石油醚超声 20 s 溶解，过 0.22 μm 的微孔滤膜除去游离的 THP，减压旋蒸除去石油醚，加入甲醇超声 20 s 溶解，进样测定参加复合的 THP 的量（X_1）。计算 THP 与磷脂的复合率。

$$复合率=X_1/X_0$$

2.3 Box-Behnken 响应面法优化 THP-PC 处方工艺

2.3.1 试验设计及结果 采用 THP 与磷脂的复合率（Y）作为 THP-PC 的优化指标。前期单因素考

察结果显示，当固定 THP 用量为 70 mg 时，磷脂用量（X_1）、制备温度（X_2）和制备时间（X_3）对 THP-PC 的复合率影响较大，采用 Box-Behnken 响应面法对磷脂用量范围为 100～200 mg，制备温度为 25～65 ℃，制备时间为 3～6 h 进行优化，各因素水平见表 1。根据不同试验组合制备不同处方工艺下的 THP-PC，并分别测定复合率，结果见表 1。

2.3.2 二次多元回归模型的建立及显著性分析 对 Box-Behnken 响应面法的因变量（X_1、X_2、X_3）和自变量（Y）的数据拟合，得包封率 Y 二次多元回归方程为 Y=98.18+8.08 X_1+11.04 X_2−1.19 X_3+2.13 X_1X_2−1.48 X_1X_3−0.35 X_2X_3−9.37 X_1^2−16.39 X_2^2−0.09 X_3^2，模型 P 值<0.000 1，决定系数 R^2=0.999 4，校正系数 R_{adj}^2=0.998 7，失拟度 F=0.205 8>0.05，说明测得的复合率与拟合值吻合度高，未知因素对模型干扰很小，因此建立的数学模型可信度较高，可用于 THP-PC 处方工艺研究。方程中 X_1、X_2 系数绝对值相对较大，影响程度明显高于 X_3。方差分析结果见表 2，X_1、X_2、X_3、X_1X_2、X_1X_3、X_1^2 和 X_2^2 等均具极显著差异（P<0.01）。

2.3.3 效应面结果、预测及验证 三维曲面图见图 2，当制备时间不变时，随着制备温度的延长或磷脂用量的增大，复合率均先增大后下降；固定制备温度不变时，随着磷脂用量的增加复合率先增加后略下降，其影响程度远大于制备时间对复合率的影响；固定磷脂用量不变时，随着制备温度的增加复合率先增加后下降，其影响程度同样远大于制备时间对复合率的影响。设置复合率最小值为 55.9%，最大值为 100%，得最佳处方工艺为磷脂用量 X_1=160.09 mg，制备温度 X_2=48.47 ℃，搅拌时间 X_3=3.57 h，

表 1 Box-Behnken 试验设计因素水平及结果 (n = 3)

Table 1 Factor levels and results for Box-Behnken experimental design (n = 3)

试验号	X_1/mg	X_2/℃	X_3/h	Y/%	试验号	X_1/mg	X_2/℃	X_3/h	Y/%	试验号	X_1/mg	X_2/℃	X_3/h	Y/%
1	150 (0)	45 (0)	4.5 (0)	98.7	7	150	45	4.5	98.2	13	200	65	4.5	93.2
2	150	25 (−1)	3 (−1)	71.3	8	150	65	3	94.3	14	200	25	4.5	67.1
3	150	25	6 (+1)	69.8	9	100	45	3	80.1	15	150	65	6	91.4
4	100 (−1)	65 (+1)	4.5	73.5	10	150	45	4.5	97.9	16	150	45	4.5	97.7
5	200 (+1)	45	6	94.4	11	100	45	6	80.5	17	150	45	4.5	98.4
6	200	45	3	99.9	12	100	25	4.5	55.9					

表 2 方差分析

Table 2 Analysis variance

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	3 117.33	9	346.37	1 369.44	<0.000 1	X_1^2	369.28	1	369.28	1 460.00	<0.000 1
X_1	521.64	1	521.64	2 062.42	<0.000 1	X_2^2	131.08	1	131.08	4 471.94	<0.000 1
X_2	974.61	1	974.61	3 853.31	<0.000 1	X_3^2	0.034	1	0.034	0.13	0.724 3
X_3	11.28	1	11.28	44.60	0.000 3	残差	1.77	7	0.25		
X_1X_2	18.06	1	18.06	71.41	<0.000 1	失拟项	1.14	3	0.38	2.43	0.205 8
X_1X_3	8.70	1	8.70	34.41	0.000 6	纯偏差	0.63	4	0.16		
X_2X_3	0.49	1	0.49	1.94	0.206 6	总离差	3 119.10	16			

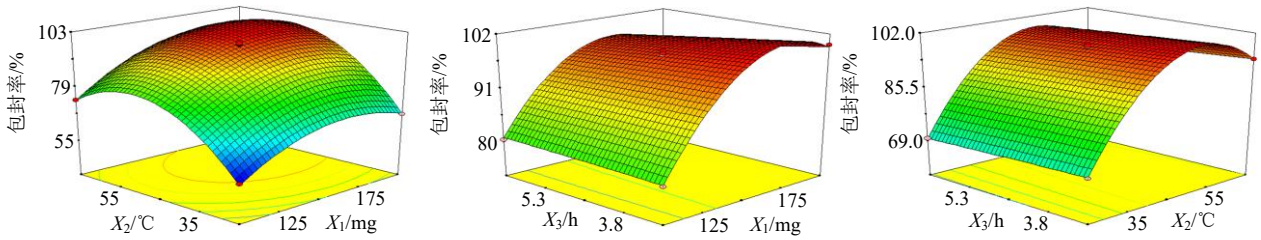

图 2 3D 效应面图

Fig. 2 Response surface plot of 3D

预测复合率为 101.85%。为便于操作，THP-PC 最佳处方调整为 X_1＝160 mg，X_2＝48.5 ℃，X_3＝3.5 h。按此处方工艺，平行制备 3 份 THP-PC，测得复合率分别为 99.52%、99.71%和 99.38%，复合率基本接近 100%。

2.4 HTP-PC 晶型分析

X 射线粉末衍射法（XRPD）对 THP-PC 进行晶型分析。速度为 8°/min，扫描范围（2θ）为 3°～45°，Cu-Kα 靶。取 THP 原料药、磷脂、THP-PC 及物理混合物（比例 THP-PC，仅作简单混合）适量置于玻璃槽中，玻璃片压制平整，置于 X 射线粉末衍射仪进行扫描，见图 3。THP 在 6.3°、7.4°、10.9°、11.5°、12.1°、16.9°、18.0°、18.7°、20.2°、20.9°、24.1°、25.3°、29.7°及 42.7°等处出现众多特征晶型峰，是一种晶型物质。在物理混合物中仍见 THP 的特征晶型峰，强度有所下降，但各峰的位置未发生任何变化，说明简单混合未改变 THP 的存在状态。但在 THP-PC 的 XRPD 图谱中，未见 THP 的晶型峰，说明存在形式发生了改变，转变成无定型物质，证明了 THP-PC 制备成功。

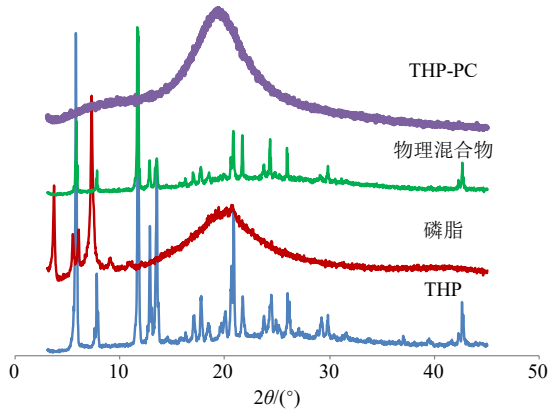

图 3 THP-PC 的 XRPD 结果

Fig. 3 XRPD results of THP-PC

2.5 表观油水分配系数（*P*）的测定

分别配制 pH 1.0、pH 2.5、pH 3.6、pH 4.5、pH 5.8、pH 6.8、pH 7.4、pH 8.0 的水相溶液，加入正辛醇进行饱和。分别取过量 THP、物理混合物（比例同 THP-PC）和 THP-PC 加入到饱和后的不同 pH 值的水溶液中，于 37 ℃振荡器中震荡 3 d，取上层混悬液，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液进样测定浓度 C_1。精密量取 1 mL 置于玻璃离心管中，平行 8 份，分别加入经不同 pH 值的水溶液饱和过的正辛醇 5 mL，于 37 ℃振荡器中震荡 3 d。取下层水相过 0.45 μm 微孔滤膜，测得浓度 C_2。计算 P，P＝(C_1－C_2)/C_2，并计算 lg$P$。结果见图 4。THP 在不同 pH 值中的 lg$P$ 变化较大，在酸性条件下水溶性较大，但在碱性条件下脂溶性较强，水溶性或脂溶性过大均不利于药物透膜吸收[12]。制备成 THP-PC 后有效调节了 THP 的表观油水分配系数，利于药物胃肠道吸收。而物理混合物对 THP 油水分配系数有一定影响，但无显著性意义。

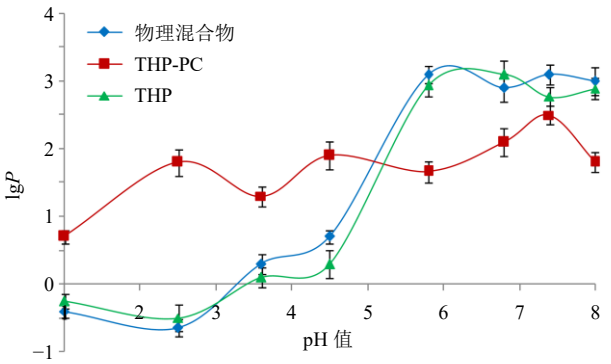

图 4 表观油水分配系数结果 (n = 3)

Fig. 4 Results of apparent oil/water partition coefficient (n = 3)

2.6 THP-PC-SD 的制备及表征

磷脂复合物热稳定性不好，因此，不适合采用熔融法制备成固体分散体，故采用溶剂法将 THP-PC 制备成 THP-PC-SD。按照质量比 1∶6，分别取 THP-PC 和 PVP K30，置于无水乙醇中，45 ℃条件下磁力搅拌 3 h 至溶液澄清，45 ℃下减压旋蒸除去有机溶剂，即得 THP-PC-SD 粉末。

2.6.1 晶型分析 取适量 THP、PVP K30、物理混合物（THP、磷脂和 PVP K30 比例同 THP-PC-SD，仅作简单混合）和 THP-PC-SD，按照“2.4”项下条件进行 XRPD 扫描，结果见图 5，在物理混合物中仍可见 THP 原料药在 10.9°、11.5°、12.1°、16.9°、

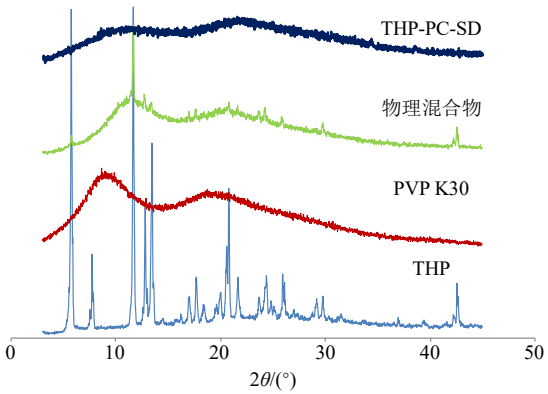

图 5 THP-PC-SD 的 XRPD 结果

Fig. 5 XRPD results of THP-PC-SD

18.0°、20.2°、20.9°、24.1°、25.3°、29.7°及 42.7°等处衍射峰，虽其强度下降，但各峰的位置并未发生变化，可能是由于处方中 PVP K30 用量较大，对衍射峰起到了掩蔽作用所致[15]。但在 THP-PC-SD 中 THP 的衍射峰全部消失，说明将 THP-PC 制备成 THP-PC-SD 后，THP 仍是以无定形状态存在，同时也证明 THP-PC-SD 制备成功。

2.6.2 SEM 分析 THP、物理混合物（THP、磷脂和 PVP K30 比例同 THP-PC-SD，仅作简单混合）和 THP-PC-SD 适量，加入无水乙醇进行分散，取 2～3 d 至导电胶上，烘干后喷金 2 min，置于 SEM 下观察，结果见图 6。THP 原料药为柱状形态，在物理混合物中可观察到原料药附着在辅料上，存在状态并未发生改变。但在 THP-PC-SD 中原料药的柱状形态消失，说明其存在状态发生变化，与 XRPD 研究结果一致。

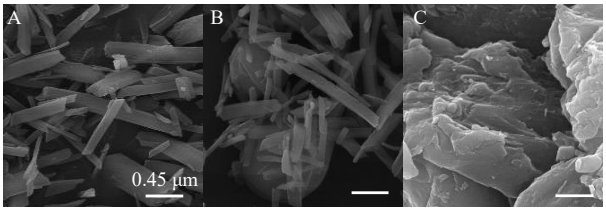

图 6 THP (A)、物理混合物 (B) 和 THP-PC-SD (C) 的 SEM 图

Fig. 6 SEM of THP (A), physical mixture (B) and THP-PC-SD (C)

2.7 THP-PC-NPs 及其冻干粉的制备及表征

2.7.1 THP-PC-NPs 及其冻干粉的制备 高压均质法制备 THP-PC-NPs。取 80 mg 的 PVP K30 溶解于 100 mL 蒸馏水中（温度为 45 ℃），另取 40 mg 的 THP-PC 超声分散于 3 mL 无水乙醇，水相与有机相合并后减压旋转蒸发 10 min（温度为 45 ℃）。混悬液于均质压力为 40 MPa 条件下循环均质 5 次，于 80 MPa 条件下循环均质 8 次，继续于 100 MPa 条件下循环均质 8 次，即得 THP-PC-NPs 混悬液。加入 5%甘露醇，混匀，分成若干份，于−40 ℃超低温冰箱预冻 1 d，迅速置于冷冻干燥机中进行冻干，即得 THP-PC-NPs 冻干粉。

2.7.2 粒径和 ζ 电位的测定 取适量 THP-PC-NPs 混悬液，蒸馏水稀释 50 倍，置于粒度仪中测得其 ζ 电位为（−31.26±1.93）mV，见图 7；平均粒径为（184.57±10.41）nm，见图 8。取适量 THP-PC-NPs 冻干粉蒸馏水复溶，测得平均粒径增长至（242.90±15.63）nm，ζ 电位为（−28.05±1.69）mV。

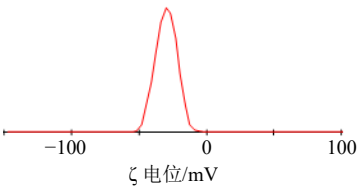

图 7 THP-PC-NPs 的 ζ 电位

Fig. 7 ζ potential of THP-PC-NPs

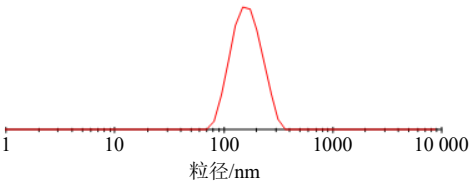

图 8 THP-PC-NPs 粒径分布

Fig. 8 Particle distribution of THP-PC-NPs

2.7.3 SEM 观察 取 THP-PC-NPs 混悬液 100 μL，加入蒸馏水 3 mL 混匀，取 2～3 d 滴加至导电胶上，自然晾干并喷金 2 min，置于 SEM 下观察其微观形态，结果见图 9，THP-PC-NPs 呈类球形。

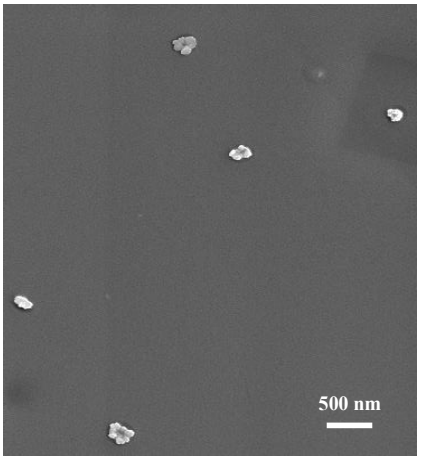

图 9 THP-PC-NPs 的 SEM 图

Fig. 9 SEM of THP-PC-NPs

2.8 THP-PC-OP 的制备

中链三酰甘油具有良好的安全性和可耐受性，广泛应用于食品及医药领域，且磷脂复合物在中链三酰甘油溶解度良好，因此，本研究采用中链三酰甘油制备 THP-PC-OP。过程为取 100 mg 的 THP-PC，超声溶于 10 mL 中链三酰甘油，即得 THP-PC 油制剂。

2.9 溶出度测定方法

取 THP、THP-PC、THP-PC-SD 和 THP-PC-NPs 冻干粉适量，使 THP 含量均为 30 mg，采用蒸馏水制备混悬液，置于透析袋中，各样品均平行制备 6 份。溶出介质为 900 mL 蒸馏水，温度和转速分别

为 37 ℃和 100 r/min，于 0、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、18、24 h 取样 3 mL，立即补进蒸馏水 3 mL。各样品经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，进 HPLC 测定 THP 质量浓度，计算各时间点累积溶出率，结果见图 10。THP 原料药 24 h 累积释放率为 49.18%，THP-PC 在各个时间点累积释放率均高于 THP 原料药，24 h 累积释放率为 69.47%，有一定的促溶出作用。将 THP-PC 制备成 THP-PC-SD 后溶出速率明显增大，8 h 的累积溶出率达到 96.02%。而 THP-PC-NPs 在 4 h 累积溶出率达到 95.67%，基本释放完毕。THP-PC-OP 是一种溶液制剂，故不再考察体外溶出情况。

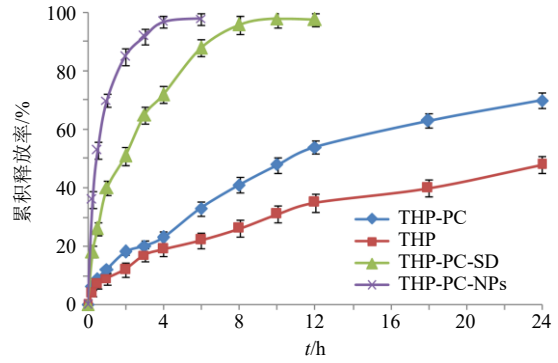

图 10　不同样品的溶出曲线（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Fig. 10　Release curves of different samples ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

2.10　口服药动学比较

2.10.1　试验方案　取 THP、THP-PC、THP-PC-SD、THP-PC-NPs 粉末适量，加入适量 0.5% CMC-Na 溶液配制灌胃液，THP-PC-OP 可直接灌胃给药。取 SD 大鼠 30 只，随机均分为 5 组，禁食 12 h 但可自由饮水，按大鼠体质量进行 ig 给药（30 mg/kg）。分别在 0、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、10、12 h 眼眶后静脉丛取血约 0.3 mL，毛细玻璃管引流至肝素化的离心管中，立即于 3000 r/min 离心 3min，分取血浆密封，−15 ℃冰箱中冷冻保存。

2.10.2　血浆样品处理过程[23]　取白屈菜红碱适量，采用甲醇配制成 600 ng/mL，作为内标溶液。吸取血浆样品 100 μL，加入内标溶液 50 μL 和 1 mL 乙腈（含体积分数为 0.05%甲酸），密封，涡旋 2 min，于 5000 r/min 离心 8 min，取有机相，40 ℃氮气吹干得残渣，加入 100 μL 甲醇涡旋 30 s 复溶，于 5000 r/min 离心 5 min，进样测定。

2.10.3　血浆对照品标准曲线　取 2.0 μg/mL 的 THP 对照品溶液，甲醇稀释配制成质量浓度分别为 1000、500、250、100、20 ng/mL，分别取 100 μL，加入白屈菜红碱内标溶液 50 μL，40 ℃氮气流缓慢吹干得残渣，分别加入空白血浆 100 μL，涡旋混匀，即得 THP 血浆对照品溶液。按照“2.10.2”项下操作，进样测定。以 THP 质量浓度（X）为横坐标，THP 与白屈菜红碱峰面积比（Y）为纵坐标，得方程 Y=0.042 6 X−2.450 1，r=0.992 6，所以线性范围为 20～2 000 ng/mL。

2.10.4　方法学考察　取空白血浆、血浆对照品和血浆样品进样，结果见图 11，血浆内源性杂质不干扰 THP 及内标测定，因此专属性较高。取 20、500、2000 ng/mL 的血浆对照品溶液，连续进样 6 次，分别计算得 THP 与内标峰面积比值的 RSD 分别为 9.97%、6.31%、9.17%，因此日内精密度良好。分别连续测定 6 d，每天测定 1 次，分别计算得 THP 与内标峰面积比值的 RSD 分别为 10.88%、7.18%、9.96%，因此日间精密度良好。取 THP 原料药 ig 给药 1 h 的血浆样品，分别于 0、3、6、12、18、24 h 进样测定 THP 与内标峰面积比值，计算得比值的 RSD 为 6.49%，说明血浆样品稳定性良好。取 20、500、2000 ng/mL 的血浆对照品，进 HPLC 测定两

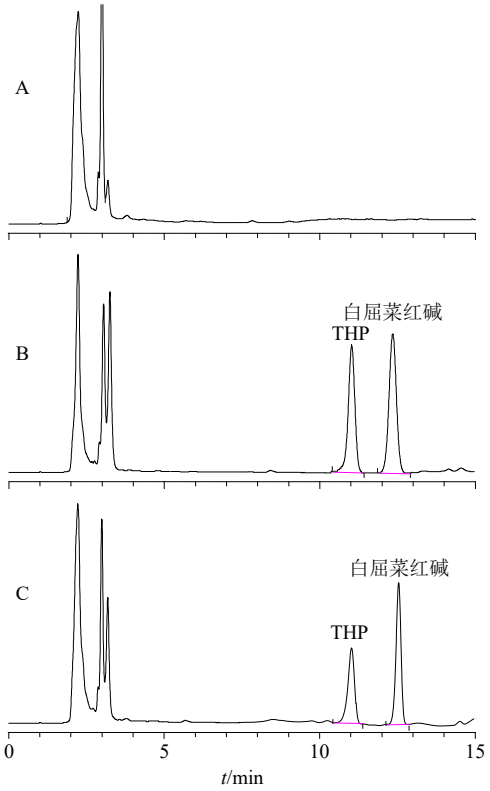

图 11　空白血浆 (A)、血浆对照品溶液 (B) 和血浆样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 11　HPLC of blank plasma (A), plasma reference solution (B) and plasma sample (C)

者峰面积，计算峰面积比值，带入血浆对照品标准曲线方程计算测得浓度，并与配制质率浓度比较，计算得平均回收率为 94.06%（n=9），RSD 值为 7.93%，可见准确度较高。因此建立的色谱方法及血浆处理过程可用于血浆样品中 THP 的含量测定。

2.10.5　药动学结果　分别测定 THP、THP-PC、THP-PC-SD、THP-PC-OP 和 THP-PC-NPs 在各个时间点的血药浓度，药-时曲线见图 12。DAS 2.0 软件包拟合各组样品药动学数据，主要药动学参数结果见表 3。THP-PC 的 t_{max} 与 THP 原料药相比无统计学意义，但 $t_{1/2}$、C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$等参数有

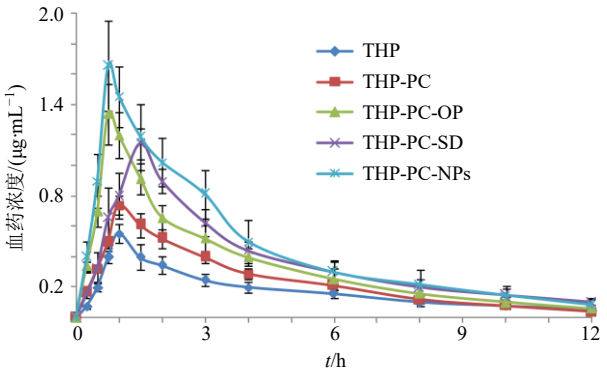

图 12　药-时曲线（$\bar{x}\pm s$, n = 6）

Fig. 12　Drug concentration-time curves ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

表 3　主要药动学参数（$\bar{x}\pm s$, n = 6）

Table 3　Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

参数	单位	THP 原料药	THP-PC	THP-PC-SD	THP-PC-NPs	THP-PC-OP
t_{max}	h	1.06±0.31	1.11±0.28	0.74±0.21$^{*\#}$	0.70±0.23$^{*\#}$	1.56±0.36$^{*\#}$
$t_{1/2}$	h	2.61±0.54	3.72±0.69*	3.34±0.57*	3.96±0.61**	4.44±0.68$^{**\#}$
C_{max}	ng·mL^{-1}	557.64±61.24	741.76±92.32**	1 388.05±148.67$^{**\#\#}$	1 704.33±253.64$^{**\#\#}$	1 147.16±148.98$^{**\#\#}$
$AUC_{0\sim t}$	ng·h·mL^{-1}	1 568.23±148.61	2 674.93±282.70**	6 447.18±627.96$^{**\#\#}$	7 629.81±721.16$^{**\#\#}$	6 615.04±589.03$^{**\#\#}$
$AUC_{0\sim\infty}$	ng·h·mL^{-1}	1 624.17±159.08	2 812.62±301.56**	6 591.43±681.42$^{**\#\#}$	7 728.64±772.08$^{**\#\#}$	6 756.08±703.58$^{**\#\#}$

与 THP 比较：$^{*}P$<0.05　$^{**}P$<0.01；与 THP-PC 比较：$^{\#}P$<0.05　$^{\#\#}P$<0.01

$^{*}P$ < 0.05　$^{**}P$ < 0.01 *vs* THP; $^{\#}P$ < 0.05　$^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* THP-PC

显著性改变，相对生物利用度提高至 1.70 倍，在一定程度上促进了 THP 体内吸收。THP-PC-SD、THP-PC-NPs 和 THP-PC-OP 的 t_{max}、C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$与 THP 或 THP-PC 相比均有显著性或极显著性差异（P<0.05、0.01），药动学行为发生了较大变化。与 THP 原料药相比，THP-PC-SD、THP-PC-NPs 和 THP-PC-OP 相对生物利用度分别提高至 4.11、4.86、4.22 倍，其中 THP-PC-NPs 提升幅度相对最大。

3　讨论

前期分别考察了制备溶剂（醋酸乙酯、乙醇、丙酮、四氢呋喃等）、制备温度（20～70 ℃）、磷脂用量（100～300 mg）、制备时间（2～6 h）等对 THP-PC 复合率的影响，发现采用四氢呋喃作为制备溶剂时复合率最高，可能是由于四氢呋喃是一种非质子溶剂，对 THP 及磷脂有较高的溶解度，有利于 THP-PC 的形成。

据文献报道[12]，质子溶剂（如乙醇）会对药物与磷脂的亲电基团与供电基团之间的电子传递产生影响，因而会干扰磷脂复合物的形成，影响复合率。磷脂容易被氧化，制备温度过高或制备时间过长时均会影响磷脂的稳定性，进而也会影响复合率。药物与磷脂分子一般是按照物质的量比 1∶1 结合在一起，磷脂用量不足时，复合率较低，但磷脂用量过大时造成材料浪费，故需要对磷脂用量进行优化。因此，选择磷脂用量、制备温度和制备时间为主要影响因素，采用 Box-Behnken 响应面法优化了 THP-PC 处方工艺，复合率接近 100%。计算结果显示，THP 与磷脂的物质的量比为 1∶1.04。XRPD 研究显示，THP 在 THP-PC 以无定型状态存在，利于提高体溶出度及生物利用度[24]。

THP-PC 是一种黏性物质，给药不便，故本研究进一步将其制备成 THP-PC-SD、THP-PC-OP 及 THP-PC-NPs 冻干粉。体外溶出结果显示，THP-PC 体外溶出较为缓慢，但 THP-PC-SD 和 THP-PC-NPs 极大促进了 THP 体外溶出，且给药便捷性大大提高。

口服后，THP-PC 的生物利用度提高至 1.70 倍，可能是由于 THP 的溶出度得到一定程度提高、降低了胃肠道对药物代谢作用[25]、调节了油水分配系数、促进胃肠道吸收等[25-26]作用所致。但磷脂复合物黏性较大，促溶出作用有限，且部分磷脂复合物在水相环境中可能发生解离[15]，因而生物利用度提高幅度受限。制备成 THP-PC-SD 后生物利用度提高至 4.11 倍，可能是由于制备成 THP-PC-SD 后 THP

仍以无定型状态存在、THP-PC 的亲水性及分散性得到极大改善、加快体外溶出速率、提高了累积溶出度等[27]。THP-PC-NPs 进一步把生物利用度提高至 4.86 倍，可能是由于 THP-PC-NPs 充分融合了 PC 和 NPs 制剂新技术的优势[22]，增强了 THP 的透膜吸收能力、增加了药物与胃肠道的接触面、延长了胃肠道滞留时间、发挥纳米制剂特殊吸收机制等[18,21]，从而实现高效吸收。THP-PC-OP 生物利用度提高至 4.22 倍，可能是由于磷脂复合物在水中容易发生解离，析出原形药物，失去促吸收作用，当以油制剂形式给药后使 THP-PC 与水相隔离，增加了 THP-PC 稳定性；THP-PC-OP 口服后在胃肠道蠕动作用下可能会形成微乳、胶束等[28-30]，从而使生物利用度远高于 THP-PC。因此，THP-PC-SD、THP-PC-NPs 和 THP-PC-OP 均可进一步促进 THP-PC 口服吸收，本研究为 THP 制剂研发提供了有价值的参考资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 董庆海, 吴福林, 王涵, 等. 延胡索药学研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2019, 38(1): 48-53.

[2] 唐逸丰. 延胡索化学成分与药理作用研究概况 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(23): 144-146.

[3] 王安铸, 马晓昌. 延胡索乙素的研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1927-1929.

[4] 于定荣, 翁小刚, 王本晓, 等. 延胡索、白芷炮制配伍对元胡止痛方中延胡索乙素、欧前胡素含量以及镇痛作用的影响 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2306-2312.

[5] 吴芸, 陈志鹏, 肖璐, 等. 延胡索乙素平衡溶解度及表观油水分配系数的测定 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(2): 178-180.

[6] Tung N T, Tran C S, Pham T M, *et al*. Development of solidified self-microemulsifying drug delivery systems containing l-tetrahydropalmatine: Design of experiment approach and bioavailability comparison [J]. *Int J Pharm*, 2018, 537(1/2): 9-21.

[7] 费雅蓉, 徐畅, 周丹婷, 等. 延胡索乙素醇质体的制备及其离体皮肤渗透特性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(5): 1088-1094.

[8] 刘雪赟. 延胡索乙素大鼠体内药动学研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(6): 555-557.

[9] 李阳杰, 周敬. 延胡索乙素纳米结构脂质载体的制备及其药动学行为 [J]. 中成药, 2019, 41(12): 2990-2993.

[10] 刘建明, 王芳, 叶颖俊, 等. 延胡索乙素多囊脂质体的制备及其大鼠体内药代动力学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 124-127.

[11] Zhao Y Q, Wang L P, Ma C, *et al*. Preparation and characterization of tetrandrine-phospholipid complex loaded lipid nanocapsules as potential oral carriers [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 4169-4181.

[12] 李强强, 王凯, 薛晓锋, 等. 黄酮类化合物磷脂复合物的制备与功能活性研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 132-137.

[13] 黄珊, 翟秉涛, 杨洁, 等. 根皮素磷脂复合物的制备、表征及体内外溶出行为评价 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5543-5551.

[14] 宋婷, 宋丹, 管海燕, 等. 松萝酸磷脂复合物在大鼠体内的药动学及组织分布研究 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1358-1364.

[15] 张留超, 刘勇华. 鞣花酸磷脂复合物的制备及其口服生物利用度研究 [J]. 中成药, 2021, 43(7): 1685-1690.

[16] 陈晓敏, 曹伶俐, 崔伟峰. 鼠李素磷脂复合物的处方工艺优化、表征及体外溶出度考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(4): 399-403.

[17] 邓向涛, 郝海军, 陈晓峰, 等. 木犀草素 2 种固体分散体制备、表征和大鼠体内药动学行为研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5787-5793.

[18] 刘会珍, 董丹丹, 范明松. 不同厚朴酚制剂的制备、表征及其在 SD 大鼠体内药动学行为比较 [J]. 中草药, 2020, 51(17): 4442-4448.

[19] 庞榕, 李开言, 王聪颖. 白杨素磷脂复合物固体分散体的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2021, 43(10): 2611-2615.

[20] 孟令玮, 王玉丽, 高春生, 等. 基于药物-磷脂复合物的纳米释药系统研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(1): 40-46.

[21] Khosh manzar M, Mohammadi M, Hamishehkar H, *et al*. Nanophytosome as a promising carrier for improving cumin essential oil properties [J]. *Food Biosci*, 2021, 42: 101079.

[22] Chi C, Zhang C S, Liu Y, *et al*. Phytosome-nanosuspensions for silybin-phospholipid complex with increased bioavailability and hepatoprotection efficacy [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 144: 105212.

[23] 赵宏兴, 王鑫, 刘有平, 等. LC-MS/MS 法研究加味左金丸在大鼠体内的药动学 [J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(7): 668-674.

[24] 施秦, 蔡挺. 无定形态药物结晶行为的研究进展 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(6): 654-662.

[25] Li F, Yang X L, Yang Y N, *et al*. Phospholipid complex as

an approach for bioavailability enhancement of echinacoside [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(11): 1777-1784.

[26] Wang W P, Zhang W S, Jiang Y X, *et al*. Preparation of ursolic acid-phospholipid complex by solvent-assisted grinding method to improve dissolution and oral bioavailability [J]. *Pharm Dev Technol*, 2020, 25(1): 68-75.

[27] 张铁山, 尚曙玉, 王聪颖, 等. 2 种斯皮诺素固体分散体的制备及其体内药动学行为 [J]. 中成药, 2019, 41(9): 2025-2029.

[28] 王震芳, 张智强, 葛振华. 蛇床子素 3 种制剂的制备、表征及药动学比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3615-3621.

[29] 尚曙玉, 张铁山, 郝海军, 等. 冬凌草甲素磷脂复合物不同制剂在 SD 大鼠体内生物利用度的比较 [J]. 中药材, 2019, 42(4): 871-874.

[30] 郜娜, 范明松, 杨庆宇, 等. 二氢杨梅素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]. 中草药, 2019, 50(17): 4060-4067.

[责任编辑　郑礼胜]