

低分子肝素纳米脂质体的制备及大鼠口服吸收

翟光喜, 陈国广¹, 赵 焰, 娄红祥, 张钧寿¹

(山东大学, 济南 250012; 中国药科大学, 南京 210009)

摘要 目的 制备低分子肝素纳米脂质体制剂, 并进行大鼠口服吸收的研究。方法 用超声波分散法制备低分子肝素纳米脂质体, 以正交实验设计确定最佳制备工艺; 电镜观察其形态及粒径分布, 以大鼠用药前后血液凝固时间的变化研究其口服吸收的促进作用。**结果** 低分子肝素纳米脂质体在电镜下为圆形或椭圆形, 平均粒径为 89.6 nm, 包封率为 36.1%; 大鼠用药后血液凝固时间显著延长。**结论** 纳米脂质体对低分子肝素大鼠口服吸收有良好的促进作用。

关键词 低分子肝素; 纳米; 脂质体; 制备

中图分类号: R945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5048(2002)03-0200-03

低分子肝素 (low molecular weight heparin) 是由肝素经降解得到的低分子量的肝素片段或经分级法得到的低分子量肝素组分, 分子量范围一般为 3000~8000; 可用于防治深部静脉血栓、肺栓塞、播散性血管内凝血等疾病^[1]。已报道胶囊剂^[1]和透皮吸收软膏、凝胶及脂质体喷胶^[2,3], 为进一步促进低分子肝素经胃肠道的吸收, 以降低口服剂量, 本文制备了低分子肝素的纳米脂质体制剂 (NLL) 并研究其大鼠的口服吸收。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

LMWH(自制, 粘均分子量 5450, 抗凝效价 50 U/mg); 大豆卵磷脂(黑龙江三江食品有限公司); 胆固醇(Sigma 进口分装); 天青 A(美国, 进口分装); 其它试剂均为化学纯或分析纯。

1.2 仪器

U-2000 紫外分光光度计(日本日立); JEM-1200EX 透射电子显微镜(日本); SS-14A 型框式超过滤器(上海瑞丽分析仪器厂); JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所); ER-162A 型电子天平(日本 A&D 公司); 恒温水浴器(北京西城区医疗器械厂)。

1.3 动物

大鼠, 体重 200~220 g, 山东大学动物中心。

2 方法与结果

2.1 NLL 的制备^[4]

取适量磷脂、胆固醇溶于无水乙醇, 与含药磷酸盐缓冲液混合, 将此混悬液进行超声(80 w)处理一定时间, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得(混悬液含 LMWH 3%, 磷脂 6%)。

2.2 NLL 中 LMWH 的测定

2.2.1 标准曲线的绘制 以天青 A 法^[2,3]测定 LMWH 的含量(效价数)。精密配制浓度为 1.0 U·ml⁻¹ 的低分子肝素标准溶液, 分别量取 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ml 于 6 支试管中, 加水至 5 ml, 分别加巴比妥缓冲液(pH=8.6)、0.1% 西黄蓍胶溶液, 天青 A 溶液各 1 ml, 摆匀后于 505 nm 处测定吸收度 A, 以 A 对相应浓度 C 进行线性回归, 求得回归方程为: $A=0.861C-8.16 \times 10^{-4}$ ($r=0.9996$)。

2.2.2 NLL 中 LMWH 的测定 取 NLL 混悬液 0.5 ml(约含药物 15 mg) 在 40 °C 减压蒸干, 取 15 ml 乙醚分三次加入, 每次振荡 5 min, 3000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 倾出上清液, 残余物以蒸馏水溶解洗涤数次, 定容至 250 ml, 精密量取 1 ml 加水至 5 ml, 以下操作同上, 于 505 nm 处测定吸收度 A 代入标准曲线方程, 测定 LMWH 的含量(效价数: u)。

2.2.3 回收率的测定 分别精密称取 LMWH 12, 15, 18 mg 分散于空白纳米脂质体混悬液 0.5 ml

中, 在 40 ℃减压蒸干, 以下操作同“2.2.2”, 回收率为 $99.64\% \pm 1.63\%$, RSD 为 1.64%。

2.3 NLL 包封率测定^[3]

采用分子量截留值为 50000 的超滤膜, 将含药脂质体混悬液进行超滤, 收集滤液, 以天青 A 法测定滤液中 LMWH 的含量(效价数)即游离药物的量, 由以下公式计算包封率。

$$EN\% = \frac{M_{\text{总}} - M_{\text{游离}}}{M_{\text{总}}} \times 100\%$$

式中: $M_{\text{总}}$ 为脂质体混悬液中 LMWH 的总量, $M_{\text{游离}}$ 为未包入脂质体的 LMWH 量。

2.4 NLL 最佳制备工艺的确定

以四因素三水平的正交设计考察磷脂与胆固醇的摩尔比(A)、脂水相体积比(B)、超声处理时间(C)、磷酸盐缓冲液 pH(D)等对脂质体包封率的影响, 以确定最佳制备工艺。正交实验设计各因素水平见表 1, 结果见表 2。由表 2 可知, 四因素中对脂质体包封率的影响顺序为 A>C>B>D, 最佳工艺为 A₃B₁C₁D₂, 以此工艺制备脂质体。在该制备条件下脂质体 LMWH 的包封率为 36.1%±2.57%。

Tab 1. Factors and Levels

	A	B	C(min)	D
1	1:0	1:9	2	6.5
2	1:0.25	1.5:8.5	3	7.0
3	1:0.5	2:8	4	7.5

2.5 NLL 的形态观察

取样品适量, 稀释, 滴加 3% 磷钨酸染色液, 混匀, 用铜网蘸取混合液, 干燥, 在透射电镜下观察脂质体颗粒的形态。颗粒呈圆形或椭圆形, 粒度分布为 30200 nm, 平均粒径为 89.6 nm。

2.6 大鼠在体口服吸收的研究

取大鼠 15 只, 正常饮食一周; 随机分为 3 组, 实验前禁食 12 h, 只给饮水。I 组灌胃纳米脂质体混悬液 0.5 ml/100 g 大鼠, II 组灌胃 LMWH + 空白纳米脂质体混悬液(将 LMWH 溶于以同样方法制备的不含药的脂质体混悬液中)0.5 ml/100 g, III 组灌胃含 LMWH 2% 的磷酸盐缓冲液 0.5 ml/100 g, 灌胃药量均为 LMWH 1500 u/ml。分别于用药后 0, 1, 3, 5, 8, 12 h 于大鼠锁骨下静脉窦取血 0.9 ml, 注入已加入 3.8% 枸橼酸钠 0.1 ml 的离心管中, 3000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 分离血浆。以内径约 8 mm 的试管 3 支分别取血浆 0.1 ml, 置(37±0.5)℃ 恒温水浴中保温 5 min, 分别加入 0.025 mol·L⁻¹ 氯化钙 0.1 ml, 秒表测定从加入氯化钙到血纤蛋白析出的时间; 取 3 支试管的平均值即为各取血时间的血液凝固时间。以用药后各时期与用药前(0 h)血液凝固时间的差值计算血液凝固时间延长百分率。结果见表 3。

Tab 2. Orthogonal design and results analyses

	A	B	C	D	Y
1	1	1	1	1	28.8
2	1	2	2	2	26.9
3	1	3	3	3	22.3
4	2	1	2	3	21.6
5	2	2	2	1	19.8
6	2	3	1	2	23.3
7	3	1	3	2	31.2
8	3	2	1	3	33.7
9	3	3	2	1	30.5
X ₁	26.0	27.2	28.6	26.4	
X ₂	21.6	26.8	26.3	27.1	
X ₃	31.8	25.4	24.4	25.9	
K	10.2	1.8	4.2	1.2	

Y: the encapsulated ratio of liposomes; X₁、X₂、X₃: means of encapsulated ratio of difference levels.

Tab 3. The prolonged percentage of rat blood coagulation time at different time after oral administration (P/%) ($\bar{x} \pm s$, n=5)

Group No.	1	3	5	8	12 h
I	48.27±17.52	82.25±29.77	55.44±22.10	28.07±11.33	12.33±14.12
II	18.89±13.55	31.52±17.42	38.67±15.98	21.31±16.13	10.18±11.65
III	6.12±8.27	13.53±8.55	16.64±10.44	13.77±11.68	9.44±10.25

由表 3 可知, 用药后 1, 3, 5, 8 h, I 组和 II 组与 0 h 相比, 大鼠血液凝固时间显著延长($P<0.05$), 而 III 组用药后各时间与 0 h 相比, 大鼠血液凝固时间延长百分率虽有增大的趋势, 但无统计学意义。说明 LMWH 与纳米脂质体相混和或包入纳米脂质体中, 均能促进其在大鼠胃肠道中的吸收。I 组与

II 组相比, 在 1, 3, 5 h 大鼠血液凝固时间延长百分率有显著性差异($P<0.05$), 表明 LMWH 包入纳米脂质体后在大鼠胃肠道的吸收较好。

3 讨论

LMWH 进入血液中后, 一部分被血管内皮细胞

所摄取^[1],不易被检测出来;而且检测试剂价格昂贵,用生物反应可全面地反映进入血液中并发挥其药效作用的LMWH的量^[2]。

脂质体由于其类脂双分子结构在胃肠道可与胃肠粘膜细胞作用发生融合、胞饮和吞噬作用,使药物进入胃肠道粘膜进而被吸收;而纳米脂质体由于其较小的粒径,口服后除上述作用外还可被胃肠道中的派伊尔氏淋巴结集(Peyer's patches)等组织所摄取,且随其粒径的减小摄取增加。另外由于其极小的粒径而具有的粘附性,使其易于粘附于肠壁上,增加了药物与肠壁的接触面积和接触时间,有利于药物吸收^[5~9]。本试验结果表明纳米脂质体可显著促进分子量为5450的LMWH的胃肠道吸收,并维持较长的作用时间,口服8 h后大鼠血液凝固时间仍有显著的延长。

在脂质体混悬液中药物除了被包入脂质体粒子内,还可通过范德华力、静电引力、氢键等作用力吸附于脂质体粒子的表面或部分基团插入到脂质体双分子层中,本试验中药物与空白脂质体的混悬液大鼠灌胃证明了该部分药物也可随脂质体与生

物膜的作用而被机体吸收。

参考文献

- [1] 张天民(Zhang TM), 崔慧斐(Cui HF), 王凤山(Wang FS), 等. 高抗血栓活性的低分子肝素[J]. 中国医药工业杂志(*Chin J Pharm*), 1994, 25(7): 301~309.
- [2] 孔德新(Kong DX), 张天民(Zhang TM), 邹立家(Zou LJ). 低分子肝素透皮吸收制剂的研究[J]. 中国药学杂志(*Chin Pharm J*), 1995, 30(7): 411~415.
- [3] 翟光喜(Zhai GX), 邹立家(Zuo LJ), 张天民(Zhang TM). 低分子肝素脂质体喷雾凝胶的研制[J]. 中国医药工业杂志(*Chin J Pharm*), 1998, 29(6): 261~265.
- [4] Cevc G, Schatzlein A, Gabriele B. Transdermal drug carriers: basic properties optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides[J]. *J Cont Rel*, 1995, 36: 3~16.
- [5] Florence AT, Hillery AM, Hussain N, et al. Factors affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles: histological and analytical evidence[J]. *J Drug Targeting*, 1995, 3(1): 65~70.
- [6] Desai MP, Labhasewar V, Amidon GL, et al. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size[J]. *Pharm Res*, 1996, 13(12): 1838~1845.

Study on Preparation of Low Molecular Weight Heparin Nanoliposomes and Their Oral Absorption in Rat

ZHAI Guang-Xi, CHEN Guo-Guang¹, ZHAO Yan, LOU Hong-Xiang, ZHANG Jun-Shou¹
Shandong University, Jinan 250012; China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

ABSTRACT AIM The purpose is to prepare low molecular weight heparin nanoliposomes and study their oral absorption. **METHODS** Nanoliposomes were prepared through ultrasonication, and the shape and diameter distribution of nanoliposomes were observed under the electronic microscope. The optimal technique was chosen with orthogonal design. The oral absorption enhancing effect of nanoliposomes on low molecular weight heparin was determined by the changes of rat blood coagulation time. **RESULTS** Low molecular weight heparin nanoliposomes were globular or elliptic, the mean diameter was about 89.6 nm, and the encapsulated ratio was 36.1%. Rat blood coagulation time was significantly prolonged. **CONCLUSION** Nanoliposomes had a significant oral absorption enhancing effect on low molecular weight heparin.

KEY WORDS Low molecular weight heparin; Nanometer; Liposomes; Preparation