

[制剂]

去氢骆驼蓬碱聚乳酸纳米粒的制备及其药动学行为

尚慧杰¹, 阮晓东², 陈晓峰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 制备去氢骆驼蓬碱聚乳酸纳米粒, 并研究其药动学行为。方法 制备纳米粒后, 测定其粒径、PDI、Zeta电位、包封率、载药量、累积释放度。然后, 绘制血药浓度-时间曲线, 计算药动学参数。结果 纳米粒平均粒径(195.38 ± 2.02) nm, PDI 0.131 ± 0.034 , Zeta电位(-19.48 ± 0.36) mV, 包封率(76.37 ± 1.08), 载药量(8.81 ± 0.25), 24 h内累积释放度82.17%, 释药过程符合Weibull模型($r=0.9857$)。与去氢骆驼蓬碱比较, 纳米粒 T_{max} 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 聚乳酸纳米粒可促进去氢骆驼蓬碱体内吸收, 提高其口服生物利用度, 并具有明显的缓释作用。

关键词: 去氢骆驼蓬碱; 聚乳酸纳米粒; 制备; 药动学行为

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)07-1481-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.07.001

Preparation of harmine-loaded polylactic acid nanoparticles and their pharmacokinetic behaviors

SHANG Hui-jie¹, RUAN Xiao-dong², CHEN Xiao-feng²

(1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China; 2. Technique Center, Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201401, China)

ABSTRACT: AIM To prepare harmine-loaded polylactic acid nanoparticles and to study their pharmacokinetic behaviors. **METHODS** For the prepared nanoparticles, their particle size, PDI, Zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading and accumulative release rate were determined. Subsequently, plasma concentration-time curve was drawn, followed by the calculation of pharmacokinetic parameters. **RESULTS** The nanoparticles shared average particle size of (195.38 ± 2.02) nm, PDI of 0.131 ± 0.034 , Zeta potential of (-19.48 ± 0.36) mV, encapsulation efficiency of (76.37 ± 1.08), drug loading of (8.81 ± 0.25), and accumulative release rate within 24 h of 82.17%, the drug release process accorded with Weibull model ($r=0.9857$). The nanoparticles' T_{max} , C_{max} , AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ were significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** Polylactic acid nanoparticles, with an obvious sustained-release effect, can promote the *in vivo* absorption of harmine and enhance the oral bioavailability.

KEY WORDS: harmine; polylactic acid nanoparticles; preparation; pharmacokinetic behaviors

骆驼蓬 *Peganum harmala* L. 为蒺藜科骆驼蓬属多年生草本植物, 去氢骆驼蓬碱是其主要活性成分之一, 具有提高免疫、辐射防护、抗菌、抗肿瘤、中枢兴奋等药理作用^[1-2], 但该成分水溶性很差, 生物利用度低下^[3]。因此, 有必要采用制剂

新技术来解决这一问题, 推进它在临床上的应用。

聚乳酸是一种可生物降解的聚合物, 体内最终代谢成二氧化碳和水, 被美国、德国等国家批准用于药用和医用材料。纳米给药系统是指采用高分子材料作为载体制备的胶体微粒, 粒径 <1000 nm,

可增加难溶性药物溶解度，降低毒副作用，促进药物吸收，实现被动靶向^[4-7]。本实验制备去氢骆驼蓬碱聚乳酸纳米粒，对其实体外基本性质进行初步研究，并考察其药动学行为，为该成分开发利用提供参考。

1 材料

Agilent 1260型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；AR2140型电子天平[梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]；VORTEX-5型涡旋混合器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；JY92-II型超声仪（宁波新知科仪器研究所）；YC-1200型台式冷冻干燥机（北京亚星仪科科技发展有限公司）；Master-sizer型粒度分析仪（英国马尔文仪器有限公司）；MD200-2型氮气吹扫仪（杭州奥威仪器有限公司）；。

去氢骆驼蓬碱对照品（批号 20170115，南京泽朗医药科技有限公司，含有量>98%）。聚乳酸（分子量 15 000，批号 2016081715，山东岱罡科技有限公司）；Poloxamer 188（德国巴斯夫公司，含有量>98%）。甲醇为色谱纯；其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠，雌雄兼具，体质量 (300 ± 20) g，购自上海斯莱克实验动物有限公司，许可证号 SCXK(沪) 2012-0002。

2 方法与结果

2.1 去氢骆驼蓬碱含有量测定

2.1.1 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm, 5 μm）；流动相甲醇-0.2% 甲酸（55:45）；检测波长 248 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 ℃；进样量 20 μL。

2.1.2 线性关系考察 精密称取去氢骆驼蓬碱对照品 10.0 mg，置于 10 mL 量瓶中，加入适量甲醇超声溶解，室温下放置 40 min 后甲醇定容，精密量取适量，甲醇稀释成 20.0、10.0、5.0、0.5、0.05 μg/mL，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以峰面积（Y）对溶液质量浓度（X）进行回归，得方程为 $Y = 1.2124X + 0.0093$ ($r = 0.9999$)，在 0.05~20.0 μg/mL 范围内呈良好的线性关系。

2.1.3 方法学考察 取 0.05、5.0、20.0 μg/mL 对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 5 次，测得 3 种质量浓度下日内精密度 RSD 分别为 0.43%、0.19%、0.17%，日间精密度（连续测定 5 d，每天 1 次）RSD 分别为 0.82%、0.37%、0.15%。取空白纳米粒混悬液或 1.0% 十二烷基硫

酸钠水溶液 1 mL，加入 0.5、5.0、20.0 μg/mL 对照品溶液各 1 mL，测得去氢骆驼蓬碱平均加样回收率为 99.71%，RSD 小于 1.76%。

2.2 聚乳酸纳米粒制备 精密称取去氢骆驼蓬碱 20 mg、聚乳酸 160 mg，溶于 25 mL 丙酮-乙醇等比例混合溶液中，注射器缓慢加到 50 mL 含 0.25% Poloxamer 188 的水相中，超声 10 min，减压旋蒸除去有机溶剂，浓缩，离心 60 min (25 000 r/min)，沉淀物用蒸馏水洗涤后定容至 10 mL，以 5% 甘露醇为冻干保护剂，-70 ℃ 下预冻 48 h，挂入冷冻干燥机中制备，即得，以去氢骆驼蓬碱计，含有量为 2.88%。同法制备空白聚乳酸纳米粒。

2.3 粒径、PDI、Zeta 电位测定 取聚乳酸纳米粒冻干前混悬液，蒸馏水适当稀释后放入比色池中，测定粒径、PDI、Zeta 电位，结果见图 1~2。聚乳酸纳米粒粒径分布在 100~450 nm 之间，平均粒径为 (195.38 ± 2.02) nm，PDI 为 (0.131 ± 0.034) ，Zeta 电位为 (-19.48 ± 0.36) mV。

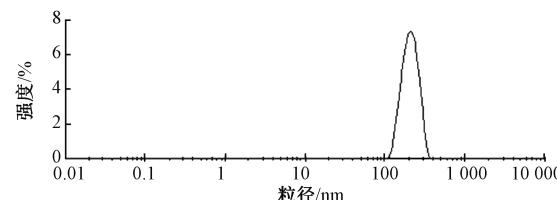


图 1 聚乳酸纳米粒粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of polylactic acid nanoparticles

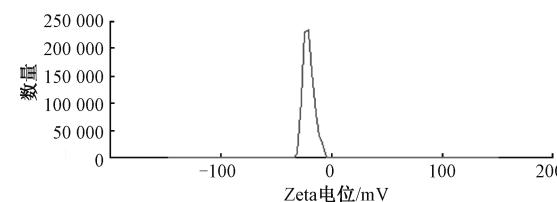


图 2 聚乳酸纳米粒 Zeta 电位

Fig. 2 Zeta potential of polylactic acid nanoparticles

2.4 包封率、载药量测定 取“2.2”项下聚乳酸纳米粒冻干前混悬液 1.0 mL，25 000 r/min 离心 60 min，取上清液，按“2.1”项下方法测定去氢骆驼蓬碱含有量 (W_1)；另取聚乳酸纳米粒混悬液 1.0 mL，加入约 7 mL 甲醇超声后定容至 10 mL，0.22 μm 微孔滤膜过滤，测定去氢骆驼蓬碱总含有量 (W_0)，计算包封率、载药量，公式分别为包封率 = $[(W_0 - W_1) / W_0] \times 100\%$ 、载药量 = $[(W_0 - W_1) / W_t] \times 100\%$ (W_t 为聚乳酸纳米粒总质量)，测得两者分别为 $(76.37 \pm 1.08)\%$ 、 $(8.81 \pm$

0.25)%。

2.5 体外释药行为研究 1.0% 十二烷基硫酸钠溶液制备去氢骆驼蓬碱、聚乳酸纳米粒冻干粉混悬液(以去氢骆驼蓬碱计, 含有量为2 mg)、含2 mg去氢骆驼蓬碱混悬液各2 mL, 置于透析袋中, 两端扎紧, 以1.0% 十二烷基硫酸钠水溶液为溶出介质, 体积100 mL, 转速100 r/min, 温度(37±1)℃, 于0、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12、24 h各取样1.0 mL, 同时补加1.0 mL空白释放介质, 按“2.1”项下方法测定药物含有量, 计算各时间点累积释放度, 绘制释药曲线, 结果见图3。由图可知, 去氢骆驼蓬碱在2.5 h内即基本释放完毕; 其聚乳酸纳米粒体外释药分为2个阶段, 在前8 h内为快速释药期, 8 h后则为缓慢释药期, 24 h内累积释放度为82.17%。然后, 通过一级模型、Higuchi模型、Weibull模型等对释药行为进行拟合, 发现释药过程更符合Weibull模型($r=0.9857$)。

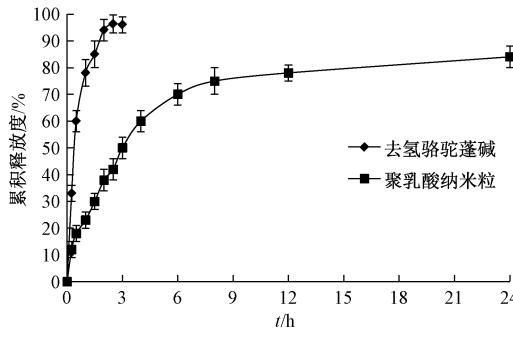


图3 样品体外释放曲线

Fig. 3 *In vitro* release curves for samples

2.6 药动学行为研究

2.6.1 对照品、内标溶液制备 取“2.1”项下0.5 μg/mL对照品溶液, 稀释成20.0、50.0、100.0、250.0、500.0 ng/mL, 即得。精密称取替硝唑10.40 mg, 置于10 mL量瓶中, 8 mL甲醇超声溶解, 冷却至室温后甲醇定容至刻度并逐步稀释, 即得(520 ng/mL)。

2.6.2 血浆样品处理^[3,8] 精密量取血浆样品200 μL于离心管中, 同时加入20 μL内标溶液, 饱和NaCO₃碱化, 加入4.0 mL乙酸乙酯振荡混匀3 min, 10 000 r/min离心6 min, 转移上清液至另一离心管中, 40 ℃氮气缓慢吹去有机溶剂, 残渣加入200 μL甲醇溶解, 10 000 r/min离心6 min, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。

2.6.3 专属性考察 取空白血浆、血浆对照品溶

液(20.0 ng/mL)、给药12 h后血浆样品适量, 按“2.6.2”项下方法处理, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图4。由图可知, 空白血浆内源性物质不干扰测定, 去氢骆驼蓬碱和内标分离度良好。

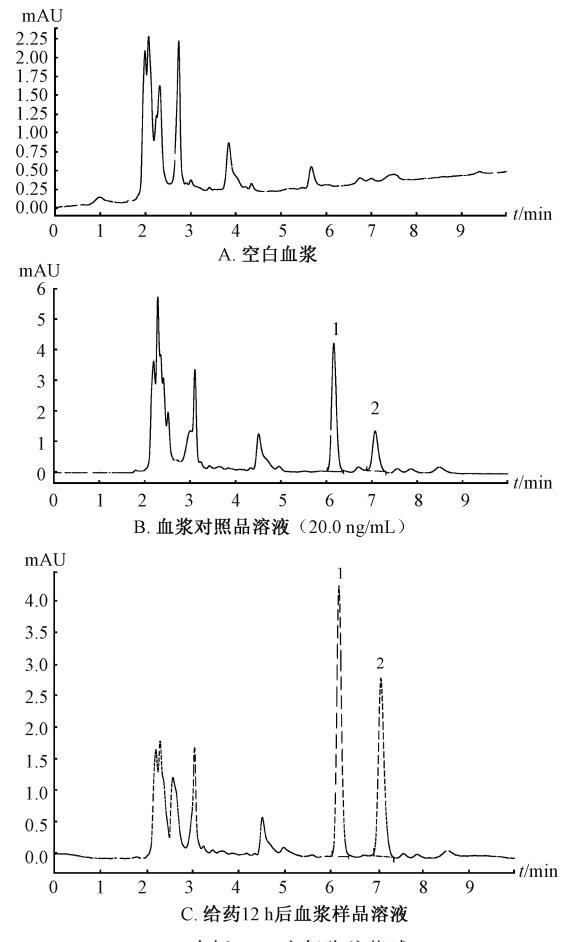


图4 去氢骆驼蓬碱 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of harmine

2.6.4 方法学考察 取“2.6.1”项下去氢骆驼蓬碱血浆样品, 按“2.6.2”项下方法处理, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 以去氢骆驼蓬碱与替硝唑峰面积比值(Y)对去氢骆驼蓬碱质量浓度(X)进行回归, 得方程为 $Y=0.0381X+0.0109$ ($r=0.9990$), 在20.0~500.0 ng/mL范围内呈现良好的线性关系。20.0、250.0、500.0 ng/mL对照品溶液日内精密度RSD分别为5.09%、3.37%、3.97%, 日间精密度(连续测定5 d, 每天1次)RSD分别为8.82%、5.17%、6.44%。取20.0、250.0、500.0 ng/mL对照品溶液各200 μL, 氮气吹除有机溶剂后, 加入200 μL空白大鼠血浆, 按“2.6.2”项下方法处理, 测得3种质量浓度下平均

加样回收率分别为 90.68%、96.06%、102.18%，RSD<8.52%。于 0、1、2、3、4 d 测定去氢骆驼蓬碱血浆样品，发现在冷冻保存条件下，去氢骆驼蓬碱与内标峰面积比值无显著变化 ($P>0.05$)。

2.6.5 给药方案及样品采集 取去氢骆驼蓬碱适量，0.5% CMC-Na 溶液配制 20 mg/mL 混悬液；另取聚乳酸纳米粒冻干粉适量，蒸馏水配制同等浓度混悬液，作为灌胃液，备用。取大鼠 12 只，实验室环境中适应 1 d，其间禁食不禁水，然后随机分为 2 组，按 40 mg/kg 剂量分别灌胃给予去氢骆驼蓬碱、聚乳酸纳米粒混悬液，于 0.083、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12 h 眼眶采血各约 0.3 mL，置于肝素化离心管中，4 000 r/min 下离心 3 min，小心分取上层血浆，置于另一空白离心管中，-20 ℃ 冰箱中保存待测。

2.6.6 药动学行为研究 大鼠灌胃给予去氢骆驼蓬碱及其聚乳酸纳米粒混悬液后，测定不同时间点血浆中去氢骆驼蓬碱血药浓度，绘制血药浓度-时间曲线，结果见图 5、表 1。由此可知，聚乳酸纳米粒 T_{max} 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 显著高于去氢骆驼蓬碱 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

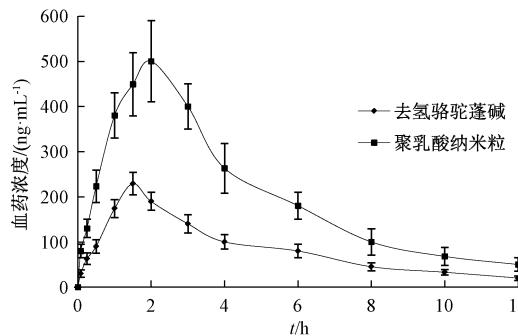


图 5 样品血药浓度-时间曲线

Fig. 5 Plasma concentration-time curves for samples

表 1 样品主要药动学参数 ($\bar{x}\pm s$, n=6)

Tab. 1 Main pharmacokinetic parameters for samples ($\bar{x}\pm s$, n=6)

参数	单位	去氢骆驼蓬碱	聚乳酸纳米粒
T_{max}	h	1.43±0.28	2.08±0.40*
C_{max}	ng·mL⁻¹	223.18±30.74	508.33±91.67**
AUC_{0-t}	ng·mL⁻¹·h	1 413.78±211.93	3 256.41±379.05**
$AUC_{0-\infty}$	ng·mL⁻¹·h	1 504.48±240.86	3 393.65±423.72**

注：与去氢骆驼蓬碱比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$

3 讨论

本实验制备的去氢骆驼蓬碱聚乳酸纳米粒粒径较小，分布均匀，可能是由于溶解药物、载体的丙酮和乙醇可在水相中迅速扩散，易得到较小的粒

径^[9-10]；水相中表面活性剂对纳米粒具有稳定作用，不易发生粘连，平均粒径为 (195.38±2.02) nm，而冻干后虽增加至 (203.28±3.94) nm，但粒径变化无显著差异 ($P>0.05$)。另外，混合溶剂乙醇与丙酮的比例不可过高，以防聚乳酸析出；水相中表面活性剂浓度也不宜太高，防止增溶作用使去氢骆驼蓬碱溶于水相，从而降低包封率、载药量，经前期预实验考察，最终选择 0.25%。

处理去氢骆驼蓬碱血浆样品时，先加入碱性物质 NaCO₃ 使待测组分游离出来，再用有机溶剂乙酸乙酯进行萃取，该方法精密度、回收率等均符合 2015 年版《中国药典》四部 9012 项下生物样品定量分析方法学验证指导原则的规定。药动学行为研究结果显示，聚乳酸纳米粒可显著提高去氢骆驼蓬碱 C_{max} 和 $AUC_{0-\infty}$ ，其原因可能是聚乳酸纳米技术可明显增加药物分散性和比表面积，从而提高与胃肠道黏膜的接触面积；纳米粒易吸附在胃肠道黏膜，有助于药物充分吸收，同时可在胃肠道具有淋巴结构的派伊尔淋巴集结中聚集，通过 M 细胞进入体循环而促进药物吸收。测定体外释放度时发现，聚乳酸纳米粒释放速度明显慢于去氢骆驼蓬碱，但两者 T_{max} 相差不大，这可能是由于纳米粒可在较短时间内经消化道直接吸收进入体循环^[11]，主要途径为消化道上皮细胞直接吸收，或通过派伊尔淋巴集结和上皮细胞吸收，其相对生物利用度是后者的 2.30 倍，有助于充分发挥药理作用^[9,12-13]。今后，将进行去氢骆驼蓬碱聚乳酸纳米粒的药效学研究，以期为进一步研发提供更完整的实验数据^[14]。

参考文献：

- [1] Zheng X Y, Zhang Z J, Chou G X, et al. Acetylcholinesterase inhibitive activity-guided isolation of two new alkaloids from seeds of *Peganum nigellastrum* Bunge by an *in vitro* TLC-bioautographic assay [J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32 (9): 1245-1251.
- [2] 赵婷, 王长虹, 王峰涛. 骆驼蓬属植物中生物碱类化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(5): 333-339, 345.
- [3] 王长虹, 孙殿甲, 高炜伟. 大鼠静脉注射和灌胃盐酸去氢骆驼蓬碱的药物动力学 [J]. 中国临床药学杂志, 2002, 11(3): 159-161.
- [4] 曾莉, 毛春芹, 陆兔林, 等. 川芎嗪聚乳酸纳米粒的制备和质量研究 [J]. 中成药, 2013, 35(2): 261-263.
- [5] 邢洁, 张典瑞, 张学顺, 等. 冬凌草甲素聚乳酸纳米粒的制备和体外性质研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42

- (13): 1006-1010.
- [6] Jeevitha D, Amarnath K. Chitosan/PLA nanoparticles as a novel carrier for the delivery of anthraquinone: Synthesis, characterization and *in vitro* cytotoxicity evaluation [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 101: 126-134.
- [7] 蒋新宇, 周春山, 唐课文. 二元溶剂分散法制备 PLA 和 PLGA 纳米粒[J]. 应用化学, 2003, 20(8): 732-735.
- [8] 史小媛, 刘伟, 张磊, 等. 骆驼蓬总生物碱中骆驼蓬碱、去氢骆驼蓬碱及其代谢产物大鼠体内药代动力学研究 [J]. 中成药, 2014, 36(6): 1169-1175.
- [9] 毛春芹, 陆免林, 钱丽, 等. 正交试验法筛选川芎嗪纳米粒制备的最佳工艺[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1792-1794.
- [10] 马君义, 陈香玲, 亢俊瑞, 等. 高乌甲素聚乳酸纳米粒的制备及体外释药特性的研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(7): 613-618.
- [11] 万坤, 孙立力, 胡雪原, 等. 姜黄素纳米结构脂质载体的药动学[J]. 中成药, 2014, 36(12): 2503-2507.
- [12] 尚小广, 李颖, 徐陆忠, 等. 大黄酸聚乳酸纳米粒的制备及大鼠体内药动学研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(7): 524-528.
- [13] 戴东波, 徐金中, 尤文挺, 等. 盐酸阿霉素聚乳酸纳米粒的制备及大鼠体内药动学研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(8): 1127-1132.
- [14] 牛小童, 张力中, 冯易, 等. 吴茱萸碱固体脂质纳米粒的制备和抗肿瘤活性[J]. 中成药, 2016, 38(10): 2149-2156.

黄芩总黄酮纳米混悬剂冻干粉的表征及辅料对其粉体学性质和吸湿性的影响

赵甜甜, 李小芳*, 马祖兵, 孙强, 刘罗娜, 仲粒

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 四川成都 611137)

摘要: 目的 制备黄芩总黄酮纳米混悬剂冻干粉后进行表征, 并考察滑石粉、糊精、可溶性淀粉、羧甲基淀粉钠、微晶纤维素对其粉体学性质和吸湿性的影响。方法 冷冻干燥法制备冻干粉后, 差示扫描量热 (DSC)、X 射线衍射 (XRD)、傅里叶红外光谱 (FT-IR) 进行结构表征。然后, 考察 5 种辅料对粉体学参数 (休止角、堆密度、振实密度)、溶出度、湿度参数 (吸湿加速度、平衡吸湿率) 的影响。结果 药物与载体之间无相互作用, 并且前者以无定型状态存在。滑石粉和糊精增加了冻干粉流动性, 阻湿效果良好。结论 不同辅料对黄芩总黄酮纳米混悬剂冻干粉的粉体学性质和吸湿性有明显影响。

关键词: 黄芩总黄酮; 纳米混悬剂冻干粉; 表征; 冷冻干燥法; 辅料; 粉体学性质; 吸湿性

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2019)07-1485-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.07.002

Characterization of nanosuspension lyophilized powder of *Scutellariae baicalensis* total flavonoids and effects of excipients on the powder properties and hygroscopicity

ZHAO Tian-tian, LI Xiao-fang*, MA Zu-bing, SUN Qiang, LIU Luo-na, ZHONG Li

(Ministry of Education Key Laboratory for Standardization of Chinese Herbal Medicine; Sichuan Provincial Key Laboratory for Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources—State Key Laboratory Breeding Base Co-founded by Sichuan Province and MOST; College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

收稿日期: 2018-09-13

基金项目: 四川省中医药管理局科研项目 (2018YY001); 成都市科技局科技惠民项目 (2016-HM01-00299-SF)

作者简介: 赵甜甜 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 18328323259, E-mail: 2193966924@qq.com

*通信作者: 李小芳 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 13808195110, E-mail: lixitaoafang918@163.com