

苦参碱靶向缓释纳米球的制备及影响因素考察

陈 纭,金 涌*,李 俊,黄晓晖,王凤娟,苏 峰

(安徽医科大学药学院,安徽 合肥 230032)

摘要:目的 制备肝靶向缓释苦参碱纳米球,并对其形态,载药量,包封率及药物利用率等纳米球质量进行研究。方法 采用乳化溶剂挥发法制备苦参碱-PLGA-纳米球,并用透射电镜观察其外观形态,利用高效液相色谱(HPLC)测定药物含量。结果 制得肝靶向缓释苦参碱-PLGA-NS,其平均包封率为79.5%,平均载药量为1.75%,平均粒径为190.5 nm。结论 制备苦参碱-PLGA-NS基本达到设计要求,该制剂有望成为一种新的药物靶向载体系统。

关键词:苦参碱; 乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA); 纳米球

中图分类号:R283 **文献标识码:**B **文章编号:**1008-0805(2009)05-1203-02

苦参碱(matrine)是从豆科槐属植物山豆根 *Sophora tonkinensis* Gagnep分离提取的氧化苦参碱和极少量果糖碱的混合物,具有抗炎,抗病毒,促进免疫机制和抗肿瘤等作用,近年来发现它对病毒性肝炎亦有明显治疗作用^[1-3]。纳米给药系统是实现靶向和缓释给药,以及提高难溶性药物的生物利用度,降低药物毒副作用等方面具有良好的应用前景^[4,5]。高分子材料乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA),因其优良的生物相容性和生物降解性,被广泛用作纳米球(nanosphere,NS)的载体材料,以其为载体的NS克服了纳米乳剂、纳米脂质体药物易泄露等缺点,成为国内外的研究热点之一,为一类新型的靶向给药载体^[6]。

本实验以PLGA为载体,Pluronic F68为乳化剂,成功地制备了粒径大小适中的KU-PLGA-NS。此制剂经血管给药后可显著聚集于肝脏并缓慢释药,这种由肝脏枯否氏(kupffer)细胞吞噬所致的被动靶向作用无疑有利于肝位病灶尤其是肝炎等的治疗^[7,8]。

1 材料与仪器

1.1 仪器 79-1型磁力搅拌器(金坛市杰瑞尔电器有限公司),AG285型电子天平(瑞典METTLER TOLEDO公司),岛津高效液相色谱仪(包括LC-20AB泵,SPD-M20A紫外检测器及岛津Lc solution色谱工作站),C₁₈色谱柱(依利特),超速冷冻离心机,纳米粒径分析仪(英国Malvern仪器公司),JEOL型高分辨透射电镜(日本电子株式会社),0.45 μm微孔滤膜。

1.2 试剂 苦参碱(陕西龙孚生物化工有限责任公司),PLGA(LA/GA=75/25,MW=8600,济南岱罡生物科技有限公司),Pluronic F-68(西安罗森伯科技有限公司),1.5%(W/V)磷酸,甲醇(色谱纯),丙酮等其他试剂均为分析纯。

标准溶液的配制:

水相:0.5% pluronicF-68,称取Pluronic F-68 0.5g溶于100 ml的纯化水中,备用。

油相:精密称取苦参碱 19.7 mg,PLGA(75/25) 83.5 mg溶于5 ml丙酮中,备用。

流动相的配制:取70 ml甲醇加入30 ml水混匀,再加入0.772 g KH₂PO₄混匀,再加入30 μl三乙胺,备用。

2 方法

2.1 苦参碱-PLGA-NS胶体溶液的制备 取3 ml已配好的油相,将其用注射器针头缓慢注入到以一定速度(以不起泡为宜)搅拌的100 ml Pluronic F-68水相中,常温下磁力搅拌除尽丙

酮,搅拌时间以3 h为宜。经0.45 μm微孔滤膜过滤即得苦参碱-PLGA-NS胶体溶液。低温避光保存。

2.2 形态及粒径观察 取KU-PLGA-NS胶体溶液适量,少量纯化水稀释后用1.5%(W/V)磷钨酸负染色,滴于镀膜的电镜铜网上,晾干后,置于透射电镜下观察纳米球的外观形态并拍摄照片。

2.3 色谱条件^[9] C₁₈色谱柱(大连依利特);流动相为甲醇-水-三乙胺(70:30:0.009);检测波长:229 nm;流速:1.0 ml/min;进样量:20 μl。

2.4 包封率、载药量及利用率的测定 精密吸取苦参碱-PLGA-NS胶体溶液500 μl超速冷冻离心(45000 r·min⁻¹)2 h,精密吸取上清液10 μl,HPLC法测定苦参碱含量。计算未包封苦参碱的量(M₁),再精密吸取苦参碱-PLGA-NS胶体溶液500 μl,用一定体积的混合有机溶剂溶解苦参碱和PLGA,测得苦参碱的总量,计算胶体溶液中苦参碱的含量(M₂),M_{PLGA}为PLGA的投药量,按下式计算包封率,载药量和药物利用率。

$$\text{包封率}(\%) = (M_2 - M_1) / M_2 \times 100\%$$

$$\text{载药量}(\%) = (M_2 - M_1) / M_{\text{PLGA}} \times 100\%$$

$$\text{药物利用率}(\%) = M_2 / \text{投药量} \times 100\%$$

3 结果

3.1 透射电镜观察 纳米球呈类球形,分布较均匀,电镜下计数500个纳米球,得平均粒径为(190.5 nm),苦参碱-PLGA-NS的透射电镜照片见图1。

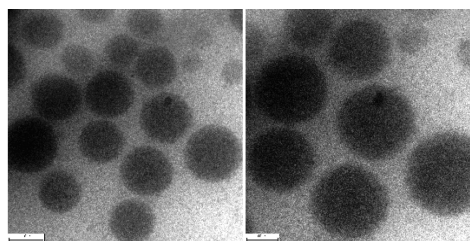


图1 苦参碱-PLGA-NS的透射电镜照片

3.2 HPLC测定药物含量^[9] 在本实验的色谱流动相条件下10 mg/L浓度苦参碱标准品溶液进样10 μl,见图2。

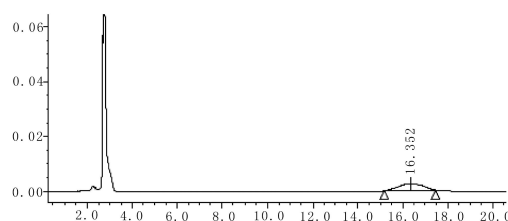


图2 苦参碱标准品溶液 HPLC图

3.3 标准曲线 利用HPLC测定药物含量,用苦参碱标准品配制

收稿日期:2008-06-19; 修订日期:2008-09-19

基金项目:安徽省自然科学基金(No.070413117);

安徽省教育厅自然科学基金项目(No.2006kj307b);

安徽医科大学校级教学研究项目

作者简介:陈 纭(1981-),男(汉族),安徽合肥人,现任安徽医科大学药学院助教,在职硕士研究生,主要从事药物分析研究工作。

*通讯作者简介:金 涌(1969-),男(汉族),安徽合肥人,现任安徽医科大学药学院教授,硕士生导师,博士学位,主要从事药剂学研究工作。

不同浓度溶液,以浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,得回归方程: $Y = 5.07 \times 10^5 X + 5.31 \times 10^3$,曲线见图 3。

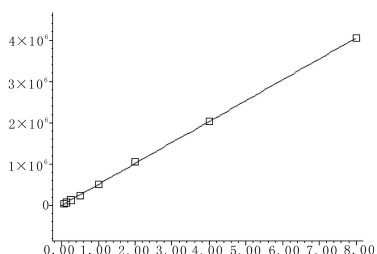


图 3 苦参碱标准品回归方程曲线

3.4 利用 HPLC测得苦参碱色谱峰面积,并通过标准回归方程计算出 M_1, M_2 ;通过“2.4 项中计算包封率,载药量及药物利用率的公式计算得肝靶向缓释苦参碱 - PLGA - NS的平均包封率 79.5%,平均载药量为 1.75%,平均药物利用率为 19.6%。

3.5 影响因素的考查 本实验采用单因素考查,只改变被考查因素的量值,其他条件不变;以载药量(DL),包封率(EE),药物利用率(DA),平均粒径(Dm)等作为因素考查的质量评价指标。实验采取 3次平衡实验所得数据求得平均值和标准差,其中标准差的计算公式为:

$$= \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

3.5.1 PLGA的浓度 将 PLGA用丙酮配制成不同浓度的溶液,制成苦参碱 - PLGA - NS,并测定 DL, EE, DA和 Dm等结果见表 1。

表 1 PLGA的浓度对纳米球质量的影响(聊±s)

浓度 C/g·L ⁻¹	DL (%)	EE (%)	DA (%)	Dm /nm
10.0	0.93 ± 0.15	70.43 ± 0.31	15.01 ± 0.36	109.1 ± 0.65
16.7	1.74 ± 0.1	79.5 ± 0.19	19.5 ± 0.15	190.5 ± 1.0
23	0.32 ± 0.08	62.01 ± 0.39	6.69 ± 0.2	189.6 ± 1.8
29.5	0.29 ± 0.13	70.1 ± 0.24	6.65 ± 0.15	240.2 ± 1.75
48	0.26 ± 0.1	75.5 ± 0.34	9.2 ± 0.14	320.4 ± 1.42

n = 3

由表 1可见,不同用量的 PLGA对 DL, EE, DA有明显影响,在一定范围内随着 PLGA浓度的增加,使苦参碱 - PLGA - NS的 DL, EE, DA均有所增加。但随 PLGA浓度的增加溶液较难通过 0.45 μm微孔滤膜,也难形成纳米级的颗粒纳米球收率较低,使 DL, EE, DA均降低。

3.5.2 理论载药量 以 0.5% Pluronic F68水溶液为水相, PLGA的浓度为 16.7 g/L,在其他条件不变的情况下,改变苦参碱药物的投药量,制备苦参碱 - PLGA - NS,并对苦参碱 - PLGA - NS的 DL, EE, DR和 Dm进行测定。结果见表 2。

表 2 投药量对纳米球质量的影响(聊±s)

理论值 DL (%)	DL (%)	EE (%)	DA (%)	Dm /nm
5.2	1.20 ± 0.11	83.95 ± 0.28	26.55 ± 0.45	119.0 ± 1.3
11.1	1.45 ± 0.05	79.50 ± 0.35	24.16 ± 0.33	174.9 ± 0.9
17.5	1.75 ± 0.12	79.01 ± 0.21	18.95 ± 0.15	183.6 ± 1.1
25.01	5.45 ± 0.16	52.60 ± 0.42	8.01 ± 0.18	196.5 ± 0.7
32.05	6.29 ± 0.13	46.5 ± 0.60	6.15 ± 0.33	200.5 ± 2.0

由表 2可见,改变投药量对 DL, EE, DR有明显影响,随着用量的增加使实际载药量显著增加,粒径也会增大,但 DL, EE, DR均减少。

3.5.3 Pluronic F68浓度 将 Pluronic F68配制成不同浓度的溶液,制备苦参碱 - PLGA - NS,并对其 DL, EE, DR和 Dm进行测定。结果见表 3。

由表 3可见, Pluronic F68在一定浓度范围内(0.1% ~ 0.5%)时, DL, EE, DR和 Dm均改变较小;但当其浓度继续增大时, DL, DA显著增大,到达 0.5%时最大;可是继续增加浓度(到 10%)时, DL, EE, DR会明显下降。

表 3 Pluronic F68浓度对纳米球质量的影响(聊±s)

浓度 (%)	DL (%)	EE (%)	DA (%)	Dm /nm
0.1	1.96 ± 0.15	93.6 ± 0.36	17.98 ± 0.30	190.50 ± 1.33
0.5	1.80 ± 0.12	80.05 ± 0.26	19.02 ± 0.13	185.0 ± 1.13
2.5	5.50 ± 0.99	94.90 ± 0.33	49.85 ± 0.24	149.60 ± 2.24
5	9.00 ± 0.12	89.20 ± 0.17	82.36 ± 0.14	120.36 ± 0.89
10	3.10 ± 0.27	40.55 ± 0.38	80.62 ± 0.71	100.96 ± 1.82

3.5.4 水相的用量 以 0.5% Pluronic F68水溶液为水相, PLGA的浓度为 16.7 g/L,油相体积不变,水相体积增加,制备苦参碱 - PLGA - NS,并对其 DL, EE, DR和 Dm进行测定。结果见表 4。

表 4 水相体积对纳米球质量的影响(聊±s)

V油	V水	DL (%)	EE (%)	DA (%)	Dm /nm
0.3	1	0.91 ± 0.14	95.63 ± 1.30	8.52 ± 1.25	196.6 ± 1.3
0.3	3	0.90 ± 0.07	84.69 ± 2.13	9.65 ± 1.38	185.1 ± 2.0
0.3	5	1.81 ± 0.16	80.55 ± 0.27	20.60 ± 0.18	183.6 ± 1.0
0.3	10	8.56 ± 1.34	87.02 ± 1.23	80.01 ± 1.12	180.9 ± 1.7

由表 4可见,水相的用量对所制备苦参碱 - PLGA - NS的 EE, Dm的影响较小,不明显;但当水相体积继续增加由 10 ml增至 100 ml时, DL和 DA显著提高。

3.5.5 有机溶剂的用量 水相体积不变,改变油相体积,制备苦参碱 - PLGA - NS,并对其 DL, EE, DR和 Dm进行测定。结果见表 5。

表 5 油相体积对纳米球质量的影响(聊±s)

体积 (ml)	DL (%)	EE (%)	DA (%)	Dm /nm
1	1.1 ± 0.4	87.10 ± 0.58	11.05 ± 0.36	305.5 ± 2.5
3	1.8 ± 0.1	78.60 ± 0.19	20.27 ± 0.18	190.86 ± 1.2
5	2.1 ± 0.1	95.23 ± 0.08	20.11 ± 0.59	163.20 ± 1.48
7	0.8 ± 0.1	79.95 ± 1.15	9.56 ± 0.45	295.63 ± 0.88
10	5.01 ± 0.2	94.11 ± 0.92	45.12 ± 0.21	150.60 ± 2.83

由表 5可见,有机溶剂的用量对所制备苦参碱 - PLGA - NS的 Dm的影响较大,无论太多或太少都会引起粒径变大;但在一定的范围内增加, DL和 DA显著提高;只是由于本实验需要将有机溶剂在搅拌下除尽,若用量太多,只有增加搅拌时间才可除去,这样会对药物制剂的稳定性产生不利影响。

3.5.6 温度 将苦参碱与 PLGA的有机相分别加入至 10, 25, 60 水相中,制备苦参碱 - PLGA - NS,并对其 DL, EE, DR和 Dm进行测定。结果见表 6。

表 6 温度对纳米球质量的影响(聊±s)

温度 (°C)	DL (%)	EE (%)	DA (%)	Dm /nm
10	7.3 ± 0.2	84.2 ± 1.1	76.84 ± 0.71	195 ± 1
25	7.5 ± 0.4	86.75 ± 0.78	79.66 ± 0.82	186 ± 3
60	7.2 ± 0.2	84.62 ± 1.08	77.20 ± 1.41	202 ± 2

由表 6可见,温度对苦参碱 - PLGA - NS的 DL, EE, DR和 Dm均无明显影响,但是温度过高影响 PLGA的稳定性,使其发生降解;温度过低不利于有机溶剂的挥发。故实验时选择室温条件较适宜。

4 讨论

纳米粒的制备方法有乳化聚合法,液中干燥法,天然高分子凝聚法,自动乳合法,盐析法等。本实验采用乳化溶剂挥发法制备苦参碱 - PLGA - NS,此法主要利用机械搅拌法制备载药纳米粒,工艺简便且避免了一些如含氯等有机溶剂的使用,同时制得的苦参碱 - PLGA - NS的外观圆整,粒径可控制在 50 ~ 200 nm范围内,且分散均匀,其包封率和载药量也较高。制备苦参碱 - PLGA纳米球基本达到设计要求,该制剂有望成为一种新的药物靶向载体系统。

本实验所采用的药用有机高分子材料乳酸 - 羟基乙酸共聚物 [poly(lactic - co - glycolic acid), PLGA],是由乳酸和乙醇酸以不同比例嵌嵌共聚而成的高分子纳米材料,其兼有两种聚酯材料的优势,如质量稳定,生物惰性,生物可降解性且降解速度可调节等优点,由于其优良的生物相容性和生物降解性,被广泛用作

纳米球 (nanosphere, NS) 的载体材料, 可延长药物作用时间, 从而达到靶向目的, 提高药物疗效。

本实验采用流动相加入三乙胺等方法调节 pH 值使峰形对称, 在本实验采用的色谱条件下, 保留时间约为 16.3 min, 峰形良好, 分离度及理论塔板数均达到要求, 纳米粒用有机溶剂溶解后测定, 杂质峰不干扰检测。

在多次实验过程中, 发现诸多因素对于纳米粒的制备产生影响, 故采用单因素考察方法对于部分影响因素进行考察研究即固定其他条件不变, 通过改变某种因素从而对所制得的纳米粒的形态质量进行研究比较, 得出制得所需纳米粒的最适条件。通过处方因素实验发现, 有机溶剂的用量, 水相的体积, Pluronic F₆₈ 的用量, PLGA 的浓度以及温度等对于纳米粒的载药量, 包封率等有着重要影响, 其中部分因素如温度等对载药量, 包封率等影响不大, 但对于纳米成型及其质量等有着不同程度的影响, 故实验过程中应注意实验条件的选择, 具体影响程度及适宜条件在正文影响因素考察中作了具体详细的介绍。此外, 由于一些原因, 本实验对纳米球制备的影响因素考察并不完善, 据实验者考虑可能有以下因素对于其制备也有影响, 如: 搅拌的时间与速度, Pluronic 的种类, pH 值得大小和介质的离子强度等。

参考文献:

[1] 胡波, 王亚玲. 安络化纤丸联合氧化苦参碱治疗慢性乙型肝炎

纤维化的近期疗效观察 [J]. 全国医药学术交流暨临床药理学研究进展培训班资料汇编, 2006, 12(8): 93.

- [2] 徐彬, 杨惠娣, 侯爱君. 苦参碱治疗慢性病毒性肝炎的作用 [J]. 国外医药·合成药·生化药·制剂分册, 2002, 23(6): 356.
- [3] 李正蓉. 苦参碱的药理与临床研究进展 [J]. 华西药理学杂志, 2003, 18(6): 435.
- [4] Li CY. The research of liver targeted dosage system [J]. Emerg Tradchin Med (Chinese), 2001, 10(6): 354.
- [5] 张耕, 易以木. 苦参素磷脂纳米粒的研制 [J]. 中国医院药学杂志, 2004, 24(9): 573.
- [6] Allemann E, Gummy R, Doelker E. Drug-loaded nanoparticles - preparation methods and drug targeting issues [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 42(6): 174.
- [7] Zur Muhlen A, Schwarz C, Mehnert W. Solid lipid nanoparticle (SLN) for controlled drug delivery - drug release and release mechanism [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2006, 47(3): 147.
- [8] 康康, 胡容峰, 马凤余, 等. 水飞蓟宾可注射用肝靶向缓释纳米球的制备及影响因素考察 [M]. 2007 安徽药剂学学术年会论文集, 2007: 48.
- [9] 杨雪, 王琳慧, 白小红. 液相微萃取/后萃取-高效液相色谱法测定苦参碱和氧化苦参碱的含量 [J]. 南昌大学学报 (理科版), 2006, 16(10): 548.

◇ 临床报道 ◇

多囊卵巢综合征患者中医证候特点的研究

谢毅强¹, 黄元华², 徐雯², 卢伟英², 牛乾¹

(1. 海南医学院, 海南海口 571101; 2. 海南医学院附属医院生殖中心, 海南海口 570102)

摘要: 目的 探讨多囊卵巢综合征患者中医证候的特点。方法 100 例多囊卵巢综合征 (PCOS) 患者按中医证候分为肾虚、肝郁、痰阻 3 组, 并观察舌象和脉象以及病程和中医证候之间的关系。结果 PCOS 患者年龄主体在 25 ~ 35 岁。肾虚型舌色以淡为主, 舌苔主要以黄白为主, 脉象以细为主; 肝郁型的病程大多在两年以上, 舌色以红为主, 舌苔以黄苔居多, 脉象以弦脉为主; 痰阻型患者的病程以 5 年以上的居多, 舌色以红为主, 舌苔以腻为主, 脉象以濡滑为主。结论 PCOS 患者的舌象脉象均符合中医基础理论对证候的认识。用客观的方法分析中医证候之间的区别与联系, 可以更好地认识中医证候的本质。

关键词: 多囊卵巢综合征; 中医证候; 特征

中图分类号: R7111/719 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-0805 (2009) 05-1205-02

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 被认为是一种发病多因性, 临床表现呈多态性的内分泌失调综合征, 是导致育龄期妇女月经紊乱, 无排卵性不孕最常见的病因, 目前在中西医领域都被视为难治性妇科疾病, 尤其好发生于育龄妇女。由于当代女性面对众多工作生活压力, 多囊卵巢综合征的患病率也愈来愈高, 已达到 5% ~ 10% 左右。临床表现除月经失调、闭经或不孕外, 还常伴有一些特殊体征, 如多毛、肥胖、皮肤粗糙、面部痤疮等, 使许多女性生活在心理和生理的负担之下, 同时它还增加了患子宫内膜癌、2 型糖尿病、心血管疾病及呼吸睡眠暂停综合征的风险^[1]。中医药对本病治疗的疗效肯定, 且不良反应少。但探究历年来中医辨证论治上的许多种类型, 这些类型从未能得到明确的统一和证实, 而每种分型又有其相对应的治法, 因此, 辨

证清晰准确与否是至关重要的, 直接关系到治疗方药的选用及疗效好坏。本研究通过部分中医四诊资料, 对 PCOS 临床中医证候的特点进行探讨, 为该病辨证论治规律的研究辨病、辨证结合的诊疗体系奠定基础。

1 资料与方法

1.1 临床资料 2007-10 ~ 2008-03 在海南医学院附属医院生殖中心就诊的育龄妇女 100 例。年龄 24 ~ 42 岁, 平均 (30.96 ± 3.80) 岁。PCOS 的诊断标准: 临床症状: 月经稀发或闭经, 基础体温测定 2 周期无排卵; 高雄激素的临床特征: 多毛、痤疮等, 和 (或) 生化指标: LH/FSH 2, 睾酮 T 升高或正常; B 超监测: 多囊性改变, 一个切面直径小于 9 mm 的小卵泡约 12 个。符合其中两项者诊为 PCOS^[2]。中医证候分类标准参照《中药新药临床研究指导原则》^[3]分为肾虚型 (主症: 畏寒肢冷、五心烦热、月经量少色淡; 次症: 腰膝酸软、咽干口渴、头晕心悸、齿松发脱), 肝郁型 (主症: 月经不调、色紫红有血块、乳房作胀; 次症: 情志抑郁、口干喜冷、大便秘结、毛发浓密), 痰阻型 (主症: 胸脘痞闷、闭经月经量少色淡、体型肥胖; 次症: 多毛皮糙、食少口腻、肢体困重、便秘痰结)。符合中医证候诊断及西医疾病诊断且自愿受试者纳入观察病例。

收稿日期: 2008-04-21; 修订日期: 2008-07-22

基金项目: 海南省卫生厅计划项目 (Na 琼卫 2006 - 23)

作者简介: 谢毅强 (1972-), 男 (汉族), 广东梅县人, 现任海南医学院中医学系讲师, 博士学位, 主要从事中医药防治内分泌及代谢疾病的临床与实验研究工作。