黄芩苷纳米粒制备方法的初步研究*

★ 卢燕香[1**] 张海燕[1] 郭兆荣[1,2] 付丽娜[1] 陈晓燕[1] 张明令[1] 杨明[1***] (1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004;2. 赣南医学院 赣州 341000)

摘要:目的:建立乳化溶剂挥发法制备黄芩苷纳米粒的方法。方法:以聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)为材料,采用乳化溶剂挥发法,对黄芩苷原料药进行包合制备纳米粒并对制备工艺进行了初步的研究。结果:以浓度为 10 mg/ml 的聚合物,pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液作为内水相,油相中加入丙酮制成的纳米粒粒径可控、包封率可达 50% 以上。结论:该方法制成的纳米粒较稳定,重复性好,可作为制备黄芩苷纳米粒的一项新工艺。

关键词:黄芩苷纳米粒;乳化溶剂挥发法;制备工艺
中图分类号:R 944.1 **文献标识码**:A

Preliminary Study on Preparation Method of Baicalin Nanoparticles

LU Yan-xiang[1], ZHANG Hai-yan[1], GUO Zhao-rong[1,2], FU Li-na[1], CHEN Xiao-yan[1], ZHANG Ming-ling[1], YANG Ming[1]
1. *Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004;
2. *Gannan Medical College*, *Ganzhou* 341000

Abstract: Objective: To develop an emulsion solvent evaporation technique for the preparation of Baicalin nanoparticles. Methods: Baicalin nanoparticle was prepared by emulsion solvent evaporation method using Poly lactic acid - glycolic acid (PLGA) for the material. Results: The nanoparticles prepared by emulsion solvent evaporation technique were round and uniform in size with Polymer concentration of 10mg/ml and pH7.0(PBS) solution as the inner water phase and the oil phase by adding acetone. The drug encapsulation efficiency of most preparions were more than 50%. ,and there particle size could be controlled. Conclusions: The Baicalin nanoparticle thus prepared is stable. The method is a new technology for preparing the Bailin nanoparticles.

Key word: Baicalin nanoparticle; emulsion solvent evaporation technique; Preparation technology

●中药研究●

境三叶木通各样品叶片的 POD 同工酶差异明显,酶谱带数先少后多,充分体现了同工酶具有阶段特异性;同一发育时期不同生境下三叶木通各样品叶片 POD 同工酶也有明显差异,反映其对不同生态环境的适应性,POD 可作为品种鉴定的生化指标;同一发育时期不同生境三叶木通各样品叶片的 SOD 同工酶酶谱表现一致,不同发育时期同一生境下三叶木通各样品叶片 SOD 同工酶酶谱有些微差异,也即三叶木通各样品叶片的 SOD 同工酶较稳定。

聚丙烯酰胺凝胶电泳技术操作简便,重现性好,电泳谱带稳定可靠,可应用于三叶木通的种质分析。

参考文献

[1]刘占朝. 三叶木通研究进展综述[J]. 河南林业,2005,25(1):20-22.
[2]庞发虎,赵旗峰,张俊民,等. 一种值得开发的野生果树—— 三叶木通[J]. 山西果树. 2002,7(3):25.
[3]汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2000.
[4]胡能书,万国贤. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1985.

(收稿日期:2009-08-03)

* 基金项目:江西省卫生厅中医科研计划(赣卫中字[2007]20 号);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ08335)
** 作者简介:卢燕香,女,汉族,硕士研究生,研究方向为中药新剂型。
*** 通讯作者:杨明,男,教授,博士生导师,从事中药新剂型与新制剂的研究。Tel:0791-7118658,E-mail:yangming16@126.com。

http://www.ajutcm.com

黄芩苷(Baicalin,BC),是中药黄芩的主要成分,用于治疗中风和瘫痪,可降低脑血管阻力,增加脑血流量,减轻组织的缺血再灌注损伤,具有明显的神经细胞保护作用[1~2];对大鼠、家兔脑水肿的治疗有积极的意义[3],但是黄芩苷稳定性不佳,脂溶性和水溶性都较差,口服生物利用度低,在血液中达峰时间为 2 ~4 小时,24 小时后大部分消除,需要频繁给药。此外,由于黄芩苷脂溶性低,不易透过血脑屏障,因此探索其脑靶向制剂的制备方法具有一定的理论和实际意义。而采用生物降解材料制备黄芩苷纳米粒(Nanoparticles,NP)可望解决此问题,并利用纳米粒的靶向缓控释作用,可在一定程度上提高药物疗效,降低毒副作用。本文探讨了采用生物相容性好、可生物降解的高分子材料—聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)作为纳米载体制备 BC-PLGA-NP 的制备工艺,为 BC-PLGA-NP 的进一步研究奠定了基础。

1　实验仪器与试剂

79HW-1 恒温磁力搅拌器(江苏金坛市金城国胜实验仪器厂);QYC-200 全温空气摇床(上海福玛实验设备有限公司);KQ-400DB 型数控超声波清洗器(昆明市超声有限公司);FA1104 型电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司); SIGMA3-18K 型高速冷冻离心机(厦门精艺兴业科技有限公司); Agilent1200 高效液相色谱仪(Agilent 科技有限公司); Hypersil ODS2 4.6 mm × 250 mm(大连依利特分析仪器有限公司);JY92-II 型超声细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Malvern 纳米粒度仪(英国马尔文公司);

黄芩苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110715-200514);黄芩苷提取物(纯度 = 95%);水为纯化水;乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA ,相对分子质量 15 000 ,中国科学院成都有机化学研究所);聚乙烯醇(PVA Mw 31 000 -50000,ALDRICH 公司);甲醇(分析纯)(上海振兴化工一厂);甲醇(色谱纯)(江苏汉邦科技有限公司);二氯甲烷(化学纯)(上海实验设计有限公司);自制磷酸盐缓冲液(pH7.0)。

2　方法与结果

2.1　BC-PLGA-NP 制备工艺的研究

2.1.1　*制备方法的选择*　根据预实验并结合参考文献选用复乳乳化溶剂挥发法[3~5]制备 BC-PLGA-NP。方法为以一定浓度黄芩苷的磷酸盐缓冲盐溶液(pH = 7.0)水溶液为内水相,PLGA 的二氯甲烷和丙酮混合溶液作为有机相,两相混合,冰浴超声形成初乳;立即将初乳注入到含有一定浓度的 PVA 水溶液中,冰浴超声形成复乳;磁力搅拌(1200 $r \cdot min^{-1}$) 4 h 使二氯甲烷完全挥发,离心(13000 $r \cdot min^{-1}$,1h, 4 ℃),蒸馏水洗涤三次,收集沉淀,冷冻干燥,将样品于 4 ℃保存。同法制备不含黄芩苷的 PLGA 空白纳米粒。该方法操作简单,所用有机溶剂能在搅拌中除去。

2.1.2　*质量评价指标的确定*　制备工艺考察时,选用了包封率、药物利用率、粒径等作为评价 BC-PLGA-NP 胶体溶液质量的指标。其中包封率、药物利用率越高越好,粒径应大小适中,均匀。

(1)包封率、载药量、药物利用率的概念和计算方法。包封率(Envelope Ratio,ER)是指胶体体系中载带于 NP 上的药物与胶体体系中药物总量的比值,ER 越高表示体系中载上 NP 的药物量越多,游离药物少,它是纳米制剂质量的一个重要考察指标。

载药量(Drug Loading,DL)是指单位载体材料上所能载带药物的量,它主要是对载体材料载药性能的一个考察,DL 高才能保证有足够量的药物以达到治疗的目的。

药物利用率(Recovery Yield,RY)是指最终得到的胶体体系中药物量与投入制备体系中的药物量的比值,RY 越高表明药物的利用率(或产率)高,它主要是考察药物在制备中的利用和损失。

$$ER = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

$$DL = \frac{W_1 - W_2}{W_{PLGA}} \times 100\%$$

$$PY = \frac{W_1 - W_2}{W_0} \times 100\%$$

式中为纳米粒混悬溶液中 BC 的量,为纳米粒混淆液中低温高速离心后上清液中 BC 的量,为投入制备体系中的 BC 量,由制备时的加入量求得。为混悬液中载体材料的 PLGA 质量,由加入时的量求得。

(2)粒径的测定。本论文在制备 BC-PLGA-NP,通过鼻腔粘膜给药和纳米粒制剂学手段,实现鼻粘膜吸收和在脑部达到缓控制释放,所以鉴于鼻腔给药,同时考虑包封率和载药量,NP 的粒径应控制在 200nm 左右。在制备工艺初步考察及工艺优化时用 Malvern Zetasizer nano-zs90 粒度测定仪测定 BC-PLGA-NP 粒径及其分布。

(3)包封率的测定。采用 HPLC 法取一定量黄芩苷 PLGA 纳米粒混悬液在 4 ℃13 800 r/min 离心

http://www.ajutcm.com

1h,然后取上清液 20ul 进样记录 HPLC 色谱峰的峰面积(A),由标准方程 $y = 4\ 596.6x - 2.255\ 1$(R^2 = 0.999 7)求算出上清液中的药物浓度,计算包封率。

2.2 单因素实验

2.2.1 内水相 pH 值的影响[6] 由于黄芩苷脂溶性差,水溶性差,采用复乳乳化溶剂挥发法制备纳米粒时需解决黄芩苷在内水相中的溶解度,黄芩苷易溶于碱液中,但在 pH 值≥7.2 的碱性溶液中随着 pH 值的升高稳定性减小,在 pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中溶解度达到 29.29 mg/ml,且黄芩苷在此 pH 值的 PBS 较稳定,所以制备工艺中一直采用一定浓度的黄芩苷 pH 为 7.0 的 PBS 溶液做内水相。

2.2.2 有机溶剂组成对纳米粒包封率的影响

表 1 有机溶剂组成对纳米粒包封率的影响

$V_{CH_2Cl_2}:V_{CH_3COCH_3}$	ER(%)	DL(%)	乳光
1:00			无乳光
1:01	55.2	5.0	澄清透明蓝色
1:02	38	3.5	澄清透明蓝色
1:04	26	2.4	澄清透明蓝色

在有机溶剂的组成中加入一定量的与水互溶的有机溶剂,对纳米粒的形成有利,用得较多的是丙酮。本实验加入一定量的丙酮可以得到包封率为 55.2% 粒径合适的澄清透明纳米粒胶体溶液,但随着有机相中丙酮的增加包封率明显下降,主要原因是丙酮是亲水性有机溶剂,大量的丙酮相向外水相外泄导致药物泄露到外水相中,所以包封率明显降低。

2.2.3 外水相中乳化剂浓度对纳米粒包封率的影响

表 2 外水相中乳化剂浓度对纳米粒包封率的影响

Emulisier(%)	DL(%)	ER(%)	乳光
0.5	51.2	4.7	澄清透明蓝色
1	46	4.2	半澄清透明蓝色
1.5	46.5	4.2	半澄清透明蓝色
2	48	4.4	半澄清透明蓝色

PVA 的浓度较高时,乳化能力较强,可以在乳滴表面形成牢固的界面膜,阻碍药物的扩散和流失,包封率本应相应提高,但 PVA 浓度越高粒径越小,导致包封率减小,同时混悬液粘度越大导致冷冻高速离心时 NP 离心不下来。因此 PVA 的质量浓度对纳米粒的包封率有明显影响。如果浓度太低,聚合物乳滴发生聚集,且很难恢复。反之,如果太高,由于药物与稳定剂之间的相互作用会使药物包封率下降。

2.2.4 聚合物浓度对纳米粒包封率的影响

表 3 聚合物浓度对纳米粒包封率的影响

PLGA /ml·kg^{-1}	ER(%)	DL(%)	乳光
20	52	4.7	澄清透明蓝色
30	78	3.7	半澄清透明蓝色
40	79	2.5	半澄清透明蓝色

聚合物浓度越高,药物被包裹越完全,药物利用有一定的增高,包封率越高,但由于载体材料增加使得载药量急剧下降,粒径也随着增大,由于 PLGA 价钱较高,考虑耗材的问题,单因素考察还是选用 PLGA 浓度为 10 mg/ml。

2.2.5 投药量对纳米粒包封率的影响

表 4 投药量对纳米粒包封率的影响

BC/ml·kg^{-1}	ER(%)	DL(%)	乳光
5	52	4.7	澄清透明蓝色
10	55	5	澄清透明蓝色
15	53	4.8	澄清透明蓝色

黄芩苷投药量的增加对黄芩苷-PLGA-NP 的载药量影响不大,但却明显地降低了黄芩苷的回收率,导致原料浪费,因此不能采用增加投药量的方法来增加包封率和载药量。

2.2.6 外水相 pH 值对纳米粒包封率的影响[7]

表 5 外水相 pH 值对纳米粒包封率的影响

pH	ER(%)	DL(%)	乳光
2	—	—	—
5	5	85	澄清透明蓝色
7	19	1.7	黄色

由于黄芩苷在碱性环境中溶解,在 pH≤7 环境中不溶,因而减小外水相的 pH 值可减少黄芩苷在外水相的溶解度,减少黄芩苷在内外水相之间的浓度差和减少黄芩苷向外水相扩散,有利于纳米粒包封率和载药量增加,pH2.0 中黄芩苷很容易以晶体析出,导致包封率偏低,而 pH7.0 导致药物很容易外泄到外水相中,包封率下降。本试验外水相的 pH 值以 5.0 最佳。

2.2.7 超声乳化强度对 DL、RY 的影响

表 6 超声乳化强度对 DL、RY 的影响

超声强度/W	ER(%)	DL(%)	乳光
160	36	3.2	半澄清透明蓝色
180	45	4.1	澄清透明蓝色
200	54	4.9	澄清透明蓝色
220	40	3.6	澄清透明蓝色偏黄色

超声强度对 BC-PLGA-NP 的载药量及药物利用率均有较大的影响,超声强度在 200W 时,载药量及药物利用率最大,低于或高于这个强度,载药量及药物利用率均下降,因为强度太低,乳化不够完全不利于载体材料包裹药物,同时强度太高,会破坏乳滴的形成,导致药物外泄,药物包封率及药物利用率均下

江西中医学院学报 Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine
http://www.ajutcm.com

降。

2.2.8　超声乳化时间对 DL、RY 的影响

表 7　超声乳化时间对 DL、RY 的影响

超声时间 /s	ER(%)	RY(%)	乳光
90	36	3.3	半澄清透明蓝色
120	56	4.3	澄清透明蓝色
150	47	4.3	澄清透明蓝色
180	40	3.6	澄清透明蓝色偏黄色

超声乳化时间对 BC-PLGA-NP 的载药量及药物利用率有一定的影响，随着超声乳化时间的延长，包封率及药物利用率均出现一定的下降，说明在制备时超声乳化时间不宜过久，乳液乳化均匀即可，所以选择 120s 为 NP 超声乳化时间。

2.2.9　内水相比油相体积比对 DL、RY 的影响

表 8　内水相比油相体积比对 DL、RY 的影响

内∶油(v∶v)	ER(%)	RY(%)	乳光
1∶01	25	2.3	半澄清透明蓝色
1∶03	42.2	3.8	澄清透明蓝色
1∶05	56.1	5.1	澄清透明蓝色
1∶10	39	3.5	澄清透明蓝色

油相体积对 BC-PLGA-NP 的包封率及药物利用率有重要的影响。油相体积小导致油相中的材料不能有效包裹内水相中的药物，不利于初乳的形成，油相体积过大，乳化不均匀，初乳容易分层，同样不利于包封率和药物利用率的提高。

2.2.10　水相体积比对 DL、RY 的影响

表 9　内水相比油相体积比对 DL、RY 的影响

水相体积 /ml	ER(%)	DL(%)	乳光
20	25	2.3	半澄清透明蓝色
25	49.8	4.5	澄清透明蓝色
30	50.4	4.6	澄清透明蓝色

水相体积对 BC-PLGA-NP 的包封率及药物利用率有明显的影响。随着水相体积的增加，包封率及药物利用率均升高，说明在制备 BC-PLGA-NP 时水相体积不宜过小。

2.2.11　搅拌时间对 DL、RY 的影响

表 10　搅拌时间对 DL、RY 的影响

水相体积 /ml	ER(%)	DL(%)	乳光
20	25	2.3	半澄清透明蓝色
25	49.8	4.5	澄清透明蓝色
30	50.4	4.6	澄清透明蓝色

随着挥发时间的延长 BC-PLGA-NP 的包封率及药物利用率均出现明显下降，但挥发时间太短，有机溶剂将挥发不完全，影响冷冻干燥，挥发时间太长，药物容易外泄，故挥发时间的选择宜适当，既能保证有机溶剂尽可能挥发完全，又不致使包封率和回收率太低。

2.2.12　内水相中加入聚乙烯醇(PVA)可促进包封率的提高[8]　本实验还考察了挥发温度、恒温磁力搅拌转速、离心转速对纳米粒包封率及药物利用率的影响，发现这几个因素对纳米粒的粒径及包封率没有明显影响，所以挥发时间以 20～25 ℃，搅拌转速为 1 200 r/min、离心转速为 13 000 r/min。

3　小结与讨论

纳米粒的质量考察指标主要有载药量、包封率和粒径。纳米粒制备有两个难点：一是粒径控制，二是高效载药。在本论文中，我们采用改良的乳化溶剂挥发法，可以制得平均粒径在 200 nm 左右的纳米粒，包封率多数在 50% 以上。在制备过程中，选择合适的乳化剂浓度、聚合物浓度、药物浓度、外水相 pH 值等是制备纳米粒的关键因素所在，由于黄芩苷特殊的理化性质，在制备初级阶段，载药量还比较低，需优化因素，以提高纳米粒的载药量和包封率。为制备目标纳米粒打下了基础。

参考文献

[1] Li H, Wang H, Chen JH, et al. Determination of amino acid neurotransmitters in cerebral cortex of rats administered with baicalin prior to cerebral ischemia by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection[J]. J Chromatogr B Anarlyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 788(1): 93－101.

[2] 陈群，曾因明，王建国. 黄芩苷的脑保护作用和对微管运动蛋白免疫活性的影响[J]. 中国药理学通报，2001，17(1)：117－118.

[3] Seung HO choi, Tae Gwan Prak. G-CSF loaded biodegradable PLGA nanoparticles prepared by a single-oil-in water emulsion method[J]. Int J Pharm, 2006, 311: 223－228.

[4] Thirumala Govender, Snjezana Stolnik, Martinc, Garnet, Lisbeth. Iuum, StanleyS. Dwis. PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug[J]. J Control Release, 1999, 57: 171－185.

[5] 称蜀，张志荣，石海涛，等. 复乳法制备阿柔比星 A 的聚乳酸-聚乙醇酸共聚物纳米粒影响包封率因素考察[J]. 中国抗生素杂志，2005，30(6)：338－340.

[6] 陈国广，周本谦，李学明. 5-氟尿嘧啶 PLGA 纳米粒的制备及其体内外研究. 中国药科大学学报，2006，37(5)：423－427.

[7] Meng Shi, Yi-Yan, Cheng-Shu Cha. Double walles POE/PLGA microspheres: encapsulation of water-soluble and water-insoluble proteins and their release properties[J]. J Control Release, 2003, 89: 167－177.

[8] Yan P, HY Zhao, Hui X, et al Effect of experimental parameters on the encapsulation of insulin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by a double emulsion method[J]. J Chin Pharma Sci, 2002, 11(1): 38－41.

(收稿日期：2009-07-28)

江西中医学院学报 Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine
http://www.ajutcm.com