

星点设计-效应面法优化银杏内酯 B 纳米冻干制剂的制备工艺及其体外释放研究

祝露佳^{1,2}, 陈礼迎¹, 郑爽¹, 范露慧¹, 梁伟宗¹, 俞洁佳¹, 熊阳^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

2. 绍兴文理学院附属医院, 浙江 绍兴 312000

摘要: 目的 为解决银杏内酯 B (GB) 溶解度小、体内消除快、长期放置稳定性差等缺陷, 用一种全新的可生物降解的多糖聚合物作为载体材料, 将 GB 制备成具有缓释作用的冻干纳米制剂。方法 采用亲水性聚合物凝聚法制备银杏内酯 B 纳米粒 (GB-NP), 以平均粒径和分散系数 (PDI) 作为评价指标, 采用 Design-Expert 8.0 软件进行星点设计, 考察 GB 的浓度、GB 与聚合物的质量比、聚合物溶液的 pH 值等因素对评价指标的影响, 应用效应面法得到优化的制备工艺, 进一步制备成冻干制剂并对其进行体外释放等考察。结果 优化的处方条件: GB 质量浓度为 1.5 mg/mL、GB 与聚合物的质量比为 0.1、聚合物溶液 pH 5.0。包封率为 $(99.64 \pm 0.45)\%$, 载药量为 $(9.04 \pm 0.04)\%$, 粒径为 (192.8 ± 2.8) nm, PDI 为 0.18 ± 0.03 。冻干条件为以 1% 的甘露醇为冻干保护剂, GB-NP 溶液置 -80°C 预冻 12 h, 在 -40°C 、5 kPa (0.05 bar) 条件下干燥 24 h。GB-NP 的体外释放度结果显示, GB 原料药 1 h 累积释药率达到 $(64.74 \pm 3.95)\%$, 而 GB-NP 1 h 时累积释药率为 $(36.90 \pm 1.41)\%$ 。结论 该生物可降解的多糖聚合物可解决 GB 在水中的溶解度小、不便于制备成静脉注射剂的问题, 而且还能使 GB-NP 具有良好的缓释作用。

关键词: 银杏内酯 B; 多糖; 聚合物; 纳米粒; 制备工艺; 星点设计-效应面法; 体外释放

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)22-5439-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.22.009

Optimization of freeze-dried nanoparticles of ginkgolide B by central composite design-response surface methodology and their *in vitro* release studies

ZHU Lu-jia^{1,2}, CHEN Li-ying¹, ZHENG Shuang¹, FAN Lu-hui¹, LIANG Wei-zong¹, YU Jie-jia¹, XIONG Yang¹

1. College of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

2. Affiliated Hospital of Shaoxing University, Shaoxing 312000, China

Abstract: Objective In order to solve the problem of ginkgolide B (GB) for preparing the intravenous injection dosage form, such as its low solubility, rapid elimination *in vivo* and poor stability in long-term storage, a novel biodegradable polysaccharide polymer was used as a carrier to encapsulate GB into nanoparticles with sustained-release profile, which then was freeze dried for keep its stability. **Methods** GB nanoparticles (GB-NP) were prepared by coacervation method with hydrophilicity polymer. The Design-Expert 8.0 software was applied for experimental design. The formulation was finalized by investigating the concentration of GB, the mass ratio of GB to polymer, and the pH of the polymer solution with size and polydispersity index as the evaluation parameters. The optimum formulation and technique were selected by response surface method. Then the nanoparticle suspension was further freeze dried and *in vitro* release behavior was tested in PBS containing 30% ethanol. **Results** The optimum prescription conditions were as follows: the concentration of GB was 1.5 mg/mL, the ratio of GB mass to polymer mass was 0.1 and the polymer solution pH was set at 5.0. The entrapment efficiency was $(99.64 \pm 0.45)\%$ with the drug loading ratio of $(9.04 \pm 0.04)\%$. Average particle size of GB-NP was (192.8 ± 2.8) nm with a preferable PDI of 0.18 ± 0.03 . The freeze-drying conditions were described as follows: using 1% mannitol as freeze-drying supporting agent, the solution of GB-NP was pre-frozen for 12 h at -80°C and dried for 24 h at -40°C . The release behavior of free GB was rapid with the cumulative release rate reaching $(64.74 \pm 3.95)\%$ during the first hour, while the cumulative release rate

收稿日期: 2019-06-25

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81774011); 国家自然科学基金面上项目 (81202926)

作者简介: 祝露佳 (1992—), 女, 在读硕士, 初级中药师, 研究方向为中药新剂型与新型给药系统。Tel: (0571)61768158 E-mail: luke5983@163.com

*通信作者 熊阳 (1979—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药新剂型与新型给药系统。Tel: (0571)61768158 E-mail: xyxn@126.com

of GB in nanoparticles was $(36.90 \pm 1.41)\%$ during the first hour. **Conclusion** The GB-NP using this special biodegradable polysaccharide polymer can improve GB's dissolution behavior in water and make GB sustained release *in vitro*, which is beneficial for preparing GB's intravenous injection dosage form.

Key words: ginkgolide B; polysaccharide; polymer; nanoparticles; preparation technology; central composite design-response surface methodology; *in vitro* release

银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 是银杏内酯中生理活性最强、迄今发现的最有效的血小板活化因子受体拮抗剂^[1-2], 具有抗休克、抗过敏、抗菌、抗炎、保护中枢神经系统和减少缺血性损伤等功效^[3-12]。常用的含 GB 或以 GB 为主要药效成分的银杏类注射剂包括舒血宁注射剂 (SXN)^[13]、银杏叶提取物注射剂 (GEB)^[14-15]、银杏内酯注射剂 (GK)^[16]、注射用银杏二萜内酯等^[17], 但是 GB 几乎不溶于水的理化性质限制了其注射剂的开发和应用^[18]。目前含 GB 的注射剂均含有较多的表面活性剂^[19], 使用前需要先加入到大量的氯化钠输液中, 缓慢静脉滴注, 并需要严格控制滴速^[20]; 如果注射速度过快便会导致病人死亡^[21]。

纳米传递系统可以将难溶药物溶解、吸附、包埋、包封或共价结合在纳米载体的表面或内部^[22-25], 达到增加药物的溶解性能或达到一定的缓释效果。目前已有不少报道将银杏内酯制备成聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒 (PBCA-NP) 和聚己内酯-聚乙二醇-聚己内酯纳米粒 (PCL-PEG-PCL NPs) 等, 旨在提高药物的生物利用度, 或使其适合应用于静脉注射, 但由于所制备的纳米制剂的不稳定性, 往往需要加入大量稳定剂^[26-27]。

本实验针对 GB 溶解度小, 体内消除快以及目前已有注射剂的缺陷等, 拟采用一种以葡聚糖为基底并对其修饰的多糖聚合物 (ZY-010) 作为载体制备 GB 纳米粒 (GB-NP)。ZY-010 是一种可生物降解的新型高分子材料, 可以批量生产并达到无菌和无热原的要求, 符合注射剂原辅料的标准; 并且在不添加任何稳定剂和表面活性剂的情况下, 可增加难溶性物质的溶解度和延缓药物释放速度, 目前 ZY-010 已经在美国用于紫杉醇注射剂的生产并申报临床试验。本实验首次以 ZY-010 为载体对 GB 进行静脉注射制剂的研究。利用星点设计 (central composite design, CCD) 和效应面优化法 (response surface method, RSM) 实验次数相对较少、精密度高、优选条件预测性好的特点^[28], 本研究首先拟采用 CCD-RSM 优化 GB-NP 的制备工艺, 随后为了避免液体纳米制剂贮存过程中不稳定的缺陷, 拟进

一步将 GB-NP 制备成纳米冻干制剂, 并考察其冻干前后平均粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI)、稳定性及体外释放特征等, 为 GB 静脉注射剂的产品开发奠定基础。

1 仪器与材料

Waters 高效液相色谱仪 (PDA), Waters 公司; XS105 十万分一电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 郑州科创仪器有限公司; SHZ-D (III) 循环水式多用真空泵, 河南省予华仪器有限公司; KH-250E 超声波清洗器, 昆山禾创超声仪器有限公司; 380ZLS 激光粒度测定仪, 美国 Nicomp 公司; pH 计, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 5810R Eppendorf 台式高速大容量离心机, 德国 Eppendorf 公司; MC-100B 恒温摇床, 牟测科技; Mill-Q 超纯水器, Millipore 公司。

GB 对照品, 中国食品药品检定研究院, 质量分数以 95.60% 计, 批号 110863-201611; GB 原料药, 成都德思特生物技术有限公司, 质量分数 $\geq 95.00\%$, 批号 DST190318-096; ZY-010, 批号 ZYT-HZ0251, 由美国 ZY Therapeutics Inc. 提供, 具体的合成细节参见美国专利 PCT/US18/28900; 胎牛血清, Gibico 公司; 无水乙醇为分析纯; 甲醇、乙腈为色谱纯; 去离子水为超纯水; 超滤离心管, 截留相对分子质量 3 500, Millipore 公司; 透析袋, 截留相对分子质量 3 500, Solarbio 公司。

2 方法与结果

2.1 GB-NP 的制备方法

采用亲水性聚合物凝聚法制备 GB-NP。按处方精密称取适量聚合物和 GB 粉末, 分别溶于去离子水和无水乙醇。聚合物溶液加一定量的乙酸调节溶液 pH 值作为水相, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜, 并将聚合物溶液保持在 60°C 下 10 min; 以一定质量浓度的 GB 乙醇溶液作为有机相, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜; 在 60°C 恒温条件下, 将有机相缓慢注入到水相后, 超声 (频率 40 kHz, 功率 250 W) 10 min, 即得 GB-NP 溶液, 置于 4°C 冰箱冷藏备用。

2.2 GB 体外 HPLC 含量测定方法的建立

2.2.1 检测波长的选择 取适量 GB 对照品用甲醇

溶解,在波长 210~400 nm 内进行光谱扫描,结果显示,GB 在 225 nm 处有最大吸收,因此选择 225 nm 作为检测波长。

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 Ultimate® XB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (30:70); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 °C; 目标波长 225 nm; 进样量 20 μL。理论塔板数以 GB 峰计算不低于 2 500。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 精密称取 ZY-010 聚合物 4.93 mg 置于 5 mL 量瓶中,加纯水溶解并稀释至刻度,作为阴性对照溶液。

2.2.4 对照品溶液的制备 精密称取 GB 对照品 10.02 mg 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品储备液,质量浓度为 1.002 mg/mL。

2.2.5 供试品溶液的制备 精密移取按“2.1”项方法制备的 GB-NP 溶液,超速离心后,取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.6 色谱专属性考察 分别取阴性对照溶液、GB 对照品溶液和供试品溶液各 20 μL 进样。色谱图见图 1,可见阴性对照在 GB 出峰处(约 12 min)无干扰。

2.2.7 线性关系的考察 分别精密移取 GB 对照品储备液适量,配制成 10、20、40、80、100、400、600、1 000 μg/mL 的系列对照品溶液,过 0.22 μm 微孔滤膜,在“2.2.2”色谱条件下分别进行测定,记录峰面积,以质量浓度为横坐标(X),相应峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,得回归方程 $Y=507.89X-3\ 406.3$, $r=0.999\ 9$,结果表明 GB 在 10~1 000 μg/mL 具有良好的线性关系。

2.2.8 精密度试验 取 400 μg/mL 的 GB 对照品溶液,按“2.2.2”项下色谱条件分别于 1 d 内测定 6 次,连续测定 6 d (每天 1 次),计算日内、日间精密度,记录峰面积,结果其日内精密度 RSD 为 0.32%,日间精密 RSD 为 0.55%。说明日内、日间精密度良好。

2.2.9 重复性试验 分别取同一批次的 GB-NP 供试品 6 份,按“2.2.2”项下色谱条件进样测定峰面积,按照回归方程计算样品中 GB 的平均质量浓度为 102.97 μg/mL,其 RSD 为 1.34%,表明该方法重复性良好。

2.2.10 稳定性试验 精密吸取 GB-NP 供试品溶液 1 mL,按“2.2.2”项下色谱条件,室温放置,于 0、

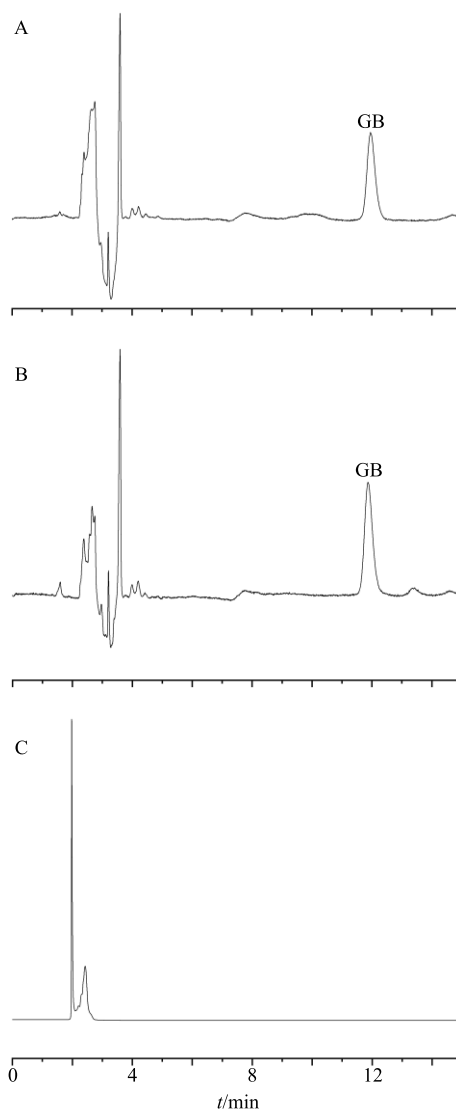


图 1 GB 对照品 (A)、供试品 (B) 和阴性对照 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of GB standard (A), sample (B), and negative control (C)

2、4、6、8、10、12 h 分别进样测定,结果 12 h 内供试品溶液中 GB 峰面积的 RSD 为 1.04%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.11 加样回收率试验 精密吸取 9 份阴性对照溶液 0.3 mL,分成 3 组,各组分别加入 110、140、170 μg/mL GB 对照品储备液 0.3 mL,各 3 份,混匀。12 000 r/min 超速离心 (4 °C) 10 min 后,取上清液 0.5 mL 过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液按“2.2.2”项下色谱条件进样,测定续滤液中 GB 的含量,以测定值与实际值之间的比值为方法回收率。结果表明,低、中、高 3 个质量浓度的平均方法回收率分别为 101.99%、96.68%、98.10%,RSD 值分别为 1.37%、1.33%、1.18%,说明建立 GB 的 HPLC 分

析方法符合要求。

2.3 GB-NP 处方优化的单因素考察

根据预试验结果,以纳米粒的平均粒径和 PDI (具体测定方法同“2.6.2”项)为指标,对水相聚合物溶液 pH 值、GB 与聚合物的质量比(W_{GB}/W_{ZY-010})、GB 质量浓度和超声时间作为单因素考察因素。

2.3.1 水相聚合物溶液 pH 值考察 固定处方中 GB 质量浓度为 1.0 mg/mL、 W_{GB}/W_{ZY-010} 为 0.1、超声时间为 10 min,考察水相中聚合物溶液的 pH 值对 GB-NP 平均粒径和 PDI 的影响,结果见表 1。结果表明,水相聚合物溶液 pH 值对 GB-NP 的平均粒径和 PDI 有较大影响。pH 值在 5.0 时平均粒径和 PDI 均符合注射剂后续滤过除菌及进一步制备的要求。

表 1 水相聚合物溶液 pH 值对 GB-NP 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of pH value of polymer solution in aqueous phase on GB-NP size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

pH 值	平均粒径/nm	PDI
4.0	131.9±1.3	0.38±0.01
5.0	196.0±1.6	0.16±0.02
6.0	161.4±1.1	0.36±0.01

2.3.2 W_{GB}/W_{ZY-010} 考察 固定处方中 GB 质量浓度为 1.0 mg/mL、水相聚合物溶液 pH 值为 5.0、超声时间为 10 min,考察 W_{GB}/W_{ZY-010} 对平均粒径和 PDI 的影响,结果见表 2。 W_{GB}/W_{ZY-010} 对 GB-NP 的平均粒径和 PDI 有一定影响。随着 W_{GB}/W_{ZY-010} 减小,平均粒径呈明显上升趋势,PDI 有所减低。考虑到载药量以及经济成本,特别是后续静脉注射剂滤过除菌的需要,本研究拟选择 W_{GB}/W_{ZY-010} 为 0.1。

2.3.3 GB 质量浓度对 GB-NP 平均粒径和 PDI 的影响 固定水相聚合物溶液 pH 值为 5.0、 W_{GB}/W_{ZY-010} 为 0.1、超声时间为 10 min,对 GB 质量浓度进行考察,结果见表 3。结果表明,GB 质量浓度对 GB-NP 的平均粒径和 PDI 有一定影响。GB 质量浓度增大,

表 2 W_{GB}/W_{ZY-010} 对 GB-NP 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of mass GB-polymer ratio on GB-NP size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

W_{GB}/W_{ZY-010}	平均粒径/nm	PDI
0.125	165.7±1.2	0.23±0.01
0.100	197.2±0.8	0.23±0.02
0.083	202.4±1.3	0.13±0.02

表 3 GB 质量浓度对 GB-NP 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of concentration of GB on GB-NP size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

GB/(mg·mL ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI
0.5	237.6±1.1	0.13±0.02
1.0	196.0±1.6	0.16±0.02
1.5	193.5±2.5	0.18±0.01
2.0	147.8±3.3	0.26±0.02
2.5	102.5±2.0	0.28±0.01

平均粒径减小,PDI 逐渐增大。当 GB 质量浓度达到 2 mg/mL 时,PDI 大于 0.22,不利于后续的过膜除菌。故选择 GB 质量浓度为 1.5 mg/mL。

2.3.4 超声时间对 GB-NP 平均粒径和 PDI 的影响 在 GB-NP 制备过程中需要用到超声,以阻止纳米粒聚合。固定处方中 GB 质量浓度为 1.0 mg/mL、水相聚合物溶液 pH 为 5.0、 W_{GB}/W_{ZY-010} 为 0.1,对超声时间进行考察,结果表明,在此制备条件下,超声时间在 5~20 min 时对 GB-NP 平均粒径和 PDI 的改变无统计学意义(表 4)。故结合实际情况,选择超声时间为 10 min。

表 4 超声时间对 GB-NP 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of ultrasonic time on GB-NP size and PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	平均粒径/nm	PDI
5	207.7±2.9	0.18±0.01
10	196.5±1.5	0.17±0.03
20	195.2±2.3	0.17±0.01

2.4 CCD-RSM 优化 GB-NP 处方

2.4.1 因素水平的确定 在单因素实验筛选的基础上,以平均粒径和 PDI 作为评价指标,选取 GB 质量浓度(A)、 W_{GB}/W_{ZY-010} (B)、溶液 pH 值(C)进行考察,设置其筛选范围分别为 A 0.5~2.5 mg/mL, B 0.075~0.125, C 4.0~6.0。采用 Design-Expert 8.0 软件进行试验设计,试验设计及结果见表 5。

2.4.2 数学模型拟合与分析 采用 Design-Expert 8.0 软件对数据进行处理及效应面处方优化,分别以平均粒径(Y_1)和 PDI(Y_2)为因变量,以 A、B、C 为自变量进行模型拟合,结果表明各因变量与自变量以二项式方程拟合时相关系数(r^2)最大, Y_1 和 Y_2 二项式拟合方程分别为 $Y_1 = 189.46 - 24.80 A -$

表 5 CCD-RSM 试验设计与结果 ($n=3$)

Table 5 Design and results of CCD-RSM test ($n=3$)

试验号	A/(mg·mL ⁻¹)	B	C	平均粒径/nm	PDI	试验号	A/(mg·mL ⁻¹)	B	C	平均粒径/nm	PDI
1	1.0 (-1)	0.086 (-1)	4.8 (-1)	224.1	0.42	11	1.5 (0)	0.075 (-1.732)	5.0	173.1	0.28
2	2.0 (+1)	0.086	4.8	151.1	0.35	12	1.5	0.125 (+1.732)	5.0	171.5	0.36
3	1.0	0.114 (+1)	4.8	227.1	0.22	13	1.5	0.100	4.0 (-1.732)	122.3	0.38
4	2.0	0.114	4.8	147.7	0.28	14	1.5	0.100	6.0 (+1.732)	144.3	0.36
5	1.0	0.086	5.2 (+1)	213.0	0.25	15	1.5	0.100	5.0	197.9	0.18
6	2.0	0.086	5.2	152.5	0.43	16	1.5	0.100	5.0	191.4	0.17
7	1.0	0.114	5.2	180.2	0.38	17	1.5	0.100	5.0	192.4	0.17
8	2.0	0.114	5.2	164.2	0.29	18	1.5	0.100	5.0	193.4	0.18
9	0.5 (-1.732)	0.100 (0)	5.0 (0)	237.6	0.13	19	1.5	0.100	5.0	188.6	0.17
10	2.5 (+1.732)	0.100	5.0	172.3	0.20	20	1.5	0.100	5.0	195.0	0.15

1.77 B-0.23 C+4.76 AB+9.49 AC-2.59 BC+8.17 A²-3.37 B²-17.16 C², $r^2=0.881\ 7$; $Y_2=0.19+0.014\ A-0.051\ B+3.125\times 10^{-3}\ C-0.016\ AB+0.010\ AC+0.032\ BC+0.011\ A^2+0.083\ C^2$, $r^2=0.701\ 4$ 。

此模型的拟合度较高,能较好地反映 3 个考察因素与评价指标之间的关系。对各指标进行方差分析,结果表明 Y_1 和 Y_2 通过 2 项式拟合的模型均具有显著差异(粒径模型 P 值为 0.001 4, PDI 模型 P 值为 0.037 7, $P<0.05$),失拟项的显著性均不明显(粒径失拟项 P 值为 0.069 6, PDI 失拟项 P 值为 0.074 0, $P>0.05$);根据 P 值可知 A 和 C 对 Y_1 的影响尤为显著,而 B 和 C 对 Y_2 的影响更加显著,

因此在响应面分析时,采用 Design-Expert 8.0 设计软件,依据所拟合的数学模型,分别绘制评价指标对 2 个考察因素的三维效应面图,另外 1 个因素置为中心值,结果见图 2、3。

2.4.3 效应面分析预测与制备工艺优化 因为 Y_1 和 Y_2 是影响 GB-NP 质量的重要因素,故选用该模型并绘制相应的效应面图,在此基础上对 GB-NP 的制备工艺进行分析和预测。分析每一效应面图中的考察因素的交互作用,根据软件预测结果,并结合研究的实际情况(GB-NP 平均粒径<200 nm, PDI<0.2),最终确定纳米粒的制备工艺条件为 GB 质量浓度为 1.5 mg/mL, W_{GB}/W_{ZY-010} 为 0.1,溶液 pH 值为 5.0。

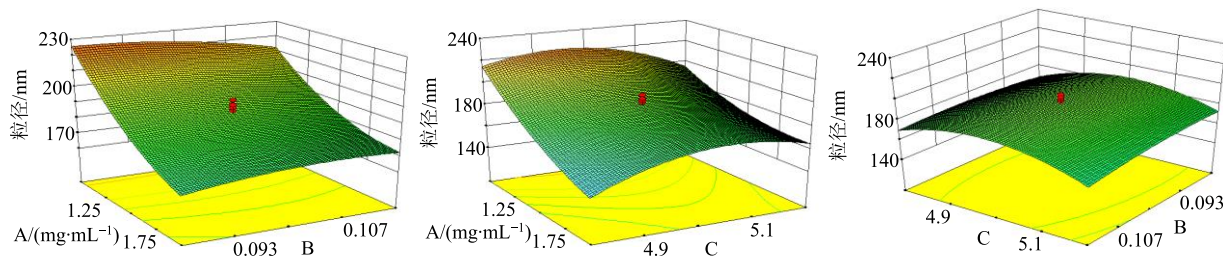


图 2 各因素对平均粒径影响的三维效应面图

Fig. 2 Three-dimensional response surface plot showing effects of various factors on average particle size

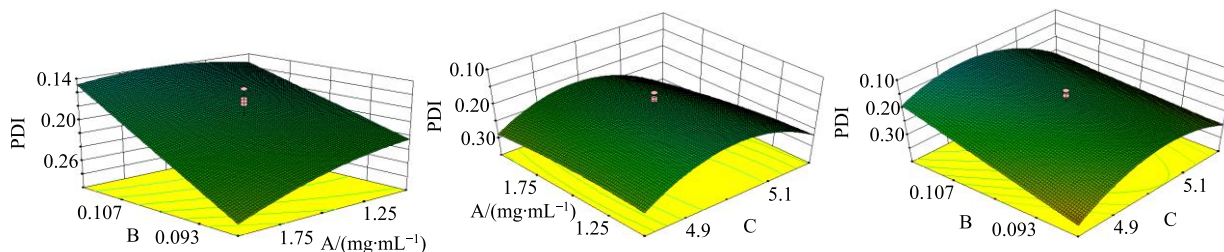


图 3 各因素对 PDI 影响的三维效应面图

Fig. 3 Three-dimensional response surface plot showing effects of various factors on PDI

2.5 优化工艺验证实验

为验证模型预测的准确性,按照上述所优化的制备工艺制备了 3 批 GB-NP 样品,并对其进行平均粒径和 PDI 分析,将 2 个评价指标的实验实际值与模型预测值进行相关性分析,计算两者间的偏差,偏差=(模型预测值-实验实际值)/模型预测值。结果表明,实际值与模型预测值的偏差较小,工艺重复性好,因此本实验所拟合的多元二项式方程能够较好反映各因变量与自变量间的关系,能满足预测要求,见表 6。

表 6 模型预测值与实际值的比较 ($n=3$)

Table 6 Comparisons between predicted and observed values of model ($n=3$)

试验号	粒径/nm	PDI
模型预测值	190.3	0.19
1	196.0	0.17
2	191.0	0.18
3	193.5	0.18
平均值	193.5	0.18
偏差/%	-1.68	5.26

2.6 GB-NP 理化性质考察

2.6.1 透射电镜法观察 GB-NP 形态 移取少量 GB-NP 溶液,用纯水稀释至适当浓度,滴至载玻片上,用 2.0% 磷钨酸负染后转移至专用铜网上,自然挥干,用透射电子显微镜观察粒径大小和形态并拍摄照片,结果见图 4。由图 4 可见 GB-NP 呈圆球形,粒子大小均匀,未见粘连和聚集的现象。

2.6.2 GB-NP 粒径及其分布、Zeta 电位考察 取 GB-NP 溶液适量,加适量纯水稀释后,采用 380 ZLS 激光粒度测定仪分别测定粒径及 Zeta 电位,结果见图 5。GB-NP 的粒径为 (190.4 ± 2.5) nm, PDI 为 0.19 ± 0.01 , 其 Zeta 电位分布在 $-44.7 \sim -36.5$ mV。

2.7 GB-NP 包封率与载药量的测定

精密移取 3 个批次 GB-NP 溶液 3 份,采用 12 000 r/min 超速离心 (4°C) 10 min 后,取上清液过 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜,取续滤液按“2.2.2”项下色谱条件下测定 GB 的量。根据公式计算包封率与载药量。测定结果见表 7。

$$\text{包封率} = W/W_1$$

$$\text{载药量} = W/W_2$$

W 为测得被包封的 GB 量, W_1 为实际投药量, W_2 为载药纳米粒总质量

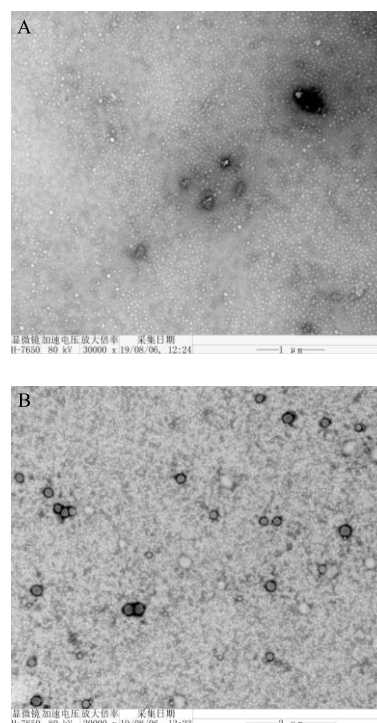


图 4 ZY-010 (A) 和 GB-NP (B) 的电镜扫描图
Fig. 4 TEM image of ZY-010 (A) and GB-NP (B)

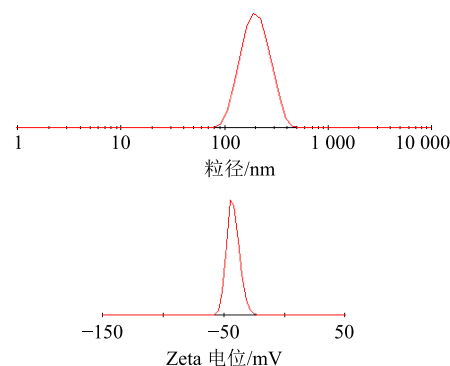


图 5 GB-NP 粒径 (A) 和 Zeta 电位 (B) 分布
Fig. 5 Distribution of average particle size (A) and Zeta potential (B) of GB-NP

表 7 GB-NP 溶液包封率和载药量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 7 Entrapment efficiency and drug loading of GB-NP solution ($\bar{x} \pm s, n=3$)

批号	包封率/%	载药量/%
1	99.64 ± 0.62	9.06 ± 0.06
2	99.82 ± 0.83	9.07 ± 0.08
3	98.97 ± 0.79	9.00 ± 0.07

2.8 GB-NP 的稳定性

2.8.1 GB-NP 溶液稳定性实验 利用本实验优化所得的处方制备 GB-NP 溶液,对其进行 72 h 内的稳定性考察,结果此方法制备的 GB-NP 溶液在 72 h

内稳定性较好,平均粒径和 PDI 在 72 h 没有明显变化,结果见表 8。

2.8.2 GB-NP 溶液血浆稳定性实验 GB-NP 在 37 °C 条件下置于模拟血浆(含 10%胎牛血清的 TRIS 缓冲液)中,24 h 内的粒径变化见表 9。可见,GB-NP 粒径和 PDI 随时间增加没有明显变化,说明在 24 h 内 GB-NP 在模拟血浆中较为稳定。

表 8 GB-NP 溶液 72 h 内稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Study on stability of GB-NP solution in 72 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/h	平均粒径/nm	PDI
0	192.8±2.8	0.14±0.03
12	190.9±2.5	0.18±0.00
24	194.0±3.1	0.17±0.01
48	188.1±3.0	0.18±0.02
72	189.9±2.4	0.19±0.01

表 9 GB-NP 在血浆中的粒径稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Particle size stability of GB-NP in plasma ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/h	平均粒径/nm	PDI
0	126.1±1.1	0.48±0.01
2	110.4±1.2	0.50±0.01
4	108.1±1.1	0.49±0.01
6	102.7±0.9	0.46±0.00
8	101.5±2.6	0.46±0.02
10	103.8±3.9	0.47±0.03
12	105.7±0.9	0.46±0.05
24	103.4±0.5	0.47±0.01

2.9 GB 纳米粒冻干制剂的研究

2.9.1 冻干工艺的建立 由“2.8.1”项下稳定性考察得到 GB-NP 溶液在 72 h 内稳定性较好,但 1 周后有肉眼可见的 EP 管内壁有微细的结晶析出,故考虑将纳米溶液进一步进行冻干。根据冷冻干燥的基本原理和预试验结果,确定冷冻干燥工艺为取已制备的 GB-NP 溶液适量,加入 1%的甘露醇,振荡使其溶解,分装入西林瓶,每瓶 2 mL,置-80 °C 的超低温冰箱中预冻 12 h,然后迅速移入冷冻干燥机中,在-40 °C、5 kPa (0.05 bar) 条件下干燥 24 h,取出后压盖密封,即得 GB-NP 冻干制剂。

2.9.2 冻干前后的变化 按确认的处方和工艺制备的 3 批 GB-NP 冻干制剂,肉眼观察均为淡黄色,表面细腻,呈疏松状,振摇后可以整块脱落。

取冻干前 GB-NP 溶液和冻干后的冻干制剂,分别测定其粒径、Zeta 电位、PDI,结果见表 10。结果表明,GB-NP 冻干前后的平均粒径、PDI 以及 Zeta 电位并无显著性差异。

2.9.3 冻干制剂稳定性考察 将 GB-NP 冻干制剂在 4 °C 下储存,分别于 0、3、7、15 d 后测定粒径和 PDI,测定结果见表 11。结果显示,在 15 d 内 GB-NP 冻干制剂稳定性较好,可较长时间储存。

表 10 冻干前、后 GB-NP 的粒径、PDI 和 Zeta 电位的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Comparison of average size and Zeta potential of GB-NP before and after lyophilization ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
冻干前	190.8±6.0	0.18±0.01	-41.9±0.9
冻干后	225.7±3.1	0.22±0.01	-48.7±2.2

表 11 GB-NP 冻干制剂 15 d 内稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Study on stability of GB-NP freeze-dried preparation in 15 d ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	平均粒径/nm	PDI
0	212.2±2.8	0.22±0.01
3	217.3±1.1	0.22±0.01
7	220.8±0.5	0.25±0.04
15	236.8±3.6	0.27±0.03

2.10 GB 和 GB-NP 的体外释放研究

本实验选用透析法进行体外释药特性研究^[29-30],设定溶出温度为(37.0±0.5) °C,转速设为 100 r/min,含 30%乙醇的生理盐水作为释放介质。取适量的 GB-NP 冻干制剂加生理盐水分散和 GB 溶液(以释放介质为溶剂,含量与 GB-NP 相当),精密吸取 2 mL 置透析袋内,扎紧后置装有释放介质 30 mL 的密闭容器内,于恒温摇床振荡下进行释放实验。在释放开始后,分别于 0.1、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36 h 取样 1 mL (同时补加等量同温空白介质),经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液按“2.2.2”项下色谱条件进样测定,计算药物的累积释放率,结果见图 6。可见,GB 原药在释放介质中释放很快,1 h 累积释放率达到(64.74±3.95)%,至 6 h 时药物已基本释放完全,累积释放率达到(99.83±0.38)%;GB-NP 在 1 h 累积释放率为(36.90±1.41)%,4 h 时累积释放率为(67.76±4.05)%,36 h 时累积释放率达到(87.76±3.44)%;显示出了明显的缓释特征。

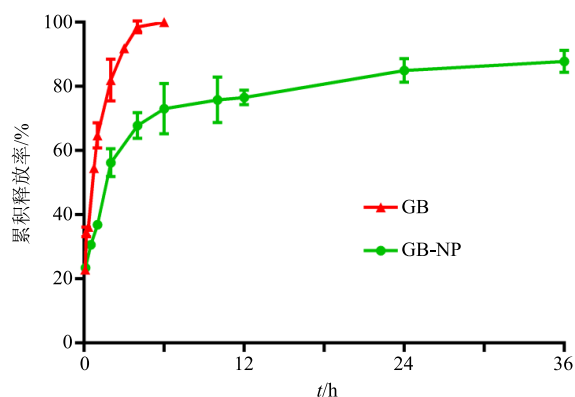


图 6 GB 和 GB-NP 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 *In vitro* release curves of GB and GB-NP ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

本实验为解决 GB 溶解度低, 体内消除快、以及目前已有注射剂的缺陷等问题, 采用一种修饰的多糖聚合物 (ZY-010) 作为载体。该聚合物是一种可生物降解的新型高分子材料, 由 1 种多糖和 1 种维生素偶联而成, 偶联物中多糖分子和维生素通过连接臂将多糖与维生素分子共价结合。与其他药物递送系统不同的是该给药系统中药物是被物理包埋到聚合物中, 而不是通过化学或共价连接^[31], 因此药物释放无需水解形成前药。

目前纳米粒的形成原理还在研究当中, 推测形成机制为药物溶于与水互溶的有机溶剂, 与溶于水相的聚合物混合后, 聚合物如丝线般缠绕在药物周围形成极小的聚合体, 再由众多聚合体形成圆球形状纳米颗粒, 透射电子显微镜观察也证实了所形成的纳米颗粒为球形。

在体外释放实验中, GB-NP 能够将药物释放时间延长数小时。药物的释放是由快速的初始释放(突释)和缓慢的释放 2 部分组成。GB 原药 1 h 累积释放率达到 $(64.74 \pm 3.95)\%$, 而 GB-NP 在 4 h 时累积释放率为 $(67.76 \pm 4.05)\%$ 。GB-NP 在最开始的 1 h 内突释可能是由于吸附在纳米粒表面或者靠近纳米粒表面的药物暴露在释放介质中, 但 GB-NP 在 4 h 后呈现缓慢释放状态。

本实验的主要目的是将 GB 制备成可静脉注射的纳米制剂, PDI 越小则制剂可以相对越稳定。在考察水相聚合物溶液 pH 值时, 虽然 pH 5.0 时纳米粒的粒径大于 pH 4.0 和 6.0 时的粒径, 但 pH 5.0 时纳米粒的 PDI 最小, 且粒径也小于 200 nm, 可以保证后续的膜 ($0.22 \mu\text{m}$) 滤过除菌的进行。因此, 本实验的制备工艺中选择了 pH 5.0。

总之, GB-NP 能较好地解决 GB 在水溶液中的溶解性能并达到一定的缓释效果, 有望通过这种新型的可生物降解多糖聚合物使 GB 适合于静脉注射。目前 GB-NP 在大鼠体内的药动学正在进一步研究。

参考文献

- [1] 刘熹昀, 赵革新, 鲍利, 等. 银杏内酯 B 对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(1): 81-84.
- [2] Li M Y, Chang C T, Han Y T, *et al.* Ginkgolide B promotes neuronal differentiation through the Wnt/ β -catenin pathway in neural stem cells of the postnatal mammalian subventricular zone [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14947-14957.
- [3] Marrache A M, Fernand G J, Sylvie G, *et al.* Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor media-ted via its cognate nuclear receptor [J]. *J Immunol*, 2002, 169(11): 6474-6481.
- [4] 黄凤娇, 李燕, 李继洪. 银杏内酯 B 注射液对大鼠生育力及早期胚胎发育毒性研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 653-657.
- [5] 王旋, 顾振纶, 秦振红, 等. 银杏内酯 A 和 B 混合物对大鼠永久性局灶性脑缺血的保护作用 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 241-244.
- [6] 蒋文潇, 王保和. 银杏内酯对缺血性脑血管疾病的药理研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(2): 441-444.
- [7] 余宙, 刘杰, 范青生, 等. 银杏内酯 B 人工抗原及多克隆抗体的制备 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(8): 648-650.
- [8] 谭才宏, 钱小蕾, 马洪峰. 银杏内酯 B 对胚胎大鼠中脑神经细胞的作用研究 [J]. 中国药房, 2011, 22(47): 4434-4436.
- [9] Zheng P D, Mungur R, Zhou H J, *et al.* Ginkgolide B promotes the proliferation and differentiation of neural stem cells following cerebral ischemia/reperfusion injury, both *in vivo* and *in vitro* [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(7): 1204-1211.
- [10] 张学非, 曹泽斌, 许治良, 等. 银杏内酯治疗脑缺血作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2943-2948.
- [11] 杨鹏飞, 陈卫东. 银杏内酯 B 药理作用研究进展 [J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(5): 86-90.
- [12] 郭春久, 兰新新, 刘科, 等. 银杏内酯注射液及其组分对大鼠缺血性脑卒中模型作用比较及对突触后致密物 95 表达的影响 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(6): 1110-1114.
- [13] 胡书佑. 舒血宁注射液的临床应用与安全用药 [J]. 湖

- 南中医药大学学报, 2012, 32(11): 78-81.
- [14] 薄芳芳, 李鸳鸯. 金纳多注射液治疗脑梗死的疗效分析 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 17(10): 118-118.
- [15] 官堂明, 黄家园, 黄浩浩, 等. 银杏叶提取物防治神经系统疾病的临床研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(22): 5078-5081.
- [16] 曾静波, 王 鹏, 高学军, 等. 银杏内酯注射液辅助治疗高血压脑出血疗效及对神经功能恢复的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 217-220.
- [17] 伍清龙, 孙永成, 万 琴, 等. HPLC-ELSD 法测定注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 255-258.
- [18] 廖 杰, 段秋华. 银杏内酯 B——来自古老植物的血小板活化因子拮抗剂 [J]. 大学化学, 2010, 25(S1): 114-117.
- [19] 郭梦翔, 胡海燕, 唐仕波, 等. 银杏内酯 B 自微乳化释药系统的制备及质量评价 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 2967-2971.
- [20] 李国信, 夏素霞, 刘胜利, 等. 银杏内酯 B 注射液在健康人体的药代动力学 [J]. 中国临床药理学杂志, 2008, 24(2): 118-121.
- [21] 王国惠, 张佳丽. 26 例银杏叶提取物注射液不良反应报告的回顾分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(7): 569-570.
- [22] 田文霞, 张曦文, 王晓飞, 等. 联氨基姜黄素脂质体纳米颗粒对 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1773-1778.
- [23] 安 飞, 刘德杰, 冷佳蔚. 紫杉醇纳米制剂的研究进展 [J]. 药学研究, 2018, 37(10): 604-608.
- [24] 王敏杰, 陈朝军, 周 南, 等. 蒙药孟根乌苏中 HgS 微-纳米颗粒的提取、分离及体外溶出研究 [J]. 中草药, 2018, 49(19): 4513-4519.
- [25] 曹雪晓, 栗焕焕, 邱喜龙, 等. 氨基表面修饰磁性纳米粒子 (MNP-NH₂) 对黄酮类和有机酸类成分选择吸附研究 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4816-4823.
- [26] 潘 见, 田 甜, 陈 彦. 脑靶向银杏内酯聚氰基丙烯酸正丁酯纳米球的制备方法比较 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(5): 1210-1211.
- [27] Xi Q Y, Yong L S, Qing F J, *et al.* Design of amphiphilic PCL-PEG-PCL block copolymers as vehicles of ginkgolide B and their brain-targeting studies [J]. *J Biomat Sci*, 2017, 28(14): 1497-1510.
- [28] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计效应面法在药理学试验设计中的应用 [J]. 中国现代应用药学, 2007, 24(6): 455-457.
- [29] 马舒伟, 刘兴艳, 辛 杨, 等. 银杏内酯 K 的 PLGA-PEG 纳米粒制备、表征和神经保护活性评价 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1562-1568.
- [30] Zekri O, Boudeville P, Genay P, *et al.* Ionization constants of ginkgolide B in aqueous solution [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(15): 2598-2604.
- [31] Li J, Bao J, Wang W. Drug formulation based on particulates comprising polysaccharide-vitamin conjugate: US, WO 2017053920A1 [P]. 2017-03-30.