

丹参酮II_A聚合物脂质纳米粒制备及脑部药物递送研究

高羚毓, 贾瑞欣, 毕野, 邱智东, 李银清, 苏婷, 邱野*

长春中医药大学 药学院, 吉林 长春 130117

摘要: 目的 为了改善丹参酮II_A (TanII_A) 的溶解性、增加脑组织中的药物浓度, 制备 TanII_A 聚合物脂质纳米粒 (TanII_A-PLNs) 并进行体外释放、药动学、脑组织分布研究。方法 建立 TanII_A 含量测定的高效液相色谱 (HPLC) 法, 以纳米制剂的包封率和粒径为指标, 优化 TanII_A-PLNs 的制备工艺, 分别优化 TanII_A 与蛋黄磷脂 (Egg-PC) 的比例、Egg-PC 与聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 的比例、有机相与水相的比例; 进行 TanII_A-PLNs 的处方验证、稳定性考察、体外释放考察。建立 TanII_A 在血浆和脑匀浆中的液-质联用 (LC-MS) 检测方法。SPF 级雄性 SD 大鼠 6 只, 随机分为 2 组, 给药前 12 h 禁食, 一组 ig 25 mg·kg⁻¹ 的 TanII_A 混悬液, 另一组尾 iv 5 mg·kg⁻¹ 的 TanII_A-PLNs 溶液, 于给药后 5、15、30、60、120、240、360、480、720 min 眼眶取血约 0.5 mL, LC-MS 法进行药动学检测。取 KM 小鼠 4 只, 尾 iv DiR 标记的 TanII_A-PLNs, 给药 30、60、120、240 min 后处死解剖, 通过荧光成像观察 TanII_A-PLNs 在组织中的分布情况。取 KM 小鼠 12 只, 随机分成 4 组, 给药前 12 h 禁食, 尾 iv 2.5 mg·kg⁻¹ 的 TanII_A-PLNs 溶液, 于给药后 30、60、120、240 min 处死小鼠, 剥离完整大脑组织, 称质量, 加入 2 倍超纯水匀浆, LC-MS 法检测 TanII_A 水平。结果 TanII_A-PLNs 的最优处方为 TanII_A:Egg-PC 为 1:4、Egg-PC:PLGA 为 5:2、有机分散体系:水分散体系为 1:15。以 Egg-PC/PLGA 作为脂质纳米粒的膜材, 采用纳米粒沉淀法制备的 TanII_A-PLNs 的平均粒径为 272 nm, Zeta 电位为 -4.93 mV, 包封率为 88.2%, 载药量为 18%。在避光、干燥 (室温) 的条件下 TanII_A-PLNs 冻干粉稳定。TanII_A 原料药在 48 h 内释放完全, 累积释放率为 (93.75±0.75)%, 与 Korsmeyer-Peppas 释放方程拟合程度较好; TanII_A-PLNs 在 400 h 左右释放完全, 累积释放率为 (89.44±2.22)%, 与零级释放方程拟合度最好。药动学结果表明, 大鼠尾 iv TanII_A-PLNs 给药剂量是 ig TanII_A 原料药剂量的 1/5, TanII_A-PLNs 的 AUC_{0-t} 和 t_{1/2β} 是 TanII_A 原料药的 2.8 和 1.5 倍。组织分布实验结果显示, 30 min 时肝组织显示荧光; 60 min 时脑组织显示出荧光, 120 min 时脑组织荧光最强, 240 min 时脑组织荧光变弱。TanII_A-PLNs 给药 2 h 后, TanII_A 脑匀浆质量浓度为 235.5 ng·g⁻¹。结论 制备的 TanII_A-PLNs 均一稳定, 包封率较高, 聚合物脂质纳米粒的应用提高了 TanII_A 的血药浓度, 可增加药物在脑部的暴露。

关键词: 丹参酮II_A; 聚合物脂质纳米粒; 脑组织分布; 药动学

中图分类号: R943, R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 05-0909-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.05.013

Study on preparation of tanshinone II_A polymer lipid nanoparticles and brain delivery

GAO Lingyu, JIA Ruixin, BI Ye, QIU Zhidong, LI Yinqing, SU Ting, QIU Ye

College of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective Tanshinone II_A polymeric lipid nanoparticles (TanII_A-PLNs) were prepared for improving the solubility and drug concentration in brain tissue to increase drug brain exposure. *In vitro* release, pharmacokinetics and brain tissue distribution were studied. **Method** A high performance liquid chromatography (HPLC) method was established to determine the content of TanII_A, and the preparation process of TanII_A-PLNs was optimized by taking the encapsulation rate and particle size of nano-preparations as indexes. The proportion of TanII_A to Egg-PC, Egg-PC to polylactic acid - hydroxyacetic acid copolymer (PLGA) and organic phase to water phase were optimized respectively. The prescription validation, stability and *in vitro* release of Tan II_A-PLNs were investigated. To establish a method for the determination of TanII_A in plasma and brain homogenates by liquid - mass spectrometry (LC-MS). Six SPF male SD rats were randomly divided into two groups, one group was given 25 mg·kg⁻¹ TanII_A suspension, the other group was given 5 mg·kg⁻¹ TanII_A-PLNs solution. At 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 720 min after administration, about

收稿日期: 2022-02-09

基金项目: 吉林省发展改革委员会项目(202000C032-4)

第一作者: 高羚毓(1997—),女,汉,硕士研究生,研究方向为中药制药新技术。E-mail:1043288537@qq.com

*通信作者: 邱野(1989—),男,研究方向为中药炮制。E-mail:ccyeqiu@163.com

0.5 mL blood was collected from orbit, and pharmacokinetic detection was performed by LC-MS. Four KM mice were selected and TanII_A-PLNs labeled with iv DiR were sacrificed 30, 60, 120 and 240 min after administration, and the distribution of TanII_A-PLNs in tissues was observed by fluorescence imaging. Twelve KM mice were randomly divided into four groups, fasted 12 h before administration, and treated with 2.5 mg·kg⁻¹ TanII_A-PLNs solution in tail iv. The mice were sacrificed 30, 60, 120 and 240 min after administration. The intact brain tissues were stripped, weighed, and the level of TanII_A was detected by LC-MS. **Results** Egg-PC/PLGA (5:2) were used as membrane materials of TanII_A-PLNs nanoparticles, and the volume ratio of organic phase to water phase was 1: 15. The particle size, zeta potential, entrapment efficiency and drug loading capacity of TanII_A-PLNs were 272 nm, -4.93 mV, 88.2%, 18% respectively. TanII_A-PLNs freeze-dried powder is stable under dry conditions (room temperature) and away from light. Pharmacokinetics showed that the AUC_(0-t) and *t*_{1/2β} of TanII_A-PLNs were 2.8 and 1.5 times higher than free TanII_A even the dose difference of administration was 1/5 times. The results of tissue distribution experiment showed that the liver tissue showed fluorescence at 30 min. The brain tissue showed fluorescence at 60 min, the fluorescence was the strongest at 120 min, and the fluorescence became weak at 240 min. The plasma concentration of TanII_A reached 235.5 ng/g after 2 h of TanII_A-PLNs administration. **Conclusion** TanII_A-PLNs were uniform and stable, and had a higher entrapment efficiency. *In vivo* pharmacokinetic parameters showed that the application of polymeric lipid nanoparticles improved the concentration of TanII_A in brain tissue and increased the exposure of the drug in the brain. **Key words:** TanII_A; Polymer Lipid Nanoparticles (PLNs); brain distribution; pharmacokinetics

脑卒中是一种常见的脑血管疾病,以血管损伤和脑组织缺血为主要症状^[1],脑组织缺血引发神经炎症^[2-3],患者出现偏瘫、共济失调等症状,严重会导致死亡。丹参酮II_A(tanshinone II_A, TanII_A)靶向葡萄糖转运蛋白1(GLUT1)减轻脑卒中导致的神经细胞损伤^[4],在干预急性缺血性脑卒中方面有显著作用^[5-8],治疗窗在24 h之内^[9]。由于TanII_A亲脂性高、口服生物利用度为2.9%~3.4%^[10],P-糖蛋白的外排机制限制TanII_A透过血脑屏障^[11],药物在脑部的暴露难以达到较高水平;另一方面血脑屏障内皮细胞之间的紧密连接严重限制了离子型水溶液药物的扩散^[12-13],临床使用的TanII_A及TanII_A磺酸钠注射剂难以在脑部蓄积,限制了其在脑卒中治疗中的应用。纳米制剂在脑部的高效递送得到广泛应用。脂质体可以透过血脑屏障^[14],通过吸附介导的内吞作用到达脑组织^[15],但稳定性差、药物包封能力有限^[16]。聚合物纳米粒子具有良好的结构稳定性和控释能力^[17],但其粒径大、生物相容性差,限制其iv给药。脂质纳米粒结合了脂质体和聚合物纳米颗粒的优点,利用打开的微血管的细胞旁系通路、内皮细胞的内吞或胞饮作用^[18],同时通过脂质增溶实现膜流化,提高膜的通透性,使药物透过血脑屏障。本实验将TanII_A与磷脂类膜材和聚乳酸-羟基乙酸共聚物[Poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]结合,制备成TanII_A聚合物脂质纳米粒(TanII_A-PLNs),使TanII_A透过血脑屏障,增加其在脑部的暴露,改善治疗卒中的能力。

1 材料

1.1 主要仪器

LC-1260 高效液相色谱仪、Agilent ZORBAX

SB-C₁₈ 色谱柱(美国安捷伦公司);LCMS-8040 三重四级杆液相色谱质谱联用仪(日本岛津公司)。

1.2 主要试剂

TanII_A原料药(南京卡塞斯医药);TanII_A对照品(质量分数≥98%, CAS号568-72-9)、隐丹参酮(质量分数≥98%, CAS号957-68-6)、聚乙烯醇(上海源叶生物科技有限公司);蛋黄磷脂(Egg-PC)、PLGA(5050A)(上海艾伟特医药科技有限公司);丙酮(西陇科学股份有限公司);甲醇(广东光华科技股份有限公司)。

1.3 实验动物

雄性SPF级SD大鼠,体质量250 g左右,8周龄;雄性SPF级KM小鼠,体质量25 g左右,8周龄;均购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,实验动物生产许可证号SCXK(吉)2020-0002。动物实验已通过长春中医药大学动物实验伦理审查。

2 方法与结果

2.1 TanII_A-PLNs的制备

以纳米粒沉淀法制备TanII_A-PLNs^[19]。精密称定5 mg TanII_A、20 mg Egg-PC和8 mg PLGA溶于丙酮:甲醇(4:1)的有机体系中,超声溶解,作为有机分散体系。1%的聚乙烯醇溶液作为水分散体系。在磁力搅拌过程中,将有机相一次性快速注入水相,挥去有机分散体系,10 000 r·min⁻¹高压均质1 min,即得TanII_A-PLNs。

2.2 TanII_A含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(80:20);体积流量1.0 mL·min⁻¹;检测波长275 nm;柱温

30 °C;进样体积 10 μL。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称定 TanII_A 对照品 2 mg, 置于 2 mL 量瓶中, 甲醇超声溶解, 制成 1 mg·mL⁻¹ 的对照品溶液。利用甲醇将 TanII_A 对照品溶液稀释成 1、5、10、30、50、100、200 μg·mL⁻¹ 的系列标准溶液, 注入高效液相色谱仪(HPLC)中, 以 HPLC 测定的峰面积(A)为纵坐标、以 TanII_A 的质量浓度为横坐标绘制标准曲线。标准曲线方程为: $Y=45.38X-93.379, R^2=0.9997$, TanII_A 在 1~200 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.2.3 专属性考察 阴性供试品: 按“2.1”项方法制备无 TanII_A 的 PLNs, 精密移取 1 mL, 甲醇破乳定容至 5 mL。供试品: 按“2.1”项方法制备 TanII_A-PLNs, 精密移取 1 mL, 甲醇破乳定容至 5 mL。精密吸取 10 μg·mL⁻¹ 的 TanII_A 对照品溶液、阴性供试品溶液和质量浓度为 26.5 μg·mL⁻¹ 的供试品溶液, 注入 HPLC 中, 按“2.2.1”项下的色谱条件测定, 空白 PLNs 对 TanII_A 的测定无干扰(图1)。定量限在信噪比(S/N)为 10 的基础上确定, TanII_A 的定量限为 4.6 μg·mL⁻¹。检测限在 S/N 为 3 的基础上确定, TanII_A 的检测限为 1.4 μg·mL⁻¹。

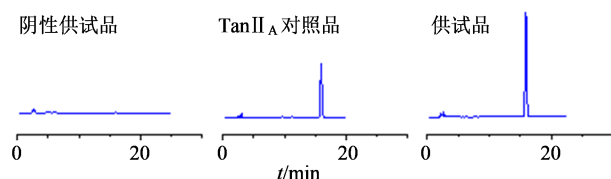


图1 TanII_A 的 HPLC 专属性考察
Fig. 1 Specificity of HPLC of TanII_A

2.2.4 精密度试验 精密吸取 TanII_A 对照品溶液, 甲醇稀释成 5、30、100 μg·mL⁻¹, 按“2.2.1”项下的色谱条件重复测定 6 次, RSD 分别为 0.29%、0.52%、0.26%, 表明此仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 按“2.1”项方法制备 6 份 TanII_A-PLNs, 精密移取 1 mL, 甲醇破乳定容至 5 mL。按“2.2.1”项下的色谱条件测定, RE 为 0.6%, RSD 为 1.02%, 表明方法重复性良好。

2.2.6 稳定性考察 取制备好的供试品溶液, 在制备后的 2、4、6、8、12 h 后分别进样, 按“2.2.1”项下的色谱条件测定, RSD 值为 0.39%, 表明 TanII_A 在 12 h 内稳定。

2.2.7 加样回收率考察 精密量取质量浓度为 26.5 μg·mL⁻¹ 的 TanII_A-PLNs 样品 9 份, 加入低(80%)、中(100%)、高(120%)浓度的对照品溶液, 精密移取 1 mL, 甲醇破乳定容至 5 mL。

按“2.2.1”项下的色谱条件测定, TanII_A 的加样回收率在 98.49%~100.64%、98.60%~101.30%、99.68%~102.54%, RSD 为 1.29%, 表明该方法回收率良好。

2.3 TanII_A-PLNs 制备工艺的研究

以 TanII_A-PLNs 的封装率和粒径为指标, 按表 1~3 处方分别优化 TanII_A 与 Egg-PC 的比例、Egg-PC 与 PLGA 的比例、有机相与水相的比例。

表1 优化 TanII_A-PLNs 中 TanII_A 与 Egg-PC 的质量比
Table 1 Mass ratio of TanII_A and Egg-PC of TanII_A-PLNs optimization

序号	TanII _A :Egg-PC	Egg-PC:PLGA	有机相:水相
1	1:1	5:3	1:15
2	1:2	5:3	1:15
3	1:3	5:3	1:15
4	1:4	5:3	1:15
5	1:5	5:3	1:15

表2 优化 TanII_A-PLNs 中 Egg-PC 与 PLGA 的质量比
Table 2 Mass ratio of Egg-PC and PLGA of TanII_A-PLNs optimization

序号	TanII _A :Egg-PC	Egg-PC:PLGA	有机相:水相
1	1:4	5:5	1:15
2	1:4	5:4	1:15
3	1:4	5:3	1:15
4	1:4	5:2	1:15
5	1:4	5:1	1:15

表3 优化 TanII_A-PLNs 中有机相与水相的体积比
Table 3 Volume ratio of organic and aqueous phases of TanII_A-PLNs optimization

序号	TanII _A :Egg-PC	Egg-PC:PLGA	有机相:水相
1	1:4	5:2	1:10
2	1:4	5:2	1:12.5
3	1:4	5:2	1:15
4	1:4	5:2	1:17.5
5	1:4	5:2	1:20

2.3.1 高速离心法测定封装率的方法及验证 采用高速离心法分离包裹药物的聚合物脂质纳米粒与游离药物, 4 °C、15 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取 1 mL 上清液, 甲醇定容至 5 mL, 利用 HPLC 法测定上清液中 TanII_A 的含量, 计为 W_{游离}; TanII_A-PLNs 破乳定容, 得到总 TanII_A 供试品溶液, HPLC 法测定

TanII_A含量,计为 $W_{总}$,计算包封率(EE)。按“2.1”项下的TanII_A-PLNs的制备方法制备空白脂质纳米粒,再加入游离药物,4℃、15 000 r·min⁻¹离心30 min,取上清液,按“2.2.1”项下方法测定TanII_A含量^[20]。游离药物与空白脂质纳米粒混合物的回收率为(93.07±0.62)%($n=3$)。表明利用高速离心法测定包封率准确、简便。

$$EE = 1 - W_{游离} / W_{总}$$

2.3.2 粒径测定 取制备好的TanII_A-PLNs适量于粒径测定杯中,并将其放入马尔文粒度分析仪中,于25℃的条件下平衡30 s后,测定样品的粒径及聚合物分散性指数(PDI),平行测定3次。

2.3.3 TanII_A与Egg-PC的比例 如图2-A所示,TanII_A:Egg-PC为1:4时,包封率最高,为86%;TanII_A:

Egg-PC为1:3时,粒径最小,为283 nm。由于Egg-PC具有乳化作用,可提高体系的稳定性^[21],Egg-PC的含量越高,TanII_A-PLNs的稳定性越强,故选择TanII_A与Egg-PC的比例为1:4。

2.3.4 Egg-PC与PLGA的比例 如图2-B所示,Egg-PC:PLGA为5:3时,包封率最高,为87.2%;Egg-PC:PLGA为5:2时,粒径最小,为272 nm。由于Egg-PC具有乳化作用,可提高体系的稳定性,Egg-PC的含量越高,TanII_A-PLNs的稳定性越强,故选择Egg-PC与PLGA的比例为5:2。

2.3.5 有机相与水相的比例 如图2-C所示,当有机分散体系:水分散体系为1:15时,包封率最高,为88.5%,粒径最小,为265.7 nm,故选择有机分散体系与水分散体系的比例为1:15。

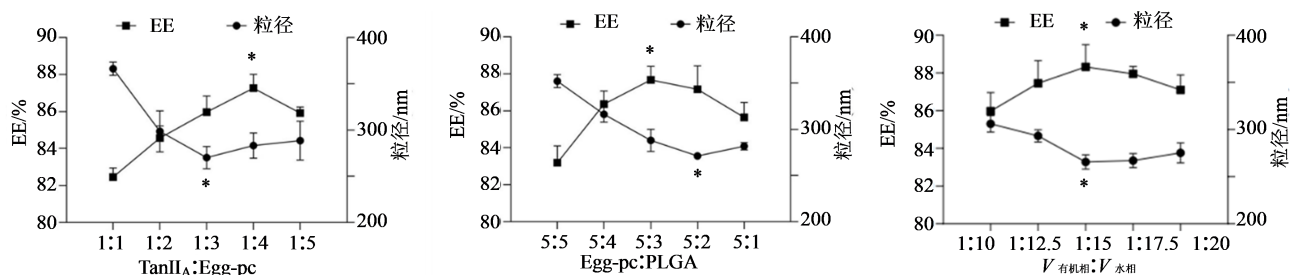


图2 TanII_A-PLNs处方优化

Fig. 2 Prescription optimization of TanII_A-PLNs

2.3.6 TanII_A-PLNs处方验证 TanII_A-PLNs的最优处方为TanII_A:Egg-PC为1:4,Egg-PC:PLGA为5:2、有机分散体系:水分散体系为1:15。按上述处方制备3批TanII_A-PLNs,包封率为(88.2±1.76)%、粒径为(271.3±6.2) nm、PDI为0.242、Zeta电位为-4.93 mV(见图3),表明TanII_A-PLNs的粒度分布均匀,TanII_A-PLNs表面带负电,体系较稳定^[22],适用于体内给药。为了便于储存,将TanII_A-PLNs制备成冻干粉,加入10 mg·mL⁻¹的甘露醇作为冻干保护剂,冻干粉的包封率为86.9%,粒径为282.9 nm。

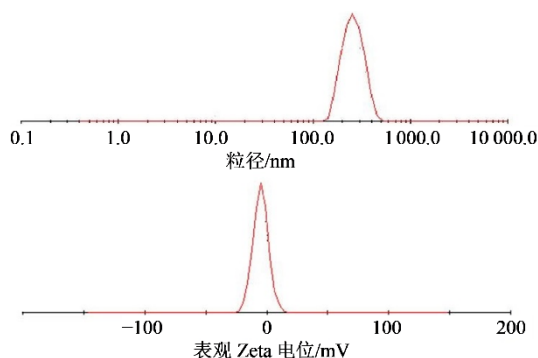


图3 TanII_A-PLNs粒径、电位图

Fig. 3 Particle size and potential diagram of TanII_A-PLNs

2.3.7 初步稳定性实验 TanII_A-PLNs冻干粉放置6个月后,其外观为淡桔色、蓬松粉末,复溶时间为2~3 min,包封率为85.6%,较放置前的样品差异不大。结果表明,在避光、干燥(室温)的条件下TanII_A-PLNs冻干粉稳定。

2.4 TanII_A-PLNs的体外释放

TanII_A原料药用5 mL的50%乙醇溶解,释放介质为50 mL的50%乙醇,TanII_A-PLNs的释放介质为50 mL的0.5%十二烷基硫酸钠溶液。将TanII_A溶液和TanII_A-PLNs转移至截留相对分子质量为8 000~14 000的透析袋中,置于37℃、120 r·min⁻¹的恒温摇床中。在固定时间点取样1 mL,并补充同体积的释放介质。利用HPLC法测定不同时间点TanII_A和TanII_A-PLNs的药物浓度,计算累计释放率。TanII_A原料药在48 h内释放完全,累积释放率为(93.75±0.75)%,TanII_A-PLNs在400 h左右释放完全,累积释放率为(89.44±2.22)%(见图4)。分别采用零级、一级、Higuchi、Korsmeyer-Peppas释放方程对释放曲线进行模拟(表4),释放方程拟合结果表明,TanII_A原料药与Korsmeyer-Peppas释放方程拟合程度较好;TanII_A-PLNs释放程度与零级释放方

程拟合度最好,保持衡定的释放速率,有利于维持更久的有效血药浓度^[23]。

$$AR = (C_n V + V_i \sum_{i=0}^{n-1} C_i) / W$$

AR-累积释放率; C_n -第 n 个时间点释放介质中的 TanII_A 浓度; V -释放介质总体积; V_i -第 i 个时间点取样体积; W -加入 TanII_A 的总量

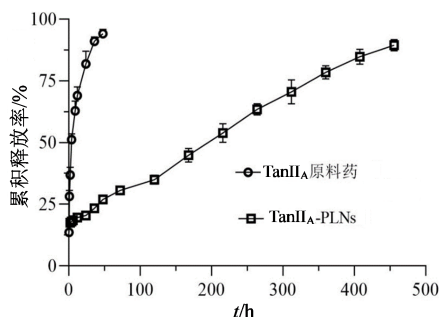


图4 TanII_A 原料药与 TanII_A -PLNs体外释放曲线
Fig. 4 *In vitro* release curve of TanII_A and TanII_A -PLNs

表4 TanII_A 原料药与 TanII_A -PLNs释放方程拟合
Table 4 Fitting table of release equation of TanII_A and TanII_A -PLNs

释放物质	拟合模型	拟合方程	R^2
TanII_A	Zero order	$Y = 1.5366X + 35.62$	0.7400
	First order	$Y = 71.51 \times (1 - e^{-0.35x})$	0.4487
	Higuchi	$Y = 16.39 X^{0.5}$	0.7425
	Korsmeyer-Peppas	$Y = 29.40 X^{0.31}$	0.93798
TanII_A -PLNs	Zero order	$Y = 0.16 X + 17.69$	0.9969
	First order	$Y = 96.48 \times (1 - e^{-0.005x})$	0.8444
	Higuchi	$Y = 3.9730 X^{0.5}$	0.9407
	Korsmeyer-Peppas	$Y = 4.24 X^{0.40}$	0.9409

2.5 TanII_A 体内分析方法的建立

2.5.1 色谱与质谱条件 色谱条件: Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 nm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水(80:20), 体积流量为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样体积 10 μL。质谱条件: 点喷雾离子源(ESI); 正离子检测模式; 离子源温度 400 °C; 喷雾电压 4.5 kV; 雾化器体积流量 3.0 L·min⁻¹。扫描方式为多反应监测模式(MRM), 检测离子对为 m/z 295/249 (TanII_A), 碰撞能量为 -20 eV; m/z 297/254(隐丹参酮), 碰撞能量为 -35 eV。

2.5.2 供试品制备 取血浆样品 0.1 mL 或脑匀浆样品 0.2 mL, 加入 10 μg·mL⁻¹ 的内标隐丹参酮溶液 10 μL 混匀, 加入含 0.3% 甲酸的甲醇溶液 500 μL 作为蛋白沉淀剂。涡旋混合 1 min 后, 9 800 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上层溶液, 40 °C 挥干。残渣加 500 μL 甲醇复溶, 进行 2 次离心, 取上层溶液, 过 0.22 μm 滤

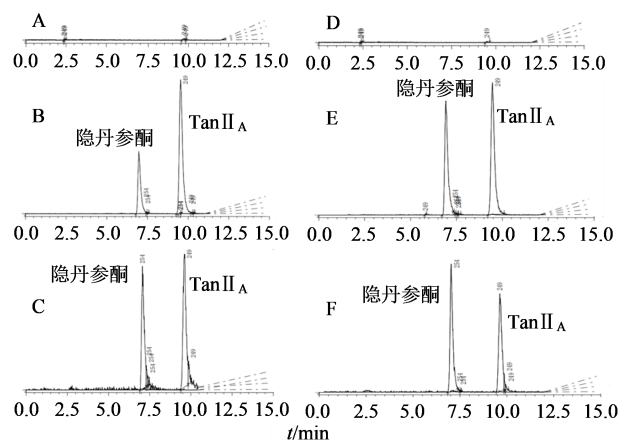
膜, 即得。

2.5.3 TanII_A 体内分析标准曲线 取空白血浆或脑匀浆样品, 加入 TanII_A 对照品和 10 μg·mL⁻¹ 的内标隐丹参酮溶液 10 μL 组成混合标准溶液。将血浆样品稀释成混标为 1、5、10、50、100、500、1 000 ng·mL⁻¹ 的系列标准溶液, 将脑匀浆样品稀释成混标为 0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0 ng·mL⁻¹ 的系列标准溶液, 按照“2.5.2”项处理, 注入 LC-MS 中, 以 TanII_A 与内标峰面积比为 Y 轴, TanII_A 质量浓度为 X 轴绘制标准曲线。

血浆中 TanII_A 的标准曲线为 $Y = 0.016X + 0.4713$, $R^2 = 0.9911$, 在 1~1 000 ng·mL⁻¹ 质量浓度范围内线性良好; 脑匀浆 TanII_A 的标准曲线为 $Y = 0.0211X + 0.1127$, $R^2 = 0.9953$, 在 0.5~200.0 ng·mL⁻¹ 浓度范围内线性良好。

2.5.4 专属性考察 取空白血浆样品、空白血浆加对照品及内标、给药后血浆样品加内标、空白脑匀浆样品、空白脑匀浆加对照品及内标、给药后脑匀浆样品加内标, 按“2.5.2”项下方法处理, 按“2.5.1”项下条件测定, 结果表明空白血浆和空白脑匀浆对 TanII_A 的测定无干扰(图 5)。定量限在 S/N 为 10 的基础上确定, TanII_A 在血浆和脑匀浆中的最低定量质量浓度分别为 1.0、0.5 ng·mL⁻¹。检测限在 S/N 为 3 的基础上确定, TanII_A 在血浆和脑匀浆中的最低定量质量浓度分别为 0.30、0.15 ng·mL⁻¹。

2.5.5 精密度与准确度考察 分别取血浆和脑匀



A-空白血浆样品; B-空白血浆加混合对照品; C-给药后血浆样品加内标; D-空白脑匀浆样品; E-空白脑匀浆加混合对照品; F-给药后脑匀浆样品加内标

A- blank plasma sample; B- blank plasma plus mixed control; C- add internal standard to plasma sample after administration; D- blank brain homogenate sample; E- blank brain homogenate plus mixed control; F- add internal standard to brain homogenate sample after administration

图5 血浆及脑匀浆样品的专属性考察

Fig. 5 Specificity of plasma and brain homogenate samples

浆的低、中、高质量浓度质控样品, LC-MS连续3 d测定, 计算日内、日间精密度。如表5所示, 血浆与脑匀浆样品在日内和日间精密度的RSD值均小于6.58%, 准确度RE在0.14%~2.77%。结果表明此分析方法的精密度和准确度良好。

2.5.6 提取回收率与基质效应考察 取空白血浆或脑匀浆样品, 加入TanII_A对照品和10 μg·mL⁻¹的内标隐丹参酮溶液10 μL组成混合标准溶液。将血浆样品稀释成混标为5、50、500 ng·mL⁻¹的质控样品, 将脑匀浆样品稀释成混标为1.0、10.0、100.0 ng·mL⁻¹的质控样品。取质控样品各5份, 按“2.5.2”项下方法制备, 按“2.5.1”项下的条件进行测定, 峰面积计为A₁; 取空白血浆和脑匀浆, 按“2.5.2”项下方法制备, 挥干后用低、中、高质量浓度的TanII_A与隐丹参酮混合溶液复溶, 各5份, 峰面积计为A₂; 取TanII_A与隐丹参酮混合溶液各5份, 按“2.5.1”项下的条件测定, 峰面积计为A₃。提取回收率=A₁/A₂, 基质效应=A₂/A₃。如表5所示, TanII_A和隐丹参酮在血浆和脑匀浆中的回收率和基质效应不影响测定。

2.6 TanII_A-PLNs初步药动学

2.6.1 给药样品的制备 称量TanII_A原料药

12.5 mg, 加4 mL的0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 超声溶解, 制成均匀的混悬溶液, ig给药2 mL; 称量TanII_A-PLNs冻干粉33 mg(内含5 mg的TanII_A), 加2 mL的生理盐水复溶, 尾iv 0.5 mL。

2.6.2 血浆药动学 SPF级雄性SD大鼠6只, 随机分为2组, 给药前12 h禁食。一组ig给药25 mg·kg⁻¹的TanII_A混悬液, 于给药后15、30、60、120、240、360、480、720 min眼眶取血, 约0.5 mL。另一组尾iv 5 mg·kg⁻¹的TanII_A-PLNs溶液, 于给药后5、15、30、60、120、240、360、480、720 min眼眶取血, 约0.5 mL。将血液置含肝素钠的离心管中, 4000 rmin⁻¹离心10 min, 取上清, -20 °C保存。采用“2.5”项方法进行血药浓度检测, 如图6、表6所示, TanII_A-PLNs的AUC_{0-t}和t_{1/2B}是TanII_A的2.8和1.5倍。

2.6.3 荧光成像观察TanII_A-PLNs的组织分布 取KM小鼠4只, 尾iv DiR标记的TanII_A-PLNs。给药30、60、120、240 min后, 处死解剖。通过荧光成像技术观察TanII_A-PLNs在组织中的分布情况。如图7所示, 30 min时肝组织显示荧光, 药物首先在肝部代谢; 60 min时脑组织显示出荧光, 药物在脑中暴露; 120 min时脑组织荧光最强, 240 min时脑组织荧光变弱。

表5 TanII_A的血浆和脑组织中LC-MS分析方法学评价(n=5)

Table 5 LC-MS analysis methodology evaluation of plasma and brain of TanII_A (n=5)

样品	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	日内精密度RSD/%	日间精密度RSD/%	准确度RE/%	提取回收率/%	基质效应/%
血浆	5	3.12	3.92	1.44	70.19±1.42	101.07±5.87
	50	3.29	3.15	0.67	71.33±4.88	100.19±2.58
	500	5.42	5.33	0.14	75.97±3.52	98.92±7.34
脑匀浆	1	2.95	3.26	1.13	72.66±2.07	104.22±2.63
	10	3.53	5.70	0.96	74.34±2.16	101.95±1.97
	100	6.28	6.58	2.77	78.41±2.66	102.91±3.00

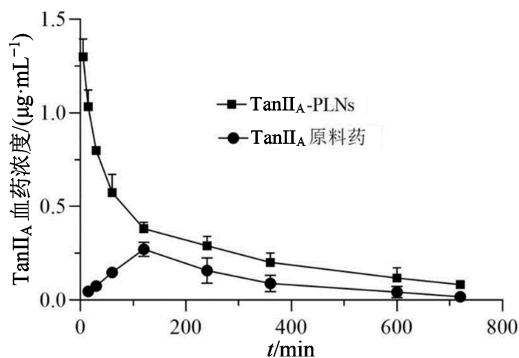


图6 TanII_A-PLNs以及TanII_A原料药的药时曲线
Fig. 6 Drug time curve of TanII_A-PLNs and TanII_A

表6 给药后血浆中TanII_A的药动学参数($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Pharmacokinetic parameters of of TanII_A in plasma ($\bar{x}\pm s, n=3$)

参数	单位	TanII _A	TanII _A -PLNs
t _{1/2B}	min	167.68±30.66	254.08±55.47**
C _{max}	μg·mL ⁻¹	0.27±0.12	1.29±0.09***
AUC _{0-t}	mg·L ⁻¹ ·min	65.40±5.42	180.55±2.46***
AUC _{0-∞}	mg·L ⁻¹ ·min	69.11±3.45	202.38±4.21***
MRT _{0-t}	min	222.60±0.97	194.49±0.04***
MRT _{0-∞}	min	262.27±20.76	291.66±36.03

与TanII_A组比较: **P<0.01 ***P<0.001
*P<0.01 ***P<0.001 vs TanII_A group

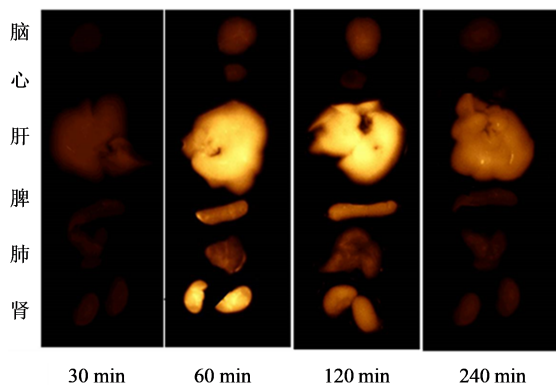


图7 TanII_A-PLNs在小鼠体内的组织分布

Fig. 7 Tissue distribution of TanII_A-PLNs in mice

2.6.4 脑组织分布 取KM小鼠12只,随机分成4组,给药前12 h禁食,尾iv 2.5 mg·kg⁻¹的TanII_A-PLNs溶液,于给药后30、60、120、240 min处死小鼠,剥离小鼠完整大脑组织,称质量,加入2倍超纯水匀浆,-20℃保存。采用“2.5”项方法进行TanII_A检测。已有研究表明^[24]口服给药TanII_A混悬液,在15 min后脑组织中并未检测到TanII_A,是因为口服TanII_A的生物利用度过低。如图8和表7所示,尾iv TanII_A-PLNs后120 min时脑组织中TanII_A的含量为235.5 ng·g⁻¹。

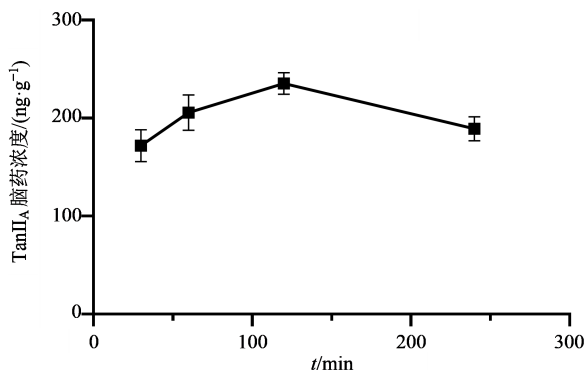


图8 尾iv TanII_A-PLNs后脑组织中TanII_A的含量变化
Fig. 8 Content of TanII_A in brain tissue after TanII_A-PLNs injection

表7 给药后脑中TanII_A的药动学参数(n=3)

Table 7 Pharmacokinetic parameters of TanII_A in brain after administration (n=3)

参数	单位	TanII _A -PLNs
C _{max}	ng·g ⁻¹	235.50
AUC _{0-t}	mg·L ⁻¹ ·min	49.58
MRT _{0-t}	min	1.94

3 讨论

由于TanII_A溶解度低,并且是P-糖蛋白的底物,P-糖蛋白介导的外排作用与首过效应致使其口服生

物利用度极低^[25],大约为3.5%,同时TanII_A的血浆蛋白结合率高,为99.2%^[26],与血浆蛋白结合的TanII_A不能转运,所以难以透过血脑屏障。TanII_A磺酸钠虽然可以达到较高的血药浓度但是因其水溶性难以透过血脑屏障^[12],所以要制备纳米制剂达到TanII_A脑部暴露的目的。本实验利用改进的纳米粒沉淀法制备聚合物脂质纳米粒^[27],以丙酮/甲醇作为有机相增加TanII_A的载药量,将有机相溶解的聚合物和药物以滴状的形式一次性注入水相中,同时采用均质操作使粒径均一。

对比TanII_A与TanII_A-PLNs药物动力学理论上应选择相同的尾iv的给药方式。临床上TanII_A口服给药,而且在药学可接受溶剂中溶解度有限,不适宜iv给药。临床上TanII_A磺酸钠注射剂静脉给药治疗卒中,但TanII_A磺酸钠与TanII_A因结构不同而导致代谢机制不同^[13],为了与制剂中的TanII_A的代谢机制保持一致,故采用口服给药CMC-Na助溶的TanII_A混悬液。TanII_A-PLNs作为纳米制剂,如进行口服给药,在消化道的pH环境及消化酶的作用下,纳米制剂会发生降解和失去递送能力,所以选择尾静脉注射的方式,也有文献报道采取这种给药方式^[24]。

即使ig给药的TanII_A剂量是尾iv TanII_A-PLNs的5倍,TanII_A-PLNs各个时间点的血药浓度、C_{max}、T_{1/2β}、AUC_{0-t}均高于TanII_A,同时,给药TanII_A-PLNs后在脑匀浆中可以定性、定量测到TanII_A,脂质结构为TanII_A进入脑组织提供机会,表明TanII_A-PLNs可以透过血脑屏障,显著提高TanII_A在脑部的暴露。AUC_{0-t}增大,延长了药物在血液循环中的时间,增加了药物在脑部的蓄积,这是由于网状内皮系统对聚合物纳米粒的识别和吸收^[28]。脑卒中的最佳治疗时间为24 h,TanII_A-PLNs进入脑组织,并在2 h内TanII_A在脑中迅速释放分布并达到最高浓度,而TanII_A-PLNs具有缓释作用,持续释放有利于保持更久的有效血药浓度。

聚合物脂质纳米粒,是一种基于脂质的纳米载体系统,与聚合纳米粒子相比,具有更好的生物相容性和更低的系统毒性,另一方面包裹的药物在纳米粒中较稳定,同时延长药物的释放时间^[29]。本研究制备的聚合物脂质纳米粒同时利用了纳米技术和磷脂载体生物相容性好的特点,制备的TanII_A-PLNs均一、稳定,通过胞吞的形式进行跨细胞递送,进一步增加TanII_A在脑中的暴露,为TanII_A进一步治疗缺血性卒中引起的神经损伤及神经系统失

调提供了可能。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1789-1858.
- [2] 张艾嘉, 王爽, 王萍, 等. 缺血性脑卒中的病理机制研究进展及中医药防治 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(5): 227-240.
Zhang A J, Wang S, Wang P, et al. Progress in pathological mechanism of ischemic stroke and prevention and treatment of traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(5): 227-240.
- [3] 王瑞飞. 注射用丹参多酚酸对急性缺血性脑卒中患者认知功能与运动功能的影响 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(11): 2443-2447.
Wang R F. Effects of Salvianolic Acids for Injection on cognitive and motor function in patients with acute ischemic stroke [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(11): 2443-2447.
- [4] 王新星, 王晶, 仝海波, 等. 丹参酮II_A通过靶向 GLUT1 减轻缺血性脑卒中模型中神经细胞损伤的机制研究 [J]. *中国药物与临床*, 2020, 20(18): 2988-2993.
Wang X X, Wang J, Tong H B, et al. Tanshinone II_A ameliorates neuronal damage in ischemic stroke model by targeting GLUT1: A mechanistic study [J]. *Chin Remed Clin*, 2020, 20(18): 2988-2993.
- [5] 王小沙. 溶栓合并丹参酮II_A对30例急性缺血性脑卒中治疗的临床观察 [J]. *上海医药*, 2013, 34(17): 29-31.
Wang X S. Clinical observation of thrombolysis combined with tanshinone II_A in the treatment of 30 cases of acute ischemic stroke [J]. *Shanghai Med Pharm J*, 2013, 34(17): 29-31.
- [6] Ji B Y, Zhou F, Han L J, et al. Sodium tanshinone II_A sulfonate enhances effectiveness rt-PA treatment in acute ischemic stroke patients associated with ameliorating blood-brain barrier damage [J]. *Transl Stroke Res*, 2017, 8(4): 334-340.
- [7] 杨恒, 张晶, 罗明建, 等. 丹参酮II_A磺酸钠注射液联合奥拉西坦对卒中后认知障碍患者认知功能、血清炎症因子和氧化应激指标的影响 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(7): 1478-1482.
Yang H, Zhang J, Luo M J, et al. Effect of Tanshinone II_A Sulfonate Injection combined with oxiracetam in treatment of cognitive impairment after stroke and its effect on serum inflammatory factors and oxidative stress indexes [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(7): 1478-1482.
- [8] 王哲义, 孙恽泽, 邓欣祺, 等. 丹参酮类脂溶性成分及其干预缺血性脑卒中机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(4): 1181-1190.
Wang Z Y, Sun Y Z, Deng X Q, et al. Research progress on liposoluble constituents of tanshinone and their intervention mechanisms in ischemic stroke [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(4): 1181-1190.
- [9] Tang Q Q, Han R D, Xiao H, et al. Protective effect of tanshinone II_A on the brain and its therapeutic time window in rat models of cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(5): 1616-1622.
- [10] Yu X Y, Lin S G, Zhou Z W, et al. Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption of tanshinone IIA, a major active ingredient in the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Curr Drug Metab*, 2007, 8(4): 325-340.
- [11] Chen X, Zhou Z W, Xue C C, et al. Role of P-glycoprotein in restricting the brain penetration of tanshinone IIA, a major active constituent from the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, across the blood-brain barrier [J]. *Xenobiotica*, 2007, 37(6): 635-678.
- [12] He T T, Zou Q G, Feng Z B, et al. Study of sodium tanshinone II A sulfonate tissue distribution in rat by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Arzneimittelforschung*, 2010, 60(11): 660-666.
- [13] Zhou Z Y, Zhao W R, Zhang J, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate: A review of pharmacological activity and pharmacokinetics [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109362.
- [14] Ross C, Taylor M, Fullwood N, et al. Liposome delivery systems for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 8507-8522.
- [15] Teleanu D M, Chircov C, Grumezescu A M, et al. Neuronanomedicine: an up-to-date overview [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(3): 101.
- [16] Allen T M, Cullis P R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(1): 36-48.
- [17] 洪璐峰. 丹参酮II_A和川芎嗪复合纳米乳的制备及其初步药代动力学研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2019.
Hong L F. Preparation and preliminary pharmacokinetic study of tanshinone II_A and tetramethylpyrazine composite nanoemulsion [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2019.
- [18] Gastaldi L, Battaglia L, Peira E, et al. Solid lipid

- nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: Current state of the art [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 87(3): 433-444.
- [19] Torchilin V P. Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives [J]. *Pharm Res*, 2007, 24(1): 1-16.
- [20] 韩 凤, 高楠楠, 崔业波. 复方氟尿嘧啶口服溶液包封率测定方法的改进 [J]. *中国药品标准*, 2021, 22(6): 510-514.
- Han F, Gao N N, Cui Y B. Improvement of the determination method of entrapment efficiency of compound fluorouracil oral solution [J]. *Drug Stand China*, 2021, 22(6): 510-514.
- [21] 唐顺之, 牛亚伟, 关伟键, 等. 不同磷脂成分的研究及其乳化能力的比较 [J]. *食品科技*, 2019, 44(3): 261-266.
- Tang S Z, Niu Y W, Guan W J, et al. Comparison of the composition and emulsifying ability of different phospholipids [J]. *Food Sci Technol*, 2019, 44(3): 261-266.
- [22] 周 洁, 王春柳, 刘琪琪, 等. 载芍药苷的甘草次酸修饰脂质聚合物杂化纳米粒体内靶向性分析 [J]. *中国药师*, 2022, 25(1): 75-81.
- Zhou J, Wang C L, Liu Q Q, et al. *In vivo* targeting analysis of glycyrrhetic acid modified lipopolymer hybrid nanoparticles loaded with paeoniflorin [J]. *China Pharm*, 2022, 25(1): 75-81.
- [23] 付 强, 蒋香云, 雷钧涛, 等. 利格列汀双层缓释片的制备及体外释放研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(6): 704-709.
- Fu Q, Jiang X Y, Lei J T, et al. Study on preparation process and *in vitro* release behavior of linagliptin double-layer sustained-release tablets [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2021, 38(6): 704-709.
- [24] 甘发平. 丹参酮II_A的药动学研究及透过血脑屏障的初步考察 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- Gan F P. Study on the pharmacokinetics of tanshinone II_A and the preliminary investigation on its permeation across the blood-brain barrier [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [25] Ashour A A, Ramadan A A, Abdelmonsif D A, et al. Enhanced oral bioavailability of Tanshinone II_A using lipid nanocapsules: Formulation, *in-vitro* appraisal and pharmacokinetics [J]. *Int J Pharm*, 2020, 586: 119598.
- [26] Hao H P, Wang G J, Cui N, et al. Pharmacokinetics, absorption and tissue distribution of tanshinone II_A solid dispersion [J]. *Planta Med*, 2006, 72(14): 1311-1317.
- [27] Sengupta S, Eavarone D, Capila I, et al. Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system [J]. *Nature*, 2005, 436(7050): 568-572.
- [28] Liu X, Ye M, An C Y, et al. The effect of cationic albumin-conjugated PEGylated tanshinone II_A nanoparticles on neuronal signal pathways and neuroprotection in cerebral ischemia [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(28): 6893-6905.
- [29] Satapathy M K, Yen T L, Jan J S, et al. Solid lipid nanoparticles (SLNs): An advanced drug delivery system targeting brain through BBB [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(8): 1183.

[责任编辑 兰新新]