

## 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束的制备、表征及在急性心肌缺血模型大鼠体内的组织分布

赵炎军<sup>1</sup>, 王建平<sup>1</sup>, 吴凡<sup>1</sup>, 谢瑞<sup>1</sup>, 周定荣<sup>2\*</sup>

1. 浙江省中医院 药剂科, 浙江 杭州 310006

2. 中南大学湘雅二医院 中心实验室, 湖南 长沙 410011

**摘要:** 目的 制备黄芩苷-聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物 (PEG-PLGA) 载药纳米胶束, 并研究其体外释药性能及在急性心肌缺血模型大鼠体内的组织分布。方法 采用正交试验优选黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束的制备工艺, 优化的黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束再进行粒径、Zeta 电位和透射电子显微镜 (TEM) 检测表征, 采用体外释放实验、组织分布实验对该载药系统进行评价。结果 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束优选的制备工艺条件为黄芩苷-PEG-PLGA 的质量比为 1:10, 旋转蒸发器转动速率为 80 r/min, 水化温度为 40 °C, 优化的黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束粒径为 (18.5±0.5) nm, Zeta 电位为 (-10.9±0.7) mV, 载药量为 (7.9±0.3)%, 包封率为 (86.2±2.5)%。采用芘测定法检测 PEG-PLGA 纳米胶束的临界胶束质量浓度为 3.8 μg/mL, TEM 检测发现黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束呈现粒径均一的圆球型; 体外释放实验表明, 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束具有明显的缓释特征; 组织分布实验表明黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束在正常大鼠脏器中分布大小顺序为肝>脾>心>肾>肺>脑, 而在急性心肌缺血模型大鼠脏器分布大小顺序为肝>心>脾>肾>肺>脑, 与正常大鼠比较, 急性心肌缺血模型大鼠心脏中药物浓度在各时间段都呈现明显升高的趋势, 在 120 min 时最高药物质量浓度可达 (2 897±135) ng/mL, 显著高于正常大鼠中心脏的最高药物浓度 (2 411±89) ng/mL, 该结果表明, 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束在急性心肌缺血区域具有良好的靶向性。结论 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束具有良好的载药性能, 体外释药缓慢, 且可以将药物蓄积于缺血心肌部位, 具有良好的心脏靶向性。

**关键词:** 黄芩苷; PEG-PLGA; 纳米胶束; 临界胶束浓度; 心脏靶向; 缓慢释放; 正交试验

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)18-4269-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.010

## Preparation and characterization of baicalin PEG-PLGA nanomicelles and tissue distribution in rats with acute myocardial ischemia

ZHAO Yan-jun<sup>1</sup>, WANG Jian-ping<sup>1</sup>, WU Fan<sup>1</sup>, XIE Rui<sup>1</sup>, ZHOU Ding-rong<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China

2. Central Laboratory of The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

**Abstract: Objective** To prepare baicalin-polyethylene glycol-poly (lactic-co-glycolic acid) copolymer (PEG-PLGA)-loaded nanomicelles, and study its *in vitro* drug release properties and tissue distributed in rats with acute myocardial ischemia. **Methods** The preparation process of baicalin PEG-PLGA nanomicelles was optimized by orthogonal test. The optimized baicalin PEG-PLGA nanomicelles were characterized by particle size, Zeta potential, and TEM electron microscopy. The *in vitro* release assay and tissue distribution of the acute myocardial ischemia rat model were used to evaluate this drug delivery system. **Results** The preferred preparation conditions for baicalin PEG-PLGA nanomicelles were a mass ratio of baicalin to PEG-PLGA at 1:10 with a rotary evaporator rotation rate of 80 r/min and a hydration temperature of 40 °C. The optimized baicalin PEG-PLGA nanomicelle particle size was (18.5±0.5) nm, the zeta potential was (-10.9±0.7) mV, the drug loading was (7.9±0.3)%, and the encapsulation efficiency was (86.2±2.5)%. The critical micelle concentration of PEG-PLGA nanomicelles was 3.8 μg/mL by oxime assay. TEM showed that baicalin PEG-PLGA nanomicelles presented a spherical shape with uniform particle size, *In vitro* release test showed that baicalin

收稿日期: 2018-04-12

基金项目: 湖南省卫计委基金资助项目 (C201800141)

作者简介: 赵炎军, 硕士, 主管药师, 主要从事中药活性成分及新制剂开发研究。Tel: (0571)87068001 E-mail: 779229498@qq.com

\*通信作者 周定荣, 副教授, 博士, 主要从事纳米高分子载体药物研究。E-mail: zhoudingrong11@126.com

PEG-PLGA nanomicelles had obvious sustained release characteristics; Tissue distribution test showed that the order of distribution of baicalin PEG-PLGA nanomicelles in normal rat organs was liver > spleen > heart > kidney > lung > brain, while the distribution of baicalin PEG-PLGA nanomicelles in acute myocardial ischemia model was liver > heart > spleen > kidney > brain. Compared with normal rats, the drug concentration in the heart of rats with acute myocardial ischemia showed a significant increase trend in all time periods, and the highest drug concentration at 120 min could reach  $(2\ 897 \pm 135)$  ng/mL, the highest drug concentration of the heart in the normal rats was  $(2\ 411 \pm 89)$  ng/mL, which indicated that the baicalin PEG-PLGA nanomicelles had good targeting in the acute myocardial ischemia zone. **Conclusion** Baicalin PEG-PLGA nanomicelles have good drug-loading properties, slow release *in vitro*, and can accumulate drugs in the ischemic myocardium, which has good cardiac targeting.

**Key words:** baicalin; PEG-PLGA; nanomicelles; critical micelle concentration; heart-targeting; slow-release; orthogonal test

黄芩苷(baicalin)是从黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 中提取的主要有效成分<sup>[1]</sup>, 近年大量文献报道黄芩苷在心脑血管方面, 具有保护心肌缺血/再灌注损伤、保护脑组织损伤、抑制血管平滑肌细胞增殖和抗心律失常等药理活性<sup>[2-6]</sup>。但黄芩苷存在亲水性和亲油性均较差、体内半衰期短、分布相半衰期仅为数十分钟、生物利用度低等系列问题<sup>[7-9]</sup>。

鉴于黄芩苷在心血管方面良好的药理活性, 故构建一种载药量高、水溶性好及释药缓慢的新型给药系统, 将黄芩苷药物聚集在缺血心肌部位, 将有助于增强其药效。聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物 (polyethylene glycol-poly(lactic acid glycolic acid), PEG-PLGA) 是由亲水 (PEG)-亲脂 (PLGA) 两者形成的双亲性嵌段共聚物, 具有良好的生物相容性和无免疫原性。据文献报道<sup>[10]</sup>, PEG-PLGA 纳米胶束在肿瘤组织部位具有渗透与滞留时间 (enhanced permeability and retention time, EPR) 效应, 由于缺血心肌与肿瘤部位环境存在炎症细胞浸润, 推测 PEG-PLGA 在缺血心肌部位是否也具有同样的作用, 值得研究探讨。因而本课题以 PEG-PLGA 为载体材料, 采用薄膜水化法制备黄芩苷纳米胶束, 对黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束在急性心肌缺血模型大鼠体内组织分布进行考察, 为黄芩苷新剂型的研究奠定基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

TGL-16M 台式高速冷冻离心机, 上海聚亮光学仪器有限公司; LC-20AT 高效液相色谱仪、AUY120 电子分析天平, 日本岛津公司; Zetasizer Nano ZS 纳米胶束电势仪, 英国马尔文公司; JEM-2100 Plus 透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社。

### 1.2 药品与试剂

PEG-PLGA, 济南岱罡生物科技有限公司, 批号 20170511, PEG<sub>2000</sub>-PLGA<sub>500</sub> 相对分子质量约

2 500; 黄芩苷原料药, 西安冰草化工有限公司, 批号 170917, 质量分数 98%; 黄芩苷对照品 (批号 110715-201117, 质量分数  $\geq 98\%$ )、内标物卡马西平 (批号 100142-201105, 质量分数  $\geq 98\%$ ), 供含量测定用, 中国食品药品检定研究院; 色谱纯甲醇购自美国 ACS 试剂公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自北京索莱宝科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

雄性 SD 大鼠, SPF 级, 购于中南大学湘雅医学院实验动物中心, 许可证号 SCXK (湘) 2017-11356, 合格证号 HUNANSLK20180425。

## 2 方法与结果

### 2.1 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束的制备工艺

精密称取设定质量的黄芩苷和 PEG-PLGA, 按照一定比例加入适量色谱甲醇使其完全溶解, 置于旋蒸瓶中, 混合均匀, 通入氩气进行保护, 于 37 °C 温度下在设定的转速下旋转蒸发形成一层均匀干燥薄膜, 再在室温条件抽真空约 10 h 除尽残留的有机溶剂, 加入适量 PBS 促使薄膜水合, 再于设定的水浴温度下水化 60 min 后, 再超声 20 min, 室温下放置 1 h 后, 采用 0.2  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过 3~4 次除去沉淀物, 促使粒径达到均一, 再冷冻干燥 24 h, 即得黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束。

### 2.2 粒径、Zeta 电位及形态考察

取制备黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束溶液, 取适量以蒸馏水稀释至合适浓度, 采用 Zetasizer Nano ZS 纳米胶束电势仪测定其粒径分布、Zeta 电位; 再取适量黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束溶液, 以蒸馏水稀释至合适浓度, 超声促使粒子分布均一, 然后滴加在铜网上, 再用滤纸吸走多余的液体, 室温烘干, 置透射电镜下观察纳米胶束的形态。

### 2.3 包封率及载药量的测定

精密吸取过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜后的黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束适量 400  $\mu\text{L}$ , 置于超滤离心管 (截

留相对分子质量 3 000) 中经高速冷冻离心机 12 000 r/min 低温离心 10 min, 上层即为载药纳米胶束, 加入 10 倍体积甲醇溶解破坏纳米胶束的包封结构, 促使黄芩苷完全释放, 经 HPLC 测定纳米胶束中包封的药物量 ( $M_{载}$ ), 采用同样过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜前 400  $\mu\text{L}$  黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束, 同法测定, 可测定总药物量 ( $M_{总}$ ), 计算包封率。精密称取黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束冻干粉适量, 计为  $W_1$ , 加入适量 PBS 成胶束, 再加入 10 倍体积甲醇破坏胶束, 同法测定即为胶束中的药物量 ( $W_0$ ), 检测方法参照《中国药典》2015 年版一部的色谱条件<sup>[11]</sup>, 甲醇-水-磷酸 (47:53:0.2) 为流动相; 检测波长为 280 nm, 按公式计算载药量<sup>[12-13]</sup>。

$$\text{包封率} = M_{载} / M_{总}$$

$$\text{载药量} = W_0 / W_1$$

## 2.4 正交试验优选黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束的制备工艺

按照表 1 设计正交试验, 考察纳米胶束制备过程中的 3 个因素, 即药物黄芩苷与载体 PEG-PLGA 比例 (A)、转速 (B) 和水化温度 (C) 对纳米胶束性质的影响。以纳米粒径、载药量、包封率为综合评价指标, 满分 100 分, 其中纳米粒径占 50%, 以最小值为满分 50 分; 载药量占 25%, 以最大值为满分 25 分; 包封率占 25%, 以最大值为满分 25 分, 优选黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束的制备工艺, 结果见表 1。由表 2 方差分析可知, 极差结果显示各因素的影响大小为  $C > A > B$ , 且这三者都具有显著性意义, 优化的水平结果表明  $A_2B_2C_2$  为最佳方案, 即黄芩苷与 PEG-PLGA 的质量比为 1:10, 旋转蒸发仪转速为 80 r/min, 水化温度为 40  $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 正交试验设计及结果

Table 1 Orthogonal design and results

试验号	A	B/(r·min <sup>-1</sup> )	C/ $^{\circ}\text{C}$	D (空白)	纳米粒径/nm	载药量/%	包封率/%	综合评分
1	0.5:10 (1)	60 (1)	20 (1)	(1)	26.0	7.2	68.2	77.2
2	0.5:10 (1)	80 (2)	40 (2)	(2)	20.3	8.7	66.3	91.4
3	0.5:10 (1)	100 (3)	60 (3)	(3)	20.6	7.5	80.3	90.5
4	1.0:10 (2)	60 (1)	40 (2)	(3)	21.4	8.9	85.3	94.0
5	1.0:10 (2)	80 (2)	60 (3)	(1)	19.5	8.6	80.9	97.3
6	1.0:10 (2)	100 (3)	20 (1)	(2)	21.8	7.2	76.2	86.7
7	2.0:10 (3)	60 (1)	60 (3)	(2)	20.3	7.7	72.9	90.5
8	2.0:10 (3)	80 (2)	20 (1)	(3)	22.7	6.4	87.5	86.1
9	2.0:10 (3)	100 (3)	40 (2)	(1)	19.7	8.4	81.1	95.1
$K_1$	259.1	261.7	250.0	269.6				
$K_2$	278.0	274.8	280.5	268.6				
$K_3$	271.7	272.3	278.3	270.6				
R	18.9	13.1	30.5	2.0				

表 2 方差分析

Table 2 Variance analysis

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	61.740 0	2	92.610 0	$P < 0.01$
B	32.246 7	2	48.370 0	$P < 0.05$
C	192.886 7	2	289.330 0	$P < 0.01$
D (误差)	0.666 7	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

按照上述优化条件制备黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束, 结果如图 1 所示, 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束大小为  $(18.5 \pm 0.5)$  nm, PDI 值为  $0.12 \pm 0.01$ ,

Zeta 电位为  $(-10.9 \pm 0.7)$  mV; TEM 观察结果表明黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束外观呈现大小比较均一的圆球型, 且分散性比较好。经 HPLC 检测, 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束的载药量为  $(7.9 \pm 0.3)$  %, 包封率为  $(86.2 \pm 2.5)$  %, 重复性和稳定性也相对良好。

## 2.5 临界胶束浓度 (critical micelle concentration, CMC) 测定

采用经典的茚测定法, 将冻干 PEG-PLGA 纳米胶束分散于 pH 7.4 PBS 溶液中, 将 1~10  $\mu\text{g/mL}$  系列质量浓度 PEG-PLGA 纳米胶束与茚混合, 室温搅

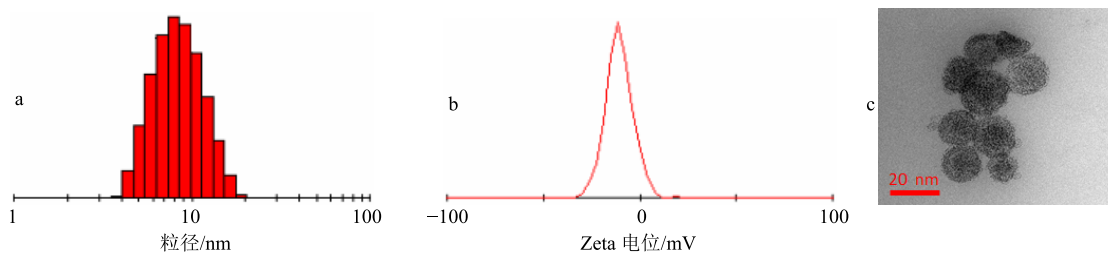


图 1 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束的粒径 (a)、Zeta 电位 (b) 和 TEM 观察结果 (c)

Fig. 1 Particle size (a), Zeta potential (b) and TEM image (c) of baicalin-PEG-PLGA nanomicelles

拌 6 h, 采用荧光光度仪检测芘在 373、374 nm 下的发射光谱强度 ( $I_{373}$  和  $I_{394}$ ), 根据系列  $I_{394}/I_{373}$  值可获得纳米胶束的 CMC<sup>[14]</sup>。

芘属于亲脂性化成分, 能包裹于 PEG-PLGA 纳米胶束亲脂性内核中, 由图 2 分析可知, 随着 PEG-PLGA 纳米胶束质量浓度增大, 胶束内核中的芘含量也增加, 推测芘由游离态逐渐过渡到纳米胶束的内核中, 拐点处恰好为 PEG-PLGA 纳米胶束的 CMC, 大约为 3.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 体外释放

采用透析法考察黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束释放动力学行为, 将 0.5 mg 黄芩苷和黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束 (含 0.5 mg 黄芩苷) 装入 Spectrumlabs 透析袋 (截留相对分子质量 2 000) 中, 密封好, 分别置于 200 mL pH 7.4 PBS 释放介质中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴环境中进行体外释放特性的研究。按照设定的时间点 1、2、4、6、8、10、12、18、24、

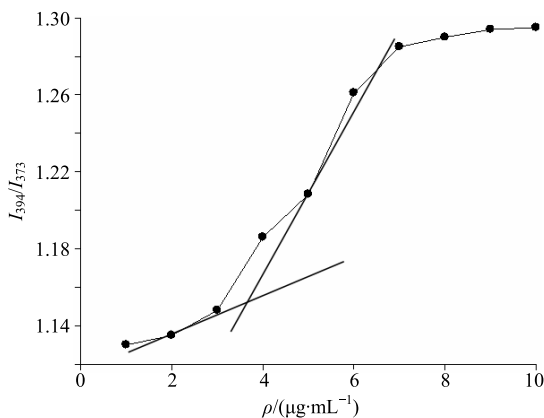


图 2 PEG-PLGA 纳米胶束的 CMC

Fig. 2 CMC of PEG-PLGA nanomicelles

48、72、96 h 取样, 每次取样 0.5 mL 进样检测分析, 同时补充相应体积的 PBS, 测定各次取样的黄芩苷质量浓度, 并计算累积释放率。

由图 3 曲线和表 3 结果显示, 黄芩苷释药迅速, 18 h 内基本释放完全, 累积释放率达到 93.5% 左右, 体外释放 50% 的时间 ( $T_{50}$ ) 为 3.8 h; 而黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束溶液在 24 h 内呈现较快释放状态, 大约 68%, 24 h 后释药比较缓慢, 直到 96 h 累积释放率为 92%,  $T_{50}$  为 16.7 h, 由此表明, 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束具有明显的缓释特征。

2.7 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束在急性心肌缺血模型大鼠体内的组织分布

2.7.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 以甲醇-0.2% 磷酸水溶液为混合流动相进行梯度洗脱, 洗脱程序为 0~6 min, 5%~20% 甲醇; 6~11 min, 20%~70% 甲醇;

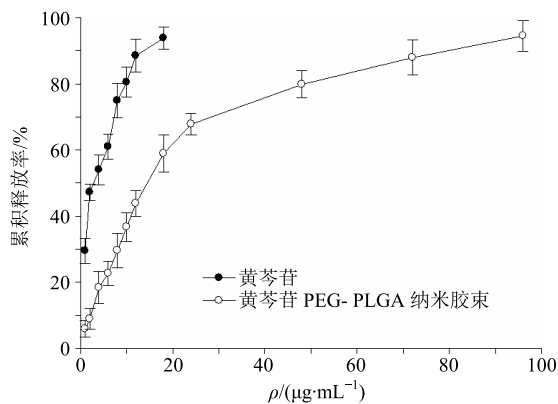


图 3 黄芩苷与黄芩苷 PEG-PLGA 体外释放曲线

Fig. 3 *In vitro* release profile of baicalin and baicalin-PEG-PLGA nanomicelles

表 3 体外释放曲线拟合方程

Table 3 Fitting equation of *in vitro* release curve

样品	曲线方程	r	$T_{50}/\text{h}$
黄芩苷	$y=22.416+81.218 2(1-e^{-0.125 4 \cdot x})$	0.991 6	3.8
黄芩苷 PEG-PLGA	$y=0.026+91.519 2/(1-e^{-0.052 8 \cdot x})$	0.997 2	16.7

11~13 min, 70%~5%甲醇; 柱温 30 °C; 检测波长 280 nm; 体积流量 1.0 mL/min。

**2.7.2 模型制备及组织脏器样品的处理** 取 70 只 SD 大鼠, 按照随机的原则分成 2 组, 每组 35 只, 给药前禁食 12 h, 将黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束配成适当质量浓度的溶液后, 从大鼠尾 iv 给药, 剂量为 30 mg/kg, 注射给药 5 min 后, 取其中一组大鼠以结扎冠脉的方式制备急性心肌缺血模型 (以心电图 II 导联 ST 段抬高作为模型制备成功的标志), 另外一组设为正常大鼠 (不结扎造模), 2 组均于给药后 30、60、90、120、180、240、300 min 处死大鼠 5 只, 迅速摘取心、肝、脾、肺、肾、脑组织, 采用 PBS 洗涤各组织脏器, 除去凝固的血块, 按照体质量选择部分组织, 立即置-80 °C 下冷冻保存。

取 2 组大鼠脏器组织适量, 加入 pH 7.4 PBS 按质量体积比配成 0.4 g/mL 的组织匀浆液, 精密吸取匀浆液 200 μL, 置于 2 mL 洁净 EP 离心管中, 再加入卡马西平内标液 (质量浓度为 1 μg/mL) 40 μL, 再添加 1 mL 色谱甲醇涡旋混匀 5 min, 沉淀蛋白, 转入高速离心机以 15 000 r/min 离心 5 min 去除蛋白, 采用移液枪吸取上清液 800 μL, 转移至 1.5 mL 洁净离心管中, 水浴氮气流下吹干, 残留物加入 50 μL 色谱甲醇溶解, 再高速离心取上清液 30 μL 进样。

**2.7.3 方法学考察**

(1) 专属性: 取适量大鼠空白心脏组织匀浆液, 除不加卡马西平内标外, 其余均按“组织脏器样品的处理”项下操作, 即为空白样品; 将黄芩苷对照品溶液和卡马西平内标溶液一同与适量的大鼠空白心脏组织进行匀浆, 同法操作, 获得相应的含黄芩苷和卡马西平内标的样品; 取大鼠 iv 给予黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束后 90 min 的心脏组织进行匀浆, 加入内标溶液, 同法操作, 得到给药后大鼠心脏组织样品。在选定的色谱条件下测定, 结果见图 4, 黄芩苷出峰时间为 8.2 min, 卡马西平内标物出峰时间 9.8 min, 黄芩苷与卡马西平峰形对称, 分离度良好, 且周围内源性物质及代谢物均不对两者形成干扰, 表明方法专属性良好。

(2) 线性关系考察: 取在 60 °C 减压干燥 4 h 的黄芩苷对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成含黄芩苷 200 μg/mL 对照品储备液, 再精密吸取 100 μL 黄芩苷对照品储备液, 添加大鼠空白组织匀浆液 900 μL, 形成 20 μg/mL 含药组织匀浆液, 再以组织匀浆液依次进行稀释, 可获得含黄芩苷的组织标准

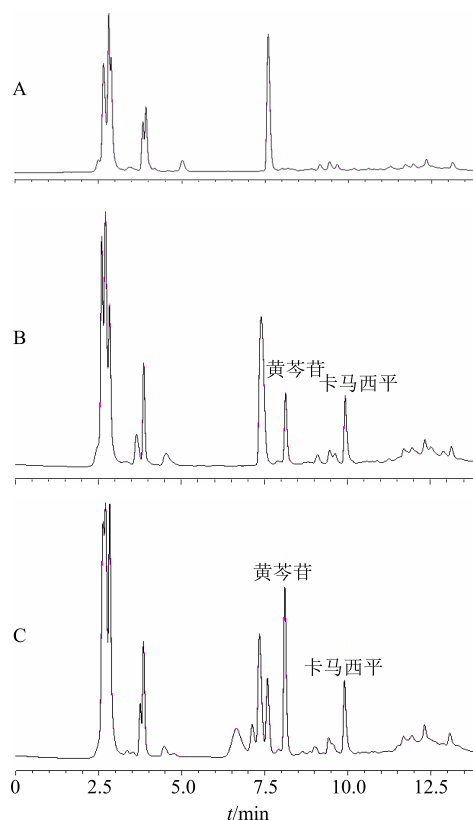


图 4 空白心脏组织 (A)、空白心脏组织+黄芩苷+卡马西平 (B)、黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束注射后心脏组织 (内含黄芩苷和卡马西平, C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of blank heart tissue (A), blank heart tissue spiked with baicalin and carbamazepine (B), and heart tissue sample after administration of baicalin-PEG-PLGA nanomicelles (containing baicalin and carbamazepine, C)

液, 质量浓度分别为 10 000、5 000、2 500、1 250、600、300、150、80 ng/mL 样品, 加入 40 μL 卡马西平内标溶液, 再按照选定色谱条件进行操作, 以组织样品中黄芩苷的质量浓度为横坐标 (C), 黄芩苷与内标物的峰面积比值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 即可获得标准曲线。

由表 4 可见, 黄芩苷质量浓度在 80~10 000 ng/mL 时, 大鼠各组织的线性关系良好, 可以满足生物组织样品中黄芩苷的含量测定。

(3) 精密度和准确度考察: 精密吸取黄芩苷储备液适量体积, 与大鼠空白组织液混合, 配制质量浓度为 2 500、600、150 ng/mL 的质控 (QC) 样品, 按照选定色谱条件进行操作, 每天各质量浓度平行 5 份, 进样分析, 计算日内精密度; 以上各质量浓度下质控样品测定 3 d, 计算日间精密度, 同时计算准确度。

表 4 黄芩苷在大鼠组织样品中的标准曲线 (80~10 000 ng·mL<sup>-1</sup>)

Table 4 Standard curves of baicalin in different tissues of rats (80—10 000 ng·mL<sup>-1</sup>)

组织脏器	曲线方程	r
心	$Y=8.49 \times 10^{-3} C-3.95 \times 10^{-3}$	0.991 6
肝	$Y=10.57 \times 10^{-3} C-4.69 \times 10^{-3}$	0.995 7
脾	$Y=4.51 \times 10^{-3} C+3.09 \times 10^{-3}$	0.997 2
肺	$Y=7.52 \times 10^{-3} C+4.03 \times 10^{-3}$	0.998 3
肾	$Y=7.13 \times 10^{-3} C+4.77 \times 10^{-3}$	0.992 3
脑	$Y=5.11 \times 10^{-3} C+2.07 \times 10^{-3}$	0.993 4

质控样品低、中、高 3 个质量浓度的日内精密度及日间精密度分别在 7.6%、9.8% 以内, 回收率在 85.3%~106.8%。结果表明, 各质控样品的精密度和准确度均比较好, 符合方法学的测定要求。

(4) 稳定性考察: 取以上 3 个质量浓度的质控样品, 分别考察各组织样品在室温下放置 12 h, 处理后 4 ℃ 放置 24 h, 连续冻融 3 次以及在 -80 ℃ 下冷冻 2 周, 测定这些条件下样品的含量, 评估其稳定性。QC 样品在室温放置 12 h、处理后 4 ℃ 放置 24 h、反复冻融 3 次以及于 -80 ℃ 冰箱中放置 2 周后, 黄芩苷 QC 样品在各组织样品测定质量浓度与理论质量浓度的偏差均小于 10%, 由此表明, 黄芩苷在组织脏器中较为稳定, 符合方法学的测定要求。

2.7.4 组织分布 图 5 结果表明, 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束在除脑外的其他脏器均有分布, 正常大鼠中的药物分布大小顺序为肝>脾>心>肾>肺>脑, 而在急性心肌缺血模型大鼠中的大小顺序为肝>心>脾>肾>肺>脑。与正常大鼠比较, 急性心肌缺血模型大鼠心脏中药物质量浓度在各时间段都呈现明显升高的趋势, 尤其在 120 min 处的最高药物质量浓度可达 (2 897±135) ng/mL, 显著高于正常大鼠中心脏在该时间的最高药物质量浓度 (2 411±89) ng/mL, 该结果表明, 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束在急性心肌缺血区域具有良好的靶向性。另外, 急性心肌缺血模型大鼠其余组织的药物质量分数与正常大鼠相比, 大体上呈降低趋势, 肝脏尤其表现最显著, 最高药物质量浓度从 (4 452±127) ng/mL 下降至 (3 518±106) ng/mL。综合分析, 急性心肌缺血模型大鼠其余脏器减少的药物可能趋向于缺血心肌部位, 故心脏中的药物质量浓度明显升高。

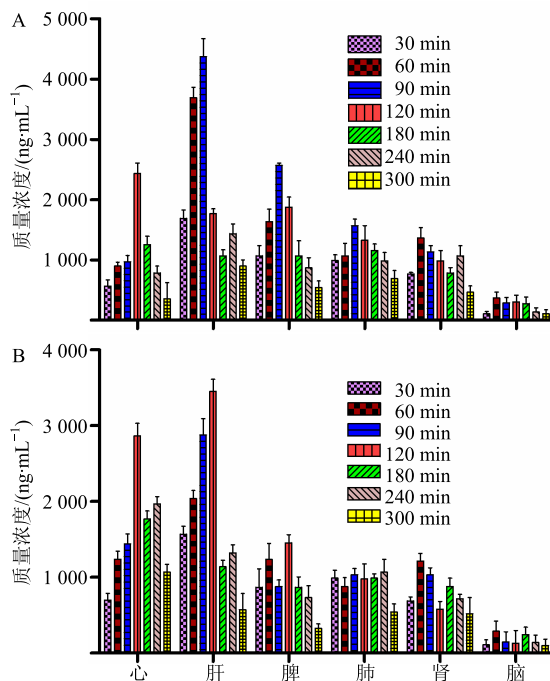


图 5 黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束在正常大鼠 (A) 与急性心肌缺血模型大鼠 (B) 中的组织分布

Fig. 5 Tissue distribution profiles of baicalin-loaded PEG-PLGA nanomicelles in normal rats (A) and acute myocardial ischemia model rats (B)

### 3 讨论

PEG-PLGA 是由聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物两者形成的双亲性嵌段共聚物, 外周 PEG 具有良好的水溶性、生物相容性和无免疫原性, 可以减少体内免疫系统如肝脾网状内皮系统的特异性识别, 加之其大分子尺寸结构, 不易被肾小球所滤过, 故在体内可以长循环, 从而延长药物的半衰期<sup>[15-16]</sup>。内核 PLGA 具有良好的亲脂性, 而黄芩苷小分子具有一定的疏水性, 恰好可以融合在疏水性内核 PLGA 中。

从正交试验优选工艺分析, 黄芩苷与 PEG-PLGA 的投料比、水化温度和搅拌速率均影响纳米胶束的形成, 从极差分析, 水化温度影响因素最大, 水化温度越高, 纳米胶束粒径相对较小, 可能温度上升, 加速了粒子之间的相互运动, 从而减少了大颗粒的聚集, 但温度太高, 可能会影响纳米胶束的形成<sup>[7]</sup>, 故本次优选的工艺选择 40 ℃; 其次, 随着黄芩苷 PEG-PLGA 的投料比的增加, 载药量呈先增大后减少趋势, 可能开始阶段纳米胶束核对黄芩苷的包覆未达饱和; 而随后载药量的减少是由于胶束制备中过量的药物分子重新结合形成大的药物颗粒, 由于这些颗粒聚集的速度明显高于药物被胶束

包裹的速度,反而导致载药量降低。由此表明胶束核-药物间的疏水相互作用和疏水药物颗粒沉淀是相互竞争的过程:较低投药量能保证药物被胶束有效包裹,过高投药量往往发生药物颗粒聚集,同样会产生低载药胶束<sup>[17-18]</sup>。另外,旋转蒸发仪的旋转速率也影响胶束的形成,需控制适当的转速,促使药物与纳米胶束在搅拌过程中形成均一的薄膜体系,有利于纳米胶束高效包裹药物。根据优选的工艺参数,制备的黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束平均粒径大小为 $(18.5 \pm 0.5)$  nm, Zeta 电位为 $(-10.9 \pm 0.7)$  mV,呈现对称性良好的正态分布,能形成粒径大小均一的纳米胶束。TEM 结果发现,黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束呈现明显的圆球形结构,粒径大小非常均一,与马尔文粒径仪检测结果基本相似。鉴于黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束粒径很小,故可通过网格蛋白和小窝蛋白的介导实现跨膜转运,还能诱导细胞膜形成临时性的孔道,增加细胞膜的流动性,便于药物进入组织细胞,从而有助于提高药物的疗效<sup>[19]</sup>。体外释放实验结果表明,黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束释药比较缓慢,这样黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束可减少药物在体内循环过程中药物的损失,从而将更多的药物输送到有效部位。

据文献报道<sup>[20-21]</sup>,缺血心肌区域存在明显的炎症细胞浸润,血管内膜通透性异常升高,血管壁之间存在类似肿瘤部位的间隙,PEG 高分子体系能在缺血心肌部位具有良好的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)。正常组织血管壁细胞结构完整,且排列非常紧密,故 PEG-PLGA 纳米胶束在正常组织血管部位几乎不会渗出,但在心肌缺血区域 PEG-PLGA 纳米胶束可以从间隙增大的血管区域自由出入,故载药 PEG-PLGA 纳米胶束可将药物携带后,聚集在心肌缺血部位,从而增加了病变部位的药物浓度。如 Lukyanov 等<sup>[22]</sup>研究发现聚乙二醇衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PLGA)纳米胶束主要聚集梗死早期心肌组织,其含量为未梗死区心肌的 8 倍。本研究结果发现,黄芩苷 PEG-PLGA 纳米胶束在急性心肌缺血模型大鼠心脏中药-时曲线下面积 AUC 为正常大鼠心脏中的 1.8 倍,该实验结果与文献报道基本一致,所以,得出结论 PEG-PLGA 纳米胶束载药系统在急性心肌缺血区域具有较好的心脏靶向性,可以将药物蓄积于病变部位,从而有利于提高药物的治疗效果。

#### 参考文献

- [1] 刘家荟,于桐,郭伟英.黄芩素固体脂质纳米粒的制备及药代动力学研究[J].中药材,2016,39(12):2823-2827.
- [2] 辛文好,宋俊科,何国荣,等.黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J].中国新药杂志,2013,22(6):647-654.
- [3] 黄新造,柯文炳,占桂香,等.肝苏胶囊联合黄芩苷胶囊治疗慢性乙型病毒性肝炎的临床研究[J].现代药物与临床,2017,32(2):271-274.
- [4] 纪相福,史道华.黄芩苷的心脑血管作用研究进展[J].海峡药学,2006,18(5):10-12.
- [5] Wang X B, He F, Liao Y L, et al. Baicalin pretreatment protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting mitochondrial damage-mediated apoptosis [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(4): 4343-4345.
- [6] Wang P, Cao Y G, Yu J, et al. Baicalin alleviates ischemia-induced memory impairment by inhibiting the phosphorylation of CaMKII in hippocampus [J]. *Brain Res*, 2016, 1(5): 95-103.
- [7] 马文转,王金铃,屠鹏飞.黄芩苷纳米胶束的制备、表征及其对 MCF-7 细胞抑制作用的研究[J].中草药,2015,46(4):507-512.
- [8] Essa S, Rabanel J M, Hildgen P. Characterization of rhodamine loaded PEG-PLGA nanoparticles (NPs): Effect of poly (ethylene glycol) grafting density [J]. *Int J Pharm*, 2011, 411(1/2): 178-187.
- [9] 吴玉梅,李新悦,张谦,等.单克隆抗体 OX26 修饰的丹酚酸 B/黄芩苷纳米结构脂质载体研究[J].中草药,2018,49(12):2801-2808.
- [10] Xie Y, Liu C, Huang H, et al. Bone-targeted delivery of simvastatin-loaded PEG-PLGA micelles conjugated with tetracycline for osteoporosis treatment [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2018, 8(5): 1090-1102.
- [11] 中国药典[S].一部.2015.
- [12] 黄仁杰,鄢雪梨,陈虎彪.蛇葡萄素混合纳米胶束的制备及体外评价[J].中国中药杂志,2016,41(6):1054-1058.
- [13] 马文转,王金铃,屠鹏飞.盐酸小檗碱纳米胶束的制备、表征及体外抗肿瘤活性的研究[J].中国中药杂志,2015,40(21):4182-4188.
- [14] Wu H, Zhu L, Torchilin V P. pH-sensitive poly (histidine)-PEG/DSPE-PEG co-polymer micelles for cytosolic drug delivery [J]. *Biomaterials*, 34(4): 1213-1222.
- [15] Dorati R, Colonna C, Tomasi C, et al. gamma-irradiation of PEGd, IPLA and PEG-PLGA multiblock copolymers: II. effect of oxygen and EPR investigation [J]. *AAPS*

- PharmSciTech*, 2008, 9(4): 1110-1118.
- [16] Haji Mansor M, Najberg M, Contini A, *et al.* Development of a non-toxic and non-denaturing formulation process for encapsulation of SDF-1 $\alpha$  into PLGA/PEG-PLGA nanoparticles to achieve sustained release [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2018, 125(2): 38-50.
- [17] 高界铭, 明 静, 顾忠伟. 等. 9-硝基喜树碱纳米胶束的制备及体外释药研究 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2008, 25(6): 1338-1343.
- [18] 唐 岚, 吕龙飞, 沈丽婷. 染料木素-维生素 E 琥珀酸酯-聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯纳米胶束的制备研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(9): 1766-1772.
- [19] Huang J G, Leshuk T, Gu F X. Emerging nanomaterials for targeting subcellular organelles [J]. *Nano Today*, 2011, 6(5): 478-492.
- [20] Formiga F R, Garbayo E, Díaz-Herráz P, *et al.* Biodegradation and heart retention of polymeric microparticles in a rat model of myocardial ischemia [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 85(3 Pt A): 665-672.
- [21] Scott R C, Crabbe D, Krynska B, *et al.* Aiming for the heart: targeted delivery of drugs to diseased cardiac tissue [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008, 5(4): 459-470.
- [22] Lukyanov A N, Hartner W C, Torchilin V P. Increased accumulation of PEG-PE micelles in the area of experimental myocardial infarction in rabbits [J]. *J Control Release*, 2004, 94(1): 187-193.