

葛根素壳聚糖/海藻酸钠口服纳米粒的制备、表征与药动学研究

李娜, 颜洁, 关志宇*, 朱卫丰*, 钟凌云*, 周冬艳

江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

摘要:目的 制备及表征葛根素壳聚糖/海藻酸钠口服纳米粒(Pur-CS/SA-NPs), 并进行药动学研究。方法 采用自组合法制备 Pur-CS/SA-NPs, 对 Pur-CS/SA-NPs 混悬液和冻干粉的形态、粒径、多分散指数(PDI)、Zeta 电位、包封率、载药量、微观结构等进行表征; 建立葛根素 LC-MS/MS 分析方法, 测定大鼠口服给予 Pur-CS/SA-NPs 后血浆中葛根素的浓度, 考察其药动学特征。结果 Pur-CS/SA-NPs 混悬液和冻干粉的形态结构完整, 其中 Pur-CS/SA-NPs 混悬液的粒径为 (208.327 ± 1.870) nm, PDI 为 0.131 ± 0.006 , 包封率为 $(89.056 \pm 1.680)\%$, 载药量为 $(44.528 \pm 0.840)\%$, Pur-CS/SA-NPs 冻干粉的粒径为 (260.000 ± 0.475) nm, Zeta 电位为 (47.300 ± 0.208) mV, 包封率为 $(86.234 \pm 0.873)\%$, 载药量为 $(43.117 \pm 0.234)\%$, 无新化学键和晶体形成; Pur-CS/SA-NPs 的药时曲线下面积(AUC_{0-24} 和 $AUC_{0-\infty}$)、达峰时间(t_{max})、达峰浓度(C_{max})分别为 (833.067 ± 132.546) mg·h/L、 (844.919 ± 154.768) mg·h/L、 (1.000 ± 0.098) h、 (236.318 ± 36.864) mg/L, 葛根素的 AUC_{0-24} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 t_{max} 、 C_{max} 分别为 (250.087 ± 32.156) mg·h/L、 (250.091 ± 28.398) mg·h/L、 (0.500 ± 0.031) h、 (191.830 ± 17.963) mg/L, Pur-CS/SA-NPs 的 AUC_{0-24} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 t_{max} 、 C_{max} 分别为葛根素的 3.331、3.378、2.000、1.232 倍。结论 自组合法制备的 Pur-CS/SA-NPs 形态结构稳定, 口服给药后药物在体内的 AUC_{0-24} 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 t_{max} 均显著增大, 循环时间也相对延长, 显著提高了葛根素的生物利用度。

关键词: 葛根素; 壳聚糖; 海藻酸钠; 口服纳米粒; 表征; 药动学; LC-MS/MS; 冷冻干燥; 包封率; 载药量; 药时曲线下面积; 达峰时间; 药峰浓度; 自组合法; 生物利用度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)15-3894-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.15.008

Preparation, characterization and pharmacokinetics of puerarin chitosan/sodium alginate oral nanoparticles

LI Na, YAN Jie, GUAN Zhi-yu, ZHU Wei-feng, ZHONG Ling-yun, ZHOU Dong-yan

School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To prepare and characterize puerarin chitosan/sodium alginate oral nanoparticles (Pur-CS/SA-NPs) and conduct its pharmacokinetics studies. **Methods** Pur-CS/SA-NPs were prepared by self-assembly method, the morphology, particle size, polydispersity index (PDI), zeta potential, entrapment efficiency, drug loading and microstructure of Pur-CS/SA-NPs suspension and lyophilized powder were characterized. To determine the concentration of puerarin in plasma after oral administration of nanoparticles to rats, an LC-MS/MS analysis method for puerarin was established, and its pharmacokinetic characteristics were investigated. **Results** The morphology, structure and texture of Pur-CS/SA-NPs suspension and lyophilized powder were complete and fine, no new chemical bonds and crystals were formed. The particle size, PDI, Zeta potential, encapsulation efficiency, and drug loading of Pur-CS/SA-NPs suspension were (208.327 ± 1.870) nm, 0.131 ± 0.006 , $(89.056 \pm 1.680)\%$ and $(44.528 \pm 0.840)\%$, respectively. The particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading of Pur-CS/SA-NPs lyophilized powder were (260.000 ± 0.475) nm, (47.300 ± 0.208) mV, $(86.234 \pm 0.873)\%$ and $(43.117 \pm 0.234)\%$, respectively. The AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, t_{max} and C_{max} of Pur-CS/SA-

收稿日期: 2020-03-03

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2017YFC1702904); 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2018ZX09721002); 江西省教育厅科技计划项目(GJJ170718); 中药学一流学科科研项目(JXSYLXK-ZHYA0049)

作者简介: 李娜, 在读硕士, 从事药物新制剂与生物药剂学研究。Tel: 13672234558 E-mail: 2937698293@qq.com

***通信作者** 关志宇, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 从事药物新制剂与生物药剂学研究。Tel: 15879196566 E-mail: adlaiguan@126.com

朱卫丰, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (0791)87118614 E-mail: zwf0322@126.com

钟凌云, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制机制、饮片质量标准等研究。

Tel: (0791)87118939 E-mail: ly1638163@163.com

NPs were (833.067 ± 132.546) mg·h/L, (844.919 ± 154.768) mg·h/L, (1.000 ± 0.098) h and (236.318 ± 36.864) mg/L, respectively. The AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, t_{max} and C_{max} of puerarin were (250.087 ± 32.156) mg·h/L, (250.091 ± 28.398) mg·h/L, (0.500 ± 0.031) h and (191.830 ± 17.963) mg/L, respectively. The AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$, t_{max} and C_{max} of Pur-CS/SA-NPs were 3.331, 3.378, 2.000, and 1.232 times of puerarin, respectively. **Conclusion** The structure of Pur-CS/SA-NPs prepared by self-assembly method is stable. After oral administration, the AUC_{0-24} , $AUC_{0-\infty}$ and t_{max} of the drug in the body are significantly increased, and the circulation time is relatively extended, which significantly improve bioavailability of puerarin.

Key words: puerarin; chitosan; sodium alginate; oral nanoparticles; characterization; pharmacokinetics; LC-MS/MS; freeze-drying; entrapment efficiency; drug loading; area under drug-time curve; peak time; drug peak concentration; self-assembly method; bioavailability

葛根素 (puerarin, Pur) 为葛根的主要生物活性成分之一, 药理作用广泛, 在心脑血管、肝脏损伤、肿瘤、糖尿病、骨坏死等疾病的预防和治疗中效果显著^[1-4]。但葛根素溶解性差, 渗透性低, 被归为生物药剂学分类系统 (BCS) IV 类药物^[5], 口服后大部分随粪便以原型形式排出^[6], 仅有少部分吸收入血, 分布到各组织器官^[7], 生物利用度低。目前, 国内批准的葛根素临床应用剂型只有注射剂和滴眼液, 其注射剂需反复给药, 用量大, 患者服用不便, 不良反应也屡见报道, 如致敏、肝肾影响、休克、溶血反应等^[8-9], 限制了其临床广泛应用。

纳米粒比表面积大, 易于制备与修饰, 能够提高药物的溶解性和渗透性^[10-11]。采用自组装法制备的葛根素壳聚糖/海藻酸钠口服纳米粒 (Pur-CS/SA-NPs), 以口服的方式给药, 提高患者的依从性, 制备工艺简单, 质量稳定, 重复性强, 易于大规模产业化生产。本实验对经过严格处方工艺考察的 Pur-CS/SA-NPs^[12]的微观结构、药物动力学性质等研究, 建立完整的测定体内外葛根素 LC-MS/MS 的分析方法, 简单快速, 灵敏度高, 重现性好, 专属性高, 结果准确。在所建立的色谱分离条件下, 血浆中内源性杂质及代谢物不干扰样品测定。以期为葛根素新型给药系统的开发、临床应用及产业化生产等奠定基础。

1 材料与仪器

葛根素对照品, 中国食品药品检定研究院, 生产批号 110752-201816, 质量分数 >95.5%; 葛根素, 成都普菲德生物技术有限公司, 生产批号 18082401, 质量分数 >98%; 兰索拉唑, 中国食品药品检定研究院, 生产批号 100709-201304, 质量分数 >99.8%; 壳聚糖, 实验室自制, 脱乙酰度 >99%; 海藻酸钠 (批号 10210832, CAS: 9005-38-3, Alfa Aesar 公司; 无水氯化钙, 生产批号 20171219, 国药集团化学试剂有限公司; 色谱甲醇、色谱乙腈、

色谱甲酸均为美国 Tedia 公司。

SQP 万分之一分析天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; Sigma3-18K 高速冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 上海江星仪器有限公司; Vortex-Genius3 涡旋仪, IKA 仪器设备有限公司; SZ-93 自动双重纯水整流器, 上海亚荣生化仪器厂; EPED-ESL-10TH 超纯水仪, 南京易普易达科技发展有限公司; BF-2000 氮气吹干仪, 八方世纪公司; TECNAL G2 透射电子显微镜 (TEM), 美国 FEI 公司; Nano-S 马尔文纳米粒度仪, 英国马尔文公司; Agilent A1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; ZNCL-BS140*140 磁力搅拌器, 西安远舰仪器设备有限公司; KQ5200DA 超声仪, 昆山市超声仪器有限公司; PHS-25 pH 校准计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

实验动物 SD 大鼠, 雄性, 180~220 g, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (赣) 2018-0003。

2 方法与结果

2.1 Pur-CS/SA-NPs 的制备^[12]

精密量取壳聚糖储备液 400 μ L, 加入超纯水 4.6 mL 后混合均匀, 用 1% 的稀盐酸和饱和氢氧化钠溶液调节壳聚糖溶液的 pH 值后标记为备用溶液 A, 用 5% 的乙醇溶液溶解 10 mg 的 Pur 于 5 mL 量瓶中, 超声溶解后标记为备用溶液 B。将备用溶液 B 缓慢加入备用溶液 A 中, 搅拌混合均匀, 标记为备用溶液 C。另取 50 μ L 海藻酸钠储备液和 100 μ L 氯化钙储备液于 25 mL 烧杯中, 在磁力搅拌器下缓慢加入超纯水 9.85 mL, 搅拌 10 min 超声 10 min, 使海藻酸钠和氯化钙充分混合均匀, 标记为备用溶液 D。将备用溶液 C 通过 1 mL 注射针管缓慢滴入备用溶液 D 中, 边滴加边置于磁力搅拌器上搅拌, 滴加完全后超声 10 min, 超声结束后继续搅拌, 至溶液显明显乳光。

其中, 储备液的配制, 分别精密称取壳聚糖、氯化钙、海藻酸钠 250.0 mg 于 10 mL 量瓶中, 用水定容至刻度, 超声溶解后放冰箱冷藏备用。所制备的纳米粒平均粒径为 (208.327 ± 1.870) nm、多分散指数 (PDI) 为 (0.131 ± 0.006) 、包封率为 $(89.056 \pm 1.680)\%$ 、载药量为 $(44.528 \pm 0.840)\%$ 。

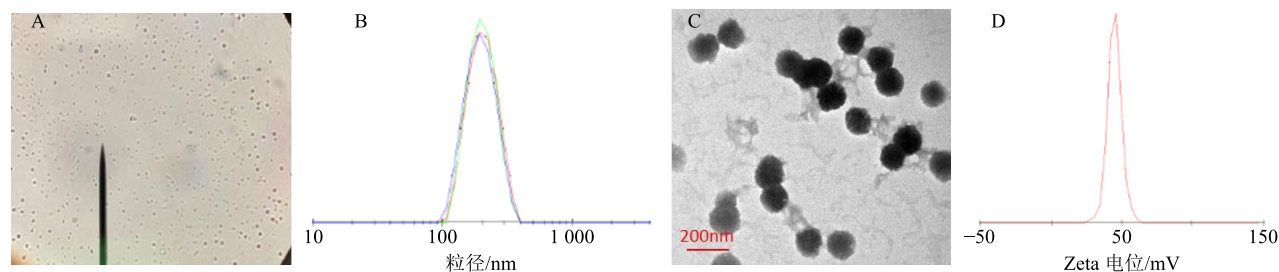


图 1 Pur-CS/SA-NPs 的电子显微镜图 (A)、粒径分布图 (B)、TEM 图 (C) 与 Zeta 电位分布图 (D)

Fig. 1 Electron microscope (A), particle size distribution (B), TEM (C) and Zeta potential distribution (D) of Pur-CS/SA-NPs

2.3 Pur-CS/SA-NPs 冷冻干燥后的表征

2.3.1 冻干后纳米粒形态、粒径与 Zeta 电位观察 将 Pur-CS/SA-NPs 混悬液置于培养皿中, 冷冻干燥后观察其形态^[13-14]。取冻干后的纳米粒 1 mg, 超纯水复溶至 10 mL, 用马尔文纳米粒度仪测定粒径与 Zeta 电位, 结果见图 2。纳米粒冻干后质地细腻, 粒径为 (260.000 ± 0.475) nm, Zeta 电位为 (47.300 ± 0.208) mV, 冻干后纳米粒粒径和 Zeta 电位稳定。

2.3.2 包封率和载药量的测定 取冻干后的纳米粒 1 mg, 超纯水复溶至 10 mL, 取 Pur-CS/SA-NPs 混悬液 400 μ L 置超滤离心管, 于 12 000 r/min 高速离

2.2 Pur-CS/SA-NPs 混悬液的表征

Pur-CS/SA-NPs 混悬液澄清透明, 有明显乳光, 丁达尔效应明显。TEM 显示, Pur-CS/SA-NPs 形态圆整完好, 均匀、分散性良好, 没有粘连现象。自组装法制备的纳米粒电位均为正电位, 纳米粒电位稳定, 结果见图 1。

心 30 min 后取截留液, 经 0.22 μ m 滤膜滤过。精密量取续滤液 100 μ L, 甲醇定容至 10 mL, 混匀, 测定纳米粒的包封率及载药量。结果如表 1 所示, 自组装法制备的纳米粒冻干后的包封率为 $(86.234 \pm 0.873)\%$, 载药量为 $(43.117 \pm 0.234)\%$, 与纳米粒混悬液之间并无显著性差异。

$$\text{包封率} = (C - C_1) / C$$

$$\text{载药量} = W_1 / (W_1 + W_2)$$

C 为混悬液中总的 Pur 的质量浓度, C_1 为混悬液中未包封的药物的质量浓度, W_1 为包封的药物的质量, W_2 为所有辅料的质量

表 1 Pur-CS/SA-NPs 混悬液与冻干粉包封率和载药量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Comparison of encapsulation efficiency and drug loading of Pur-CS/SA-NPs suspension and lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	包封率/%	载药量/%
纳米粒混悬液	89.056 ± 1.682	44.528 ± 0.841
纳米粒冻干粉	86.234 ± 0.873	43.117 ± 0.234

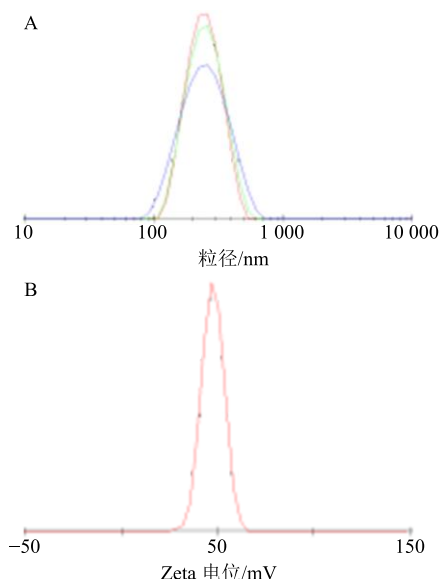


图 2 Pur-CS/SA-NPs 的粒径分布 (A) 与 Zeta 电位 (B)

Fig. 2 Particle size distribution (A) and Zeta potential (B) of Pur-CS/SA-NPs

2.3.3 X 射线衍射分析 (XRD) 采用 XRD 研究葛根素在纳米粒中的晶态改变^[15]。分别取 Pur-CS/SA-NPs 冻干品、壳聚糖、海藻酸钠、葛根素各 10 mg, Cu 靶、石墨单色器, Sc 探测器, 满标为 104 cps。扫描速度 $40^\circ / \text{min}$, 管压为 40 kV, 管流 100 mA, 取样间隔 $2^\circ / \text{min}$, 衍射角 $6^\circ \sim 40^\circ$ 。XRD 结果如图 3 所示。由 XRD 可知, 葛根素本身存在多个晶体衍射峰, 在壳聚糖、海藻酸钠中, 壳聚糖存在一定的晶体衍射峰, 但自组装法制备的纳米粒经过

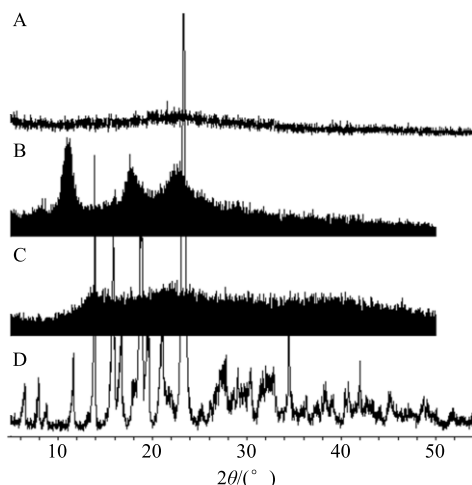


图3 Pur-CS/SA-NPs (A)、壳聚糖 (B)、海藻酸钠(C)、葛根素 (D) 的 XRD 图谱

Fig. 3 XRD of Pur-CS/SA-NPs (A), chitosan (B), sodium alginate (C) and puerarin (D)

XRD, 并不存在晶体衍射峰, 且葛根素的晶体衍射峰完全消失, 表明葛根素已基本被包裹或吸附完全, 不具有晶体结构, 形成了新物相, 其自身的晶体特征被抑制。

2.3.4 红外光谱 (IR) 研究 应用 IR 法^[16-17]对单体和药物的相互作用进行了研究。分别取葛根素、壳聚糖、葛根素/海藻酸钠/壳聚糖物理混合、Pur-CS/SA-NPs 冻干粉各 1 mg, 光谱纯溴化钾约 200 mg, 在环境温度 25 °C、湿度<50%条件下, 置于研钵中混合后研磨均匀, 红外灯烘干后, 将烘干的样品压制成片, 后放入红外光谱仪光路中进行分析。结果见图 4。

由 IR 图谱可知, 葛根素-壳聚糖-海藻酸钠物理混合, 基本上是峰的叠加, 葛根素特征峰 1 633、

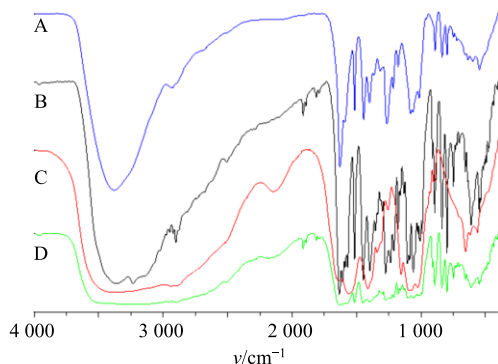


图4 自组装纳米粒 (A)、葛根素 (B)、壳聚糖 (C)、葛根素/海藻酸钠/壳聚糖物理混合 (D) 的 IR 图

Fig. 4 IR spectra of self-assembled nanoparticles (A), puerarin (B), chitosan (C) and physical mixture of puerarin, sodium alginate and chitosan (D)

1 515、1 445、891 cm^{-1} 依然存在, 主要吸收峰的位置和强度并没有明显的变化, 在自组装载药纳米粒中, 葛根素特征峰 1 633、1 515、1 445、891 cm^{-1} 均发生了偏移且减弱, 说明葛根素结构中的官能团与壳聚糖、海藻酸钠分子的某些部分发生了相互作用。Pur-CS/SA-NPs 的 IR 图谱中壳聚糖吸收峰形状和宽度也发生了改变, 葛根素在 1 600 cm^{-1} 和 650 cm^{-1} 附近的苯环吸收峰在 Pur-CS/SA-NPs 图谱中同样存在, 但强度稍弱。IR 光谱分析结果表明 Pur-CS/SA-NPs 中葛根素与壳聚糖、海藻酸钠的基本化学结构没有发生根本的改变, 说明葛根素与壳聚糖、海藻酸钠之间无新的化学键的形成, 并未形成新的化合物而是形成复合物, 可以推测葛根素与壳聚糖、海藻酸钠之间可能有氢键或范德华力的形成。

2.4 药动学研究

2.4.1 动物分组与给药 取 SD 大鼠 18 只, 随机分为 2 组, 葛根素组 ig 给予葛根素 200 mg/kg, 自组装法 Pur-CS/SA-NPs 组 ig 给予 Pur-CS/SA-NPs (相当于葛根素 200 mg/kg), 实验前禁食, 自由饮水。给药后在 15、30、45 min 及 1、1.5、2、4、6、8、12、24 h 时间点自眼眶静脉采血 0.3 mL, 加肝素抗凝, 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆置冰箱中保存^[18-19]。

2.4.2 血浆样品处理 取 100 μL 血浆, 加入 200 μL 色谱纯甲醇, 100 μL 内标 (兰索拉唑), 于涡旋混合器上涡旋振荡 3 min, 15 000 r/min 离心 10 min, 沉淀蛋白, 取上清液全部转移至另一支离心管中后, 45 °C 下氮气吹干, 残渣加入 100 μL 色谱甲醇溶解后涡旋 5 min, 于 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进样, 记录色谱图^[20-21]。

2.5 药动学方法学的建立

2.5.1 LC-MS/MS 条件

(1) 液相色谱条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax 300SB-C₁₈ 柱 (150 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相为 0.3%甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱程序为 0.00~1.00 min, 10%乙腈; 1.00~2.00 min, 60%乙腈; 2.00~4.00 min, 95%乙腈; 4.10~6.00 min, 10%乙腈; 体积流量 0.30 mL/min; 进样量 2 μL 。柱温 30 °C。

(2) 质谱条件: 离子源为电喷雾离子源, 通过正离子扫描的方式进行扫描, 通过多反应监测 (MRM) 的方式进行监测。电喷雾电压为 5 500 V, 雾化气压力 (GS1) 为 310.264 kPa (45 psi), 气帘气压力 (CUR) 为 241.317 kPa (35 psi), 辅助气压

力(GS2)为 344.738 kPa(50 psi),离子源温度(TEM)为 550 °C,优化后的葛根素与内标(兰索拉唑)的 MRM 参数见表 2 和图 5。

表 2 葛根素与内标的 MRM 参数

Table 2 MRM parameters of puerarin and internal standard

成分	定量离子对 (<i>m/z</i>)	去簇电压 (DP)/V	碰撞能量 (CE)/V	碰撞室出口电 压 (CXP)/V
葛根素	417.0/297.2	100	23	6
内标	370.2/252.0	57	15	6

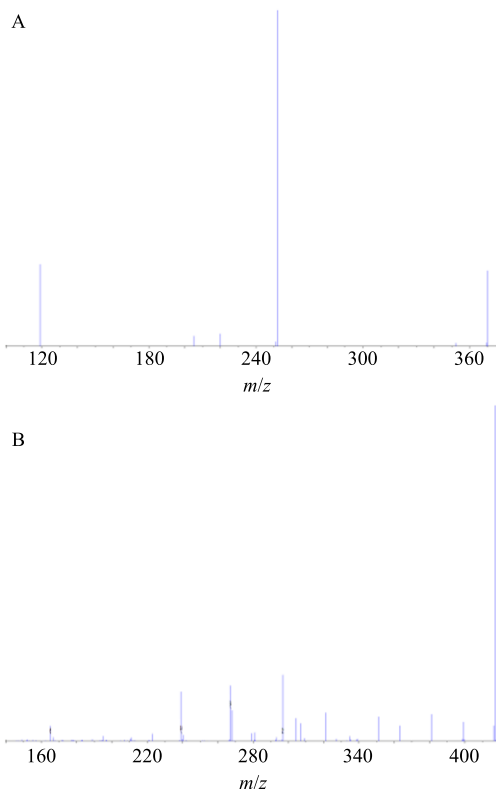


图 5 内标 (A) 与葛根素 (B) 质谱图

Fig. 5 Mass spectra of internal standard (A) and puerarin (B)

2.5.2 专属性 取空白血浆加入葛根素对照品储备液,制成葛根素的血浆样品,按“2.4.2”项方法处理后,在“2.5.1”项条件下进样测定,结果显示并未出现干扰峰,血浆中内源性物质不干扰葛根素和内标的测定,说明该方法专属性较好,结果见图 6。

2.5.3 线性关系考察 取空白血浆 100 μ L,加入葛根素系列对照品溶液,制成葛根素血浆样品质量浓度分别为 5、10、20、40、80、120 ng/mL 系列血浆样本,按照按“2.4.2”项方法进行操作,以峰面积为纵坐标 (*Y*),葛根素质量浓度为横坐标 (*X*),进行线性回归,得回归方程为 $Y=0.2007X+0.9663$,

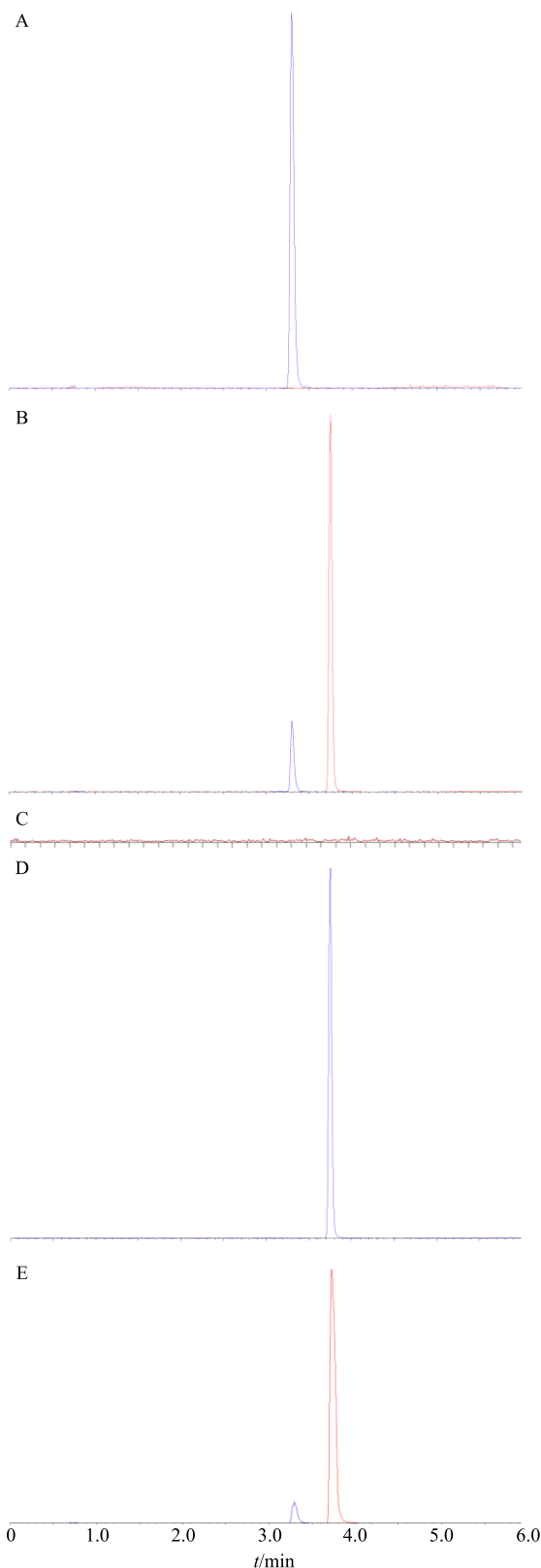


图 6 葛根素对照品 (A)、葛根素+内标 (B)、空白血浆 (C)、内标 (D)、Pur-CS/SA-NPs 给药样品的 HPLC 图谱

Fig. 6 HPLC of puerarin standard (A), puerarin + internal standard (B), blank plasma (C), internal standard (D) and Pur-CS/SA-NPs administration sample (F)

$r^2=0.9973$, 表明在 5~120 ng/mL 下呈线性相关, 葛根素的检测限为 1.0 ng/mL, 定量限为 5.0 ng/mL。

2.5.4 精密度考察 分别取葛根素对照品储备液, 稀释成 10、20、40 ng/mL 3 种质量浓度的葛根素对照品溶液, 按“2.4.2”项方法处理和“2.5.1”项测定方法进行操作, 分别于日内进样 5 次, 考察日内精密度; 每天同一时间进样 1 次, 共进样 5 次, 测得日间精密度 RSD 均小于 3.00%, 日间精密度均小于 5.00%, 表明精密度良好。

2.5.5 回收率试验 取葛根素对照品储备液, 制成质量浓度分别为 10、20、40 ng/mL 的葛根素对照品溶液, 测定葛根素峰面积, 另取血浆样品, 配制 10、20、40 ng/mL 3 种质量浓度的葛根素血浆样品, 按照按“2.4.2”项方法处理, 测定 RSD。由结果可知, 低、中、高 3 种质量浓度回收率 RSD 值依次为 4.80%、3.12%、2.15%, 均在 5.00% 以内, 表明该方法准确度良好。

2.5.6 稳定性试验 制备低、中、高 3 种质量浓度 (相当于葛根素血药浓度为 10、20、40 ng/mL) 的血浆样品, 按“2.4.2”项下方法操作, 分别考察葛根素血浆样品-20℃冷冻保存, 冻融循环 3 次, 复融后血浆样品溶液室温放置 6 h, 进样测定 RSD 为 1.21%, 表明稳定性良好。

2.6 药动学参数的求算及数据处理

采用药动学软件 (DAS 2.0), 将血药浓度测定结果输入软件, 计算得出药动学参数。结果表明, Pur-CS/SA-NPs 及葛根素均符合二室房室模型, 药时曲线及主要药动学参数分别见图 7 和表 3, Pur-CS/SA-NPs 的药时曲线下面积 (AUC_{0-24} 、 $AUC_{0-\infty}$)、达峰时间 (t_{max})、达峰浓度 (C_{max}) 分别是葛根素的 3.331、3.378、2.000、1.232 倍, 表明所制备的

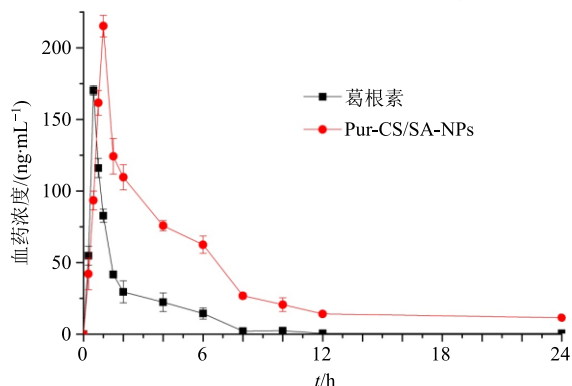


图 7 葛根素和 Pur-CS/SA-NPs 药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=9$)
Fig. 7 Drug-time curve of purine and Pur-CS/SA-NPs ($\bar{x} \pm s, n=9$)

表 3 葛根素和 Pur-CS/SA-NPs 大鼠血浆中的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Pharmacokinetic parameters in plasma of purine and Pur-CS/SA-NPs rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	葛根素	Pur-CS/SA-NPs
AUC_{0-24}	$mg \cdot h \cdot L^{-1}$	250.087 ± 32.156	833.067 ± 132.546
$AUC_{0-\infty}$	$mg \cdot h \cdot L^{-1}$	250.091 ± 28.398	844.919 ± 154.768
MAT	h	2.611 ± 0.532	6.472 ± 1.809
t_{max}	h	0.500 ± 0.031	1.000 ± 0.098
C_{max}	$mg \cdot L^{-1}$	191.830 ± 17.963	236.318 ± 36.864
CL/F	$L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.991 ± 0.021	0.230 ± 0.017
$t_{1/2}$	h	0.351 ± 0.013	0.415 ± 0.009
K_{10}	h^{-1}	0.433 ± 0.037	0.209 ± 0.403
K_{12}	h^{-1}	0.049 ± 0.102	0.081 ± 0.217
K_{21}	h^{-1}	0.014 ± 0.305	0.027 ± 0.152
$t_{1/2\alpha}$	h	1.426 ± 0.032	2.256 ± 0.164
$t_{1/2\beta}$	h	69.315 ± 0.709	69.315 ± 0.472
MRT_{0-24}	h	2.808 ± 0.014	6.214 ± 0.143
$MRT_{0-\infty}$	h	2.968 ± 0.121	8.661 ± 2.213

Pur-CS/SA-NPs 提高了葛根素在体内的吸收速率和吸收程度, 明显提高了葛根素的生物利用度。消除半衰期 ($t_{1/2}$) 也相对延长。结果表明天然聚阳离子壳聚糖和天然聚阴离子海藻酸钠在水溶液中的静电相互作用形成的聚电解质, 延缓了葛根素的释放。

3 讨论

采用天然聚阳离子壳聚糖和天然聚阴离子海藻酸钠, 利用带相反电荷的聚电解质在水溶液中的静电相互作用制备的自组装 Pur-CS/SA-NPs 口服纳米粒, 反应条件温和, 易于制备, 生物相容性良好, 适用性广, 为葛根素纳米粒的进一步研究奠定了良好的基础。

Pur-CS/SA-NPs 的表征结果显示, 在冷冻和解冻过程中, 由于内外渗透压的改变, 使得微粒裂解, 粒径变大, 但该纳米粒形态结构、理化性质稳定, 若在冻干过程中加入合适的冻干保护剂, 可对纳米粒的粒径进行保护使其免受影响。红外检测葛根素与壳聚糖、海藻酸钠之间的物理混合并没有发生化学反应, 制备的纳米粒经过分析也没有新的化学键形成, 可以推测葛根素与壳聚糖、海藻酸钠之间可能有氢键或范德华力形成, Pur-CS/SA-NPs 形成的是复合物而非化合物。XRD 显示纳米粒中葛根素的晶体衍射峰完全消失, 葛根素已基本被包裹或吸附完全, 其自身的晶体特征被抑制。故而纳米粒没有

显示出晶体特效,以无定形特征存在的 Pur-CS/SA-NPs 的溶出要高于葛根素。

体内药动学研究显示 Pur-CS/SA-NPs 的相对生物利用度较葛根素原料药提高到 3 倍左右,显著改善了葛根素的生物利用度,且在体循环时间延长,结合课题组之前的体外释放实验,其释药过程符合 Higuchi 模型方程,且在释放过程中无突释现象,缓释效果相关一致,为葛根素口服纳米制剂的进一步研究提供了依据。

参考文献

- [1] 孙泽铃,李以菊,闫玉芹.葛根素的临床应用[J].实用医技杂志,2006,13(16):2830-2832.
- [2] 万小敏,丁宇翔,赵兵杰,等.载葛根素的 PEG 修饰介孔硅纳米粒的制备及其对急性心肌缺血大鼠的保护作用[J].中草药,2018,49(8):1789-1795.
- [3] 宋卉,李银花,郑晖,等.葛根素的药理作用与临床研究进展[J].现代医药卫生,2011(19):60-61.
- [4] 黄亚光,王金凤,杜利鹏,等.葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究[J].中草药,2019,50(13):3127-3133.
- [5] Li H W, Dong L, Liu Y, *et al.* Biopharmaceutics classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats [J]. *Int J Pharm*, 2014, 466(1/2): 133-138.
- [6] Prasain J K, Peng N, Moore R, *et al.* Tissue distribution of puerarin and its conjugated metabolites in rats assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(1): 65-71.
- [7] Tosapol A, Pilasak P, Natthaphon H, *et al.* Absolute oral bioavailability and disposition kinetics of puerarin in female rats [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2018, 19(1): 25-33.
- [8] 邓培媛,李群娜,朱玉珍,等.葛根素注射剂不良反应及其影响因素分析[J].药物流行病学杂志,2005,14(1):14-17.
- [9] 侯少贞,李耿,赖小平,等.葛根素注射液引起急性溶血机制的实验研究[J].药物不良反应杂志,2008,10(1):1-6.
- [10] 刘丽丽,史畑女,方蕾,等.马钱子总碱-白芍总苷脂质立方液晶纳米粒制备及体外评价[J].中草药,2019,50(17):4076-4083.
- [11] 张喜武,李秋晗,刘美欣,等.星点设计-效应面法优化丁香苦苷聚乳酸-羟基乙酸纳米粒的制备工艺[J].中草药,2019,50(17):4108-4113.
- [12] 颜洁,关志宇,朱卫丰,等.Box-Behnken 效应面法优化自组装法制备葛根素壳聚糖/海藻酸钠口服纳米粒的处方与工艺研究[J].中草药,2019,50(23):5706-5713.
- [13] 彭润玲,尹沙沙,韦妍,等.真空冷冻干燥法制备无机纳米粉的研究现状[J].真空,2019,56(5):77-84.
- [14] 王喆.探究真空冷冻干燥技术在生物制药方面的应用[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(88):247-248.
- [15] Yeo S D, Kim M S, Lee J C. Recrystallization of sulfathiazole and chlorpropamide using the supercritical fluid antisolvent process [J]. *J Supercrit Fluids*, 2003, 25(2): 143-154.
- [16] 祝业光,高尔,郝耀礼,等.葛根素磷脂复合物的红外和紫外光谱分析研究[J].潍坊医学院学报,2003,25(5):355-356.
- [17] 程琥,朱昌宝,杨勇.聚氧化乙烯基聚合物电解质中离子缔合与结晶状态的傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 研究[J].化学学报,2007,65(24):2832-2838.
- [18] Yang T, Zheng T H, Zhao Q, *et al.* Effects of Fuzheng Huayu recipe on entecavir pharmacokinetics in normal and dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis rats [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 1-7.
- [19] 冯晓杰,杜丽英,冯章英,等.LC-MS/MS 法测定人血药浓度的基质效应研究进展[J].中国新药杂志,2015,24(13):1488-1492.
- [20] 王晴,孙吉叶,沙春洁,等.LC-MS/MS 测定单抗药动力学参数的样品前处理方法研究进展[J].药学进展,2015,39(4):300-304.
- [21] 张晓燕,刘霏,刘玲,等.LC-MS/MS 法测定盐酸噻吩诺啡鼻腔喷雾剂的生物利用度[J].中国新药杂志,2010,19(16):1450-1454.