

## • 药剂与工艺 •

## 钩藤碱纳米混悬剂缓释片制备、优化与体外释放评价

邓向涛<sup>1</sup>, 张文周<sup>1</sup>, 张智强<sup>2</sup>

1. 郑州大学附属肿瘤医院, 河南 郑州 450003
2. 天津药物研究院药业有限责任公司, 天津 300301

**摘要:** 目的 制备钩藤碱纳米混悬剂及其冻干粉, 并进一步研制成缓释片。方法 微量沉淀法联合高压均质法制备钩藤碱纳米混悬剂, 并制备成冻干粉。测定其粒径及 Zeta 电位, 扫描电子显微镜观察纳米混悬剂外貌形态。采用乳糖作为冻干保护剂, 将纳米混悬剂制备成冻干粉。羟丙基甲基纤维素 (hydroxypropyl methyl cellulose, HPMC) 作为骨架材料, 将钩藤碱纳米混悬剂冻干粉制备成凝胶骨架缓释片。单因素考察联合设计正交试验得出最佳处方, 并进行释药模型拟合。结果 钩藤碱纳米混悬剂平均粒径为 (153.7±4.9) nm, Zeta 电位为 (-18.54±1.32) mV, 纳米混悬剂外貌为球形或类球形。正交优化后的钩藤碱纳米混悬剂缓释片, 在 12 h 内累积释放率为 92.53%。体外释放符合 Higuchi 释药模型药物释放, 释药方程为  $\ln(1-M_t/M_\infty)=0.2860 t^{1/2}-0.0690$  ( $r=0.9924$ ), 药物释放为扩散和骨架溶蚀并存。结论 钩藤碱纳米混悬剂粒径较小, 研制的缓释片可有效控制钩藤碱纳米混悬剂缓释片缓慢释放。

**关键词** 钩藤碱; 纳米混悬剂; 溶解度; 累积释放率; 缓释片; 冻干粉; 微量沉淀法; 高压均质法; 羟丙基甲基纤维素; 正交试验; Higuchi 释药模型; 扩散; 骨架溶蚀

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)20-5128-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.004

## Rhynchophylline nanosuspensions sustained-release tablets: Preparation, optimization and release evaluation *in vitro*

DENG Xiang-tao<sup>1</sup>, ZHANG Wen-zhou<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-qiang<sup>2</sup>

1. Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China
2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300301, China

**Abstract: Objective** To prepare the rhynchophylline nanosuspensions and lyophilized powder, and study its sustained-release tablets. **Methods** Rhynchophylline nanosuspensions were prepared by microprecipitation combined with high pressure homogenization method, and the particle size and zeta potential were determined. Scanning electron microscopy (SEM) was employed to observe the appearances of nanosuspensions. Nanosuspensions were prepared into lyophilized powder using lactose as freeze-dried protectors. HPMC (hydroxypropyl methyl cellulose) was used as hydrophilic matrix to prepare the sustained-release tablets. Single factor investigation and orthogonal experiments were employed to optimize the formulation of rhynchophylline nanosuspensions sustained-release tablets, and the model fitting was also been studied. **Results** The particle size and zeta potential of rhynchophylline nanosuspensions were (153.7 ± 4.9) nm and (-18.54 ± 1.32) mV, respectively. The appearances of rhynchophylline nanosuspensions were spherical or nearly spherical. After orthogonal optimization, the cumulative release rate of rhynchophylline nanosuspensions sustained-release tablets was 92.53% in 12 h. The optimized formulation of hydrogel matrix sustained-release tablets was better accorded with Higuchi model:  $\ln(1-M_t/M_\infty)=0.2860 t^{1/2}-0.0690$  ( $r=0.9924$ ). The drug release from hydrogel matrix sustained-release tablets were controlled by diffusion and degradation. **Conclusion** The obtained rhynchophylline nanosuspensions has small particle size. The prepared hydrogel matrix sustained-release tablets can control the release of rhynchophylline nanosuspensions in a slow characteristic.

收稿日期: 2020-05-14

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX09201009-002-009); 国家科技重大专项 (2017ZX09101007-001-005)

作者简介: 邓向涛 (1980—), 女, 硕士, 主要从事医院药学研究。Tel: (0371)65587172 Email: dengxt2007@126.com

**Key words:** rhynchophylline; nanosuspension; solubility; accumulative release rate; sustained-release tablets; lyophilized powder; microprecipitation method; high pressure homogenization method; hydroxypropyl methyl cellulose; orthogonal experiments; Higuchi model; diffusion; degradation

近年来,随着生活水平的不断提高,高血压的发病率也越来越高,严重威胁着人类健康<sup>[1]</sup>。钩藤碱(rhynchophylline)是茜草科钩藤属植物钩藤*Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil. 的主要成分之一<sup>[2-3]</sup>,具有抗血栓、抑制外周血管收缩、降低血压、抑制心肌肥厚等多种药理活性<sup>[4-6]</sup>。因此将钩藤碱开发成抗高血压药物制剂具有较高的临床应用价值。由于钩藤碱溶解度较差<sup>[7]</sup>,目前已有 mPEG-PLGA 脂质体<sup>[7]</sup>、固体脂质纳米粒<sup>[8]</sup>等制剂相关报道,但存在载药量低、制备过程复杂等缺点。

纳米混悬剂(nanosuspension)<sup>[9-13]</sup>是将难溶性药物通过一定的制剂手段而制备的一种“纯”药物纳米给药系统,具有载药量高、制备工艺简单等优势,可显著提高药物的溶解度及溶出度,进而为提高其生物利用度及疗效奠定基础,具有良好的应用前景。但纳米混悬剂释药速率较快,容易导致血药浓度波动幅度较大<sup>[14-15]</sup>,可能会影响药物的安全性及有效性。因此,控制纳米混悬剂在机体内平稳释放,是解决这一问题的关键所在。据报道<sup>[14]</sup>,口服后钩藤碱的半衰期为 2.39 h,且钩藤碱在胃肠道各段均有吸收<sup>[16]</sup>,制备成缓释制剂有利于药物在体内充分吸收。有报道通过采用双层渗透泵技术控制纳米药物平稳释放<sup>[17]</sup>,但双层渗透泵制剂工艺较为复杂<sup>[18]</sup>。因此本研究首先将钩藤碱制备成纳米混悬剂和冻干粉末,解决其溶解度及溶出度问题,进一步压制成制备工艺相对简单的凝胶骨架缓释片<sup>[19-21]</sup>。理想的钩藤碱纳米混悬剂缓释片在初始阶段(2 h)不存在迟释现象,中间阶段(6 h)不存在过度释放情况,最终阶段(12 h)能释放较为完全<sup>[22]</sup>,并据此设计正交试验优化钩藤碱纳米混悬剂凝胶骨架缓释片的处方,为钩藤碱制剂研发提供一种新的策略。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Mettler PB203-N 型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Agilent1100 型高效液相色谱仪,DAD 检测器,美国安捷伦公司;Mastersizer 3000E 型激光粒度分析仪,英国马尔文仪器有限公司;TF-86-200-WA 型超低温冰箱,上海田枫实业有限公司;DDL-6 型超低温离心机,上海安亭精密仪器有限公司;JSM-IT500 型扫描电子显微镜(SEM),

日本电子株式会社;LGJ-10 型冷冻干燥机,北京松原华兴科技公司;ZRS8G 型智能溶出试验仪,上海双旭电子有限公司;BP-8170-B 型单冲压片机,河南宝品科技有限公司。

### 1.2 材料

钩藤碱,批号 PH170210,质量分数 98.3%,宝鸡市辰光生物科技有限公司;钩藤碱对照品,批号 20161025,质量分数 $\geq 98.8\%$ ,上海源叶生物科技有限公司;乳糖,德国美剂乐公司;卵磷脂,批号 PC20170510,郑州明欣化工产品有限公司;泊洛沙姆 188,批号 HZB50C,德国 BASF 公司;羟丙基甲基纤维(HPMC),Ashland 公司;聚乙二醇(PEG)4000,批号 113091013,韩国乐天集团;硬脂酸镁,批号 151026,曲阜市天利药用辅料有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 钩藤碱含量测定

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱为 Angilent Extend C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长为 254 nm;柱温 30 °C;流动相为乙腈-0.01 mol/L 水溶液(稀冰醋酸调 pH 值至 7.7)(45:65);体积流量 1.0 mL/min;进样量 20 μL。

**2.1.2 线性关系考察** 称取钩藤碱对照品 10.00 mg,置于 50 mL 量瓶中,加入约 40 mL 乙腈超声溶解后放置至室温,定容至刻度线即得 200.0 μg/mL 的对照品储备液。精密量取适量,采用流动相稀释配制成质量浓度分别为 0.05、2.5、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/mL 的对照品溶液,进 HPLC 测定峰面积,各个对照品质量浓度(C)与相应峰面积(A)线性回归后得方程  $A = 1.120 1 C + 0.019 7$ ,  $r = 0.999 8$ ,线性范围为 0.05~50.0 μg/mL。

**2.1.3 供试品溶液的配制** 取 15 片缓释片破碎后研细成粉末,称取约 0.5 g 至 50 mL 量瓶中,加入约 30 mL 乙腈超声后采用流动相定容,摇匀。取适量,0.45 μm 微孔滤膜进行滤过,取续滤液 2.5 mL 置于 50 mL 量瓶中,流动相定容至刻度线即得供试品溶液。

**2.1.4 专属性考察** 按处方比例混匀辅料,并压制成空白制剂,按“2.1.3”项下处理方法制备阴性样品。取阴性样品、对照品溶液(质量浓度为 10.0 μg/mL)和“2.1.3”项下的样品溶液分别进 HPLC,

按照“2.1.1”项下色谱条件进行分析,结果见图 1。结果表明,辅料不干扰样品测定,专属性较高。理论塔板数以钩藤碱计,不低于 8 000。

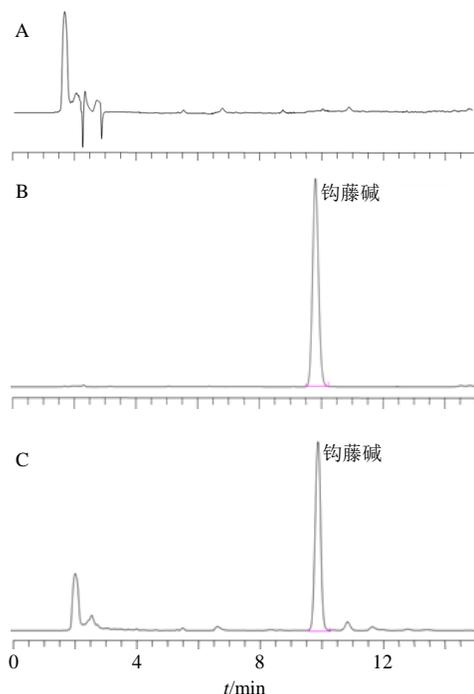


图 1 阴性溶液 (A)、对照品溶液 (B) 和样品溶液 (C) HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC spectrum of negative solution (A), reference substance (B), and sample solution (C)

**2.1.5 稳定性考察** 取“2.1.3”项下供试品溶液,分别于 0、2、4、6、12、24 h 进 HPLC 测定钩藤碱峰面积,计算得其 RSD 值为 0.93%,因此供试品溶液至少在 24 h 内基本保持稳定。

**2.1.6 精密度考察** 分别取低、中和高质量浓度 (0.05、20.0、50.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的钩藤碱对照品溶液,分别连续进样 6 次,计算钩藤碱峰面积的 RSD 值分别为 0.22%、0.14%、0.08%,可见其精密度良好。

**2.1.7 重复性考察** 按照“2.1.3”项下方法操作,平行制备 6 份缓释片的供试品溶液,进 HPLC 测定钩藤碱含量,计算其 RSD 值为 1.63%,因此重复性良好。

**2.1.8 加样回收率考察** 取钩藤碱含量已测定的缓释片粉末 9 份,每份 0.25 g (钩藤碱含有量为 10 mg),置于 50 mL 量瓶中,分别按照钩藤碱含有量的 50%、100%、150% 加入钩藤碱对照品,每份各 3 份。分别按照“2.1.3”项下方法操作,并进 HPLC 测定钩藤碱总含量,计算得平均加样回收率为 99.58%,RSD 值为 1.14%。

## 2.2 钩藤碱纳米混悬剂及其冻干粉的制备

**2.2.1 纳米混悬剂的制备** 称取钩藤碱 50 mg 溶于 5 mL 无水乙醇中即得有机相,备用。另称取卵磷脂和泊洛沙姆 188 各 0.1 g,溶于 50 mL 蒸馏水,磁力搅拌溶解 (转速为 1 000 r/min)。将溶有钩藤碱的有机相滴入水相,滴毕后减压旋蒸 (温度为 45  $^{\circ}\text{C}$ ),除去有机溶剂。于压力为 80 MPa 的条件下连续均质 10 次,即得钩藤碱纳米混悬剂混悬液。

**2.2.2 冻干粉的制备** 冻干粉末不仅提高可纳米混悬剂的稳定性,也为下一步缓释片的制备奠定基础。取纳米混悬液置于西林瓶中,每份 4 mL,分别加入 3% 的乳糖混匀 (质量比),按照表 1 程序使纳米粒混悬液经历预冻、升华、解析阶段后即得钩藤碱纳米混悬剂冻干粉末。经测定钩藤碱的质量分数为 5.7%。

表 1 冻干程序

Table 1 Freeze-drying procedure

阶段	变动点	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间/h
预冻阶段	1	-65	12
	1	-55	4
	2	-35	18
升华阶段	3	-20	4
	1	0	2
解析阶段	2	10	2
	3	25	6

## 2.3 纳米混悬剂的表征

**2.3.1 粒径、多分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位的测定** 测定条件为室温,测试角为 90 $^{\circ}$ ,折光率为 3%。取纳米混悬剂 0.1 mL,加入蒸馏水 3.5 mL 后混匀,转移至比色皿中,采用激光粒度分析仪测定其粒径、PDI 和 Zeta 电位。结果显示,纳米混悬剂的平均粒径为 (153.7 $\pm$ 4.9) nm (图 2),PDI 为 0.058 $\pm$ 0.009,Zeta 电位为 (-18.54 $\pm$ 1.32) mV (图 3)。取冻干粉末适量,蒸馏水复溶后其粒径、PDI 和 Zeta 电位。结果显示,冻干粉末复溶样品的平均粒径为 (229.9 $\pm$ 10.3) nm,PDI 为 0.101 $\pm$ 0.016,Zeta 电位为 (-15.6 $\pm$ 1.8) mV。与冻干前纳米混悬剂的粒径分布相比,尽管平均粒径有所增大,但仍处于 1~1 000 nm。

**2.3.2 溶解度测定** 取过量的钩藤碱原料药和钩藤碱纳米混悬剂冻干粉,分别置于 10 mL 蒸馏水中。设置摇床温度和速度分别为 37  $^{\circ}\text{C}$  和 100 r/min,震

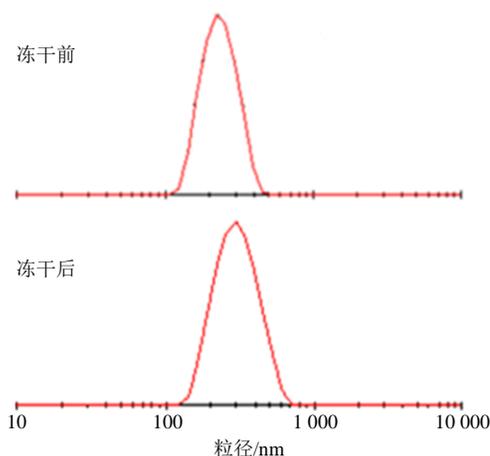


图 2 钩藤碱纳米混悬剂及其冻干粉复溶后的粒径  
Fig. 2 Particle size of rhynchophylline nanosuspension and its lyophilized powder

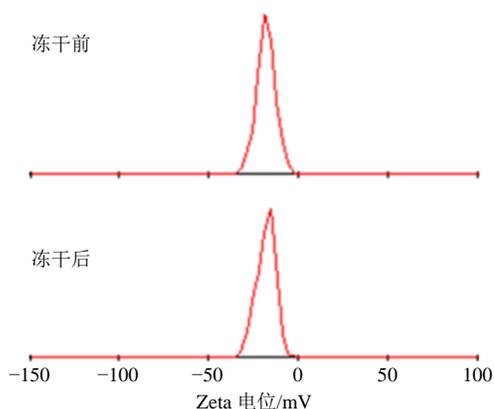


图 3 钩藤碱纳米混悬剂及其冻干粉复溶后 Zeta 电位  
Fig. 3 Zeta potential of rhynchophylline nanosuspension and its lyophilized powder

荡 2 d 后取样。于 12 000 r/min 高速离心 15 min (4 °C)，取上清液进 HPLC 测定钩藤碱含量。结果显示，钩藤碱原料药溶解度为 37.17 μg/mL，钩藤碱纳米混悬剂冻干粉溶解度为 2.16 mg/mL，溶解度提高了 57.11 倍。

**2.3.3 SEM 观察纳米粒子** 取钩藤碱纳米混悬剂 0.1 mL 至 5 mL 蒸馏水，混匀。取纳米混悬剂冻干粉适量，蒸馏水复溶。取待测样品滴于铜柱，常温条件下挥干，真空条件下喷金后于 SEM 下观察并拍照，结果见图 4。制备的纳米混悬剂为球形或近似球形。电镜观察到粒径小于激光粒度分析仪测得的粒径，这可能是由于电镜观察到的是干燥纳米粒子的粒径，而激光粒度分析仪测定的是水化粒子的粒径<sup>[23]</sup>。另外，由于纳米混悬剂冻干粉中含有大量冻干保护剂，SEM 扫描图片可观察到保护剂包裹纳米粒子。

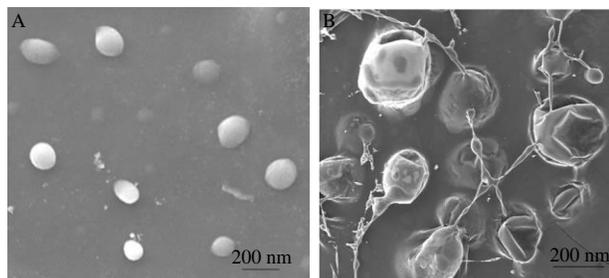


图 4 钩藤碱纳米混悬剂 (A) 和冻干粉 (B) 的 SEM 图  
Fig. 4 SEM of nanosuspension (A) and lyophilized powder (B)

#### 2.4 纳米混悬剂冻干粉放置稳定性考察

冻干粉末置于温度为 25 °C，湿度为 55% 的恒温恒湿箱中。分别于 0、2、4、8、15、23、30 d 取适量冻干粉末，蒸馏水复溶后其粒径、PDI 和 Zeta 电位。结果显示 (表 2)，冻干粉放置 30 d 内，其纳米粒径、PDI 和 Zeta 电位均无明显变化，无肉眼可见的聚集或沉淀现象，说明钩藤碱纳米混悬剂冻干粉在 30 d 内基本稳定。

表 2 稳定性试验 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Stability experiments ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

t/d	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
0	230.2 ± 9.8	0.109 ± 0.14	-16.0 ± 1.8
2	231.4 ± 11.3	0.115 ± 0.16	-15.7 ± 1.2
4	234.6 ± 10.2	0.111 ± 0.12	-16.2 ± 1.5
8	232.9 ± 9.6	0.118 ± 0.09	-14.9 ± 1.1
15	236.8 ± 8.5	0.113 ± 0.15	-16.5 ± 0.9
23	235.1 ± 7.1	0.121 ± 0.14	-15.2 ± 1.3
30	237.6 ± 11.9	0.110 ± 0.13	-16.0 ± 1.7

#### 2.5 凝胶骨架缓释片的制备工艺

取钩藤碱纳米混悬剂冻干粉与处方量的骨架材料 (HPMC K4M 和 HPMC K15M 混合物) 和 PEG 4000 等混匀，乳糖补充片质量至 0.5 g，采用 6% 淀粉浆搅拌均匀后制备软材。20 目筛制粒，真空干燥箱 24 h (40 °C)，20 目筛整粒后加入适量的硬脂酸镁混匀，压制钩藤碱纳米混悬剂缓释片。片剂硬度为 (50 ± 10) N。

#### 2.6 释放度测定方法

采用转篮法考察缓释片释放度。于温度为 (37.0 ± 0.5) °C，转速为 (75 ± 1) r/min 和体积 900 mL 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液为释放介质的条件下进行体外释放研究。分别于 0、1、2、4、6、8、10、12 h 取样 3 mL，立即补进同温度、同体积 pH 6.8

磷酸盐缓冲液空白释放介质。精密量取样品溶液 1 mL 后加入 1 mL 乙腈, 称定质量, 超声 30 s 破乳, 乙腈补充减失的质量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过。进 HPLC 测定含量, 计算累积释放率, 并绘制缓释片的体外释药曲线。

### 2.7 单因素考察

**2.7.1 HPMC 4K 和 HPMC 15K 比例对释药行为的影响** 固定冻干粉用量为 350 mg/片, PEG 4000 用量为 20 mg/片, HPMC 总用量为 50 mg/片, 硬脂酸镁为片质量 1% 的条件下, 分别考察不同 HPMC 4K 和 HPMC 15K 比例 (1:2、1:1、2:1) 时对钩藤碱纳米混悬剂凝胶骨架缓释片体外释药的影响, 结果见图 5。HPMC 的黏度与其相对分子质量的大小有关, 相对分子质量越大, 遇水溶解后产生的黏度越高, 阻滞作用愈大<sup>[18]</sup>。由于 HPMC 15K 的相对分子质量较 HPMC 4K 高, 黏度较大, 因此随着 HPMC 4K 在混合缓释材料中比例的增加, 缓释片释药速率逐渐增大, 而当 HPMC 4K 和 HPMC 15K 比例为 1:1 时体外释药速率相对平稳。

**2.7.2 缓释材料用量的考察** 固定冻干粉用量为 350 mg/片, PEG 4000 用量为 20 mg/片, HPMC 4K 和 HPMC 15K 比例为 1:1, 硬脂酸镁为片质量 1% 的条件下, 分别考察不同 HPMC 总用量时 (40、50、60 mg) 对缓释片体外释药的影响, 结果见图 6。缓释片的释药速率和累积释放率随着 HPMC 用量的增加而下降。缓释材料 HPMC 遇水后形成一层凝胶阻滞层, 从而延缓纳米药物释放出去。HPMC 用量越大, 形成的凝胶阻滞层愈厚, 对药物释放的阻滞作用愈明显。因此通过调节 HPMC 的总用量, 从而达到调节缓释片释药速率的目的。本研究结果显示, 当 HPMC 4K 和 HPMC (1:1) 总用量为 50 mg 时缓释片体外释药情况相对理想。

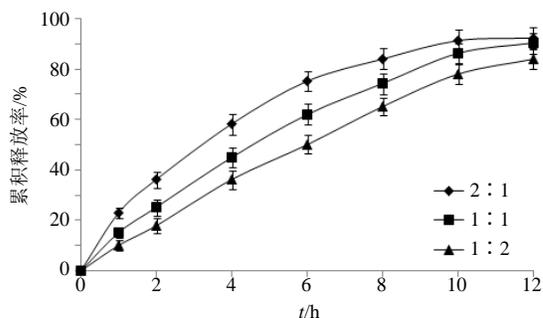


图 5 缓释材料比例的考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Study of different ratio of framework material ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

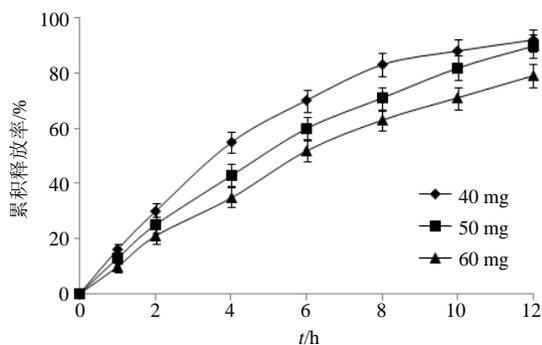


图 6 缓释材料用量的考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Study of amounts of framework material ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**2.7.3 PEG 4000 用量的考察** 固定冻干粉用量为 350 mg/片, HPMC 4K 和 HPMC 15K 比例为 1:1, 用量为 50 mg/片, 硬脂酸镁为片质量 1% 的条件下, 分别考察不同 PEG 4000 用量时 (15、20、25 mg) 对缓释片体外释药的影响, 结果见图 7。不同用量对缓释片的体外释药有较大影响, 随着 PEG 4000 用量的增加, 缓释片释药速率逐渐增大。这是由于 PEG 4000 遇水容易溶解, 在凝胶阻滞层中留下释药通道。而释药通道的多少与 PEG 4000 用量呈正比, 因而可通过调节 PEG 4000 的用量达到调节缓释片释药速率的作用。HPMC 与 PEG 4000 两者是一种相互牵制作用, 最终控制钩藤碱固体脂质纳米粒的缓慢释放。本研究结果表明, 当 PEG 4000 用量为 20 mg/片时, 缓释片体外释药相对平稳。

**2.7.4 硬脂酸镁用量的考察** 固定冻干粉用量为 350 mg/片, PEG 4000 用量为 20 mg/片, HPMC 4K 和 HPMC 15K 比例为 1:1, 用量为 50 mg/片, 分别考察硬脂酸镁不同用量 (0.5%、1.0%、1.5%) 时对缓释片体外释药的影响, 结果见图 8。硬脂酸镁为水不溶性物质, 随着缓释片中硬脂酸镁用量的逐渐增加, 释药速率及累积释放率逐渐下降。另外,

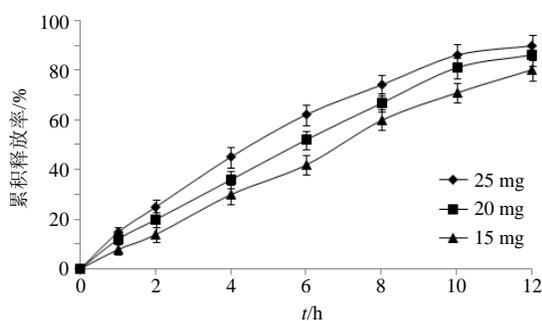


图 7 PEG 4000 用量的考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Study of amounts of PEG 4000 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

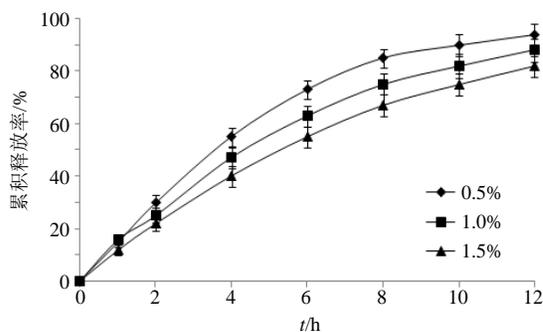


图 8 硬脂酸镁用量的考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Study of amounts of magnesium stearate ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

硬脂酸镁的用量为 1.5% 时, 压制的缓释片硬度偏低; 当用量为 0.5% 时, 缓释片出现了黏冲现象。而当硬脂酸镁的用量为 1.0% 时, 压制的缓释片体外释药相对平稳, 且片剂硬度适中, 表面光滑。

### 2.8 正交试验优化缓释片处方

经单因素考察发现, 骨架材料种类比例及用量、PEG 4000 用量等对缓释片影响较大, 综合考虑最终选择骨架材料 HPMC K4M 和 HPMC K15M 用量比例 (1.5 : 1.0、1.0 : 1.0、1.0 : 1.5, A)、两者总用量 (45、50、55 mg, B)、PEG 4000 的用量 (18、20、22 mg, C) 和硬脂酸镁用量 (0.8%、1.0%、1.2%, D) 作为正交试验的影响因素及水平, 并采用  $L_9(3^4)$  正交试验优化缓释片的处方。选择初始阶段的累积释放率 ( $L_{2h}$ )、中间阶段的累积释放率 ( $L_{6h}$ ) 和最后阶段的累积释放率 ( $L_{12h}$ ) 3 个评价指标, 分别考察缓释片在初始阶段和中间阶段是否存在迟释或过度释放情况, 以及最终阶段是否释放完全, 权重系数的设置及综合评价公式为  $L = |L_{2h} - 0.25| \times 100 \times 1 + |L_{6h} - 0.65| \times 100 \times 1 + |L_{12h} - 0.95| \times 100 \times 2$ 。

正交试验设计与结果见表 3。根据极差  $R$ , 体外释药影响的顺序为  $A > B > D > C$ ; 根据  $R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  值, 缓释片最佳组合为  $A_1B_2C_2D_1$ 。方差分析结果见表 4。其中因素 A (HPMC K4M 和 HPMC K15M 比例) 对钩藤碱纳米混悬剂凝胶骨架缓释片体外释药具有显著性影响。最终确定的缓释片最佳制备处方为冻干粉为 350 mg/片 (含钩藤碱约 20 mg), 骨架材料 HPMC K4M 和 HPMC K15M 比例为 1.5 : 1.0, 总用量为 50 mg/片、PEG 4000 用量为 20 mg/片、硬脂酸镁用量为 0.8%。

### 2.9 工艺验证及释药机制研究

按照最佳处方平行制备 3 批缓释片, 体外释药情况见图 9, 可见该处方工艺重现性良好, 在 12 h

表 3 正交试验

Table 3 Orthogonal test

试验号	A	B/mg	C/mg	D/%	L
1	1.5 : 1.0 (1)	45 (1)	18 (1)	0.8 (1)	18.4
2	1.5 : 1.0 (1)	50 (2)	20 (2)	1.0 (2)	16.3
3	1.5 : 1.0 (1)	55 (3)	22 (3)	1.2 (3)	19.3
4	1.0 : 1.0 (2)	45 (1)	20 (2)	1.2 (3)	22.6
5	1.0 : 1.0 (2)	50 (2)	22 (3)	0.8 (1)	19.4
6	1.0 : 1.0 (2)	55 (3)	18 (1)	1.0 (2)	24.8
7	1.0 : 1.5 (3)	45 (1)	22 (3)	1.0 (2)	27.3
8	1.0 : 1.5 (3)	50 (2)	18 (1)	1.2 (3)	24.8
9	1.0 : 1.5 (3)	55 (3)	20 (2)	0.8 (1)	25.1
$R_1$	54.0	68.3	68.0	62.9	
$R_2$	66.8	60.5	64.0	68.4	
$R_3$	77.2	69.2	66.0	66.7	
R	23.2	8.7	4.0	5.5	

表 4 方差分析

Table 4 Variance analysis

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	90.026 7	2	33.760 0	$P < 0.05$
B	15.260 0	2	5.722 5	
C (误差)	2.666 7	2	1.000 0	
D	5.286 7	2	1.982 5	

$F_{0.05(2, 2)} = 19.00$

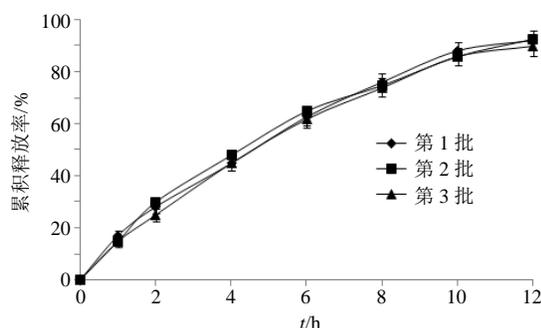


图 9 3 批凝胶骨架缓释片体外释药曲线 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 9 Drug release profiles of three batches of hydrogel matrix sustained-release tablets ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

内累积释放率为 92.53%。释放模型结果见表 5, 根据相关系数  $r$  判断, 缓释片符合 Higuchi 释药模型, 释药方程为  $\ln(1 - M_t/M_\infty) = 0.286 0 t_{1/2} - 0.069 0$  ( $r = 0.992 4$ )。该缓释片释药机制可由 Ritger-Peppas 模型来描述。对于圆柱形片剂, 当释放参数  $n > 0.89$  时为溶蚀作用; 当  $0.45 < n < 0.89$  时, 为扩散与溶蚀协同作用; 当  $n < 0.45$  则为 Fick 扩散。由于拟合参

表 5 药物释放模型

Table 5 Fitting release model

拟合模型	拟合方程	<i>r</i>	<i>n</i>
零级模型	$M_t/M_\infty=0.0758t+0.1068$	0.9770	—
Higuchi 模型	$M_t/M_\infty=0.2860t^{1/2}-0.0690$	0.9924	—
一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.2072t+0.0928$	0.9914	—
Ritger-Peppas 模型	$\ln(M_t/M_\infty)=0.7232\ln t-1.7925$	0.9936	0.7232

$M_t$  为  $t$  时间点的累积释放率,  $M_\infty$  为  $\infty$  时累积释放率,  $M_t/M_\infty$  为  $t$  时间点的累积释放率,  $t$  为时间,  $n$  为释放参数

$M_t$  is accumulative drug-release at time  $t$ ,  $M_\infty$  is accumulative drug-release at time  $\infty$ ,  $M_t/M_\infty$  is accumulative release at time  $t$ ,  $t$  is time,  $n$  is release parameter

数  $n$  为 0.723 2, 符合  $0.45 < n < 0.89$ , 因此缓释片体外释药为扩散与溶蚀协同作用。溶蚀作用与骨架材料本身性质有关, 而扩散作用至少与缓释片处方中亲水性物质 PEG 4000 遇水溶解形成的扩散通道有关, 处方中 PEG 4000 用量大小可能会对缓释片的扩散作用产生较大影响。钩藤碱纳米混悬剂的溶出曲线采用 MATLAB 软件得出威布尔分布模型参数  $T_{50}$  和  $T_d$ 。结果显示, 3 批缓释片溶出 50% 所需时间为 4.3 h, 溶出 63.2% 所需时间为 5.9 h。

### 2.10 钩藤碱几种片剂体外释药比较

取钩藤碱原料药、PEG 4000, 采用乳糖补充片质量至 0.5 g, 采用 6% 淀粉浆搅拌均匀后制备软材, 20 目筛制粒, 置于真空干燥箱 24 h (40 °C), 20 目筛整粒后加入适量的硬脂酸镁混匀, 压制钩藤碱普通片。取钩藤碱纳米混悬剂冻干粉, 按照普通片制备方法同法制备钩藤碱纳米混悬剂片。取钩藤碱原料药, 按照“2.8”项下制备工艺制备钩藤碱原料药缓释片, 处方种类及用量与钩藤碱纳米混悬剂缓释片一致。所制备的钩藤碱普通片、钩藤碱纳米混悬剂片和钩藤碱原料药缓释片剂量均同钩藤碱纳米混悬剂缓释片 (20 mg/片)。在同一条件下考察钩藤碱普通片, 纳米混悬剂片、原料药缓释片和纳米混悬剂缓释片体外释药情况, 结果见图 10。钩藤碱普通片最大累积释放率仅为 41.5%, 可能与钩藤碱溶解度较低有关, 导致药物沉淀于溶出杯底部。制备成纳米混悬剂片后, 由于钩藤碱的溶解度及溶出速率达到极大改善, 在 2 h 内药物基本溶出完毕。钩藤碱纳米混悬剂缓释片则具有良好的缓释效果, 最大释放度与纳米混悬剂片基本相同, 且在各个时间点累积释放率均高于原料药缓释片。

### 3 讨论

制备钩藤碱纳米混悬剂时, 水相与有机相互溶程度愈高, 扩散速度愈快, 越有助于形成粒径较小的纳米粒子。综合考虑有机溶剂毒性、对钩藤碱的

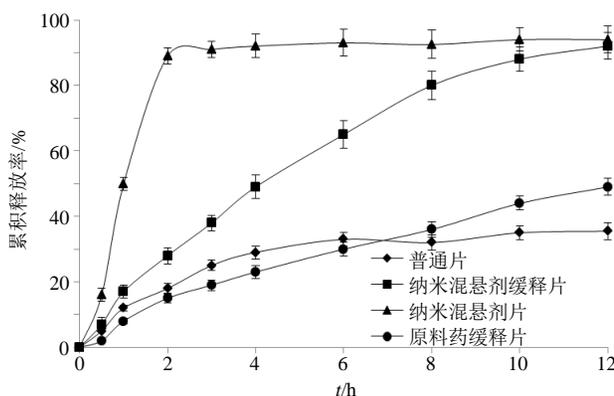


图 10 钩藤碱片剂体外释药行为 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 10 Release behavior of tablets of rhynchophylline ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

溶解度等问题, 最终采用乙醇作为有机溶剂。另外, 由于纳米粒形成过程是一放热过程<sup>[15]</sup>, 且较高的制备温度增加了纳米粒子的碰撞几率, 从而容易导致纳米粒子之间聚集。因此在制备纳米混悬剂过程中采用冰水混合物对其进行控温, 有助于获得粒径较小且分布均匀的纳米混悬剂。课题组以纳米混悬剂的粒径为考察指标, 分别对卵磷脂和泊洛沙姆比例 (2 : 1、1 : 1、1 : 2)、表面活性剂总用量 (0.1、0.2、0.3 g)、均质压力 (80、90、100 MPa) 和均质次数 (6、8、10 次) 进行了优化, 最终得出最佳制备工艺。方差分析结果显示, 均质次数具有显著性差异。在一定范围内增加均质次数, 可有效降低纳米混悬剂的粒径, 但继续增加均质次数, 粒径下降不再明显<sup>[8]</sup> (由于篇幅有限, 正交试验结果和方差分析具体数据不再展示)。本研究制备的纳米混悬剂 Zeta 电位绝对值小于 20 mV, 不利于纳米混悬剂的长期稳定, 因此将纳米混悬剂进一步制备成了冻干粉。稳定性试验显示, 冻干粉在放置的 30 d 内, 其纳米粒径、PDI 和 Zeta 电位均无明显变化。另外, 前期课题组曾采用甘露醇作为纳米混悬剂的冻干保护剂, 但压制的缓释片出现顶裂、黏冲现象, 因此最

终选择乳糖作为冻干保护剂。

近年来,采用缓控释制剂来控制纳米粒缓慢释放的报道逐渐增多<sup>[16,18-19]</sup>。本研究采用制备工艺简单、容易实现规模化生产的凝胶骨架缓释片技术对钩藤碱纳米混悬剂缓释片制备工艺进行了研究,结果显示缓释片在体外具有明显的缓释特征,12 h 内累积释放率达到 92.53%,体外释药符合 Higuchi 释药模型。钩藤碱纳米混悬剂从凝胶骨架缓释片中缓慢释药的过程为:缓释片处方中高分子材料 HPMC 遇水后形成凝胶阻滞层,对缓释片中的钩藤碱纳米混悬剂释放起到阻滞作用。同时,缓释片处方中 PEG 遇水后在凝胶阻滞层中留下释药孔道,起到释药速率调节作用。因此,在 HPMC 和 PEG 用量合适的情况下,通过两者的相互牵制作用,最终使钩藤碱纳米混悬剂从凝胶骨架片中缓慢释放。此外,缓释片中的乳糖不仅作为纳米粒保护剂,也作为缓释片的填充剂,遇水后也可在凝胶阻滞层中形成释药孔道,也起到了类似 PEG 的释药速率调节剂的作用<sup>[18-19,24]</sup>。

通过比较钩藤碱缓释片和钩藤碱纳米混悬剂缓释片发现,钩藤碱纳米混悬剂缓释片释药速率、各个时间点释放度和累积释放率均高于钩藤碱缓释片,可能是因为难溶性药物主要通过骨架溶蚀来释放药物,骨架材料遇水后形成的凝胶层黏度越大,骨架材料越难溶蚀,从而使药物释放减慢。溶解度较好的药物则不能阻止致密凝胶层的形成,因而水化速率较快的骨架材料容易形成释药通道,有利于药物扩散释放。由于纳米混悬剂极大提高了钩藤碱的溶解度,因而 2 种缓释片在体外释放有很大差别。

目前临床使用的钩藤碱制剂主要是胶囊剂,但容易造成体重下降等不良反应,这可能与给药剂量较高,血药浓度波动幅度较大有关<sup>[25]</sup>,因此开发一种安全、持续、高效的钩藤碱缓释制剂具有重要意义。钩藤碱溶解度极差,直接制备成缓释片后可能存在体内吸收困难、生物利用度不高、体内外相关性差等问题<sup>[17]</sup>。据报道<sup>[26-27]</sup>,将纳米技术与缓释技术联用,可进一步提高生物利用度,也有助于提高制剂的安全性和顺应性等。钩藤碱纳米混悬剂缓释片的制备成功,证明了其工艺上的可行性。接下来将该缓释片的体内药动学、药效学等继续研究<sup>[28-30]</sup>,为钩藤碱纳米混悬剂缓释片提供更为全面的研究资料。纳米混悬剂有普通片剂、注射剂、透皮制剂等方式给药,本研究提供了一种缓释制剂,

扩大了纳米混悬剂的应用范围,值得进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 陈晨,郭小梅. 高血压致主动脉夹层机制研究及治疗进展 [J]. 医药导报, 2018, 36(2): 171-177.
- [2] 王子明,杨龄,房银东,等. 攀茎钩藤茎枝的化学成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2802-2808.
- [3] 罗俊,张妮,马小攀,等. HPLC 测定黔产钩藤不同部位钩藤碱和异钩藤碱的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(14): 1733-1737.
- [4] 崔莹. 钩藤化学成分和药理活性研究进展 [J]. 西安文理学院学报: 自然科学版, 2015, 18(4): 16-18.
- [5] 李超,蔺琳,张蕾,等. 钩藤碱增强自噬改善 TNF- $\alpha$  介导的血管内皮细胞血栓前状态的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(24): 5224-5229.
- [6] 张馨方,杨莹,崔磊,等. 钩藤人参合用对高血压合并心衰大鼠模型的影响 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(12): 2183-2188.
- [7] Xu R L, Wang J Y, Xu J J, *et al.* Rhynchophylline loaded-mPEG-PLGA nanoparticles coated with Tween-80 for preliminary study in Alzheimer's disease [J]. *Int J Nanomed*, 2020, 18(2): 1149-1160.
- [8] 王盟,田宝成,田桂芹,等. 钩藤碱固体脂质纳米粒的毒性研究 [J]. 西北药学杂志, 2018, 33(1): 50-54.
- [9] 徐浩,高艺璇,王向涛. 槲皮素纳米混悬剂的制备、表征及抗乳腺癌研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 42-51.
- [10] 王一安,付婧欣,李好文,等. 舒林酸纳米混悬剂的制备及其体内外抗肿瘤作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(1): 16-21.
- [11] 唐海龙,李小芳,龙家英,等. 以甘草酸为稳定剂制备水飞蓟素纳米混悬剂及稳定机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 971-977.
- [12] 石淼,张洪,吕舰,等. 氯雷他定纳米混悬剂的制备与稳定性考察 [J]. 医药导报, 2018, 37(11): 1381-1385.
- [13] 陈奋,杨月,张玲,等. 姜黄素纳米制剂在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(21): 2731-2737.
- [14] 王震芳,张智强,葛振华,等. 蛇床子素 3 种制剂的制备、表征及药动学比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3615-3621.
- [15] 闫瑞,李凌军,李顺. 天钩降压胶囊中钩藤碱大鼠体内药动学研究 [J]. 山东中医药大学学报, 2014, 38(3): 257-259.
- [16] 李季,李凌军,姜华伟. 天钩降压胶囊中钩藤碱、异钩藤碱大鼠在体肠吸收动力学研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 167-170.
- [17] Zhao Z Z, Wu C, Zhao Y, *et al.* Development of an oral

- push-pull osmotic pump of fenofibrate-loaded mesoporous silica nanoparticles [J]. *Int J Nanomed*, 2015(10): 1691-1701.
- [18] 李阳杰, 周敬. 马钱子碱双层渗透泵控释片的研制及处方优化 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(22): 2805-2809.
- [19] 董丹丹, 郑研, 刘会珍, 等. 田蓟苷纳米混悬剂冻干粉缓释片制备工艺研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(12): 2841-2847.
- [20] 李宏伟, 付金芳, 范明松. 白杨素固体脂质纳米粒水凝胶骨架缓释片的制备 [J]. *中成药*, 2020, 42(3): 564-569.
- [21] 孟戎茜, 王曼, 王慧芳, 等. 卡维地洛凝胶骨架缓释片的处方优选与表征 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(15): 1876-1881.
- [22] 李雪怡, 段颀珊, 王珂玉, 等. 星点设计-效应面法优化盐酸丁螺环酮胃漂浮缓释片处方 [J]. *医药导报*, 2018, 37(8): 986-989.
- [23] 黄甜甜, 沈一平, 路丽康, 等. 高载药量雷公藤红素纳米混悬剂的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2125-2133.
- [24] 邓向涛, 阮晓东, 郝海军. 马钱子碱固体脂质纳米粒凝胶骨架缓释片的研制 [J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5298-5304.
- [25] 陈颖, 李玉洁, 杨庆, 等. 天钩降压胶囊的毒理学研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(23): 3358-3363.
- [26] Tian Z Q, Yu Q, Xie Y C, *et al.* Controlling release of integral lipid nanoparticles based on osmotic pump technology [J]. *Pharm Res*, 2016, 33(8): 1988-1997.
- [27] Wu C, Zhao Z Z, Zhao Y, *et al.* Preparation of a push-pull osmotic pump of felodipine solubilized by mesoporous silica nanoparticles with a core-shell structure [J]. *Pharm Nanotechnol*, 2014, 475(1/2): 298-305.
- [28] 徐兵勇, 潘迎锋, 平丽. 氟伐他汀钠缓释片的制备及其 Beagle 犬体内药动学研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(4): 421-425.
- [29] 黄聪, 王洋洋, 刘雁飞, 等. 基于生理驱动的生理药动学模型建立及其预测能力研究 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(5): 822-828.
- [30] 顾和亚, 江静怡, 周洪亮, 等. 芪葵缓释片中 6 种活性成分在兔血浆中的药动学研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(12): 2891-2898.