

氧化苦参碱微球冻干针剂器官靶向性研究

倪晨¹, 赖春丽², 王倩¹, 熊艺花¹, 赖小平¹

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 广州医学院附属肿瘤医院; 广州 510000)

[摘要] 目的: 研究氧化苦参碱微球 (OMAT-PBCA-NP) 冻干针剂的动物器官靶向性。方法: 采用高效液相色谱法测定给药大鼠各主要脏器的氧化苦参碱含量。色谱条件: Kromasil C₁₈ 柱 (4.60 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水-三乙胺 (50:50:0.02), 柱温 20 °C, 检测波长 210 nm, 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量为 10 μL。结果: 氧化苦参碱在 50 ~ 400 mg·L⁻¹ 线性关系良好 ($r=0.999\ 0$), 在 30 min, 1, 4, 8 h 等时间点中, 氧化苦参碱在肝内的含量最高, 与其他脏器含量有极显著性差异 ($P < 0.01$)。结论: OMAT-PBCA-NP 具有良好的肝脏靶向性。

[关键词] 氧化苦参碱微球; 靶向性; HPLC

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)16-0203-04

Targeting Investigation for Freeze-dried Injection of Oxymatrine- Polybutylcyanoacrylate- Nanoparticles

NI Chen¹, LAI Chun-li², WANG Qian¹, XIONG Yi-hua¹, LAI Xiao-ping¹

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Cancer Institute and Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the organ targeting for freeze-dried injection of Oxymatrine-Polybutylcyanoacrylate-Nanoparticles (OMAT-PBCA-NP) in rats. **Method:** The content of oxymatrine in major organs of rats after injected with OMAT-PBCA-NP was investigated by high performance liquid chromatography. HPLC was carried out on a Kromasil C₁₈ column (4.60 mm × 250 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of methanol and water and triethylamine (50:50:0.02), the column temperature was 20 °C and UV detection wavelength was 210 nm, the flow was 1 mL·min⁻¹ and the injection volume was 10 μL. **Result:** The calibration curve of oxymatrine was linear in the concentration range of 50-400 mg·L⁻¹ ($r=0.999\ 0$), in 30 min, 1, 4, 8 h, the content of oxymatrine was highest in the liver with significant difference from other organs ($P < 0.01$). **Conclusion:** OMAT-PBCA-NP has good targeting for liver.

[Key words] oxymatrine-polybutylcyanoacrylate-nanoparticles; targeting; HPLC

氧化苦参碱 (oxymatrine, OMAT), 是中药苦参、山豆根、苦豆子的主要活性成分, 临床结果显示对慢性乙型肝炎、肝纤维化有良好的效果^[1]。传统的氧化苦参碱制剂在体内吸收分布广泛, 到达肝脏的药物浓度低; 为提高氧化苦参碱的肝靶向性, 提高其生物利用度, 本单位将其制成微球冻干针剂。

本试验采用高效液相色谱法^[2-4], 测定给药动物的血浆、器官匀浆液中氧化苦参碱的含量, 以研究氧化苦参碱微球冻干针剂的动物器官靶向性, 为研究靶向治疗肝脏疾病新药提供数据支持。

1 材料

1.1 仪器 Dionex Summit 高效液相色谱仪 (P580Pump, ASI-100 自动进样器, 柱温箱, DAD 检测器); 赛多利斯 1/万电子天平 (德国); TLL-C 台式高速冷冻离心机; XH-89 涡旋机 (浙江乐城电器厂)。

1.2 试药 氧化苦参碱对照品 (批号 110780-

[收稿日期] 20110412(007)

[第一作者] 倪晨, 助理研究员, 硕士, 从事中药新药开发研究, Tel: 020-39358103, E-mail: 30617114@QQ.com

200506, 由中国药品生物制品检定所提供); 纯度为 99%。供试样品氧化苦参碱微球冻干针剂, 采用聚氰基丙烯酸正丁酯 (BCA) 为药物载体, 以乳化聚合法制备: 氧化苦参碱原料 10 mg, Pluronic F-68 10 mg, Dextran-70 10 mg, 亚硫酸钠 10 mg, 充分混匀, 调节 pH 2, 磁力搅拌下加 BCA 5 mg, 搅拌 2 h, 调节 pH 7, 继续搅拌 0.5 h, 0.45 μm 微孔滤膜过滤; 冷冻干燥条件: $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻 5 h, 减压干燥 ($\leq 20\text{ Pa}$), $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 10 h, 最后于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 5 h 即得。径粒分布范围 90 ~ 150 nm, 平均包封率为 79.32% (本单位自制, 批号 091220)。市售氧化苦参碱注射液 (江苏正大天晴药业股份有限公司, 批号 ZD20100408044); 甲醇、三乙胺为色谱纯, 水为超纯水; 其化学试剂均为分析纯。

1.3 动物 SD 大鼠, 体重 (200 ± 20) g, 雌雄各半, 广州中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 0021168。

2 方法

2.1 色谱条件 Kromasil C_{18} 柱 (4.60 mm \times 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水-三乙胺 (50: 50: 0.02), 柱温 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 检测波长 210 nm, 流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量为 10 μL 。

2.2 生物样品的处理 SD 大鼠 10 只, 断头取血, 置于含肝素钠的抗凝管内, 常规方法取血浆; 置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用; 摘取心、肝、脾、肺、肾等脏器, 合并称重, 加 5 倍生理盐水匀浆备用。

精密称定氧化苦参碱对照品约 5 mg, 置于 1 mL 量瓶中, 加血浆定容配成质量浓度为 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对照品溶液, 移置 5 mL 量瓶中, 加入甲醇至刻度, 在旋涡混合器上振荡 2 min, 离心 ($12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) 12 min, 取上清液, 氮气吹干后用甲醇定容至 1 mL 母液, 稀释至含 $250\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氧化苦参碱血浆样品, 同法制备脏器匀浆液样品。

2.3 对照品溶液的制备 分别取 2.2 项下制备的血浆、脏器匀浆液母液, 用甲醇稀释为 50, 100, 160, 250, 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 精密称定氧化苦参碱微球冻干针剂约 400 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 分别加入空白血浆、脏器匀浆, 定容为氧化苦参碱 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 即得。

2.5 专属性考察 分别取空白血浆、脏器匀浆液 1 mL, 除不加氧化苦参碱外, 其他按 2.2 项下方法操

作, 为空白血浆、空白脏器匀浆液样品。分别取上述样品及含氧化苦参碱的血浆、脏器匀浆液样品各 10 μL , 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 结果见图 1 ~ 4。由图可知, 空白血浆、脏器中的内源性物质不干扰氧化苦参碱的测定。

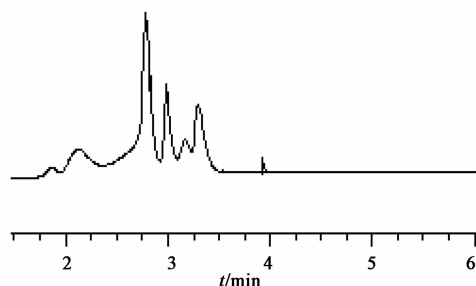


图 1 空白血浆 HPLC

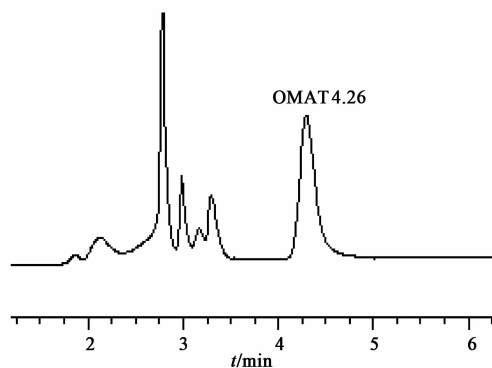


图 2 含氧化苦参碱血浆 HPLC

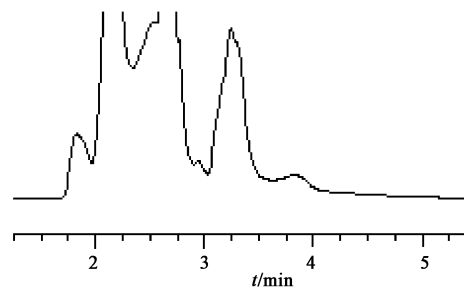


图 3 空白脏器匀浆液 HPLC

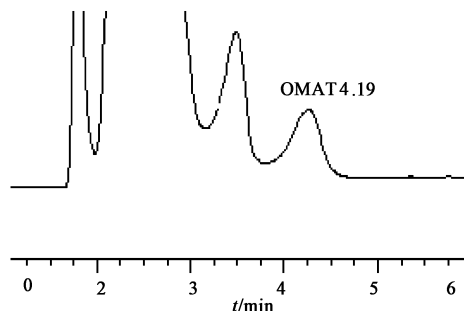


图 4 含氧化苦参碱脏器匀浆液 HPLC

2.6 标准曲线制定 分别精密吸取对照品血浆溶

液各 10 μL ,注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以质量浓度 $C(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ 为横坐标,峰面积 A 为纵坐标,得到线性方程 $A = 0.1491C + 0.1252$, $r = 0.9990$ 。同法测得脏器匀浆溶液中,氧化苦参碱的线性方程 $A = 0.1462C + 0.5121$, $r = 0.9994$ 。结果表明,在该色谱条件下,氧化苦参碱在 50 ~ 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.7 精密度试验 分别取 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 血浆、脏器匀浆液对照品溶液各 10 μL ,按 2.1 项下色谱条件进样测定,连续进样 6 次,结果代入标准曲线方程进行计算,血浆质量浓度为 (94.97 \pm 3.21) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, RSD 2.39%,脏器匀浆液质量浓度为 (95.11 \pm 4.37) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; RSD 3.22%,表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验 取同一批氧化苦参碱微球冻干

针剂 6 份,按 2.4 项下方法制备供试品血浆液和匀浆液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,结果代入标准曲线方程进行计算,血浆质量浓度为 (75.30 \pm 4.57) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, RSD 3.70%,脏器匀浆液质量浓度为 (74.84 \pm 3.15) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, RSD 2.82%,表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取氧化苦参碱标准品适量,分别加入 6 份含氧化苦参碱的血浆,按 2.1 项下色谱条件进样测定;含药血浆、脏器匀浆样本同法去蛋白定容后测定峰面积,按线性方程算,结果如表 1。血浆中氧化苦参碱平均回收率为 99.40%, RSD 3.25%;脏器匀浆中氧化苦参碱平均回收率为 97.35%, RSD 1.45%,表明该方法具有良好的回收率。

表 1 氧化苦参碱加样回收试验 ($n=6$)

样品来源	编号	测得量/ μg	样品中含量/ μg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
血浆	1	389.24	185.4	101.92	99.40	3.25
	2	388.39	189.08	99.66		
	3	376.27	183.55	96.36		
	4	376.29	186.71	94.79		
	5	394.42	188.18	103.12		
	6	384.03	182.95	100.54		
脏器匀浆	1	385.84	192.50	96.67	97.35	1.45
	2	380.76	189.68	95.54		
	3	389.07	189.59	99.74		
	4	386.10	190.79	97.66		
	5	384.04	188.62	97.71		
	6	378.77	185.15	96.81		

注:取样体积均为 0.5 mL,对照品加入量均为 200 μg 。

2.10 靶向性试验

2.10.1 给药 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,随机分成 2 组;第 1 组每只肌注供试品溶液 0.5 mL;第 2 组每只肌注市售氧化苦参碱注射液 0.5 mL。各组分别于 30 min,1,4,8 h 取 5 只大鼠,采血,取心、肝、脾、肺、肾各主要脏器。

2.10.2 样品处理 全血按 2.2 项下处理取血浆,精密移取血浆 500 μL ,加入甲醇 2 mL,同上法去蛋白、定容后注入高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样测定,脏器匀浆同法处理、测定。

血浆中的药物含量以浓度计算,脏器中的药物以药量的百分含量计算。

3 结果

与市售氧化苦参碱注射液对比,在 30 min,1,4,8 h 等时间点中,供试品在肝脏内的含量均为最高,与其他脏器含量有极显著性差异 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

4 讨论

传统的氧化苦参碱给药方式因全身分布,局部血药浓度低,达不到很好的治疗效果。微球给药系统是指药物分子分散或吸附在高分子聚合物载体中形成的微粒分散系统,其具有及时释放药物、维持较高的血药浓度或靶器官浓度的特点,同时因其粒径小(90 ~ 150 nm),可对特定的靶器官具有良好的亲

表 2 氧化苦参碱微球冻干针剂趋靶性试验 ($n=5$)

检测项	30 min		1 h		4 h		8 h	
	注射液	供试品	注射液	供试品	注射液	供试品	注射液	供试品
肝/%	3.53	32.09 ¹⁾	6.18	73.64 ¹⁾	5.39	56.33 ¹⁾	4.03	37.00 ¹⁾
肾/%	7.40	9.36	10.86	14.97	8.75	10.02	5.50	6.99
血浆/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	145.74	138.15	182.92	163.17	129.63	97.56	70.77	55.83

注:与同时时间点注射液组比较¹⁾ $P < 0.01$;心、脾、肺所测峰面积无或太小,仪器未能对峰面积进行准确积分,故不在表内显示。

和性,可被巨噬细胞吞噬,并运送到肝脏。本研究基于氧化苦参碱的肝脏活性,考察自制微球制剂的器官靶向性,为进一步研究防治乙肝、肝纤维化提供实验依据。

从内源性物质考察结果中看出,动物的血浆和各主要脏器中的内源性物质对氧化苦参碱色谱峰干扰不大,表明甲醇去蛋白方法可行。从浓度-峰面积线性方程来看,血浆、脏器匀浆甲醇液中药物浓度线性好,因此峰面积定量可行。

趋靶性试验中,心、脾、肺所检测值低于检测限,故无相关数据;试验数据结果表明,供试品组的肝脏匀浆中药物含量在 1 h 时最高;而血浆中药物含量较低,可能与在脏器中分布较多有关。

试验结果表明,本课题制备的氧化苦参碱微球冻干针剂具有良好的肝脏靶向性,与其他脏器含量有极显著性差异($P < 0.01$),同时较市售注射液相

比,亦有极显著性差异($P < 0.01$),证明采用该工艺制备的微球制剂肝脏靶向性强于注射液,可为进一步开发新药物提供实验基础。

[参考文献]

- [1] 李常青,李小颀. 氧化苦参碱治疗肝病的研究进展[J]. 热带医学杂志, 2003,3(2):243.
- [2] 杨雪,王琳慧,白小红. 液相微萃取/后萃取-高效液相色谱法测定苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 南昌大学学报:理科版,2006,16(10):548.
- [3] 白晓朝,刘利军,张守宗. 聚氰基丙烯酸正丁酯毫微粒中氧化苦参碱的含量测定[J]. 中外健康文摘,2008,14(2):133.
- [4] 郑庆忠,刘利军,白晓朝. 氧化苦参碱脂质体的制备及其质量评价[J]. 中国药房,2007,18(10):760.

[责任编辑 聂淑琴]