

毛萼乙素纳米混悬剂. I. 制备及在小鼠体内的药动学

王 健¹, 侯惠民¹, 夏怡然¹, 孙汉董², 普建新²

(1. 中国医药工业研究总院药物制剂国家工程研究中心, 上海 201203; 2. 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650204)

摘要: 以卵磷脂和泊洛沙姆为稳定剂, 结合研磨法和高压均质法制备了毛萼乙素纳米混悬剂, 所得纳米粒的平均粒径为 98.2 nm, 含药量为 4.2 mg/ml。制品经小鼠尾静脉注射给药的体内过程符合二室模型。静脉注射和腹腔注射给药后药物的血浆消除半衰期分别为 49.8 和 45.1 min, 表观分布容积分别为 4.0 和 5.4 L/kg。

关键词: 毛萼乙素; 纳米混悬剂; 制备; 药动学

中图分类号: R944.9 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2012)02-0100-04

Eriocalyxin B Nanosuspension. I. Preparation and Pharmacokinetics in Mice

WANG Jian¹, HOU Huimin¹, XIA Yiran¹, SUN Handong², PU Jianxin²

(1. National Pharmaceutical Engineering Research Center, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203;

2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

ABSTRACT: The eriocalyxin B nanosuspension was prepared by combined application of wet milling and high pressure homogenization with lecithin and poloxamer as stabilizers. The mean diameter of the product was 98.2 nm with the drug loading of 4.2 mg/ml. The *in vivo* process of eriocalyxin B in mice after iv administration could be described by two-compartment model. The plasma elimination half-lives of iv group and ip group were 49.8 and 45.1 min, respectively. The apparent volumes of distribution were 4.0 and 5.4 L/kg, respectively.

Key Words: eriocalyxin B; nanosuspension; preparation; pharmacokinetics

毛萼乙素 (eriocalyxin B, **1**) 是从疏花毛萼香茶菜中提取分离得到的贝壳杉烷二萜类化合物, 为抗肿瘤药冬凌草甲素的类似物^[1]。体外抗肿瘤活性测试表明, **1** 有广谱抑瘤作用, 对卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌、肠癌、肺癌、胃癌、肝癌、前列腺癌及白血病等肿瘤细胞均具有显著的增殖抑制作用^[2]; 小鼠体内试验结果也呈现出较好的抗肿瘤作用^[3], 显示出良好的药用开发前景。但由于 **1** 溶解性差, 在水中的饱和溶解度约为 0.11 mg/ml, 在正辛醇-水体系中的表观油水分配系数 ($\lg P_{app}$) 约为 2^[4], 在

制剂研究中存在一定的困难。

采用纳米药物晶体技术 (drug nanocrystal technology) 制备药物纳米混悬剂 (nanosuspension), 可解决几乎所有难溶性药物的溶解度和溶出度问题^[5]。该技术无需载体材料, 处方简单, 可制得高浓度的药物制剂。并且在活性化合物进行筛选时可摒除附加剂造成的不良反应, 提高筛选效率。因此, 本研究结合介质研磨法和高压均质机 (上海惠同代理) 均质法制备了 **1** 纳米混悬剂, 并考察了其在小鼠体内的药动学, 为抗肿瘤药药效学研究提供帮助。

1 仪器与试药

LC-10A 型高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司); LS-230 型激光散射粒度测定仪 (美国 Beckman Coulter 公司); 高压均质机 (上海惠同代理)。

1 原药 (中国科学院昆明植物研究所, 含量 >

收稿日期: 2011-06-20; 修回日期: 2011-11-03 基金项目: 上海市科委国内科技合作项目 (10495801300) 作者简介: 王 健 (1967-

), 男, 副研究员, 从事黏膜给药制剂及

纳米制剂研究。

Tel: 021-51320211 × 8305

E-mail: wangj@nperc.com.cn

高压均质机——上海惠同贸易有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305

98%)；卵磷脂(德国Lipoid公司)；泊洛沙姆(Lutrol F68, 德国BASF公司)；叔丁基甲醚(色谱纯, Sigma-Alderich公司)；氧化锆珠(直径0.5 mm, 恒利达公司)；注射用生理盐水(上海百特医疗用品有限公司)；四氢呋喃和甲醇为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

ICR小鼠[体重20~25 g, 雄性, 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证编号: SCXK(沪)2008-0016]饲养于24℃、相对湿度60%的环境中, 试验前给予正常饲料和饮水。

2 方法与结果

2.1 1纳米混悬剂的制备

取卵磷脂0.15 g、泊洛沙姆0.1 g, 置一小杯中, 加入注射用生理盐水50 ml分散, 然后加入1 0.5 g、氧化锆珠25 ml。开动搅拌, 搅拌转速逐渐提高至2 000 r/min, 室温搅拌2 h后, 过200目筛分取药液, 移至高压均质机(上海惠同代理)中, 5 000 psi循环5次, 10 000 psi循环5次, 20 000 psi循环10次, 得1纳米混悬剂。

2.2 1纳米混悬剂的含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱 Inertsil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相 甲醇-水(65 : 35, 含0.1%三乙胺, 用磷酸调至pH 6.8)；检测波长233 nm；柱温35℃；流速1.0 ml/min；进样量20 μl。

2.2.2 标准曲线

精密称取1原药15 mg, 置25 ml量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 混匀, 作为贮备液。精密量取贮备液适量, 加甲醇稀释得1浓度分别为0.5、1、1.5、2.5、5和10 μg/ml的溶液。分别进样测定, 记录色谱图。以峰面积(A)为纵坐标, 以1浓度(c)为横坐标进行线性回归, 得标准曲线方程 $A=53\ 784c-2\ 141.8$ ($r=0.999\ 9$)。表明1在0.5~10 μg/ml浓度范围内线性关系良好。最低检测限为5 ng/ml。

2.2.3 精密度和回收率试验

精密量取1贮备液适量, 用甲醇分别稀释成1浓度为0.5、5和10 μg/ml的溶液, 1 d内测定5次, 连续5 d测定。计算得日内RSD为0.22%~1.9%, 日间RSD为0.45%~1.1%, 方法回收率为98.2%~99.8% ($n=3$)。

2.2.4 含量测定

取1纳米混悬剂适量, 置10 ml量瓶中, 用甲醇定容, 取样测定, 计算得制品中1的含量为(4.2±0.1) mg/ml ($n=3$)。

2.3 1纳米混悬剂的粒径分布

取1纳米混悬剂适量, 测定其平均粒径及分布。结果制品数均粒径为(98.2±5.6) nm ($n=3$), 粒径分布见图1。

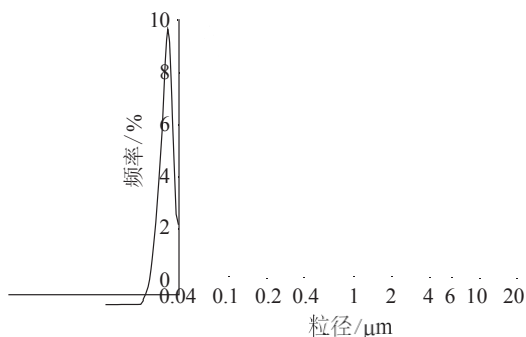


图1 1纳米混悬剂粒径分布图

2.4 1纳米混悬剂在小鼠体内的药理学

2.4.1 给药方案

将制得的1纳米混悬剂用生理盐水稀释至1浓度为1 mg/ml, 作为供试品。取ICR小鼠随机分组, 每组3只, 其中8组尾静脉注射(iv)给药, 7组腹腔注射(ip)给药, 剂量均为10 mg/kg。iv组分别于给药后2、5、8、20、40、60、120和180 min各取一组小鼠, 摘眼球取血约0.5 ml, 离心(12 000×g)3 min, 分取血浆, 于-20℃冻存备用。ip组分别于给药后5、10、20、40、60、120和180 min各取一组小鼠, 同上操作, 所得血浆冻存备用。

2.4.2 血浆样品处理

取小鼠血浆100 μl置10 ml离心管中, 加叔丁基甲醚3 ml, 涡旋3 min, 离心(3 000×g)10 min, 取有机层置10 ml离心管中, 室温下氮气流吹干。向残留物中加甲醇100 μl, 涡旋1 min, 移至0.5 ml离心管中, 离心(12 000×g)2 min, 取上清液进样测定。

2.4.3 色谱条件

色谱柱 Inertsil ODS C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相 甲醇-四氢呋喃-水(59 : 3 : 38, 含0.1%三乙胺, 用磷酸调至pH 4.8)；流速

高压均质机——上海惠同贸易有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305

1.0 ml/min ; 检测波长 233 nm ; 柱温 40 °C ; 进样量 20 μ l。

2.4.4 标准曲线、精密度与回收率

取 **1** 贮备液, 用甲醇稀释成浓度为 0.2 ~ 50 μ g/ml 的溶液, 待用。

取空白小鼠血浆 100 μ l, 加入 **1** 溶液适量, 分别配制成 **1** 浓度为 0.04、0.1、0.8、2 和 10 μ g/ml 的血浆样品, 按“2.4.2”项下操作后进样测定。以峰面积 (*A*) 对 **1** 浓度 (*c*) 进行线性回归, 权重因子为 $1/c^2$, 得回归方程 $A=34\ 438c+296$ ($r^2=0.999\ 1$)。表明 **1** 浓度在 0.04 ~ 10 μ g/ml 范围内线性关系良好。

取 **1** 浓度分别为 0.04、0.8 和 10 μ g/ml 的血浆质控样品, 按“2.4.2”项下方法操作, 1 d 内测定 3 次, 连续 3 d 测定。计算得日内 RSD 为 1.1% ~ 5.4%, 日间 RSD 为 2.4% ~ 13.0%, 方法回收率为 98.7% ~ 106.0% ($n=3$)。

2.4.5 数据处理及统计

1 纳米混悬剂经小鼠 iv 及 ip 给药后的药 - 时曲线见图 2, 用 DAS 2.0 药动学软件处理数据, 根据非隔室模型统计矩计算药动学参数 (表 2)。结果表明, **1** 纳米混悬剂经 iv 给药后的体内过程符合二室模型。iv 及 ip 给药途径下 **1** 的表观分布容积分别为 4.0 和 5.4 L/kg, 血浆消除半衰期分别为 49.8 和 45.1 min。

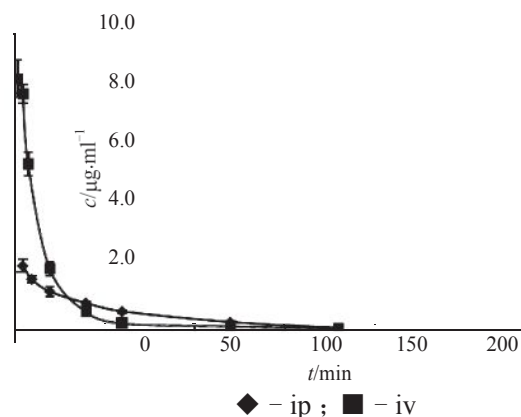


图 2 尾静脉和腹腔注射 **1** 纳米混悬剂后小鼠的药 - 时曲线 ($n=3$)

3 讨论

3.1 **1** 纳米混悬剂的制备

表 2 小鼠尾静脉 (iv) 和腹腔注射 (ip) **1** 纳米混悬剂后的药动学参数 ($n=3$)

组别	$t_{1/2}/\text{min}$	$V_d/L\cdot\text{kg}^{-1}$	$AUC_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$	$AUC_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}$
iv	49.8	4.0	170.3	176.7
ip	45.1	5.4	112.8	120.1

介质研磨法和高压均质机 (上海惠同代理) 均质法是制备纳米混悬剂的常用方法 [5]。本研究将两法联用制备 **1** 纳米混悬剂。纳米粒的粒径除与药物性质有关外, 还受研磨介质的性质 (材质、硬度和粒径)、搅拌转速、稳定剂、均质压力和次数等因素的影响 [5]。本研究以 F68 和卵磷脂为稳定剂, 采用高硬度小粒径 (0.5 mm) 的氧化锆珠进行研磨, 再经高压均质机 (上海惠同代理) 均质作用进一步减小和匀化粒径, 得到数均粒径为 98.2 nm 的纳米混悬剂, 可用于 **1** 的药动学和药效学研究。F68 和卵磷脂可使粉碎后的纳米粒子同时具有静电斥力和空间位阻作用, 有利于纳米粒子的稳定 [6]。

3.2 **1** 纳米混悬剂的药动学性质

1 纳米混悬剂用于小鼠 iv 给药后的体内过程符合二室模型, 表观分布容积大 (4.0 L/kg), **1** 血浆浓度在 2 ~ 60 min 内从 8.5 μ g/ml 降至 0.3 μ g/ml 以下, 血浆消除半衰期约 50 min, 表明 **1** 在小鼠体内分布快, 与在大鼠体内相似 [7]。ip 给药后 0 ~ 30 min 的血药浓度显著低于 iv 给药, 但 30 min 后血药浓度高于 iv 给药, 血浆 **1** 浓度维持在 0.3 μ g/ml 以上的时间约为 2 h, 绝对生物利用度约 68%。

本研究曾尝试进行 **1** 纳米混悬剂在小鼠体内的组织分布研究, 但无论用乙醚、叔丁基甲醚、氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、环己烷等溶剂进行液 - 液萃取, 还是用甲醇、乙腈、三氯乙酸、高氯酸等试剂进行蛋白沉淀, **1** 在肝、肾、肺、脑及心脏等组织匀浆中的回收率大多小于 10%, 最高也不超过 18%。在组织匀浆中加入抗氧化剂或对组织进行熟化处理, 均不能显著提高 **1** 的提取回收率, 因此未能测定 **1** 纳米混悬剂在小鼠体内的组织分布。推测 **1** 能与小鼠组织蛋白快速形成稳定的复合物, 有待进一步研究。

高压均质机——上海惠同贸易有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305

某国产卡马西平缓释片与参比制剂的释放度比较

宋 一, 宫珊珊

(辽宁省大连市食品药品检验所, 辽宁大连 116021)

摘要: 比较了国内某一厂家 3 批卡马西平缓释片(受试制剂)与 Tegretol(参比制剂)在不同 pH 介质中的体外释放度。采用桨板法, 转速 75 r/min, 分别考察了受试制剂和参比制剂在不同释放介质(水、pH 4.5 乙酸盐缓冲液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液)900 ml 中的释放行为。结果显示, 在上述 3 种介质中, 受试制剂的批间差异显著, 同批产品在不同介质中的释放行为也有显著差异。受试制剂的内在品质不如参比制剂。

关键词: 卡马西平; 缓释片; 释放度

中图分类号: R944.9

文献标志码: A

文章编号: 1001-8255(2012)02-0103-04

Comparison of Release Rate Between A Domestic Brand of Carbamazepine Sustained-release Tablets and Reference Preparation

SONG Yi, GONG Shanshan

(Institute for Food and Drug Control of Dalian City, Dalian 116021)

ABSTRACT: The *in vitro* release rates of carbamazepine from three batches of sustained-release tablets of a domestic factory (test preparation) and Tegretol (reference preparation) in different pH mediums (water, pH 4.5 acetate buffer and pH 6.8 phosphate buffer) were compared. The determination was carried out in 900 ml medium by paddle method with 75 r/min stirring rate. The results showed that there was a significant difference in the release rates of the three batches, even the same batch, of test preparation in the above mediums. The quality of the test preparation was inferior to the reference preparation.

Key Words: carbamazepine; sustained-release tablet; release

作为 20 世纪 60 年代研发并仍在全世界使用的药物, 卡马西平(carbamazepine, 1)一直是治疗癫痫的常规首选药。在我国, 由于医保现状及药物经济学等因素, 1 片剂为一线治疗药物并被国家基本药物目录收载。为减少与血药浓度相关的不良反应和简化服药程序, 在国内已有缓释片与缓释胶囊两种缓释剂型。然而多数情况下国内制剂的内在品质与国外同类参比制剂相差较大, 缓释制剂更是如此。

作为 20 世纪 60 年代研发并仍在全世界使用的药物, 卡马西平(carbamazepine, 1)一直是治疗癫痫的常规首选药。在我国, 由于医保现状及药物经济学等因素, 1 片剂为一线治疗药物并被国家基本药物目录收载。为减少与血药浓度相关的不良反应和简化服药程序, 在国内已有缓释片与缓释胶囊两种缓释剂型。然而多数情况下国内制剂的内在品质与国外同类参比制剂相差较大, 缓释制剂更是如此。

收稿日期: 2011-07-19; 收稿日期: 2011-09-23

作者简介: 宋 一(1974-), 女, 副主任药师, 从事药品质量标准研究。

Tel: 0411-84255304

E-mail: yjs_sy@dl.gov.cn

参考文献:

- [1] Sun HD, Lin ZW, Niu FD, *et al.* Diterpenoids from *Isodon eriocalyx* var. *laxiefora* [J]. *Phytochemistry*, 1995, **38** (6): 1451-1455.
- [2] 孙汉董, 赵勤实, 牛雪梅, 等. 一种治疗癌症的药物及其用途: 中国, 1424028[P]. 2003-06-18.
- [3] Wang L, Zhao WL, Yan JS, *et al.* Eriocalyxin B induces apoptosis of t(8;21) leukemia cells through NF-kappaB and MAPK signaling pathways and triggers degradation of AML1-ETO oncoprotein in a caspase-3-dependent manner [J]. *Cell Death Differ*, 2007, **14** (2): 306-317.
- [4] 夏怡然. 毛萆乙素纳米混悬剂及药效学研究 [D]. 药物制剂国家工程研究中心硕士学位论文, 2010: 3-13.
- [5] 夏怡然, 王 健, 朱金屏, 等. 纳米药物晶体的制备技术研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2010, **41** (2): 134-140.
- [6] Gao L, Zhang D, Chen M, *et al.* Studies on pharmacokinetics and tissue distribution of oridonin nanosuspensions [J]. *Int J Pharm*, 2008, **335** (1-2): 321-327.
- [7] 夏怡然, 王 健, 朱金屏, 等. 大鼠血浆中毛萆乙素的 HPLC 测定 [J]. 中国医药工业杂志, 2010, **41** (1): 41-43.