



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102772362 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201210252981. X

(22) 申请日 2012. 07. 21

(71) 申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路南  
一段 24 号

(72) 发明人 张志荣 龚涛 赵晖

(51) Int. Cl.

A61K 9/10 (2006. 01)

A61K 9/19 (2006. 01)

A61K 31/4745 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

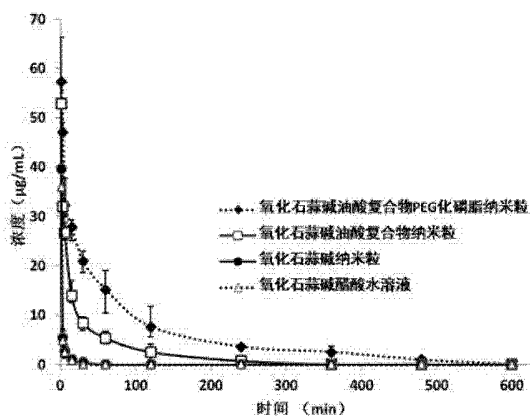
权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

## (54) 发明名称

一种提高生物利用度的氧化石蒜碱组合物及其制剂

## (57) 摘要

本发明提供一种生物碱类抗肿瘤化合物的油酸复合物的制备方法及分别制备该复合物、磷脂和脂肪酸甘油酯的油水两相,制成纳米粒制剂,本发明的制备方法制得的制剂具有辅料用量少、载药量高、稳定性好、制备工艺简单,适合工业化大生产,本发明制备的制剂显著的提高了生物利用度,延长体内循环时间,具有较好的临床应用价值。



1. 一种氧化石墨烯的油酸复合物纳米粒制剂,其特征在于包含氧化石墨烯与油酸形成的复合物、表面活性剂、脂类,基于重量份计为氧化石墨烯 1 份、油酸 1 ~ 10 份、表面活性剂 1 ~ 10 份、脂类 1 ~ 10 份。

2. 根据权利要求 1 所述的氧化石墨烯的油酸复合物纳米粒制剂,其特征在于所述表面活性剂选自大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、PEG 化磷脂、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、十二烷基硫酸钠、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、鲸蜡醇硫酸钠、硬脂醇硫酸钠、脂肪酸磺酸化物、烷基芳基磺酸化物、司盘、吐温、卖泽、苜泽、泊洛沙姆、壬基酚、辛基酚、辛基甲酚、平平加 O 和类似化合物的一种或其混合物。

3. 根据权利要求 1 所述的氧化石墨烯的油酸复合物纳米粒制剂,其特征在于所述纳米粒粒径分布范围在 40 ~ 1000 nm,平均粒径为 50 ~ 250 nm。

4. 一种包含氧化石墨烯油酸复合物的纳米粒的制剂,其特征在于包含,基于重量份计为氧化石墨烯 1 份、油酸 1~5 份、表面活性剂 3~10 份、脂类 2~8 份,冻干保护剂 5 ~ 100 份,其他药学上可接受辅料适量。

5. 权利要求 4 所述的制剂,其特征在于选自注射制剂、口服制剂、缓释制剂、控释制剂、粘膜吸收制剂。

6. 一种制备权利要求 1-4 所述的氧化石墨烯的油酸复合物纳米粒制剂的方法,其特征在于包括下述步骤:

取氧化石墨烯的药学上可接受的盐,先用碱性物质中和对应酸之后,再加入溶于脂溶性溶剂的油酸,漩涡一分钟,加入油酸漩涡至水层无色,形成氧化石墨烯油酸复合物;或者直接取氧化石墨烯与油酸溶于脂溶性溶剂中,在温度约 30℃~约 50℃下搅拌反应 1 ~ 2 小时,形成氧化石墨烯油酸复合物;

减压浓缩除去脂溶性溶剂;

用适当的水不溶性有机溶剂溶解上述的药理活性物质与其他辅料;

根据表面活性剂的溶解特性,在上述的水相或油相中加入适当的表面活性剂;

油相与水相混合,搅拌或超声形成混悬液;

将步骤 (5) 中所述的混悬液用制备成纳米乳剂,即得。

7. 一种制备权利要求 4-6 所述的氧化石墨烯油酸复合物纳米粒的制剂方法,其特征在于将权利要求 6 所得的产品,加入冷冻干燥赋形剂,冻干成为粉末;或进一步加入其他赋形剂制成药学上可接受的制剂。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于药学上可接受的制剂选自注射制剂、口服制剂、缓释制剂、控释制剂、粘膜吸收制剂。

9. 一种氧化石墨烯油酸复合物纳米粒的制剂在制备抗肿瘤、抗炎及辅助癌症治疗的药物中的应用。

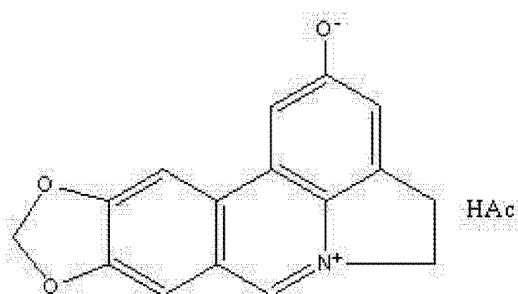
## 一种提高生物利用度的氧化石蒜碱组合物及其制剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种提高氧化石蒜碱生物利用度的油酸复合物的纳米粒制剂及其制备方法,涉及医药技术领域。

### 背景技术

[0002] 氧化石蒜碱又名恩其明,是由石蒜科植物 *Umgernia minor* 的叶子或 *Crinum asiaticum* 的果实中提取出的四级吡啶类生物碱。其醋酸盐(AT 1840,石蒜碱内铵盐)是一种抗癌物质,可通过石蒜碱氧化制得,化学名为:2-羟基-9,10-次甲乙氧基-4,5-二氢-吡咯并[3,2,1-de]菲啶醋酸盐。其化学结构如下:



研究表明,本品腹腔注射大、小鼠多种瘤株的疗效明显优于石蒜碱。它不仅能抑制癌细胞生长,而且还能杀死癌细胞,对胃癌、卵巢癌有较好疗效,没有骨髓抑制等毒副不良反应,可与其它化疗药物联合应用,也可与放射治疗同时应用。动物实验显示其对艾氏腹水癌、腹水肝癌、白血病 L-1210、腹水型吉田肉瘤和 Lewis 肺癌有较强抑制作用。对其构效关系的研究表明,其亚甲二氧基和内铵盐部分对其抗癌活性来说是必要的。其作用机制是选择性地抑制拓扑异构酶 II  $\beta$  从而抑制人类肿瘤细胞的增殖。

[0003] 氧化石蒜碱具有显著的抗肿瘤活性使其具有重要的研究价值,1983 年,抗肿瘤新药氧化石蒜碱曾通过临床鉴定,用于多种肿瘤的治疗而毒副作用较低。但此水溶液制剂生物利用度极低,体内半衰期只有 30 秒,影响了氧化石蒜碱本身的药效,需要大剂量多次给药。而且由于药物脂溶性太差,不适用于大部分现有载体,这也限制了它在临床中的使用。

[0004] 综上所述,可以看出目前还没有生物利用度高,稳定性好,适于工业化大生产,制备方法简单,而且生产成本低的氧化石蒜碱的新制剂。开发此类新制剂将为肿瘤的临床治疗提供一个很好的选择,将会产生良好的社会和经济效益。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种克服上述缺点的生物利用度高、稳定性好、载药量包封率高、制备方法简单、疗效好、副作用少的氧化石蒜的新型制剂,供临床上使用。

[0006] 本发明的目的是提供一种氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒制剂,旨在提高氧化石蒜碱的生物利用度,适宜于工业化生产,减少给药次数,方便临床使用,增加疗效。

[0007] 实验表明如果不对氧化石蒜碱进行亲脂化处理,并不能制备出适合临床需要的、具有较高包封率、粒径均匀、贮存稳定的氧化石蒜碱的纳米粒制剂。

[0008] 本发明通过制备氧化石蒜碱油酸复合物,增加药物的脂溶性,采用适当的有机溶剂将其与磷脂及类脂等溶解作为油相,水作为水相,旋蒸除去有机溶剂后,水化混合高压均质制成纳米粒,经过冷冻干燥,将其配制成药学上可以接受的注射给药纳米粒混悬制剂。

[0009] 本发明人研究发现将氧化石蒜碱与油酸制备成油酸复合物,氧化石蒜碱的季铵基部分和油酸的羧基部分以离子对形成复合物,增强其疏水性,使其能更好地溶解在类脂成分中,能显著提高载药量。而且更为重要地,油酸和磷脂能够相互作用,更利于纳米粒的稳定,这是现有技术中预料不到的结果。

[0010] 本发明提供的纳米粒粒径在约 10-500nm,优选在 100-300nm。

[0011] 本发明提供了一种氧化石蒜碱油酸复合物的纳米粒制剂,其包含氧化石蒜碱、油酸、表面活性剂及脂类,也可以加上冻干保护剂和其他药学上可接受辅料,冷冻干燥制成粉末。

[0012] 本发明的目的之一是提供了一种氧化石蒜碱油酸复合物的纳米粒制剂,包含氧化石蒜碱与油酸形成的复合物、表面活性剂及脂类,其中氧化石蒜碱、油酸、表面活性剂的重量份为氧化石蒜碱 1 份、油酸 1~10 份,表面活性剂 1~10 份,脂类 1~10 份;优选地,氧化石蒜碱 1 份、油酸 1~5 份、表面活性剂 3~10 份、脂类 2~8 份。

[0013] 本发明所述的油酸作为氧化石蒜碱油酸复合物的成分。油酸 (oleic acid) 学名为顺-9-十八烯酸,是一种不饱和脂肪酸。

[0014] 本发明所述的氧化石蒜碱油酸复合物的纳米粒制剂制备过程中加入的适量表面活性剂,选自大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰甘油、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、十二烷基硫酸钠、Solutol HS 15、月桂酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、鲸蜡醇硫酸钠、硬脂醇硫酸钠、脂肪酸磺酸化物、烷基芳基磺酸化物、司盘、吐温、卖泽、芊泽、泊洛沙姆、壬基酚、辛基酚、辛基甲酚、平平加 O 和类似化合物的一种或其混合物;优选蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、PEG 化磷脂一种或他们的混合物。

[0015] 本发明所述的氧化石蒜碱油酸复合物的纳米粒制剂制备过程中加入的适量脂类,选自山萘酸甘油酯、单油酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、硬脂酸棕榈酸甘油酯、硬脂酸棕榈酸乙二醇酯、蓖麻油、氢化蓖麻油、胆固醇、玉米油、棉籽油、棕榈酸维生素 C 酯乙酰枸橼酸三丁酯、乙酰枸橼酸三乙酯、低芥酸菜籽油、中碳链甘油三脂、大豆油、结构脂肪酸甘油酯等等其中一种或他们的混合物。优选结构脂肪酸甘油酯。

[0016] 本发明所述的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒制剂还包括冷冻干燥时保护氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒结构、形态的冻干保护剂,其包括但不限于:葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露糖、海藻糖、甘氨酸、右旋糖酐、白蛋白中的一种或它们的混合物。优选的冻干保护剂为蔗糖。干燥后的粉末在接触水性介质时自动分散形成氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒的混悬液。

[0017] 本发明的目的之一是提供了一种包含氧化石蒜碱油酸复合物的纳米粒的制剂,包含氧化石蒜碱与油酸形成的复合物、表面活性剂、脂类、冻干保护剂和其他药学上可接受辅料,基于重量份计为氧化石蒜碱 1 份、油酸 1~10 份、表面活性剂 1~10 份、脂类 1~10 份、冻干保护剂 1~300 份,其他药学上可接受辅料适量。进一步优选地,氧化石蒜碱 1 份、油酸 1~5 份、表面活性剂 3~10 份、脂类 2~8 份,冻干保护剂 5~100 份,其他药学上可接受

辅料适量。

[0018] 本发明所述的其他辅料可为等渗调节剂、抗氧化剂、防腐剂、pH 调节剂等药剂学制备氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒的常规赋形剂。

[0019] 本发明所述的氧化石蒜碱油酸复合物的纳米粒制剂通过注射给药、口服给药、体内局部给药、黏膜吸收给药等方式给药。

[0020] 本发明的目的之一是提供了一种氧化石蒜碱油酸复合物的纳米粒制剂，所述制剂选自注射制剂、口服制剂、缓释制剂、控释制剂、粘膜吸收制剂等。

[0021] 本发明的目的之一是提供了一种氧化石蒜碱油酸复合物的纳米粒制剂在提高生物利用度中的应用。

[0022] 本发明的目的之一是提供了一种氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒制剂的制备方法，其特征包括下述步骤：

(1) 取氧化石蒜碱的药学上可接受的盐溶于水中，先用碱性物质中和对应酸之后，再与油酸混合，在室温下，优选搅拌反应 10~60 分钟，形成氧化石蒜碱油酸复合物；

(2) 冷冻干燥得到氧化石蒜碱油酸复合物；

(3) 用适当的水不溶性有机溶剂溶解上述的药理活性物质；

(4) 根据表面活性剂的溶解特性，在上述的水相或油相中加入适当的表面活性剂；

(5) 加入脂类后，搅拌均匀，减压蒸发除去有机溶剂；

(6) 与水相混合，搅拌或超声形成混悬液；

(7) 将步骤 (6) 中所述的混悬液用制备成纳米乳剂；

(8) 得到氧化石蒜碱的油酸复合物的纳米粒混悬溶液。

[0023] 其中，步骤 (1) 中的碱性物质主要是用于中和氧化石蒜碱的药学上可接受盐中的酸根，获得药物分子形式游离碱。所述碱性物质选自氢氧化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钾、碳酸钾、碳酸氢钾、三乙胺、氨水，或是两种或多种碱性物质的混合物；步骤 (1) 所述碱性物质优选碳酸氢钠，其加入量是本领域的常规选择。

[0024] 作为具体的实施方案之一，步骤 (7) 中所述的将步骤 (6) 中所述的混悬液可用高压乳匀机、高剪切混合器、超声处理器、高剪切搅拌器或类似设备制备成纳米乳剂。

[0025] 本发明所述的药理活性物质即氧化石蒜碱和油酸形成的复合物优选溶解在一种合适的有机溶剂内，所述溶剂选自氯仿、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醇、甲醇、四氢呋喃、乙腈、丙酮、脂肪烃、芳香烃、卤代烃及其混合物，以及 2 种或 2 种以上这些溶剂的混合物或类似溶剂。

[0026] 其中，步骤 (3) 所述的水不溶性有机溶剂指乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷、乙醚、正己烷、正庚烷等，优选二氯甲烷。

[0027] 其中，步骤 (5) 所述的表面活性剂优选蛋黄卵磷脂 E80 与 PEG 化磷脂的混合物。

[0028] 作为具体的实施方案之一，步骤 (8) 所得氧化石蒜碱油酸复合物的纳米粒混悬溶液，还可以加入冷冻干燥赋形剂和其他辅料，经过本领域的常规方式冻干成为粉末。

[0029] 本发明所述的其他辅料可为等渗调节剂、抗氧化剂、防腐剂、pH 调节剂等药剂学制备氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒的常规赋形剂。

[0030] 其次，有机溶剂于减压下蒸发。蒸发方法包括使用旋转蒸发器、降膜蒸发器、喷雾干燥器、冷冻干燥器和类似设备。本发明优选旋转蒸发器。

[0031] 最后,本发明所述的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒是在高压和高剪切力条件下经均化作用形成的。这种均化作用通常在高压乳匀机内进行,典型的操作压力在 3,000 至 30,000Psi 的范围内,本发明优选的压力在 5,000 至 15,000Psi 的范围内更好。可接受的均化方法包括可赋予高剪切和空化作用,如高压乳匀机、高剪切混合器、超声处理器、高剪切搅拌器和类似设备。

[0032] 本发明通过制备氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒药剂,并通过相应的体内试验证明所制备的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒提高了氧化石蒜碱的生物利用度,延长体内循环时间。

[0033] 下面再以实施例对本发明加以进一步的说明,同时也结合实施例中附图加以说明,但绝不是对本发明的范围限制。

#### 附图说明

[0034] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

图 1 为氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒的粒径分布图

图 2 为氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒的大鼠血药浓度测定结果。

#### 具体实施方式

[0035] 以下实施例是对本发明的进一步说明,但绝不是对本发明范围的限制。下面参照实施例进一步详细阐述本发明,但是本领域技术人员应当理解,本发明并不限于这些实施例以及使用的制备方法。而且,本领域技术人员根据本发明的描述可以对本发明进行等同替换、组合、改良或修饰,但这些都包括在本发明的范围内。

##### [0036] 实施例 1

取氧化石蒜碱醋酸盐 10mg,溶解于醋酸水溶液中,加入 50mg/ml 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液 100ul,漩涡一分钟,加入油酸 40ul,漩涡至水层无色,7000r/min 离心 5min,取复合物沉淀。加入蛋黄卵磷脂 E80 100mg,加入结构脂肪酸甘油酯 30mg,用二氯甲烷 10ml 将其溶解,旋转蒸发除去有机溶剂,加水水化、探头超声 10 次制成混悬液,然后将混悬液在高压乳匀器内乳匀 15 次,加入冻干保护剂蔗糖配制成含 10% 的蔗糖的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒水溶液,在无菌条件下冷冻干燥,即可。

[0037] 得到的冻干粉末用注射用水重制形成的胶体溶液,平均粒径为 170nm,多分散系数(PDI)为 0.155。氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒的平均粒径分布图见附图 1 所示。

##### [0038] 实施例 2

取氧化石蒜碱醋酸盐 10mg,溶解于醋酸水溶液中,加入 50mg/ml 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液 100ul,漩涡一分钟,加入油酸 40ul,漩涡至水层无色,7000r/min 离心 5min,取复合物沉淀。加入蛋黄卵磷脂 E80 与 PEG 化磷脂共 80mg,用二氯甲烷 10ml 将其溶解,旋转蒸发除去有机溶剂,加适量水进行水化后,探头超声 10 次制成混悬液,然后将混悬液在高压乳匀器内乳匀 15 次,将其旋蒸以除去溶剂,加入冻干保护剂蔗糖配制成含 10% 的蔗糖的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒水溶液,在无菌条件下冷冻干燥,即可。

[0039] 得到的冻干粉末用注射用水重制形成的胶体溶液,平均粒径为 236nm, PDI 为 0.192。

**[0040] 实施例 3**

取氧化石蒜碱醋酸盐 10mg, 溶解于适量的醋酸水溶液中, 加入 50mg/ml 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液 100 $\mu\text{l}$ , 漩涡一分钟, 加入油酸 30mg, 漩涡至水层无色, 7000r/min 离心 5min, 取复合物沉淀。加入注射用大豆磷脂 60mg, 大豆油 30  $\mu\text{l}$ , 用二氯甲烷 10ml 将其溶解, 搅拌反应 0.5~2 小时, 将其旋蒸以除去溶剂, 用注射用水水化后, 探头超声 10 次制成混悬液, 然后将混悬液在高压乳匀器内乳匀 15 次, 加入冻干保护剂葡萄糖配制成含 10% 葡萄糖的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒水溶液, 在无菌条件下冷冻干燥, 即可。

[0041] 得到的冻干粉末用注射用水重制形成的胶体溶液, 平均粒径为 198nm, PDI 为 0.194。

**[0042] 实施例 4**

在 100ml 水中加入 40mg 十二烷基硫酸钠配制成水溶液。

[0043] 取氧化石蒜碱醋酸盐 10mg, 溶解于醋酸水溶液中, 加入 50mg/ml 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液 100 $\mu\text{l}$ , 漩涡一分钟, 加入油酸 40 $\mu\text{l}$ , 漩涡至水层无色, 7000r/min 离心 5min, 取复合物沉淀。加入注射用大豆磷脂 60mg, 大豆油 30  $\mu\text{l}$ , 用二氯甲烷 10ml 将其溶解, 搅拌反应 0.5~2 小时, 将其旋蒸以除去溶剂, 加入上述十二烷基硫酸钠水溶液水化, 探头超声 10 次制成混悬液, 然后将混悬液在高压乳匀器内乳匀 15 次, 加入冻干保护剂麦芽糖配制成含 10% 麦芽糖的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒水溶液, 冷冻干燥, 即可。

[0044] 得到的冻干粉末用注射用水重制形成的胶体溶液, 平均粒径为 178nm, PDI 为 0.195。

**[0045] 实施例 5**

在 10ml 注射用水中加入 F68 10mg 溶解得到 F68 水溶液。

[0046] 取氧化石蒜碱醋酸盐 10mg, 溶解于醋酸水溶液中, 加入 50mg/ml 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液 100 $\mu\text{l}$ , 漩涡一分钟, 加入油酸 40 $\mu\text{l}$ , 漩涡至水层无色, 7000r/min 离心 5min, 取复合物沉淀。加入注射用大豆磷脂 60mg, 大豆油 30  $\mu\text{l}$ , 用二氯甲烷 10ml 将其溶解, 搅拌反应 0.5~2 小时, 将其旋蒸以除去溶剂, 加入上述 F68 水溶液水化, 探头超声 10 次制成混悬液, 然后将混悬液在高压乳匀器内乳匀 15 次, 加入冻干保护剂配制成含 5% 葡萄糖和 5% 甘露糖的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒水溶液, 在无菌条件下冷冻干燥, 即可。

[0047] 得到的冻干粉末用注射用水重制形成的胶体溶液, 平均粒径为 177nm, PDI 为 0.170。

**[0048] 实施例 6**

取氧化石蒜碱醋酸盐 10mg, 溶解于醋酸水溶液中, 加入 50mg/ml 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液 100 $\mu\text{l}$ , 漩涡一分钟, 加入油酸 40 $\mu\text{l}$ , 漩涡至水层无色, 7000r/min 离心 5min, 取复合物沉淀。加入注射用大豆磷脂与 PEG 化磷脂共 100mg, 用二氯甲烷 10ml 将其溶解, 搅拌反应 0.5~2 小时, 将其旋蒸以除去溶剂, 加入注射用水水化, 探头超声 10 次制成混悬液, 然后将混悬液在高压乳匀器内乳匀 15 次, 将其旋蒸以除去溶剂, 加入冻干保护剂配制成含 10% 的蔗糖的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒水溶液, 在无菌条件下冷冻并冻干 48 小时。

[0049] 得到的冻干粉末用注射用水重制形成的溶液, 平均粒径为 166nm, PDI 为 0.196。

**[0050] 实施例 7**

将 50mg Solutol HS 15 加入 10ml 注射用水中溶解制成 Solutol HS 15 水溶液。

[0051] 取氧化石蒜碱醋酸盐 10mg, 溶解于醋酸水溶液中, 加入 50mg/ml 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液 100 $\mu\text{l}$ , 漩涡一分钟, 加入油酸 40 $\mu\text{l}$ , 漩涡至水层无色, 7000r/min 离心 5min, 取复合物沉淀。加入蛋黄卵磷脂 E80 与 PEG 化磷脂共 60mg, 用二氯甲烷 10ml 将其溶解, 搅拌反应 0.5~2 小时, 将其旋蒸以除去溶剂, 加入上述 Solutol HS 15 溶液水化, 探头超声 10 次制成混悬液, 然后将混悬液在高压乳匀器内乳匀 15 次, 加入冻干保护剂配制成含 10% 的蔗糖的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒水溶液, 在无菌条件下冷冻干燥, 即可。

[0052] 得到的冻干粉末用注射用水重制形成的胶体溶液, 平均粒径为 170nm, PDI 为 0.166。

#### [0053] 实施例 8

在 10ml 水中加入吐温 80 20mg 制得吐温 80 水溶液。

[0054] 取氧化石蒜碱醋酸盐 10mg, 溶解于醋酸水溶液中, 加入 50mg/ml 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液 100 $\mu\text{l}$ , 漩涡一分钟, 加入油酸 40 $\mu\text{l}$ , 漩涡至水层无色, 7000r/min 离心 5min, 取复合物沉淀。加入蛋黄卵磷脂 E80 40mg, 用二氯甲烷 10ml 将其溶解, 搅拌反应 0.5~2 小时, 将其旋蒸以除去溶剂, 加入上述吐温 80 水溶液水化, 探头超声 10 次制成混悬液, 然后将混悬液在高压乳匀器内乳匀 15 次, 加入冻干保护剂配制成含 10% 的蔗糖的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒水溶液, 在无菌条件下冷冻干燥, 即可。

[0055] 得到的冻干粉末用注射用水重制形成的胶体溶液, 平均粒径为 184nm, PDI 为 0.196。

#### [0056] 实施例 9

取氧化石蒜碱醋酸盐 10mg, 溶解于醋酸水溶液中, 加入 50mg/ml 的  $\text{NaHCO}_3$  溶液 100 $\mu\text{l}$ , 漩涡一分钟, 加入油酸 40 $\mu\text{l}$ , 漩涡至水层无色, 7000r/min 离心 5min, 取复合物沉淀。加入蛋黄卵磷脂 E80 80mg, 加入注射用中碳链甘油三脂 40mg, 用二氯甲烷 10ml 将其溶解, 搅拌反应 0.5~2 小时, 将其旋蒸以除去溶剂, 加入上述吐温 80 水溶液水化, 探头超声 10 次制成混悬液, 然后将混悬液在高压乳匀器内乳匀 15 次, 加入冻干保护剂配制成含 10% 的蔗糖的氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒水溶液, 在无菌条件下冷冻并冻干 48 小时, 即可。

[0057] 得到的冻干粉末用注射用水重制形成的溶液, 平均粒径为 194nm, PDI 为 0.183。

#### [0058] 实施例 10 不同处方的制剂工艺的可行性对比

实施例 1 是加入了油酸、脂类、表面活性剂; 对比例 1 是考察不加油酸的影响; 对比例 2 是考察不加表面活性剂的影响。

成分	实施例 1	对比例 1	对比例 2
氧化石蒜碱醋酸盐	10mg	10mg	10mg
油酸	40 $\mu\text{l}$	/	40 $\mu\text{l}$
结构脂肪酸甘油酯	30mg	30mg	30mg
蛋黄卵磷脂 E80	100mg	100mg	/
包封率	>80%	<20%	<20%
粒径	170nm	1087nm	4765nm
PDI	0.155	0.366	0.474

[0059] 对比例 1 和对比例 2 采用实施例 1 的工艺完成。

[0060] 从上表可看出, 实施例 1 有较好的包封率、粒径和 PDI; 对比例 1 有较小的包封率、较大的粒径和 PDI; 对比例 2 有较小的包封率、较大的粒径和 PDI, 且观察到肉眼可见的大颗



粒,已不适于注射使用。可见油酸、表面活性剂、脂类三者的组合才能得到粒径较小、分布均匀、包封率高的纳米粒。

#### [0061] 药动学试验例

本实验考察了氧化石蒜碱醋酸盐蔗糖水溶液,氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒及氧化石蒜碱油酸复合物 PEG 化磷脂纳米粒及对照例在大鼠体内的生物利用度。

#### [0062] 1. 材料与动物:

氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒(实施例 1),氧化石蒜碱油酸复合物 PEG 化磷脂纳米粒(实施例 2)、对比例 1、对比例 2

对比例 1:氧化石蒜碱醋酸盐蔗糖水溶液。

[0063] 制备方法:精密称取 10mg 氧化石蒜碱醋酸盐,用 10% 的蔗糖溶液溶解并定容至 5ml,即得。

[0064] 对比例 2:氧化石蒜碱脂质纳米粒。

[0065] 制备方法:取氧化石蒜碱醋酸盐 10mg,加入蛋黄卵磷脂 E80 80mg,加入注射用结构甘油三酯 40mg,用二氯甲烷 10ml 将其溶解,将其旋蒸以除去溶剂,加入注射用水水化,探头超声 10 次制成混悬液,然后将混悬液在高压乳匀器内乳匀 15 次,过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜取续滤液,加入冻干保护剂配制含 10% 的蔗糖的氧化石蒜碱纳米粒水溶液,在无菌条件下冷冻并冻干 48 小时,即可。

[0066] 氧化石蒜碱:从四川宏升植物有限公司购买,纯度 > 96% (HPLC)

雄性 Wistar 大鼠 20 只(体重 150-250g)

#### 2. 方法:

给药方案:取 Wistar 大鼠 20 只,随机分为四组,禁食 12h 后四组分别尾静脉注射给予氧化石蒜碱蔗糖水溶液,氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒,氧化石蒜碱油酸复合物 PEG 化磷脂纳米粒及氧化石蒜碱脂质纳米粒。给药剂量均相当于氧化石蒜碱醋酸盐 10mg/kg。样品采集:于各药给药后 0.5、3、6、15、30、60、120、240、360、480、600min 由尾静脉取血 0.3ml,置于经肝素处理的离心管中,离心分离血浆,于 -20℃ 冰箱中保存直至分析。血浆样品处理:取出 100  $\mu\text{l}$  血浆样品加入干净离心管中,后依次加入 20  $\mu\text{l}$  20% 三氯乙酸水溶液,旋涡混匀 5min 后,13500rpm/min 离心 10min,再加入 280  $\mu\text{l}$  1% 醋酸水溶液,旋涡混匀 5min 后,13500rpm/min 离心 10min,取上清液 20  $\mu\text{l}$  进样检测。

[0067] 色谱条件:色谱柱:Kromasil C18 (150  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:1% 三乙胺(冰醋酸调节 pH3.6)10mmol/L 醋酸铵水溶液-甲醇(74:26);流速:1.0 ml/min;柱温:35 °C;紫外检测波长:260nm;进样量:20  $\mu\text{l}$ 。

[0068] 方法建立:以氧化石蒜碱醋酸盐考察线性关系,氧化石蒜碱醋酸盐线性范围:0.4645~92.91  $\mu\text{g/ml}$  ( $r=0.9999$ )。专属性考察表明血浆中内源性物质并不干扰测定结果,峰型对称性良好。该方法氧化石蒜碱醋酸盐高、中、低三种浓度的回收率分别为 94.10  $\pm$  5.21 %、93.26  $\pm$  3.37 %、和 99.46  $\pm$  6.99 %。日内 RSD 分别为 3.93%、8.77% 和 8.94% ( $n=3$ ),日间 RSD 分别为 3.28 %、1.37% 和 7.61 % ( $n=3$ )。

#### [0069] 3. 结果

(1) 血药浓度(mean  $\pm$  SD,  $n=5$ ) 测定结果如图 2 所示。

[0070] 结论:

结果表明,氧化石蒜碱水溶液尾静脉注射进入体内约半小时即在血浆中检测不到 ;氧化石蒜碱纳米粒溶液与原药相比在体内循环时间上略有延长但总体趋势比较相似,一小时后已检测不到 ;氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒相比前两种明显延长的体内循环时间,达到了4小时左右 ;氧化石蒜碱油酸复合物 PEG 化磷脂纳米粒,相比氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒进一步的延长了体内循环时间使其延长到了 10 小时左右。体内循环时间的结果可以表示为 :氧化石蒜碱油酸复合物 PEG 化磷脂纳米粒 > 氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒 > 氧化石蒜碱纳米粒 > 氧化石蒜碱醋酸水溶液。

[0071] (2) 药动力学参数计算 :

血药浓度 - 时间数据采用 DAS 软件经计算机拟合得到 AUC 及相关参数,主要药代动力学参数见表 1 :

表 1 药代动力学参数

参数	T <sub>1/2α</sub> (min)	AUC (mg/L*min)	MRT (min)	C <sub>max</sub> (mg/L)	Cl <sub>z</sub> (L/min/kg)
实施例 1	2.282	863.532	32.210	56.354	0.012
实施例 2	4.603	2789.976	106.447	50.505	0.004
实施例 1	0.538	101.435	3.356	35.965	0.099
实施例 2	0.603	116.085	3.772	39.685	0.088

将氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒及氧化石蒜碱油酸复合物 PEG 化磷脂纳米粒与氧化石蒜碱醋酸水溶液的主要药代动力学参数进行 t 检验( $p<0.05$ ),结果显示 AUC (mg/L\*min)、C<sub>max</sub> (mg/L) 均存在显著性差异,而氧化石蒜碱纳米粒与氧化石蒜碱醋酸水溶液相比则没有显著差异。与氧化石蒜碱醋酸水溶液相比,氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒及氧化石蒜碱油酸复合物 PEG 化磷脂纳米粒给药后,可以延长在体内的滞留时间,减缓清除速度,尤其是氧化石蒜碱油酸复合物 PEG 化磷脂纳米粒具有更大的药时曲线下面积(约为原药的 27.5 倍),更小的清除率和更长的滞留时间。

[0072] 以上结果表明氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒及氧化石蒜碱油酸复合物 PEG 化磷脂纳米粒均能够明显提高氧化石蒜碱的生物利用度。氧化石蒜碱油酸复合物 PEG 化磷脂纳米粒比氧化石蒜碱油酸复合物纳米粒的提高效果好。这也许与 PEG 化磷脂具有亲水的 PEG 长链能够减慢在体内被吞噬细胞吞噬从而延长在体内的循环时间有关。而氧化石蒜碱纳米粒的对比例结果也说明只有将氧化石蒜碱制备成油酸复合物才能够有效的将药物包封在纳米粒中以达到提高生物利用度并且延长体内循环时间的效果。

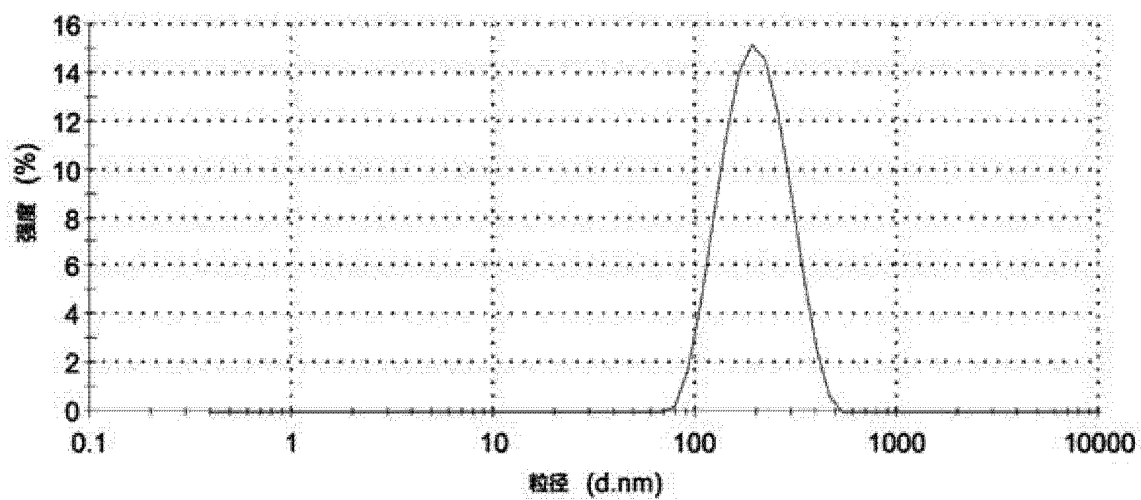


图 1

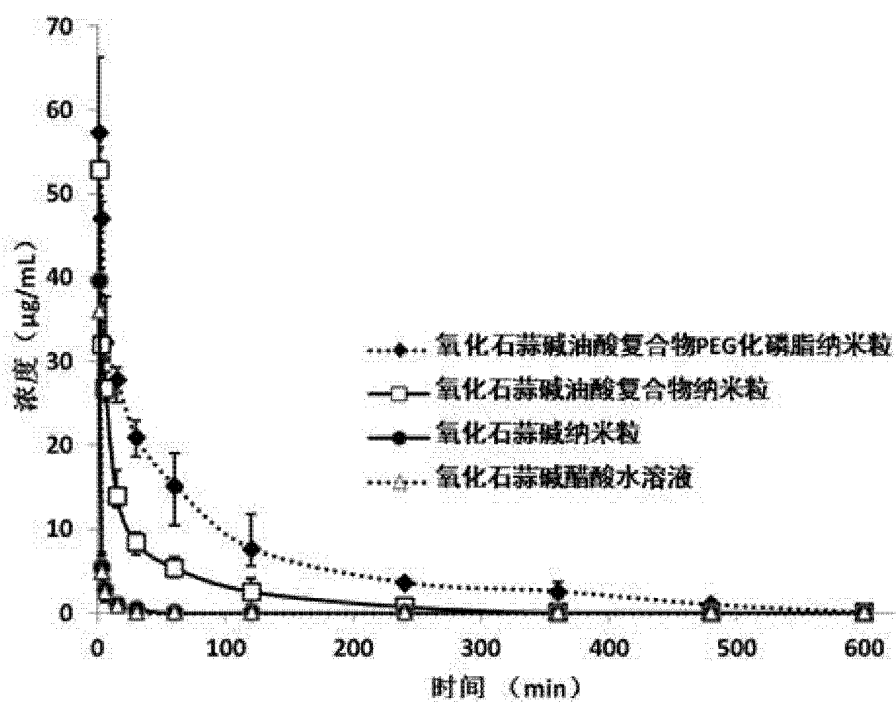


图 2