

# 纳米多孔花形乳糖装载姜黄素干粉吸入剂的制备及体外释药性能研究<sup>△</sup>

李楠<sup>1\*</sup>, 李旭<sup>1</sup>, 程鹏<sup>1</sup>, 孔令钰<sup>1</sup>, 冯仁慈<sup>1</sup>, 谭沁文<sup>2#</sup>(1.天津市医药科学研究所, 天津 300020; 2.中南大学湘雅药学院, 长沙 410013)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)07-0794-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.07.05

**摘要** 目的:制备一种新型的纳米多孔花形乳糖(FL)装载姜黄素(Cur)干粉吸入剂(DPI),为难溶性药物治疗慢性阻塞性肺疾病提供一种安全、高效的肺内递药方式。方法:采用溶液吸附法制备FL微粒装载Cur(Cur-FL)复合粉末。以载药量和吸附率为指标,通过单因素试验优选Cur投药浓度、Cur与FL的投药比例(*m/m*)和吸附时间,以确定Cur-FL复合粉末的最佳制备工艺。采用傅里叶变换红外光谱、扫描电子显微镜、差示扫描量热法等技术对以最优工艺制备的Cur-FL复合粉末的理化性质进行表征;测定其含水量并考察其空气动力学性质;通过体外模拟人工肺液环境,探讨其体外释药行为。结果:Cur-FL复合粉末的最佳制备工艺为Cur投药浓度5 mg/mL、Cur与FL的投药比例1:4、吸附时间1 h。所得复合粉末的载药量为(23.37±0.43)%、包封率为(91.64±0.44)%、吸附率为(30.50±0.72)%。Cur-FL微粒呈花形外观;Cur被物理吸附在FL微粒孔隙内,未发生化学变化。Cur-FL复合粉末的松密度为(0.21±0.02) g/cm<sup>3</sup>、振实密度为(0.33±0.01) g/cm<sup>3</sup>、休止角为(24.07±0.31)°、平均粒径为(3.96±0.80) μm、空气动力学粒径为(3.33±0.99) μm、含水量为(5.63±0.24)%、排空率为(92.53±0.87)%、体外有效部位沉积率为(45.93±1.77)%;其在人工肺液中的24 h溶解度[(358.93±1.67) μg/mL]为Cur的3.28倍、48 h累积体外释放率(90.21%)为Cur的1.63倍,而Cur+FL物理混合物不能提高Cur在人工肺液中的溶解度和释放度。结论:所制Cur-FL复合粉末的体外释药性能较好,且其粉体学性质、溶解性、水分、流动性及空气动力学性能等均符合《中国药典》对DPI的要求。

**关键词** 姜黄素;花形乳糖;干粉吸入剂;制备;体外释药

## Preparation and *in vitro* Release Property Study of Curcumin Dry Powder Inhalation Loaded by Nanoporous Flower-shaped Lactose

LI Nan<sup>1</sup>, LI Xu<sup>1</sup>, CHENG Peng<sup>1</sup>, KONG Lingyu<sup>1</sup>, FENG Renrui<sup>1</sup>, TAN Songwen<sup>2</sup> (1.Tianjin Institute of Pharmaceutical Science, Tianjin 300020, China; 2. Xiangya School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare a novel Curcumin (Cur) dry powder inhalation (DPI) loaded by nanoporous flower-shaped lactose (FL), and to provide a safe and effective intrapulmonary drug delivery method for the therapy of chronic obstructive pulmonary disease with insoluble drugs. METHODS: FL-loaded Cur (Cur-FL) compound powder was prepared by solution adsorption method. Using drug-loading amount and adsorption rate as indicators, single-factor experiment was used to optimize Cur concentration, Cur-FL ratio (*m/m*) and adsorption time so as to determine the optimal preparation technology for Cur-FL compound powder. Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscope and differential scanning calorimetry were used to characterize the physical and chemical properties of Cur-FL compound powder prepared with optimal technology. The water content and aerodynamic properties were determined; *in vitro* drug release behavior was investigated by simulating the environment of artificial lung fluid. RESULTS: The optimal preparation technology of Cur-FL compound powder was Cur concentration of 5 mg/mL, Cur-FL ratio of 1:4, adsorption time of 1 h. The drug-loading amount of compound powder was (23.37±0.43)%, the encapsulation rate was (91.64±0.44)%, and the adsorption rate was (30.50±0.72)%. Cur-FL particles were flower shaped; Cur was physically adsorbed in the pores of FL without chemical changes. The bulk density of Cur-FL compound was (0.21±0.02) g/cm<sup>3</sup>, tap density was (0.33±0.01) g/cm<sup>3</sup>, angle of repose was (24.07±0.31)°, average particle size was (3.96±0.80) μm, aerodynamic particle size was (3.33±0.99) μm, water content was (5.63±0.24)%, emptying rate was (92.53±0.87)%, and deposition rate of effective parts *in vitro* was (45.93±1.77)%. Its 24 h solubility in artificial lung fluid [(358.93±1.67) μg/mL] were 3.28 times of Cur, 48 h

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81903565);天津市自然科学基金资助项目(No.18JCQNJC13500);天津市卫生健康科技人才培养项目(No.KJ20079)

\* 助理研究员, 硕士。研究方向:纳米给药系统。E-mail: co-co10190286@sina.com

# 通信作者:教授, 硕士生导师。研究方向:药剂学。E-mail: songwen.tan@csu.edu.cn

cumulative release rates *in vitro* (90.21%) were 1.63 times of Cur, but Cur+FL physical mixture could not improve the solubility and release of Cur in artificial lung fluid. CONCLUSIONS: Cur-FL compound powder has good *in vitro* release property, and its powder properties, solubility, water content, fluidity and aerodynamic properties meet the requirements of DPI in *Chinese Pharmacopoeia*.

**KEYWORDS** Curcumin; Flower-shaped lactose; Dry powder inhaler; Preparation; *in vitro* drug release

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以持续呼吸道症状和气流受限为特征的炎症性疾病<sup>[1]</sup>。据2018年的文献报道,我国COPD患者约9 990万,40岁以上的患病率为13.4%<sup>[2]</sup>,其病死率仅次于恶性肿瘤和脑血管疾病<sup>[3]</sup>。部分COPD患者常反复发作,肺功能降低,严重影响了其生活质量,加重了其经济负担<sup>[4]</sup>。目前,临床COPD常用的对症治疗药物包括抗菌药物、糖皮质激素药物和支气管扩张药等,但长期使用上述药物的不良反应较多,限制了其临床应用<sup>[5]</sup>。

姜黄素(Curcumin,以下简称“Cur”)是从姜黄属植物姜黄 *Curcuma longa* L.中提取得到的一种多酚类活性物质,其能通过抗炎发挥对COPD的治疗作用<sup>[4,6-7]</sup>。有研究发现,Cur可有效减轻COPD模型小鼠气道炎症和气道重塑<sup>[8]</sup>。但Cur生物利用度极低(<1%)且难溶于水(溶解度为0.6 μg/mL),而其中性和碱性环境中易被水解,在体内容易被代谢,血药浓度很低,很难在病灶部位维持有效的治疗浓度<sup>[9]</sup>。小分子药物的吸入给药可将药物直接输送到治疗部位,提高治疗部位的药物浓度,降低系统浓度,避开药物的首过效应<sup>[10]</sup>。因此,改变治疗药物的给药途径,直接进行靶器官给药是COPD等呼吸系统疾病治疗的首选途径。

本课题组前期研制了一种新型干粉吸入剂(DPI)载体——含纳米孔结构的花形乳糖(Flower-shaped lactose,以下简称“FL”)微粒(所用材料是美国FDA唯一批准用于DPI的安全载体纯乳糖)。FL微粒处于 $\alpha/\beta$ 复合结晶态,具有花形外观,均一度高,内部有明显的多孔结构,表面积非常大;其细粉粒径可达2~4 μm,粗粉尺寸可调。吸附药物后,FL微粒可有效提高药物的溶出速度与溶出率,较现有的DPI载体具有更好的药物递释能力<sup>[11-13]</sup>。在本研究中,本课题组拟以Cur为原料药、FL微粒为载体制备一种新型的FL装载Cur(Cur-FL) DPI,用于肺部吸入给药,以期对COPD的治疗提供一种安全、高效的肺内递药方式。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

LC-20A型高效液相色谱(HPLC)仪、Irraffinity-1S型红外光谱仪、SPD-M20A型紫外检测器均购自日本Shimadzu公司;AB135型十万分之一电子天平、AL204型万分之一电子分析天平均购自瑞士Mettler Toledo公司;Büchi-290型喷雾干燥器购自瑞士Büchi公司;S-3400N型扫描电子显微镜购自日本Hitachi公司;HELOS-OA-SIS型激光粒度仪购自德国Sympatec公司;214型差示

扫描量热仪购自德国Netzsch公司;Sorvall Legend 17R型微量离心机购自美国Thermo Fisher Scientific公司;KQ-250B型超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司;ZNCL-T型智能磁力搅拌器购自上海科兴仪器有限公司;PHS-3C型pH计购自上海虹益仪器仪表有限公司;Aerolizer®吸入装置购自澳大利亚Novartis Pharmaceutical公司。

### 1.2 主要药品与试剂

Cur原料药(批号TZSW200317-1,纯度99.0%)购自西安通泽生物科技有限公司;Cur对照品(批号110823-201004,纯度99.0%)购自中国食品药品检定研究院;乳糖(批号2008004,纯度99.0%)购自江苏道宁药业有限公司;硼酸(批号20180523)购自天津市化学试剂批发公司;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为娃哈哈纯净水。

## 2 方法与结果

### 2.1 Cur含量的测定

采用HPLC法测定Cur的含量。

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱为Agilent C<sub>18</sub>(150 mm×4.6 μm, 5 mm);流动相为乙腈-5%冰乙酸水溶液(55:45, V/V);检测器为紫外检测器,检测波长为426 nm;流速为1.0 mL/min;柱温为35℃;进样量为10 μL。

#### 2.1.2 溶液的制备

(1)Cur对照品溶液:精密称取Cur对照品50 mg,置于10 mL棕色量瓶中,用无水乙醇溶解并定容,得质量浓度为5 mg/mL的Cur对照品贮备液。取上述贮备液0.5 mL,置于50 mL棕色量瓶中,用无水乙醇稀释并定容,即得质量浓度为50 μg/mL的Cur对照品溶液。(2)Cur-FL供试品溶液:称取“2.5”项下最优工艺制备的Cur-FL复合粉末适量(约含Cur 5 mg),置于100 mL棕色量瓶中,加无水乙醇适量,超声(频率40 kHz,功率250 W)处理20 min使其充分溶解,然后以无水乙醇定容,摇匀,过0.45 μm滤膜,收集滤液,即得。(3)阴性对照溶液:取“2.2”项下FL微粒适量,置于10 mL量瓶中,同供试品溶液制备方法处理,即得。

#### 2.1.3 方法学考察

按照2015年版《中国药典》(四部)通则9101药品质量标准分析方法验证指导原则相关操作进行方法学考察<sup>[14]</sup>。专属性试验结果显示,溶剂及辅料对Cur的测定无干扰,方法的专属性较好,色谱图见图1;以系列Cur对照品溶液中Cur质量浓度( $X$ , mg/mL)为横坐标、峰面

积( $Y$ )为纵坐标绘制标准曲线,得线性回归方程为 $Y=110\ 745X-53\ 235(r=0.999\ 8)$ ,Cur检测质量浓度的线性范围为 $0.013\sim 6.39\ \text{mg/mL}$ ;精密度试验中,Cur峰面积的RSD为 $0.87\%$ ( $n=6$ );稳定性(24 h)试验中,Cur峰面积的RSD为 $0.93\%$ ( $n=6$ );重复性试验中,Cur含量的RSD为 $1.43\%$ ( $n=6$ );取Cur-FL供试品溶液9份,置于不同10 mL棕色量瓶中,分别精密加入“2.1.2(1)”项下Cur对照品贮备液 $0.05、0.5、2.5\ \text{mL}$ ,每个浓度各3份,用无水乙醇定容,即得低、中、高质量浓度样品溶液,其平均加样回收率分别为 $98.06\%、98.67\%、98.15\%$ ,RSD分别为 $1.09\%、0.61\%、1.21\%$ ( $n=3$ )。方法学考察结果均符合相关要求<sup>[14]</sup>。

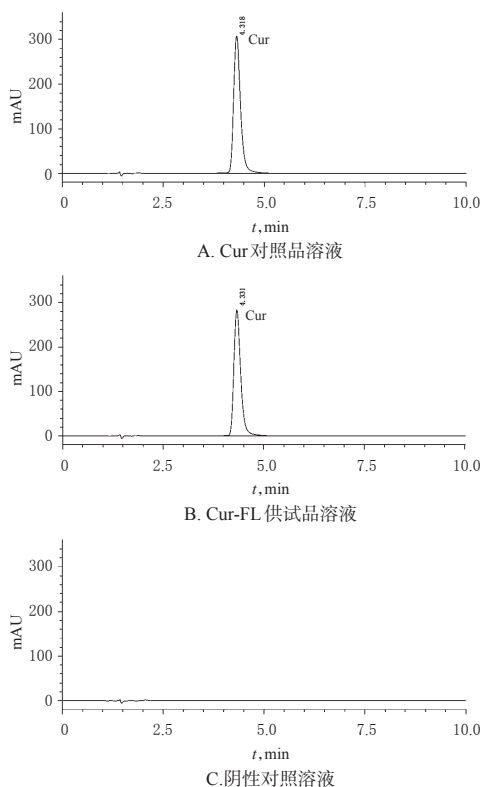


图1 Cur-FL测定的高效液相色谱图  
Fig 1 HPLC chromatograms of Cur-FL

## 2.2 FL微粒的制备

采用本课题组前期筛选的工艺制备FL微粒<sup>[12-13]</sup>。称取水100 g,分别加入乳糖10 g和硼酸1 g,溶解后进行喷雾干燥,再用乙醇洗涤30 min,然后以600 r/min离心1 min,去除上清液。将沉淀在50 ℃下恒温干燥至质量恒定,即得FL微粒,研磨,备用。

## 2.3 Cur-FL复合粉末的制备

采用溶液吸附法制备Cur-FL复合粉末<sup>[15]</sup>。将适量Cur原料药溶于无水乙醇中,制成一定质量浓度的溶液。待Cur完全溶解后,加入适量FL微粒,超声(频率40 kHz,功率250 W)处理30 min,在37 ℃下涡旋混合一定时间使其吸附,然后以12 000 r/min离心15 min,弃去上清液,沉淀挥干,即得。

## 2.4 包封率、载药量和吸附率的测定

精密称取Cur原料药适量( $m_{总}$ ),置于10 mL棕色量瓶中,按“2.3”项下制备方法进行吸附等操作,然后以12 000 r/min离心15 min。吸取上清液0.5 mL于50 mL棕色量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,摇匀,过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜,收集滤液,采用“2.1”项下HPLC法测定滤液中Cur的含量( $m_{游离}$ );将沉淀挥干,称定并记录沉淀质量( $m_{沉淀}$ )。按以下公式分别计算包封率和载药量:包封率( $\%$ )= $(m_{总}-m_{游离})/m_{总}\times 100\%$ ;载药量( $\%$ )= $(m_{总}-m_{游离})/m_{沉淀}$ <sup>[16]</sup>。并根据载药量计算出FL的吸附率:吸附率( $\%$ )= $\text{载药量}/(1-\text{载药量})\times 100\%$ <sup>[16]</sup>。

## 2.5 Cur-FL复合粉末制备工艺的优选

因FL装载Cur的过程系物理吸附过程,因此笔者将载药量和吸附率作为考察指标,对Cur的投药浓度、Cur与FL的投药比例( $m/m$ ,下同)和吸附时间这3个因素进行单因素考察,以确定最佳制备工艺。

### 2.5.1 Cur投药浓度的确定

分别在8个烧杯中加入无水乙醇各10 mL和适量的Cur原料药,制备成质量浓度分别为 $0.25、0.5、0.75、1、2.5、5、7.5、10\ \text{mg/mL}$ 的Cur系列溶液,再分别按Cur与FL投药比例1:4加入FL微粒,混匀,室温下超声(频率40 kHz,功率250 W)处理30 min,然后在37 ℃下涡旋混合吸附1 h。每组试验重复3次。吸附完成后,分别以12 000 r/min离心15 min,合并3次上清液。取上清液0.5 mL,置于25 mL棕色量瓶中,用无水乙醇定容,混匀,然后采用“2.1”项下HPLC法测定溶液中Cur的含量,并按“2.4”项下方法计算载药量和吸附率。结果见图2A。

由图2A可见,刚开始时,载药量和吸附率均随着Cur投药浓度的增加而升高;当Cur投药浓度为 $5\ \text{mg/mL}$ 时,载药量 $[(23.24\pm 0.21)\%]$ 和吸附率 $[(30.27\pm 0.42)\%]$ 均达到最大值,且此时的包封率达 $(93.89\pm 1.11)\%$ ;此后,载药量和包封率均开始降低。因此,本研究将Cur的最佳投药浓度确定为 $5\ \text{mg/mL}$ 。

### 2.5.2 Cur与FL投药比例的确定

以无水乙醇为溶剂制备6份质量浓度均为 $5\ \text{mg/mL}$ 的Cur溶液,分别按Cur与FL的投药比例为1:10、1:8、1:6、1:5、1:4和1:3的量加入相应量的FL微粒,其余步骤同“2.5.1”项下。采用“2.1”项下HPLC法测定溶液中Cur的含量,并按“2.4”项下方法计算载药量和吸附率。试验重复3次,结果见图2B。

由图2B可见,刚开始时,载药量和吸附率随着FL微粒投药比例的增加而升高;当Cur与FL微粒的投药比例为1:4时,载药量 $[(23.35\pm 0.64)\%]$ 和吸附率 $[(30.46\pm 0.41)\%]$ 均达到最大值,且此时的包封率达 $(92.21\pm 0.59)\%$ ;此后,载药量与吸附率均开始下降。因此,本研究最终确定Cur与FL的投药比例为1:4。

### 2.5.3 吸附时间的确定

以无水乙醇为溶剂制备4份质量浓度均为 $5\ \text{mg/mL}$



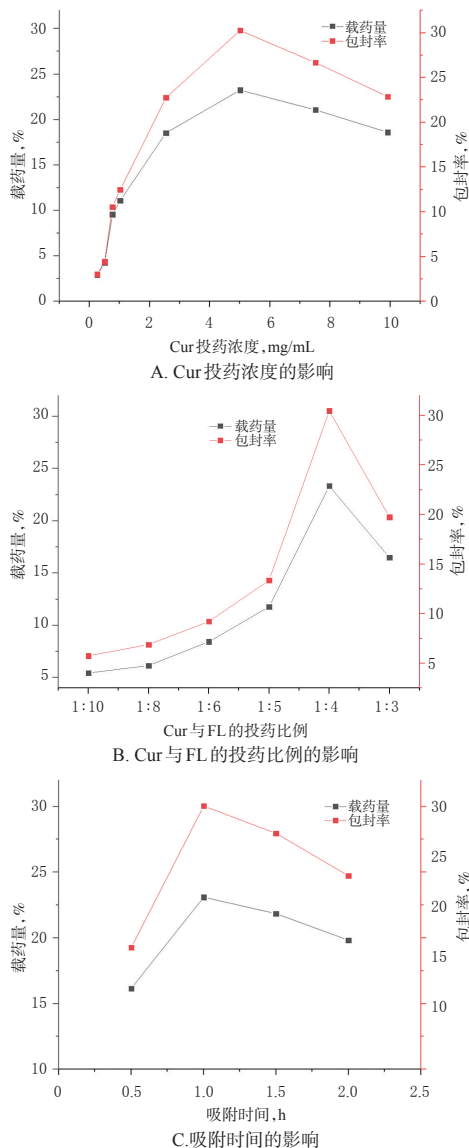


图2 不同Cur投药浓度、Cur与FL的投药比例、吸附时间对载药量和吸附率的影响

Fig 2 Effects of different concentration of Cur, Cur-FL ratio and adsorption time on drug-loading amount and adsorption rate

的Cur溶液,分别按Cur与FL投药比例1:4加入FL微粒,吸附时间分别为0.5、1、1.5、2 h,其余步骤同“2.5.1”项下。采用“2.1”项下HPLC法测定溶液中Cur的含量,并按“2.4”项下方法计算载药量和吸附率。试验重复3次,结果见图2C。

由图2C可见,当吸附1 h后,载药量 $[(23.10 \pm 0.79)\%]$ 和吸附率 $[(30.04 \pm 0.29)\%]$ 均达最大,且此时包封率达 $(91.68 \pm 0.59)\%$ ;此后,载药量和吸附率均开始下降。因此,本研究最终确定FL微粒吸附Cur原料药的最佳时间为1 h。

综上,优选出Cur-FL复合粉末的制备工艺为:精密称取Cur原料药0.050 g,溶于10 mL无水乙醇中制成质量浓度为5 mg/mL的Cur溶液;待Cur完全溶解后,加入

FL微粒0.2 g,超声(频率40 kHz,功率250 W)处理30 min,37 °C下涡旋吸附1 h,然后以12 000 r/min离心15 min,弃去上清液,沉淀挥干,研磨,即得淡黄色Cur-FL复合粉末。按“2.4”项下方法测得以最优制备工艺制得的3批Cur-FL复合粉末的载药量为 $(23.37 \pm 0.43)\%$ 、包封率为 $(91.64 \pm 0.44)\%$ 、吸附率为 $(30.50 \pm 0.72)\%$ ( $n=3$ )。

## 2.6 Cur-FL复合粉末的表征

### 2.6.1 外貌形态观察

将少量待测样品(按筛选的最优工艺条件制备,下同)涂布在双面导电胶上,并将导电胶固定于金属板上,喷金后在扫描电子显微镜下观察Cur-FL复合粉末的微粒形态。结果显示,Cur-FL复合粉末呈现花形外观。Cur-FL复合粉末的扫描电镜图见图3。

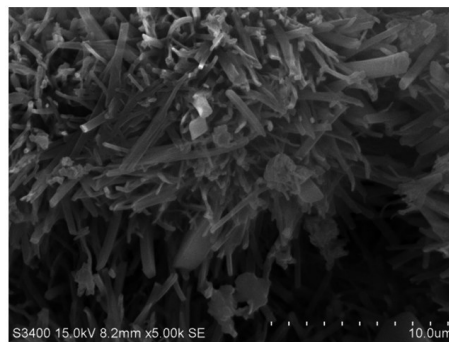


图3 Cur-FL复合粉末的扫描电镜图

Fig 3 SEM image of Cur-FL compound powder

### 2.6.2 表面化学结构检测

采用傅里叶红外光谱仪对样品的表面化学结构进行检测。分别称取样品[Cur、FL微粒、Cur-FL复合粉末和Cur+FL物理混合物(1:4, m/m)]各2 mg,分别与溴化钾300 mg一起研磨均匀、烘干、压制后,在 $4\ 000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内进行扫描,得到对应光谱图,见图4。

如图4所示,本研究所得Cur的红外图谱符合系统红外光谱库中收录的Cur红外图谱,其在 $1\ 506\text{ cm}^{-1}$ 处有1个明显的特征峰<sup>[7]</sup>;FL微粒在 $3\ 362$ 、 $1\ 036\text{ cm}^{-1}$ 处有特征峰;Cur+FL物理混合物具有Cur和FL微粒的双重特征峰,即在 $3\ 366$ 、 $1\ 510$ 、 $1\ 032\text{ cm}^{-1}$ 处各有1个特征吸收峰;而Cur-FL复合粉末则主要表现出FL微粒的特征峰,即在 $3\ 364$ 、 $1\ 032\text{ cm}^{-1}$ 处各有1个吸收峰。由于FL微粒具有花形外观且比表面积较大,因此在其花形的表面也会吸附少量的Cur,但在制备过程中笔者已弃去离心后的上清液,FL表面吸附的Cur溶于无水乙醇,而FL微粒不溶于无水乙醇,因此最后获得的Cur-FL复合粉末表面少量吸附的Cur已被排除。结合图3的扫描电镜结果,笔者推测Cur被FL微粒主要是物理吸附于多孔淀粉的内部孔隙之中,其化学结构没有变化。

### 2.6.3 热转变性质测定

采用差示扫描量热法测定样品的热转变性质。分

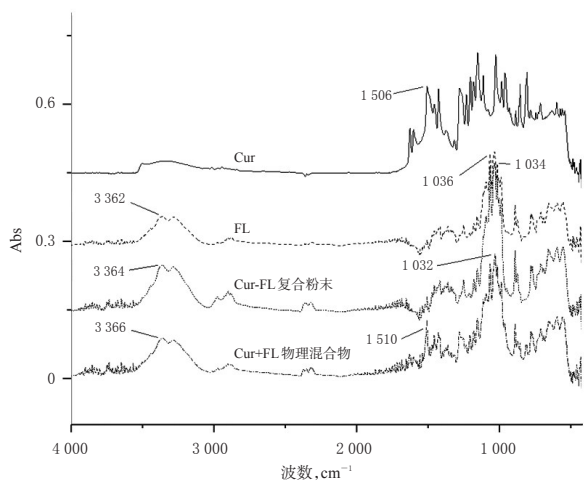


图4 Cur、FL、Cur-FL复合粉末和Cur+FL物理混合物的红外光谱特征图

Fig 4 Infrared spectrums of Cur, FL, Cur-FL compound powder and Cur+FL physical mixture

分别称取Cur原料药、FL微粒、Cur+FL物理混合物(1:4,  $m/m$ )和Cur-FL复合粉末各约3.0 mg,置于铝坩埚中,加盖密封、打孔;另取一空坩埚,加盖密封、打孔,作为参比。采用差示扫描量热仪按测试条件(氮气吹扫流量为60 mL/min,升温速率为10 °C/min,升温范围为20~350 °C)进行扫描,结果见图5。

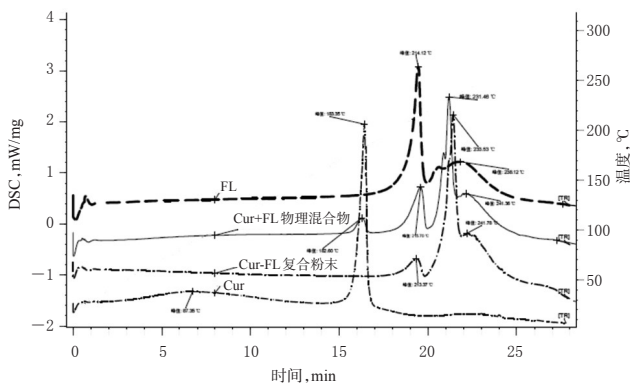


图5 Cur、FL、Cur-FL复合粉末和Cur+FL物理混合物的差示扫描量热图

Fig 5 DSC diagram of Cur, FL, Cur-FL compound powder and Cur+FL physical mixture

如图5所示, Cur在87.35、183.35 °C处具有特征吸收峰; FL微粒在215.82、232.14、241.41、295.98 °C处具有特征吸收峰; Cur+FL物理混合物既有FL微粒的特征吸收峰,也具有Cur的特征吸收峰;而Cur-FL复合粉末的特征吸收峰出现在213.37、233.53、241.78 °C处,已无Cur的特征吸收峰。以上结果提示,大部分的Cur已经被FL微粒吸附在其内部孔隙中,而少部分吸附在FL微粒表面的Cur已溶于无水乙醇上清液中被洗脱弃去。

#### 2.6.4 Cur-FL复合粉末的粉体学性质考察

(1)松密度。按文献[18]方法进行测定。将按最优工艺制得的Cur-FL复合粉末研磨后过200目筛,备用。

取一5 mL干燥量筒,精密称定其质量( $m_1$ );然后将过筛后的Cur-FL复合粉末缓慢加入量筒中,精密称定其质量( $m_2$ ),并读取量筒内粉末体积( $V$ )。按以下公式计算Cur-FL复合干粉的松密度:松密度= $(m_2 - m_1)/V$ 。试验重复3次。结果显示, Cur-FL复合干粉的松密度为 $(0.21 \pm 0.02) \text{ g/cm}^3 (n=3)$ 。

(2)振实密度。按文献[19]方法进行测定。取按最优工艺制得的Cur-FL复合粉末适量(约1 g),缓缓加入一5 mL干燥量筒中(先称定量筒质量,记为 $m_1$ ),将量筒中粉末振实200次,记录振实后粉末的质量( $m_2$ ,总质量 $-m_1$ ),并读取量筒内粉末体积( $V$ )。按以下公式计算Cur-FL复合干粉的振实密度:振实密度= $m_2/V$ 。试验重复3次。结果显示, Cur-FL复合干粉的振实密度为 $(0.33 \pm 0.01) \text{ g/cm}^3 (n=3)$ 。

(3)休止角。采用固定漏斗法<sup>[19]</sup>进行测定。将3只漏斗串联并固定于距离水平放置的纸上约1 cm的高度( $H$ )处,将样品粉末沿漏斗壁倒入最上面的漏斗中,直到纸上形成的颗粒圆锥体尖端接触到漏斗口为止,测量圆锥底部的直径( $2R$ ),并计算休止角( $H/R$ )。试验重复3次。结果显示, Cur-FL复合干粉的休止角为 $(24.07 \pm 0.31)^\circ (n=3)$ 。

#### 2.6.5 平均粒径和空气动力学粒径测定

使用激光粒度仪测定按最优工艺制备的Cur-FL复合粉末的粒径分布,试验重复3次。结果,其平均粒径为 $(3.96 \pm 0.80) \mu\text{m}$ ,中位几何粒径为 $(5.52 \pm 1.20) \mu\text{m}$ 。然后按以下公式计算其空气动力学粒径( $D_a$ ):

$$D_a = D_e \sqrt{\frac{\rho_p}{\rho_0 \chi}}$$

式中, $D_e$ 为中位几何粒径; $\rho_p$ 为有效颗粒密度,其数值为振实密度的1.26倍; $\rho_0$ 为参照密度,为 $1 \text{ g/cm}^3$ ; $\chi$ 为动态形态因子(球形时 $\chi=1$ ,本文采用1)。通常认为 $D_a$ 在1~5  $\mu\text{m}$ 的粒子可以到达肺深部<sup>[19-20]</sup>。

经计算,本研究按最优工艺制得的Cur-FL复合粉末的 $D_a$ 为 $(3.33 \pm 0.99) \mu\text{m} (n=3)$ 。结合“2.6.4”“2.6.5”项下结果,所制Cur-FL复合粉末符合微粒的吸入要求。

#### 2.6.6 溶解度测定

按文献[21]方法配制人工肺液。在装有人工肺液(5 mL)溶出介质的锥形瓶中投入过量Cur原料药(5 mg)、Cur-FL复合干粉(含Cur 5 mg)和Cur+FL物理混合物(Cur和FL的质量比为1:4,其中含Cur 5 mg),密封后置于37 °C恒温振荡器内反应24 h(转速为100 r/min),然后取样1 mL,以12 000 r/min离心10 min,取上清液,经0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,收集滤液。采用“2.1”项下HPLC法测定滤液中Cur的含量,将测得的峰面积代入标准曲线中计算出样品的质量浓度,作为样品的溶解度。试验重复3次。

结果显示,相较于Cur和Cur+FL物理混合物[溶解度分别为 $(109.34 \pm 1.52)$ 、 $(93.13 \pm 1.75) \mu\text{g/mL}$ ], Cur-FL

复合粉末在人工肺液中的溶解度最高[(358.93 ± 1.67) μg/mL]。Cur-FL 复合粉末在人工肺液中的溶解度是Cur的3.28倍;而Cur+FL物理混合物不仅没有提高Cur的溶解度,其溶解度反而低于Cur,可见将Cur与FL微粒单纯通过物理混合的方法制成DPI不能达到提高Cur溶解度的目的。该结果提示,FL微粒可将溶解于无水乙醇的Cur吸附至其内部孔隙中;相比于Cur和FL+Cur物理混合物,Cur在溶出介质中可从Cur-FL复合粉末孔隙中释放出来,显著提高了Cur的水溶性,有望更好地改善Cur在体内的吸收和释放。

## 2.7 水分测定

按2015年版《中国药典》(四部)通则“0832水分测定法”第二法烘干法测定样品中水分<sup>[14]</sup>。取Cur-FL复合粉末2g,平铺于干燥至恒质量的扁形称量瓶中(厚度不超过10mm),称定其质量( $m_1$ )。开启瓶盖,在100~105℃下干燥5h,将瓶盖盖好,移置干燥器中,放冷30min,称定其质量;重复上述干燥、冷却操作,直至质量恒定(连续2次称定的质量差异不超过5mg),将质量计为 $m_2$ 。根据减失的质量,计算样品含水量:含水量(%) =  $(m_1 - m_2) / m_1 \times 100\%$ 。试验重复3次。结果显示,Cur-FL复合粉末的含水量为(5.63 ± 0.24)% ( $n=3$ ),符合DPI稳定性要求(水分不得超过9.0%)<sup>[22]</sup>。

## 2.8 Cur-FL复合干粉的空气动力学性质考察

### 2.8.1 排空率测定

根据2010年版《中国药典》(二部)附录II项下方法测定<sup>[23]</sup>。取10粒装有Cur-FL复合粉末的4号明胶胶囊(直接将Cur-FL复合粉末填充于4号明胶胶囊中即得),精密称定其质量( $m_1$ );然后将胶囊置于Aerolizer<sup>®</sup>吸入装置内,以(60 ± 5) L/min的气流抽吸4次,每次1.5s,然后取出胶囊,称定其质量( $m_2$ );用小刷拭净胶囊内的残留内容物,再称定囊壳质量( $m_3$ )。按以下公式计算每粒胶囊的排空率:排空率(%) =  $(m_1 - m_2) / (m_1 - m_3) \times 100\%$ 。试验重复3次。结果显示,Cur-FL复合粉末的排空率为(92.53 ± 0.87)%,均高于《中国药典》规定的最低限度90%<sup>[23]</sup>,符合粉雾剂项下排空率的性能要求。

### 2.8.2 体外有效部位沉积率测定

根据2015年版《中国药典》(四部)通则0951项下方法<sup>[14]</sup>,采用装置1(双级撞击器)测定Cur-FL复合粉末的微细粒子剂量。取供试品胶囊(制备方法同“2.8.1”项下)1粒,置于Aerolizer<sup>®</sup>吸入装置内刺破,通过将适配器与模拟喉部连接,开启真空泵,以气流速度为(60 ± 5) L/min进行粉末的喷发,10s后取下吸入器,重复上述操作,共测定10粒胶囊。以人工肺液作为双级沉积瓶接收液,将收集液合并后转入50mL棕色量瓶中,用无水乙醇定容。按“2.1.1”项下色谱条件测定溶液中Cur含量,并计算沉积率(其值应不小于标示量的10%):沉积率(%) = 第2级分布瓶中Cur的药量/样品胶囊中Cur总药

量×100%。试验重复3次。结果,测得Cur-FL复合粉末的体外有效部位沉积率为(45.93 ± 1.77)%,表明其雾化性能较好,符合DPI的要求<sup>[19,21]</sup>。

## 2.9 Cur-FL复合粉末的体外释药特性考察

精密称取Cur原料药5mg、Cur+FL物理混合物25mg(Cur原料药和FL微粒的质量比1:4,含Cur5mg)和Cur-FL复合粉末25mg(含Cur5mg),各3份,分别置于100mL锥形瓶中,分别加入新鲜配制的人工肺液(含0.5%聚山梨酯80)50mL,将锥形瓶放于转速为80r/min、温度为37℃的摇床中,于0.033、0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、5、7、9、12、18、24、36、48h时分别取液1mL(同时补液1mL于释放介质中)。将取出的释放液于12000r/min离心10min,吸取上清液,备测。采用“2.1”项下HPLC法测定相应时间点( $t$ )溶液中Cur的含量,计算其质量浓度( $c_t$ ),并计算各时间点的累积释放量和累积释放率:累积释放量( $M_t$ ) =  $c_t \times 50 + \sum c_{t-1}$ ;累积释放率(%) =  $M_t / M_0$ ,式中 $M_0$ 为Cur的含量。Cur、Cur-FL复合粉末和Cur+FL物理混合物在人工肺液中的溶出曲线见图6。

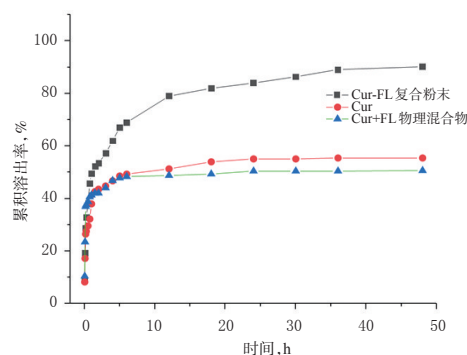


图6 Cur、Cur-FL复合粉末和Cur+FL物理混合物在人工肺液中的溶出曲线

Fig 6 Dissolution curves of Cur, Cur-FL compound powder and Cur+FL physical mixture in artificial lung fluid

在人工肺液中,Cur、Cur+FL物理混合物和Cur-FL复合粉末的1h累积释放率分别为37.99%、41.32%、49.55%;Cur-FL复合粉末的48h累积释放率达到90.21%,约为Cur和Cur+FL物理混合物的1.63、1.78倍。上述结果显示,在同等条件下,Cur-FL复合粉末在人工肺液中的释放性能最好。这提示,将Cur制备成复合物DPI用于肺部吸入给药,更适于Cur在体内的溶解、吸收和发挥药效。同时由图6可见,Cur在人工肺液中溶出释放12h即趋于稳定,其累积溶出率为55.45%;而Cur-FL复合粉末在36h时才达到平台期,这提示被FL微粒吸附于孔隙内的Cur可缓慢溶解于释放介质中,相较于Cur和Cur+FL复合粉末,Cur-FL复合粉末的释药更为平缓,具有一定的缓释效果。



### 3 讨论

COPD因肺组织增生重构、血运差,极大地影响了药物在患者体内的分布,故药物的治疗效果较差<sup>[24]</sup>。有文献指出,COPD早期的病变基础多为小气道阻塞,且COPD的气道重构亦始于小气道的重塑<sup>[25]</sup>。可见,小气道疾病(SAD)和肺实质的破坏(肺气肿)是COPD重要的发病机制,也是气流受限的主要原因,重视并及早干预小气道阻塞对COPD的治疗具有重要的现实意义<sup>[26]</sup>。精准、靶向的小气道递送给药可能是COPD治疗的关键。通常认为,药物能沉积至小气道的粒径应小于3~4 μm,而在理想情况下质量中值空气动力学直径应为2 μm<sup>[27]</sup>。因此,制备一种吸入给药后可均匀沉积在大、小气道,并具有较高肺部沉积率、可更好地改善包括小气道在内的整个气道功能、更好地控制COPD病情的吸入制剂是目前肺部吸入给药研究的重点。本研究采用FL微粒对Cur进行物理吸附,Cur-FL复合粉末在人工肺液中的24 h溶解度为Cur的3.28倍、48 h累积体外释放率为Cur的1.63倍,有效提高了Cur的溶解性和体外模拟肺内的释药能力,有望实现Cur在肺内定位靶向治疗COPD的同时减少不良反应的发生。

制备Cur-FL复合粉末的过程中,在室温下超声和恒温磁力搅拌器上搅拌吸附时均需将烧杯密封,且将转速控制在300 r/min内,以防止乙醇挥发而影响吸附效率。吸附完成后,弃去吸附体系的上清液可排除部分未被吸附至FL微粒内部孔隙、黏附于FL微粒表面的Cur。此外,由于Cur对光敏感,故在试验过程中应注意避光操作。

药物颗粒经呼吸道沉积至肺内后,首先与肺衬里液体接触,然后药物从沉积的颗粒中溶解并释放出来,参与肺内吸收转运过程。而本研究采用人工肺液模拟FL复合粉末经呼吸道肺内沉积后与肺衬里液体接触的过程。由于肺上皮表层体内衬液约20~50 mL,且厚度差异较大(0.07~15 μm),加上肺表面积大(约100 m<sup>2</sup>)<sup>[10]</sup>,因此药物颗粒吸入后若能迅速溶解并释放出药物,可显著提高药物在病灶区域的有效浓度。因FL呈αβ复合结晶态,30 s溶解试验结果显示FL极易溶于水<sup>[11]</sup>,这有利于Cur-FL复合粉末一旦沉积至肺衬液较薄的区域仍能较好地溶解FL骨架,从内部孔隙中释放出Cur。本研究体外人工肺液释药试验结果显示,相较Cur原料药,Cur-FL复合粉末具有更好的释放性能,这与上述推测一致,提示Cur-FL复合粉末适宜于肺部给药。

综上所述,本研究采用溶液吸附法制备了一种新型的纳米多孔FL微粒装载Cur的DPI。FL微粒可将Cur吸附于其内部的孔隙内,在显著提高了Cur溶解性的同时,改善了Cur的稳定性,从而增加药物在肺内的沉积。进一步对Cur-FL复合粉末的粉体学性质、溶解性、水分和流动性(休止角)及空气动力学性能进行考察后发现,上述指标均符合《中国药典》对DPI的要求。

### 参考文献

- [1] 陈亚红. 2020年GOLD慢性阻塞性肺疾病诊断、治疗及预防全球策略解读[J/OL]. [2020-10-18]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2019, 11(12): 32-50. <https://d.wanfangdata.com.cn/DOI:10.12037/YXQY.2019.12-08>.
- [2] WANG C, XU J Y, YANG L, et al. Prevalence and risk factors of chronic obstructive pulmonary disease in China (the China Pulmonary Health [CPH] study): a national cross-sectional study[J]. *Lancet*, 2018, 391(10131): 1706-1717.
- [3] ZHANG M, XIE Y Y, YAN R, et al. Curcumin ameliorates alveolar epithelial injury in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Life Sci*, 2016, 164(1): 1-8.
- [4] 黄美健, 朱成圣, 姚航平, 等. 姜黄素对慢性阻塞性肺病患者外周血内皮细胞数量及功能的影响[J]. *中国临床药学杂志*, 2015, 24(3): 147-152.
- [5] 刘娟, 王军, 邓庆华. 慢性阻塞性肺疾病炎症机制及中药单体成分对其治疗作用的研究进展[J]. *中国药房*, 2018, 29(8): 1145-1149.
- [6] 林先刚, 谭丽, 黄威, 等. 姜黄素对慢性阻塞性肺疾病大鼠辅助性T细胞17与调节性T细胞的调节作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(1): 31-35.
- [7] TZE P, MATHEW N, KENG B, et al. Curcumins-rich curry diet and pulmonary function in Asian older adults[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51753.
- [8] YUAN J, LIU R, MA Y, et al. Curcumin attenuates airway inflammation and airway remodeling by inhibiting NF-κB signaling and COX-2 in cigarette smoke-induced COPD mice[J]. *Inflammation*, 2018, 41(5): 1804-1814.
- [9] MEHTA P, BOTHIRAJA C, MAHADIK K, et al. Phyto-constituent based dry powder inhalers as biomedicine for the management of pulmonary diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 828-837.
- [10] 陆亚媛, 赵娣, 李宁, 等. 缓释型肺吸入制剂的研究进展[J]. *药学研究*, 2018, 37(8): 469-481.
- [11] TAN S W, EBRAHIMI A, LANGRISH T. Template-directed flower-like lactose with micro-meso-macroporous structure[J]. *Mater Des*, 2017, 117(5): 178-184.
- [12] 谭淞文, 谭旭. 新型干粉吸入剂载体: 含纳米孔结构的药用花形载体乳糖微粒[J]. *药学学报*, 2017, 52(9): 1466-1470.
- [13] TAN S W, JIANG T T, EBRAHIMI A, et al. Effect of spray-drying temperature on the formation of flower-like lactose for griseofulvin loading[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 111(1): 534-539.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 374-377, 103-105, 125-130.
- [15] TAN S W, EBRAHIMI A, LANGRISH T. Preparation of core-shell microspheres of lactose with flower-like morphology and tailored porosity[J]. *Powder Technol*, 2018,

# 补阳还五汤对高脂血症模型大鼠血液流变学和血小板相关生物学指标的影响<sup>Δ</sup>

凌爽\*,冯月男,刘思莹,毕悦,卞敬琦,肖洪彬<sup>#</sup>,牛雯颖<sup>#b</sup>(黑龙江中医药大学基础医学院,哈尔滨 150040)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)07-0801-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.07.06

**摘要** 目的:探讨补阳还五汤对于高脂血症模型大鼠血液流变学和血小板相关生物学指标的影响。方法:将雄性Wistar大鼠随机分为空白对照组(10只)和造模组(40只)。空白对照组大鼠给予普通饲料,造模组大鼠给予高脂饲料,分组喂养至少6周以复制高脂血症模型。将造模成功的大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组(辛伐他汀,0.004 g/kg)和补阳还五汤低、高剂量组(3.5、14.0 g/kg,以生药量计),每组10只。空白对照组和模型对照组大鼠灌胃生理盐水,各药物组大鼠灌胃相应药液,0.01 mL/g,每日1次,连续4周。末次给药30 min后,检测大鼠的血液流变学指标(全血黏度、血浆黏度)、血小板黏附作用相关指标[黏附率、血管性血友病因子(vWF)、纤维连接蛋白(FN)]、血小板释放作用相关指标[ $\beta$ -血小板球蛋白( $\beta$ -TG)、血小板第4因子(PF4)]、血小板纤溶系统相关指标[组织型纤溶酶原活化剂(t-PA)、纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI-1)]、血小板参数[血小板计数(PLT)、血小板分布宽度(PDW)、血小板平均体积(MPV)、血小板压积(PCT)、大型血小板比率(PLCR)]和凝血4项指标[活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(FIB)]。结果:与空白对照组比较,模型对照组大鼠全血黏度(低、中、高切变率)、血浆黏度、血小板黏附率以及vWF、FN、 $\beta$ -TG、PAI-1、PLT、MPV、PCT、PLCR、FIB含量或水平均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),t-PA含量显著降低( $P < 0.05$ )。与模型对照组比较,各药物组大鼠全血黏度(除补阳还五汤高剂量组高切变率全血黏度外)、血浆黏度、血小板黏附率以及vWF、FN、 $\beta$ -TG、PAI-1、PLT、PDW(除补阳还五汤低、高剂量组外)、MPV、PCT、PLCR(除补阳还五汤低剂量组外)、FIB含量或水平均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),t-PA含量(除阳性对照组外)均显著升高( $P < 0.05$ )。结论:补阳还五汤可能是通过降低血液黏度和FN含量、改善血小板黏附性、增强纤溶活性、改善血小板聚集状态、抑制凝血及血小板释放亢进等途径,来发挥对高脂血症模型大鼠病理状态的改善作用。

**关键词** 补阳还五汤;高脂血症;血小板;黏附;释放;纤溶;大鼠

325(1):309-315.

- [16] 李雨宸,陈正浩,潘远风,等. 巯基改性纤维素的制备及其对亚甲基蓝的吸附研究[J]. 纤维素科学与技术, 2020, 28(1):34-41.
- [17] 冯甜华. 姜黄素的提纯、稳定性及抗氧化性研究[D]. 重庆:重庆大学, 2016.
- [18] 邹佳辉,黄偲偲,邱娜,等. 用于肺部给药的磷酸奥司他韦微粉的制备及肺组织分布初步考察[J]. 中国医药工业杂志, 2017, 28(5):692-698.
- [19] 张国立,肖志美,于翔,等. 治疗急性损伤的莜术油和莜术醇粉雾剂的比较研究[J]. 药学学报, 2020, 5(6):1312-1319.
- [20] 朱李飞,刘晓妍,陈红君,等. 白藜芦醇二棕榈卵磷脂脂质

粉雾剂的制备及其抗菌作用研究[J]. 中草药, 2018, 49(24):5803-5811.

- [21] 胡玉贞. 防治肺纤维化的肺吸入姜黄素大多孔微粒的研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2017.
- [22] 李楠,刘佩莉,孔令钰,等. 姜黄素固体脂质纳米粒干粉吸入剂的质量评价及初步稳定性考察[J]. 中国药房, 2016, 27(34):4838-4841.
- [23] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:附录12-附录13.
- [24] SILVA A L D, CRUZ F F, ROCCO P R M, et al. New perspectives in nanotherapeutics for chronic respiratory diseases[J]. Biophys Rev, 2017, 9(5):793-803.
- [25] FERNANDO J M, MEILAN K H, JAMES P A, et al. At the root: defining and halting progression of early chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care, 2018, 197(12):1540-1551.
- [26] 张攀. 慢性阻塞性肺疾病稳定期患者小气道改变及其对吸入剂的治疗反应评价[D]. 广州:南方医科大学, 2016.
- [27] SANTUS P, RADOVANOVIC D, PECCHIARI M, et al. The relevance of targeting treatment to small airways in asthma and COPD[J]. Respir Care, 2020, 65(9):1392-1412.

(收稿日期:2020-11-24 修回日期:2020-02-02)

(编辑:林静)

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81703981, No.82074326);中国博士后科学基金第13批特别资助(站中)(No.2020T130180);中国博士后科学基金第65批面上资助二等项目(No.2019M651320);黑龙江省博士后资助经费(No.LBH-Z18250);黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(No.UN-PYSCT-2018232);黑龙江中医药大学科研基金项目(No.2019M39)

\* 博士研究生。研究方向:方剂学配伍规律与药理学基础。电话:0451-8219349。E-mail:986990984@qq.com

#a 通信作者:教授,硕士。研究方向:方剂学配伍规律与药理学基础。电话:0451-8219342。E-mail:hrbxiaohongbin@126.com

#b 通信作者:研究员,博士。研究方向:方剂学配伍规律与药理学基础。电话:0451-8219349。E-mail:121505982@qq.com