

白杨素固体脂质纳米粒的制备及其药动学行为

杨金枝¹, 孙文霞², 王姣姣², 崔 锋^{2*}, 郝海军^{2*}

(1. 郑州澍青医学高等专科学校, 河南 郑州 450064; 2. 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院, 上海 201203)

摘要: **目的** 制备白杨素固体脂质纳米粒, 并评价其药动学行为。**方法** 乳化超声-低温固化法制备纳米粒, 测定其粒径、Zeta 电位、体外释放度。12 只 SD 大鼠随机分为 2 组, 分别灌胃给予原料药、纳米粒混悬液。HPLC 法测定血浆中白杨素含量, 绘制血药浓度-时间曲线, 计算药动学参数。**结果** 所得纳米粒平均粒径为 (207.15 ± 30.59) nm, PDI 为 0.224 ± 0.067, Zeta 电位为 (−34.8 ± 5.9) mV, 36 h 内累积释放度达 84.36%。其 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 分别为 (9.04 ± 1.52) μg/mL、(33.67 ± 3.47) μg · h/mL, 明显高于原料药 ($P < 0.01$)。**结论** 固体脂质纳米粒可促进白杨素的口服吸收和生物利用度, 并具有显著缓释特征。

关键词: 白杨素; 固体脂质纳米粒; 制备; 药动学; 乳化超声-低温固化; HPLC

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)01-0076-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.014

Preparation of chrysin solid lipid nanoparticles and their pharmacokinetic behaviors

YANG Jin-zhi¹, SUN Wen-xia², WANG Jiao-jiao², CUI Feng^{2*}, HAO Hai-jun^{2*}

(1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China; 2. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare chrysin solid lipid nanoparticles and to evaluate their pharmacokinetic behaviors. **METHODS** The particle size, Zeta potential and *in vitro* release rate of nanoparticles prepared by emulsification ultrasonication-low temperature solidification method were determined. Twelve SD rats were randomly divided into two groups and were intragastrically given suspensions of crude drug and nanoparticles, respectively. HPLC was used for the content determination of chrysin in plasma, after which blood drug concentration-time curves were drawn, and pharmacokinetic parameters were calculated. **RESULTS** The obtained nanoparticles demonstrated the particle size of (207.15 ± 30.59) nm, PDI of (0.224 ± 0.067) and Zeta potential of (−34.8 ± 5.9) mV, respectively, whose accumulative release rate reached 84.36% within 36 h. Their $C_{\max}$ [(9.04 ± 1.52) μg/mL] and $AUC_{0\sim t}$ [(33.67 ± 3.47) μg · h/mL] were much higher than those of the crude drug ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Solid lipid nanoparticles can promote the oral absorption and bioavailability of chrysin, with significant sustained-release characteristics.

KEY WORDS: chrysin; solid lipid nanoparticles; preparation; pharmacokinetics; emulsification ultrasonication-low temperature solidification; HPLC

白杨素属于黄酮类化合物, 主要来源于蕨科植物木蝴蝶 *Oroxylum indicum* (L.) Vent., 具有抗肿瘤、抗氧化、改善脑损伤等多种药理作用^[1-2], 有较大的研究开发价值, 但其口服吸收生物利用度较

收稿日期: 2017-07-10
作者简介: 杨金枝 (1980—), 女, 硕士, 讲师, 从事中药学研究。E-mail: yangjz2007@126.com
* 通信作者: 崔 锋 (1982—), 男, 助理研究员, 从事药品质量控制及质量标准研究。E-mail: cf2002sdu@hotmail.com
郝海军 (1981—), 男, 硕士, 助理研究员, 从事新型给药系统及药物分析。E-mail: haohj2007@126.com

低,极大限制了临床应用^[3]。

固体脂质纳米粒^[4]是采用生理相容性较高的脂质材料作为载体,将难溶性药物包裹或夹嵌于其中而形成的一种固体胶粒给药系统,可提高难溶性药物的溶解度,保护药物免受降解,提高口服吸收生物利用度,增强体内靶向作用和药效,适合大规模生产,有着广阔的发展前景。本实验首先将白杨素制成固体脂质纳米粒,并进行初步的体外性质考察,再测定大鼠灌胃给药后血浆中该成分含有量,考察其体内药动学行为,以期对相关制剂开发提供实验依据。

1 仪器、材料与动物

U3000 型高效液相色谱仪(戴安中国有限公司);DF-101S 型磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);AR2140 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);MD200-2 型氮气吹扫仪(杭州奥盛仪器有限公司);XW-80 A 型涡旋混合器(上海医科大学仪器厂);Nanosep[®]超滤离心管(截留相对分子质量 10 000,美国 Pall 公司);Master-sizer 型粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司)。

白杨素原料药(批号 160422,上海源叶生物科技有限公司,含有量 > 98%);柚皮素(批号 05-2010)、白杨素(批号 111701-200501)对照品(中国食品药品检定研究院);磷脂酰胆碱(PC-98T,艾韦拓上海医药科技有限公司,含有量 > 98%);单硬脂酸甘油酯、泊洛沙姆 188(F-68,德国巴斯夫有限公司);其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠,体质量(300 ± 20) g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号 SCXK(沪)2003-0003。

2 方法与结果

2.1 白杨素含有量测定

2.1.1 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.1% 磷酸(23:77);检测波长 221 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温室温;进样量 10 μL。

2.1.2 方法学考察 精密称取白杨素对照品 9.88 mg,置于 100 mL 量瓶中,加入约 60 mL 甲醇超声处理,静置至室温后定容至刻度,作为贮备液,冰箱中保存备用,取适量用甲醇配制成 9.88、19.76、39.52、49.40、98.80 μg/mL,进样测定。以白杨素质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐

标(Y)进行线性回归,得回归方程为 $Y = 1.2007X - 0.0127$ ($r = 0.9998$),在 9.88 ~ 98.8 μg/mL 范围内线性关系良好。以 9.88、49.4、98.8 μg/mL 分别作为低、中、高质量浓度,进行日内、日间精密度试验,测得白杨素日内精密度 RSD 分别为 0.15%、0.09%、0.37%,日间精密度 RSD 分别为 0.58%、0.19%、0.82%。低、中、高质量浓度的平均加样回收率分别为 99.38%、100.08%、99.94%,RSD 分别为 0.93%、0.72%、1.11%。由此可知,所建立的含有量测定方法符合分析要求。

2.2 包封率及载药量测定 采用低温超速离心法测定包封率。精密量取 2.0 mL 固体脂质纳米粒于超速离心管中,15 000 r/min 离心 60 min,取滤液测定含有量。再精密量取同体积固体脂质纳米粒于 100 mL 量瓶中,乙腈破坏后定容至刻度,测定总含有量。计算公式为包封率 = $[(m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{总}}] \times 100\%$ 、载药量 = $[(m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{质}}] \times 100\%$ (式中 $m_{\text{总}}$ 表示白杨素总含有量, $m_{\text{游离}}$ 表示游离白杨素含有量, $m_{\text{质}}$ 表示固体脂质纳米粒总质量)。

2.3 纳米粒制备^[5] 采用乳化超声-低温固化法制备。称取白杨素 20 mg、单硬脂酸甘油酯 200 mg、磷脂酰胆碱 75 mg,溶于 10 mL 无水乙醇中,(75 ± 2)℃ 下水浴溶解,作为有机相;取泊洛沙姆 188、Tween-80 各 100 mg,置于 20 mL 蒸馏水中,同温度下搅拌溶解,作为水相^[6]。在搅拌速度 1 000 r/min、温度(75 ± 2)℃ 下用注射器将有机相缓慢滴入水相中,继续搅拌 3 h 以除去残留的有机溶剂,并浓缩至约 10 mL,作为初乳,超声(800 W,每超声 6 s 间隔 3 s)12 min,迅速放入 -20℃ 冰箱中进行固化,即得,按“2.2”项下方法测定,测得平均包封率为 76.63%,载药量为 5.27%。

2.4 粒径及 Zeta 电位 将纳米粒用蒸馏水稀释至一定浓度后,放入比色池中测定,结果见图 1~2,可知其平均粒径为(207.15 ± 30.59) nm, PDI 为 0.224 ± 0.067, Zeta 电位为(-34.8 ± 5.9) mV。

2.5 纳米粒体外释药行为 精密量取纳米粒混悬液 3.0 mL(白杨素含有量 5.88 mg),置于透析袋中(截留分子量 10 000 Da),溶出介质配制同等含有量的混悬液 3 mL,置于透析袋中,两端扎紧,以 900 mL 0.5% 十二烷基硫酸钠为溶出介质,转速 100 r/min,温度(37 ± 1)℃,于 0、0.5、1、2、

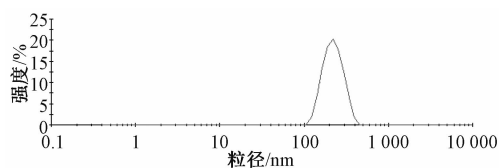


图1 纳米粒粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of nanoparticles

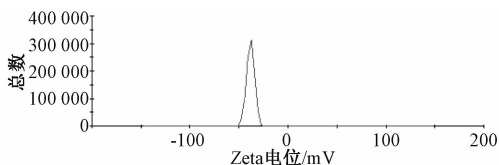


图2 纳米粒 Zeta 电位

Fig. 2 Zeta potential of nanoparticles

4、8、12、24、36 h 取样 2 mL，同时补充同温同体积溶出介质，HPLC 法测定。以累积释放度为纵坐标，取样时间为横坐标绘制释放曲线，结果见图 3，可知混悬液在 4 h 时的累积释放度为 90.14%，6 h 内基本释放完全；纳米粒在 8 h 前属于快速释放期，8 h 后属于缓慢释放期，36 h 内累积释放度达 84.36%，具有明显的缓释特征。

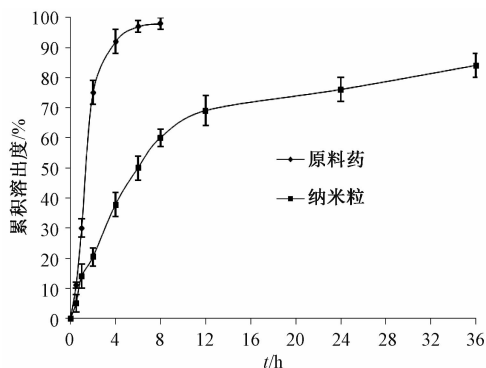


图3 原料药及纳米粒体外释药曲线

Fig. 3 *In vitro* drug release curves for crude drug and nanoparticles

2.6 冻干粉制备及评价 于纳米粒中加入 5% 冻干保护剂（甘露醇、乳糖、蔗糖），涡旋混匀后分别量取 2 mL 置于西林瓶中， $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冻 24 h 后冷冻干燥 48 h ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 Pa)，得淡黄色疏松粉末，并发现以 5% 甘露醇为冻干保护剂时，冻干粉外形饱满，再分散性较好，色泽均匀。再测定其包封率及粒径，发现前者下降至 73.93%，后者增大至 $(219.33 \pm 33.17)\text{ nm}$ ，但均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.7 体内药动学行为

2.7.1 灌胃药液配制 取原料药适量，0.5%

CMC-Na 溶液配制成 10 mg/mL 混悬液。另取冻干粉，纯化水配制成相同质量浓度的混悬液。

2.7.2 分组、给药及血样采集 取 SD 大鼠 12 只，随机分为 2 组，实验室适应 24 h，禁食不禁水，按 40 mg/kg 剂量分别灌胃给予原料药、纳米粒混悬液。原料药组于 0.167、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、8、12 h 眼眶采血 0.3 mL，纳米粒组采血时间延长至 24 h，血样置于肝素化离心管中，4 000 r/min 离心 3 min，小心吸取上层血浆，置于另一离心管中， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，备用。

2.7.3 血浆处理 精密量取血浆 100 μL 、内标溶液 80 μL ，置于离心管中，加入 3 mL 提取液（正己烷-二氯甲烷-异丙醇 = 100 : 50 : 10），涡旋 5 min 后 6 000 r/min 离心 30 min，吸取上层有机相，转移至另一离心管中，氮气吹去有机溶剂，残渣用 100 μL 流动相复溶，按“2.1.1”项下方法测定含量。

2.7.4 对照品溶液制备 精密称取柚皮素对照品 10.28 mg，置于 10 mL 量瓶中，加入 4 mL 左右甲醇超声溶解，静置至室温后定容至刻度，甲醇继续稀释至 0.514 $\mu\text{g/mL}$ ，作为内标溶液，冰箱中保存备用。取“2.1.2”项下对照品溶液，稀释成 0.25、1.24、2.47、4.94、7.41、9.88 $\mu\text{g/mL}$ 系列质量浓度，以白杨素质量浓度为横坐标 (X)，白杨素、内标峰面积之比为纵坐标 (Y) 进行线性回归，得回归方程为 $Y = 0.1284X - 0.0293$ ($r = 0.9939$)，在 0.25 ~ 9.88 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.7.5 方法学考察 取空白血浆、含药血浆、对照品溶液、按“2.6.3”项下方法处理，在“2.1.1”项色谱条件下测定，发现内标和白杨素分别在 5.1 min 和 7.0 min 出峰，互不干扰，峰型理想，而且内源性杂质峰不影响测定。

取 0.25、4.94、9.88 $\mu\text{g/mL}$ 含药血浆溶液分别作为低、中、高质量浓度，测得白杨素日内精密度 RSD 分别为 8.11%、4.51%、4.74%，日间精密度 RSD 分别为 8.39%、6.81%、7.05%。另取空白血浆 200 μL ，配制成同样 3 种质量浓度，测得回收率在 89.04% ~ 93.11% 之间。

2.7.6 测定结果 大鼠灌胃原料药、纳米粒混悬液后，按“2.7.3”项下方法处理，在“2.1.1”项色谱条件下测定，绘制血药浓度-时间曲线，结果见图 4。

主要药动学参数采用 3P97 程序统计矩模型计

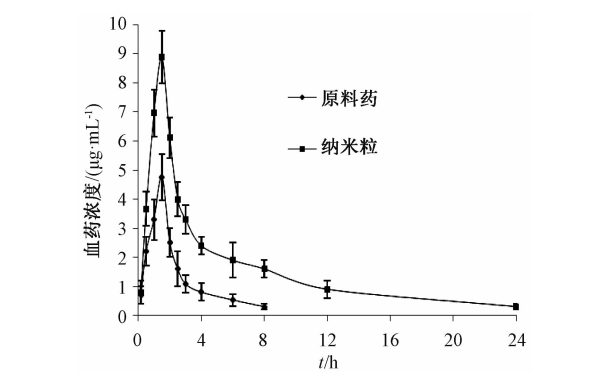


图 4 原料药及纳米粒血药浓度-时间曲线

Fig. 4 Blood drug concentration-time curves for crude drug and nanoparticles

算,结果见表 1。由表可知,纳米粒的 $t_{1/2}$ 与原料药相比显著延长 ($P < 0.05$), $C_{\max}$ 极显著提高 ($P < 0.01$), 相对生物利用度提高到 235.62%。

表 1 原料药及纳米粒主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Main pharmacokinetic parameters of crude drug and nanoparticles ($\bar{x} \pm s$)

参数	单位	原料药	纳米粒
$t_{\max}$	h	1.61 ± 0.20	1.43 ± 0.41
$t_{1/2}$	h	2.04 ± 0.31	5.57 ± 1.18 *
$C_{\max}$	μg·mL ⁻¹	4.68 ± 0.73	9.04 ± 1.52 **
AUC _{0~t}	μg·h·mL ⁻¹	14.29 ± 1.25	33.67 ± 3.47 **

注:与原料药比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3 讨论

仅采用单硬脂酸甘油酯载体制备固体脂质纳米粒时,药物包封率往往较低^[7],而本实验所制备的白杨素固体脂质纳米粒以单硬脂酸甘油酯和磷脂酰胆碱为混合载体。一般认为,采用 2 种以上脂质载体制备的固体脂质纳米粒可防止高度结晶颗粒形成,从而使药物排出晶格,并且包封率较高。同时在制备有机相时,白杨素可能会和脂质载体磷脂酰胆碱形成复合物^[8-14],大大提高了药物脂溶性,并增强其与单硬脂酸甘油酯的亲亲和性和相容性,有利于提高包封率^[15]。

研究结果表明,采用固体脂质纳米粒载药系统给药后, $C_{\max}$ 及相对生物利用度均显著提高。由于纳米粒平均粒径较小,比表面积较大,可增加与胃肠道黏膜的接触面积,并且它具有较强的生物黏附作用,有助于经细胞、胞间、淋巴转运等途径进入血液循环,从而提高口服吸收生物利用度。另外,白杨素及其固体脂质纳米粒的 $t_{\max}$ 无显著性差异,其原因可能是一方面所制备的纳米粒平均包封率为 76.63%,除了药物与脂质载体紧密结合外,还有胶束、混合胶束^[16]、药物晶体等形式存在,从而

发挥以纳米粒为主的不同结构吸收优势^[7];另一方面,纳米粒经口服进入胃肠道后,在胃肠道中发生了部分泄露。

白杨素是一种很有开发前景的中药活性成分,但其口服吸收生物利用度较低,成为制备相关口服制剂的一大难题。采用固体脂质纳米粒给药后,其口服吸收生物利用度显著提高,在减少给药剂量的同时可达到相同的治疗效果。

参考文献:

[1] Mantawy E M, El-Bakly W M, Esmat A, *et al.* Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 728: 107-118.

[2] 邹雅茹,童建簪,叶 静,等. 白杨素抗肿瘤效应及其机制的研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2015, 44 (7): 165-167.

[3] 崔晓鸽,曹伶俐,侯佳威,等. 白杨素磷脂复合物的制备及其药动学行为 [J]. *中成药*, 2017, 39 (5): 934-939.

[4] 张小飞,刑传峰,果秋婷. 川陈皮素固体脂质纳米粒的制备 [J]. *中成药*, 2014, 36 (9): 1857-1862.

[5] 李莎莎,程 亮,危红花,等. 盐酸青藤碱固体脂质纳米粒药动学和药效学研究 [J]. *中成药*, 2013, 35 (9): 1882-1887.

[6] 李 欣,郑少华,张沛沛,等. 不同固体制剂中白杨素的溶出度评价 [J]. *西北药学杂志*, 2016, 31 (1): 76-79.

[7] 李厚丽,翟光喜,祝伟伟,等. 槲皮素固体脂质纳米粒的制备及小鼠口服吸收研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2008, 3 (6): 435-438.

[8] 张红芹,郝海军,樊敏伟,等. 磷脂复合物在经皮及黏膜给药系统中的应用 [J]. *中成药*, 2014, 36 (1): 153-157.

[9] Wu X C, Hao H J, Liu Y X, *et al.* Bioavailability of 10-hydroxycamptothecin-phospholipid complex loaded by solid dispersion and lipid-based formulations [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2015, 24 (12): 779-787.

[10] Hao H J, Jia Y Z, Han R. Phytosomes: an effective approach to enhance the oral bioavailability of active constituents extracted from plants [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2013, 22 (5): 385-392.

[11] 吴先闯,郝海军,张永州,等. 姜黄素磷脂复合物不同制剂对 SD 大鼠口服生物利用度的影响 [J]. *中成药*, 2015, 37 (10): 2163-2166.

[12] 郝海军,张红芹,贾幼智,等. 采用制剂新技术提高中药磷脂复合物的溶出度和生物利用度研究进展 [J]. *中草药*, 2013, 44 (17): 2474-2479.

[13] 陈志鹏,孙 俊,刘 丹,等. 银杏叶提取物磷脂复合物大鼠体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2010, 32 (12): 2067-2070.

[14] 吴先闯,郝海军,刘瑜新,等. 羟喜树碱 2 种固体分散体在 SD 大鼠口服吸收生物利用度的比较 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41 (6): 1130-1134.

- [15] 侯冬枝, 谢长生, 平其能, 等. 雷公藤内酯醇新型 SLN 包封率的测定及载体材料筛选[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(12): 919-923.
- [16] 刘 蕾, 平其能, 张 灿, 等. 环孢素 A 壳聚糖衍生物胶束的制备及其大鼠口服生物利用度[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(3): 208-212.

猴头菌素 A 2 种包合物制备工艺的优化及其稳定性

刘若曦¹, 王 平^{1*}, 何晋浙²
(1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014; 2. 浙江工业大学海洋学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: **目的** 优化猴头菌素 A 2 种包合物制备工艺, 并评价其稳定性。**方法** 以投料比、研磨时间、研磨速度为影响因素, 包合率、收率为评价指标, 正交试验优化制备工艺。红外分光光度法和 TLC 法对所得包合物进行表征, 并考察其在高温 (60 ℃)、强光 (3 000 lx)、高湿度 [(90 ± 5)%] 下的稳定性。**结果** 环糊精最佳包合条件为投料比 5 : 1, 研磨时间 60 min, 研磨速度 300 r/min, 包合率 20.66%, 收率 88.21%; 羟丙基-β-环糊精最佳包合条件为投料比 25 : 1, 研磨时间 90 min, 研磨速度 400 r/min, 包合率 69.25%, 收率 96.31%。猴头菌 80% 乙醇提取物的包合是物理过程, 未发生成分变化。在高温、强光下, 两种包合物外观无明显变化, 猴头菌素 A 损失小, 在高湿度条件下恰好相反。羟丙基-β-环糊精包合物的包合效果优于 β-环糊精包合物。**结论** 猴头菌素 A β-环糊精、羟丙基-β-环糊精包合物具有良好的热稳定性、光稳定性, 但易发生潮解。

关键词: 猴头菌素 A; 包合物; β-环糊精; 羟丙基-β-环糊精; 制备; 正交试验; 稳定性

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)01-0080-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.015

Preparation optimization for two inclusion compounds of erinacine A and their stabilities

LIU Ruo-xi¹, WANG Ping^{1*}, HE Jin-zhe²
(1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. Ocean College, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: AIM To optimize the preparation of two inclusion compounds of erinacine A and to evaluate their stabilities. **METHODS** With feed ratio, milling time and milling speed as influencing factors, inclusion rate and yield as evaluation indices, the preparation was optimized by orthogonal test. The obtained inclusion compounds were characterized by infrared spectrophotometry and TLC, whose stabilities at high temperature (60 ℃), strong light (3 000 lx) and high humidity [(90 ± 5)%] were investigated. **RESULTS** The optimal β-cyclodextrin inclusion conditions were determined to be 5 : 1 for feed ratio, 60 min for milling time, and 300 r/min for milling speed, the inclusion rate and yield were 20.66% and 88.21%, respectively. The optimal hydroxypropyl-β-cyclodextrin inclusion conditions were determined to be 25 : 1 for feed ratio, 90 min for milling time, and 400 r/min for milling speed, the inclusion rate and yield were 69.25% and 96.31%, respectively. The inclusion of *Hericium erinaceus* 80% ethanol extract was physical process without composition change. At high temperature and strong light, two inclusion compounds' appearance showed no obvious change with little loss of erinacine A, which was just the

收稿日期: 2017-01-19
基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 课题 (2014AA022205)
作者简介: 刘若曦 (1990—), 女, 硕士生。Tel: (0571) 88320867, 13750842047, E-mail: 252619105@qq.com
* 通信作者: 王 平 (1969—), 女, 博士, 教授, 研究方向为天然药物化学、中药及天然药物活性成分。Tel: (0571) 88320867, E-mail: wangping45@zjut.edu.cn