

基于ACQ探针示踪槲皮素纳米晶的体内外行为

潘新彤[#], 王立夫[#], 陈 潇, 李梓茜, 康 鑫, 潘振华^{*}, 党云洁^{*}

河北医科大学 药学院, 河北 石家庄 050017

摘要: 目的 将聚集引起的猝灭(ACQ)探针P2杂化到槲皮素(QUE)纳米晶的晶格内制备荧光杂化槲皮素纳米晶(QUE-HNC),考察QUE-HNC的体外溶出行为及体内药动学。方法 通过沉淀-反溶剂超声法制备QUE-HNC,单因素分析考察滴加速度、探头浸入液面的位置、超声功率、聚维酮K30(PVP K30)的加入方式,筛选制备工艺。制备170、250、310 nm 3种粒径的QUE-HNC,HPLC法检测QUE含量,Nano ZS90激光粒度仪检测粒径及聚合物分散性指数(PDI),Zeta电位分析仪检测电位;扫描电镜观察微观结构;透析袋法比较QUE原料药及不同粒径QUE-HNC的体外溶出行为;雄性昆明小鼠尾iv给予3种粒径的QUE-HNC($126\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),猝灭组尾iv给予P2水猝灭溶液,给药后0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、11.0、24.0 h放入小动物活体三维多模式成像系统检测QUE-HNC的体内组织分布;Wistar大鼠尾iv给予3种粒径的QUE-HNC($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),在0.083、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000、8.000、11.000、24.000 h时眼内眦取血0.5 mL进行荧光定量,进行QUE-HNC的粒子动力学研究;HPLC法检测QUE-HNC($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)在大鼠体内的药动学参数。结果 根据单因素考察的结果,最终的处方为:有机相与水的比例为1:10,PVP K30添加在水相中,有机相的滴加速度为 $0.01\text{ mL}\cdot\text{s}^{-1}$ 。通过调整超声功率和粉碎时间,成功制备170、250、310 nm 3种粒径的QUE-HNC,粒径在所需范围内,PDI均小于0.3,微观形态呈棒状,大小较为均一,QUE质量浓度均在 $0.40\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右;与原料药相比,溶出速度和程度明显提高。3种粒径QUE-HNC的体内分布行为基本一致,在前4 h主要蓄积于肝脏部位,11 h后的荧光信号逐渐向腹部的下方和脾脏处转移,并且随着时间的延长,肝脏部位荧光信号及腹部总荧光信号强度均呈现逐渐减小的趋势。药动学实验的结果反映了粒子快速消除的现象,但粒子动力学结果显示QUE-HNC并不会在血液中快速的溶解,部分QUE-HNC一直处于粒子状态,3种粒径的QUE-HNC在体内都有较长的平均滞留时间。结论 成功制备了3种粒径的QUE-HNC,与槲皮素原料药对比,显著提高了溶出度,但其依然有缓释的效果。

关键词: 槲皮素; 荧光杂化纳米晶; 粒子动力学; 药动学; 溶出度; 分布; 聚集引起的猝灭探针

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2024)12-2844-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.12.014

Investigation of *in vivo* and *in vitro* behaviors of quercetin nanocrystals tracked by ACQ probe

PAN Xintong, WANG Lifu, CHEN Xiao, LI Ziqian, KANG Xin, PAN Zhenhua, DANG Yunjie

School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: **Objective** Fluorescently labeled quercetin-hydroxyapatite nanocrystals (QUE-HNC) was prepared by incorporating the aggregation-induced quenching (ACQ) probe P2 into the crystal lattice of quercetin nanocrystals, and investigated the *in vitro* dissolution behavior and *in vivo* pharmacokinetics of QUE-HNC. **Methods** The QUE-HNC was prepared by precipitation-anti-solvent ultrasonic method, and single factor analysis was used to investigate the effects of dropping speed, probe immersion position, ultrasonic power, and PVP K30 addition method on the preparation process. The preparation process was optimized to produce QUE-HNC with three different sizes of 170, 250, and 310 nm. The content of QUE was determined by HPLC, the size and polymer dispersion index (PDI) were determined by Nano ZS90 laser particle size analyzer, the Zeta potential was determined by Zeta potential analyzer, the microstructure was observed by scanning electron microscopy, the *in vitro* dissolution behavior of QUE raw material and different sizes of QUE-HNC was compared using dialysis bags, and the *in vivo* distribution behavior and particle

收稿日期: 2024-06-13

基金项目: 河北省教育厅引进留学人才项目(C20220345)

[#]共同第一作者: 潘新彤,女,硕士研究生,研究方向为药物新技术与新剂型。E-mail:22033100158@stu.hebmu.edu.cn

王立夫,男,硕士,研究方向为药物新技术与新剂型。E-mail:wanglifu20202109@163.com

^{*}共同通信作者: 潘振华,男,副教授,从事药物新技术与新剂型的研究。E-mail:1416027198@qq.com

党云洁,女,副教授,研究方向为药物新技术与新剂型。E-mail:dangyunjie@hebmu.edu.cn

kinetics of QUE-HNC with three different sizes were investigated in male Kunming mice by iv injection of $126 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and in Wister rats by iv injection of $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The pharmacokinetics of QUE-HNC with three different sizes were investigated in Wister rats by iv injection of $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. **Results** As a result of the single factor investigation, the final formulation was determined to be: A 1:10 ratio of organic phase to water, with PVP K30 added to the aqueous phase, and a drop rate of $0.01 \text{ mL} \cdot \text{s}^{-1}$ for the organic phase. By adjusting the ultrasonic power and grinding time, we successfully prepared QUE-HNC particles with three different sizes of 170, 250, and 310 nm, within the desired range, with PDI all less than 0.3, microscopic morphology in the form of rods, relatively uniform size, and QUE concentration all around $0.40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Compared with the raw drug, the dissolution rate and extent were significantly improved. The *in vivo* distribution behavior of the three sizes of QUE-HNC was basically the same, with the fluorescence signal mainly accumulating in the liver area in the first 4 h, gradually shifting to the lower abdomen and spleen area after 11 h, and the fluorescence signal intensity in the liver area and the total fluorescence signal intensity gradually decreasing over time. The pharmacokinetic experiment results reflected the phenomenon of rapid elimination of particles, but the particle dynamics results showed that QUE-HNC would not dissolve rapidly in the blood, with some QUE-HNC remaining in particle form. All three sizes of QUE-HNC had a relatively long average residence time in the body. **Conclusion** Fluorescent hybridized nanocrystals with three particle sizes were successfully prepared, and the nanocrystals significantly improved the dissolution compared to quercetin API, but they still had a slow release effect.

Key words: quercetin; hybrid nanocrystals; particle dynamics; pharmacokinetics; dissolution rate; distribution; aggregation-induced quenching probe

据统计,超过40%的商业药物和70%的候选活性药物难溶于水,使其临床应用受到生物利用度差的困扰^[1]。纳米制剂因其粒径较小、能显著提高药物的溶出速度和程度,逐渐成为改善难溶性药物吸收、提高体内生物利用度的有效方法。其中,纳米晶(NC)具有载药量高、稳定剂用量少等优势,与传统纳米制剂相比,还改善了包封率低、稳定性差的问题,且避免了载体毒性带来的制约,有利于药物表现出更好的治疗效果^[2]。但是,目前大多数药物生物利用度的研究主要以总浓度为评价指标,而游离药物才是其体内发挥药理作用的部分,因此开发能够区分制剂颗粒和游离药物的方法是非常必要的^[3]。

荧光杂化纳米晶(HNC)技术可以将少量(约1%)的荧光探针包裹在NC中,在保证其晶体结构不被破坏的同时发出荧光信号,已逐步成为研究NC体外和体内行为的实用工具^[4]。但是,普通探针在被释放后依然具有荧光信号,无法排除游离探针的干扰,聚集引起的猝灭(ACQ)探针具有良好的环境响应性,能随着NC的结构变化形成 on-off 效应^[5-6],为这一难题提供了解决方案。P2是一种强疏水性的ACQ探针,激发波长较长且荧光稳定^[7],其被NC的晶格包裹时可呈现强烈且稳定的荧光信号,而一旦NC溶解将其释放,随即遇水发生 π - π 堆叠、团聚形成复合物,荧光会迅速且完全淬灭。因此,检测的荧光信号仅为NC颗粒信号,为准确示踪NC的体内外行为提供了可能^[8]。

槲皮素(QUE)是主要的多酚类黄酮化合物,具

有抗氧化、抗炎、心脏保护等多种功效,开发价值极高,但由于水溶性差、大量首关效应以及随之而来的低生物利用度,其临床应用受到严重限制^[9]。本研究以QUE为模型药物,将ACQ探针P2杂化到槲皮素纳米晶(QUE-NC)的晶格内(QUE-HNC),利用探针的环境响应性区分NC颗粒和游离药物,考察QUE-NC的体外溶出行为及体内过程,为NC制剂的开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Nano ZS90激光粒度仪、Zeta 电位分析仪(马尔文仪器有限公司);TU-1950双光束紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);RF-6000荧光分光光度计(日本岛津公司);旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);循环超声波细胞粉碎机(昆山市超声仪器有限公司);SHA-B双功能水浴恒温振荡器(江金坛亿通电子有限公司);XW-80A型旋涡混合器(上海医大仪器有限公司);氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);LC-20AT高效液相色谱仪(日本岛津公司);小动物活体三维多模式成像系统(PerkinElmer.Lnc.)。

1.2 主要试剂

QUE原料药(批号CY160517,质量分数 $\geq 95\%$)购自上海创诺制药有限公司;聚维酮K30(PVP K30)购自北京风礼精求商贸有限公司;无水乙醇购自天津市永大化学试剂有限公司;P2由上海复旦大学吴伟课题组提供;纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司;乙腈(色谱纯)购自美国天地公

司;二氯甲烷购自天津市永大化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯)购自美国天地公司;醋酸乙酯购自天津市永大化学试剂有限公司

1.3 实验动物

雄性昆明小鼠,体质量(29.88 ± 2.25)g,由河北医科大学动物实验中心提供,实验动物生产许可证号为SCXK(冀)2018-004。雌性Wistar大鼠,体质量(253.91 ± 22.99)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2016-0011。动物使用方案经河北医科大学动物实验伦理委员会审查并批准,批准文号IACUC-Hebmu-P2024176。

2 方法与结果

2.1 QUE紫外分析方法的建立

2.1.1 检测波长的确定 取适量的QUE,用乙醇超声溶解后,0.45 μm 微孔滤膜滤过,按紫外分光光度法在200~800 nm进行全波长扫描。

QUE在200~400 nm处有2个最大吸收峰,从图1中可以看出,372 nm处的吸收峰与254 nm处的吸收峰强度相似但是更加平缓,因此选择372 nm作为检测波长,可以减少仪器误差带来的干扰。

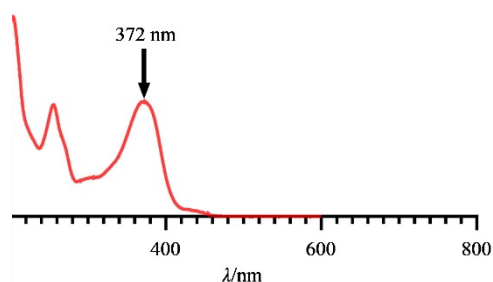


图1 QUE的紫外扫描图

Fig. 1 UV scanning image of QUE

2.1.2 标准曲线的建立 精密称量适量QUE,用无水乙醇配制成50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液。分别取0.4、0.8、1.0、1.2、1.6、2.0、2.4 mL储备液置于10 mL量瓶中,用无水乙醇定容至刻度线,分别得到2、4、5、6、8、10、12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,0.45 μm 滤膜滤过,在最大吸收波长处测定其吸光度(A)值,以QUE质量浓度为横坐标, A 值为纵坐标,绘制标准曲线。线性方程为 $Y=0.062 C-0.016$, $R^2=0.999 8$ ($n=7$),在2~12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 有良好的线性关系。

2.1.3 精密度考察 用无水乙醇分别配制质量浓度为2、5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的QUE对照品溶液,于最大吸收波长处测定 A 值,平行测定3次,计算QUE含量及日内精密度;依照上述方法连续测定3 d,计算日间精密度。日内精密度RSD为1.3%、1.3%、1.1%,日

间精密度RSD为2.1%、1.6%、1.0%,精密度良好。

2.1.4 准确度考察 精密量取已知质量浓度的供试品9份,分为3组,分别加入相当于QUE含量80%、100%、120%的QUE对照品,用无水乙醇稀释至刻度后,再次稀释10倍,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液在最大吸收波长处测定 A 值,计算QUE含量及加样回收率。3种质量浓度的回收率分别为98.58%、99.91%、100.32%,RSD分别为0.49%、1.00%、1.40%,回收率符合要求。

2.2 QUE-HNC的制备

取10 μL 质量浓度为100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的P2二氯甲烷溶液置于EP管内,在通风橱中挥干二氯甲烷溶液,加入5.00 mg的QUE,加乙醇超声溶解,制备成QUE-P2乙醇溶液。量取质量浓度为25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的PVP K30水溶液10 mL至西林瓶中,将超声探头浸入液面下0.5 cm,在超声作用下以0.01 $\text{mL} \cdot \text{s}^{-1}$ 速度缓慢滴加QUE-P2溶液,超声条件为5 s on/5 s off、功率99%、总时间5 min。将上述所得混悬液抽滤后洗涤并收集滤饼,按照相同的超声条件将其分散至含有PVP K30的水溶液中,即得QUE-HNC。

2.3 QUE-HNC制备工艺的筛选

2.3.1 滴加速度的考察 设置药液的滴加速度为0.01、0.02、0.05 $\text{mL} \cdot \text{s}^{-1}$,其余步骤按照“2.2”项方法进行,制备QUE-HNC混悬剂,采用Nano ZS90激光粒度仪检测混悬剂粒径和聚合物分散性指数(PDI),考察滴加速度对其粒径和PDI的影响。结果见表1。随着滴加速度的增加,QUE-HNC的粒径减少,但是PDI较大。综合考虑选择滴加速度为0.01 $\text{mL} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

表1 滴加速度的考察结果

Table 1 Investigation results of injection speed

滴加速度/ $(\text{mL} \cdot \text{s}^{-1})$	粒径/nm	PDI
0.01	205.7 $\pm$ 2.7	0.247 $\pm$ 0.014
0.02	192.4 $\pm$ 3.4	0.302 $\pm$ 0.023
0.05	156.7 $\pm$ 0.8	0.319 $\pm$ 0.035

2.3.2 探头浸入液面的位置 调整西林瓶和超声探头的位置,探头浸入液面0.25、0.50、1.00、1.50 cm,其余步骤按照“2.2”项方法进行,制备QUE-HNC混悬剂,考察探头位置对粒径和PDI的影响。结果见表2。超声探头浸入液面的位置过浅时,会产生大量的泡沫,QUE-HNC的PDI较大。随着探头位置的继续深入,粒径不断加大,当探针浸入液面过深时,能量并未被NC完全吸收,且对液面的搅动有限,使

表 2 探头浸入液面的结果

Table 2 Result of immersion of probe into liquid surface

探头位置/cm	粒径/nm	PDI
0.25	186.3±5.8	0.330±0.013
0.50	214.7±3.2	0.262±0.019
1.00	232.8±5.5	0.327±0.030
1.50	196.1±1.9	0.277±0.009

得 QUE 不能有效的分散, PDI 增大。当探头继续深入时, 由于距离瓶底太近, 导致瓶内的液体剧烈翻动, 粒径和 PDI 都较小。为了充分发挥超声探头的能量和避免西林瓶的破裂, 选择了探头浸入深度为 0.5 cm。

2.3.3 超声功率考察 设置超声功率为 99%、80%、60%、40%、30%、20%, 其余步骤与“2.2”项相同, 考察功率对粒径和 PDI 的影响。结果见表 3。随着超声功率的增加, QUE-HNC 粒径不断的减小, 但是当功率超过 80% 时会破坏 PVP K30 与 QUE-HNC 表面的结合, 导致粒径增大。

2.3.4 PVP K30 的加入方式 将 QUE 分别溶于质量浓度为 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PVP K30 水溶液和 PVP K30 乙醇溶液中, 其余步骤与“2.2”项相同, 考察 PVP K30 的加入方式对粒径和 PDI 的影响。如表 4 所示, PVP K30 在水相中制备的 QUE-HNC 有更小的 PDI。因此选择将 PVP K30 溶解在水中。

表 3 超声功率的考察结果

Table 3 Investigation results of ultrasonic power

超声功率/%	粒径/nm	PDI
20	502.7±21.6	0.474±0.039
30	364.8±20.3	0.353±0.042
40	214.9±4.3	0.262±0.029
60	206.7±5.9	0.247±0.021
80	199.3±1.6	0.235±0.032
99	243.3±4.0	0.294±0.045

表 4 PVP K30 加入方式的考察结果

Table 4 Results of investigation on adding method of PVP K30

加入方式	粒径/nm	PDI
有机相	187.5±2.879	0.319±0.059
水相	199.3±1.582	0.235±0.032

2.3.5 水与有机相的比例 设置水相与有机相的比例为 1:10、1:20。其余步骤与“2.2”项相同, 考察水与有机相的比例对粒径和 PDI 的影响。如表 5 所

表 5 水与有机相比例的考察结果

Table 5 Results of water to organic ratio

水和有机相的比例	粒径/nm	PDI
1:10	199.3±1.6	0.235±0.032
1:20	194.7±1.0	0.359±0.059

示, 当有机相与水相的比例为 1:10 时制备的 QUE-HNC 有更小的 PDI。

2.4 QUE-HNC 的质量评价

2.4.1 QUE-HNC 的工艺验证 根据单因素考察的结果, 最终的处方为: 有机相与水的比例为 1:10, PVP K30 添加在水相中, 有机相的滴加速度为 0.01 $\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$ 。通过调整超声功率和粉碎时间, 制备 3 组粒径在 400~300 nm (超声功率为 30%, 其余步骤与“2.2”项相同)、200~300 nm (制备方法与 400~300 nm 的 QUE-HNC 的制备方法相同, 延长抽滤后的粉碎时间至 3 min)、100~200 nm (功率为 80%, 抽滤后粉碎时间为 5 min) 的 QUE-HNC, Nano ZS90 激光粒度仪检测粒径及 PDI, Zeta 电位分析仪检测电位。如表 6 所示, 制备的 3 批 QUE-HNC 的粒径在所需范围内, PDI 均小于 0.3。表明上述工艺可以制备相应粒径的 QUE-HNC。

表 6 工艺验证的结果

Table 6 Results of process validation

QUE-HNC/nm	粒径/nm	PDI	电位/mV
400~300	313.6±3.3	0.200±0.020	-15.03±0.97
300~200	243.5±11.6	0.252±0.017	-13.40±0.70
200~100	168.0±1.3	0.231±0.012	-15.60±1.96

2.4.2 QUE-HNC 的外观 将制备好的 QUE-HNC 用 50 nm 的滤膜抽滤后, 室温晾干。用导电胶黏附少许, 置于喷金仪中, 在真空状态下喷金后, 于扫描电镜下观察其微观表面形态。由图 2 可知, QUE 原料药为棒状, 粒径并不均一; 各个粒径的 QUE-HNC 也成棒状, 但是大小较为均一。对比 QUE-NC 和 QUE-HNC 可以看到, 二者在外观上没有差别。

2.4.3 含量测定 吸取 100 μL QUE-HNC 至 10 mL 的量瓶中乙醇超声溶解, 定容, 测定其含量。结果见表 7, 不同粒径的 QUE-HNC 中 QUE 质量浓度均在 0.40 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右, 表明制备过程中约有 20% 的药物损失于滤膜的吸附和滤液中。

2.5 QUE-HNC 的溶出度考察

采用透析袋法比较 QUE 原料药及不同粒径 QUE-HNC 的体外溶出行为。分别将 QUE 原料

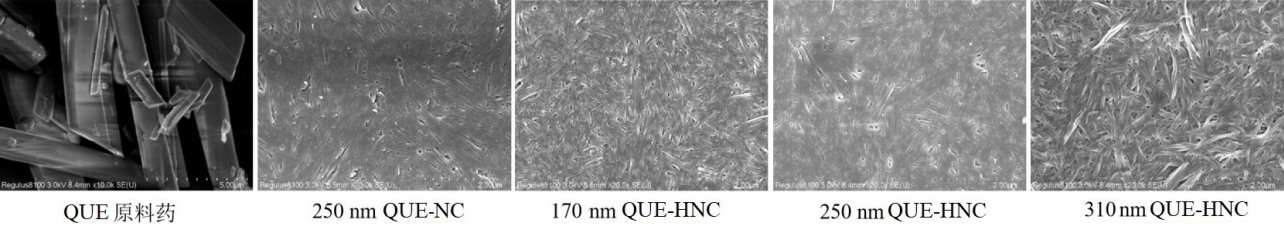


图2 QUE原料药及各制剂的扫描电镜图

Fig. 2 Scanning electron microscope of QUE raw materials and various formulations

表7 QUE-HNC中QUE含量

Table 7 QUE content in hybrid nanocrystals

QUE-HNC/nm	QUE/(mg·mL ⁻¹)
170	0.40±0.02
250	0.41±0.01
310	0.42±0.01

药(240 μg)及3种粒径的QUE-HNC(含QUE 240 μg)加入到透析袋中,系紧两端、放入含1 mmol·L⁻¹维生素C及0.1%聚山梨酯80的水溶液中(体积为20 mL),37℃恒温水浴振荡。在不同的时间点取样,测定荧光强度,计算其溶出度。结果见图3,将QUE制备成QUE-HNC后,可以显著提高QUE的溶出速度和程度。在6 h时,QUE-HNC最低的溶出度已经大于22%,而原料药仅有18%,6 h后QUE-HNC的溶出速度要远高于原料药。

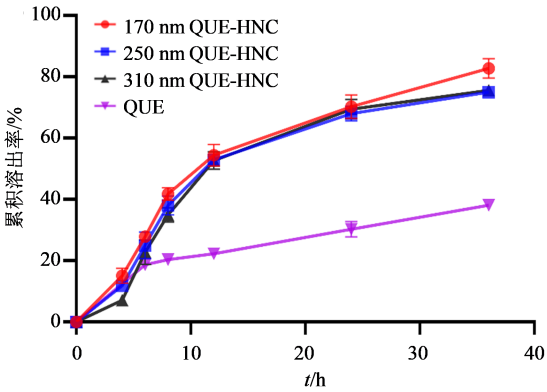


图3 溶出曲线

Fig. 3 Dissolution curves

2.6 HCN的体内分布研究

2.6.1 P2水淬灭溶液的制备 取100 μL的P2探针,挥干二氯甲烷后用乙醇溶解,超声3 min后,按照制备QUE-HNC相同的参数和步骤制备P2探针淬灭溶液,在40℃下旋蒸10 min,用25 μg·mL⁻¹的PVP K30溶液稀释至10 mL,制成P2探针淬灭溶液。

2.6.2 QUE-HNC的体内组织分布 取小鼠12只,

随机分成4组,每组3只,实验前1天,禁食不禁水,用脱毛膏除去胸腹部的毛发。前3组分别尾iv给予3种粒径的QUE-HNC,每组按126 mg·kg⁻¹给药,猝灭组尾iv给予200 μL的P2水淬灭溶液^[9]。给药后分别在0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、11.0、24.0 h将小鼠放入小动物活体三维多模式成像系统进行荧光信号扫描并拍照获取图像,进行荧光定量。在进行扫描时,小鼠一直处于麻醉状态。

结果如图4所示,在11 h内猝灭组几乎不产生荧光,且持续至24 h其荧光强度仍然较低,说明其对判断QUE-HNC体内分布的影响不大。3种粒径QUE-HNC的体内分布行为基本一致,在前4 h主要蓄积于肝脏部位,11 h后的荧光信号逐渐向腹部的下方和脾脏处转移,并且随着时间的延长,肝脏部位荧光信号及腹部总荧光信号强度均呈现逐渐减小的趋势。

2.7 QUE-HNC的体内药动学研究

取9只Wistar大鼠,随机分成3组,每组3只,实验前12 h禁食不禁水,实验期间禁食禁水。分别尾iv给予3种粒径的QUE-HNC(100 mg·kg⁻¹),在0.083、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000、8.000、11.000、24.000 h时眼内眦取血0.5 mL,吸取血样200 μL置于黑色96孔板内,放入小动物活体成像仪进行荧光信号扫描并拍照获取图像,进行荧光定量。采用药动学程序DAS 3.2.8,按照非房室模型分析QUE-HNC的粒子动力学参数。

图5为不同粒径QUE-HNC给药后血中荧光强度监测结果,可以看出其荧光信号均随着时间逐渐减弱,但在24 h时其值仍大于1×10⁸ p·cm²·s⁻¹·μW⁻¹(约为初始检测荧光值的1/4),说明QUE-HNC不会在血中快速的溶解,部分QUE-HNC一直处于粒子状态。通过软件拟合并计算QUE-HNC的平均滞留时间(MRT_{0-∞}),发现3种粒径的QUE-HNC在体内都有较长的MRT_{0-∞},其药动学参数无太大差异(表8)。250 nm QUE-HNC与170 nm QUE-HNC组均有1只大鼠死亡。

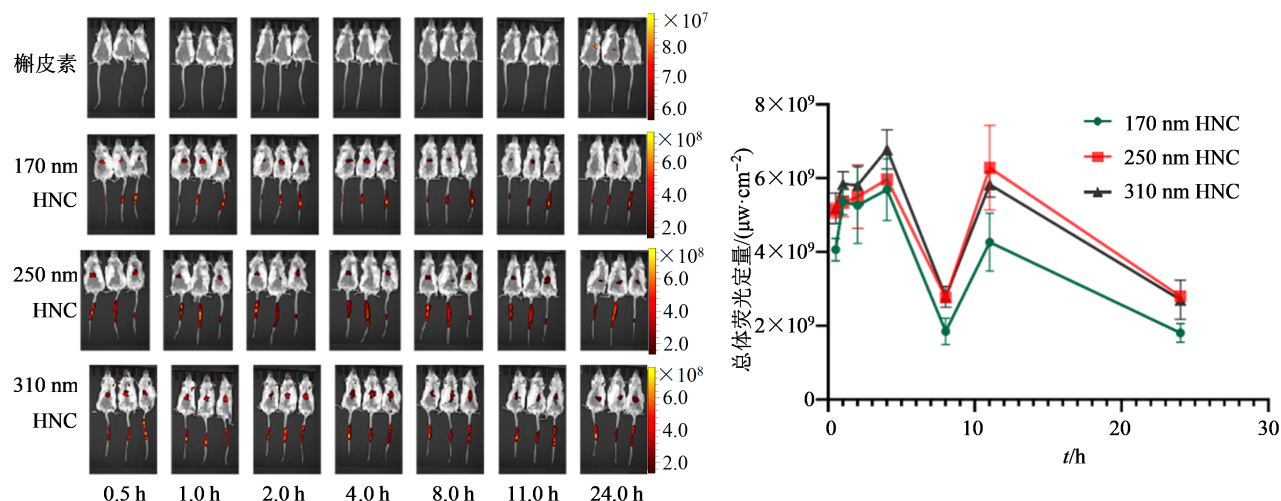


图4 小鼠尾iv荧光猝灭溶液和QUE-HNC的活体成像和总体荧光定量

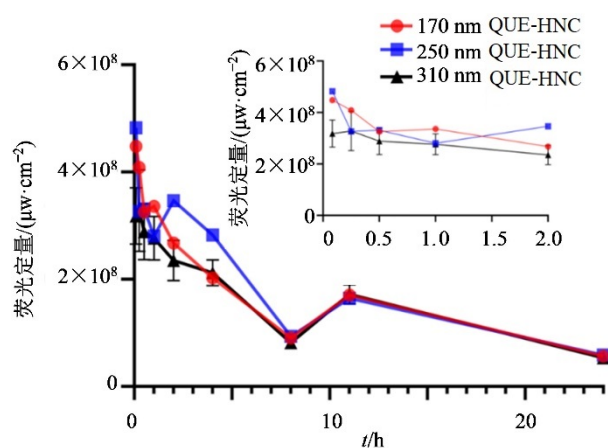
Fig. 4 *In vivo* imaging of mouse tail iv quenched solution and QUE-HNC and whole-body fluorescence quantitative image

图5 QUE-HNC的粒子动力学

Fig. 5 Pharmacokinetic profile of QUE-HNC

2.8 HPLC法测定大鼠血浆中QUE含量

2.8.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液 (30:70); 体积流量为 1 mL·min⁻¹; 检测波长 372 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

2.8.2 样品处理 精确量取血浆样品 100 μL, 加入 25% 盐酸溶液 100 μL 振荡, 涡旋混合 90 s。水浴 90 °C、15 min。加入醋酸乙酯 1 mL, 涡旋 5 min。10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 移取 500 μL 的上清液, 氮气吹干, 加入 300 μL 流动相复溶, 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 离心 2 次, 吸取上清液 20 μL, 进样。

2.8.3 专属性考察 将大鼠空白血浆、大鼠空白血

表8 QUE-HNC动力学参数($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 8 Particle dynamics parameters of QUE-HNC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

参数	单位	170 nm QUE-HNC	250 nm QUE-HNC	310 nm QUE-HNC
AUC _{0-t}	$\times 10^9 \cdot \text{p} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1} \cdot \mu\text{W}^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{h}$	3.60±0.08	3.26±0.09	2.68±0.28
MRT _{0-t}	h	8.35±0.32	7.18±0.43	7.67±0.69

浆加QUE对照品和大鼠血浆样品,按照“2.8.2”项下的方法进行处理。在按照“2.8.1”的色谱条件进行测定,记录各个样品的色谱图。该方法具有良好的专属性,QUE在15.5 min左右出峰,见图6,血浆中的QUE的保留时间与对照品的一致,其峰形良好,无其他峰的干扰。

2.8.4 标准曲线的建立 取适宜的QUE甲醇溶液,用氮气吹干。吹干后,添加200 μL的空白血浆,涡旋3 min,配制成质量浓度为1、2、3、5、10、15、20 μg·mL⁻¹的QUE血浆对照品溶液。按照“2.8.2”项下的方法进

行处理,再按照“2.8.1”的色谱条件进行测定。以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得到线性方程为: $Y=7\ 190.9 X-2\ 023.1, R^2=0.996\ 2 (n=7)$, 线性范围为1~20 μg·mL⁻¹。

2.8.5 精密度的考察 配制1、5、15 μg·mL⁻¹的QUE血浆对照品溶液,按照“2.8.2”项下的方法进行处理,按照“2.8.1”的色谱条件进行测定。1 d内测定3次,计算日内精密;连续测定3 d,计算日间精密。日内精密RSD为4.3%、6.4%、1.3%;日间精密度的RSD为3.1%、7.7%、4.6%,精密度符合要求。

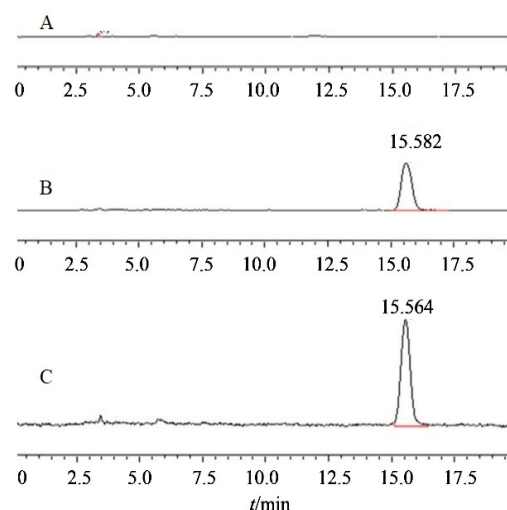


图6 空白血浆(A)、空白血浆加QUE对照品(B)、血浆样品(C)HPLC专属性色谱图

Fig. 6 HPLC specific chromatogram of blank plasma (A), blank plasma with QUE control (B), and plasma sample (C)

2.8.6 提取回收率的测定 平行配制3组1、5、15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的QUE血浆对照品溶液,按照“2.8.2”项下的方法进行处理,再按照“2.8.1”项的色谱条件进行测定。取QUE对照品溶液挥干甲醇后,用流动相稀释到相应的浓度,测定其峰面积。比较两者的峰面积值,测定提取回收率。各个质量浓度的样品的提取回收率均在80%左右,提取回收率良好。

2.9 QUE-HNC药动学研究

取18只Wistar大鼠,随机分成3组,每组6只,实验前12 h禁食不禁水,实验期间禁食禁水。分别

尾iv给予3种粒径的QUE-HNC($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[9],在0.083、0.250、0.500、1.000、2.000、4.000、8.000、11.000、24.000 h时眼内眦取血0.5 mL。将血样在4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,分离上层血浆样品备用。将各组血浆样品按照“2.8.2”项下的方法进行处理,再按照“2.8.1”的色谱条件进行测定,绘制大鼠的血药浓度时间曲线。采用药动学程序DAS 3.2.8,按照非房室模型计算大鼠的药动学参数。图7和表9分别为不同粒径QUE-HNC给药后的药-时曲线及药动学参数,结果表明前4 h内QUE在血浆中的含量快速下降,与活体成像及荧光监测结果一致,但3种粒径的QUE-HNC在体内的 MRT_{0-t} 无明显差异。

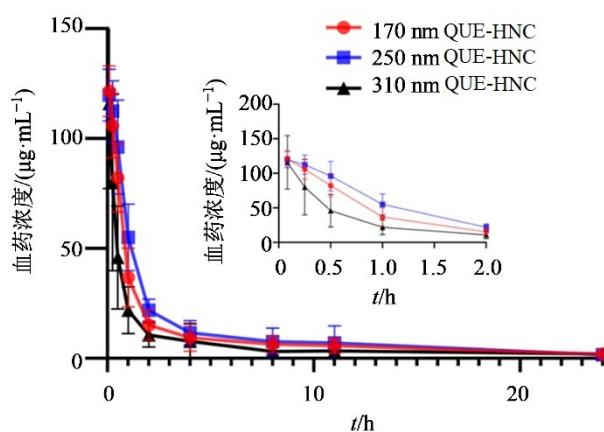


图7 QUE血药浓度-时间曲线
Fig. 7 Plasma QUE concentration-time curve

表9 QUE-HNC的药动学参数($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 9 Pharmacokinetic parameters of QUE-HNC ($\bar{x}\pm s, n=4$)

参数	单位	170 nm QUE-HNC	250 nm QUE-HNC	310 nm QUE-HNC
AUC_{0-t}	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	287.69 ± 26.96	309.00 ± 45.27	153.27 ± 38.89
MRT_{0-t}	h	3.32 ± 0.45	5.90 ± 0.33	4.14 ± 1.50

3 讨论

本研究成功制备了3种粒径的QUE-HNC,并对其进行了评价。评价结果表明制备的QUE-HNC符合要求,与QUE原料药对比,QUE-HNC显著地提高了溶出度,但是其依然有缓释的效果。通过体外实验,可以推测大量的QUE-HNC也可以在体内存在很长的一段时间,这说明很有必要探讨QUE-HNC的体内过程。

HNC在以iv给药的方式进入机体后,会被识别为异物,并通过内皮网状系统(RES)迅速从血液中清除^[9-13],富集在肝脏和脾脏处。这与文献中报道

的结果相似,如Hollis等^[14]通过氚标记和闪烁计数分析药物在小鼠中的组织分布也发现NC主要分布在肝脏、脾脏和肺等部位。活体成像荧光定量结果及粒子动力学结果显示荧光信号在11 h时出现了荧光强度增强的现象,分析导致该现象的原因可能有2个:其一,由于QUE-HNC在体内溶解后导致部分的游离探针复燃发出荧光信号,导致该部分的荧光信号强度较高,由猝灭组的活体成像图来看,这种情况的可能性比较低;其二,荧光信号发生向腹腔下部和脾脏处发生迁移,由于HNC的荧光信号强度受到浓度和透过组织深度的影响,因此该处的信

号也有可能是HNC再分布过程的信号突变,对于该现象还需要进一步的探究。

体内组织分布实验中猝灭组在24 h时发生了荧光复燃的情况,其很有可能与动物有关。本实验的小鼠体质量较大,其内脏的脂肪较多。P2探针是脂溶性探针,更倾向于蓄积溶解在脂肪组织中,随着时间的推移,P2探针在体内出现了复燃的现象,不过由于24 h内的荧光强度不大,对体内结果的干扰较小。

HNC在血液中的荧光强度要小于活体成像的,而且由于血样的测定是离体进行的,受到皮肤和毛发的干扰少,荧光强度反而更低,这表明血液中游离的荧光杂化纳米晶的量较少。这进一步表明大部分血液中的HNC会被快速地靶向到RES。同时粒子动力学结果也说明HNC不会在血中快速的溶解,而是有部分的HNC一直处于粒子状态。

药动学实验原本计划只采用醋酸乙酯萃取血浆中的QUE原型来分析QUE-HNC的药动学参数。但是能直接测定的原型药物较少,只有采用酸水解的方法才能检测到QUE。采用直接水解和沉淀蛋白的方法不能够有效地萃取血浆中的QUE,水解时加入的盐酸还会损伤色谱柱。因此本实验采用水解和萃取结合的方法,才能够对血浆样品进行有效测定。

药动学实验的结果反映了粒子快速消除的现象,但粒子动力学结果显示QUE-HNC并不会在血液中快速的溶解,而是能够在血中存在较长的时间,两者存在一定的差别,原因很有可能是该方法对QUE总浓度的测定,包括了QUE的原型药物和未溶解的药物粒子,因此产生了差异。此外由于不能够建立QUE-HNC浓度与荧光强度的线性关系,直接采用荧光强度代替浓度,也有可能产生差异。这说明通过荧光杂化纳米晶的方法直接观察粒子的行为是很有必要的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lv Y J, Wu W, Corpstein C D, et al. Biological and intracellular fates of drug nanocrystals through different delivery routes: Recent development enabled by bioimaging and PK modeling [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022, 188: 114466.
- [2] Sheng Y Z, Zhang S, Ling J W, et al. Oxybutynin nanosuspension gel for enhanced transdermal treatment for overactive bladder syndrome [J]. *Pharm Dev Technol*, 2022, 27(4): 459-468.
- [3] Lv Y J, He H S, Qi J P, et al. Visual validation of the measurement of entrapment efficiency of drug nanocarriers [J]. *Int J Pharm*, 2018, 547(1/2): 395-403.
- [4] Lu Y, Lv Y, Li T. Hybrid drug nanocrystals [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 143: 115-133.
- [5] Liu C, Cai Y F, Zhang Z C, et al. Julolidinyl aza-BODIPYs as NIR-II fluorophores for the bioimaging of nanocarriers [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(7): 3155-3168.
- [6] Yuan H L, Zhao W L, Wu W. How can aggregation-caused quenching based bioimaging of drug nanocarriers be improved? [J]. *Ther Deliv*, 2020, 11(1): 809-812.
- [7] He H S, Wang L T, Ma Y H, et al. The biological fate of orally administered mPEG-PDLLA polymeric micelles [J]. *J Control Release*, 2020, 327: 725-736.
- [8] Mirza M A, Mahmood S, Hilles A R, et al. Quercetin as a therapeutic product: Evaluation of its pharmacological action and clinical applications-a review [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(11): 1631.
- [9] Shen B D, Shen C Y, Zhu W F, et al. The contribution of absorption of integral nanocrystals to enhancement of oral bioavailability of quercetin [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(4): 978-988.
- [10] 李阳杰, 曹瑞梅, 毛雅君, 等. 槲皮素的结构修饰及生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1636-1653.
- [11] Li Y j, Cao R m, Mao Y j, et al. Research progress on structural modification and biological activity of quercetin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(5): 1636-1653.
- [12] Wang T, Qi J P, Ding N, et al. Tracking translocation of self-discriminating curcumin hybrid nanocrystals following intravenous delivery [J]. *Int J Pharm*, 2018, 546(1/2): 10-19.
- [13] Sigfridsson K, Skantze P, Skantze U, et al. Nanocrystal formulations of a poorly soluble drug. 2. Evaluation of nanocrystal liver uptake and distribution after intravenous administration to mice [J]. *Int J Pharm*, 2017, 524(1/2): 248-256.
- [14] Lu Y, Li Y, Wu W. Injected nanocrystals for targeted drug delivery [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(2): 106-113.
- [15] Hollis C P, Weiss H L, Leggas M, et al. Biodistribution and bioimaging studies of hybrid paclitaxel nanocrystals: Lessons learned of the EPR effect and image-guided drug delivery [J]. *J Control Release*, 2013, 172(1): 12-21.

【责任编辑 兰新新】