

二氢杨梅素磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备、表征及药动学研究

郜娜¹, 范明松², 杨庆宇³, 郝海军²

1. 郑州大学附属肿瘤医院 药学部, 河南 郑州 450000

2. 上海雷允上药业有限公司技术中心, 上海 201401

3. 郑州人民医院 药学部, 河南 郑州 450003

摘要:目的 制备二氢杨梅素(DMY)磷脂复合物(DMY-PC)和二氢杨梅素磷脂复合物纳米结构脂质载体(DMY-PC-NLC), 并分别进行体外内外评价。方法 溶剂挥发法制备 DMY-PC, 高压均质法制备 DMY-PC-NLC。采用正交试验优化 DMY-PC-NLC 处方中固液脂质比例, 固液脂质材料总用量, DMY-PC 投药量和泊洛沙姆 188 用量, 得出 DMY-PC-NLC 最佳制备处方。5%甘露醇为冻干保护剂进一步将 DMY-PC-NLC 制备成冻干粉末, 并比较 DMY-PC 和 DMY-PC-NLC 体外释放和体内药动学行为。结果 DMY 在 DMY-PC 中以无定形态存在, ¹H-NMR 显示 DMY 化学结构未发生改变。正交试验确定 DMY-PC-NLC 的最佳处方为固液脂质比例为 5:1, 固液脂质材料总用量为 325 mg, DMY-PC 投药量为 45 mg, 泊洛沙姆 188 用量为 0.9%。DMY-PC-NLC 平均粒径为 (197.25±4.42) nm, Zeta 电位为 (-18.2±2.1) mV, 包封率为 (71.68±1.36)%, 载药量为 (3.94±0.24)%。DMY-PC-NLC 体外释药模型符合 Weibull 模型, 方程为 $\ln(1-M_t/M_\infty)=0.7001 \ln t-1.9541$ ($r=0.9714$)。与 DMY 原料药相比, DMY-PC 相对生物利用度提高至 1.63 倍, 而 DMY-PC-NLC 提高至 3.22 倍。结论 与 DMY-PC 相比, DMY-PC-NLC 进一步促进了 DMY 的体内吸收, 有效提高了 DMY 口服吸收生物利用度。

关键词: 二氢杨梅素; 磷脂复合物; 纳米结构脂质载体; 包封率; 药动学; 溶剂挥发法; 高压均质法; 正交试验; Weibull 模型; 生物利用度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)17-4060-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.009

Preparation, characterization and pharmacokinetics of dihydromyricetin phospholipids complex loaded by nanostructured lipid carriers

GAO Na¹, FAN Ming-song², YANG Qing-yu³, HAO Hai-jun²

1. Department of Pharmacology, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

2. Technique Center, Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201401, China

3. Department of Pharmacology, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To prepare dihydromyricetin (DMY) phospholipids complex (DMY-PC) and its nanostructured lipid carriers (DMY-PC-NLC), and carry out *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Methods** DMY-PC was prepared by solvent evaporation method. High pressure homogenization method was used to prepare DMY-PC-NLC. Orthogonal test was employed to optimize the ratio of solid/liquid lipid, dose of lipids materials, dose of DMY-PC and the concentration of emulsifier of poloxamer. The lyophilized powder of DMY-PC-NLC was prepared with 5% of mannitol as protective agent. The comparison of *in vitro* release and pharmacokinetics between DMY-PC and DMY-PC-NLC was also studied. **Results** DMY was in an amorphous state in DMY-PC. The results of ¹H-NMR showed that the structure of DMY was not changed. The optimized prescription of DMY-PC-NLC determined by orthogonal test was as follow: The ratio of solid/liquid lipid was 5:1, dose of lipids materials was 325 mg, dose of DMY-PC was 45 mg and the concentration of emulsifier of poloxamer was 0.9%. The average size, Zeta potential, entrapment efficiency and drug loading of DMY-PC-NLC was (197.25±4.42) nm, (-18.2±2.1) mV, (71.68±1.36)% and (3.94±0.24)%, respectively. The *in vitro* release model was accord with Weibull model and the equation was $\ln(1-M_t/M_\infty)=0.7001 \ln t-1.9541$ ($r=0.9714$). The relative bioavailability of DMY-PC and DMY-PC-NLC were enhanced to 1.63 and 3.22 times compared to DMY, respectively. **Conclusion** Compared with

收稿日期: 2019-05-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81771025); 河南省重大科技专项 (162102310003)

作者简介: 郜娜 (1981—), 女, 本科, 主要从事医院药学研究。Tel: (0371)65587016 E-mail: gaona6677@126.com

DMY-PC, the absorption was promoted by DMY-PC-NLC in further, and the bioavailability of DMY was enhanced effectively.

Key words: dihydromyricetin; phospholipids complex; nanostructured lipid carriers; entrapment efficiency; pharmacokinetics; solvent evaporation method; high pressure homogenization method; orthogonal test; Weibull model; bioavailability

二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)主要存在于蛇葡萄科葡萄属植物中,属于二氢黄酮类化合物。现代药理学研究表明,DMY具有抗炎、降压、降血糖及治疗脂肪性肝炎等活性^[1-3]。近年来随着对DMY抗肿瘤活性的深入研究,发现DMY对乳腺癌、肝癌、鼻咽癌、肺癌等多种肿瘤细胞的增殖具有较强的抑制作用。抗肿瘤作用机制包括诱导肿瘤细胞周期阻滞、抑制肿瘤血管生成及抑制肿瘤侵袭和转移等^[4],因此非常有希望开发成为一种中药抗肿瘤药物。但DMY溶解度较差^[5],体内吸收困难,导致生物利用度较低^[6]。目前已有DMY包合物、微乳、脂质体及纳米胶束等制剂学研究^[7-8]。

纳米结构脂质载体(nanostructured lipid carriers, NLC)系采用固态和液态混合脂质为载体而制备的一种纳米给药系统^[9-12],与固体脂质纳米粒相比,具有相对较高的载药量和制剂稳定性等优势。但中药活性成分的亲脂性对NLC包封率影响较大,合适的亲脂性可提高包封率^[13-14]。磷脂复合物(phospholipids complex, PC)在改善中药活性成分脂溶性方面已获得制剂研究者的公认^[15-19],但PC具有较强的疏水性,体外溶出受限。本研究首先将DMY制备二氢杨梅素-磷脂复合物(DMY-PC),并对制备的DMY-PC进行表征。进一步将DMY-PC制备成DMY-PC-纳米结构脂质载体(DMY-PC-NLC),正交试验优化得出最佳处方,并对DMY-PC-NLC进行体外和体内药动学评价。期望为DMY制剂的开发、研究提供有价值的借鉴。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

DMY原料药,批号P20151015,质量分数99.0%,上海爱启医药技术有限公司;磷脂酰胆碱,批号PC-98T,质量分数>85%,上海艾韦拓医药科技有限公司;芹菜素对照品,批号P0587,质量分数99.4%,成都瑞芬思生物科技有限公司;单硬脂酸甘油酯、泊洛沙姆188,国药集团化学试剂有限公司;氘代甲醇(CD₃OD),美国Sigma公司;肝素,批号160507,南京新百药业有限公司;其他试剂为分析纯。

1.2 仪器

BP 210D型电子天平,赛多利斯科学仪器有限

公司;1200型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;R2000型旋转蒸发仪,艾卡仪器设备有限公司;400 MHz ADV III型核磁共振仪,Topspin 3.2试验控制及数据处理软件,瑞士Bruker公司;GJB300-100型均质机,常州均质机械有限公司;ZRS-8型智能溶出试验仪,天津大学无线电厂;Nanosep[®]超滤离心管,截留相对分子质量10 000,美国PALL公司;Nano ZS90型纳米粒度仪,英国Malvern公司;HX-10-50D型冻干机,上海沪析冷冻干燥机电设备公司;MD200-2型氮气吹扫仪,杭州奥威仪器有限公司;DZF-6050型真空干燥箱,上海跃进医疗器械厂。

1.3 动物

清洁级SD大鼠,体质量约为300 g,雌雄兼用,河南省实验动物中心,动物使用许可证号SCXK(豫)2016-0002。

2 方法与结果

2.1 DMY-PC的制备及纯化

按照物质的量比为1:1.2,分别称取DMY和磷脂酰胆碱适量置于三角烧瓶中,加入四氢呋喃100 mL。50℃水浴中磁力搅拌3 h至溶液澄清,于40℃减压旋干,收集残留物即得DMY-PC粗品。由于DMY难溶于石油醚,而DMY-PC在石油醚中溶解度较好,DMY-PC粗品具体纯化过程为石油醚加入到DMY-PC粗品中,采用0.22 μm微孔滤膜过滤出去游离的DMY。滤液经减压旋蒸后收集残留物即得纯DMY-PC,密封保存。物理混合物按同比例简单物理混合。

2.2 DMY-PC表征

2.2.1 DMY-PC存在状态研究 采用XRPD分别对DMY、磷脂酰胆碱、物理混合物和DMY-PC进行扫描。扫描条件为铜靶,管压40 kV,管流200 mA,扫描范围3°~45°,扫描速度5°/min。结果见图1,DMY的XRPD图谱呈现典型的晶型特征,DMY与磷脂酰胆碱制备的物理混合物中仍显现DMY的特征晶型峰,说明简单的混合不改变DMY的存在状态。而DMY-PC的XRPD图谱呈现典型的无定形特征,说明DMY-PC是不同于物理混合物的一种物质。

2.2.2 DMY-PC氢核磁共振(¹H-NMR)研究 DMY结构式中含有5个酚羟基(图2),选用CD₃OD作为氘代溶剂时,化学位移δ 3.33处为溶剂峰,δ 4.78

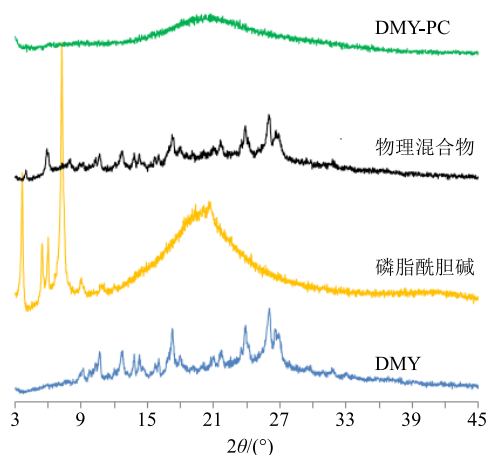


图 1 XRPD 图谱结果

Fig. 1 Results of XRPD spectrum

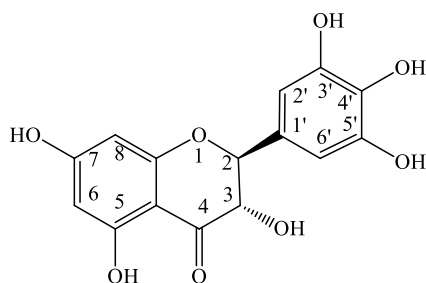
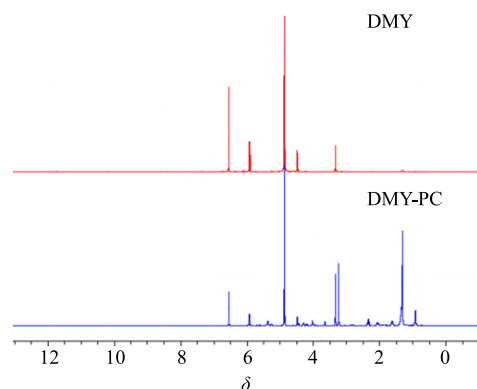


图 2 DMY 结构式

Fig. 2 Structure of DMY

处为水峰。由于 CD_3OD 的质子交换作用,使 DMY 结构中的 5 个酚羟基在氢谱中消失。DMY 的 $^1\text{H-NMR}$ 及其他 4 处峰归属分别见图 3 和表 1。将 DMY 制备成 DMY-PC 后,DMY 的 5 处质子峰在 DMY-PC 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱中仍可观察到,且化学位移及峰型均未发生变化,说明 DMY 与磷脂酰胆碱之间未发生化学反应。在 DMY-PC 中 DMY 仍保持自身的化学结构,这与相关研究观察到的现象一致^[20],但 DMY 在 DMY-PC 中峰强度明显变弱。

图 3 DMY-PC 和 DMY 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of DMY-PC and DMY表 1 DMY 的 $^1\text{H-NMR}$ 解析Table 1 $^1\text{H-NMR}$ spectrum data for DMY

δ	氢数	峰型	峰归属
4.45~4.50	1	d	H-2
4.84~4.87	1	d	H-3
5.88~5.99	2	m	H-6, 8
6.59~6.65	2	s	H-2', 6'

2.3 DMY-PC-NLC 的制备

按处方量称取 DMY-PC、单硬脂酸甘油酯和中链甘油三酯置于圆底烧瓶,75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热熔融后作为混合油相。另称取适量泊洛沙姆 188 溶解于 50 mL 蒸馏水中,并加热至 75 $^{\circ}\text{C}$ 后作为水相。设置搅拌速度为 1 000 r/min,将混合油相逐滴滴加至水相中制备初乳。装有初乳的圆底烧瓶置于冰水混合物中,于均质压力为 60 MPa 的条件下,循环高压均质 8 次,即得 DMY-PC-NLC。空白 NLC 采用磷脂酰胆碱代替 DMY-PC 同法制备。

2.4 DMY 含量分析

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Waters C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (45:55); 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长 291 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样体积 20 μL 。理论塔板数以 DMY 计不低于 8 000。典型色谱图见图 4。

2.4.2 线性关系考察 精密称取 DMY 对照品 25 mg, 溶解于 50 mL 乙腈即得 0.5 mg/mL 的 DMY 对照品储备液。采用乙腈-0.1%磷酸水溶液 (45:55) 逐步稀释到质量浓度为 25、12.5、5、0.5、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液,进行 HPLC 测定,以各质量浓度的峰面积 (A) 对质量浓度 (C) 进行线性回归,得标准曲线方程 $A=0.1008C+0.96895$, $r=0.9999$ 。

2.4.3 供试品溶液的制备 取 1.0 mL DMY-PC-NLC 置于 50 mL 量瓶中,加入约 30 mL 乙腈超声 3 min 后放置至室温,乙腈-0.1%磷酸水溶液 (45:55) 定容即得供试品溶液。

2.4.4 方法学研究 分别取 25、12.5、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 的 DMY 对照品溶液,分别连续进样 6 次,并计算其 RSD 值。结果显示,DMY 峰面积 RSD 值分别为 0.19%、0.24%、0.37%。取供试品溶液,于 0、2、4、6、12、24、48 h 时间点分别进样测定 DMY 峰面积,计算其 RSD 值为 1.17%。取 DMY-PC-NLC,按照“2.4.3”项方法配制供试品溶液 6 份,按照“2.4.1”项色谱条件分别进行 HPLC 测定,计算其 RSD 值。结果显示 6 批 DMY-PC-NLC 的 RSD 值为 1.43%。

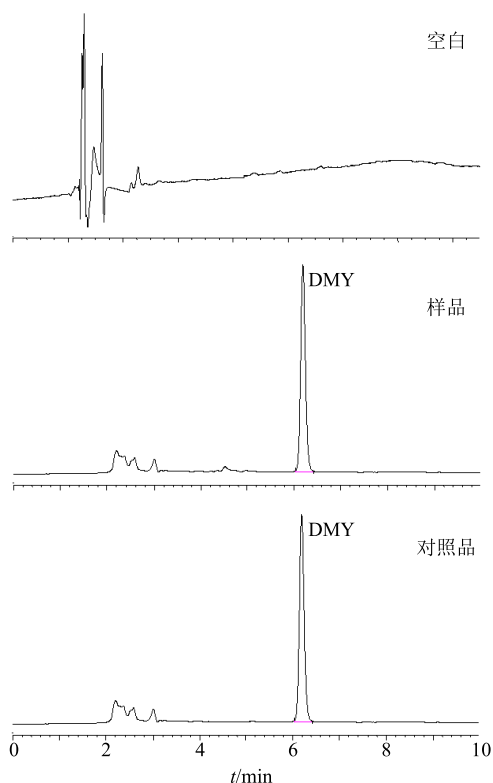


图 4 DMY 定量测定色谱图

Fig. 4 Quantitative determination of DMY by HPLC

说明分析方法的重复性良好。取 9 份 1.0 mL 空白 NLC 混悬液置于 50 mL 的量瓶中,分别加入高(20.0 $\mu\text{g/mL}$)、中(12.5 $\mu\text{g/mL}$)、低(5.0 $\mu\text{g/mL}$)的 DMY 对照品溶液,每种质量浓度分别配制 3 份,加入约 30 mL 乙腈超声 3 min 后放置至室温,乙腈-0.1%磷酸水溶液(45:55)定容,分别进行 HPLC 测定 DMY 含量,并计算回收率。结果显示回收率在 98.83%~99.56%,3 种质量浓度的 RSD 值均小于 1.51%。

2.5 包封率及载药量的测定

取 1.0 mL DMY-PC-NLC 加入到超速离心管中,12 000 r/min 离心 30 min,测定滤液中游离 DMY 含量($m_{\text{游离}}$)。另量取 1.0 mL DMY-PC-NLC 至 10 mL 量瓶中,乙腈超声并定容,测定 DMY 总量($m_{\text{总}}$)。计算 DMY-PC-NLC 的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = (m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / (m_{\text{总脂膜}} + m_{\text{总}} - m_{\text{游离}})$$

$m_{\text{总}}$ 表示 DMY 总量, $m_{\text{游离}}$ 表示游离 DMY 含量, $m_{\text{总脂膜}}$ 表示 DMY-PC-NLC 固态和液态脂质总量

2.6 正交试验优化 DMY-PC-NLC 制备工艺

正交试验优化以包封率为评价指标。根据预试验,选择脂质材料总用量(A)、固液脂质材料比例

(B)、DMY-PC 的投药量(C)和泊洛沙姆 188 的质量分数(D),设计 4 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交设计表。因素水平和结果见表 2,4 因素的方差分析见表 3。由表 3 中极差值可判断出选定的各因素影响大小顺序为 $A > B > C > D$ 。由各因素均值大小可知最佳处方为 $A_2B_1C_2D_1$ 。即 DMY-PC-NLC 最佳处方为固液脂质材料总用量为 325 mg,固液脂质材料比例为 5:1,DMY-PC 投药量为 45 mg,泊洛沙姆 188 的质量分数为 0.9%。按照“2.5”项下方法测定 3 批 DMY-PC-NLC 的包封率为 $(71.68 \pm 1.36)\%$,载药量为 $(3.94 \pm 0.24)\%$ 。

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

试验号	A/mg	B	C/mg	D/%	包封率/%
1	350 (1)	5 : 1 (1)	50 (1)	0.9 (1)	68.67
2	350 (1)	4 : 1 (2)	45 (2)	1.0 (2)	65.34
3	350 (1)	3 : 1 (3)	40 (3)	1.1 (3)	50.28
4	325 (2)	5 : 1 (1)	45 (2)	1.1 (3)	68.66
5	325 (2)	4 : 1 (2)	40 (3)	0.9 (1)	64.13
6	325 (2)	3 : 1 (3)	50 (1)	1.0 (2)	56.87
7	300 (3)	5 : 1 (1)	40 (3)	1.0 (2)	54.37
8	300 (3)	4 : 1 (2)	50 (1)	1.1 (3)	51.71
9	300 (3)	3 : 1 (3)	45 (2)	0.9 (1)	46.14
K_1	184.29	191.70	177.25	178.94	
K_2	189.66	181.18	180.14	176.58	
K_3	152.22	153.29	168.78	170.65	
R	37.44	38.41	11.36	8.29	

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

方差来源	方差	自由度	F 值	显著性
A	273.230 6	2	22.465 8	$P < 0.05$
B	262.650 1	2	21.595 8	$P < 0.05$
C	23.238 1	2	1.910 7	
D(误差)	12.162 1	2	1.000 0	

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

2.7 DMY-PC-NLC 粒径及 Zeta 电位

取最佳处方制备的 DMY-PC-NLC,采用蒸馏水 1:10 稀释后,测得平均粒径为 (197.25 ± 4.42) nm,聚合物分散系数(polymer dispersion index, PDI)为 0.122 ± 0.034 ,典型图谱见图 5。测得 Zeta 电位为 (-18.2 ± 2.1) mV,典型图谱见图 6。

2.8 DMY-PC-NLC 冻干粉末的制备

取 2 mL DMY-PC-NLC 置于西林瓶中,加入 5%

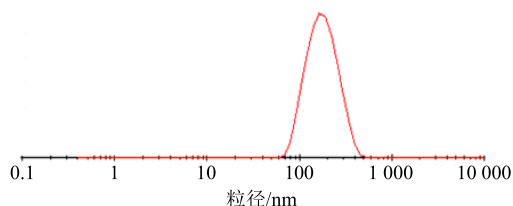


图 5 DMY-PC-NLC 粒径分布

Fig. 5 Particle size distribution of DMY-PC-NLC

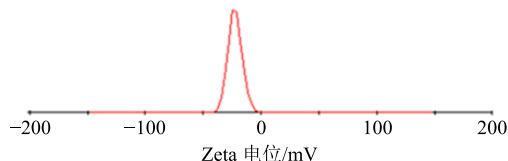


图 6 DMY-PC-NLC 的 Zeta 电位

Fig. 6 Zeta potential of DMY-PC-NLC

表 4 DMY-PC-NLC 冻干粉末的冻干程序

Table 4 Freeze-drying procedure of freeze-dried powder of DMY-PC-NLC

程序	温度/℃	时间/h
预冻阶段	(1) -65	16
升华阶段	(1) -50	4
	(2) -40	12
	(3) -30	4
	(4) -20	2
解析阶段	(1) 0	4
	(2) 15	4
	(3) 25	6

甘露醇，震荡混匀。按照表 4 冻干程序，混合液经历预冻（-65℃ 温度保持不变 16 h）、升华阶段（4 个升温点）和解析阶段（3 个升温点）进行冻干，并在 52 h 后于 25℃ 维持 6 h，最终得 DMY-PC-NLC 冻干粉末。

2.9 体外释放及机制研究

取 DMY-PC-NLC 冻干粉、DMY-PC 和 DMY 原料药（以 DMY 计，含量 40 mg），2 mL 蒸馏水制备混悬液，置于透析袋中，两端扎紧。设置溶出仪速度为 75 r/min，温度为 37℃，溶出介质为 900 mL 的蒸馏水。分别于 0、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12、18、24 h 时间点取样 4 mL，立即补加 4 mL 蒸馏水。测定取样液中 DMY 含量，计算各个时间点的药物累积释放率，结果见图 7。DMY 原料药在 4 h 内累积释放率达到 97.12%。DMY-PC 溶出速率较慢，这与 DMY-PC 疏水性较强、分散性较差有关。DMY-PC-NLC 在前期 8 h 内释药相对较快，累积释放率为 45.37%，之后具有明显的缓释特征，在 24 h

内累积释放率为 63.73%。分别以零级模型、一级模型、Weibull 模型和 Higuchi 模型对 DMY-PC-NLC 体外释药行为进行拟合，并以相关系数（ r ）判断最佳释药模型，结果见表 5。DMY-PC-NLC 体外释药模型更符合 Weibull 模型，方程为 $\ln \ln(1-M_t/M_\infty) = 0.7001 \ln t - 1.9541$ ， $r = 0.9714$ ，其中， M_t 为 t 时间累积释放率， M_∞ 为 ∞ 时累积释放率， M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放率， t 为时间。另外，分别以零级模型、一级模型、Weibull 模型和 Higuchi 模型对 DMY-PC 和原料药体外释药行为进行拟合，DMY-PC 体外释药也最符合 Weibull 模型，方程为 $\ln \ln(1-M_t/M_\infty) = 0.6899 \ln t - 2.5683$ ， $r = 0.9756$ ；DMY 原料药在前 4 h 内释药模型更符合一级释药模型，方程为 $\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.7153 t + 0.0648$ ， $r = 0.9894$ 。

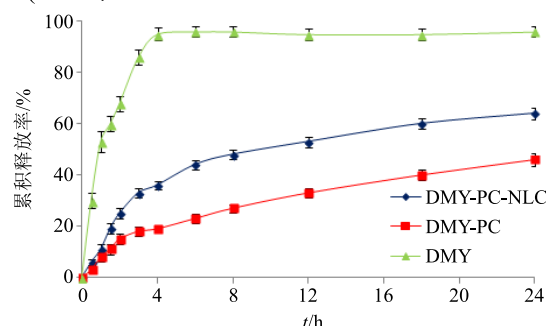
图 7 DMY、DMY-PC 和 DMY-PC-NLC 体外释药曲线 ($n = 6$)Fig. 7 Release profile *in vitro* of DMY, DMY-PC and DMY-PC-NLC ($n = 6$)

表 5 药物释放模型和相关系数

Table 5 Fitting release model and coefficient of drug

模型	拟合方程	r
零级模型	$M_t/M_\infty = 0.0245 t + 0.1692$	0.8780
一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.0412 t - 0.1798$	0.9352
Higuchi 模型	$M_t/M_\infty = 0.1406 t^{1/2} + 0.0284$	0.9699
Weibull 模型	$\ln \ln(1-M_t/M_\infty) = 0.7001 \ln t - 1.9541$	0.9714

2.10 体内药动学研究

2.10.1 给药溶液的配制 称取 DMY 原料药、DMY-PC 和 DMY-PC-NLC 适量，加入体积为 3 mL 质量分数为 0.5% 的 CMC-Na 溶液，配制成 50.0 mg/mL 的给药混悬液（以 DMY 含量计）。

2.10.2 分组、给药及血样采集 取 SD 大鼠 18 只，雌雄兼用，随机分为 3 组。按 150 mg/kg 剂量（以 DMY 计）分别 ig 给予 DMY 原料药、DMY-PC 和 DMY-PC-NLC 的给药混悬液。于 0.083、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12 h 时间点，眼眶取血

0.3 mL, 玻璃毛细管引流至肝素化离心管中, 混匀。4 000 r/min 离心 2 min, 分取上层血浆置于冰箱冷冻保存。

2.10.3 血浆样品的处理 量取正己烷 100 mL, 二氯甲烷 70 mL 和异丙醇 15 mL, 混匀, 超声 5 min 后即得血浆样品的提取溶液。精密吸取解冻后的血浆样品 100 μ L 和内标溶液 40 μ L, 涡旋混匀后加入 4 mL 提取溶剂, 混匀后涡旋 4 min。10 000 r/min 离心 10 min, 小心分取上层有机相, 40 $^{\circ}$ C 氮气缓慢吹除有机溶剂得残渣。加入 100 μ L 的流动相复溶。

2.10.4 色谱条件及线性关系考察 精密称取 10.0 mg 的芹菜素对照品溶解于 10 mL 乙腈, 进一步用流动相稀释至 1.0 μ g/mL 即得内标溶液。取“2.4.2”项下 DMY 对照品溶液, 大鼠空白血浆配制 20、50、100、200、400、800 ng/mL 的 DMY 血浆溶液, 按照“2.10.3”项下处理。流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (40:60), 其他色谱条件同“2.4.1”项下, HPLC 法测定 DMY 各个质量浓度的峰面积和内标的峰面积。DMY 与内标峰面积之比 (A_s/A_i) 为横坐标, DMY 质量浓度 (C) 为纵坐标进行线性回归后得方程 $C=179.864\ 2\ A_s/A_i-0.48$, $r=0.991\ 4$ 。由 r 可知, DMY 在 20~800 ng/mL 线性关系良好。

2.10.5 方法学考察 分别取大鼠空白血浆, 血浆对照品及血浆样品。流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液 (40:60), 其他色谱条件同“2.4.1”项下色谱条件进行 HPLC 测定, 典型色谱图见图 8, 血浆内源性物质不干扰 DMY 和内标色谱峰, 专属性较高。其中, DMY 约在 6.1 min 处出峰, 内标在 7.08 min 处出峰。取 20、400、800 ng/mL 的 DMY 血浆溶液, 分别作为低、中、高质量浓度。各质量浓度连续进样 6 次后计算低、中、高质量浓度血浆样品的 RSD 值分别为 13.62%、10.83%、6.12%。6 d 内分别进行测定, 计算低、中、高质量浓度血浆样品的 RSD 值分别为 12.55%、6.89%、7.93%。取 DMY-PC-NLC 给药 0.5 h 的血浆样品, 分别于 12 h 内测定 DMY 与内标峰面积比值, 计算得 RSD 值 1.87%。大鼠空白血浆分别配制低 (20 ng/mL)、中 (400 ng/mL)、高 (800 ng/mL) 质量浓度, 进行 HPLC 测定, 将测得的峰面积带入方程得测定质量浓度, 并与配制质量浓度进行对比得出回收率。实验表明低、中、高质量浓度回收率在 86.49%~102.67%。取 DMY 血浆对照品进行逐步稀释, 结果显示定量限 ($S/N=10$) 为 20 ng/mL, 检测限 ($S/N=3$) 为 10 ng/mL。综合

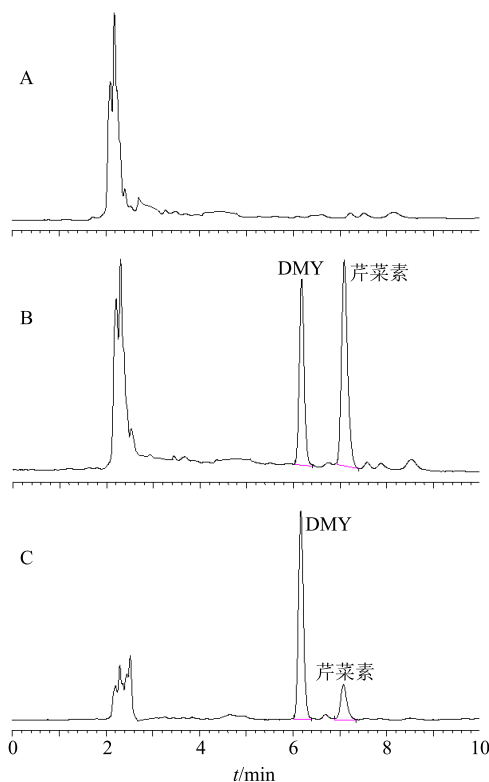


图 8 空白血浆 (A)、DMY+芹菜素 (内标)+空白血浆 (B) 和血浆样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC of blank plasma (A), DMY + apigenin (internal standard) + blank plasma (B), and plasma sample (C)

方法学考察结果, 建立的 HPLC 方法和血浆处理方法可用于 DMY 血浆样品分析。

2.10.6 药动力学结果 药-时曲线见图 9。主要药动力学参数采用 3P97 软件进行数据处理, 拟合的 DMY 在大鼠体内药动过程均符合二室模型。AUC 和 C_{max} 经对数转换后采用独立样本 t 检验, $t_{1/2}$ 和 t_{max} 采用非参数法秩和检验, 结果见表 6。与 DMY 相比, DMY-PC 的 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 差异均具有显著性 ($P<0.05$), 而 t_{max} 、 C_{max} 和 $t_{1/2}$ 等参数差异无显著性 ($P>0.05$)。DMY-PC 进一步制备成 DMY-PC-

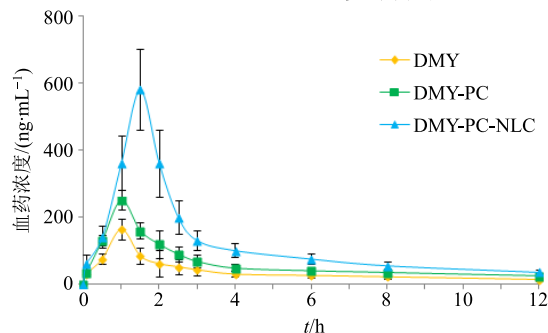


图 9 药-时曲线 ($n=6$)

Fig. 9 Profiles of plasma concentration-time ($n=6$)

表 6 主要药动学参数 ($n = 6$)
Table 6 Main pharmacokinetic parameters ($n = 6$)

参数	单位	DMY	DMY-PC	DMY-PC-NLC
$t_{\max}$	h	1.04 ± 0.27	1.08 ± 0.26	1.67 ± 0.35* [#]
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	165.02 ± 39.14	251.09 ± 67.24	583.14 ± 101.76*** [#]
$t_{1/2}$	h	2.91 ± 0.67	3.09 ± 0.75	4.53 ± 0.71*** [#]
AUC_{0-12}	ng·h·mL ⁻¹	445.14 ± 66.43	727.93 ± 96.17*	1 459.90 ± 216.02*** [#]
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	519.71 ± 74.11	1 035.56 ± 171.63*	1 663.05 ± 231.64*** [#]
CL	mL·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	65.81 ± 8.36	57.46 ± 7.14	46.03 ± 6.42*** [#]

与 DMY 原料药相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 DMY-PC 相比: [#] $P < 0.05$ *** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs DMY; [#] $P < 0.05$ *** $P < 0.01$ vs DMY-PC

NLC 后, $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 等药动学参数均有显著变化 ($P < 0.05$ 、 0.01), 说明 DMY-PC-NLC 极大改变了 DMY 在体内的药动学行为。DMY-PC-NL 与 DMY-PC 相比, $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 等药动学参数也具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01), 说明 DMY-PC-NLC 可进一步促进 DMY-PC 体内吸收。清除率 (CL) 均下降, 其中 DMY-PC-NL 的 CL 与 DMY 或 DMY-PC 相比差异具有显著性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 体内循环时间延长。与 DMY 相比, DMY-PC 相对生物利用度提高至 1.63 倍, 而 DMY-PC-NLC 提高至 3.22 倍。

3 讨论

超速离心法测定包封率时, 具有操作简单, 费用较少等优势。但前期研究发现, 当转速达到 20 000 r/min 时, 通过采用纳米粒度仪测定上清液, 发现仍有纳米粒子存在, 表明高速离心法并不能使 DMY-PC-NLC 完全沉淀。采用葡聚糖凝胶柱法测定包封率时, 出现回收率较低或洗脱过程葡聚糖凝胶塌陷现象, 因此也不合适。超滤法是在离心力的作用下, 利用筛分原理对相对分子质量较大的溶质或纳米粒进行截留, 从而实现有效分离。采用纳米粒度仪测定超滤法滤液时, 未能检测到纳米粒, 说明超滤离心管可以截留 DMY-PC-NLC, 因而最终选用超滤法测定包封率及载药量^[21]。

磷脂酰胆碱分子由 2 条自由移动的非极性尾部及极性头部构成, 其中 2 条尾部含有非饱和的双键及饱和的脂肪酸链。有报道认为^[16], 药物与磷脂酰胆碱形成磷脂复合物时, 自由移动的的非极性尾部包裹了药物分子, 使药物分子与磷脂酰胆碱极性端定向结合, 使药物分子高度分散在磷脂酰胆碱中, 各自的晶型特征被抑制, 从而表现出无定型状态。磷脂酰胆碱中磷原子上羟基的氧原子有得电子能

力, 而氮原子有失电子能力, 可与药物分子之间以氢键或范德华力结合在一起, 但并不能形成新的化合物, 因而在 ¹H-NMR 图谱上认可观察到 DMY 的各个基团峰, 但峰强度发生明显下降。

PC 技术可改善难溶性药物的脂溶性, 但 PC 分散性很差, 导致体外溶出速率较慢。本研究将 DMY-PC 制备成 DMY-PC-NLC 后, 极大提高了分散性。同时由于 NLC 的包裹保护作用, 使 DMY-PC 免受水相环境、酶等因素对其破坏, 也有助于提高 DMY-PC 的稳定性, 为进一步提高生物利用度奠定了基础。因此, 不同制剂新技术的联用可以弥补单种制剂技术的某种不足。

药动学研究结果显示, DMY-PC-NLC 的 $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 等药动学参数与 DMY-PC 相比具有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01), 说明 DMY-PC-NLC 可进一步促进 DMY-PC 体内吸收。课题组前期将本处方中物理混合物代替 DMY-PC, 其他处方及制备工艺均保持不变, 制备 DMY-NLC。测定 DMY-NLC 包封率为 (58.79 ± 1.70) %, 低于 DMY-PC-NLC 的包封率 (71.68 ± 1.36) %。这可能与 DMY-PC 改善了 DMY 的脂溶性有关, 使更多的药物被包裹进 NLC 中, 再次体现出不同制剂技术联用的必要性。

本实验中用到的磷脂酰胆碱除了改善 DMY 亲脂性, 提高包封率, 还可与泊洛沙姆 188 发生协同作用, 对 DMY-PC-NLC 的粒径分布均匀及制剂稳定性的提高也有一定益处^[22]。与 DMY 相比, DMY-PC-NLC 的生物利用度提高至 3.22 倍。NLC 由于较小的粒径可增加与胃肠道黏膜的接触面积, 有助于增加药物吸收; 同时 DMY-PC-NLC 中的磷脂及非离子表面活性剂泊洛沙姆 188 可提高胃肠道黏膜的通透性、增加药物在胃肠道的滞留时间等^[23-24], 也

可促进药物吸收。另外, NLC 可在淋巴结构 Peyer's patches 中聚集, 经 M 细胞吸收进入体循环^[25-28], 最终极大提高了 DMY 的生物利用度。本研究证明了 DMY-PC 与 NLC 联用的必要性及可行性, 接下来研究重点放在 DMY-PC-NLC 的药效学评价上, 为 DMY-PC-NLC 提供更为全面的研究资料。

参考文献

- [1] 侯小龙, 王文清, 施春阳, 等. 二氢杨梅素药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 603-609.
- [2] 谢雪佳, 王晨光, 侯小龙, 等. 冷却结晶法纯化二氢杨梅素的工艺 [J]. 医药导报, 2017, 36(8): 912-917.
- [3] 周海云, 王文清, 施春阳, 等. 二氢杨梅素药理及药物相互作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3411-3418.
- [4] 周防震, 张晓元, 郭勇. 二氢杨梅素抗肿瘤活性及其机制的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(9): 1914-1916.
- [5] 白秀秀, 夏广萍, 赵娜夏, 等. 羟丙基- β -环糊精对二氢杨梅素的增溶作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 12-14.
- [6] Lu L, Yin X L, Wang X, *et al.* Determination of dihydromyricetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 657-662.
- [7] 张文娟, 陈一桢, 唐兰如, 等. 二氢杨梅素长循环纳米脂质体的制备及大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 806-813.
- [8] 向东, 熊微, 王文清, 等. 二氢杨梅素制剂新技术与新剂型的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 689-694.
- [9] Nagaich U, Gulati N. Nanostructured lipid carriers (NLC) based controlled release topical gel of clobetasol propionate: Design and *in vivo* characterization [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2016, 6(3): 289-298.
- [10] 管庆霞, 张伟兵, 张喜武, 等. 马钱子碱纳米结构脂质载体处方与制备工艺的优化 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2557-2563.
- [11] 郑娟, 沈成英, 庞建云, 等. 丹参酮 II_A 纳米结构脂质载体的体外评价及其对 HaCaT 细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4340-4344.
- [12] 庞建云, 沈成英, 周敏, 等. 异补骨脂素纳米结构脂质载体的体外溶出及其抗白癜风活性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1796-1801.
- [13] 李月灵, 王丽华, 周竞. 青藤碱磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备、表征及药动学研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(4): 669-674.
- [14] Li M, Zheng Y, Shan F Y, *et al.* Development of ionic-complex-based nanostructured lipid carriers to improve the pharmacokinetic profiles of breviscapine [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(6): 1108-1115.
- [15] 王益, 李婉蓉, 杨佳佳, 等. 氧化苦参碱磷脂复合物自乳化释药系统的研制 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4277-4283.
- [16] 魏永鸽, 徐凯. 青藤碱磷脂复合物的制备、表征及体外透皮研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(8): 1449-1453.
- [17] 宋婷, 宋丹, 管海燕, 等. 松萝酸磷脂复合物在大鼠体内的药动学及组织分布研究 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1358-1364.
- [18] 刘蒸生, 郝海军, 马进安. 高乌甲素磷脂复合物及其固体分散体在大鼠体内的药动学 [J]. 医药导报, 2018, 37(4): 449-452.
- [19] 邓向涛, 郝海军, 陈晓峰, 等. 木犀草素 2 种固体分散体制备、表征和大鼠体内药动学行为研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5787-5793.
- [20] Pu Y Q, Zhang X T, Zhang Q, *et al.* 20(S)-Protopanaxadiol phospholipid complex: Process optimization, characterization, *in vitro* dissolution and molecular docking studies [J]. *Molecules*, 2016, 21(10): 1396-1409.
- [21] 李园, 陈桐楷, 林华庆, 等. 石杉碱甲固体脂质纳米粒包封率的测定方法研究 [J]. 广东药学院学报, 2010, 26(2): 111-114.
- [22] 冯诗杨, 王春杰, 丁圆平, 等. 艾叶挥发油纳米结构脂质载体的制备 [J]. 中成药, 2018, 40(1): 70-75.
- [23] 孙迎东, 汪风芹, 张金杰, 等. 氟康唑温敏型原位用凝胶基质处方优化 [J]. 医药导报, 2018, 37(12): 1494-1497.
- [24] 任少琳, 符馨尹, 裔文静. 肝素-泊洛沙姆 407 新材料应用进展 [J]. 医药导报, 2019, 38(1): 75-78.
- [25] 徐凯, 魏永鸽. 高乌甲素磷脂复合物纳米粒的制备、表征及药动学研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(5): 870-874.
- [26] 盛剑勇, 杨晓宇, 陈佶棠, 等. 胰岛素口服纳米给药系统研究进展 [J]. 医药导报, 2018, 37(6): 703-707.
- [27] 高彩芳, 夏加璇, 朱颖, 等. 纳米技术在改善中药有效成分成药性中的应用 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2754-2762.
- [28] 王耿焕, 沈和平, 金成胜, 等. 鬼臼毒素纳米靶向制剂的制备与理化性质评价 [J]. 医药导报, 2018, 37(10): 1237-1240.