·药剂与工艺·

不同粒径波棱甲素纳米混悬剂的制备及药动学研究

杭凌宇[1,2]，申宝德[2]，沈成英[2]，杨　阔[1]，袁海龙[2*]

1. 江西中医药大学药学院，江西 南昌　330004
2. 空军特色医学中心 药学部，北京　100042

摘　要：目的　制备不同粒径波棱甲素纳米混悬剂（herpetrione nanosuspension，Her-NS），并探讨粒径对 Her-NS 口服生物利用度的影响。**方法**　采用反溶剂沉淀法制备 2 种不同粒径 Her-NS，采用单因素实验以平均粒径、多分散系数、稳定性指数为评价指标优化处方工艺参数，扫描电子显微镜（SEM）观察 Her-NS 形态，X 射线衍射（XRD）分析晶型，透析法研究体外释放特性。通过 SD 大鼠比较 2 种不同粒径 Her-NS 口服药动学差异。**结果**　以 P188、P407 为稳定剂分别制备了 200、450 nm 2 种不同粒径 Her-NS（Her-NS_{200}、Her-NS_{450}），SEM 显示 2 种粒径的 Her-NS 均为球状，XRD 分析表明 2 种粒径 Her-NS 均为无定型态。体外释放度与药动学结果显示，与波棱甲素原料药比较，2 种粒径 Her-NS 的累积释放度明显提高，Her-NS 的达峰浓度（C_{max}）、药时曲线下面积（$AUC_{0\sim t}$）均显著提高；Her-NS_{200} 的 C_{max}、$AUC_{0\sim t}$ 均高于 Her-NS_{450}。**结论**　Her-NS 可明显提高波棱甲素口服生物利用度，且粒径越小，生物利用度越高。

关键词：波棱甲素；反溶剂沉淀法；纳米混悬剂；粒径；体外释放；药动学；口服生物利用度

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2021)07 - 1898 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.07.006

Preparation and *in vivo* pharmacokinetic behaviors of herpetrione nanosuspensions

HANG Ling-yu[1,2], SHEN Bao-de[2], SHEN Cheng-ying[2], YANG Kuo[1], YUAN Hai-long[2]

1. College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
2. Department of Pharmacy, Air Force Medical Center, Beijing 100042, China

Abstract: Objective　To prepare herpetrione nanosuspension (Her-NS) with different particle sizes, and explore the effects of particle size on the oral bioavailability. **Methods**　Her-NS with two different particle sizes were prepared by anti-solvent precipitation method, and optimized by single factor experiments with average particle size, polydispersity index, and stability index as evaluation indexes. The morphology of Her-NS was observed by scanning electron microscope (SEM), and the physical state was analyzed by X-ray diffraction (XRD). The drug release of Her-NS was evaluated by dialysis method. The oral pharmacokinetics of Her-NS with two different particle sizes were compared using SD rats. **Results**　Her-NS with two different particle sizes around 200 nm (Her-NS_{200}) and 450 nm (Her-NS_{450}) were successfully prepared with P188 and P407 as stabilizers. SEM showed that Her-NS with two different particle sizes were all spherical in shape, and the XRD analysis showed that Her-NS with two different particle sizes were amorphous. *In vitro* release and pharmacokinetic results showed that the cumulative release and the C_{max} and AUC_{0-t} of Her-NS with two different particle sizes were significantly increased as compared to coarse Her, but the C_{max} and AUC_{0-t} of the Her-NS_{200} were higher than those of Her-NS_{450}. **Conclusion**　NS can significantly improve the oral bioavailability of Her, and the small particle size is more significant.

Key words: herpetrione; anti-solvent precipitation method; nanosuspension; particle size; *in vitro* release; pharmacokinetics; oral bioavailability

收稿日期：2020-11-23

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81573697）；国家自然科学基金资助项目（81873092）；国家重大新药创制（2016ZX09101073）

作者简介：杭凌宇，博士研究生，研究方向为中药制剂工程技术研究。E-mail: 445914871@qq.com

***通信作者：**袁海龙，博士，研究员，博士生导师，研究方向为中药新型给药系统。Tel: (010)66928505　E-mail: yhlpharm@126.com

波棱瓜子是葫芦科波棱瓜属植物波棱瓜 *Herpetospermum caudigerum* Wall.的干燥成熟种子，为藏医临床治疗肝病的常用药物之一[1]。波棱瓜子药用历史悠久，疗效确切，其味苦，性寒，能清腑热、胆热，具有清热解毒、去火降热、助消化的作用，用于治疗肝热、黄疸性传染型肝炎等[1]。现代研究表明，波棱瓜子具有保肝降酶、抗乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）及抗肝纤维化等多种药理作用[2-3]。波棱甲素（herpetrione，Her）分子式为 $C_{30}H_{32}O_{10}$，相对分子质量 552.579，是从波棱瓜子的中分离得到的活性木脂素单体化合物[4-5]，其对 *D*-氨基半乳糖诱导的小鼠急性肝损伤具有明显的保护作用，可有效抑制 HepG2.215 细胞乙型肝炎表面抗原 HBsAg 和乙型肝炎 e 抗原 HBeAg 的表达及 HBV-DNA 的复制，并呈现一定的剂量相关性。但它在水中几乎不溶，属于难溶性木脂素类药物，口服生物利用度低，极大地限制了该药物的临床应用。

纳米混悬剂（nanosuspension，NS）是由药物粒子与少量稳定剂组成的亚微胶体分散体系[6-7]，不同于传统意义上的基质骨架型纳米体系，NS 辅料添加少，载药量高，尤其适用于难溶性中药有效成分及有效部位的开发[8]。近年来，NS 的体内行为越来越受到关注。研究发现，粒径通过影响表观溶解度及其在生物膜上的通透性和转运途径从而影响 NS 的吸收和分布[9-11]。

本实验采用反溶剂沉淀法制备 2 种不同粒径的 Her-NS，以平均粒径（PS）、多分散指数（PDI）及稳定性指数（SI）为指标，通过单因素实验优化处方和工艺，利用扫描电子显微镜（SEM）、X 射线衍射分析（XRD）观察其形态、晶型变化，并进行初步的药动学研究。

1 仪器与试药

LCMS-2010EV 高效液相色谱仪，日本岛津公司；Winner802 纳米粒度仪，济南微纳颗粒仪器股份有限公司；BT125D 分析天平，北京赛多利斯科学仪器有限公司；DF-101D 集热式恒温加热磁力搅拌器，巩义市予华仪器有限责任公司；KH5200DB 型数控超声波清洗器，昆山禾创超声仪器有限公司；SHB-III循环水式多用真空泵，郑州长城科工贸有限公司；WH861 涡旋混合器，北京科尔德科贸有限公司；S-4800 扫描电子显微镜，日本日立公司。

波棱甲素，质量分数≥95%，实验室自制，批号 SPR190505-KZ01；泊洛沙姆 188（P188）、泊洛沙姆 407（P407）均购于北京凤礼精求商贸有限责任公司；羟丙甲纤维素 HPMC-E15、HPMC-E50，购自安徽山河药用辅料有限公司；甲醇、乙腈为色谱纯；其他试剂为分析纯。

SD 大鼠，雄性，体质量（200±20）g，SPF 级，北京科宇动物养殖中心，动物许可证号 SCXK（京）2018-0010。动物实验经空军特色中心伦理委员会批准，批准文号：空特（科研）第 2020-148-PJ01。

2 方法与结果

2.1 波棱甲素纳米混悬剂（Her-NS）的制备

采用反溶剂沉淀法制备 Her-NS[12-13]。称取 50 mg Her 粉末，溶于 0.25 mL 乙醇溶液中，超声使其充分溶解。然后在磁力搅拌条件下，将含有 Her 的乙醇溶液快速倒入到 5 mL 含有一定量稳定剂溶液中，减压旋蒸挥去有机溶剂，补充适量去离子水定容至原体积，即得 Her-NS。

2.2 粒径分析

取适量 Her-NS，加蒸馏水稀释 20 倍，采用纳米粒度仪测定 PS 与 PDI，重复测定 3 次，取平均值。

2.3 SI 的测定

取适量 Her-NS 于离心管中，1500 r/min 离心 30 min，取上层混悬液，加蒸馏水稀释 20 倍，采用纳米粒度仪测定 PS 与 PDI，重复测定 3 次，取平均值，Her-NS 的稳定性通过 SI 进行评估，SI 值越接近 1，表示 Her-NS 越稳定。

SI＝离心前 PS/离心后 PS

2.4 单因素考察

本实验以纳米混悬剂的 PS、PDI 和 SI 为评价指标，分别对稳定剂种类、稳定剂用量、联合稳定剂比例、药物与稳定剂比例、搅拌转速 5 个因素进行考察。

2.4.1 稳定剂种类的筛选 固定稳定剂用量为 0.6%，药物与稳定剂比例为 2∶1，搅拌转速 600 r/min，考察 P188、P407、羟丙基甲基纤维素（HPMC）E15 和 HPMC E50[14]对 Her-NS 的 PS、PDI 和 SI 的影响，结果见图 1 和表 1。以 HPMC 系列作为稳定剂，所制备的混悬液不稳定，易产生药物黏壁的现象。单独以 P407 为稳定剂时，Her-NS 的 PDI 虽然小于 0.3（SI＞0.75），但粒径较大；单独以 P188 为稳定剂时，纳米混悬剂的粒径小，但 PDI 大于 0.3 或 SI＜0.60；因此，选择将 P188 和 P407 联用作为 Her-NS 的稳定剂。

2.4.2 稳定剂用量的筛选 固定药物与稳定剂比例

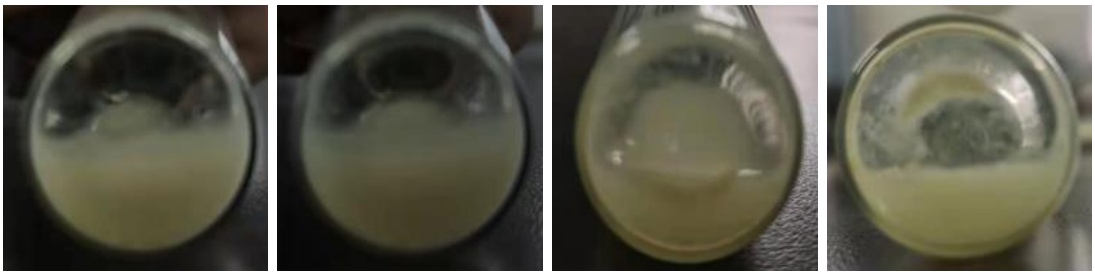


图 1　稳定剂种类的影响

Fig. 1　Effect of stabilizer type on Her-NS

表 1　稳定剂种类对 Her-NS 的 PS、PDI 和 SI 的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 1　Effect of stabilizer type on particle size, PDI and SI of Her-NS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

稳定剂种类	PS/nm	PDI	SI
P188	167.80±18.49	0.302±0.090	0.60±0.12
P407	492.21±28.78*	0.128±0.034*	0.75±0.09*
HPMC E15	225.00±16.23	0.289±0.015	0.48±0.14*
HPMC E50	304.90±15.82*	0.311±0.047*	0.50±0.21

与 P188 比较：*P<0.05

*P < 0.05 *vs* P188

为 2∶1，稳定剂（P188-P407）比例为 2∶1，搅拌转速 600 r/min，搅拌时间 20 s，稳定剂用量分别为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%，按照“2.1”项下方法制备 Her-NS，考察联合稳定剂用量对 PS、PDI 和 SI 的影响，结果见表 2。随着稳定剂用量的增加，纳米混悬剂的 PS 及 PDI 呈先降低后升高趋势，当稳定剂用量为 0.6%时，PS、PDI 和 SI 最佳。

2.4.3　稳定剂比例的筛选　固定药物与稳定剂比例为 2∶1，稳定剂用量为 0.6%，搅拌转速 600 r/min，搅拌时间 20 s，P188-P407 比例分别为 4∶1、2∶1、1∶1、1∶2，按照“2.1”项下方法制备 Her-NS，并测定 PS、PDI 和 SI，结果见表 3。随着 P407 比例的增加，NS 溶液 PDI 减小、SI 增大，继续增加 P407，Her-NS 的粒径和 PDI、SI 无明显变化。当 2 种稳定剂比例达到 1∶1 时，可获得粒径相对较低，溶液状态良好，PDI 合格、SI＞0.75 的 NS。

表 2　稳定剂用量对 Her-NS 的 PS、PDI 和 SI 的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 2　Effect of stabilizer concentration on particle size, PDI, and SI of Her-NS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

稳定剂/%	PS/nm	PDI	SI
0.2	232.03±11.63*	0.330±0.020*	0.73±0.11
0.4	218.02±17.05	0.228±0.034*	0.75±0.09
0.6	206.13±6.83	0.121±0.020	0.77±0.11
0.8	209.29±12.41	0.108±0.038	0.78±0.10

与稳定剂用量为 0.6%组比较：*P<0.05

*P < 0.05 *vs* the stabilizer dosage of 0.6% group

表 3　稳定剂比例对 Her-NS 的 PS、PDI 和 SI 的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 3　Effect of ratio of poloxamer 188 to poloxamer 407 on particle size, PDI and SI of Her-NS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

P188 与 P407 比例	PS/nm	PDI	SI
4∶1	189.06±15.14*	0.350±0.020*	0.75±0.03*
2∶1	199.09±7.03	0.308±0.019*	0.79±0.12
1∶1	206.21±16.83	0.121±0.032	0.83±0.07
1∶2	221.33±16.41	0.109±0.020*	0.84±0.03

与稳定剂比例 1∶1 组比较：*P<0.05

*P < 0.05 *vs* the stabilizer ratio 1∶1 group

2.4.4　药物与稳定剂比例的筛选　固定 P188-P407 比例分别为 2∶1，稳定剂用量为 0.6%，搅拌转速 600 r/min，搅拌时间 20 s，按照“2.1”项下方法制备 Her-NS，对药物与稳定剂的比例（5∶1、5∶3、1∶1）进行考察，并测定 PS、PDI 和 SI，结果见表 4。当药物与稳定剂比例为 5∶3 时，各项指标较优。

2.4.5　搅拌速度　固定 P188-P407 比例分别为 2∶1，药物与稳定剂的比例 2∶1，稳定剂用量为 0.6%，搅拌时间 20 s，搅拌速度分别为 400、600、800 r/min，

表 4　药物与稳定剂比例对 Her-NS 的 PS、PDI 和 SI 的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 4　Effect of ratio of drug to stabilizer on particle size, PDI, and SI of Her-NS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

药物与稳定剂比例	PS/nm	PDI	SI
5∶1	213.43±9.63	0.330±0.020*	0.85±0.02
5∶3	210.28±13.98	0.121±0.018	0.85±0.04
1∶1	209.34±14.26	0.117±0.038	0.88±0.01

与药物与稳定剂比例 5∶3 组比较：*P<0.05

*P < 0.05 *vs* the 5∶3 group of drug and stabilizer ratio

按照“2.1”项下方法制备 Her-NS，并测定 PS、PDI 和 SI，结果见表 5。Her-NS 的粒径随搅拌速度增大而减小，当转速为 400 r/min 时，可获得粒径为 450 nm 左右的 Her-NS（Her-NS_{450}），当转速为 600、800 r/min 时，可获得粒径为 200 nm 左右的 Her-NS（Her-NS_{200}），但当转速为 800 r/min 时，PDI 明显增加，SI 减小，可能是由于转速过大导致液体产生气泡，使 NS 稳定性降低。

表 5 搅拌速度对 Her-NS 的 PS、PDI 和 SI 的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 5 Effect of stirring speed on average particle size, PDI and SI of Her-NS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

搅拌速度/(r·min^{-1})	PS/nm	PDI	SI
400	450.02±35.01*	0.110±0.031*	0.87±0.03
600	215.25±17.05	0.208±0.034	0.83±0.04
800	218.02±14.41	0.261±0.026	0.73±0.05

与搅拌速度 600 r·min^{-1} 组比较：*P<0.05

*P < 0.05 *vs* the stirring speed 600 r·min^{-1} group

2.4.6 工艺条件的确定 称取稳定剂 P407 和 P188（P407 与 P188 比例 1∶1，质量浓度 6 mg/mL），置于 5 mL 去离子水中，搅拌使其充分溶解，得到稳定剂溶液。称取波棱甲素粉末 50 mg，溶于 0.25 mL 乙醇溶液中，超声使其充分溶解，分别在 400、600 r/min 转速的磁力搅拌条件下，将含有药物的有机溶液快速倒入到稳定剂溶液中混合均匀，持续搅拌 20 s，减压挥去有机溶剂，补充适量去离子水定容至原体积，即得 Her-NS_{450}、Her-NS_{200}。以 PS、PDI 和 SI 为指标进行测定，结果见表 6。

表 6 Her-NS 最佳工艺条件验证（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

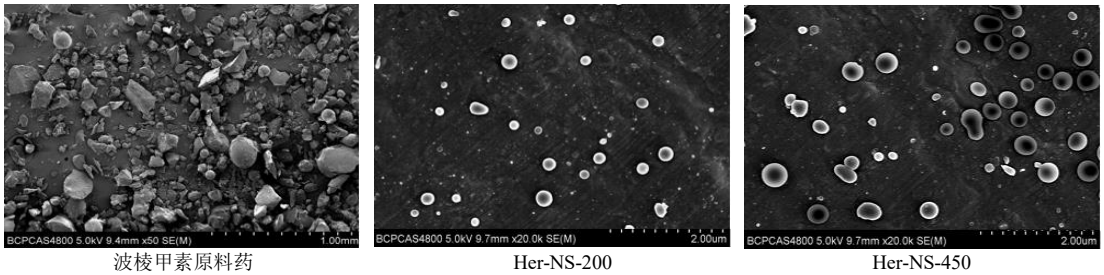
Table 6 Her-NS optimal process conditions verification ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

制剂	PS/nm	PDI	SI
Her-NS-200	202.23±12.01	0.191±0.023	0.83±0.09
Her-NS-450	453.47±31.03	0.181±0.071	0.87±0.03

2.5 Her-NS 的表征

2.5.1 形态观察 SEM 观察 Her-NS 和波棱甲素原料药的形态，将样品适当稀释后，将 Her-NS 制剂滴在锡纸上，然后在 20 mA 电流下用金钯导电层溅射镀膜 1 min，并在 10 kV 的加速激励电压下进行观察，Her-NS 的形态见图 2，波棱甲素原料药呈球状及不规则块状，棱角分明，大小不一，粒径在 5～40 μm（图 2-A）；Her-NS_{200} 呈均匀球状（图 2-B），粒径在 150～200 nm；Her-NS_{450} 呈球状（图 2-C），可看到纳米粒之间有黏附，其长径和短径不同；短径小于 400 nm，长径在 600～800 nm。

2.5.2 晶型表征 采用 XRD 分别对 2 种粒径的 Her-NS 及波棱甲素原料药晶型进行扫描分析。分别对波棱甲素原料药、P188、P407、波棱甲素与 P188、P407 的物理混合物及 2 种粒径的 Her-NS 样品进行 XRD 分析。工作条件：Cu 靶，管电压 40 kV，管电流 60 mA。扫描速率 2º/min，扫描 2θ 范围为 3º～60º。结果（图 3）显示，不同粒径的 Her-NS 及波棱甲素原料药相同的位置上均无衍射峰，说明波棱甲素制备成不同粒径的 Her-NS，制备过程不会影响药物的晶型。



波棱甲素原料药　Her-NS-200　Her-NS-450

图 2 Her-NS 的 SEM 图

Fig. 2 SEM photographs of Her-NS

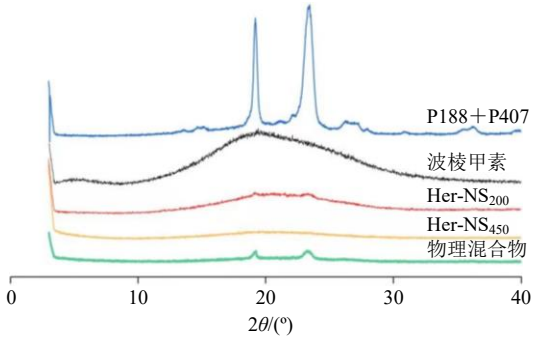


图 3 Her-NS 的 XRD 图

Fig. 3 XRD photographs of Her-NS

2.5.3 稳定性考察 将 Her-NS_{200}、Her-NS_{450} 在室温条件下分别放置 7 d，每天取样，蒸馏水稀释 20

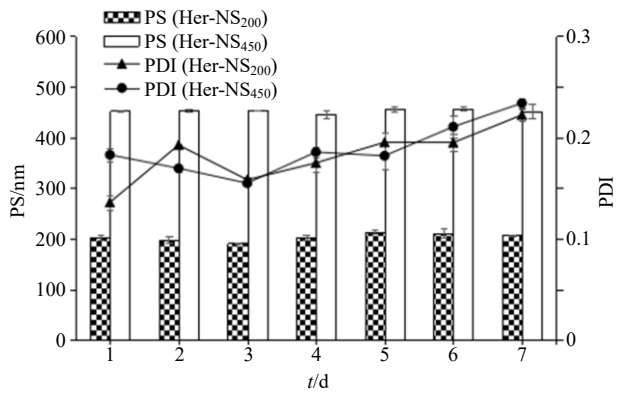


图 4　Her-NS 的粒径和 PDI 随时间的变化 (n = 3)

Fig. 4　Variation of particle size and PDI of Her-NS over time (n = 3)

倍测定 PS 和 PDI，结果如图 4，Her-NS_{200}、Her-NS_{450} 在室温条件下放置 7 d，粒径分别在 200、450 nm 左右，PDI 在 0.25 左右，表明 Her-NS 在 7 d 内物理稳定。

2.6　体外释放度研究

2.6.1　色谱条件　色谱柱为 Inertsil® ODS-3（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈-2%醋酸水溶液（30∶70），检测波长 280 nm，柱温 30 ℃，进样量 20 μL，体积流量 1.0 mL/min，理论塔板数按波棱甲素峰计算不低于 4500，色谱图见图 5。

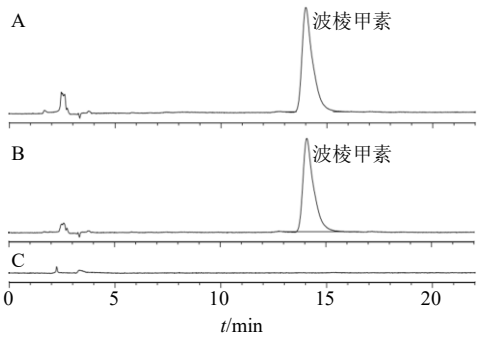


图 5　波棱甲素对照品 (A)、Her-NS 样品 (B)、空白 (C) 的 HPLC 图

Fig. 5　HPLC of herpetrione (A), Her-NS sample (B), and blank (C)

2.6.2　对照品溶液的配制　精密称取波棱甲素对照品 6.97 mg，置于 10 mL 量瓶中，加入一定量的甲醇超声溶解并定容至刻度，配成波棱甲素质量浓度为 697 μg/mL 的对照品储备液。

2.6.3　供试品溶液的配制　精密吸取新鲜制备的 Her-NS 0.1 mL 于 10 mL 量瓶中，加适量甲醇超声溶解，定容，滤过，精密吸取续滤液 1 mL 于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度线，摇匀即得供试品溶液。

2.6.4　线性关系考察　精密吸取对照品储备液用甲醇稀释成 34.850、27.880、13.940、6.970、3.485 μg/mL 的波棱甲素对照品溶液，用甲醇稀释并定容至刻度线，摇匀 HPLC 法依次测定各个质量浓度，以药物质量浓度（X）对峰面积（Y）作线性回归，绘制标准曲线，得线性回归方程 Y＝25 051 X－52.926，r＝0.999 9，线性范围为 3.485～34.850 μg/mL。

2.6.5　方法学验证　分别取低、中、高（3.485、13.940、34.850 μg/mL）3 个质量浓度的波棱甲素对照品溶液，分别连续进样 HPLC 测定 6 次，计算各个质量浓度的精密度，结果显示，低、中、高质量浓度的波棱甲素对照品溶液 RSD 值分别为 0.94%、0.19%、0.23%。表明仪器精密度良好。

按“2.6.3”项下制备供试品溶液，分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 按色谱条件测定峰面积，观察峰面积比值变化情况，其 RSD 为 1.71%，表明供试品溶液稳定性良好。

按照“2.6.3”项下分别制备 6 份供试品溶液，按色谱条件测定峰面积，计算 NS 中波棱甲素的量，其 RSD 为 0.52%，表明该方法重复性良好。

精密量取已测定含量的同一供试品溶液 9 份各 1 mL，分别加入对照品的量与其在 NS 中的量的比值为 0.8∶1、1∶1、1.2∶1，每个比例 3 份，按“2.6.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，计算加样回收率。结果低、中、高不同质量浓度的平均回收率分别为 101.12%、102.74%、101.17%，RSD 值均小于 1.81%。表明回收率符合要求。

2.6.6　测定方法　采用透析袋扩散法测定 Her-NS_{200}、Her-NS_{450} 和波棱甲素在 PBS（pH 7.4）中的释放行为。取溶液 2 mL（相当于 20 mg 波棱甲素）及等质量浓度的波棱甲素溶液于截留相对分子质量 8000 的透析袋内，以 200 mL 蒸馏水作为溶出介质，控制温度为（37.0±0.5）℃，转速为 100 r/min，于释放后 1、2、4、6、8、12、16、22、24 h 取样 1 mL，同时补足等温等量的溶出介质，样品经微孔滤膜滤过，通过 HPLC 测定含量（以波棱甲素计）。并绘制释放度曲线，见图 6。结果显示，在 12 h 内，Her-NS_{200}、Her-NS_{450} 和波棱甲素的累积释放率分别为 49.78%、40.76%、21.95%。在 24 h 内，分别在透析袋外检测到 85.88%、80.10%、35.41%。在 24 h 内，与波棱甲素原料药相比，Her-NS_{200}、Her-NS_{450} 的释放度显著提高（P＜0.05），粒径越小，累积释放度越大。

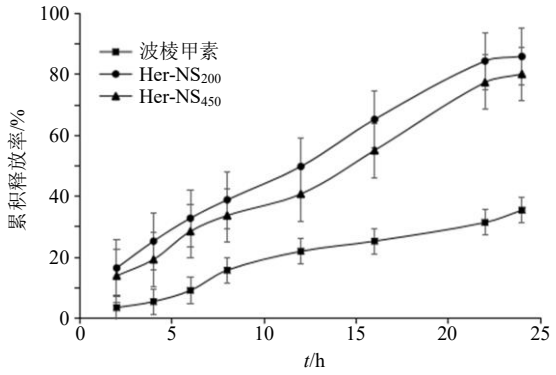


图 6 Her-NS$_{200}$、Her-NS$_{450}$ 和波棱甲素原料药在 PBS (pH 7.4) 中的体外药物释放曲线 (n = 3)

Fig. 6 *In vitro* release profile of Her-NS$_{200}$, Her-NS$_{450}$, and herpetrione coarse in PBS (pH 7.4) (n = 3)

2.7 体内药动学研究

2.7.1 给药方案与样品采集 SD 大鼠 18 只，随机分为 3 组，每组 6 只，给药前禁食 12 h，不禁水，分别 ig 给药 Her-NS$_{200}$、Her-NS$_{450}$ 及波棱甲素原料药（0.5% CMC-Na 配制的波棱甲素混悬液）。每只大鼠给药剂量为 250 mg/kg（以波棱甲素计），给药后分别在 0.083、0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12 h 于大鼠眼底静脉丛取血，所得血样放置肝素浸润的离心管中，6000 r/min 离心 10 min 后吸取上清液，待测。

2.7.2 血浆样品处理 精密移取空白血浆 0.2 mL，置于具塞离心管中，加入 600 μL 的甲醇沉淀蛋白，涡旋振摇 30 s，8000 r/min 离心 10 min，吸取上清液，在 25 ℃下用氮气吹干，残渣加入 100 μL 甲醇溶解，充分涡旋振荡，8000 r/min 离心 10 min，取上清液 40 μL 进样分析。

2.7.3 色谱条件 色谱柱为 Inter Sustain® C$_{18}$（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为乙腈-2%醋酸水溶液（30∶70），检测波长 280 nm，柱温 30 ℃，进样量 40 μL，体积流量 1.0 mL/min，理论塔板数按波棱甲素峰计算不低于 4500。色谱图见图 7。

2.7.4 方法专属性 取“2.7.2”项预处理后的空白血浆、空白血浆加标样品和含药血浆样品各 40 μL 进样分析，结果见图 7。大鼠血浆中内源物质对波棱甲素的测定无干扰，该方法专属性强。

2.7.5 线性关系考察 取空白血浆 0.2 mL，分别精密加入系列的波棱甲素对照品溶液，涡旋混匀，配制成 0.945 1、1.890、3.780、5.671、7.561、9.451 μg/mL 质量浓度的标准血浆样品。按“2.7.2”项下处理血浆样品，按“2.7.1”项色谱条件进行药物测定，以药物质量浓度（X）对峰面积（Y）作线性回归，得标准曲线方程 Y＝47 700 X＋29 285，r＝0.999 3，线性范围为 0.945 1～9.451 μg/mL。

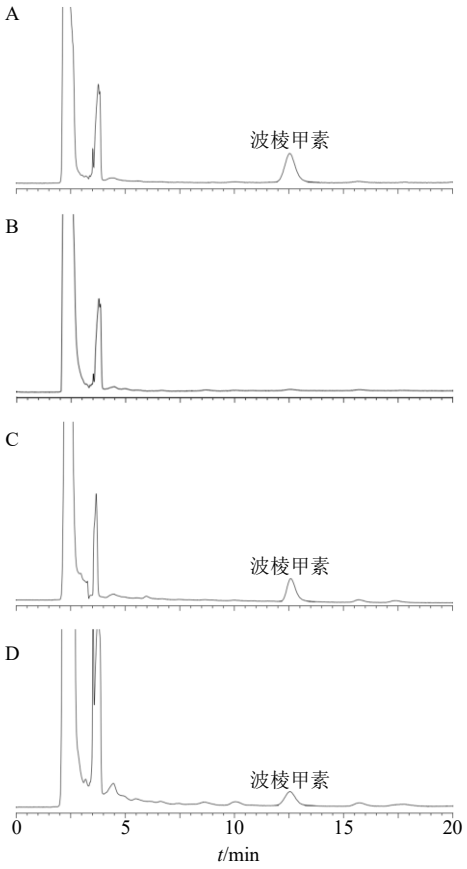


图 7 波棱甲素对照品 (A)、空白血浆样品 (B)、空白血浆样品＋波棱甲素对照品 (C) 和大鼠给药 Her-NS 1 h 后血浆样品 (D) 的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC of herpetrione (A), blank plasma (B), blank plasma + herpetrione (C), and plasma samples of SD rats 1h after administration (D)

2.7.6 回收率试验 分别取高、中、低（7.561、3.780、0.945 1 μg/mL）3 个质量浓度的加药血浆，经处理后进样测定，每个质量浓度平行测定 5 次，计算血浆药物质量浓度，所得质量浓度与实际质量浓度的比值即为回收率。高、中、低 3 个质量浓度的平均回收率分别为 97.66%、101.35%、97.40%，RSD 分别为 1.19%、2.60%、2.67%（n＝5）。符合生物样品分析方法的基本要求。

2.7.7 精密度试验 分别取高、中、低（7.561、3.780、0.945 1 μg/mL）3 个质量浓度的加药血浆按“2.7.2”项下方法处理，按“2.7.1”项色谱条件，进样测定，1 d 内连续测定 3 次，计算日内精密度，每天测定 1 次并连续测定 3 d，计算日间精密度。

高、中、低 3 个质量浓度的日内精密度 RSD 分别为 1.65%、1.93%、1.06%。日间精密度 RSD 则分别为 1.78%、2.44%、2.36%（n＝3）。符合生物样品分析方法的基本要求。

2.7.8　稳定性试验　分别取高、中、低（7.561、3.780、0.945 1 μg/mL）3 个质量浓度的加药血浆，各个血浆样品反复冻融 3 次，经处理后进样测定，考察其稳定性。高、中、低 3 种质量浓度的 RSD 分别为 1.34%、3.23%、2.26%，结果显示，反复冻融不影响血浆样品的测定。

2.7.9　定量限和检测限　取波棱甲素对照品溶液，逐步稀释，HPLC 测定各质量浓度对应信噪比（S/N）。以 S/N＝10 为定量限，以 S/N＝3 为检测限。结果显示，定量限为 0.9 μg/mL，检测限为 0.2 μg/mL。

2.7.10　血药浓度－时间曲线　以血药质量浓度对时间作图，血浆药物质量浓度-时间曲线见图 8，药动学参数见表 7，药-时曲线经拟合显示 Her-NS 在大鼠体内动力学行为符合二室模型。由图 8 和表 7 可知，大鼠 ig 给药后，2 种粒径的 Her-NS 均在 30 min 达到血药峰浓度（C_{max}），C_{max} 分别为（15.50±1.83）、（11.84±0.59）mg/L，与波棱甲素原料药相比，Her-NS 的达峰时间（T_{max}）是波棱甲素的 0.6 倍，Her- NS_{200}、Her-NS_{450} C_{max} 是波棱甲素（6.67±0.68）mg/L 的 2.32、1.78 倍。表明 Her-NS 入血快，且血药浓度高。Her-NS_{200}、Her-NS_{450} 的药-时曲线下面积（$AUC_{0\sim t}$）分别为（32.55±7.69）、（27.18±4.50）mg/(L·h)，分别是波棱甲素（12.84±0.81）mg/(L·h) 的 2.54、2.12 倍。Her-NS 中的 C_{max} 和 $AUC_{0\sim t}$ 较波棱甲素原料药都有了显著提高（P＜0.01），可见，Her-NS 较波棱甲素更容易被吸收，Her-NS 显著提高了波棱甲素的体内生物利用度。

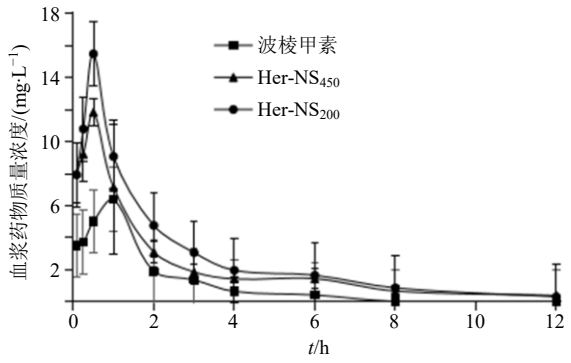


图 8　Her-NS 和波棱甲素 (给药剂量 250 mg·kg^{-1}) 的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

Fig. 8　Mean plasma concentration-time curve of Her-NS and herpetrione (administration dose 250 mg·kg^{-1}) ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

表 7　大鼠 ig 给药 Her-NS 后的主要药动学参数 ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

Table 7　Main pharmacokinetic parameters of herpetrione or Her-NS after oral administration in rats ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

参数	单位	波棱甲素	Her-NS_{200}	Her-NS_{450}
$AUC_{0\sim t}$	mg·L^{-1}·h^{-1}	12.84±0.81	32.55±7.69**	27.18±4.50**
$t_{1/2z}$	h	2.07±0.87	3.13±0.49*	2.26±1.10*
T_{max}	h	0.83±0.26	0.50±0	0.50±0
C_{max}	mg·L^{-1}	6.67±0.68	15.50±1.83**	11.84±0.59**
$MRT_{0\sim t}$	h	1.77±0.29	2.45±0.69*	2.57±0.44**

与波棱甲素组比较：*P＜0.05　**P＜0.01

*P < 0.05　**P < 0.01 *vs* herpetrione group

3　讨论

本实验采用反溶剂沉淀法制备纳米混悬剂，通过单因素实验优化，成功制备了 2 种不同粒径的 Her-NS，即 Her-NS-200、Her-NS-450。粒径分别为 200 nm 和 450 nm 左右；PDI 小于 0.2，SI 大于 0.75。表明粒径分布均匀[15]。本实验考察了稳定剂种类、稳定剂用量、联合稳定剂比例、药物与稳定剂比例、搅拌转速等因素对 Her-NS 粒径及 PDI 的影响，结果显示稳定剂的种类及搅拌转速对其影响较显著，这可能由于不同稳定剂对维持不同药物的 NS 体系效果不同，添加稳定剂是维持纳米混悬剂稳定性的主要方法，良好的稳定剂可以为纳米混悬剂提供足够的空间位阻或静电排斥力，以阻止粒子聚集[15-17]。在本研究中，单一稳定剂 P188 的应用虽然能够获得较小粒径的 Her-NS，但是粒径分布较大，不稳定。研究报道，应用联合稳定剂可更好的保证纳米混悬剂的稳定性。本研究参考文献报道[14]，应用联合稳定剂 P188 和 P407，结合实验优化比例，从而得到较稳定的 Her-NS。P188 和 P407 均为聚合物，能够为 Her-NS 提供足够的空间位阻，以阻止粒子聚集，保证 Her-NS 的稳定。混合过程的搅拌转速可能影响沉淀过程的纳米粒形成与成长，低转速下，溶液分散慢，在反溶剂中聚集沉淀快，导致纳米粒粒径较大；而转速过高则因能量过度输入，打破体系原有平衡，导致已获得的纳米粒聚集，分布变差，PDI 变大[13]。通过单因素实验，本研究确定将 P188 和 P407 联用作为 Her-NS 的稳定剂，所制备的 NS 粒径小、粒径分布较窄。本实验主要是探讨粒径对 Her-NS 药动学的影响，在确定处方的基础上，通过控制不同工艺参数获得不同粒径的 Her-NS。扫描电

镜结果显示，Her-NS_{200}、Her-NS_{450} 均呈圆球状；XRD 结果显示 Her 原料药及不同粒径的 Her-NS 均为无定型态，表明纳米化过程不会影响波棱甲素的形态及晶型。

体外释放度实验结果显示，Her-NS_{200}、Her-NS_{450} 与波棱甲素原料药相比，Her-NS 的累积释放度显著提高（$P<0.05$），表明将波棱甲素制成 Her-NS 能提高其体外释放度。NS 粒径与释放度呈负相关，这是因为随着粒径的减小，较大的比表面积导致 NS[9]的溶解度较高[9,18]。

药动学实验结果显示，2 种粒径的 Her-NS 的 $AUC_{0\sim t}$ 和 C_{max} 均显著高于波棱甲素（$P<0.01$）；表明波棱甲素制成纳米混悬剂后，生物利用度显著提高。这主要是因为波棱甲素纳米化后，粒径显著降低，增加波棱甲素的溶出及与胃肠道的黏附性，促进了波棱甲素的吸收，进而提高了波棱甲素的口服生物利用度。此外，显著延长的 $MRT_{0\sim t}$ 也有利于生物利用度的增加。Her-NS_{200} 的 $AUC_{0\sim t}$ 和 C_{max} 高于 Her-NS_{450}，说明粒径小更有助于生物利用度的改善。两者差异不显著，这与文献报道的不一致[9,18]，分析可能原因如下：Her-NS 口服进入胃肠道，受复杂的胃肠道环境如不同的 pH 值，消化酶等的影响，导致 Her-NS 在胃肠道有轻微聚集，降低了粒径差异，导致吸收差异不显著。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药品标准•藏药 (第 1 册) [S]. 1995: 64.

[2] 杭凌宇, 申宝德, 沈成英, 等. 藏药波棱瓜子抗肝病现代研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 549-556.

[3] 刘美琳, 张梅. 藏药波棱瓜子的现代研究进展 [J]. 中药与临床, 2016, 7(2): 99-102,105.

[4] Kaouadji M, Favre B J. Herpetrione, trimeric lignoid isolated from *Herpetospermum caudigerum* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1983, 24(52): 5881-5884.

[5] Guo J J, Yue P F, Lv J L, *et al*. Development and *in vivo*/*in vitro* evaluation of novel herpetrione nanosuspension [J]. *Int J Pharm*, 2013, 441(1/2): 227-233.

[6] Pawar S S, Dahifale B R, Nagargoje S P, *et al*. Nanosuspension technologies for delivery of drugs [J]. *J Nanosci Nanotechnol,* 2017, 4(2): 59-66.

[7] 罗开沛, 李小芳, 罗佳, 等. 纳米混悬技术在中药制剂中的应用及发展趋势 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 865-871.

[8] Md S, Kit B, Jagdish S, *et al*. Development and *in vitro* evaluation of a zerumbone loaded nanosuspension drug delivery system [J]. *Crystals*, 2018, 8(7): 286.

[9] Wang X H, Liu Y, Shen C Y, *et al*. Effect of particle size on *in vitro* and *in vivo* behavior of astilbin nanosuspensions [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2019, 52: 778-783.

[10] Shen C, Yang Y, Shen B, *et al*. Self-discriminating fluorescent hybrid nanocrystals: Efficient and accurate tracking of translocation via oral delivery [J]. *Nanoscale*, 2017, 10(1): 436-450.

[11] Xia F, Fan W F, Jiang S F, *et al*. Size-dependent translocation of nanoemulsions via oral delivery [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9(26): 21660-21672.

[12] Ahmadi Tehrani A, Omranpoor M M, Vatanara A, *et al*. Formation of nanosuspensions in bottom-up approach: Theories and optimization [J]. *Daru*, 2019, 27(1): 451-473.

[13] Shen B D, Wu N, Shen C Y, *et al*. Hyperoside nanocrystals for HBV treatment: Process optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2016, 42(11): 1772-1781.

[14] 程佳慧, 刘喜纲, 常金花, 等. 不同稳定剂种类对齐墩果酸纳米混悬剂溶出度的影响 [J]. 中国医院药学杂志. DOI:42. 1204. R. 20201016. 1446. 008.

[15] Tuomela A, Hirvonen J, Peltonen L. Stabilizing agents for drug nanocrystals: Effect on bioavailability [J]. *Pharmaceutics*, 2016, 8(2): E16.

[16] Xie Y K, Shi B K, Xia F, *et al*. Epithelia transmembrane transport of orally administered ultrafine drug particles evidenced by environment sensitive fluorophores in cellular and animal studies [J]. *J Control Release*, 2018, 270: 65-75.

[17] Du J, Li X G, Zhao H X, *et al*. Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies [J]. *Int J Pharm*, 2015, 495(2): 738-749.

[18] Bi C, Miao X Q, Chow S F, *et al*. Particle size effect of curcumin nanosuspensions on cytotoxicity, cellular internalization, *in vivo* pharmacokinetics and biodistribution [J]. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2017, 13(3): 943-953.

[责任编辑 郑礼胜]