

# 晶型对落新妇苷纳米混悬剂体内行为的影响<sup>Δ</sup>

汪小涵<sup>1,2\*</sup>, 王聪颖<sup>2</sup>, 刘肖<sup>1,2</sup>, 沈成英<sup>2</sup>, 钟芮娜<sup>1,2</sup>, 申宝德<sup>2</sup>, 袁海龙<sup>2#</sup> (1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 中国人民解放军空军总医院药学部, 北京 100142)

中图分类号 R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)04-0458-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.04.06

**摘要** 目的:探讨晶型对落新妇苷纳米混悬剂(AT-NS)体内行为的影响。方法:分别采用沉淀法和微型化介质研磨法制备两种AT-NS,即AT-NS1和AT-NS2,采用纳米激光粒度仪测定其粒径和多分散性指数(PDI);通过X射线衍射技术(XRD)、电镜扫描技术(SEM)、高效液相色谱法(HPLC)和桨法对AT原料药、AT-NS1、AT-NS2的结构特征、外观形态及体外溶出度进行分析、比较。取15只健康雄性SD大鼠随机分为AT原料药组、AT-NS1组和AT-NS2组,每组5只。分别单次灌胃相应药物混悬液120 mg/kg(均以水为溶剂),并于给药前(0 min)及给药后5、10、20、30、60、120、240、480 min自眼眶取血,以芦丁为内标,采用HPLC法测定大鼠血浆中AT的质量浓度,采用DAS 2.0软件计算其药动学参数,并进行比较。结果:AT-NS1和AT-NS2粒径分别为(212.48 ± 0.32)、(226.36 ± 2.29) nm, PDI分别为0.129 3 ± 0.026 3、0.254 7 ± 0.012 4。XRD分析显示,AT-NS1为无定型,AT-NS2为结晶型,两者的衍射峰均与AT原料药存在差异。SEM分析显示,AT-NS1和AT-NS2形态相似,均呈圆球状且大小均一;AT原料药为块状,粒径较大且大小不一。溶出度试验结果显示,1 h时,AT原料药、AT-NS1和AT-NS2的累积溶出度分别为4.54%、35.01%、12.22%;12 h时,三者的累积溶出度分别为24.01%、81.14%、64.69%;24 h时,三者的累积溶出度分别达到36.04%、84.87%、85.86%。药动学研究结果显示,与原料药组比较,AT-NS1组和AT-NS2组大鼠的 $c_{max}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 以及AT-NS1组的 $t_{1/2}$ 均显著升高,AT-NS1组大鼠的 $t_{max}$ 显著缩短( $P < 0.05$ );与AT-NS2组比较,AT-NS1组大鼠的 $c_{max}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 均显著升高, $t_{max}$ 显著缩短( $P < 0.05$ )。结论:将AT制备成NS后,可明显增加其体外溶出,并促进其体内口服吸收;且在短时间内,无定型NS比结晶型NS的溶出/吸收更快。

**关键词** 落新妇苷;纳米混悬剂;无定型;结晶型;溶出度;药动学

## Effects of Crystal Form on *in vivo* and *in vitro* Behavior of Astilbin Nanosuspensions

WANG Xiaohan<sup>1,2</sup>, WANG Congying<sup>2</sup>, LIU Xiao<sup>1,2</sup>, SHEN Chengying<sup>2</sup>, ZHONG Ruina<sup>1,2</sup>, SHEN Baode<sup>2</sup>, YUAN Hailong<sup>2</sup> (1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Dept. of Pharmacy, Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100142, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effects of crystal form on *in vivo* and *in vitro* behavior of Astilbin nanosuspensions (AT-NS). METHODS: AT-NS1 and AT-NS2 were prepared by precipitation method and miniaturized media milling method respectively. The particle size and polydispersity index (PDI) were determined by laser particle size analyzer. X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), HPLC and paddle method were used to analyze and compare the structure characteristics, appearance morphology and *in vitro* dissolution of AT raw material, AT-NS1 and AT-NS2. Totally 15 healthy male SD rats were randomly divided into AT raw material, AT-NS1 and AT-NS2 group, with 5 rats in each group. They were given relevant medicine suspension 120 mg/kg (using water as solvent) intragastrically; blood samples were collected from orbit before medication (0 min) and 5, 10, 20, 30, 60, 120, 240, 480 min after medication. Using rutin as internal standard, HPLC method was used to determine plasma concentration of AT in rats. Pharmacokinetic parameters were calculated by using DAS 2.0 software and then compared. RESULTS: The particle sizes of AT-NS1 and AT-NS2 were (212.48 ± 0.32) nm and (226.36 ± 2.29) nm, respectively; PDI were 0.129 3 ± 0.026 3 and 0.254 7 ± 0.012 4. XRD analysis showed AT-NS1 was amorphous, and AT-NS2 was crystalline. Diffraction peaks of both were different from those of AT raw material. SEM analysis showed that AT-NS1 and AT-NS2 were similar in morphology, and they were spherical and uniform in size; AT raw material was lump with large particle size and different sizes. Results of dissolution tests showed that accumulative dissolution of AT raw material, AT-NS1 and AT-NS2 were 4.54%, 35.01%, 12.22% at 1 h; accumulative dissolution of them were 24.01%, 81.14%, 64.69% at 12 h; accumulative dissolution of them were 36.04%, 84.47%, 85.86% at 24 h, respectively. Results of pharmacokinetic study showed, compared with AT raw material group,  $c_{max}$  and  $AUC_{0-\infty}$  of AT-NS1 and AT-NS2 groups as well as  $t_{1/2}$  of AT-NS1 group were increased

<sup>Δ</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81573697、81803741、81873092);军队后勤科研重点项目(No.BKJ16J011)

\* 硕士研究生。研究方向:中药新制剂、新剂型及新技术。  
E-mail: Hannahwxh@163.com

# 通信作者:研究员,博士。研究方向:中药新型给药系统。电话:010-66928505。E-mail: yhlpharm@126.com

significantly, while  $t_{max}$  of AT-NS1 group was significantly reduced significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with AT-NS2 group,  $c_{max}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  and  $t_{1/2}$  of AT-NS1 group were increased significantly, while  $t_{max}$  was reduced significantly ( $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: When AT is prepared into NS, dissolution *in vitro* and oral absorption *in vivo* of AT are increased

significantly. In a short time, the dissolution/absorption of amorphous NS is faster than crystalline NS.

**KEYWORDS** Astilbin; Nanosuspensions; Amorphous; Crystalline; Dissolution; Pharmacokinetics

落新妇苷(AT)为一种天然的二氢黄酮醇苷类化合物,存在于土茯苓等多种植物中,具有抗炎、抑制免疫、保护肝肾、抗氧化、抗糖尿病等多种药理活性<sup>[1]</sup>。与环孢素A全面抑制各时相迟发型超敏反应(DTH)以及Th1、Th2细胞相比,AT只影响DTH的效应阶段,且只抑制Th1细胞的活化;此外,AT导致肾脏及神经毒性的可能性更低,故其免疫抑制作用的选择性更高<sup>[2]</sup>,临床应用前景更为广阔。但AT难溶于水,溶解度(25℃)仅为250 μg/mL<sup>[3]</sup>,在大鼠体内的绝对生物利用度仅为0.066%<sup>[4]</sup>,口服吸收差,使得其开发利用受到了一定的限制。

纳米给药系统[包括纳米混悬剂(NS)、纳米脂质载体、固体脂质纳米粒、纳米乳等]可通过降低药物粒径、提高溶解度来有效解决难溶性药物生物利用度低的问题<sup>[5]</sup>。与其他纳米制剂相比,NS具有载药量高、制备工艺简单、给药途径多样的优点,可避免大量辅料可能导致的毒副作用<sup>[6-7]</sup>;同时在制备过程中无需将药物先溶解至辅料内,适用于水溶性、脂溶性均较差的药物<sup>[6]</sup>。NS体外溶出及体内代谢行为的影响因素是其现有研究的热点之一,研究范围涉及晶型、粒径、稳定剂种类、纳米粒表面修饰剂等<sup>[8-9]</sup>。与结晶型相比,无定型药物具有更高的自由能、更大的饱和溶解度及更快的溶出速率,因此其口服给药的生物利用度更高<sup>[10-11]</sup>。但目前关于晶型的试验性研究相对较少,故尚无法获知晶型对NS体内外行为的影响尚不明确。鉴于此,本研究采用不同方法制备了处方、粒径一致但晶型不同的落新妇苷纳米混悬剂(AT-NS),并以X射线衍射技术(XRD)、电镜扫描技术(SEM)和高效液相色谱法(HPLC)对其进行表征和体内外行为研究,初步探讨了晶型对NS体内外行为的影响,以期AT新剂型的筛选提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Winner 802型纳米激光粒度仪(济南微纳科技有限公司);DF101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(北京恒丰长伟科技有限公司);S-4800型扫描电镜(日本Hitachi公司);D8-Advance型RD仪(德国Bruker公司);ZRS-8G型智能溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司);DGU-20A3型HPLC仪(日本Shimadzu公司);N-1300D型旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);SHB III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);TTL-DC型多功能氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司);Kylin-Bell型涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Spin215型微型高速离心机(北京东迅天地医疗仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

AT原料药(陕西锦泰生物工程有限公司,批号:JT160316,纯度:80%);AT对照品(批号:111798-201504,纯度:93.9%);芦丁对照品(内标,批号:100080-201610,纯度:91.7%)均购自中国食品药品检定研究院;聚维酮K30(PVP K30,安徽山河药用辅料股份有限公司,批号:160502);氧化锆珠子(直径:0.5 mm,长沙华尊陶瓷材料有限公司);透析袋(截留分子量:8 000~14 000,美国Viskase公司,批号:20171112215);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

### 1.3 动物

SPF级健康雄性SD大鼠,2月龄,体质量为(220±20)g,购于斯贝福(北京)实验动物科技有限公司,生产许可证号为SCXK(京)2016-0002。

## 2 方法与结果

### 2.1 AT-NS的制备及表型

2.1.1 沉淀法 称取AT原料药200 mg,溶于无水乙醇0.6 mL中,得溶液A;称取PVP K30 100 mg,溶于水10 mL中,得溶液B;将溶液A迅速倒入溶液B中,以100 r/min的转速磁力搅拌5 min后,旋转蒸发至无醇味,即得质量浓度为16 mg/mL的AT-NS1。取适量AT-NS1,加水稀释,使用纳米激光粒度仪检测其粒径和分散性指数(PDI),重复测定3次<sup>[12]</sup>。结果,AT-NS1的粒径为(212.48±0.32)nm,PDI为0.129 3±0.026 3。

2.1.2 微型化介质研磨法 称取AT原料药200 mg、PVP K30 100 mg,置于30 mL小瓶中,加水10 mL、氧化锆珠子10 mL及搅拌子后,置于磁力搅拌器上,于0℃、避光条件下以800 r/min的转速研磨24 h,即得质量浓度为16 mg/mL的AT-NS2<sup>[13]</sup>。采用“2.1.1”项下方法检测得AT-NS2的粒径为(226.36±2.29)nm,PDI为0.254 7±0.012 4。

### 2.2 XRD分析

取AT原料药、PVP K30、AT-NS1、AT-NS2各适量,经冷冻干燥后,置于带有凹槽的定性分析用塑料玻璃板材上,用毛玻璃片压实,使用XRD仪进行扫描分析。扫描范围(2θ):3~60°,管压:40 kV,管流:60 mA,扫描步长:0.02°,扫描速度:2°/min,发散和散射狭缝:1°,接收狭缝:0.15 mm。结果,AT原料药在3~30°有明显的晶体衍射峰,表明其具有晶体结构特征;PVP K30无明显的晶体衍射峰;AT-NS2仍具有与原料药相似的晶体衍射峰,但强度和数目明显减弱或减少,为结晶型;AT-NS1无类似特征衍射峰,为无定型,详见图1。

### 2.3 SEM分析

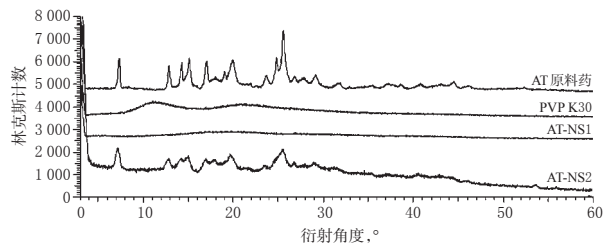
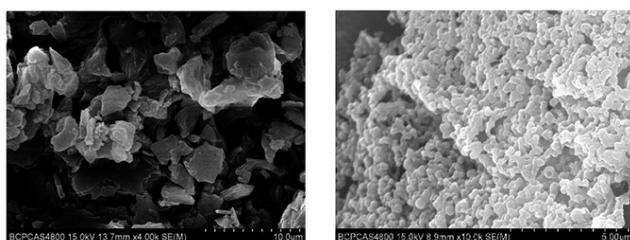


图1 X射线衍射图

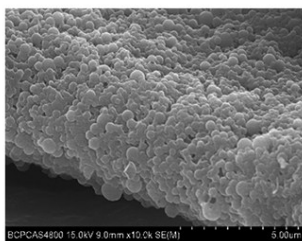
Fig 1 X-ray diffractograms

取AT原料药、AT-NS1、AT-NS2各适量,经冷冻干燥后,分别置于扫描电镜下观察其形态。结果,AT原料药呈块状,粒径较大且大小不一;AT-NS1和AT-NS2形态相似,均呈圆球状且大小均一,粒径在200 nm左右,详见图2。



A. AT原料药( $\times 4\ 000$ )

B. AT-NS1( $\times 10\ 000$ )



C. AT-NS2( $\times 10\ 000$ )

图2 扫描电镜图

Fig 2 SEM images

## 2.4 体外溶出度检测

**2.4.1 色谱条件** 色谱柱:Kromasil 100-5  $C_{18}$ (250 mm $\times$ 4.6 mm,5  $\mu$ m);流动相:乙腈-0.1%醋酸溶液(19:81, V/V);流速:1 mL/min;检测波长:291 nm;柱温:30  $^{\circ}$ C;进样量:10  $\mu$ L。

**2.4.2 对照品溶液的制备** 取AT对照品适量,精密称定,置于25 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度为0.379 0 mg/mL的AT对照品贮备液。取上述AT对照品贮备液200  $\mu$ L,置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,得质量浓度为7.58  $\mu$ g/mL的对照品溶液,备用。

**2.4.3 供试品溶液的制备** 取“2.1.1”项下AT-NS1 2 mL,放入透析袋中,参照2015年版《中国药典》(四部)通则“溶出度与释放度测定法”第二法(浆法)<sup>[14]</sup>,以磷酸盐缓冲液(PBS,pH 4.5)500 mL为溶出介质,控制转速为100 r/min,温度为(37.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}$ C。于溶出24 h时取样1 mL,经0.45  $\mu$ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.4.4 专属性考察** 取AT对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液(即空白溶出介质)适量,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,AT峰形良好,保留时间约为11.3 min;阴性对照溶液在上述保留时间处未见干扰,详见图3。

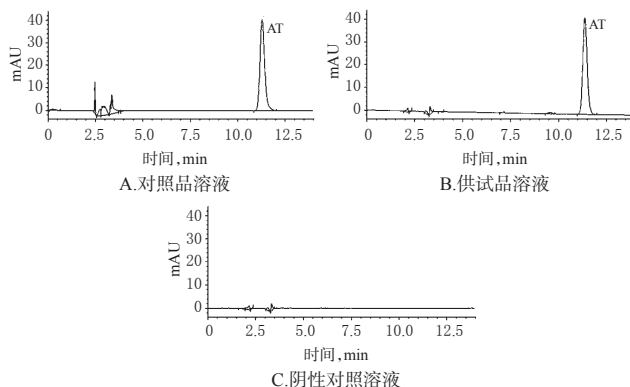


图3 高效液相色谱图(体外溶出试验)

Fig 3 HPLC chromatograms (*in vitro* dissolution test)

**2.4.5 标准曲线的绘制** 取“2.4.2”项下AT对照品贮备液各适量,加甲醇稀释制得质量浓度分别为0.95、1.89、3.79、7.58、15.16、30.32、45.48  $\mu$ g/mL的系列标准溶液,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测物质量浓度( $c$ , $\mu$ g/mL)为横坐标,峰面积( $A$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $A=26\ 271.11c-748.46$ ( $R^2=0.999\ 8$ )。结果,AT检测质量浓度的线性范围为0.95~45.48  $\mu$ g/mL。

**2.4.6 定量限与检测限考察** 取“2.4.2”项下AT对照品贮备液各适量,加甲醇逐级稀释,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,分别以信噪比为10:1、3:1计算定量限、检测限。结果,AT的定量限为0.13  $\mu$ g/mL,检测限为0.04  $\mu$ g/mL。

**2.4.7 精密度试验** 取“2.4.5”项下质量浓度为7.58  $\mu$ g/mL的AT标准溶液适量,按“2.4.1”项下色谱条件连续进样测定6次,连续测定6 d,考察日内、日间精密度。结果,日内RSD为1.43%( $n=6$ ),日间RSD为1.78%( $n=36$ ),表明仪器精密度良好。

**2.4.8 稳定性试验** 取同一批次AT-NS1,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12 h时按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,各时间点AT峰面积的RSD为0.99%( $n=5$ ),表明供试品溶液在室温下放置12 h基本稳定。

**2.4.9 重复性试验** 取同一批次AT-NS1,共6份,按“2.4.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算AT的质量浓度。结果,AT的平均质量浓度为42.43  $\mu$ g/mL,RSD为1.61%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

**2.4.10 加样回收率试验** 精密量取已知含量的供试品

溶液 0.5 mL,置于 10 mL 量瓶中,平行量取 9 份;分别精密加入质量浓度为 41.69  $\mu\text{g/mL}$  的对照品溶液 0.4、0.5、0.6 mL 各 3 份(约相当于样品含量的 80%、100%、120%),以溶出介质定容至刻度,混匀,经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过。取续滤液适量,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果,AT 的加样回收率分别为  $(100.09 \pm 2.40)\%$ 、 $(99.04 \pm 1.52)\%$ 、 $(97.75 \pm 0.95)\%$ ,RSD 分别为 2.40%、1.53%、0.97% ( $n=9$ )。

## 2.5 体外溶出特性考察

参照 2015 年版《中国药典》(四部)通则“溶出度与释放度测定法”第二法(浆法)<sup>[14]</sup>,分别取“2.1”项下 AT 原料药混悬液(称取 AT 原料药 200 mg,加水 10 mL,搅拌均匀即得)、AT-NS1 以及 AT-NS2 各 2 mL,放入透析袋中,以 PBS 500 mL 为溶出介质<sup>[10]</sup>,控制转速为 100 r/min,温度为  $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。分别于溶出 0.5、1、2、4、8、12、16、20、24 h 时取样 1 mL,并同时补充等体积溶出介质。样品液经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按公式计算药物的体外溶出度( $\rho$ )和累积溶出度,再采用 Excel 2016 软件绘制体外溶出曲线。 $\rho = c_n V_2 / m_0$ ,累积溶出度  $= \rho_n + (\rho_1 + \rho_2 + \dots + \rho_{n-1}) V_1 / V_2$  [式中, $c_n$  为第  $n$  个取样点样品中 AT 的质量浓度(由“2.4.5”项下回归方程计算而得), $m_0$  为 0 h 时透析袋中 AT 的质量; $\rho_n$  为第  $n$  个取样点的溶出度, $V_1$  为取样体积, $V_2$  为溶出介质体积]。上述试验平行操作 3 次。AT 原料药、AT-NS1 和 AT-NS2 的体外溶出曲线见图 4。

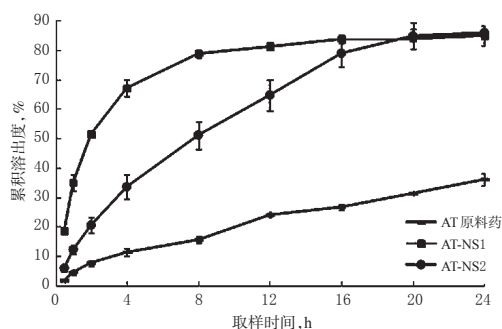


图 4 AT 原料药、AT-NS1 和 AT-NS2 的体外溶出曲线 ( $n=3$ )

Fig 4 Dissolution curves *in vitro* of AT raw material, AT-NS1 and AT-NS2 ( $n=3$ )

由图 4 可知,1 h 时,AT 原料药、AT-NS1 和 AT-NS2 的累积溶出度分别为 4.54%、35.01%、12.22%;12 h 时,三者的累积溶出度分别为 24.01%、81.14%、64.69%;24 h 时,三者的累积溶出度分别达到 36.04%、84.87%、85.86%。这提示将 AT 制备成 NS 后,其体外溶出度明显提高;与 AT-NS2 相比,AT-NS1 的体外溶出更快,但两者在 24 h 时的累积溶出度相当。

## 2.6 药动学研究

2.6.1 色谱条件 除进样量为 20  $\mu\text{L}$ 、流速为 0.8 mL/min

外,其余条件均同“2.4.1”项。

2.6.2 溶液的制备 取“2.4.2”项下 AT 对照品贮备液各适量,加甲醇稀释制得质量浓度分别为 0.237、0.474、0.947、3.790、7.580、15.159  $\mu\text{g/mL}$  的系列标准溶液,备用。取内标(芦丁)对照品适量,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度为 320  $\mu\text{g/mL}$  的内标溶液,备用。

2.6.3 血浆样品处理 取空白血浆 200  $\mu\text{L}$ ,精密加入 320  $\mu\text{g/mL}$  的内标溶液 25  $\mu\text{L}$ ,涡旋混匀;加入乙酸乙酯 1.5 mL,涡旋混匀 2 min,10 000 r/min 离心 10 min;吸取 1.4 mL 上层有机相转移至另一 EP 管中,以氮吹流吹干,残渣加甲醇 100  $\mu\text{L}$  复溶后,13 000 r/min 离心 20 min,取上清液进样测定<sup>[15]</sup>。

2.6.4 专属性考察 取空白血浆、空白血浆+AT+内标、AT-NS1 给药 30 min 后的血浆样品+内标,按“2.6.3”项下方法处理后,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,AT 和内标的保留时间分别约为 14.9、9.5 min,空白血浆中的内源性物质无干扰,详见图 5。

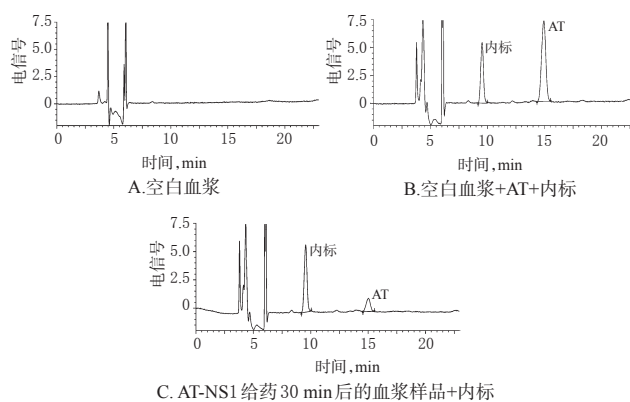


图 5 高效液相色谱图(药动学研究)

Fig 5 HPLC chromatograms (pharmacokinetic study)

2.6.5 标准曲线的绘制及定量下限的考察 取空白血浆 200  $\mu\text{L}$ ,加入“2.6.2”项下系列标准溶液各适量,得 AT 质量浓度分别为 0.030、0.059、0.118、0.474、0.947、1.895  $\mu\text{g/mL}$  的血浆样品,按“2.6.3”项下方法处理后,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测物质量浓度( $x$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标、待测物与内标的峰面积比值( $y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程为  $y = 1.281 4x - 0.012 0$  ( $R^2 = 0.999 3$ )。结果,AT 检测血药浓度的线性范围为 0.030~1.895  $\mu\text{g/mL}$ ,定量下限为 0.030  $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6.6 精密度的试验 按“2.6.5”项下方法配制 AT 定量下限浓度的血浆样品以及低、中、高质量浓度(0.030、0.059、0.947、1.516  $\mu\text{g/mL}$ )的质控样品,按“2.6.3”项下方法处理后,再按“2.6.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,考察日内精密度的;连续测定 3 d,考察日间精密度的。结

果,日内RSD分别为4.35%、2.19%、3.23%、2.03% ( $n=6$ ),日间RSD分别为1.11%、2.36%、3.34% ( $n=18$ ),表明精密良好。

**2.6.7 回收率试验** 按“2.6.5”项下方法配制AT低、中、高质量浓度(0.059、0.947、1.516  $\mu\text{g/mL}$ )的质控样品,按“2.6.3”项下方法处理后,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算质量浓度。按“2.6.2”项下方法配制AT低、中、高质量浓度(0.059、0.947、1.516  $\mu\text{g/mL}$ )的标准溶液,经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。将质控样品的AT实测质量浓度与其理论质量浓度进行比较,考察方法回收率;将质控样品的AT峰面积与对应质量浓度标准溶液的AT峰面积进行比较,考察提取回收率。每个质量浓度平行操作5次。结果,各质控样品的方法回收率为89.83%~98.77% ( $\text{RSD}<5\%$ ,  $n=5$ ),提取回收率为80.14%~91.39% ( $\text{RSD}<5\%$ ,  $n=5$ ),符合生物样品定量分析的相关要求<sup>[14]</sup>,详见表1。

表1 回收率试验结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 1 Results of recovery tests( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

理论质量浓度, $\mu\text{g/mL}$	方法回收率试验		提取回收率试验	
	方法回收率, %	RSD, %	提取回收率, %	RSD, %
0.059	92.54 $\pm$ 2.54	2.74	86.38 $\pm$ 4.05	4.68
0.947	94.25 $\pm$ 2.64	2.80	85.09 $\pm$ 4.04	4.74
1.516	95.34 $\pm$ 2.90	3.04	88.82 $\pm$ 1.79	2.02

**2.6.8 稳定性试验** 按“2.6.5”项下方法配制AT低、中、高质量浓度(0.059、0.947、1.516  $\mu\text{g/mL}$ )的质控样品,按“2.6.3”项下方法处理后,分别于室温下放置0、8、12、24 h时按“2.6.1”项下色谱条件进样测定。结果,各质量浓度质控样品实测质量浓度的RSD分别为2.45%、3.46%、2.51% ( $n=4$ ),表明其在室温放置24 h内稳定。

**2.6.9 药动力学研究** 取15只大鼠随机分为3组,即AT原料药组、AT-NS1组和AT-NS2组,每组5只。所有大鼠均禁食、不禁水12 h后,于次日晨起分别单次灌胃AT原料药、AT-NS1和AT-NS2的混悬液(均以水为溶剂),剂量均为120  $\text{mg/kg}$ <sup>[14,15]</sup>。分别于给药前(0 min)及给药后5、10、20、30、60、120、240、360、480 min自大鼠眼眶取血0.5 mL至肝素化EP管中,3 500  $\text{r/min}$ 离心7 min,分离上层血浆,按“2.6.3”项下方法处理后,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,计算AT的血药浓度。采用Excel 2016软件绘制平均药-时曲线,结果见图6;采用DAS 2.0软件处理上述平均药-时曲线数据,并以非房室模型(统计距法)<sup>[16]</sup>计算药动力学参数,结果见表2。采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

由图6可见,AT-NS1组和AT-NS2组大鼠的血药浓度较AT原料药组有明显提高。由表1可见,与AT原料药组比较,AT-NS1组和AT-NS2组大鼠的 $c_{\text{max}}$ 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 以

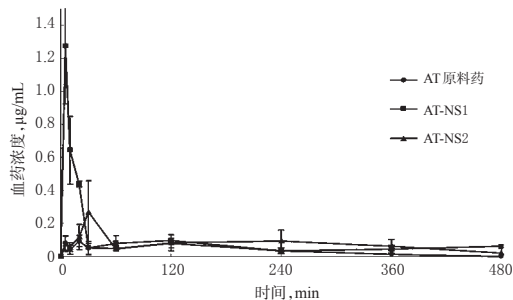


图6 大鼠灌胃AT原料药、AT-NS1、AT-NS2的平均药-时曲线( $n=5$ )

Fig 6 Average plasma concentration-time curves of AT raw material, AT-NS1 and AT-NS2 in rats after intragastrical administration ( $n=5$ )

表2 大鼠灌胃AT原料药、AT-NS1、AT-NS2的主要药动力学参数( $n=5$ )

Tab 2 Main pharmacokinetic parameters of AT raw material, AT-NS1 and AT-NS2, in rats after intragastrical administration ( $n=5$ )

参数	AT 原料药	AT-NS1	AT-NS2
$t_{\text{max}}$ , min	17.00 $\pm$ 6.71	5.00 $\pm$ 0**	23.00 $\pm$ 10.95
$c_{\text{max}}$ , $\mu\text{g/mL}$	0.11 $\pm$ 0.02	1.27 $\pm$ 0.26**	0.28 $\pm$ 0.08*
$\text{AUC}_{0-\infty}$ , $\mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$	24.47 $\pm$ 6.05	106.73 $\pm$ 27.11**	49.34 $\pm$ 9.70*
$t_{1/2}$ , min	145.28 $\pm$ 60.26	311.74 $\pm$ 62.96**	164.34 $\pm$ 48.60

注:与AT原料药比较,\* $P<0.05$ ;与AT-NS2比较,\*\* $P<0.05$

Note: vs. AT raw material, \* $P<0.05$ ; vs. AT-NS2, \*\* $P<0.05$

及AT-NS1组的 $t_{1/2}$ 均显著升高,AT-NS1组大鼠的 $t_{\text{max}}$ 显著缩短,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。其中,AT-NS1组和AT-NS2组大鼠的 $c_{\text{max}}$ 分别是其原料药的11.55、2.55倍, $\text{AUC}_{0-\infty}$ 分别是其原料药的4.36、2.02倍。与AT-NS2组比较,AT-NS1组大鼠的 $c_{\text{max}}$ 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 均显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。其中,AT-NS1组大鼠的 $c_{\text{max}}$ 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 分别是AT-NS2组的4.54、2.16、1.90倍。与AT-NS2组比较,AT-NS1组大鼠的 $t_{\text{max}}$ 显著缩短,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。而AT-NS2组大鼠的 $t_{\text{max}}$ 、 $t_{1/2}$ 与原料药组比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

本研究初步探索了晶型对AT-NS表征、体外溶出度及体内药动力学行为的影响,以期NS口服吸收的研究提供参考。本研究首先参照2015年版《中国药典》(一部)<sup>[17]</sup>,建立了测定AT体内外浓度的HPLC法。本课题组前期考察了3种色谱柱[Kromasil 100-5  $\text{C}_{18}$ (250  $\text{mm} \times 4.6 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$ )、Inertsil ODS-3(250  $\text{mm} \times 4.6 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$ )、Agilent ZORBAX SB- $\text{C}_{18}$ (250  $\text{mm} \times 4.6 \text{ mm}$ , 5  $\mu\text{m}$ )]的分离效果。结果显示,Kromasil 100-5 $\text{C}_{18}$ 的分离效果最佳,且待测物色谱峰峰形良好,故最终以其作为HPLC分析的色谱柱。同时,本课题组对乙腈-0.1%醋酸溶液(19:81,  $V/V$ )、乙腈-水(19:81,  $V/V$ )、甲醇-0.1%醋酸溶液

(39:61, V/V)等3种流动相体系的分离效果进行了评价。结果显示,当流动相为乙腈-0.1%醋酸溶液(19:81, V/V)时,待测物与内标基线分离,且峰形对称,亦无内源性物质的干扰,故最终以其作为HPLC分析的流动相。此外,本课题组还对血浆样品处理的溶剂进行了筛选。结果显示,与甲醇、乙腈相比,乙酸乙酯的萃取效率最高,故最终以其作为血浆样品处理的萃取溶剂。

XRD分析结果显示,AT原料药在3~30°内有明显的晶体衍射峰。与原料药相比,AT-NS2仍有部分晶体衍射峰,但强度减弱、数量减少,为结晶型;AT-NS1无晶体衍射峰,为无定型。SEM分析结果显示,AT原料药为粒径较大且大小不一的块状物;AT-NS1和AT-NS2形态相似,均呈圆球状且大小均一。体外溶出度试验和药动学研究结果显示,与AT原料药比较,AT-NS1和AT-NS2在24 h时的累积溶出度均明显升高,且两者在大鼠体内的 $c_{max}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著升高,提示将AT制成NS后,可明显增加其体外溶出,并促进其体内口服吸收。与AT-NS2比较,AT-NS1在12 h时的累积溶出度明显升高,而两者24 h时的累积溶出度相当;AT-NS1组大鼠的 $c_{max}$ 、 $AUC_{0-\infty}$ 、 $t_{1/2}$ 均显著升高,提示晶型可对其体内行为造成影响。其中,AT-NS1较AT-NS2有更高的AUC和 $c_{max}$ ,故可将需快速起效的药物(如过敏等免疫性疾病治疗药物)制成结晶型NS;将日常保健用药或糖尿病等慢性疾病治疗药物制成无定型NS。笔者认为造成两者体内行为差异可能是由于无定型NS较结晶型NS具有更高的吉布斯自由能和更高的饱和溶解度<sup>[11]</sup>;此外,根据Noyes-Whitney方程,提高NS的饱和溶解度可明显提高药物的溶出速率<sup>[18]</sup>。

综上,本研究建立的HPLC法专属性强,重复性好,精密度高、回收率均较高,可用于AT浓度的测定及药动学的研究。将AT制备成NS后,可明显增加其体外溶出度,促进其体内口服吸收;且晶型对AT-NS的体内行为影响较大,无定型AT-NS比结晶型AT-NS在短时间内溶出更快、体内吸收更好。但本研究只初步考察了AT-NS的体外溶出和体内药动学特征,而晶型对AT-NS的体内组织分布及药效学的影响仍有待后续深入研究。

## 参考文献

[1] 李玉琪,袁婷婷,茅风燕,等.落新妇苷的药理活性及植物来源研究进展[J].中国药房,2017,28(19):2718-2723.  
[2] 徐强,孙洋.源于中药选择性效应的新型免疫抑制疗法[J].化学进展,2009,21(1):55-62.  
[3] 张清峰,聂海纯,郑国栋,等.落新妇苷的理化性质与生物

活性研究进展[J].现代食品科技,2012,28(12):1834-1838.

[4] 王晓丹.花旗松素和落新妇苷体外转运和大鼠体内药物代谢动力学研究[D].杭州:浙江大学,2009.  
[5] 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.  
[6] 王丽丽,祝美华,刘正平,等.纳米混悬剂给药系统的研究进展[J].中国药房,2017,28(10):1415-1418.  
[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] LU Y, QI JP, DONG XC, et al. The in vivo fate of nanocrystals[J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(4):744-750.  
[9] GAO L, LIU GY, MA JL, et al. Drug nanocrystals: in vivo performances[J]. *J Control Release*, 2012, 160(3):418-430.  
[10] GAO L, LIU GY, WANG XQ, et al. Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology[J]. *Int J Pharm*, 2011, 404(1/2):231-237.  
[11] SIGFRIDSSON K, FORSSÉN S, HOLLÄNDER P, et al. A formulation comparison, using a solution and different nanosuspensions of a poorly soluble compound[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 67(2):540-547.  
[12] 汪小涵,钟芮娜,申宝德,等.落新妇苷无定型纳米混悬剂的制备及其体外评价[J].中国中药杂志,2018,43(8):1626-1632.  
[13] 刘肖,刘娟,庞建云,等.微型化介质研磨法制备槲皮素纳米混悬剂[J].中国中药杂志,2017,42(15):2984-2988.  
[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,2015:121、363-368.  
[15] GUO JM, XU Q, CHEN T. Quantitative determination of astilbin in rabbit plasma by liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 805(2):357-360.  
[16] 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.  
[17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:18.  
[18] ZHAO Y, WU C, ZHAO Z, et al. Preparation of starch macrocellular foam for increasing the dissolution rate of poorly watersoluble drugs[J]. *Pharm Dev Technol*, 2016, 21(6):749-754.

(收稿日期:2018-05-29 修回日期:2018-12-17)

(编辑:张元媛)