

甘草次酸纳米粒的制备、表征及其抗肿瘤活性研究^Δ

张丽娟^{1*}, 喻红梅², 张勇³, 龚宁波^{2,3#} (1.首都医科大学燕京医学院临床医学学系, 北京 101300; 2.北京协和医学院/中国医学科学院药物研究所药物晶型研究中心, 北京 100050; 3.海南医学院基础医学与生命科学学院药理教研室, 海口 571199)

中图分类号 R943;R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)13-1589-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.13.09

摘要 目的:制备和表征甘草次酸(GA)纳米粒,并评价其体外抗肿瘤活性。方法:以聚乙烯吡咯烷酮K30为载体,使用反溶剂沉淀-冷冻干燥法制备GA纳米粒。采用X射线衍射分析、红外光谱分析、差示扫描量热分析、粒度分析等方法对所制纳米粒进行表征;采用高效液相色谱法测定纳米粒中GA的溶解度和载药量;采用MTT法考察GA原料药及纳米粒(GA剂量均为12.5、25、50、100、200 μmol/L)对人肝癌细胞HepG2的体外抑制活性并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。结果:所制纳米粒中GA的X射线衍射特征峰和红外特征吸收峰均消失,吸热峰发生改变。纳米粒的粒径为(194.88 ± 23.52) nm,低于原料药的(2 592.33 ± 207.51) nm;分散指数为0.24 ± 0.04,高于原料药的0.15 ± 0.03;纳米粒的平均载药量为15.99%;溶解度由原料药的(1.05 ± 0.01) μg/mL升至(250.00 ± 0.15) μg/mL。体外抗肿瘤试验结果显示,GA原料药200 μmol/L组和纳米粒各剂量组的细胞存活率均较空白对照组显著降低,且GA纳米粒各剂量组(除12.5 μmol/L组外)的细胞存活率均显著低于同剂量原料药组($P < 0.01$);GA纳米粒的IC₅₀值为86.3 μmol/L,低于原料药的364.4 μmol/L。结论:成功制得GA纳米粒;所制纳米粒粒径小且分布均匀,溶解度增大且体外抗肿瘤活性增强。

关键词 甘草次酸纳米粒;反溶剂沉淀-冷冻干燥法;制备;表征;抗肿瘤活性;HepG2细胞

Preparation, Characterization and Anti-tumor Activity Study of Glycyrrhetic Acid Nanoparticles

ZHANG Lijuan¹, YU Hongmei², ZHANG Yong³, GONG Ningbo^{2,3} (1. Dept. of Clinical Medicine, Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing 101300, China; 2. Drug Crystal Form Research Center, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. Dept. of Pharmacology, College of Basic Medicine and Life Sciences, Hainan Medical University, Haikou 571199, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare and characterize glycyrrhetic acid (GA) nanoparticles, and to evaluate its *in vitro* anti-tumor activity. METHODS: Using PVP K30 as carrier, GA nanoparticles were prepared by anti-solvent precipitation and freeze-drying method. X-ray diffraction, infrared spectrum, differential scanning calorimetry and granularity analysis were used to characterize the nanoparticles; HPLC method was used to measure the solubility and drug-loading amount of GA in the nanoparticles. MTT method was used to assay the *in vitro* inhibition activity of GA raw material and nanoparticles (GA doses were 12.5, 25, 50, 100, 200 μmol/L) on human liver cancer cell HepG2 and calculate its IC₅₀. RESULTS: The characteristic peaks of X-ray diffraction and infrared absorption of GA disappeared in the nanoparticles and the endothermic peak changed. The particle size of the nanoparticles was (194.88 ± 23.52) nm, which was lower than (2 592.33 ± 207.51) nm of raw material. The dispersion index was 0.24 ± 0.04, which was higher than 0.15 ± 0.03 of raw material. The average drug-loading amount of GA was 15.99%. Moreover, the solubility of nanoparticles increased from (1.05 ± 0.01) μg/mL to (250.00 ± 0.15) μg/mL. The results of antitumor test *in vitro* showed that the cell survival rates in the group of GA raw material 200 μmol/L and GA nanoparticles groups were significantly lower than that in blank control group, and the cell survival rates of GA nanoparticles groups (except for 12.5 μmol/L group) were significantly lower than that of same dose group of raw material ($P < 0.01$). IC₅₀ of GA nanoparticles was 86.3 μmol/L, which was lower than 364.4 μmol/L of raw material. CONCLUSIONS: GA nanoparticles are prepared successfully; the prepared nanoparticles have small size and uniform distribution, and the solubility are increased and antitumor activity *in vitro* are enhanced.

^Δ 基金项目:国家科技重大专项(民口)课题(No.2018ZX09711-001);中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(No.2017-I2M-1-010);首都医科大学燕京医学院科研培育基金(No.18qdky02)

* 副教授,硕士。研究方向:天然产物的作用机理、分子生物学。电话:010-81476189。E-mail:zhanglijuan@ccmu.edu.cn

通信作者:副研究员,硕士生导师,博士。研究方向:药物分析、晶型药物研发。电话:010-63030566。E-mail:gnb@imm.ac.cn

KEYWORDS Glycyrrhetic acid nanoparticle; Anti-solvent precipitation and freeze-drying method; Preparation; Characterization; Anti-tumor activity; HepG2 cells

甘草次酸(Glycyrrhetic acid, GA)是一种由从豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草(*G. in-*

flata Bat.)或光果甘草(*G. glabra* L.)的干燥根和根茎中提取的甘草酸经水解后精制得到的五环三萜类化合物^[1]。药理研究证实,GA及其衍生物可通过诱导肿瘤细胞的凋亡和分化、阻滞细胞周期、抑制肿瘤细胞多药耐药以及抑制促癌剂的诱癌作用等途径来发挥对肝癌^[2]、皮肤癌^[3]、结肠癌^[4]、乳腺癌^[5]、卵巢癌^[6]、胃癌^[7]及白血病^[8]等多种肿瘤细胞系体外生长的抑制作用,且对正常体细胞的毒性较小^[9];研究还发现,GA具有抗病毒、抗菌、抗溃疡、保肝护肝、降血糖、降血脂、抗氧化和改善内分泌异常等多种生物活性^[10]。此外,GA在工业中也有广泛应用,可用于合成天然防腐剂、天然增色剂、天然增稠剂和防晒养护肤品等^[11]。但由于该化合物的水溶性较差,导致其在临床药物研发等领域的应用受到了一定的限制。

纳米制剂是近年来的药剂学研究热点之一,可有助于增强药物缓控释性能、靶向定位作用及生物利用度,并提高患者的服药依从性^[12-13]。纳米粒是指粒径大小为10~1 000 nm的固体胶体颗粒,可由脂类或高分子聚合物制备而成,具有制备过程简单、物理稳定性高、药物释放稳定等特点^[14]。与脂质体相比,纳米粒所用赋形剂较少;与传统剂型相比,纳米粒生物相容性好、溶解度高,具有可缓控释及靶向传递等优点^[14];此外,纳米粒还具有小尺寸效应和表面效应,可将药物包裹于其中,避免被机体降解或消除,是促进药物分布和吸收的优良载体^[15]。由此可见,将难溶性药物制成纳米粒可解决其溶解度和溶出度问题,有助于改善药物在体内的分布、提高其口服生物利用度。

纳米粒的常用制备方法包括反溶剂沉淀法、高压均质法、介质研磨法等,其中以反溶剂沉淀法较为常用^[16]。聚乙烯吡咯烷酮(PVP,如PVP K30)是一种高分子聚合物,呈无定型态,既溶于水又溶于多种有机溶剂,增溶作用优、络合作用强、分散效果好,且廉价易得,同时兼具优异的溶解性和良好的生物相容性,是一种理想的载体材料^[17]。本研究以PVP K30为载体,采用反溶剂沉淀-冷冻干燥法制备GA纳米粒,借助X射线衍射法、红外光谱法、差示扫描量热法对其进行表征,采用高效液相色谱法(HPLC)测定纳米粒中GA的含量,并采用MTT法测定GA纳米粒的抗肿瘤活性,以期为GA的应用及其相关制剂的开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Zetasizer Nano S90型纳米粒度分析仪(英国Malvern公司);D/max-2550型X射线粉末衍射仪(日本Rigaku公司);DSC-1型差示扫描量热仪(瑞士Mettler Toledo公司)、Spectrum 400型傅里叶红外光谱仪(英国PerkinElmer公司);1200型HPLC仪(美国Agilent公司);FDU-1100真空冷冻干燥机(日本Eylea公司);ZH-

WY-103D型恒温振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司);RHD S025型磁力搅拌仪(德国IKA公司);HERA-cell VIOS 160i型细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);Synergy Mx型多功能微孔板检测仪(美国BioTek公司)。

1.2 药品与试剂

GA原料药[南京泽朗医药科技有限公司,批号:20180729,纯度(HPLC法检测): $\geq 98.5\%$];GA对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110723-201413,纯度:99.6%);PVP K30(西安天正药用辅料有限公司);MTT检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号:KGA311);二甲基亚砜(DMSO)(细胞培养级,美国Thermo Fisher Scientific公司);胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶、青链霉素双抗混合液(100 \times)、MEM α 培养基均购自美国Gibco公司;甲醇和乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

1.3 细胞

人肝癌细胞HepG2购自中国科学院上海生科院细胞资源中心。

2 方法与结果

2.1 GA纳米粒的制备

采用反溶剂沉淀-冷冻干燥法制备纳米粒。称取PVP K30 40 mg,加水20 mL使溶解,制成稳定剂;称取GA原料药50 mg,溶于甲醇5 mL中,得GA-甲醇溶液,备用。于室温条件下,将上述稳定剂20 mL置于磁力搅拌仪中,以3 000 r/min搅拌,随后将GA-甲醇溶液缓慢注入其中,继续搅拌10 min,得GA纳米混悬液。将上述混悬液滤过并减压浓缩至原体积的1/3,经冷冻干燥后,即得GA纳米粒78 mg。

2.2 GA纳米粒的表征

2.2.1 X射线衍射分析 分别称取GA原料药、PVP K30、“2.1”项下所制GA纳米粒各50 mg,研磨,过200目筛。取上述粉末各适量,置于样品架中,采用X射线粉末衍射仪检测。检测条件:Cu-K辐射,石墨单色器, $\theta/2\theta$ 连续扫描,电压40 kV,电流150 mA,扫描速度8 $^{\circ}$ /min,步长0.02 $^{\circ}$,扫描范围3 $^{\circ}$ ~40 $^{\circ}$ 。结果,GA原料药在5.6 $^{\circ}$ 、6.8 $^{\circ}$ 、9.8 $^{\circ}$ 、13.8 $^{\circ}$ 、14.6 $^{\circ}$ 、15.1 $^{\circ}$ 、17.5 $^{\circ}$ 、19.8 $^{\circ}$ 处均有较强衍射峰,表明其以晶体形式存在(见图1A);PVP K30仅在11.7 $^{\circ}$ 、20.4 $^{\circ}$ 处各有1个弥散衍射峰,表明PVP K30以无定型态存在(见图1B);在GA纳米粒的衍射图谱中,GA的特征峰消失,仅在19.7 $^{\circ}$ 处出现1个弥散衍射峰,提示GA可能与PVP K30形成了新的物相(见图1C)。

2.2.2 红外光谱分析 分别称取GA原料药、PVP K30、“2.1”项下所制GA纳米粒各5 mg,使用傅里叶红外光谱仪进行检测。检测条件:光谱扫描范围4 000~650 cm^{-1} ,分辨率4 cm^{-1} ,扫描次数16次。结果,GA原料药在3 434 cm^{-1} (羟基)、2 945 cm^{-1} (亚甲基)、1 701 cm^{-1} (羧

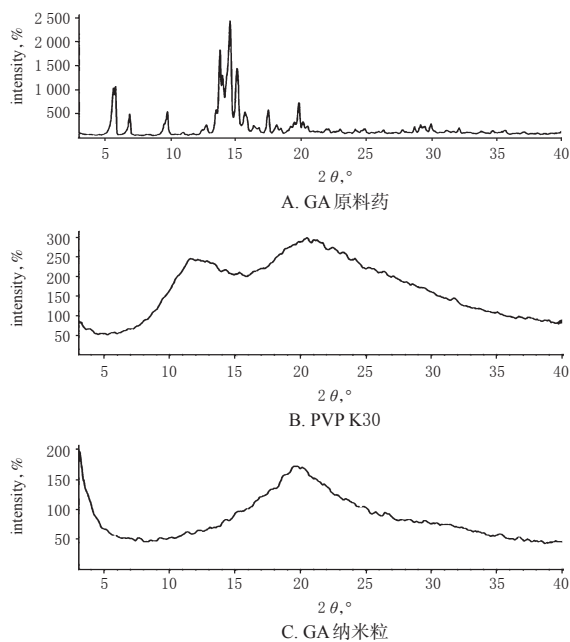


图1 X射线衍射图谱

Fig 1 X-ray diffraction patterns

基)、 1660 cm^{-1} (羰基)、 1384 cm^{-1} (甲基)、 1176 cm^{-1} (亚甲氧基)处均可见明显特征峰(见图2A);PVP K30在 1651 cm^{-1} (羰基)、 1285 cm^{-1} (叔氨基)处有明显特征峰(见图2B);而在GA纳米粒的红外光谱中,GA原料药的羟基与羰基的特征吸收峰均消失,图谱与PVP K30相似,且在 3356 cm^{-1} 处可见吸收峰,提示GA可能与PVP以氢键结合(见图2C)。

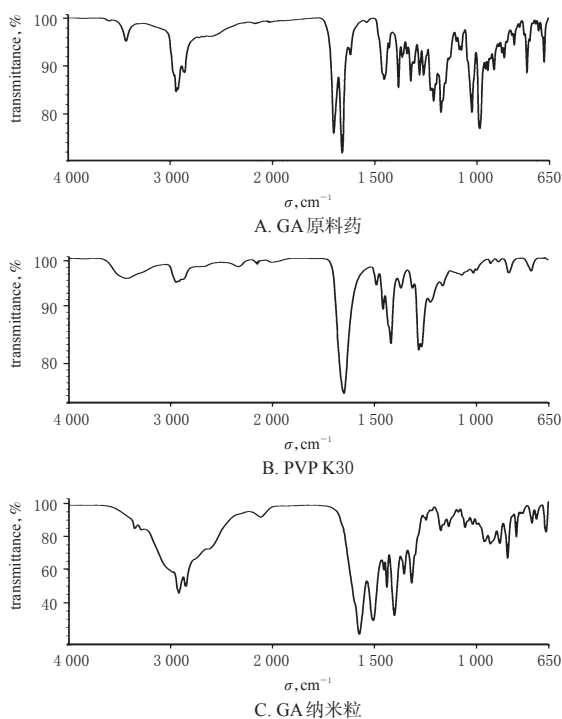


图2 红外光谱图

Fig 2 IR patterns

2.2.3 差示扫描量热分析 分别称取GA原料药、PVP

K30、“2.1”项下制得的GA纳米粒各3~5 mg,以铝制坩埚装样后,采用差示扫描量热仪进行检测。检测条件:温度扫描范围30~320 ℃,升温速率10 ℃/min。结果,GA原料药在295 ℃处可见明显的吸热熔点峰(见图3A);PVP K30在106 ℃处有1个较宽的吸热峰(见图3B);GA纳米粒则无明显熔点峰,但在69、187 ℃处有2个较宽的吸热峰,亦证明了新物相的形成(见图3C)。

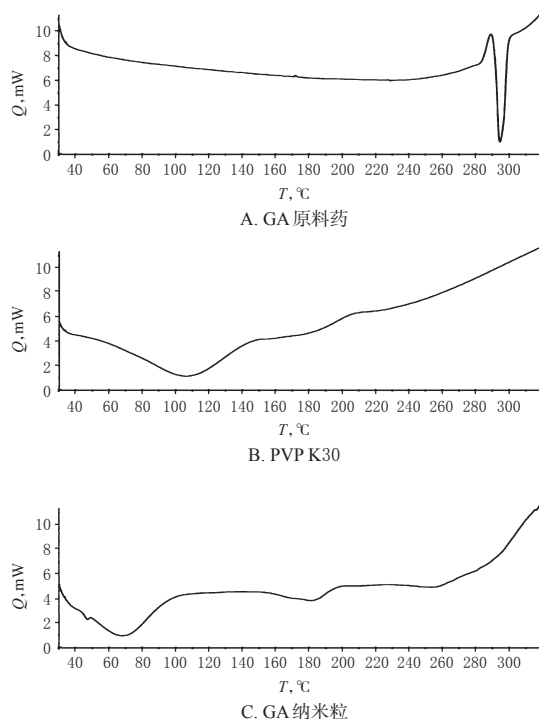


图3 差示扫描热分析图

Fig 3 DSC patterns

2.2.4 粒度分析 分别称取GA原料药、“2.1”项下所制GA纳米粒各5 mg,用适量水稀释后,使用纳米粒度分析仪测定其粒径。每种样品平行测定3次。结果,GA原料药的平均粒径为 $(2592.33 \pm 207.51)\text{ nm}$,分散指数为 0.15 ± 0.03 ;GA纳米粒的平均粒径为 $(194.88 \pm 23.52)\text{ nm}$,PDI为 0.24 ± 0.04 ,表明GA与PVP K30形成了纳米粒,且粒度分散均匀,详见图4。

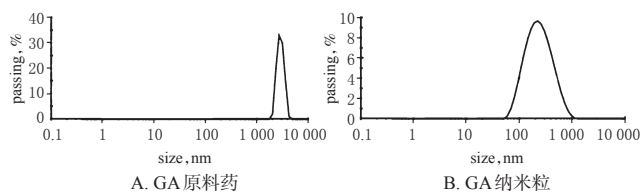


图4 粒径分布图

Fig 4 Particle size distribution

2.3 含量测定方法的建立

采用HPLC法测定纳米粒中GA的含量。

2.3.1 色谱条件 色谱柱:AQ-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.2%磷酸水溶液(90:10, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:250 nm;柱温:25 ℃;进样量:

10 μL 。

2.3.2 溶液的制备 对照品贮备液:精密称取GA对照品50 mg,用甲醇定容至50 mL量瓶中,制成质量浓度为1 mg/mL的对照品贮备液。供试品溶液:分别精密称取GA原料药及纳米粒各30 mg,加水5 mL超声(功率:300 W,频率:50 Hz)处理20 min后,制成过饱和溶液,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温振荡器中以100 r/min振摇12 h,所得溶液静置30 min后,经0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。阴性对照溶液:取PVP K30适量,按上述供试品溶液配制方法制备,即得。

2.3.3 专属性试验 取GA对照品溶液(取“2.3.2”项下GA对照品贮备液用流动相溶解,质量浓度为50 $\mu\text{g/mL}$)、GA纳米粒供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,GA对照品及其纳米粒在相同保留时间处均有类似的色谱峰,且PVP K30对定量分析无干扰,详见图5。

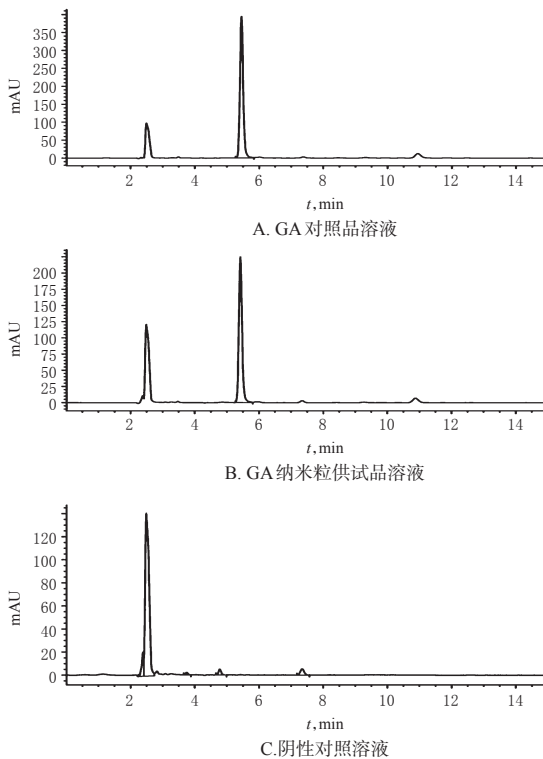


图5 高效液相色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms

2.3.4 标准曲线的绘制 精密量取“2.3.2”项下GA对照品贮备液适量,用甲醇稀释,制成质量浓度分别为1 000、500、200、100、50、10、5 $\mu\text{g/mL}$ 的GA系列标准溶液,按“2.3.1”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、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=12.63x-57.67$ ($R^2=0.9984$)。结果,GA检测质量浓度的线性范围为5~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.5 检测限与定量限 取“2.3.4”项下质量浓度为50 $\mu\text{g/mL}$ 的GA标准溶液适量,用甲醇稀释,以信噪比3:1、

10:1分别计算检测限和定量限。结果,GA的检测限为1 $\mu\text{g/mL}$,定量限为4 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.6 精密度的试验 精密量取“2.3.2”项下GA对照品贮备液2 mL,用甲醇定容至10 mL量瓶中,制成质量浓度为200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积,考察精密度。结果,GA峰面积的RSD为0.32% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.7 重复性试验 取GA纳米粒共6份,分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按标准曲线法计算GA含量。结果,GA含量的RSD为1.26% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.3.8 稳定性试验 取GA纳米粒适量,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置0、6、12、24、48、72 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,GA峰面积的RSD为1.17% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置72 h内稳定性良好。

2.3.9 加样回收率试验 精密称取已知含量的GA纳米粒适量,共9份,分别按已知量的120%、100%、80%加入GA对照品,用甲醇定容至10 mL,制得相应溶液,再按“2.3.1”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,不同加样量样品的平均回收率分别为98.78%、98.89%、98.84%,RSD均小于1% ($n=3$),详见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=3$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=3$)

纳米粒称样量,mg	已知量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
14.96	2.39	1.91	4.28	98.95	98.78	0.79
14.97	2.39	1.92	4.27	97.92		
14.93	2.39	1.91	4.29	99.48		
14.95	2.39	2.41	4.78	99.17	98.89	0.49
14.92	2.39	2.39	4.74	98.33		
14.96	2.39	2.41	4.78	99.17		
14.94	2.39	2.88	5.24	98.96	98.84	0.88
14.95	2.39	2.87	5.20	97.91		
14.93	2.39	2.89	5.27	99.65		

2.4 溶解度的测定

取GA原料药和GA纳米粒各适量,按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以标准曲线法计算GA含量,并计算溶解度:溶解度($\mu\text{g/mL}$)=溶质质量/溶剂体积。每种样品平行测定3次。结果,GA原料药在水中的溶解度为(1.05 \pm 0.01) $\mu\text{g/mL}$;制成纳米粒后,GA的溶解度为(250.00 \pm 0.15) $\mu\text{g/mL}$,提示纳米粒对GA的增溶效果明显。

2.5 载药量的测定

精密称取GA纳米粒5 mg,共3份,加甲醇5 mL,按“2.3.2”项下供试品溶液制备方法处理后,再按“2.3.1”项下方法进样分析,记录峰面积。采用标准曲线法计算含

量,并计算载药量:载药量(%)= $m_{\text{游离}}/m_{\text{总}}\times 100\%$ (式中, $m_{\text{游离}}$ 、 $m_{\text{总}}$ 分别为游离GA和GA纳米粒的质量)^[16]。结果,3份GA纳米粒的载药量分别为16.01%、15.92%、16.03%,平均载药量为15.99%(RSD=0.06%, $n=3$)。

2.6 GA纳米粒的体外抗肿瘤活性研究

采用MTT法测定。将HepG2细胞接种于MEM α 完全培养基(即含10%FBS、1%青链霉素双抗混合液的MEM α 培养基,下同)中复苏后,稳定传代2次。取传代后处于对数生长期的细胞,按 1.0×10^5 个/mL以100 μL /孔接种至96孔板中,置于5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养24 h后,替换培养基为含0.5%FBS的MEM α 培养基,孵育过夜,将细胞随机分为空白对照组(DMSO)和给药组(GA原料药及纳米粒的终浓度分别均为12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$,以GA计;剂量设置参考本课题组前期预试验结果和含量测定结果),每组设3个复孔。吸弃上清液,空白对照组加入含0.1% DMSO的MEM α 完全培养基100 μL ,各给药组加入含相应药物的MEM α 完全培养基100 μL ,置于5% CO₂、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养24 h;向各孔中加入MTT试剂50 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h;吸弃上清液,向各孔中加入DMSO 150 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器中以500 r/min振摇5 min后,采用多功能微孔板检测仪于490 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值。上述试验重复3次。以空白对照组为100%,计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(各药物组平均OD值/空白对照组平均OD值) $\times 100\%$,并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

采用GraphPad Prism 5软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。结果显示,与空白对照组比较,GA原料药200 $\mu\text{mol/L}$ 组和GA纳米粒各剂量组的细胞存活率均显著降低,且GA纳米粒组(除12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组外)显著低于同剂量GA原料药组($P<0.01$);GA原料药及纳米粒的IC₅₀值分别为364.4、86.3 $\mu\text{mol/L}$,前者是后者的4.2倍。GA原料药及纳米粒对HepG2细胞的抑制作用见表2,两者的抑制曲线见图6。

表2 GA原料药及纳米粒对HepG2细胞的抑制作用
Tab 2 Inhibitory effect of GA and its nanoparticles on HepG2 cells

组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %
空白对照组	100	GA纳米粒12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	94.35 \pm 1.15**
GA原料药12.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	95.48 \pm 8.50	GA纳米粒25 $\mu\text{mol/L}$ 组	73.38 \pm 1.19***
GA原料药25 $\mu\text{mol/L}$ 组	97.31 \pm 1.03	GA纳米粒50 $\mu\text{mol/L}$ 组	88.53 \pm 0.18***
GA原料药50 $\mu\text{mol/L}$ 组	100.89 \pm 1.34	GA纳米粒100 $\mu\text{mol/L}$ 组	40.36 \pm 0.89***
GA原料药100 $\mu\text{mol/L}$ 组	94.86 \pm 3.79	GA纳米粒200 $\mu\text{mol/L}$ 组	9.91 \pm 0.88***
GA原料药200 $\mu\text{mol/L}$ 组	80.01 \pm 2.62**		

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与GA原料药组比较,## $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$; vs. GC raw material group, ## $P<0.01$

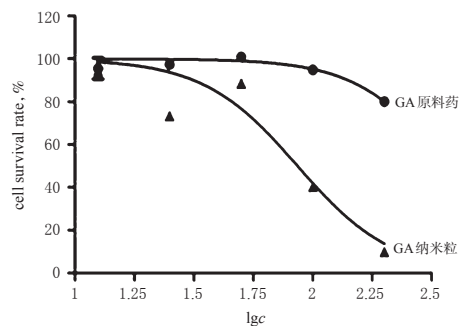


图6 GA原料药及纳米粒对HepG2细胞的抑制曲线($n=3$)

Fig 6 Inhibitory curves of GA and its nanoparticles on HepG2 cells($n=3$)

3 讨论

纳米技术的发展为药物输送系统的研究提供了新的思路 and 方向。目前,肿瘤的临床治疗以手术治疗为主,并辅以化疗、放疗和生物治疗,而固体脂质纳米粒是肿瘤治疗中最有应用前景的纳米载体,除可改善化疗药物溶解度和生物利用度外,还可克服其靶向性不佳的缺点^[18]。

GA生物活性多样且应用广泛,但由于该化合物较低的溶解度使得其应用受到了一定的限制^[2-11]。为改善GA的溶解度和生物利用度,并将其制成适宜的制剂类型,国内外学者进行了多方面的尝试和研究^[19-20],常见的剂型包括微晶纤维素微丸^[21]、聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球^[22]、脂质凝胶^[23]、脂质混悬剂^[24]、长循环固体脂质纳米粒^[25]等。考虑到纳米粒制备过程简单、物理稳定性高、药物释放稳定、所用赋形剂少、不易被机体降解或消除等优点^[14-15],本研究拟将GA制成纳米粒。PVP作为一种合成水溶性高分子化合物,具有优良的生理惰性,不参与人体新陈代谢,同时具有优良的生物相容性,是一种理想的纳米粒稳定剂^[26]。因此,本研究选择常用的PVP K30为载体材料。

与介质研磨法和高压均质法等耗能过程相比,反溶剂沉淀法具有低耗能、操作简单等优点,同时还具有溶剂选择范围较广、温度适用范围大的优势,是一种常用的药物纳米粒制备方法^[27]。与传统的反溶剂沉淀法相比,本研究还增加了冷冻干燥的处理步骤,以保证制备的纳米粒粒径小、分布均匀^[28]。在制备GA纳米粒的基础上,本研究采用X射线衍射法、红外光谱法、差示扫描量热法、粒度分析等方法对所得纳米粒进行表征;采用HPLC法测定了GA原料药与纳米粒的溶解度,并同法测定了纳米粒中GA的载药量;同时,采用MTT法比较了GA原料药与纳米粒对人肝癌细胞HepG2细胞增殖的影响。

结果显示,本研究所制GA纳米粒中GA的X射线衍射特征峰和红外特征吸收峰均消失,吸热峰发生改

变;纳米粒的粒径为(194.88±23.52) nm,低于原料药的(2592.33±207.51) nm;PDI为0.24±0.04,高于原料药的0.15±0.03;纳米粒的平均载药量为15.99%,溶解度由原料药的(1.05±0.01) μg/mL升至(250.00±0.15) μg/mL。体外抗肿瘤试验结果显示,GA原料药200 μmol/L组和GA纳米粒各剂量组(12.5、25、50、100、200 μmol/L)的细胞存活率均较空白对照组显著降低,且除12.5 μmol/L组外其余GA纳米粒剂量组的细胞存活率均显著低于同剂量GA原料药组;GA纳米粒的IC₅₀值为86.3 μmol/L,低于原料药的364.4 μmol/L。这提示反溶剂沉淀-冷冻干燥法所制纳米粒粒径小且分布均匀;将GA制成纳米粒可明显提高药物的溶解度,并可增强药物对人肝癌细胞HpG2的体外抑制活性。

综上所述,本研究成功制备了GA纳米粒;所制纳米粒粒径小且分布均匀,溶解度增大且体外抗肿瘤活性增强。本研究为GA的开发利用提供了新的研究思路,也为GA纳米粒药动学及靶向制剂等研究奠定了基础。

参考文献

[1] 梁亚冰,苏秀兰.甘草次酸逆转肿瘤多药耐药机制的研究进展[J].中国现代应用药学,2019,36(9):1151-1154.

[2] 张韞琪,蔡云,刘媛,等.甘草次酸选择性抑制肝癌细胞的增殖[J].南方医科大学学报,2018,38(4):477-482.

[3] MANCHA-RAMIREZ A, YANG X, LIANG H, et al. Harnessing the gatekeepers of glucocorticoids for chemoprevention of non-melanoma skin cancer[J]. *Mol Carcinogen*, 2018,58(1):102-112.

[4] 邱润丰. 18β-甘草次酸在结直肠癌细胞增殖、侵袭、迁移中的作用及其机制的研究[D].杭州:浙江大学,2017.

[5] 彭江华,马建永.甘草次酸对人乳腺癌MDA-MB-231细胞的影响研究[J].中国临床药理学杂志,2019,35(20):2616-2619.

[6] LI X, LIU Y, WANG N, et al. Synthesis and discovery of 18β-glycyrrhetic acid derivatives inhibiting cancer stem cell properties in ovarian cancer cells[J]. *RSC Advances*, 2019. DOI:10.1039/C9RA04961D.

[7] 丁佩剑,王婧婧,赵津,等.甘草次酸对胃癌细胞SGC7901增殖的影响及其机制[J].中国临床药理学杂志,2019,35(17):1902-1908.

[8] HOSTETLER BJ, UCHAKINA ON, BAN H, et al. Treatment of hematological malignancies with glycyrrhizic acid[J]. *Anticancer Res*, 2017,37(3):997-1004.

[9] YU T, YAMAGUCHI H, NOSHITA T, et al. Selective cytotoxicity of glycyrrhetic acid against tumorigenic r/m HM-SFME-1 cells: potential involvement of H-Ras down-regulation[J]. *Toxicol Lett*, 2010,192(3):425-430.

[10] 罗晔,孙晓飞,许琼明.甘草次酸、11-脱氧甘草次酸和熊果酸水溶性钠盐的制备[J].亚太传统医药,2008,4(2):50-53.

[11] 徐静.甘草次酸及乙酰甘草次酸的制备和纯化研究[D].兰州:兰州理工大学,2011.

[12] 祝露佳,陈礼迎,郑爽,等.星点设计-效应面法优化银杏内酯B纳米冻干制剂的制备工艺及其体外释放研究[J].中草药,2019,50(22):5439-5447.

[13] 刘敏,张芷依,陆伟跃.多肽介导靶向的纳米制剂[J].中国医药工业杂志,2019,50(10):1085-1097.

[14] 姜怀利.纳米技术在药物制剂研究中的应用[J/CD].临床医药文献电子杂志,2019,6(40):189-190.

[15] 韦秋雨.生姜中活性成分6-姜酚的纳米制剂研究[D].南京:江苏大学,2019.

[16] 周小圆,林华庆,雷伟.难溶性药物纳米晶体的研究进展[J].中南药学,2013,11(5):353-358.

[17] 潘菲.甘草次酸固体分散体对福染毒大鼠肝损伤的干预作用[D].唐山:华北理工大学,2015.

[18] 栗达,贾颜鸿,周童,等.固体脂质纳米粒药物载体在肿瘤治疗中应用的研究进展[J].吉林大学学报(医学版),2020,46(1):200-204.

[19] LI M, WANG Y, JIANG S, et al. Biodistribution and biocompatibility of glycyrrhetic acid and galactose-modified chitosan nanoparticles as a novel targeting vehicle for hepatocellular carcinoma[J]. *Nanomedicine: Lond*, 2019,15(2):145-161.

[20] ALHO DPS, SALVADOR JAR, CASCANTE, M, et al. Synthesis and antiproliferative activity of novel a-ring cleaved glycyrrhetic acid derivatives[J]. *Molecules*, 2019. DOI:10.3390/molecules24162938.

[21] 张永强,刘新友,唐志书,等.甘草次酸结肠靶向微丸的研制[J].现代生物医学进展,2017,17(3):425-428.

[22] 王虹,张广兴,刘艳华,等.溶剂体系对甘草次酸微球性能的影响研究[J].中国医院药学杂志,2016,36(22):1947-1950.

[23] 宋艳丽,徐坤,韩腾飞,等.甘草次酸固体脂质纳米凝胶的制备及体外透皮效应[J].西北药学杂志,2013,28(2):197-200.

[24] 雷亚亚,冯军,王虹,等.甘草次酸钠晶混悬液的稳定化研究[J].中国药学杂志,2016,51(2):115-119.

[25] 王炯,周小菊,胡先明,等.甘草次酸长循环固体脂质纳米粒的制备与体外性能研究[J].中国药房,2012,23(15):1364-1367.

[26] 侯慧玉. PVP系聚合物在发用化妆品中的应用概述[J].广州化工,2010,38(2):38-41.

[27] 杜新莹.反溶剂法制备的熊果酸纳米粒及其口服生物利用度研究[D].天津:天津大学,2015.

[28] 刘雪姣.真空冷冻干燥法制备纳米碳酸钙粉体实验研究[D].沈阳:东北大学,2010.

(收稿日期:2019-12-26 修回日期:2020-04-24)

(编辑:张元媛)