

# 灯盏花素纳米晶的制备及质量评价<sup>Δ</sup>

刘柳毅<sup>1\*</sup>, 温璐平<sup>1</sup>, 许男徽<sup>1</sup>, 李庆国<sup>2#</sup> (1. 中山大学附属第七医院药学部, 广东 深圳 518107; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

中图分类号 R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)15-1861-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.15.12

**摘要** 目的: 制备灯盏花素(BRE)纳米晶, 并对其质量评价。方法: 采用介质研磨法制备BRE纳米晶混悬液, 以其粒径和多分散系数(PDI)为评价指标, 对研磨介质的直径和用量、研磨时间、稳定剂种类和比例、BRE比例进行考察, 筛选最优工艺和处方; 以BRE纳米晶形态、色泽、粒径和PDI为评价指标, 对加不同种类冻干保护剂(5%甘露醇、5%葡萄糖、5%乳糖)和不加冻干保护剂进行考察, 筛选最优冻干保护剂; 采用粒度分析仪、扫描电镜、X-射线粉末衍射法(XRPD)、差示扫描量热法(DSC)对以最优工艺和处方所制备的BRE纳米晶进行质量评价。结果: BRE纳米晶最优工艺及处方为氧化锆珠粒径0.6 mm、用量450 g, 研磨时间为1 h, 稳定剂为15%吐温80, BRE比例为25%, 不添加冻干保护剂。所制得的BRE纳米晶为质地疏松、色泽均匀的黄色粉末, 平均粒径为(283.10 ± 3.08) nm, 平均PDI为0.212 ± 0.021, 平均Zeta电位为(-38.48 ± 0.39) mV; 其为棒状晶型, 分布均一且晶型稳定; 20 min内累积溶出度为(90.37 ± 1.22)%; 在温度(40 ± 2) °C、相对湿度(75 ± 5)%条件下, 避光放置3个月后稳定性良好。结论: BRE纳米晶的制备方法简单、可行, 且所制得的BRE纳米晶稳定性、溶出度均良好。

**关键词** 灯盏花素; 纳米晶; 介质研磨法; 处方; 工艺; 质量评价

## Preparation and Quality Evaluation of Breviscapine Nanocrystals

LIU Liuyi<sup>1</sup>, WEN Luping<sup>1</sup>, XU Nanhui<sup>1</sup>, LI Qingguo<sup>2</sup> (1. Dept. of Pharmacy, the Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangdong Shenzhen 518107, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Breviscapine (BRE) nanocrystals, and to evaluate its quality. METHODS: BRE nanocrystal suspensions were prepared by media milling method. The diameter and amount of grinding beads, grinding time, type and ratio of stabilizer, BRE ratio were investigated to screen the optimal technology and formulation with particle size and polydispersity index (PDI) as evaluation indexes. Using morphology, color, particle size and PDI of BRE nanocrystals as evaluation index, different lyoprotectants (50% mannitol, 5% glucose, 5% lactose) and without lyoprotectant were investigated to screen the optimal lyoprotectant. Particle size analyzer, scanning electron microscope (SEM), X-Ray diffraction (XRPD), differential scanning calorimeter (DSC) were used to evaluate the quality of BRE nanocrystals which was prepared with the optimal technology and formulation. RESULTS: The optimal technology and formulation of BRE nanocrystals included that particle size of 0.6 mm zirconia beads with the amount of 450 g, grinding time of 1 h, stabilizer of 15% Tween-80, BRE ratio of 25%, without lyoprotectant. Prepared BRE nanocrystals were yellow powder with loose texture and uniform color. The average particle size of BRE nanocrystals was (283.10 ± 3.08) nm, average PDI was (0.212 ± 0.021) and average Zeta potential was (-38.48 ± 0.39) mV. BRE nanocrystals were rod-like crystals, uniform in distribution and had no change in crystalline state. Accumulative dissolution of BRE nanocrystals were (90.37 ± 1.22)% within 20 min. Under the condition of (40 ± 2) °C temperature and (75 ± 5)% relative humidity, BRE nanocrystals remained stable after being kept away from light for 3 months. CONCLUSIONS: Established preparation method of BRE nanocrystals is simple and feasible. Prepared BRE nanocrystals show good stability and dissolution.

**KEYWORDS** Breviscapine; Nanocrystals; Media milling; Formulation; Technology; Quality evaluation

灯盏花素(BRE)是从灯盏花中提取的一类总黄酮, 以野黄芩苷(又名灯盏乙素)为主要成分(占95%以上), 是治疗冠心病、脑血栓等心脑血管疾病的有效成分, 广

<sup>Δ</sup> 基金项目: 广东省自筹经费类科技计划项目(No.2017ZC-0140)

\* 药师, 硕士。研究方向: 药物制剂新技术。电话: 0755-81206168。E-mail: 916293115@qq.com

# 通信作者: 教授, 博士。研究方向: 药物制剂新技术。电话: 020-39358044。E-mail: lqg8512@gzucm.edu.cn

泛应用于临床<sup>[1]</sup>。BRE属于生物药剂学第Ⅳ类药物<sup>[2]</sup>, 其水溶解性较差, 在25 °C水中的平衡溶解度约59 μg/mL<sup>[3]</sup>; 在小肠上皮细胞的渗透性较弱, 口服生物利用度较低, 例如犬口服BRE的绝对生物利用度仅为0.4%<sup>[4]</sup>, 从而限制了其在临床上的应用。因此, 研究BRE新的给药系统, 解决其生物利用度低的问题, 已经成为药剂工作者的研究重点。

纳米晶技术是近年来针对难溶性药物开发的一种

新剂型,该技术以少量表面活性剂或高分子材料作为稳定剂,通过降低药物粒径至纳米级来增加难溶性药物的溶出度,从而提高药物生物利用度<sup>[5]</sup>。余佐彦等<sup>[6]</sup>采用自乳化溶剂扩散法制备了BRE纳米混悬剂,显著提高了BRE在大鼠体内的生物利用度并延长了其作用时间。Yang X等<sup>[7]</sup>以野黄芩苷元作为前体化合物,采用反溶剂沉淀法制备了野黄芩苷元纳米混悬剂,且在大鼠药动学实验中发现,野黄芩苷元纳米混悬剂组的达峰时间和迟滞时间相比原料药组显著减少。由此可知,将BRE制备成纳米制剂是可行的,但是这些研究所采用的方法存在一定局限性,如反溶剂沉淀法多用有机溶剂溶解药物,其残留的溶剂可能会对人体产生副作用,且该方法要求药物必须在能与水互溶的溶剂中溶解,但BRE不仅水溶性差,在非水介质中也难以溶解<sup>[8]</sup>。介质研磨法制备过程简单、不需要加入有机溶剂、适用范围广,且所制备的纳米药物的粒径窄<sup>[9]</sup>。基于此,本研究采用介质研磨法制备BRE纳米晶混悬液,以BRE粒径和分散系数(PDI)为评价指标,筛选其最优工艺参数和处方;再经冷冻干燥技术将其固化形成纳米晶,并对其粒径分布、形态、溶出度、稳定性等进行评价,以期对BRE纳米晶后续研究提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Lyo-0.5型真空冷冻干燥机(上海东富龙科技股份有限公司);KQ3200B型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);ACCELA型高效液相色谱系统(美国Thermo Fisher Scientific公司);Zetasizer 1000 HSA型粒径分析仪(英国Malvern公司);Zeta PALS型粒度仪(美国Brookhaven仪器公司);Merlin Compact型场发射扫描电镜(德国Zeiss公司);D8Advance型X射线粉末衍射(XRPD)仪(德国Bruker公司);DSC-60型差示扫描量热(DSC)仪(日本Shimadzu公司);KYC-100B型恒温培养摇床(上海福玛实验设备有限公司);ZRS-8G型智能溶出度试验仪(天津市盛鑫通达科技有限公司);立式砂磨机(沈阳化工研究院)。

### 1.2 药品与试剂

BRE原料药(珠海远城医药化工有限公司,批号:20180301,纯度:95.30%);野黄芩苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号:20180204,纯度:≥98%);吐温80(天津市福晨化学试剂厂,批号:20170822);乳糖、十二烷基硫酸钠(SDS)(天津市大茂化学试剂厂,批号:20170902、20170812);泊洛沙姆(德国BASF公司,批号:WPCE565D);聚维酮K30(PVPK30,安徽山河药用辅料有限公司,批号:20170924);葡萄糖(山东瑞泰化工有限公司,批号:20171124);甘露醇(北京化学试剂厂,批号:20170823);水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 BRE纳米晶混悬液工艺参数考察

相关研究发现,研磨介质的粒径、用量以及研磨时间对纳米晶制备工艺有一定的影响<sup>[10]</sup>,因此本研究选择这几个因素考察BRE纳米晶混悬液的制备工艺。

2.1.1 研磨珠粒径的筛选 称取BRE原料药7.5 g,置于含有吐温80(1.125 g)的水溶液(22.5 mL)中,搅拌混悬,再加入不同粒径(0.6、0.8、1.0、2.0 mm)的氧化锆珠450 g,研磨1 h,分别制备3批BRE纳米晶混悬液。以BRE纳米晶混悬液的粒径、PDI为指标,筛选最优研磨珠用量。结果,直径为0.6 mm的氧化锆珠所制备的BRE纳米晶混悬液的粒径和PDI较小,因此确定研磨珠粒径为0.6 mm。研磨珠粒径的筛选结果见图1。

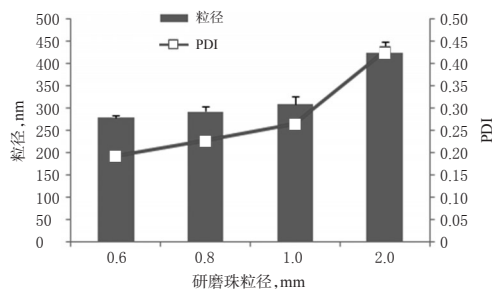


图1 研磨珠粒径的筛选结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig 1 Screening result of grinding bead particle size ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

2.1.2 研磨珠用量的筛选 称取BRE原料药7.5 g,置于含有吐温80(1.125 g)的水溶液(22.5 mL)中,搅拌混悬,再加入不同用量(390、420、450、480 g)的氧化锆珠(粒径为0.6 mm),研磨1 h,分别制备3批BRE纳米晶混悬液。以BRE纳米晶混悬液的粒径、PDI为指标,筛选最优研磨珠用量。结果,随着氧化锆珠用量的增加,BRE纳米晶混悬液的粒径、PDI逐渐减小;但氧化锆珠用量增加到一定程度时,BRE纳米晶混悬液的粒径、PDI反而增加,因此确定氧化锆珠的用量为450 g。研磨珠用量的筛选结果见图2。

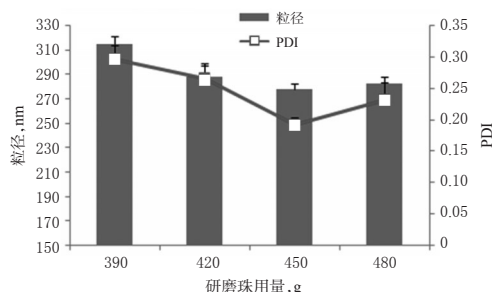


图2 研磨珠用量的筛选结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig 2 Screening result of grinding bead amount ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

2.1.3 研磨时间的筛选 称取BRE原料药7.5 g,置于含有吐温80(1.125 g)的水溶液(22.5 mL)中,搅拌混悬,加入氧化锆珠(粒径为0.6 mm)450 g,分别研磨0.5、

0.75、1.0、1.5 h,制备3批BRE纳米晶混悬液。以BRE纳米晶混悬液的粒径、PDI为指标,筛选最优研磨时间。结果,随着研磨时间的延长,BRE纳米晶混悬液的粒径、PDI逐渐减小;研磨0.5、0.75、1.0 h时,BRE纳米晶混悬液的粒径、PDI减小的幅度较大;研磨1.5 h时,BRE纳米晶混悬液粒径虽然较研磨1.0 h时的粒径减小,但减小幅度不大。综合考虑能耗和时间,确定研磨时间为1 h。研磨时间的筛选结果见图3。

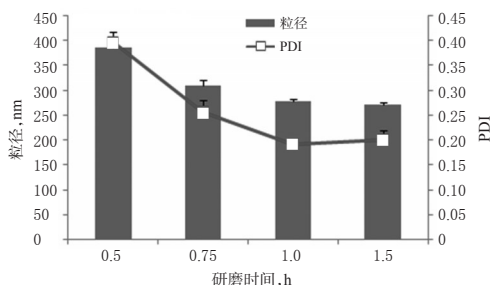


图3 研磨时间的筛选结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig 3 Screening result of grinding time( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

## 2.2 BRE纳米晶混悬液的处方考察

相关研究发现,将难溶性药物研磨成纳米级的粒子后,能产生较高的表面能,进而导致粒子的粒径增加,失去纳米晶药物特有的物理、化学优势<sup>[11]</sup>。因此,常使用稳定剂包裹在粒子的表面,防止粒子的聚集。常用的稳定剂包括表面活性剂和聚合物两大类。本研究选择非离子型表面活性剂泊洛沙姆、吐温80和阴离子型表面活性剂SDS以及高分子聚合物PVPK30作为稳定剂进行筛选。

**2.2.1 稳定剂种类和比例的筛选** 称取BRE原料药7.5 g若干份,分别置于含有8%、12%、15%、18%不同稳定剂(泊洛沙姆、吐温80、SDS、PVPK30)的水溶液(22.5 mL)中,搅拌混悬,加入氧化锆珠(粒径为0.6 mm)450 g,研磨1 h,分别制备3批BRE纳米晶混悬液。以BRE纳米晶混悬液的粒径、PDI为指标,筛选最优稳定剂种类和比例。另外,为了充分比较稳定剂种类和比例对BRE纳米晶混悬液稳定性的影响,笔者还考察了将其避光放置7 d后的粒径、PDI情况。结果,15%吐温80和15%SDS作为稳定剂所制得的BRE纳米晶混悬液放置0、7 d的粒径变化不大,稳定效果较好;由于SDS在研磨过程中会产生大量泡沫,影响药物的回收,因此确定稳定剂为15%吐温80。稳定剂种类和比例的筛选结果见图4、图5。

**2.2.2 BRE比例的筛选** 分别称取BRE原料药4.5、6、7.5、9 g(在BRE纳米晶混悬液中的比例分别为15%、20%、25%、30%),分别置于含有15%吐温80的水溶液(水用量分别为25.5、24.0、22.5、21.0 mL)中,搅拌混悬,加入氧化锆珠(粒径为0.6 mm)450 g,研磨1 h,分别制备3批BRE纳米晶混悬液。以BRE纳米晶混悬液的粒径、

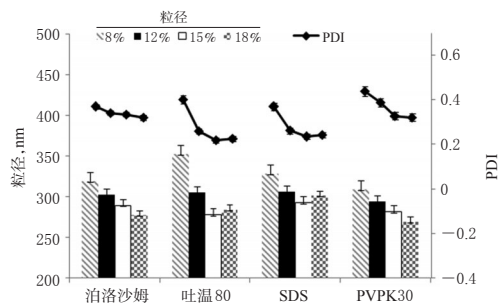


图4 放置0 d时稳定剂种类和比例的筛选结果( $n=3$ )

Fig 4 Screening result of stabilizer type and ratio under 0 day of placement ( $n=3$ )

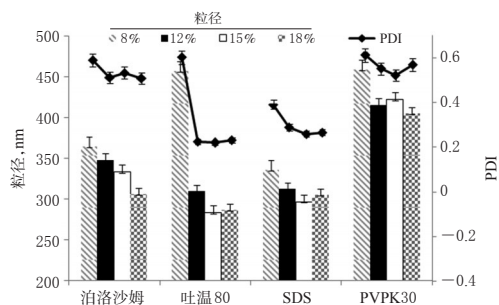


图5 放置7 d时稳定剂种类和比例的筛选结果( $n=3$ )

Fig 5 Screening result of stabilizer type and ratio under 7 days of placement ( $n=3$ )

PDI为指标,筛选最优BRE比例。结果,随BRE比例的增加,BRE纳米晶混悬液的粒径和PDI均先逐渐减少后逐渐增大;当BRE比例为25%时,BRE纳米晶混悬液的粒径和PDI最小,因此确定BRE比例为25%。BRE比例的筛选结果见图6。

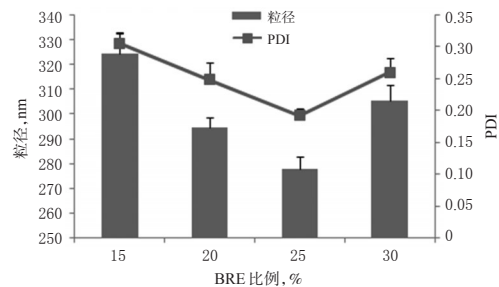


图6 BRE比例的筛选结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig 6 Screening result of BRE ratio( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.2.3 BRE纳米晶混悬液的处方工艺验证** 取BRE原料药7.5 g(在BRE纳米晶混悬液中的比例为25%),置于含有15%吐温80的水溶液(22.5 mL)中,搅拌混悬,加入氧化锆珠(粒径为0.6 mm)450 g,研磨1 h,平行制备3批BRE纳米晶混悬液,并测定其粒径和PDI。结果,BRE纳米晶混悬液的平均粒径为 $(278.03 \pm 4.85)$  nm,平均PDI为 $0.192 \pm 0.012$ 。

## 2.3 BRE纳米晶冻干工艺考察

以BRE纳米晶冻干前后体积变化不大,冻干后不收缩、无塌陷,色泽均匀、无花斑,有韧性,轻轻捻磨即成粉

状,加原体积的水可迅速恢复至冻干前状态,且粒径和PDI与混悬液状态所测结果无显著性差异为其冻干工艺合格的筛选标准<sup>[12]</sup>。

**2.3.1 冻干保护剂种类的筛选** 取“2.2.3”项下制得的BRE纳米晶混悬液15 mL,分别加入冻干保护剂5%甘露醇、5%葡萄糖、5%乳糖各0.75 g,同时考察不加入冻干剂的情况(不需振摇),振摇使其溶解均匀,分装于25 mL西林瓶中,于-40 ℃条件下预冻5 h后,加热升温至-20 ℃,维持此温度20 h后,加热升温至20 ℃,并维持此温度5 h,即得BRE纳米晶。观察所制BRE纳米晶的外观,并取适量以水溶解后,测定其粒径和PDI。平行试验3次,以筛选冻干保护剂种类。结果,加入冻干保护剂和不加冻干保护剂对BRE粒径和PDI的影响差异不大,因此,选择不加冻干保护剂。冻干保护剂的筛选结果见表1。

表1 冻干保护剂种类的筛选结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1 Screening result of lyoprotectants type ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

保护剂种类	外观	粒径, nm	PDI
5%甘露醇	质地疏松、色泽均匀黄色粉末	284.86 ± 3.87	0.225 ± 0.018
5%葡萄糖	质地疏松、色泽均匀黄色粉末	280.48 ± 4.52	0.220 ± 0.012
5%乳糖	质地疏松、色泽均匀黄色粉末	287.56 ± 4.69	0.219 ± 0.020
不加保护剂	质地疏松、色泽均匀黄色粉末	283.09 ± 3.51	0.212 ± 0.017

**2.3.2 BRE纳米晶冻干工艺验证** 取“2.2.3”项下制得的BRE纳米晶混悬液15 mL,分装于25 mL西林瓶中,按“2.3.1”项下“于-40 ℃条件下预冻5 h后……并维持此温度5 h”的步骤操作,平行制备3批BRE纳米晶。观察所制BRE纳米晶的外观,并取适量水溶解后,测定其粒径和PDI。结果,BRE纳米晶混悬液冻干后不皱缩、无塌陷,色泽均匀、无花斑,平均粒径为(283.09 ± 3.51) nm,平均PDI为0.212 ± 0.017。

## 2.4 BRE纳米晶中野黄芩苷含量测定方法的建立

**2.4.1 色谱条件** 色谱柱为Diamonsil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液(60:40, V/V);检测波长为335 nm;流速为900 mL/min;柱温为35 ℃;进样量为10 μL。

**2.4.2 野黄芩苷对照品溶液制备** 精密称取野黄芩苷对照品10 mg于25 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容,制成质量浓度为400 μg/mL的对照品贮备液;精密吸取750 μL对照品贮备液于5 mL量瓶中,加甲醇制成质量浓度为60 μg/mL的野黄芩苷对照品溶液。

**2.4.3 供试品溶液制备** 精密称取“2.3.2”项下制备的BRE纳米晶15 mg(相当于含BRE 10 mg),参照2015年版《中国药典》(四部)中溶出度测定第三法(小杯法)<sup>[13]</sup>,以200 mL水作为溶出介质,设置水温为(37 ± 0.5) ℃、转速为35 r/min,于投样后60 min取样3 mL,用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.4.4 空白辅料溶液** 按“2.2.3”项下处方比例和方法

制备无BRE的空白辅料混悬溶液,按“2.3.2”项下方法制备无BRE的空白纳米晶,再按“2.4.3”项下方法制备空白辅料溶液。

**2.4.5 专属性考察** 取上述野黄芩苷对照品溶液、供试品溶液、空白辅料溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。结果,野黄芩苷的峰形对称,且空白辅料对其色谱峰无干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图7。

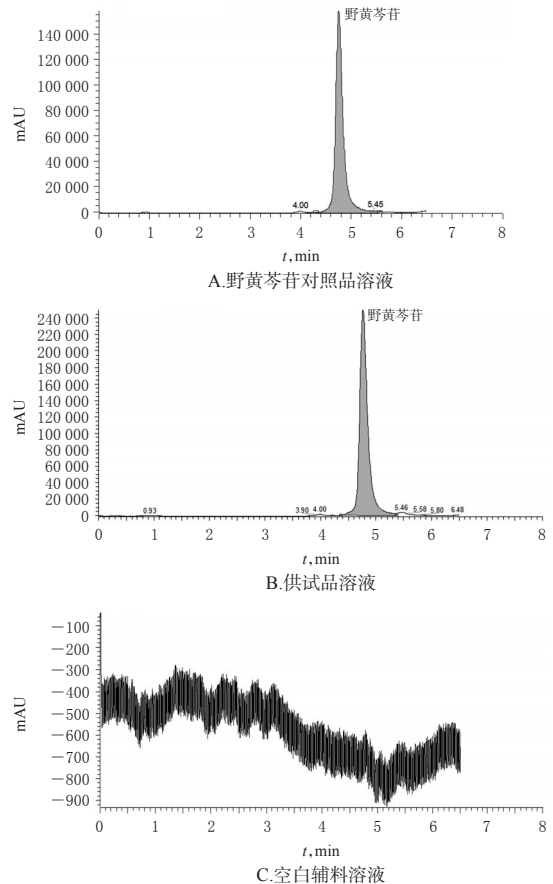


图7 高效液相色谱图

Fig 7 HPLC chromatograms

**2.4.6 线性关系考察** 分别精密量取“2.4.2”项下野黄芩苷对照品贮备液0.06、0.125、0.25、0.75、1.00、1.25 mL至5 mL量瓶中,加甲醇稀释制成质量浓度分别为4.8、10、20、60、80、100 μg/mL的系列线性溶液,用0.45 μm微孔滤膜滤过后,取续滤液,按“2.4.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。以野黄芩苷质量浓度为横坐标(x, μg/mL)、峰面积为纵坐标(y)进行回归分析,得回归方程为 $y=21\ 485x-25\ 461$ ( $r=0.999\ 6$ ),表明野黄芩苷质量浓度线性范围为4.8~100 μg/mL。

**2.4.7 检测限与定量限考察** 取“2.4.6”项下制备的质量浓度为4.8 μg/mL的野黄芩苷对照品溶液适量,用甲醇倍比稀释,按“2.4.1”项下色谱条件进样分析,以信噪比3:1、10:1分别计算检测限和定量限。结果,野黄芩苷的检测限为0.066 8 μg/mL,定量限为0.131 5 μg/mL。

2.4.8 精密度试验 取“2.4.6”项下制备的质量浓度为60 μg/mL野黄芩苷对照品溶液适量,按“2.4.1”项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果,野黄芩苷峰面积的RSD为1.49% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

2.4.9 稳定性试验 取“2.4.3”项下供试品溶液适量,于室温放置0、2、4、6、8 h后,按“2.4.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果,野黄芩苷峰面积的RSD为0.71% ( $n=5$ ),表明供试品溶液在室温放置8 h内稳定性良好。

2.4.10 加样回收率试验 精密称取已知野黄芩苷含量的BRE纳米晶3 mg,置于100 mL量瓶中,分别精密加入野黄芩苷对照品贮备液5 mL,加水稀释至刻度,然后用0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液,平行制备6份,再按“2.4.1”项下色谱条件进样分析并计算加样回收率。结果,野黄芩苷的平均加样回收率为100.15% (RSD=1.83%,  $n=6$ ),表明方法准确度良好。加样回收率试验结果见表2。

表2 加样回收率试验结果  
Tab 2 Results of recovery tests

编号	取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
1	3.034 8	2.094 0	2.000 0	4.130 0	101.80	100.15	1.83
2	2.992 7	2.065 0	2.000 0	4.038 0	98.65		
3	3.021 4	2.084 8	2.000 0	4.032 4	97.38		
4	3.013 3	2.079 2	2.000 0	4.091 3	100.61		
5	2.989 2	2.062 5	2.000 0	4.106 1	102.18		
6	3.025 1	2.087 3	2.000 0	4.092 5	100.26		

## 2.5 BRE纳米晶的质量评价

2.5.1 粒径和PDI的测定 取“2.3.2”项下制备的BRE纳米晶样品适量,加水溶解,采用粒度仪测定其粒径、PDI,平行测定3次。结果,BRE纳米晶的平均粒径为(283.10 ± 3.08) nm,平均PDI为0.212 ± 0.021,且粒径分布较窄、呈正态分布,详见图8。

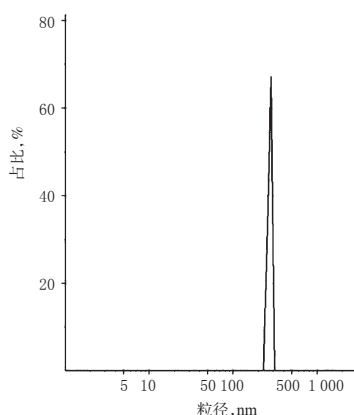


图8 BRE纳米晶的粒径分布图

Fig 8 Particle size distribution of BRE nanocrystals

2.5.2 Zeta电位测定 取“2.3.2”项下制备的BRE纳米晶样品适量,加水溶解,采用粒度仪测定其Zeta电位,平行测定3次。结果,BRE纳米晶的平均Zeta电位为

(-38.48 ± 0.39) mV。

2.5.3 扫描电镜观察 取适量BRE原料药和“2.3.2”项下制备的BRE纳米晶预先进行真空喷金处理,再采用扫描电镜观察两者的表面和晶体结构。结果,BRE原料药主要以针状结构存在,BRE纳米晶主要以棒状结构存在,详见图9。

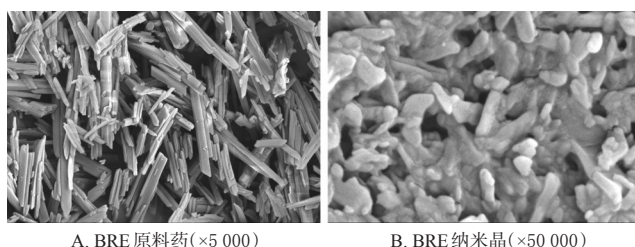


图9 BRE纳米晶和原料药的扫描电镜图

Fig 9 SEM photograph of BRE nanocrystals and raw material

2.5.4 DSC分析 分别取“2.3.2”项下制备的BRE纳米晶、吐温80、BRE原料药各5 mg,进行DSC分析。设置气氛为干燥空气,温度范围为30~350 °C,升温速率为10 °C/min,三氧化二铝为参比物。结果,BRE原料药在136.96、210.79 °C处有吸热峰,在213.6 °C处有放热峰;吐温80的DSC曲线没有吸热、放热峰,表明其为无定形态;BRE纳米晶在131.83、198.55 °C处有吸热峰,在202.27 °C处有放热峰,表明BRE纳米晶仍以晶体形式存在,且晶体形态没有发生改变,详见图10。根据Van't Hoff方程可知,当物质中有微量杂质存在时,其熔点会降低、熔距会变宽<sup>[14]</sup>,而本研究所制备的BRE纳米晶表面由于吸附有吐温80,所以其吸热、放热峰均提前,熔距变宽。

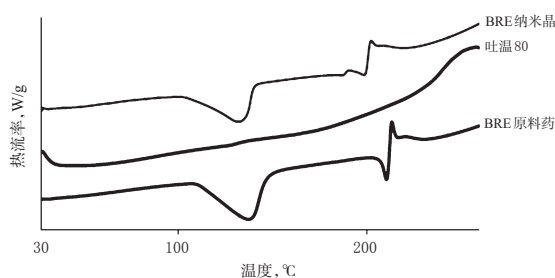


图10 BRE纳米晶、吐温80和BRE原料药的DSC图  
Fig 10 DSC patterns of BRE nanocrystals, Tween 80 and BRE raw material

2.5.5 XRPD分析 分别取BRE原料药和“2.3.2”项下制备的BRE纳米晶适量,进行XRPD分析。选择Cu靶,设置管压为40 kV、管流为40 mA、扫描速度为4°/min、2θ角扫描范围为5°~40°。结果,BRE原料药在10.10°、14.85°、15.93°、25.61°、26.86°有较强的衍射峰,BRE纳米晶在对应位置也有较强的衍射峰出现,表明BRE纳米晶和原料药具有相同的晶体形态,且无新的晶型出现,详见图11。由此可知,介质研磨和冷冻干燥过程并未改变

BRE的晶体形态。

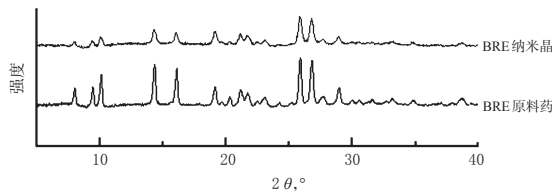


图 11 BRE 纳米晶和原料药的 XRPD 图

Fig 11 XRPD patterns of BRE nanocrystals and raw material

2.5.6 BRE 纳米晶体外溶出度测定 参考 2015 年版《中国药典》(四部)中溶出度测定第三法(小杯法)<sup>[13]</sup>进行溶出度试验。精密称取“2.3.2”项下制备的 BRE 纳米晶、BRE 物理混合物[称取 BRE 原料药 7.5 g 置于含有 15%吐温 80 的水溶液(22.5 mL)中,搅拌混悬,不进行研磨,再按“2.3.2”项下冻干方法操作,即得]、BRE 原料药适量(均相当于含野黄芩苷约 10 mg),各 3 份,设置溶出介质为 200 mL 水、水温为(37±0.5)℃、转速为 35 r/min。分别于投样后 1、3、5、10、20、30、45、60 min 时取样 3 mL,取样后迅速补足 3 mL 水。取样溶液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按“2.4.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,根据标准曲线法计算野黄芩苷的质量浓度,再计算累积溶出度 $[Y_n = (c_n \times V_1 + c_1 \times V_2 + c_2 \times V_2 + \dots + c_{n-1} \times V_2) \div M \times 100\%$ ,其中  $Y_n$  为第  $n$  时间点的累积溶出度,  $c_n$  为所取样品测定的野黄芩苷质量浓度,  $V_1$  为溶出介质总体积,  $V_2$  为每次取样后所补充的体积,  $M$  为样品中野黄芩苷总含量],并绘制 BRE 累积溶出度-时间曲线,详见图 12。结果,5 min 内 BRE 纳米晶的累积溶出度约为 84%,而 BRE 原料药和物理混合物的累积溶出度均未达到 40%;20 min 内 BRE 纳米晶的累积溶出度约为 90.37%,是 BRE 原料药和物理混合物的 1.6 倍左右,说明将 BRE 制备成纳米晶可显著改善其溶出度。

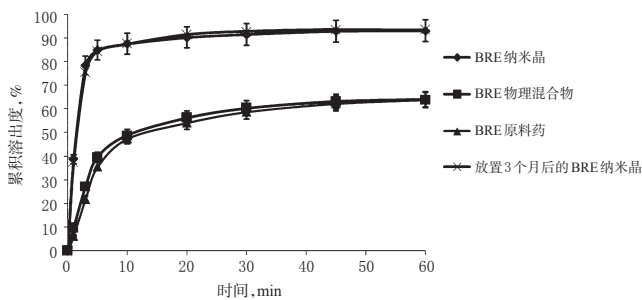


图 12 BRE 纳米晶、物理混合物、原料药及放置 3 个月后的 BRE 纳米晶的溶出曲线

Fig 12 Dissolution curves of BRE nanocrystals, physical mixtures, raw material and BRE nanocrystals after 3 months' storage

2.5.7 BRE 纳米晶加速稳定性考察 取 3 批“2.3.2”项下制备的 BRE 纳米晶,于温度为(40±2)℃、相对湿度为(75±5)%的条件下,避光放置 3 个月,然后测定其粒

径、PDI 和 Zeta 电位,并按“2.5.6”项下方法测定其累积溶出度。结果,BRE 纳米晶放置 3 个月后其粒径、PDI、Zeta 电位、累积溶出度均未有明显改变,表明其稳定性较好。BRE 纳米晶加速稳定性考察结果见表 3,放置 3 个月后的溶出曲线见图 12。

表 3 BRE 纳米晶加速稳定性考察结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 3 Accelerated stability of BRE nanocrystals ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

放置时间	粒径, nm	PDI	Zeta 电位
0 d	283.10±3.08	0.212±0.017	-38.48±0.39
3 个月	288.40±4.16	0.238±0.160	-37.85±0.75

### 3 讨论

本课题组在进行 BRE 纳米晶制备工艺考察时发现, BRE 的粒径随着氧化锆珠用量的增加而减小,但增加到一定程度后, BRE 的粒径反而增加。相关研究发现,适宜的研磨时间能使药物颗粒被充分碰撞、剪切成小粒径药物粒子,并让稳定剂均匀吸附在纳米颗粒表面,但过长的研磨时间可能导致纳米粒子之间相互连接生长,且由于机器持续产热,会导致药物不稳定,进而使药物粒子的粒径和 PDI 重新增加<sup>[14]</sup>。

本研究采用 DSC 法和 XRPD 法对 BRE 纳米晶和原料药进行晶型分析,以分析介质研磨和冻干处理对药物晶型的影响。结果发现, BRE 纳米晶和原料药的吸/放热峰和衍射峰的峰位没有发生变化,表明介质研磨和冻干处理并未改变 BRE 的晶型。但是 BRE 纳米晶衍射峰的相对强度较其原料药有所降低,推测其原因可能与药物粒径减小有关,即 BRE 经介质研磨处理后,其纳米晶分子排列紧密程度降低;另外, BRE 粒子表面被辅料包裹,也可能导致衍射峰强度相对于原料药较弱<sup>[15-16]</sup>。

本研究所制备的 BRE 纳米晶平均粒径为(283.10±3.08) nm,平均 PDI 为 0.212±0.021,平均 Zeta 电位为(-38.48±0.39) mV。与 BRE 原料药比较, BRE 纳米晶具有良好的溶出度;而且在温度(40±2)℃、相对湿度(75±5)%条件下避光放置 3 个月后,其外观、分散性、粒径分布、累积溶出度并未发生明显改变。这说明所制备的 BRE 纳米晶的溶出度和稳定性均良好。

综上所述, BRE 纳米晶的制备方法简单、可行,且所制得的 BRE 纳米晶稳定性、溶出度均良好。

### 参考文献

- [1] 崔建梅,吴松.灯盏花素的研究进展[J].天然产物研究与开发,2003,15(3):255-258.
- [2] 张凤娇,刘明玉,单柏松,等.基于 BCS 系统 IV 类药物提高口服生物利用度的研究进展[J].黑龙江医药,2015,28(4):721-724.
- [3] 卢秀霞,何琳,陈莉.灯盏花素的溶解度与油水分配系数的测定[J].广东药学院学报,2011,27(11):1-4.
- [4] 葛庆华,周臻,支晓瑾,等.灯盏花素在犬体内的药动学和绝对生物利用度研究[J].中国医药杂志,2003,34(12):618-621.

# 左旋紫草素对顺铂耐药人宫颈癌HeLa细胞的逆转作用研究<sup>Δ</sup>

杜春双<sup>1\*</sup>, 马亚妮<sup>2</sup>, 王 帅<sup>2</sup>, 张 飞<sup>1</sup>, 张 洁<sup>1</sup>, 桑广健<sup>1</sup>(1.天津医科大学肿瘤医院药学部/国家肿瘤临床医学研究中心/天津市肿瘤防治重点实验室/天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060; 2.天津医科大学药学院, 天津 300041)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)15-1867-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.15.13

**摘要** 目的:探讨左旋紫草素(L-SHK)对顺铂(DDP)耐药人宫颈癌HeLa细胞(HeLa/DDP)的逆转作用及其可能机制。方法:以人宫颈癌HeLa细胞株为研究对象,以DDP诱导获得HeLa/DDP耐药细胞;采用CCK-8法测定HeLa/DDP细胞的耐药指数以及不同剂量L-SHK(0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16 μmol/L)对该细胞的抑制率、半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)和逆转倍数;采用流式细胞术检测低、中、高剂量L-SHK(0.3、0.6、1.2 μmol/L)联合DDP对HeLa/DDP细胞周期及凋亡率的影响,采用Western blotting法检测低、中、高剂量L-SHK(0.3、0.6、1.2 μmol/L)联合DDP对HeLa/DDP细胞凋亡相关蛋白[剪切型胱天蛋白酶3(Cleaved caspase-3)、Bcl-2、Bax]表达的影响。结果:所得HeLa/DDP细胞的耐药指数为11.8。L-SHK对HeLa/DDP细胞的抑制率有随剂量增加而逐渐升高的趋势。与单用DDP比较,DDP+低、中、高剂量L-SHK组细胞的IC<sub>50</sub>值均显著降低,且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ );DDP+低、中、高剂量L-SHK组的逆转倍数分别为1.38、2.80、6.71。与空白对照组比较,各药物组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期、S期细胞比例,各剂量L-SHK联用组细胞的早期、晚期凋亡率及总凋亡率以及Bax、Cleaved caspase-3蛋白的表达量均显著升高;各药物组G<sub>2</sub>/M期细胞比例以及各剂量L-SHK联用组Bcl-2蛋白的表达量均显著降低( $P < 0.05$ )。与DDP组比较,各剂量L-SHK联用组S期、G<sub>2</sub>/M期细胞比例和Bcl-2蛋白的表达量均显著降低;G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例,早期、晚期凋亡率及总凋亡率和Bax、Cleaved caspase-3蛋白的表达量均显著升高( $P < 0.05$ )。结论:HeLa/DDP细胞对DDP具有一定的耐药性,L-SHK可逆转这种耐药性。L-SHK和DDP联用可促进HeLa/DDP细胞凋亡,且作用强于DDP单用;这种作用可能与影响细胞周期、调控凋亡相关蛋白的表达有关。

**关键词** 人宫颈癌HeLa细胞;左旋紫草素;顺铂;耐药;凋亡;细胞周期;凋亡蛋白;逆转作用;机制

## Study on Reversal Effects of Levoshikonin on Cisplatin Resistance of Human Cervical Carcinoma HeLa Cells

DU Chunshuang<sup>1</sup>, MA Yani<sup>2</sup>, WANG Shuai<sup>2</sup>, ZHANG Fei<sup>1</sup>, ZHANG Jie<sup>1</sup>, SANG Guangjian<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmacy, Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital/National Clinical Research Center for Cancer/Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy/Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China; 2. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300041, China)

- [5] 邹清,谈唯,宁青,等.厚朴酚纳米晶体混悬剂的制备及质量评价[J].中国药房,2019,30(15):2037-2041.
- [6] 余佐彦,柯学,平其能,等.灯盏花素纳米混悬剂的制备及其大鼠体内药动学研究[J].中国天然药物,2007,5(1):50-55.
- [7] YANG X, MIAO X, CAO F, et al. Nanosuspension development of scutellarein as an active and rapid orally absorbed precursor of its BCS class IV glycoside scutellarin [J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(11):3576-3584.
- [8] 田晓娜.一种新型三联苯衍生物的纳米混悬液的制备及体内外评价[D].济南:山东大学,2014.
- [9] 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.
- [10] 戎欣玉,宋红岩,王慧春,等.伊曲康唑纳米晶体的制备与表征[J].中国医院药学杂志,2017,37(10):916-921.
- [11] 付强,孙进,何仲贵.纳米结晶的研究进展[J].沈阳药科大学学报,2010,27(12):952-960.
- [12] 常金花,薛禾菲,刘沛,等.薯蓣皂苷元纳米混悬液的制备[J].中成药,2017,39(9):1819-1824.
- [13] 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.
- [14] 贺凌云.吴茱萸次碱纳米混悬剂的构建、表征及体内评价[D].长沙:中南大学,2010.
- [15] 李炜.难溶性药物理化性质对其纳米混悬剂生物利用度的影响[D].沈阳:沈阳药科大学,2013.
- [16] ZHANG Y, ZHANG JH. Preparation of budesonide nanosuspensions for pulmonary delivery: characterization, in vitro release and in vivo lung distribution studies[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, 44(1):285-289.

Δ 基金项目:天津市卫生局科技基金资助项目(No.2015KZ087)

\* 副主任药师,硕士。研究方向:肿瘤药理学、临床药学。电话:022-23340123。E-mail:9150143@qq.com

(收稿日期:2020-03-19 修回日期:2020-05-22)

(编辑:唐晓莲)