

黄豆苷元纳米混悬剂胶囊的制备、表征及其体内外吸收特性考察

杨晓茗, 黄尊, 张君, 左甜甜, 沈琦*
(上海交通大学药学院, 上海 200240)

[摘要] **目的:**制备黄豆苷元纳米混悬剂胶囊,以市售黄豆苷元胶囊为参考,考察两者对小肠吸收与口服生物利用度的影响。**方法:**采用沉淀法联用高压均质技术制备黄豆苷元纳米混悬剂,通过正交试验优化其处方,利用 X 射线粉末衍射分析(XRPD),傅里叶红外光谱(FT-IR),透射电子显微镜(TEM)以及粒径,多分散指数和 Zeta 电位等指标对黄豆苷元纳米混悬剂进行表征。采用外翻肠囊法研究自制制剂与市售黄豆苷元胶囊的体外肠吸收情况,考察了黄豆苷元纳米混悬剂在体内胃肠道的分布,并通过 HPLC 测定大鼠体内黄豆苷元的血药浓度,以考察口服给药后的生物利用度。**结果:**以市售黄豆苷元胶囊内容物为参比制剂,自制黄豆苷元纳米混悬剂胶囊的小肠吸收促进率 2.49($P < 0.01$),胃肠道生物分布评价证实了纳米混悬液的生物黏附性,相对生物利用度 294%。**结论:**沉淀法联用高压均质技术制备的黄豆苷元纳米混悬剂冻干后可用于胶囊剂等剂型的生产,有益于增加药物的小肠吸收并改善口服以后的体内生物利用度。

[关键词] 黄豆苷元; 纳米混悬剂; 胶囊; 高压均质技术; 体外肠吸收; 药代动力学; 生物利用度

[中图分类号] R22;O433;R285.5;R283.6;R94 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0040-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182301

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180911.1104.025.html>

[网络出版时间] 2018-9-13 9:46

Preparation, Characterization and *in Vitro* and *in Vivo* Absorption Characteristics of Daidzein Nanosuspension Capsules

YANG Xiao-ming, HUANG Zun, ZHANG Jun, ZUO Tian-tian, SHEN Qi*
(School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare daidzein nanosuspension capsules, and to investigate intestinal absorption and oral bioavailability by comparing with commercial daidzein capsules. **Method:** Daidzein nanosuspensions were prepared by precipitation method combined with high pressure homogenization, orthogonal design method was utilized to optimize its formulation. Daidzein nanosuspensions was characterized by X-ray powder diffraction (XRPD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), transmission electron microscope (TEM), and indexes including mean particle size, polydispersity index (PDI), and Zeta potential. Intestinal absorption study was carried out to compare the accumulative permeated amount of daidzein from daidzein nanosuspensions and commercial daidzein capsules. Biodistribution of daidzein in gastrointestinal tract was investigated, and oral bioavailability was examined through pharmacokinetic study by HPLC. **Result:** The *in vitro* small intestinal absorption enhancement ratio of daidzein nanosuspension capsules was approximately 2.49-fold higher than that of commercial capsules ($P < 0.01$). Biodistribution evaluation in gastrointestinal tract verified the bioadhesion of the nanosuspensions. Pharmacokinetic study calculated by DAS 2.0 revealed that the relative bioavailability of daidzein nanosuspension capsules was 294%. **Conclusion:** Daidzein nanosuspensions prepared

[收稿日期] 20180517(014)

[第一作者] 杨晓茗,在读硕士,从事纳米制剂研究,E-mail:miny@sjtu.edu.cn

[通信作者] * 沈琦,博士,教授,从事纳米制剂研究,Tel:021-34204049,E-mail:qshen@sjtu.edu.cn

by combined method can be applied to the production of capsules, which is beneficial to increase the absorption of drug in small intestine and improve its bioavailability after oral administration.

[Key words] daidzein; nanosuspensions; capsules; high pressure homogenization technology; *in vitro* intestinal absorption; pharmacokinetics; bioavailability

黄豆苷元(4',7-二羟基异黄酮)在治疗心血管疾病方面具有显著的疗效^[1],且药理作用广泛、毒性作用小,非常适用于临床;但该药物极难溶于水和油,使得其口服生物利用度较低,进而导致患者需要在较长周期内大量口服。因此,如何改善黄豆苷元这类生物药剂学分类(BCS)系统中Ⅳ类药物的生物利用度,已成为近年来医药行业科研工作者的主要研究方向。其中一种主流研究方向是从化学性质上改变黄豆苷元,制备黄豆苷元衍生物^[2];另一个重要的研究方向是开发以黄豆苷元为原药的新剂型,如黄豆苷元的壳聚糖微球注射用制剂、固体脂质纳米粒、环糊精包合物、固体分散体及半固体骨架胶囊等,但有些受工艺限制无法投入生产,有些则是口服生物利用度仍然较低。因此,还需要按以上两点为基础寻找到一种工艺容易实现且能解决口服生物利用度低这一难题的剂型。

纳米混悬剂是直接将药物纳米化,形成纳米结晶或者纳米无定形态的制剂^[3],可应用于大规模生产中。该制剂可有效增加药物的饱和溶解度,提高药物溶出度,并具有增加药物生物黏附性的作用。第一个上市的纳米混悬剂药物为 Wyeth 公司研发的西罗莫司片,随后包括阿瑞吡坦胶囊、非诺贝特片及紫杉醇-白蛋白注射用纳米混悬液等纳米混悬剂相继被美国食品药品监督管理局批准上市。市售纳米制剂的制备方法主要分为沉淀法与分散法^[4],本实验联用这 2 种方法制备纳米混悬剂,将黄豆苷元粒径降低到纳米级,以促进该药物的口服吸收;将制备的纳米混悬剂装载入胶囊中,形成成熟的剂型。采用正交设计进行处方工艺优化,考察冻干前后纳米混悬剂的形貌、粒径、多分散指数及 Zeta 电位等理化性质,评价其制剂稳定性;使用外翻肠囊法考察黄豆苷元纳米混悬胶囊的小肠吸收情况;通过口服灌胃给药,对黄豆苷元纳米混悬胶囊在大鼠体内的胃肠道生物分布与生物利用度进行考察;通过冷冻干燥技术制备得到纳米混悬剂冻干粉,探究黄豆苷元制成纳米混悬胶囊的可能性,考察该胶囊剂的体外肠吸收情况和口服生物利用度。以期制备得到可投入工业生产并能有效提高药物口服生物利用度的黄豆苷元纳米混悬胶囊剂,避免市售普通

片剂或胶囊剂口服进入人体后药物还未溶解吸收就被肝脏或肾脏清除而造成的长期大剂量服用的问题,改善患者服药的顺应性。

1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), Mill-Q 型超纯水仪器(美国密理博公司), BSA124S 型分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司), Scientz-IIID 型细胞粉碎机(宁波新芝生物科技公司), AH-2010 型高压均质机(ATS 工业系统有限公司), WRL-160 型高速剪切机(沙城科磊机械设备有限公司), LGJ-10D 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器制造有限公司), Nano-S90 型激光粒度仪(英国马尔文仪器公司), Nicolet 6700 型红外光谱仪(赛默飞世尔科技公司), D8 Advance 型 X 射线衍射仪(德国布鲁克公司), Talos F200X 型透射电子显微镜(美国 FEI 公司)。

黄豆苷元(DDZ,南京青泽医药科技开发公司,批号 DFU2007030025,纯度 >98.0%),市售黄豆苷元胶囊(陕西功达制药有限公司,批号 H61023321),大豆卵磷脂(国药集团化学试剂有限公司,批号 69014933);泊洛沙姆 188(F68),十二烷基硫酸钠(SDS),聚乙烯醇(PVA)均购自阿拉丁生化科技股份有限公司;水为超纯水,甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

清洁级雄性 SD 大鼠,体质量(250 ± 15) g,实验前 24 h 禁食不禁水,由上海交通大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(沪)2010-0128,试验方案经上海交通大学药学院伦理委员会批准,批准号 14H100000006。

2 方法与结果

2.1 黄豆苷元的含量测定

2.1.1 色谱条件 Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(30:70),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 249 nm,柱温 25 °C,进样量 20 μL^[5]。

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取黄豆苷元对照品约 5.0 mg,加入甲醇超声使溶解并转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,混匀,配成 100 mg·L⁻¹ 黄豆苷元储备液。精密量取该储备液适量,加甲醇

稀释, 制得质量浓度分别为 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0 mg·L⁻¹ 的系列溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以黄豆苷元质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得标准曲线 $Y = 96\ 550X - 10\ 169$ ($r = 0.999\ 4$), 线性范围 1.0 ~ 50.0 mg·L⁻¹。

2.2 黄豆苷元纳米混悬胶囊的制备

2.2.1 黄豆苷元纳米混悬剂的制备

将适量 F68, PVA 及 SDS 加入水中, 超声分散均匀形成水相; 将黄豆苷元与大豆卵磷脂溶于少量 DMSO 中形成有机相, 置冰浴下将有机相快速注入水相中, 超声后高速剪切, 投入高压均质机中, 得联用法制备的黄豆苷元纳米混悬剂 (DDZ-NS/CP); 将黄豆苷元, F68, PVA, SDS 及大豆卵磷脂适量分散至水中, 直接高速剪切后进行高压均质, 得分散法制备的黄豆苷元纳米混悬剂 (DDZ-NS/TD)。

2.2.2 黄豆苷元纳米混悬剂的处方优化^[6-9]

选择 F68, 大豆卵磷脂和 PVA 为稳定剂。称取 9 份黄豆苷元原料药, 每份 200 mg, 采用联用法制备黄豆苷元纳米混悬剂, 筛选稳定剂的比例。以粒径为评价指标, 采用正交试验进行处方比例筛选, 以 F68, 大豆卵磷脂和 PVA 的用量为考察因素, 每个因素设计 3 个水平, 试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 黄豆苷元纳米混悬剂处方优选的正交试验分析

Table 1 Orthogonal experimental analysis on prescription of daidzein nanosuspensions

No.	A F68/mg	B 大豆卵磷脂/mg	C PVA /mg	D (空白)	粒径 /nm
1	0	0	0	1	782.5
2	0	15	15	2	672.4
3	0	30	30	3	624.1
4	20	0	15	3	472.8
5	20	15	30	1	453.2
6	20	30	0	2	375.2
7	40	0	30	2	323.9
8	40	15	0	3	298.3
9	40	30	15	1	193.4

由直观分析可知, 各稳定剂对纳米混悬剂粒径影响大小为 F68 > 大豆卵磷脂 > PVA。方差分析发现因素 B 具有显著性差异, 因素 A 具有极显著性差异, 而因素 C 的各水平则对粒径无显著性影响, 确定选择最优化组合方案为 A₃B₃C₂, 即 F68 用量 40 mg, 大豆卵磷脂用量 30 mg, PVA 用量 15 mg, 投

表 2 粒径的方差分析

Table 2 Variance analysis of particle size

方差来源	SS	MS	F	P
A	270 773. 307	135 386. 654	484. 614	<0. 01
B	25 217. 087	12 608. 544	45. 132	<0. 05
C	2 300. 507	1 150. 254	4. 117	>0. 05
D(误差)	558. 739	279. 370		

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19, F_{0.01}(2, 2) = 99$ 。

药量 200 mg。

2.2.3 黄豆苷元纳米混悬剂胶囊的制备

将 F68 40 mg, PVA 15 mg 及 SDS 15 mg 加热溶解于 100 mL 水中, 水浴恒温超声 30 min, 分散均匀后得到水相, 冰浴保存待用; 称取黄豆苷元 200 mg 和大豆卵磷脂 30 mg, 加热超声溶于极少量 DMSO 中, 得到黄豆苷元有机溶液; 置冰水浴中, 在超声探头功率 200 W, 开 5 s, 停 5 s 条件下, 将黄豆苷元有机溶液用 5 号针头注射器快速注入水相中, 超声 10 min, 得到的溶液投入高压均质机中, 按 200 Pa 均质 2 次, 500 Pa 均质 5 次, 1 kPa 均质 10 次, 1.5 kPa 均质 15 次, 1.8 kPa 均质 20 次处理后, 得 DDZ-NS/CP; 称取同质量的黄豆苷元, F68, PVA, SDS 及大豆卵磷脂, 分散至 100 mL 水中, 先用高速剪切机 1 万 r·min⁻¹ 剪切 2 min, 高压均质按 200 Pa 均质 2 次, 500 Pa 均质 5 次, 1 kPa 均质 10 次, 1.5 kPa 均质 15 次, 1.8 kPa 均质 20 次处理, 得 DDZ-NS/TD。1% 甘露醇-乳糖 (1:3) 作为冻干保护剂加入到制备好的黄豆苷元纳米混悬剂中, 混匀后置于西林瓶中, 用封口膜覆盖, 先置 -20 ℃ 冰箱保存固定 6 h, 接着放入 -80 ℃ 超低温冰箱 24 h, 取出后用注射器扎孔并迅速放置于冷冻干燥机中, 冷冻干燥 36 h 后得到纳米混悬剂冻干粉。将黄豆苷元冻干粉与辅料过筛后混匀装于胶囊壳中。

2.3 黄豆苷元纳米混悬剂冻干粉的表征

2.3.1 冻干粉的晶型测定

对样品粉末分别进行 X 射线粉末衍射分析 (XRPD) 和傅里叶红外光谱 (FT-IR) 测定。取黄豆苷元, F68, 纳米混悬剂处方组成的物理混合物及 2 种方法制备得到的黄豆苷元纳米混悬剂冻干粉适量, Cu-Kα (电压 40 kV) 为 X 射线管阴极, 5 ~ 60 度 (2θ) 扫描, 速度 2 度/min, 见图 1 (A)。取黄豆苷元、纳米混悬剂处方组成的物理混合物及 2 种方法制备得到的黄豆苷元纳米混悬剂冻干粉适量 (约 2 mg), 分别与溴化钾混合均匀后压片, 在 4 000 ~ 400 cm⁻¹ 进行红外扫描, 见图 1 (B)。XRPD 结果表明黄豆苷元的特征衍射峰分别为

10.31, 15.81, 16.91, 24.41, 24.66, 26.33, 27.74, 28.15, 29.56 度, F68 的衍射谱显示其特征峰为 19.12, 23.11 度, 纳米混悬剂冻干粉与物理混合物的特征峰相似 (20.53, 20.31, 20.33, 24.52, 24.42, 24.56 度), 即制备工艺与辅料对药物的晶型没有影响。FT-IR 图谱显示 3166 cm^{-1} 为羟基的伸缩振动峰, 1388 cm^{-1} 为酚羟基的弯曲振动, 1632 cm^{-1} 为羰基的振动。黄豆苷元在物理混合物 ($3221, 1632, 1388\text{ cm}^{-1}$) 和纳米混悬剂冻干粉 ($3281, 1632, 1377\text{ cm}^{-1}$) 中的特征吸收峰基本一致, 表明在制备过程中黄豆苷元自身的化学晶型没有发生变化。

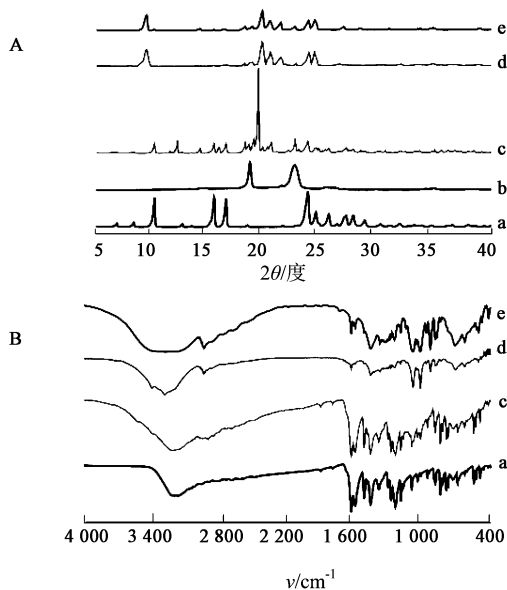


图 1 黄豆苷元原药 (a), F68 (b), 物理混合物 (c), DDZ-NS/TD 冻干粉 (d) 及 DDZ-NS/CP 冻干粉 (e) 的 XRPD (A) 和 FT-IR (B)

Fig. 1 XRPD (A) and FT-IR (B) spectra of daidzein (a), F68 (b), physical mixture (c), DDZ-NS/TD lyophilized powder (d) and DDZ-NS/CP lyophilized powder (e)

2.3.2 冻干粉的质量评价 将样品 (联用法制备的纳米混悬液和其冻干粉复溶液) 适当稀释后滴在镀膜的铜网侧, 静置 2 min 后滤纸吸干多余液体, 用 2% 磷钨酸溶液 (pH 7.4) 染色, 然后放置在滤纸上自然干燥, 通过透射电子显微镜 (TEM) 观察两者形貌。采用激光粒度仪对两者粒径、多分散指数和 Zeta 电位进行测试, 见图 2。结果发现冻干前与冻干后复溶的纳米混悬剂都呈现粒径均一的规则表面形态。冻干前的纳米混悬剂粒径及多分散指数分别为 189.4 nm 和 0.182, 冻干后复溶的纳米混悬剂粒径和多分散指数则依次为 194.1 nm 和 0.178。纳米混悬剂中的 F68 和 PVA 作为聚合物通过形成空

间障碍维持粒子稳定性, 大豆卵磷脂作为两性离子表面活性剂可以同时形成空间位阻和静电斥力以维持粒子稳定。纳米混悬粒子的 Zeta 电位绝对值须达到 20 mV 以上以维持系统稳定^[10], 故同时加入少量的阳离子表面活性剂 SDS, 以提高粒子的静电斥力, 冻干前的纳米混悬剂与冻干后复溶的纳米混悬剂的 Zeta 电位分别为 -26.8, -27.2 mV, 符合要求, 且冻干前后的纳米混悬剂粒径与多分散指数均无明显差异, 说明制备纳米混悬剂冻干粉的工艺过程不影响混悬液的质量。

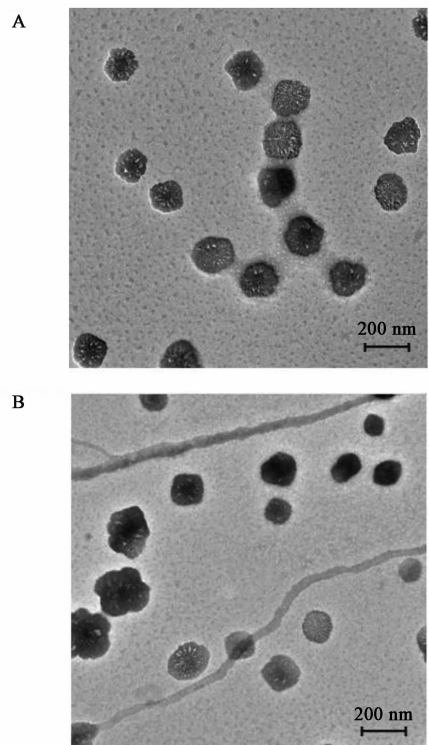


图 2 DDZ-NS/CP (A) 及其冻干粉复溶液 (B) 的 TEM ($\times 25\ 000$)
Fig. 2 TEM of DDZ-NS/CP (A) and rehydration solution of its lyophilized powder (B) ($\times 25\ 000$)

2.4 黄豆苷元混悬剂胶囊的小肠体外吸收特性

2.4.1 黄豆苷元药液的制备 称取氯化钠 7.8 g, 磷酸二氢钠 0.32 g, 碳酸氢钠 1.37 g, 氯化钾 0.35 g, 氯化镁 0.02 g 和葡萄糖 1.4 g, 加水稀释并定容至 1 L, 得 Krebs-Ringer's (K-R) 营养液 (pH 7.4)^[11]。分别取市售黄豆苷元胶囊内容和 2 种自制黄豆苷元纳米混悬剂冻干粉适量, 精密称定, 加入 K-R 营养液超声使溶解, 得药物质量浓度均为 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3 组黄豆苷元药液。

2.4.2 体外肠囊法 将大鼠随机等分为 3 组, 分别为市售黄豆苷元胶囊组和 2 种方法制备的黄豆苷元纳米混悬剂胶囊组 ($n = 5$), 乙醚麻醉大鼠后脱颈

处死,解剖腹腔后找到小肠,剪取长约 10 cm 的空肠,用 K-R 营养液反复冲洗至所有残留物洗净后用细线扎紧一端于玻璃棒上,并迅速用细线扎好另一端后用 1 mL 的注射器吸取 K-R 营养液作为受药体系,捏紧端口将溶液缓慢推入已经扎好的肠囊中,并检查表面是否有破损。确认完好无误后,将其放入持续通入 95% 氧气,5% 二氧化碳的黄豆苷元药液中,取样时间点设定为 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min, 取样量均为 5 mL, 每次取样完毕后应补入相同体积的 K-R 营养液。取样全部完成后将结扎的肠囊剖开,量取其长度与宽度,计算所截取小肠的吸收面积。

2.4.3 体外小肠累积透过量 收集完所有样品后离心,照 2.1 项下方法计算黄豆苷元的体外小肠累积透过量,结果见图 3。计算联用法制备的纳米混悬剂胶囊与分散法制备的纳米混悬剂胶囊的体外小肠累积透过量分别为 (10.93 ± 0.42) , (8.77 ± 0.25) μg , 分别约为市售胶囊 $[(6.29 \pm 0.28) \mu\text{g}]$ 的 1.74 倍和 1.39 倍。所得结果进行 *t* 检验发现 2 种自制黄豆苷元纳米混悬剂胶囊较市售黄豆苷元胶囊内容物具有显著性差异 ($P < 0.01$), 即纳米混悬剂胶囊有利于提高黄豆苷元的体外小肠累积透过量。

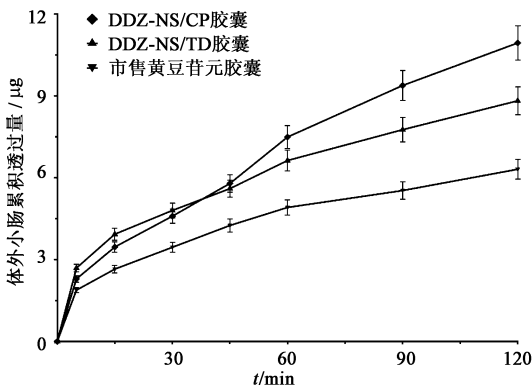


图 3 市售胶囊与自制纳米混悬剂胶囊中黄豆苷元的体外小肠累积透过性能 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Cumulative permeability of small intestine *in vitro* of daidzein from commercial capsules, DDZ-NS/TD capsules and DDZ-NS/CP capsules ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.4.4 体外小肠吸收特性 将计算得到的体外小肠累积透过量带入公式 $P_{app} = d_Q/d_t \times 1/A \times 1/C_0$ 和 $R = P_{app(\text{样品})}/P_{app(\text{参比制剂})}$ 计算黄豆苷元的表观渗透系数 (P_{app}) 和吸收促进率 (R), 式中 A 为小肠的透过面积, C_0 为药物初始质量浓度, Q 为体外小肠累积透过量, t 为时间, d_Q/d_t 为药物的体外小肠透过

速率。结果市售黄豆苷元胶囊, DDZ-NS/TD 胶囊及 DDZ-NS/CP 胶囊的 P_{app} 分别为 (2.44 ± 0.25) , (4.37 ± 0.59) , $(6.08 \pm 0.89) \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$, 说明黄豆苷元小肠透过能力排序为 DDZ-NS/CP 胶囊 > DDZ-NS/TD 胶囊 > 市售黄豆苷元胶囊, 且 2 种自制黄豆苷元纳米混悬剂胶囊与市售黄豆苷元胶囊内容物相比均具有显著性差异 ($P < 0.01$)。以市售黄豆苷元胶囊内容物为参比制剂, 计算 DDZ-NS/TD 胶囊及 DDZ-NS/CP 胶囊的 R 分别为 1.79 和 2.49; 原因可能是纳米混悬剂降低了药物粒子的粒径, 增大的粒子比表面积使纳米混悬剂在口服进入体内后对小肠黏膜的黏附性也增强, 从而延长了药物在肠道的滞留时间, 间接促进了药物的吸收^[12-16]。综上所述, 选用联用法制备的纳米混悬剂胶囊进行后续试验。

2.5 黄豆苷元纳米混悬剂的体内分布及生物黏附性 将大鼠随机等分为黄豆苷元原药组和 DDZ-NS/CP 胶囊组 ($n = 5$), 称重后进行灌胃给药 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以黄豆苷元计, 下同), 分别于 15, 45 min 测量胃、十二指肠及空肠中黄豆苷元的含量^[17-21]。取出胃肠道的各组织 (胃、十二指肠和空肠), 用冷磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 反复清洗, 用滤纸吸干, 精确称重后均质。利用组织匀浆法从甲醇中提取黄豆苷元, 照 2.1 项下方法计算各组织中黄豆苷元的浓度, 计算组织中黄豆苷元质量与组织质量的比值。结果表明黄豆苷元原药组和 DDZ-NS/CP 胶囊组在灌胃给药后 15, 45 min 的体内药物质量分数由大到小的排序均为胃 > 十二指肠 > 空肠; 与黄豆苷元原药组比较, 纳米混悬剂有助于延长黄豆苷元在胃和十二指肠中的滞留时间 ($P < 0.05$), 见表 3。说明纳米混悬剂具有胶体分散体系的优点, 对胃肠道黏膜具有一定的生物黏附性, 可能是由于颗粒与表面粘液间的静电作用、氢键和范德华力。此外, 处方中的稳定剂 PVA^[22] 可作为黏附性聚合物用于提高胃肠道药物浓度。两者在空肠中的黄豆苷元质量分数均保持较低的水平, 黄豆苷元原料药在 15, 45 min 的质量分数分别为 (0.37 ± 0.06) , $(0.26 \pm 0.03) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 可能是环状皱襞和小肠绒毛使空肠成为重要的吸收部位所导致。

2.6 黄豆苷元纳米混悬剂胶囊的药代动力学

2.6.1 色谱条件 Diamonsil C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$), 流动相甲醇-水 (55 : 45), 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 260 nm, 进样量 20 μL 。

2.6.2 样品处理 取大鼠血浆 100 μL , 加入乙腈

表 3 黄豆苷元原料药和 DDZ-NS/CP 胶囊在胃肠道中的药物分布情况 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Distribution of daidzein in gastrointestinal tract after oral administration from daidzein and DDZ-NS/CP capsules ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	<i>t</i> /min	μg·g ⁻¹		
		胃	十二指肠	空肠
黄豆苷元原药	15	3.22 ± 0.22	1.93 ± 0.17	0.37 ± 0.06
	45	0.56 ± 0.04	0.33 ± 0.07	0.26 ± 0.03
DDZ-NS/CP 胶囊	15	6.74 ± 0.17	3.01 ± 0.73	0.91 ± 0.10
	45	3.45 ± 0.45	1.67 ± 0.24	0.83 ± 0.11

注:给药剂量均为 10 mg·kg⁻¹。

200 μL, 涡旋, 沉淀蛋白, 于转速 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液进样测定。

2.6.3 标准曲线绘制 大鼠经眼眶后静脉丛取血, 将所得样品置于事先用肝素钠润洗过的离心管中, 于 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 得空白血浆。分别取空白血浆 100 μL, 加入不同质量浓度的黄豆苷元对照品溶液 100 μL, 得质量浓度分别为 0.025, 0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg·L⁻¹ 的黄豆苷元血浆对照品溶液, 按 2.6.2 项下方法操作, 以黄豆苷元质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得标准曲线 $Y = 66\ 955X + 1\ 410.1$ ($r = 0.999\ 3$), 线性范围 0.025 ~ 1 mg·L⁻¹。

2.6.4 药代动力学分析 将大鼠随机等分为 DDZ-NS/CP 胶囊组和市售黄豆苷元胶囊组 ($n = 5$), 称重后灌胃给药 (10 mg·kg⁻¹), 为防止血液凝固, 预备好经肝素钠润洗并烘干的离心管和用来取血的毛细管。灌胃给药后 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 720 min 经眼眶取血约 500 μL, 迅速将所得血液置于台式冷冻高速离心机中, 于 3 000 r·min⁻¹, 4 °C 离心 10 min, 吸取上清血浆置于 -20 °C 冰箱冷冻保存。按上述方法处理后测定, 绘制药-时曲线, 见图 4。使用 DAS 2.0 软件模拟并计算药动学参数, 见表 4。结果与市售黄豆苷元胶囊比较, DDZ-NS/CP 胶囊的口服吸收程度提高了, 相对生物利用度达到了 294%; 在大鼠体内存留时间延长; 说明纳米混悬剂胶囊对于难溶性药物的口服生物利用度具有较好的促进作用。

2.7 DDZ-NS/CP 胶囊的稳定性考察 将 DDZ-NS/CP 胶囊放置于药物稳定性试验箱中 [(25 ± 2) °C, 相对湿度 (65 ± 5)%] 进行 3 个月的稳定性考察。分别于 0, 1, 2, 3 月取样, 观察外观性状并检测纳米

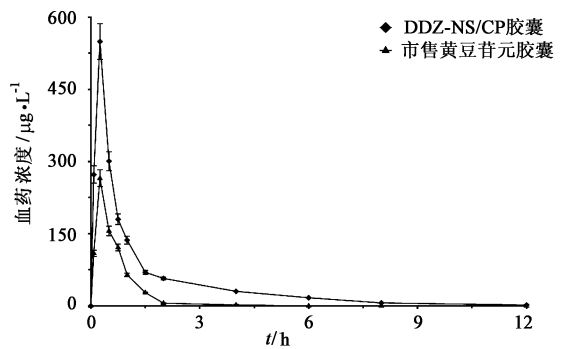


图 4 大鼠口服不同黄豆苷元制剂后血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 4 Plasma concentration-time curves of different daidzein formulations after oral administration to rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

表 4 大鼠口服不同黄豆苷元制剂后的体内药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 4 Pharmacokinetic parameters of daidzein after oral administration of different daidzein formulations in rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

参数/单位	市售黄豆苷元胶囊	DDZ-NS/CP 胶囊
$C_{max}/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	259 ± 31.3	544 ± 49.3 ¹⁾
T_{max}/h	0.25	0.25
$CL/\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	4.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1
$AUC_{0-12\text{h}}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	445 ± 52.8	1 310 ± 99.3 ¹⁾
$F_r/\%$	-	294 ± 1.37

注:与市售黄豆苷元胶囊比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

混悬剂胶囊内容物复溶后的黄豆苷元含量及粒径。结果发现 0 d 时 DDZ-NS/CP 胶囊内容物中的黄豆苷元质量分数 (99.32 ± 0.68)%, 粒径 (193.2 ± 20.3) nm。计算在 1, 2, 3 个月取样测得的黄豆苷元质量分数分别为 (99.64 ± 0.36)%, (99.45 ± 0.71)% 和 (99.12 ± 0.88)%, 粒径分别为 (227.2 ± 32.8), (231.7 ± 27.6), (230.6 ± 28.3) nm。DDZ-NS/CP 胶囊及其内容物的外观性状在 3 个月中未产生变化, 质量分数变化均在 ±1% 内, 复溶后粒径也仅轻微增大, 说明 DDZ-NS/CP 胶囊的稳定性较好。

3 讨论

通常情况下, 难溶性药物制备成普通制剂后须通过大量增加制剂服用量来达到治疗的有效药物浓度, 这在一定程度上加大了发生药物不良反应及不良事件的风险。本研究以难溶性药物黄豆苷元为研究对象, 为改善其口服吸收、提高生物利用度并克服用量大造成的毒副作用, 采用沉淀法联用高压均质技术制备了黄豆苷元纳米混悬剂胶囊, 所用辅料均无毒、无刺激性, 具有良好的安全性, 且被美国食品药品监督管理局 (FDA) 收载可运用于多种剂型。

本文通过正交试验优选了制剂的辅料组成及制备工艺,考察粒径的同时也考察了多分散指数作为评价指标进行补充验证,结果方差分析显示各因素对黄豆苷元纳米混悬剂分散度的影响程度为 F68 > 大豆卵磷脂 > PVA,与粒径作评价指标时的结果一致,但其中仅 F68 的用量具有显著性差异($P < 0.05$),说明大豆卵磷脂和 PVA 对分散体系的粒径分布影响不大,故最终仅以粒径为评价指标。

本研究对黄豆苷元纳米混悬剂冻干粉、冻干前的混悬液及冻干后复溶的混悬液进行理化表征,结果显示冻干前与冻干后复溶的纳米混悬剂的粒径与 Zeta 电位均符合要求,并且分散度较好,表明纳米混悬剂冻干粉较稳定,且高压均质及冻干过程对黄豆苷元的晶型无影响。以 SD 大鼠为模型,考察了黄豆苷元纳米混悬剂胶囊的体外肠吸收、胃肠道内生物分布和口服生物利用度。通过外翻肠囊法比较了联用法与仅用分散法制备的黄豆苷元纳米混悬剂胶囊的体外肠吸收情况。结果发现与市售黄豆苷元胶囊相比,2 种自制的黄豆苷元纳米混悬剂胶囊均能显著增加黄豆苷元的体外肠吸收,值得注意的是联用法较分散法提升更多,可能由于联用法制备的纳米混悬剂粒径更小。与原料药相比,黄豆苷元纳米混悬剂在口服进入体内后对小肠黏膜的黏附性增强,延长了药物在肠道的滞留时间,间接促进了药物的吸收。

通过沉淀法制备的纳米混悬剂放置后粒子有聚集的倾向,可能引起粒径及多分散指数均增大的现象^[23],可通过 TEM 及激光粒度仪对不同时间间隔制备得到的纳米混悬剂进行观察与记录,进一步探索减少沉淀法与高压均质技术联用的间隔时间对改善纳米混悬剂粒径及多分散指数的作用。并且纳米混悬剂口服后胃肠道的分布考察还可进一步对其部位细分,如胃部、十二指肠、空肠、回肠、盲肠和结肠等^[17],也可进一步对其在体内组织器官中的分布进行研究。本研究说明对比市售黄豆苷元剂型,将其制成纳米混悬剂可明显提高黄豆苷元的载药量和生物利用度,且沉淀法联用高压均质技术适用于大规模生产,为今后以黄豆苷元纳米混悬剂为基础制备其他剂型提供了参考和启示。

[参考文献]

[1] 王艳梅,吕立勋. 黄豆苷元的药理作用及临床应用[J]. 中国药师,2007,10(9):910-912.
[2] 姜铁夫,康万军,杜妙,等. 葛根黄豆苷元衍生物的合

成及理化性质研究[J]. 解放军药学报,2006,22(3):228-230.
[3] 王廉卿,戎欣玉,刘魁,等. 纳米药物晶体的制备技术及其应用[J]. 河北科技大学学报,2014,35(4):339-348.
[4] Möschwitzer J P. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process[J]. Int J Pharm, 2013,453(1):142-156.
[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:59-61.
[6] Kayser O, Olbrich C, Yardley V, et al. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration[J]. Int J Pharm,2003,254(1):73-75.
[7] Jacobs C, Müller R H. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration[J]. Pharm Res,2002,19(2):189-194.
[8] GAO Y, LI Z, SUN M, et al. Preparation, characterization, pharmacokinetics, and tissue distribution of curcumin nanosuspension with TPGS as stabilizer[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36(10):1225-1234.
[9] Verma S, Huey B D, Burgess D J. Scanning probe microscopy method for nanosuspension stabilizer selection[J]. Langmuir,2009,25(21):12481-12487.
[10] 吴超群,李小芳,牟倩倩,等. 甘草总黄酮纳米混悬剂冻干粉的表征及稳定性考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(2):29-33.
[11] 许海舰,刘一鑫,刘喜纲,等. 黄芩苷镁盐和黄芩苷的肠吸收动力学和药代动力学比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(4):78-83.
[12] Hecq J, Deleers M, Fanara D, et al. Preparation and *in vitro/in vivo* evaluation of nano-sized crystals for dissolution rate enhancement of ucb-35440-3, a highly dosed poorly water-soluble weak base[J]. Eur J Pharm Biopharm,2006,64(3):360-368.
[13] MOU D, CHEN H, WAN J, et al. Potent dried drug nanosuspensions for oral bioavailability enhancement of poorly soluble drugs with pH-dependent solubility[J]. Int J Pharm,2011,413(1/2):237-244.
[14] Lenhardt T, Vergnault G, Grenier P, et al. Evaluation of nanosuspensions for absorption enhancement of poorly soluble drugs; *in vitro* transport studies across intestinal epithelial monolayers [J]. AAPS J, 2008, 10(3):435-438.
[15] GAO Y, WANG C, SUN M, et al. *In vivo* evaluation of curcumin loaded nanosuspensions by oral administration [J]. J Biomed Nanotechnol,2012,8(4):659-668.
[16] Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, et al. Formulation

- design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system; basic approaches and practical applications [J]. Int J Pharm, 2011, 420 (1): 1-10.
- [17] Mane V, Muro S. Biodistribution and endocytosis of ICAM-1-targeting antibodies versus nanocarriers in the gastrointestinal tract in mice [J]. Int J Nanomed, 2012, 7: 4223-4237.
- [18] Blanchfield J T, Gallagher O P, Cros C, et al. Oral absorption and *in vivo* biodistribution of alpha-conotoxin MII and a lipidic analogue [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 361 (1): 97-102.
- [19] Bhavsar M D, Amiji M M. Gastrointestinal distribution and *in vivo* gene transfection studies with nanoparticles-in-microsphere oral system (NiMOS) [J]. J Control Release, 2007, 119 (3): 339-348.
- [20] Kimura T, Higaki K. Gastrointestinal transit and drug absorption [J]. Biol Pharm Bull, 2002, 25 (2): 149-164.
- [21] Shingaki T, Takashima T, Wada Y, et al. Imaging of gastrointestinal absorption and biodistribution of an orally administered probe using positron emission tomography in humans [J]. Clin Pharmacol Ther, 2012, 91 (4): 653-659.
- [22] Ponchel G, Montisci M J, Dembri A, et al. Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract [J]. Eur J Pharm Biopharm, 1997, 44 (1): 25-31.
- [23] ZHANG J Y, SHEN Z G, ZHONG J, et al. Preparation of amorphous cefuroxime axetil nanoparticles by controlled nanoprecipitation method without surfactants [J]. Int J Pharm, 2006, 323 (1/2): 153-160.

[责任编辑 刘德文]