

漆黄素固体分散体的制备

冯春来， 丁洋洋， 李文静， 余剑吟， 徐希明*
(江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

摘要: **目的** 制备漆黄素固体分散体。**方法** 分别采用熔融法和溶剂法制备固体分散体。在单因素试验基础上, 以载体种类、药载比、搅拌时间为影响因素, 累积溶出率为评价指标, 正交试验优化制备工艺。傅里叶红外光谱考察药物与载体间的相互作用, 差示扫描量热法分析药物存在状态。**结果** 溶剂法更适合制备固体分散体。最佳条件为载体 PVPK-30, 药载比 1 : 12, 搅拌时间 30 min, 20 min 内累积溶出率达 90. 87%。PVPK-30 与原本以无定型或分子形式存在的漆黄素之间可能有着氢键缔合。**结论** 漆黄素制备成固体分散体后, 可显著提高其溶出度。
关键词: 漆黄素; 固体分散体; 制备; 正交试验; 傅里叶红外光谱; 差示扫描量热
中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)12-2503-05
doi:10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2017. 12. 011

Preparation of fisetin solid dispersions

FENG Chun-lai, DING Yang-yang, LI Wen-jing, YU Jian-yin, XU Xi-ming*
(School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare fisetin solid dispersions. **METHODS** Melting method and solvent method were used for the preparation of solid dispersions, respectively. With carrier type, drug-carrier ratio and stirring time as influencing factors, accumulative dissolution rate as an evaluation index, the preparation was optimized by orthogonal test on the basis of single factor experiment. The interaction between drug and carrier was investigated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and the drug existing state was analyzed by differential scanning calorimetry (DSC). **RESULTS** Solvent method was more suitable for the preparation of solid dispersions. The optimal conditions were determined to be PVPK-30 as a carrier, 1 : 12 for drug-carrier ratio, and 30 min for stirring time, the accumulative dissolution rate reached 90. 87% within 20 min. There might be a hydrogen bond association between PVPK-30 and fisetin previously existing in amorphous or molecular state. **CONCLUSION** The dissolution rate of fisetin can be obviously increased after being prepared into solid dispersions.
KEY WORDS: fisetin; solid dispersions; preparation; orthogonal test; Fourier transform infrared spectroscopy; differential scanning calorimetry

漆黄素是一种黄酮类化合物, 难溶于水、四氯化碳和石油醚, 易溶于丙酮、乙酸等溶剂, 广泛存在于草莓、苹果、洋葱、黄瓜等水果和蔬菜中, 来源广泛, 价廉易得, 具有广泛的药理活性, 如抗炎、抗氧化、抗凝血、抗血栓、解痉、治疗糖尿病肾损伤等。近年来研究发现, 漆黄素可以通过抑制肿瘤细胞增殖和信号转导通路、诱

导肿瘤细胞凋亡等途径发挥抗肿瘤作用^[1-4], 故其日益受到大家的关注。但该成分存在难溶于水、生物利用度低等缺点^[5], 从而限制了其进一步开发和临床应用。

目前, 对漆黄素的研究主要集中在药理活性、作用机理、提取工艺等方面, 鲜有相关剂型方面的报道。近年来, 研究者尝试通过制备漆黄素脂质体

收稿日期: 2017-06-01
基金项目: 国家自然科学基金 (81373897); 江苏省博士后科研基金 (1402174C); 江苏大学高级专业人才科研启动基金 (12JDG034)
作者简介: 冯春来 (1976—), 男, 博士, 副教授, 从事基于网络药理学的药效物质和药剂学研究。Tel: (0511) 88791526, E-mail: feng@ujs. edu. cn
* 通信作者: 徐希明 (1965—), 男, 博士, 教授, 从事药剂学与组织工程研究。Tel: (0511) 88791396, E-mail: xuxm@ujs. edu. cn

和纳米胶束来改善其溶解度、提高其生物利用度及抗肿瘤效果,如 Seguin^[6]等制备漆黄素脂质体,经腹腔注射给药后可明显提高其溶解度和生物利用度,而且进行荷瘤小鼠抗肿瘤活性实验时发现,与原料药相比,低剂量脂质体可明显增加抗肿瘤效果;Chen^[7]等制备漆黄素胶束,可增加其溶解度和抗肿瘤效果。虽然上述纳米粒制剂作为一种新型给药方式,在改善药物溶解性、提高生物利用度上取得了一定成果,但该类制剂存在工艺复杂、成本高、耗时长、稳定性差等问题。

固体分散体通过将难溶性药物高度分散于水溶性、难溶性或肠溶性载体中形成固体溶液、微晶或无定型分散状态,从而提高药物溶出度^[8-10],具有工艺简单、稳定性好等优点,而且它不仅可以制备成速释制剂,也可以制备成缓释或控释制剂,或者作为中间体进一步制备成片剂、胶囊剂、滴丸剂等剂型,为最终制剂开发提供基础。因此,本实验拟制备漆黄素固体分散体以增加其溶出度、提高其生物利用度,从而为相关新剂型的开发提供实验基础。

1 仪器和试药

1.1 仪器 磁力搅拌器(江苏省金坛市佳美仪器有限公司);旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);DZF-6020 真空干燥箱(上海一恒科技有限公司);60 目筛(上海倍微衡器有限公司);电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);ZRS-8G 智能溶出仪(上海江仪仪器有限公司)。

1.2 试药 漆黄素(含有量>98%,南京春秋生物工程有限公司)。乙醇为色谱纯(国药集团化学试剂有限公司);水为蒸馏水(自制)。PVPK-30、PEG6000、泊洛沙姆 188(F68)(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 漆黄素含有量测定

2.1.1 检测波长确定 精密称取一定量漆黄素对照品、PEG6000、F68、PVPK-30,加入适量乙醇,超声溶解,配制成 10 μg/mL 溶液,过滤后在 190~400 nm 范围内进行紫外全波长扫描,结果见图 1。由图可知,漆黄素在 364 nm 波长处具有最大吸收,PEG6000 有少量吸收,但考虑其与前者吸收峰之间差异最大化,而且 F68 和 PVPK-30 未见吸收,对药物测定的干扰较小,故确定检测波长为 364 nm。

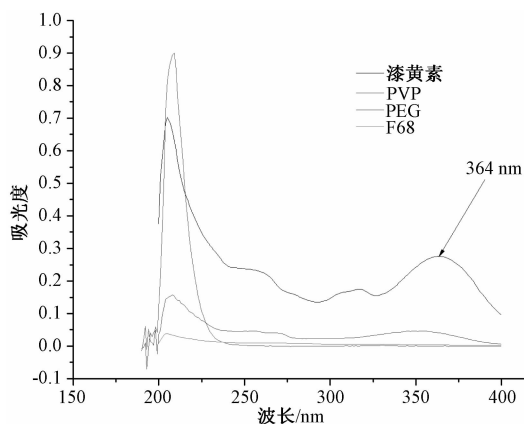


图 1 检测波长筛选结果

Fig. 1 Results of detection wavelength screening

2.1.2 紫外标准曲线绘制 精密称取漆黄素 10 mg,加入适量乙醇,超声充分溶解后转移至 100 mL 量瓶中,摇匀,定容,制成 100 μg/mL 贮备液,精密量取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,乙醇定容,配制成 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μg/mL 溶液,在漆黄素最大吸收波长处测定其吸光度。以漆黄素质量浓度为横坐标(X),其对应的吸光度为纵坐标(A),绘制紫外标准曲线,得到回归方程 $A = 0.078\ 6X - 0.005\ 4$ ($R^2 = 0.999\ 08$),在 2~10 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.3 精密度和准确度测定 配制高、中、低(10.0、6.0、3.0 μg/mL)3 个质量浓度的漆黄素乙醇溶液,同一天平行测定 5 次,计算日内精密度;每天各测 1 次,连续 5 d,计算日间精密度。结果,低、中、高质量浓度的日内和日间精密度 RSD 分别为 0.98% 和 1.85%、0.50% 和 1.04%、0.61% 和 0.72%,准确度分别为 100%、100%、101%,表明该方法精密度和准确度良好。

2.2 固体分散体制备

2.2.1 熔融冷却法 选择 PEG6000 和 F68 作为载体,将不锈钢板置于电炉上,加热至 100 ℃,将漆黄素分别与 2 种载体的物理混合物充分混匀,投于钢板上,待熔融后充分搅拌混合,室温下冷却 12 h,粉碎,过 60 目筛,置于干燥器中,室温下保存备用。

2.2.2 溶剂挥发法 选择 PVPK-30 作为载体,将其与漆黄素以一定比例溶解于适量乙醇中,超声完全溶解后,将两者混合,常温下磁力搅拌一定时间,将混合均匀的溶液在 50 ℃下置于旋转蒸发器上蒸去有机溶剂,倒入坩埚中,电热套加热

(100 ℃) 挥干, 干燥成脆碎状的固体分散体, 置于研钵中研细, 过 60 目筛, 粉末密封保存备用。

2.3 载体物理混合物制备 按比例分别称取漆黄素和载体, 置于研钵中混合均匀并研磨, 过 60 目筛, 干燥保存, 即得。

2.4 漆黄素体外溶出度的测定 采用 2015 年版《中国药典》中的桨法, 选择 900 mL 0.1% SDS 溶液作为溶出介质, 在 37 ℃ 下以 100 r/min 转速处理。投入各待测处方的固体分散体 (含药量 10 mg), 在规定的时间点 (5、10、20、40、60、90、120、150、180 min) 取溶出液 5 mL (迅速补充 5 mL 新的同温 0.1% SDS 溶液), 过 0.45 μm 微孔滤膜, 在 364 nm 波长处测定续滤液吸光度, 代入“3.1.2”项下紫外标准曲线, 求出各取样时间点待测物的质量浓度, 按式 (1) 计算累积溶出率^[11] (C_i 为 t 时刻溶出杯中溶液的质量浓度, C_{i-1} 为 $t-1$ 时刻溶液的质量浓度)。

累积溶出率 = $(C_i \times 900 + C_{i-1} \times 5) / M$ (相当于药的质量 mg) $\times 10^{-4}$ (1)

2.5 单因素试验

2.5.1 载体种类 以累积溶出率为指标, 考察 PVPK-30、PEG6000、F68 所制备的固体分散体对漆黄素体外溶出度的影响, 结果见图 2。由图可知, PVPK-30 载体所制备的固体分散体累积溶出率明显更高, 在 10 min 时达 77%。

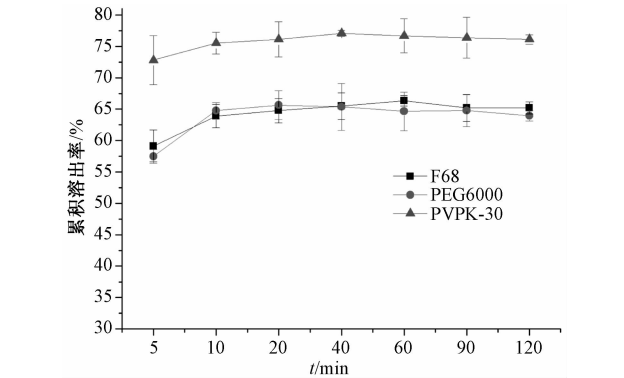


图 2 载体种类对累积溶出率的影响
Fig. 2 Effect of carrier type on the accumulative dissolution rate

2.5.2 药载比 固定载体 PVPK-30, 搅拌时间 30 min, 考察药载比对累积溶出率的影响, 结果见图 3。由图可知, 药载比为 1 : 12 时, 固体分散体累积溶出率更高, 在 20 min 时达 90%。

2.5.3 搅拌时间 固定载体 PVPK-30, 药载比 1 : 12, 考察搅拌时间对累积溶出率的影响, 结果

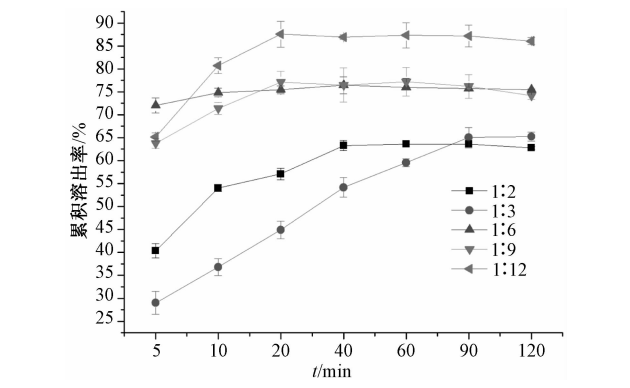


图 3 药载比对累积溶出率的影响
Fig. 3 Effect of drug-carrier ratio on the accumulative dissolution rate

见图 4。由图可知, 搅拌 15、30、45 min 后, 漆黄素的累积溶出率分别达 87%、91%、89%。

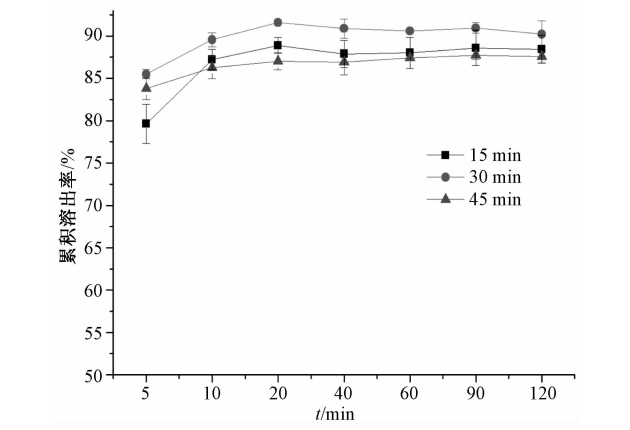


图 4 搅拌时间对累积溶出率的影响
Fig. 4 Effect of stirring time on the accumulative dissolution rate

2.6 正交试验优化 在单因素试验基础上, 设计 3 因素 (A 载体种类、B 药载比、C 搅拌时间) 3 水平正交试验, 以累积溶出率为评价指标, 因素水平见表 1, 试验设计与结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 因素水平			
Tab. 1 Factors and levels			
水平	因素		
	A 载体种类	B 药载比	C 搅拌时间/min
1	PEG6000	1 : 6	15
2	F68	1 : 9	30
3	PVP-K30	1 : 12	45

由此可知, 3 个因素的影响程度依次为载体 > 药载比 > 搅拌时间, 最优工艺为载体 PVPK-30, 药载比 1 : 12, 搅拌时间 30 min, 累积溶出率达 89.4%。

表 2 试验设计与结果
Tab. 2 Design and results of tests

编号	因素				累积溶出率/%
	A(载体)	B(药载比)	C(搅拌时间/min)	D(误差)	
1	1(PEG6000)	1(1 : 6)	1(15)	1	65.8
2	1(PEG6000)	2(1 : 9)	2(30)	2	75.3
3	1(PEG6000)	3(1 : 12)	3(45)	3	74.6
4	2(F68)	1(1 : 6)	2(30)	3	66.1
5	2(F68)	2(1 : 9)	3(45)	1	69.4
6	2(F68)	3(1 : 12)	1(15)	2	67.0
7	3(PVP-K30)	1(1 : 6)	3(45)	2	77.8
8	3(PVP-K30)	2(1 : 9)	1(15)	3	77.3
9	3(PVP-K30)	3(1 : 12)	2(30)	1	89.4
K ₁	215.7	209.7	210.1	224.6	
K ₂	202.5	222.0	230.8	220.1	
K ₃	244.5	231.0	221.8	218.0	
k ₁	71.9	69.9	70.0	74.9	
k ₂	67.5	74.0	76.9	73.4	
k ₃	81.5	77.0	73.9	72.7	
R	14.0	7.1	6.9	2.2	

表 3 方差分析
Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	307.52	2	153.76	40.57	<0.05
B	76.22	2	38.11	10.06	>0.05
C	71.82	2	35.91	9.47	>0.05
误差	7.58	2	3.79	—	—

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$

2.7 验证试验 按“2.2”项下方法以最优工艺制备 3 批固体分散体,按“2.4”项下方法进行体外溶出实验,计算累积溶出率,结果见表 4,可知该方法重复性良好。

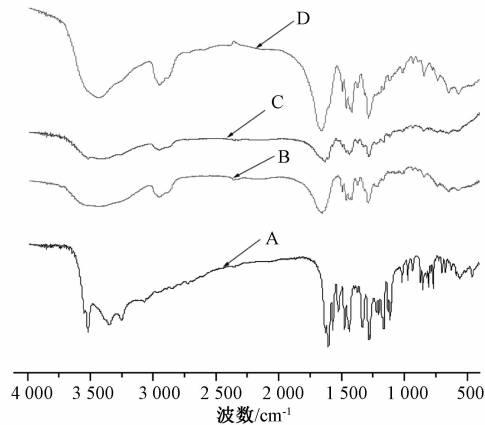
表 4 验证试验结果
Tab. 4 Results of verification tests

编号	累积溶出率/%
1	89.91
2	91.16
3	91.55
平均值	90.87
RSD/%	0.94

2.8 物相鉴别

2.8.1 傅立叶红外光谱 (FTIR) 分析 将固体分散体、物理混合物、漆黄素、PVPK-30、KBr 真空烘干,用干燥的 KBr 粉末分别充分混合、压片,在 $4\,000\sim400\text{ cm}^{-1}$ 范围内进行分析,结果见图 5。由图可知,漆黄素在 $3\,252.52\text{ cm}^{-1}$ 有个 O-H 伸缩振动,苯环上的 C = C 伸缩振动在 $1\,629.78\text{ cm}^{-1}$ 处;PVPK-30 和物理混合物的红外图谱无明显区别,可能是物理混合物中的 PVPK-30 较多,从而

掩盖了漆黄素的吸收峰;固体分散体红外图谱中 $3\,252.52\text{ cm}^{-1}$ 处的峰消失,而且漆黄素结构里有酚羟基,PVPK-30 结构里有 C = O,推测两者之间可能存在氢键缔合。



A. 漆黄素 B. PVPK-30 C. 物理混合物 D. 固体分散体
A. fisetin B. PVPK-30 C. physical mixture D. solid dispersions

图 5 样品 FTIR 图

Fig. 5 FTIR image of samples

2.8.2 差示扫描量热分析 (DSC) 以空白铝坩埚为参比物, N_2 为保护气,温度 $20\sim400\text{ }^\circ\text{C}$,升温速度 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$,对漆黄素、PVPK-30、物理混合物、固体分散体进行 DSC 分析,结果见图 6。由图可知,漆黄素有 2 个主要尖峰 ($124.88、329.95\text{ }^\circ\text{C}$),其中后者吸热峰温度对应其熔点;PVPK-30 也有 2 个吸热峰 ($51.81、392.45\text{ }^\circ\text{C}$);物理混合物有 3 个吸热峰 ($56.92、114.85、400.24\text{ }^\circ\text{C}$),仍保留微弱的药物吸收峰,表明 PVPK-30 与漆黄素之间没有发生相互作用,两者仍以晶体状态存在;固体分散体有 2 个吸热峰 ($55.36、398.47\text{ }^\circ\text{C}$);漆黄素吸热峰消失,说明其与 PVPK-30 形成低共熔物或共沉淀物,即漆黄素以分子形式或者无定形状态存在。

3 讨论与结论

体外溶出实验结果可知,最优工艺制备的漆黄素固体分散体在 20 min 内的体外累积溶出率高达 90% 左右,而漆黄素原料药低于 10%,表明固体分散体能显著地提高漆黄素的溶出度。虽然以 F68 和 PEG6000 为载体制备的固体分散体也能提高药物溶出度,但效果不如 PVPK-30,可能是在使用熔融法制备固体分散体时,由于两者熔点较低,在较高温度下难以骤冷成固态,并且容易吸潮,从而影响其分散效果;PVPK-30 热稳定性好,熔点高,但能溶于多种有机溶剂中,可使漆黄素充分地分散于

其中, 从而显著提高该成分溶解度。

综上所述, 固体分散体是提高漆黄素溶解度的简单有效的方法。今后, 将对漆黄素固体分散体的体内药代动力学特性及其生物利用度进行考察, 为相关新剂型开发提供更充分的参考。

参考文献:

- [1] Khan N, Syed D N, Ahmad N, *et al.* Fisetin: A dietary antioxidant for health promotion[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(2): 151-162.
- [2] Liao H, Wu Y, Zang Z, *et al.* Research progress of the anti-tumor effects of fisetin[J]. *Tianjin Pharm*, 2013, 25(6): 44-46.
- [3] Suh Y, Afaq F, Johnson J J, *et al.* A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappaB-signaling pathways [J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(2): 300-307.
- [4] 刘立群, 郭 微, 余文丹, 等. 漆黄素通过调节 Apaf-1, ERK 和 COX-2 信号通路诱导人宫颈癌细胞凋亡[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2013, 34(1): 75-82.
- [5] Ragelle H, Crauste-Manciet S, Seguin J, *et al.* Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice[J]. *Int J Pharm*, 2012, 427(2): 452-459.
- [6] Seguin J, Brullé L, Boyer R, *et al.* Liposomal encapsulation of the natural flavonoid fisetin improves bioavailability and antitumor efficacy[J]. *Int J Pharm*, 2013, 444(1-2): 146-154.
- [7] Chen Y, Wu Q, Song L, *et al.* Polymeric micelles encapsulating fisetin improve the therapeutic effect in colon cancer[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(1): 534-542.
- [8] 郝 阳, 黄家宇, 张 敏, 等. 二乙酰大黄酒酸固体分散体的制备以及体外溶出度的测定[J]. *中成药*, 2016, 38(3): 702-704.
- [9] 唐 岚, 裴帅波, 吴 兰, 等. 厚朴酚-交联羧甲基纤维素钠固体分散体的制备及体外溶出研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(3): 433-437.
- [10] 赵娜夏, 夏广萍, 韩英梅. 环黄芪醇-单葡萄糖苷固体分散体的制备及溶出特性的研究[J]. *中成药*, 2016, 38(3): 539-542.
- [11] 袁 颖. 基于多层次相互作用网络的夏枯草抗肿瘤有效成分筛选及处方设计[D]. 镇江: 江苏大学, 2016.

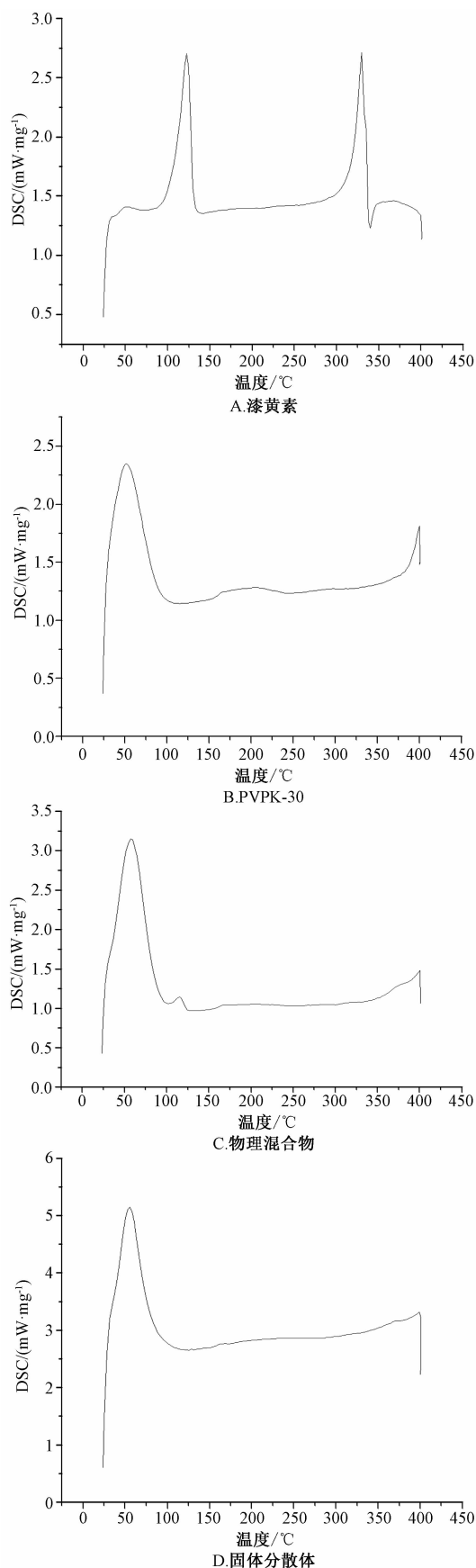


图 6 样品 DSC 图

Fig. 6 DSC images of samples