

**Comparison of Spray Freeze Drying and the Solvent
Evaporation Method for Preparing Solid Dispersions
of Baicalein to Improve Dissolution and Oral
Bioavailability**

by

He Xiu Qiong



Institute of Chinese Medical Sciences

University of Macau

2010

Comparison of Spray Freeze Drying and the Solvent Evaporation Method for Preparing Solid Dispersions of Baicalein to Improve Dissolution and Oral Bioavailability

by

He Xiu Qiong

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of

Master of Science

Institute of Chinese Medical Sciences
University of Macau

2010

Approved by _____

Supervisor

Date _____

In presenting this thesis in partial fulfillment of the requirements for a Master's degree at the University of Macau, I agree that the Library and the Institute of Chinese Medical Sciences shall make its copies freely available for inspection. However, reproduction of this thesis for any purposes or by any means shall not be allowed without my written permission. Authorization is sought by contacting the author at

Address:

Telephone:

Fax:

E-mail:



碩士學位論文

利用噴霧冷凍乾燥和溶劑-蒸發法製備黃芩
素固體分散體以提高其溶出度和口服生物
利用度的研究

研究生姓名：何秀瓊
導 師：鄭穎 博士
專 業：中 藥 學
日 期：2010.8



澳門大學中華醫藥研究院

目 錄

Figure Legend	I
Table Legend	II
致 謝	III
摘 要	IV
Abstract	VI
第一章 前言	1
第一節 黃芩素研究概述	1
一、 提取分離	1
二、 理化性質	2
1、 物理性質	2
2、 化學性質	2
三、 藥理活性	2
四、 藥物動力學研究	3
五、 藥劑研究進展	4
六、 展望	5
第二節 固體分散體研究概述	6
一、 載體選擇	6
1、 高 Tg 載體	6
2、 低 Tg 載體	7
二、 製備方法	7
1、 物理研磨法	7
2、 熔融法	8
3、 溶劑法	8
4、 溶劑-熔融法	8
5、 噴霧乾燥法	8
6、 噴霧冷凍乾燥法 (SFD)	9
第二章 黃芩素的體外 HPLC 測定及方法學考察	10
一、 儀器和材料	10
1、 儀器	10
2、 試劑和對照品	10
二、 實驗方法	10
1、 稀釋液的配製	10
2、 測定波長的選擇	10
3、 流動相的優化	10
4、 輔料的影響	11
5、 標準曲線的繪製	11
6、 檢測限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 的測定	11
7、 精密度和準確度考察	11
三、 實驗結果與討論	11
1、 測定波長的選擇	11

	2、	流動相的優化.....	12
	3、	輔料的影響.....	13
	4、	標準曲線的製備.....	13
	5、	檢測限（LOD）和定量限（LOQ）的確定.....	14
	6、	精密度和準確度的考察.....	14
	四、	小結.....	14
第三章		黃芩素固體分散體的製備、表徵和體外評價.....	15
	一、	材料.....	15
	二、	實驗方法.....	15
	1、	噴霧冷凍乾燥法（SFD）和溶劑-蒸發法（Solvent-evaporation method）製備固體分散體.....	15
	2、	製備物理混合物（PM）.....	15
	3、	溶出度測定.....	16
	4、	樣品表徵.....	16
	三、	實驗結果和討論.....	17
	1、	噴霧冷凍乾燥法（SFD）和溶劑-蒸發法製備的樣品比較... ..	18
	2、	溶出度考察.....	18
	3、	固體分散體的樣品表徵.....	20
	4、	穩定性研究.....	25
	四、	小結.....	26
第四章		黃芩素固體分散體的大鼠體內藥動學評價.....	27
	一、	材料.....	27
	1、	藥品和試劑.....	27
	2、	儀器.....	27
	3、	實驗動物.....	27
	二、	實驗方法.....	27
	1、	對照品溶液配制.....	27
	2、	色譜條件.....	27
	3、	專屬性實驗.....	28
	4、	標準曲線的製備.....	28
	5、	回收率、精密度和準確度實驗.....	28
	6、	凍融穩定性實驗.....	29
	7、	藥物動力學研究.....	29
	8、	血漿樣品處理.....	29
	9、	數據處理.....	30
	三、	實驗結果與討論.....	30
	1、	專屬性.....	30
	2、	標準曲線和定量限測定.....	31
	3、	回收率、精密度与冻融稳定性实验.....	31
	4、	藥物動力學研究.....	33
	四、	小結.....	36
第五章		總結與展望.....	37
	一、	主要研究工作和結果.....	37
	1、	建立黃芩素體外含量測定的 HPLC 分析方法.....	37

2、	篩選製備固體分散體的方法.....	37
3、	篩選製備固體分散體所需的載體及最優比例.....	37
4、	處方的表徵分析.....	37
5、	建立黃芩素體內含量測定的 HPLC 分析方法	37
6、	最優處方的大鼠體內藥物動力學實驗.....	38
二、	研究工作的創新性.....	38
三、	實驗尚需完善之處.....	38
個人簡歷.....		39
參考文獻.....		40



Figure Legend

Figure 1. 1	Baicalein Isolated From Baicalin	1
Figure 2. 1	UV Spectrum of Baicalein.....	12
Figure 2. 2	HPLC Chromatogram of Baicalein	13
Figure 2. 3	Standard Curve	14
Figure 3. 1	Macroscopic appearance of solid dispersions prepared by SFD method, baicalein-Pluronic F68 1:4 (A); or solvent method, baicalein-Pluronic F68 1:4 before (B) and after (C) desiccation.	17
Figure 3. 2	Dissolution profiles of SFD baicalein-PVP K40 and SFD baicalein-Pluronic F68 with various drug/carrier ratios in water (mean $\pm$ SD, n = 3).	19
Figure 3. 3	Dissolution profiles of SFD baicalein- Pluronic F68 with various drug/carrier ratios in water (mean $\pm$ SD, n = 3).	19
Figure 3. 4	SEM micrographs of (A) bulk baicalein (Mag. 300), (B) PM of baicalein with Pluronic F68 (Mag. 1000) and (C) SFD baicalein powders (Mag. 5000).	21
Figure 3. 5	Powder X-ray diffraction patterns of bulk baicalein, Pluronic F68, PM of baicalein with Pluronic F68, SFD and solvent evaporation prepared powders of baicalein.	22
Figure 3. 6	DSC thermograms of bulk baicalein, Pluronic F68, PM of baicalein with Pluronic F68 and SFD baicalein powders.	22
Figure 3. 7	FTIR spectra of (A) bulk baicalein, (B) Pluronic F68, (C) PM of baicalein with Pluronic F68 and (D) SFD baicalein powders.	23
Figure 4. 1	Representative chromatograms of baicalein in rat plasma determined by HPLC-UV method. (A) Blank rat plasma; (B) blank rat plasma spiked with 1 μg/mL baicalein and IS; (C) rat plasma sample collected at 24 h after the oral administration of 75 mg/kg baicalein to SD rat.	31
Figure 4. 2	Mean plasma concentration-time profile of baicalein in free form (A) and after hydrolysis (B) determined by HPLC-UV method after a single dose of baicalein to rats at 75 mg/kg (i.g.). Each point represents the mean + SD (n = 5).	34
Figure 4. 3	Mean plasma concentration-time profile of baicalein determined by HPLC-UV method after a single dose of baicalein to rats at 75 mg/kg (i.g.). Each point represents the mean + SD (n = 5).	34

Table Legend

Table 2. 1	Optimization of HPLC-DAD Mobile Phase.....	12
Table 2. 2	Intra- and Inter-day Precision and Accuracy	14
Table 3. 1	Accelerated stability study at 40°C in SFD baicalein formulation (mean $\pm$ SD, n = 3).....	26
Table 4. 1	The extraction recoveries of baicalein in rat plasma by HPLC-UV method (n = 5) and freeze-thaw stability of baicalein in plasma (n = 3) by determining of baicalein free form.	32
Table 4. 2	The extraction recoveries of baicalein in rat plasma by HPLC-UV method (n = 5) and freeze-thaw stability of baicalein in plasma (n = 3) by determining of baicalein after enzymolysis).	32
Table 4. 3	Intra and inter-day precision and accuracy of HPLC method for determination of baicalein in plasma (n = 5) by determining baicalein free form).	32
Table 4. 4	Intra and inter-day precision and accuracy of HPLC method for determination of baicalein in plasma (n = 5) by determining baicalein after enzymolysis).	33
Table 4. 5	The main pharmacokinetic parameters of baicalein free form in SD rats with noncompartmental model. (mean $\pm$ SD, n = 5).	35
Table 4. 6	The main pharmacokinetic parameters of baicalein after enzyme hydrolysis in SD rats with noncompartmental model. (mean $\pm$ SD, n = 5). .	35

致 謝

在澳門大學中華醫藥研究院兩年短暫的碩士學習和生活中，我收穫了許多東西，老師的教誨，同學的友誼，是我今後人生道路上的重要精神支柱。

感謝中華醫藥研究院和西南交通大學藥學院給了我來到澳門大學深造的機會，使我有幸在這裡結識了來自全國各大高校的同學，從他們身上，我學到了很多，如獨立思考的能力、勤奮學習的精神、勇於面對挫折、不怕困難的品質，以及同學之間的美好情誼。

十分感謝我的導師鄭穎博士，在我的實驗階段，她給予我悉心的指導，督促我不斷學習進步；當實驗遇到困難時，她詳細地指導我如何解決困難，渡過難關；在文章和論文寫作階段，她耐心地指導我進行專業文章寫作，使論文最終得以順利完成。而且，在為人處事上，鄭穎博士也給予了我很深的教誨，在此，衷心地說聲謝謝！

本實驗的 DSC 測定部份是在香港中文大學藥學院測定的，十分感謝 Aviva 師兄的幫助。本實驗的其他表徵部份在中山大學分析測試中心和華南理工大學材料學院完成，對各位相關的老師表示衷心的感謝。本實驗的動物實驗部份由裴利霞博士指導，在廣東省醫學實驗動物中心完成，十分感謝裴利霞博士的指導和相關工作人員的協助。

感謝李銘源博士對我的大力支持，使我能全心投入到實驗研究中。感謝王一濤教授、李紹平教授、張慶文博士、燕茹博士、許貝文博士及中華醫藥研究院的各位老師和技術員，你們的支持使我順利地完成了碩士學位，衷心感謝！感謝各位師兄師姐同學對我的幫助，你們給我帶來了許多快樂。

感謝我的家人，你們的支持是我不斷前進的動力！

感謝澳門科學技術發展基金（資助號：008/2007/A1 和 005/2007/A1）對我和本課題的資助。

最後，謹向參加論文審閱和答辯的所有專家和老師致以誠摯的敬意和衷心的感謝。

澳門大學

摘要

利用噴霧冷凍乾燥和溶劑-蒸發法製備黃芩素固體分散體以提高其溶出度和口服生物利用度的研究

何秀瓊

指導老師：鄭穎

中華醫藥研究院

噴霧冷凍乾燥技術是一種于九十年代發展起來的製備固體分散體的新技術，這種製備方法因避免了加熱過程，特別適合將熱敏性藥物製備成固體分散體。噴霧冷凍乾燥技術的製備過程大致為將溶有輔料和水難溶性藥物的溶液通過蠕動泵輸送至噴嘴，在液氮上方噴霧而使霧滴在液氮中迅速被凍結成固態顆粒，隨後將這些顆粒轉移至冷凍乾燥機中進行乾燥，得到固體分散體。這種製備方法與傳統製備方法相比，更易得到具有無定形狀態、高比表面積的固體分散體。

黃芩素是一種從黃芩藥材中提取得到的黃酮類化合物，為黃芩的有效成分之一，在临床上主要用于抗炎和抗菌，此外还具有抗氧化、抗腫瘤、抗血栓形成以及保护肝脏、心脑血管、神经元等多种药理作用。黃芩素屬於生物藥劑學分類系統中的 II 類藥物，即難溶於水(25℃時，其溶解度為 0.13 mg·mL⁻¹)、易透過($P_{app}=1.7\times 10^{-5}$ cm·s⁻¹) 的藥物。研究數據顯示，由於其難溶於水、溶出不完全、首過效應嚴重，黃芩素的口服生物利用度很低，限制了其在醫藥學上的應用。因此本實驗旨在擬通過將黃芩素製備成固體分散體改變其溶出性能，使黃芩素在水

中的溶出速度增加，從而提高其口服生物利用度。

本實驗以一種低玻璃轉化溫度和低熔點的輔料 (Pluronic F68)為載體，採用噴霧冷凍乾燥法製備黃芩素固體分散體，並將所制得的樣品與傳統的溶劑-蒸發法製備的樣品相比較。在採用噴霧冷凍乾燥法製備固體分散體的過程中，料液被凍結成固態細小顆粒，凍乾后形成蓬鬆粉末狀顆粒。然而，採用溶劑-蒸發法時，樣品粘附於玻璃燒瓶內壁上，而且可見到黃芩素晶體析出。採用掃描電鏡法、粉末 X-衍射法、比表面積測定法、差示掃描量熱法和傅利葉紅外光譜法對製備的樣品進行表徵。掃描電鏡和粉末 X-衍射結果顯示，採用噴霧冷凍乾燥法製備的黃芩素固體分散體為無定形狀態，其比表面積大於黃芩素原藥的。然而，當採用溶劑-蒸發法製備藥物/載體比相同的黃芩素固體分散體時，大部份黃芩素在蒸發溶劑時析出晶體，其體外溶出速度與同比例的物理混合物相同。噴霧冷凍乾燥法製備的樣品在低濕、40℃條件下保存 6 個月，其物理穩定性和化學穩定性都較好。

對噴霧冷凍乾燥法製備的樣品進行大鼠體內藥物動力學評價，經大鼠口服給藥后，以酶解后的黃芩素總量為指標，其 T_{max} 快于黃芩素原藥，而 C_{max} 高於黃芩素原藥。由 AUC_{0-12} 計算黃芩素固體分散體相對於黃芩素原藥的相對生物利用度為 233%，說明噴霧冷凍乾燥技術能有效地提高黃芩素的口服生物利用度。

關鍵詞：固體分散體；黃芩素；Pluronic F68；噴霧冷凍乾燥法；溶劑-蒸發法；溶出度；生物利用度。

University of Macau

Abstract

Comparison of Spray Freeze Drying and the Solvent Evaporation Method for Preparing Solid Dispersions of Baicalein to Improve Dissolution and Oral Bioavailability

By He Xiu Qiong

Thesis Supervisor: Dr. Zheng Ying

Institute of Chinese Medical Sciences

Spray freeze drying (SFD) has been successfully developed to prepare solid dispersions at ambient temperature, which was developed in the 1990s. SFD technology involves the atomization of a feed liquid containing poorly water-soluble or insoluble APIs and excipients directly into a cryogenic liquid at ambient temperature to produce a frozen micronized powder that is subsequently dried. This process offers a variety of advantages compared to traditional technologies for solid dispersions, including amorphous structure and high surface area.

Baicalein (5, 6, 7-trihydroxyflavone), one of the major flavones isolated from the root of *Scutellaria baicalensis*, has been demonstrated to have numerous pharmacological activities including anti-inflammatory, antioxidative, anticancer, antiallergic, and antiviral effects. It is a Class II (i.e., poorly water-soluble and highly permeable, with $P_{app} = 1.7 \times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) API according to the Biopharmaceutics Classification System. Its poor water solubility ($\sim 0.13 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), inadequate dissolution, and extensive first-pass metabolism result in its low oral bioavailability and limit its use in the pharmaceutical field.

The objective of this study was to prepare solid dispersions consisting of baicalein and a carrier with a low glass transition/melting point (Pluronic F68) by SFD technology. We compared these powders to those produced from the conventional solvent-evaporation method. In the SFD process, a feeding solution was atomized above the surface of liquid nitrogen following lyophilization, which resulted in instantaneously frozen microparticles. However, solid dispersions prepared by the solvent-evaporation method formed a sticky layer on the glass flask with crystalline baicalein separated out from the carrier. The powder samples were characterized by scanning electron microscopy (SEM), powder X-ray diffraction (PXRD), surface area measurement, differential scanning calorimetry (DSC), and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR). SEM and PXRD results suggested that the majority of baicalein in the SFD processed solid dispersion was in the amorphous state, which has a higher specific surface area than bulk baicalein. However, the majority of baicalein was recrystallized in the solid dispersion at the same composition prepared by the solvent-evaporation method, which showed a similar dissolution rate to the physical mixture. SFD product was physically and chemically stable after being stored at 40°C with low humidity for six months. After enzyme hydrolysis, baicalein in the SFD product displayed a significantly shorter T_{max} and higher C_{max} than bulk baicalein after oral dosing. The relative bioavailability of the SFD product vs. bulk baicalein determined by comparing the AUC_{0-12} was 233%, which demonstrated the significantly improved oral bioavailability of baicalein produced by the SFD technique.

Keywords: Solid dispersion; Baicalein; Pluronic F68; Spray freeze drying (SFD); Solvent evaporation; Dissolution; Bioavailability.