

**Formulation Development of Scutellarein Nanosuspensions as
an In-vivo Active, Rapidly Absorbed Precursor of Its Glycosides
Scutellarin**

Yang Xiao

Master of Science

2013



**State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine
Institute of Chinese Medical Sciences
University of Macau**

Formulation Development of Scutellarein Nanosuspensions as an In-vivo Active, Rapidly
Absorbed Precursor of Its Glycosides Scutellarin

by

Yang Xiao

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

Master of Science

State Key Laboratory of Quality
Research in Chinese Medicine

Institute of Chinese Medical
Sciences

University of Macau

2013

Approved by _____

Supervisor

Date _____

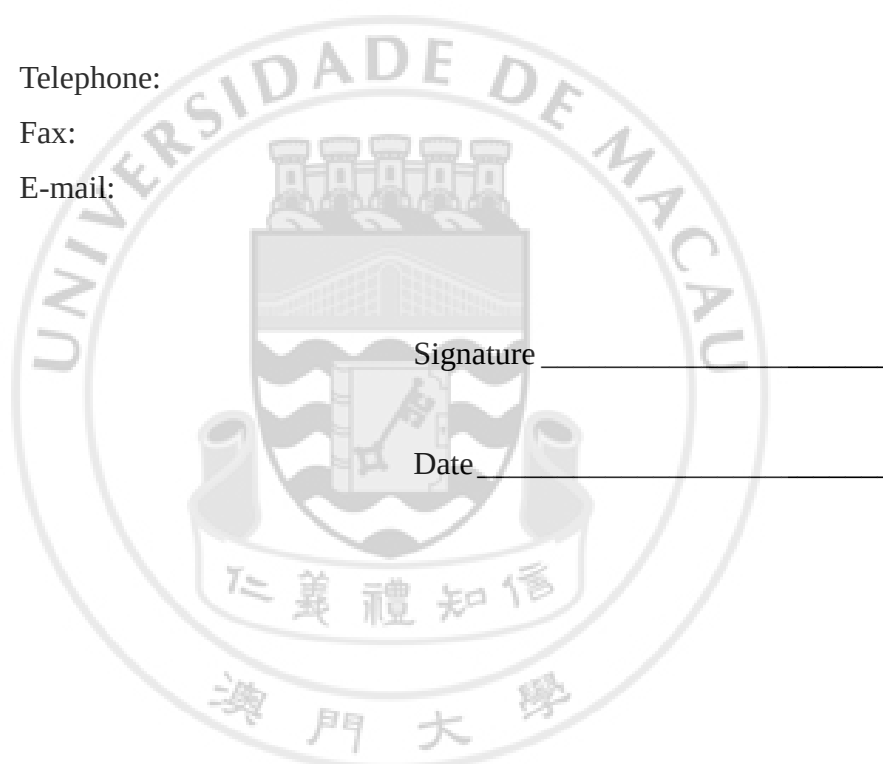
In presenting this thesis in partial fulfillment of the requirements for a Master's degree at the University of Macau, I agree that the Library and the Institute of Chinese Medical Sciences shall make its copies freely available for inspection. However, reproduction of this thesis for any purposes or 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

野黃芩素納米混懸液製備及其作為野黃芩苷活性前體的體內研究

研究生姓名 楊 瀟

導師 鄭 穎

專業 中藥學

日期 2013 年 12 月



中藥質量研究國家重點實驗室

澳門大學中華醫藥研究院

摘要

野黃芩素納米混懸液製備及其作為野黃芩苷活性前體的體內研究

楊瀟

指導老師：鄭穎 副教授

中華醫藥研究院

黃酮類化合物野黃芩苷（Scutellarin, SG），又名燈盞花乙素，是傳統中藥材燈盞花的主要活性成份，被廣泛的應用於心血管疾病的臨床治療。目前已有多種野黃芩苷類製劑上市，比如燈盞花素注射液，燈盞花素分散片和燈盞花素滴丸等。其中燈盞花素注射液被 2010 版中國藥典收錄，並作為心腦血管科室常規處方用藥，臨床上用於治療腦血栓、腦出血及其後遺症、冠心病、心絞痛、心律失常、高粘血症、頑固性頸周綜合征、椎基底動脈供血不足及其他缺血及伴有微循環障礙等疾病。但是水溶性差和口服生物利用度低等問題成為限制它應用的因素。SG 在水中溶解度僅為 0.16 mg/mL，在 Beagle 犬和大鼠上口服絕對生物利用度分別為 0.40%和 10.67%。

野黃芩素（Scutellarein, S），是 SG 的苷元，其透過細胞單層膜的滲透能力比 SG 好，在體內 SG 需要被水解成為 S 才能在胃腸道被吸收。在吸收過程中和入血後，S 被迅速代謝成其醛酸 SG 和 SG 的同分異構體 SG'的形式在體內循環，而 S 原形在體內含量很低。本研究欲通過水解的方法大量製備 S，並製備 S 納米混懸液，考察 S 納米混懸液的大鼠體內的藥物代謝和動力學行為，以及考察在斑馬魚腦出血模型上的藥效作用。

本研究中首先成功建立了一個從 SG 原藥中大量製備 S 固體的四步法-酸水解，結

晶，沉澱，凍乾。這個方法中，水解時間2小時，產物固体粉末HPLC純度在95%以上，回收率達52.5%（理論回收率61.9%）。在此基礎上，本研究以水解得到的S為模型藥，利用反溶劑沉澱法製備S納米混懸液。通過單因素實驗設計，考察了穩定劑種類、穩定劑用量、有機相比例以及有機相中藥物含量等因素對粒徑、粒徑分佈（多分散係數，PDI）、Zeta電位和穩定性的影響。篩選出合適的凍乾保護劑，應用冷凍乾燥的方法對S納米混懸液進行固化，獲得凍乾粉末，同時研究凍乾保護劑種類對S納米混懸液在不同分散介質中重分散能力的影響。最終製備工藝如下：50mg S溶解於2 mL 甲醇和DMF比例為3:1的混合混合有機相，超聲條件下用注射器注入到體積為20 mL含有0.2% (w/v) F68的水相中，保持超聲2 min。以2% (w/v) D型海藻糖或者5% (w/v) 羥丙基 β 環糊精作為凍乾保護劑，置於 -80°C 冰箱預凍12 h後，在真空冷凍乾燥機中乾燥24 h，獲得S納米凍乾粉末（SP-DT或者SP-HP- β -CD）。SP-DT在室溫保存條件下具有至少兩個月的短期穩定性，重分散後的粒徑為 324.8 ± 6.4 nm，PDI為 0.211 ± 0.013 ，Zeta電位為 -28.7 ± 1.9 mV。透射電鏡和X射線衍射結果表明，重分散後，含有D型海藻糖的S納米混懸液

（SN-DT）中的S納米粒以無定型的形式存在。溶出實驗中，以模擬胃液（pH1.2）和模擬腸液（pH6.8）作為溶出介質，以D型海藻糖作為凍乾保護劑的S納米凍乾粉末（SP-DT）在5 min內釋放87.2%和77.2%，10 min內釋放完全。和SP-DT類似，和以羥丙基 β 環糊精做凍乾保護劑的S納米凍乾粉末（SP-HP- β -CD）在5 min內分別釋放90.7%和88.9%，10 min內釋放完全。相比之下由於晶體粒徑較大（ 9.2 ± 4.1 μ m），原藥在10 min時在模擬胃液和模擬腸液中釋放分別為16.8%和13.9%，以上結果表明納米化之後S溶出速率加快。

體內實驗以雄性SD大鼠為模型動物，建立了S和SG在大鼠血漿中的分析方法，研究了SG，S和S納米混懸液口服給藥之後的藥物動力學特徵。實驗發現口服給藥SG，S或者S納米混懸液（含有凍乾保護劑HP- β -CD）之後，血漿中均無法檢測到S原型的存在，同時發現SG和S在體內均轉化成相同的代謝產物M1和M2。實驗證明M1即為SG原型，和M2互為同分異構體。S的口服生物利用度比SG提高至142%，達峰時間（T_{max}）分別為 4.08 ± 5.41 h和 8.00 ± 2.45 h，並且兩者的藥物動力學特徵接近，血藥濃度-時間曲線中血藥濃度平穩，無明顯藥峰。S經過納米化之後，藥物動力學特徵發生明顯改變，達到藥物濃度峰時

間快，僅為 0.54 ± 0.48 h，藥峰濃度分別比 SG 和 S 組提高至 740% 和 362%，消除半衰期 $t_{1/2}$ 僅為 2.68 ± 0.88 h，顯著低於 SG (12.20 ± 2.98 h) 和 S (7.29 ± 5.75 h) 組 ($p < 0.05$)，並且血藥濃度-時間曲線呈現明顯雙峰。

在斑馬魚腦出血模型上同時考察了 SG 原料藥，S 原料藥以及高載藥量 S 納米混懸液 (High Drug Loading S nanosuspension, SN) 的治療效果。實驗結果發現 SG, S 和 S 納米混懸液降低斑馬魚腦出血率的作用均呈現明顯的劑量依賴性，給藥劑量越大，降低腦出血率的作用越明顯。對照組中斑馬魚的腦出血率為 $89.68 \pm 9.02\%$ 。低給藥劑量組 ($50 \mu\text{M}$) 中 SG, S 和 S 納米混懸液給藥后斑馬魚的腦出血率分別降低至 $69.82 \pm 11.71\%$, $47.81 \pm 12.55\%$ 和 $35.83 \pm 15.07\%$ 。中給藥劑量組 ($100 \mu\text{M}$) 和高給藥劑量組 ($200 \mu\text{M}$) 中，S 納米混懸液給藥后斑馬魚腦出血率分別降至 $10.32 \pm 9.02\%$ 和 $10.37 \pm 10.02\%$ ，顯著低於 S 原料藥的 $33.45 \pm 11.96\%$ 和 $30.56 \pm 12.03\%$ ($p < 0.01$)。結果表明 S 降低斑馬魚腦出血率的作用強於 SG，經過納米化之後 S 作用效果進一步增強。

結論：本研究成功從 SG 中製備出 S 並將 S 納米化。S 納米混懸液可以提高體外溶出度。S 經過納米化之後改變在大鼠體內的藥物動力學特徵，主要體現在消除半衰期縮短，血藥達峰濃度提升和達峰時間提前，同時 S 納米混懸液顯著提高斑馬魚腦出血后救治作用。S 納米混懸液是一種有潛力被開發成針對腦出血后救治效果的口服納米製劑。

關鍵詞：野黃芩素；野黃芩苷；水解；納米混懸液；反溶劑沉澱；溶出度；大鼠；藥物代謝動力學；斑馬魚；腦出血

Abstract

Formulation Development of Scutellarein Nanosuspensions as an In-vivo Active, Rapidly Absorbed Precursor of Its Glycosides Scutellarin

Yang Xiao

Supervisor: Dr. Zheng Ying

Institute of Chinese Medical Sciences

The aims of this study were to synthesize the scutellarin (SG) aglycone scutellarein (S) by an acidic hydrolysis, and to formulate and characterize the S nanosuspension for improved dissolution in vitro and enhanced reduction effect for cerebral hemorrhage on zebrafish in vivo. An optimized successive 4 steps preparation of S powder with high chemical purity (HPLC purity>95%) has been established including hydrolysis, crystallization, concentrate and lyophilization. Hydrolysis reaction took 2 hours and the yield was 52.5% (theoretical value is 61.9% with completely reaction). S nanosuspension containing poloxamer 188 (F68) as stabilizer was prepared by anti-solvent precipitation approach and then dried S nanoparticles with D-trehalose as lyophilizing protectant were prepared with fine re-dispersibility. The average particle size, PdI and Zeta potential of dried S nanoparticles were 324.8 ± 6.4 nm, 0.211 ± 0.013 and 28.7 ± 1.9 mV after re-dispersion. The dissolution rate of the S nanosuspension was superior compared to physical mixture in mimic gastric (pH 1.2) and intestinal (pH 6.8) media.

Following oral administration of SG, S or S nanosuspension to SD rats, they were transformed into the same two major metabolites SG (M1) and its isomer (M2).

Meanwhile, the pharmacokinetic parameters of M1 and M2 indicated that S had an enhance bioavailability than SG, and nanosizing could significantly change the in vivo behavior of S. After oral administration, the pharmacokinetic profiles revealed that S nanosuspension afforded higher peak and short T_{max}. The C_{max} was increased to 740% of SG and 362% of S, respectively, and the T_{max} was only 0.54 ± 0.48 h (8.00 ± 2.45 h of SG, 4.08 ± 5.41 h of S).

The results of zebrafish tests showed that S nanosuspension had a further improvement of therapeutic effect on cerebral hemorrhage than free S which was better than SG. At each treatment dosage (50, 100, and 200 μ M), it supposed that S and SG groups effectively rescued the hemorrhage phenotype, and by 72 hpf approximately $10.32 \pm 9.02\%$ 和 $10.37 \pm 10.02\%$ in 100 μ M and 200 μ M of the embryos showed evident cerebral hemorrhages, compared with $89.68 \pm 9.02\%$ of control embryos receiving atorvastatin and the vehicle

Overall, S nanosuspension were considered to be used as a potential delivery formulation with enhanced dissolution rate and rescue activity on zebrafish cerebral hemorrhage for S.

Key words: Scutellarein; Scutellarin; synthesis; anti-solvent precipitation; nanosuspension; dissolution; rat; pharmacokinetic; zebrafish; cerebral hemorrhage

致謝

感謝澳門大學中華醫藥研究院給了我在這裡學習的機會，兩年半的碩士研究生生活對我是磨礪，更多的是種種收穫。這裡嚴謹優良的科研氛圍，浪漫充實的校園生活，還有五湖四海的朋友們都將是我永遠的珍貴財富。

本課題是在鄭穎副教授的悉心指導下完成的。鄭老師在論文選題、文獻查閱、實驗方案設計、實驗難點分析以及最後的文章撰寫，總結等每一個階段，都給予了我充足的指導。鄭老師精益求精的學術態度，樂觀豁達的生活理念也一直啟發著我，使我在待人處事上獲益匪淺。感謝鄭穎老師一直以來對我的關心，教導和幫助！

感謝李銘源教授在斑馬魚藥理實驗上給予的指導，感謝黎响師兄和艾娜娜同學在斑馬魚實驗上提供的充分幫助。感謝中國醫學科學院藥用植物研究所的常琪老師和曹方瑞同學在大鼠實驗上的大量工作。感謝苗曉慶師姐在樣品製備和表徵上的建議，感謝宋菊同學在平時實驗中的幫助和敦促，感謝周政政博士，李焯師姐，王言才博士、黃麗婷師姐、畢超師姐、陳學文師兄、孫琳師姐、胡德俊師兄、游暢師兄、胡光師兄、陳桐楷師兄、王璐、朱侃、許發祥、李堅、王英、陳晨等朋友們的支持和鼓勵。

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 ICMS 其他老師，能在你們的課堂上學習是我的榮幸。感謝實驗技術員 Leon、Sandy、Kio、Wing、Dorian、Joanna 對我的實驗提供支持。感謝中華醫藥研究院所有關心我的同學。

感謝我的家人，感謝他們多年來對我的理解、支持和付出！

感謝澳門科學技術發展基金（項目號：044/2011/A2）對我和本課題提供的資助！

目录

摘要.....	3
Abstract.....	6
致謝.....	8
縮略詞對照表.....	16
第一章 研究概述.....	17
1.1 野黃芩素和野黃芩苷研究概述.....	17
1.1.1 理化性質.....	17
1.1.2 藥代動力學研究.....	18
1.1.3 劑型研究.....	19
1.1.4 野黃芩素的製備.....	19
1.2 納米混懸液.....	20
1.2.1 納米混懸液的定義和特點.....	21
1.2.2 納米混懸液的製備.....	22
1.2.3 納米混懸液的應用.....	23
1.3 設計思路.....	24
第二章 野黃芩素和野黃芩苷的體外 HPLC 方法.....	26
2.1 儀器和材料.....	26
2.1.1 儀器.....	26
2.1.2 藥品和試劑.....	26
2.2 實驗方法.....	26
2.2.1 測定波長選擇.....	26
2.2.2 流動相優化.....	27
2.2.3 標準曲線的繪製.....	27
2.2.4 精密度和準確度考察.....	27
2.3 結果與討論.....	27
2.3.1 測定波長選擇.....	27
2.3.2 流動相優化.....	28
2.3.3 標準曲線製備.....	29

2.3.4 精密度和準確度的考察.....	29
2.4 本章小結.....	30
第三章 野黃芩素的製備.....	31
3.1 儀器和材料.....	31
3.1.1 儀器.....	31
3.1.2 藥品和試劑.....	31
3.2 實驗方法.....	31
3.2.1 水解製備野黃芩素流程優化.....	31
3.2.2 水解野黃芩苷產物結構驗證和定量分析.....	32
3.3 結果與討論.....	32
3.3.1 產物結構驗證.....	32
3.3.2 水解流程優化.....	35
3.4 本章小結.....	37
第四章 野黃芩素納米混懸液的製備和表徵.....	38
4.1 儀器和材料.....	38
4.1.1 儀器.....	38
4.1.2 藥品和試劑.....	38
4.2 野黃芩素納米混懸液的製備和體外表徵.....	39
4.2.1 野黃芩素納米混懸液的處方優化.....	39
4.2.2 粒徑分佈及 zeta 電位的測定.....	40
4.2.3 野黃芩素納米混懸液的固化.....	40
4.2.4 野黃芩素納米混懸液凍乾粉末重分散性實驗.....	41
4.2.5 野黃芩素納米混懸液的溶出度測定.....	41
4.2.6 透射電鏡觀察野黃芩素納米混懸液.....	42
4.3 結果和討論.....	42
4.3.1 穩定劑種類的考察.....	42
4.3.2 穩定劑濃度考察.....	44
4.3.3 有機相優化.....	45
4.3.4 凍乾保護劑選擇.....	46

4.3.5 野黃芩素凍乾粉末在不同介質中的重分散性.....	47
4.3.6 野黃芩素納米混懸液的形態觀察.....	49
4.3.7 溶出度測定結果.....	50
4.4 本章小結.....	52
第五章 口服野黃芩素納米混懸液大鼠體內藥物代謝動力學評價.....	53
5.1 儀器和材料.....	53
5.1.1 儀器.....	53
5.1.2 藥品和試劑.....	53
5.1.3 實驗動物.....	53
5.1.4 大鼠空白血漿.....	53
5.2 方法.....	54
5.2.1 對照品溶液的配製.....	54
5.2.2 血漿樣品的處理.....	54
5.2.3 色譜分析條件.....	54
5.2.4 标准血浆样品的配制.....	55
5.2.5 藥物動力學實驗.....	55
5.2.6 方法學驗證.....	55
5.2.7 數據處理.....	56
5.3 結果與討論.....	57
5.3.1 方法特異性.....	57
5.3.2 線性範圍、最低檢測限和最低定量限.....	58
5.3.3 精密度、準確度和回收率.....	59
5.3.4 代謝產物分析.....	60
5.3.5 藥物動力學實驗結果.....	61
5.4 本章小結.....	68
第六章 野黃芩素納米混懸液對斑馬魚腦出血后救治作用的研究.....	69
6.1 儀器和材料.....	69
6.1.1 儀器.....	69
6.1.2 藥品和試劑.....	69

6.2 倫理學聲明.....	69
6.3 斑馬魚培養.....	69
6.4 斑馬魚腦出血模型.....	70
6.5 結果和討論.....	71
6.6 本章小結.....	73
第七章 總結與展望.....	74
7.1 主要研究工作和結果.....	74
7.2 本研究的意義.....	75
7.3 展望.....	75
參考文獻.....	77
簡歷.....	81



List of Figures

<u>Fig1.1 Chemical structure of Scutellarin (SG, upper) and Scutellarien (S, lower)</u>	20
<u>Fig 1.2 Biopharmaceutical Classification System (BCS)</u>	21
<u>Fig 2.1 UV Spectrum of S (left) and SG (right) in methonal</u>	28
<u>Fig 2.2 HPLC Chromatogram of SG and S</u>	29
<u>Fig 2.3 Standard curve of SG (left) and S (right)</u>	29
<u>Fig 3.1 HPLC Chromatogram of raw material SG (upper) and Product powder (lower)</u>	29
<u>Fig 3.2 LC-MS analysis of hydrolysis product</u>	33
<u>Fig 3.3 FT-IR analysis of S standard and hydrolysis product</u>	34
<u>Fig 3.4 DSC analysis of hydrolysis product (upper) and S standard (lower)</u>	35
<u>Fig 3.5 Synthesis of S from SG</u>	35
<u>Fig 3.6 Effects of different reaction conditions on product purity</u>	36
<u>Fig 4.1 Effects of stabilizers on particle size and PDI of S nanosuspension</u>	43
<u>Fig 4.2 Effects of stabilizers on zeta potential of S nanosuspension</u>	44
<u>Fig 4.3 Effects of F68 concentration on particle size of S nanosuspension</u>	45
<u>Fig 4.4 Effects of ratio between MeOH and DMF on particle size of S nanosuspension</u>	46
<u>Fig 4.5 TEM photos of S nanosuspension (I: $\times 8000$; II: $\times 20000$)</u>	49
<u>Fig.4.6 Particle size of S coarse suspension</u>	50
<u>Fig 4.7 Dissolution profiles of SP-DT, SP-HP-β-CD and S coarse suspension in mimic gastric (pH 1.2) and intestinal (pH 6.8) media</u>	51
<u>Fig 5.1 UPLC of standard, plasma blank and plasma standard</u>	58
<u>Fig 5.3 The UPLC Chromatograms of SG (S or S nanosuspension) in the Rat Plasma (upper) and the standard (lower)</u>	60
<u>Fig 5.7 Plasma concentration profiles of M1 and M2 after oral administration of SG, S or S nanosuspension (n=6)</u>	66
<u>Fig 6.1 Establishment of zebrafish cerebral hemorrhage rescue model</u>	71

Fig 6.2 Rescue effect of Aspirin, SG, S and S nanosuspension on cerebral hemorrhage zebrafish.....72



List of Tables

<u>Table 1.1 The apparent partition coefficient of SG (upper) and S (lower)</u>	<u>18</u>
<u>Table 2.1 HPLC conditions used for analysis of SG and S</u>	<u>28</u>
<u>Table 4.1 Concentration of Different Kinds of lyophilizing protectant</u>	<u>41</u>
<u>Table 4.2 Shape, Particle Size and PdI of Lyophilized S nanosuspension Using Different Kinds of lyophilizing protectant after Redispersion into MilliQ</u>	<u>47</u>
<u>Table 4.3 Sediment appearance of S nanosuspension in different redispersion media at room temperature</u>	<u>48</u>
<u>Table 5.1 UPLC conditions used for analysis of metabolites</u>	<u>55</u>
<u>Table 5.2 Intra-day and Inter-day precision and accuracy, and extraction recovery of the method for determination of SG and S in rat plasma (n = 5)</u>	<u>60</u>
<u>Table 5.3 M1 and M2 concentration after oral delivery of SG, S and SN-HP-β-CD</u>	<u>62</u>
<u>Table 5.4 M1 and M2 pharmacokinetic parameters of SG after oral delivery</u>	<u>63</u>
<u>Table 5.5 M1 and M2 pharmacokinetic parameters of S after oral delivery</u>	<u>64</u>
<u>Table 5.6 M1 and M2 pharmacokinetic parameters of SN-HP-β-CD after oral delivery</u>	<u>65</u>
<u>Table 5.7 M1 pharmacokinetic parameters of SG, S and S nanosuspension after oral administration in SD rats (means $\pm$ S.D., n = 6)</u>	<u>67</u>
<u>Table 5.8 M2 pharmacokinetic parameters of SG, S and S nanosuspension after oral administration in SD rats (means $\pm$ S.D., n = 6)</u>	<u>67</u>

縮略詞對照表

縮寫	英文全稱	中文全稱
S	Scutellarein	野黃芩素
SG	Scutellarin	野黃芩苷
PdI	Polydispersion Index	多分散係數
PVP	Polyvinyl pyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
PVA	Polyvinyl alcohol	聚乙烯醇
F68	Poloxamer 188	泊洛沙姆 188
F127	Poloxamer 407	泊洛沙姆 407
HPMC	Hydroxypropyl methylcellulose	羥丙基甲基纖維素
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸鈉
Tween80	Polysorbate 80	吐溫 80
DSC	Different scanning calorimetry	差示掃描量熱法
TEM	Transmission electron microscope	透視電鏡
PXRD	X-Ray Diffraction	X 射線衍射
HPLC	High performance liquid chromatograph	高效液相色譜