

# 去甲斑蝥素纳米胶束的制备及抑瘤作用研究<sup>△</sup>

王琳<sup>1,2\*</sup>, 陆丹玉<sup>1</sup>, 方晨<sup>3</sup>(1.苏州卫生职业技术学院药学院, 江苏苏州 215009; 2.苏州大学医学部药学院, 江苏苏州 215213; 3.香港浸会大学中医药学院, 中国香港)

中图分类号 R943; R361<sup>+.3</sup> 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2680-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.25

**摘要** 目的:制备去甲斑蝥素纳米胶束,并研究其抑瘤作用。方法:采用三嵌段共聚物二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-马来酰亚胺在水中自组装形成去甲斑蝥素纳米胶束。观察所制纳米胶束形态,考察其载药率、包封率、粒径和Zeta电位。通过MTT法考察阴性对照组(磷酸盐缓冲液)、载体组(空白纳米胶束)、阳性对照组(去甲斑蝥素原料药,5~320 μg/mL)和去甲斑蝥素纳米胶束组(以去甲斑蝥素计,5~320 μg/mL)人肺癌A549细胞在作用不同时间(24、48、72 h)后的细胞生存率。将荷瘤裸鼠随机分为空白对照组、去甲斑蝥素注射液组(1 mg/kg)和去甲斑蝥素纳米胶束低、高剂量组(0.5、1 mg/kg),每组6只,每天尾iv相应药物1次,连续8周;每周测量肿瘤的大小,给药结束后第2天检测瘤质量。结果:去甲斑蝥素纳米胶束呈圆球状,载药率为(2.82±0.05)%,包封率为(83.67±1.78)%,粒径为(138.6±45.8) nm, Zeta电位为-(12.75±0.34) mV(n=6);载体组A549细胞生存率无明显变化,阳性对照组和去甲斑蝥素纳米胶束组A549细胞生存率明显降低,与浓度和时间呈正相关,且去甲斑蝥素纳米胶束组细胞生存率降低程度较阳性对照组更明显(P<0.01)。与空白对照组比较,3个给药组裸鼠的瘤质量均减小(P<0.05),其中去甲斑蝥素纳米胶束高剂量组减小程度较去甲斑蝥素注射液组更明显(P<0.05)。结论:成功制得去甲斑蝥素纳米胶束,其对A549细胞具有较好的体内外抑瘤作用。

**关键词** 二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-马来酰亚胺;去甲斑蝥素;纳米胶束;抑瘤作用

## Preparation of Norcantharidin Nano-micelle and Study on Its Antitumor Effect

WANG Lin<sup>1,2</sup>, LU Danyu<sup>1</sup>, FANG Chen<sup>3</sup>(1.School of Pharmacy, Suzhou Vocational Health College, Jiangsu Suzhou 215009, China; 2.School of Pharmacy, Medical College of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215213, China; 3.School of Chinese Medicine, HongKong Baptist University, HongKong, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare the norcantharidin (NCTD) nano-micelle and study its antitumor effect. METHODS: NCTD nano-micelle was self-formed in water using Triblock copolymers distearyl phosphatidylethanolamine-polyethylene glycol-maleimide; its shape was observed, the drug-loading rate, entrapment efficiency, particle size, Zeta potential were investigated. MTT was used to investigate the cell survival rate of human lung cancer A549 cells in negative control group (Phosphate buffer solution), carrier group (blank nano-micelle), positive control group (NCTD APIs, 5-320 μg/mL) and NCTD nano-micelle group (NCTD, 5-320 μg/mL) after acting different time (24, 48, 72 h). Tumor nude mice were randomly divided into blank control group, NCTD injection group (1 mg/kg), NCTD low-dose, high-dose groups (0.5, 1 mg/kg), 6 in each group. All mice were intravenously injected relevant medicines in tail, once a day, for 8 weeks. Tumor size was measured every week, and tumor quality was detected after the second day of finishing administration. RESULTS: NCTD nano-micelle was round, drug-loading rate was (2.82±0.05)%, entrapment efficiency was (83.67±1.78)%, particle size was (138.6±45.8) nm, Zeta potential was -(12.75±0.34) mV (n=6). Cell survival rate of A549 cells in carrier group had no obvious changes, and was obviously decreased in positive control group and NCTD nano-micelle group, which was positively correlated with concentration and time. And the decrease degree of cell survival rate in NCTD nano-micelle group was stronger than positive control group (P<0.01). Compared with blank control group, the tumor quality of mice in 3 administration groups was reduced (P<0.05), the reduction degree in NCTD nano-micelle high-dose group was stronger than NCTD nano-micelle injection group (P<0.05). CONCLUSIONS: NCTD nano-micelle is successfully prepared, which has good *in vitro* and *in vivo* anti-tumor effect on A549 cells.

**KEYWORDS** Distearyl phosphatidylethanolamine-polyethylene glycol-maleimide; Norcantharidin; Nano-micelle; Antitumor effect

去甲斑蝥素(Norcantharidin)是将斑蝥属昆虫南方大斑蝥和黄黑小斑蝥的虫体所含的抗癌有效成分斑蝥素(Cantharidin)1,2位去甲基而得的,是我国首先研制开发的具有一定潜力的抗肿瘤药物<sup>[1-2]</sup>。但由于其毒性

很大,在人工胃液及人工肠液中以去甲斑蝥酸的形式存在<sup>[3-4]</sup>,水溶性增加,导致其口服生物利用度低,影响了其对肿瘤细胞的抑制和杀伤作用,限制了其临床应用。本研究拟采用三嵌段共聚物二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-马来酰亚胺(DSPE-PEG-MAL)制备在水中自组装形成PEG在外、其他成分及药物在内的去甲斑蝥素纳米胶束,并研究其抑瘤作用。

<sup>△</sup> 基金项目:江苏省卫生厅科技项目(No.JZ201402)

\* 副教授,博士研究生。研究方向:药物新制剂。电话:0512-62693011。E-mail:wanglinlinda@126.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

Acquity 超高效液相色谱仪(UPLC),包括PDA Detector 光电二极管阵列检测器(美国 Waters 公司);激光散射粒径测定仪(美国 Beckman Coulter 有限公司);5417R 冷冻台式离心机(德国 Eppendorf 公司);倒置显微镜(德国 Leica 公司);IVIS Lumina XR 活体动物体内成像系统(美国 Caliper 生命科学公司);HT7700 透射电镜(日本 Hitachi 公司);连续光谱酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 药品与试剂

去甲斑蝥素原料药(南京泽朗医药科技有限公司,批号:20141206,纯度: $>98\%$ );去甲斑蝥素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100414-201501,纯度:100%);DSPE-PEG2000-MAL(美国 Avanti 公司,批号:228234);大豆卵磷脂(美国 Avanti Polar Lipids 公司,批号:186969);胆固醇(美国 Sigma 公司,批号:C8667-25G,纯度:94%);交联葡聚糖 G50(美国 Pharmacia 公司进口分装,上海化学试剂厂,粒径:100~300  $\mu\text{m}$ );胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);MTT(德国 Merck 公司,批号:475989);正辛醇、甲醇、无水乙醇等均为分析纯,乙腈为色谱纯。

### 1.3 细胞与动物

人肺癌细胞株 A549 和 A549 荧光酶素细胞株 A549-luc 均购自上海睿星生物技术有限公司。BALA/C 裸鼠 36 只,SPF 级, $\delta$ ,4~6 周龄,体质量在 19 g 左右,购自香港中文大学实验动物中心,动物编号为 2015-0241。

## 2 方法

### 2.1 去甲斑蝥素纳米胶束的制备

将一定比例的去甲斑蝥素和 DSPE-PEG2000-MAL,用一定量的乙醇超声溶解后,以 1 滴/10 s 的速度逐滴加入至磁力搅拌的蒸馏水中,挥发 30 min,倒入透析袋中,封口,在 1 000 mL 的蒸馏水中透析 24 h,每 4 h 换 1 次水。最后将制得的聚合物纳米胶束溶液 4 000 r/min(离心半径 13.5 cm,下同)离心 30 min,取上清,即得去甲斑蝥素纳米胶束。其中,离心的目的是为了除去沉降在离心管底部的未加载的聚合物。同法制得不加去甲斑蝥素的空白纳米胶束。

### 2.2 去甲斑蝥素的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:BEH Shield RP-18(50 mm $\times$ 2.1 mm,1.7  $\mu\text{m}$ );流动相:0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液(用磷酸调节 pH 至 3.0)-甲醇(75:35);检测波长:213 nm;流速:0.6 mL/min;柱温:35  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:5  $\mu\text{L}$ 。

2.2.2 方法学考察 精密称取去甲斑蝥素对照品适量,加磷酸盐缓冲液(PBS)溶解制成一定浓度的对照品溶液,取对照品溶液和阴性对照溶液(PBS)进样分析。另取经交联葡聚糖 G50 分离后的去甲斑蝥素纳米胶束溶

液和空白纳米胶束溶液,加消解液超声消解,定容,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液进样分析,记录色谱。另按方法学相关要求操作,考察去甲斑蝥素的回归方程、线性范围、回收率、稳定性、精密密度。

### 2.3 纳米胶束的质量评价

2.3.1 载药量与包封率 取去甲斑蝥素纳米胶束溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定其中去甲斑蝥素的含量,根据 2015 年版《中国药典》(四部)中的相关规定<sup>[5]</sup>,计算载药量和包封率。载药量(%)=纳米胶束中去甲斑蝥素质量/纳米胶束的质量 $\times 100\%$ ;包封率(%)=纳米胶束中去甲斑蝥素质量/去甲斑蝥素的投药量 $\times 100\%$ 。

2.3.2 粒径、Zeta 电位与形态 取 100  $\mu\text{L}$  的去甲斑蝥素纳米胶束溶液,用 PBS 稀释至 2 mL,混匀,采用激光散射粒径测定仪分析其粒径和 Zeta 电位。采用磷酸钠溶液对纳米胶束进行染色,透射电镜下观察其形态。

2.3.3 体外释放度 取 1 份去甲斑蝥素原料药和 3 份相同质量的去甲斑蝥素纳米胶束,分别用蒸馏水定容至 5 mL,置于透析袋中密封。将原料药溶液置于装有 10 mL 含 1% 十二烷基硫酸钠(SDS)的 PBS(pH 为 7.4)的离心管中,将胶束溶液分别置于装有 10 mL PBS(pH 分别为 6.5、7.0、7.4)的离心管中,( $37 \pm 0.5$ )  $^{\circ}\text{C}$  下以 100 r/min 恒温振荡。分别于 0、0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48、60、72 h 取样,每次将 10 mL 释放液全部倒出,同时补充 10 mL 新鲜释放介质。释放液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定去甲斑蝥素含量,计算累积释放度(Q),以取样时间(t)为横坐标、Q 为纵坐标绘制标准曲线。

### 2.4 体外抗肿瘤活性实验

2.4.1 细胞培养 采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 A549 细胞,待细胞生长达 90% 融合状态时以 0.25% 胰蛋白酶消化,根据试验需要接种于 96 孔板上。

2.4.2 细胞生存率测定 将 A549 细胞复苏传代,待生长状态良好时,用胰酶消化,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液调整细胞密度为  $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ ,以每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后开始加药。试验分为 4 组,分别为(1)阴性对照组:只加 PBS,不加药物;(2)载体组:加空白纳米胶束溶液;(3)阳性对照组:加质量浓度分别为 5、10、20、40、80、160、320  $\mu\text{g/mL}$  的去甲斑蝥素原料药溶液(原料药先溶解在二甲基亚砜中,再用 PBS 稀释至所需质量浓度);(4)去甲斑蝥素纳米胶束组:加去甲斑蝥素质量浓度分别为 5、10、20、40、80、160、320  $\mu\text{g/mL}$  的去甲斑蝥素纳米胶束溶液(纳米胶束用 PBS 稀释至所需质量浓度),每个质量浓度设 3 个复孔。加药后继续培养 24、48、72 h,每孔再加入 5 mg/mL 的 MTT 20  $\mu\text{L}$ ,培养 4 h,取出,弃上清,加入二甲基亚砜 150  $\mu\text{L}$ ,振荡 15 min 均匀溶解,在

570 nm 波长处测定 OD 值, 计算细胞生存率。细胞生存率(%) = 加药组 OD 值/阴性对照组 OD 值 × 100%。分别对影响细胞生存率的药物质量浓度作析因分析和单向方差分析, 对药物作用时间作重复测量的方差分析。

## 2.5 体内抗肿瘤活性实验

**2.5.1 荷瘤裸鼠模型建立** 将 A549-luc 细胞复苏, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。待细胞生长至 80% 瓶底面积时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 收集细胞于离心管内, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 冲洗 3 次, 用不含血清的 DMEM 培养液重悬细胞后调整细胞密度为 5 × 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>。将细胞悬液用注射器接种于裸鼠腋下, 每只 0.2 mL。每次注射前将细胞摇匀, 以保证肿瘤成瘤比较均匀; 接种完成后用手指轻压注射点, 防止细胞外渗。所有细胞保证在 2 h 内接种完毕, 所有操作均在无菌操作台内进行。7 d 后, 所有裸鼠均成为荷瘤裸鼠。

**2.5.2 体内抑瘤实验** 将荷瘤裸鼠随机分成空白对照组(生理盐水)、去甲斑蝥素注射液组(1 mg/kg)和去甲斑蝥素纳米胶束低、高剂量组(0.5、1 mg/kg), 每组 6 只。给药剂量是根据笔者前期的急性毒性实验结果(裸鼠对于去甲斑蝥素的最大耐受量为 1 mg/kg)设置的。接种成功后的第 2 天开始每天尾 iv 相应药物 1 次, 连续 8 周。从给药的第 1 天起, 每天观察裸鼠的饮食、精神状态, 测量肿瘤长径(*a*)和短径(*b*), 按公式  $V = ab^2/2$  估算肿瘤的近似体积(*V*, cm<sup>3</sup>), 绘制肿瘤生长曲线。给药结束后的第 2 天, 将荷瘤裸鼠处死, 剥瘤, 称质量, 计算抑瘤率, 抑瘤率(%) = (对照组瘤质量 - 给药组瘤质量) / 对照组瘤质量 × 100%。采用 SPSS 19.0 软件对数据结果进行单因素方差分析。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 去甲斑蝥素的含量测定方法学考察结果

系统适用性结果显示, 去甲斑蝥素的保留时间在 6.2 min 左右, 阴性对照溶液及空白纳米胶束溶液对其测定均无干扰。去甲斑蝥素峰面积(*y*)对质量浓度(*x*)的回归方程为  $y = 61.534x + 169.99$  ( $r^2 = 0.9999$ ,  $n = 6$ ), 线性范围为 25.41 ~ 813.12 μg/mL; 加样回收率为 (99.58 ± 1.95)% ( $n = 6$ ); 10 h 内稳定性试验中含量的 RSD 为 1.11% ( $n = 6$ ); 去甲斑蝥素低、中、高浓度的精密度试验中峰面积的 RSD 分别为 2.07%、1.31%、0.83% ( $n = 6$ ), 色谱图见图 1。

### 3.2 纳米胶束质量评价

去甲斑蝥素纳米胶束呈圆球状、边缘整齐、表面光滑, 载药量为 (2.82 ± 0.05)%, 包封率为 (83.67 ± 1.78)%, 粒径为 (138.6 ± 45.8) nm, Zeta 电位为 -(12.75 ± 0.34) mV ( $n = 6$ ), 透射电镜图见图 2。

### 3.3 体外释放度

去甲斑蝥素原料药具有突释效应, 在 2 h 内 *Q* 已达

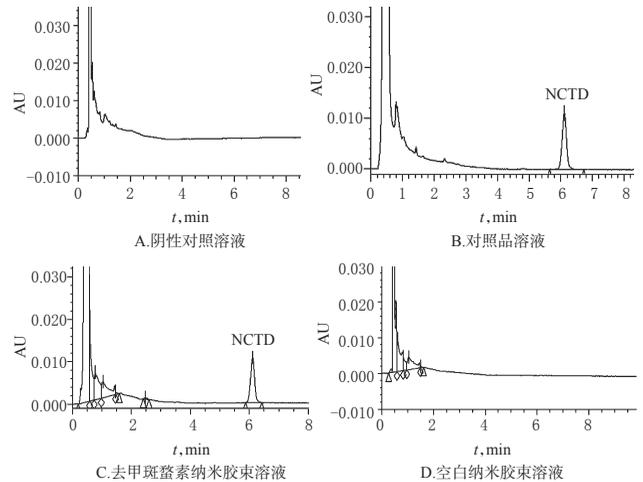


图 1 超高效液相色谱图

Fig 1 UPLC chromatograms

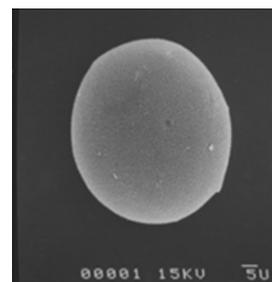


图 2 去甲斑蝥素纳米胶束的透射电镜图(×12 000)

Fig 2 Transmission electron microscopy figure of NCTD nano-micelle(×12 000)

80%, 6 h 内 *Q* 已达 95%; 去甲斑蝥素纳米胶束在不同 pH 释放介质中均随着时间延长缓慢持续释放, 释放曲线呈抛物线形。pH 为 6.5、7.0 时去甲斑蝥素纳米胶束呈现出比 pH 为 7.4 时更快的释放速度。72 h 时, 去甲斑蝥素纳米胶束在 pH 6.5、7.0、7.4 释放介质中的 *Q* 分别为 (83.5 ± 3.5)%、(80.0 ± 1.6)%、(72.0 ± 1.5)% ( $n = 6$ )。累积释放曲线见图 3。

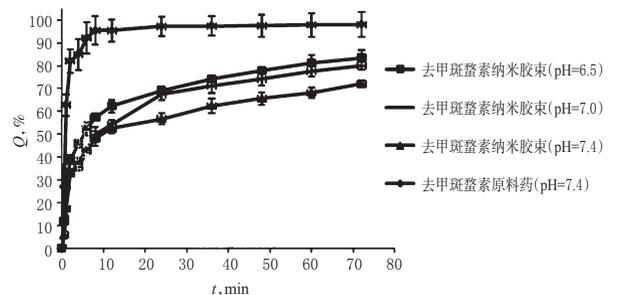


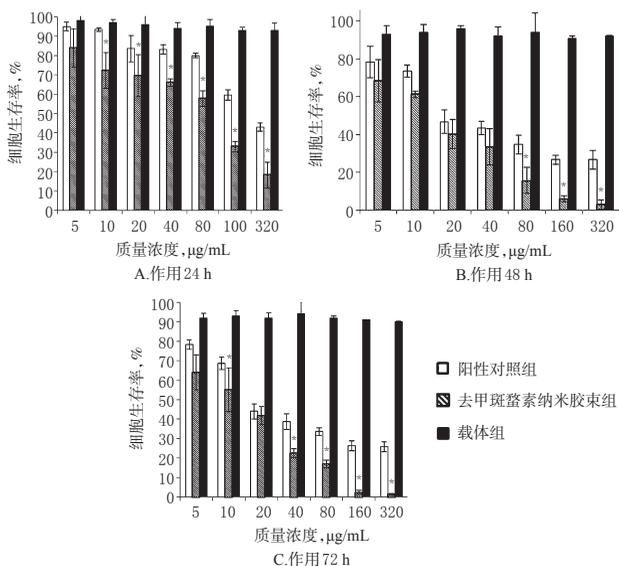
图 3 累积释放曲线

Fig 3 Cumulative release curves

### 3.4 体外抗肿瘤活性

结果显示, 载体组 A549 细胞生存率无明显变化, 阳性对照组和去甲斑蝥素纳米胶束组 A549 细胞生存率明显降低, 且与药物浓度和作用时间呈正相关。其中, 去甲斑蝥素纳米胶束组细胞生存率降低程度强于阳性对

对照组( $P<0.01$ )。各组 A549 细胞的细胞生存率测定结果见图 4。



注:与阳性对照组比较,  $*P<0.01$

Note: vs. positive control group,  $*P<0.01$

图 4 各组 A549 细胞在不同作用时间后细胞生存率的测定结果 ( $n=3$ )

Fig 4 Determination results of the survival rates of A549 cells after acting for different time in each group ( $n=3$ )

### 3.5 体内抗肿瘤活性

实验期间裸鼠一般情况良好,未见死亡。处死后解剖各器官均未见瘤转移。各组荷瘤裸鼠移植瘤生长曲线见图 5,切除后各组裸鼠的肿瘤形状见图 6。

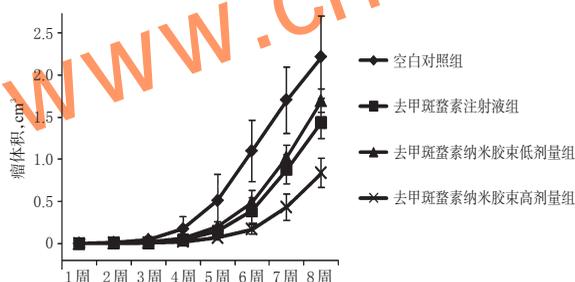


图 5 各组荷瘤裸鼠移植瘤生长曲线

Fig 5 Growth curves of transplanted tumor of tumor nude mice in each group

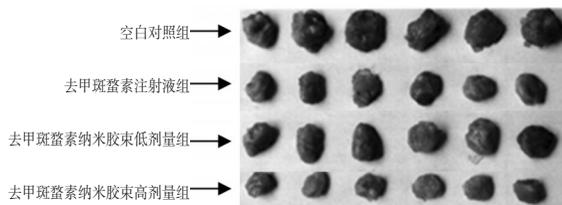


图 6 各组荷瘤裸鼠移植瘤的图片

Fig 6 Pictures of transplanted tumor of tumor nude mice in each group

由图 5 所示,在给药的前 3 周,空白对照组和所有给药组裸鼠的肿瘤大小没有显著变化。从给药第 3 周开始到第 8 周,空白对照组荷瘤裸鼠的瘤体积呈持续快速增长的趋势;到第 8 周,空白对照组荷瘤裸鼠的呼吸非常困难。与空白对照组比较,去甲斑蝥素注射液组和去甲斑蝥素纳米胶束低、高剂量组荷瘤裸鼠的瘤体积均减小 ( $P<0.05$ ),其中去甲斑蝥素纳米胶束高剂量组抑瘤率明显高于去甲斑蝥素注射液组 ( $P<0.05$ )。各组荷瘤裸鼠的体质量、瘤质量和抑瘤率的测定结果见表 1。

表 1 各组荷瘤裸鼠的体质量、瘤质量和抑瘤率的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Determination results of body mass, tumor quality, tumor inhibition rate of tumor nude mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	给药前体质量,g	处死时体质量,g	瘤质量,g	抑瘤率,%
空白对照组	18.3±0.8	30.2±1.4	1.15±0.14	
去甲斑蝥素注射液组	18.6±1.0	28.9±2.1	0.52±0.12*	54.78
去甲斑蝥素纳米胶束低剂量组	19.1±0.6	28.1±1.6	0.63±0.14*	45.22
去甲斑蝥素纳米胶束高剂量组	19.2±0.4	26.6±1.5	0.41±0.21**	64.35*

注:与空白对照组比较,  $*P<0.05$ ;与去甲斑蝥素注射液组比较,  $**P<0.05$

Note: vs. blank control group,  $*P<0.05$ ; vs. NCTD injection group,  $**P<0.05$

### 4 讨论

去甲斑蝥素的传统剂型为片剂,尽管片剂在制备工艺上容易操作、成本低,但是不能解决去甲斑蝥素生物利用度低、毒性强的缺点。国内研究学者为了解决去甲斑蝥素存在的不足,将其制成了壳聚糖纳米粒、脂质体等新剂型,但是目前国内将去甲斑蝥素制成聚合物胶束的研究并不多。将去甲斑蝥素制成纳米胶束不仅可以具备纳米制剂的靶向性,同时还能增加药物的溶解性。载体材料 DSPE-PEG-MAL 的应用也是一个创新,其无毒性、无免疫原性、无抗原性以及可降解性和生物相容性的优点使其在生物医学材料界备受青睐<sup>[6-8]</sup>。

本课题初步完成了去甲斑蝥素纳米胶束的制备、质量评价、体外抗肿瘤及体内抗肿瘤研究,表明其具有较好的体内外抑瘤作用。但是由于研究水平、实验条件及实验时间的限制,许多工作仍需要进一步完善。今后还将开展其药动学研究,考察去甲斑蝥素纳米胶束在动物体内的组织分布,进一步验证其对肿瘤组织的靶向性。

### 参考文献

[1] 胡展红,石琦,张学农.去甲斑蝥素脂质体的制备工艺优化及其药剂学性质研究[J].中国药房,2009,20(4):279-282.

[2] 吴超,郭伟英,张磊.甘草次酸衍生物修饰去甲斑蝥素脂质体的制备及其小鼠肝靶向性实验研究[J].中国药房,2009,20(28):2184-2186.

[3] Xie J, Zhang Y, Hu X, et al. Norcantharidin inhibits Wnt signal pathway via promoter demethylation of WIF-1 in

# 正交试验优化益骨颗粒的提取工艺<sup>Δ</sup>

彭红英\*, 江涛#, 杨滨滨, 陈雪华, 陈晓坚, 刘敏珊(广州白云山敬修堂药业股份有限公司研究所, 广州510130)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)19-2684-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.19.26

**摘要** 目的:优化益骨颗粒的提取工艺。方法:采用L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验,以淫羊藿苷、龙胆苦苷、马钱苷酸转移率和出膏率的综合评分为评价指标,以乙醇体积分数、溶剂用量、提取次数、提取时间为考察因素,优化益骨颗粒的提取工艺并进行工艺验证。结果:优化的提取工艺为药材加10倍量60%乙醇回流提取2次,每次1h。验证试验结果表明,淫羊藿苷、龙胆苦苷、马钱苷酸的平均转移率分别为81.28%、48.71%、59.82%(RSD分别为1.54%、2.37%、2.52%,n=3),平均出膏率为31.48%(RSD=1.97%,n=3)。结论:优化的益骨颗粒提取工艺稳定可行、重复性好,可为后续的生产工艺研究提供依据。

**关键词** 益骨颗粒;正交试验;提取工艺;淫羊藿苷;龙胆苦苷;马钱苷酸

## Optimization of Extraction Technology of Yigu Granule by Orthogonal Test

PENG Hongying, JIANG Tao, YANG Binbin, CHEN Xuehua, CHEN Xiaojian, LIU Minshan (Institute of Guangzhou Baiyunshan Jingxiutang Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510130, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of Yigu granule. METHODS: L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal test was used, using comprehensive scores of transfer rate of icariin, gentiopicroside, loganic acid and yield rate as evaluation indexes, alcohol volume fraction, the amount of solvent, extraction times and extraction time as investigation factors, extraction technology of Yigu granule was optimized, and the verification test was conducted. RESULTS: The optimized extraction technology was 10-fold 60% ethanol reflux extraction for twice, 1 h once. Results of verification test showed, average transfer rates of icariin, gentiopicroside and loganic acid were 81.28% (RSD=1.54%, n=3), 48.71% (RSD=2.37%, n=3) and 59.82% (RSD=2.52%, n=3); average yield rate was 31.48% (RSD=1.97%, n=3). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology for Yigu granule is stable and feasible with good reproducibility, which can provide basis for the follow-up study of production process.

**KEYWORDS** Yigu granule; Orthogonal test; Extraction technology; Icariin; Gentiopicroside; Loganic acid

益骨颗粒处方源于暨南大学附属第一医院治疗骨质疏松症的院内制剂益骨胶囊,全方由淫羊藿、秦艽、杜仲等药材组成,具有补骨生髓、活血止痛的功效,临床上用于肝肾不足、瘀血阻络所致骨质疏松症,症见腰膝酸软、疼痛。益骨胶囊作为医院制剂在临床用于防治骨质疏松症已近20年,对210例绝经后骨质疏松症患者进行

的为期6个月的前瞻性、随机双盲、安慰剂对照和阳性药对照的临床研究显示,益骨胶囊治疗组总有效率为95.5%,未见可能相关的毒副反应发生<sup>[1-2]</sup>。由于原制剂益骨胶囊采用传统的药材水提工艺,导致临床服用量大、制剂易吸潮、产品质量稳定性差,制约了该产品进一步的临床推广和应用。鉴于此,需对原制剂的提取工艺

human non-small cell lung cancer[J]. *Med Oncol*, 2015, 32(5):1-7.

[4] Wu H, Fan F, Liu Z, et al. Norcantharidin combined with EGFR-TKIs overcomes HGF-induced resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer cells via inhibition of Met/PI3k/Akt pathway[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 76(2):307-315.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年

<sup>Δ</sup> 基金项目:广州市科技计划项目(No.2012J4300070)

\* 高级工程师。研究方向:中药学。电话:020-81157716。E-mail:penghy@21cn.com

# 通信作者:高级工程师,硕士。研究方向:中药工艺及质量标准研究。电话:020-81157722。E-mail:jiangtao1609@163.com

版.北京:中国医药科技出版社,2015:371.

[6] 王咏,陈军,林爱华,等. NGR多肽修饰的脂质体及其抗肿瘤研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(13):2041-2045.

[7] 尹愈佳,王小双,唐洁,等. 八聚精氨酸修饰的载紫杉醇脂质体的制备工艺研究[J]. *华西药学杂志*, 2012, 27(6):630-633.

[8] 黄发珍,姜晓淳,胡青,等. 配体多肽GE11修饰的阿霉素靶向脂质体的制备及表征[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(17):2086-2089.

(收稿日期:2016-10-27 修回日期:2016-12-17)

(编辑:邹丽娟)