

木犀草素磷脂复合物介孔二氧化硅纳米粒的制备、表征和药动学研究

房伟¹, 王彦阁², 王奎鹏¹, 决利利^{2*}

1. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000

2. 郑州工业应用技术学院, 河南 郑州 451100

摘要: **目的** 制备木犀草素磷脂复合物介孔二氧化硅纳米粒 (Lut-PC-MSNs), 并进行药动学评价。**方法** 采用溶剂挥发法制备 Lut-PC-MSNs。以包封率、载药量、粒径和 Zeta 电位为指标, 选择 MSNs 粉末与 Lut-PC 用量比、木犀草素质量浓度和搅拌时间为主要影响因素, Box-Behnken 设计-效应面法筛选 Lut-PC-MSNs 最优处方。进行 Lut-PC-MSNs 样品表征, 考察 Lut-PC-MSNs 在模拟胃肠液中的释药行为。SD 大鼠 ig 给予 Lut-PC-MSNs (以木犀草素计 40 mg/kg), 测定血药浓度, 计算主要药动学参数和相对生物利用度。**结果** Lut-PC-MSNs 最佳处方工艺为: MSNs 粉末与 Lut-PC 用量比为 1.45 : 1.0, 木犀草素质量浓度为 1.1 mg/mL, 搅拌时间为 8.25 h。Lut-PC-MSNs 粉末分散于纯化水后即可形成外观均一的混悬液。木犀草素在 Lut-PC-MSNs 以无定形态存在。Lut-PC-MSNs 在模拟胃肠液中累积释放度明显增加, 释药行为符合 Weibull 模型。Lut-PC-MSNs 药动学行为发生很大变化, 口服吸收生物利用度提高至 5.24 倍。**结论** Lut-PC-MSNs 处方简单, 贮存稳定性好, 显著增加了木犀草素口服吸收生物利用度。

关键词: 木犀草素磷脂复合物介孔二氧化硅纳米粒; 木犀草素; 包封率; 载药量; 药动学; 生物利用度

中图分类号: R943; R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2025)02 - 0330 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.02.009

Luteolin phospholipids complex mesoporous silica nanoparticles: Preparation, characterization and pharmacokinetics study

FANG Wei¹, WANG Yange², WANG Kuipeng¹, JUE Lili²

1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

2. Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451100, China

Abstract: Objective To prepare luteolin phospholipids complex mesoporous silica nanoparticles (Lut-PC-MSNs), and evaluate bioavailability. **Methods** Solvent evaporation method was employed to prepare Lut-PC-MSNs. Entrapment efficiency, drug loading, particle size, and Zeta potential were selected as indexes, MSNs powder to Lut-PC dosage ratio, luteolin concentration, and stirring time were selected as main influencing factors, and Box-Behnken design-response surface methodology was used to screen the optimal prescription of Lut-PC-MSNs. Lut-PC-MSNs samples were characterized, and release behavior in simulate gastrointestinal fluid were also investigated. SD rats were ig administered with Lut-PC-MSNs (calculated by luteolin, 40 mg/kg), its main pharmacokinetic parameters and relative bioavailability were calculated. **Results** Optimal formulation of Lut-PC-MSNs: dosage ratio of MSNs powder to Lut-PC was 1.45 : 1.0, luteolin concentration was 1.1 mg/mL, and stirring time was 8.25 h. Lut-PC-MSNs powder could be dispersed in purified water to form a homogeneous suspension with a uniform appearance. Luteolin existed as an amorphous state in Lut-PC-MSNs powder, cumulative release rate in simulate gastrointestinal fluid was obviously increased, and drug release behavior accorded with Weibull model. The pharmacokinetic behavior of Lut-PC-MSNs underwent significant changes, and oral bioavailability was increased to 5.24-fold. **Conclusion** Prescription of Lut-PC-MSNs is simple with its good storage stability, and can significantly increase the bioavailability of luteolin.

Key words: luteolin phospholipids complex mesoporous silica nanoparticles; luteolin; entrapment efficiency; drug loading; pharmacokinetics; bioavailability

收稿日期: 2024-09-04

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (23B310010)

作者简介: 房伟 (1980—), 副主任药师, 硕士, 研究方向为医院药学。E-mail: fw96906@126.com

*通信作者: 决利利 (1984—), 女, 副教授, 硕士, 主要从事药动学、解剖学研究。E-mail: 147374991@qq.com

木犀草素属于多羟基黄酮类化合物,广泛存在于伞形科、天南星科、十字花科植物中^[1]。药理学研究结果显示木犀草素具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌消炎、调血糖、心脑血管保护、抗过敏等活性^[1-3],且不良反应小^[4]。本课题组测得木犀草素在水中溶解度仅为 $(78.64 \pm 0.26) \mu\text{g/mL}$,导致药物溶出困难,油水分配系数仅 (0.73 ± 0.06) ,属于生物药剂学分类系统(BCS)IV类药物,与文献报道基本一致^[5]。木犀草素在体内易受 pH 值、胃蛋白酶、胰蛋白酶等影响^[6],导致降解严重,首关效应明显,大鼠 ig 给予不同剂量木犀草素后口服生物利用度仅 $3.87\% \sim 5.57\%$,严重影响了药效^[7]。木犀草素纳米制剂目前报道的有纳米乳^[8]、固体脂质纳米粒^[9]、纳米结构脂质载体^[10]、固体分散体^[11],但纳米制剂存在稳定性差、大量使用表面活性剂、制备工艺繁琐等缺陷;固体分散体贮存时易吸潮,在体内药物易发生析晶现象,影响了促吸收作用。

磷脂复合物(PC)对药物水溶性和脂溶性均有明显的改善作用^[12],适用于 BCS IV 类药物的生物利用度提高。但磷脂复合物存在黏性大、溶出度低等缺陷,极大影响了成药性评价。介孔二氧化硅纳米粒(MSNs)孔径一般在 $10 \sim 50 \text{ nm}$,具有稳定性高、制备工艺简单、辅料种类少等优势^[13-14],无需冻干保护剂即可制成粉末,可极大提高药物溶解度和溶出度,促进口服吸收,并增强药效,在新型纳米制剂研究中颇受关注。介孔二氧化硅纳米粒可有效解决磷脂复合物自身的各种缺陷,目前磷脂复合物和介孔二氧化硅纳米粒联合使用的报道较少^[14]。本研究制备木犀草素磷脂复合物(Lut-PC),采用介孔二氧化硅纳米粒为载体,进一步制备成木犀草素磷脂复合物二氧化硅纳米粒(Lut-PC-MSN),考察 Lut-PC-MSN 晶型状态、模拟胃肠液中的释药行为、贮存稳定性等,并以木犀草素原料药为参考,比较 Lut-PC-MSN 药动学行为和生物利用度,期望为木犀草素口服制剂开发提供策略。

1 材料

1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); ATX224R 型电子天平(日本岛津仪器公司); KQ-700TDV 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); Neofuge-13 型高速离心机(上海力康医疗设备有限公司); BX-2F 型磁力搅拌器(常州普天仪器制造有限公司); Nano-ZS90 型粒度分析仪(英国马尔文公司); TTL-DCII 型氮吹仪(北京同泰联科技发展有

限公司); APD 2000 型 X 射线粉末衍射仪(北京利曼科技有限公司); 860DL 型溶出仪(上海景宁科学仪器有限公司); HZQ-2 型数显恒温摇床(常州迈科诺仪器有限公司); SW-CJ 型超净工作台(青岛聚创环保集团有限公司)等。

木犀草素对照品(批号 111520-201605,质量分数 99.6%,中国食品药品检定研究院); 木犀草素原料药(批号 220523,质量分数 98.0%,西安融升科技有限公司); 黄芩素对照品(批号 20220915,质量分数 98.0%,南京欣厚生物科技有限公司); 二氧化硅纳米粒(批号 221124,宁波博华斯纳米科技有限公司); 磷脂(批号 221028,广州天宝磷脂科技有限公司); 模拟胃液(批号 220102,含胃蛋白酶)、模拟肠液(批号 220102,含胰蛋白酶),上海起发实验试剂有限公司。

SD 大鼠购自河南省实验动物中心,雄性,体质量 $18 \sim 22 \text{ g}$,许可证号为 SCXK(豫)2020-001。动物实验经郑州工业应用技术学院医学院实验动物伦理批准,编号为 202301。

2 方法与结果

2.1 Lut-PC-MSNs 制备

2.1.1 Lut-PC 的制备^[6] 取干燥的木犀草素 2.1 g 和磷脂 6.0 g ,置于锥形瓶,加入 200 mL 四氢呋喃后密封,置于 $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中持续磁力搅拌 3 h ,搅拌速度为 600 r/min ,于 $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下旋转蒸发除去四氢呋喃,即得 Lut-PC。置于 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱中过夜,收集 Lut-PC,密封,置于干燥器中。

2.1.2 Lut-PC-MSNs 制备 采用溶剂挥发法制备 Lut-PC-MSNs。取 50 mg Lut-PC 和处方量的 MSNs 粉末,置于圆底烧瓶,加入一定体积无水乙醇,置于 $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中,在搅拌速度为 600 r/min 条件下磁力搅拌一定时间。于 $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度下旋转蒸发除去乙醇,即得 Lut-PC-MSNs 粉末。

2.2 HPLC 法测定木犀草素

2.2.1 色谱条件 Waters C_{18} 色谱柱($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),流动相为 0.2% 磷酸水溶液-甲醇($50:50$),检测波长为 350 nm ,柱温为 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$,体积流量为 1.0 mL/min 。

2.2.2 标准曲线和线性范围 使用甲醇配制 0.2 mg/mL 木犀草素对照品储备液。以甲醇稀释成 10.00 、 5.00 、 2.00 、 1.00 、 0.20 、 $0.05 \mu\text{g/mL}$ 木犀草素对照品溶液。进样测定木犀草素各质量浓度的峰面积值,进行线性回归,得方程 $A=19.2554C+$

0.254 1, $r=0.999\ 8$ 。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密取 Lut-PC-MSNs 粉末 10 mg, 置三角瓶中, 加入甲醇约 30 mL 超声 10 min, 置于离心机中 14 500 r/min 离心 30 min, 移出提取液后同法再提取 2 次, 将提取液合并至 100 mL 量瓶, 加甲醇至刻度。取 2 mL 置 10 mL 量瓶, 加甲醇至刻度, 即得。

2.2.4 精密度试验 取 10.00、2.00、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 木犀草素对照品溶液, 分别进样 6 次, 测定峰面积值, 计算得峰面积 RSD 值分别为 0.42%、0.30%、0.38%。

2.2.5 稳定性试验 取 Lut-PC-MSNs 供试品溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 测得木犀草素质量分数的 RSD 值为 0.78%。

2.2.6 重复性试验 取 Lut-PC-MSNs 平行配制 6 份供试品溶液, 计算得木犀草素质量分数 RSD 值为 1.43%。

2.2.7 回收率试验 精密取 5 mg Lut-PC-MSNs 粉末, 共 9 份, 分为 3 组, 分别加入 0.2 mg/mL 木犀草素对照品储备液 6.0、8.0、10.0 mL, 制备供试品溶液, 进样测定, 计算得平均回收率为 99.79%, RSD 值为 1.79%。

2.2.8 测定计算方法 取 Lut-PC-MSNs 粉末约 10 mg, 加入 50 mL 蒸馏水摇匀, 即得混悬液, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 14 500 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 于沉淀中加入 0.5% SDS 水溶液 5 mL, 震荡洗涤, 再次 14 500 r/min 离心 10 min, 弃去上清液后直接冻干, 采用外标法计算木犀草素的质量分数。

2.3 包封率、载药量、粒径、Zeta 电位测定

取 Lut-PC-MSNs 粉末, 测定被包封木犀草素质量 ($M_{\text{包封}}$), 与木犀草素投药量 ($M_{\text{投药量}}$) 相比, 计算 Lut-PC-MSNs 包封率。根据木犀草素、磷脂和空白 MSNs 粉末总用量 ($M_{\text{总}}$) 计算载药量。

$$\text{包封率} = M_{\text{包封}} / M_{\text{投药量}}$$

$$\text{载药量} = M_{\text{包封}} / M_{\text{总}}$$

使用蒸馏水将 Lut-PC-MSNs 混悬液稀释 50 倍, 于粒度分析仪上分别测定粒径、多分散指数 (PDI)、Zeta 电位, 各样品平行测试 3 次, 取平均值。

2.4 Lut-PC-MSNs 处方工艺单因素考察

2.4.1 MSNs 粉末与 Lut-PC 用量比的影响 在 Lut-PC 投药量为 50 mg、木犀草素质量浓度为 1 mg/mL、搅拌时间 8 h 条件下考察 MSNs 粉末与 Lut-PC 用量比的影响, 结果见表 1。随着 MSNs 粉末用量的增加, Lut-PC-MSNs 包封率逐渐增加后趋稳, 而载药量呈先增加后下降, 表明增加适当 MSNs 用量利于提高 Lut-PC-MSNs 包封率, 但 MSNs 用量过大时使 Lut-PC-MSNs 载药量下降。Lut-PC-MSNs 粒径随着 MSNs 用量的增加总体呈现增大趋势, 可能是 MSNs 用量过大时导致 Lut-PC-MSNs 之间聚集, 从而使粒径和 PDI 值减少^[6]。可见 MSNs 粉末与 Lut-PC 比例对 Lut-PC-MSNs 的包封率、载药量、粒径影响较大, 后续选择 MSNs 与 Lut-PC 用量比 1 : 1~2 : 1 进行优化。

2.4.2 木犀草素质量浓度的影响 在 Lut-PC 投药量为 50 mg、MSNs 与 Lut-PC 比例为 1.5 : 1.0、搅拌时间 8 h 条件下考察木犀草素质量浓度的影响, 结果见表 2。Lut-PC-MSNs 包封率和载药量随着木犀草素质量浓度增加均先增加后趋稳, 可能是药物主要在质量浓度驱动力作用下进入 MSNs 内部^[12], 质量浓度越大越利于 MSNs 对 Lut-PC 吸附。但木犀草素质量浓度过大时无水乙醇体积较小, 从而使 Lut-PC-MSNs 之间聚集, 导致粒径和 PDI 值变大。可见木犀草素质量浓度对 Lut-PC-MSNs 的包封率、载药量、粒径等影响较大, 后续选择木犀草素质量浓度 0.5~1.5 mg/mL 进行优化。

表 1 MSNs 与 Lut-PC 用量比考察 ($n=3$)
Table 1 Investigation of MSNs to luteolin ratio ($n=3$)

MSNs 与 Lut-PC 用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI 值
1.0 : 2.0	32.16±1.15	5.15±0.22	166.71±8.61	0.559±0.062
1.0 : 1.5	42.98±1.62	6.12±0.14	164.20±7.15	0.413±0.036
1.0 : 1.0	66.62±0.96	8.29±0.23	172.87±6.97	0.238±0.020
1.5 : 1.0	82.85±1.24	8.13±0.21	188.94±5.45	0.121±0.017
2.0 : 1.0	88.84±0.94	7.30±0.26	229.71±9.28	0.166±0.013
2.5 : 1.0	89.06±1.21	6.57±0.19	256.35±13.74	0.190±0.021

表 2 木犀草素质量浓度考察 ($n=3$)Table 2 Investigation of luteolin concentration ($n=3$)

木犀草素质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI 值
0.2	71.76±1.08	70.11±0.32	178.45±7.64	0.129±0.014
0.5	74.63±0.99	73.94±0.28	171.73±6.77	0.117±0.018
1.0	83.50±1.32	84.51±0.21	184.92±8.05	0.123±0.018
1.5	86.17±0.95	85.96±0.21	224.79±10.68	0.173±0.020
2.0	86.43±0.99	86.58±0.19	269.81±13.24	0.209±0.027

2.4.3 搅拌时间的影响 在 Lut-PC 投药量为 50 mg、MSNs 与 Lut-PC 比例为 1.5 : 1.0、木犀草素质量浓度为 1.0 mg/mL 条件下考察搅拌时间的影响, 结果见表 3。Lut-PC-MSNs 包封率和载药量随着搅拌时间的延长均先增加后下降, 可能是由于适当增加搅拌时间利于 Lut-PC 吸附到 MSNs 的纳米孔道内部, 因而包封率和载药量逐渐增加。木犀草素的

热稳定性比较差^[5], 搅拌时间过长, 温度升高, 可能会导致药物的降解, 影响了包封率和载药量; 搅拌时间较短时 Lut-PC 并未进入 MSNs 孔道内部, 主要附着在 MSNs 表面, 因而粒径和 PDI 值均较大。可见搅拌时间对 Lut-PC-MSNs 的包封率、载药量和粒径影响较大, 后续选择搅拌时间 6~10 h 进行优化。

表 3 搅拌时间考察 ($n=3$)Table 3 Investigation of stirring time ($n=3$)

搅拌时间/h	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI 值
4	71.69±1.30	7.21±0.22	221.17±9.56	0.167±0.018
6	77.29±1.14	7.60±0.21	208.64±11.58	0.136±0.010
8	84.73±0.96	8.37±0.17	175.94±8.42	0.115±0.014
10	80.52±1.31	7.96±0.24	170.81±6.07	0.120±0.016
12	70.69±0.97	7.07±0.13	172.64±6.73	0.123±0.011

2.5 Box-Behnken 设计-效应面法优化 Lut-PC-MSNs 处方工艺

2.5.1 试验方案 据 2.4 项下考察结果, MSNs 与 Lut-PC 用量比 (X_1)、木犀草素质量浓度 (X_2) 和搅拌时间 (X_3) 对 Lut-PC-MSNs 影响较大, 各因素水平见表 4。采用 Lut-PC-MSNs 包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 和粒径 (Y_3) 作为优化指标, 期望 Lut-PC-MSNs 具有较高包封率和载药量, 且较小的粒径, 故将该 3 个指标转变为归一值 (OD), 采用 OD 来筛选 Lut-PC-MSNs 处方工艺。OD 值计算过程为: 包封率 (d_1) 和载药量 (d_2) 计算公式为 d_1 或 $d_2 = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$, M_i 、 $M_{\max}$ 、 $M_{\min}$ 分别为实测值、最大值、最小值; 粒径 (d_3) 计算公式 $d_3 = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$; $OD = (d_1 d_2 d_3)^{1/3}$ 。按不同处方工艺组合制备不同处方工艺的 Lut-PC-MSNs, 分别测定包封率、载药量和粒径, 并计算 OD 值, 结果见表 5。

表 4 因素水平

Table 4 Factors and levels

水平	因素		
	X_1	X_2 /(mg·mL ⁻¹)	X_3 /h
-1	1.0 : 1.0	0.5	6
0	1.5 : 1.0	1.0	8
1	2.0 : 1.0	1.5	10

2.5.2 数学模型和方差分析 使用 Design Expert 软件 (版本为 V12.0.7) 对实验数据作二次多项式拟合, 得 OD 拟合方程: $OD = 0.88 - 0.077 X_1 + 0.053 X_2 + 0.048 X_3 - 0.22 X_1 X_2 + 0.044 X_1 X_3 + 0.085 X_2 X_3 - 0.39 X_1^2 - 0.27 X_2^2 - 0.26 X_3^2$, 该数学模型 $< 0.000 1$, 具有极显著差异。方差分析结果见表 6, 其中 $R^2 = 0.987 5$, $R_{adj}^2 = 0.971 4$, 失拟项 $P = 0.067 6 > 0.05$, 不具有统计学意义。所以建立的 OD 值数学模型可信度较高, 可用于 Lut-PC-MSNs 处方工艺研究。OD

表 5 试验结果 ($n=3$)
Table 5 Experiments results ($n=3$)

序号	X_1	$X_2/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD 值
1	1.5 : 1.0	1.0	8	84.44	8.31	164.95	0.904
2	1.0 : 1.0	1.0	10	70.25	8.66	177.94	0.374
3	1.0 : 1.0	1.0	6	69.50	8.97	180.56	0.284
4	1.5 : 1.0	0.5	10	69.41	7.19	164.98	0.219
5	1.5 : 1.0	1.0	8	82.62	8.15	166.04	0.840
6	1.5 : 1.0	1.0	8	84.17	8.43	167.52	0.898
7	2.0 : 1.0	0.5	8	75.41	6.58	189.76	0.326
8	1.5 : 1.0	0.5	6	73.63	7.29	193.44	0.372
9	1.0 : 1.0	0.5	8	68.96	8.52	175.43	0.000
10	2.0 : 1.0	1.5	8	80.72	6.69	214.68	0.000
11	1.5 : 1.0	1.5	10	76.43	7.58	190.47	0.489
12	1.0 : 1.0	1.5	8	73.18	9.04	184.61	0.545
13	2.0 : 1.0	1.0	10	76.24	6.29	186.45	0.265
14	2.0 : 1.0	1.0	6	74.25	6.08	180.99	0.000
15	1.5 : 1.0	1.0	8	83.62	8.27	171.66	0.841
16	1.5 : 1.0	1.5	6	71.81	7.02	190.43	0.303
17	1.5 : 1.0	1.0	8	84.75	8.36	168.62	0.894

表 6 方差分析
Table 6 Analysis of variance

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.67	9	0.19	61.33	<0.000 1
X_1	0.05	1	0.05	15.53	0.005 6
X_2	0.02	1	0.02	7.30	0.030 6
X_3	0.02	1	0.02	6.19	0.041 7
X_1X_2	0.19	1	0.19	62.67	<0.000 1
X_1X_3	7.58×10^{-3}	1	7.58×10^{-3}	2.51	0.157 3
X_2X_3	0.03	1	0.03	9.51	0.017 7
X_1^2	0.63	1	0.63	207.83	<0.000 1
X_2^2	0.31	1	0.31	102.57	<0.000 1
X_3^2	0.28	1	0.28	92.79	<0.000 1
残差	0.02	7	3.02×10^{-3}		
失拟项	0.02	3	5.67×10^{-3}	5.44	0.067 6
绝对误差	4.16×10^{-3}	4	1.04×10^{-3}		
总和	1.69	16			

拟合方程的 X_1 、 X_1X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 均具有极显著差异 ($P<0.01$), X_2 、 X_3 、 X_2X_3 有显著差异 ($P<0.05$)。

2.5.3 效应面结果与最佳制备工艺参数预测 X_1 、 X_2 、 X_3 各个不同因素与 OD 值的交互作用的响应面

见图 1。设置 OD 值范围为 0~1, 并以望大值为优化目标, 得到 Lut-PC-MSNs 最佳处方工艺条件为: MSNs 粉末与 Lut-PC 用量比为 1.43 : 1.0, 木犀草素质量浓度为 1.08 mg/mL, 搅拌时间为 8.22 h。预

测 Lut-PC-MSNs 的 OD 值为 0.963。为了便于实际操作,将 MSNs 粉末与 Lut-PC 用量比调整为 1.45:

1.0, 木犀草素质量浓度设定为 1.1 mg/mL, 搅拌时间为 8.25 h。

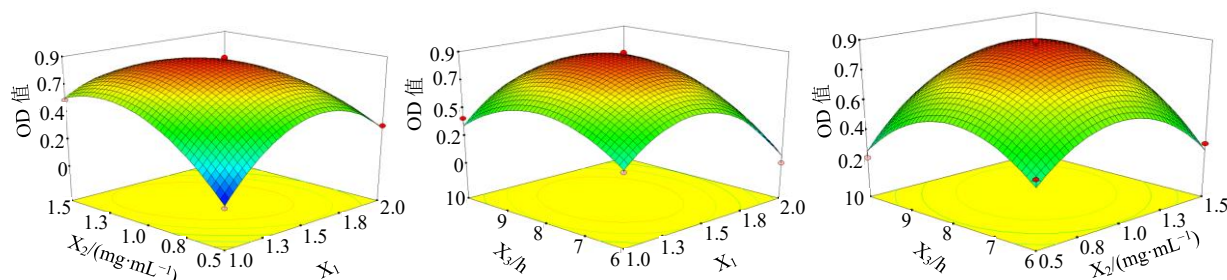


图 1 不同因素对 OD 值的效应面

Fig. 1 Response surface of different factor on OD value

2.6 处方工艺验证

按最佳处方工艺制备 3 批 Lut-PC-MSNs 样品,加入蒸馏水,得到 Lut-PC-MSNs 混悬液,进行测定,结果平均包封率、载药量和粒径分别为 $(85.91 \pm 1.18) \%$ 、 $(8.82 \pm 0.21) \%$ 、 $(160.69 \pm 6.80) \text{ nm}$, 计算得实际 OD 值为 0.958。OD 值的相对偏差 = (实际值 - 预测值) / 预测值, 计算得 OD 值相对偏差为

-0.52%, 绝对值小于 1%, 表明建立的 OD 数学模型预测性良好。

2.7 样品表征

2.7.1 外观、粒径分布和 Zeta 电位 Lut-PC-MSNs 粉末分散于纯化水后即可形成外观均一的混悬液, 测得 PDI 值为 (0.098 ± 0.09) , Zeta 电位为 $(1.09 \pm 0.11) \text{ mV}$, 见图 2。

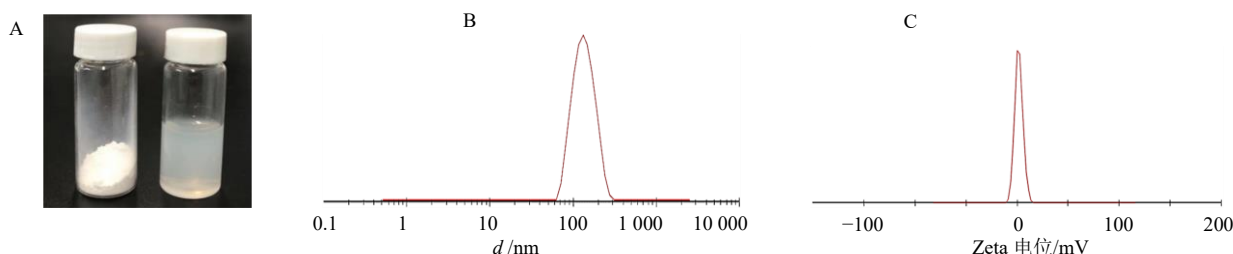


图 2 Lut-PC-MSNs 粉末、混悬液样品外观 (A)、粒径分布图 (B) 和 Zeta 电位图 (C)

Fig. 2 Appearance (A), particle distribution image (B), Zeta potential image (C) of Lut-PC-MSNs samples

2.7.2 扫描电镜 取铜胶带黏贴至 T 型台上, 无水乙醇冲洗 3 遍, 晾干, 滴加 Lut-PC-MSNs 混悬液, 铺展后于室温晾干, 喷金 1 min。置于扫描电镜下, 放大 50 000 倍观察 Lut-PC-MSNs 微观外貌, 拍照。同法测定空白 MSNs 微观外貌, 结果见图 3。空白 MSNs 和 Lut-PC-MSNs 基本形貌均为球形, 其中空白 MSNs 可观察到表面的介孔结构, 且边界清晰, Lut-PC-MSNs 表面无介孔结构, 这是由于 Lut-PC 进入 MSNs 介孔结构所致, 且边界模糊。

2.7.3 晶型分析 取木犀草素、MSNs 粉末、物理混合物 (木犀草素、磷脂和 MSNs 比例同 Lut-PC-MSNs)、Lut-PC 和 Lut-PC-MSNs 各 10 mg, 玻璃片压制平整后作 XRPD 扫描, 扫描范围 (2θ) 为 $3^\circ \sim$

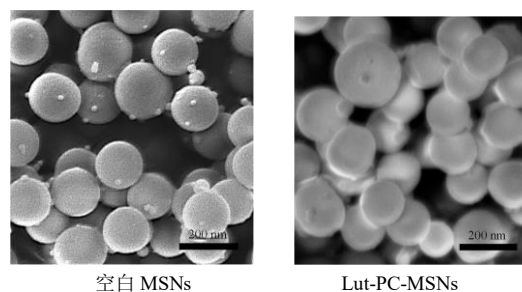


图 3 扫描电镜结果 ($\times 50\,000$)

Fig. 3 SEM results ($\times 50\,000$)

45° , Cu-K α 靶。结果见图 4。木犀草素大多数特征晶型峰在 $3^\circ \sim 30^\circ$ 出现, 在物理混合物 XRPD 图谱中木犀草素特征晶型峰仍可观察到, 且峰位未发生

变化,证明木犀草素在物理混合物中仍以结晶状态存在。Lut-PC 未观察到木犀草素的晶型峰,表明木犀草素可能以无定形态存在于 Lut-PC^[6]。将 Lut-PC 制备成 Lut-PC-MSNs 后仍未观察到木犀草素的晶型峰,表明木犀草素在 Lut-PC-MSNs 以无定形态存在。

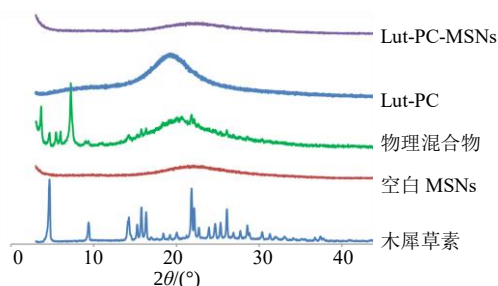


图 4 XRPD 结果
Fig. 4 XRPD results

2.8 释药行为和释药机制研究

取木犀草素原料药、物理混合物(木犀草素、磷脂和 MSNs 粉末的混合物,比例同 Lut-PC-MSNs)、Lut-PC 和 Lut-PC-MSNs 粉末适量,使木犀草素均为 5 mg,加入 5 mL 模拟胃液(pH 2.0,含胃蛋白酶),密封至透析袋中(截留相对分子质量 10 000)。溶出仪温度为 37 ℃,转速为 75 r/min,释药介质为 1 000 mL 模拟胃液,取样点设置为 0.25、0.5、1.0、1.5、2、4、6、8、12 h,取样体积为 5 mL,取样后均补加 5 mL 空白介质。样品于 14 500 r/min 离心 30 min,取上清液采用 HPLC 法测定木犀草素的质量浓度。同法测定各样品在模拟肠液(pH 7.4,含胰蛋白酶)中的释药行为,结果见图 5。木犀草素在模拟胃、肠液中累积释放度先增加后下降,可

能与原料药在模拟胃、肠液中容易降解有关^[6]。Lut-PC-MSNs 在模拟胃、肠液中的累积释放度分别增加至 63.12%、71.74%,提高幅度远大于物理混合物和 Lut-PC。Lut-PC-MSNs 的释药模型见表 7,可见 Lut-PC-MSNs 在模拟胃肠液中的释药行为符合 Weibull 模型,且 R^2 均大于 0.95。

2.9 稳定性研究

取 Lut-PC-MSNs 粉末置于药用塑料瓶中(50 mg/瓶),置于湿度 65%、温度 30 ℃恒温恒湿箱,于 0、1、2、3、6 个月取样,加入蒸馏水复溶,测

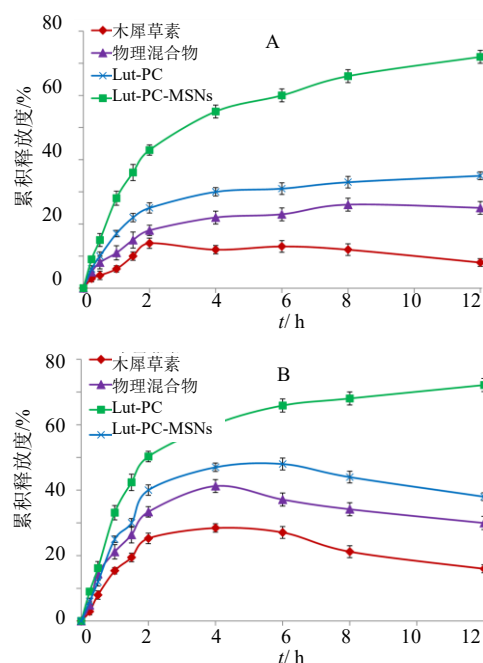


图 5 各样品在模拟胃液(A)和模拟肠液(B)中的释药曲线($n=6$)

Fig. 5 Drug release curves of different samples in simulate gastric fluids (A) and intestinal fluids (B) ($n=6$)

表 7 Lut-PC-MSNs 释放模型
Table 7 Fitting release model of Lut-PC-MSNs

介质	模型	拟合方程	R^2
模拟胃液	一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.074\ 2\ t - 0.287\ 5$	0.843\ 2
	Higuchi 模型	$M_t/M_\infty = 0.176\ 8\ t^{1/2} + 0.105\ 9$	0.905\ 5
	Weibull 模型	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.617\ 5\ \ln t - 1.263\ 0$	0.957\ 1
模拟肠液	一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.095\ 3\ t - 0.333\ 8$	0.831\ 9
	Higuchi 模型	$M_t/M_\infty = 0.204\ 4\ t^{1/2} + 0.112\ 9$	0.877\ 9
	Weibull 模型	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.669\ 5\ \ln t - 1.129\ 3$	0.955\ 4

M_t 和 M_∞ 分别为 t 和 ∞ 时的累积释放度, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放率。

M_t and M_∞ were accumulative release at time t and M_∞ , M_t/M_∞ is accumulative release rate at time t .

定 Lut-PC-MSNs 混悬液包封率、粒径、PDI 值和 Zeta 电位，结果见表 8。放置 6 个月后，Lut-PC-MSNs 的包封率仍大于 80%（《中国药典》规定微粒

制剂包封率不得低于 80%）。Lut-PC-MSNs 包封率、粒径、PDI 值和 Zeta 电位在不同时间点的波动均无显著变化，表明 Lut-PC-MSNs 粉末稳定性良好。

表 8 Lut-PC-MSNs 粉末稳定性考察 (n=3)
Table 8 Stability of Lut-PC-MSNs powder (n=3)

时间/个月	包封率/%	粒径/nm	PDI 值	Zeta 电位/mV
0	86.03±1.19	163.56±7.11	0.106±0.06	0.98±0.11
1	85.79±0.96	166.04±6.58	0.098±0.09	1.12±0.13
2	85.54±1.22	163.94±7.02	0.104±0.010	1.25±0.12
3	84.97±1.17	168.42±7.34	0.109±0.011	1.09±0.09
6	84.06±1.30	166.80±6.95	0.103±0.008	1.17±0.14

2.10 药动学研究

2.10.1 实验方案 取木犀草素原料药、物理混合物和 Lut-PC-MSNs 粉末适量，使用 CMC-Na 水溶液（质量浓度为 0.5%）配制，使木犀草素质量浓度均为 5 mg/mL。取 18 只 SD 大鼠禁食过夜，随机分为 3 组。记录各只大鼠体质量，按 40 mg/kg（以木犀草素计）分别 ig 给药，于 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、10、12 h 于眼眶后静脉丛采血，血样引流至含 2 滴肝素钠（质量浓度 1.0%）离心管，涡旋 5 s 混匀，置离心机中 3 500 r/min 离心 3 min，取血浆冷冻保存。

2.10.2 血浆处理^[7] 使用甲醇配制 4 000 ng/mL 黄芩素对照品溶液，作为内标。取 100 μL 血浆样品置于空白离心管中，加入 100 μL 高氯酸-甲醇（5：95）溶液和 25 μL 内标溶液，涡旋 5 min。加醋酸乙酯 1.0 mL，涡旋 5 min，8 500 r/min 离心 5 min，取有机相置于 37 ℃氮吹仪上缓慢吹干，加 100 μL 甲醇复溶，即得。

2.10.3 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为 0.2%磷酸水溶液-甲醇（50：50），检测波长为 350 nm，柱温为 35 ℃，体积流量为 1.0 mL/min。

2.10.4 标准曲线的绘制 使用空白血浆配制质量浓度为 2 500、2 000、1 000、500、100、50 ng/mL 木犀草素血浆对照品溶液（含内标），测定木犀草素、黄芩素的峰面积。以两者峰面积比为纵坐标，木犀草素的质量浓度为横坐标，采用加权最小二乘法作线性回归，得方程 $Y=0.001\ 2\ X-0.054\ 1$ ($r=0.996\ 8$)。

2.10.5 专属性试验 取空白血浆、血浆样品和血

浆对照品溶液进样测定，结果见图 6。木犀草素与黄芩素色谱峰不受其他杂质干扰，专属性高。

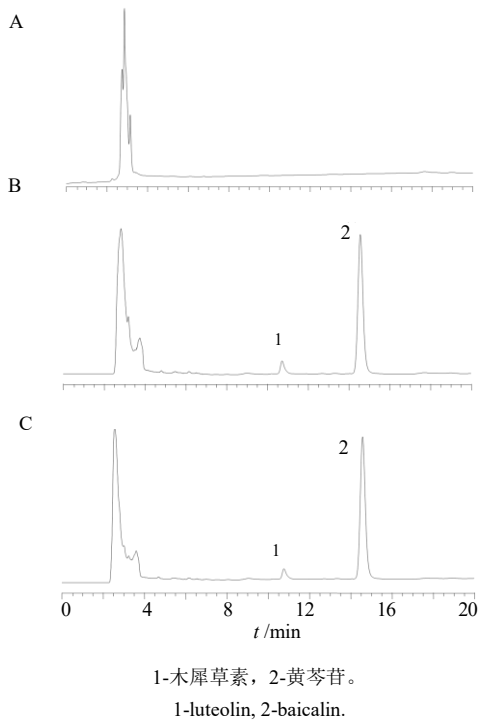


图 6 空白血浆 (A)、样品 (B) 和对照品 (C) HPLC 色谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms of blank plasma (A), plasma samples (B), and reference substance (C)

2.10.6 稳定性试验 取 Lut-PC-MSNs ig 2 h 血浆样品，于 0、3、6、9、12、18 h 测定木犀草素和黄芩素峰面积，计算得两者峰面积比值 RSD 值为 6.34%。血浆样品置于-20 ℃冰箱，分别于 0、3、6、9、12、15 d 取样，制备血浆样品溶液，进样测定木犀草素和黄芩素峰面积，计算得木犀草素质量

浓度的 RSD 值为 9.69%，表明血浆样品在-20℃温度下存放时稳定性良好。

2.10.7 精密度试验和准确度试验 配制了 2 500、1 000、50 ng/mL 质控样品，制备供试品溶液，分别连续测定 6 次，根据随行标准曲线计算得木犀草素质量浓度的 RSD 值分别为 3.47%、6.08%、6.42%；取 2 500、1 000、50 ng/mL 质控样品溶液，连续测定 6 d，1 次/d，根据随行标准曲线计算得木犀草素质量浓度的 RSD 值分别为 5.28%、4.05%、4.39%。准确度采用测得值与理论值接近程度表示，2 500、1 000、50 ng/mL 质量浓度准确度分别为 107.96%、94.58%、98.11%，符合《中国药典》2020 年版四部生物样品定量分析方法验证指导原则的技术要求。

2.10.8 提取回收率试验 取空白血浆，配制 2 500、1 000、50 ng/mL 质控样品（均含内标）6 份，制备质控样品溶液，进行测定，记录木犀草素、黄芩素的峰面积（*a*）。取空白血浆，加入木犀草素对照品，配制 2 500、1 000、50 ng/mL 对照品（均含内标），分别进行测定，记录木犀草素和内标峰面积（*b*）。按照提取回收率=*a/b* 计算提取回收率^[15]。结果显示，2 500、1 000、50 ng/mL 木犀草素和黄芩素的提取回收率分别为 100.15%、104.74%、96.14%、97.86%，RSD 值分别为 8.46%、5.92%、9.20%、8.76%。

2.10.9 药动学结果 绘制各组样品的药-时曲线，见图 7，使用 DAS 3.2 软件非房室模型计算各

组样品的药动学参数，见表 9。与木犀草素原料药相比，物理混合物的 $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 和 MRT 无显著改变， $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 、 $AUC_{0\sim\infty}$ 有显著增加（ $P<0.05$ ），可能与处方中磷脂、MSNs 粉末促吸收作用有关^[6, 13]，相对生物利用度增加至 1.29 倍。与木犀草素原料药相比，Lut-PC 的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 、 $AUC_{0\sim\infty}$ 有极显著增加（ $P<0.01$ ），相对生物利用度增加至 1.48 倍，主要是由于 Lut-PC 改善了木犀草素的溶解度、脂溶性和溶出度等^[6]。Lut-PC-MSNs 药动学行为发生很大变化，其中 $t_{\max}$ 延后至（ 2.04 ± 0.83 ）h， $t_{1/2}$ 延长至（ 5.64 ± 0.94 ）h， $C_{\max}$ 增加至（ $2\,087.93\pm 466.35$ ）ng/mL，口服吸收生物利用度提高至 5.24 倍，表明 Lut-PC-MSNs 极大地提高了木犀草素的生物利用度，其促吸收作用远大于物理混合物。

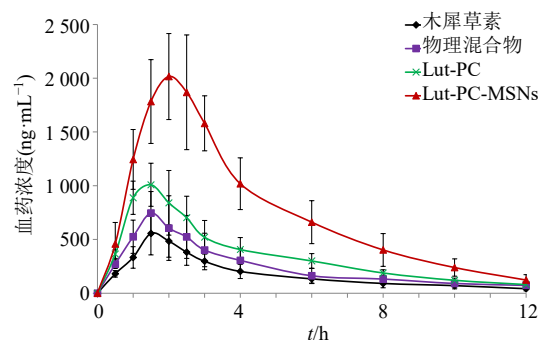


图 7 药-时曲线（*n*=6）

Fig. 7 Drug-time curves (*n*=6)

表 9 药动学参数（*n*=6）

Table 9 Pharmacokinetic parameters (*n*=6)

参数	单位	木犀草素	物理混合物	Lut-PC	Lut-PC-MSNs
$t_{\max}$	h	1.51 ± 0.33	1.62 ± 0.42	1.48 ± 0.34	$2.14\pm 0.53^{*#}$
$t_{1/2}$	h	3.36 ± 0.68	3.50 ± 0.75	3.74 ± 0.80	$5.64\pm 0.94^{*#}$
MRT	h	4.17 ± 0.77	4.29 ± 0.82	4.56 ± 0.71	$6.28\pm 1.57^{*#}$
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	539.07 ± 146.72	$759.02\pm 192.56^{*}$	$1\,024.55\pm 261.73^{**}$	$2\,087.93\pm 466.35^{***\#}$
$AUC_{0\sim t}$	ng·mL ⁻¹ ·h	$1\,578.55\pm 366.24$	$2\,038.37\pm 436.89^{*}$	$2\,342.40\pm 601.39^{**}$	$8\,269.80\pm 1\,713.22^{***\#}$
$AUC_{0\sim\infty}$	ng·mL ⁻¹ ·h	$1\,606.46\pm 408.57$	$2\,111.98\pm 469.74^{*}$	$2\,407.14\pm 658.79^{**}$	$8\,404.34\pm 1\,869.07^{***\#}$

与木犀草素相比：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ；与物理混合物相比：# $P<0.05$ ## $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs luteolin；# $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs physical mixture.

3 讨论

固体脂质纳米粒、脂质体、纳米结构脂质载体等脂质纳米制剂的主要缺陷是稳定性差、辅料种类多、处方含大量表面活性剂、贮存条件要求苛刻等。MSNs 是一种稳定性良好的无机纳米载体，制备过

程无需脂质载体和表面活性剂，储存过程中不易发生氧化、降解、聚集等情况^[13-14]，稳定性很高，因而 MSNs 比脂质纳米制剂更具有推广价值。很多研究者在优化纳米制剂处方工艺时，仅以包封率作为指标，而忽略了载药量、粒径，对纳米制剂的质量

控制不够全面。本研究在优化 Lut-PC-MSNs 处方工艺时将包封率、载药量和粒径转化为总评归一值^[6], 利于获得包封率、载药量和粒径均较理想的 Lut-PC-MSNs 处方工艺。木犀草素的热稳定较差, 在 55 °C 条件下测得木犀草素在 4、6、8、10、12 h 降解率分别为 0.09%、0.12%、0.14%、4.84%、9.73%, 可见制备时间大于 10 h 时严重影响木犀草素稳定性, 经 Box-Behnken 设计-效应面法优化后确定制备时间为 8.25 h。

XRPD 结果证明木犀草素以无定形状态分散于 Lut-PC, 进一步制备成 Lut-PC-MSNs 粉末后木犀草素仍以无定形状态存在, 说明在 Lut-PC-MSNs 制备过程中木犀草素以 Lut-PC 形式进入 MSNs 的纳米孔道内部, 利于改善药物的溶解度、释放速率、释放度^[12]。木犀草素易受介质 pH 值、酶蛋白酶、胰蛋白酶等因素影响^[6], 导致药物降解较严重, 是导致木犀草素生物利用度很低的原因之一。据报道, MSNs 会对消化酶产生吸附作用, 进而形成蛋白冠, 利于抑制消化酶活性, 提高药物在胃、肠液中的稳定性^[16], 因而木犀草素在物理混合物中累积释放度高于木犀草素原料药。Lut-PC-MSNs 进一步提高了木犀草素的释放度, 可能与药物溶解度提高、比表面积增加、晶型改变等因素有关; 另外 Lut-PC 进入 MSNs 纳米孔道后, 降低了模拟胃肠液消化酶的破坏作用, 因而对包载的药物起到了保护作用。Lut-PC-MSNs 在模拟胃、肠液中的释药行为具有一定的缓释特点, 可能会对木犀草素的体内药动学行为产生一定影响^[17]。

Lut-PC-MSNs 的 $t_{\max}$ 发生延后, 可能是由于 Lut-PC-MSNs 的保护作用降低了药物降解几率, 使后期入血量增加, 且 Lut-PC-MSNs 也具有一定的缓释作用, 从而导致 $t_{\max}$ 延后, 同时也影响了 $t_{1/2}$, 并使之延长, 利于药物充分吸收。Lut-PC-MSNs 的 $C_{\max}$ 显著增大可能是由于木犀草素的溶解度、累积释放度、体内稳定性等得到明显改善, 增加了进入血液循环的量^[13-14]。Lut-PC-MSNs 生物利用度得到显著提高, 可能是由于 Lut-PC 解决了木犀草素溶解度、脂溶性较差缺陷^[6, 18], 将 Lut-PC 制备成 Lut-PC-MSNs 后解决了木犀草素释药速率、累积释放度较低问题, 从而解决了木犀草素的吸收瓶颈; 纳米药物与胃肠道接触更充分, 利于增加吸收^[19-20]; MSNs 可抑制消化酶活性^[15], 降低了木犀草素的降解几率, 增加了吸收量; 木犀草素转变为无定型状态,

而无定型药物更易吸收^[19, 21]。因此本研究制备的 Lut-PC-MSNs 粒径小于 200 nm, 提高了在模拟胃肠液中的累积释放度, 加速条件下贮存 6 个月仍表现出较高的稳定性, 口服后可有效改善木犀草素口服吸收, 为评价其成药性提供参考数据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 胡泽香, 佟雷, 耿艳萌, 等. 木犀草素的药理活性及其制剂研究进展 [J]. 中医临床研究, 2022, 14(10): 141-145.
- [2] 张文, 姚晓燕, 周文慧, 等. 木犀草素防治急性肺损伤的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(9): 2448-2452.
- [3] 陈娟, 邓敏, 周焕, 等. 木犀草素抑制 PKM2 继而促进自噬诱导肝癌细胞凋亡 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(11): 1103-1108.
- [4] 隋佳琪. 木犀草素通过 EGFR 信号通路发挥抗乳腺癌作用的机制及其与 ER α /IGF-1R 的关系 [D]. 大连: 辽宁师范大学, 2016.
- [5] 王兰. 木犀草素/SBE- β -CD 包合物的制备和生物利用度研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [6] 田莉, 李伟宏, 张付利. 木犀草素磷脂复合物白蛋白纳米粒的制备及口服药动学评价 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3280-3290.
- [7] 涂亮星, 杨如月, 刘佳丽, 等. 不同剂量木犀草素在大鼠体内药动学的比较 [J]. 中成药, 2022, 44(12): 3753-3757.
- [8] 胡泽香, 佟雷, 耿艳萌, 等. 木犀草素纳米乳对 DPPH·自由基的清除活性研究 [J]. 安徽科技学院学报, 2021, 35(6): 73-76.
- [9] 杨娟, 尚曙玉, 贾安, 等. 木犀草素固体脂质纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2021, 43(9): 2281-2286.
- [10] 毛艳婷, 马姝丽, 白朝辉, 等. 木犀草素纳米结构脂质载体及其冻干粉的制备和体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(23): 2423-2429.
- [11] 周周. 木犀草素固体分散体系的制备及其胰岛素抵抗作用的研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2022.
- [12] 廉唱唱, 周梅, 彭成军, 等. 磷脂种类对吡啶菁脂质体制剂学性质的影响 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(3): 524-530.
- [13] 杨丽萍, 王海军, 李伟宏, 等. 载芒果苷的氨基修饰介孔二氧化硅纳米粒的制备及口服药动学评价 [J]. 中草药, 2024, 55(8): 2542-2552.
- [14] 李伟宏, 郑伟, 王风云, 等. 金丝桃苷磷脂复合物及其介孔二氧化硅纳米粒的制备和口服药动学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4157-4167.

- [15] 彭于之, 姜良竹, 徐传锡, 等. β -环糊精-聚乙二醇-7-乙基-10-羟基喜树碱胶束在大鼠体内的药动学研究 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(4): 894-898.
- [16] 邢畅. 二氧化硅纳米粒消化酶蛋白冠的形成及影响因素 [J]. 现代化工, 2017, 37(4): 71-74.
- [17] 储晓婷, 周 梅, 汪康, 等. 不同粒径聚乙二醇化维生素 K1 脂质体的制备及体内外评价 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(7): 1323-1331.
- [18] 张伟利, 李晓婷, 决利利, 等. 柠檬苦素磷脂复合物制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(4): 1051-1057.
- [19] 张韬, 李玉因, 钱占寅, 等. 基于藻酸双酯钠的阿霉素/塞来昔布纳米药物晶体的制备及其抗肿瘤作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(11): 2475-2481.
- [20] 张文凯, 李戟玘, 孙亦华, 等. 治疗炎症性肠病的纳米颗粒研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(8): 1892-1897.
- [21] 杨璞, 李晓, 宋亚琼, 等. 二氢杨梅素混合胶束的制备、表征及药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(10): 2351-2360.

[责任编辑 解学星]