

芒果苷纳米囊泡的制备、表征和药动学研究

毛利紧¹, 朱家豪², 郝海军^{2*}

1. 郑州大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450000

2. 上海雷允上药业有限公司, 上海 201203

摘要: **目的** 制备芒果苷纳米囊泡, 考察其性质、稳定性和大鼠药动学研究。**方法** 采用乙醇注入法制备芒果苷纳米囊泡。以包封率为指标, 芒果苷质量浓度、聚山梨酯 80 与胆固醇比例、囊材与药物比例为主要影响因素, 采用 Box-Behnken 响应面法优化芒果苷纳米囊泡处方工艺, 并制成冻干粉。透射电镜观察芒果苷纳米囊泡微观形态, X-射线粉末衍射考察芒果苷晶型, 透析袋法考察芒果苷纳米囊泡在模拟胃肠液中释药行为。ig 大鼠芒果苷纳米囊泡, 绘制药时曲线, 计算吸收生物利用度。**结果** 芒果苷纳米囊泡最佳处方为: 芒果苷质量浓度为 0.51 mg/mL, 聚山梨酯 80 与胆固醇比例为 1.56:1, 囊材与药物比例为 18.73:1。芒果苷纳米囊泡的平均包封率为 (82.67±1.19)%, 载药量为 (4.15±0.18)%, 粒径为 (318.84±26.46) nm, Zeta 电位为-(31.71±1.87) mV。芒果苷纳米囊泡外观呈椭圆形, 芒果苷在芒果苷纳米囊泡冻干粉中转变为无定形, 在模拟胃肠液中累积释放度得到明显增加。芒果苷纳米囊泡血药浓度 (C_{max}) 和相对口服吸收生物利用度分别增加至 3.54、5.30 倍。**结论** 芒果苷纳米囊泡可增加芒果苷在胃肠液中累积释放度和稳定性, 有效促进了口服吸收。

关键词: 芒果苷纳米囊泡; 芒果苷; 包封率; 处方; 释放度; 药动学; 血药浓度

中图分类号: R283 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)06-1389-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.06.006

Preparation, characterization and pharmacokinetic study of mangiferin nanovesicles

MAO Lijin¹, ZHU Jiahao², HAO Haijun²

1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

2. Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To prepare mangiferin nanovesicles (MF-NVs), and study its properties, stability, and pharmacokinetics in rats. **Methods** Ethanol injection method was employed to prepare MF-NVs. Envelopment rate was used as evaluation indexes, mangiferin concentration, Tween 80 to cholesterol ratio, and materials to drug ratio were acted as main factors, Box-Behnken design-response surface method was employed to optimize the prescriptions of MF-NVs, and its lyophilized powder was also prepared. Transmission electron microscope (TEM) was employed to observe the microscopic morphology of MF-NVs, X-ray powder diffraction (XRPD) was used to investigate the crystal form of mangiferin. Dialysis bag method was used to investigate its release behavior in simulated gastrointestinal fluid. After ig administration of MF-NVs for rat, drug-time curve was drawn and the oral bioavailability was calculated. **Results** The optimal formulation of MF-NVs: mangiferin concentration was 0.51 mg/mL, Tween 80 to cholesterol ratio was 1.56:1, materials to drug ratio was 18.73:1. Envelopment efficiency, drug loading, particle size and Zeta potential of MF-NVs were (82.67±1.19)%, (4.15±0.18)%, (318.84±26.46) nm, and -(31.71±1.87) mV, respectively. The appearance of MF-NVs was oval. Mangiferin in MF-NVs lyophilized powder was transformed into amorphous state, and cumulative release rate of mangiferin was significantly increased in simulated gastrointestinal fluid. C_{max} and relative oral bioavailability of MF-NVs were increased to 3.54 and 5.30 times, respectively. **Conclusion** MF-NVs can increase cumulative release rate of mangiferin in gastrointestinal fluid, and promote oral absorption effectively.

Key words: mangiferin nanovesicles; mangiferin; envelopment rate; formulation; release; pharmacokinetics; C_{max}

收稿日期: 2025-01-07

基金项目: 上海市科技计划项目 (21S21903400)

作者简介: 毛利紧 (1984—), 女, 主管药师, 本科, 从事医院药学研究。E-mail: maolijin1983@163.com

*通信作者: 郝海军 (1981—), 男, 高级工程师, 博士, 从事中药新技术研究。E-mail: haohj2007@126.com

芒果苷是芒果叶、鸢尾中活性成分之一，具有免疫调节、镇咳、降血糖、抗肿瘤等活性^[1-2]，在脑血管、呼吸系统等领域应用较多。芒果苷毒性极低^[3]，安全性高，具有开发价值。芒果苷在 pH 2.0、6.0、7.0 水相中溶解度分别为 109.11、196.46、584.95 μg/mL，较低的溶解度严重影响了溶出度，且脂溶性也较差^[4]，导致透膜吸收困难。芒果苷在胃肠道中易被代谢^[5]，极大影响了进入血液循环的量，同时也是 P-糖蛋白的底物^[6]，导致绝对口服生物利用度仅 1.2%^[7]，未达到药效时常常需增加给药剂量，增加了患者治疗费用。目前芒果苷已有自微乳^[8]、固体脂质纳米粒^[9]，但自微乳含有大量表面活性剂，临床使用安全性存在较大争议，且处方工艺较复杂；固体脂质纳米粒的包封率较低，在储存过程中药物易被排挤出晶格结构^[10]，影响了制剂的稳定性。非离子表面活性剂在水相中可自组装形成纳米囊泡，结构类似于脂质体，为提高纳米囊泡的稳定性，加入一定量的胆固醇或胆固醇衍生物来增加韧性。纳米囊泡处方中不含易氧化的磷脂^[11]，因而稳定性优于脂质体，更具推广应用价值^[12-13]。设计药物制剂处方时，应充分考虑被包载药物的本身缺陷，芒果苷是 P-糖蛋白的底物，而聚山梨酯 80 具有抑制 P-糖蛋白的外排作用^[14]，利于增加药物口服吸收^[15-16]。本研究采用聚山梨酯 80 作为非离子表面活性剂，引入适量的胆固醇，将芒果苷制备成芒果苷纳米囊泡，期望改善芒果苷溶解度和溶出度，提高胃肠道稳定性，促进体内吸收。通过 Box-Behnken 响应面法优化芒果苷纳米囊泡的处方工艺，并以芒果苷原料药为对比，比较模拟胃肠液中释药情况和药动学行为，期望为芒果苷的临床使用提供一种新型制剂。

1 仪器与材料

1100 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；BSA224S 型电子天平（赛多利斯仪器公司）；WH420 型磁力搅拌器（北京维根技术有限公司）；UA03 型超声仪（北京维根技术有限公司）；TURBOVAP-LV 型氮吹浓缩仪（上海拜泰齐贸易有限公司）；BeNano 90 型粒度分析仪（丹东百特仪器有限公司）；FD-50 型真空冻干机（上海楚定分析仪器有限公司）；Distek6100 型溶出仪（苏州科沃安科技有限公司）。

芒果苷对照品（批号 111607-201116，质量分数 98.1%，中国食品药品检定研究院）；聚山梨酯 80（批号 190412，金北京克隆生物技术技术有限公司）；葛根

素对照品（批号 110752-201815，质量分数 95.6%，中国食品药品检定研究院）；芒果苷原料药（批号 20201013，质量分数 96%，西安汇林生物科技有限公司）；胆固醇（批号 K200804D，湖北齐飞医药化工有限公司）；乳糖（批号 202106-1，江苏星德药用辅料有限公司）。

SD 大鼠购自河南省动物实验中心，动物生产许可证号[SCXK（豫）2020-0001]，雌雄兼具，平均体质量（220±20）g。实验过程遵循郑州大学第一附属医院动物伦理委员会相关规定，批准伦理号 2024M324。

2 方法与结果

2.1 芒果苷纳米囊泡的制备^[16]

聚山梨酯 80 和胆固醇作为囊材，采用乙醇注入法制备芒果苷纳米囊泡。取芒果苷 20 mg、处方量聚山梨酯 80 和胆固醇置于锥形瓶中，加入 20 mL 乙醇溶解，并缓慢注入 50 °C、pH 4.5 磷酸盐缓冲液中，持续搅拌 1 h 至无醇味。200 W 功率下超声 20 min，置于冰浴中降温，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得芒果苷纳米囊泡混悬液。

2.2 芒果苷纳米囊泡中芒果苷的 HPLC 测定

2.2.1 色谱条件 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液（12：88）；检测波长为 258 nm；柱温 35 °C；体积流量为 1 mL/min；进样体积 10 μL^[17]。

2.2.2 供试品溶液的配制 取芒果苷纳米囊泡混悬液 1 mL 置 50 mL 量瓶中，加 30 mL 乙腈超声 6 min，加乙腈-0.1%磷酸水溶液（12：88）稀释至刻度，混匀后取 1 mL 置 10 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.3 标准曲线 取芒果苷对照品，精密称定，使用甲醇配制成 40 μg/mL 对照品储备液。流动相稀释至 5.00、2.00、1.00、0.50、0.25、0.05 μg/mL，进样测定。以质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，得回归方程 $Y=422.7X-109.5$ （ $r=0.9999$ ），线性质量浓度范围为 0.05~5.00 μg/mL。

2.2.4 专属性考察 按处方工艺制备不含芒果苷的阴性样品，并按照供试品溶液的配制项下方法制备阴性样品溶液。另取芒果苷对照品溶液、芒果苷纳米囊泡供试品溶液进样测定，结果发现芒果苷出峰时间为（20.5±0.1）min，且色谱峰无干扰，专属性高。

2.2.5 精密度实验 取 0.05、1.00、5.00 μg/mL 芒

果昔对照品溶液, 分别进样 10 μL , 连续测定 6 次, 结果芒果昔峰面积 RSD 值分别为 0.20%、0.48%、0.32%。

2.2.6 稳定性实验 取芒果昔纳米囊泡供试品溶液, 分别于 0、3、6、9、12、24 h 进样 10 μL , 计算得芒果昔峰面积 RSD 值为 1.70%, 表明供试品溶液稳定性良好。

2.2.7 重复性实验 取芒果昔纳米囊泡混悬液, 平行制备 6 份供试品溶液, 分别进样 10 μL , 结果芒果昔质量浓度的 RSD 值为 1.64%。

2.2.8 回收率实验 分别精密吸取芒果昔纳米囊泡混悬液 0.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 共 9 份, 分成低、中、高 3 组, 每组各 3 份。按芒果昔质量的 50%、100%、150% 分别加入芒果昔对照品, 制备供试品溶液, 分别进样 10 μL , 计算得芒果昔的平均加样回收率为 101.04%, RSD 值为 1.76%。

2.3 包封率、载药量的测定

取芒果昔纳米囊泡混悬液, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 精密取 1 mL 续滤液置超滤管中 (截留相对分子质量 8000), 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 高速离心机腔体中, 8500 r/min 离心 10 min, 测定游离芒果昔峰面积 (A_1), 根据对照品峰面积 ($A_{\text{对}}$)、质量浓度 ($C_{\text{对}}$) 和样品体积 (V) 计算游离芒果昔质量 ($m_{\text{游离}}$)。精密取 1 mL 芒果昔纳米囊泡混悬液, 测定总芒果昔峰面积 (A_2), 根据对照品峰面积 ($A_{\text{对}}$)、质量浓度 ($C_{\text{对}}$)、样品体积 (V) 计算总芒果昔质量。计算芒果昔纳米囊泡包封率。采用 m_0 代表芒果昔、聚山梨酯 80 和胆固醇总量, 计算芒果昔纳米囊泡载药量。

$$m_{\text{游离}} = A_1 C_{\text{对}} V / A_{\text{对}}$$

$$m_{\text{总}} = A_2 C_{\text{对}} V / A_{\text{对}}$$

$$\text{包封率} = (m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = (m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_0$$

2.4 粒径和 Zeta 电位测定

取 5 mL 蒸馏水置离心管中, 加入芒果昔纳米囊泡混悬液 0.1 mL, 震荡混匀, 于粒度分析仪上测定芒果昔纳米囊泡粒径、多分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位。

2.5 Box-Behnken 响应面法优化芒果昔纳米囊泡处方工艺

2.5.1 试验方案设计 根据前期预实验情况, 选择药物浓度 (X_1)、聚山梨酯 80 与胆固醇比例 (X_2) 和囊材与药物比例 (X_3) 作为芒果昔纳米囊泡主要影响因素, 各因素水平见表 1。采用芒果昔纳米囊

泡包封率 (Y) 为作为评价指标, Box-Behnken 响应面法优化芒果昔纳米囊泡的处方工艺, 根据试验方案分别制备不同处方的芒果昔纳米囊泡, 测定包封率, 结果见表 2。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	$X_1/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	X_2	X_3
-1	0.3	1.0 : 1.0	15 : 1
0	0.5	1.5 : 1.0	20 : 1
1	0.7	2.0 : 1.0	25 : 1

表 2 试验结果

Table 2 Experiments results

试验号	X_1	X_2	X_3	$Y/\%$ ($n=3$)
1	0.5	1.5 : 1.0	20 : 1	82.35
2	0.7	1.5 : 1.0	25 : 1	74.17
3	0.3	1.5 : 1.0	15 : 1	68.92
4	0.3	1.5 : 1.0	25 : 1	75.90
5	0.3	1.0 : 1.0	20 : 1	65.47
6	0.5	2.0 : 1.0	25 : 1	76.82
7	0.5	2.0 : 1.0	15 : 1	72.64
8	0.5	1.5 : 1.0	20 : 1	83.61
9	0.5	1.0 : 1.0	15 : 1	72.27
10	0.7	1.5 : 1.0	15 : 1	73.63
11	0.7	2.0 : 1.0	20 : 1	74.14
12	0.5	1.0 : 1.0	25 : 1	75.78
13	0.5	1.5 : 1.0	20 : 1	81.81
14	0.3	2.0 : 1.0	20 : 1	70.33
15	0.7	1.0 : 1.0	20 : 1	70.25
16	0.5	1.5 : 1.0	20 : 1	82.46
17	0.5	1.5 : 1.0	20 : 1	83.44

2.5.2 数学模型分析 对表 2 数据进行拟合, 得包封率二次多元方程 $Y=82.37+1.45 X_1+1.27 X_2+1.90 X_3-0.24 X_1 X_2-1.61 X_1 X_3+0.17 X_2 X_3-6.95 X_1^2-5.73 X_2^2-2.62 X_3^2$, 决定系数 $R^2=0.973 4$, 校正系数 $\text{Adj } R^2=0.959 3$, 仅有 4.07% 数据存在异常。方差分析见表 3, 该数学模型 P 值=0.000 1, 表明建立的数学模型具有极显著意义 ($P<0.01$)。失拟项 P 值=0.057 0, 表明未知因素干扰无显著性意义, 可信度高, 因此可用于芒果昔纳米囊泡处方工艺研究。芒果昔纳米囊泡包封率二次多元方程中 X_2 具有显著性差异 ($P<0.05$); X_1 、 X_3 、 $X_1 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 具有极显著差异 ($P<0.01$)。

表 3 方差分析

Table 3 Analysis variance

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	476.86	9	52.98	28.50	0.000 1
X_1	16.73	1	16.73	9.00	0.019 9
X_2	12.90	1	12.90	6.94	0.033 7
X_3	28.92	1	28.92	15.55	0.005 6
X_1X_2	0.24	1	0.24	0.13	0.735 6
X_1X_3	10.37	1	10.37	5.58	0.048 2
X_2X_3	0.11	1	0.11	0.06	0.813 0
X_1^2	203.64	1	203.64	109.53	<0.000 1
X_2^2	138.34	1	138.34	74.41	<0.000 1
X_3^2	29.00	1	29.00	15.60	0.005 5
残差	13.01	7	1.86		
失拟项	10.67	3	3.56	6.08	0.057 0
纯偏差	2.34	4	0.59		
总离差	489.88	16			

2.5.3 效应面分析和最佳处方工艺调整 X_1 、 X_2 和 X_3 两两因素对包封率 Y 的响应面见图 1。固定其中某个因素时，包封率均随着另外两个因素的增加呈先增加后减小情况。包封率最大值为优化目标，得芒果苷纳米囊泡最佳处方工艺为：芒果苷质量浓度为 0.51 mg/mL、聚山梨酯 80 与胆固醇比例为 1.56 : 1、囊材与药物比例为 18.73 : 1，构建数学模型预测的包封率为 83.18%。考虑到实际操作便捷性，将芒果苷质量浓度调整为 0.50 mg/mL，聚山梨酯 80 与胆固醇比例调整为 1.55 : 1，囊材与药物比例调整为 18.70 : 1。

2.6 芒果苷纳米囊泡最佳处方工艺验证

按最佳处方工艺制备 3 批芒果苷纳米囊泡，测得芒果苷纳米囊泡平均包封率为 $(82.67 \pm 1.19)\%$ ，与预测包封率 83.18% 相比，实测包封率相对偏差为 -0.61% 。测得芒果苷纳米囊泡载药量为 $(4.15 \pm 0.18)\%$ ，粒径为 (318.84 ± 26.46) nm，PDI 值为 (0.124 ± 0.013) ，Zeta 电位为 $-(31.71 \pm 1.87)$ mV。粒径分布和 Zeta 电位分别见图 2。

2.7 芒果苷纳米囊泡的微观形态

取芒果苷纳米囊泡混悬液，滴加至铜网上，采用 1.5% 磷钨酸钠染色，晾干后于透射电镜下观察芒果苷纳米囊泡的外貌，放大倍数为 50 000，结果见图 3。芒果苷纳米囊泡外观呈椭圆形，呈明显的囊泡结构^[18]。

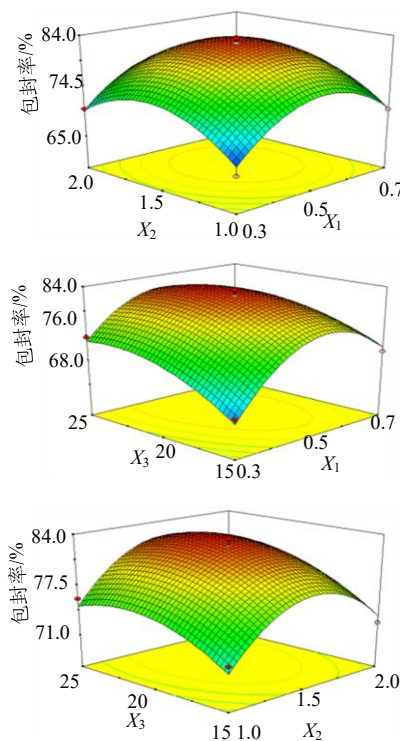


图 1 响应面图

Fig. 1 Graphs of response surface

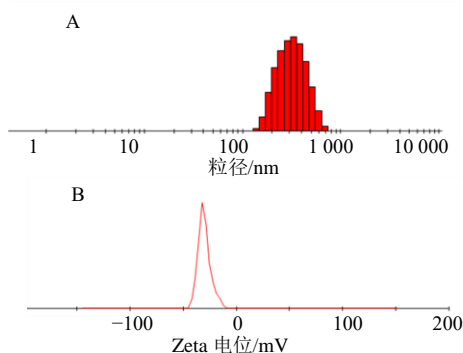


图 2 芒果苷纳米囊泡的粒径分布 (A) 和 Zeta 电位 (B) of mangiferin nanovesicles

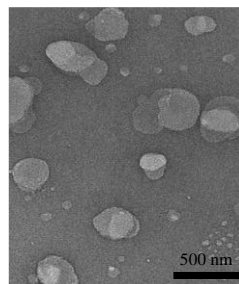


图 3 芒果苷纳米囊泡的外貌 ($\times 50\ 000$)

Fig. 3 Appearance of mangiferin nanovesicles ($\times 50\ 000$)

2.8 芒果苷纳米囊泡冻干粉的制备

取芒果苷纳米囊泡混悬液，使用红色激光笔照射，结果见图 4A，可见一条明显的光路，表现为丁达尔效应。取芒果苷纳米囊泡混悬液，加入 4% 乳糖震荡溶解，分装于西林瓶中，液面高度约 0.8 cm， $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻 3 d，取出立即置于 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥机中，抽真空至 0.3 MPa，冷冻干燥 48 h 后按 $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{h}$ 速度缓慢升温至 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，保持 3 h 后取出，即得芒果苷纳米囊泡冻干粉。芒果苷纳米囊泡混悬液及其冻干粉样品外观分别见图 4B、C。测得芒果苷纳米囊泡冻干粉复溶后的包封率、粒径、PDI 值、Zeta 电位分别为 $(80.77 \pm 1.31)\%$ 、 $(350.16 \pm 33.46)\text{ nm}$ 、 0.150 ± 0.022 、 $-(29.15 \pm 1.63)\text{ mV}$ 。

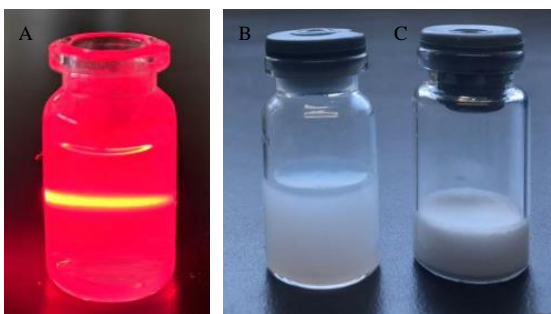


图 4 芒果苷纳米囊泡的丁达尔效应 (A)、芒果苷纳米囊泡混悬液 (B) 及其冻干粉 (C) 外观

Fig. 4 Tyndall effects of mangiferin nanovesicles (A) and appearance of mangiferin nanovesicles suspension (B) and its lyophilized powder (C)

2.9 芒果苷纳米囊泡的体外释药行为研究

取芒果苷原料药和芒果苷纳米囊泡冻干粉，使药物质量为 5 mg，加入适量模拟胃液 (pH 2.0 磷酸盐缓冲液) 制备混悬液，密封于型号 8 000~12 000 透析袋，固定于转篮内部。取 1 000 mL 模拟胃液，温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，转速为 100 r/min，于 15、30、45、60、90、120 min 取样 3 mL，并补 3 mL 模拟胃液。过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜后测定芒果苷的质量浓度，计算累积释放度。同法测定芒果苷和芒果苷纳米囊泡在模拟肠液 (pH 7.4 磷酸盐缓冲液) 的释药情况，取样点为 0.5、1、2、3、4、6、8、12、18 h，结果见图 5。芒果苷纳米囊泡在模拟胃、肠液释放度均高于芒果苷原料药，解决了芒果苷释放度较低的问题，利于增加芒果苷体内吸收程度。

2.10 芒果苷纳米囊泡冻干粉晶型研究

XRPD 扫描条件：扫描角度 (2θ) 和速度分别为 $3^{\circ}\sim 45^{\circ}$ 和 $3^{\circ}/\text{min}$ 。取芒果苷原料药、空白辅料冻

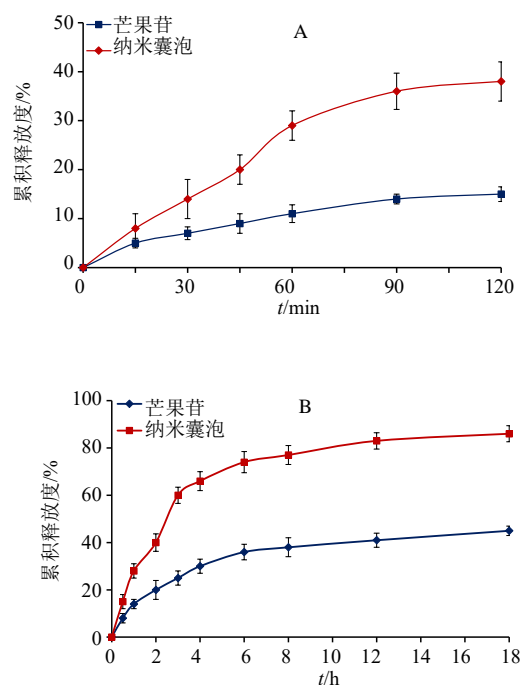


图 5 芒果苷纳米囊泡再模拟胃液 (A) 和肠液 (B) 体外释放曲线 ($n=6$)

Fig. 5 *In vitro* release curve in simulate gastric juice (A) and intestinal juice (B) of mangiferin nanovesicles ($n=6$)

干粉 (不含芒果苷，辅料比例同芒果苷纳米囊泡冻干粉)、物理混合物 (比例同芒果苷纳米囊泡冻干粉)、芒果苷纳米囊泡冻干粉适量，进行 XRPD 扫描，结果见图 6。芒果苷原料药在 10.1° 、 12.2° 、 13.8° 、 16.4° 、 16.5° 、 17.2° 、 19.9° 、 21.3° 、 24.9° 、 25.0° 、 27.4° 处出现特征晶型峰，在物理混合物 XRPD 图谱中仍可见芒果苷在 10.1° 、 21.2° 、 24.9° 、 25.0° 、 27.4° 处特征晶型峰，其他特征晶型峰被辅料掩盖，说明芒果苷与辅料简单混合后并不能对芒果苷晶型产生影响。在芒果苷纳米囊泡冻干粉 XRPD 图谱中，芒果苷特征晶型峰均消失，证明芒果苷由晶型转变为无定形，同时也说明芒果苷纳米囊泡冻干粉是不同于物理混合物的一种物质。

2.11 芒果苷纳米囊泡的稳定性研究

取芒果苷纳米囊泡冻干粉，加入纯化水复溶，过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜 (水性膜)，测定续滤液中芒果苷质量 (m_i)，测定芒果苷总质量 (m_0)，计算渗漏率 [渗漏率 = $(m_0 - m_i) / m_0$]。取芒果苷纳米囊泡冻干粉，密封于药用瓶中，置于恒温恒湿箱中 (湿度为 70%，温度为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$)，分别于 0、1、2、3、6 个月取样，测定渗漏率和粒径，结果见表 4。

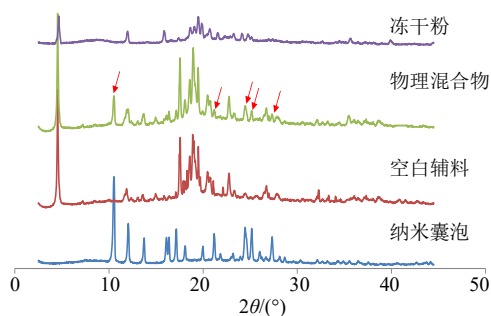


图 6 芒果苷纳米囊泡的 XRPD 结果

Fig. 6 XRPD results of mangiferin nanovesicles

表 4 芒果苷纳米囊泡的渗漏率和粒径变化

Table 4 Change of leakage rate and particle size of mangiferin nanovesicles

时间/月	渗漏率/%	粒径/nm
0	1.16±0.10	354.72±33.45
1	1.32±0.11	348.16±40.71
2	1.28±0.09	361.77±36.79
3	1.57±0.13	366.52±41.44
6	1.84±0.17	363.94±39.68

随着放置时间的延长, 芒果苷纳米囊泡冻干粉的渗漏率总体呈增加趋势, 粒径总体呈增长趋势, 但加速条件下储存 6 个月时, 芒果苷纳米囊泡冻干粉的渗漏率仍小于 2%, 粒径仍小于 400 nm, 说明芒果苷纳米囊泡冻干粉储存稳定性良好。

2.12 芒果苷纳米囊泡大鼠药动学研究

2.12.1 实验设计 取 SD 大鼠, 随机分为芒果苷原料药、物理混合物(芒果苷与辅料比例同芒果苷纳米囊泡冻干粉)和芒果苷纳米囊泡组, 每组 6 只, 雌雄各半。分别取待试样品, 使用 0.5% CMC-Na 水溶液配制混悬液, 按 40 mg/kg ig 给药。芒果苷原料药组和物理混合物组分别于 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12 h 眼眶后静脉丛采血。由于芒果苷纳米囊泡极大地改变了芒果苷药动学行为, 经前期考察后芒果苷纳米囊泡组的取血时间点调整为 0.5、1、2、2.5、3、4、6、8、10、12 h。血样置于含抗凝剂离心管中, 3 000 r/min 离心 4 min, 取血浆于 -20 °C 下冷冻保存。

2.12.2 血浆样品处理^[9] 使用甲醇配制 800 ng/mL 葛根素对照品溶液, 作为内标溶液。血浆样品解冻, 精密取 100 μL 血浆样品、50 μL 内标溶液和甲醇 2 mL 置离心管, 涡旋 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min,

取出上层有机相, 使用 37 °C 氮气吹干, 加 100 μL 甲醇复溶, 密封待测。

2.12.3 标准曲线绘制 配制 2 500、1 000、500、250、100、20 ng/mL 芒果苷对照品溶液, 分别精密取 100 μL 于 37 °C 氮气吹干, 加入 100 μL 空白血浆复溶, 即得相同质量浓度的芒果苷血浆对照品溶液。处理并进样测定, 以葛根素与芒果苷峰面积比为纵坐标, 质量浓度为横坐标回归, 得回归方程为 $Y=0.4108X+0.0726$ ($r=0.9942$), 在 25~2 500 ng/mL 线性良好。

2.12.4 专属性考察 取空白血浆、20 ng/mL 芒果苷对照品血浆和芒果苷纳米囊泡样品 ig12 h 血浆, 样品处理后进样检测, 色谱图见图 7, 可见血浆内源性杂质未对芒果苷、葛根素产生干扰, 专属性高。

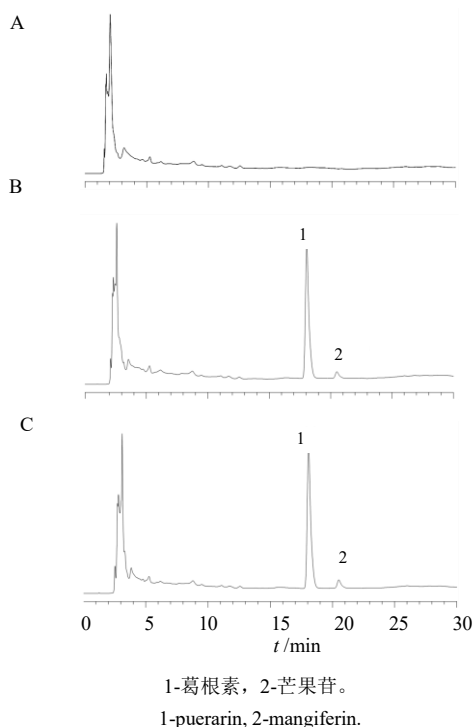


图 7 空白血浆 (A)、芒果苷血浆对照品 (B) 和芒果苷纳米囊泡血浆样品 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of blank plasma (A), mangiferin plasma reference substance (B) and mangiferin nanovesicles plasma samples (C)

2.12.5 稳定性实验 取芒果苷质量浓度为 500 ng/mL 质控样品(含葛根素内标), 置于 -20 °C 冰箱, 分别于 0、3、6、9、12、15 d 取样处理, 计算得芒果苷质量浓度的 RSD 值为 5.49%, 表明血浆样品在 -20 °C 温度中 15 d 内稳定性良好。取芒果苷质量浓度为 500 ng/mL 质控样品(含葛根素), 处理得

质控样品溶液,置于室温,分别于 0、2、4、8、12、24 h 测定,计算得芒果苷质量浓度的 RSD 值为 7.17%,表明血浆样品溶液在室温环境中基本稳定。

2.12.6 精密度和准确度实验 配制芒果苷质量浓度分别为 25、500、2 500 ng/mL 质控样品(含葛根素内标),处理后连续测定 6 次,采用随行标准曲线计算,计算得芒果苷质量浓度的 RSD 值分别为 8.01%、3.90%、5.58%;将测得的质量浓度与配制质量浓度相比计算准确度,结果显示 25、500、2 500 ng/mL 准确度分别为 99.40%、96.74%、104.16%,表明日内精密度良好且准确度较高。25、500、2 500 ng/mL 各个质量浓度测定 6 d,每天测定 1 次,采用随行标准曲线计算得芒果苷质量浓度的 RSD 值分别为 5.73%、8.24%、6.90%,计算得准确度分别为 104.43%、103.01%、105.10%,表明日间精密度良好且准确度较高。

2.12.7 提取回收率实验 取空白血浆,加入芒果苷对照品适量,分别配制成质量浓度分别为 25、500、2 500 ng/mL(均含葛根素内标),各质量浓度均 6 份,进样测定,记录葛根素与芒果苷峰面积(a)。采用空白血浆分别配制 25、500、2 500 ng/mL 质控样品(均含葛根素内标),各质量浓度均 6 份,处理后分别测定,记录葛根素与芒果苷峰面积(b)。按公式提取回收率= b/a 计算提取回收率,结果显示,25、500、2 500 ng/mL 芒果苷提取回收率分别为 96.77%、104.71%、95.69% ($n=3$),RSD 值依次为 4.44%、6.38%、5.82%。

2.12.8 计算方法 测定芒果苷和葛根素峰面积,计算葛根素与芒果苷峰的面积比值,带入回归方程 $Y=0.4108X+0.0726$,计算出芒果苷的质量浓度。

2.12.9 体内药动学结果 芒果苷原料药、物理混合物、芒果苷纳米囊泡的药-时曲线见图 8,DAS2.0 软件非房室模型计算药动学参数,见表 5。与芒果苷原料药相比,物理混合物组 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 显著增加 ($P<0.05$),主要与聚山梨酯 80 促吸收作用有关^[14-15],相对生物利用度增加至 1.45 倍。芒果苷纳米囊泡的 t_{max} 显著延后至 (2.57 ± 0.72) h, $t_{1/2}$ 显著延长至 (5.11 ± 0.84) h, C_{max} 显著增加 3.54 倍,可见芒果苷纳米囊泡极大改变了芒果苷的药动学行为,芒果苷纳米囊泡相对大鼠 ig 吸收生物利用度提高至 5.30 倍。

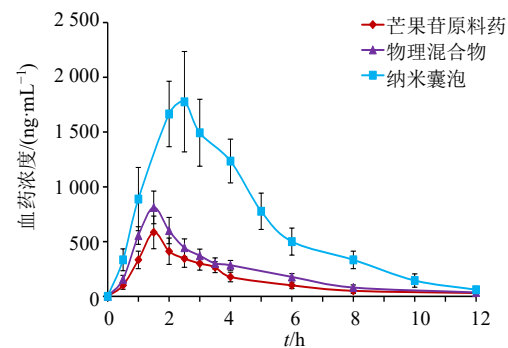


图 8 芒果苷纳米囊泡的药-时曲线 ($n=6$)

Fig. 8 Drug-time curves of mangiferin nanovesicles ($n=6$)

表 5 主要药动学参数 ($n=6$)

Table 5 Main pharmacokinetic parameters ($n=6$)

参数	单位	芒果苷原料药	物理混合物	芒果苷纳米囊泡
t_{max}	h	1.43 ± 0.39	1.35 ± 0.34	$2.57\pm 0.72^*$
C_{max}	$ng\cdot mL^{-1}$	412.60 ± 94.25	$812.13\pm 207.28^*$	$1\ 458.67\pm 489.03^{**}$
$t_{1/2}$	h	2.66 ± 0.70	2.81 ± 0.87	$5.11\pm 0.84^{**}$
AUC_{0-t}	$ng\cdot mL^{-1}\cdot h^{-1}$	$1\ 072.53\pm 189.04$	$1\ 552.77\pm 280.49^*$	$5\ 679.48\pm 841.96^{**}$
$AUC_{0-\infty}$	$ng\cdot mL^{-1}\cdot h^{-1}$	$1\ 113.72\pm 201.16$	$1\ 616.09\pm 300.24^*$	$5\ 782.33\pm 991.81^{**}$

与芒果苷原料药组相比: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs mangiferin raw material group.

3 讨论

采用薄膜分散法制备芒果苷纳米囊泡时,类脂成膜不均匀,水化时难以形成囊泡,且底部有沉淀出现,说明该法不适合制备芒果苷纳米囊泡,故本研究采用乙醇注入法制备芒果苷纳米囊泡。芒果苷属于难溶性药物,直接采用超滤离心法测定包封率

或载药量时,未包封的芒果苷和芒果苷纳米囊泡均可能被超滤膜截留,药物与囊泡无法有效分离,导致包封率或载药量测定结果偏高。本研究先将芒果苷囊泡混悬液经 $0.45\ \mu m$ 微孔滤膜除去未包封的药物,再采用超滤离心法测定芒果苷纳米囊泡包封率或载药量,可使测定结果更准确。前期曾考虑将包

封率、载药量、粒径作为综合指标筛选芒果苷纳米囊泡处方,但得到最优处方的包封率不足 80%,低于《中国药典》2020 年版四部 9014 微粒制剂指导原则中包封率大于 80%的要求。考虑到包封率影响纳米制剂的安全性、有效性,故在设计 Box-Behnken 响应面法时仅将包封率作为优化指标。

芒果苷在 pH 4.5 磷酸盐缓冲液中稳定性最高,故选择 pH 4.5 磷酸盐缓冲液作为制备芒果苷纳米囊泡的水相。前期考察发现,芒果苷纳米囊泡包封率随着芒果苷质量浓度的增加呈先增加后下降趋势,可能是一定的质量浓度梯度利于增加芒果苷纳米囊泡的包封率^[16],但药物的质量浓度过大时,超过了囊泡的载药能力,故包封率下降,结合预实验考察情况,选择药物质量浓度区间 0.3~0.7 mg/mL 继续优化。芒果苷纳米囊泡包封率随着聚山梨酯 80 与胆固醇比例的增加呈现先增加后下降趋势,可能是胆固醇比例较小时,囊泡结构稳定性较差,导致药物易泄漏;胆固醇比例较大时,囊泡的膜曲率变小,影响了囊泡的容纳空间^[16],故包封率下降,结合预实验考察情况选择对聚山梨酯 80 与胆固醇比例 1:1~2:1 继续优化。芒果苷纳米囊泡包封率随着囊材与药物比例的增加呈逐渐增加后趋稳,增加囊材用量利于增加包封率,但考虑到囊材用量过大会使芒果苷纳米囊泡载药量下降^[10],结合预实验的考察情况,故选择囊材与药物比例 15:1~25:1 继续优化。

芒果苷在模拟胃、肠液中释放度均极低,可能是由于芒果苷原料药粒度大、疏水性强^[9]、易发生降解^[5, 17]等因素有关。芒果苷纳米囊泡在模拟胃肠液中药物累积释放度均明显增加,可能是由于药物包载于芒果苷纳米囊泡后增加了药物溶解度和在胃肠液中稳定性^[18]。芒果苷纳米囊泡对包裹于内部药物的存在形式也产生了较大影响,使芒果苷由晶型状态转变为无定形状态,而无定形状态的药物往往具有较快的溶出速率和溶出度^[10, 19]。

芒果苷纳米囊泡的 t_{max} 发生显著延后,且 $t_{1/2}$ 也得到显著延长,可能是由于芒果苷在胃肠道中稳定性较差,且受肠道菌群代谢严重^[17],制成芒果苷纳米囊泡利于提高芒果苷的稳定性,故使后期血药浓度增加,进而对芒果苷 t_{max} 和 $t_{1/2}$ 产生较大影响。芒果苷纳米囊泡的 C_{max} 、相对口服吸收生物利用度分别增加至 3.54、5.30 倍,可能与芒果苷纳米囊泡增加了芒果苷的溶解度、提高了释放度、降低芒果苷

在胃肠道中的降解几率等因素有关,解决了吸收瓶颈^[20-21];聚山梨酯 80 可抑制 P-糖蛋白对芒果苷的外排作用^[14],利于增加芒果苷口服吸收量。可见芒果苷纳米囊泡有效促进了芒果苷的体内吸收,为充分发挥药理活性奠定了坚实基础,后续需对芒果苷纳米囊泡毒理、药效等进行研究,期望为评估芒果苷纳米囊泡成药性和临床应用提供参考资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈煜,张雪映,王烁今,等. 芒果苷的药理作用研究进展 [J]. 海峡药学, 2019, 31(6): 31-33.
- [2] 宋红岩,王树根,李梦冉,等. 芒果苷单钠盐对高胆固醇血症大鼠肝脂质代谢及 PCSK9/LDLR 途径的影响 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(8): 1843-1849.
- [3] 林华,候亮,高丽辉,等. 芒果苷与别嘌醇长期毒性比较研究 [J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(16): 16-22.
- [4] 邢宇航. 负载芒果苷凝胶体系的构建及其对银屑病治疗效果的初探 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [5] Samadarsi R, Dutta D. Anti-oxidative effect of mangiferin-chitosan nanoparticles on oxidative stress-induced renal cells [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 151(2): 36-46.
- [6] 何倩梅,李丹,邱昆成,等. 单向在体肠灌流模型研究 P-gp 和 MRP2 抑制剂对芒果苷肠吸收的影响 [J]. 中药药理与临床, 2016, 32(4): 35-38.
- [7] Li Y J, Sui Y J, Dai Y H, et al. LC determination and pharma cokinetics study of mangiferin in rat plasma and tissues [J]. *Chromatographia*, 2008, 67(11-12): 957-960.
- [8] 轩肖玉,王亚静,张伟玲,等. 芒果苷自微乳给药系统的制备及其大鼠体内药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 166-170.
- [9] 吕东霞,禹瑞,屈战果,等. 芒果苷固体脂质纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2020, 42(11): 2835-2839.
- [10] 李伟宏,高娟,王风云,等. 橘红素 2 种脂质纳米粒的制备、表征和口服吸收生物利用度评价 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8031-8042.
- [11] 廉唱唱,周梅,彭成军,等. 磷脂种类对吡啶菁绿脂质体制剂学性质的影响 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(3): 524-530.
- [12] 牛艳玲,张芬,姚倩,等. RAFT-PISA 制备聚合物囊泡及在药物输送领域的应用 [J]. 化学研究与应用, 2021, 33(11): 2096-2103.
- [13] 李秋艳,谢鹏. 奈帕芬胺纳米混悬滴眼剂的制备及其性能评价 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(11): 2799-2807.

- [14] Ren Y, Nie L, Zhu S, *et al.* Nanovesicles-mediated drug delivery for oral bioavailability enhancement [J]. *Int J Nanomed*, 2022, 17(10): 4861-4877.
- [15] 吕大庆. 红花黄色素囊泡的制备及药代动力学研究 [D]. 青岛: 青岛科技大学, 2015.
- [16] 王美丽, 唐静, 方晓东, 等. 冬凌草甲素类脂囊泡制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2023, 45(10): 3387-3391.
- [17] 叶美麟. 芒果苷固体分散体及其包合物的制备和表征 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2017.
- [18] Ali M A, Mohamed M I, Megahed M A, *et al.* Cholesterol-based nanovesicles enhance the *in vitro* cytotoxicity, *ex vivo* intestinal absorption, and *in vivo* bioavailability of flutamide [J]. *Pharmaceutics*. 2021, 13(11): 1741-1762.
- [19] 尚慧杰, 王颖慧, 郝海军. 三叶苷-磷脂复合物处方工艺优化及理化性质的初步研究 [J]. *化学研究与应用*, 2024, 36(11): 2724-2730.
- [20] 徐传锡, 王志强, 孙勇兵. 7-乙基-10-羟基喜树碱新型给药系统的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(7): 1793-1797.
- [21] AbuElfadl A, Boughdady M, Meshali M. New Peceol™/Span™ 60 Niosomes coated with chitosan for candesartan cilexetil: Perspective increase in absolute bioavailability in rats [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16(8): 5581- 5601.

【责任编辑 解学星】