

二氢杨梅素混合胶束的制备、表征及药动学研究

杨 璞¹, 李 晓¹, 宋亚琼¹, 穆卫卫¹, 薛晓菲¹, 陈四清^{1, 2*}

1. 郑州澍青医学高等专科学校, 河南 郑州 450064

2. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 制备二氢杨梅素混合胶束(DMY-MMs), 考察口服药动学行为, 并计算口服吸收相对生物利用度。方法 通过单因素试验确定主要影响因素的筛选区间, Box-Behnken设计-响应面法优化DMY-MMs处方。透射电镜观察DMY-MMs微观形态, X-射线粉末衍射法分析晶型, 透析法考察DMY-MMs体外释药行为。SD大鼠分别ig给予二氢杨梅素和DMY-MMs, 比较药动学行为和吸收相对生物利用度。结果 DMY-MMs最佳处方为: 载-药用量比为7.6:1, Soluplus与TPGS用量比为6.4:1, 水化时间为2 h。包封率、载药量、粒径及Zeta电位分别为(90.21±1.60)%、(10.43±0.21)%、(68.14±7.23) nm和(1.07±0.26) mV。DMY-MMs外貌为类球形, 并以无定形态存在于DMY-MMs冻干粉中。DMY-MMs体外释药行为符合Weibull模型, 释药方程为 $\ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.6397 \ln t - 1.7811$ ($r = 0.9784$)。药动学结果显示, DMY-MMs半衰期($t_{1/2}$)延长至(4.11±1.07) h, $C_{\max}$ 增加至4.41倍, 相对生物利用度提高至5.18倍。结论 DMY-MMs改变了二氢杨梅素体内药动学行为, 显著促进了口服吸收。

关键词: 二氢杨梅素; 混合胶束; 药动学; 生物利用度; 口服吸收

中图分类号: R945

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2024)10-2351-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.10.015

Dihydromyricetin mixed micelles: Preparation characterization and pharmacokinetic study

YANG Pu¹, LI Xiao¹, SONG Yaqiong¹, MU Weiwei¹, XUE Xiaofei¹, CHEN Siqing^{1,2}

1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China

2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To prepare dihydromyricetin mixed micelles (DMY-MMs), and evaluate oral pharmacokinetic behavior and calculate its relative oral bioavailability. **Methods** Single factor tests were used to determine the screening interval of the main influencing factors, and Box-Behnken design-response surface methodology was employed to optimize prescriptions of DMY-MMs. Transmission electron microscope (TEM) was employed to observe its microscopic appearance. Crystal form of lyophilized powder was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD). Release behavior of DMY-MMs *in vitro* was investigated by dialysis method. SD rats in each group were administered intragastrically with dihydromyricetin and DMY-MMs, respectively. Pharmacokinetics and relative bioavailability were also compared. **Results** Optimal formulation of DMY-MMs: carrier to drug ratio was 7.6:1, Soluplus to TPGS ratio was 6.4:1, and hydration time was 2 h. Envelopment efficiency, drug loading, particle size and Zeta potential were (90.21±1.60)%, (10.43±0.21)%, (68.14±7.23) nm and (1.07±0.26) mV, respectively. Appearance of DMY-MMs was spherical, dihydromyricetin changed into an amorphous form in DMY-MMs lyophilized powder. Release behavior *in vivo* of DMY-MMs was in accordance with Higuchi model, and drug release equation was $\ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.6397 \ln t - 1.7811$ ($r = 0.9784$). Pharmacokinetics of DMY-MMs showed that $t_{1/2}$ was prolonged to (4.11±1.07) h, $C_{\max}$ was enhanced to 4.41-fold and oral relative bioavailability was increased to 5.18-fold. **Conclusion** DMY-MMs changed pharmacokinetic behavior of dihydromyricetin *in vivo* and significantly promoted its oral absorption.

Key words: dihydromyricetin, mixed micelles, pharmacokinetic; relative bioavailability; oral absorption

收稿日期: 2024-01-15

基金项目: 河南省2023年度科技攻关项目(232102310104); 2024年郑州市高等教育教学改革研究与实践项目(2024KCSZ013)

第一作者: 杨 璞(1989—), 学士, 讲师, 从事临床药学与基础医学研究。E-mail: yangpu9129@126.com

*通信作者: 陈四清(1966—), 学士, 教授, 从事药物研发研究。E-mail: hn890320@163.com

二氢杨梅素又名白藜素,主要存在于蛇葡萄科葡萄属植物中,藤茶中的含量最高,属于二氢黄酮醇类化合物,具有抗炎、降血压、调血脂、抗肿瘤等活性^[1-3]。二氢杨梅素还可用于新型冠状病毒肺炎^[4]及传染性非典型肺炎^[5]的治疗。二氢杨梅素溶解度较低^[6],属于生物药剂学分类系统中II类药物^[7],在体内受P-糖蛋白外排、消化酶降解等影响^[8-9],导致其口服吸收极差(生物利用度仅4.02%)^[10]。目前二氢杨梅素有自微乳^[11]、脂质纳米粒^[12-13]、固体分散体^[6]等研究,但自微乳处方组成复杂,含有大量表面活性剂,易引起胃肠道不适;脂质纳米粒存在制备工艺繁琐、载药量低、稳定性差等问题;固体分散体存在易吸潮、稳定性差、血药浓度波动幅度大等缺陷。

胶束系两亲性聚合物载体在水相中通过自组装行为形成粒径小于100 nm的纳米粒,但单一聚合物构建的胶束存在载药量不高、药物控释效果不佳、促吸收作用有限、储存稳定性差等缺陷^[14-15]。采用2种或2种以上聚合物构建的混合胶束(MMs)可改善单一聚合物胶束这些缺陷,临床推广意义更大^[16]。二氢杨梅素是P-糖蛋白底物^[9],D- α -维生素E聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS)可抑制P-糖蛋白活性^[16-17],混合胶束处方中引入适量TPGS利于增加二氢杨梅素体内吸收,但TPGS临界胶束浓度较高(249 mg·L⁻¹)^[17],药物有泄露的风险。聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物(Soluplus)具有较低的临界胶束浓度(7.6 mg·L⁻¹)^[17],可弥补TPGS胶束浓度较高的缺陷。本研究采用TPGS和Soluplus作为载体制备二氢杨梅素混合胶束(DMY-MMs),并对体外性质及体内药动学进行考察,期望为二氢杨梅素或其他难溶性药物研究及开发提供思路。

1 材料

1.1 仪器

5F-101S系列集热式恒温磁力搅拌器(常州德普纺织科技有限公司);1200型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);RE-52CS旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);MS105DU分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);Zetasizer Nono ZS-90型粒度测定仪(英国马尔文公司);DZ5/500型西林瓶轧盖机(长沙步源制药机械设备有限公司);SN-P150超声波细胞粉碎机(广东洁盟超声实业有限公司);RT61212型溶出仪(深圳市锐拓仪器设备有限公司);MXW型涡旋仪(杭州齐威仪器有限公司);

JEM-2100透射电子显微镜(日本JEOL公司);AYAN-DC48S型氮吹仪(杭州安研仪器制造有限公司);GL-25MS超速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);FD-1D-80型真空冷冻干燥机(江苏天翎仪器有限公司);LHS-150SC恒温恒湿箱(上海康路仪器设备有限公司);FD-1A50真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)等。

1.2 试剂

二氢杨梅素对照品(批号20211202,质量分数98.6%,四川精萃天成药物科技有限公司);二氢杨梅素原料药(批号200510,质量分数97.0%,湖北常奥药业有限公司);芹菜素对照品(批号k188655,质量分数99.2%,西安开来生物工程有限公司);TPGS(批号20211208,武汉国邦达药业有限责任公司);Soluplus(批号20220101,陕西昌吉辅生物科技有限公司);乳糖(批号P201015,河北科隆多生物科技有限公司);甘露醇(批号20210525,寿光华力糖醇有限公司)。

1.3 动物

清洁级SD大鼠,体质量为(220±20)g,雌雄兼具,购自河南省实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK-2020-0001。动物实验经郑州澍青医学高等专科学校伦理委员会批准,批准号:2023-SQL1-EC-20230915-1007-0000001。

2 方法与结果

2.1 DMY-MMs混悬液的制备

取处方量Soluplus和TPGS溶于5 mL三氯甲烷,另取二氢杨梅素20 mg溶于5 mL无水乙醇中,两者合并至圆底烧瓶中,600 r·min⁻¹磁力搅拌1 h使二氢杨梅素和载体充分融合。减压旋蒸至形成薄膜(无醇味),置40℃水浴中,加入恒温至40℃的蒸馏水20 mL,600 r·min⁻¹磁力搅拌使之水化,水化一定时间后于200 W超声功率下超声10 min。采用微孔滤膜(0.22 μ m)滤过,续滤液即为DMY-MMs混悬液,补加蒸馏水至20 mL。不含二氢杨梅素的阴性样品同法制备。

2.2 DMY-MMs混悬液含量测定

2.2.1 色谱条件 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(65:35);检测波长为290 nm;色谱柱为Diamonsil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μ m);柱温为30℃;进样量为10 μ L;体积流量为1.0 mL·min⁻¹。

2.2.2 二氢杨梅素对照品配制及标准曲线 精密称二氢杨梅素对照品25 mg置于50 mL量瓶中,加入约40 mL乙腈超声30 s溶解(功率为200 W、频率

为40 kHz),乙腈稀释定容即得二氢杨梅素对照品储备液($0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。取适量,继续稀释成8.00、4.00、1.00、0.40、0.10、0.05 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,测定各质量浓度的峰面积,回归后得方程: $Y=13.6927X+6.1404$ ($r=0.9999$),表明二氢杨梅素线性范围为0.05~8.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.3 DMY-MMs 供试品溶液的制备 取DMY-MMs混悬液1 mL至100 mL量瓶中,加入60 mL乙腈超声30 s,加乙腈定容。过0.22 μm 微孔滤膜,取5 mL续滤液至10 mL量瓶,加乙腈-0.1%磷酸水溶液(65:35)稀释定容。不含二氢杨梅素的阴性样品的供试品溶液同法制备。

2.2.4 专属性考察 取二氢杨梅素对照品溶液,“2.2.3”项下DMY-MMs供试品和阴性样品溶液,分别测定HPLC图谱,见图1,表明专属性较高。理论塔板数按二氢杨梅素计不低于7 000。

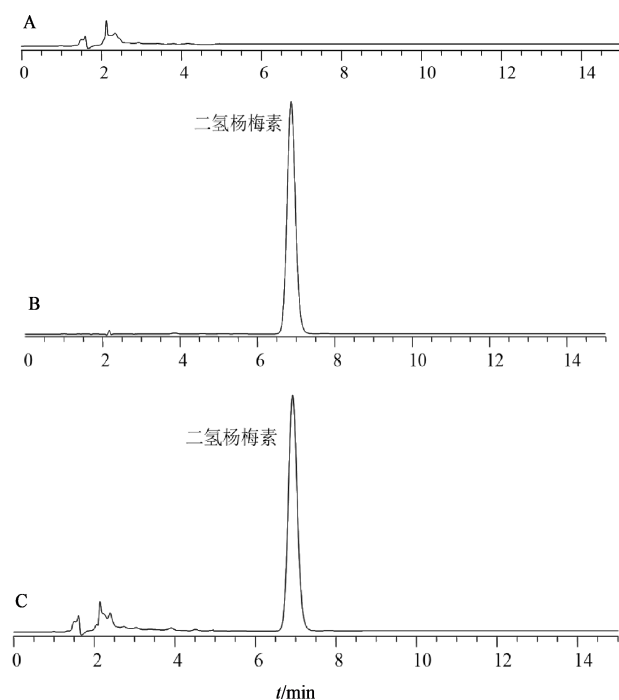


图1 阴性样品(A)、对照品(B)和供试品溶液(C)的HPLC图
Fig. 1 HPLC spectrum of negative sample (A), reference substance (B) and sample solution (C)

2.2.5 重复性考察 取DMY-MMs混悬液平行制备6份供试品,分别进样测定。二氢杨梅素质量分数RSD为1.10% ($n=6$),表明重复性良好。

2.2.6 精密度考察 取质量浓度为0.05、1.00、8.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,分别测定6次。低、中、高浓度峰面积RSD值分别为0.22%、0.67%和0.53% ($n=6$),表明精密度良好。

2.2.7 稳定性考察 取DMY-MMs供试品溶液分别于0、2、4、8、12、24 h测定。二氢杨梅素质量分数RSD值为0.85% ($n=6$),表明稳定性良好。

2.2.8 回收率考察 分别取DMY-MMs混悬液0.5 mL至100 mL量瓶中,共9份,分为低、中、高质量浓度3组,分别加入“2.2.2”项下质量浓度为0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的二氢杨梅素对照品储备液0.5、1.0、1.5 mL,分别制备供试品溶液后进样测定。平均加样回收率为99.08%,RSD为1.69% ($n=6$)。

2.3 DMY-MMs 指标测定方法

精密取DMY-MMs混悬液1 mL,按“2.2.3”项方法测定DMY-MMs中总药量($m_{\text{总药量}}$)。另精密取DMY-MMs混悬液1 mL至超滤离心管(截留相对分子质量3 000),10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min(半径6.8 cm),测定游离药量($m_{\text{游离}}$)。精密取DMY-MMs混悬液1 mL于 -40°C 温度下预冻2 d,取出直接冷冻干燥,称质量($m_{\text{总}}$)。

$$\text{DMY-MMs 载药量} = (m_{\text{总药量}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{总}}$$

$$\text{DMY-MMs 包封率} = (m_{\text{总药量}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{总药量}}$$

取0.1 mL的DMY-MMs混悬液加入蒸馏水4 mL,混匀,各样品均平行制备3份,于激光粒度上测定DMY-MMs粒径、聚合物分散性指数(PDI)值和Zeta电位。

2.4 单因素考察DMY-MMs 处方工艺

2.4.1 载-药用量比考察 二氢杨梅素投药量为20 mg、Soluplus和TPGS比例为8:1、水化时间为2 h条件下分别考察载-药用量比对DMY-MMs的影响,见表1。随着载-药用量比的增加DMY-MMs包封率随之增加,说明增加载体用量利于增加包封率;而DMY-MMs载药量呈现先下降后增加,然后再下降的趋势,说明载体用量过大时会造成材料浪费,进而影响DMY-MMs载药量。因此载-药用量比对DMY-MMs包封率和载药量影响较大,以载-药用量比8:1为中心,对两者用量比6:1~10:1继续进行优化。

2.4.2 Soluplus 和 TPGS 用量比的考察 在二氢杨

表1 载-药用量比的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of carrier to drug ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

载-药用量比	包封率/%	载药量/%
4:1	56.29 $\pm$ 0.97	10.70 $\pm$ 0.14
6:1	63.45 $\pm$ 1.12	8.52 $\pm$ 0.10
8:1	79.71 $\pm$ 1.04	8.93 $\pm$ 0.15
10:1	91.89 $\pm$ 1.48	8.15 $\pm$ 0.17
12:1	92.46 $\pm$ 1.63	7.09 $\pm$ 0.13

梅毒投药量为20 mg,载-药用量比为8:1,水化时间为2 h条件下,考察 Soluplus 和 TPGS 用量比的影响,见表2。随着 Soluplus 比例的减少,DMY-MMs 包封率和载药量呈现先增加后下降趋势,可能是由于不同 Soluplus 和 TPGS 用量比形成胶束的稳定性存在一定差异^[18],进而影响了 DMY-MMs 载药。可见 Soluplus 和 TPGS 比例对 DMY-MMs 影响较大,以 Soluplus 和 TPGS 用量比6:1为中心,后续对两者用量比4:1~8:1进行优化。

表2 Soluplus 和 TPGS 用量比的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effects of Soluplus to TPGS ratio($\bar{x}\pm s, n=3$)		
Soluplus 和 TPGS 用量比	包封率/%	载药量/%
10:1	81.18±0.96	9.12±0.22
8:1	80.46±1.07	8.79±0.17
6:1	85.99±1.03	9.58±0.21
4:1	79.17±1.35	8.70±0.15
2:1	75.54±1.40	7.97±0.11

2.4.3 水化时间的考察 在二氢杨梅素投药量为20 mg,载-药用量比为8:1, Soluplus 和 TPGS 用量比6:1条件下,考察水化时间的影响,见表3。DMY-MMs 包封率和载药量随着水化时间的延长呈先增加后下降趋势,可能是 Soluplus 和 TPGS 充分水化需要一定时间^[19],进而提高 DMY-MMs 载药效率;但水化时间过长不仅可能影响载体材料的稳定性,也可能影响 DMY-MMs 的结构稳定性^[12,16]。可见水化时间对 DMY-MMs 影响较大,以水化时间2 h为中心,后续对水化时间1~3 h继续优化。

表3 水化时间的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effects of hydration time ($\bar{x}\pm s, n=3$)		
水化时间/h	包封率/%	载药量/%
0.5	75.96±1.28	8.64±0.22
1.0	84.17±1.08	9.89±0.19
2.0	91.23±1.65	10.28±0.25
3.0	88.78±1.43	10.02±0.18
4.0	83.54±1.17	9.40±0.19

2.5 Box-Behnken 响应面法优化 DMY-MMs 混悬液处方工艺

2.5.1 实验方案 预实验研究结果显示,载-药用量比(X_1)、Soluplus 与 TPGS 用量比(X_2)和水化时间(X_3)对 DMY-MMs 包封率(Y_1)和载药量(Y_2)影响较大,各个因素的低(-1)、中(0)、高(1)水平设置情况见表4。采用 Box-Behnken 响应面设计3因素3水

平的优化实验,并按“2.3”项下方法测定 DMY-MMs 包封率及载药量。不同 DMY-MMs 处方组合及测定结果见表5。

表4 各因素及其水平设置

Table 4 Different factors and its levels

因素	水平		
	-1	0	1
载-药用量比(X_1)	6:1	8:1	10:1
Soluplus 与 TPGS 用量比(X_2)	4:1	6:1	8:1
水化时间(X_3)/h	1	2	3

表5 优化实验结果($n=3$)Table 5 Optimize experimental results ($n=3$)

序号	X_1	X_2	X_3 /h	Y_1 /%	Y_2 /%
1	10:1	6:1	3	92.72	8.33
2	6:1	4:1	2	75.94	10.57
3	8:1	6:1	2	91.37	9.95
4	8:1	4:1	1	79.81	8.61
5	8:1	8:1	3	82.92	9.17
6	10:1	4:1	2	85.48	7.67
7	6:1	6:1	3	77.24	10.89
8	8:1	6:1	2	92.22	10.23
9	8:1	6:1	2	90.84	10.06
10	8:1	6:1	2	90.44	10.18
11	8:1	4:1	3	79.25	8.56
12	8:1	8:1	1	83.72	9.27
13	10:1	8:1	2	91.90	8.24
14	8:1	6:1	2	91.68	10.21
15	6:1	6:1	1	80.54	10.97
16	6:1	8:1	2	78.75	10.89
17	10:1	6:1	1	86.23	7.82

2.5.2 模型的建立以及分析 利用 DesignExpert V10.0.7 版本拟合,得 DMY-MMs 包封率 Y_1 回归方程为: $Y_1 = 91.31 + 5.48 X_1 + 2.10 X_2 + 0.23 X_3 + 0.90 X_1 X_2 + 2.45 X_1 X_3 - 0.06 X_2 X_3 - 2.77 X_1^2 - 5.52 X_2^2 - 4.36 X_3^2$, 其中 R^2 和 $\text{adj}R^2$ 分别为 0.991 0 和 0.979 5, 均大于 0.97。DMY-MMs 载药量 Y_2 回归方程为: $Y_2 = 10.13 - 1.41 X_1 + 0.27 X_2 + 0.04 X_3 + 0.06 X_1 X_2 + 0.15 X_1 X_3 - 0.01 X_2 X_3 - 0.09 X_1^2 - 0.69 X_2^2 - 0.53 X_3^2$, 其中 R^2 和 $\text{adj}R^2$ 分别为 0.994 1 和 0.986 5, 均大于 0.98。方差分析结果见表6, Y_1 和 Y_2 模型 P 值均具极显著性差异($P < 0.01$), 且失拟项均无统计学意义($P > 0.05$), 因此该数学模型可用于 DMY-MMs 混悬液处方研究。方程 Y_1 的 X_1 、 X_2 、 $X_1 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 均具极显著性差异($P < 0.01$); 方程 Y_2 的 X_1 、 X_2 、 X_2^2 和 X_3^2 均

表6 方差分析
Table 6 Analysis of variance

项目	自由度	Y ₁		Y ₂	
		F值	P值	F值	P值
模型	9	85.84	<0.000 1	130.46	<0.000 1
X ₁	1	326.00	<0.000 1	928.98	<0.000 1
X ₂	1	47.89	0.000 2	34.19	0.000 6
X ₃	1	0.57	0.475 8	0.57	0.473 2
X ₁ X ₂	1	4.42	0.073 7	0.92	0.370 4
X ₁ X ₃	1	32.48	0.000 7	5.10	0.048 5
X ₂ X ₃	1	0.02	0.892 8	0.04	0.853 6
X ₁ ²	1	43.72	0.000 3	2.08	0.192 7
X ₂ ²	1	174.25	<0.000 1	118.10	<0.000 1
X ₃ ²	1	108.51	<0.000 1	69.79	<0.000 1
残差	7				
失拟项	3	2.20	0.230 1	1.50	0.342 1
纯误差	4				
总差	16				

具极显著性差异($P<0.01$),而 X_1X_3 具显著性差异($P<0.05$)。

2.5.3 响应面分析及优化结果 响应面图见图2。随着载-药用量比、Soluplus与TPGS用量比及水化时间其中两因素的增加,DMY-MMs包封率均呈先增大后减小趋势。随着载-药用量比的增加DMY-MMs载药量逐渐下降,随着Soluplus与TPGS用量比和水化时间的增加DMY-MMs载药量呈先增加后下降趋势,说明这3个影响因素对DMY-MMs包封率影响较大,进行处方筛选也是非常必要的。将包封率和载药量望大值作为优化目标,得DMY-MMs最佳处方:载-药用量比为7.54:1,Soluplus与TPGS用量比6.35:1,水化时间为1.98 h,预测包封率为90.1%,预测载药量10.5%。

2.6 DMY-MMs最佳处方确定及验证

考虑到实际操作便捷性,DMY-MMs最佳处方的载-药用量比调整为7.6:1,Soluplus与TPGS用量

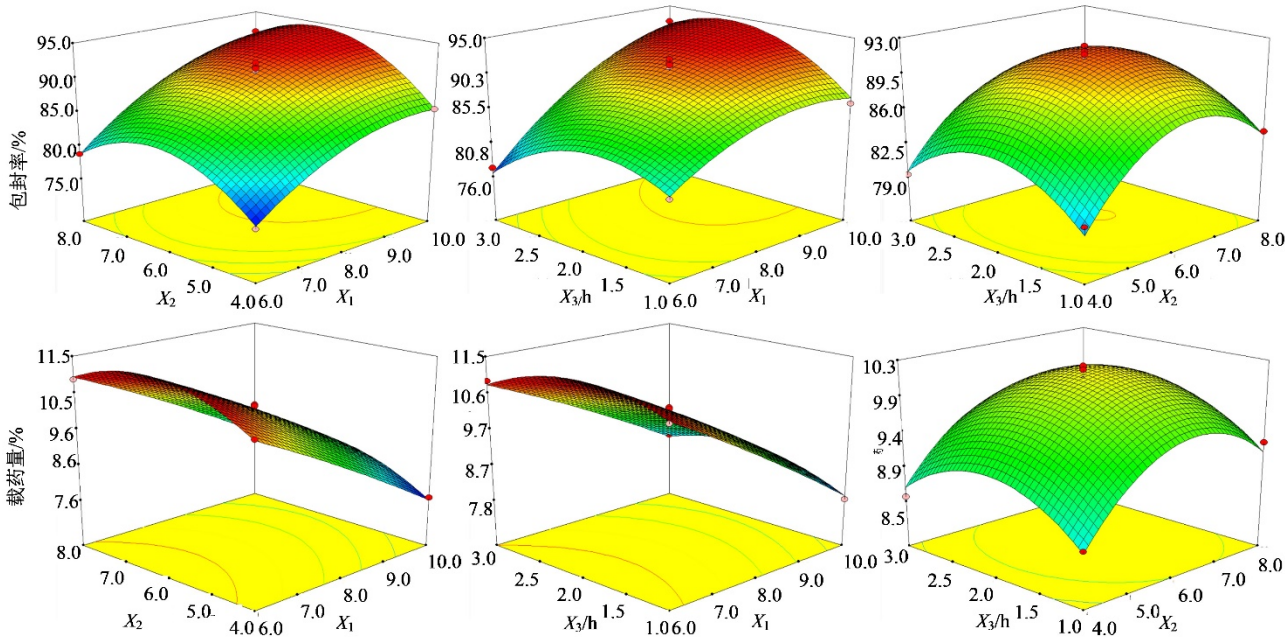


图2 包封率和载药量的响应面图
Fig. 2 Response surface diagram of envelopment efficiency and drug loading

比调整为6.4:1,水化时间调整为2 h。平行制备3批DMY-MMs,按“2.3”项下操作,测得平均包封率为 $(90.21\pm1.60)\%$,载药量为 $(10.43\pm0.21)\%$ 。以预测值为参考,分别计算包封率和载药量相对偏差[相对偏差=(实际值-预测值)/预测值],结果显示包封率和载药量相对偏差分别为0.12%和-0.67%,绝对值均小于1%,表明构建的数学模型可信度较高。另测得DMY-MMs平均粒径为 (68.14 ± 7.23) nm,PDI为

0.112 ± 0.014 ,粒径分布见图3;Zeta电位为 (1.07 ± 0.26) mV,见图4。

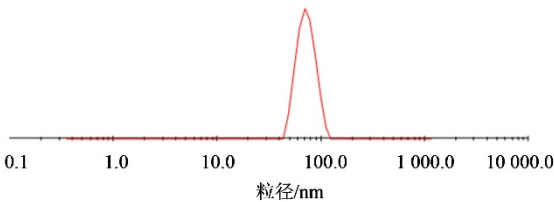


图3 粒径分布图
Fig. 3 Chart of particle size distribution

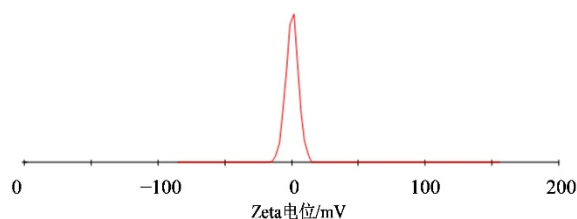
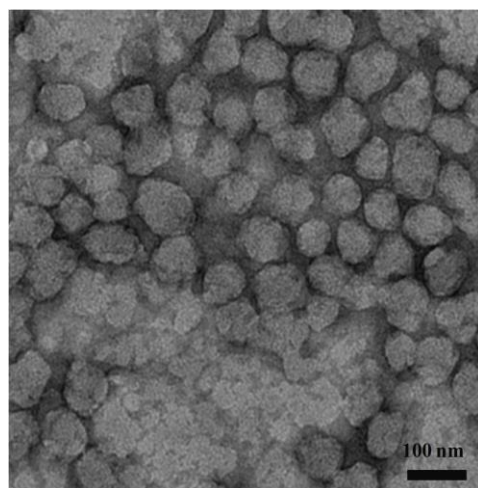


图4 Zeta电位图

Fig. 4 Chart of Zeta potential

2.7 透射电镜(TEM)

取 0.1 mL 的 DMY-MMs 混悬液加入蒸馏水 4 mL, 混匀后滴至铜网上, 晃动使之铺展, 加磷钨酸钠(质量浓度为 1.5%)染色, 晾干后置于 TEM 下观察 DMY-MMs 形貌, 放大倍数为 14 500。结果见图 5, DMY-MMs 微观外貌为类球形。

图5 DMY-MMs的TEM图($\times 14\,500$)Fig. 5 TEM of DMY-MMs ($\times 14\,500$)

2.8 DMY-MMs冻干粉的制备

取甘露醇和乳糖按质量比 1:1 混匀, 作为冻干保护剂。按质量浓度 5% 取冻干保护剂适量加至 DMY-MMs 混悬液中, 溶解后于 $-40\,^{\circ}\text{C}$ 温度下预冻 2 d, 得到完全冻结成固态的样品, 置于 $-35\,^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥机中冷冻干燥 2 d, 即得 DMY-MMs 冻干粉。DMY-MMs 各状态样品外观见图 6, DMY-MMs 混悬液有乳光(图 6-A), 冻干粉色泽均一, 无塌陷现象(图 6-B), 冻干粉复溶后仍可见乳光(图 6-C)。

2.9 DMY-MMs冻干粉晶型分析

X射线粉末衍射(XRPD)测试条件: Cu-K α 靶, 扫描速度为 $5\,^{\circ}\cdot\text{min}^{-1}$ 。取 DMY-MMs 冻干粉、简单混合物(药物与辅料比例同 DMY-MMs 冻干粉)、空白辅料(辅料比例同 DMY-MMs 冻干粉)和二氢杨梅素原料药约 20 mg 作 XRPD 扫描, 见图 7。二氢杨梅素在 $8^{\circ}\sim 28.0^{\circ}$ 出现大量晶型衍射峰, 其中在

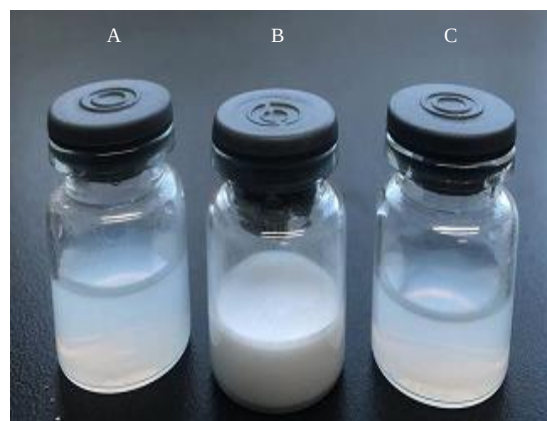


图6 DMY-MMs混悬液(A)、冻干粉(B)和复溶后样品(C)外观

Fig. 6 Appearance of DMY-MMs suspension (A), lyophilized powder (B) and sample after resolved (C)

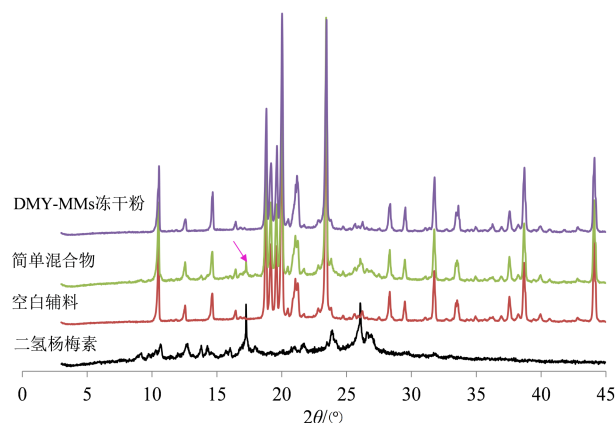


图7 各样品的XRPD结果

Fig. 7 XRPD results of samples

17.2° 和 25.8° 两处相对最强。在简单混合物 XRPD 图谱中 17.2° 处二氢杨梅素的特征晶型峰清晰可见(箭头所示), 其他晶型峰被辅料掩盖, 说明二氢杨梅素晶型未变。在 DMY-MMs 冻干粉 XRPD 图谱中未见二氢杨梅素 17.2° 处的特征晶型峰, 说明药物晶型可能发生改变。

2.10 DMY-MMs冻干粉体外释药行为研究

取 30 mg 二氢杨梅素和 DMY-MMs 冻干粉(药物含量相同), 分别转移至透析袋中(截留相对分子质量 8 000~12 000), 加入蒸馏水 5 mL, 扎紧, 震荡即得混悬液。释药条件为: 释放介质为 900 mL、 $37\,^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水, 开启溶出仪, 使搅拌桨转速为 $75\,\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。于 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0、18.0、24.0、36.0 h 使用自动取样器于介质中取样 3 mL, 并自动补进 3 mL、 $37\,^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水。使用 $0.22\,\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过并测定, 结果见图 8。DMY-MMs 将二氢杨梅素累积释放率由 26.80% 提高至 76.73%。DMY-MMs 体外释药符合 Weibull 模型: $\ln\ln[1/(1-M_t/M_{\infty})]=$

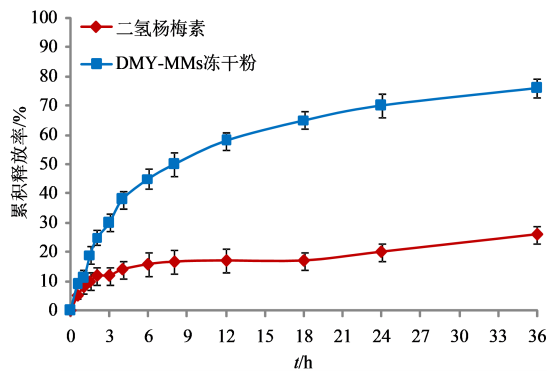


图8 DMY-MMs释放曲线($\bar{x}\pm s, n=6$)
Fig. 8 Release profiles of DMY-MMs ($\bar{x}\pm s, n=6$)

0.639 7ln t −1.781 1(表7),式中 t 代表时间, M_t/M_∞ 代表累积释放百分率。

2.11 DMY-MMs冻干粉稳定性考察

取DMY-MMs冻干粉加蒸馏水复溶,按“2.2.3”项下操作并测定二氢杨梅素含量(m_0)。取DMY-MMs冻干粉密封置于恒温恒湿箱中(温度和湿度分别为35℃和60%),于0、1、2、3、6月取样。样品加蒸馏水复溶,过0.22 μm微孔滤膜,取续滤液测定DMY-MMs中二氢杨梅素的量(m_i),计算DMY-MMs冻干粉不同时间点的沉降率,沉降率=(m_0-m_i)/ m_0 。测定DMY-MMs冻干粉在不同时间点的粒

表7 DMY-MMs释放模型

Table 7 Fitting release model of DMY-MMs

模型	拟合方程	r
零级模型	$M_t/M_\infty=0.019\ 9t+0.244$	0.839 5
一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.038\ 6t-0.257\ 2$	0.909 8
Higuchi 模型	$M_t/M_\infty=0.127\ 4t^{1/2}+0.087\ 0$	0.948 7
Weibull 模型	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.639\ 7\ln t-1.781\ 1$	0.978 4

径、PDI值和Zeta电位,结果见表8。DMY-MMs沉降率、粒径、PDI和Zeta电位未发生明显变化,储存稳定性良好。

表8 6个月时间内各指标测定结果($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 8 Determination results of every index in six months ($\bar{x}\pm s, n=3$)

t /月	沉降率/%	粒径/nm	PDI值	Zeta 电位/mV
0	1.56±0.11	73.44±5.61	0.099±0.008	1.08±0.19
1	1.48±0.16	69.87±6.04	0.107±0.012	2.03±0.24
2	1.63±0.09	75.72±5.83	0.110±0.007	1.16±0.26
3	1.66±0.13	70.69±4.39	0.111±0.013	0.89±0.18
6	1.70±0.08	72.83±5.87	0.104±0.010	1.94±0.23

2.12 药动学研究

2.12.1 实验方案 取SD大鼠18只,随机分为DMY-MMs冻干粉、简单混合物和二氢杨梅素原料药组,每组6只,均采用0.5%的CMC-Na水溶液配制ig液,ig剂量均为100 mg·kg⁻¹[7]。分别于0.25、0.50、0.75、1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、12.00 h乙醚麻醉后采血约250 μL,置肝素浸润离心管中,4 000 r·min⁻¹离心2 min,移取含药血浆待测。

2.12.2 血浆样品的处理[7, 13] 取100 mL醋酸乙酯、60 mL二氯甲烷和10 mL异丙醇超声混匀,作为血浆样品的提取溶剂。取血浆样品100 μL,加入50 μL内标溶液(芹菜素质量浓度为1 208 ng·mL⁻¹)

和4 mL提取溶剂,涡旋5 min。8 000 r·min⁻¹离心10 min使蛋白完全沉淀,移取上层有机相,置于氮吹仪中吹干(40℃),加入100 μL乙腈复溶即得含内标的血浆样品溶液。

2.12.3 线性曲线考察 乙腈配制芹菜素质量浓度为1 208 ng·mL⁻¹,作为内标溶液。采用空白血浆配制2 500、1 250、500、250、100、50 ng·mL⁻¹二氢杨梅素血浆样品,按照“2.12.2”项下操作制备血浆对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定二氢杨梅素和芹菜素的峰面积,计算两者比值(Y),与二氢杨梅素质量浓度(X)作线性回归得方程: $Y=0.002\ 9X-0.124\ 8(r=0.992\ 7)$,因此在50~2 500 ng·mL⁻¹线性关系良好。

2.12.4 方法学考察 取100 μL空白血浆按照“2.12.2”项下处理(不加内标),即得空白血浆样品溶液(A),另取血浆对照品(芹菜素质量浓度为1 208 ng·mL⁻¹,B)和血浆样品溶液(芹菜素质量浓度为1 208 ng·mL⁻¹,C)按“2.2.1”项下色谱条件测定。结果见图9,芹菜素和二氢杨梅素色谱峰均未受杂质干扰,表明专属性高。

取低、中、高质量浓度(50、500、2 500 ng·mL⁻¹)二氢杨梅素血浆对照品溶液(芹菜素质量浓度为1 208 ng·mL⁻¹),连续进样测试6次,计算得峰面积比的RSD值依次为8.15%、4.17%和6.86%($n=3$);连续测试6 d,每天测试1次,计算得峰面积比的RSD

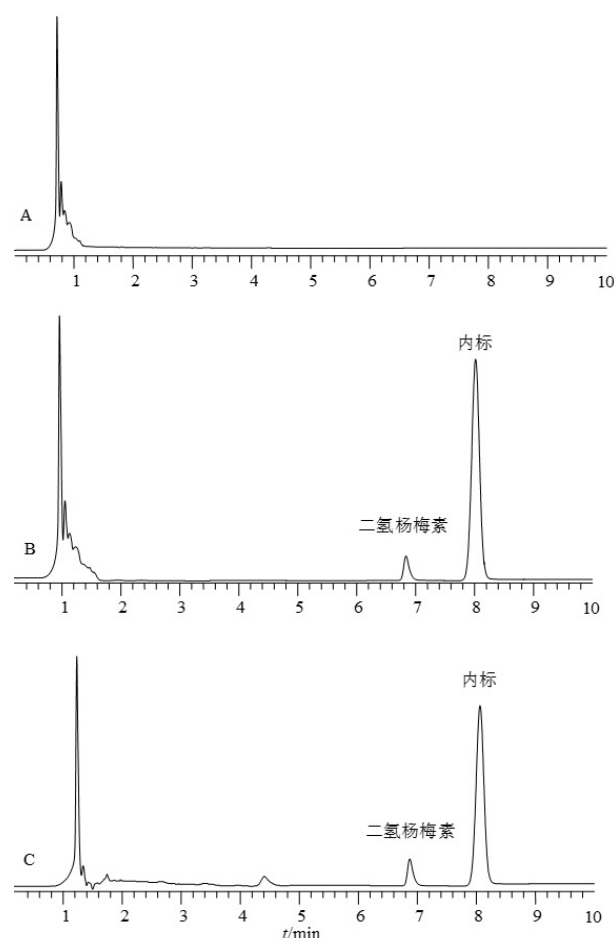


图9 空白血浆(A)、血浆对照品(B)和血浆样品(芹菜素质量浓度为 $1\,208\,\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, C) HPLC 色谱图

Fig. 9 HPLC chromatograms of blank plasma (A), plasma reference (B), and plasma samples (celery mass concentration $1\,208\,\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, C)

值依次为8.09%、9.04%、6.25% ($n=3$),表明日内、日间精密度良好。取血浆样品溶液(芹菜素质量浓度为 $1\,208\,\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$),分别于0、4、8、12、18、24 h测试,峰面积比RSD值为7.19% ($n=6$),表明稳定性良好。取适量空白血浆(A)和纯化水(B),按“2.12.2”项下方法处理(不加芹菜素),加入二氢杨梅素对照品,制备低、中、高质量浓度(50 、 500 、 $2\,500\,\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的样品,进样测定, A 与 B 峰面积比值计算基质效应。结果显示平均基质效应为95.82%, RSD 为3.63% ($n=9$),表明基质效应较小。配制低、中、高质量浓度(50 、 500 、 $2\,500\,\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的二氢杨梅素血浆对照品溶液,分别按“2.2.1”项下色谱条件测定浓度,与实际浓度对比计算二氢杨梅素回收率,计算得平均回收率为94.64%, RSD 为5.03% ($n=9$),表明建立的分析方法可用于药动力学研究。

2.12.5 药动力学结果 采用3P97程序统计矩模型分别计算二氢杨梅素原料药、简单混合物和DMY-MMs主要药动力学参数,结果见表9。根据测得血药质量浓度及取样时间,分别绘制药-时曲线,见图10。简单混合物的 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-t} 及 $AUC_{0-\infty}$ 等药动力学参数与二氢杨梅素比较均具有显著性差异($P<0.05$),说明Soluplush和TPGS聚合物对二氢杨梅素的体内吸收有一定的促进作用^[16],相对生物利用度提高到1.61倍。DMY-MMs的 $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 AUC_{0-t} 等药动力学参数与二氢杨梅素比较均具极显著性统计学意义($P<0.01$),其中DMY-MMs的 $t_{1/2}$ 延长至 $(4.11\pm 1.07)\text{h}$, $C_{\max}$ 增加至4.41倍,相对生物利用

表9 药动力学参数 ($n=6$)

Table 9 Pharmacokinetic parameters ($n=6$)

参数	单位	二氢杨梅素	简单混合物	DMY-MMs
$t_{\max}$	h	1.17 ± 0.31	1.09 ± 0.32	0.73 ± 0.22
$t_{1/2}$	h	2.38 ± 0.51	2.75 ± 0.58	$4.11\pm 1.07^{***}$
$C_{\max}$	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	452.74 ± 78.06	$683.22\pm 124.69^*$	$1\,995.23\pm 460.85^{***}$
AUC_{0-t}	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	$1\,204.76\pm 132.79$	$1\,783.19\pm 204.72^*$	$6\,246.55\pm 1\,439.10^{***}$
$AUC_{0-\infty}$	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	$1\,273.21\pm 140.04$	$1\,851.03\pm 218.86^*$	$6\,401.17\pm 1\,506.26^{***}$

与二氢杨梅素比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与简单混合物比较: *** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs dihydromyricetin group; *** $P<0.01$ vs simple mixture.

度提高到5.18倍,可见DMY-MMs促吸收作用远大于简单混合物组。

3 讨论

本研究采用薄膜水化法制备了DMY-MMs,这种方式制得的胶束包封率往往较高。可能是药物与胶束载体(Soluplus和TPGS)形成薄膜后有助于

使之充分接触与融合,脂溶性的二氢杨梅素与载体的亲脂端链段亲和度较高^[12],在水化作用下可自组装形成DMY-MMs,从而实现载药。前期DMY-MMs制备工艺研究结果显示,水化温度过低时聚合物载体(Soluplus和TPGS)水化程度不足,进而影响DMY-MMs载药,使包封率下降;但水化温度过高时

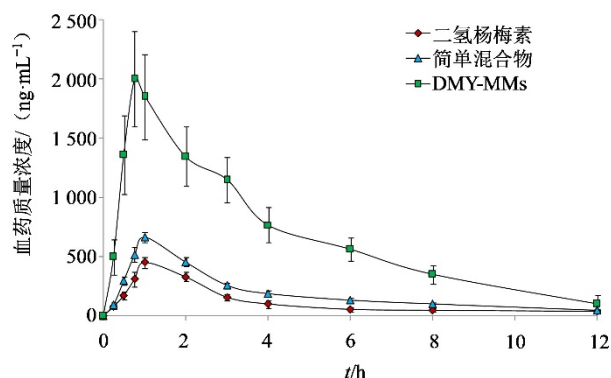


图10 药物浓度-时间曲线(n=6)

Fig. 10 Curve of drug concentration-time (n=6)

对载体材料和DMY-MMs结构稳定性均会产生不利影响^[17]。当水化温度为40℃时,不仅可使聚合物载体充分水化,且该温度相对温和,不会影响聚合物材料稳定性,故确定水化温度为40℃。超声利于降低DMY-MMs粒径,并提高粒径均一性,但超声功率过高或超声时间过长均会破坏DMY-MMs,造成药物泄漏,经考察确定超声功率200 W,超声时间为10 min。

DMY-MMs冻干粉晶型分析表明,二氢杨梅素可能在DMY-MMs冻干粉转变为无定形态,这种状态往往对药物溶解度、溶出速率、生物利用度等提升作用较大^[6-7]。DMY-MMs冻干粉前期释药较快,可能是负载于胶束表面或浅表面药物、“核-壳”交界处的药物以及游离药物等快速释药导致。当DMY-MMs载体降解后负载于内部的药物才能释放出去,故而DMY-MMs后期表现出缓慢释药特征。快速释药阶段有助于使体内血药浓度增大,进而利于快速发挥药效;缓慢释药阶段利于使血药浓度维持相对较高水平,利于药效持续发挥。这种包含快速释药和缓慢释药阶段的纳米制剂,会对药物在体内药动学行为及药效产生较大影响。

据报道^[15],采用单一载体制备的二氢杨梅素纳米胶束的相对生物利用度提高至2.05倍,本研究构建的DMY-MMs相对生物利用度进一步提高到5.18倍,可能与载体材料种类、胶束体内稳定性等因素有关^[18]。药动学结果显示,简单混合物对二氢杨梅素体内吸收有一定促进作用,可能是由于Soluplus和TPGS具有一定的表面活性剂作用^[20-21],对二氢杨梅素具有增溶作用;二氢杨梅素是P-糖蛋白底物,处方中的TPGS可抑制P-糖蛋白的外排作用,因而二氢杨梅素的简单混合物可增加药物体内吸收。DMY-MMs的 t_{max} 提前至 (2.04 ± 0.42) h,可能是由于较小粒径的纳米胶束可顺利透过胃肠道黏液层,从

而实现快速吸收^[17-19],也可能与DMY-MMs前期快速释药有关,最终使 t_{max} 显著性提前。DMY-MMs的 $t_{1/2}$ 得到极显著延长,可能是由于DMY-MMs中药物缓慢释放所致,另外较小粒径的DMY-MMs容易与黏液层之间发生黏附作用,减弱了胃肠道蠕动对药物的清除,增加了药物在体内的血药浓度水平^[19],从而使 $t_{1/2}$ 延长。DMY-MMs的 C_{max} 和相对口服生物利用度分别增加至4.41倍和5.18倍,可能是由于药物的粒径极大下降,利于与胃肠道充分接触并顺利吸收进入血液循环;DMY-MMs增加了药物累积释放度,利于药物体内吸收;DMY-MMs结构稳定性较高^[16, 21],降低了被包载药物在胃肠道的降解几率,增加了吸收量;处方中TPGS可抑制P-糖蛋白对二氢杨梅素外排作用,增加了进入血液循环的量^[21]。

本研究制备的DMY-MMs具有较高的包封率和载药量,无需使用表面活性剂,处方组成简单,冻干粉稳定性良好,促吸收效果明显,为二氢杨梅素新药研发提供了新思路及策略。下一步继续评价DMY-MMs注射药动学、体内抗肿瘤药效等,为评价DMY-MMs成药性提供理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen S H, Zhao X L, Wan J, et al. Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 99: 74-81.
- [2] 石依姗, 方建国, 施春阳, 等. 二氢杨梅素抗菌、抗病毒作用的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2021, 36(2): 408-413.
Shi Y S, Fang J G, Shi C Y, et al. Research progress on antibacterial and antiviral activities of dihydromyricetin [J]. *Drugs Clin*, 2021, 36(2): 408-413.
- [3] 吴聪, 王文茂, 彭彩云, 等. 二氢杨梅素结构修饰及生物活性研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2024, 36(3): 540-553.
Wu C, Wang W M, Peng C Y, et al. Research advances of the structural modification and biological activity of dihydromyricetin [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2024, 36(3): 540-553.
- [4] 曾铁鑫, 许利嘉, 宋颜君, 等. 蛇葡萄属药用植物亲缘学研究 [J]. *中国现代中药*, 2024, 26(6): 978-988.
Zeng T X, Xu L J, Song Y J, et al. Pharmacophylogenetic relationship of Ampelopsis [J]. *Mod Chin Med*, 2024, 26(6): 978-988.
- [5] Xiao T, Wei Y L, Cui M Q, et al. Effect of dihydromyricetin on SARS-CoV-2 viral replication and

- pulmonary inflammation and fibrosis [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153704.
- [6] 范炎峰, 荆玲, 范金点, 等. 二氢杨梅素固体分散体的制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2020, 42(3): 553-558.
- Fan Y F, Jing L, Fan J D, et al. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of dihydromyricetin solid dispersions [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2020, 42(3): 553-558.
- [7] 魏永鸽, 黄贺梅, 徐凯, 等. 二氢杨梅素磷脂复合物及其滴丸的制备及其体内药动学比较 [J]. *中成药*, 2021, 43(12): 3270-3274.
- Wei Y G, Huang H M, Xu K, et al. Preparation of dihydromyricetin phospholipids complex and its dropping pills and comparison of their *in vivo* pharmacokinetics [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(12): 3270-3274.
- [8] Huang Y X, Zhao J Y, Jian W, et al. Effects of verapamil on the pharmacokinetics of dihydromyricetin in rats and its potential mechanism [J]. *Xenobiotica*, 2018, 48(8): 839-844.
- [9] Zhang H L, Wang M L, Yi L Z, et al. Stability profiling and degradation products of dihydromyricetin in Dulbecco's modified eagle's medium [J]. *Food Chem*, 2022, 378: 132033.
- [10] Liu L, Yin X L, Wang X, et al. Determination of dihydromyricetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 657-662.
- [11] Zheng Y M, Chen B Y, Huang X X, et al. A designed self-microemulsifying delivery system: Stability and anti-inflammation *in vivo* enhancement of dihydromyricetin [J]. *J Funct Foods*, 2024, 118: 106266.
- [12] 周海云, 王文清, 施春阳, 等. 二氢杨梅素药理及药物相互作用研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3411-3418.
- Zhou H Y, Wang W Q, Shi C Y, et al. Preparation, *in vivo* pharmacokinetics and anti-tumor activity of artesunate nanomicelles [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(14): 3411-3418.
- [13] 郜娜, 范明松, 杨庆宇, 等. 二氢杨梅素磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备、表征及药动学研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4060-4067.
- Gao N, Fan M S, Yang Q Y, et al. Preparation, characterization and pharmacokinetics of dihydromyricetin phospholipids complex loaded by nanostructured lipid carriers [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(17): 4060-4067.
- [14] 黄欢, 宁洪鑫, 姚薛超, 等. 基于分子动力学的十二烷基硫酸钠对黄酮醇糖苷增溶作用及对体内药动学的影响 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(1): 25-30.
- Huang H, Ning H X, Yao X C, et al. Influence of SDS on DF3G solubilizing behavior by molecular dynamics simulation and pharmacokinetics *in vivo* [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(1): 25-30.
- [15] Ye J, Bao S, Zhao S Y, et al. Self-assembled micelles improve the oral bioavailability of dihydromyricetin and anti-acute alcoholism activity [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22(3): 111.
- [16] 尚慧杰, 杨金枝, 张付利. 岩白菜素 Soluplus/TPGS 混合胶束的制备、表征及体外释药研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2023, 43(11): 1248-1254.
- Shang H J, Yang J Z, Zhang F L. Preparation, characterization and drug release *in vitro* of bergenin Soluplus/TPGS mixed micelles [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2023, 43(11): 1248-1254.
- [17] 李禄辉, 郭允, 侯先巧, 等. 包载三苯基膦-阿霉素和槲皮素的还原敏感性抗肿瘤耐药纳米混合胶束的制备及评价 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(7): 1563-1571.
- Li L H, Guo Y, Hou X Q, et al. Formulation and assessment of reduction-responsive hybrid nano-micelles containing triphenylphosphine-adriamycin and quercetin for combating drug resistance in cancer treatment [J]. *Drug Eval Res*, 2024, 47(7): 1563-1571.
- [18] Sharma S, Kirwale S S, Katakia Y T, et al. Development and evaluation of a simvastatin-loaded biopolymeric scaffold for improved angiogenesis and healing of diabetic wounds [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2023, 87: 104832.
- [19] 董丹丹, 焦红军, 郝海军. 根皮素聚乙二醇-聚乳酸纳米胶束的制备、表征及口服药动学研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(3): 779-788.
- Dong D D, Jiao H J, Hao H J. Preparation and characterization of phloretin-mPEG-PLA nanomicelles and oral pharmacokinetic study [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(3): 779-788.
- [20] 王慧弟, 张金坤, 郭进. 负载 α -常春藤皂苷聚合物胶束的制备与体内外评价 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(1): 123-129.
- Wang H D, Zhang J K, Guo J. Preparation and evaluation *in vitro* and *in vivo* of α -hederin-loaded polymer micelles [J]. *Drug Eval Res*, 2024, 47(1): 123-129.
- [21] Hu M, Zhang J J, Ding R, et al. Improved oral bioavailability and therapeutic efficacy of dabigatran etexilate via Soluplus-TPGS binary mixed micelles system [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(4): 687-697.

[责任编辑 兰新新]