

染料木素-维生素 E 琥珀酸酯-聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯纳米胶束的制备研究

唐 岚¹, 吕龙飞¹, 沈丽婷¹, 孙伯璇¹, 朱转凤¹, 张振海^{2*}, 单伟光^{1*}

1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014

2. 江苏省中医药研究院 国家中医药管理局中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028

摘要: 目的 制备染料木素 (genistein, GEN)-维生素 E 琥珀酸酯 (VES)-聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS) 纳米胶束, 以改善染料木素口服生物利用度。方法 薄膜分散法制备 GEN-VES-TPGS 纳米胶束, 以胶束平均粒径、包封率、载药量为评价指标, 单因素实验优化处方及工艺, 包括 TPGS、VES、GEN 的用量、水化体积、水化温度、水化时间; 对优选处方工艺的胶束形态、体外释放度及大鼠体内药动学进行了考察。结果 优化得到处方为 TPGS 200 mg、VES 30 mg、GEN 6 mg, 水化体积 15 mL、水化温度 50 °C、水化时间 3 h。所制备 GEN-VES-TPGS 纳米胶束澄明度好, 平均粒径为 (43.50 ± 1.65) nm, 包封率为 (98.99 ± 0.69)%, 载药量为 (2.57 ± 0.04)%; 胶束呈球形, 可见明显的囊泡结构, GEN 原料药和纳米胶束在体外均呈现缓释特征; 大鼠 ig 给药药动学结果显示, 所构建的 GEN 纳米胶束生物利用度为 GEN 原料药的 162.96%。结论 所制备的 GEN-VES-TPGS 纳米胶束粒径小, 稳定性好, 显著地提高了 GEN 口服生物利用度。

关键词: 染料木素; 维生素 E 琥珀酸酯; 聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯; 纳米胶束; 口服生物利用度; 薄膜分散法; 包封率; 载药量; 释放度; 药动学

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)09-1766-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.011

Preparation and evaluation of GEN-VES-TPGS1000 nano-micelles

TANG Lan¹, LV Long-fei¹, SHEN Li-ting¹, SUN Bo-xuan¹, ZHU Zhuan-feng¹, ZHANG Zhen-hai², SHAN Wei-guang¹

1. School of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

2. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: Objective To prepare GEN-VES-TPGS nano-micelles and improve the oral bioavailability of genistein (GEN). **Methods** GEN-VES-TPGS nano-micelles, made by film hydration, were evaluated with particle size, entrapment efficiency, and drug-loading as indexes. Single factor experiment was used to optimize the formulation and productive technology, including dosages of TPGS, VES, GEN, hydration volume, temperature, and time. Morphology of nano-micelles, release rate *in vitro*, and pharmacokinetics in rat were investigated. **Results** The results showed GEN-VES-TPGS nano-micelles presented with good clarity, appropriate particle diameter (43.50 ± 1.65) nm, negative charge, when the dosages of TPGS, VES, GEN were 200, 30, and 6 mg, respectively. Meanwhile, a condition of 15 mL, 50 °C at 3 h to hydrate was necessary to prepare. In this setting, the encapsulation efficiency of the nano-micelles was (98.99 ± 0.69)% and drug-loading rate was (2.57 ± 0.04)%. The pharmacokinetic results in rats showed the oral bioavailability of GEN-VES-TPGS nano-micelles was 162.96% of the GEN APIs. **Conclusion** The prepared GEN-VES-TPGS nano-micelles have small particle size and good stability, and increase the oral bioavailability of GEN evidently.

Key words: genistein; vitamin E succinate; *D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate; nano-micelles; oral bioavailability; filming-dispersion method; encapsulation efficiency; drug-loading rate; release degree; pharmacokinetics

收稿日期: 2017-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81403117)

作者简介: 唐 岚, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为药剂学。E-mail: tanglan@zjut.edu.cn

*通信作者 张振海 Tel: (025)85639640 E-mail: davidpharm@yeah.net

单伟光 Tel: (0571)88871075 E-mail: tiananyaowu@zjut.edu.cn

染料木素 (genistein, GEN), 又名染料木黄酮、金雀异黄酮, 淡黄色至浅褐色粉末, 是一种植物雌激素, 存在于人及动物食用的各种植物中, 尤其在大豆、三叶草、苜蓿、燕麦、大麦、黑麦、小麦、玉米中量较高^[1-2]。广泛的流行病学动物研究和体外实验表明, GEN 对癌症、心血管疾病、骨质疏松和绝经后症状等有一定的疗效^[3-9]。目前 GEN 胶囊作为 I 类新药已经进入临床 II 期研究, 然而 GEN 具有低溶解性, 高渗透性, 在生物药剂学分类系统中属于 BCS II, 水中的溶解度很低, 只有 0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (37 $^{\circ}\text{C}$), 口服生物利用度较低^[10]。

聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS) 是由天然维生素 E 琥珀酸酯 (VES) 的羧基与聚乙二醇 (PEG) 酯化而成, 亲水亲油平衡 (HLB) 值为 13~17, 具有良好的两亲性和较好的水溶性, 无明显生殖毒性, 是一种安全的辅料^[11-13]。由于 TPGS 的两亲性以及良好的水溶性, 在药物传递系统中有着广泛的应用, 在制备胶束时, 随着 TPGS 在水中浓度变化可得到各向同性的球状、圆筒状、正反六角形、反球状胶束^[14-15]。TPGS 与其他表面活性剂相比, 其生育酚酯的结构具有较好的抗氧化性, 更有助于增加制剂的稳定性^[16]。目前尚无关于改善 GEN 水溶性及生物利用度方法的报道, 为了解决 GEN 在水中溶解度低以及提高 GEN 的生物利用度, 本课题组利用复配表面活性剂的原理, 以 TPGS 和 VES 制备 GEN-VES-TPGS 纳米胶束, 并对胶束的制备方法、制剂学性质和体内生物利用度进行研究。

1 仪器与材料

EYELA N-1100 旋转蒸发仪, 日本东京理化器械(株)独资工厂; LEGEND MICRO 17R Centrifuge 高速低温离心机, 美国 Thermo Sorvall Scientific 公司; DF-101S 加热搅拌器, 河南巩义予华有限责任公司; DelsaNano C 纳米粒径电位分析仪, Beckman Coulter; Agilent 1200 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 科技公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝公司; JEM-1200EX 透射电子显微镜, 日本电子株式会社。

GEN, 质量分数 >98%, 批号 NF-20160120, 西安天丰生物科技有限公司; GEN 对照品, 质量分数 99.1%, ID: R9Q4-JCM2, 批号 111704-201302, 中国食品药品检定研究院; VES, 规格 1210IU, 批号 HP160106, 西安海斯夫生物科技有限公司; TPGS, 海门慧聚药业有限公司; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

清洁级雄性 SD 大鼠 12 只, 体质量 (250 \pm 20) g, 由浙江省医学科学院实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (浙) 2014-0001。

2 方法与结果

2.1 载药纳米胶束的制备

采用薄膜分散法制备 GEN-VES-TPGS 纳米胶束: 精密称取 GEN、VES、TPGS 适量, 加入 10 mL 无水乙醇超声溶解, 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压旋转蒸发除去溶剂, 加入 15 mL 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 值 7.2 \pm 0.1), 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下搅拌水化 3 h, 然后于 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min 离心 10 min, 上清液经过细胞粉碎仪破碎, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 滤液即为澄清透明的 GEN-VES-TPGS 纳米胶束。由于使用 PBS 水化较水作为水化溶剂形成的胶束具有更好的澄明度及更小的粒径, 因此水化时采用 PBS 为溶剂。

2.2 载药纳米胶束包封率和载药量的测定

2.2.1 色谱条件^[17] C_{18} 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (60:40), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 260 nm, 柱温 28 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μL , 理论塔板数不低于 2 800。

2.2.2 对照品溶液配制 精密称取 GEN 对照品适量, 用无水乙醇溶解定容, 得到 0.65 mg/mL 的对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的配制 精密移取 GEN-VES-TPGS 纳米胶束溶液加入无水乙醇 9 mL, 超声 (200 W, 40 kHz, 10 min) 破乳, 摇匀, 得到 GEN 质量浓度为 0.02 mg/mL 的供试品溶液。

同法制备空白胶束溶液。

2.2.4 GEN-VES-TPGS 纳米胶束包封率和载药量的测定^[18] 采用高速离心法 (10 000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$) 除去胶束中的游离药物, 上清液经过细胞粉碎仪破碎, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 滤液即为载药胶束。分别取 1 mL 离心前的胶束溶液和载药胶束溶液, 加入适量的无水乙醇, 超声破坏胶束结构后, 稀释至 10 mL, 精密吸取 0.1 mL 用无水乙醇稀释至 10 mL, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 测定胶束中 GEN 的量, 计算包封率; 同时将载药胶束溶液在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冻 24 h 后, 取出, 放入冻干机冻干 12 h 后 (真空度 <10 Pa) 取出, 得到胶束冻干品。称取一定量的胶束冻干品, 加入无水乙醇超声溶解破坏, 测定 GEN 的量, 计算载药量。

包封率 = 纳米胶束中 GEN 量 / GEN 的投药量

载药量 = 冻干胶束中 GEN 量 / 冻干胶束的质量

2.2.5 方法专属性 分别量取适量“2.2.2”项下的 GEN 对照品储备液及“2.2.3”项下的 GEN-VES-TPGS 纳米胶束、空白胶束供试品溶液，用无水乙醇稀释 10 倍，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，按“2.2.1”项下色谱条件测定，GEN 色谱峰峰形良好，辅料及溶剂对 GEN 的测定无干扰，见图 1。

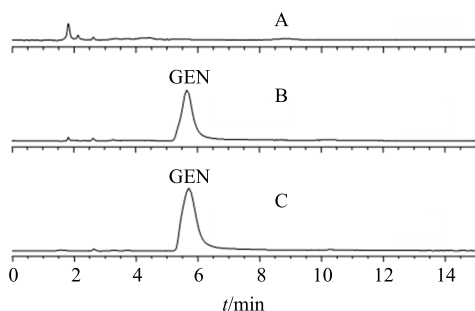


图 1 空白胶束 (A)、GEN-VES-TPGS 纳米胶束 (B) 和 GEN 对照品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank nano-micelles (A), GEN-VES-TPGS nano-micelles (B), and GEN (C)

2.2.6 线性关系考察 精密吸取 0.65 mg/mL 对照品储备液，用无水乙醇稀释定容，分别得到质量浓度为 22.10、16.64、11.18、5.720、0.256 μg/mL 的 GEN 对照品溶液，按“2.2.1”项下 HPLC 法测定，以峰面积积分为纵坐标 (Y)，GEN 质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线，标准曲线方程为 $Y=65.15X-1.408$ ，线性范围 0.256~22.10 μg/mL， $r=0.9990$ ，线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 将 22.10、11.18、0.256 μg/mL 高、中、低 3 个不同质量浓度的 GEN 对照品溶液于同日内连续进样测定 5 次 (间隔 2 h)，读取对应的峰面积积分值，计算得日内 RSD 分别为 0.58%、0.70%、2.07%。同法连续测定 5 d，计算得日间 RSD 为 0.77%、1.20%、2.59%，表明精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 量取适量的“2.2.3”项下的 GEN-VES-TPGS 纳米胶束供试品溶液，用无水乙醇稀释 10 倍，滤过后分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 按“2.2.1”项下 HPLC 法测定，结果 RSD 为 1.63%，表明供试品溶液稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 量取“2.2.3”项下的 GEN-VES-TPGS 纳米胶束供试品溶液 6 份，用无水乙醇稀释 10 倍，滤过后按“2.2.1”项下 HPLC 法测定 GEN，结果 GEN 质量浓度的 RSD 为 0.86%，表明此方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 配制质量浓度为 0.04

mg/mL 的 GEN 含药胶束溶液，平行取 9 份，分别加入高、中、低 3 个质量浓度的 GEN 对照品溶液，每个质量浓度 3 份，滤过后按“2.2.1”项下 HPLC 法测定，计算得平均回收率分别为 (100.35 ± 0.69)%、(99.46 ± 1.13)%、(99.93 ± 0.47)% ($n=3$)，表明建立的方法回收率良好。

2.3 处方优化

2.3.1 TPGS 用量的筛选 固定处方其他组分及工艺条件 (GEN 8 mg, VES 30 mg, 水化体积 20 mL, 水化时间 3 h, 水化温度 40 °C)，分别考察不同用量的 TPGS 对所制备胶束包封率及载药量的影响，结果见表 1。当 TPGS 量从 100 mg 增加到 250 mg 时，胶束的包封率与载药量先增高后降低，用量为 200 mg 时最大，选择 200 mg 为 TPGS 的处方用量。

表 1 TPGS 的量对包封率及载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of TPGS dosage on encapsulation efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s, n=3$)

TPGS/mg	包封率/%	载药量/%
100	27.87 ± 1.19	1.76 ± 0.09
150	44.43 ± 3.10	1.98 ± 0.11
200	59.03 ± 1.68	2.05 ± 0.08
250	51.70 ± 2.66	1.40 ± 0.08

2.3.2 VES 用量的筛选 TPGS 选最佳用量，处方其他组分及工艺条件同上，分别考察不同用量的 VES 对所制备的胶束的包封率及载药量的影响，结果见表 2。当 VES 的用量从 20 mg 增加到 50 mg 时，胶束的包封率及载药量先升高后降低，在 VES 的用量为 30 mg 时最大。VES 的用量在 30 mg 以下时所制备的胶束具有较好的澄明度，当 VES 的用量为 40 mg 及以上时，由于 VES 水溶性较差，所制备的胶束呈浅乳白色，澄明度较差，综合考虑，选择 VES 处方用量为 30 mg。

2.3.3 水化体积的筛选 TPGS、VES 选用最佳量，其他工艺条件同上，分别考察不同体积的水化溶剂

表 2 VES 的量对包封率及载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of VES dosage on encapsulation efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s, n=3$)

VES/mg	包封率/%	载药量/%
20	47.50 ± 2.20	1.74 ± 0.08
30	65.93 ± 1.33	2.26 ± 0.10
40	59.43 ± 1.11	2.02 ± 0.05
50	50.93 ± 1.72	1.63 ± 0.06

对所制备胶束包封率及载药量的影响, 结果见表 3。当水化体积从 10 mL 增加到 25 mL 时胶束的包封率及载药量均呈现先升后降趋势, 15 mL 时最大, 胶束溶液澄清度较好, 未见明显白色絮状物与游离药物。水化体积为 10 mL 时水化后的胶束溶液中可见少量白色絮状物, 澄明度较差, 当水化体积达到 20 mL 及以上时水化后的胶束溶液则可见少量的游离药物, 以包封率及载药量为主要评价指标, 综合考虑胶束的性状, 选择的水化体积为 15 mL。

表 3 水化体积对包封率及载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of hydration solvent volume on encapsulation efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化体积/mL	包封率/%	载药量/%
10	63.52 ± 1.11	2.22 ± 0.14
15	71.70 ± 0.98	2.56 ± 0.09
20	63.93 ± 1.40	2.19 ± 0.05
25	50.03 ± 2.43	1.81 ± 0.07

2.3.4 水化温度的筛选 TPGS、VES 选用最佳量, 水化体积为 15 mL, 其他工艺条件同上, 分别考察不同水化温度下胶束的包封率及载药量, 结果如表 4 所示。当水化温度从 40 °C 升高到 70 °C 时所制备的胶束的包封率先呈小幅上升后明显下降, 水化温度为 50 °C 时, 胶束的包封率及载药量最高, 故选择 50 °C 作为制备胶束的水化温度。

2.3.5 水化时间的筛选 处方及其他工艺条件均选

表 4 水化温度对包封率及载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of hydration temperature on encapsulation efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化温度/°C	包封率/%	载药量/%
40	73.48 ± 0.98	2.48 ± 0.13
50	78.53 ± 0.80	2.58 ± 0.06
60	55.30 ± 1.90	2.04 ± 0.11
70	38.50 ± 3.40	1.34 ± 0.07

表 6 不同的药物-载体比例对 GEN-VES-TPGS 纳米胶束包封率、载药量、平均粒径、Zeta 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of drug-carrier ratios on encapsulation efficiency, drug loading, average particle size, and Zeta potential of GEN-VES-TPGS nano-micelles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物-载体比例	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm	Zeta 电位/mV
3 : 115	98.65 ± 0.45	2.57 ± 0.04	43.50 ± 1.65	-30.33 ± 1.55
4 : 115	75.29 ± 2.38	2.55 ± 0.16	70.83 ± 3.33	-19.92 ± 1.92
5 : 115	62.63 ± 0.96	2.36 ± 0.16	62.97 ± 7.03	-7.37 ± 1.30
6 : 115	50.56 ± 0.81	2.53 ± 0.16	58.57 ± 2.06	-4.04 ± 0.28
8 : 115	40.13 ± 1.01	2.12 ± 0.13	120.33 ± 5.92	-1.94 ± 0.92

用优选条件, 分别考察不同水化时间下所制备的胶束的包封率及载药量, 结果见表 5。水化时间为 2 h 时能基本得到均一的胶束溶液, 水化时间为 3 h 时所制备的胶束的包封率及载药量最佳, 随着水化时间的增加, 由于胶束为热力学不稳定体系, 包封率及载药量呈下降趋势, 故选择 3 h 作为制备胶束的水化时间。

表 5 水化时间对包封率及载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of hydration time on encapsulation efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化时间/h	包封率/%	载药量/%
2	66.18 ± 2.65	1.95 ± 0.10
3	76.58 ± 1.22	2.57 ± 0.11
4	69.79 ± 0.94	2.41 ± 0.05
5	39.33 ± 1.46	1.36 ± 0.06

2.3.6 药物-载体比例的筛选 对 TPGS 及 VES 的用量、水化体积、水化温度、水化时间等影响胶束包封率与载药量的因素进行单因素实验优化, 优化结果为 TPGS 用量为 200 mg、VES 的用量为 30 mg、水化体积为 15 mL、水化温度为 50 °C、水化时间为 3 h。胶束的包封率及载药量随着 VES 用量的增加先增加后降低, 在此基础上固定 VES 与 TPGS 的量, 考察不同药物-载体比例下胶束的包封率、载药量、平均粒径、Zeta 电位, 结果见表 6。当药物-载体比例为 3 : 115 时胶束的包封率接近 99%, 胶束澄明度好, 未离心出游离药物, 载体基本能将投入的 GEN 全部包封。随着药物-载体比例增大, 胶束包封率一直下降, 在药物-载体比为 4 : 115 时, 水化后的胶束中有明显可见不溶性药物及载体析出, 随着药物-载体比例增大, 水化后的胶束中游离药物与载体逐渐增加, 当药物-载体比例为 6 : 115 时, 胶束的包封率仅为 (50.56 ± 0.81) %。5 个不同药物-载体比例下的胶束载药量接近, 可知在水化体积

一定时形成的载药胶束中药物浓度基本固定，胶束疏水内核中的药物基本饱和，无法再进一步包封更多的药物进去。5 个不同比例药物-载体胶束平均粒径除了药物-载体比 8 : 115 外，其余几组胶束的平均粒径均在 100 nm 以下。Zeta 电位绝对值随着药物-载体比例提高而减小，故药物-载体比例增加时 GEN-VES-TPGS 纳米胶束的稳定性也不断降低，当药物-载体比例为 3 : 115 时，胶束的稳定性最高。

2.3.7 处方及制备工艺的确定 最终确定 GEN-VES-TPGS 纳米胶束的处方及制备工艺为 GEN 6 mg、VES 30 mg、TPGS 200 mg，加入无水乙醇 10 mL 超声溶解 10 min，40 °C 减压旋转蒸发除去溶剂，加入预热到 50 °C 的 PBS (pH 7.2±0.1) 15 mL，在 50 °C 下加热搅拌水化 3 h，得到的澄清、透明、均一的纳米胶束，经 10 000 r/min 高速离心 10 min 除去游离药物后，经过超声细胞破碎仪(工作时间 5 s，间隙时间 5 s，功率 200 W，40 次)破碎后，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，滤液即为 GEN-VES-TPGS 纳米胶束。

2.4 平均粒径、Zeta 电位以及粒子形态考察

取 GEN-VES-TPGS 纳米胶束溶液加入到粒径杯中，DelsaNano C 型粒径电位分析仪测定纳米胶束的平均粒径和 Zeta 电位。采用透射电子显微镜 (TEM) 观察纳米胶束粒子形态，取适量的纳米胶束溶液滴加在铜网上，用滤纸在边缘吸去多余的纳米胶束，然后滴加 1% 的醋酸双氧铀负染，自然晾干后观察胶束粒子形态。在最终的处方工艺下所制备的纳米胶束的平均粒径为 (43.50±1.65) nm，多分散系数为 0.17±0.04，Zeta 电位为 (-30.33±1.55) mV，表明所制备的纳米胶束粒径大小合适，粒径均一，表面呈负电荷，胶束形态完整，呈球形，分布均匀，可见明显的囊泡结构。见图 2。

2.5 体外释药行为考察

选择 GEN 原料药作为对照，精密称取 30 mg 的 GEN 原料药，精密加入 3 mL 无水乙醇，超声溶解，精密移取 0.5 mL，用 PBS (pH 7.2±0.1) 定容至 10 mL，形成 0.5 mg/mL 的 GEN 混悬液^[19]。称取含有 5 mg GEN 的纳米胶束冻干品 (制备方法见“2.3.7”项)，加入 PBS 溶胀后，定容到 10 mL，得到含 GEN 0.5 mg/mL 的纳米胶束溶液。分别吸取 2 mL 的 GEN 混悬液与纳米胶束溶液放入处理好的透析袋中，两端扎紧。将透析袋置于 50 mL 释放介质中 (pH 7.2±0.1 的 PBS，含 2% 聚山梨酯-80)。原

料药组和胶束组分别平行 3 组，于 (37.0±0.5) °C 恒温水浴振荡 (50 r/min)。分别于 0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48、60、72、84、96 h 取 1 mL 含药释放介质，同时补加同温 1 mL 空白释放介质，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，续滤液按“2.2.1”项方法测定 GEN 量。累积释放曲线见图 3。结果表

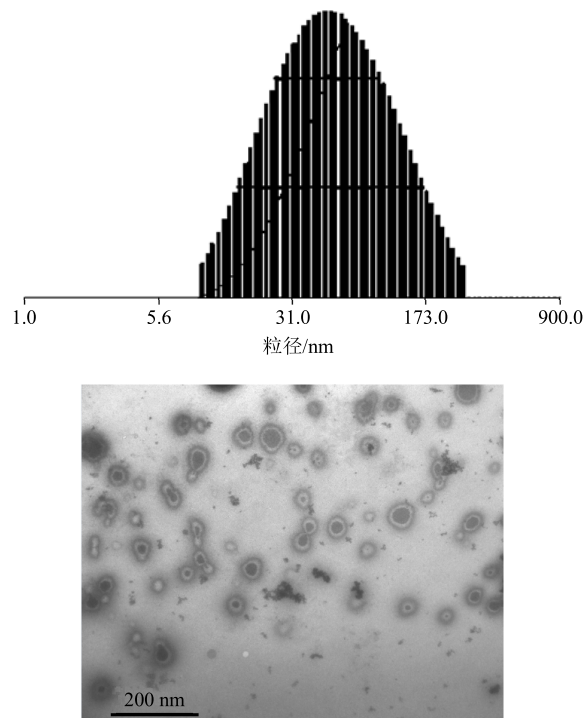
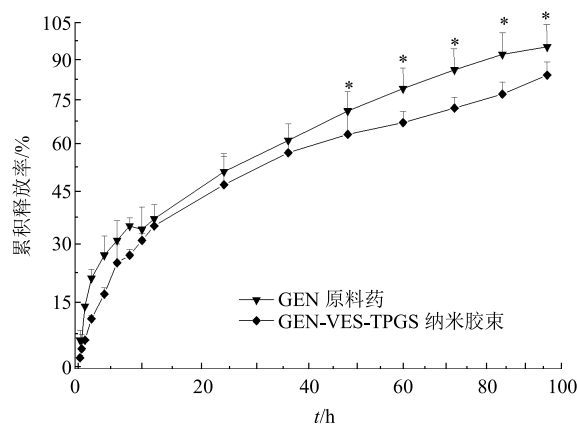


图 2 GEN-VES-TPGS 纳米胶束粒径分布和 TEM 图
Fig. 2 Distribution of particle size and TEM photograph of GEN-VES-TPGS nano-micelles



*表示此时间点 GEN 原料药与胶束释放具有显著性差异 (P<0.05)
*said this point in time GEN apis with micellar release has significant difference (P<0.05)

图 3 GEN-VES-TPGS 胶束和 GEN 原料药释药曲线
Fig. 3 Release curves of genistein and GEN-VES-TPGS nano-micelles

明 GEN 原料和纳米胶束在体外均呈现缓释特征，由于被胶束包裹，纳米胶束缓释效果比原料药明显。

2.6 药动学研究

GEN 原料药组和 GEN-VES-TPGS 胶束组各 6 只 SD 大鼠，分别 ig 给予 GEN 0.5% CMC-Na 混悬液和 GEN 冻干胶束 PBS 复溶液，给药量为 65 mg/kg。分别在 ig 给药后 5、10、20、30、40 min 及 1、2、3、5、8、12、24 h 经过眼眶取血 0.6 mL，8 000 r/min 离心 10 min，吸取 300 μ L 血浆，加入 800 μ L 醋酸乙酯，涡旋 1 min，离心，吸取上清液，下层液体再加入 400 μ L 醋酸乙酯，涡旋 1 min，离心，吸取上层液体合并到第 1 次萃取液中，40 $^{\circ}$ C 水浴下氮气吹干，加入 100 μ L 无水乙醇，超声，涡旋混匀后离心，吸取上清液至微量进样管中，经 HPLC 分析，测定 GEN 的血药浓度。

药动学标准曲线的绘制：精密称取 GEN 对照品 10.6 mg，用无水乙醇稀释得到质量浓度分别为 2.544、1.02、0.407、0.163、0.065、0.026 μ g/mL 的 GEN 对照品溶液，按“2.2.1”项下 HPLC 法测定，以峰面积为纵坐标(Y)，GEN 质量浓度为横坐标(X)

绘制标准曲线，标准曲线方程为 $Y=61\ 370 X+2.380\ 2$ ，线性范围为 0.026~2.544 μ g/mL， $r=0.999\ 6$ ，线性关系良好。

GEN 混悬液与 GEN-VES-TPGS 纳米胶束的血药浓度-时间曲线见图 4；采用 DAS 3.2.7 软件以非房室模型统计分析其药动学参数，结果见表 7。

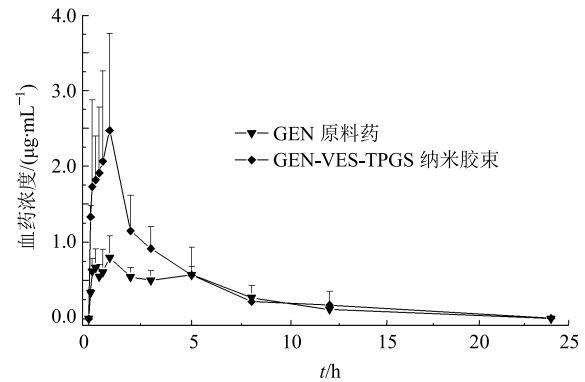


图 4 大鼠 ig GEN 原料药与 GEN-VES-TPGS 纳米胶束后血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 4 Plasma concentration-time curves of GEN APIs and GEN-VES-TPGS nano-micelles after ig administration in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 7 大鼠 ig GEN 原料药与 GEN-VES-TPGS 胶束后体内的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 *In vivo* pharmacokinetic parameters of GEN APIs and GEN-VES-TPGS nano-micelles after ig administration in rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

药动参数	单位	GEN 原料药	GEN-VES-TPGS 纳米胶束
AUC _{0-t}	μ g·h·L ⁻¹	5.804 ± 1.028	9.458 ± 3.590
AUC _{0-∞}	μ g·h·L ⁻¹	6.205 ± 1.401	9.565 ± 3.495
R_AUC _{t/∞}	%	94.583 ± 7.202	98.367 ± 2.733
C _{last}	μ g·L ⁻¹	0.037 ± 0.043	0.013 ± 0.014
t _{1/2z}	h	4.563 ± 3.041	3.908 ± 2.021
t _{max}	h	1.889 ± 1.772	0.778 ± 0.360
Vz/F	L·kg ⁻¹	64.331 ± 31.880	47.063 ± 39.160
CLz/F	L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	10.957 ± 2.566	7.528 ± 2.601
C _{max}	μ g·L ⁻¹	0.939 ± 0.252	2.698 ± 0.975

药动学数据显示，GEN-VES-TPGS 纳米胶束的半衰期 ($t_{1/2}$) 为 (3.908 ± 2.021) h，与 GEN 混悬液的 $t_{1/2}$ 为 (4.563 ± 3.041) h 相比较短；纳米胶束达峰时间 (t_{max}) 为 (0.778 ± 0.360) h，GEN 混悬液 t_{max} 为 (1.889 ± 1.772) h；纳米胶束的达峰浓度 (C_{max}) 为 (2.698 ± 0.975) μ g/L，GEN 混悬液 C_{max} 为 (0.939 ± 0.252) μ g/L。结果显示将 GEN 制备成 GEN-VES-TPGS 纳米胶束，无论是在吸收速度或者是吸收程度上较 GEN 原料药都有较大地提高。

GEN-VES-TPGS 纳米胶束与原料药在 0~t 时间内以及在 0~∞的相对生物利用度分别为 162.96%和 154.15%。表明将 GEN 制备成 GEN-VES-TPGS 纳米胶束后在大鼠体内的生物利用度有较大提高。

3 讨论

改善难溶性药物的生物利用度在新药研发中是一项重要的研究内容。据报道，《美国药典》中三分之一以上的药物为水不溶性，另外目前大约 40%的药物因溶出的问题而被限制使用^[20-21]。加入助溶剂

或表面活性剂能够在一定程度上改善难溶性药物的溶解性和溶出度。亲水性辅料表面活性剂的选用,不但能降低药物界面张力,利于加快药物在黏膜黏液层和绒毛间的扩散,而且还能增加疏水性药物粒子表面的润湿性,加速药物的溶出和吸收,当表面活性剂的浓度超过临界胶束浓度时,形成的胶束又会增加药物的溶解度^[22]。聚合物胶束作为一种新型的载体,具有高载药量、高水溶性、优良的组织渗透性、靶向性等特点,且制备方法简单、结构稳定、体内滞留时间长,是很有发展前景的药物载体^[23]。本课题以 TPGS 为表面活性剂^[24],采用 VES 复配,制备出粒径、Zeta 电位大小合适的 GEN-VES-TPGS 纳米胶束,通过进行药动学实验评价,显示 GEN 的口服生物利用度有较大的提高,为 GEN 高效口服制剂的研究提供了一定的参考。

参考文献

- [1] Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 75(4/5): 265-271.
- [2] 蔡锦源, 陈玲, 朱焯雄, 等. 染料木素的制备方法研究进展 [J]. *粮食科技与经济*, 2015, 40(4): 69-72.
- [3] Anderson J J, Ambeose W W, Gerner S C. Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model [J]. *Proc Soc*, 1998, 217(3): 345-350.
- [4] 翁春艳, 杨艳, 李晓波. 染料木素抗动脉粥样硬化的研究进展 [J]. *中国医药指南*, 2016, 14(7): 33-34.
- [5] Branes S. Evolution of the health benefits of soy isoflavones [J]. *Proc Soc*, 1998, 217(3): 386-392.
- [6] Honove E K, Williams J K, Anthony M S, et al. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques [J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(1): 148-154.
- [7] 苏文, 刘艳平, 李忠魁, 等. 染料木素诱导人胃癌 BGC-823 细胞凋亡及其分子机制的研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(6): 874-878.
- [8] 赖文秀, 杨亚军, 崔燎. 染料木素抗骨质疏松研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(10): 1345-1348.
- [9] Potter S M, Baum J A, Teng H, et al. Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women [J]. *Am J Clin Nutr*, 1998, 68(6): 1375s-1379s.
- [10] 孟庆杰, 包琳琳, 潘五九, 等. 染料木素固体分散体的制备及其性质研究 [J]. *中国药房*, 2016, 27(10): 1406-1408.
- [11] Zhang Z, Tan S, Feng S S. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(19): 4889-4906.
- [12] 严红梅, 贾晓斌, 张振海, 等. 维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯对宝藜苷 I 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响 [J]. *中草药*, 2015, 46(3): 384-388.
- [13] Krasavage W J, Terhaar C J. d-alpha-Tocopheryl poly (ethylene glycol) 1000 succinate. Acute toxicity, subchronic feeding, reproduction, and teratologic studies in the rat [J]. *J Agric Food Chem*, 1977, 25(2): 273-278.
- [14] 郑楠楠, 唐景玲, 吴琳华. 聚乙二醇维生素 E 琥珀酸酯作为药物载体的最新进展 [A] // 2013 年中国药学会暨第十三届中国药师周论文集 [C]. 南宁: 中国药学会, 2013.
- [15] 马文转, 王金铃, 屠鹏飞. 黄芩苷纳米胶束的制备、表征及其对 MCF-7 细胞抑制作用的研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(4): 507-512.
- [16] Carrini R, Poli G, Dianzani M, et al. Comparative evaluation of the antioxidant activity of alpha-tocopherol, alpha-tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate and alpha-tocopherol succinate in isolated hepatocytes and liver microsomal suspensions [J]. *Biochem Pharmacol*, 1990, 39(10): 1597-1601.
- [17] 陈帅, 袁崇均, 吴诗慧, 等. HPLC 测定槐角总黄酮水解产物中的染料木素 [J]. *华西药理学杂志*, 2011, 26(5): 499-500.
- [18] 马文转, 王金铃, 屠鹏飞. 盐酸小檗碱纳米胶束的制备、表征及体外抗肿瘤活性的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(21): 4182-4188.
- [19] 张李巧, 栾立标, 吴炎, 等. 姜黄素 CTPP-PEG-PCL 胶束的制备及体外评价 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(13): 2109-2113.
- [20] Wong S M, Kellaway I W, Murdan S. Enhancement of the dissolution rate and oral absorption of a poorly water soluble drug by formation of surfactant containing microparticles [J]. *Int J Pharm*, 2006, 317(1): 61-68.
- [21] Patravale V B, Date A A, Kulkarni R. Nanosuspensions: A promising drug delivery strategy [J]. *Pharm Pharmacol*, 2004, 56(7): 827-840.
- [22] 刘营营, 肖瑶, 苏文晶, 等. 高载药量甘草次酸纳米混悬剂的制备及其大鼠体内药动学研究 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(1): 74-79.
- [23] 冀艳艳, 韩国华, 朱澄云. 改善口服难溶性药物生物利用度的方法 [J]. *中国药剂学杂志: 网络版*, 2012, 10(5): 86-92.
- [24] 朱亚楠, 王满, 王璐璐, 等. 含聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯的秋水仙碱醇质体的制备及其体外透皮效果研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(24): 3655-3660.