

• 药剂与工艺 •

甘草酸-F127/TPGS 混合纳米胶束的制备及其大鼠在体肠吸收研究

朱君君^{1,2}, 沈成英^{1,2}, 王 镜^{1,2}, 戴 博², 袁海龙^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 空军特色医学中心 药学部, 北京 100142

摘要: **目的** 制备甘草酸 (GL)-普朗尼克 F127 (F127)/聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS) 混合纳米胶束 (MMs) (GL-F127/TPGS-MMs), 以改善 GL 的口服吸收。**方法** 采用薄膜分散法制备 GL-F127/TPGS-MMs, 以胶束包封率、载药量为评价指标, 单因素实验优化处方及工艺, 包括 F127 与 TPGS 的比例、聚合物的质量浓度、GL 的用量、水化温度、水化时间; 采用透射电镜考察胶束形态; 以吸收速率常数 (K_a) 和表观吸收系数 (P_{app}) 为评价指标, 采用大鼠在体单向肠灌注法考察 GL-F127/TPGS-MMs 的肠吸收特性。**结果** 优化得到处方和工艺为 TPGS 180 mg、F127 270 mg、GL 70 mg、水化温度 50 °C、水化时间 3 h。所制备 GL-F127/TPGS-MMs 澄明度好, 平均粒径为 (28.20 ± 5.63) nm, 多分散系数为 0.20 ± 0.06 , Zeta 电位为 (-5.24 ± 1.55) mV, 包封率为 (97.57 ± 5.29) %, 载药量为 (13.13 ± 0.71) %; 胶束呈球形, 可见明显的囊泡结构。与回肠段比较, GL 在空肠段吸收较好, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 GL 原料药比较, GL-F127/TPGS-MMs 的肠吸收较好, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 所制备的 GL-F127/TPGS-MMs 显著地提高了 GL 的体内吸收。

关键词: 甘草酸; 纳米胶束; 薄膜分散法; 包封率; 载药量; 肠吸收; 吸收速率常数; 表观吸收系数; 单向肠灌注法
中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)07-1845-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.020

Preparation of glycyrrhizic acid-F127/TPGS mixed nanomicelles and its *in vivo* intestinal absorption in ratsZHU Jun-jun^{1,2}, SHEN Cheng-ying^{1,2}, WANG Jing^{1,2}, DAI Bo², YUAN Hai-long²

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Department of Pharmacy, Air Force Medical Center, Beijing 100142, China

Abstract: **Objective** To prepare glycyrrhizic acid (GL)-Pluronic F127 (F127)/polyethylene glycol 1000 vitamin E succinate (TPGS) mixed nanomicelles (MMs) and improve oral absorption of GL. **Methods** GL-F127/TPGS-MMs was prepared by thin film dispersion method. The encapsulation efficiency and drug loading of MMs were used as evaluation indexes. The formulation and process, including the ratio of F127 to TPGS, the concentration of polymer and GL, hydration temperature and time, were optimized by the single factor experiment. The morphology of MMs was investigated by transmission electron microscopy. The single-pass perfusion model was established in rats to investigate the intestinal absorption characteristics of GL-F127/TPGS-MMs with absorption rate constant (K_a) and apparent absorption coefficient (P_{app}) as evaluation indexes. **Results** The optimal formulation and process of GL-F127/TPGS-MMs were as follows: TPGS 180 mg, F127 270 mg, GL 70 mg, hydration temperature 50 °C and hydration time 3 h. The prepared GL-F127/TPGS-MMs had good clarity and the particle size, polydispersity index, and Zeta potential were (28.20 ± 5.63) nm, 0.20 ± 0.06 , and (-5.24 ± 1.55) mV, respectively. The encapsulation efficiency and drug loading were (97.57 ± 5.29) % and (13.13 ± 0.71) %, respectively. The MMs were spherical with distinct vesicle structure. The absorption of GL in the jejunum segment was significantly higher than that in the ileum segment ($P < 0.05$). Compared with raw GL, GL-F127/TPGS-MMs had a statistically significant higher absorption rate in the intestinal segment ($P < 0.05$). **Conclusion** The

收稿日期: 2019-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81803741); 北京市科委重点项目 (Z171100001717026)

作者简介: 朱君君, 女, 硕士研究生, 主要从事药物新型给药系统研究。Tel: (010)66928506 E-mail: 2250952057@qq.com

*通信作者 袁海龙, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事药物新型给药系统研究。Tel: (010)66928505 E-mail: yhlpharm@126.com

prepared GL-F127/TPGS-MMs could significantly improve the absorption of GL *in vivo*.

Key words: glycyrrhizic acid; nanomicelles; thin film dispersion method; encapsulation efficiency; drug loading; intestinal absorption; absorption rate constant; apparent absorption coefficient; single-pass intestinal perfusion

甘草酸 (glycyrrhizic acid, GL) 是从甘草中提取的一种三萜类皂苷, 由 1 分子甘草次酸 (代谢产物) 和 2 分子的葡萄糖醛酸组成, 是甘草中最重要的有效成分之一。GL 具有抗氧化、抗炎、免疫调节、抗病毒、保肝等多种药理作用, 临床被广泛用于保护肝脏、防治肝硬化、治疗各种急慢性肝炎等^[1-5]。但是 GL 极性大, 在水溶液中易形成聚集体, 在胃肠道的渗透性极差, 不溶于冷水, 可溶于热水, 但溶于热水后冷却呈胶体状沉淀析出^[6], 因此, 其口服吸收较差。目前, 绝大多数的市售制剂都将 GL 制成盐, 以注射给药为主, 且给药剂量较大, 易产生水钠潴留、高血压、低血钾、水肿等副作用^[7]。

目前, 聚合物胶束因具有增加药物在吸收部位的浓度, 提高药物在胃肠道中的稳定性, 进而提高了药物的生物利用度等优势在口服给药系统中广泛应用^[3,8-9]。普朗尼克 F127 (F127) 是一种两亲性的三嵌段共聚物, 因其具有较低的临界胶束浓度 (CMC) 值 (0.003 1%)、无刺激、无免疫原性、可溶于体液等优点而成为理想的胶束载体, 据文献报道, F127 具有较好的黏液渗透性能, 可促进药物穿透黏液层到达上皮层, 但因其相对亲水的特性, 不利于跨膜转运^[10]。聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS) 是天然维生素 E 的衍生物, 由维生素 E 琥珀酸酯和聚乙二醇酯化而成, 具有良好的生物相容性^[9,11]。TPGS 具有增溶、促进细胞摄取、延长药物在体内循环时间等作用, 但其 CMC 值 (0.02%) 较高, 易在体液中解聚而稳定性差^[12]。因此, 本研究采用 F127 与 TPGS 2 种材料制备混合胶束并将 GL 载入其中, 制备甘草酸 (GL)-普朗尼克 F127 (F127)/聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS) 混合纳米胶束 (MMs) (GL-F127/TPGS-MMs), 以促进 GL 的口服吸收。

1 材料

1.1 药品与试剂

GL 对照品, 批号 PS010448, 成都普思生物科技股份有限公司, 质量分数 $\geq 99.0\%$; GL 原料药, 批号 190421, 北京世纪奥科生物技术有限公司, 质量分数 $\geq 95.0\%$; 普朗尼克 F127, 批号 160713, 北京中生瑞泰科技有限公司; 聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS), 批号 BCBW9938, Sigma 公司;

无水乙醇, 批号 20190418, 北京化工厂; 甲醇, 色谱纯; 其余试剂或试剂均为分析纯。

1.2 仪器

LC-20AD 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; 3000SH Zeta 粒度仪, 英国马尔文仪器有限公司; DF101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 北京恒丰长伟科技有限公司; N-1300D 旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; SHB-III 循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; LSP01-1A 蠕动泵, 保定兰格恒流泵有限公司; Lab-1A-50 冻干机, 北京博医康实验仪器有限公司; Tecnai G2 F30 场发射透射电子显微镜, TEI 格林海外有限公司。

1.3 动物

雄性 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 10) g, 由北京科宇动物养殖中心提供, 生产许可证号 SCXK (京) 2018-0010。

2 方法与结果

2.1 GL-F127/TPGS-MMs 的制备

采用薄膜水化法制备 GL-F127/TPGS-MMs。精密称取 GL、F127、TPGS 适量, 加入无水乙醇 5 mL 超声 5 min 使之完全溶解, 45 °C 减压旋转蒸发除去溶剂, 加入 10 mL 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 值 7.4 ± 0.1)。在适当温度条件下搅拌水化, 然后于 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 使用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 除去游离的 GL, 滤液即为澄清透明的 GL-F127/TPGS-MMs。同法制备空白胶束 (不含 GL)。

2.2 GL-F127/TPGS-MMs 包封率和载药量的测定

2.2.1 GL-F127/TPGS-MM 包封率和载药量的测定
精密吸取载药胶束溶液 20 μL , 加入适量的甲醇, 超声破坏胶束结构后, 定容至 10 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 测定胶束中 GL 的量, 计算包封率, 同时将载药胶束溶液在 -80 °C 冰箱中预冻 5 h 后, 取出, 放入冻干机 12 h 后 (真空度 $< 10 \text{ Pa}$) 取出, 得到胶束冻干粉, 称定质量。称取 1.4 mg 的胶束冻干粉, 加入适量的甲醇, 超声破坏胶束结构后, 定容至 10 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 测定 GL 的量, 计算载药量^[13-15]。

包封率 = 胶束中甘草酸质量 / 甘草酸投药量

载药量 = 胶束中甘草酸质量 / 甘草酸胶束质量

2.2.2 色谱条件 C_{18} 色谱柱为 Inertsil ODS-3 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (75:25); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 250 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样体积 10 μ L。理论塔板数以甘草酸色谱峰计算不少于 6 000。

2.2.3 对照品溶液配制 精密称取 GL 对照品 10.92 mg, 用甲醇溶解定容, 制得质量浓度为 2.18 mg/mL 的 GL 对照品储备液。

2.2.4 供试品溶液的配制 精密移取 GL-F127/TPGS-MMs 20 μ L, 加入甲醇适量, 超声 (100 W, 20 kHz, 10 min), 定容至 10 mL, 摇匀, 即得供试品溶液。同法制备空白胶束溶液。

2.2.5 专属性考察 精密吸取 1 mL “2.2.3” 项下的 GL 对照品储备液, 用甲醇定容至 50 mL, 及 “2.2.4” 项下的 GL-F127/TPGS-MMs、空白胶束供试品溶液, 按 “2.2.2” 项下色谱条件测定, GL 色谱峰峰形良好, 辅料及溶剂对 GL 的测定无干扰, 色谱图见图 1。

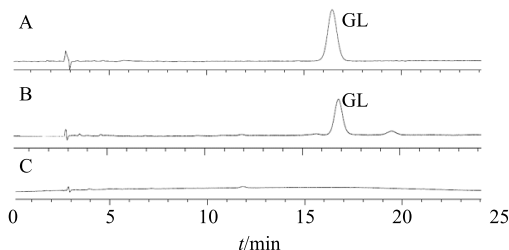


图 1 GL 对照品 (A)、GL-F127/TPGS-MMs (B) 和空白胶束 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of GL (A), GL-F127-TPGS MMs (B), and blank nanomicelles (C)

2.2.6 线性关系考察 精密吸取质量浓度为 2.18 mg/mL 的 GL 对照品储备液, 用甲醇稀释定容, 分别得到质量浓度为 87.20、43.60、21.80、17.44、8.72、4.36、2.18 μ g/mL 的 GL 对照品溶液, 按 “2.2.2” 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标 (Y), GL 质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 标准曲线方程为 $Y=9\,481.6 X-4\,597.9$, $r^2=1.000\,0$, 结果表明, GL 在 2.18~87.20 μ g/mL 线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 制备质量浓度分别为 53.60、21.80、8.72 μ g/mL GL 对照品溶液, 分别连续进样 6 次, 记录对应的峰面积, 计算得 RSD 分别为 0.49%、0.93%、1.19%, 表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取 “2.2.4” 项下的 GL-F127/TPGS-MMs 供试品溶液, 滤过后分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 按 “2.2.2” 项下色谱条件测定, 结果

GL 峰面积的 RSD 为 1.09%, 表明供试品溶液稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取 “2.2.4” 项下的 GL-F127/TPGS-MMs 供试品溶液 6 份, 滤过后按 “2.2.2” 项下色谱条件测定, 计算 GL 质量浓度, 其 RSD 为 0.32%, 表明此方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密移取已知质量浓度的 GL-F127/TPGS-MMs 9 份, 分别加入对照品的量与其在胶束中的量的比值为 0.5:1、1:1、1.5:1, 每个比例为 3 份, 加入甲醇适量, 超声 (100 W, 20 kHz) 10 min, 定容至 10 mL, 摇匀, 按照 “2.2.2” 项下色谱条件进行分析, 计算加样回收率。结果测得 3 个质量浓度下的平均回收率分别为 100.62%、99.55%、100.65%, RSD 分别为 0.52%、0.55%、1.79%, 表明该方法回收率良好。

2.3 处方优化

2.3.1 F127-TPGS 比例的筛选 固定处方其他组分及工艺条件 (GL 60 mg, 聚合物质量浓度为 40 mg/mL, 水化体积 10 mL, 水化时间 1 h, 水化温度 50 $^{\circ}$ C), 考察 F127-TPGS 不同比例对所制备胶束包封率及载药量的影响, 结果见表 1。当 F127-TPGS 比例从 9:1 到 5:5 时, 胶束的包封率与载药量先增高后降低, 当比例为 6:4 时, 包封率、载药量达到最大。

2.3.2 聚合物质量浓度的筛选 固定处方其他组分及工艺条件 (GL 60 mg, F127-TPGS 比例固定为 6:4, 水化体积 10 mL, 水化时间 1 h, 水化温度 50 $^{\circ}$ C) 考察不同聚合物质量浓度对所制备胶束包封率及载药量的影响, 结果见表 2。当聚合物质量浓度达到 45 mg/mL 时, 包封率不再随着聚合物质量浓度增加而增加, 因此选择聚合物质量浓度为 45 mg/mL。

2.3.3 GL 用量的筛选 固定处方其他组分及工艺

表 1 F127-TPGS 不同比例对胶束包封率及载药量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of F127-TPGS different proportions on encapsulation efficiency and drug loading of MMs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

F127-TPGS 比例	包封率/%	载药量/%
9:1	77.59 $\pm$ 8.50	10.12 $\pm$ 1.11
8:2	78.91 $\pm$ 5.61	10.29 $\pm$ 0.73
7:3	82.37 $\pm$ 6.62	10.74 $\pm$ 0.86
6:4	83.58 $\pm$ 10.42	10.90 $\pm$ 1.36
5:5	81.77 $\pm$ 7.22	10.67 $\pm$ 0.94

条件 (聚合物质量浓度为 45 mg/mL, F127-TPGS 比例 6:4, 水化体积 10 mL, 水化时间 1 h, 水化温度 50 ℃), 考察 GL 不同用量对所制备胶束包封率及载药量的影响, 结果见表 3。包封率和载药量随着 GL 用量增加而增大, 当 GL 用量超过 7 mg/mL 时, 溶液呈现黏稠状, 故筛选 GL 用量为 7 mg/mL。

表 2 聚合物质量浓度对胶束包封率及载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

聚合物质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%
30	80.26±13.97	13.38±2.33
40	83.58±10.42	10.90±1.36
45	85.35±10.44	10.04±1.23
50	85.47±5.87	9.16±0.63

表 3 GL 用量对胶束包封率及载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of GL concentration on encapsulation efficiency and drug loading of MMs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

GL 用量/(mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%
5	82.42±7.47	8.24±0.75
6	85.35±10.44	10.04±1.23
7	87.90±9.91	11.83±1.33

2.3.4 水化温度的筛选 固定处方其他组分及工艺条件 (GL 用量 7 mg/mL, 聚合物质量浓度为 45 mg/mL, F127/TPGS 比例 6:4, 水化体积 10 mL, 水化时间 1 h) 分别考察不同水化温度下胶束的包封率及载药量, 结果见表 4。当水化温度从 40 ℃升高到 60 ℃时, 所制备的胶束的包封率先上升后下降, 水化温度为 50 ℃时, 胶束的包封率及载药量最高, 故选择 50 ℃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 0.5 h 时能基本得到均一的胶束溶液, 水化时间为 3.0 h 时所制备的胶束的包封率及载药量最佳, 故选择

表 4 水化温度对胶束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 of MMs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化温度/℃	包封率/%	载药量/%
40	71.89±9.90	9.68±1.33
50	87.90±9.91	11.83±1.33
60	78.21±8.27	10.53±1.11

表 5 水化时间对胶束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 of MMs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化时间/h	包封率/%	载药量/%
0.5	79.35±5.45	10.68±0.73
1.0	87.90±9.91	11.83±1.33
2.0	90.49±9.49	12.18±1.28
3.0	97.57±5.29	13.13±0.71

3.0 h 作为制备胶束的水化时间。

2.3.6 最优处方及工艺的确定 最终确定 GL-F127/TPGS-MMs 的处方及制备工艺如下: GL 70 mg、F127 270 mg、TPGS 180 mg, 加入无水乙醇 5 mL 超声 5 min 使之完全溶解, 45 ℃减压旋转蒸发除去溶剂, 加入预热至 50 ℃的 PBS (pH 7.4±0.1) 10 mL, 在 50 ℃下加热搅拌水化 3 h, 得到澄清、淡黄色、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 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 滤液即为 GL-F127/TPGS-MMs, 以此条件重复制备 3 批样品, 测定包封率、载药量。结果显示包封率为 (96.89±4.19)%, 载药量为 (13.21±0.68)%, 表明该方法重复性良好。

2.4 GL-F127/TPGS-MMs 的表征

2.4.1 粒径、Zeta 电位 取 GL-F127/TPGS-MMs 溶液, 装入比色皿中, 测试温度为 25 ℃, 重复 3 次, 测得平均粒径为 (28.20±5.63) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.20±0.06, Zeta 电位为 (-5.24±1.55) mV。

2.4.2 GL-F127/TPGS-MMs 的形态观察 采用透射电子显微镜 (TEM) 观察纳米胶束粒子形态, 取适量的 GL-F127/TPGS-MMs 溶液滴加在铜网上, 用滤纸在边缘吸去多余的纳米胶束, 自然晾干后观察胶束粒子形态。结果见图 2, 所制备的纳米胶束粒径在 10~30 nm, 胶束形态完整, 呈球形, 分布均匀, 可见明显的囊泡结构。

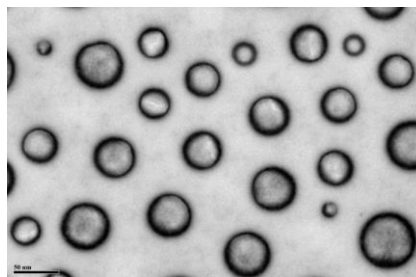


图 2 GL-F127/TPGS-MMs 的 TEM 图 (×200 000)

Fig. 2 TEM photograph of GL-F127/TPGS-MMs (×200 000)

2.5 稳定性实验

将 GL-F127/TPGS-MMs 溶液置于 4 ℃ 冰箱储存 10 d, 分别于第 3、7、10 天, 肉眼观察形态, 测定粒径、PDI、包封率及载药量。结果显示, GL-F127/TPGS-MMs 放置 10 d, 形态无明显变化, 粒径分布、包封率、载药量均无显著变化, 结果见表 6, 说明该纳米胶束在 4 ℃ 条件下放置 10 d 稳定。

表 6 GL-F127/TPGS-MMs 的储存稳定性 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 6 Storage stability of GL-F127/TPGS-MMs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

放置时间/d	平均粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
0	28.20±5.63	0.20±0.06	97.57±5.29	13.13±0.71
3	29.12±6.13	0.18±0.03	98.41±3.12	12.25±0.65
7	27.45±2.11	0.20±0.09	96.01±1.18	12.65±0.31
10	25.83±4.46	0.15±0.06	94.05±2.07	12.95±0.28

2.6 大鼠在体单向肠灌流实验

2.6.1 灌流液中 GL 的 HPLC 测定

(1) 对照品溶液配制: 精密称取 GL 对照品 10.92 mg, 用甲醇溶解定容, 制得质量浓度为 2.18 mg/mL 的 GL 对照品储备液。

(2) 供试品溶液的配制: 称取 GL-F127/TPGS-MMs 适量, 用 K-R 溶液溶解, 配制含 GL 质量浓度为 150 μg/mL 的供试品溶液。

(3) 专属性: 用 K-R 液配制 GL-F127/TPGS-MMs 和空白胶束溶液, 分别取上述样品各 1 mL, 加入适量的甲醇, 超声破坏胶束结构后, 定容至 5 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 按照“2.2.2”项下色谱条件进行分析, 辅料及溶剂在此条件下对 GL 的测定无干扰。

(4) 线性关系考察: 精密吸取 GL 对照品储备液, 用 K-R 液稀释配制成 87.20、43.60、21.80、17.44、8.72、4.36、2.18 μg/mL 的 GL 溶液, 进样测定。以 GL 峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得 GL 的标准曲线方程为 $Y=9481.6X-4597.9$, 线性范围 2.18~87.20 μg/mL, $r^2=1.0000$, 线性关系良好。

(5) 精密度试验: 以空白灌流液分别配制质量浓度为 53.60、21.80、8.72 μg/mL 的 GL 对照品溶液, 分别连续进样 3 次, 记录对应的峰面积, 计算 RSD 分别为 0.45%、0.67%、0.58%, 表明仪器精密度良好。

(6) 稳定性试验: 取“2.6.1 (2)”项下的供试品溶液, 置 (37.0±0.5) ℃ 恒温水浴中保温, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 取样滤过, 按“2.2.2”项下色谱条件测定, 结果 GL 峰面积的 RSD 为 1.55%, 表明供试品溶液稳定性良好。

(7) 加样回收率试验: 精密移取已知质量浓度的 GL-F127/TPGS-MMs 的灌流液 9 份, 分别加入对照品的量与其在胶束中的量的比值为 0.5:1、1:1、1.5:1, 每个比例为 3 份, 加入甲醇适量, 超声 (100 W, 20 kHz) 10 min, 定容至 10 mL, 摇匀, 按照“2.2.2”项下色谱条件测定, 计算加样回收率。结果测得 3 个质量浓度下的平均回收率分别为 100.54%、100.24%、99.85%, RSD 分别为 1.32%、0.67%、0.98%, 表明该方法回收率良好。

2.6.2 单向肠灌流实验 雄性 SD 大鼠 (实验前禁食 12 h, 期间自由饮水), 水合氯醛麻醉, 沿腹中线剪开腹腔 3~4 cm, 分离出肠段 (空肠为自幽门 15 cm 开, 回肠为自盲肠上行 20 cm 处), 结扎胆管^[16]。各肠段分别取 10 cm 于两端切口, 与两端切口处分别连接灌流液流入和流出管, 用预热至 37 ℃ 的生理盐水, 2 mL/min 快速灌流肠段, 最后用空气排空生理盐水。伤口处于红外灯下以生理盐水浸润的脱脂棉保湿保温。用预热至 37 ℃ 的 K-R 溶液 (称取氯化钠 7.80 g, 氯化钾 0.35 g, 碳酸氢钠 1.37 g, 磷酸二氢钠 0.32 g, 氯化镁 0.02 g, 葡萄糖 1.40 g, 加水定容至 1 000 mL, 即可得到 pH 值为 7.4 的 K-R 试液^[17]) 以 0.2 mL/min 灌流 15 min 平衡肠段, 之后用预热的供试液以 0.2 mL/min 平衡 30 min, 用已称定质量的装有灌流液的 EP 管进行灌流, 同时于出口处收集灌流液, 每 15 分钟更换 1 次收集小瓶, 然后称定质量, 灌流持续时间为 60 min。精密吸取载药胶束溶液和混悬液各 1 mL, 加入适量的甲醇, 超声破坏胶束结构后, 定容至 5 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 测定灌流液中 GL 的质量浓度, 大鼠处死后, 从入口处和出口处剪下肠段, 测量各肠段的内径与长度^[18-19]。

2.6.3 数据处理 采用质量法, 按公式计算吸收速率常数 (K_a) 和表观吸收系数 (P_{app})^[20]。

$$K_a = [1 - C_{out}Q_{out}/(C_{in}Q_{in})]Q/V$$

$$P_{app} = -Q \ln(C_{out}Q_{out}/C_{in}Q_{in})/2\pi r l$$

Q_{in} 和 Q_{out} 分别为灌入液和收集液的体积 (根据测得质量按密度为 1 g/mL 折算成体积), C_{in} 和 C_{out} 分别为肠道进口和出口灌流液中 GL 的质量浓度, l 为灌流肠段的长度, r 为

灌流肠段的内径半径, Q 为灌流体积流量, V 为灌流肠段的体积

2.6.4 不同肠段对 GL 的吸收特性 取 SD 大鼠 24 只, 随机分为 GL 混悬液空肠组、GL 混悬液回肠组、GL-F127/TPGS-MMs 空肠组以及 GL-F127/TPGS-MMs 回肠组, 每组 6 只, 配制含 GL 质量浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 的 GL 混悬液和 GL-F127/TPGS-MMs 灌流液^[21-22], 按“2.6.2”项下方法, 取相应肠段进行

实验, 每 15 分钟取样 1 次, 共取 4 次。样品经处理后进行 HPLC 测定, 计算 4 次取样的 K_a 和 P_{app} 值, 取平均值。结果见表 7, GL 混悬液和 GL-F127/TPGS-MMs 在空肠吸收较快, 表明空肠是 GL 的最佳吸收部位; GL-F127/TPGS-MMs 在空肠的 K_a 和 P_{app} 与混悬液比较差异性显著 ($P < 0.05$), 说明 GL-F127/TPGS-MMs 能提高 GL 的肠吸收, 且主要促进部位是空肠。

表 7 GL 混悬液和 GL-F127/TPGS-MMs 在不同肠段的吸收参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Absorption parameters of GL suspension and GL-F127/TPGS-MMs in different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	回肠		空肠	
	$K_a/(\times 10^{-4} \text{ s}^{-1})$	$P_{app}/(\times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_a/(\times 10^{-4} \text{ s}^{-1})$	$P_{app}/(\times 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1})$
GL 混悬液	2.19 ± 0.63	2.88 ± 0.98	$3.16 \pm 0.77^*$	$4.26 \pm 1.02^*$
GL-F127/TPGS-MMs	$3.38 \pm 0.93^*$	3.78 ± 1.29	$5.09 \pm 1.42^{**}$	$6.19 \pm 1.11^{**}$

与回肠组比较: $^*P < 0.05$; 与 GL 混悬液组比较: $^{**}P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs ileum group; $^{**}P < 0.05$ vs GL suspension group

3 讨论

目前, 口服给药仍然是最方便的给药方式, 但是 GL 极性大, 在水溶液中易形成聚集体, 而导致其肠道渗透性较差。聚合物纳米胶束因具有缓释、提高药物在吸收部位的浓度等优点在口服给药系统中应用较多, 而表面活性剂相互间混合复配形成的混合纳米胶束体系无论其增溶、分散、乳化或者稳定性都优于单一表面活性剂。

F127 具有较好的黏液渗透性、有助于粒子及药物穿透小肠黏液层, TPGS 具有促进粒子及药物细胞摄取^[23-25], 本研究利用两者优势制备 F127/TPGS 混合胶束, 并包载 GL 以提高其口服吸收。粒径测定结果表明, 所制备的 MMs 粒径较小, 分布较均匀, 平均粒径是 28.2 nm。透射电镜下胶束的形态均匀, 圆整, 无黏连, 表明 F127 与 TPGS 形成了球形混合胶束。

灌流实验过程中, 肠道不仅会吸收药物, 也会吸收或分泌水分, 造成肠灌流液出口端质量浓度的改变, 目前多采用酚红法和重量法来减少实验误差, 但有研究表明, 肠道对酚红同样也存在一定程度的吸收, 从而导致所测吸收参数较实际值偏低。聂淑芳等^[26]对重量法和酚红法进行了比较, 结果显示, 重量法能显著减少实验误差, 提高实验数据的准确性。故本课题采用重量法对出口液的体积进行校正^[27]。在大鼠单向在体肠灌流实验中, 以较低的体积流量 (0.2~0.3 mL/min) 对某一肠段进行单向灌流, 对肠壁黏膜的损伤小, 且实验条件与口服给药后药物接

触的肠道环境较接近, 吸收速率稳定, 与人体有良好的相关性^[27]。实验结果表明, GL-F127/TPGS-MMs 在空肠中的 K_a 和 P_{app} 均大于原料药, 且差异具有显著性, 说明 GL-F127/TPGS-MMs 显著提高了小肠对 GL 的吸收。

参考文献

- [1] Shibata S. A Drug over the Millennia: Pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2000, 120(6): 849-862.
- [2] 张明发, 沈雅琴. 甘草酸及其衍生物的抗炎和抗变态反应研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2011, 26(5): 359-364.
- [3] 王若宁, 柳雨影, 陈健, 等. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(23): 5876-5886.
- [4] 黄群荣, 马哲. 甘草酸的药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(5): 384-387.
- [5] Wang Y, Zhang Y, Peng G, et al. Glycyrrhizin ameliorates atopic dermatitis-like symptoms through inhibition of HMGB1 [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 60: 9-17.
- [6] 靳士晓, 靳世英, 李仙义, 等. 甘草酸磷脂/胆盐混合胶束的制备及其体内评价 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(4): 280-285.
- [7] 潘旭旺, 王福根, 方红英, 等. 18 α -甘草酸固体脂质纳米粒的药动学研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(9): 1086-1089.
- [8] 梁宇飞, 张欣欣, 许洁, 等. 星点设计-效应面法优化姜黄素-胡椒碱聚合物复方胶束的处方工艺研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(1): 43-50.

- [9] 童晓东, 范永春, 严 玮. 姜黄素维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯-聚乙二醇硬脂酸酯 15 胶束对姜黄素溶解度和口服生物利用度的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 902-906.
- [10] Chen D, Xia D, Li X, *et al.* Comparative study of Pluronic® F127-modified liposomes and chitosan-modified liposomes for mucus penetration and oral absorption of cyclosporine A in rats [J]. *Int J Pharm*, 2013, 449(12): 1-9.
- [11] Cianetti S, Cooper V B, Attenni B, *et al.* Enhancement of intestinal absorption of 2-methyl cytidine prodrugs [J]. *Drug Deliv*, 2010, 17(4): 214-222.
- [12] 唐 岚, 吕龙飞, 沈丽婷, 等. 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 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1766-1772.
- [13] Patra A, Satpathy S, Shenoy A K, *et al.* Formulation and evaluation of mixed polymeric micelles of quercetin for treatment of breast, ovarian, and multidrug resistant cancers [J]. *Int J Nanomedic*, 2018, 13: 2869-2881.
- [14] Shen H, He D, Wang S, *et al.* Preparation, characterization, and pharmacokinetics study of a novel genistein-loaded mixed micelles system [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2018, 44(9): 1536-1542.
- [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] 吴干斌, 褚延乐. 大鼠在体单向肠灌流模型研究冬凌草乙素的吸收动力学 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(15): 3192-3197.
- [17] 孙勇兵, 涂亮星, 甘 薇, 等. 在体单向肠灌流模型研究帕拉米韦拟肽类衍生物的大鼠小肠吸收特性 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(11): 2763-2768.
- [18] Dahlgren D, Roos C, Peters K, *et al.* Evaluation of drug permeability calculation based on luminal disappearance and plasma appearance in the rat single-pass intestinal perfusion model [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 19(2): 542-567.
- [19] Xiong S, Li J L, Mu Y L, *et al.* The absorption of oral morroniside in rats: *In vivo*, *in situ* and *in vitro* studies [J]. *Acta Pharm*, 2019, 69(2): 287-296.
- [20] 许 蕾, 杨中林. 大鼠在体单向灌流法研究橙皮苷肠道吸收性质 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(8): 594-597.
- [21] 吴青青, 陈 彦, 辛 然, 等. 甘草主成分及其提取物肠吸收差异的多元化分析 [J]. 药科学报, 2012, 47(5): 657-663.
- [22] 闫 涛, 姜 维, 王琴会, 等. 苦参碱和甘草酸的小肠吸收特性分析 [J]. 中国药师, 2017, 20(11): 1906-1910.
- [23] Meng X, Liu J, Yu X, *et al.* Pluronic F127 and D- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) mixed micelles for targeting drug delivery across the blood brain barrier [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 29-41.
- [24] Saxena V, Hussain M D. Poloxamer 407/TPGS mixed micelles for delivery of gambogic acid to breast and multidrug-resistant cancer [J]. *Int J Nanomedic*, 2012, 7(10): 713-721.
- [25] Grimaudo M A, Pescina S, Padula C, *et al.* Poloxamer 407/TPGS mixed micelles as promising carriers for cyclosporine ocular delivery [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(2): 571-584.
- [26] 聂淑芳, 潘卫三, 杨星钢, 等. 对大鼠在体肠单向灌流技术中重量法的评价 [J]. 中国新药杂志, 2005, 14(10): 56-59.
- [27] 马永贵, 袁 龙, 王文清, 等. 在体单向肠灌流模型研究小檗碱磷脂固体分散体的大鼠肠吸收特性 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1820-1824.