

共载同源成分葛根素与大豆苷元的聚合物混合胶束的制备及表征

朱卫丰, 况文亮, 李文栋, 丁 权, 周志炜, 吴文婷*, 管咏梅*

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 鉴于葛根黄酮类成分间溶解性与渗透性的自调节作用, 以泊洛沙姆 407 (Pluronic F127, F127) 和 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯 (Solutol HS15) 为载体材料制备共载葛根素与大豆苷元的聚合物混合胶束 (puerarin and daidzein co-delivery polymer mixed micelles, PD-FS/PMMs) 及其冻干粉, 以实现同源成分共载。方法 采用薄膜水化法制备 PD-FS/PMMs, 以胶束稳定性为考察指标进行了处方工艺优化; 应用核磁共振氢谱、透射电子显微镜与激光粒度仪等对其进行物理性能表征, 并通过体外透析法考察药物释放情况。为了进一步提升胶束相关口服制剂的成型性, 还对胶束溶液进行了冻干处理并基于外观与复溶效果考察了冻干保护剂的种类与用量, 同时开展了冻干粉的性能表征研究。结果 成功制备了 PD-FS/PMMs, 最佳处方为葛根素与大豆苷元的投药量分别为 80.98、3.46 mg, 载体总量为 200 mg, 其中, F127 质量分数为 77.30%; 制备的胶束外观圆整, 粒度均匀, 粒径为 18~20 nm, 且 2 种成分的体外释放互不影响; 确定了胶束溶液的最佳冻干工艺是以 40 mg/mL 甘氨酸作为冻干保护剂, 冻干粉形态以片状为主且复溶效果好。结论 研究不仅解决了不同疏水性成分共载的难题, 且实现了同源成分共载胶束的制备, 为后期开展葛根素口服降压制剂的体内研究与临床开发奠定基础, 并为旨在高生物利用度的共载制剂体系的设计提供共载成分筛选的新思路。

关键词: 葛根素; 大豆苷元; 共载; 聚合物混合胶束; 冻干; 自调节; 同源成分; 薄膜水化法; 体外透析法; 成型性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)04-1004-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.04.006

Preparation and characterization of polymer mixed micelles co-loaded with homologous components of puerarin and daidzein

ZHU Wei-feng, KUANG Wen-liang, LI Wen-dong, DING Quan, ZHOU Zhi-wei, WU Wen-ting, GUAN Yong-mei

Key laboratory of Modern Chinese Materia Medica Preparation of Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective Based on the self-regulatory effect of solubility and permeability between the flavonoid components of *Gegen* (*Pueraria lobata*) found in the previous study, Pluronic F127 (F127) and Solutol HS15 were used as carrier materials to prepare polymer mixed micelles of puerarin and daidzein co-delivery (PD-FS/PMMs) and their lyophilized powder to achieve co-loading of homologous components. **Methods** In this study, PD-FS/PMMs were prepared by thin film hydration, and the stability of PD-FS/PMMs was used as an indicator for the optimization of the prescription process. Proton nuclear magnetic resonance, transmission electron microscopy and laser particle size measurement were applied to characterize the physical properties of PD-FS/PMMs, and the release of the drug was investigated by *in vitro* dialysis. To further enhance the formability of PD-FS/PMMs-related oral formulations, PD-FS/PMMs were lyophilized and the type and dosage of lyoprotectant were investigated based on the appearance and re-solubilization effect of PD-FS/PMMs, and a performance characterization study of the lyophilized powder was carried out. **Results** The results showed that PD-FS/PMMs were successfully prepared with an optimal prescription of 80.98 mg puerarin, 3.46 mg daidzein and 200 mg carrier, of which F127 accounted for 77.30% of the carrier. The PD-FS/PMMs were prepared with a rounded appearance and uniform particle size of 18—20 nm, and the *in vitro* release of the two components did not affect each other. The optimal lyophilisation process for PD-FS/PMMs was determined to be 40 mg/mL glycine as a lyophilisation protectant, with the lyophilised powder form being

收稿日期: 2021-10-24

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC1702904); 江西省自然科学基金项目 (20212BAB216013)

作者简介: 朱卫丰, 博士生导师, 教授, 从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: zwf0322@126.com

*通信作者: 吴文婷, 博士, 硕士生导师, 从事中药新剂型与新剂型研究。E-mail: wuwenting0109@163.com

管咏梅, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术及食疗学研究。E-mail: guanym2008@163.com

predominantly flake and with good re-solubilisation. **Conclusion** The study not only solved the problem of co-loading of different hydrophobic components, but also achieved the preparation of co-delivery micelles of homologous components, and laid the foundation for later *in vivo* studies and clinical development of oral antihypertensive formulations of puerarin, and provided a new idea of co-delivery component screening for the design of co-delivery formulation systems aiming to improve the low bioavailability.

Key words: puerarin; daidzein; co-delivery; polymer mixed micelles; lyophilized powder; self-adjusting; homologous components; thin-film hydration method; *in vitro* dialysis; formability

聚合物混合胶束 (polymer mixed micelles, PMMs) 由 2 种或 2 种以上两亲性聚合物自组装形成的聚集体, 是单一聚合物胶束 (PMs) 的延伸^[1], 不仅有效继承了单一 PMs 的优点, 且拓展了自己的独有优势。研究发现混合胶束不仅有更强的增溶能力、稳定性, 且能保护药物不受胃肠道环境影响, 此外, 由于 PMMs 的粒径通常 <100 nm, 可通过细胞内吞和胞饮作用被吸收, 同时基于其内部载药位点的多样性, PMMs 表现出实现多药共载的能力。共载递药多以增加药效为目标, 但共载成分的筛选思路局限, 常见的成分组合多为公认的联合用药方案^[2]。课题组前期研究发现同源成分, 即来源相同的成分, 如葛根黄酮类成分, 其成分间可能存在着药效协同与物理性质相互调节的作用, 基于此, 采用 PMMs 实现同源成分共载为口服生物利用度低的药物提供了口服制剂研究的新思路。

葛根素 (puerarin) 是葛根的主要生物活性成分之一, 具有广泛的药理效应, 如血管扩张等, 临床用于治疗心血管疾病等^[3-5], 目前临床上应用的葛根素制剂主要是注射剂, 但发现其存在诸多不良反应^[6], 便捷的口服给药途径则成为突破口之一。然而, 葛根素属于生物药剂学分类系统 IV 类药物^[7], 影响其口服生物利用度的关键是溶解度或渗透性, 故有必要开发一种能同时改善溶解度及渗透性的递药系统。本课题组前期通过系统药理学结合细胞水平研究了葛根治疗高血压的机制^[8], 发现其中黄酮类成分如葛根素及大豆苷元 (daidzein, 7,4'-二羟基异黄酮) 均对葛根发挥降压作用起到了重要作用^[9-10], 同时课题组的前期研究^[11]表明大豆苷元对葛根素的渗透性有促进作用, 因此, 若将上述 2 种同源成分共载于同一载体, 有望改善葛根素的溶解度及渗透性的同时实现药效协同作用。但是由于葛根素的脂水分配系数 ($\lg P$) 为 0.480, 而大豆苷元的 $\lg P$ 为 2.836, 疏水性差异较大, 故需要一种能同时共载葛根素与大豆苷元的载体。

鉴于本课题组前期成功制备了由泊洛沙姆 407 (Pluronic F127) 与 15-羟基硬脂酸聚乙二醇脂

(Solutol HS15) 构成的混合胶束 (mixed micelles of Pluronic F127 and Solutol HS15, FS/PMMs), 并实现了对葛根素单一药物的包载^[12], 并通过结合分子模拟与各种实验表征手段证实了 FS/PMMs 内部空间存在不同疏水程度的载药位点, 为实现疏水性差异较大的药物的共载提供了可能^[13]。基于上述研究基础, 本实验以 FS/PMMs 作为载体制备共载葛根素与大豆苷元的载药胶束 (mixed micelles composed of Pluronic F127 and Solutol HS15, PD-FS/PMMs), 并对其处方工艺优化; 同时, 采用核磁共振氢谱 (¹H-NMR)、透射电子显微镜 (TEM) 与激光粒度仪等对最佳处方工艺下制备的载药胶束进行物理性能表征, 并通过体外透析法考察药物释放情况。此外, 为了进一步提升胶束相关口服制剂的成型性, 对最佳工艺制备的胶束溶液进行冻干工艺筛选及表征, 为后期开展葛根素的口服降压制剂的体内研究与临床开发奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪, 美国沃特世公司; N-1300 型旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; SCIENTZ-12 型冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Nano-S 型马尔文纳米粒度仪, 英国马尔文公司; Bruker Avance III HD 600MHz 型核磁共振波谱仪, 瑞士 Bruker 公司; SU8010 型热场发射扫描电子显微镜 (SEM)、Hitachi MC1000 型离子溅射仪, 日本日立公司; Tecnai G2 型透射电子显微镜, 美国菲达康有限责任公司; Spectrum Two 型傅里叶变换红外光谱仪、Diamond DSC 型差示热量扫描量热仪, 美国 PerkinElmer 公司; ZRS-8G 型智能溶出仪, 天大天发科技有限公司。

1.2 试剂

葛根素对照品, 批号 110752-201816, 中国食品药品检定研究院, 质量分数 ≥98%; 葛根素原料药, 批号 18082401, 成都普菲德生物技术有限公司, 质量分数 98%; 大豆苷元原料药, 批号 20005-201808, 南昌贝塔生物科技有限公司, 质量分数 ≥97%; 大

豆昔元对照品,批号 18022808,成都普菲德生物技术有限公司,质量分数 $\geq 98\%$;泊洛沙姆 407(F127,批号 GNC06921B)、15-羟基硬脂酸聚乙二醇脂(HS15,批号 17600947G0),德国巴斯夫公司;葡萄糖,批号 20191116H,范德生物科技有限公司;甘露醇,批号 C2002155,阿拉丁生化科技股份有限公司;乳糖(批号 D0808A)、D-海藻糖无水(批号 S0425A),美仑生物技术有限公司;甘氨酸,批号 G8200,索莱宝科技有限公司;蔗糖,批号 57-50-1,天津市大茂化学试剂厂;2-羟丙基- β -环糊精,批号 RH167889,罗恩科学仪器有限公司;分析甲醇,西陇科学股份有限公司;色谱乙腈、色谱甲醇,美国天地公司。

2 方法与结果

2.1 PD-FS/PMMs 的制备

采用薄膜水化法,分别称取 80.00 mg 葛根素、3.00 mg 大豆昔元、160.00 mg F127 和 40.00 mg HS15 置于 100 mL 圆底烧瓶中,加入 20 mL 甲醇完全溶解后在 40 °C、50 r/min 条件下旋蒸,使甲醇旋干形成薄膜,真空干燥过夜。精密量取 10 mL 的超纯水振摇 5 min 水化,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过取续滤液,即得。

2.2 葛根素渗漏率的测定

2.2.1 色谱条件^[14] 色谱柱为飞诺美 00G-4252-E0 C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);等度洗脱,流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(16:84);进样量 10 μL ;柱温 30 °C;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 254 nm,理论塔板数以葛根素计算为 10 000。

2.2.2 葛根素渗漏率计算 在制备好 PD-FS/PMMs 后取样测定葛根素含量,并将 PD-FS/PMMs 放入 25 °C 恒温箱中,待 48 h 后取上清液进行葛根素含量测定。

葛根素渗漏率=(载入胶束的葛根素质量-48 h 后胶束中葛根素质量)/载入胶束的葛根素质量

2.3 PD-FS/PMMs 处方及制备工艺考察及优化

2.3.1 单因素考察 以葛根素在混合胶束中 48 h 渗漏率为评价指标,通过考察大豆昔元用量(1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mg)、葛根素用量(60.00、80.00、90.00、100.00、120.00 mg)、F127 质量分数(10%、30%、50%、70%、90%)、旋蒸温度(20、30、35、40、50 °C)、甲醇用量(10、20、25、30、40 mL) 5 个因素对评价指标的影响,保持制备过程中其他条件不变(在单因素改变的基础上,保持

“2.1”项中制备 PD-FS/PMMs 的其他条件不变),选出影响 PD-FS/PMMs 最大的 3 个因素,为响应面实验因素水平的选择提供依据。

不同单因素实验中不同大豆昔元用量渗漏率分别为(5.86 $\pm$ 1.21)%、(4.69 $\pm$ 0.30)%、(1.40 $\pm$ 0.67)%、(2.28 $\pm$ 1.62)%、(5.36 $\pm$ 1.23)%、不用葛根素用量渗漏率分别为(3.11 $\pm$ 0.94)%、(1.89 $\pm$ 0.80)%、(2.84 $\pm$ 0.41)%、(3.79 $\pm$ 0.74)%、(23.91 $\pm$ 2.79)%,不同 F127 质量分数渗漏率分别为(3.79 $\pm$ 1.71)%、(5.96 $\pm$ 1.88)%、(5.18 $\pm$ 2.06)%、(1.71 $\pm$ 1.35)%、(4.55 $\pm$ 0.60)%,不同旋蒸温度渗漏率分别为(1.56 $\pm$ 0.31)%、(1.78 $\pm$ 0.28)%、(1.54 $\pm$ 0.48)%、(1.42 $\pm$ 0.33)%、(1.66 $\pm$ 0.29)%,不同甲醇用量渗漏率分别为(1.40 $\pm$ 0.10)%、(1.60 $\pm$ 0.20)%、(1.54 $\pm$ 0.40)%、(1.39 $\pm$ 0.21)%、(1.49 $\pm$ 0.29)%。单因素实验结果表明,大豆昔元用量、葛根素用量、F127 质量分数 3 个因素对胶束中葛根素渗漏率影响较大,而旋蒸温度和甲醇用量对于葛根素渗漏率无明显影响。

2.3.2 Box-Behnke 设计-响应面法优化处方 用 Design-Expert 8 软件,根据单因素考察结果,选取影响 PD-FS/PMMs 渗漏率(Y)最大的 3 个因素葛根素用量(X_1)、大豆昔元用量(X_2)、F127 质量分数(X_3)进行进一步优化,用 Box-Behnken 响应面法对处方进一步优化^[23],实验设计与结果见表 1。

利用 Design-Expert8.0 统计软件对表 1 数据进行回归分析,建立关于葛根素渗漏率的回归模型,结果为 $Y=7.419\ 2-0.181\ 45\ X_1+0.199\ 05\ X_2+0.026\ 338\ X_3+9.247\ 74\times 10^{-3}\ X_1X_2-2.990\ 12\times 10^{-4}\ X_1X_3+5.692\ 28\times 10^{-4}\ X_2X_3+1.467\ 42\times 10^{-3}\ X_1^2+0.062\ 2\ X_2^2-8.205\ 53\times 10^{-3}\ X_3^2$ 。

对该模型进行方差分析及模型系数显著性检验,结果如表 2 所示, $P=0.000\ 8<0.05$,说明该试验模型具有显著性意义,其中回归失拟项 $P=0.222\ 5>0.05$,无显著性差异,说明模型拟合度良好。由方差分析结果可知,对回归方程进行检验,葛根素渗漏率模型的相关性系数(R^2)为 0.951 4,表明该模型可以较好的描述各因素和响应值之间的关系;决定校正系数(R_{adj}^2)为 0.888 8,说明该模型能解释 88.88%响应值的变化,表明该模型与数据的拟合度很高,实验误差小。在所选取的 3 个因素中,葛根素用量和大豆昔元用量对结果具有显著影响,按照对结果的影响大小排序为葛根素用量>大豆昔元用

量>F127 质量分数。

图 1 直观的给出了各个因素相互作用的 3D 响应曲面图, 根据所拟合的图形分析各个因素对葛根素渗漏率的影响。利用 Design-Expert 8.0 统计软件求解回归方程, 以葛根素渗漏率为指标得到的最佳处方条件为葛根素用量 80.98 mg、大豆苷元用量

为 3.46 mg、F127 质量分数为 77.30%, 此条件下葛根素渗漏率为 1.03%。

2.3.3 最佳处方验证 根据优化后的处方工艺进行重复实验验证, 将最优处方工艺平行 3 次进行葛根素渗漏率测定实验, 并与所建立的模型预测值进行比较, 判断所建模型的可行性。

表 1 Box-Behnken 设计-响应面法实验安排与结果

Table 1 Arrangement and results of Box-Behnken design-response surface method

试验号	X_1/mg	X_2/mg	$X_3/\%$	$Y/\%$	试验号	X_1/mg	X_2/mg	$X_3/\%$	$Y/\%$	试验号	X_1/mg	X_2/mg	$X_3/\%$	$Y/\%$
1	60 (-1)	1.0 (-1)	50 (0)	2.77	7	90 (0)	3.5 (0)	50 (0)	1.76	13	120 (+1)	6.0 (+1)	50 (0)	9.85
2	60 (-1)	3.5 (0)	10 (-1)	3.18	8	90 (0)	1.0 (-1)	90 (+1)	2.99	14	90 (0)	3.5 (0)	50 (0)	2.72
3	120 (+1)	3.5 (0)	90 (+1)	7.02	9	60 (-1)	6.0 (+1)	50 (0)	3.76	15	120 (+1)	3.5 (0)	10 (-1)	17.29
4	90 (0)	3.5 (0)	50 (0)	3.17	10	60 (-1)	3.5 (0)	90 (+1)	2.93	16	90 (0)	6.0 (+1)	90 (+1)	1.60
5	90 (0)	3.5 (0)	50 (0)	1.10	11	120 (+1)	1.0 (-1)	50 (0)	31.81	17	90 (0)	1.0 (-1)	10 (-1)	4.57
6	90 (0)	6.0 (+1)	10 (-1)	2.09	12	90 (0)	3.5 (0)	50 (0)	1.26					

表 2 各因素回归系数和方差分析

Table 2 Regression coefficients and variance analysis for each factor

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	21.72	9	2.41	15.21	0.000 8	极显著	X_1^2	7.34	1	7.34	46.30	0.000 3	极显著
X_1	9.01	1	9.01	56.78	0.000 1	极显著	X_2^2	0.64	1	0.64	4.01	0.085 2	
X_2	1.43	1	1.43	9.04	0.019 7	显著	X_3^2	0.07	1	0.07	0.46	0.520 5	
X_3	0.59	1	0.59	3.72	0.095 2		残差	1.11	7	0.16			
X_1X_2	1.92	1	1.92	12.13	0.010 2	显著	失拟项	0.70	3	0.23	2.27	0.222 5	不显著
X_1X_3	0.51	1	0.51	3.25	0.114 6		净误差	0.41	4	0.10			
X_2X_3	0.03	1	0.03	0.08	0.783 3		总和	22.83	16				

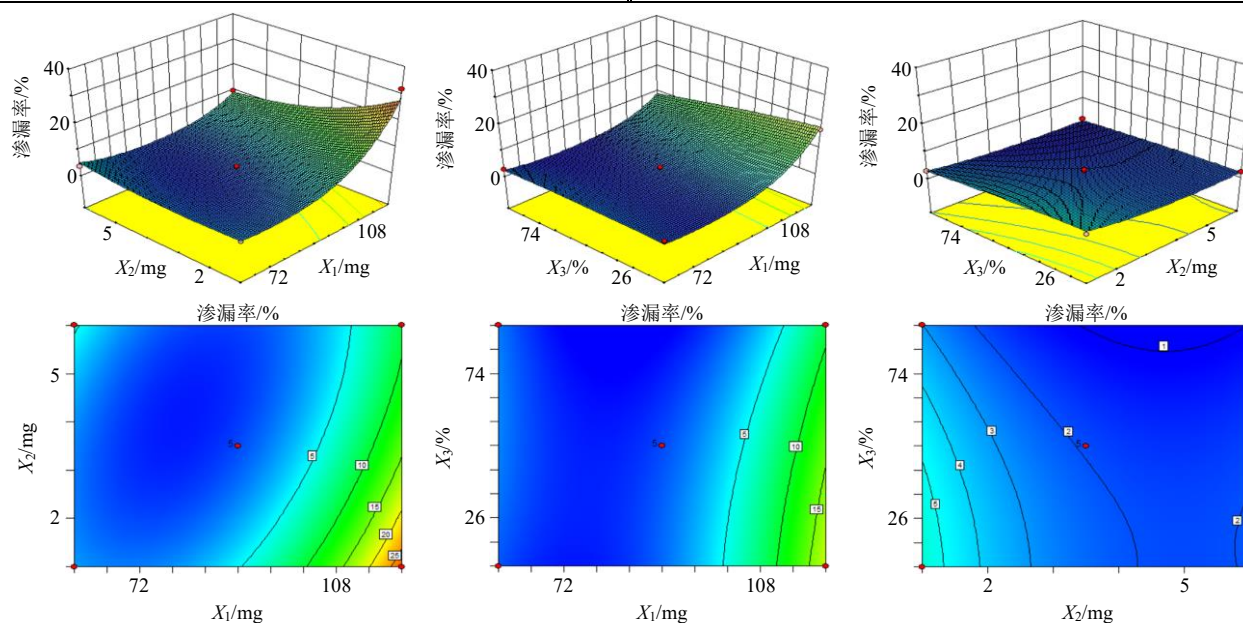


图 1 F127 比例、葛根素用量和大豆苷元用量对葛根素渗漏率的响应曲面图和等高线图

Fig. 1 Response surface and contour plot for effects of ratio of F127, amount of puerarin and daidzein on leakage ratio of puerarin

分别称取 80.00 mg 葛根素、3.50 mg 大豆苷元、150 mg F127 和 50 mg HS15 至 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 20 mL 甲醇完全溶解后在 40 °C、50 r/min 条件下旋蒸, 使甲醇旋干形成薄膜, 静置过夜。精密量取 10 mL 的超纯水振摇 5 min 水化, 测得 3 批次 PD-FS/PMMs 中葛根素渗漏率分别为 0.96%、0.95%、0.97%, 平均为 0.96%, RSD 为 0.85%, 与理论预测值 (1.03%) 相比无显著差异, 表明所建立的数学模型预测性较好。

2.4 PD-FS/PMMs 的表征

2.4.1 粒径分布及 TEM 观察 将 PD-FS/PMMs 稀释至适当倍数, 取适量置于石英比色皿中, 用马尔文粒径仪测定其粒径。将 PD-FS/PMMs 稀释 10 倍, 取 10 μ L 滴在覆有支持膜的铜网上, 静置 3 min 后用滤纸吸干多余 PD-FS/PMMs, 再滴加 1% 磷钨酸溶液于铜网上, 染色 3 min 后用滤纸吸去多余 PD-FS/PMMs, 常温干燥 24 h, 待溶液完全干燥后置于 TEM 下观察^[15]。结果如图 2 所示, PD-FS/PMMs 粒径分布均匀, 在 18~20 nm; TEM 结果显示 PD-FS/PMMs 呈圆球形, 形态完整。

2.4.2 ^1H -NMR 检测 取 1 mg 葛根素和大豆苷元分别用 3 mL 氘代水和氘代氯仿溶解后, 分别取出 1 mL 至核磁共振管中。另外, 移取 10 mL 重水至载药薄膜的圆底烧瓶中, 摇晃使其水化, 同样取出 1 mL 至核磁共振管中。将样品进行 ^1H -NMR (600 MHz) 检测^[16]。结果如图 3 所示, 葛根素在化学位移值 δ 6.87 (H-12, 14)、7.26 (H-11, 15)、7.95 (H-4) 等位置有

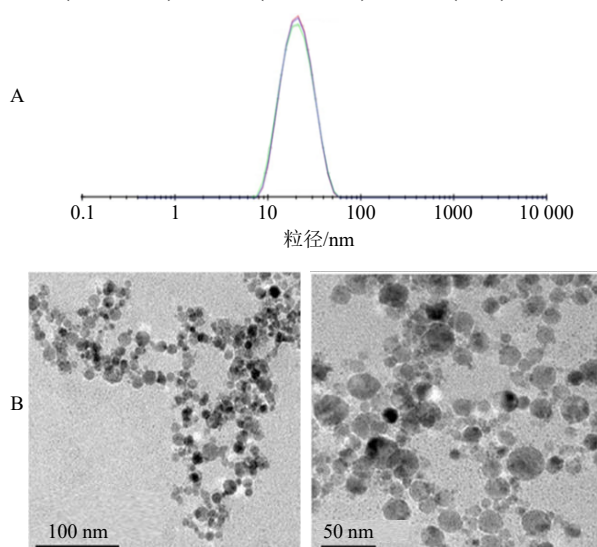


图 2 PD-FS/PMMs 的粒径分布 (A) 和 TEM 图 (B)

Fig. 2 Particle size distribution (A) and TEM images (B) of PD-FS/PMMs

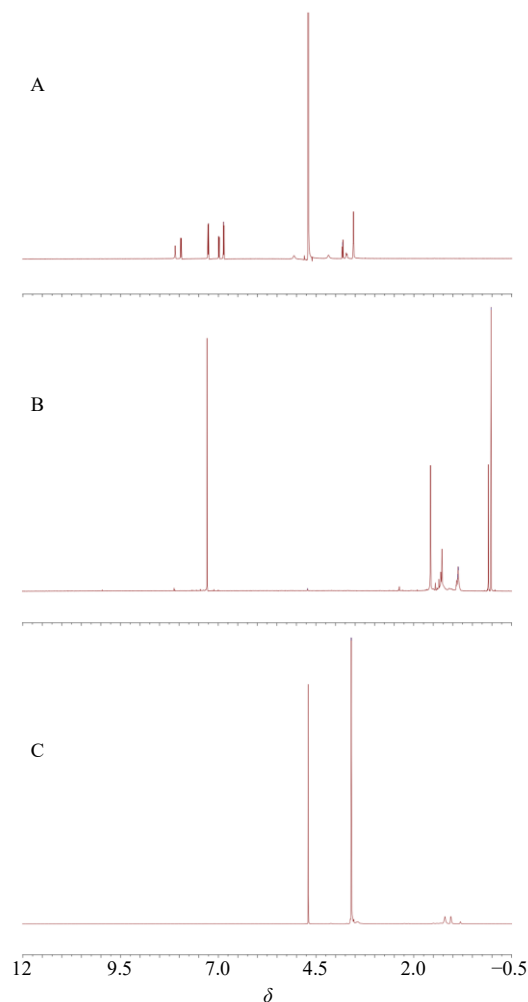


图 3 葛根素 (A)、大豆苷元 (B)、PD-FS/PMMs (C) 的 ^1H -NMR 图

Fig. 3 ^1H -NMR spectra of puerarin (A), daidzein (B) and PD-FS/PMMs (C)

其特征峰。大豆苷元在化学位移值 δ 7.28 (H-11, 15)、1.31 (H-7) 等位置有其特征峰。而在载药胶束中 2 种成分的特征峰均已消失或明显减弱, 表明葛根素和大豆苷元均已包载于胶束中。

2.5 体外释放实验

2.5.1 葛根素与大豆苷元的色谱条件^[14] 色谱柱为飞诺美 00G-4252-E0 C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 保护柱 KJO-4282 C_{18} (4 mm $\times$ 3 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~7 min, 16% 乙腈; 7~14 min, 16%~51% 乙腈; 14~20 min, 51%~16% 乙腈; 进样量 10 μ L; 柱温 30 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 254 nm; 理论塔板数以葛根素峰计算为 10 000。

2.5.2 体外透析实验 精密量取 5 mL PD-FS/PMMs 置于透析袋中, 两端用透析袋夹夹紧并排除多余气

泡,置于含有 200 mL pH 为 6.8 的 10 mg/mL HP- β -环糊精磷酸盐缓冲液(PBS)释放介质的溶出杯中,在 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、100 r/min 条件下进行实验。分别于 0.5、1、2、4、8、10、12、24、32、36 h 取样 2 mL,同时补充 2 mL 同温介质,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后取续滤液进样,计算药物质量浓度和累积释放率(Q)^[17],并计算葛根素和大豆苷元释放曲线间相似度因子(f_2)^[18]。

$$Q = (V_e \sum_{i=0}^n C_n + V C_n) / m$$

V_e 为取样体积, C_n 为第 n 个时间点中药物的质量浓度, m 为透析袋中药物的含量, V 为释放液体积

$$f_2 = 50 \lg \{ 100 / [1 + \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 / n]^{1/2} \}$$

R_i 和 T_i 分别为参比和受试制剂第 i 时间点的平均累积释放度, n 为测试点数

当 $0 < f_2 < 50$ 时,表明两者任一取样点平均累积释放度差异大于 10%,释放行为不相似。当 $50 \leq f_2 < 100$ 时,表明两者释放行为相似。当 $f_2 = 100$ 时表明两者释放行为完全相同。

由表 3 可知,葛根素和大豆苷元的释放曲线均与 Weibull 释放动力学方程拟合度最高,相关系数均大于 0.99。由图 4 可知,两者释放曲线相似度因子 $f_2 = 33 < 50$,表明两者释放行为并不相似,且葛根素在胶束中释放快于大豆苷元。为进一步探讨释放机制,用 Ritger-Peppas 模型对 2 种药物释放曲线

表 3 PD-FS/PMMs 中葛根素与大豆苷元的体外释放动力学模型

Table 3 Drug *in vitro* release kinetics models of puerarin and daidzein from PD-FS/PMMs

药物	模型	方程	R^2
葛根素	零级动力学	$Q = 0.0194t + 0.4572$	0.59
	一级动力学	$\ln(1-Q) = -0.1460t - 0.4355$	0.97
	Higuchi	$Q = 0.15431t^{1/2} + 0.2284$	0.79
	Weibull	$\ln[\ln(1/(1-Q))] = 0.8476 \ln t - 1.2343$	0.99
	Ritger-Peppas	$\ln Q = 0.4501 \ln t - 1.3438$	0.89
	Hixon-Crowell	$(1-Q)^{1/3} = -0.0208t + 0.8133$	0.86
大豆苷元	零级动力学	$Q = 0.0218t + 0.2210$	0.84
	一级动力学	$\ln(1-Q) = -0.0592t - 0.1691$	0.98
	Higuchi	$Q = 0.1606t^{1/2} + 0.0032$	0.96
	Weibull	$\ln[\ln(1/(1-Q))] = 0.8276 \ln t - 2.0959$	1.00
	Ritger-Peppas	$\ln Q = 0.6194 \ln t - 2.1211$	0.97
	Hixon-Crowell	$(1-Q)^{1/3} = -0.0073t + 0.2597$	0.84

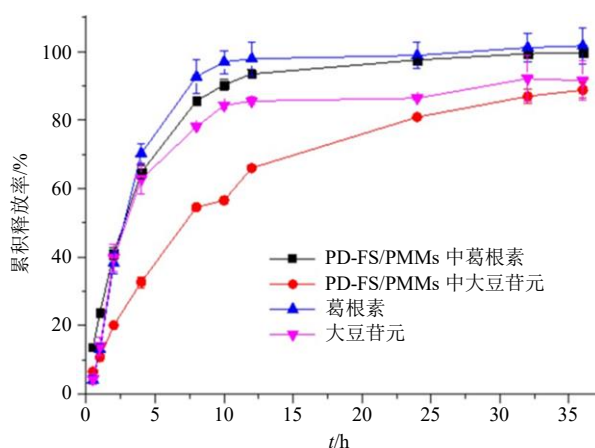


图 4 PD-FS/PMMs 中葛根素与大豆苷元的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Release curve of puerarin and daidzein *in vitro* from PD-FS/PMMs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

进行拟合,葛根素释放指数(n)^[24] = 0.4501 $\approx$ 0.45,表明葛根素在胶束中的释放以 Fick 扩散为主。大豆苷元的 $n = 0.6194$,且 $0.45 < n < 0.89$,表明大豆苷元在胶束中的释放行为同时存在 Fick 扩散和非 Fick 扩散。

2.6 冻干工艺考察

2.6.1 冻干粉制备与复溶 制备一定浓度的冻干保护剂,精密量取 10 mL 置于含药膜的圆底烧瓶中,将胶束进行水化,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过至培养皿中,培养皿用保鲜膜封口并扎数个小孔,放置于 -20°C 冰箱中预冻 24 h,然后取出置于冷冻干燥机中冷冻干燥 24 h,即得到冻干粉。称取 300 mg 冻干粉至西林瓶中,量取 10 mL 超纯水加入后轻微振摇 2~3 min,即可将冻干粉复溶。

2.6.2 冻干保护剂种类考察 用甘露醇、乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘氨酸、海藻糖作为保护剂,以 80 mg/mL 作为初始保护剂质量浓度,并以空白保护剂组作为对照,将冻干粉复溶,考察不同保护剂对胶束冻干外观和再分散性的影响。以复溶后的平均粒径、多分散系数(polydispersity index, PDI)和再分散系数(redistribution index, RDI)作为指标。其中, $\text{RDI} = \text{冻干粉复溶后粒径} / \text{初始粒径}$,RDI 越接近 1,表明胶束受冻干过程损伤越小^[19-20]。由表 4 可知,相对于空白组,各类保护剂对胶束都有较为明显的保护作用,RDI 值均小于 1.5,组间差异具有统计学意义($P < 0.001$)。但糖类作为冻干保护剂黏度高,流动性差,后期难以制粒和压片;甘露醇和甘氨酸作为冻干保护剂较为疏松、容易分散。其中甘氨酸

冻干粉的 RDI 最接近 1, 且 PDI 值最小, 故选择甘氨酸作为保护剂并进一步考察甘氨酸用量对冻干粉再分散性的影响。

2.6.3 冻干保护剂用量考察 根据冻干保护剂种类考察结果, 以 RDI 作为主要指标, 配制 20、40、60、80、100、120 mg/mL 6 个不同质量浓度的冻干保护剂, 将冻干粉复溶, 考察冻干保护剂的用量对胶束冻干粉外观和再分散性的影响。结果如表 5 所示, 冻干粉除在甘氨酸质量浓度为 20 mg/mL 时外观上有较为黏稠且呈现表面塌陷状外, 随着甘氨酸质量浓度增大外观上差异不明显, 复溶后粒径均较为均一, 且都均匀分散, 但综合考虑辅料用量及 RDI 值接近 1 的情况, 因此, 选择质量浓度为 40 mg/mL 的

甘氨酸溶液作为 PD-PMMs 的冻干保护剂。

2.7 冻干粉的表征

2.7.1 外观及复溶后粒径分布 将冻干粉置于 10 mL 透明西林瓶中, 从色泽、疏松程度及表面状态等角度观察, 冻干粉为内部疏松细腻, 表面平整的白色粉末状态; 将复溶后的冻干粉稀释至适当倍数, 取适量置石英比色皿中, 用马尔文粒径仪测定其粒径。结果如图 5-A, 使用 40 mg/mL 的甘氨酸溶液作为冻干粉的保护剂, 冻干粉复溶后的胶束粒径分布较窄, 与冻干前基本保持一致, 表明冻干效果较好。

2.7.2 SEM 观察 在样品台上均匀粘一条导电胶带, 撒少许冻干粉在粘好的胶带上, 将样品台朝下, 使尚未与胶带接触的冻干粉脱落, 再用洗耳球轻吹掉

表 4 冻干保护剂种类对冻干粉外观和再分散性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of different lyoprotectants on appearance and RDI of lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冻干保护剂	外观	复溶后粒径/nm	PDI	RDI
乳糖	淡黄色、黏稠、表面平整	25.24±0.41***	0.253±0.010	1.36
葡萄糖	白色、多孔、表面有塌陷、黏稠	23.82±0.41***	0.243±0.040	1.28
蔗糖	白色、表面平整、黏稠	27.56±0.21***	0.225±0.010	1.48
海藻糖	白色, 表面多孔, 较为黏稠	24.26±0.10***	0.234±0.010	1.31
甘露醇	白色、表面平整疏松、质地均一	22.90±0.07***	0.123±0.010	1.23
甘氨酸	白色、细腻疏松、表面平整	21.93±0.13***	0.101±0.010	1.18
空白	油状薄膜、不成粉末状	229.20±25.40	0.334±0.030	12.35

与空白组比较: *** $P < 0.001$

*** $P < 0.001$ vs blank group

表 5 冻干保护剂用量对冻干粉再分散性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of dosage of lyoprotectant on RDI of lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

甘氨酸/(mg·mL ⁻¹)	外观	复溶后粒径/nm	PDI	RDI
20	白色, 较为黏稠, 表面有塌陷	24.24±0.32	0.285±0.020	1.31
40	白色, 疏松细腻, 表面平整	19.44±0.12	0.085±0.010	1.05
60	白色、疏松细腻, 表面平整	21.56±0.06	0.082±0.010	1.16
80	白色、疏松、表面平整	21.93±0.13	0.098±0.010	1.18
100	白色、疏松多孔、表面平整	22.96±0.12	0.075±0.010	1.24
120	白色、疏松多孔、表面平整	24.39±0.14	0.113±0.010	1.31

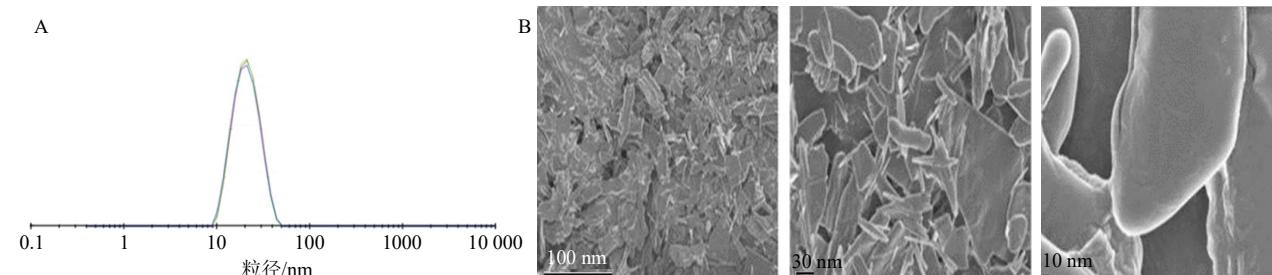


图 5 冻干粉的粒径分布 (A) 和 SEM 图 (B)

Fig. 5 Particle size distribution (A) and SEM images (B) of PD-FS/PMMs-LP

游离的冻干粉,放入离子溅射仪中喷金处理,取出用 SEM 观察^[21]。结果如图 5-B,形态主要为针状、棒状和片状,以片状为主。

2.7.3 傅里叶红外光谱分析 (FTIR) 采用 FTIR 对葛根素、大豆苷元以及冻干粉的相互作用进行研究^[22]。分别取葛根素、大豆苷元、空白胶束、载药胶束以及物理混合物约 2 mg,光谱纯溴化钾 200 mg、置于研钵中研磨均匀,并放置于灯箱中烘干,在环境温度 25 ℃、湿度<50%条件下压制成片后进行 FTIR 扫描。结果如图 6 所示,空白胶束的红外光谱与载药胶束的红外光谱几乎一致,葛根素特征谱峰在 1700~1000、600~900 cm⁻¹,其羟基特征峰在 3377 cm⁻¹。大豆苷元为葛根素的苷元,因此其特征谱峰与葛根素相似,在 1700~1000、600~900 cm⁻¹,其羟基特征峰在 3224 cm⁻¹。但在载药胶束中葛根素和大豆苷元特征峰均被空白胶束掩盖,葛根素和大豆苷元的特征峰消失,表明葛根素和大豆苷元均已包载在混合胶束体系中。

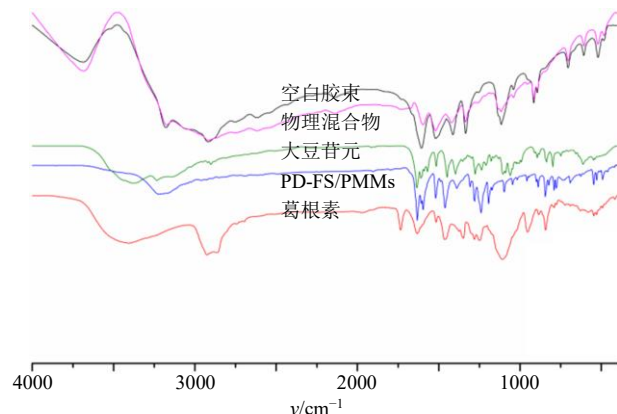


图 6 葛根素、大豆苷元、空白胶束、物理混合物和 PD-FS/PMs 的红外光谱图

Fig. 6 FTIR spectra of puerarin, daidzein, blank micelle, physical mixture and PD-FS/PMs

2.8 统计学方法

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 软件进行统计学分析,多组间采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验。

3 讨论

近年来的葛根素新型制剂研究屡见不鲜,口服给药主要集中于固体脂质纳米粒、微球以及树形分子聚合物等,尽管这些方法能在一定程度上改善难溶性药物生物利用度低的问题,但也都存在一定的局限性,如脂质赋形剂随时间会发生物理变化或化学降解,纳米粒的粒径尺寸及其分布、形态的良好

控制是一个极大的挑战等^[25],而且大部分制剂都无法同时实现药物的增溶促渗作用等。

PMMs 作为制剂领域的新制剂技术,采用的材料通常为生物相容性较好的聚合物分子,且由于临界胶束浓度低,可以大大降低所用载体材料使用量,此外,由于选用材料多为注射给药用材料,如此可尽可能减小胶束材料对胃肠道的刺激作用^[26]。考虑到 FS/PMs 结构上的独有特点,即胶束内部形成了主要疏水区 and 次级疏水区,为疏水性不同的葛根素和大豆苷元的载入提供了相应位点,制备得到的 PD-FS/PMs 同时提高了葛根素和大豆苷元的溶解度。此外,葛根素与大豆苷元均来自葛根,也就是同源成分,所以它们药效同向,且大豆苷元对葛根素的溶解性与渗透性都有调节促进作用,因此,二者的共载不仅有望改善药物的物理性质,且有望提高混合胶束体系的稳定性^[27]并实现协同发挥药效,并为旨在提高生物利用度低的共载制剂体系的设计提供共载成分筛选的新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Manjappa A S, Kumbhar P S, Patil A B, et al. Polymeric mixed micelles: Improving the anticancer efficacy of single-copolymer micelles [J]. *Crit Rev Ther Drug Carr Syst*, 2019, 36(1): 1-58.
- [2] 李双双, 吕佳琦, 李媛, 等. 帕布昔利布和氟维司群共载药阳离子脂质体的制备和性质评价 [J]. *天津科技大学学报*, 2021, 36(4): 8-13.
- [3] 张晓娟, 周海纯. 葛根化学成分, 现代药理及临床应用研究进展 [J]. *中医药信息*, 2017, 34(1): 124-126.
- [4] 魏述永. 葛根素心血管保护作用及其机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(12): 2278-2284.
- [5] 樊红波, 郭晶, 辛斌全. 葛根素的现代分子药理学作用机制及临床应用进展 [J]. *甘肃医药*, 2020, 39(8): 684-686.
- [6] 巫朝银, 陈桐楷, 王奇. 葛根素制剂的研究进展 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(14): 2188-2192.
- [7] 吴文婷, 邹斌, 李文栋, 等. 葛根素口服给药的药剂学研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(19): 4134-4141.
- [8] Wu W T, Yang S H, Liu P, et al. Systems pharmacology-based strategy to investigate pharmacological mechanisms of *Radix Puerariae* for treatment of hypertension [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 345.
- [9] Cao Y X, Yang X J, Liu J, et al. Effects of daidzein sulfates on blood pressure and artery of rats [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2006, 99(6): 425-430.

- [10] 张丽梅. 黄豆苷元的临床应用进展 [J]. 医药导报, 2009, 28(增刊): 81-82.
- [11] 管咏梅, 万鑫浩, 邹斌, 等. 基于“自洽调节”的葛根异黄酮类成分对葛根素溶解性及渗透性影响研究 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7138-7147.
- [12] 朱卫丰, 吴文婷, 李文栋, 等. 一种口服葛根素混合胶束制剂, 制备方法及应用: 中国, CN110934827A [P]. 2020-03-31.
- [13] Wu W T, Zou Z, Yang S H, *et al.* Coarse-grained molecular dynamic and experimental studies on self-assembly behavior of nonionic F127/HS15 mixed micellar systems [J]. *Langmuir*, 2020, 36(8): 2082-2092.
- [14] 李文栋. 葛根素与大豆苷元共载混合胶束的制备与体内外评价研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- [15] 邱玲. 芍药苷脂质液晶纳米粒的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [16] Gaballa H, Theato P. Glucose-responsive polymeric micelles via boronic acid-diol complexation for insulin delivery at neutral pH [J]. *Biomacromolecules*, 2019, 20(2): 871-881.
- [17] 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.
- [18] Stevens R E, Gray V, Dorantes A, *et al.* Scientific and regulatory standards for assessing product performance using the similarity factor, f_2 [J]. *AAPS J*, 2015, 17(2): 301-306.
- [19] Ma Y Q, Zhang Z Z, Li G, *et al.* Solidification drug nanosuspensions into nanocrystals by freeze-drying: A case study with ursodeoxycholic acid [J]. *Pharm Dev Technol*, 2016, 21(2): 180-188.
- [20] 张琳琳, 李小芳, 宋佳文, 等. 甘草酸为稳定剂的葛根素纳米乳冻干粉的制备及体外评价 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 2929-2936.
- [21] 王娜, 肖云峰, 钱新宇, 等. 丁香酚/淀粉包合物冻干粉的制备及表征 [J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 180-187.
- [22] 赵甜甜, 李小芳, 马祖兵, 等. 黄芩总黄酮纳米混悬剂冻干粉的表征及辅料对其粉体学性质和吸湿性的影响 [J]. 中成药, 2019, 41(7): 1485-1490.
- [23] 王明明, 孙赞, 王晓曼, 等. 响应曲面法优化米托蒽醌长循环脂质体的制备工艺 [J]. 食品工业, 2019, 40(9): 102-107.
- [24] 李润萍. 喘平缓释制剂体外释药机制的研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2012.
- [25] Zhao L X, Liu A C, Sun M, *et al.* Enhancement of oral bioavailability of puerarin by polybutylcyanoacrylate nanoparticles [J]. *J Nanomater*, 2011, 2011: 126562.
- [26] Wu W T, Guan Z Y. Docetaxel-loaded mixed micelles composed of Solutol HS15 and Pluronic F127 or folate-conjugated F127: Preparation, optimization and *in vitro* comparative characterization [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2015, 24(2): 95-103.
- [27] Wu W T, Li W D, Zhu W F *et al.* Understanding the synergistic correlation between the spatial distribution of drug-loaded mixed micellar systems and *in vitro* behavior via experimental and computational approaches [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2021, 18(4): 1643-1655.

[责任编辑 郑礼胜]