

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

董丹丹¹, 焦红军^{1*}, 郝海军²

1. 郑州大学第二附属医院 药学部, 河南 郑州 450000

2. 上海市中药研究所, 上海 201401

摘要: 目的 制备根皮素聚乙二醇-聚乳酸 [methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid), mPEG-PLA] 纳米胶束 (phloretin mPEG-PLA nanomicelles, Phl@mPEG-PLA/NM) 处方, 考察其口服药动学行为。方法 薄膜分散-探头超声法制备 Phl@mPEG-PLA/NM。采用包封率、载药量、沉降率为指标, 单因素结合 Box-Behnken 设计-效应面法优化处方。透射电子显微镜 (TEM) 观察外形形态, 透析法考察体外释药行为。SD 大鼠分别 ig 给予根皮素混悬液和 Phl@mPEG-PLA/NM, HPLC 法测定根皮素血药浓度, 计算主要药动学参数。结果 Phl@mPEG-PLA/NM 最佳处方为 mPEG-PLA 用量为 105 mg、水化体积为 9.5 mL、水化温度 40 °C。包封率、载药量、沉降率、粒径及 ζ 电位分别为 $(88.52 \pm 1.86)\%$ 、 $(8.84 \pm 0.32)\%$ 、 $(8.04 \pm 0.23)\%$ 、 (85.07 ± 6.12) nm 和 (-23.56 ± 1.49) mV。纳米胶束外貌为球形。Phl@mPEG-PLA/NM 的半衰期 ($t_{1/2}$) 增加至 (4.60 ± 0.84) h, 血药浓度 ($C_{\max}$) 增加至 $(1\,284.56 \pm 307.65)$ ng/mL, 口服相对生物利用度提高至 3.34 倍。结论 Phl@mPEG-PLA/NM 显著促进了根皮素口服吸收。

关键词: 根皮素; 聚乙二醇-聚乳酸; 纳米胶束; 薄膜分散-探头超声法; 冻干粉; 药动学行为; 生物利用度; Box-Behnken 设计-效应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)03-0779-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.011

Preparation and characterization of phloretin-mPEG-PLA nanomicelles and oral pharmacokinetic study

DONG Dan-dan¹, JIAO Hong-jun¹, HAO Hai-jun²

1. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

2. Shanghai Municipal Institute for Chinese Materia Medica, Shanghai 201401, China

Abstract: Objective To optimize the formulation of phloretin mPEG-PLA nanomicelles (Phl@mPEG-PLA/NM). Oral pharmacokinetic behavior *in vivo* was also studied. **Methods** Phl@mPEG-PLA/NM were prepared by thin film dispersion-probe ultrasonic method. Single factor experiments combined with Box-Behnken response surface design method was used to gain optimal prescriptions. Transmission electron microscope (TEM) was employed to observe its appearance. Release behavior of nanomicelles *in vitro* was investigated by dialysis method. SD rats in each group were administered intragastrically with phloretin suspension and Phl@mPEG-PLA/NM, respectively. Concentration of phloretin in plasma was analyzed by HPLC and the main pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** Optimal formulation of Phl@mPEG-PLA/NM: mPEG-PLA amounts were 105 mg, hydration volume was 9.5 mL and hydration temperature was 40 °C. Envelopment efficiency, drug loading, settlement rate, particle size and Zeta potential were $(88.52 \pm 1.86)\%$, $(8.84 \pm 0.32)\%$, $(8.04 \pm 0.23)\%$, (85.07 ± 6.12) nm and (-23.56 ± 1.49) mV, respectively. The prepared nanomicelles were spherical. $t_{1/2}$ of Phl@mPEG-PLA/NM was increased to (4.60 ± 0.84) h, $C_{\max}$ was enhanced to $(1\,284.56 \pm 307.65)$ ng/mL and oral relative bioavailability was increased to 3.34-fold. **Conclusion** Phl@mPEG-PLA/NM promoted oral absorption of phloretin effectively.

Key words: phloretin; Mpeg-PLA; nanomicelles; thin film dispersion-probe ultrasonic method; lyophilized powder; pharmacokinetic behavior; bioavailability; Box-Behnken response surface design method

收稿日期: 2022-08-09

基金项目: 河南省二〇二一年科技发展计划 (212102310315); 上海市科委项目 (21S21903400)

作者简介: 董丹丹 (1988—), 女, 硕士, 主管药师, 主要从事医院药学研究。Tel: (0371)63921700 E-mail: dong003286@126.com

*通信作者: 焦红军 (1969—), 男, 学士, 副主任药师, 研究方向为医院药学及药事管理。Tel: (0371)63921700 E-mail: 13673668808@163.com

根皮素属于二氢查耳酮化合物,主要存在于草莓、苹果、海棠叶、梨等果蔬或植物中。根皮素具有抗糖尿病、抗骨质疏松、抗氧化、保护神经系统、抗动脉粥样硬化、抗菌等药理活性^[1-3],在化妆品领域也有较多应用^[4]。根皮素溶解度为 26.51 $\mu\text{g/mL}$ ^[5]、稳定性差^[6]、生物利用度仅为 8.68%^[5-6]。因此,提高根皮素生物利用度是根皮素研发的难点和重点。马记平等^[5]对根皮素的磷脂复合物进行了研究,但磷脂复合物黏度较大,给药便捷性差;杨金枝等^[7]将根皮素制备成纳米结构脂质载体,但辅料种类多、制备工艺复杂。

纳米胶束是由两亲性聚合物载体在水相中形成的一种“核-壳”型胶体载药系统,粒径一般小于 100 nm,具有载药量高、抗稀释能力强等优势^[8-11]。聚乙二醇-聚乳酸 [methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid), mPEG-PLA] 聚合物材料在我国已实现量产,价格低廉,其结构由 PEG 亲水端和 PLA 亲脂端组成的两亲性聚合物材料,具有良好的黏液渗透性能,可促进药物透过黏液层进入血液循环^[12],且体内可生物降解,相容性高^[13],其临界胶束浓度仅为 7.71 mg/L^[14],可抵抗体外稀释及体内水相环境对胶束结构的破坏,口服后可提高药物在胃肠道中的稳定性^[15]、促进渗透、增加生物利用度及提高药效等^[9-10,12]。本研究以 mPEG-PLA 材料为载体制备根皮素 mPEG-PLA 纳米胶束 (phloretin mPEG-PLA nanomicelles, Phl@mPEG-PLA/NM),单因素考察结合 Box-Behnken 设计-效应面法优化其处方工艺,并进行表征。以根皮素混悬液为对比,评价 Phl@mPEG-PLA/NM 口服药动学行为,为根皮素新型制剂开发提供参考数据及研究资料。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;FA1104 型电子天平,上海民桥精密科学仪器有限公司;HJ-4D 数显恒温测速磁力加热搅拌器,江苏省金坛市友联仪器研究所;Zetasizer Nono ZS-90 型粒度测定仪,英国马尔文公司;JY92-IIN 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;JEM-2100 透射电子显微镜 (TEM),日本电子株式会社;RT61212 型溶出仪,深圳市锐拓仪器设备有限公司;HTM-BX 型超低温冰箱,佛山市汇泰美机械设备有限公司;TG16 台式高速离心机,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;UGC-12MF 型氮吹仪,北京优晟联合科技有限公司。

1.2 材料

根皮素对照品,批号 202008101,质量分数 98.3%,成都普菲德生物技术有限公司;根皮素原料药,批号 PT20200218,质量分数 97.0%,上海卓鼎生物技术有限公司;聚乙二醇-聚乳酸 (mPEG₅₀₀₀-PLA₂₀₀₀),批号 20210325,广州碳水科技有限公司;地塞米松,批号 529684,质量分数 99.2%,成都瑞芬思生物科技有限公司;十二烷基苯磺酸钠 (SDS),批号 20191120,山东澳凯化工有限公司;甘露醇,批号 20210525,寿光华力糖醇有限公司。

1.3 动物

SD 大鼠购自河南省动物实验中心,许可证编号 SCXK-2016-0001,清洁级,体质量为 (220 $\pm$ 20) g。遵循郑州大学第二附属医院有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 Phl@mPEG-PLA/NM 的制备^[16]

薄膜分散-探头超声法制备 Phl@mPEG-PLA/NM。固定根皮素投药量 10 mg 不变,取处方量的 mPEG-PLA 置于圆底烧瓶中,加入适量乙醇超声溶解。于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴温度下缓慢旋转蒸发除去乙醇形成一层均匀的薄膜,置于 45 $^{\circ}\text{C}$ 真空干燥箱中过夜,以除尽有机溶剂。加入适量蒸馏水水化一定时间,超声 (功率为 200 W),采用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,即得 Phl@mPEG-PLA/NM。加入 5% 冻干保护剂 (乳糖-甘露醇 1:1,质量比)-30 $^{\circ}\text{C}$ 预冻 2 d 后,置于-25 $^{\circ}\text{C}$ 冻干机中 2 d,取出即得冻干粉。

2.2 根皮素含量测定

2.2.1 色谱条件 Symmetry-C₁₈ 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液 (50:50);柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;进样体积为 10 μL ;测波长为 280 nm;体积流量为 1.0 mL/min。

2.2.2 线性关系考察 采用甲醇配制 0.5 mg/mL 的根皮素储备液。取适量,采用甲醇-0.1%磷酸水溶液 (50:50) 稀释至 10.00、5.00、1.00、0.25、0.10、0.05 $\mu\text{g/mL}$,进样分析。以根皮素峰面积 (Y) 对其质量浓度 (X) 做线性回归,得回归方程 $Y=42\,618X+36\,459$, $r=0.999\,8$,结果表明根皮素在 0.05~10 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.3 供试品溶液的配制 取 Phl@mPEG-PLA/NM 混悬液 1 mL 至 10 mL 量瓶中,加入适量甲醇

超声 6 min, 放置至室温后定容, 摇匀。取 5 mL 至 100 mL 量瓶中, 甲醇-0.1%磷酸水溶液 (50:50) 定容, 即得供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 取 mPEG-PLA 等辅料按照“2.1”项方法制备空白样品, 按照“2.2.3”项方法制备空白样品溶液, 另取根皮素对照品溶液、Phl@mPEG-PLA/NM 供试品溶液进样分析, 色谱图见图 1, 结果表明辅料未对根皮素色谱峰产生干扰, 理论塔板数以根皮素计不低于 7500。

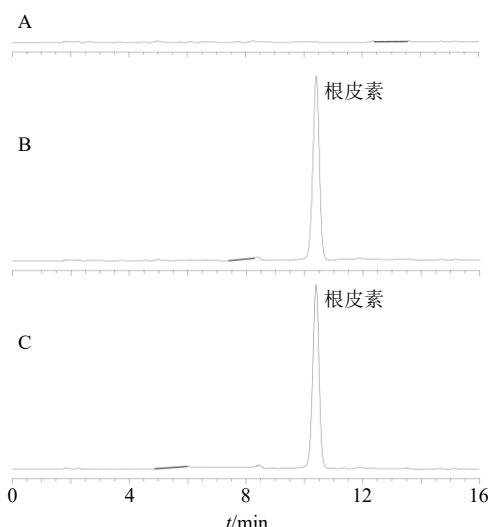


图 1 空白辅料 (A)、根皮素对照品 (B) 和 Phl@mPEG-PLA/NM 样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of blank excipients (A), phloretin reference substance (B) and Phl@mPEG-PLA/NM sample solution (C)

2.2.5 精密度试验 取 0.05、1.00、10.00 $\mu\text{g/mL}$ 的根皮素对照品溶液, 连续测定 6 次, 计算得根皮素峰面积的 RSD 分别为 0.63%、0.19%、0.24%, 结果表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 取 Phl@mPEG-PLA/NM 供试品溶液, 分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 进样测定, 计算得根皮素峰面积的 RSD 为 0.92%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取 Phl@mPEG-PLA/NM, 按“2.2.3”项方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样测定, 计算得根皮素质量分数的 RSD 为 1.30%, 结果表明该实验重复性良好。

2.2.8 加样回收率试验 分别取 0.5 mL Phl@mPEG-PLA/NM 混悬液, 共 9 份, 置于 10 mL 量瓶中, 分为 3 组 (低、中、高质量浓度组), 分别加入质量浓度为 0.5 mg/mL 的根皮素对照品溶液 0.5、

1.0、1.5 mL, 制备供试品溶液。按“2.2.1”项色谱条件进样测定, 计算根皮素加样回收率, 结果显示, 根皮素的平均加样回收率为 101.06%, RSD 为 1.50%, 结果表明本实验准确度较高。

2.3 包封率、载药量及沉降率的测定^[16-18]

取 0.5 mL 的 Phl@mPEG-PLA/NM 混悬液, 按“2.2”项下方法测定载药胶束中总根皮素量 ($m_{\text{总药量}}$); 另取 Phl@mPEG-PLA/NM 0.5 mL 置于超滤离心管 (截留相对分子质量为 3000) 中, 12 000 r/min 离心 (离心半径 8.6 cm) 8 min, HPLC 测定超滤管外液中根皮素游离药物量 ($m_{\text{游离}}$); 取载药胶束直接冷冻干燥, 称定质量 ($m_{\text{总}}$)。计算包封率和载药量。

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

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

沉降率用来衡量胶束的稳定性^[18], 是胶束重要指标之一。取新制备的纳米胶束 ($M_{\text{新}}$) 置于温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中 2 d, 取适量于 8000 r/min 离心 (离心半径 8.6 cm) 10 min 分离析出药物, 取离心液采用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过, 并测定根皮素量 ($M_{2\text{d}}$), 计算药物沉降率。

$$\text{沉降率} = (M_{\text{新}} - M_{2\text{d}}) / M_{\text{新}}$$

2.4 纳米胶束粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位测定

取 Phl@mPEG-PLA/NM 适量, 加入纯化水稀释 40 倍, 震荡混匀, 置于激光粒仪中测定其粒径、PDI 值和 ζ 电位值。

2.5 Phl@mPEG-PLA/NM 制备工艺单因素研究

2.5.1 mPEG-PLA 用量考察 固定根皮素用量为 10 mg, 水化温度为 40 $^{\circ}\text{C}$, 水相体积为 9 mL, 水化时间为 2 h, 超声时间为 10 min 等条件不变, 分别考察 mPEG-PLA 用量对 Phl@mPEG-PLA/NM 包封率、载药量和沉降率的影响。结果见表 1, 随着表 1 mPEG-PLA 用量对 Phl@mPEG-PLA/NM 包封率、载药量和沉降率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of mPEG-PLA amounts on Phl@mPEG-PLA/NM encapsulation efficiency, drug loading and sedimentation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

mPEG-PLA 用量/mg	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
50	64.28 $\pm$ 1.02	10.12 $\pm$ 0.29	20.51 $\pm$ 0.31
80	71.55 $\pm$ 1.92	8.16 $\pm$ 0.18	14.69 $\pm$ 0.32
100	82.73 $\pm$ 1.64	7.24 $\pm$ 0.21	8.41 $\pm$ 0.23
120	83.24 $\pm$ 1.11	6.11 $\pm$ 0.23	7.83 $\pm$ 0.18
150	83.09 $\pm$ 1.86	5.19 $\pm$ 0.19	7.06 $\pm$ 0.15

mPEG-PLA 用量的增加,包封率逐渐增加,用量达到 100 mg 后包封率趋稳,说明载体载药基本达饱和状态,继续增加用量时导致载药量下降。胶束的沉降率呈明显的下降趋势,提示增加载体用量有助于提高纳米胶束的稳定性^[15]。可见载体用量对纳米胶束影响较大,后续需对 mPEG-PLA 用量继续进行优化。

2.5.2 水化体积的考察 固定根皮素用量为 10 mg, mPEG-PLA 用量为 100 mg, 水化温度为 40 ℃, 水化时间为 2 h, 超声时间为 10 min 等条件不变, 考察水化体积对 Phl@mPEG-PLA/NM 包封率、载药量和沉降率的影响。结果见表 2, 随着水化体积的增加, 包封率和载药量先变大后下降。可能是水化体积较小时, mPEG-PLA 材料的舒展程度不足, 且药物浓度过高, 容易达过饱和状态, 最终影响了载药。水化体积过大时, 部分药物可进入水相, 另一方面, mPEG-PLA 浓度下降, 影响了载体的包载能力^[12]。沉降率先减小后增大, 说明水化体积也对胶束的稳定性产生一定影响。故后续需对水化体积进行优化。

表 2 水化体积对 Phl@mPEG-PLA/NM 包封率、载药量和沉降率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of hydration volume on Phl@mPEG-PLA/NM encapsulation efficiency, drug loading and sedimentation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化体积/mL	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
3	62.69 ± 1.17	5.52 ± 0.20	32.03 ± 0.33
6	73.51 ± 0.98	6.48 ± 0.18	13.31 ± 0.26
9	82.14 ± 1.26	7.27 ± 0.24	8.58 ± 0.17
12	79.69 ± 1.43	6.94 ± 0.16	10.96 ± 0.22
15	74.63 ± 1.02	6.68 ± 0.13	15.24 ± 0.24

2.5.3 水化温度的考察 固定根皮素用量为 10 mg, mPEG-PLA 用量为 100 mg, 水化体积为 9 mL, 水化时间为 2 h, 超声时间为 10 min 等条件不变, 考察水化温度对 Phl@mPEG-PLA/NM 包封率、载药量和沉降率的影响。结果见表 3。随着水化温度的升高, 纳米胶束的包封率和载药量逐渐增加, 说明适当提高水合温度利于 mPEG-PLA 包载药物, 但温度达到 50 ℃时包封率、载药量开始下降, 可能由于过高的温度影响 mPEG-PLA 稳定性, 进而影响包载药物, 也可能对已形成的胶束产生破坏作用。水化温度对沉降率也有较大影响, 故后续需对水化温度继续进行优化。

表 3 水化温度对 Phl@mPEG-PLA/NM 包封率、载药量和沉降率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of hydration temperature on Phl@mPEG-PLA/NM encapsulation efficiency, drug loading and sedimentation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化温度/℃	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
30	66.70 ± 1.82	5.91 ± 0.23	13.62 ± 0.38
35	73.65 ± 1.57	6.36 ± 0.26	10.86 ± 0.25
40	82.63 ± 1.41	7.20 ± 0.31	9.03 ± 0.24
45	85.19 ± 1.29	7.46 ± 0.29	8.78 ± 0.33
50	80.16 ± 1.01	6.94 ± 0.23	17.83 ± 0.28
60	68.23 ± 0.93	6.20 ± 0.18	20.12 ± 0.17

2.5.4 水化时间 固定根皮素用量为 10 mg, mPEG-PLA 用量为 100 mg, 水化体积为 9 mL, 水化温度为 45 ℃, 超声时间为 10 min 等条件不变, 考察水化时间对 Phl@mPEG-PLA/NM 包封率、载药量和沉降率的影响。结果见表 4。随着水化时间的增加, 纳米胶束的包封率和载药量逐渐增加, 说明适当增加水化时间对 mPEG-PLA 包载药物产生积极影响, 但水化时间达到 4 h 时胶束的包封率和载药量均出现下降, 沉降率上升。可能由于胶束是热力学不稳定体系, 过长的水化时间可能对胶束产生破坏作用。由于水化时间为 3 h 时, 胶束包封率、载药量和沉降率均相对理想, 故选之。

表 4 水化时间对 Phl@mPEG-PLA/NM 包封率、载药量和沉降率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of hydration time on Phl@mPEG-PLA/NM encapsulation efficiency, drug loading and sedimentation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化时间/h	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
1	73.62 ± 1.71	6.64 ± 0.20	15.97 ± 0.45
2	84.83 ± 1.39	7.52 ± 0.27	8.99 ± 0.28
3	86.72 ± 1.07	7.81 ± 0.36	8.57 ± 0.21
4	82.24 ± 1.63	7.26 ± 0.25	13.87 ± 0.28
5	73.91 ± 0.95	6.99 ± 0.24	18.14 ± 0.32

2.5.5 超声时间的考察 固定根皮素用量为 10 mg, mPEG-PLA 用量为 100 mg, 水化体积为 9 mL, 水化时间 3 h, 水化温度为 45 ℃等条件不变, 考察超声时间对 Phl@mPEG-PLA/NM 包封率、载药量和沉降率的影响。由结果(表 5)可知, 过长的超声时间可能破坏纳米胶束结构, 超声时间为 12 min 时, 胶束的各个指标均相对理想。

表 5 超声时间对 Phl@mPEG-PLA/NM 包封率、载药量和沉降率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of ultrasonic time on Phl@mPEG-PLA/NM encapsulation efficiency, drug loading and sedimentation rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
5	68.97±1.72	6.23±0.19	9.96±0.32
8	80.56±1.53	7.32±0.23	10.63±0.36
10	86.22±0.98	7.76±0.31	8.46±0.23
12	89.58±1.40	7.90±0.33	8.02±0.17
15	84.55±1.47	7.61±0.24	11.38±0.26
18	72.86±0.93	6.56±0.16	16.40±0.18

2.6 Box-Behnken 设计-效应面法优化处方工艺

2.6.1 试验设计 采用包封率、载药量和沉降率 3 个指标对 Phl@mPEG-PLA/NM 处方工艺进行优化,并分别作为因变量 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 。根据“2.5”项单因素考察发现, mPEG-PLA 用量 (X_1)、水化体积 (X_2) 和水化温度 (X_3) 对该 3 个指标影响较大, 根据单因素考察结果确定各考察因素的水平见表 6。

为综合反映包封率、载药量和沉降率 3 个指标对处方工艺的影响, 将该 3 个指标作归一化处理, 按照如下步骤计算总评归一值 (overall desirability, OD)。包封率和载药量的计算公式为 $d_{\max} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$; 沉降率计算公式为 $d_{\min} = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$, 公式中 M_i 为实际值, $M_{\min}$ 和 $M_{\max}$ 分别为试验中最小值和最大值; 将所得包封率和载药量的 $d_{\max}$ 及沉降率的 $d_{\min}$ 值带入 $OD = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k}$, k 为指标数, 即得各组试验的 OD 值, 结果见表 6。

2.6.2 数学模型、显著性检查及结果 利用 Design Expert V8.0.6 软件对表 6 中数据进行多元回归拟合, 得 OD 方程为 $OD = 0.970 + 0.060 X_1 + 0.029 X_2 + 0.068 X_3 - 0.048 X_1 X_2 + 0.088 X_1 X_3 - 0.087 X_2 X_3 - 0.290 X_1^2 - 0.130 X_2^2 - 0.580 X_3^2$, $R^2 = 0.9931$, $R_{\text{adj}}^2 = 0.9843$ 。显著性检查结果见表 7, 模型 P 值具有极显著性水平; 失拟项为 $0.0697 > 0.05$, 提示无显著性水平, 因此, 拟合得到的数学模型基本无干扰性。

方差分析结果显示, X_1 、 X_3 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 均有统计学意义。各因素对响应值 OD 的 3D 响应面图见图 2, Phl@mPEG-PLA/NM 最佳处方为 mPEG-PLA 用量为 104.09 mg、水化体积为 9.21 mL、水化温度 40.21 °C, 预测包封率为 90.16%, 载药量为 9.04%, 沉降率为 7.79%。

表 6 Box-Behnken 设计-效应面法优化处方工艺的试验设计与结果 ($n = 3$)

Table 6 Experiments design and results of Box-behnken design-response surface method to optimize formulation process ($n = 3$)

序号	X_1/mg	X_2/mL	$X_3/^\circ\text{C}$	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	$Y_3/\%$	OD 值
1	80 (-1)	12 (+1)	30 (-1)	56.98	6.11	18.36	0.000
2	100 (0)	6 (-1)	50 (+1)	73.87	6.62	21.32	0.222
3	120 (+1)	9 (0)	40 (0)	80.17	6.13	10.69	0.576
4	120	9	50	77.68	5.81	17.21	0.354
5	100	9	40	88.94	8.19	7.89	0.994
6	100	12	40	87.86	7.96	8.25	0.949
7	80	9	40	71.28	7.78	13.79	0.603
8	80	9	50	68.74	6.15	21.84	0.000
9	100	6	40	87.26	7.92	8.19	0.939
10	100	9	50	74.86	6.64	19.17	0.731
11	100	6	40	89.12	8.18	7.72	0.998
12	80	9	40	66.28	7.33	16.87	0.418
13	100	9	40	88.23	7.92	8.06	0.953
14	120	12	30	71.46	5.18	13.62	0.000
15	120	12	40	81.67	6.31	12.87	0.568
16	100	6	30	68.42	6.39	15.31	0.304
17	100	9	30	61.48	5.49	18.05	0.101

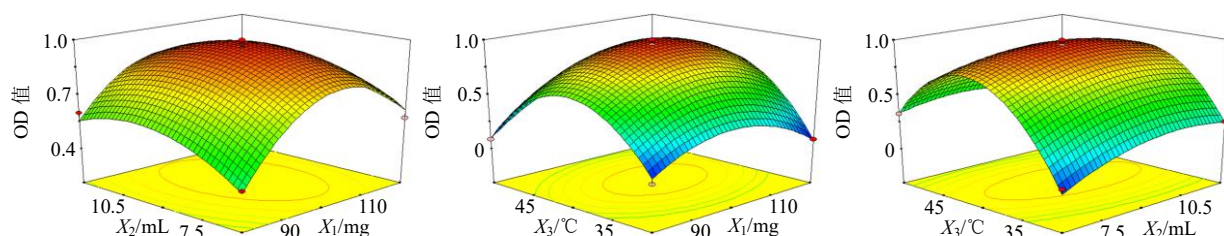
表 7 方差分析 (OD 值)

Table 7 Analysis of variance (OD values)

项目	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2.17	9	0.24	112.30	<0.000 1
X_1	0.03	1	0.03	13.28	0.008 2
X_2	6.68×10^{-3}	1	6.68×10^{-3}	3.12	0.120 8
X_3	0.04	1	0.04	17.14	0.004 4
$X_1 X_2$	9.33×10^{-3}	1	9.33×10^{-3}	4.36	0.075 3
$X_1 X_3$	0.03	1	0.03	14.62	0.006 5
$X_2 X_3$	0.03	1	0.03	14.46	0.006 7
X_1^2	0.36	1	0.36	168.90	<0.000 1
X_2^2	0.07	1	0.07	34.33	0.000 6
X_3^2	1.44	1	1.44	672.21	<0.000 1
残差	0.02	7	0.02		
失拟项	0.01	3	0.01	5.34	0.069 7
绝对误差	2.99×10^{-3}	4	2.99×10^{-3}		
总和	2.18	16	2.18		

2.7 工艺验证

为便于操作, 将 Phl@mPEG-PLA/NM 处方调整为 mPEG-PLA 用量为 105 mg、水化体积为 9.5 mL、

图 2 自变量 (X_1, X_2, X_3) 与响应值 (OD) 的三维图Fig. 2 Three-dimensional plot of independent factors (X_1, X_2, X_3) and response values (OD)

水化温度 40 ℃。平行制备 3 批纳米胶束并冻干，外观见图 3，根皮素原料药混悬液可见不溶性药物颗粒及沉淀，但纳米胶束呈现透明的蓝色乳光，两者有明显差别，冻干粉外观均一饱满。测定各主要指标并计算偏差，公式为偏差=(预测值-实际值)/预测值，结果见表 8。各指标的相对偏差均小于±5%，说明 Box-Behnken 设计-效应面法优化 Phl@mPEG-PLA/NM 处方时具有重现性好、精确度高的特点。冻干粉复溶后测得平均粒径为 (85.07 ± 6.12) nm，PDI 为 0.065 ± 0.008 ，粒径分布见图 4；平均 ζ 电位为 (-23.56 ± 1.49) mV， ζ 电位见图 5。



根皮素混悬液 纳米胶束 冻干粉

图 3 Phl@mPEG-PLA/NM 外观

Fig. 3 Appearance of Phl-mPEG-PLA nanomicelles

表 8 预测值和实际值的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 8 Comparison of predictive and actual value ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

指标	实际值/%	预测值/%	偏差/%
包封率	88.52 ± 1.86	90.16	1.82
载药量	8.84 ± 0.32	9.04	2.21
沉降率	8.04 ± 0.23	7.79	-3.21

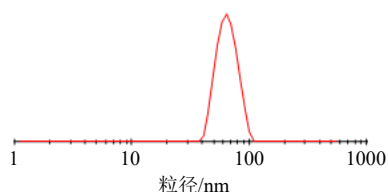
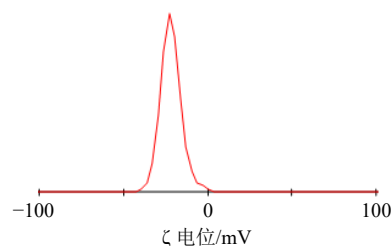


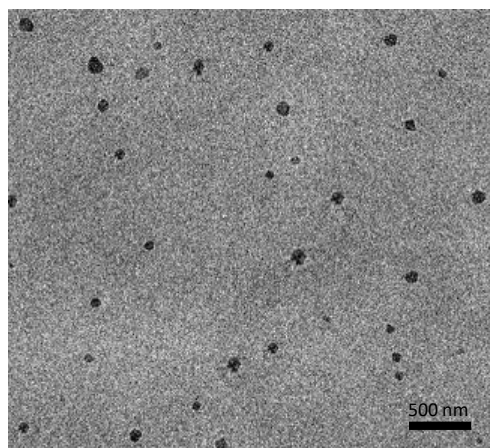
图 4 Phl@mPEG-PLA/NM 的粒径分布

Fig. 4 Distribution diagram of particle size Phl@mPEG-PLA/NM

图 5 Phl@mPEG-PLA/NM 的 ζ 电位Fig. 5 Diagram of ζ potential of Phl@mPEG-PLA/NM

2.8 TEM 观察

采用纯化水将 Phl@mPEG-PLA/NM 混悬液稀释 40 倍，震荡混匀，吸取适量滴至铜网上，1.5%磷钨酸钠染色，室温自然晾干，置于 TEM 下观察其外貌，结果见图 6。可见，纳米胶束为类球形，无黏连现象。

图 6 纳米胶束的 TEM 图 ($\times 14\ 000$)Fig. 6 TEM picture of nanomicelles ($\times 14\ 000$)

2.9 体外释药及模型拟合

取根皮素原料药作为对照，加入无水乙醇溶解，取适量（使根皮素质量为 10 mg）加入空白释药介质至 4 mL，备用。取适量 Phl@mPEG-PLA/NM 冻干粉适量（使根皮素质量为 8 mg），加空白释药介质至 4 mL 制备混悬液。分别置于活化的透析袋中，两端扎紧后置于温度为 (37 ± 1) ℃、体积为 1000 mL 的 1.5% 的 SDS 水溶液中，于转速为 75 r/min 条

件下比较释药情况,于 0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、4.00、6.00、12.00、18.00、24.00、48.00、72.00 h 取样,取样量和补加空白释药介质均为 3 mL。用 0.22 μm 滤膜滤过后测定根皮素含量,结果见图 7。根皮素在 4 h 基本释放完全,但 Phl@mPEG-PLA/NM 释药过程表现出一定的缓释特点,在 6、12、24、72 h 的累积释放率分别为 27.03%、42.95%、63.17%、82.76%。纳米胶束体外释药模型拟合结果见表 9,根据相关系数 R^2 判断,Phl@mPEG-PLA/NM 体外释药过程与 Higuchi 模型拟合程度最高,拟合方程为 $M_t/M_\infty=0.113 t^{1/2}+0.034$ 。

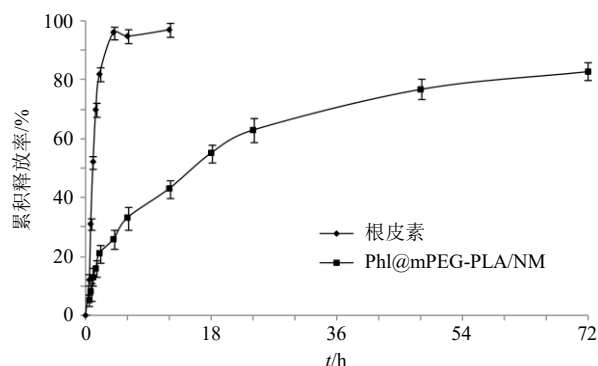


图 7 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Release profiles *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表 9 药物释放模型和相关系数

Table 9 Fitting release model and coefficient

模型	拟合方程	R^2
零级模型	$M_t/M_\infty=0.014 t+0.194$	0.868 2
一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.029 t-0.181$	0.967 1
Higuchi 模型	$M_t/M_\infty=0.113 t^{1/2}+0.034$	0.983 0
Weibull 模型	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.676 1\ln t-2.163$	0.973 3

M_t 和 M_∞ 分别代表 t 和 ∞ 时间的累积释放率, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放率, t 为时间

M_∞ and M_t were accumulative drug-release at time t and ∞ , respectively, M_t/M_∞ is accumulative release rate at time t , t is time

2.10 冻干粉稳定性考察

取 Phl@mPEG-PLA/NM 冻干粉置于恒温恒湿箱中(温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 65%),于 0、15、30、45、60、90 d 取样测定复溶后包封率、粒径及沉降率,结果见表 10。冻干粉在 90 d 内包封率和粒径基本维持不变,说明稳定性较高。

2.11 药动学研究

2.11.1 药动学研究方案 取 12 只健康 SD 大鼠(雌雄兼具),分为根皮素原料药和 Phl@mPEG-PLA/NM 2 组,自由饮水但禁食 12 h。按 60 mg/kg 分别

表 10 稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Study of stability ($\bar{x} \pm s, n=3$)

取样时间/d	包封率/%	粒径/nm	沉降率/%
0	87.04 $\pm$ 1.13	88.15 $\pm$ 7.62	8.05 $\pm$ 0.16
15	88.36 $\pm$ 1.76	89.04 $\pm$ 6.55	7.94 $\pm$ 0.13
30	87.09 $\pm$ 1.21	88.27 $\pm$ 7.08	8.13 $\pm$ 0.14
45	86.72 $\pm$ 1.34	90.37 $\pm$ 6.12	8.10 $\pm$ 0.19
60	86.43 $\pm$ 0.96	91.58 $\pm$ 7.44	8.22 $\pm$ 0.23
90	86.06 $\pm$ 1.59	93.16 $\pm$ 6.87	8.29 $\pm$ 0.17

进行 ig 给药,分别于 10、15、30 min 及 1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、12.0 h 于眼眶后静脉丛取血约 250 μL ,至离心管中(肝素浸润),震荡混匀,3500 r/min 离心(离心半径 8.6 cm)4 min,取上层淡黄色血浆,冷冻保存。

2.11.2 血浆样品的处理^[19] 室温下解冻血浆样品,精密吸取 100 μL 至空白离心管中,加入 50 μL 地塞米松内标溶液(1000 ng/mL)、100 μL 甲醇和 1 mL 醋酸乙酯,涡旋 5 min 后超声 30 s,8000 r/min 离心(离心半径 8.6 cm)5 min。取上清液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气缓慢吹干,加入 100 μL 甲醇复溶后 8000 r/min 离心 5 min,取上清液测定。

2.11.3 溶液的配制及线性关系考察 采用甲醇配制浓度为 1000 ng/mL 的地塞米松对照品溶液,作为内标溶液。用甲醇配制质量浓度为 1.6 $\mu\text{g/mL}$ 的根皮素对照品溶液,并稀释至 1600、800、400、100、50、25 ng/mL,分别取 200 μL ,40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气缓慢吹干,加入 200 μL 空白血浆,涡旋 5 min 后超声 30 s。按“2.11.2”项方法处理,即得根皮素血浆对照品溶液(含内标),以根皮素与地塞米松峰面积比为纵坐标(y),质量浓度为横坐标(x),得回归方程 $y=0.014 6 x+0.500 6$, $r=0.995 8$,结果表明根皮素线性范围为 25~1600 ng/mL。

2.11.4 方法学考察 取空白血浆、血浆对照品(根皮素质量浓度为 400 ng/mL)和血浆样品溶液(根皮素原料药 ig 给药 4 h)分别进样,结果见图 8,血浆内源性物质不干扰根皮素和地塞米松的色谱峰,专属性高。

取 25、400、1600 ng/mL 的根皮素血浆对照品溶液,同 1 d 内连续测定 6 次,计算得根皮素与地塞米松峰面积比值的 RSD 分别为 6.17%、5.02%、3.90%,结果表明日内精密度良好;于 6 d 内分别进行测试,计算得根皮素与地塞米松峰面积比值的

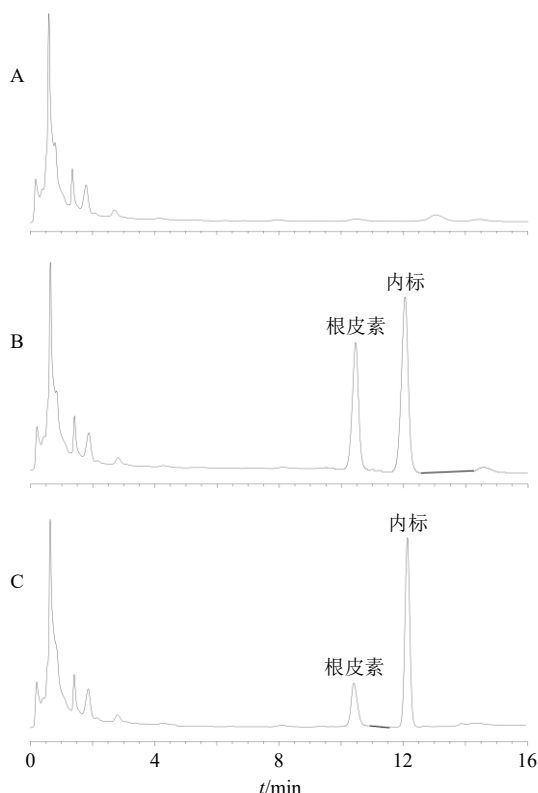


图 8 空白血浆 (A)、血浆样品 (B) 和血浆对照品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC of blank plasma (A), plasma sample (B), plasma reference solution (C)

RSD 分别为 8.23%、4.73%、5.45%，结果表明日间精密度良好。

取血浆样品溶液于 0、2、4、8、12、24 h 进样测试，计算得根皮素与地塞米松峰面积比值的 RSD 为 7.91%，结果表明稳定性良好。

取 25、400、1600 ng/mL (低、中、高质量浓度) 的根皮素血浆对照品溶液，每个质量浓度均 3 份，进样测试根皮素与地塞米松峰面积比值，带入血浆对照品标准曲线计算根皮素的测得含量，并与实际含量比较，计算得 3 种质量浓度下的平均回收率为 94.16%，RSD 为 8.82%，可见本实验的准确度较高。

2.11.5 药动力学结果 药-时曲线见图 9，血药浓度数据用 DAS 2.0 软件非房室模型对数据进行分析，主要药动力学参数见表 11。与根皮素原料药混悬液的主要药动力学参数 $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 等药动力学参数相比，Phl@mPEG-PLA/NM 主要药动力学参数发生显著变化 ($P < 0.05$ 、 0.01)。Phl@mPEG-PLA/NM 将根皮素的 $t_{\max}$ 延后至 (2.04 ± 0.42) h，且 $t_{1/2}$ 增加至 (4.60 ± 0.84) h。且 $C_{\max}$ 增加至 2.82 倍，说明 mPEG-PLA 纳米胶束极大促进了根皮素的口服吸收，相对

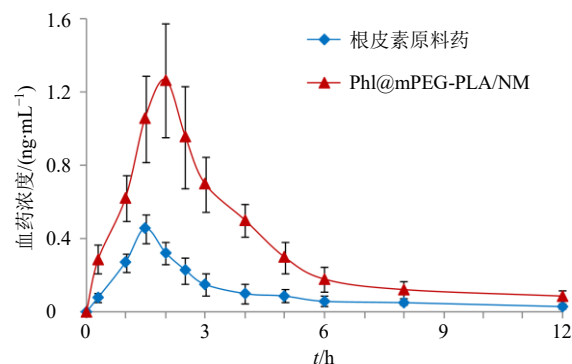


图 9 药-时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 9 Profiles of plasma concentration-time ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 11 主要药动力学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 11 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

参数	单位	根皮素原料药	Phl@mPEG-PLA/NM
$t_{\max}$	h	1.53 ± 0.34	$2.04 \pm 0.42^*$
$t_{1/2}$	h	2.79 ± 0.46	$4.60 \pm 0.84^*$
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	455.70 ± 82.64	$1\ 284.56 \pm 307.65^{**}$
$AUC_{0\sim t}$	ng·h·mL ⁻¹	$1\ 305.19 \pm 364.23$	$4\ 357.04 \pm 673.37^{**}$
$AUC_{0\sim\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	$1\ 393.84 \pm 392.18$	$4\ 421.89 \pm 723.58^{**}$

与根皮素原料药比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs phloretin drug substance

口服生物利用度提高至 3.34 倍。

3 讨论

mPEG-PLA 作为两亲性高分子材料，在水相中的浓度超过临界胶束浓度后可形成纳米胶束，可提高药物的溶解度、溶出度及生物利用度^[10,20]，制备方法简单。本研究报道的 Phl@mPEG-PLA/NM 无需使用表面活性剂，减少了辅料种类，避免了潜在的毒副作用及不良反应。

纳米胶束常用的制备方法有溶剂挥发法、薄膜分散法等，但薄膜分散法制得胶束的封装率和载药量较高^[21-22]。可能是由于通过薄膜分散法可使药物与载体充分融合、接触，使疏水性药物更易被聚合物中疏水性链段缔合、包裹从而形成胶束^[17]。溶剂挥发法需加热搅拌除去有机溶剂，可能会影响聚合物材料的稳定性，而且也可能存在溶剂残留问题。Phl@mPEG-PLA/NM 体外释药具有一定的缓释特点，这可能是由于根皮素分子结构中活泼性基团与聚合物载体基团之间，形成了某种作用力（如氢键等）^[22-23]，使药物从胶束的内核扩散至释药介质阻力较大所致。

一室模型与二室模型拟合结果均不理想，故最终采用了基于统计矩理论的非房室模型进行计算。

Phl@mPEG-PLA/NM 的 $t_{\max}$ 延后至 (2.04 ± 0.42) h, 可能是由于 Phl@mPEG-PLA/NM 粒径较小, 极易吸附于胃肠道中延缓了入血速度^[24], 另外胶束载体材料的阻滞作用也可能对 $t_{\max}$ 产生影响。纳米胶束的 $t_{1/2}$ 得到延长, 说明增加了药物在体内的血药浓度水平, 有助于提高生物利用度。

Phl@mPEG-PLA/NM 的口服相对生物利用度提高至 3.34 倍, 可能是由于根皮素包裹进 mPEG-PLA 胶束内核后药物的亲水性得到提高, 有利于与肠道亲水性黏液层接触, 进而利于药物吸收; 纳米胶束可增加药物肠道渗透吸收^[25-26]; 药物的粒径得到极大下降, 利于溶解度的提高及与胃肠道充分接触^[27-28]; mPEG-PLA 表面的 mPEG 接枝可避免网状内皮系统吞噬^[10,29], 增加体循环时间, 因而最终提高了根皮素的口服吸收生物利用度。本研究完成了 Phl@mPEG-PLA/NM 制备工艺及口服药动学评价, 将来继续对注射药动学、药效学进行研究, 为该制剂提供更为完整的研究资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁红宝, 姚景春, 关永霞, 等. 湖北海棠叶中根皮素的提取纯化及其抗肿瘤活性 [J]. 中成药, 2018, 40(7): 1619-1621.
- [2] Chang W T, Huang W C, Liou C J. Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages [J]. *Food Chem*, 2012, 134(2): 972-979.
- [3] 魏丽娜, 赵静, 罗仓学, 等. 根皮素的制备、结构修饰及生理活性研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(17): 278-285.
- [4] 荆玲, 范炎峰, 范金点, 等. 根皮素醇质体的制备、表征及对外透皮吸收的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(16): 1653-1657.
- [5] 马记平, 刘丹花, 郝海军, 等. 根皮素磷脂复合物的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2020, 42(6): 1577-1580.
- [6] Zhao Y Y, Fan Y, Wang M, et al. Studies on pharmacokinetic properties and absorption mechanism of phloretin: *In vivo* and *in vitro* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110809.
- [7] 杨金枝, 赵兴业, 周开, 等. Box-Behnken 设计-效应面法优化根皮素纳米结构脂质载体处方研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(20): 2076-2081.
- [8] 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.
- [9] Fares A R, ElMeshad A N, Kassem M A A. Enhancement of dissolution and oral bioavailability of lacidipine via pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: Formulation, optimization using central composite design and *in vivo* bioavailability study [J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 132-142.
- [10] 王丽, 黄一聆, 房伟. 柚皮素-mPEG-PLA 聚合物胶束的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2022, 44(4): 1052-1057.
- [11] 尹丽娜, 张雅雯, 周云珊, 等. 积雪草酸自组装胶束的构建及其大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(23): 4891-4896.
- [12] Duan Y W, Zhang B M, Chu L J, et al. Evaluation *in vitro* and *in vivo* of curcumin-loaded mPEG-PLA/TPGS mixed micelles for oral administration [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 141: 345-354.
- [13] 李因文, 田润, 王晓红, 等. 聚合物胶束纳米药物的研究进展 [J]. 高分子材料科学与工程, 2020, 36(1): 167-174.
- [14] 向存程, 季金苟, 刘月华, 等. mPEG-PLA 共聚物胶束对 DHA 的增溶及光保护作用 [J]. 功能高分子学报, 2017, 30(2): 221-226.
- [15] 胡悦, 孙敬蒙, 卢美彤, 等. 辛伐他汀泊洛沙姆 P123/F127 混合胶束的制备及表征 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(18): 1823-1829.
- [16] 王松, 汪茂胜, 周定荣, 等. 丹参酮 II_A 聚乙二醇-聚己内酯纳米胶束的制备、细胞内分布及减少心肌缺血再灌注损伤的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2141-2150.
- [17] 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.
- [18] 杨艳梅, 赵丽艳, 王东晗, 等. 均匀设计法优化姜黄素 TPGS/F127/P123 混合胶束的处方工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1556-1561.
- [19] 李晰, 王庆伟, 梁力, 等. HPLC 法测定大鼠血浆中根皮素及其药物代谢动力学研究 [J]. 中成药, 2013, 35(3): 487-490.
- [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] 韩德恩, 申延利, 田萍, 等. Box-Behnken 响应面法优化白藜芦醇 Labrasol/P407 混合胶束处方工艺及体外评价 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3209-3215.
- [22] 周韵秋, 冀素平, 刘聪, 等. 白藜芦醇聚合物胶束的制备及质量评价 [J]. 中国医药生物技术, 2020, 15(1): 25-31.

- [23] 曾雅文, 宗琦, 刘佳, 等. 载多西紫杉醇的 F3 多肽靶向单分子胶束的制备和体外评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(15): 1519-1523.
- [24] 杨富恒, 李国锋, 李振东, 等. 基于甘草酸为载体的紫杉醇-甘草酸纳米胶束的构建和口服生物利用度的评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(10): 1040-1044.
- [25] 张宇航, 邱智东, 邱野, 等. 金丝桃苷混合纳米胶束的制备及其肠吸收研究 [J]. 中国药房, 2022, 33(10): 1189-1197.
- [26] 朱君君, 沈成英, 王镜, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1845-1851.
- [27] Zhang Z H, Cui C C, Wei F, *et al.* Improved solubility and oral bioavailability of apigenin via Soluplus/Pluronic F127 binary mixed micelles system [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2017, 43(8): 1276-1282.
- [28] 董丹丹, 焦红军, 郝海军, 等. 吴茱萸碱纳米结构脂质载体处方优化和 SD 大鼠体内口服药动力学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 60-70.
- [29] 刘万路. Box-Behnken 设计-效应面法优化白屈菜红碱 mPEG-PLGA 纳米粒处方制备工艺及其药动力学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(23): 7361-7371.

[责任编辑 郑礼胜]