

Box-Behnken 效应面法优化小豆蔻明纳米混悬剂处方工艺及其体外抗肿瘤活性研究

刘欣欣^{1,2}, 黄甜甜^{2,3}, 付婧欣², 李鑫^{1*}, 王向涛^{1,2*}

1. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193

3. 首药控股(北京)股份有限公司, 北京 102600

摘要: 目的 制备小豆蔻明纳米混悬剂(cardamonin nanosuspensions, Car-NPs), 研究其体外抗肿瘤活性。方法 采用反溶剂沉淀联合高压均质法制备 Car-NPs, 以平均粒径及多分散指数(polydispersity index, PDI)为评价指标, 对药载比、均质压力、均质次数进行单因素考察, 利用 Box-Behnken 效应面设计法优化处方工艺; 对最优处方工艺制备的 Car-NPs 进行表征, 以动态光散射法测定平均粒径、粒度分布和 ζ 电位, 在不同生理介质中监测粒径变化考察介质稳定性, 透析法考察载药纳米粒的体外药物释放; 通过细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法测定并评估小豆蔻明游离药物及 Car-NPs 对人肝癌 HepG2 细胞、小鼠乳腺癌 4T1 细胞的体外细胞毒性。结果 选用 P188 为稳定剂制备 Car-NPs, 最佳工艺处方为药载比 4:1, 均质压力为 65.37 MPa, 均质次数 11 次; 所制备的 Car-NPs 平均粒径为 (198.5 ± 5.4) nm, PDI 为 0.191 ± 0.020 , 载药量为 $(62.54 \pm 0.13)\%$, 包封率为 $(95.65 \pm 0.26)\%$, 透射电子显微镜(TEM)下呈均一的圆球状; Car-NPs 在 PBS、5%葡萄糖、生理盐水、人工胃液中都能够稳定存在, 满足口服和 iv 给药要求; 以 0.1%聚乙烯吡咯酮(PVP)为保护剂, Car-NPs 冻干复溶后粒径基本不变, 便于长期保存; Car-NPs 在磷酸盐缓冲液中, 呈现出先速释后缓释的两相释放曲线, 释药过程符合一级释放方程, $Q = 1 - e^{-0.1048t + 73.586}$, $R^2 = 0.9903$ 。在 168 h 内累积释放率达到 76.49%, 而相同条件下小豆蔻明物理混悬液的累积释放率仅有 22.65%; Car-NPs 显著提高了小豆蔻明对 4T1 细胞[半数抑制浓度(IC_{50}), 113.2 $\mu\text{g/mL}$ vs 33.89 $\mu\text{g/mL}$, $P < 0.001$]和 HepG2 细胞的杀伤作用(IC_{50} , 126.4 $\mu\text{g/mL}$ vs 52.94 $\mu\text{g/mL}$, $P < 0.001$)。结论 采用 Box-Behnken 效应面法优化了 Car-NPs 的处方和工艺, 所制备的 Car-NPs 有效解决了小豆蔻明难溶、难给药问题, 冻干后便于长期保存。Car-NPs 提高了小豆蔻明的体外释放度和对肿瘤细胞的杀伤作用, 口服有望提高生物利用度; 基于滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR), iv 给药有望提高药物在肿瘤组织中的分布。

关键词: 小豆蔻明; 纳米混悬剂; Box-Behnken 效应面法; 稳定性; 抗肿瘤活性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)05-1419-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.008

Optimization of cardamonin nanosuspensions prescription process based on Box-Behnken response surface method and *in vitro* antitumor activity

LIU Xin-xin^{1,2}, HUANG Tian-tian^{2,3}, FU Jing-xin², LI Xin¹, WANG Xiang-tao^{1,2}

1. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Shouyao Holdings (Beijing) Co., Ltd., Beijing 102600, China

Abstract: Objective To prepare cardamonin nanosuspensions (Car-NPs) and study their antitumor activity *in vitro*. **Methods** The Car-NPs was prepared by anti-solvent precipitation combined with high-pressure homogenization, and the average particle size and polydispersion index (PDI) were used as evaluation indexes to investigate the drug loading ratio, homogenization pressure and

收稿日期: 2022-09-26

基金项目: 中国医学科学院医学与健康创新工程(2021-I2M-1-071); 黑龙江省应用技术与开发计划项目(GA19C107)

作者简介: 刘欣欣(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药剂学。E-mail: 1969964000@qq.com

*通信作者: 李鑫(1971—), 男, 副教授, 研究方向为药物传输系统研究。Tel: 13603602001 E-mail: 102105@hrbcu.edu.cn

王向涛(1973—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药物新剂型研究。Tel: 18101037961 E-mail: xtaowang@163.com

homogenization times and the Box-Behnken response surface design method was used to optimize the formulation and process. The particle size, PDI and the surface potential of the obtain Car-NPs were measured by dynamic light scattering technology. The obtain Car-NPs were co-incubated with a series of physiological media for particle size change so as to evaluate their stability in these media. Dialysis in PBS was employed to assess the *in vitro* drug release of Car-NPs, and *in vitro* cytotoxicity of free cardamonin and Car-NPs on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and mouse mammary carcinoma 4T1 cells were determined and evaluated by the cell counting kit-8 (CCK-8) analysis. **Results** Poloxamer 188 (P188) was screened to be the best stabilizer, the optimal formulation and process parameters was as follows: the drug loading ratio of 4:1, the homogenization pressure being 65.37 MPa, and the homogenization times being 11 times. The prepared Car-NPs showed an average particle size of (198.5 ± 5.4) nm, a PDI value of 0.191 ± 0.020 , a high drug loading content of $(62.54 \pm 0.13)\%$, a high encapsulation efficiency of $(95.65 \pm 0.26)\%$, and a uniform spherical shape under transmission electron microscopy. Car-NPs were quite stable in PBS, 5% glucose, normal saline, and artificial gastroenteric fluid, and thus meeting the requirement for both oral administration and intravenous injection. With 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP) as the cryoprotective agent, Car-NPs could be easily lyophilized and reconstituted into nanoparticle suspensions with nearly unchanged particle size, thus convenient for long-term storage; Car-NPs showed a bi-phase drug release in PBS, and the release process was in accordance with the first-order release equation, the cumulative release rate reached 76.49% within 168 h, while under the same conditions, the cumulative release rate of cardamonin physical suspension was only 22.65%. The nanosuspensions significantly improved the killing effect of free cardamonin against 4T1 cells (IC_{50} , 113.2 $\mu\text{g/mL}$ vs 33.89 $\mu\text{g/mL}$, $P < 0.001$) and HepG2 cells (IC_{50} , 126.4 $\mu\text{g/mL}$ vs 52.94 $\mu\text{g/mL}$, $P < 0.001$). **Conclusion** The Box-Behnken effect surface design method was used to optimize the formulation and process parameters of Car-NPs, and the nanosuspensions technology effectively solved the problem of poor solubility and difficulty for the *in vivo* drug delivery confronted by free cardamonin, the obtained Car-NPs were convenient for long-term storage after lyophilization. The nanosuspensions improved the *in vitro* release of cardamonin and the inhibition on tumor cells. The oral administration of Car-NPs was expected to improve the bioavailability, and intravenous administration was hopeful to enhance the drug distribution in tumors on basis on the well-known EPR effect.

Key words: cardamonin; nanosuspensions; Box-Behnken response surface design method; stability; antineoplastic activity

小豆蔻明 (cardamonin, Car) 主要存在于姜科山姜属植物草豆蔻 *Alpinia katsumadai* Hayata 种子中的黄酮类单体化合物, 化学结构为 2,4-双羟基-6 甲氧查耳酮^[1]。小豆蔻明及其衍生物主要具有抗炎^[2]、抗氧化^[3]、松弛血管平滑肌^[4]等多种生物活性。近些年发现小豆蔻明可以抑制肿瘤细胞增殖与转移^[5]、诱导肿瘤细胞凋亡^[6], 并表现出广谱抗肿瘤作用, 对多形性胶质母细胞瘤^[5]、Lewis 肺癌^[7]、乳腺癌^[6,8]、结肠癌^[9]、卵巢癌^[10]、胃癌^[11]、骨肉瘤^[12]、黑色素瘤^[13]等细胞的生长均有抑制作用。在抗肿瘤机制方面, 小豆蔻明能够靶向多种信号分子、转录因子、细胞因子和酶, 如雷帕霉素靶蛋白 (target of rapamycin, mTOR)、对核转录因子- κB (nuclear factor κB , NF- κB)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、信号转导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription, STAT3)、Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin, Wnt/ β -catenin) 和环氧化酶 2 (cyclooxygenase, COX2) 等, 有望成为一种多靶点的抗肿瘤分子实体^[2,4,6,14]。但小豆蔻明几乎不溶于水 (溶解度 $< 2.7 \mu\text{g/mL}$), 难于给药、生物利用度低, 限制了其进一步的体内研究和临床应用^[15]。

许多制剂手段可以改善难溶性药物溶解性, 如

增溶、潜溶、环糊精包合、固体分散体、纳米给药系统等方法^[16]。其中, 纳米给药系统备受关, 其不但可以解决药物的难溶性问题, 而且可通过改善药物溶出、扩大与小肠吸收部位接触面积、延长药物在小肠微绒毛的停留时间等多种途径提高药物的口服生物利用度, 此外, 基于实体瘤的高通透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 提高难溶性抗肿瘤药物在肿瘤中的分布^[17-18]。

纳米混悬剂 (nanosuspensions, NPs) 是指采用少量的表面活性剂稳定“纯”药物粒子所形成的一种亚微米级别 (200~500 nm) 的胶体分散体系^[19]。通过减小粒径, 能增加药物的饱和溶解度和溶出速率^[20], 非常符合小豆蔻明需要大剂量给药的要求。因此, 本研究以简单的反溶剂沉淀法联合高压均质法制备小豆蔻明纳米混悬剂 (cardamonin NPs, Car-NPs), 从泊洛沙姆 188 (P188)、维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG₂₀₀₀) 中筛选出合适的稳定剂, 采用 Box-Behnken 效应面法对药物与稳定剂的比例、高压均质参数等进行了优化, 并对其进行了体外表征与体外抗肿瘤效果研究, Car-NPs 展现出了巨大的抗肿

瘤潜力。

1 仪器与材料

Mettler Toledo AL204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; Purelab Classic 综合纯水仪, 英国 ELGA 公司; KQ3200DB 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; RE52CS 旋转蒸发器, 上海振捷实验设备有限公司; Zetasizer-nanozs 90 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 马尔文仪器有限公司; Plphr-2-4 LD Plus 低温冻干机, 德国 Christ 有限公司; RMC018AC 二氧化碳培养箱, 日本 Sanyo 公司; JEM-1400 透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; Tecan Infinite M1000 PRO 多功能酶标仪, 力臻卓越科学仪器有限公司; UltiMate 3000 高效液相色谱仪, 赛默飞世尔科技有限公司。

小豆蔻明对照品, 质量分数 98%, 批号 C58635E93, 上海吉至生化有限公司; 小豆蔻明原料药, 质量分数 98%, 批号 20220715, 上海金穗生物科技有限公司; 维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (TPGS), 上海海斯夫生物有限公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG2000), 山东岱罡生物有限公司; 泊洛沙姆 188 (P188), Sigma 公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS), 西安海斯夫生物科技有限公司; 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 无锡科技实验二厂; 麦芽糖, 北京兰博利德商贸有限公司; 葡萄糖, 上海吉至有限公司; 甘露醇, 北京索莱宝科技有限公司; 色谱甲醇, 上海吉至生物科技有限公司; 实验用水为去离子水, 其余试剂或药品均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

小鼠乳腺癌 4T1 细胞、人肝癌 HepG2 细胞, 北京协和医学院细胞中心; RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清、青链霉素双抗, 美国 Gibco 公司; 96 孔无菌培养板, 美国 Corning 公司。

2 方法与结果

2.1 Car-NPs 的制备

将小豆蔻明分别与不同的稳定剂 (P188、TPGS、SDS、DSPE-mPEG₂₀₀₀) 以一定的比例共同溶于丙酮中, 在超声条件 (25 °C、250 W) 下, 匀速缓慢地滴入到去离子水中, 35 °C 下减压旋蒸除去丙酮, 高压均质数次, 即得 Car-NPs 混悬液。

空白小豆蔻明纳米粒供试品溶液同法制备。

2.2 小豆蔻明含量测定

2.2.1 供试品溶液的配制 精密量取 Car-NPs 混悬液 1 mL 至 25 mL 量瓶中, 加入 10 mL 甲醇, 超声

5 min 以破坏 Car-NPs, 放置至室温, 甲醇定容至刻度, 即得 Car-NPs 供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取小豆蔻明对照品 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并加至刻度, 即得质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Venusil XBP C₁₈ (L) (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (75:25); 检测波长为 343 nm; 体积流量为 1 mL/min; 柱温为 25 °C; 进样量为 20 μL; 理论塔板数以小豆蔻明计算不低于 10 000。

2.2.4 专属性考察 分别取小豆蔻明对照品溶液、Car-NPs 混悬液、空白纳米粒溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 在“2.2.3”项下色谱条件进行 HPLC 检测。由图 1 可知, Car-NPs 混悬液与对照品溶液在相同时间出峰 (7.67 min 左右), 空白纳米粒样品溶液未出现色谱峰, 故确定空白纳米粒对小豆蔻明测定无干扰。

2.2.5 线性关系考察 精密量取对照品溶液适量, 用甲醇稀释, 分别配制成质量浓度分别为 0.25、0.50、5.00、10.00、25.00、50.00、75.00、100.00、200.00、250.00 μg/mL 的小豆蔻明对照品溶液。按照“2.2.3”项色谱条件进样测定, 分别记录峰面积。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归分析, 得回归方程 $Y=1.877\ 6\ X+$

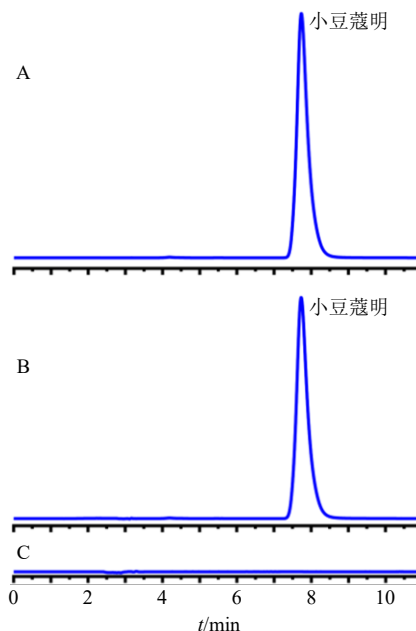


图 1 小豆蔻明对照品 (A)、Car-NPs 混悬液 (B)、空白纳米粒 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of cardamomin reference substance (A), Car-NPs suspension (B), and blank nanoparticles (C)

2.067 4, $R^2=0.999\ 6$, 结果表明小豆蔻明在 0.25~250 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 取高、中、低 (250.00、50.00、0.25 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度的小豆蔻明对照品溶液, 按“2.2.3”项下色谱条件下分别连续进样 6 次。测定结果显示, 高、中、低质量浓度下小豆蔻明峰面积的 RSD 分别为 0.34%、0.98%、0.67%, 结果表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一批冻干粉, 用适量甲醇溶解, 平行制备 6 份供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、12、24 h, 按照“2.2.3”项下色谱条件进样, 测得小豆蔻明峰面积的 RSD 为 1.44%, 表明 Car-NPs 的冻干粉供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 按照“2.2.3”项下方法平行制备 6 份 Car-NPs 冻干粉供试品溶液, 分别进样测定。测定结果显示, 小豆蔻明质量浓度的 RSD 为 1.81%, 因此该方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取 Car-NPs 的冻干粉溶液 9 份, 每份均为 0.5 mL, 分别加入小豆蔻明对照品储备液 (质量浓度为 1 mg/mL) 3、5、7 mL, 制备成供试品溶液。取供试品溶液在“2.2.3”项下色谱条件测定小豆蔻明含量并计算回收率。结果显示, 小豆蔻明的平均加样回收率为 100.45%, RSD 为 1.23%。

2.3 单因素实验

以制备得到的 Car-NPs 的平均粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI) 以及 ζ 电位为评价指标, 对方工艺进行单因素考察。

2.3.1 稳定剂种类 尝试以 TPGS、P188、SDS 和 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 为稳定剂, 药载比为 1:1, 药物终质量浓度为 1 mg/mL , 60 MPa 下高压均质 10 次, 通过单因素试验考察不同稳定剂对 Car-NPs 的粒径、PDI 和 ζ 电位的影响。结果见表 1, P188 为稳定剂制备的 Car-NPs 粒径最小、PDI 最集中。这可能原因是与 P188 的巨大位阻效应有关, 使得其较小的用量就使得纳米混悬剂均一且稳定, 故后续选

表 1 稳定剂种类的筛选 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Screening of stabilizer types ($\bar{x} \pm s, n=3$)

稳定剂	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
TPGS	268.0 $\pm$ 11.7	0.240 $\pm$ 0.035	-14.2 $\pm$ 0.8
P188	197.0 $\pm$ 9.7	0.203 $\pm$ 0.049	-19.7 $\pm$ 0.5
SDS	259.4 $\pm$ 15.1	0.209 $\pm$ 0.033	-20.0 $\pm$ 0.1
DSPE-mPEG ₂₀₀₀	336.1 $\pm$ 4.9	0.283 $\pm$ 0.038	-13.4 $\pm$ 0.3

择 P188 为稳定剂制备 Car-NPs。

2.3.2 药物质量浓度 以 P188 为稳定剂, 药载比为 1:1, 药物终质量浓度为 2、4、5、10 mg/mL , 60 MPa 下高压均质 10 次, 通过单因素试验考察药物质量浓度对 Car-NPs 的粒径、PDI 值和 ζ 电位的影响 (表 2)。结果发现药物质量浓度为 2 mg/mL 时制备的 Car-NPs 粒径和 PDI 值均最小, ζ 电位最高, 增大药物质量浓度后粒径均在 250 nm 以内, 但 PDI 变化较大, 可能原因是药物质量浓度的增加影响了载体对药物的包裹。

表 2 药物质量浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of drug concentration ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物质量浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
2	192.8 $\pm$ 3.9	0.190 $\pm$ 0.029	-19.7 $\pm$ 0.1
4	227.4 $\pm$ 2.6	0.266 $\pm$ 0.013	-18.2 $\pm$ 0.3
5	192.5 $\pm$ 1.5	0.317 $\pm$ 0.022	-18.9 $\pm$ 0.3
10	178.4 $\pm$ 3.7	0.333 $\pm$ 0.034	-16.7 $\pm$ 0.9

2.3.3 药物与稳定剂用量比例 以 P188 为载体, 制备药物终质量浓度为 2 mg/mL 的 Car-NPs, 于 60 MPa 下高压均质 10 次, 通过单因素实验考察药物与稳定剂的比例对 Car-NPs 的粒径、PDI 值和 ζ 电位的影响 (表 3)。随着药载比的不断变化, 粒径及 PDI 也随之改变, 当药载比较小时, PDI 也较小但粒径较大, 在药载比 5:1 时粒径最小且分布较集中, 故选择药载比 5:1 用来后续研究。

2.3.4 均质压力 以 P188 为载体, 药物终质量浓度为 2 mg/mL 、药载比为 1:1, 在不同均质压力 (10、30、90、100 MPa) 下, 高压均质 10 次, 通过单因素试验考察不同均质压力对 Car-NPs 的粒径、PDI 值和 ζ 电位的影响 (表 4)。随着均质压力的增

表 3 稳定剂与药物用量比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of ratio of stabilizer to drug dosage ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药载比	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
1:1	288.5 $\pm$ 3.0	0.138 $\pm$ 0.030	-23.2 $\pm$ 0.3
2:1	246.0 $\pm$ 3.7	0.139 $\pm$ 0.030	-18.8 $\pm$ 0.2
3:1	250.9 $\pm$ 2.2	0.147 $\pm$ 0.022	-18.5 $\pm$ 0.6
5:1	195.5 $\pm$ 1.7	0.196 $\pm$ 0.068	-19.2 $\pm$ 0.6
6:1	227.7 $\pm$ 5.9	0.220 $\pm$ 0.007	-14.6 $\pm$ 0.9
7:1	207.9 $\pm$ 0.9	0.240 $\pm$ 0.056	-14.3 $\pm$ 0.5
8:1	283.9 $\pm$ 5.4	0.158 $\pm$ 0.034	-15.0 $\pm$ 0.8

表 4 均质压力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of homogenization pressure ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

均质压力/MPa	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
10	402.1 $\pm$ 12.3	0.287 $\pm$ 0.008	-17.7 $\pm$ 0.4
30	255.6 $\pm$ 4.7	0.277 $\pm$ 0.072	-18.6 $\pm$ 0.9
60	197.4 $\pm$ 3.5	0.325 $\pm$ 0.055	-19.5 $\pm$ 0.3
90	163.5 $\pm$ 0.5	0.212 $\pm$ 0.016	-20.0 $\pm$ 0.2
100	248.5 $\pm$ 0.5	0.435 $\pm$ 0.052	-19.1 $\pm$ 0.5

加, Car-NPs 粒径减小, 压力为 60 MPa 时粒径较小且分布较均一, 继续增加压力, 所得纳米粒的粒径略有减小但分布宽度增加。在 100 MPa 时, 粒径和 PDI 明显增加, 这可能原因是较大的均质压力将 Car-NPs 结构改变。

2.3.5 均质次数 以 P188 为载体, 药物终质量浓度为 2 mg/mL, 药载比为 1:1, 均质压力为 60 MPa, 分别均质 5、10、15 次, 通过单因素试验考察不同均质次数对 Car-NPs 的粒径、PDI 值和 ζ 电位的影响 (表 5), 可发现随着均质次数增加, Car-NPs 的粒径逐渐减小, 表面电位略有增高。

表 5 均质次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of homogenization times ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

均质次数	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
5	227.4 $\pm$ 3.5	0.287 $\pm$ 0.008	-17.7 $\pm$ 0.5
10	199.6 $\pm$ 4.7	0.277 $\pm$ 0.072	-18.6 $\pm$ 0.4
15	157.4 $\pm$ 3.5	0.325 $\pm$ 0.055	-19.5 $\pm$ 0.5

2.4 Box-Behnken 效应面法优化 Car-NPs 处方

2.4.1 设计方案 以 P188 为稳定剂制备的 Car-NPs, 由于药载比、均质压力及均质次数对 Car-NPs 的影响较为复杂, 因此采用 Box-Behnken 效应面法对 Car-NPs 处方进行优化; 以药载比 (X_1)、均质压力 (X_2) 及均质次数 (X_3) 为自变量, 以平均粒径 (Y_1) 及 PDI (Y_2) 为主要评价指标, 进行统计分析。

2.4.2 回归模型方差分析及显著性检验 以 Box-Behnken 响应面法优化其工艺参数^[21], 因素水平及实验结果见表 6。采用 Design-Expert V8.0.6 软件进行数学模型拟合。 Y_1 和 Y_2 作为响应值, X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量, 建立的 2 次回归方程为 $Y_1 = 667.95 - 16.69 X_1 - 6.311 X_2 - 41.006 X_3 - 0.267 92 X_1 X_2 -$

表 6 Box-Behnken 试验设计与结果 ($n = 3$)

Table 6 Experimental design and results of Box-Behnken ($n = 3$)

序号	X_1	X_2 /MPa	X_3	Y_1 /nm	Y_2	序号	X_1	X_2 /MPa	X_3	Y_1 /nm	Y_2	序号	X_1	X_2 /MPa	X_3	Y_1 /nm	Y_2
1	2:1	30	10	203.6	0.266	7	2:1	60	15	198.8	0.232	13	4:1	60	10	285.1	0.143
2	6:1	30	10	342.3	0.189	8	6:1	60	15	269.5	0.230	14	4:1	60	10	259.4	0.141
3	2:1	90	10	340.7	0.246	9	4:1	30	5	210.1	0.332	15	4:1	60	10	259.2	0.132
4	6:1	90	10	283.1	0.213	10	4:1	90	5	190.1	0.311	16	4:1	60	10	316.6	0.151
5	2:1	60	5	241.9	0.347	11	4:1	30	15	247.8	0.194	17	4:1	60	10	319.8	0.147
6	6:1	60	5	196.7	0.268	12	4:1	90	15	299.9	0.233						

$1.072 5 X_1 X_3 - 0.064 833 X_2 X_3 + 5.664 38 X_1^2 + 0.062 286 X_2^2 + 2.186 3 X_3^2, R^2 = 0.984 4, P < 0.000 1$; $Y_2 = 1.162 - 0.132 14 X_1 - 6.863 3 \times 10^{-3} - 0.086 855 X_2 + 1.833 33 \times 10^{-4} X_1 X_2 + 1.925 \times 10^{-3} X_1 X_3 + 8.333 33 \times 10^{-5} X_2 X_3 + 0.011 244 X_1^2 + 4.525 \times 10^{-5} X_2^2 + 3.259 \times 10^{-3} X_3^2, R^2 = 0.988 8, P < 0.000 1$; 结果表明各因素之间具有良好的相关性。自变量与响应值的三维图如图 2 所示。 Y_1 是评价纳米粒的主要指标, 理想的纳米粒应具有尽可能小的粒径以最大限度实现其尺寸效应, 同时应分布均匀, 具有较高载药量, 且制备简单的特点, 因此, 最佳处方确定条件为 $X_1 = 4:1$, $X_2 = 65.37$ MPa, $X_3 = 11$ 次, 预测平均粒径为 194.8 nm, PDI 为 0.187。

2.4.3 工艺验证 根据优化后的处方工艺制备 3 批

Car-NPs, 平均粒径为 (198.5 $\pm$ 5.4) nm, PDI 为 0.191 $\pm$ 0.020, 见图 3; 且表面成正电位, 呈现良好的稳定性。与预测值方差相差小于 5%, 说明该模型可信度良好, 预测性较优, 可用于处方工艺优化。

2.5 Car-NPs 的外观形态

Car-NPs 外观呈黄色, 无沉淀和不溶性微粒存在 (图 4-a)。采用 TEM 观察 Car-NPs 的形态。将 1 滴 Car-NPs 滴在铜网上, 用 2% 磷钨酸染色 5 min。室温下将铜网晾干, 放置 TEM 下观察。Car-NPs 呈现圆球形, 大小分布较为均匀, 粒子之间无黏连和聚集现象 (图 4-b)。

2.6 Car-NPs 的稳定性考察

2.6.1 放置稳定性考察 将制备好的 Car-NPs 于室温 25 °C 放置, 测定 15 d 内的粒径变化。结果 Car-

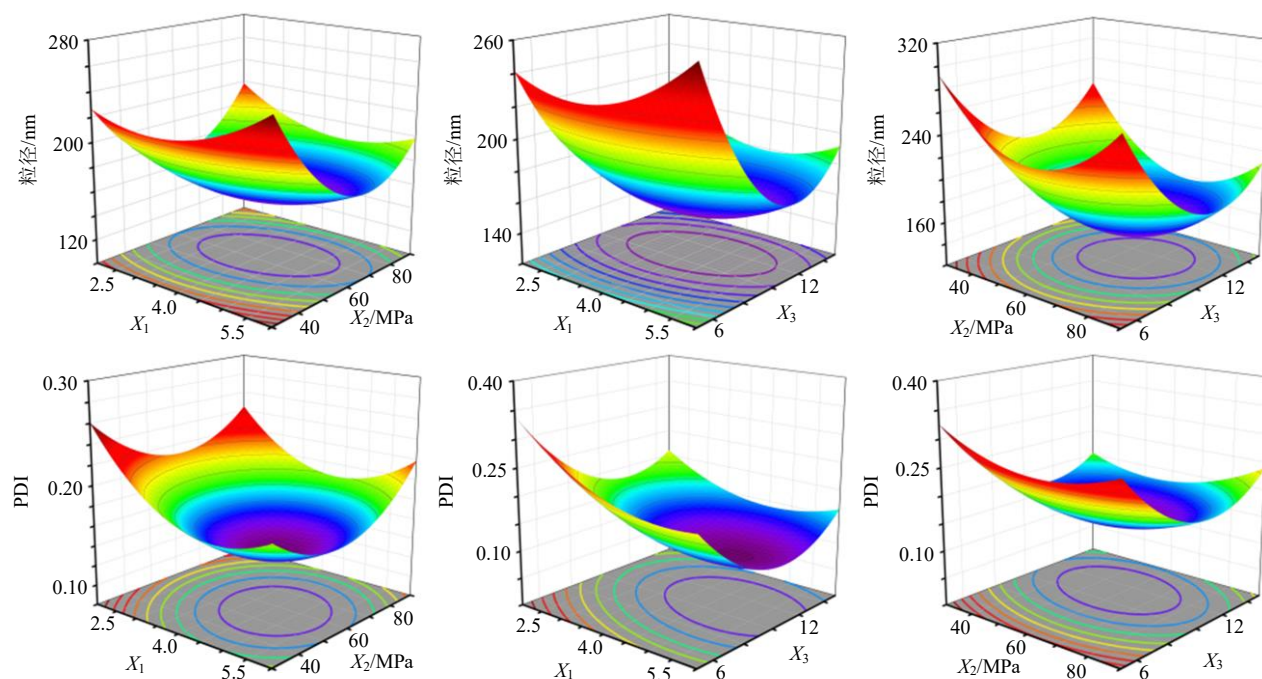


图 2 自变量与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plot of independent variable and response values

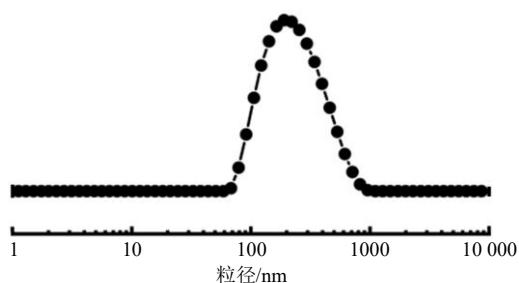
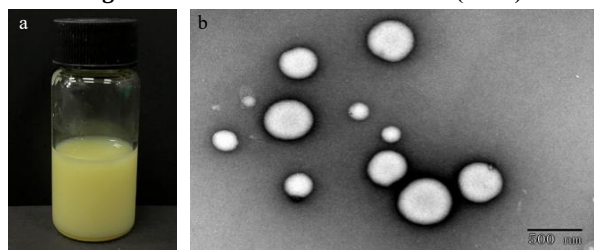
图 3 Car-NPs 的粒径分布图 ($n=3$)Fig. 3 Size distribution of Car-NPs ($n=3$)

图 4 Car-NPs 的实物照片 (a) 和透射电镜照片 (b)

Fig. 4 Photo (a) and TEM photograph (b) of Car-NPs

NPs 在 15 d 内粒径变化较小 (表 7), Car-NPs 室温放置 15 d 内粒径较为稳定。

2.6.2 在生理介质中的稳定性考察 精密吸取 Car-NPs 1 mL, 与 $2 \times \text{PBS}$ (2 倍浓度的磷酸盐缓冲溶液, pH 7.4)、1.8% NaCl 溶液和 10% 葡萄糖溶液等体积混合, 得到等渗的 Car-NPs 的 0.9% NaCl 溶液、5% 葡萄糖溶液和 PBS 溶液; 与人工胃液、人工肠液按体积比 1:4 混合, 37°C 孵育, 分别在 0、1、3、

表 7 室温放置粒径变换 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 7 Particle size transformation of Car-NPs when stored at room temperature ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	平均粒径/nm	t/d	平均粒径/nm	t/d	平均粒径/nm
1	197.7 $\pm$ 1.4	7	207.8 $\pm$ 1.1	13	212.3 $\pm$ 0.9
3	204.5 $\pm$ 1.3	9	205.2 $\pm$ 1.3	15	207.7 $\pm$ 2.1
5	200.8 $\pm$ 1.3	11	209.5 $\pm$ 2.0		

5、7 h 间点取样测定平均粒径及 PDI 变化^[22]。结果见表 8, 可知 Car-NPs 在 PBS、5% 葡萄糖、0.9% NaCl、和人工胃液肠液中孵育 7 h 后平均粒径和 PDI 变化均较小, 没有出现任何浑浊或沉淀现象, 说明 Car-NPs 在这些生理介质中稳定性好, Car-NPs 或可以调成 PBS、生理盐水、5% 葡萄糖等渗溶液, 为 Car-NPs 注射给药提供参考依据。实验中制备的 Car-NPs 在人工胃肠液中连续孵育 7 h 均能保持粒径没有明显增大, 满足口服给药的条件, 为提高 Car-NPs 的口服生物利用度提供可能。

2.7 溶血性考察

2.7.1 红细胞悬浮液的配制 将新鲜大鼠全血 3500 r/min 离心 (离心半径 9.8 cm) 10 min, 去除上清。红细胞沉淀用 0.9% NaCl 溶液吹打洗涤, 3500 r/min 离心 (离心半径 9.8 cm) 10 min 去除上清液, 重复 2~3 次, 直至上清无色透明。最终用 0.9% NaCl 溶液将红细胞调节成浓度为 4% 的红细胞悬浮液。

表 8 Car-NPs 在不同生理介质中的粒径变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Characterization of Car-NPs particle size transformation in different physiological media ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

生理介质	平均粒径/nm					PDI				
	0 h	1 h	3 h	5 h	7 h	0 h	1 h	3 h	5 h	7 h
PBS	199.2±2.7	206.3±1.8	203.2±2.5	215.7±2.8	211.9±2.8	0.158±0.013	0.159±0.012	0.167±0.022	0.156±0.014	0.153±0.023
5%葡萄糖	203.4±2.0	198.6±0.6	200.0±2.4	209.5±1.6	212.8±1.9	0.153±0.014	0.230±0.016	0.193±0.017	0.196±0.016	0.191±0.012
0.9% NaCl	206.9±1.8	199.9±4.7	205.1±2.4	202.1±2.6	216.0±3.8	0.183±0.011	0.152±0.005	0.214±0.014	0.210±0.013	0.168±0.024
人工胃液	206.8±1.8	197.0±2.0	203.1±7.9	214.2±1.2	211.3±1.8	0.177±0.012	0.219±0.007	0.179±0.011	0.174±0.016	0.185±0.010
人工肠液	202.8±1.8	210.3±2.6	205.7±2.2	199.1±3.0	216.5±2.7	0.198±0.015	0.215±0.017	0.241±0.011	0.177±0.009	0.233±0.017

2.7.2 Car-NPs 溶血性的考察 将 Car-NPs 用一定浓度的 NaCl 溶液调成质量浓度分别为 2.00、1.00、0.50、0.25 mg/mL 的生理盐水等渗液，取等渗液与红细胞悬浮液体积比 1:1 (使红细胞终浓度为 2%) 混合后 37 °C 孵育 4 h，3500 r/min 离心 (离心半径 9.8 cm) 5 min。小豆蔻明溶液组同法制备。上清液用酶标仪在 540 nm 测吸光度 (A) 值，每一质量浓度平行实验 3 次，以 0.9% NaCl 为空白对照，以蒸馏水为阳性对照，计算溶血率，溶血率随质量浓度变化结果如表 9 所示。

$$\text{溶血率} = 1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{空白}}$$

表 9 Car-NPs 不同质量浓度的溶血率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Hemolysis rate of Car-NPs at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	溶血率/%	
	Car-NPs	小豆蔻明
0.25	-8.57±1.25	5.78±2.32
0.50	-4.39±1.51	22.01±1.51
1.00	4.55±1.43	55.56±1.24
2.00	24.33±1.24	72.45±1.75

iv 给药时，纳米混悬剂的溶血率不得超过 5%。表 9 中可以看出，小豆蔻明溶液在 0.25 mg/mL 时溶血率较低，但当药物质量浓度增加，溶血率也不断变大，在 2 mg/mL 时，溶血率最高为 72.45%，这可能是由于小豆蔻明脂溶性很强，它的脂肪长链结构易插入红细胞膜并且相互作用，使膜的表面张力下降从而使得膜结构被破坏导致溶血，然而当把小豆蔻明制备成纳米混悬剂后，2 mg/mL 时的溶血率下降到 24.33%，在药物质量浓度低于 1 mg/mL 时完全不溶血。这可能是由于小豆蔻明被包载在 P188 形成的两亲性聚合物的内核之中，由于 P188 的生物相容性很好几乎没有红细胞膜毒性，因此 Car-NPs 的溶血率很低。故 Car-NPs，在不高于 1 mg/mL 时

基本满足 iv 的给药要求。

2.8 载药量和包封率的测定

将 Car-NPs 不加保护剂的情况下直接冻干，取适量精密称定质量为 W ，加入冻干前 10 倍体积的甲醇充分溶解 (体积 V)，13 000 r/min 离心 (离心半径 9.8 cm) 10 min，取上清液在“2.2.3”项色谱条件下测定小豆蔻明的含量 (C)，按照下式计算载药量^[22]。

$$\text{载药量} = CV/W$$

精密称取药物和辅料 P188，按照优化的处方工艺制备 Car-NPs，定容 ($V_{\text{总}}$)，精密量取 2 mL ($V_{\text{样}}$)，以截留相对分子质量 3000 的超滤离心管在 6000 r/min 转速下离心 (离心半径 9.8 cm) 5 min，收集滤液，在“2.2.3”项色谱条件下测定滤液中游离小豆蔻明的含量 ($C_{\text{游离}}$)。根据投药量 (W)，计算包封率^[22]。由表 10 结果可知，Car-NPs 的载药量为 (62.54±0.13) %，包封率为 (95.65±0.26) %，重复性良好，说明药物被有效地包载在纳米粒中。

$$\text{包封率} = 1 - C_{\text{游离}} V_{\text{样}} / W$$

表 10 Car-NPs 的载药量及包封率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Drug-loading rate and encapsulation efficiency of Car-NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	载药量/%	包封率/%
1	62.87±0.12	94.87±0.22
2	65.51±0.13	95.51±0.23
3	59.25±0.11	96.56±0.34

2.9 Car-NPs 冻干保护剂筛选

取 1 mL Car-NPs 冷冻干燥，加入 1 mL 去离子水复溶，观察复溶情况并检测粒径。另各取 1 mL Car-NPs 于西林瓶中，分别加 0.1% 的 PVP、葡萄糖、甘露醇和麦芽糖为冻干保护剂，冷冻干燥，冻干粉加入 1 mL 去离子水振摇复溶，必要时辅以震荡、超声，观察溶解情况，测定冻干复溶前后的粒径变

化。结果如表 11 所示, Car-NPs 直接冻干后加去离子水, 振摇即可复溶, 但粒径较大且分布较宽。以 0.1% PVP 为冻干保护剂时, 冻干复溶较其他保护剂粒径最小, 同时表现出良好的 PDI, 表面电荷呈负电稳定状态, 这和冻干前相差不大; 故选用 0.1% PVP 为 Car-NPs 的冻干保护剂。

表 11 Car-NPs 不同冻干保护剂筛选 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 11 Screening of cryoprotectants for Car-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

冻干保护剂	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
无	446.4 $\pm$ 13.9	0.318 $\pm$ 0.011	-20.2 $\pm$ 0.4
0.1% PVP	207.7 $\pm$ 6.7	0.171 $\pm$ 0.028	-19.2 $\pm$ 0.2
0.1%葡萄糖	366.9 $\pm$ 6.6	0.322 $\pm$ 0.019	-17.5 $\pm$ 0.2
0.1%甘露醇	375.5 $\pm$ 13.5	0.291 $\pm$ 0.024	-17.3 $\pm$ 0.3
0.1%麦芽糖	680.2 $\pm$ 28.3	0.575 $\pm$ 0.052	-19.8 $\pm$ 0.6

2.10 体外释放

采用透析法考察 Car-NPs 的体外释放情况^[23]。取 Car-NPs、小豆蔻明原料药的物理混悬液(分散于 0.5% CMC-Na 的去离子水)各 1 mL 于截留相对分子质量为 8000~14 000 的即用型透析袋中, 13 000 r/min 搅拌下对 50 mL 含 0.5%聚山梨酯 80 的 PBS 透析, 每个样品平行 3 份, 每 24 小时更换 1 次释放外液; 分别于 0.5、1、2、4、8、12、24、36、48、72、96、120、144、168 h 取 1 mL 释放外液, 13 000 r/min 离心(离心半径 9.8 cm) 20 min, 取上清以 HPLC 测定药物质量浓度, 计算累积释放率。同时补充相应体积 37 °C 的释放介质。结果如图 5 所示, Car-NPs 在含 0.5%聚山梨酯 80 的 PBS (pH 7.4) 中呈两相释放, 先是 12 h 内快速释放, 累积释放率达 52.85%, 然后是 12~168 h 内缓慢释放(累积释放率达 76.49%)。而完全相同的条件下, 小豆蔻明原

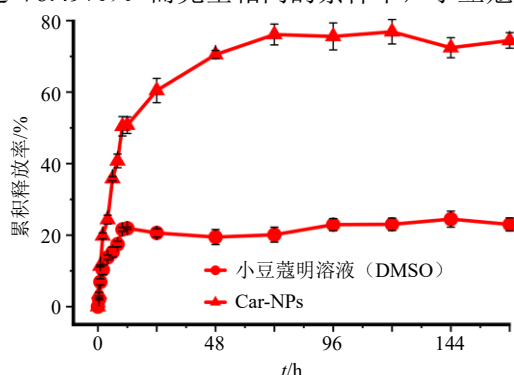


图 5 Car-NPs 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 *In vitro* drug release profiles of Car-NPs and the CAR physical suspensions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

料药释放非常缓慢, 168 h 累积释放率仅 22.65%。可见将小豆蔻明制成纳米混悬剂后, 显著提高了药物释放, 这将非常有利于提高小豆蔻明的口服生物利用度。

通过 Origin 2021 软件, 分别应用零级方程、一级方程和 Higuchi 方程对小豆蔻明及 Car-NPs 的体外释放行为进行拟合(表 12), 可知小豆蔻明和 Car-NPs 的释放符合一级动力学释放方程。证明了二者主要通过扩散控制方式进行释药。

表 12 小豆蔻明和 Car-NPs 分别在 PBS 下体外释放的拟合方程

Table 12 Fitting equations of *in vitro* release of cardamomin and Car-NPs under PBS

样品	模型	拟合方程	R^2
小豆蔻明	零级释放	$Q=12.54+0.087 t$	0.668 0
	一级释放	$Q=1-e^{2.61 t+21.94}$	0.976 6
	Higuchi 模型	$Q=9.288+1.376 t^{1/2}$	0.567 9
Car-NPs	零级释放	$Q=29.74+0.374 t$	0.765 5
	一级释放	$Q=1-e^{-0.105 t+73.586}$	0.990 3
	Higuchi 模型	$Q=16.89+5.692 t^{1/2}$	0.804 5

2.11 体外细胞毒性实验

体外培养 HepG2、4T1 细胞至对数期, 按 6.0×10^3 /孔的细胞密度接种于 96 孔板中, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 分别用不含胎牛血清的 DMEM 培养基 (HepG2 细胞)、RPMI 培养基 (4T1 细胞) 将 Car-NPs、小豆蔻明的 DMSO 溶液 (2.4 mg/mL) 稀释成含小豆蔻明 100.0、50.0、20.0、10.0、5.0、2.0、1.0、0.5、0.1 μ g/mL 的溶液, 每孔 200 μ L 加入到 96 孔板中, 空白对照组只加等体积的不含胎牛血清的 DMEM、RPMI 培养基, 每个质量浓度平行给药 6 孔, 孵育 24 h。随后每孔加入 CCK-8 的溶液 10 μ L, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h, 用微孔振荡器震荡 10 min, 酶标仪 450 nm 处测其吸光度 (A) 值, 用 GraphPad Prism 7 软件测其半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 值^[23]。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

通过细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法测定并评估小豆蔻明游离药物溶液及 Car-NPs 对 HepG2 细胞、4T1 细胞的体外细胞毒性。结果如表 13 所示, 所有游离小豆蔻明及 Car-NPs 组的细胞抑制率都随着质量浓度的增加而上升, 其细胞毒性作用呈现出明显的剂量依赖性。在 2~100 μ g/mL 质量浓度下, Car-

表 13 Car-NPs 和小豆蔻明 (DMSO) 对 HepG2、4T1 细胞的生长抑制情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 13 Growth inhibition of HepG2 and 4T1 cells by Car-NPs and cardamomin (DMSO) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	HepG2 细胞抑制率/%		4T1 细胞抑制率/%	
	小豆蔻明 (DMSO)	Car-NPs	小豆蔻明 (DMSO)	Car-NPs
0.1	1.53 $\pm$ 0.69	1.12 $\pm$ 0.35	0.17 $\pm$ 0.11	1.14 $\pm$ 0.76
0.5	4.44 $\pm$ 0.87	5.81 $\pm$ 0.54	2.20 $\pm$ 0.66	4.48 $\pm$ 0.09
1.0	6.66 $\pm$ 0.82	9.78 $\pm$ 0.03	5.57 $\pm$ 0.62	9.63 $\pm$ 0.76
2.0	9.94 $\pm$ 0.74	13.04 $\pm$ 1.21**	8.45 $\pm$ 0.58	16.99 $\pm$ 0.18***
5.0	13.4 $\pm$ 1.41	19.45 $\pm$ 1.45*	11.14 $\pm$ 0.69	21.75 $\pm$ 0.26***
10.0	17.6 $\pm$ 0.99	23.10 $\pm$ 0.96**	15.51 $\pm$ 1.14	27.62 $\pm$ 1.23***
20.0	23.15 $\pm$ 1.00	34.15 $\pm$ 0.41***	26.78 $\pm$ 1.06	39.67 $\pm$ 0.59***
50.0	27.78 $\pm$ 2.21	43.78 $\pm$ 2.33***	32.22 $\pm$ 1.44	54.14 $\pm$ 1.03***
100.0	52.20 $\pm$ 1.34	69.20 $\pm$ 1.48***	53.11 $\pm$ 1.36	72.30 $\pm$ 0.57***

与同种细胞的小豆蔻明 (DMSO) 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
*** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs the same cell group of cardamomin (DMSO) group

NPs 组显示出比游离小豆蔻明组显著或非常显著的抑瘤效果 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

通过 GraphPad Prism 7 软件拟合了小豆蔻明和 Car-NPs 的 IC_{50} 曲线并计算得到 IC_{50} 值。小豆蔻明游离药物对 HepG2 细胞的 IC_{50} 值为 126.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而 Car-NPs 对 HepG2 细胞杀伤作用提高 1.39 倍 (IC_{50} 值降到 52.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$)；小豆蔻明游离药物对 4T1 细胞的 IC_{50} 值为 113.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，Car-NPs 对 HepG2 细胞杀伤作用提高 2.34 倍 (IC_{50} 值降到 33.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。这可能原因是纳米粒子能够通过非特异性吸附等多种途径和肿瘤细胞表面发生相互作用，并通过被动靶向等途径被细胞摄取，从而把药物带入肿瘤细胞内部发挥药效^[24-26]。

3 讨论

小豆蔻明难溶于水，在目前的工作中大多数研究停留在细胞层面，有限的体内研究也仅涉及药物配制，如小豆蔻明与阿拉伯胶^[27]或 CMC-Na^[28]的物理混悬液配制。由于物理混悬液尺寸较大，一般在 0.5~10 μm ，使得药物颗粒容易聚集，药物溶出和吸收缓慢、不规则，且只能口服给药，使得小豆蔻明的生物利用度较低，限制了小豆蔻明的临床应用。

本研究采用反溶剂蒸发联合高压均质方法，以 P188 为稳定剂，成功制备了 Car-NPs，使得小豆蔻明抗肿瘤效果得到明显改善。本实验采用的稳定剂

P188 为 FDA 批准的可静脉注射的辅料，且低廉易得，作为两亲性嵌段共聚物，可吸附在纳米粒子表面，形成空间位阻，阻碍纳米粒子彼此靠近和聚集，从而产生良好的稳定作用。

由于 NPs 本身是一种热力学不稳定体系，长期放置会出现粒径变大、聚集甚至沉淀等现象，而冷冻干燥后能将 NPs 的结构以固态的形式“冻结固化”，便于运输和较长时间储存，临用前再加水复溶。Car-NPs 以 1% 的 PVP 为保护剂冻干后可长期保存，复溶后粒径几乎不变，表现出其良好的应用前景。原因可能是 PVP 是亲水性高分子，在纳米颗粒间形成亲水链段的空间位阻，阻碍颗粒间的黏附聚集。在冻干过程中 PVP 包围在纳米粒左右，阻止了纳米颗粒的聚集和黏附，利于维持空间结构的稳定。

将小豆蔻明制备成 Car-NPs 后，由于比表面积急剧增加，药物的溶出和释放度也大幅度增加；体外抗肿瘤实验表明 Car-NPs 显著提高了小豆蔻明对 4T1 细胞和 HepG2 细胞的杀伤作用，主要的原因可能是 NPs 可以通过网格蛋白介导的内吞、胞膜窖介导的内吞、巨胞饮作用等多种途径与肿瘤细胞相互作用，增强肿瘤细胞摄取，除此之外，以 P188 为包衣的 Car-NPs 可延长药物在血液中的滞留时间，实现体内长效循环，并提高对肿瘤细胞的靶向性，从而表现出较原药更强的肿瘤杀伤作用。

综上所述，Car-NPs 的成功制备，使小豆蔻明在水相中的药物质量浓度提高到 10 mg/mL (原药溶解度 $< 2.7 \mu\text{g}/\text{mL}$)，同时满足 *po* 给药和 *iv* 给药的要求，有效解决了其难溶和难给药的问题。本研究做了大量的处方优化工作以及体外抗肿瘤活性研究，为小豆蔻明纳米制剂的改良提供了参考依据，也为其体内研究，尤其在抗肿瘤研究和药物研发方面奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王萍, 石海莲, 吴晓俊. 中药草豆蔻抗肿瘤化学成分和作用机制研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(9): 880-888.
- [2] Ren G Y, Sun A N, Deng C, *et al.* The anti-inflammatory effect and potential mechanism of cardamomin in DSS-induced colitis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 309(7): G517-G527.
- [3] James S, Aparna J S, Paul A M, *et al.* Cardamomin inhibits colonic neoplasia through modulation of microRNA expression [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13945.

- [4] Je H D, Jeong J H. Cardamonin inhibits agonist-induced vascular contractility via Rho-kinase and MEK inhibition [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2016, 20(1): 69-74.
- [5] Lu T, Zheng C J, Fan Z M. Cardamonin suppressed the migration, invasion, epithelial mesenchymal transition (EMT) and lung metastasis of colorectal cancer cells by down-regulating ADRB2 expression [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1011-1021.
- [6] Hossan M S, Break M K B, Bradshaw T D, et al. Novel semi-synthetic Cu(II)-cardamonin complex exerts potent anticancer activity against triple-negative breast and pancreatic cancer cells via inhibition of the Akt signaling pathway [J]. *Molecules*, 2021, 26(8): 2166.
- [7] Yang L B, Luo W, Zhang Q Y, et al. Cardamonin inhibits LPS-induced inflammatory responses and prevents acute lung injury by targeting myeloid differentiation factor 2 [J]. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153785.
- [8] Jin J, Qiu S, Wang P, et al. Cardamonin inhibits breast cancer growth by repressing HIF-1 α -dependent metabolic reprogramming [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 377.
- [9] James S, Aparna J S, Babu A N, et al. Cardamonin attenuates experimental colitis and associated colorectal cancer [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(5): 661.
- [10] Niu P G, Shi D H, Zhang S S, et al. Cardamonin enhances the anti-proliferative effect of cisplatin on ovarian cancer [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 3991-3997.
- [11] Naidu V G M, Shrivastava S, Jeengar M K, et al. P2 Cardamonin suppresses the proliferation of gastric cancer cells by promoting β -catenin degradation [J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50: S9.
- [12] 张露露, 杨春梅, 黄衍然, 等. 小豆蔻明对骨肉瘤细胞的抑制作用及机制 [J]. *中国药理学杂志*, 2020, 55(18): 1505-1511.
- [13] Yue Y Y, Liu L J, Liu P P, et al. Cardamonin as a potential treatment for melanoma induces human melanoma cell apoptosis [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(2): 1393-1399.
- [14] Hou G, Yuan X, Li Y, et al. Cardamonin, a natural chalcone, reduces 5-fluorouracil resistance of gastric cancer cells through targeting Wnt/ β -catenin signal pathway [J]. *Invest New Drugs*, 2020, 38(2): 329-339.
- [15] 李金穗, 牛培广, 史道华. 小豆蔻明及其衍生物抗肿瘤作用的研究进展 [J]. *肿瘤*, 2016, 36(10): 1171-1175.
- [16] Muller R H, Bhm B. *Emulsions and Nanosuspensions for Formulation of Poorly Soluble Drugs* [M]. Stuttgart: Medpharm Scientific Publisher, 1998.
- [17] Keck C M, Müller R H. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 62(1): 3-16.
- [18] Lai F, Schlich M, Pireddu R, et al. Production of nanosuspensions as a tool to improve drug bioavailability: Focus on topical delivery [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(42): 6089-6103.
- [19] 蒲晓辉, 张晓, 孙进, 等. 纳米混悬剂的应用及体内行为研究进展 [J]. *东南大学学报: 医学版*, 2011, 30(4): 630-635.
- [20] 谢青璇, 李小芳, 谢龙, 等. Box-Behnken 效应面法优化大黄素/小檗碱-壳聚糖双载药纳米粒的处方工艺研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1614-1622.
- [21] 黄甜甜, 沈一平, 路丽康, 等. 高载药量雷公藤红素纳米混悬剂的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2125-2133.
- [22] 季宇彬, 周欣欣, 国瑞琪, 等. 和厚朴酚纳米混悬剂的制备及其体内研究 [J]. *药理学学报*, 2018, 53(1): 133-140.
- [23] Fernández-Urrusuno R, Fattal E, Rodrigues J M, et al. Effect of polymeric nanoparticle administration on the clearance activity of the mononuclear phagocyte system in mice [J]. *J Biomed Mater Res*, 1996, 31(3): 401-408.
- [24] Parnsubsakul A, Sapcharoenkun C, Warin C, et al. Selection of cryoprotectants for freezing and freeze-drying of gold nanoparticles towards further uses in various applications [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2022, 217: 112702.
- [25] Dong F Y, Dong X L, Zhou L P, et al. Doxorubicin-loaded biodegradable self-assembly zein nanoparticle and its anti-cancer effect: Preparation, *in vitro* evaluation, and cellular uptake [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 140: 324-331.
- [26] Fakhoury V S, Pessoa A S, Tokuhara C K, et al. Evaluation of *Myrcia bella* in murine osteosarcoma cells: Effect of the extract and enriched fractions of tannins and flavonoids [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(22): 5823-5827.
- [27] Liao N C, Shih Y L, Ho M T, et al. Cardamonin induces immune responses and enhances survival rate in Wehi-3 cell-generated mouse leukemia *in vivo* [J]. *Environ Toxicol*, 2020, 35(4): 457-467.
- [28] Dey M, Das M, Chowhan A, et al. Breaking the barricade of oral chemotherapy through polysaccharide nanocarrier [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 130: 34-49.

[责任编辑 郑礼胜]