

## TPGS 表面修饰岩白菜素固体脂质纳米粒的制备与口服生物利用度研究

杨金枝<sup>1</sup>, 崔晓鸽<sup>1</sup>, 郝海军<sup>2,3\*</sup>

1. 郑州澍青医学高等专科学校, 河南 郑州 450064

2. 上海市中药研究所, 上海 201401

3. 上海雷允上药业有限公司, 上海 201401

**摘要:** 目的 制备 *D*- $\alpha$ -维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (TPGS) 修饰岩白菜素固体脂质纳米粒 (TPGS surface-modified bergenin solid lipid nanoparticles, TPGS-Ber-SLN), 并考察其体外释药和口服药动学行为。方法 采用高压均质法制备 TPGS-Ber-SLN。以包封率、载药量和粒径为考察指标, 通过单因素考察结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化 TPGS-Ber-SLN 处方, 并制备成冻干粉末。X 射线粉末衍射法 (X-ray powder diffraction, XRPD) 和差式扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 分析岩白菜素在 TPGS-Ber-SLN 冻干粉末中的存在状态, 透析袋法考察 TPGS-Ber-SLN 在不同介质中释药情况。以岩白菜素原料药为参考, 比较 TPGS-Ber-SLN 在体内药动学行为及口服生物利用度。结果 TPGS-Ber-SLN 最佳处方工艺: 岩白菜素用量为 40 mg, 单硬脂酸甘油酯用量 525 mg, 泊洛沙姆 188 质量浓度为 17.5 mg/mL, TPGS 质量浓度为 0.2 mg/mL, 均质次数为 9 次。TPGS-Ber-SLN 的平均包封率、载药量、粒径及  $\zeta$  电位分别为 (83.16 $\pm$ 1.09) %、(4.97 $\pm$ 0.13) %、(229.46 $\pm$ 19.07) nm 和 (-15.67 $\pm$ 0.23) mV, 体外释药过程符合 Weibull 模型。口服药动学结果显示, TPGS-Ber-SLN 的  $t_{\max}$  延长至 (2.07 $\pm$ 0.43) h,  $t_{1/2}$  延长至 (4.21 $\pm$ 0.78) h,  $C_{\max}$  和生物利用度分别提高至 3.91 倍和 5.34 倍。结论 TPGS-Ber-SLN 显著改变了岩白菜素的药动学行为, 增加了口服吸收生物利用度。

**关键词:** 岩白菜素; 固体脂质纳米粒; *D*- $\alpha$ -维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯; 药动学; 口服生物利用度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)13-4144-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.13.008

## Formulation optimization of TPGS surface-modified bergenin solid lipid nanoparticles and oral bioavailability study

YANG Jin-zhi<sup>1</sup>, CUI Xiao-ge<sup>1</sup>, HAO Hai-jun<sup>2,3</sup>

1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China

2. Shanghai Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201401, China

3. Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201401, China

**Abstract: Objective** To prepare *D*- $\alpha$ -vitamin E polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) surface-modified bergenin (Ber) solid lipid nanoparticles (TPGS-Ber-SLN), and investigate its drug release *in vitro* and oral pharmacokinetics behavior. **Methods** High pressure homogenization method was used to prepare TPGS-Ber-SLN. Encapsulation rate, drug loading and particle size were taken as evaluation indexes, single factor investigation method combined with Box-Behnken design-response surface method was employed to optimize the prescription process of TPGS-Ber-SLN. Lyophilized powder of TPGS-Ber-SLN was also prepared. X-ray powder diffraction (XRPD) and differential scanning calorimetry (DSC) were employed to analyze the state of Ber in lyophilized powder of TPGS-Ber-SLN. *In vitro* drug release behavior of TPGS-Ber-SLN in different pH media were investigated by dialysis bag method. Using Ber suspension as control, pharmacokinetics behavior *in vivo* of TPGS-Ber-SLN and oral bioavailability was compared. **Results** Optimal prescription process of TPGS-Ber-SLN was as follow: Ber dosage was 40 mg, glycerol monostearate dosage was 525 mg, poloxamer 188 mass concentrations was 17.5 mg/mL, TPGS mass concentrations was 0.2 mg/mL and

收稿日期: 2022-11-30

基金项目: 上海市科委项目 (21S21903400)

作者简介: 杨金枝 (1980—), 女, 硕士, 副教授, 从事中药学研究。Tel: (0371)67673621 E-mail: yangjz2007@126.com

\*通信作者: 郝海军 (1981—), 男, 博士, 高级工程师, 从事中药新型给药系统及质量标准研究。Tel: (021)67103277 E-mail: haohj@shlys.com

homogenization times were nine times. Average envelopment efficiency, drug loading, particle size and  $\zeta$  potential of TPGS-Ber-SLN were  $(83.16 \pm 1.09)\%$ ,  $(4.97 \pm 0.13)\%$ , and  $(229.46 \pm 19.07)$  nm and  $(-15.67 \pm 0.23)$  mV, respectively. The drug release process of TPGS-Ber-SLN *in vitro* accorded with Weibull model. Results of oral pharmacokinetics showed that  $t_{max}$  of TPGS-Ber-SLN was delayed to  $(2.07 \pm 0.43)$  h,  $t_{1/2}$  was extended to  $(4.21 \pm 0.78)$  h,  $C_{max}$  and oral bioavailability were increased to 3.91 fold and 5.34 fold, respectively. **Conclusion** TPGS-Ber-SLN significantly altered the pharmacokinetic behavior of Ber *in vivo* and increased its oral bioavailability effectively.

**Key words:** bergenin; solid lipid nanoparticles; *D*- $\alpha$ -vitamin E polyethylene glycol 1000 succinate; pharmacokinetics; oral bioavailability

岩白菜素 (bergenin, Ber) 是一类异香豆素类化合物, 主要存在于虎耳草科、豆科、紫金牛科等植物中<sup>[1]</sup>, 国内外研究显示, 岩白菜素具有抗肿瘤、消炎、镇痛、增强免疫、抗糖尿病、肾脏保护、镇咳等活性<sup>[1-2]</sup>, 且毒性很小<sup>[1]</sup>, 具备开发成新药的潜力。岩白菜素属于生物药剂学 IV 类药物<sup>[3]</sup>, 在 25 °C 下溶解度为  $(1.37 \pm 0.02)$  mg/mL<sup>[4]</sup>, 表观油/水分配系数  $lgP$  为  $-1.060 \pm 0.033 \sim -1.190 \pm 0.044$ <sup>[3]</sup>。据报道<sup>[4-5]</sup>, 岩白菜素在酸性和中性条件下可保持稳定, 但在碱性条件下可发生降解现象, 降解速度随着 pH 值增加而加快<sup>[5]</sup>, 且受 P-糖蛋白外排作用影响<sup>[6]</sup>导致岩白菜素口服生物利用度仅为 4.83%<sup>[5]</sup>。目前岩白菜素已有固体分散体<sup>[7]</sup>、磷脂复合物<sup>[3]</sup>、自微乳<sup>[8]</sup>等制剂新技术报道。但固体分散体并不能改善岩白菜素的透膜能力及 P-糖蛋白外排作用等; 磷脂复合物在胃肠道中容易发生解离<sup>[9]</sup>, 可能会削弱促吸收作用; 自微乳技术需要添加大量的表面活性剂, 存在一定的安全隐患。

固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticles, SLN) 是由可生物降解、安全性高的固态脂质作为载体制备的一种纳米给药系统, 具有提高药物在胃肠道的稳定性、促进药物体内吸收、提高生物利用度、增强药效等优势<sup>[10-11]</sup>, 且 SLN 的稳定性优于脂质体<sup>[12]</sup>。*D*- $\alpha$ -维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (*D*- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS) 是一种非离子型表面活性剂, 不仅有助于增加药物的溶解度、提高纳米制剂的包封率, 而且可抑制 P-糖蛋白活性<sup>[13-14]</sup>, 从而有利于增加药物口服吸收<sup>[15-17]</sup>。故本研究将岩白菜素制备成 TPGS 表面修饰固体脂质纳米粒 (TPGS surface-modified bergenin solid lipid nanoparticles, TPGS-Ber-SLN), 以包封率、载药量、粒径为指标, 通过单因素试验结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化 TPGS-Ber-SLN 处方工艺, 为便于储存及给药

故将 TPGS-Ber-SLN 制备成冻干粉, 并考察 TPGS-Ber-SLN 冻干粉体外释药及体内药动学行为, 为后续药效学评价奠定实验基础。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

BSA124S 型电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; 1100 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; HJ-3 型磁力搅拌器, 常州市伟嘉仪器制造有限公司; RCY-1400T 型智能溶出仪, 博科控股集团有限公司; RE-200 型旋转蒸发仪, 华辰仪器有限公司; KL-060 型超声波仪器, 深圳市科力超声波洗净设备有限公司; CGJB60-70 型实验室用高压均质机, 郑州玉祥机械设备有限公司; XLW 型超低温冰箱, 江苏天日智能科技有限公司; LGJ-10N 型真空冻干机, 北京亚星仪科技发展有限公司; Toppersizer 型激光粒度分析仪, 珠海欧美克仪器有限公司; JEM-2100 透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; HS-50AA 型恒温恒湿箱, 上海目尼实验设备有限公司; D8 Venture 型 X 射线粉末衍射仪, 德国布鲁克仪器公司; DSC-HSC-2 型差示扫描量热仪, 北京恒久实验设备有限公司; ZX-DC 型氮吹仪, 北京众信佳仪科技有限公司。

### 1.2 试剂

岩白菜素对照品, 批号 JW10533, 质量分数 98.6%, 上海极威生物科技有限公司; 岩白菜素原料药, 批号 191208, 质量分数 98.0%, 湖北新星化工有限公司; 对乙酰氨基酚对照品, 批号 100018-210615, 质量分数 99.4%, 中国食品药品检定研究院; 磷酸 (批号 C12747030)、四氢呋喃 (批号 C10303495), 上海麦克林生化科技有限公司; 单硬脂酸甘油酯 (批号 F1821057)、聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS, 批号 T124208), 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 无水乙醇 (批号 20200921)、醋酸乙酯 (批号 20200322), 国药集团化学试剂有限公司; 大豆磷脂, 批号 200718, 上海辅必成医药

科技有限公司；泊洛沙姆 188（批号 WPEE587E，德国巴斯夫有限公司）；乳糖（批号 191220）、甘露醇（批号 201028），郑州宇控生物科技有限公司；其他试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

SD 大鼠，体质量（ $220 \pm 20$ ）g，雌雄兼具，购自河南动物实验中心[许可证号 SCXK(豫)2020-0001]，每组实验中雌雄数量各半。饲养温度为  $20 \sim 25$  °C，相对湿度为 50%~65%，实验室适应 1 周后进行药动学研究，给药前禁食 12 h，自由饮水。遵循郑州澍青医学高等专科学校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 TPGS-Ber-SLN 的制备<sup>[15,17]</sup>

精密称取 40 mg 岩白菜素和 100 mg 大豆磷脂至圆底烧瓶，加入 10 mL 四氢呋喃并置于 75 °C 水浴中磁力搅拌 1 h（800 r/min）至澄清，减压旋蒸除去四氢呋喃<sup>[4]</sup>，加入处方量的固态脂质和 10 mL 无水乙醇并置于 75 °C 水浴中，磁力搅拌（800 r/min）约 10 min 至体系澄清即得有有机相。配制含一定质量浓度的泊洛沙姆 188 及 TPGS 的水相，水相体积为 50 mL，置于 75 °C 水浴中磁力搅拌溶解。将有机相缓慢加至水相，继续磁力搅拌 20 min（800 r/min），于一定均质压力下均质数次，置于  $-10$  °C 冰箱中存放 15 min，过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜，补加蒸馏水至 50 mL，即得 TPGS-Ber-SLN 混悬液。

### 2.2 TPGS-Ber-SLN 中岩白菜素含量测定

**2.2.1 色谱条件<sup>[6]</sup>** 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱（150 mm×4.6 mm，5  $\mu\text{m}$ ）；检测波长为 275 nm；柱温为 30 °C；流动相为甲醇-水（20：80，稀磷酸调节 pH 值至 2.5）；体积流量为 1.0 mL/min；进样体积为 10  $\mu\text{L}$ 。理论塔板数以岩白菜素计不低于 6000。

**2.2.2 TPGS-Ber-SLN 供试品溶液的配制** 精密量取 1 mL 的 TPGS-Ber-SLN 混悬液至 50 mL 量瓶中，加入约 30 mL 甲醇超声 5 min（超声功率为 250 W、频率为 40 kHz），加入甲醇稀释，混匀后过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜。精密量取 5 mL 至 10 mL 量瓶中，加入流动相稀释，即得 TPGS-Ber-SLN 供试品溶液。

**2.2.3 岩白菜素对照品溶液的配制** 精密称取岩白菜素对照品 20 mg 至 100 mL 量瓶中，加入约 80 mL 甲醇超声溶解（超声功率为 250 W、频率为 40 kHz），加入甲醇稀释至刻度，即得岩白菜素对照品储备液（质量浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

**2.2.4 线性关系考察** 分别精密量取质量浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的岩白菜素对照品储备液，加入流动相配制成质量浓度为 10.00、5.00、2.50、1.00、0.50、0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件测定，以岩白菜素峰面积为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X），得回归方程为  $Y=17.666 2 X-0.045 8$ ， $r=0.999 9$ ，结果表明岩白菜素在 0.05~10.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  线性关系良好。

**2.2.5 专属性考察** 取空白辅料制备阴性样品，另取岩白菜素对照品溶液和 TPGS-Ber-SLN 供试品溶液分别进样测定，结果见图 1，试验结果表明辅料未对岩白菜素色谱峰产生干扰，专属性高。

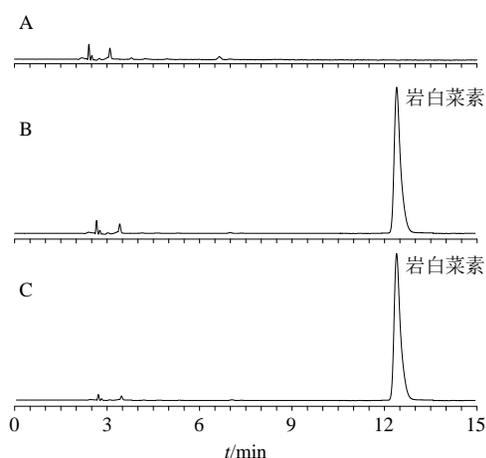


图 1 空白辅料 (A)、岩白菜素对照品 (B) 和 TPGS-Ber-SLN 样品 (C) 溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank material (A), bergenin reference substance (B) and TPGS-Ber-SLN sample (C)

**2.2.6 精密度考察** 取 0.05、2.50、10.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件分别连续进样测定 6 次，计算得岩白菜素峰面积的 RSD 分别为 0.68%、0.12%、0.16%，结果表明仪器精密度良好。

**2.2.7 重复性考察** 取 1 份 TPGS-Ber-SLN 混悬液，按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份 TPGS-Ber-SLN 供试品溶液并进样测定，按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定，计算得岩白菜素质量浓度的 RSD 为 0.89%，结果表明该方法的重复性良好。

**2.2.8 稳定性考察** 取 TPGS-Ber-SLN 供试品溶液，置于室温（温度 25 °C，湿度 55%），分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 取样，按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定，计算得岩白菜素峰面积的 RSD 为 1.45%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.2.9 加样回收率考察** 精密量取 0.5 mL 的

TPGS-Ber-SLN 混悬液置于 50 mL 量瓶中, 平行 9 份, 分为低、中、高 3 组, 分别加入岩白菜素对照品储备液 (质量浓度为 200 μg/mL) 1、2、3 mL, 按照“2.2.2”项下方法分别制备 TPGS-Ber-SLN 的供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定岩白菜素含量, 计算得岩白菜素的平均加样回收率为 101.54%, RSD 为 1.58%。

### 2.3 TPGS-Ber-SLN 包封率及载药量的测定

精密量取 TPGS-Ber-SLN 混悬液 1 mL 至超滤管中 (平均截留相对分子质量 12 000), 于 4 °C 下 12 500 r/min 离心 (离心半径为 6.8 cm) 20 min<sup>[18]</sup>, 取续滤液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定游离岩白菜素的量 ( $M_{\text{游离}}$ )。精密量取 TPGS-Ber-SLN 混悬液 1 mL 按“2.2.2”项下方法处理后按“2.2.1”项下色谱条件测定岩白菜素总量 ( $M_{\text{总}}$ )。精密量取 4 mL 的 TPGS-Ber-SLN 混悬液于 -50 °C 预冻 1 d 后置于低温冻干机中 (-40 °C) 直接冻干, 称定质量, 计算 1 mL 的 TPGS-Ber-SLN 混悬液中药物与辅料总质量 ( $W_{\text{总}}$ )。计算 TPGS-Ber-SLN 的包封率及载药量。

$$\text{包封率} = (M_{\text{总}} - M_{\text{游离}}) / M_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = (M_{\text{总}} - M_{\text{游离}}) / W_{\text{总}}$$

### 2.4 TPGS-Ber-SLN 粒径及 ζ 电位的测定

精密量取 TPGS-Ber-SLN 混悬液 0.1 mL, 加入蒸馏水稀释 40 倍, 摇匀。取 4 mL 置于四面透光型比色皿中测定 TPGS-Ber-SLN 粒径及多分散指数 (polydispersity index, PDI) 值。取稀释后的 TPGS-Ber-SLN 混悬液适量至 ζ 电位专用样品池中, 测定 ζ 电位, 平行测定 3 次, 取平均值。

### 2.5 TPGS-Ber-SLN 处方工艺研究

**2.5.1 固态脂质种类的考察** 岩白菜素投药量为 40 mg, 固态脂质用量为 500 mg, 泊洛沙姆 188 质量浓度为 15.0 mg/mL, TPGS 质量浓度为 0.20 mg/mL, 均质压力为 80 MPa, 均质次数为 6 次, 考察固态脂质种类对 TPGS-Ber-SLN 的影响, 结果见表 1。结果显示, 与双硬脂酸甘油酯和硬脂酸相比, 单硬脂酸甘油酯制得的 TPGS-Ber-SLN 具有相对较

表 1 固态脂质种类考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

固体脂质种类	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
单硬脂酸甘油酯	79.90 ± 1.42	4.91 ± 0.27	250.75 ± 13.47
双硬脂酸甘油酯	73.68 ± 1.37	4.42 ± 0.20	245.13 ± 12.04
硬脂酸	57.03 ± 1.68	3.45 ± 0.21	307.86 ± 27.88

高的包封率和载药量, 平均粒径虽大于双硬脂酸甘油酯制得的 TPGS-Ber-SLN, 但两者之间无显著性差异 ( $P = 0.1528 > 0.05$ ), 因此, 选择单硬脂酸甘油酯作为制备 TPGS-Ber-SLN 的固态脂质。

**2.5.2 单硬脂酸甘油酯用量的考察** 岩白菜素投药量为 40 mg, 单硬脂酸甘油酯为固态脂质, 泊洛沙姆 188 质量浓度为 15.0 mg/mL, TPGS 质量浓度为 0.20 mg/mL, 均质压力为 80 MPa, 均质次数为 6 次, 考察单硬脂酸甘油酯用量对 TPGS-Ber-SLN 的影响, 结果见表 2。结果显示, TPGS-Ber-SLN 包封率随着单硬脂酸甘油酯用量增加而增加, 可见加大载体用量利于提高包封率。但载药量随着单硬脂酸甘油酯用量的增加呈先增大后下降趋势, 而粒径呈现先变小后增大趋势。为获得较高包封率和载药量、较小粒径的 TPGS-Ber-SLN 处方, 选择单硬脂酸甘油酯用量在 450~600 mg 进行优化。

表 2 单硬脂酸甘油酯用量的考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Investigation of glyceryl monostearate amounts ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

单硬脂酸甘油酯用量/mg	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
400	61.82 ± 1.63	4.31 ± 0.17	270.76 ± 19.80
450	73.17 ± 1.67	5.77 ± 0.23	237.12 ± 23.74
500	78.78 ± 1.08	4.93 ± 0.21	255.61 ± 18.42
550	80.64 ± 1.36	4.53 ± 0.14	271.50 ± 20.93
600	82.97 ± 1.54	4.42 ± 0.18	283.69 ± 17.45
650	83.20 ± 1.54	4.50 ± 0.19	293.07 ± 18.11

**2.5.3 泊洛沙姆 188 质量浓度的考察** 岩白菜素投药量为 40 mg, 单硬脂酸甘油酯用量为 500 mg, TPGS 质量浓度为 0.20 mg/mL, 均质压力为 80 MPa, 均质次数为 6 次, 考察泊洛沙姆 188 质量浓度对 TPGS-Ber-SLN 的影响, 结果见表 3。结果显示, 随着泊洛沙姆 188 质量浓度的增加 TPGS-Ber-SLN 包封率和载药量呈先增加后下降情况, 所以适量增加泊洛沙姆 188 利于增加包封率及载药量, 但泊洛沙姆 188 用量过大时可能由于增溶作用使药物进入水相<sup>[18]</sup>, 导致包封率和载药量下降。TPGS-Ber-SLN 粒径随着泊洛沙姆 188 质量浓度增加总体呈下降趋势, 可见泊洛沙姆 188 质量浓度对 TPGS-Ber-SLN 影响较大, 后续可对质量浓度 12.5~22.5 mg/mL 进行优化。

**2.5.4 TPGS 质量浓度的考察** 岩白菜素投药量为 40 mg, 单硬脂酸甘油酯用量为 500 mg, 泊洛沙姆

表3 泊洛沙姆 188 质量浓度的考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 3 Investigation of mass concentration of poloxamer 188 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

泊洛沙姆 188/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
10.0	68.43±0.98	4.07±0.15	363.82±36.75
12.5	75.12±1.39	4.51±0.16	310.76±28.69
15.0	79.08±1.72	4.90±0.18	253.70±20.85
17.5	81.62±1.06	5.01±0.23	232.46±16.72
20.0	77.53±1.47	4.62±0.17	221.83±12.61
22.5	73.81±1.75	4.30±0.14	210.51±13.87
25.0	67.04±1.66	3.87±0.10	211.23±10.46

188 质量浓度为 15.0 mg/mL, 均质压力为 80 MPa, 均质次数为 6 次, 考察 TPGS 质量浓度对 TPGS-Ber-SLN 的影响, 结果见表 4。结果显示, 当处方中不含 TPGS 时包封率及载药相对较低, 随着 TPGS 质量浓度的增加 TPGS-Ber-SLN 包封率和载药量逐渐增加后下降, 而粒径呈逐渐增加趋势。可能是由于 TPGS 长链有助于阻止 TPGS-Ber-SLN 表层或浅表层药物泄露<sup>[19]</sup>, 从而使包封率和载药量增加; 但 TPGS 用量过大时, TPGS 长链之间的排斥作用降低了 TPGS-Ber-SLN 表面致密度, 从而导致药物泄露。由于 TPGS 质量浓度为 0.2 mg/mL 时包封率和载药量均相对较高, 粒径小于 250 nm, 故确定 TPGS 质量浓度为 0.2 mg/mL。

**2.5.5 均质压力的考察** 岩白菜素投药量为 40 mg, 单硬脂酸甘油酯用量为 500 mg, 泊洛沙姆 188 质量浓度为 17.5 mg/mL, TPGS 质量浓度为 0.20 mg/mL, 均质次数为 6 次, 考察均质压力对 TPGS-Ber-SLN 的影响, 结果见表 5。结果显示, 均质压力在 60~80 MPa 时对 TPGS-Ber-SLN 包封率和载药量无显著性影响, 但压力达到 90 MPa 时包封率和载药量出现明显下降情况, 可能是均质压力较高

表4 TPGS 质量浓度的考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 4 Investigation of mass concentration of TPGS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

TPGS/(mg·mL <sup>-1</sup> )	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0	70.60±1.04	4.07±0.11	193.25±11.92
0.10	72.77±0.99	4.21±0.14	199.47±18.14
0.15	75.85±1.28	4.84±0.10	213.26±17.56
0.20	79.18±1.32	4.93±0.12	227.61±14.92
0.25	77.68±1.59	4.61±0.13	266.40±22.71
0.30	74.36±0.97	4.26±0.09	282.51±24.04

表5 均质压力的考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 5 Investigation of homogeneous pressure ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

均质压力/MPa	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
60	79.86±0.91	4.97±0.11	324.57±23.67
70	81.04±1.49	5.03±0.20	268.66±19.50
80	80.93±1.18	5.00±0.18	236.74±13.28
90	77.45±0.94	4.72±0.15	228.08±10.89
100	73.27±1.44	4.34±0.09	261.43±15.67

时体系温度过高, 在表面活性剂作用下使岩白菜素进入水相从而降低了 TPGS-Ber-SLN 的包封率及载药量。较高的均质压力也使 TPGS-Ber-SLN 粒径出现增长趋势, 为降低过高均质压力带来的影响, 故固定均质压力为 80 MPa。

**2.5.6 均质次数的考察** 岩白菜素投药量为 40 mg, 单硬脂酸甘油酯用量为 500 mg, 泊洛沙姆 188 质量浓度为 17.5 mg/mL, TPGS 质量浓度为 0.20 mg/mL, 均质压力为 80 MPa, 考察均质次数对 TPGS-Ber-SLN 的影响, 结果见表 6。结果显示, 随着均质次数的增加 TPGS-Ber-SLN 包封率和载药量均呈现先增加后下降, 而粒径呈下降后增加情况。说明均质次数过少或过多均会对 TPGS-Ber-SLN 的各项指标产生影响, 后续需对均质次数在 6~10 次进行优化。

表6 均质次数的考察 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )Table 6 Investigation of homogeneous times ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

均质次数	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
4	77.94±1.01	4.77±0.18	351.12±28.21
5	78.07±1.73	4.83±0.16	276.90±23.75
6	81.84±1.45	5.04±0.13	233.10±17.62
7	82.17±0.89	5.02±0.19	218.44±12.83
8	81.40±1.07	4.97±0.12	203.65±10.99
10	77.26±0.91	4.64±0.13	240.76±14.06
12	71.08±0.95	4.21±0.16	281.27±17.48

## 2.6 BBD-RSM 优化 TPGS-Ber-SLN 处方工艺

**2.6.1 试验方案** 结合单因素试验发现单硬脂酸甘油酯用量、泊洛沙姆 188 质量浓度和均质次数对 TPGS-Ber-SLN 影响较大, 故分别将其作为自变量  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ , 各水平设置见表 7。BBD-RSM 仍采用包封率、载药量和粒径作为优化指标, 即作为因变量  $Y_1$ 、 $Y_2$  和  $Y_3$ 。为了得到具有较高包封率及载药量、同时具有较小粒径的 TPGS-Ber-SLN 处方工艺, 将 3 个指标作归一化处理。

归一值 (overall desirability, OD) 计算过程为  
 ①包封率和载药量计算公式为  $d_{max} = (M_i - M_{min}) / (M_{max} - M_{min})$ ;  
 ②粒径计算公式为  $d_{min} = (M_{max} - M_i) / (M_{max} - M_{min})$ , 其中  $M_{max}$  和  $M_{min}$  分别为该试验组中最大及最小值,  $M_i$  为实际值;  
 ③  $OD = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k}$ 。

分别制备 TPGS-Ber-SLN, 各组均进行 3 次平行试验, 取平均值, 结果见表 7。

**2.6.2 模型拟合、效应面图处方工艺的确定** 采用 Design Expert V8.0.6 软件对试验数据进行拟合, 得 OD 方程:  $OD = 0.93 + 4.03 \times 10^{-3} X_1 - 9.21 \times 10^{-3} X_2 + 0.04 X_3 + 0.08 X_1 X_2 + 0.06 X_1 X_3 - 0.29 X_2 X_3 - 0.51 X_1^2 - 0.28 X_2^2 - 0.29 X_3^2$ 。

方差分析结果 (表 8) 显示, 模型  $P < 0.000 1$ ,  $R^2 = 0.992 6$ ,  $R_{adj}^2 = 0.983 1$ , 失拟项  $P = 0.057 7 > 0.05$ , 说明所选模型的拟合度较高。OD 方程中  $X_3$ 、 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$  具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),  $X_2 X_3$ 、 $X_1^2$ 、 $X_2^2$  和  $X_3^2$  具有极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 交互作用三维效应面见图 2, 当固定某一因素时, 随着其他 2 因素 (质量浓度、用量或次数) 的增加响应值 OD 均呈现先增大后减小趋势, 说明采用 BBD-RSM 优化 TPGS-Ber-SLN 处方工艺是非常必要的。

TPGS-Ber-SLN 最佳处方工艺为单硬脂酸甘油酯 524.71 mg, 泊洛沙姆 188 质量浓度为 17.2 mg/mL, 均质次数为 8.72 次。包封率、载药量和粒径的预测值分别为 83.87%、5.14% 和 224.37 nm。

表 7 BBD-RSM 试验设计与结果 (n = 3)

Table 7 Design and results of BBD-RSM experiments (n = 3)

序号	X <sub>1</sub> /mg	X <sub>2</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub> /%	Y <sub>2</sub> /%	Y <sub>3</sub> /nm	OD	序号	X <sub>1</sub> /mg	X <sub>2</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub> /%	Y <sub>2</sub> /%	Y <sub>3</sub> /nm	OD
1	525 (0)	17.5 (0)	8 (0)	80.96	4.91	234.80	0.918	10	525	17.5	8	80.77	5.08	234.78	0.964
2	525	12.5 (-1)	10 (+1)	67.43	4.01	269.24	0.191	11	450	17.5	10	64.49	4.22	278.04	0.140
3	450 (-1)	12.5	8	65.36	4.26	256.68	0.247	12	525	22.5	10	68.22	4.07	286.18	0.192
4	600 (+1)	12.5	8	75.67	3.97	300.14	0.083	13	525	22.5	6	75.63	4.53	248.84	0.637
5	525	17.5	8	80.30	4.89	223.69	0.947	14	525	17.5	8	82.16	4.90	226.93	0.971
6	600	22.5 (+1)	8	77.43	4.11	269.18	0.385	15	450	17.5	6	65.88	4.37	294.64	0.161
7	525	12.5	6 (-1)	66.76	3.92	278.25	0.000	16	450	22.5	8	63.92	4.11	241.47	0.000
8	600	17.5	10	75.21	3.98	289.36	0.178	17	600	17.5	6	82.14	4.39	301.56	0.000
9	525	17.5	8	82.74	4.99	245.16	0.920								

表 8 方差分析

Table 8 Analysis of variance

误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	误差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2.36	9	0.26	104.14	<0.000 1	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1.08	1	1.08	428.94	<0.000 1
X <sub>1</sub>	1.30 × 10 <sup>-4</sup>	1	1.30 × 10 <sup>-4</sup>	0.05	0.826 7	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.34	1	0.34	134.27	<0.000 1
X <sub>2</sub>	6.79 × 10 <sup>-4</sup>	1	6.79 × 10 <sup>-4</sup>	0.27	0.619 2	X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.37	1	0.37	145.21	<0.000 1
X <sub>3</sub>	0.01	1	0.01	4.93	0.041 8	残差	0.02	7	2.51 × 10 <sup>-3</sup>		
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.02	1	0.02	9.49	0.017 8	失拟项	0.01	3	4.80 × 10 <sup>-3</sup>	6.03	0.057 7
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.01	1	0.01	5.23	0.046 1	绝对误差	3.19 × 10 <sup>-3</sup>	4	7.97 × 10 <sup>-3</sup>		
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.34	1	0.34	134.38	<0.000 1	总和	2.37	16			

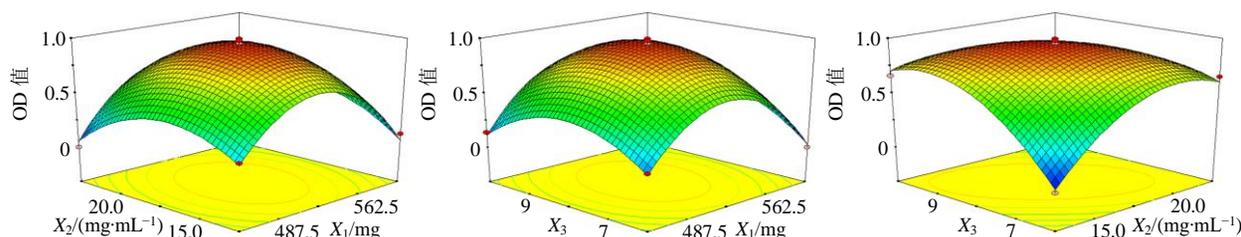


图 2 不同因素对 OD 值的效应面

Fig. 2 Response surface of different factors on OD value

## 2.7 处方工艺验证

为便于实际操作，将单硬脂酸甘油酯用量调整为 525 mg，泊洛沙姆 188 质量浓度调整为 17.5 mg/mL，均质次数调整为 9 次，按“2.2”项方法平行制备 3 批 TPGS-Ber-SLN，按“2.3”及“2.4”项下方法操作，分别测定 TPGS-Ber-SLN 包封率、载药量及粒径，并计算各自测定值与预测值的偏差，结果见表 9。TPGS-Ber-SLN 的包封率、载药量及粒径的偏差均小于±5%。粒径分布见图 3，平均 PDI 为 0.099±0.011，平均 ζ 电位为(-15.67±0.23)mV，ζ 电位见图 4。

$$\text{偏差} = (\text{测定值} - \text{预测值}) / \text{预测值}$$

表 9 验证实验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 9 Results of confirmatory experiments ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

项目	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
测定值	83.16±1.09	4.97±0.13	229.46±19.07
预测值	83.87	5.14	224.37
偏差/%	-0.85	-3.31	2.27

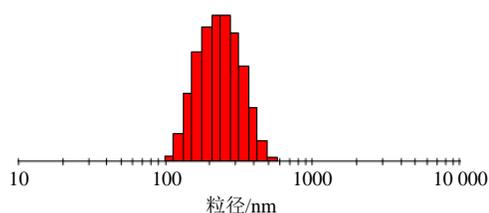


图 3 TPGS-Ber-SLN 粒径分布

Fig. 3 Distribution of particle size of TPGS-Ber-SLN

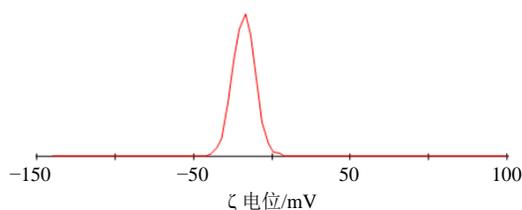


图 4 TPGS-Ber-SLN 的 ζ 电位

Fig. 4 Diagram of ζ potential of TPGS-Ber-SLN

## 2.8 TEM 观察 TPGS-Ber-SLN 微观形态

取 TPGS-Ber-SLN 混悬液 0.1 mL，稀释 50 倍后滴至铜网上，用 2% 磷钨酸钠染色，置于室温环境晾干，于 TEM 下放大至 12 000 倍（高压为 5.0 kV），即可观察到 TPGS-Ber-SLN 的微观形态，结果见图 5。结果显示，TPGS-Ber-SLN 基本形态为类球形，无粘连。

## 2.9 冻干粉的制备及稳定性评价

**2.9.1 冻干粉种类及处方用量的考察** 于 TPGS-Ber-SLN 混悬液中加入冻干保护剂（乳糖、甘露醇

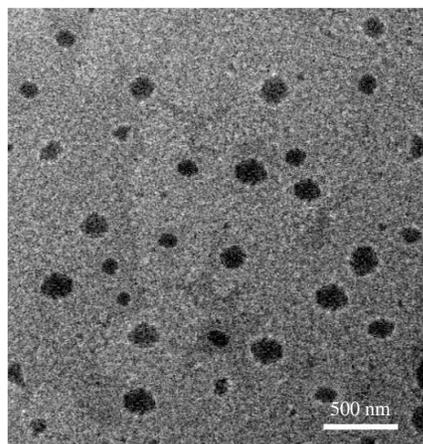


图 5 TPGS-Ber-SLN 的 TEM 图

Fig. 5 TEM picture of TPGS-Ber-SLN

或两者混合物)，震荡至澄清，-50℃超低温冰箱预冻 1 d，取出立即置于-40℃冷冻干燥机中，抽真空，冷冻干燥 1 d 后取出冻干品。按表 10 进行评价，冻干粉出现塌陷、分层且色差明显、再分散时间大于 90 s 时表示冻干粉不理想，因而评分较低；反之则表示冻干粉较为理想，评分较高。考察结果见表 11，质量浓度为 0.05、0.07 g/mL 的乳糖和甘露醇（质量比为 1:1）制得的冻干粉得分最高，考虑到辅料用量问题，最终选择 5% 的乳糖和甘露醇（质量比为 1:1）来制备 TPGS-Ber-SLN 冻干粉。复溶后测得包封率、粒径和 PDI 值分别为 (81.26±1.01)%、(242.03±15.86)nm 和 0.116±0.021。TPGS-Ber-SLN 冻干前、冻干粉和蒸馏水复溶后样品外观见图 6。

**2.9.2 TPGS-Ber-SLN 冻干粉稳定性考察** TPGS-Ber-SLN 冻干粉密封置于恒温恒湿箱中（温度 30℃，湿度 60%），分别于 0、5、10、15、30、45、60、75、90 d 取样，蒸馏水复溶后测定包封率和粒径，结果见表 12。TPGS-Ber-SLN 混悬液稳定性较差，但制备成冻干粉后包封率和粒径波动幅度明显变小（PDI 值均小于 0.2），说明制备成冻干粉后增加了稳定性。

## 2.10 TPGS-Ber-SLN 冻干粉的 XRPD 研究

采用 XRPD 对 TPGS-Ber-SLN 冻干粉进行晶型

表 10 评分标准

Table 10 Scoring criteria

外观	分成及色泽均匀度	再分散性	评分
塌陷	分层，色差明显	>90 s	0~3
轻微塌陷	色差不明显	60~90 s	4~7
饱满	无分层，无色差	<30 s	8~10

表 11 冻干结果 (n = 3)

Table 11 Freeze-dried results (n = 3)

处方 编号	冻干保护剂种类及用量/ (g·mL <sup>-1</sup> )		评分			总得分
	乳糖	甘露醇 乳糖-甘露醇 (1:1)	外观	色泽	分散性	
1	0.03		1	2	3	6
2	0.05		4	4	6	14
3	0.07		7	7	7	21
4		0.03	2	3	5	10
5		0.05	6	7	6	19
6		0.07	8	8	7	23
7			4	6	8	18
8		0.05	10	10	9	29
9		0.07	10	10	9	29



A-TPGS-Ber-SLN 混悬液 B-TPGS-Ber-SLN 冻干粉 C-蒸馏水复溶后样品

A-TPGS-Ber-SLN suspension B-lyophilized powder of TPGS-Ber-SLN C-sample after redissolving by distilled water

图 6 TPGS-Ber-SLN 样品外观

Fig. 6 Appearance of TPGS-Ber-SLN samples

表 12 TPGS-Ber-SLN 的稳定性考察结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 12 Stability investigation results of TPGS-Ber-SLN ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

t/d	包封率/%		粒径/nm	
	混悬液	冻干粉	混悬液	冻干粉
0	83.12 ± 1.34	79.98 ± 0.89	236.17 ± 12.32	251.13 ± 8.64
5	80.04 ± 0.95	78.18 ± 1.04	241.36 ± 18.78	255.84 ± 9.11
10	73.58 ± 1.11	79.04 ± 1.63	421.44 ± 39.41	243.60 ± 7.94
15	64.89 ± 1.65	76.43 ± 0.96	840.58 ± 103.26	259.22 ± 9.62
30	17.12 ± 1.82	77.04 ± 1.04	322.15 ± 244.85	255.31 ± 8.88
45	5.63 ± 1.35	75.89 ± 1.28		260.24 ± 10.26
60		75.97 ± 0.99		267.19 ± 11.33
75		76.03 ± 1.26		270.73 ± 13.04
90		74.82 ± 1.38		274.86 ± 13.92

分析。取岩白菜素原料药、空白辅料、物理混合物(岩白菜素和辅料的比例与TPGS-Ber-SLN冻干粉一致)和TPGS-Ber-SLN冻干粉适量置于样品槽中,

玻璃片将样品粉末压制平整后进行扫描。测试条件为Cu-K $\alpha$ 靶,速度为4°/min,扫描角度(2 $\theta$ )为3°~45°,结果见图7。岩白菜素原料药在6.97°、8.03°、11.77°、13.45°、14.26°等处的晶型峰相对较强,在物理混合物的XRPD图谱中仍可观察到这些晶型峰,位置未发生变化但强度下降明显。TPGS-Ber-SLN冻干粉XRPD中仅可观察到空白辅料的晶型衍射峰,岩白菜素晶型峰完全消失,说明岩白菜素在TPGS-Ber-SLN冻干粉中晶型发生很大改变,转变为无定型物质。

取TPGS-Ber-SLN冻干粉密封后置于恒温恒湿箱(温度30℃,湿度60%),分别于0、30、60、90d取样作XRPD分析,结果见图8。TPGS-Ber-SLN冻干粉放置90d后XRPD图谱中仍未出现岩白菜素原料药特征晶型峰,说明岩白菜素在TPGS-Ber-SLN冻干粉中仍以无定形的形式存在,未出现析晶现象。

### 2.11 TPGS-Ber-SLN 冻干粉的差式扫描量热法(DSC)研究

取岩白菜素原料药、空白辅料、物理混合物(岩

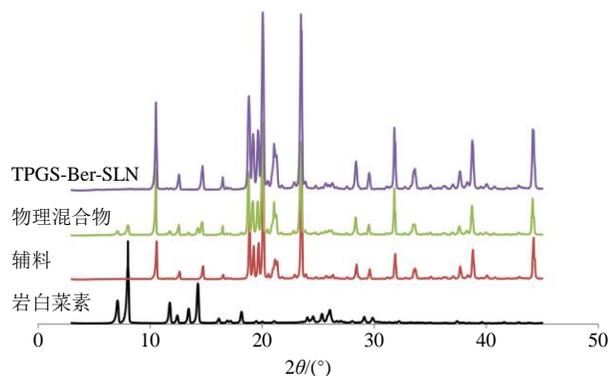


图 7 TPGS-Ber-SLN 冻干粉的 XRPD 结果

Fig. 7 XRPD results of TPGS-Ber-SLN freeze-dried powder

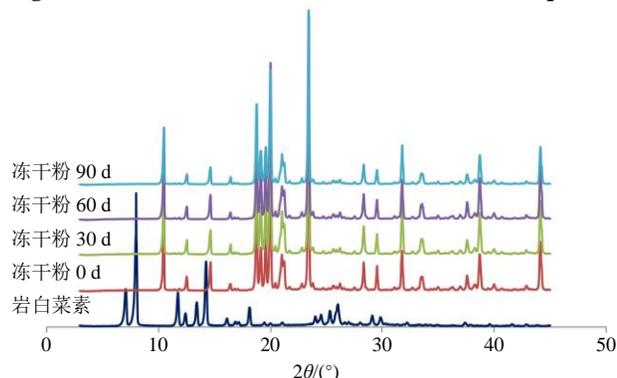


图 8 TPGS-Ber-SLN 冻干粉的晶型稳定性结果 (XRPD)  
Fig. 8 Crystal stability results of TPGS-Ber-SLN freeze-dried powder (XRPD)

白菜素和辅料比例与 TPGS-Ber-SLN 冻干粉一致)、TPGS-Ber-SLN 冻干粉 (0、30、60、90 d) 适量置于样品槽中测试条件为氧化铝 ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) 为参比物,升温速度为  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , 升温范围为  $30\sim 300\text{ }^\circ\text{C}$ 。结果见图 9, 岩白菜素原料药在  $242.2\text{ }^\circ\text{C}$  出现熔点峰, 在物理混合物中吸热峰提前至  $217.8\text{ }^\circ\text{C}$ 。TPGS-Ber-SLN 冻干粉 (0 d) 的 DSC 图谱中未出现岩白菜素原料药吸热峰, 说明岩白菜素在 TPGS-Ber-SLN 冻干粉中以无定型形式存在, 与 XRPD 研究结果一致。在 TPGS-Ber-SLN 冻干粉的 30、60、90 d 样品的 DSC 图谱中仍未出现原料药吸热峰, 证明样品稳定性良好。

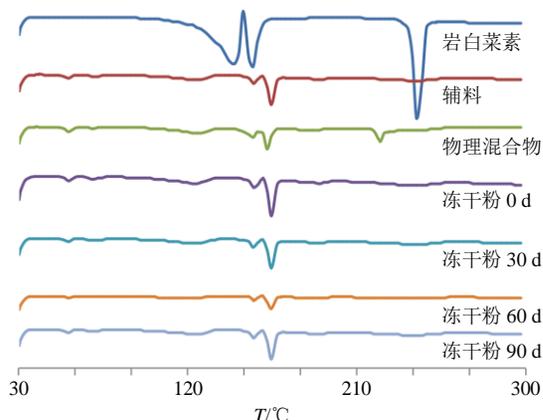


图 9 TPGS-Ber-SLN 冻干粉的晶型稳定性结果 (DSC)

Fig. 9 Crystal stability results of TPGS-Ber-SLN freeze-dried powder (DSC)

## 2.12 TPGS-Ber-SLN 体外释药行为研究

测得岩白菜素在 pH 1.2 盐酸水溶液及 pH 5.0 和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中溶解度分别为  $(1.58\pm 0.04)$ 、 $(1.60\pm 0.03)$ 、 $(0.98\pm 0.02)$  mg/mL, 因此 50 mg 岩白菜素在体积为 500 mL 的 3 种释药介质中可达漏槽条件。按照 TPGS-Ber-SLN 处方工艺制备 Ber-SLN (不加 TPGS), 并按“2.9.1”项下方法制备成冻干粉末。取岩白菜素原料药、Ber-SLN 和 TPGS-Ber-SLN 冻干粉适量, 使岩白菜素含量为 50 mg, 加入 pH 1.2 盐酸水溶液 5 mL, 置于透析袋中 (平均截留相对分子质量为 12 000), 扎紧。释药介质为 500 mL 的 pH 1.2 盐酸水溶液, 介质温度为  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 转速为 75 r/min, 分别于 0、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 h 取样 3 mL。同法考察在 pH 5.0 和 pH 6.8 PBS 中释药情况, 取样点调整为 0、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、4.00、6.00、8.00、12.00、18.00、24.00、48.00 h。样品均过  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜后进样测定, 结果见图 10。Ber-SLN 和 TPGS-Ber-

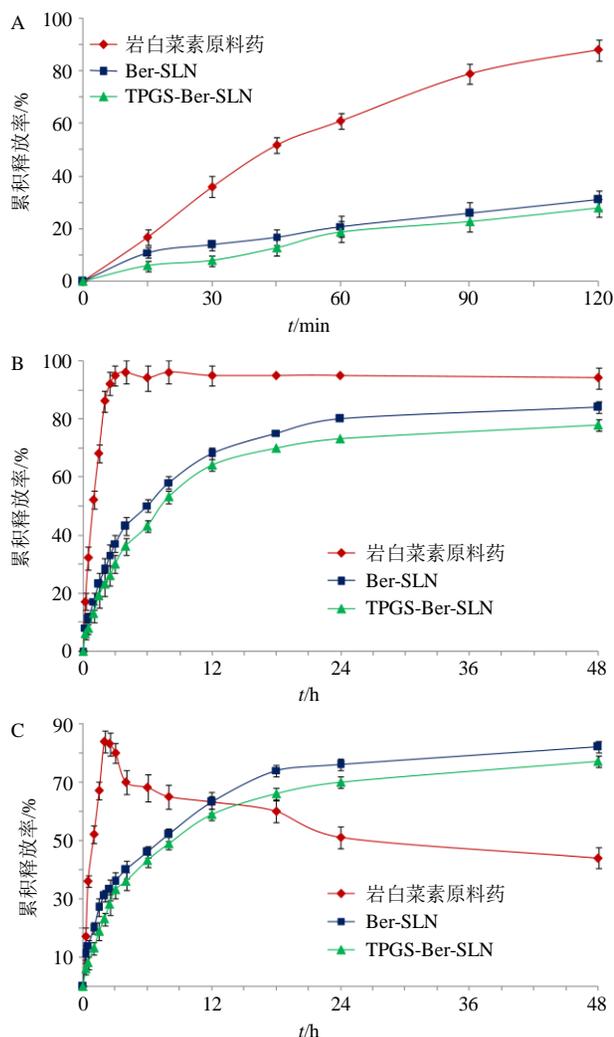


图 10 岩白菜素原料药、Ber-SLN 和 TPGS-Ber-SLN 在 pH 1.2 盐酸水溶液 (A) 及 pH 5.0 PBS (B) 和 pH 6.8 PBS (C) 中的体外释放曲线 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Fig. 10 *In vitro* release profile of bergenin bulk drug, Ber-SLN and TPGS-Ber-SLN in pH 1.2 hydrochloric acid aqueous solution (A), pH 5.0 PBS (B) and pH 6.8 PBS (C) ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

SLN 均呈缓释特征, Ber-SLN 在不同 pH 值的释药介质中, 释药速率和累积释放度均高于 TPGS-Ber-SLN。岩白菜素原料药在 pH 1.2 盐酸水溶液和 pH 5.0 PBS 中 2 h 内累积释放度均达 90% 以上, 但在 pH 6.8 PBS 中随着时间的延长累积释放度呈现下降趋势, 可能是由于岩白菜素在碱性环境中发生降解所致<sup>[4,6]</sup>。

Ber-SLN 和 TPGS-Ber-SLN 在 pH 5.0 和 pH 6.8 PBS 中释药过程均符合 Weibull 模型 (表 13), 说明释药过程是典型的双相动力学特征。

## 2.13 口服药动力学比较

### 2.13.1 给药及取血方案 取岩白菜素原料药、Ber-

表 13 Ber-SLN 和 TPGS-Ber-SLN 在 pH 5.0、6.8 PBS 中的释放模型  
Table 13 Fitting release model of Ber-SLN and TPGS-Ber-SLN in pH 5.0 and 6.8 PBS

样品	释药介质	Weibull 模型拟合方程	R <sup>2</sup>
Ber-SLN	pH 5.0 PBS	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.634 \ln t-1.576$	0.962 4
	pH 6.8 PBS	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.667 \ln t-1.845$	0.982 0
TPGS-Ber-SLN	pH 5.0 PBS	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.573 \ln t-1.501$	0.967 1
	pH 6.8 PBS	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.676 \ln t-1.913$	0.980 5

SLN 和 TPGS-Ber-SLN 冻干粉末, 采用 0.5% 的 CMC-Na 溶液配制灌胃液。取 18 只健康 SD 大鼠, 过夜禁食, 随机分成 3 组, 各只大鼠称定质量后按 60 mg/kg ig 给药 (以岩白菜素含量计)。岩白菜素原料药组分别于 0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、8.00 h 取血约 0.3 mL, Ber-SLN 和 TPGS-Ber-SLN 冻干粉末分别增加 10 h 和 12 h 取血点, 将血样引流至肝素浸润离心管中, 震荡, 并以 3000 r/min 离心 (离心半径为 6.8 cm) 2 min, 即得血浆样品。

**2.13.2 血浆样品的处理**<sup>[6]</sup> 取 100 μL 血浆样品和 50 μL 对乙酰氨基酚内标溶液 (质量浓度为 800 ng/mL) 至离心管中, 密封涡旋 15 s, 加入 0.5 mL 醋酸乙酯后继续密封涡旋 30 s, 置于 4 °C 离心机中 5000 r/min 离心 (离心半径为 6.8 cm) 3 min, 移取上层有机相。同法再次提取 1 次, 合并有机相, 于 40 °C 温度下用氮气吹干得残渣, 采用 100 μL 甲醇复溶, 待测。

**2.13.3 血浆对照品溶液的配制** 甲醇配制 50、100、250、500、1250、2500 ng/mL 的岩白菜素对照品溶液, 各个质量浓度分别取 100 μL, 氮气吹除有机溶液后加入 100 μL 空白血浆, 涡旋 30 s 后超声 30 s 混合均匀, 即得血浆对照品溶液。

**2.13.4 线性关系考察** 按“2.13.2”项方法配制岩白菜素血浆对照品溶液, 并进样测定岩白菜素和对乙酰氨基酚的峰面积。以两者峰面积比为纵坐标 (Y), 岩白菜素质量浓度为横坐标 (X), 作线性回归得方程:  $Y=2.231 0 X+8.042 6$ ,  $r=0.996 4$ , 结果表明岩白菜素血浆对照品溶液的线性范围为 50~2500 ng/mL。

**2.13.5 专属性考察** 血药浓度测定时色谱条件与“2.1.1”项下色谱条件一致。取空白血浆、岩白菜素血浆对照品溶液和岩白菜素原料药 ig 给药 8 h 血浆样品, 分别按“2.13.2”项下方法进行处理, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定。色谱图见图 11, 试验结果

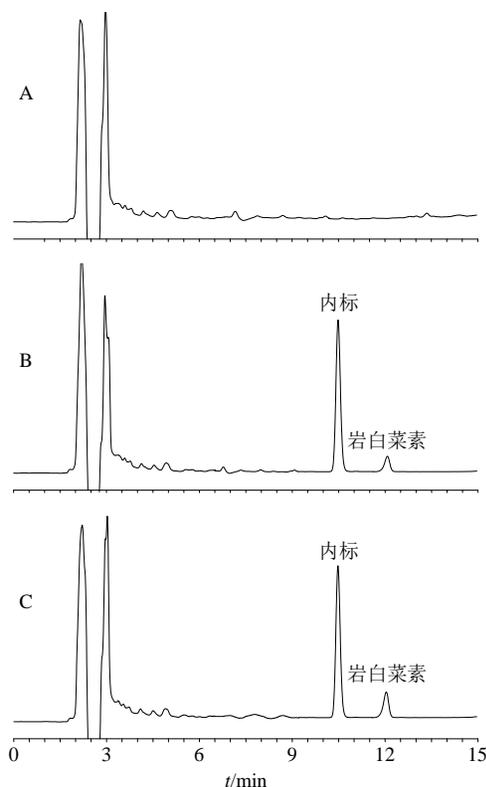


图 11 空白血浆 (A)、岩白菜素+空白血浆 (B) 和血浆样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 11 HPLC of blank plasma (A), Ber + blank plasma (B), and plasma sample (C)

表明血浆内源性物质未对岩白菜素和内标峰产生干扰, 专属性较高。

**2.13.6 日内精密度考察** 分别取 50、500、2500 ng/mL 血浆对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件同 1 d 内分别连续测定 6 次, 计算得岩白菜素和内标峰面积比值的 RSD 分别为 9.05%、4.17%、6.02%, 试验结果表明日内精密度良好。

**2.13.7 日间精密度考察** 分别取 50、500、2500 ng/mL 血浆对照品溶液每天测试 1 次, 按“2.1.1”项下色谱条件连续测定 6 d, 计算得岩白菜素和内标峰面积比值 RSD 分别为 6.79%、9.32%、5.10%, 试验结果表明日间精密度良好。

**2.13.8 稳定性考察** 取岩白菜素原料药 1g 给药 1 h 的血浆样品, 分别于 0、3、6、9、12、24 h 进样测定, 计算得岩白菜素和内标峰面积比值 RSD 为 6.07%, 试验结果表明稳定性良好。

**2.13.9 提取回收率考察**<sup>[20]</sup> 取岩白菜素质量浓度为 50、500、2500 ng/mL 对照品溶液各 100 μL, 氮气吹除有机溶液后加入 100 μL 空白血浆, 涡旋 30 s 后超声 30 s 混合均匀后按“2.13.2”项下方法处理, 按“2.1.1”项下色谱条件进样测定岩白菜素和内标峰面积, 并计算两者峰面积比值, 带入岩白菜素血浆对照品线性方程  $Y=2.2310X+8.0426$ , 计算测得质量浓度及提取回收率, 结果显示平均提取回收率为 94.98%, RSD 为 7.18% ( $n=9$ )。

**2.13.10 定量限考察** 取质量浓度为 50 ng/mL 的岩白菜素血浆对照品溶液, 加入空白血浆逐步稀释, 按“2.13.2”项下方法处理后进样测定, 采用信噪比为 10 作为定量限, 试验结果表明岩白菜素在血浆中定量限为 15 ng/mL。

**2.13.11 药动学结果** 岩白菜素原料药、Ber-SLN 和 TPGS-Ber-SLN 药-时曲线见图 12, 使用 DAS2.0 计算主要药动学参数, 结果见表 14。Ber-SLN 与 TPGS-Ber-SLN 组与原料药相比, 达峰时间 ( $t_{max}$ )

均发生了显著性延后 ( $P<0.05$ ); 半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 也发生了显著性延长 ( $P<0.05$ ), 利于维持血药浓度; 峰浓度 ( $C_{max}$ ) 分别提高至 2.63 倍和 3.91 倍, 差异具有极显著性水平 ( $P<0.01$ ); 药时曲线下面积 ( $AUC_{0-t}$  和  $AUC_{0-\infty}$ ) 均有极显著性改变 ( $P<0.01$ ), 说明 Ber-SLN 与 TPGS-Ber-SLN 极大影响了岩白菜素体内吸收过程, 生物利用度分别提高至 3.37 倍和 5.34 倍。TPGS-Ber-SLN 与 Ber-SLN 相比,  $t_{max}$  和  $t_{1/2}$  无明显改变, 但  $C_{max}$ 、 $AUC_{0-t}$  和  $AUC_{0-\infty}$  发生了显著性提高 ( $P<0.05$ ), 证明 TPGS-Ber-SLN 更能促进岩白菜素体内吸收。

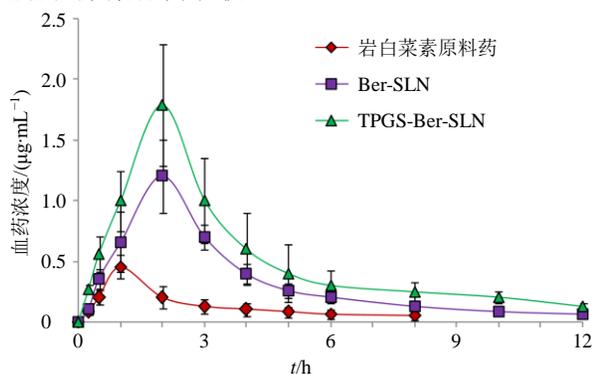


图 12 药-时曲线 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 12 Drug concentration-time curves ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

表 14 主要药动学参数 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 14 Main pharmacokinetic parameters ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

参数	单位	岩白菜素	Ber-SLN	TPGS-Ber-SLN
$t_{max}$	h	1.07 ± 0.28	2.12 ± 0.38*	2.07 ± 0.43*
$t_{1/2}$	h	2.23 ± 0.41	4.09 ± 0.72*	4.21 ± 0.78*
$C_{max}$	ng·mL <sup>-1</sup>	459.04 ± 58.23	1 206.43 ± 138.23**	1 793.44 ± 205.83***
$AUC_{0-t}$	ng·h·mL <sup>-1</sup>	1 179.04 ± 134.97	3 978.62 ± 468.12**	6 293.07 ± 864.77***
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL <sup>-1</sup>	1 224.65 ± 142.08	4 121.75 ± 508.04**	6 502.65 ± 941.92***

与岩白菜素比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$ ; 与 Ber-SLN 比较: # $P<0.01$  \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  vs bergenin drug substance; # $P<0.05$  vs Ber-SLN

### 3 讨论

在制备 TPGS-Ber-SLN 时先将岩白菜素与磷脂在四氢呋喃中磁力搅拌至体系澄清, 此时岩白菜素可与磷脂形成磷脂复合物<sup>[4]</sup>, 从而利于增强岩白菜素溶解度及与单硬脂酸甘油酯的亲油性<sup>[18,21]</sup>, 为后续制备 TPGS-Ber-SLN 奠定了基础。也有学者认为<sup>[19]</sup>, 药物-磷脂复合物本身可作为固体脂质纳米粒的脂质载体, 采用 2 种以上的脂质载体可防止药物被排出晶格, 增加纳米粒的包封率, 本研究结果可为脂溶性差的药物制备 SLN 提供参考。TPGS 是一种同时带有亲水和亲脂基团的高分子材料, 具有一定

的乳化能力, 在水中临界胶束质量浓度为 249 mg/L<sup>[22]</sup>, 为了防止 TPGS 从 SLN 表面逃逸出去自发形成胶束, 故确定其在水相中质量浓度为 0.20 mg/mL, 该用量也与相关研究者采用的用量基本一致<sup>[15,17]</sup>。

测得 TPGS-Ber-SLN 平均  $\zeta$  电位绝对值不足 30 mV, 稳定性不佳。可能是由于位于 TPGS-Ber-SLN 表面的 TPGS 接枝较长, 起到了屏蔽作用<sup>[23-24]</sup>, 故将 TPGS-Ber-SLN 制备成冻干粉来加以改善。糖类保护剂 (乳糖) 在冻干失去水分时, 体系可形成高黏度的玻璃态来防止纳米微观结构发生变化<sup>[25]</sup>, 但

糖类保护剂容易出现塌陷现象。甘露醇具有优良的支撑作用,可解决糖类保护剂的不足,因此选用糖类保护剂(乳糖)和甘露醇联用来制备TPGS-Ber-SLN冻干粉。考察发现,采用质量浓度0.05 g/mL的乳糖和甘露醇(质量比为1:1)来制备TPGS-Ber-SLN冻干粉时外观饱满、无分层、再分散性良好。

岩白菜素原料药在pH 6.8 PBS中累积释放度逐渐降低,而Ber-SLN和TPGS-Ber-SLN在pH 6.8 PBS中的累积溶出度逐渐增加,可能是由于载体的包裹作用提高了岩白菜素稳定性,为后续顺利进入血液循环奠定了基础。TPGS-Ber-SLN释药速率较慢,可能是由于TPGS-Ber-SLN表面的亲水性高于Ber-SLN,疏水性药物更倾向于分布于TPGS-Ber-SLN内部<sup>[26]</sup>,因而释药更为缓慢;另外TPGS-Ber-SLN表面经TPGS修饰后对药物释放也起到一定的阻滞作用。

Ber-SLN和TPGS-Ber-SLN的 $t_{max}$ 均发生显著性延后,可能与Ber-SLN和TPGS-Ber-SLN缓释作用有关,而且较小的粒径容易使Ber-SLN和TPGS-Ber-SLN滞留于肠道或绒毛间隙中<sup>[27-28]</sup>,影响了入血速度,因而使 $t_{max}$ 发生显著性延后。Ber-SLN和TPGS-Ber-SLN的 $t_{1/2}$ 也发生显著性延长,有助于维持血药浓度,增加岩白菜素的生物利用度。Ber-SLN和TPGS-Ber-SLN的 $C_{max}$ 分别极显著性提高至2.63倍和3.91倍,说明2种SLN均有效促进了药物吸收。Ber-SLN和TPGS-Ber-SLN口服吸收生物利用度的提高,可能是由于SLN对药物的包裹作用降低了岩白菜素在肠道降解,提高了岩白菜素的稳定性;纳米药物增加了与胃肠道接触面积;提高了岩白菜素累积溶出度;处方中脂质成分可打开肠壁紧密连接,增强药物渗透<sup>[12]</sup>;纳米药物可经细胞间、淋巴转运等方式进入血液循环<sup>[29-30]</sup>,最终显著促进了药物吸收。

另外,TPGS-Ber-SLN的 $C_{max}$ 和生物利用度与Ber-SLN相比具有显著性差异( $P<0.05$ ),可能是由于TPGS-Ber-SLN处方中TPGS抑制了P-糖蛋白活性,减少了岩白菜素外排作用<sup>[15]</sup>,因而生物利用度提高幅度更大。

本研究制备的TPGS-Ber-SLN口服相对生物利用度提高至5.34倍,比已报道的固体分散体(提高至1.48倍)<sup>[7]</sup>、磷脂复合物(提高至439%)<sup>[4]</sup>及磷脂复合物固体分散体(202.46%)<sup>[31]</sup>改善幅度更大。

后续将研究进一步对TPGS-Ber-SLN药效学、毒理学等进行评价,为TPGS-Ber-SLN提供更为全面的研究资料。另外,只采用TPGS来制备SLN是否具有更高的包封率或生物利用度有待进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 刘斌,谭成玉,池晓会,等.岩白菜素的研究进展[J].西北药学杂志,2015,30(5):660-662.
- [2] 裴少萌.岩白菜素的提取、衍生化与生物活性研究[D].西安:陕西科技大学,2009.
- [3] 李凤,周丹,秦瑄,等.岩白菜素理化性质的研究[J].中国药学杂志,2009,44(2):92-95.
- [4] Qin X, Yang Y, Fan T T, et al. Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of bergerin-phospholipid complex [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(1): 127-136.
- [5] 秦瑄.岩白菜素的生物药剂学和药代动力学基础研究[D].成都:四川大学,2007.
- [6] 吴秀稳,温然,王娜,等.岩白菜素在MDCK-MDR1细胞模型中的跨膜转运机制[J].中国药理学通报,2022,38(11):1698-1704.
- [7] Fang Y, Niu HD, Guo YY, et al. Preparation, optimization and bioavailability studies of the bergerin solid dispersion pellets [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 73: 103379.
- [8] 陈伶俐,晏亦林,罗燕娜,等.Box-Behnken实验设计法优化岩白菜素自微乳剂处方的研究[J].中药新药与临床药理,2017,28(4):528-533.
- [9] 李君霞,曹亚蕊,王金涛,等.延胡索乙素磷脂复合物及其固体分散体、油制剂、纳米混悬剂的制备及药理学研究[J].中草药,2022,53(14):4307-4316.
- [10] 黄苏莉,吴贻明,包瑞,等.基于TPGs表面修饰的雷公藤甲素固体脂质纳米粒的制备与质量评价[J].药物评价研究,2020,43(7):1283-1288.
- [11] 侯文书,张丹参,张力,等.PEG修饰姜黄素固体脂质纳米粒的制备、表征及溶出特征[J].中草药,2019,50(8):1927-1934.
- [12] Dattani S, Li X L, Lampa C, et al. A comparative study on micelles, liposomes and solid lipid nanoparticles for paclitaxel delivery [J]. *Int J Pharm*, 2023, 631: 122464.
- [13] 苏日娜,刘腾飞,朱秀梅,等.基于TPGS的纳米递药系统在逆转P-糖蛋白介导肿瘤多药耐药中的应用[J].药科学报,2018,53(11):1797-1807.
- [14] Guo Y Y, Luo J, Tan S W, et al. The applications of vitamin E TPGS in drug delivery [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 49(2): 175-186.
- [15] Cho H J, Park J W, Yoon I S, et al. Surface-modified solid

- lipid nanoparticles for oral delivery of docetaxel: Enhanced intestinal absorption and lymphatic uptake [J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 495-504.
- [16] Vieira R, Severino P, Nalone L A, *et al.* Sucupira oil-loaded nanostructured lipid carriers (NLC): Lipid screening, factorial design, release profile, and cytotoxicity [J]. *Molecules*, 2020, 25(3): 685.
- [17] Patel M, Mundada V, Sawant K. Enhanced intestinal absorption of asenapine maleate by fabricating solid lipid nanoparticles using TPGS: Elucidation of transport mechanism, permeability across Caco-2 cell line and *in vivo* pharmacokinetic studies [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 144-153.
- [18] 郜娜, 范明松, 杨庆宇, 等. 二氢杨梅素磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备、表征及药动学研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4060-4067.
- [19] 陈春燕, 徐萍, 袁弘. 口服聚乙二醇修饰固体脂质纳米粒的组织分布及抗肿瘤药效学研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(5): 586-592.
- [20] 万俊芳. 利格列汀自乳化释药系统的制备与大鼠体内药动学研究 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2022, 39(10): 1183-1188.
- [21] 周开, 张佩琛, 郝海军, 等. 蒙花苷磷脂复合物固体脂质纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2020, 42(6): 1401-1405.
- [22] 赵小义, 冯华, 朱钰叶. 洛匹那韦混合胶束的制备与大鼠口服生物利用度研究 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2022, 39(7): 773-779.
- [23] 卢慧芳, 刘艳美, 王荷香, 等. 穿心莲内酯甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸纳米粒处方优化及体外释药考察 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(19): 2034-2039.
- [24] 尹元元, 耿燕娜, 范明松. Box-Behnken 设计-效应面法优化延胡索乙素聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方和体外释药行为研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(22): 6806-6815.
- [25] 田焯, 吴明媛. 生物制品冻干保护方法研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2018, 13(1): 73-76.
- [26] Khalil N M, do Nascimento T C, Casa D M, *et al.* Pharmacokinetics of curcumin-loaded PLGA and PLGA-PEG blend nanoparticles after oral administration in rats [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 101: 353-360.
- [27] 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 大鼠体内口服药动学研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(1): 60-70.
- [28] 毛艳婷, 陶兴茹, 张胜男, 等. 漆黄素纳米混悬剂和冻干粉末的制备及体外评价 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(4): 393-398.
- [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学研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(23): 7361-7371.
- [30] 杨志欣, 王闻文, 卞士嘉, 等. 苦参总生物碱固体脂质纳米粒的制备工艺研究 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(3): 517-523.
- [31] Gao H, Wei Y, Xi L, *et al.* Evaluation of intestinal absorption and bioavailability of berberine-phospholipid complex solid dispersion in rats [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2018, 19(4): 1720-1729.

[责任编辑 郑礼胜]