

• 药剂与工艺 •

聚乙二醇修饰高良姜素纳米结构脂质载体处方优化及口服药动学评价

周 敬¹, 郑宝玉¹, 李阳杰¹, 张国民^{2*}

1. 郑州工业应用技术学院药学与化学工程学院, 河南 郑州 451150

2. 上海市中药研究所 药学部, 上海 201401

摘要: 目的 优化聚乙二醇修饰高良姜素纳米结构脂质载体 (pegylated galangin nanostructured lipid carriers, PEG-Gal-NLCs) 处方, 并进行体外释药行为和体内药动学评价。方法 采用乳化法制备 PEG-Gal-NLCs。Box-Behnken 设计-效应面法 (Box Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 筛选 PEG-Gal-NLCs 最优处方, 测定包封率、载药量、粒径及 ζ 电位。将 PEG-Gal-NLCs 混悬液制备成冻干粉, X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 法分析高良姜素在 PEG-Gal-NLCs 冻干粉中的存在形式。考察 PEG-Gal-NLCs 冻干粉在模拟胃肠液中的释药行为, 并对释药模型进行拟合。SD 大鼠按 50 mg/kg 剂量 ig 后采血, HPLC 法测定血药浓度, 计算主要药动学参数及相对生物利用度。结果 PEG-Gal-NLCs 最佳处方为聚乙二醇-单硬脂酸酯 (PEG₂₀₀₀-SA) 占载体的质量分数为 16%、载体与药物比例为 13.5:1、固-液脂质比例为 3.6:1。PEG-Gal-NLCs 的包封率为 (92.75±1.38)%, 载药量为 (6.44±0.23)%, 平均粒径为 (181.05±8.62) nm, ζ 电位为 (-30.71±1.56) mV。XRPD 分析结果表明, 高良姜素在 PEG-Gal-NLCs 冻干粉中以无定形态存在。PEG-Gal-NLCs 冻干粉在模拟胃肠液中体外释药具有缓释特征, 释药过程均符合 Weibull 模型。PEG-Gal-NLCs 的半衰期 ($t_{1/2}$) 增加至 (4.82±0.93) h, 血药浓度 (C_{max}) 增加至 (1.43±0.42) μ g/mL, 口服相对生物利用度提高至 4.28 倍。结论 PEG-Gal-NLCs 显著增加了高良姜素口服吸收。

关键词: 高良姜素; 纳米结构脂质载体; Box-Behnken 设计-效应面法; 冻干粉; Weibull 模型; 药动学; 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)14-4455-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.006

Formulation optimization of pegylated galangin nanostructured lipid carriers and oral pharmacokinetics evaluation

ZHOU Jing¹, ZHENG Bao-yu¹, LI Yang-jie¹, ZHANG Guo-min²

1. Pharmacy and Chemical Engineering College, Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451150, China

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

Abstract: Objective To optimize prescriptions of pegylated galangin nanostructured lipid carriers (PEG-Gal-NLCs), and carry out drug release behavior *in vitro* and oral pharmacokinetics *in vivo* evaluation. **Methods** Emulsification method was employed to prepare PEG-Gal-NLCs. Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) was used to investigate the optimal prescriptions of PEG-Gal-NLCs. Entrapment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential of PEG-Gal-NLCs were determined. Lyophilized powder of PEG-Gal-NLCs was prepared. The existence of Gal in PEG-Gal-NLCs lyophilized powder was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD). *In vitro* release behavior of PEG-Gal-NLCs lyophilized powder in simulate gastrointestinal fluid was investigated, and the release model was fitted. SD rats were administered intragastrically at a dose of 50 mg/kg and blood samples were collected. Plasma concentrations were determined by HPLC, and main pharmacokinetic parameters and relative bioavailability were calculated. **Results** Optimal formulation of PEG-Gal-NLCs: content of PEG₂₀₀₀-SA in carriers was 16%, ratio of carriers to drug was

收稿日期: 2023-02-14

基金项目: 国家“重大新药创制”(2018ZX09201009-002-09); 教育部产学研合作协同育人项目(202102028026); 教育部产学研合作协同育人项目(202101021046)

作者简介: 周 敬(1987—), 女, 实验师, 从事药物制剂研究。Tel: (0371)62632593 E-mail: 721314410@qq.com

*通信作者: 张国民(1963—), 男, 硕士, 教授级高级工程师, 从事中药新型给药系统研究。Tel: (021)51620418 E-mail: zguomin63@126.com

13.5:1, and solid to liquid lipid ratio was 3.6:1. Envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were (92.75 ± 1.38)%, (6.44 ± 0.23)%, (181.05 ± 8.62) nm and (-30.71 ± 1.56) mV, respectively. Gal existed as an amorphous state in PEG-Gal-NLCs lyophilized powder. The drug release *in vitro* has obvious sustained-release characteristics in simulate gastrointestinal fluid, and the release process conformed to the Weibull model. The $t_{1/2}$ of PEG-Gal-NLCs was increased to (4.82 ± 0.93) h, C_{max} was enhanced to (1.43 ± 0.42) $\mu\text{g/mL}$ and oral relative bioavailability was increased to 4.28-fold. **Conclusion** PEG-Gal-NLCs can promote oral absorption of Gal effectively.

Key words: galangin; nanostructured lipid carriers; Box-Behnken design-response surface methodology; lyophilized powder; Weibull model; pharmacokinetics; bioavailability

高良姜素 (galangin, Gal) 属于黄酮类化合物, 可从姜科山姜属植物高良姜 *Alpinia officinarum* Hance 根茎及蜂胶中提取得到^[1], 具有抗肿瘤、抗骨质疏松、降血糖、调血脂、抗糖尿病心肌病变等活性^[1-3]。本课题组测得高良姜素在 25 °C 水中及不同 pH 值介质中的溶解度均小于 1 $\mu\text{g/mL}$, 油水分配系数为 3.1~3.4, 易受胃肠道 pH 值及各种酶降解影响^[4-5], 体内稳定性差, 口服吸收生物利用度仅为 (7.6 ± 2.1) %^[5], 限制了临床使用。目前, 高良姜素有自微乳^[6]、脂质体^[7]、纳米乳^[8]等新型制剂报道, 但自微乳和纳米乳处方中包含大量的表面活性剂, 存在一定的安全隐患, 脂质体处方中的磷脂在肠液中稳定性较差^[9], 容易导致脂质体中药物泄露, 可能影响被包裹药物的口服吸收。

纳米结构脂质载体 (nanostructured lipid carriers, NLCs) 系联合采用固态和液态脂质作为载体而制得的一种纳米制剂, 包封率、载药量、稳定性明显优于固体脂质纳米粒 (仅采用固态脂质)^[10-11], 但由于高黏弹性的胃肠道黏膜的阻挡作用, NLCs 难以顺利进入体循环, 因而限制了生物利用度的提高幅度。据报道, NLCs 经聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰后可提高其表面亲水性及胃肠道黏膜的穿透能力、保持完整纳米结构、延长体内循环时间等, 从而进一步提高生物利用度^[12-13]。聚乙二醇-单硬脂酸酯 (PEG₂₀₀₀-SA) 价格低廉, 安全性高, 故本研究使用 PEG₂₀₀₀-SA 作为修饰材料制备聚乙二醇修饰高良姜素纳米结构脂质载体 (pegylated gallerythrine nanostructured lipid carriers, PEG-Gal-NLCs), 采用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化处方工艺, 并对其冻干工艺、模拟胃肠液中的释药情况及口服药动学行为等进行研究, 为高良姜素制剂研究提供实验参考。

1 仪器与材料

PWN125DZH 型电子天平, 美国 OHAUS 公司;

1100 型高效液相色谱仪 (HPLC), 美国 Agilent 公司; HJ-6A 型多头恒温磁力搅拌器, 金坛市精达仪器制造有限公司; PRD-S-027HDHT 型超声仪, 深圳市普瑞登科技有限公司; FD-1C-50 型真空冷冻干燥机, 上海豫明仪器有限公司; Nano-ZS90 型粒度分析仪, 英国马尔文公司; JEM-2100 透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; HC-3514 型高速离心机, 长沙湘智离心机仪器有限公司; DW-40 型超低温冰箱, 沧州鑫兴试验仪器有限公司; RT61212 型溶出仪, 深圳市锐拓仪器设备有限公司; UGC-12MF 型氮吹仪, 北京优晟联合科技有限公司。

高良姜素对照品, 批号 110807-201915, 质量分数 98.6%, 中国食品药品检定研究院; 高良姜素原料药, 批号 20201120, 质量分数 98.0%, 武汉欣欣佳丽生物科技有限公司; 漆黄素, 批号 k295520, 西安开来生物工程有限公司; 单硬脂酸甘油酯, 批号 F2009064, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; PEG₂₀₀₀-SA, 批号 20210813, 西亚化学科技有限公司; 油酸 (批号 C14175087)、十二烷基磺酸钠 (SDS, 批号 20201024), 上海麦克林生化科技有限公司; 乳糖, 药用, 批号 20190823, 北京艾普迪医药科技有限公司; 甘露醇, 药用, 批号 200612, 上海华茂药业有限公司; 泊洛沙姆 188, 批号 20180622, 西安晋湘药用辅料有限公司; 模拟胃液 (批号 20211022)、模拟肠液 (批号 20210914), 东莞信恒科技有限公司。

SD 大鼠, 雌雄兼用, 体质量为 (200 ± 20) g, 购自河南省实验动物中心, 许可证号: SCXK (豫) 2020-0001, 购时周龄为 6 周。所有动物实验遵循郑州工业应用技术学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 HPLC 法测定 PEG-Gal-NLCs 中高良姜素含量

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Waters C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 柱温为 35 °C; 流动相为甲醇-0.1%

甲酸水溶液 (65 : 35); 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 282 nm。理论塔板数以高良姜素计不低于 8000。

2.1.2 线性关系考察 精密称取高良姜素对照品 18.80 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), 放置至室温后加入甲醇稀释至刻度, 即得质量浓度为 188 μg/mL 高良姜素对照品储备液。以流动相作为稀释液, 稀释成质量浓度 9.400、4.700、2.350、1.880、0.940、0.047 μg/mL 一系列高良姜素对照品溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件测定。以高良姜素的峰面积 (A) 对其质量浓度 (C) 作线性回归, 得标准曲线方程 $A = 13.578 2 C + 0.105 2$, $r = 0.999 8$, 实验结果表明, 高良姜素线性范围为 0.047~9.400 μg/mL。

2.1.3 PEG-Gal-NLCs 供试品溶液的制备 精密取 PEG-Gal-NLCs 混悬液 1 mL 至 100 mL 量瓶中, 加入约 80 mL 甲醇超声 1 min (超声功率为 250 W), 放置 20 min 后加入流动相稀释定容, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得 PEG-Gal-NLCs 供试品溶液。

2.1.4 专属性考察 取空白辅料、高良姜素对照品 (质量浓度 2.35 μg/mL) 和 PEG-Gal-NLCs 样品溶液分别进样, 色谱图见图 1, 实验结果表明辅料未干扰高良姜素色谱峰, 专属性较高。

2.1.5 精密度考察 取 PEG-Gal-NLCs 供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件连续测定 6 次, 计算得高良姜素峰面积的 RSD 为 0.40%, 实验结果表明

精密度良好。

2.1.6 稳定性考察 取供试品溶液置于室温 (温度 25 °C、湿度 55%), 分别于 0、4、8、12、16、24 h 取样, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积, 计算得高良姜素浓度的 RSD 为 0.96%, 实验结果表明供试品溶液稳定性良好。

2.1.7 重复性考察 取同一份 PEG-Gal-NLCs 混悬液, 按“2.1.3”项下方法平行处理 6 份, 按“2.1.1”项下色谱条件测定峰面积, 计算得高良姜素质量浓度 RSD 为 1.25%, 实验结果表明重复性良好。

2.1.8 加样回收率考察 分别精密量取 0.5 mL 的 PEG-Gal-NLCs 混悬液 9 份, 置于 100 mL 量瓶中, 分为低、中、高 3 组, 每组各 3 份。分别加入高良姜素对照品储备液 (质量浓度为 188 μg/mL) 0.5、1.0、1.5 mL, 后续按“2.1.3”项下方法处理, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 计算得高良姜素的平均加样回收率分别为 99.60%, RSD 为 1.68%, 实验结果表明该法准确度较高。

2.2 PEG-Gal-NLCs 的制备工艺^[3]

高良姜素投药量为 20 mg, 另取处方量的单硬脂酸甘油酯、油酸和 PEG₂₀₀₀-SA 置于圆底烧瓶, 加入无水乙醇 10 mL, 置于 75 °C 水浴加热磁力搅拌至溶解澄清 (转速为 800 r/min), 得有机相。配制一定质量分数的泊洛沙姆 188 水溶液 50 mL, 置于 75 °C 水浴加热磁力搅拌溶解 (转速为 800 r/min), 得水相。将有机相滴至水相, 并搅拌 1 h, 于一定功率下超声一定时间 (间隔 2 s、工作 3 s)。于 -8 °C 冰箱中放置 10 min, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 加入蒸馏水稀释至 50 mL, 即得 PEG-Gal-NLCs 混悬液。同法制备 Gal-NLCs (不加 PEG₂₀₀₀-SA)

2.3 包封率、载药量、粒径及 ζ 电位的测定

按照“2.1.3”项下方法制备 PEG-Gal-NLCs 供试品溶液, 并进样测定高良姜素总量 ($m_{总}$)。精密量取 1 mL 的 PEG-Gal-NLCs 混悬液至超滤管中 (截留相对分子质量 8000~14 000), 10 000 r/min 离心 (离心半径 8.6 cm) 30 min, 测定续滤液中游离高良姜素的量 ($m_{游离}$)。精密取 1 mL 的 PEG-Gal-NLCs 混悬液至西林瓶中, -40 °C 条件下预冻 2 d, 立即置于冷阱温度为 -30 °C 的冷冻干燥仪中冻干 (不加冻干保护剂), 精密称定质量 ($W_{总}$), 计算包封率和载药量。

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

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

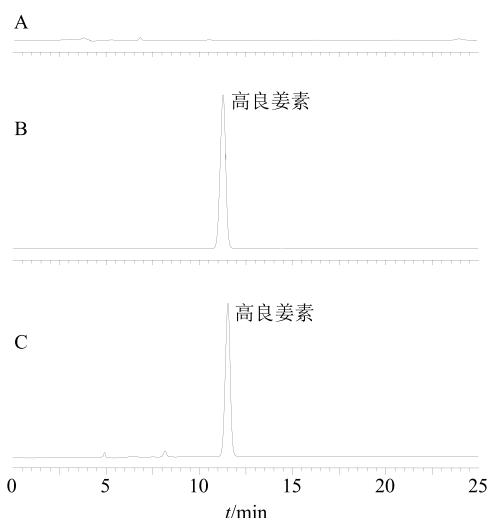


图 1 空白辅料 (A)、高良姜素对照品 (B) 和 PEG-Gal-NLCs 样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of blank excipients (A), galangin reference substance (B) and PEG-Gal-NLCs sample (C)

精密量取 PEG-Gal-NLCs 混悬液 0.1 mL，加入 5 mL 蒸馏水稀释，摇匀，于粒度分析仪分别测定粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 及 ζ 电位，每份样品测试 3 次，取均值。

2.4 单因素考察 PEG-Gal-NLCs 处方工艺

2.4.1 PEG₂₀₀₀-SA 占载体总量质量分数的考察 载体总量代表 PEG₂₀₀₀-SA、单硬脂酸甘油酯和油酸的总量。高良姜素投药量为 20 mg，载体与药物比例为 15 : 1，固-液脂质比例为 3 : 1，泊洛沙姆质量分数为 0.8%，超声功率 250 W，超声时间 10 min 的条件下分别考察 PEG₂₀₀₀-SA 质量分数对 PEG-Gal-NLCs 包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 1。随着 PEG₂₀₀₀-SA 质量分数逐渐升高 PEG-Gal-NLCs 包封率和载药量均呈现先增加后下降情况，说明处方中加入适量的 PEG₂₀₀₀-SA 利于包载药物，但粒径总体呈增大趋势。实验结果表明，PEG₂₀₀₀-SA 质量分数对 PEG-Gal-NLCs 影响较大，后续需对 PEG₂₀₀₀-SA 质量分数 10%~30% 继续优化。

2.4.2 载体与药物比例的考察 高良姜素投药量为 20 mg，固-液脂质比例为 3 : 1，PEG₂₀₀₀-SA 占载体总量质量分数为 20%，泊洛沙姆质量分数为 0.8%，超声功率 250 W，超声时间 10 min 条件下分别考察载体与药物比例对 PEG-Gal-NLCs 包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 2。随着载体用量的增加

表 1 PEG 2000-SA 质量分数的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Investigation of content of PEG 2000-SA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PEG ₂₀₀₀ -SA 质量分数/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0	76.16 ± 1.36	4.68 ± 0.10	223.44 ± 18.92
10	77.82 ± 0.98	4.78 ± 0.08	221.64 ± 15.36
20	81.11 ± 1.14	4.95 ± 0.14	230.81 ± 14.02
30	78.03 ± 1.62	4.72 ± 0.16	269.56 ± 17.66
40	70.56 ± 1.58	4.23 ± 0.12	285.82 ± 20.38

表 2 载体与药物比例的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Investigation of carrier to drug ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

载体与药物比例	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
5 : 1	56.33 ± 0.92	9.00 ± 0.36	172.18 ± 9.63
10 : 1	67.82 ± 1.11	5.98 ± 0.17	176.67 ± 8.44
15 : 1	80.24 ± 1.35	5.07 ± 0.20	184.40 ± 9.15
20 : 1	88.79 ± 1.62	4.28 ± 0.14	227.84 ± 10.36
25 : 1	90.59 ± 1.69	3.54 ± 0.12	263.93 ± 13.87

PEG-Gal-NLCs 包封率呈增加趋势，而载药量呈下降趋势。PEG-Gal-NLCs 粒径随着载体用量增加而增大，可能是由于载体用量增加时体系黏度增大所致^[10]。实验结果表明载体与药物比例对 PEG-Gal-NLCs 各个指标影响较大，后续选择比例区间 10 : 1~20 : 1 进行优化。

2.4.3 固-液脂质比例的考察 高良姜素投药量为 20 mg，载体与药物比例为 15 : 1，PEG₂₀₀₀-SA 占载体总量质量分数为 20%，泊洛沙姆质量分数为 0.8%，超声功率 250 W，超声时间 10 min 的条件下分别考察固-液脂质比例对 PEG-Gal-NLCs 包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 3。当不加液态脂质时 PEG-Gal-NLCs 包封率和载药量均相对较低，因此，处方中加入一定量的液态脂质是必要的。随着固态脂质比例的增加 PEG-Gal-NLCs 包封率和载药量均呈先增大后减小趋势，说明适量的液态脂质利于 PEG-Gal-NLCs 包载药物。但固-液脂质比例对粒径影响不大，粒径波动区间在 180~195 nm，后续选择固-液脂质比例区间 2 : 1~4 : 1 继续优化。

表 3 固-液脂质比例的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Investigation of solid to liquid lipid ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

固-液脂质比例	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
无液态脂质	68.15 ± 0.96	4.37 ± 0.26	192.08 ± 9.63
2 : 1	76.52 ± 1.53	4.74 ± 0.20	186.23 ± 8.44
3 : 1	89.14 ± 1.64	5.60 ± 0.18	189.47 ± 7.97
4 : 1	84.87 ± 1.30	5.19 ± 0.24	183.60 ± 8.82
5 : 1	78.59 ± 1.07	4.82 ± 0.19	194.72 ± 8.75

2.4.4 泊洛沙姆 188 质量分数的考察 高良姜素投药量为 20 mg，固-液脂质比例为 3 : 1，载体与药物比例为 15 : 1，PEG₂₀₀₀-SA 占载体总量质量分数为 20%，超声功率 250 W，超声时间 10 min 的条件下分别考察泊洛沙姆 188 质量分数对 PEG-Gal-NLCs 包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 4。随着泊洛沙姆 188 质量分数的增加 PEG-Gal-NLCs 包封率和载药量均呈先增大后下降趋势，可能是由于泊洛沙姆 188 质量分数不足时影响乳化效果，进而影响载药；质量分数过大时在增溶作用下使药物进入水相^[10]，导致包封率和载药量下降。随着泊洛沙姆 188 质量分数的增加粒径下降后趋稳，当泊洛沙姆 188 质量分数为 0.8% 时，PEG-Gal-NLCs 包封率、载药量和粒径均较为理想，故确定其质量分数为 0.8%。

表4 泊洛沙姆188质量分数的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Investigation of poloxamer 188 concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

泊洛沙姆188/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0.4	72.56 ± 1.08	4.39 ± 0.21	282.79 ± 25.96
0.6	79.31 ± 1.60	4.84 ± 0.18	242.26 ± 18.73
0.8	87.92 ± 1.44	5.62 ± 0.13	179.07 ± 9.67
1.0	84.45 ± 0.96	5.29 ± 0.20	176.69 ± 8.46
1.2	81.76 ± 1.35	4.92 ± 0.16	180.91 ± 9.11

2.4.5 超声功率考察 高良姜素投药量为 20 mg, 固-液脂质比例为 3 : 1, 载体与药物比例为 15 : 1, PEG₂₀₀₀-SA 质量分数为 20%, 泊洛沙姆 188 质量分数为 0.8%, 超声时间 10 min 条件下分别考察超声功率对 PEG-Gal-NLCs 包封率、载药量和粒径的影响, 结果见表 5。超声功率大于 250 W 时 PEG-Gal-NLCs 包封率和载药量均下降, 可能是过大的超声功率对 PEG-Gal-NLCs 产生了破坏作用, 导致药物泄露出去。随着超声功率的增加粒径先变小后增大, 可能是超声功率较小时提供的能力不足, 使粒径较大; 超声功率过大时导致 PEG-Gal-NLCs 发生融合、聚集, 使粒径增大。由于超声功率为 200 W 时 PEG-Gal-NLCs 包封率、载药量和粒径均较为理想, 故确定超声功率为 200 W。

表5 超声功率的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Investigation of ultrasonic power ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声功率/W	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
150	90.56 ± 1.16	5.72 ± 0.21	240.66 ± 13.64
200	92.37 ± 1.48	5.68 ± 0.16	180.51 ± 8.87
250	87.40 ± 0.95	5.43 ± 0.19	173.84 ± 7.92
300	82.78 ± 0.98	5.10 ± 0.13	206.92 ± 9.56

2.4.6 超声时间的考察 高良姜素投药量为 20 mg, 固-液脂质比例为 3 : 1, 载体与药物比例为 15 : 1, 固-液脂质比例为 3 : 1, PEG₂₀₀₀-SA 占载体总量质量分数为 20%, 泊洛沙姆 188 质量分数为 0.8%, 超声功率 200 W 为条件下分别考察超声时间对 PEG-Gal-NLCs 包封率、载药量和粒径的影响, 结果见表 6。超声时间低于 10 min 时包封率和载药量无显著性差异 ($P > 0.05$), 但超声时间大于 12 min 时包封率和载药量出现下降情况, 可能是过长的超声时间对 PEG-Gal-NLCs 产生了破坏作用。超声时间为 10 min 时 PEG-Gal-NLCs 包封率、载药量和粒径均相对理想, 故确定超声时间为 10 min。

表6 超声时间的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Investigation of ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
6	90.17 ± 1.52	5.55 ± 0.16	259.10 ± 15.58
8	90.85 ± 1.30	5.63 ± 0.14	186.74 ± 9.12
10	91.22 ± 1.19	5.69 ± 0.20	180.88 ± 7.86
12	87.03 ± 1.01	5.36 ± 0.19	206.47 ± 9.43
14	83.96 ± 1.24	4.99 ± 0.15	230.26 ± 10.67

2.5 BBD-RSM 优化 PEG-Gal-NLCs 处方

2.5.1 优化方案 单因素实验发现 PEG₂₀₀₀-SA 质量分数 (X_1)、载体与药物比例 (X_2) 和固-液脂质比例 (X_3) 对 PEG-Gal-NLCs 包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 和粒径 (Y_3) 的影响较大, 结合前期预实验各个因素水平见表 7。

为获得同时具有理想包封率、载药量和粒径的 PEG-Gal-NLCs 处方, 故将这 3 个指标转换为总评归一值 (overall desirability, OD), 并作为 BBD-RSM 的响应指标。OD 值计算过程为包封率 (d_1) 和载药量 (d_2) 公式为 $[d = (M_i - M_{min}) / (M_{max} - M_{min})]$, M_i 为测量值, M_{max} 和 M_{min} 为最大值和最小值; 粒径 (d_3) 公式为 $[d = (M_{max} - M_i) / (M_{max} - M_{min})]$; OD =

表7 BBD-RSM 实验优化 PEG-Gal-NLCs 处方的因素水平及试验结果 ($n = 3$)

Table 7 Factor level and test results of BBD-RSM experiment for optimizing PEG-Gal-NLCs prescription ($n = 3$)

序号	X_1 /%	X_2	X_3	Y_1 /%	Y_2 /%	Y_3 /nm	OD
1	30 (+1)	10 : 1 (-1)	3 : 1 (0)	63.82	5.42	246.15	0.000
2	30	20 : 1 (+1)	3 : 1	80.64	3.77	240.36	0.136
3	10 (-1)	20 : 1	3 : 1	68.89	4.06	231.48	0.212
4	30	15 : 1 (0)	4 : 1 (+1)	72.25	4.38	210.08	0.396
5	20 (0)	10 : 1	4 : 1	76.56	5.89	180.37	0.793
6	20	15 : 1	3 : 1	90.23	5.63	186.25	0.916
7	30	15 : 1	2 : 1 (-1)	61.61	3.72	222.93	0.000
8	20	10 : 1	2 : 1	64.83	3.99	231.54	0.150
9	10	15 : 1	2 : 1	63.65	3.67	214.63	0.000
10	20	15 : 1	3 : 1	88.41	5.42	192.34	0.833
11	20	20 : 1	2 : 1	81.72	3.93	231.34	0.261
12	20	15 : 1	3 : 1	91.65	5.53	180.60	0.943
13	20	15 : 1	3 : 1	90.67	5.55	185.18	0.913
14	10	15 : 1	4 : 1	80.42	4.89	192.77	0.654
15	20	20 : 1	4 : 1	89.47	4.31	230.31	0.401
16	20	15 : 1	3 : 1	89.92	5.64	188.62	0.902
17	10	10 : 1	3 : 1	64.35	5.52	180.75	0.423

$(d_1d_2d_3)^{1/3}$, 结果见表7, 表中包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2) 和粒径 (Y_3) 的RSD值均小于1.93%。

2.5.2 模型及方差分析 采用 Design-Expert V8.0.6 软件对所得实验数据进行拟合, 得OD二次多元回归方程为 $Y_1=0.900-0.095X_1-0.044X_2+0.230X_3+0.087X_1X_2-0.064X_1X_3-0.130X_2X_3-0.240X_1^2-0.290X_2^2-0.220X_3^2$, $R^2=0.9864$, $R_{adj}^2=0.9688$ 。方差分析见表8, 模型P值<0.0001(具极显著性差异); 失拟项P值=0.0990($P>0.05$), 说明未知因素干扰可忽略不计, 表明建立的数学模型具有较强的指导意义, 可用于优化PEG-Gal-NLCs处方工艺。对二次多项式各项系数进行统计检验, 发现 X_1 、 X_3 、 X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 均具有极显著差异($P<0.01$)。

2.5.3 效应面评估与预测 分别固定PEG₂₀₀₀-SA质量分数(X_1)、载体与药物比例(X_2)和固-液脂质比例(X_3)因素中之一(分别取中间值), 绘制因变量 X_1 、 X_2 、 X_3 对自变量OD的三维曲面图, 结果见图2。固定某一因素不变时, OD值均随着另外2因素用量或比例增加呈现先增大后下降趋势。

设置OD值为最大值, PEG-Gal-NLCs最佳处方

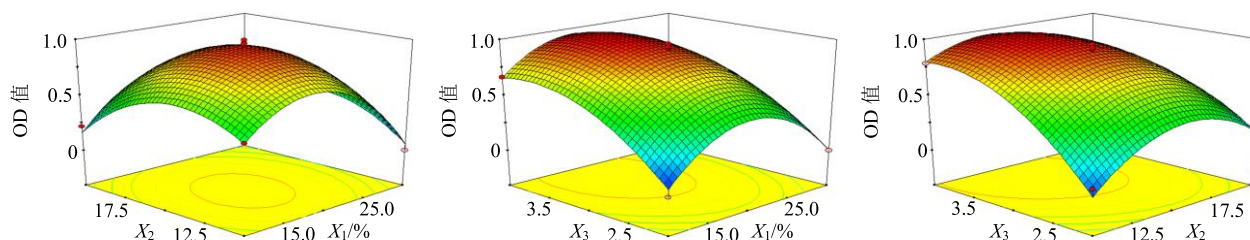


图2 自变量与因变量的效应面图

Fig. 2 Response surface of independent variable and dependent variable

2.6 PEG-Gal-NLCs最佳处方调整及验证

为便于实际操作, 将PEG-Gal-NLCs最佳处方略作调整(调整幅度均小于±5%): PEG₂₀₀₀-SA占载体的质量分数为16%、载体与药物比例为13.5:1、固-液脂质比例为3.6:1。制备3批PEG-Gal-NLCs, 测定包封率、载药量和粒径, 并计算实际测定值与模型预测值的偏差[偏差=(实际值-预测值)/预测值], 结果见表9。

结果显示, 各个指标偏差均小于±5%, 说明采用BBD-RSM优化PEG-Gal-NLCs处方时具有精确度高、准确度强的特点。测得PEG-Gal-NLCs粒径PDI值为0.083±0.014(小于0.3), 说明粒径分布均匀, 结果见图3-A。测得PEG-Gal-NLCs的ζ电位为(-30.71±1.56)mV, 结果见图3-B。

为PEG₂₀₀₀-SA占载体的质量分数为15.94%、载体与药物比例为13.51:1、固-液脂质比例为3.62:1, OD值为0.968。模型预测该最佳处方的包封率为92.96%, 载药量为6.41%, 粒径为176.64nm。

表8 方差分析结果

Table 8 Results of variance analysis

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	2.050	9	0.231	56.26	<0.0001
X_1	0.072	1	0.072	17.73	0.0040
X_2	0.016	1	0.016	3.92	0.0883
X_3	0.420	1	0.420	104.08	<0.0001
X_1X_2	0.030	1	0.030	7.47	0.0292
X_1X_3	0.017	1	0.017	4.11	0.0821
X_2X_3	0.063	1	0.063	15.61	0.0055
X_1^2	0.760	1	0.760	186.86	<0.0001
X_2^2	0.341	1	0.341	84.67	<0.0001
X_3^2	0.192	1	0.192	48.24	0.0002
残差	0.028	7	4.041×10^{-3}		
失拟项	0.021	3	7.165×10^{-3}	4.22	0.0990
纯偏差	6.792×10^{-3}	4	1.698×10^{-3}		
总离差	2.071	16			

表9 验证试验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

指标	实测值	预测值	偏差/%
包封率/%	92.75 ± 1.38	92.96	-0.22
载药量/%	6.44 ± 0.23	6.35	-1.40
粒径/nm	181.05 ± 8.62	176.64	2.50

2.7 TEM观察PEG-Gal-NLCs外观形态

精密取PEG-Gal-NLCs混悬液0.1mL, 加入5mL蒸馏水稀释, 摇匀, 滴至铜网上, 1.5%磷钨酸钠负染, 自然晾干。置于TEM下, 放大至14000倍即可观察到PEG-Gal-NLCs微观形态, 结果见图4。PEG-Gal-NLCs微观为类球形, 无黏连。

2.8 冻干粉的制备及冻干保护剂的选择

PEG-Gal-NLCs混悬液稳定性较差, 不适于长

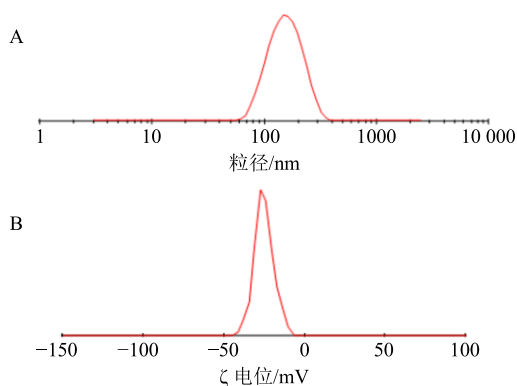


图3 PEG-Gal-NLCs的粒径分布(A)和ζ电位(B)

Fig. 3 Particle distribution (A) and ζ potential (B) of PEG-Gal-NLCs

期存放,故将其制备成冻干粉末以增加储存稳定性。取 PEG-Gal-NLCs 混悬液,加入处方量的冻干保护剂(甘露醇、乳糖、蔗糖或不同保护剂的等量混合物),涡旋 10 s 混匀,分装至西林瓶中。-40 °C 条件下预冻 2 d,立即置于冷阱温度为-30 °C 的冷冻干燥仪中,抽真空,冷冻干燥 2 d 后取出即得 PEG-Gal-NLCs 冻干粉末。

取适量冻干粉末加入蒸馏水复溶,按照“2.3”

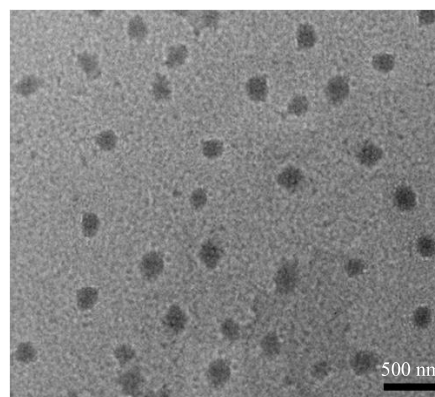


图4 PEG-Gal-NLCs的TEM图

Fig. 4 TEM picture of PEG-Gal-NLCs

项下分别测定包封率和粒径,结果分别见表 10。由于采用质量分数为 4%乳糖和甘露醇混合物(用量比为 1:1)制得的冻干粉复溶后包封率相对较大,且粒径相对较小,故选之作为 PEG-Gal-NLCs 冻干保护剂。PEG-Gal-NLCs 混悬液、PEG-Gal-NLCs 冻干粉和蒸馏水复溶后样品外观见图 5。

2.9 PEG-Gal-NLCs 冻干粉晶型分析

X 射线粉末衍射法(XRPD)扫描条件:扫描范

表 10 冻干保护剂对 PEG-Gal-NLCs 冻干粉复溶后包封率和平均粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Effect of freeze-drying protective agents on entrapment efficiency and average particle size of PEG-Gal-NLCs freeze-dried powder redissolved ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冻干保护剂	包封率/%				平均粒径/nm			
	2%	3%	4%	5%	2%	3%	4%	5%
甘露醇	65.23±1.24	68.71±0.92	72.98±1.27	71.10±1.53	354.61±30.74	243.50±26.81	232.07±16.85	248.90±18.56
乳糖	68.54±1.30	73.04±1.03	75.91±0.90	76.14±1.07	334.08±33.36	264.87±26.23	235.89±16.42	240.73±14.62
蔗糖	65.87±0.96	71.32±1.44	73.20±0.96	82.95±1.34	400.76±36.16	359.04±30.81	298.75±24.74	251.69±18.11
甘露醇+乳糖(1:1)	72.88±1.15	80.63±0.95	88.56±1.36	85.24±1.22	311.42±28.90	258.11±19.64	214.56±11.82	226.73±14.28
甘露醇+蔗糖(1:1)	71.14±0.94	77.98±0.87	84.61±1.52	82.03±0.97	335.49±30.78	296.54±26.07	238.74±14.28	245.41±13.76

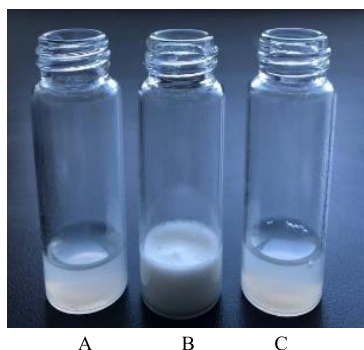


图5 PEG-Gal-NLCs 混悬液(A)、冻干粉(B)和复溶后(C)外观

Fig. 5 Appearance of PEG-Gal-NLCs suspension (A), lyophilized powder (B) and redissolution (C)

围(2θ)为 3°~45°,扫描速度为 4°/min, Cu-Kα 靶。取高良姜素原料药、空白辅料(不含药物,辅料比例同 PEG-Gal-NLCs 冻干粉)、物理混合物(高良姜素与空白辅料比例同 PEG-Gal-NLCs 冻干粉)和 PEG-Gal-NLCs 冻干粉约 15 mg,玻璃片压制平整后扫描,结果见图 6。高良姜素在 5.4°、7.7°、10.6°、12.3°、14.0°、25.3°等处结晶峰强度相对较强(图 6-A),在物理混合物的 XRPD 图谱中仍可观察到高良姜素在 5.4°、7.7°、14.0°特征晶型峰(图 6-C),尽管强度下降,但峰位未变,说明高良姜素存在状态未变,其他高良姜素特征晶型峰被辅料掩蔽。在 PEG-Gal-NLCs 冻干粉的 XRPD 图谱中所有高良姜

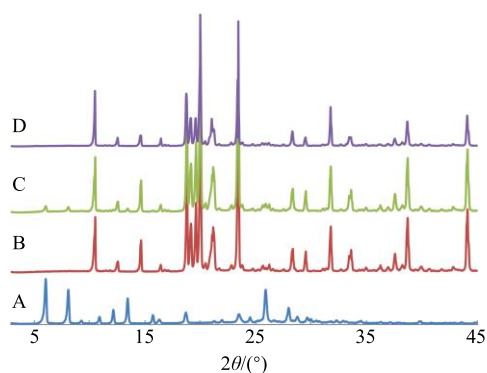


图6 高良姜素原料药 (A)、空白辅料 (B)、物理混合物 (C) 和 PEG-Gal-NLCs 冻干粉 (D) 的 XRPD 结果

Fig. 6 XRPD results of Gal (A), blank excipients (B), physical mixture (C) and PEG-Gal-NLCs lyophilized powder (D)

素特征晶型峰消失不见 (图 6-D), 证明高良姜素以无定形形式存在于 PEG-Gal-NLCs 冻干粉中。

2.10 PEG-Gal-NLCs 冻干粉稳定性考察

分别考察 PEG-Gal-NLCs 混悬液及其冻干粉置于恒温恒湿箱中 (温度为 30 °C, 湿度为 60%), 于 0、3、6、9、12、18、30、60、90 d 取样, 考察包封率和粒径变化情况, 结果见表 11。PEG-Gal-NLCs 混悬液在第 18 d 包封率降至 20% 以下, 第 9 天粒径超过 1000 nm, 说明 PEG-Gal-NLCs 混悬液稳定性较差。PEG-Gal-NLCs 冻干粉的包封率和粒径在 90 d 内波动较小, 90 d 时包封率大于 85%, 粒径小于 250 nm, 可见将 PEG-Gal-NLCs 混悬液制备成冻干粉后稳定性得到明显改善。

2.11 体外释药考察

2.11.1 滤膜吸附考察 取 PEG-Gal-NLCs 在模拟

表 11 PEG-Gal-NLCs 冻干粉稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 11 Stability study of PEG-Gal-NLCs lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	PEG-Gal-NLCs 混悬液		PEG-Gal-NLCs 冻干粉	
	包封率/%	粒径/nm	包封率/%	粒径/nm
0	92.75 ± 1.15	181.05 ± 9.45	88.93 ± 1.03	234.16 ± 12.36
3	84.80 ± 1.30	368.72 ± 35.90	89.16 ± 0.94	228.84 ± 15.10
6	62.63 ± 1.98	784.23 ± 86.71	88.06 ± 1.54	236.23 ± 9.89
9	46.81 ± 2.04	1 092.64 ± 102.43	87.89 ± 1.36	230.96 ± 11.36
12	35.97 ± 2.16	/	88.58 ± 0.89	226.47 ± 13.47
18	17.92 ± 0.98	/	88.79 ± 1.25	236.91 ± 8.99
30	/	/	88.13 ± 0.91	233.75 ± 12.14
60	/	/	87.57 ± 1.22	240.67 ± 10.06
90	/	/	86.16 ± 1.65	242.06 ± 9.92

胃液 (含 2% SDS) 溶出试验中 0.25、8.00、18.00 h 样品, 分别于 10 000 r/min 离心 (离心半径 8.6 cm) 30 min, 取上清液测定高良姜素含量 ($W_{\text{过滤前}}$)。取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜 (弃去 0.5 mL 初滤液), 测定高良姜素含量 ($W_{\text{过滤后}}$), 计算滤膜吸附率。同法考察 PEG-Gal-NLCs 在模拟肠液 (含 2% SDS) 溶出试验 0.25、8.00、18.00 h 样品的滤膜吸附率。结果显示, 在模拟胃液 (含 2% SDS) 为释药介质时滤膜平均吸附率为 0.34%, RSD 为 0.18%。在模拟肠液 (含 2% SDS) 为释药介质时滤膜平均吸附率为 0.16%, RSD 为 0.09%。可见, 用滤膜滤过样品对释药情况考察基本无影响。

$$\text{吸附率} = 1 - (W_{\text{过滤后}} / W_{\text{过滤前}})$$

2.11.2 释药试验方案及结果 10 mg 高良姜素在 1000 mL 模拟胃肠液 (含 2% SDS) 可达漏槽条件, 采用透析法考察高良姜素及 PEG-Gal-NLCs 冻干粉在模拟胃肠液释药情况。取 PEG-Gal-NLCs 冻干粉适量 (高良姜素含有量为 10 mg), 加入 5 mL 空白介质配制混悬液, 转移至活化透析袋中 (截留相对分子质量为 8000~12 000)。采用 1000 mL 模拟胃液 (含 2% SDS) 作为释药介质, 转速为 75 r/min, 介质温度为 37 °C, 于 0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50、3.00、4.00、6.00、8.00、12.00、18.00 h 取样 5 mL, 立即补进 5 mL 空白介质, 样品过 0.45 μm 微孔滤膜 (弃去 1 mL 初滤液), 进行测定, 同法考察 PEG-Gal-NLCs 冻干粉在模拟肠液 (含 2.0% SDS) 释药情况, 结果见图 7。高良姜素原料药在模拟胃液及模拟肠液累积释放率均不足 20%, 可能是由于高良姜素原料药颗粒较大、疏水性强有关, 导致溶出受限^[4]。PEG-Gal-NLCs 冻干粉在模拟胃液及模拟肠液累积释放率分别为 70.54% 和 61.09%, 远高于原料药的累积释放率。体外释药模型拟合结果见表 12,

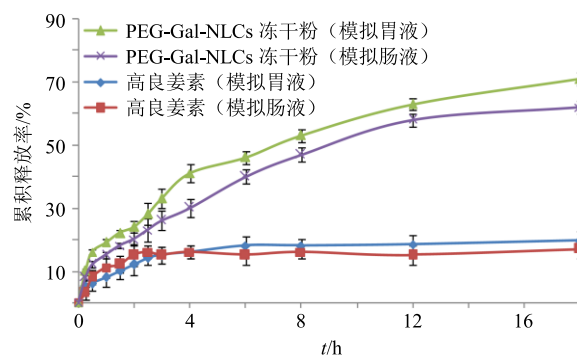


图7 体外释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

表 12 PEG-Gal-NLCs 冻干粉在模拟胃、肠液中药物高良姜素的释放模型和相关系数

Table 12 Release model and correlation coefficient of PEG-Gal-NLCs lyophilized powder in simulated gastric and intestinal fluids for galangin

介质种类	模型	拟合方程	R^2
模拟胃液	一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.013 2 t-0.350 8$	0.944 6
	Higuchi 模型	$M_t/M_\infty=0.064 0 t^{1/2}+0.206 7$	0.957 2
	Weibull 模型	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.401 3 \ln t-1.440 4$	0.988 7
模拟肠液	一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.010 3 t-0.288 4$	0.917 1
	Higuchi 模型	$M_t/M_\infty=0.058 2 t^{1/2}+0.166 2$	0.948 3
	Weibull 模型	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.415 4 \ln t-1.696 6$	0.982 4

M_t 为 t 时间累积释放率; t 为取样时间; M_∞ 为 ∞ 时累积释放率; M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率

M_t is accumulative drug-release at time t , t is sampling time, M_∞ is accumulative drug-release at time ∞ , M_t/M_∞ is accumulative release rate at time t

表明 PEG-Gal-NLCs 释药过程与 Weibull 模型拟合程度最高。

2.12 药动学研究

2.12.1 实验方案 取高良姜素、Gal-NLCs 和 PEG-Gal-NLCs 冻干粉适量, 加入 0.5% 的 CMC-Na 水溶液配制灌胃液。将禁食过夜的 SD 大鼠 18 只随机分为 3 组, 用灌胃针按 50 mg/kg 剂量分别 ig 给药。高良姜素分别于 0.167、0.500、0.750、1.000、1.500、2.000、3.000、4.500、6.000 h 取血, Gal-NLCs 组增加 8 h 取血点, PEG-Gal-NLCs 组增加 8 h 和 12 h 取血点。分别眼眶后静脉丛取血约 0.25 mL 至肝素化离心管中, 震荡混匀, 3000 r/min 离心 3 min, 取上层淡黄色血浆冷冻保存。

2.12.2 血浆样品的处理^[7] 采用乙腈配制质量浓度为 1000 ng/mL 漆黄素对照品溶液, 作为内标溶液。精密量取 100 μ L 血浆样品和 50 μ L 内标溶液至离心管中, 精密加入乙腈 1 mL, 密封涡旋 1 min 沉降蛋白。置于高速离心机中, 8000 r/min 离心 (离心半径 8.6 cm) 8 min, 取上清液至另一空白离心管, 37 $^{\circ}$ C 氮气吹干得残渣, 精密加入乙腈 100 μ L 复溶即得血浆样品。

2.12.3 标准曲线 取 SD 大鼠乙醚麻醉后心脏取血至肝素化离心管中, 震荡混匀, 3000 r/min 离心 3 min, 取出空白血浆。采用空白血浆配制 2.00、1.00、0.50、0.25、0.10、0.05 μ g/mL 的一系列高良姜素血浆对照品溶液, 按“2.12.2”项下方法操作, 取上清液按“2.1.1”项下色谱条件测定高良姜素和内标漆黄素峰面积, 以两者峰面积比值 (Y) 对高良姜素质量浓度 (X) 作线性回归, 得方程 $Y=2.055 X-0.182$, $r=0.997 2$, 表明高良姜素血药浓度线性范围为 0.05~2.00 μ g/mL。

2.12.4 专属性考察 色谱条件与“2.1.1”项色谱条件一致。取空白血浆、血浆+对照品 (高良姜素质量浓度为 0.25 μ g/mL) 和 Gal-NLCs ig 给药 8 h 的血浆样品分别进 HPLC, 结果见图 8, 表明血浆内源性物质未对高良姜素和漆黄素色谱峰产生干扰, 专属性较高。

2.12.5 日内精密度和日间精密度考察 取质量浓度为 0.05 (低)、0.50 (中) 和 2.00 (高) μ g/mL 的

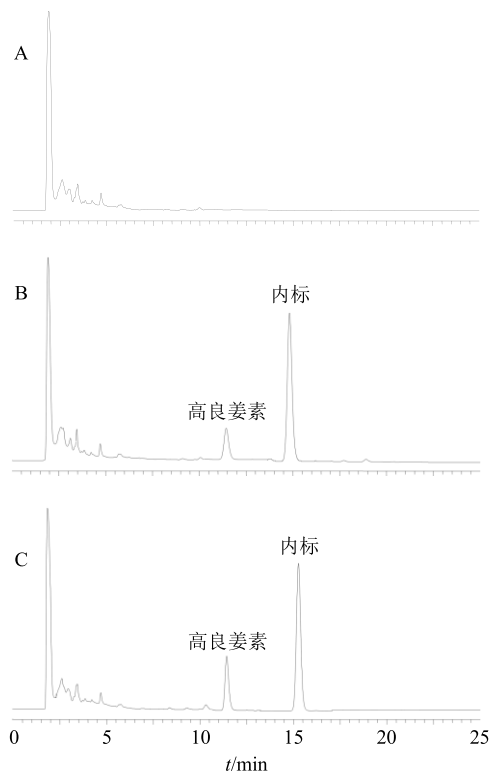


图 8 空白血浆 (A)、血浆样品 (B) 和血浆+对照品溶液 (C) 的 HPLC 图

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

血浆对照品溶液，分别连续进样6次，测定高良姜素和内标漆黄素峰面积，计算得高良姜素含量RSD分别为5.10%、4.67%、7.28%，表明日内精密度良好；各浓度连续测定6d，每天1次，计算得高良姜素含量RSD分别为8.17%、9.52%、7.40%，表明日间精密度良好。

2.12.6 稳定性考察 取高良姜素浓度为0.25 μg/mL 血浆样品，于0、2、4、8、12、24 h 分别测定高良姜素和内标漆黄素峰面积，计算得高良姜素含量RSD值为7.69%，表明血浆样品稳定性良好。

2.12.7 准确度考察 取0.05 μg/mL(低)、0.5 μg/mL(中)和2 μg/mL(高)高良姜素血浆对照品溶液分别进样测定高良姜素和内标漆黄素峰面积，按“2.12.3”项标准曲线方程计算测得浓度，并与实际浓度对比计算回收率。结果显示平均回收率96.64%，RSD为5.85%，表明准确度较高。

2.12.8 定量限和检测限考察 取质量浓度为0.05 μg/mL的高良姜素血浆对照品溶液，逐步稀释后进样测定。以信噪比为10时质量浓度作为定量限，试验结果显示高良姜素定量限为15 ng/mL。

2.12.9 药动力学结果 高良姜素、Gal-NLCs及PEG-Gal-NLCs血药浓度曲线见图9。DAS 2.0软件中二室模型计算主要药动力学参数，结果见表13。Gal-NLCs的达峰时间(t_{max})、半衰期($t_{1/2}$)、达峰浓度(C_{max})、0~ t 药-时曲线下面积(AUC_{0-t})、0~ ∞ 药-时曲线下面积($AUC_{0-\infty}$)与高良姜素原料药相比均有显著性改变($P < 0.05$)，其中 $t_{1/2}$ 延长至(3.37 ± 0.78) h， C_{max} 和口服生物利用度分别提高至1.79倍和2.50倍。PEG-Gal-NLCs组主要药动力学参数发生了极显著性差异($P < 0.01$)， $t_{1/2}$ 延长至(4.82 ± 0.93) h， C_{max} 和口服生物利用度分别提高至2.47倍和4.28倍。与Gal-NLCs相比，PEG-Gal-NLCs的 t_{max} 无显

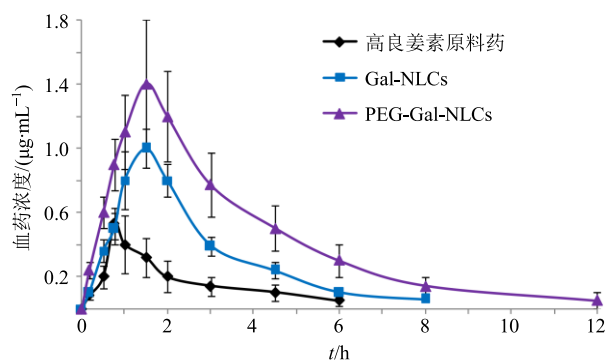


图9 药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

表13 主要药动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 13 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	高良姜素 原料药	Gal-NLCs	PEG-Gal- NLCs
t_{max}	h	0.73 ± 0.24	1.62 ± 0.53*	1.66 ± 0.58*
$t_{1/2}$	h	2.07 ± 0.63	3.37 ± 0.78*	4.82 ± 0.93**#
MRT	h	3.14 ± 0.89	5.57 ± 1.59*	7.40 ± 2.53**#
C_{max}	μg·mL ⁻¹	0.58 ± 0.15	1.04 ± 0.34*	1.43 ± 0.42**#
AUC_{0-t}	μg·h·mL ⁻¹	1.03 ± 0.30	2.58 ± 0.69*	4.41 ± 1.08**#
$AUC_{0-\infty}$	μg·h·mL ⁻¹	1.12 ± 0.34	2.73 ± 0.77*	4.75 ± 1.19**#

与高良姜素原料药相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Gal-NLCs 相比:

$P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Gal suspension; # $P < 0.05$ vs Gal-NLCs

著性差异，但 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 均具有显著性改变($P < 0.05$)，说明PEG-Gal-NLCs可进一步促进高良姜素体内吸收。

3 讨论

PEG₂₀₀₀-SA分子结构由PEG亲水性长链端和单硬脂酸酯亲脂端构成，亲脂端与脂质材料亲和性良好，可共同作为PEG-Gal-NLCs载体。PEG亲水性长链端位于PEG-Gal-NLCs表面，并向水相伸展，形成较大的空间位阻，从而改变了PEG-Gal-NLCs表面性质(赋予亲水性)及空间结构^[14-15]，利于阻止纳米粒聚集^[16]，提高稳定性。

单因素考察发现，适量的PEG₂₀₀₀-SA可增加PEG-Gal-NLCs包封率和载药量，可能是由于PEG长链有助于阻止PEG-Gal-NLCs表层或浅表层药物的泄露^[16]，利于包载药物。但PEG₂₀₀₀-SA用量过大时PEG长链之间的排斥作用可能会影响纳米载体的致密度^[17]，导致药物泄露，同时粒径增大，结合考察结果选择PEG₂₀₀₀-SA质量分数10%~30%进行优化。

载体与药物比例对PEG-Gal-NLCs各个指标也有较大影响，当载体比例较低时无法有效包裹药物，当载体比例过大时PEG-Gal-NLCs载药量下降，且粒径有变大趋势^[11]，故最终选择载体与药物比例为10:1~20:1进行优化。PEG-Gal-NLCs处方中含有固态和液态脂质，液态脂质的加入利于形成晶体缺陷结构^[11]，当固态脂质比例较高时不利于晶体缺陷结构的形成，包载药物能力下降，但固态脂质比例较低时制得的PEG-Gal-NLCs韧性较低，药物容易发生泄露，故选择固-液脂质比例为2:1~4:1进行优化。泊洛沙姆188质量分数对PEG-Gal-NLCs

各个指标也有较大影响,但影响趋势较为清晰,为减少BBD-RSM的实验次数,最终确定泊洛沙姆188质量分数为0.8%。

PEG-Gal-NLCs冻干粉在模拟胃肠液中释药情况均与Weibull模型拟合程度最高,说明其释药过程是双相动力学特征^[11],即包含快速释药期和缓慢释药期,表现出的缓释释药期可能是脂质材料本身对药物释放的阻滞作用,也可能与覆盖在纳米粒表面的PEG长链有关^[17],该长链可在PEG-Gal-NLCs表面形成一层水化膜,从而延缓了药物释放^[18-19]。PEG-Gal-NLCs口服相对生物利用度提高至4.28倍,可能是由于PEG-Gal-NLCs增加了药物释放度;纳米药物与胃肠道接触更充分,利于药物吸收^[9,20];PEG-Gal-NLCs对包裹于内部的药物提供了保护作用^[15],降低了降解几率,增加了吸收量,最终提高了高良姜素口服吸收生物利用度。

PEG-Gal-NLCs生物利用度改善程度高于Gal-NLCs,证明了进行PEG表面修饰是必要的,可能是由于PEG-Gal-NLCs的亲水性优于Gal-NLCs,使PEG-Gal-NLCs更易于克服胃肠道黏液层的快速清除或滞留而进入体循环,实现高效吸收^[12,15-16];PEG-Gal-NLCs表面PEG长链可增加NLCs体内稳定性及体循环时间^[15,21-25],增加吸收量,因而PEG-Gal-NLCs促吸收作用比Gal-NLCs更具优势。本研究完成了PEG-Gal-NLCs处方优化、冻干粉制备及药动学行为评价,为后续注射药动学、药效学、毒理学等评价奠定了基础^[26-28]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 陈昭,张靖年,胥爱丽,等.基于UHPLC-MS-MS大通量分析的蜂胶影响PXR/CYP3A4调控血脂质量标志物筛选和评价[J].中草药,2020,51(3):662-668.
 [2] 张旭光,尹航,陈峰,等.高良姜素药理活性的研究进展[J].中国现代中药,2016,18(11):1532-1536.
 [3] 李程,张惠文,容鹏飞.高良姜素对肝癌细胞抑制作用的机制[J].临床肝胆病杂志,2020,36(8):1862-1865.
 [4] 汪芙蓉.体外模拟消化对酚类化合物稳定性和抗氧化活性的影响[D].南昌:南昌大学,2020.
 [5] Ye W J, Sun W, Chen R J, et al. Pharmacokinetics in rat plasma and tissue distribution in mice of galangin determined by UHPLC-MS/MS [J]. *Acta Chromatogr*, 2019, 31(2): 120-125.
 [6] 张欣,陈曦文,卢昊,等.高良姜素自微乳大鼠在体肠吸收和体内药动学研究[J].中药新药与临床药理,

2021, 32(11): 1699-1704.
 [7] Yao H, Lu H, Zhang J, et al. Preparation of prolonged-circulating galangin-loaded liposomes and evaluation of antitumor efficacy *in vitro* and pharmacokinetics *in vivo* [J]. *J Nanomater*, 2019, 2019: 1-9.
 [8] 方杰,李颜伶,秦铭,等.高良姜素过饱和自纳米乳的制备及质量评价[J].中南药学,2022,20(8):1765-1772.
 [9] 刘玮琳,魏富强,韩剑众.脂质体在食品中的应用及体外消化研究进展[J].食品科学,2015,36(23):295-300.
 [10] 王小霞,张智强.鞣花酸纳米结构脂质载体处方优化和口服生物利用度研究[J].中草药,2021,52(13):3862-3871.
 [11] 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.
 [12] 张雅雯,尹丽娜,黄夏樱,等.PEG化脂质纳米粒促进积雪草酸口服吸收研究[J].中国中药杂志,2017,42(14):2784-2788.
 [13] Luan J J, Zhang D R, Hao L L, et al. Preparation, characterization and pharmacokinetics of Amoitone B-loaded long circulating nanostructured lipid carriers [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2014, 114: 255-260.
 [14] 孙艺丹,赵青,王锐利,等.正交设计联用星点设计-效应面法优化蒿甲醚长循环纳米结构脂质载体处方[J].沈阳药科大学学报,2015,32(1):7-13.
 [15] 李金明,林东海,田景振.咪喃二烯mPEG-PLGA纳米粒的制备及大鼠口服生物利用度[J].中国新药杂志,2015,24(14):1670-1674.
 [16] 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.
 [17] 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.
 [18] 秦欢,张兵,马喆,等.PEG修饰的紫草素纳米结构脂质载体的制备和体外评价[J].天津中医药大学学报,2021,40(5):647-652.
 [19] Poovi G, Damodharan N. Development of tamoxifen-loaded surface-modified nanostructured lipid carrier using experimental design: *in vitro* and *ex vivo* characterisation [J]. *IET Nanobiotechnol*, 2020, 14(4): 261-274.
 [20] 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.
 [21] 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.

- [22] Yao H, Lu H, Zhang J, *et al.* Preparation of prolonged-circulating galangin-loaded liposomes and evaluation of antitumor efficacy *in vitro* and pharmacokinetics *in vivo* [J]. *J Nanomater*, 2019, 2019: 1-9.
- [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] 董丹丹, 焦红军, 郝海军. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 779-788.
- [25] 戴江东, 李会鹏, 孙敏捷. 不同链长聚乙二醇修饰的香豆素 6 脂质纳米粒对口服吸收的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(3): 293-300.
- [26] 苏晓丹, 麦琬婷, 钟华帅, 等. Box-Behnken 设计-效应面法优化岩黄连碱纳米结构脂质载体处方工艺及体外药效评价 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7019-7028.
- [27] 陈聪慧, 张佩语. 双靶向共载紫杉醇及白藜芦醇纳米系统构建及其体外抗多药耐药肿瘤研究 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 395-402.
- [28] 李伟宏, 王风云. 白藜芦醇 mPEG-PLGA 纳米粒的制备及其体内药动学、抗肿瘤活性研究 [J]. 中成药, 2022, 44(11): 3409-3415.

[责任编辑 郑礼胜]