

以牛血清白蛋白为稳定剂制备紫檀芪聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒及口服药动力学研究

张春燕¹, 李燕红¹, 陈乾^{1,2*}, 蒋会哲³

1. 黄河科技学院, 河南 郑州 450063

2. 河南中医药大学, 河南 郑州 450001

3. 郑州铁路职业技术学院, 河南 郑州 450052

摘要: 目的 优化牛血清白蛋白修饰紫檀芪聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 纳米粒 (bovine serum albumin-modified pterostilbene PLGA nanoparticles, BSA-Pte-PLGA-NPs) 处方, 进行体外及体内评价。方法 纳米沉淀法制备 BSA-Pte-PLGA-NPs, 以包封率、载药量和粒径大小为评价指标, 单因素结合 Box-Behnken 效应面设计法筛选 BSA-Pte-PLGA-NPs 最优处方。采用乳糖作为冻干保护剂将 BSA-Pte-PLGA-NPs 制备成冻干粉, 并进行表征。SD 大鼠分为紫檀芪原料药组、物理混合物组和 BSA-Pte-PLGA-NPs 组, 按 40 mg/kg (以紫檀芪计) 剂量 ig 给药, 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 BSA-Pte-PLGA-NPs 最佳处方为 BSA 质量浓度为 19.0 mg/mL、载药比为 8.8:1、水相与有机相体积比为 8:1。BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率为 (86.69±1.81)%, 载药量为 (9.02±0.37)%, 粒径为 (176.10±8.12) nm。紫檀芪在 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉中以无定型形式存在。BSA-Pte-PLGA-NPs 在 pH 1.2 或 pH 7.4 磷酸盐缓冲液中体外释药过程均与 Weibull 模型拟合度最高。药动学结果显示, BSA-Pte-PLGA-NPs 达峰时间 (t_{max}) 延后至 (2.11±0.60) h, 半衰期 ($t_{1/2}$) 延长至 (4.82±0.89) h, 相对口服吸收生物利用度提高至 3.24 倍。结论 BSA-Pte-PLGA-NPs 可显著促进紫檀芪口服吸收, 值得进一步研究。

关键词: 紫檀芪; 牛血清白蛋白; PLGA 纳米粒; 纳米沉淀法; Box-Behnken 设计-效应面法; 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)14-4481-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.008

Preparation of pterostilbene PLGA nanoparticles with bovine serum albumin as stabilizer and oral pharmacokinetics study

ZHANG Chun-yan¹, LI Yan-hong¹, CHEN Qian^{1,2}, JIANG Hui-zhe³

1. Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450063, China

2. Henan University of Traditional Chinese medicine, Zhengzhou 450001, China

3. Zhengzhou Railway Vocational and Technical College, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To optimize the formulation of bovine serum albumin-modified pterostilbene PLGA nanoparticles (BSA-Pte-PLGA-NPs), and carry out *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Methods** Nanoprecipitation method was used to prepare BSA-Pte-PLGA-NPs. Envelopment efficiency, drug loading and particle size were used as evaluation index, single factor investigation method combined with Box-Behnken response surface design method was employed to investigate the optimal prescriptions of BSA-Pte-PLGA-NPs. BSA-Pte-PLGA-NPs were prepared into lyophilized powder using lactose as freeze-dried protector, and the optimal formulation was characterized. SD rats were divided into pterostilbene suspension group, physical mixture group and BSA-Pte-PLGA-NPs group, blood samples were collected after gastric administration at a dose of 40 mg/kg (pterostilbene). The plasma concentrations were determined, main pharmacokinetic parameters and relative bioavailability were also calculated. **Results** Optimal formulation of BSA-Pte-PLGA-NPs: BSA mass concentration was 19.0 mg/mL, carriers to drug ratio was 8.8:1, and volume ratio of water phase to organic phase

收稿日期: 2023-01-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82104833)

作者简介: 张春燕 (1976—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为临床药学。Tel: (0371)62867916 E-mail: zzzhchy1701@163.com

*通信作者: 陈乾 (1990—), 男, 博士, 主治医师, 研究方向为中医药。Tel: (0371)68951335 E-mail: 15201889539@163.com

was 8:1. Envelopment efficiency, drug loading and particle size of BSA-Pte-PLGA-NPs were $(86.69 \pm 1.81)\%$, $(9.02 \pm 0.37)\%$ and (176.10 ± 8.12) nm, respectively. Pterostilbene was existed as an amorphous form in lyophilized powder of BSA-Pte-PLGA-NPs. *In vitro* release of BSA-Pte-PLGA-NPs showed best conformed to Weibull model in pH 1.2 and pH 7.4 phosphate buffers. Pharmacokinetic results showed that t_{max} of BSA-Pte-PLGA-NPs was delayed to (2.11 ± 0.60) h, $t_{1/2}$ was prolonged to (4.82 ± 0.89) h and relative oral bioavailability was enhanced to 3.24 times. **Conclusion** BSA-Pte-PLGA-NPs can significantly promote the oral absorption of pterostilbene, which was worthy of further study.

Key words: pterostilbene; bovine serum albumin; PLGA nanoparticles; nanoprecipitation method; Box-Behnken design-response surface method; Weibull model; pharmacokinetic; bioavailability

紫檀芪是天然二苯乙烯类化合物, 主要存在于檀香、花生、蓝莓、浆果、葡萄等植物中, 具有抗肿瘤、抗菌、抗氧化、抗炎、调节糖脂代谢、抗纤维化等活性^[1-4], 人体安全用量达 250 mg/d^[5], 毒性很低, 因而具有较大的研究开发价值。紫檀芪在水中几乎不溶 (仅为 30 $\mu\text{g/mL}$ ^[6]), 导致药物难以溶出, 但紫檀芪脂溶性良好, 属于生物药剂学分类系统中 II 药物^[7], 进入胃肠道后易受到各种酶代谢影响^[8], 生物利用度仅为 11.9%^[9], 不利于疗效发挥及临床应用。目前紫檀芪纳米制剂研究有纳米乳^[10]、脂质纳米粒^[11]等报道。但纳米乳需用到大量的表面活性剂, 存在安全隐患; 纳米粒一般需加入一定量的稳定剂或表面活性剂 (如聚乙烯醇、聚维酮等) 来防止纳米粒子聚集^[12-13], 但这些稳定剂或表面活性剂不仅难以从机体内彻底清除, 对机体也存在一定毒性^[14]。为将纳米混悬液制备成冻干粉, 需加入大量的冻干保护剂, 最终导致纳米制剂的载药量很低, 这些缺陷是纳米制剂普遍存在的问题。

白蛋白作为一种天然乳化剂及稳定剂, 比传统的表面活性剂等更具安全性, 而且本身还是优良的冻干保护剂, 可极大减少辅料种类及用量, 因而在纳米制剂研究中的应用颇受重视, 可解决纳米制剂载药量低的问题^[15-16], 但目前鲜见采用白蛋白作为稳定剂制备纳米粒的报道。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 是一种安全、可生物降解的药用辅料, 被美国 FDA 批准用于医药及临床等研究, 将难溶性中药成分制备成 PLGA 纳米粒后可提高生物利用度及药效^[17-19]。本研究采用来源广泛的牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作为稳定剂制备牛血清白蛋白修饰的紫檀芪 PLGA 纳米粒 (bovine serum albumin-modified pterostilbene PLGA nanoparticles, BSA-Pte-PLGA-NPs)^[20-21], 单因素考察结合 Box-Behnken 设计-效应面法优化 BSA-Pte-PLGA-NPs 处方, 并制备成冻干粉。考察 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉的晶型、体

外释药情况及存放稳定性。以紫檀芪原料药为参考, 比较 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉体内药动学行为, 为紫檀芪新型制剂研发提供新思路。

1 仪器与材料

MSE125P-CE 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; Agilent 1100 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; FS-900N 型超声仪, 上海生析超声仪器有限公司; MYP11-2 型磁力搅拌器, 广州沪瑞明仪器有限公司; BD/BC-100KEMS 型超低温冰箱, 惠州市泰恒盛电器有限公司; Master-sizer 型粒度分析仪, 马尔文仪器公司; RC-6D 型溶出仪, 天津创兴电子设备制造股份有限公司; BMH 型真空冻干机, 北京博励设备有限公司; JSM-6360LV 型扫描电子显微镜 (SEM), 日本 JEOL 公司; LC-DCY-12SF 型氮吹仪, 上海力辰仪器科技有限公司。

紫檀芪对照品, 批号 C12799188, 质量分数 98%, 上海麦克林生化科技有限公司; 白藜芦醇 (批号 20200512, 质量分数 98.3%)、紫檀芪原料药 (批号 20201016, 质量分数 97%), 成都嘉叶生物科技有限公司; PLGA, 乳酸-羟基乙酸 (75:25), 相对分子质量为 38 000, 德国 Evonik Industries 公司; BSA, 批号 20201118, 上海蓝季生物科技有限公司; 乳糖, 批号 20190915, 上海康朗生物科技有限公司。

清洁级 SD 大鼠, 雌雄兼用, 体质量 (220 ± 20) g, 由河南省实验动物中心 [SCXK (豫) 2020-0001] 提供。所有动物实验遵循黄河科技学院有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R (减量化、再利用和再循环) 原则。

2 方法与结果

2.1 BSA-Pte-PLGA-NPs 制备^[11]

采用纳米沉淀法制备 BSA-Pte-PLGA-NPs。固定紫檀芪投药量为 30 mg, 加入处方量的 PLGA, 溶于 10 mL 有机溶剂 (无水乙醇-丙酮 1:1), 200 W 功率下超声 1 min 使之完全溶解, 得有机相。配制一定质量浓度、一定体积的 BSA 水溶液作为水

相。将水相和有机相一同置于 60 °C 水浴中，待恒温后将有机相缓慢滴加至水相中，800 r/min 磁力搅拌 40 min 以挥去有机溶剂，一定功率下超声一定时间（工作 2 s，间隔 2 s），立即置于 -10 °C 冰箱中固化 10 min。过 0.45 μm 微孔滤膜，即得 BSA-Pte-PLGA-NPs 混悬液。

同法制备不含紫檀芪的空白 BSA-PLGA-NPs 混悬液。

2.2 BSA-Pte-PLGA-NPs 中紫檀芪含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；柱温为 35 °C；流动相为甲醇-水 (55 : 45)；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长为 306 nm；进样体积为 10 μL。理论塔板数以紫檀芪峰计不低于 6500。

2.2.2 供试品溶液的配制 取 BSA-Pte-PLGA-NPs 混悬液 1 mL 置于 50 mL 量瓶中，加入 10 mL 有机溶剂（无水乙醇-丙酮 1 : 1）超声 5 min，静置至室温后加入乙醇稀释至刻度，即得 BSA-Pte-PLGA-NPs 供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的配制 精密称取紫檀芪对照品 10 mg 置于 100 mL 量瓶中，加入约 80 mL 甲醇超声至溶解澄清，放置至室温后加入甲醇稀释定容，即得 100 μg/mL 的紫檀芪对照品储备液。

2.2.4 线性关系考察 采用流动相稀释至紫檀芪质量浓度为 10.00、5.00、2.50、1.00、0.10、0.05 μg/mL，按“2.2.1”项下色谱条件测定各质量浓度的峰面积。以紫檀芪质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，进行线性回归，得线性回归方程为 $Y=16.3584X-0.4129$ ， $r=0.9998$ ，结果表明紫檀芪在 0.05 ~ 10.00 μg/mL 线性关系良好。

2.2.5 专属性考察 取空白 BSA-PLGA-NPs 供试品溶液、紫檀芪对照品溶液和 BSA-Pte-PLGA-NPs 供试品溶液进样，结果见图 1，辅料不干扰紫檀芪的色谱峰，专属性高。

2.2.6 重复性考察 取 BSA-Pte-PLGA-NPs 混悬液，按照“2.2.2”项下方法平行制备 6 份 BSA-Pte-PLGA-NPs 供试品溶液，测定结果显示紫檀芪质量浓度的 RSD 为 1.16%，试验表明重复性良好。

2.2.7 稳定性考察 取 BSA-Pte-PLGA-NPs 供试品溶液，于制备后 0、3、6、9、12、24 h 测定，结果显示紫檀芪峰面积的 RSD 值为 1.04%，表明供试品溶液至少在 24 h 稳定性良好。

2.2.8 精密度考察 取质量浓度为 0.05、2.50、10.00

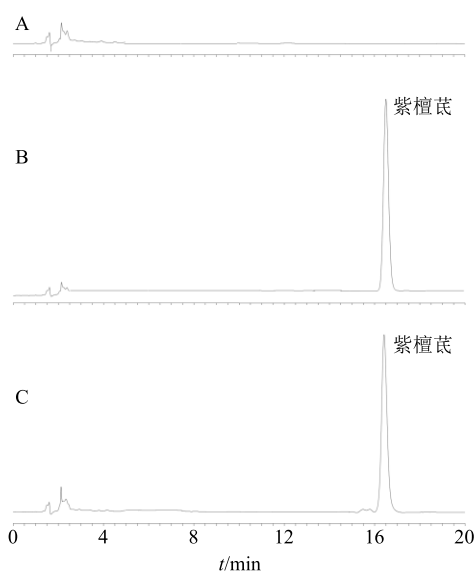


图1 空白样品 (A)、紫檀芪对照品 (B) 和 BSA-Pte-PLGA-NPs 样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of blank sample (A), pterostilbene reference substance (B) and BSA-Pte-PLGA-NPs sample (C)

μg/mL 的紫檀芪对照品溶液，分别测定 6 次，结果显示，紫檀芪峰面积的 RSD 分别为 0.28%、0.65%、0.23%，表明仪器精密度良好。

2.2.9 加样回收率考察 精密取 9 份 0.5 mL 的 BSA-Pte-PLGA-NPs 混悬液，分别置于 50 mL 量瓶中，分为低、中、高 3 组，每组各 3 份，分别加入标示量 80%、100%、120% 的紫檀芪对照品溶液。按照“2.2.2”项下方法操作制备供试品溶液，进样测定紫檀芪含量并计算回收率。结果显示，紫檀芪的平均加样回收率为 99.89%，RSD 为 1.43%，表明该法准确度较高。

2.3 BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位测定

精密取 BSA-Pte-PLGA-NPs 混悬液 1 mL 至离心管中，置于温度为 4 °C 的高速离心机中，12 000 r/min 离心（离心半径 8.6 cm）20 min，取上清液进样测定游离紫檀芪质量浓度，计算含量 ($m_{\text{游离}}$)。取 BSA-Pte-PLGA-NPs 混悬液 1 mL 置于 50 mL 量瓶中，按“2.2.2”项下方法处理后测定紫檀芪质量浓度，计算紫檀芪总含量 ($m_{\text{总}}$)。计算 BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率和载药量。

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

$$\text{载药量} = (m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_0$$

m_0 代表 $m_{\text{总}}$ 与载体的总量

取 BSA-Pte-PLGA-NPs 混悬液适量，用蒸馏水

稀释 40 倍, 取适量于粒度分析仪上分别测定其粒径和 ζ 电位, 各样品平行测试 3 次, 计算平均值。

2.4 BSA-Pte-PLGA-NPs 单因素考察

2.4.1 BSA 质量浓度的考察 紫檀芪投药量为 30 mg, 载药比为 8 : 1, 水相与有机相体积比为 8 : 1, 超声功率为 250 W, 超声时间为 12 min, 考察 BSA 质量浓度对 BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率、载药量、粒径、 ζ 电位的影响, 结果见表 1。随着 BSA 质量浓度的增加, BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率和载药量先增加后下降, 可能是由于适当质量浓度的 BSA 增加了乳化效果, 附着在纳米粒表面形成了较厚的保护层, 阻止了紫檀芪泄露。但 BSA 质量浓度过大时在增溶作用下紫檀芪进入水相, 因而降低了包封率及载药量。粒径随着 BSA 质量浓度的增加呈现下降后增加, 可能是由于 BSA 质量浓度较小时乳化效果不佳, 因而粒径较大, 但 BSA 质量浓度过大时泡沫较多, 影响了乳化效果, 导致 BSA-Pte-PLGA-NPs 粒径变大。 ζ 电位绝对值随着 BSA 质量浓度的增加呈增加后趋稳情况。根据考察结果, 选择 BSA 质量浓度优化范围为 15.0~25.0 mg/mL。

表 1 BSA 质量浓度的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Investigation of mass concentration of BSA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

BSA 质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
5.0	56.87±1.36	6.02±0.17	418.43±37.65	-24.62±1.33
10.0	64.41±1.58	7.03±0.18	302.68±24.42	-26.17±0.96
15.0	67.90±1.12	7.59±0.20	220.50±7.79	-29.60±1.08
20.0	75.63±0.99	8.25±0.17	172.17±8.02	-30.26±1.19
25.0	71.45±1.63	7.68±0.14	186.23±9.06	-31.02±1.45
30.0	66.62±1.97	7.39±0.16	194.66±10.24	-30.78±1.10

2.4.2 载药比的考察 紫檀芪投药量为 30 mg, BSA 质量浓度为 20.0 mg/mL, 水相与有机相体积比为 8 : 1, 超声功率为 250 W, 超声时间为 12 min, 考察载药比对 BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率、载药量、粒径、 ζ 电位的影响, 结果见表 2。随着载药比的增加 BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率先增加后趋于稳定, 但载药量先增加后下降; 而 BSA-Pte-PLGA-NPs 的粒径呈逐渐增大趋势, 可能是载药比越大导致体系的黏度较大, 且过多的 BSA 附着在纳米粒表面从而导致形成的纳米粒粒径较大。 ζ 电位绝对值随着载药比的增加呈增加后趋稳情况。根据考察结果, 选

表 2 载药比的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

载药比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
5 : 1	46.71±1.53	6.08±0.17	169.44±5.86	-27.55±1.73
6 : 1	68.24±1.86	7.96±0.25	171.18±6.54	-29.92±1.06
8 : 1	75.46±2.01	8.24±0.23	172.93±6.91	-30.12±1.28
10 : 1	74.96±1.42	6.75±0.19	183.75±7.68	-31.54±0.97
12 : 1	75.71±1.80	5.88±0.18	201.38±7.90	-30.04±1.64

择载药比优化范围为 6 : 1~10 : 1。

2.4.3 水相与有机相体积比考察 紫檀芪投药量为 30 mg, 载药比为 8 : 1, BSA 质量浓度为 20.0 mg/mL, 超声功率为 250 W, 超声时间为 12 min, 考察载药比对 BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率、载药量、粒径、 ζ 电位的影响, 结果见表 3。随着水相体积的增加, BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率和载药量先增大后减小, 可能是水相体积较小时影响乳化效果, 不利于 PLGA 载药; 但水相体积过大时在 BSA 增溶作用下紫檀芪进入水相, 从而也会影响载药。水相与有机相体积比大于 8 : 1 后 BSA-Pte-PLGA-NPs 粒径小于 200 nm, ζ 电位绝对值大于 30 mV。综合考虑, 选择水相与有机相体积比 6 : 1~10 : 1 进行优化。

2.4.4 超声时间的影响 紫檀芪投药量为 30 mg, 载药比为 8 : 1, BSA 质量浓度为 20.0 mg/mL, 水相与有机相体积比为 8 : 1, 超声功率为 250 W, 分别考察超声时间对 BSA-Pte-PLGA-NPs 的影响, 结果见表 4。可能由于较长的超声时间对 BSA-Pte-PLGA-NPs 有破坏作用, 超声时间超过 12 min 时包封率和载药量均出现下降情况, 平均粒径开始变大, ζ 电位绝对值出现下降情况。综合考虑, 选择超声时间为 10 min, 此时 BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率大于 80%, 粒径小于 200 nm, ζ 电位绝对值大于 30 mV。

2.4.5 超声功率的影响 紫檀芪投药量为 30 mg,

表 3 水相与有机相体积比考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Investigation of volume ratio of water phase to organic phase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水相与有机 相体积比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
4 : 1	56.71±1.26	6.97±0.25	281.43±26.45	-26.91±0.99
6 : 1	69.85±2.07	7.71±0.18	226.50±20.71	-28.94±1.11
8 : 1	75.98±1.84	8.54±0.26	179.11±10.46	-31.10±1.22
10 : 1	67.63±2.12	7.46±0.20	170.24±8.26	-32.03±1.64
12 : 1	60.38±1.74	6.69±0.23	166.40±7.88	-31.65±1.37

表4 超声时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
5	78.34±1.50	8.74±0.18	281.94±12.73	-29.62±1.10
8	79.00±1.08	8.85±0.14	206.33±9.14	-30.76±1.34
10	80.86±2.01	8.82±0.25	177.91±8.12	-31.94±0.96
12	76.16±1.36	8.46±0.22	181.50±9.07	-30.85±1.07
15	72.56±2.14	8.11±0.17	226.46±11.32	-27.43±1.28

载药比为 8 : 1, BSA 质量浓度为 20.0 mg/mL, 水相与有机相体积比为 8 : 1, 超声功率时间为 10 min, 分别考察超声功率对 BSA-Pte-PLGA-NPs 的影响, 结果见表 5。超声功率较高时影响 BSA-Pte-PLGA-NPs 的包封率、载药量及粒径, 可能由于太大的超声功率破坏纳米结构, 导致药物泄露, 而且较高的体系温度, 使形成的纳米粒子因表面自由能过大反而容易发生聚集、融合, 导致粒径变大, 且 ζ 电位绝对值下降。由于超声功率为 200 W 时 BSA-Pte-PLGA-NPs 具有相对较高的包封率和载药量, 粒径相对较小且 ζ 电位绝对值大于 30 mV, 因而确定超声功率为 200 W。

表5 超声功率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

超声功率/W	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
150	81.90±1.67	9.20±0.26	256.03±11.99	-26.13±1.42
200	83.86±2.07	9.28±0.19	184.44±8.06	-30.92±1.06
250	80.13±1.74	8.76±0.22	180.03±7.64	-32.68±1.84
300	75.76±1.96	8.31±0.18	216.56±9.27	-30.22±1.07
350	64.52±1.33	3.39±0.19	206.79±10.23	-27.17±0.98

表6 Box-Behnken 试验因素水平、实验设计及结果

Table 6 Box-Behnken experimental factor level, experimental design and results

序号	X_1 /(mg·mL ⁻¹)	X_2	X_3	Y_1 /%	Y_2 /%	Y_3 /nm	OD	序号	X_1 /(mg·mL ⁻¹)	X_2	X_3	Y_1 /%	Y_2 /%	Y_3 /nm	OD
1	25.0 (+1)	8 : 1 (0)	6 : 1 (-1)	72.27	7.93	238.82	0.235	10	25.0	6 : 1	8 : 1	70.01	9.48	173.19	0.589
2	20.0 (0)	6 : 1 (-1)	6 : 1	70.41	8.89	241.75	0.220	11	15.0	8 : 1	6 : 1	77.72	8.55	246.23	0.000
3	20.0	8 : 1	8 : 1 (0)	83.64	8.63	175.09	0.849	12	15.0	10 : 1	8 : 1	79.65	9.03	209.04	0.673
4	20.0	10 : 1 (+1)	10 : 1 (+1)	79.18	7.12	177.14	0.367	13	25.0	8 : 1	10 : 1	67.05	8.03	168.76	0.272
5	25.0	10 : 1	8 : 1	77.58	6.93	169.36	0.000	14	20.0	8 : 1	8 : 1	83.80	9.29	176.43	0.944
6	20.0	8 : 1	8 : 1	83.26	9.26	170.84	0.955	15	20.0	8 : 1	8 : 1	80.63	8.99	181.86	0.822
7	15.0 (-1)	8 : 1	10 : 1	69.06	8.34	206.64	0.358	16	20.0	10 : 1	6 : 1	66.57	9.21	205.92	0.207
8	15.0	6 : 1	8 : 1	72.18	7.01	225.83	0.141	17	20.0	6 : 1	10 : 1	66.24	9.42	183.73	0.000
9	20.0	8 : 1	8 : 1	81.26	9.17	182.08	0.856								

2.5 Box-Behnken 响应面法优化处方

2.5.1 BSA-Pte-PLGA-NPs 优化方案

单因素实验结果显示, BSA 质量浓度、载药比和水相与有机相体积比对 BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率、载药量和粒径影响较大。故将 BSA 质量浓度、载药比和水相与有机相体积比分别作为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 , 包封率、载药量和粒径大小分别作为响应值 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 。采用 Box-Behnken 响应面法对 BSA-Pte-PLGA-NPs 处方进行优化, 为得到具有理想的包封率、载药量及粒径的 BSA-Pte-PLGA-NPs 处方工艺, 将这 3 个指标作归一化处理得出总评归一值(overall desirability, OD)。OD 值计算过程为①粒径(d_1) 越小越好 $d_{min} = (M_{max} - M_i) / (M_{max} - M_{min})$; 包封率(d_2)和载药量(d_3) 越大越好, $d_{max} = (M_i - M_{min}) / (M_{max} - M_{min})$, 公式中 M_{max} 和 M_{min} 分别为试验组中最大值和最小值, M_i 为该试验组中实际值。②各指标归一值求算几何平均数, 得 $OD = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k}$, k 为指标数 3。Box-Behnken 试验因素水平、实验设计及结果见表 6。

2.5.2 模型拟合、分析与预测

使用 Design Expert V8.0.6 软件对所得数据拟合, 得 OD 二次多元回归方程为 $OD = 0.890 - 9.095 \times 10^{-3} X_1 + 0.037 X_2 + 0.042 X_3 - 0.028 X_1 X_2 - 0.079 X_1 X_3 + 0.095 X_2 X_3 - 0.264 X_1^2 - 0.028 X_2^2 - 0.422 X_3^2$ 。模型的 P 值 = 0.000 4 < 0.01, 说明模型具有显著性意义; 失拟项 $P = 0.079 4 > 0.05$, 因此未知因素对模型干扰较小。另外模型的 $R^2 = 0.959 5$, $R_{adj}^2 = 0.907 4$, 两者均大于 0.9, 所以采用此数学模型对 BSA-Pte-PLGA-NPs 处方研究具有较高可信度和指导意义。

方差检验结果见表 7, 可见 X_1 、 $X_1 X_2$ 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 均显著或极显著差异 ($P < 0.05$ 、0.01)。固定 BSA 质量浓度 (X_1)、载药比 (X_2) 和水相与有机相

表 7 方差分析

Table 7 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	1.860	9	0.210	18.41	0.000 4	X_1^2	0.281	1	0.281	25.07	0.001 6
X_1	0.058	1	0.058	5.13	0.039 2	X_2^2	0.321	1	0.321	28.65	0.001 1
X_2	0.011	1	0.011	1.00	0.350 7	X_3^2	0.710	1	0.710	63.13	<0.000 1
X_3	0.014	1	0.014	1.25	0.300 2	残差	0.079	7	0.011		
X_1X_2	0.320	1	0.320	28.15	0.001 1	失拟项	0.064	3	0.021	5.92	0.059 4
X_1X_3	0.026	1	0.026	2.29	0.174 2	绝对误差	0.014	4	3.614×10^{-3}		
X_2X_3	0.036	1	0.036	3.21	0.116 2	总和	1.940	16			

体积比 (X_3) 的中间值不变, 绘制各因素与 OD 的三维曲面图, 结果见图 2。最终得到 BSA-Pte-PLGA-NPs 最佳处方为 BSA 质量浓度为 19.2 mg/mL、载药比为 8.86:1、水相与有机相体积比为 8.02:1, 预测的 BSA-Pte-PLGA-NPs 包封率、载药量和粒径分别为 84.83%、8.90% 和 172.76 nm。

2.6 工艺验证

将 BSA-Pte-PLGA-NPs 最佳处方略作调整, 其

中 BSA 质量浓度调整为 19.0 mg/mL、载药比调整为 8.8:1、水相与有机相体积比为 8:1。制备 3 批 BSA-Pte-PLGA-NPs, 分别测定包封率、载药量和粒径, 计算实测值与预测值的偏差 [偏差=(实际值-预测值)/预测值]。结果见表 8, 实际值与预测值相对偏差均小于 ±5%, 证明建立的数学模型对 BSA-Pte-PLGA-NPs 处方工艺研究具有良好的预测性。另测得 BSA-Pte-PLGA-NPs 最佳处方的 ζ 电位为

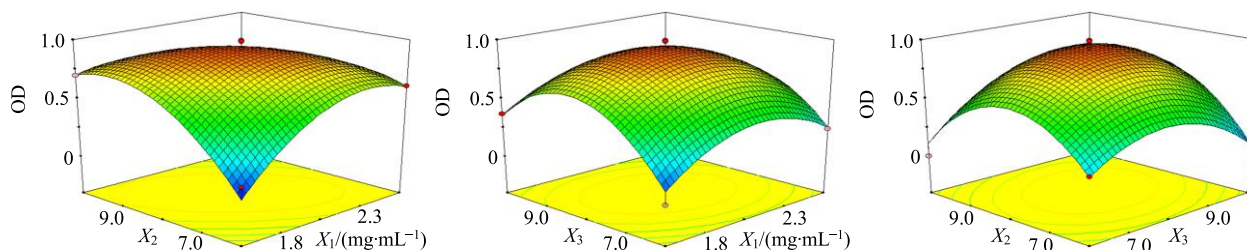


图 2 各因素与响应值的三维图

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

表 8 处方验证结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Comparison of predictive value and actual value ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

评价指标	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
实际值	86.69 ± 1.81	9.02 ± 0.37	176.10 ± 8.12
预测值	84.83	8.90	172.76
偏差/%	2.19	1.34	1.93

(-33.43 ± 1.82) mV, 粒径分布图和 ζ 电位图分别见图 3。

2.7 SEM 观察 BSA-Pte-PLGA-NPs 微观形态

取 BSA-Pte-PLGA-NPs 混悬液适量, 蒸馏水稀释 50 倍, 混匀, 滴于铜柱 (覆以锡箔纸), 置于常温 30 min 至晾干, 喷金 30 s 后置于 SEM 下, 放大至 15 000 倍观察 BSA-Pte-PLGA-NPs 外貌形态, 见图 4。BSA-Pte-PLGA-NPs 外貌形态为类球形或球形粒子, 无粘连。

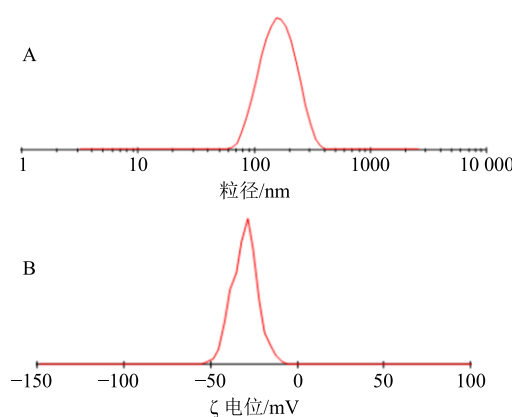


图 3 BSA-Pte-PLGA-NPs 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)
Fig. 3 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of BSA-Pte-PLGA-NPs

2.8 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉的制备及稳定性考察

2.8.1 处方筛选 取 BSA-Pte-PLGA-NPs 混悬液加

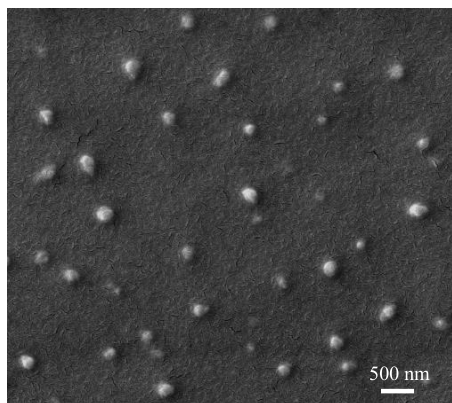


图4 BSA-Pte-PLGA-NPs的SEM图
Fig. 4 SEM of BSA-Pte-PLGA-NPs

入冻干保护剂，涡旋溶解，分装至西林瓶中（液面高度约1 cm），于-55 °C冰箱预冻1 d。立即置于冷阱温度为-55 °C冷冻干燥机，真空冻干2 d[真空度10 Pa (0.1 mbar)]即得不同处方的BSA-Pte-PLGA-NPs冻干粉末。分别加入蒸馏水复溶，过0.45 μm微孔滤膜，测定粒径和包封率，结果见表9。采用甘露醇制得的BSA-Pte-PLGA-NPs冻干粉，复溶后粒径相对较小，但包封率下降相对较大，故不适合作为保护剂。乳糖制得的冻干粉与蔗糖相比，在相同浓度下具有相对较小的粒径和相对较高的包封率，因而乳糖更具优势。当乳糖用量超过1%时BSA-Pte-PLGA-NPs冻干粉复溶后粒径相对较小，且包封率

表9 不同冻干保护剂对粒径和包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Effects of different freeze-drying protectant on particle size and entrapment efficiency ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冻干保护剂 用量/%	平均粒径/nm			包封率/%		
	甘露醇	乳糖	蔗糖	甘露醇	乳糖	蔗糖
0	363.36 ± 28.31	457.15 ± 43.68	508.05 ± 60.47	56.26 ± 1.26	58.78 ± 0.98	57.08 ± 1.03
0.5	302.14 ± 29.67	404.84 ± 36.75	447.62 ± 52.18	63.18 ± 1.65	73.12 ± 1.12	65.64 ± 1.28
1.0	224.26 ± 22.68	246.34 ± 26.92	356.38 ± 40.28	68.69 ± 1.72	82.85 ± 1.08	72.43 ± 1.05
1.5	231.87 ± 24.10	253.61 ± 23.18	336.27 ± 27.64	71.45 ± 1.58	80.64 ± 1.36	73.38 ± 0.97
2.0	247.39 ± 19.73	255.79 ± 25.54	303.60 ± 25.85	63.60 ± 1.10	76.27 ± 1.75	74.55 ± 1.68

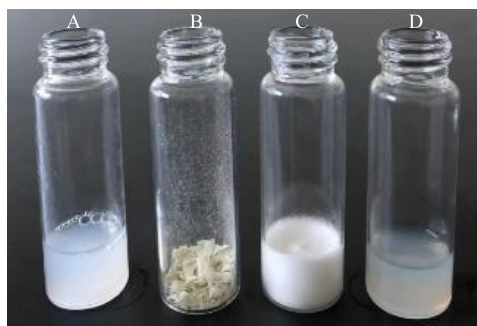
相对较高，为减少辅料用量，故确定乳糖用量为1%。BSA-Pte-PLGA-NPs混悬液、BSA-Pte-PLGA-NPs直接冻干（不加冻干保护剂）、BSA-Pte-PLGA-NPs冻干粉及蒸馏水复溶后外观见图5。

2.8.2 BSA-Pte-PLGA-NPs冻干粉稳定性考察 取BSA-Pte-PLGA-NPs混悬液置于恒温恒湿箱中（温度30 °C，湿度60%），放置至5 d时底部出现肉眼可见的沉淀，说明稳定性较差。取BSA-Pte-PLGA-

NPs冻干粉置于相同条件，分别于0、5、10、15、30、45、60、75、90 d取样，蒸馏水复溶后测定粒径和包封率，结果见表10，放置90 d后平均粒径为(247.86 ± 22.93) nm，包封率为(77.86 ± 0.99) %，可见将BSA-Pte-PLGA-NPs混悬液制备成冻干粉后改善了稳定性。

2.9 晶型分析

晶型分析条件：电压为40 kV，Cu-Kα靶，2θ为3°~45°，扫描速度8°/min。取紫檀芪原料药、空



A-BSA-Pte-PLGA-NPs混悬液 B-BSA-Pte-PLGA-NPs冻干粉(不加乳糖) C-BSA-Pte-PLGA-NPs冻干粉 D-蒸馏水复溶
A-BSA-Pte-PLGA-NPs suspension B-lyophilized powder of BSA-Pte-PLGA-NPs (not add lactose) C-lyophilized powder of BSA-Pte-PLGA-NPs D-redissolved by distilled water

图5 样品外观

Fig. 5 Appearance of samples

表10 稳定性试验 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Stability experiments ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

取样时间/d	包封率/%	平均粒径/nm
0	78.12 ± 1.70	231.15 ± 26.10
5	78.51 ± 1.27	226.94 ± 21.57
10	79.04 ± 1.00	230.86 ± 25.98
15	78.87 ± 1.53	236.15 ± 22.56
30	78.63 ± 1.72	235.08 ± 24.87
45	78.08 ± 1.85	240.53 ± 20.96
60	77.54 ± 0.96	234.90 ± 22.87
75	77.06 ± 1.14	244.17 ± 19.46
90	77.86 ± 0.99	247.86 ± 22.93

白辅料（不加紫檀芪，其余辅料比例同 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉）、物理混合物和 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉置于玻璃板凹槽内，按压平整后进行扫描，图谱见图 6。紫檀芪原料药在 11.8°、17.8°和 26.6°处的晶型峰相对较强，这些特征晶型峰在物理混合物 XRPD 图谱中仍可观察到。在 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉 XRPD 图谱中，尽管在 11.8°处受到空白辅料 XRPD 晶型峰干扰，但在 17.8°和 26.6°处的特征晶型峰均消失不见，由此可判断紫檀芪在 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉以无定型状态存在。

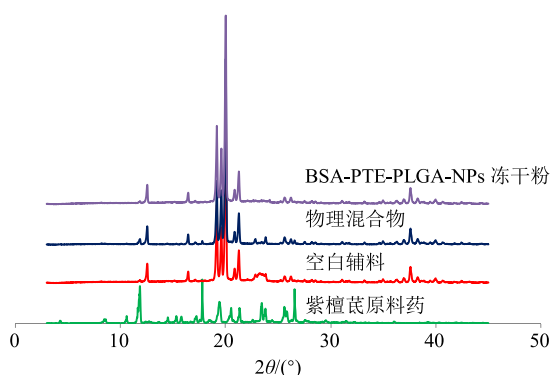


图 6 XRPD 结果
Fig. 6 XRPD results

2.10 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉体外释药行为研究及模型拟合

分别取适量紫檀芪原料药、物理混合物（紫檀芪与辅料比例同 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉）和 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉（含 20 mg 的紫檀芪），加入 5 mL 的 pH 1.2 磷酸盐缓冲液（含 1.0% 的 SDS），置于活化的透析袋中（截留相对分子质量为 8000~12 000），扎紧。释放介质为 900 mL 的 pH 1.2 磷酸盐缓冲液（1.0% 的 SDS），转速和温度分别为 100

r/min 和 37 °C，分别于 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、8、12、18 h 分别取样 3 mL，并立即补加 3 mL 空白释放介质。过 0.45 μm 微孔滤膜后测定紫檀芪质量浓度。BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液（含 1.0% 的 SDS）中的释药情况同法操作，结果见图 7。紫檀芪原料药和物理混合物在不同释药介质中的释药情况区分度不大，BSA-Pte-PLGA-NPs 在 pH 1.2 磷酸盐缓冲液（含 1.0% 的 SDS）累积释放度高于在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液（含 1.0% 的 SDS），18 h 内的累积释放率分别为 73.06% 和 63.15%。对 BSA-Pte-PLGA-NPs 体外释药机制进行拟合，结果见表 11，BSA-Pte-PLGA-NPs 在 pH 1.2 或 pH 7.4 磷酸盐缓冲液（含 1.0% 的 SDS）中体外释药均与 Weibull 模型拟合度最高。

2.11 口服药动力学研究

2.11.1 给药及血液样品前处理 取紫檀芪原料药、物理混合物（紫檀芪与辅料比例同 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉，仅做简单混合）和 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉适量，分别加入 0.5% 的 CMC-Na 水溶液配制成混悬液。将禁食 12 h 的 SD 大鼠随机分成 3 组，每组 6 只，ig 剂量按紫檀芪计 40 mg/kg。于 0.10、0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、10.00、12.00 h 眼眶后静脉丛采血约 250 μL，置于肝素化离心管中，涡旋 5 s 混匀，4000 r/min 离心（离心半径 8.6 cm）2 min，取上层血浆至空白离心管中，密封后冷冻保存。

2.11.2 血浆样品处理过程^[9] 取白藜芦醇对照品 20 mg 至 50 mg 量瓶中，加入甲醇稀释至刻度，并用甲醇稀释成质量浓度为 1.000 μg/mL，作为内标溶液。血浆样品置于室温解冻，精密取 100 μL 置于离

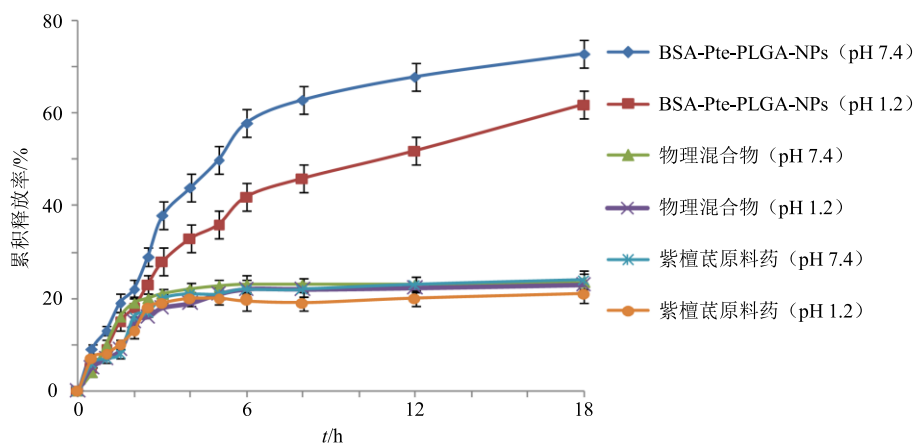


图 7 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 7 Release profile *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 11 BSA-Pte-PLGA-NPs 药物释放模型和相关系数

Table 11 Fitting release model and correlation coefficient of BSA-Pte-PLGA-NPs

释药介质	模型	拟合方程	R ²
pH 1.2	零级模型	$M_t/M_\infty=0.042\ 6\ t+0.174\ 3$	0.771 6
	一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.075\ 2\ t-0.171\ 4$	0.855 1
	Higuchi 模型	$M_t/M_\infty=0.203\ 5\ t^{1/2}-0.001\ 29$	0.922 4
	Weibull 模型	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.827\ 0\ \ln t-1.814\ 4$	0.965 7
pH 7.4	零级模型	$M_t/M_\infty=0.033\ 6\ t+0.119\ 2$	0.843 2
	一级模型	$\ln(1-M_t/M_\infty)=-0.053\ 4\ t-0.108\ 3$	0.917 4
	Higuchi 模型	$M_t/M_\infty=0.164\ 8\ t^{1/2}-0.028\ 6$	0.946 6
	Weibull 模型	$\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]=0.848\ 5\ \ln t-2.218\ 5$	0.974 1

M_∞ 为 ∞ 时累积释放度; t 为时间; M_t 为 t 时间累积释放度; M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率

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

心管中,加入 50 μ L 白藜芦醇内标溶液和 1.5 mL 乙腈,密封后涡旋 2 min,再加入 1 mL 醋酸乙酯,继续涡旋 2 min 得混悬液。6500 r/min 离心(离心半径 8.6 cm) 5 min,小心移取上层有机溶剂至空白离心管中,置于 40 $^{\circ}$ C 水浴中氮吹仪吹干。加入 100 μ L 甲醇涡旋复溶,即得。

2.11.3 血浆对照品溶液的配制及线性关系考察 采用甲醇配制质量浓度为 2800、1400、600、280、140、46.67 ng/mL 的紫檀芪对照品溶液,各质量浓度分别取 100 μ L 至离心管中,置于 40 $^{\circ}$ C 水浴中氮吹仪吹干,加入 100 μ L 空白血浆,涡旋复溶,得 2800、1400、600、280、140、46.67 ng/mL 的紫檀芪血浆对照品溶液。按“2.11.2”项下方法处理,按“2.2.1”项下色谱条件进样 10 μ L,测定各质量浓度血浆对照品中紫檀芪与白藜芦醇的峰面积。以紫檀芪与白藜芦醇内标的峰面积比为纵坐标(Y),紫檀芪质量浓度为横坐标(X),得回归方程 $Y=0.004\ 7\ X-0.020\ 9$, $r=0.994\ 6$,可见紫檀芪血浆对照品溶液在 46.67~2800 ng/mL 线性关系良好。

2.11.4 专属性考察 取空白血浆、血浆样品和血浆对照品溶液分别进样,结果见图 8,血浆内源性物质不干扰内标和紫檀芪色谱峰,专属性较高。

2.11.5 稳定性考察 取血浆样品于 0、3、6、9、12、24 h 测定,记录紫檀芪与内标面积峰面积,计算得两者峰面积比值 RSD 为 7.12%,表明血浆样品至少在 24 h 内稳定性良好。

2.11.6 精密度考察 取 46.67 ng/mL (低质量浓度)、600 ng/mL (中质量浓度)和 2800 ng/mL (高质量浓度)血浆对照品溶液,同 1 d 内分别连续进样,记录紫檀芪与内标面积峰面积,计算两者比值

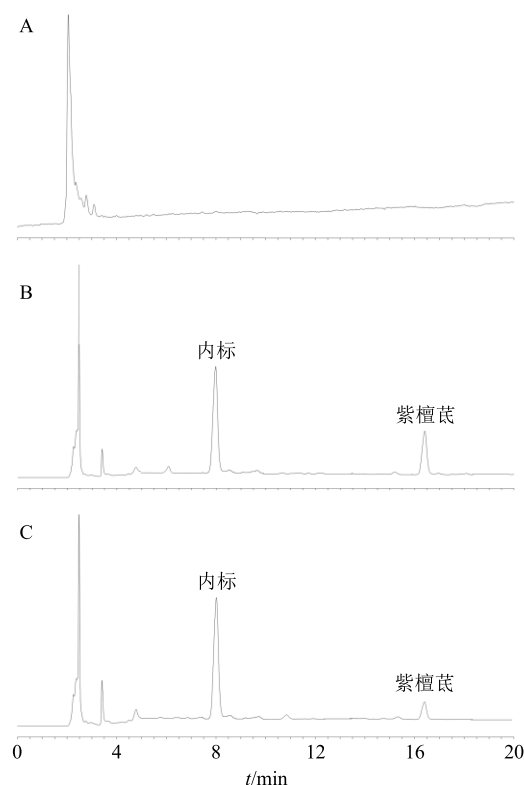


图 8 空白血浆 (A)、血浆样品 (B)、血浆对照品溶液 (C) 的 HPLC 图

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

RSD 分别为 10.53%、6.16%、8.56%,表明日内精密度良好;各质量浓度连续测定 6 d,记录紫檀芪与内标面积,计算得两者比值 RSD 分别为 7.69%、9.10%和 6.68%,表明日间精密度良好。

2.11.7 回收率考察 配制紫檀芪质量浓度分别为 46.67、600、2800 ng/mL 血浆样品,按“2.11.2”项下方法处理后测定,记录紫檀芪与内标面积峰面积,

带入回归方程 $Y=0.0047X-0.0209$ 计算紫檀芪测得质量浓度,与实际质量浓度相比计算提取回收率。结果显示平均回收率为 94.75%, RSD 为 7.30%,表明准确度较高。

2.11.8 药动学结果 将紫檀芪原料药、物理混合物和 BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉各个时间点的血药浓度与对应的时间作图,药动学曲线见图 9。各组动物的药动学数据用 DAS 2.0 软件非房室模型进行分析。结果见表 12。物理混合物组的 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} 等药动学参数与紫檀芪原料药相比统计学意义 ($P>0.05$),说明处方中的辅料对紫檀芪药动

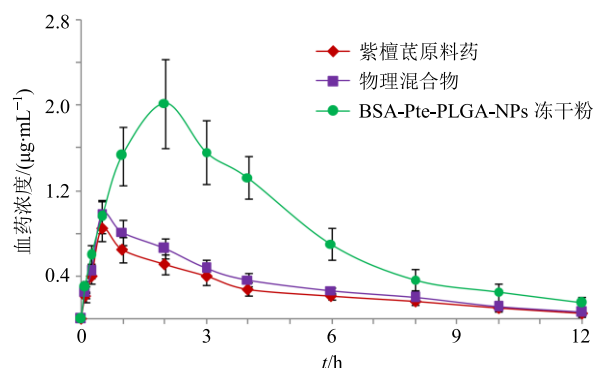


图 9 药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

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

表 12 主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 12 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	紫檀芪原料药	物理混合物	BSA-Pte-PLGA-NPs 冻干粉
t_{max}	h	0.51±0.16	0.56±0.13	2.11±0.60***
$t_{1/2}$	h	2.68±0.53	2.80±0.58	4.82±0.89***
C_{max}	ng·mL ⁻¹	861.53±114.08	987.03±137.55	2 096.43±302.91***
AUC_{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	3 226.25±392.58	3 892.07±401.75	10 459.21±1 368.99***
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	3 317.60±421.79	4 012.54±446.81	10 984.87±1 429.70***

与紫檀芪比较: ** $P<0.01$; 与物理混合物比较: *** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs pterostilbene; *** $P<0.01$ vs physical mixture

学行为有一定影响,但无显著性差异。将紫檀芪以 BSA-Pte-PLGA-NPs 形式 ig 给药后 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} 等药动学参数与紫檀芪原料药相比均有极显著性差异 ($P<0.01$),其中 t_{max} 延后至 (2.11±0.60)h, $t_{1/2}$ 延长至 (4.82±0.89)h, C_{max} 提高至 2.43 倍,相对口服生物利用度提高至 3.24 倍,可见 BSA-Pte-PLGA-NPs 极大影响了紫檀芪体内药动学行为,有效促进了药物吸收。

3 讨论

PLGA 分子中聚乳酸具有较强的亲脂性,其比例越高越利于包载亲脂性药物(紫檀芪属于亲脂性药物)^[18],故选择型号为 75:25 来制备 BSA-Pte-PLGA-NPs。预实验对比了纳米沉淀法和高压均质法制备 BSA-Pte-PLGA-NPs,但发现高压均质法制得的 BSA-Pte-PLGA-NPs 粒径分为 50~120 nm 和 150~450 nm 2 部分,可能是由于高压均质时使白蛋白产生了变性,从而形成了 BSA 纳米粒子^[16],故本研究最终采用纳米沉淀法来制备 BSA-Pte-PLGA-NPs。BSA 稳定纳米粒的机制主要分为 3 步,即吸附-重排-成膜^[22]。在界面吸附过程中 BSA 分子结构会在水相中展开,但由于相对分子质量较大在界面吸附速度较慢;疏水性链段(如氨基酸)在脂质纳

米粒表面伸展并发生重排,然后界面吸附的白蛋白之间交联后最终形成界面膜。尽管 BSA 乳化能力不强,但由于其巨大的空间位阻有效维持了纳米体系的稳定性^[20]。

目前,常见的稳定剂大多是表面活性剂或高分子聚合物,如泊洛沙姆、聚山梨酯、聚乙烯醇等,可以使药物粒径控制在 500 nm 以下,但需注意控制这类稳定剂的用量,否则可能产生溶血等毒副作用^[23-24]。本研究采用了安全性很高的 BSA 作为稳定剂,制备了 BSA-Pte-PLGA-NPs,平均粒径为 (178.29±7.65) nm,为扩大 BSA 在纳米制剂的应用范围提供了借鉴^[25-26]。在 BSA-Pte-PLGA-NPs 处方中 BSA 除了作为的稳定剂外,本身还可以作为冻干保护剂^[15-16]。前期预实验研究结果显示,在不加入其他保护剂,直接将 BSA-Pte-PLGA-NPs 进行冻干时,所得冻干粉为疏松片状及粉末物质,外观较差^[27-28],故加入少量的冻干保护剂进行冻干。考察发现只需加入 1%的乳糖后冻干粉外观饱满,复溶后粒径变化相对最小。甘露醇保护剂粒径变化相对较大,可能是甘露醇在冻干过程中形成了冰晶^[29-30],对 BSA-Pte-PLGA-NPs 产生了一定的损伤,乳糖在冻干时可形成黏度较高的玻璃态,对纳米粒具有更

好的保护作用,故选择1%乳糖作为BSA-Pte-PLGA-NPs的冻干保护剂。本研究制备的BSA-Pte-PLGA-NPs与其他纳米制剂相比,极大减少了辅料用量,具有推广意义。

BSA-Pte-PLGA-NPs在pH 1.2或pH 7.4磷酸盐缓冲液中体外释药均与Weibull模型拟合度最高,说明其体外释药过程是典型的双相动力学特征^[29],即分为快速释药期和缓慢释药期。快速释药阶段可能是游离药物以及分散于纳米粒表面乳化层、浅表层或表层的药物快速释放所致;而包裹于BSA-Pte-PLGA-NPs内部药物需克服较多屏障才能释放,因而出现缓慢释药期,这种释药行为可能会影响药物的体内药动学行为及药效。

BSA-Pte-PLGA-NPs的 t_{max} 显著性延后($P < 0.01$),这可能是由于BSA-Pte-PLGA-NPs粒径较小,容易被胃肠道吸附,从而延缓了进入血液循环时间,另外BSA-Pte-PLGA-NPs本身具有缓释特征,从而使紫檀芪的 t_{max} 延后^[31]。BSA-Pte-PLGA-NPs的 $t_{1/2}$ 发生显著性延长($P < 0.01$),有利于提高紫檀芪的血药浓度并维持药效。BSA-Pte-PLGA-NPs的 C_{max} 和相对口服生物利用度分别提高至2.43倍和3.24倍,促吸收作用明显,可能多种原因共同作用的结果:紫檀芪原料药制备成BSA-Pte-PLGA-NPs后表面积激增,极大增加与胃肠道的接触面^[31-33],利于药物被充分吸收;BSA-Pte-PLGA-NPs的载体的包裹作用降低了机体各种酶代谢等对紫檀芪稳定性的影响^[8],增加了吸收量;紫檀芪在BSA-Pte-PLGA-NPs冻干粉中以无定型形式存在,而无定型药物比晶型药物更易吸收^[13];白蛋白等辅料本身具有增溶及促吸收作用^[16,27-28]。综上,本研究初步完成了BSA-Pte-PLGA-NPs冻干粉制备工艺研究及口服药动学评价,具有继续研究价值,接下来将开展药效学等评价,为该纳米制剂提供更为全面的研究资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 姜桥,薛博,张野,等. 蓝莓紫檀芪的体外抗肿瘤机制研究进展 [J]. 中国果菜, 2020, 40(5): 14-19.
 [2] 徐方方,漆睿,江斯炜,等. 紫檀芪的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(3): 406-410.
 [3] 王若利,岳红梅,王潇,等. 紫檀芪治疗纤维化疾病的实验研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2021, 40(7): 494-498.

[4] Wang W, Wang Y R, Chen J, et al. Pterostilbene attenuates experimental atherosclerosis through restoring catalase-mediated redox balance in vascular smooth muscle cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(46): 12752-12760.
 [5] Riche D M, McEwen C L, Riche K D, et al. Analysis of safety from a human clinical trial with pterostilbene [J]. *J Toxicol*, 2013, 2013: 463595.
 [6] Zhang Y, Shang Z H, Gao C H, et al. Nanoemulsion for solubilization, stabilization, and *in vitro* release of pterostilbene for oral delivery [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2014, 15(4): 1000-1008.
 [7] 陈哲. 紫檀芪纳米混悬剂的制备与初步药代动力学研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
 [8] 舒桥,冯皓. 纳米乳提升紫檀芪稳定性及生物可给性的研究[J]. 武汉理工大学学报, 2019, 41(1): 13-20.
 [9] Deng L, Li Y Z, Zhang X S, et al. UPLC-MS method for quantification of pterostilbene and its application to comparative study of bioavailability and tissue distribution in normal and Lewis lung carcinoma bearing mice [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 114: 200-207.
 [10] Zhang Y, Shang Z H, Gao C H, et al. Nanoemulsion for solubilization, stabilization, and *in vitro* release of pterostilbene for oral delivery [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2014, 15(4): 1000-1008.
 [11] Tzeng W S, Teng W L, Huang P H, et al. Pterostilbene nanoparticles downregulate hypoxia-inducible factors in hepatoma cells under hypoxic conditions [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 867-879.
 [12] 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动学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4307-4316.
 [13] 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.
 [14] 魏永鸽,黄贺梅,齐园圃,等. Box-Behnken设计-效应面法优化吴茱萸碱-羟基乙酸共聚物纳米粒处方及体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(23): 2416-2422.
 [15] 王建筑,鞠晓月. 柚皮素纳米混悬剂的制备及表征 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(11): 1212-1216.
 [16] 辛娟,易华,谈秀凤,等. 大黄酚白蛋白纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2021, 43(6): 1399-1404
 [17] 管庆霞,夏昭睿,王艳宏,等. 包载马钱子碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方工艺优化及其特性研究 [J]. 中草药, 2021, 53(4): 951-961.
 [18] 王晓明,张智强. 柚皮素-PLGA纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2022, 44(2): 356-362.

- [19] Ma C J, Wei T T, Hua Y Y, *et al.* Effective antitumor of orally intestinal targeting penetrating peptide-loaded tyrosylleucide/PLGA nanoparticles in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16: 4495-4513.
- [20] 罗玉莹. 人血清白蛋白修饰的盐酸伊立替康 PLGA 纳米粒的制备及评价 [D]. 成都: 成都大学, 2021.
- [21] Varshochian R, Jeddi-Tehrani M, Mahmoudi A R, *et al.* The protective effect of albumin on bevacizumab activity and stability in PLGA nanoparticles intended for retinal and choroidal neovascularization treatments [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 50(3/4): 341-352.
- [22] 常翠华. 血清蛋白界面吸附、聚集行为及应用特性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [23] 刘洋. 从分子、细胞水平研究三种类型表面活性剂的毒性效应与机理 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [24] 刘迎, 胡燕, 姜蕾, 等. 6种表面活性剂对斑马鱼胚胎发育的毒性效应 [J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(6): 1091-1096.
- [25] 高彩芳, 梁剑铭, 秦晶, 等. 共载紫杉醇和纳米银的叶酸-白蛋白纳米粒的制备和体外评价 [J]. *中草药*, 2018, 49(12): 2786-2792.
- [26] 亓文霞, 王胜兰, 杨桁, 等. 基于乳腺癌化疗-光动力联合治疗的负载紫杉醇白蛋白纳米给药系统的制备及其体外评价 [J]. *中草药*, 2022, 53(4): 993-1003.
- [27] 辛娟, 易华, 李明, 等. 蛇床子素白蛋白纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2022, 44(10): 3104-3110.
- [28] 王风云, 李伟宏. 黄芩素磷脂复合物白蛋白纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2021, 43(11): 2939-2944.
- [29] 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.
- [30] 陈蓓, 陈春燕, 高惠静, 等. 阿苯达唑纳米脂质体冻干粉制备及性质考察 [J]. *中国药房*, 2017, 28(7): 967-970.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.

[责任编辑 郑礼胜]