

蒙花苷巯基化纳米胶束的制备、表征及其口服吸收生物利用度评价

董亚楠¹, 任书强², 柳超¹, 李伟宏¹, 董姣姣³, 王风云^{1*}

1. 河南应用技术职业学院, 河南 郑州 450042

2. 郑州澍青医学高等专科学校, 河南 郑州 450064

3. 北京大学肿瘤医院, 北京 100142

摘要: 目的 制备蒙花苷巯基化纳米胶束 (buddleoside sulfhydryl-modified nanomicelles, Bud-SH-NMs), 考察口服药动力学行为。方法 薄膜分散-超声法制备 Bud-SH-NMs, 单因素实验结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化处方。X 射线粉末衍射法 (XRPD) 分析晶型, 透射电子显微镜 (TEM) 观察 Bud-SH-NMs 外貌形态, 透析法考察在 pH 2.0 和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的释药行为。SD 大鼠分别 ig 给予蒙花苷混悬液和 Bud-SH-NMs 冻干粉, HPLC 法测定血药浓度, 计算主要药动学参数。结果 Bud-SH-NMs 最佳处方: 巯基修饰二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀-SH) 与药物用量比为 7.5:1, 水合体积为 9.7 mL, 水合温度 45 °C。Bud-SH-NMs 的包封率、载药量、沉降率、粒径和 ζ 电位分别为 (90.86 ± 1.78) %、(10.76 ± 0.24) %、(4.14 ± 0.29) %、(49.27 ± 6.82) nm 和 (-18.53 ± 1.12) mV。蒙花苷在 Bud-SH-NMs 冻干粉中以无定型形式存在, 微观外貌为球形, 在 pH 2.0 和 pH 6.8 PBS 中缓释特征明显, 释药过程符合 Weibull 模型。药动学结果显示, Bud-SH-NMs 半衰期 ($t_{1/2}$) 增加至 (5.93 ± 0.96) h, 血药浓度 (C_{max}) 和相对口服吸收生物利用度分别提高至 2.83 倍和 5.10 倍。结论 Bud-SH-NMs 粒径小, 包封率高, 稳定性好, 显著促进了蒙花苷口服吸收, 为后续研究奠定基础。

关键词: 蒙花苷; 巯基修饰; 纳米胶束; 薄膜分散-超声法; Box-Behnken 设计-效应面法; 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)23 - 7776 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.23.020

Buddleoside sulfhydryl-modified nanomicelles: Preparation, characterization and oral bioavailability evaluation

DONG Ya-nan¹, REN Shu-qiang², LIU Chao¹, LI Wei-hong¹, DONG Jiao-jiao³, WANG Feng-yun¹

1. Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 450042, China

2. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China

3. Peking University Cancer Hospital, Beijing 100142, China

Abstract: Objective To prepare buddleoside sulfhydryl-modified nanomicelles (Bud-SH-NMs) and investigate their oral pharmacokinetic behavior *in vivo*. **Methods** Bud-SH-NMs were prepared by thin film dispersion-ultrasonic method. Single factor experiments combined with Box-Behnken response surface design method was used to optimize the prescriptions. Crystal form of Bud-SH-NMs lyophilized powder was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD), and the appearance was observed using transmission electron microscope (TEM). The release behavior of Bud-SH-NMs in pH 2.0 and pH 6.8 phosphate buffers were investigated by dialysis method. SD rats in each group were administered intragastrically with buddleoside suspension and Bud-SH-NMs lyophilized powder, respectively. The concentration of buddleoside in plasma was analyzed by HPLC, and main pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** The optimal formulation of Bud-SH-NMs was as follows: DSPE-PEG₂₀₀₀-SH to drug ratio of 7.5:1, hydration volume of 9.7 mL, and hydration temperature of 45 °C. Envelopment efficiency, drug loading, settlement rate, particle size and ζ potential were (90.86 ± 1.78)%, (10.76 ± 0.24)%, (4.14 ± 0.29)%, (49.27 ± 6.82) nm and (-18.53 ± 1.12) mV, respectively. Buddleoside existed in an amorphous form in Bud-SH-NMs lyophilized powder, and its microscopic appearance was spherical.

收稿日期: 2023-05-29

基金项目: 2023 年度河南省高等学校重点科研项目 (23B320013); 河南应用技术职业学院青年骨干教师 资助项目 (2020-GGJS-Y003)

作者简介: 董亚楠 (1987—), 女, 硕士, 讲师, 主要从事临床药学及基础医学研究。Tel: (0371)67592759 E-mail: dyn11212020@126.com

*通信作者: 王风云 (1973—), 女, 硕士, 副教授, 从事肿瘤药理学开发研究。Tel: (0371)67673862 E-mail: wangfengyun1973@126.com

Sustained release characteristics of Bud-SH-NMs were obvious in pH 2.0 and pH 6.8 phosphate buffer, and drug release process conformed to Weibull model. Pharmacokinetic results showed that $t_{1/2}$ of Bud-SH-NMs was increased to (5.93 ± 0.96) h, C_{max} and oral relative bioavailability was increased to 2.83-fold and 5.10-fold, respectively. **Conclusion** Bud-SH-NMs had small particle size, high entrapment efficiency and good stability, and promoted oral absorption of buddleoside effectively, which laid the foundation for the following research.

Key words: buddleoside; sulfhydryl-modified; nanomicelles; thin film dispersion-ultrasonic method; Box-Behnken response surface design method; pharmacokinetic; bioavailability

蒙花苷是从野菊花、密蒙花、醉鱼草等药用植物中提取的一种有效成分^[1-2],属于天然黄酮苷类化合物,呈白色结晶性粉末。国内外药理学研究结果显示^[3-5],蒙花苷具有抗肿瘤、抗氧化、降血压、镇痛、护肝等药理作用^[1-3]。大鼠口服蒙花苷的半数致死量(median lethal dose, LD_{50})达 2 280.32 mg/kg^[2],无发育毒性,临床使用安全性较高,具备一定的研究开发价值。蒙花苷在水中的溶解度仅为 0.059 $\mu\text{g/mL}$ ^[6],不同 pH 值中油水分配系数($\lg P$)值在 0.50~1.04^[6],水溶性脂溶性均较差^[7],属于生物药剂学分类系统中 IV 药物。蒙花苷在胃肠道中易发生降解作用,首关效应明显^[8],且受 P-糖蛋白外排作用影响^[9],最终导致口服吸收生物利用度不足 1%^[10]。为增加蒙花苷体内吸收,目前已有蒙花苷磷脂复合物^[7]、固体脂质纳米粒^[11]等研究。可能受制于蒙花苷影响吸收的因素较多,生物利用度提高幅度均不理想。

纳米胶束由两亲性高分子材料在水相中自组装形成“核-壳”结构的纳米粒子,粒径一般在 10~100 nm,具有载药量高、结构稳定性好等优势^[12-15],可极大增加药物的溶解度、溶出度及生物利用度等,是一种理想的纳米递药载体。二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀)作为纳米载体颇受研究者关注^[16-17],作为一种两亲性聚合物在水相中可自发形成纳米胶束,临界胶束浓度仅为 8.0 $\mu\text{mol/L}$ ^[18]。DSPE 亲脂端可形成纳米胶束的疏水性核心,为包载药物创造合适环境,而 PEG 亲水端位于胶束表面,不仅增加亲水性,也可提供空间位阻增加结构稳定性及体内循环时间,已被美国 FDA 批准应用于医药领域,生物相容性及安全性高。

巯基化聚合物是一种生物黏膜性聚合物,巯基可与黏液层富含半胱氨酸区域形成二硫键进而增加滞留时间^[19],还具有抑制 P-蛋白介导的外排作用^[20],增加体内吸收。故本研究采用巯基修饰二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG₂₀₀₀-SH)为载体材料,制备蒙花苷巯基化纳米胶束

(buddleoside sulfhydryl-modified nanomicelles, Bud-SH-NMs),以包封率、载药量及沉降率为指标,单因素实验考察结合 Box-Behnken 设计-效应面法(Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM)优化 Bud-SH-NMs 处方。制备未巯基化的蒙花苷纳米胶束(buddleoside-nanomicelles, Bud-NMs),并与 Bud-SH-NMs 比较体内药动学行为,为蒙花苷制剂研发提供思路和参考资料。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, DAD 检测器,美国安捷伦公司; 85-1 型磁力搅拌器,欧莱博科学仪器有限公司; AR2140 型电子天平,梅特勒仪器上海有限公司; DS-5510DTH 型超声仪,上海生析超声仪器有限公司; Zetasizer Nono ZS-90 型粒度分析仪,英国马尔文公司; TG16 型台式高速离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司; RT61212 型溶出仪,深圳市锐拓仪器设备有限公司; JEM-2100 型透射电子显微镜(TEM),日本电子株式会社; HTM-BX 型超低温冰箱,佛山市汇泰美机械设备有限公司; FD-1D-80 型压盖挂瓶型真空冷冻干燥机,江苏天翎仪器有限公司; UGC-12MF 型氮吹仪,北京优晟联合科技有限公司。

1.2 材料

蒙花苷对照品,批号 111528-201910,质量分数 96.6%,中国食品药品检定研究院;蒙花苷原料药,批号 20200617,质量分数 95.2%,成都普菲德生物技术有限公司;磺胺甲恶唑对照品,批号 201022,质量分数 99.2%,上海士锋生物科技有限公司; DSPE-PEG₂₀₀₀-SH(批号 20200625)、DSPE-PEG₂₀₀₀(批号 20200408),广州碳水科技有限公司;磷酸,批号 C12747030,上海麦克林生化科技有限公司;磷酸二氢钾,批号 20201015,国药集团化学试剂有限公司;十二烷基苯磺酸钠,批号 20191120,山东澳凯化工有限公司;甘露醇,批号 20210525,寿光华力糖醇有限公司。

2 方法与结果

2.1 Bud-SH-NMs 的制备

采用薄膜分散-超声法制备 Bud-SH-NMs^[21-22]。精密取 5 mg 蒙花苷加入 20 mL 甲醇中, 45 °C 下加热溶解, 取 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 材料加入 10 mL 氯仿超声溶解后滴加至蒙花苷溶液中, 800 r/min 磁力搅拌 0.5 h, 45 °C 下缓慢旋转蒸发除去有机溶剂。置于真空干燥箱中过夜, 即得一层透明、均匀薄膜, 加入一定温度、一定体积蒸馏水进行水合, 探头超声(功率为 250 W, 工作 2 s 间歇 1 s), 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得 Bud-SH-NMs 混悬液。空白纳米胶束(SH-NMs)同法制备(不加蒙花苷), 采用 DSPE-PEG₂₀₀₀ 同法制备 Bud-NMs。

2.2 蒙花苷含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Symmetry-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 30 °C; 测波长为 325 nm; 流动相为甲醇-0.5%磷酸水溶液(35:65); 进样体积为 10 μL; 体积流量为 1.0 mL/min, 理论塔板数以蒙花苷计不低于 6500。

2.2.2 线性关系考察 精密称取蒙花苷对照品 10 mg 置于 50 mL 量瓶中, 加入 45 mL 甲醇超声 5 min 溶解(功率为 250 W, 工作 2 s 间歇 1 s), 甲醇稀释定容即得 0.2 mg/mL 的蒙花苷对照品储备液。采用流动相稀释配制质量浓度为 5.00、2.50、1.00、0.25、0.10、0.05 μg/mL 一系列对照品溶液, 进样测定峰面积(Y), 并对蒙花苷质量浓度(X)作线性回归, 得回归方程: $Y=42\ 370 X-258.2$, $r=0.999\ 9$, 试验表明线性范围为 0.05~5.00 μg/mL。

2.2.3 Bud-SH-NMs 供试品溶液的配制 精密取 Bud-SH-NMs 混悬液 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 加入甲醇-氯仿混合溶剂(2:1) 5 mL, 超声 5 min(功率为 250 W, 工作 2 s 间歇 1 s), 放置至室温后稀释定容, 摇匀。精密取 1 mL 至 50 mL 量瓶中, 加流动相稀释定容, 即得 Bud-SH-NMs 供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 取空白纳米胶束按“2.2.3”项下方法制备空白样品溶液。取空白样品溶液、Bud-SH-NMs 供试品溶液、Bud-NMs 供试品溶液和蒙花苷对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图。结果见图 1, 制剂辅料未干扰蒙花苷色谱峰, 专属性较高。

2.2.5 精密度考察 取高、中、低质量浓度为 5.00、1.00、0.05 μg/mL 的蒙花苷对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定 6 次, 计算得高、中、低质

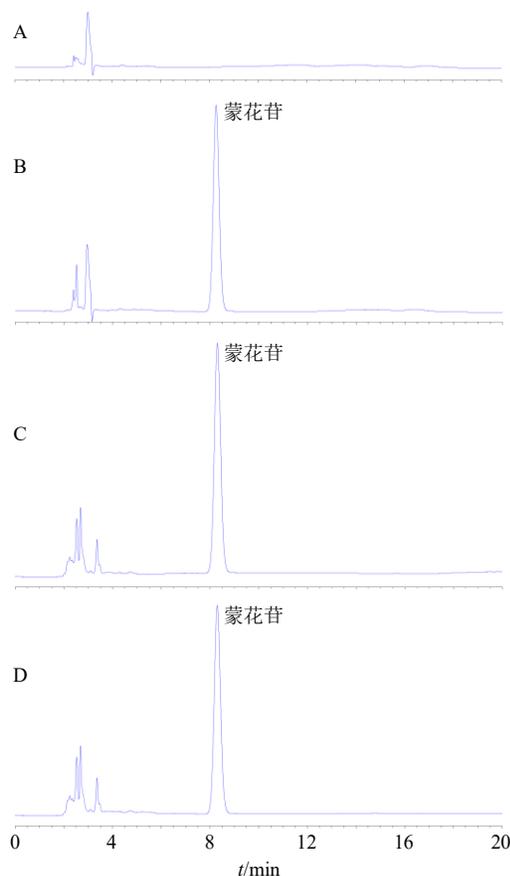


图 1 空白样品 (A)、Bud-SH-NMs 供试品 (B)、Bud-NMs 供试品 (C) 和蒙花苷对照品溶液 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of blank sample (A), Bud-SH-NMs sample solution (B), Bud-NMs sample solution (C) and buddleioside reference substance (D)

量浓度蒙花苷峰面积的 RSD 依次为 0.29%、0.48%、0.58%, 结果表明精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 Bud-SH-NMs 供试品溶液置于室温, 于 0、2、4、8、12、24 h 按“2.2.1”项下色谱条件进样, 测得蒙花苷峰面积的 RSD 为 1.62%, 同法测得 Bud-NMs 供试品溶液中蒙花苷峰面积的 RSD 为 1.19%, 结果表明 Bud-SH-NMs 和 Bud-NMs 供试品溶液稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取同一份 Bud-SH-NMs 样品, 按“2.2.3”项下方法操作平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测得蒙花苷质量分数的 RSD 为 1.80%, 同法测得 Bud-NMs 供试品溶液中蒙花苷质量分数的 RSD 为 0.89%, 结果表明该法重复性良好。

2.2.8 准确度考察 取 9 份 Bud-SH-NMs 混悬液 0.5 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 分为高、中、低 3 组, 分别加入蒙花苷对照品储备液 (0.2 mg/mL)

0.8、1.2、1.6 mL，并制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样测定蒙花苷含量。结果显示，蒙花苷的平均加样回收率为 100.16%，RSD 为 1.34%，同法测得 Bud-NMs 供试品溶液中蒙花苷的平均加样回收率为 99.40%，RSD 为 1.71%，结果表明准确度较高。

2.3 包封率、载药量及沉降率^[15]的测定

精密取 1 mL 的 Bud-SH-NMs 混悬液置于超滤管中（截留相对分子质量 2500），放入高速离心机（温度为 4 °C，离心半径 8.6 cm）12 500 r/min 离心 15 min，取外管滤液，按“2.2.1”项下色谱条件测定游离蒙花苷的量（ $M_{\text{游离}}$ ）。精密取 Bud-SH-NMs 混悬液 1 mL 按照“2.2.3”项下操作，按“2.2.1”项下色谱条件测定总蒙花苷的量（ $M_{\text{总}}$ ）。

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

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

$W_{\text{载体}}$ 代表 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 载体用量

取新制备的 Bud-SH-NMs 混悬液测定蒙花苷含量（ $M_{\text{总}}$ ），置于冰箱 7 d（温度为 10 °C），取出后过 0.22 μm 微孔滤膜，除去析出的药物，取续滤液进样测定蒙花苷的量（ M_{7d} ），计算 Bud-SH-NMs 沉降率。

$$\text{沉降率} = (M_{\text{总}} - M_{7d}) / M_{\text{总}}$$

2.4 粒径及 ζ 电位测定

取 Bud-SH-NMs 混悬液 0.1 mL 至空白离心管中，加入纯化水 5 mL，震荡混匀，于激光粒仪上测定粒径、多分散指数（polydispersity index, PDI）及 ζ 电位。

2.5 单因素实验考察 Bud-SH-NMs 制备处方工艺

2.5.1 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与蒙花苷用量比考察 固定蒙花苷用量为 5 mg，水合温度为 45 °C，水相体积为 10 mL，水合时间为 2 h，超声时间为 10 min 等条件不变，分别考察 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与蒙花苷用量比例的影响。结果见表 1，随着 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 载体用量的增加，Bud-SH-NMs 包封率先增加后趋稳，提示药物逐渐达饱和状态，但 Bud-SH-NMs 载药量逐渐下降。药物的沉降率呈明显的下降趋势，说明增加 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 载体用量可提高 Bud-SH-NMs 的稳定性^[15]。DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与蒙花苷用量比例对包封率、载药量和沉降率影响较大，后续对两者比例 5 : 1 ~ 10 : 1 进行优化。

2.5.2 水合体积的考察 固定蒙花苷用量为 5 mg，DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与蒙花苷用量比例为 8 : 1，水合

表 1 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与蒙花苷用量比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effects of dosage ratio of DSPE-PEG₂₀₀₀-SH to buddleioside ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

DSPE-PEG ₂₀₀₀ -SH 与蒙花苷用量比	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
3 : 1	52.03 ± 0.89	12.42 ± 0.34	23.42 ± 0.36
5 : 1	66.03 ± 1.27	10.75 ± 0.25	16.87 ± 0.22
8 : 1	74.66 ± 1.63	8.29 ± 0.19	5.42 ± 0.16
10 : 1	74.47 ± 1.58	6.78 ± 0.17	4.79 ± 0.11
12 : 1	75.08 ± 1.69	5.71 ± 0.17	4.28 ± 0.13

温度为 45 °C，水合时间为 2 h，超声时间为 10 min 等条件不变，分别考察水合体积的影响。结果见表 2。随着水合体积的增加，Bud-SH-NMs 包封率和载药量均呈现先增大后下降情况，可能是由于水合体积过小时影响水合效果^[15]，不利于载体材料包载药物。水合体积过大时使载体浓度下降，导致载体材料包载药物能力下降，同时沉降率上升，说明 Bud-SH-NMs 稳定性下降。可见水合体积对包封率、载药量和沉降率影响较大，后续对水合体积 5 ~ 15 mL 进行优化。

表 2 水合体积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

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

水合体积/mL	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
3	52.79 ± 0.87	6.47 ± 0.14	18.10 ± 0.30
5	65.46 ± 1.40	7.24 ± 0.23	12.16 ± 0.36
8	70.07 ± 1.52	7.69 ± 0.15	9.47 ± 0.21
10	73.82 ± 1.23	8.22 ± 0.22	5.13 ± 0.13
12	70.21 ± 1.34	8.03 ± 0.17	11.54 ± 0.19
15	67.80 ± 0.96	7.72 ± 0.20	15.19 ± 0.14
18	64.06 ± 1.04	7.18 ± 0.14	16.80 ± 0.23

2.5.3 水合温度的考察 固定蒙花苷用量为 5 mg，DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与蒙花苷用量比为 8 : 1，水相体积为 10 mL，水合时间为 2 h，超声时间为 10 min 等条件不变，分别考察水合温度的影响，结果见表 3。随着水合温度的升高，Bud-SH-NMs 包封率和载药量先增加后减小，说明合适的水合温度利于 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 包载药物。但温度达到 55 °C 时包封率、载药量均出现明显下降，沉降率明显上升，提示过高的温度可能会使胶束结构稳定性下降^[23]，药物容易泄露^[24]。可见水合温度影响较大，后续需对水合温度 35 ~ 55 °C 进行优化。

表 3 水合温度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水合温度/°C	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
30	51.94 ± 1.03	6.47 ± 0.17	10.12 ± 0.16
35	62.71 ± 1.65	6.99 ± 0.23	9.88 ± 0.20
40	70.43 ± 1.03	7.72 ± 0.14	10.04 ± 0.14
45	72.97 ± 0.94	8.26 ± 0.19	7.47 ± 0.19
50	78.72 ± 0.92	8.76 ± 0.21	5.91 ± 0.21
55	73.14 ± 1.08	8.32 ± 0.16	10.27 ± 0.18
60	64.26 ± 1.31	7.06 ± 0.18	17.42 ± 0.23

2.5.4 水合时间的考察 固定蒙花苷用量为 5 mg, DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与蒙花苷用量比为 8 : 1, 水合温度为 50 °C, 水相体积为 10 mL, 超声时间为 10 min 等条件不变, 分别考察水合时间的影响, 结果见表 4。适当的水合时间利于载体材料在水相中充分舒展, 进而包载药物。水合时间过长时可能影响 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 载体材料稳定性, 导致药物泄露, 沉降率上升。水合时间在 1.5~2.5 h 时, 包封率和载药量无显著性差异 ($P > 0.05$), 但水合时间为 2.0 h 时沉降率较小, 故确定水合时间为 2.0 h。

表 4 水合时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水合时间/h	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
0.5	66.47 ± 1.05	7.94 ± 0.18	10.17 ± 0.12
1.0	71.26 ± 1.58	8.23 ± 0.17	8.24 ± 0.16
1.5	79.18 ± 0.99	8.66 ± 0.20	6.27 ± 0.19
2.0	79.14 ± 1.15	8.73 ± 0.24	4.79 ± 0.20
2.5	79.05 ± 1.29	8.70 ± 0.15	7.20 ± 0.19
3.0	68.49 ± 1.36	7.87 ± 0.21	13.39 ± 0.17

2.5.5 超声时间的考察 前期对超声功率进行了考察, 发现超声功率大于 300 W 时胶束包封率、载药量均开始出现下降情况, 故选用超声功率为 250 W 进行制备, 并在此超声功率下考察超声时间的影响。固定蒙花苷用量为 5 mg, DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与蒙花苷用量比为 8 : 1, 水相体积为 10 mL, 水合温度为 50 °C, 水合时间为 2.0 h 等条件不变, 分别考察超声时间对胶束的影响, 结果见表 5。随着超声时间的增加, Bud-SH-NMs 的包封率和载药量均先减小后增大, 说明合适的超声时间利于载体包载药物, 但超声时间达 15 min 时两者均下降明显, 且沉降率升高, 说明过长的超声时间对纳米胶束具有破坏作用^[21], 稳定性下降。当超声时间为 12 min 时, 包封

表 5 超声时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
5	72.73 ± 1.54	7.86 ± 0.18	17.24 ± 0.23
8	74.59 ± 1.03	8.16 ± 0.21	11.01 ± 0.13
10	79.11 ± 1.26	8.81 ± 0.16	7.06 ± 0.14
12	83.69 ± 1.40	9.24 ± 0.19	5.19 ± 0.19
15	78.90 ± 1.08	8.67 ± 0.12	16.27 ± 0.24

率、载药量和沉降率均相对较佳, 故选择超声时间为 12 min。

2.6 BBD-RSM 优化 Bud-SH-NMs 处方

2.6.1 试验设计 据“2.5”项下单因素考察结果, DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与蒙花苷用量比、水合体积和水合温度对 Bud-SH-NMs 包封率、载药量和沉降率影响较大, 故分别作为自变量 X_1 、 X_2 和 X_3 , 包封率、载药量和沉降率分别作为因变量 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 , 各个自变量水平见表 6。

为了获得较大包封率及载药量, 同时沉降率较小的 Bud-SH-NMs 处方工艺, 故将包封率、载药量和沉降率作归一化处理, 计算总评归一值 (overall desirability, OD): ①包封率和载药量越大越好, 计算公式为 $d_{\max} = (M_i - M_{\min}) / (M_{\max} - M_{\min})$, M_{\max} 和 M_{\min} 分别为该组试验中最大值和最小值, M_i 为实际值。②沉降率越小越好, 计算公式为 $d_{\min} = (M_{\max} - M_i) / (M_{\max} - M_{\min})$ 计算; ③OD 值计算公式为 $OD = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k}$, k 为指标数。采用 BBD-RSM 优化 Bud-SH-NMs 处方, 结果见表 6。

2.6.2 模型的拟合、效应面优化与预测 使用 Design Expert V10.0.3 软件进行拟合, 得 OD 方程为 $OD = 0.960 - 0.010 X_1 - 0.034 X_2 - 8.880 \times 10^{-3} X_3 - 0.170 X_1 X_2 - 0.120 X_1 X_3 + 0.130 X_2 X_3 - 0.420 X_1^2 - 0.300 X_2^2 - 0.420 X_3^2$ 。方差分析结果见表 7, 模型具有极显著性差异 ($P < 0.000 1$), $R^2 = 0.998 9$, $R_{\text{adj}}^2 = 0.997 5$, 失拟项值为 $0.176 3 > 0.05$, 无显著性差异, 说明建立的数学模型可靠性高, 可用于 Bud-SH-NMs 处方工艺优化。

数学模型中 X_2 、 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 各项均有极显著性差异 ($P < 0.01$)。两两因素交互作用见图 2。得到的 Bud-SH-NMs 最佳处方为 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与药物用量比为 7.51 : 1, 水相体积为 9.69 mL, 水合温度 44.80 °C; 预测包封率为 89.22%, 载药量为 10.58%, 沉降率为 4.26%。

表 6 BBD-RSM 试验因素水平设计与结果 (n = 3)

Table 6 Factor level design and results of BBD-RSM (n = 3)

序号	X ₁	X ₂ /mL	X ₃ /°C	Y ₁ /%	Y ₂ /nm	Y ₃ /%	OD 值	序号	X ₁	X ₂ /mL	X ₃ /°C	Y ₁ /%	Y ₂ /nm	Y ₃ /%	OD 值
1	10.0 (+1)	5 (-1)	45 (0)	77.55	6.18	12.93	0.427	10	7.5	10	45	85.19	9.92	4.20	0.950
2	5.0 (-1)	5	45	45.62	5.86	17.51	0.122	11	7.5	15	35	60.74	7.01	20.83	0.099
3	10.0	15 (+1)	45	71.08	6.63	20.92	0.000	12	5.0	15	45	52.67	8.84	16.48	0.392
4	10.0	10 (0)	55 (+1)	62.01	5.46	18.46	0.000	13	7.5	15	55	63.86	7.52	18.99	0.320
5	7.5 (0)	10	45	84.81	10.09	8.60	0.975	14	7.5	10	45	83.56	10.11	4.31	0.974
6	5.0	10	55	50.16	7.94	19.34	0.229	15	7.5	10	45	85.74	10.23	4.42	0.970
7	7.5	5	35 (-1)	61.84	7.21	15.69	0.409	16	10.0	10	35	73.46	6.56	19.91	0.236
8	5.0	10	35	42.09	6.56	16.98	0.000	17	7.5	10	45	83.25	9.93	4.90	0.944
9	7.5	5	55	47.11	5.82	18.14	0.124								

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	2.36	9	0.26	710.16	<0.000 1	X ₁ ²	0.76	1	0.76	2 055.13	<0.000 1
X ₁	8.00×10 ⁻⁴	1	8.00×10 ⁻⁴	2.17	0.184 5	X ₂ ²	0.39	1	0.39	1 045.43	<0.000 1
X ₂	9.18×10 ⁻³	1	9.18×10 ⁻³	24.86	0.001 6	X ₃ ²	0.75	1	0.75	2 028.60	<0.000 1
X ₃	6.30×10 ⁻⁴	1	6.30×10 ⁻⁴	1.71	0.232 7	残差	2.58×10 ⁻³	7	3.69×10 ⁻³		
X ₁ X ₂	0.12	1	0.12	328.89	<0.000 1	失拟项	1.74×10 ⁻³	3	5.01×10 ⁻³	2.75	0.176 3
X ₁ X ₃	0.05	1	0.05	146.38	<0.000 1	绝对误差	8.43×10 ⁻⁴	4	2.11×10 ⁻⁴		
X ₂ X ₃	0.06	1	0.06	173.34	<0.000 1	总和	2.36	16			

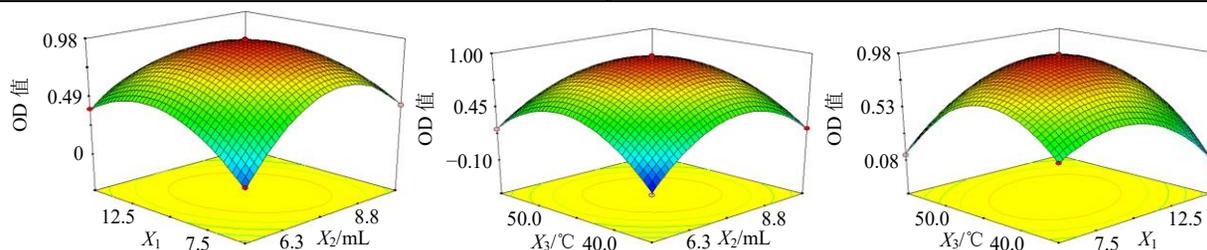


图 2 自变量 (X₁、X₂、X₃) 与响应值 (OD) 的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plot of independent factors (X₁, X₂, X₃) and response values (OD)

2.7 工艺验证

为了便于操作, 将 Bud-SH-NMs 的处方调整为 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 与药物用量比为 7.5 : 1, 水合体积为 9.7 mL, 水合温度 45 °C。平行制备 3 批 Bud-SH-NMs, 测定包封率、载药量及沉降率, 计算各个指标的相对偏差 [相对偏差=(实际值-预测值)/预测值]。结果见表 8, 各指标相对偏差均小于±5%, 因此建立的数学模型可靠性较高。测得 Bud-SH-NMs 的平均粒径为 (49.27±6.82) nm, 结果见图 3-A, 多分散指数 (PDI) 值为 0.082±0.009, ζ 电位为 (-18.53±1.12) mV, 结果见图 3-B。

2.8 TEM 观察

取 Bud-SH-NMs 混悬液 0.1 mL, 加入蒸馏水稀

表 8 预测值和实际值的比较 (x̄ ± s, n = 3)

Table 8 Comparison of predictive and actual value (x̄ ± s, n = 3)

项目	包封率/%	载药量/%	沉降率/%
实际值	90.86±1.78	10.76±0.24	4.14±0.29
预测值	89.22	10.58	4.26
相对偏差/%	1.84	1.70	-2.82

释 50 倍, 滴至铜网上, 采用 1.5%磷钨酸钠染色, 自然晾干后置于 TEM 下, 放大至 13 000 倍即可观察到 Bud-SH-NMs 的微观外貌, 拍照。结果见图 4, Bud-SH-NMs 粒子之间无黏连。激光粒度分析仪测得的是水合径, 而 TEM 需将样品干燥后测定, 故激光粒度分析仪测得粒径一般会大于 TEM。

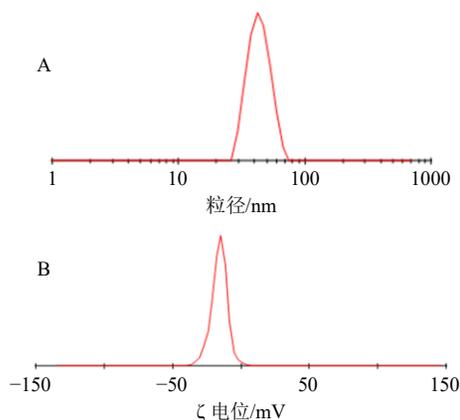


图3 Bud-SH-NMs的粒径分布(A)和 ζ 电位(B)

Fig. 3 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of Bud-SH-NMs

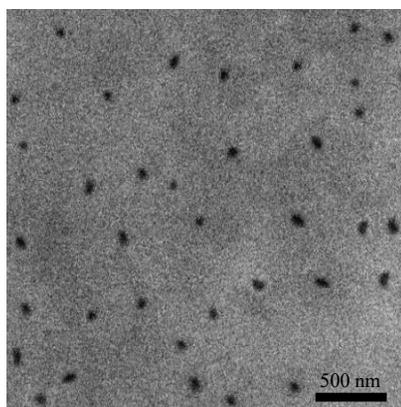
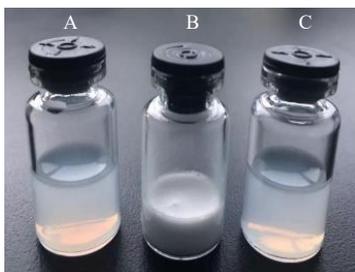


图4 Bud-SH-NMs的TEM图

Fig. 4 TEM picture of Bud-SH-NMs

2.9 Bud-SH-NMs冻干粉制备工艺

采用甘露醇作为冻干保护剂制备 Bud-SH-NMs 冻干粉。取 Bud-SH-NMs 混悬液，精密测量体积，加入质量浓度为 5%甘露醇，震荡溶解至澄清，分装至西林瓶中。于 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中预冻 3 d，取出，立即敞口置于 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻干机中，抽真空，冷冻干燥 2 d，取出即得 Bud-SH-NMs 冻干粉。Bud-SH-NMs 混悬液、冻干粉和蒸馏水复溶外观见图 5。



A-混悬液 B-冻干粉 C-蒸馏水复溶
A-suspension B-lyophilized powder C-redissolved by distilled water

图5 Bud-SH-NMs样品的外观

Fig. 5 Appearance of Bud-SH-NMs samples

3批 Bud-SH-NMs 冻干粉复溶后测得其平均包封率为 $(90.38 \pm 1.69)\%$ ，载药量为 $(10.51 \pm 0.17)\%$ ，沉降率为 $(4.54 \pm 0.29)\%$ ，粒径为 (56.91 ± 5.89) nm，PDI 值为 0.097 ± 0.009 ， ζ 电位为 (-17.94 ± 1.20) mV。

2.10 晶型研究

X 射线粉末衍射法 (X-ray powder diffraction method, XRPD) 对 Bud-SH-NMs 冻干粉晶型进行研究，采用 Cu-K α 靶，扫描速度为 $8^{\circ}/\text{min}$ ，角度 (2θ) 为 $3^{\circ} \sim 45^{\circ}$ 。取蒙花苷原料药、空白辅料、物理混合物 (比例同 Bud-SH-NMs 冻干粉，仅简单混合) 和 Bud-SH-NMs 冻干粉适量置于玻璃凹槽中，玻璃片压制平整，刮去凹槽外多余样品后置于 X 射线粉末衍射仪下扫描，结果见图 6。蒙花苷原料药有较多晶型峰，其中以 12.1° 、 15.6° 等处较强。物理混合物样品中仍可观察到这 2 处特征晶型峰，但其他晶型峰被甘露醇等辅料掩盖。Bud-SH-NMs 冻干粉的 XRPD 图谱仅可观察到空白辅料的晶型衍射峰，说明蒙花苷转变为无定型形式存在。

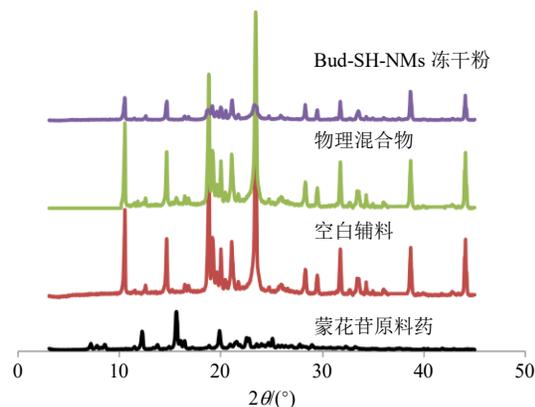


图6 Bud-SH-NMs样品的XRPD结果

Fig. 6 XRPD results of Bud-SH-NMs samples

2.11 溶解度的测定

取过量蒙花苷原料药、物理混合物 (药物与辅料比例同 Bud-SH-NMs 冻干粉) 和 Bud-SH-NMs 冻干粉置于 5 mL 的 pH 2.0 PBS 中，于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中磁力搅拌 48 h， $12\ 500\ \text{r}/\text{min}$ 离心 (离心半径 8.6 cm) 25 min，取上清液进样测定溶解度。同法测定蒙花苷原料药、物理混合物和 Bud-SH-NMs 冻干粉在 pH 6.8 PBS 中溶解度，结果见表 9。蒙花苷在物理混合物中溶解度有一定增加，可能与 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 等辅料增溶作用有关^[17]。蒙花苷在 Bud-SH-NMs 冻干粉溶解度得到极大提高，在 pH 2.0 PBS 和 pH 6.8 PBS 溶解度分别提高至 29.88 倍和 27.94 倍。

表9 溶解度测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

样品	溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	pH 2.0 PBS	pH 6.8 PBS
蒙花苷	0.24 ± 0.02	0.31 ± 0.03
物理混合物	0.63 ± 0.04	0.86 ± 0.05
Bud-SH-NMs 冻干粉	7.17 ± 0.12	8.66 ± 0.15

2.12 体外释药情况比较

取蒙花苷原料药、蒙花苷溶液 (DMSO 溶解) 和 Bud-SH-NMs 冻干粉适量, 使蒙花苷含量为 5 mg, 加入 4 mL 释放介质后置于透析袋中 (截留相对分子质量为 2500)。释药介质为 pH 2.0 PBS (含 0.5% SDS) 900 mL, 介质温度为 (37 ± 1) °C, 转速为 75 r/min, 取样点为 0、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、12、18、24、48 h 取样 3 mL, 补加空白释药介质 3 mL。样品经 12 500 r/min 离心 (离心半径 8.6 cm) 25 min, 进 HPLC 测定含量。同法考察在 pH 6.8 PBS (含 0.5% SDS) 中释药情况, 结果见图 7。蒙花苷溶液在 2 种释药介质中释药较快, 表明透析袋基本未吸附药物, 但蒙花苷原料药释药度均不足 15%。Bud-SH-NMs 冻干粉在 2 种释药介质中表现出明显的缓

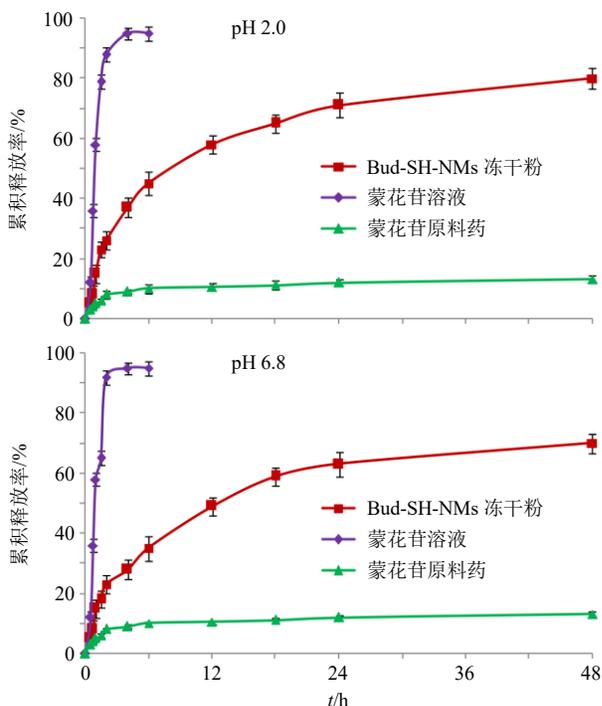


图7 蒙花苷原料药、蒙花苷溶液和 Bud-SH-NMs 冻干粉在 pH 2.0 PBS 和 pH 6.8 PBS 中的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 7 Release profiles *in vitro* of buddleside raw material, buddleside solution, and Bud-SH-NMs freeze-dried powder in pH 2.0 PBS and pH 6.8 PBS ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

释特征, 48 h 累积释放率分别为 80.46%和 69.57%。释药模型拟合结果见表 10, Bud-SH-NMs 体外释药过程均与 Weibull 模型拟合度最高, 说明体外释药过程是双相动力学特征^[13]。

表10 释放模型

Table 10 Fitting release model

介质	模型	拟合方程	R ²
pH 2.0 PBS	零级模型	$M_t/M_\infty = 0.010 4 t + 0.196 3$	0.798 4
	一级模型	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.023 7 t - 0.240 5$	0.952 1
	Higuchi 模型	$M_t/M_\infty = 0.095 6 t^{1/2} + 0.089 7$	0.952 3
pH 6.8 PBS	零级模型	$M_t/M_\infty = 0.013 2 t + 0.172 5$	0.765 5
	一级模型	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.024 1 t - 0.185 4$	0.876 7
	Higuchi 模型	$M_t/M_\infty = 0.107 3 t^{1/2} + 0.046 3$	0.946 2
	Weibull 模型	$\ln \ln [1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.634 4 \ln t - 2.003 6$	0.964 9
	Weibull 模型	$\ln \ln [1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.630 7 \ln t - 2.020 8$	0.954 3

t 为时间, M_t 为 t 时间累积释放率, M_∞ 为 $t \rightarrow \infty$ 时累积释放率, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率

t is time, M_t is the cumulative release rate at time t , M_∞ is the cumulative release rate at time ∞ , and M_t/M_∞ is the cumulative release percentage at time t

2.13 Bud-SH-NMs 冻干粉稳定性考察

取新制备 Bud-SH-NMs 冻干粉, 密封, 置于恒温恒湿箱中 (温度 30 °C, 湿度 65%), 取样点为 0、5、15、30、45、60、90 d, 分别测定包封率和沉降率, 结果见表 11。90 d 后 Bud-SH-NMs 冻干粉包封率仍大于 88%, 沉降率小于 5%, 可见 Bud-SH-NMs 冻干粉稳定性良好。

2.14 Bud-NMs 及其冻干粉的制备

参考 Bud-SH-NMs 最佳处方工艺, 采用未巯基化的载体材料 DSPE-PEG₂₀₀₀ 制备 Bud-NMs 混悬液。测得蒙花苷的包封率为 (92.47 ± 1.24)%, 载药量为 (10.94 ± 0.21)%, 沉降率为 (4.76 ± 0.22)%, 平均

表11 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Experimental results of stability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	包封率/%	沉降率/%	t/d	包封率/%	沉降率/%
0	90.38 ± 1.69	4.54 ± 0.29	45	88.93 ± 0.94	4.73 ± 0.27
5	91.09 ± 1.03	4.06 ± 0.32	60	89.07 ± 1.69	4.69 ± 0.31
15	89.72 ± 1.44	4.75 ± 0.36	90	88.16 ± 0.92	4.76 ± 0.34
30	90.35 ± 1.01	4.44 ± 0.26			

粒径为 (53.61 ± 5.90) nm, ζ 电位为 (-19.25 ± 1.09) mV。取 Bud-NMs 混悬液, 按“2.9”项下方法操作, 制备 Bud-NMs 冻干粉, 蒸馏水复溶后测得蒙花苷的平均包封率为 $(90.77 \pm 1.51)\%$, 载药量为 $(10.72 \pm 0.19)\%$, 沉降率为 $(5.04 \pm 0.27)\%$, 平均粒径为 (60.22 ± 6.19) nm, ζ 电位为 (-17.85 ± 1.31) mV。

2.15 药动学研究

2.15.1 ig 供试液的配制 取蒙花苷原料药、Bud-NMs 冻干粉末和 Bud-SH-NMs 冻干粉末适量, 分别采用 0.5% CMC-Na 水溶液配制灌胃液, 临用现配。

2.15.2 实验方案 取 SD 大鼠 18 只, 雌雄兼具, 随机分为蒙花苷原料药组、Bud-NMs 冻干粉末和 Bud-SH-NMs 冻干粉末组, 每组雌雄各半, 记录每只大鼠体重, 按 40 mg/kg 剂量 ig 给药 (以蒙花苷含量计)。蒙花苷原料药组 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8 h 采血, Bud-NMs 和 Bud-SH-NMs 组分别增加 10 h 和 12 h 取血点, 取血量均约 0.25 mL, 置于肝素浸润的离心管中, 3500 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 4 min, 防止溶血。取上层血浆至另一空白离心管中, 冷冻保存。

2.15.3 血样的处理 精密称取磺胺甲恶唑对照品 16 mg 转移至 100 mL 量瓶中, 加入甲醇稀释定容, 并采用甲醇稀释至 800 ng/mL 即得内标溶液。血浆样品置于 37 °C 水浴中解冻, 精密量取血浆样品 100 μ L 和磺胺甲恶唑内标溶液 50 μ L 至离心管中, 加入 2 mL 甲醇涡旋混匀 5 min, 6000 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 20 min。取上清液, 置于 37 °C 水浴中氮气缓慢吹干, 加入甲醇 100 μ L 涡旋 1 min 复溶, 6000 r/min 离心 20 min, 取上清液即得血浆样品^[11]。

2.15.4 血浆对照品标准曲线及线性范围 取质量浓度为 10 μ g/mL 蒙花苷对照品, 甲醇稀释配制成 2000、1000、500、250、100、50 ng/mL 的一系列质量浓度对照品溶液, 各个质量浓度精密量 100 μ L, 置于 37 °C 水浴中氮气缓慢吹干, 加入大鼠空白血浆 100 μ L 涡旋 1 min 复溶, 得蒙花苷质量浓度分别为 2000、1000、500、250、100、50 ng/mL 血浆对照品溶液。按“2.15.3”项下方法操作制备含磺胺甲恶唑内标的血浆对照品溶液, 进 HPLC 测定磺胺甲恶唑内标和蒙花苷峰面积。以两者峰面积比为纵坐标 (Y), 蒙花苷质量浓度为横坐标 (X), 线性回归后得方程: $Y=0.9875X+7.1562$, $r=0.9958$, 结果表明蒙花苷在 50~2000 ng/mL 存在线性关系。

2.15.5 专属性考察 蒙花苷血药浓度测定采用

“2.2.1”项下色谱条件。取空白血浆、血浆对照品溶液和 Bud-SH-NMs ig 12 h 血浆样品, 分别按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 结果见图 8, 表明血浆内源性物质未对内标和蒙花苷色谱峰产生干扰, 专属性较高。

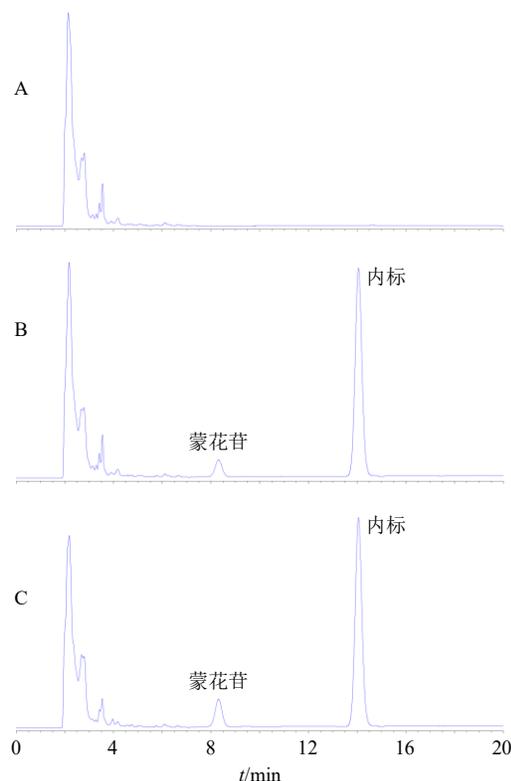


图 8 空白血浆 (A)、血浆对照品溶液 (B) 和血浆样品 (C) 的 HPLC 图

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

2.15.6 精密度考察 蒙花苷原料药 ig 1.5 h 蒙花苷质量浓度为 50、500、2000 ng/mL 血浆对照品溶液, 同 1 d 内连续进样 6 次, 计算得内标与蒙花苷峰面积比的 RSD 分别为 9.16%、3.83%、4.27%, 表明日内精密度良好; 连续测试 6 d, 计算得内标与蒙花苷峰面积比的 RSD 分别为 6.42%、5.67%、7.25%, 表明日间精密度良好。

2.15.7 稳定性考察 取蒙花苷原料药 ig 1.5 h 的血浆样品, 于 0、2、4、8、12、18、24 h 进样测定, 计算得内标与蒙花苷峰面积比的 RSD 为 6.09%, 表明血浆样品稳定性良好。

2.15.8 准确度考察 取质量浓度为 50、500、2000 ng/mL 蒙花苷对照品, 按“2.15.4”项下方法制备血浆对照品溶液, 按“2.15.3”项下方法进行处理后进 HPLC 测定内标与蒙花苷峰面积, 并计算两者比值,

带入 $Y=0.9875X+7.1562$ 方程计算测得质量浓度，以测得质量浓度与实际质量浓度相比计算回收率。平均回收率为 96.17%，RSD 为 2.97%，表明准确度较高。

2.15.9 定量限和检测限考察 取质量浓度为 50 ng/mL 的蒙花苷血浆对照品溶液，逐步稀释，以信噪比为 10 时测得定量限为 8 ng/mL，信噪比为 3 时测得检测限为 4 ng/mL。

2.15.10 药动学结果 药动学曲线见图 9，血药浓度数据用 DAS 2.0 软件非房室模型对数据进行分析，结果见表 12。与蒙花苷 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 AUC_{0-t}

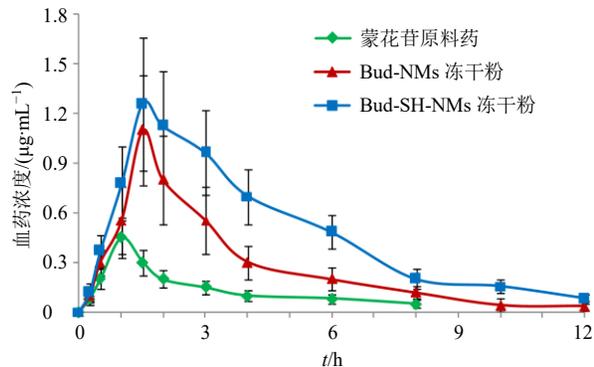


图 9 药时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

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

表 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	蒙花苷原料药	Bud-NMs 冻干粉	Bud-SH-NMs 冻干粉
t_{max}	h	0.93 ± 0.32	1.60 ± 0.51*	1.56 ± 0.46*
$t_{1/2}$	h	2.61 ± 0.88	3.87 ± 0.74*	5.93 ± 0.96***#
C_{max}	ng·mL ⁻¹	445.79 ± 81.06	1 182.34 ± 392.07**	1 259.46 ± 413.28**
AUC_{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	1 239.44 ± 389.12	4 456.91 ± 576.95**	6 324.90 ± 689.21***
$AUC_{0-\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	1 280.15 ± 403.34	4 601.36 ± 594.68**	6 588.75 ± 766.52***

与蒙花苷原料药比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Bud-NMs 比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs buddleoside drug substance; # $P < 0.05$ vs Bud-NMs

和 $AUC_{0-\infty}$ 等药动学参数相比，Bud-NMs 均有显著性改变 ($P < 0.05$ 、 0.01)，结果说明 Bud-NMs 改变了蒙花苷体内药动学行为，其中 t_{max} 显著性延后至 (1.60 ± 0.51) h， $t_{1/2}$ 延长至 (3.87 ± 0.74) h， C_{max} 和相对口服吸收生物利用度分别提高至 2.65 倍和 3.60 倍。Bud-SH-NMs 药动学参数也有显著性改变 ($P < 0.05$ 、 0.01)，其中 t_{max} 显著性延后至 (1.56 ± 0.46) h， $t_{1/2}$ 延长至 (5.93 ± 0.96) h， C_{max} 和相对口服吸收生物利用度分别提高至 2.83 倍和 5.10 倍。与 Bud-NMs 相比，Bud-SH-NMs 的 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 和 $AUC_{0-\infty}$ 均有显著性差异 ($P < 0.05$)，说明 Bud-SH-NMs 促吸收作用更大。

3 讨论

蒙花苷溶解度极差，前期曾采用泊洛沙姆^[22-23]、聚乙二醇单甲醚-聚乳酸共聚物^[13]、聚乙二醇聚己内酯^[14]等材料来制备纳米胶束，但载药效率均低于 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH。据报道^[25]，磷脂酰胆碱可与难溶性药物之间形成一种复合物，进而增加脂溶性溶解度。DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 结构中有磷脂酰胆碱母核结构，可能会对蒙花苷有一定的增溶作用，进而利于形成纳米胶束。

前期分别对乳化-溶剂挥发法、薄膜分散-超声

法等进行了比较^[24]，结果发现薄膜分散-超声法包封率及载药量较高，且操作简单、重复性良好。可能是由于药物与载体形成薄膜经水合后在疏水作用下药物更易吸附于两嵌段共聚物材料 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 的疏水链段 (DSPE 链段)，进而发生链间纠缠、缔合形成稳定结构的纳米胶束^[24]。

Bud-SH-NMs 冻干粉的 XRPD 研究结果显示，蒙花苷存在状态发生较大改变，由晶型状态转变为无定型状态，利于溶解度、溶出度及生物利用度的改善^[12]。蒙花苷在 Bud-SH-NMs 冻干粉溶解度得到极大提高，可能由于粒径极大下降、无定型存在状态以及 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 材料增溶等因素有关。可能由于 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 材料的包裹作用，药物扩散至释药介质阻力较大，也可能由于蒙花苷与 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 材料之间形成了某种作用力^[26]，对药物释放起到了较大的阻滞作用，从而导致 Bud-SH-NMs 体外释药具有明显的缓释特征，该释药形式可能会对药物体内药动学行为产生影响。

药动学结果显示，Bud-SH-NMs 的 t_{max} 显著性延后可能与载体材料的缓释作用有关^[27-28]，Bud-SH-NMs 粒径较小，容易吸附于胃肠道黏膜从而延缓了入血速度，巯基化的 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 材料可

与黏液层富含半胱氨酸区域形成二硫键进而增加滞留时间^[19,29], 最终导致 t_{\max} 发生显著性延后。

Bud-SH-NMs 的 $t_{1/2}$ 发生显著性延长, 可能由于 Bud-SH-NMs 结构稳定性较高, 可能以整体形式进入血液循环^[17], 在 Bud-SH-NMs 表面的 PEG 长链的长循环作用下从而导致 $t_{1/2}$ 延长, 利于维持血药浓度。Bud-SH-NMs 的 C_{\max} 和相对口服吸收生物利用度分别得到显著性提高, 可能是由于载体材料对药物的保护作用使蒙花苷免受体内各种酶、pH 值等因素的影响, 增加药物体内稳定性^[24]; Bud-SH-NMs 增加了蒙花苷的溶解度及溶出度, 利于药物体内吸收; $t_{1/2}$ 显著性延长增加了药物在体内的血药浓度水平, 有助于提高生物利用度; DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 材料中巯基可抑制 P-蛋白介导的外排作用^[20,30]; Bud-SH-NMs 表面的 PEG 长链增加了亲水性, 利于穿透胃肠道黏膜进入血液循环^[31], 最终提高了蒙花苷的口服吸收生物利用度。与 Bud-NMs 相比, Bud-SH-NMs 促吸收作用更大, 证明引入巯基化材料 DSPE-PEG₂₀₀₀-SH 是必要的^[29-30]。

综上, 本研究完成了 Bud-SH-NMs 处方工艺研究, 该纳米制剂体外缓释特征明显, 显著促进了口服吸收, 值得进一步研究。后续需对该纳米制剂继续进行组织分布、注射药动学、抗肿瘤药效学等研究, 并为蒙花苷制剂学研究提供借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘慧妍, 沈国滨. 一测多评法同时测定野菊花中 7 种成分 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2012-2017.
- [2] 高雅, 姚碧云, 周宗灿. 应用 T.E.S.T. 平台预测中草药重要成分的 LD₅₀、致突变性和发育毒性 [J]. 毒理学杂志, 2016, 30(5): 334-338.
- [3] 黄器伟, 黄涛, 牛美兰, 等. 蒙花苷通过调控 IKK/NF- κ B 信号通路抑制人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(12): 2194-2200.
- [4] 庄振杰, 罗燕, 苏洁, 等. 富含蒙花苷的野菊花提取物调节脂质组成及胆固醇代谢改善肝损伤的机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2020, 36(4): 108-114.
- [5] 苏洁, 俞静静, 颜美秋, 等. 基于主动脉 Ang II/AT1 通路研究蒙花苷对高血压血管重构的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 5003-5010.
- [6] 韩越, 许浚, 张铁军. 蒙花苷溶解度及油水分配系数的研究 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(2): 120-123.
- [7] 付金芳, 高青, 胡瑞瑞, 等. 蒙花苷磷脂复合物的制备及其药动学评价 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(16): 2039-2043.
- [8] Feng X C, Liu Y P, Wang X, et al. Analysis of linarin and its metabolites in rat urine by LC-MS/MS [J]. *Chromatographia*, 2014, 77(7): 571-579.
- [9] Feng X C, Liu Y P, Wang X, et al. Effects of piperine on the intestinal permeability and pharmacokinetics of linarin in rats [J]. *Molecules*, 2014, 19(5): 5624-5633.
- [10] Feng X C, Liu Y P, Wang X, et al. A rapid and sensitive LC-MS/MS method for the determination of linarin in small-volume rat plasma and tissue samples and its application to pharmacokinetic and tissue distribution study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(4): 618-624.
- [11] 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.
- [12] 朱卫丰, 况文亮, 李文栋, 等. 共载同源成分葛根素与大豆苷元的聚合物混合胶束的制备及表征 [J]. 中草药, 2022, 53(4): 1004-1012.
- [13] 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.
- [14] 王松, 汪茂胜, 周定荣, 等. 丹参酮 II_A 聚乙二醇-聚己内酯纳米胶束的制备、细胞内分布及减少心肌缺血再灌注损伤的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2141-2150.
- [15] 栗忠强, 决利利, 万亚存, 等. 高良姜素纳米胶束制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(5): 1410-1416.
- [16] 李燕红, 张春燕, 陈乾. DSPE-mPEG2000 修饰荷叶碱脂质体制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(8): 2457-2464.
- [17] 颜寅萍. 灯盏花素 DSPE-PEG 聚合物胶束的研究 [D]. 大理: 大理大学, 2020.
- [18] 杨栋梁. 共轭聚合物荧光探针及其离子检测与生物成像研究 [D]. 南京: 南京邮电大学, 2018.
- [19] 方桂花. 巯基化纳米结构脂质载体提高多西他赛口服吸收的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2016.
- [20] Iqbal J, Hombach J, Matuszczak B, et al. Design and *in vitro* evaluation of a novel polymeric P-glycoprotein (P-gp) inhibitor [J]. *J Control Release*, 2010, 147(1): 62-69.
- [21] 曾雅文, 宗琦, 刘佳, 等. 载多西紫杉醇的 F3 多肽靶向单分子胶束的制备和体外评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(15): 1519-1523.
- [22] 韩德恩, 申延利, 田萍, 等. Box-Behnken 响应面法优化白藜芦醇 Labrasol/P407 混合胶束处方工艺及体外评价 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3209-3215.
- [23] 胡悦, 孙敬蒙, 卢美彤, 等. 辛伐他汀泊洛沙姆 P123/F127 混合胶束的制备及表征 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(18): 1823-1829.

- [24] 杜艳, 杜丽. 姜黄素聚合物胶束的制备及抗肿瘤活性评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(2): 181-185.
- [25] 尚曙玉, 张铁山, 杨娟, 等. 田蓟苷-磷脂酰胆碱复合物的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2022, 44(9): 2757-2762.
- [26] Hu W D, Mao A, Wong P, *et al.* Characterization of 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy (polyethylene glycol)-2000] and its complex with doxorubicin using nuclear magnetic resonance spectroscopy and molecular dynamics [J]. *Bioconjugate Chem*, 2017, 28(6): 1777-1790.
- [27] 尚慧杰, 杨金枝, 张付利. 岩白菜素 Soluplus/TPGS 混合胶束的制备、表征及体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(11): 1248-1254.
- [28] 张菊, 魏丹, 张雪, 等. 蝙蝠葛碱复合纳米胶束的制备及大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2276-2284.
- [29] 廉鹤. 功能性巯基化聚合物胶束口服药物传递系统的构建与评价 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2014.
- [30] 蒋丽琴, 张超, 王海, 等. 巯基化壳聚糖修饰的 PLA-PCL-TPGS 纳米粒用于肺癌口服化疗药物载体的研究 [J]. 国际生物医学工程杂志, 2017, 40(5): 331-338.
- [31] 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.
- [32] 周敬, 郑宝玉, 李阳杰, 等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4455-4466.

[责任编辑 郑礼胜]