

花旗松素磷脂复合物白蛋白纳米粒的构建及其肠吸收研究

张佳慧¹, 孙敬蒙², 张鑫¹, 张诗雨¹, 张欣¹, 张炜煜^{1*}

1. 长春中医药大学药学院, 吉林 长春 130117

2. 吉林大学第一医院 临床药学部, 吉林 长春 130061

摘要: 目的 构建花旗松素磷脂复合物白蛋白纳米粒 (taxifolin phospholipid complex albumin nanoparticles, Tax-PC/BSA NPs) 并优化其制备工艺, 考察其肠吸收特性。方法 采用溶剂挥发法和新型白蛋白纳米粒制备技术 (NabTM 技术) 制备花旗松素磷脂复合物白蛋白纳米粒。采用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM), 优化其制备工艺并验证; 以透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)、粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位、差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC)、傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 及 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 技术对 Tax-PC/BSA NPs 进行表征, 测定理化性质并考察制剂稳定性; 体外模拟消化释放, 探讨制剂在人体消化环境的释放规律; 大鼠在体单向肠灌流模型评价 Tax-PC/BSA NPs 肠吸收特性。结果 Tax-PC/BSA NPs 的最优制备工艺为药脂比 1:3, 药/BSA 比 1:9.39, 油水比 1:11.51, 超声时间 7.76 min; 3 次验证实验结果显示, Tax-PC/BSA NPs 的封装率为 (86.14 $\pm$ 0.38)%, 载药量为 (7.27 $\pm$ 0.03)%, 渗漏率为 (0.87 $\pm$ 0.04)%。按优化后工艺所制 Tax-PC/BSA NPs 在 TEM 下呈类球状, 平均粒径为 (184.90 $\pm$ 0.98) nm、PDI 为 0.275 $\pm$ 0.010、 ζ 电位为 (-36.6 $\pm$ 0.53) mV, DSC、FT-IR、XRD 进一步验证了 Tax-PC/BSA NPs 的形成; Tax-PC/BSA NPs 溶解度相较花旗松素提高了 38.48 倍, lg*P* 值>1, 脂溶性明显提高; Tax-PC/BSA NPs 冻干粉在 4℃下存放 3 个月稳定性良好; 花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 累积释放率分别为 (48.26 $\pm$ 0.71)%, (71.86 $\pm$ 1.83)%, (82.73 $\pm$ 0.62)%; Tax-PC/BSA NPs、Tax-PC 和花旗松素在各肠段均有吸收, 主要吸收部位分别为十二指肠和空肠, Tax-PC/BSA NPs 的吸收速率常数和表观吸收系数均显著高于 Tax-PC 和花旗松素 ($P<0.05$ 、 0.01)。结论 优化所得 Tax-PC/BSA NPs 制备工艺稳定、可行; 所制 Tax-PC/BSA NPs 有效提高药物的脂溶性、水溶性, 增强药物在体肠吸收能力。

关键词: 花旗松素; 磷脂复合物; 白蛋白; 纳米粒; 制备工艺; 肠吸收特性; 单向肠灌流模型

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)24-8043-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.009

Construction and intestinal absorption of taxifolin phospholipid complex albumin nanoparticles

ZHANG Jia-hui¹, SUN Jing-meng², ZHANG Xin¹, ZHANG Shi-yu¹, ZHANG Xin¹, ZHANG Wei-yu¹

1. Pharmacy College, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Department of Clinical Pharmacy, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130061, China

Abstract: Objective To construct taxifolin phospholipid complex albumin nanoparticles (Tax-PC/BSA NPs) and optimize its preparation technology, and investigate its intestinal absorption characteristics. **Methods** Tax-PC/BSA NPs were prepared by solvent evaporation method and nanoparticle-albumin bound technology (NabTM). Box-Behnken design-response surface method (BBD-RSM) was used to optimize the preparation process and verify it. Tax-PC/BSA NPs were characterized by transmission electron microscope (TEM), particle size, polydispersity index (PDI), ζ potential, differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray diffraction (XRD) to determine the physicochemical properties and to investigate the stability of the formulation. The absorption characteristics of Tax-PC/BSA NPs were investigated to investigate the release rule of the preparation in human digestive environment. The intestinal absorption characteristics of Tax-PC/BSA NPs were evaluated in rats with unidirectional

收稿日期: 2023-06-08

基金项目: 吉林省科技发展规划项目 (YDZJ202201ZYT5628); 长春中医药大学研究生精品示范课程建设创新示范项目 (2022JP06)

作者简介: 张佳慧, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型与新型给药系统。E-mail: jiahuihang094@163.com

*通信作者: 张炜煜, 女, 硕士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为药物新剂型与新型给药系统。E-mail: weiyuzhang2003@126.com

intestinal perfusion model in situ. **Results** The optimal preparation process of Tax-PC/BSA NPs included drug-phosphorus ratio of 1:3, drug/BSA ratio of 1:9.39, oil-water ratio of 1:11.51, and sonication time of 7.76 min. Results of three validation experiments showed that the encapsulation efficiency of Tax-PC/BSA NPs was $(86.14 \pm 0.38)\%$, the drug loading was $(7.27 \pm 0.03)\%$, and the leakage rate was $(0.87 \pm 0.04)\%$. The Tax-PC/BSA NPs prepared by the optimal process were spherical, the average particle size was (184.90 ± 0.98) nm, the PDI was 0.275 ± 0.010 , and the ζ potential was (-36.60 ± 0.53) mV. The formation of Tax-PC/BSA NPs was further verified by DSC, FT-IR, and XRD. The solubility of Tax-PC/BSA NPs increased 38.48 times compared with Tax, $\lg P > 1$, and lipid solubility was significantly improved; Tax-PC/BSA NPs lyophilized powder was stable at 4°C for 3 months. The cumulative release rates of Tax, Tax-PC, and Tax-PC/BSA NPs were $(48.26 \pm 0.71)\%$, $(71.86 \pm 1.83)\%$, $(82.73 \pm 0.62)\%$, respectively. Tax-PC/BSA NPs, Tax-PC and Tax were absorbed in all intestinal segments, and the main absorption sites were duodenum and jejunum, and the absorption rate constants and apparent absorption coefficients of Tax-PC/BSA NPs were significantly higher than those of Tax-PC and Tax ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The optimized preparation technology of Tax-PC/BSA NPs is stable and feasible; prepared Tax-PC/BSA NPs effectively improved the liposolubility and water-solubility of the drug, and enhanced the absorption of the drug in the body intestine.

Key words: taxifolin; phospholipid complex; albumin; nanoparticles; preparation technology; intestinal absorption characteristics; unidirectional intestinal perfusion model

花旗松素又名二氢槲皮素、紫杉叶素，是一种二氢黄酮醇类化合物，为国家卫生健康委员会发布的 2021 年第 5 号文件批准的新食品原料；广泛存在于水飞蓟、落叶松、土茯苓和黄杞叶等 50 多种植物体内^[1]。花旗松素具备多种生物学活性，如抗氧化^[2]、抗病毒^[3]、抗炎^[4]、抗肿瘤^[5]等，具备很好的医药开发潜能，美国、俄罗斯、日本等国家以花旗松素为原料开发出多种药用、食用产品。但该成分水溶性低^[6]、脂溶性差^[7]，肠道通透性差，导致口服吸收受限，从而影响临床疗效，限制其开发应用。现代研究开发了多种新型给药制剂，用于增强花旗松素的溶解度，包括脂质体^[8]、纳米粒^[9]、包合物^[10]等。然而，仅提高其溶解度没有改善其渗透性，仍不能满足其功效发挥。因此，构建新型给药系统，协同改善其溶解性和膜渗透性，提高花旗松素体外溶出及体内吸收程度是当前口服给药途径研究的关键问题。

磷脂复合物白蛋白纳米粒是一种新型二元给药系统，能够提高药物的水溶性、脂溶性及体外溶出和体内吸收情况，而且磷脂和白蛋白均属于食品级辅料，因此将花旗松素制备成磷脂复合物白蛋白纳米粒，能提高花旗松素的功效。磷脂作为人体细胞膜的重要组成成分，能够提高药物与机体内胃肠道黏膜的生物相容性与亲和力，增加渗透性和滞留效应^[11]。特别是天然磷脂，能够直接从大豆或蛋黄中提取，生物安全性良好^[12]。白蛋白属于高度水溶性蛋白质，空间上具有网状结构和疏水区域，且携带多种药物结合位点，便于包载疏水性药物，具备提高药物溶解度的独特优势^[13]。通常自牛血清、人血

清或重组技术中获得，其中牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）凭借其丰富性、低成本、易纯化等特性被制药行业广泛接受。本研究首次将花旗松素载入磷脂复合物白蛋白纳米粒中，并采用 Box-Behnken 设计（Box-Behnken design, BBD）-响应面法（response surface method, RSM）优化花旗松素磷脂复合物白蛋白纳米粒（taxifolin phospholipid complex albumin nanoparticles, Tax-PC/BSA NPs）的制备工艺，并对其进行质量评价；同时，通过大鼠在体单向肠灌流模型来评价 Tax-PC/BSA NPs 的肠道吸收特性，为花旗松素制剂的进一步研发和应用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪，安捷伦科技有限公司；TGL-18C 型高速台式离心机，上海安亭科学仪器厂；Scientz-II D 型超声波细胞粉碎机，宁波新芝生物科技股份有限公司；RE-52AA 型旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂；Epsilon 2-4 LSC plus 型冷冻干燥机，德国 Christ 公司；Infinite M200 Pro 型酶标仪，瑞士 Tecan 公司；DSC3 型差示扫描量热（differential scanning calorimetry, DSC）仪，瑞士 Mettler Toledo 公司；FTIR-8400S 型傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR）仪，日本岛津公司；XRD-7000 X 型射线衍射仪，日本 Shimadzu 公司；H-7650 型透射电子显微镜（transmission electron microscope, TEM），Hitachi 公司；Zetasizer Nano ZS 型动态光散射仪，英国 Malvern 公司；BS100-1A 型基本型蠕动泵，保定思

诺流体科技有限公司; DKZ-2 型电热恒温振荡水槽, 上海精宏实验设备有限公司。

1.2 药品与试剂

花旗松素对照品, 批号 111816-201102, HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$, 购自中国食品药品检定研究院; 花旗松素原料药, 批号 20191208, 质量分数 $\geq 90\%$, 购自吉林健维天然生物科技有限公司; 大豆卵磷脂(批号 S30870, 质量分数 $\geq 90\%$)、BSA(批号 S12012, 生物试剂, 质量分数 98%)、胃蛋白酶(批号 S10027)、胰蛋白酶(批号 S23119)、磷酸二氢钾(批号 S24278, 分析纯, 质量分数 99%)、磷酸氢二钾(批号 S24279, 分析纯, 质量分数 99%)均购自上海源叶生物科技有限公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 无水乙醇、二氯甲烷、正辛醇均为分析纯, 水为纯化水。

1.3 实验动物

本研究所用实验动物为 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量为 180~200 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 动物生产许可证号为 SCXK(辽)2020-0001, 动物实验经长春中医药大学实验动物伦理委员会批准, 批准文号 2023191。

2 方法与结果

2.1 花旗松素磷脂复合物(taxifolin phospholipid complex, Tax-PC)的制备

采用溶剂挥发法制备 Tax-PC。取适量花旗松素和大豆卵磷脂溶于有机溶剂, 恒温磁力搅拌一段时间后, 旋转蒸发除去有机溶剂, 加入适量二氯甲烷复溶, 抽滤, 减压干燥, 即得 Tax-PC。

2.2 Tax-PC/BSA NPs 及其冻干粉制备

经过前期实验筛选, 采用新型白蛋白纳米粒制备技术(NabTM 技术)制备 Tax-PC/BSA NPs。取 Tax-PC 以二氯甲烷溶解, 得油相; 取处方量的 BSA 加入纯水溶解, 得水相; 将油、水两相混合, 采用超声波细胞粉碎机超声一定时间, 旋转蒸发去除有机溶剂, 即得 Tax-PC/BSA NPs。同样方法制备不含药物的空白 PC/BSA NPs。将 Tax-PC/BSA NPs 置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冻 24 h, 放入冷冻干燥机(温度 $< -40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 真空度 $< 20\text{ Pa}$)36 h 后取出, 称定质量, 即得 Tax-PC/BSA NPs 冻干粉。同样方法制备不含药物的空白 PC/BSA NPs 冻干粉。

2.3 花旗松素含量测定

2.3.1 色谱条件 以 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱为色谱柱; 乙腈-水(22:78)为流动相; 检测波长 290

nm; 柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$; 体积流量 1.0 mL/min 。

2.3.2 对照品溶液的制备 取花旗松素对照品 2.5 mg 置于 25 mL 量瓶内, 甲醇溶解并定容, 摇匀, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 即得含花旗松素 0.1 mg/mL 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取 Tax-PC/BSA NPs 混悬液 5 mL , 置于 25 mL 量瓶内, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 得供试品溶液。同法制备空白溶液。

2.3.4 专属性考察 取适量对照品溶液、供试品溶液及空白溶液, 按“2.3.1”项下方法进行分析, 记录色谱图, 结果见图 1。结果花旗松素色谱峰峰形良好, 且测定不受辅料和溶剂的干扰, 专属性良好。

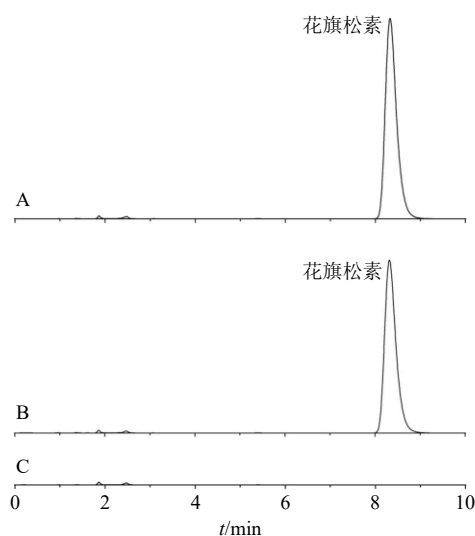


图 1 花旗松素对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和空白溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of taxifolin reference substance (A), test solution (B) and blank solution (C)

2.3.5 线性关系考察 精密吸取“2.3.2”项下对照品溶液适量, 分别加甲醇稀释至质量浓度梯度为 100、50、25、12.5、6.3、 $3.1\text{ }\mu\text{g/mL}$, 按“2.3.1”项下方法测定各质量浓度下样品含量, 以对照品质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 得花旗松素的线性回归方程为 $Y=47.899X-0.0351$, $R^2=0.9999$, 提示花旗松素在 $3.1\sim 100.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.3.6 精密度试验 取“2.3.3”项下供试品溶液适量, 分别加甲醇稀释至质量浓度梯度为 75、50、 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$, 在“2.3.1”项色谱条件下 1 d 内测定 5 次, 日内精密度 RSD 分别为 1.75%、1.25%、1.42%, 表

明日内精密度良好;连续测定 5 d, 日间精密度 RSD 分别为 1.42%、1.11%、0.85%, 表明日间精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液适量, 分别在室温下放置 0、2、4、6、12、24 h, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 结果花旗松素峰面积的 RSD 为 1.25%, 表明稳定性良好。

2.3.8 重复性试验 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 结果花旗松素质量分数的 RSD 为 1.06%, 表明重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 取“2.3.3”项下供试品溶液适量, 分别加入低、中、高不同质量浓度的花旗松素对照品溶液, 得到含药质量浓度梯度为 80、100、120 $\mu\text{g/mL}$ 的回收率样品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 结果花旗松素的回收率在 97%~101%, 平均加样回收率为 99.22%, RSD 为 0.82%, 表明该方法符合检测要求。

2.4 复合率的测定

取 Tax-PC 加甲醇超声溶解, 稀释适当倍数, 进样测定, 记录峰面积, 按公式计算复合率。

$$\text{复合率} = m_1/m_0$$

m_1 为测定的花旗松素含量, m_0 为投药量

2.5 药脂比的筛选

根据 Tax-PC 的复合率, 对不同药脂比 2:1、1:1、1:2、1:3、1:4 进行筛选。结果如表 1 所示, 随磷脂占比增高复合率逐渐增大, 当药脂比达 1:3 后, 复合率增长减缓。观察各比例下的 TAX-PC, 磷脂用量增大, 复合物干燥效率降低, 且易出现黏结现象。综合考虑确定 1:3 为最佳药脂比。

2.6 包封率、载药量和渗漏率的测定

经前期实验考察, 采用高速离心法, 设定条件离心转速 14 000 r/min, 离心时间 20 min 进行 Tax-PC/BSA NPs 的包封率、载药量和渗漏率测定, 在该条件下纳米粒和游离药物得到了有效分离, 同时不

影响纳米粒结构稳定性。取 Tax-PC/BSA NPs 1 mL 于超滤离心管, 甲醇破乳并定容, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 测定包封与未包封的花旗松素总药量 (m); 取 Tax-PC/BSA NPs 1 mL, 置 EP 管中, 14 000 r/min 离心 20 min, 取上清液 200 μL 于 2 mL 量瓶, 甲醇定容, 测定游离药量 ($m_{\text{游}}$), 进样测定含量, 按公式计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (m - m_{\text{游}})/m$$

$$\text{载药量} = (m - m_{\text{游}})/m_{\text{纳}}$$

$m_{\text{纳}}$ 为 Tax-PC/BSA NPs 冻干粉质量

分别取新鲜制备的及置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内储存 48 h 后的 Tax-PC/BSA NPs 混悬液, 在 14 000 r/min 条件下离心 20 min, 按公式计算纳米粒渗漏率。

$$\text{渗漏率} = (m_{48} - m_{\text{游}})/(m - m_{\text{游}})$$

m_{48} 为经 48 h 沉降后的 Tax-PC/BSA NPs 混悬液药物含量,

$m_{\text{游}}$ 为游离药量, m 为投药量

2.7 BBD-RSM 优化 Tax-PC/BSA NPs 的处方工艺

2.7.1 BBD 实验设计与结果 以总评归一值 (OD) 作为工艺优化的评价指标。采用数学转换计算归一值 (d), 其中渗漏率取值小为优, 包封率和载药量取值大为优。公式分别如下。

$$d_1 \text{ 或 } d_2 = (Y_1 - Y_{\min})/(Y_{\max} - Y_{\min})$$

$$d_3 = (Y_{\max} - Y_1)/(Y_{\max} - Y_{\min})$$

d_1 、 d_2 、 d_3 分别为 Tax-PC/BSA NPs 的包封率、载药量及渗漏率的归一值, Y_1 为实测值, $Y_{\max}$ 、 $Y_{\min}$ 分别是包封率、载药量及渗漏率的实测最大值和最小值

将各指标的 d 值按下列公式计算, 得 OD 值。

$$\text{OD} = d_1 d_2 d_3 / 3$$

在单因素实验的基础上, 选择药/BSA 比 (X_1)、油水比 (X_2)、超声时间 (X_3) 进行 3 因素 3 水平的分析实验。BBD 实验设计的因素与水平、安排与结果见表 2。

2.7.2 BBD 实验设计数据分析 对表 2 数据进行统计分析, 通过拟合得二元多项回归方程为 $\text{OD} = 0.768 0 + 0.206 2 X_1 + 0.058 8 X_2 - 0.062 5 X_3 - 0.002 5 X_1 X_2 + 0.040 0 X_1 X_3 - 0.225 0 X_2 X_3 - 0.132 8 X_1^2 - 0.242 8 X_2^2 - 0.300 3 X_3^2$, $R^2 = 0.990 2$ 。对回归方程进行方差分析, 结果如表 3 所示, 所建立的回归模型具有显著性 ($P < 0.01$), 表明该模型具有统计学意义。失拟项无显著性 ($P > 0.05$), 说明模型拟合度良好, 可用于分析和预测最优工艺。采用软件绘制等高线图和三维响应面图, 结果见图 2。最终通过软件分析优化得到最优处方为药/BSA 比 1:9.39,

表 1 药脂比的筛选结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Screening results of drug-phosphorus ratio ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

药脂比	复合率/%	药脂比	复合率/%
2:1	60.72 $\pm$ 0.28**	1:3	89.12 $\pm$ 0.69
1:1	70.83 $\pm$ 0.60**	1:4	89.69 $\pm$ 0.69
1:2	84.60 $\pm$ 0.18**		

与药脂比 1:3 组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs drug to lipid ratio 1:3 group

表 2 BBD 实验设计的安排与结果

Table 2 Arrangements and results of BBD experimental design

序号	X_1	X_2	X_3/min	包封率/%	载药量/%	渗漏率/%	OD 值
1	1 : 7.5 (0)	1 : 11 (0)	8 (0)	85.36±0.39	7.18±0.03	1.10±0.03	0.78
2	1 : 5 (-1)	1 : 11 (0)	10 (+1)	80.39±0.45	5.59±0.03	3.49±0.04	0.00
3	1 : 7.5 (0)	1 : 11 (0)	8 (0)	85.54±0.13	7.19±0.01	0.98±0.03	0.79
4	1 : 10 (+1)	1 : 14 (+1)	8 (0)	82.01±0.11	8.73±0.11	7.98±0.10	0.61
5	1 : 10 (+1)	1 : 11 (0)	6 (-1)	83.00±0.02	8.84±0.23	9.06±0.01	0.59
6	1 : 7.5 (0)	1 : 11 (0)	8 (0)	85.13±0.25	7.16±0.02	0.91±0.02	0.77
7	1 : 7.5 (0)	1 : 14 (+1)	6 (-1)	84.84±0.12	7.14±0.11	7.16±0.08	0.59
8	1 : 5 (-1)	1 : 14 (+1)	8 (0)	82.01±0.11	8.73±0.11	7.98±0.10	0.61
9	1 : 10 (+1)	1 : 11 (0)	10 (+1)	79.67±0.19	8.48±0.02	5.29±0.11	0.56
10	1 : 7.5 (0)	1 : 8 (-1)	10 (+1)	78.16±0.36	6.57±0.30	4.00±0.04	0.31
11	1 : 7.5 (0)	1 : 14 (+1)	10 (+1)	83.02±0.08	6.98±0.07	12.59±0.09	0.00
12	1 : 5 (-1)	1 : 11 (0)	6 (-1)	81.67±0.02	5.68±0.13	6.93±0.03	0.19
13	1 : 7.5 (0)	1 : 11 (0)	8 (0)	84.39±0.32	7.01±0.03	1.09±0.07	0.72
14	1 : 7.5 (0)	1 : 11 (0)	8 (0)	85.22±0.07	7.17±0.06	0.81±0.05	0.78
15	1 : 7.5 (0)	1 : 8 (-1)	6 (-1)	77.01±0.26	6.48±0.02	2.31±0.07	0.00
16	1 : 5 (-1)	1 : 8 (-1)	8 (0)	81.52±0.25	5.67±0.18	8.00±0.06	0.17
17	1 : 10 (+1)	1 : 8 (-1)	8 (0)	78.49±0.12	8.35±0.01	1.44±0.02	0.52

表 3 BBD 实验设计的方差分析结果

Table 3 ANOVA results of BBD experimental design

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1.380 0	9	0.153 2	63.830 0	<0.000 1	极显著	X_1^2	0.074 2	1	0.074 2	30.910 0	0.000 9	极显著
X_1	0.340 3	1	0.340 3	141.750 0	<0.000 1	极显著	X_2^2	0.367 0	1	0.367 0	152.890 0	<0.000 1	极显著
X_2	0.033 8	1	0.033 8	14.080 0	0.007 1	极显著	X_3^2	0.258 4	1	0.258 4	107.650 0	<0.000 1	极显著
X_3	0.025 3	1	0.025 3	10.540 0	0.014 1	显著	残差	0.016 8	7	0.002 4			
X_1X_2	0.004 9	1	0.004 9	2.040 0	0.196 2		失拟项	0.013 7	3	0.004 6	5.940 0	0.059 0	不显著
X_1X_3	0.000 2	1	0.000 2	0.093 7	0.768 4		纯误差	0.003 1	4	0.000 8			
X_2X_3	0.202 5	1	0.202 5	84.350 0	<0.000 1	极显著	总离差	1.400 0	16				

油水比 1 : 11.51, 超声时间 7.76 min。

2.8 Tax-PC/BSA NPs 最优处方工艺的验证

根据响应面实验结果, 按照最优工艺平行制备 3 批 Tax-PC/BSA NPs 混悬液, 结果如表 4 所示, 3 批 Tax-PC/BSA NPs 混悬液平均 OD 值为 0.82, 与预测 OD 值 0.85 相对偏差较小, 预测性良好, 综上所述表明 Tax-PC/BSA NPs 最优制备工艺稳定可靠。

2.9 Tax-PC/BSA NPs 的表征

2.9.1 TEM 观察 分别取空白 PC/BSA NPs 与 Tax-PC/BSA NPs 溶液, 滴加于覆盖碳膜铜网上, 以 2% 磷钨酸染色 3 min, 干燥后于 TEM 下观察, 可见空白 PC/BSA NPs 和载药纳米粒 (Tax-PC/BSA NPs)

均为形态规整的类球形, 且无黏连聚集现象 (图 3)。

2.9.2 粒径、PDI 与 ζ 电位测定 取 Tax-PC/BSA NPs 及空白纳米粒溶液适量, 置于动态光散射仪样品池中, 测定其粒径、 ζ 电位以及 PDI。结果显示, 空白 PC/BSA NPs 的平均粒径为 (158.00±1.55) nm、PDI 为 0.190±0.010 及 ζ 电位为 (-32.60±0.35) mV, Tax-PC/BSA NPs 的平均粒径为 (184.90±0.98) nm、PDI 为 0.275±0.010 及 ζ 电位为 (-36.60±0.53) mV, 见图 4。

2.9.3 DSC 取花旗松素、大豆卵磷脂、BSA、物理混合物、TAX-PC、空白 PC/BSA NPs 冻干粉、Tax-PC/BSA NPs 冻干粉各 5.0 mg 置铝坩埚中, 以空白

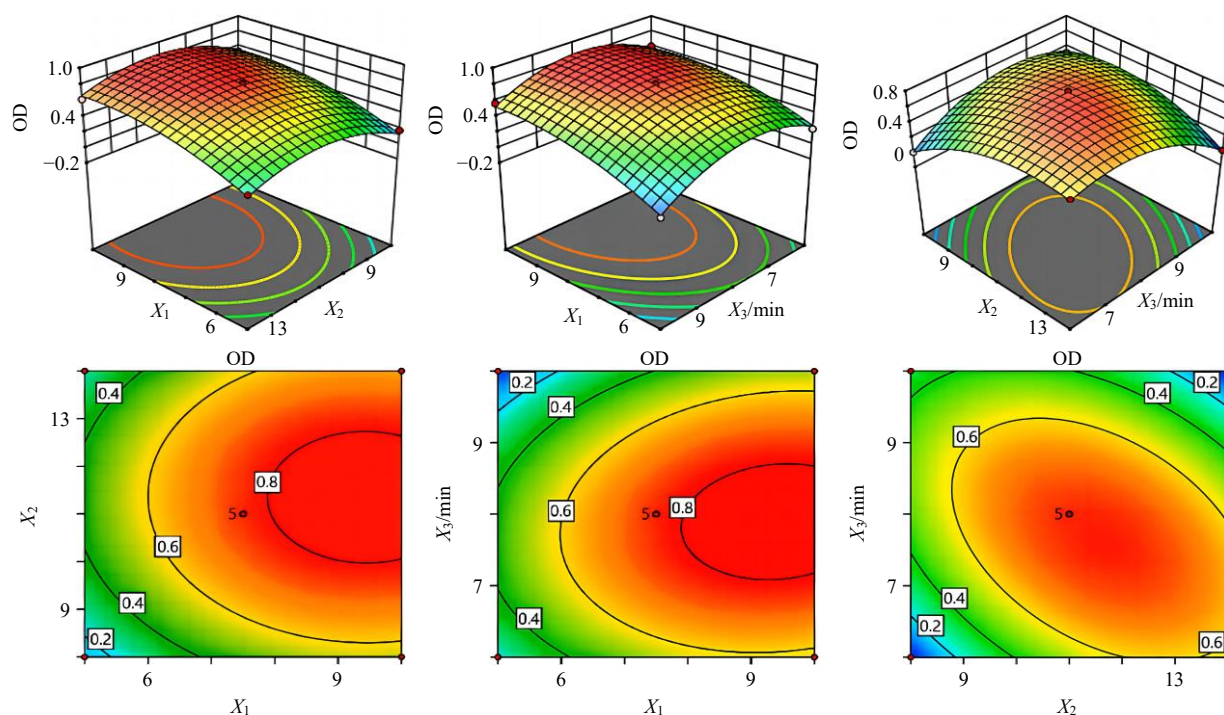


图 2 各因素间影响 OD 值的响应曲面及等高线图

Fig. 2 Response surface and contour map of various factors affecting OD value

表 4 验证试验考察结果

Table 4 Results of validation test investigations

批次	包封率/ %	载药量/ %	渗漏率/ %	OD 值		相对 偏差/%
				实测值	预测值	
1	85.70	7.24	0.82	0.80	0.85	3.59
2	86.33	7.28	0.88	0.83		
3	86.38	7.29	0.9	0.83		
平均值	86.14	7.27	0.87	0.82		

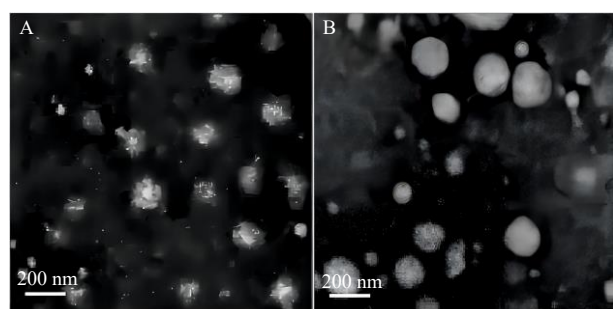


图 3 空白纳米粒 (A) 和载药纳米粒 (B) 的 TEM 图

Fig. 3 TEM of blank nanoparticles (A) and drug-loaded nanoparticles (B)

坩埚为参比, 载气为 N_2 , 体积流量 50.0 mL/min, 升温速度 10 $^{\circ}C/min$, 温程 30~250 $^{\circ}C$, 进行 DSC 分析。如图 5 所示, 大豆卵磷脂在 129.17 $^{\circ}C$ 和 180.17 $^{\circ}C$ 各存在 2 个低强度、宽吸热峰, 表明磷脂极性区域的熔化。TAX-PC 中花旗松素的熔点峰明

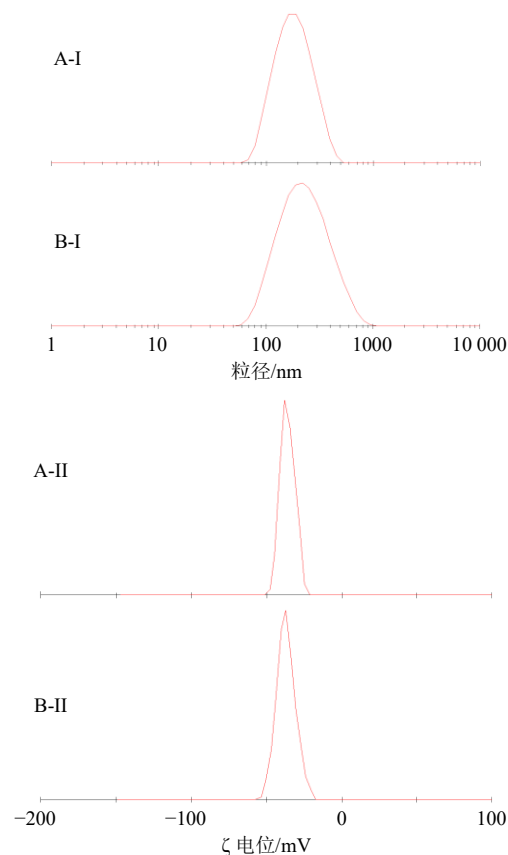


图 4 空白 PC/BSA NPs (A) 和 Tax-PC/BSA NPs (B) 的粒径分布 (I) 和 ζ 电位 (II)

Fig. 4 Particle size distribution (I) and ζ potential (II) of blank PC/BSA NPs (A) and Tax-PC/BSA NPs (B)

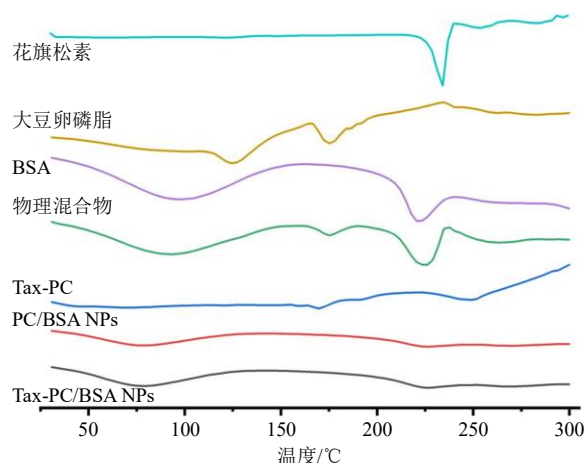


图 5 花旗松素、大豆卵磷脂、BSA、物理混合物、空白 PC/BSA NPs、Tax-PC/BSA NPs 的 DSC 谱图

Fig. 5 DSC spectrum of taxifolin, soybean lecithin, BSA, physical mixture, blank PC/BSA NPs, and Tax-PC/BSA NPs

显消失，而在 174.50 °C 和 253.83 °C 存在 2 处低强度吸热峰，显示了药物的非晶化。说明花旗松素与大豆卵磷脂之间存在诸如氢键作用或范德华力等弱分子间相互作用，使两者结合形成磷脂复合物。BSA 的熔点峰分别为 94.31、220.50 °C，花旗松素在 231.25 °C 处有 1 个强吸热峰，温度升高熔融了物理混合物，形成部分原位混合物，与原始峰相比，峰强度降低，表明物理混合物具有相加特性，该结果与 Telange 等^[4]报道一致。而 Tax-PC/BSA NPs 冻干粉 DSC 曲线中，花旗松素的熔点峰被掩盖，且出现 1 处新的大宽峰，峰值为 78.83 °C，表明了 Tax-PC/BSA NPs 的形成。

2.9.4 FT-IR 分析 采用 KBr 压片法，将花旗松素、大豆卵磷脂、BSA、物理混合物、Tax-PC、空白 PC/BSA NPs 冻干粉、Tax-PC/BSA NPs 冻干粉分别与 KBr 以 1 : 100 比例研匀，压片进行测定。观察图 6 发现，物理混合物展现了物质的单纯加和性；花旗松素中，3 549.02、3 402.43 cm^{-1} 属于 -OH 吸收特征峰；大豆卵磷脂中，2 924.08、2 852.71 cm^{-1} 为脂肪酸酯-CH₂-的不对称振动吸收峰，1 230.58、1 058.91 cm^{-1} 为大豆卵磷脂的 P=O 基团的伸缩振动峰。Tax-PC 的 -OH 峰明显消失，并在 3 404.36 cm^{-1} 处显示 1 大宽峰，可能是大豆卵磷脂的 P=O 基团与花旗松素的 -OH 结合，致使 -OH 峰变弱，并与大豆卵磷脂的 3 396.64 cm^{-1} 附近的宽峰相重叠。因此，推测花旗松素与磷脂分子间可能通过氢键作用形成了 Tax-PC。载药后的 Tax-PC/BSA NPs 中花旗松素的羟基酚吸收峰 (3 549.02、3 402.43 cm^{-1})、苯环骨架峰

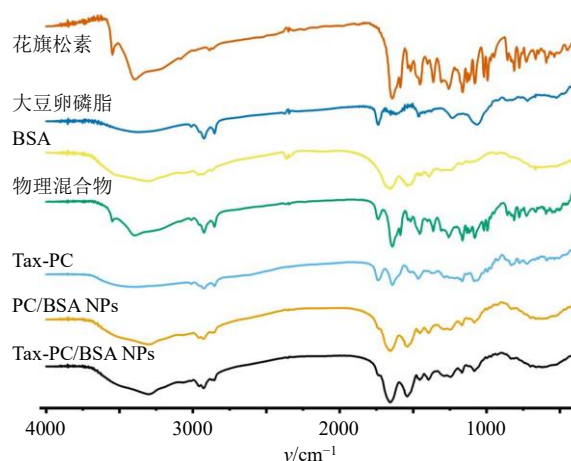


图 6 花旗松素、大豆卵磷脂、BSA、物理混合物、Tax-PC、空白 PC/BSA NPs、Tax-PC/BSA NPs 的 FT-IR 谱图

Fig. 6 FTIR spectrum of taxifolin, soybean lecithin, BSA, physical mixture, Tax-PC, blank PC/BSA NPs, and Tax-PC/BSA NPs

(1 585.48 cm^{-1}) 被掩盖，药物吸收特征峰消失，表明花旗松素被包裹在纳米粒中。

2.9.5 XRD 分析 采用管流/管压 (20 mA/40 kV)，衍射范围 $3^\circ < 2\theta < 45^\circ$ ，扫描速度 8°/min 的检测条件对花旗松素、大豆卵磷脂、BSA、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 冻干粉进行 XRD 分析。如图 7 所示，花旗松素存在明显的晶体衍射峰，表明花旗松素是以结晶型存在的物质。而 Tax-PC 中，花旗松素已由结晶型转为无定型，表明花旗松素与大豆卵磷脂结合形成了磷脂复合物。随着白蛋白纳米粒的进一步封装，物质依然显示无定型态，此形态有利于改善花旗松素的溶解度和释放速率。

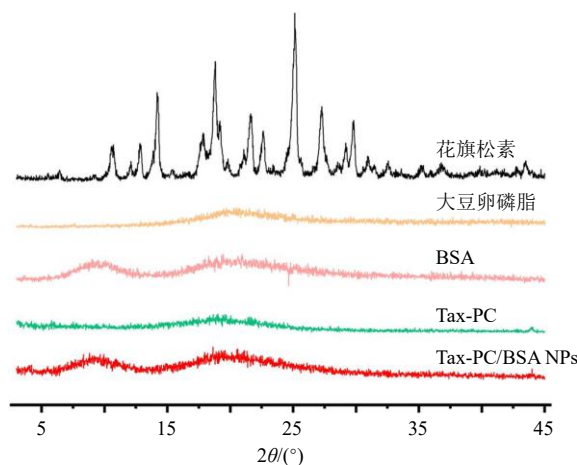


图 7 花旗松素、大豆卵磷脂、BSA、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 的 XRD 谱图

Fig. 7 XRD spectrum of taxifolin, soybean lecithin, BSA, Tax-PC and Tax-PC/BSA NPs

2.10 理化性质测定

参考文献报道^[15], 采用摇瓶法测量溶解度和表观油水分配系数 ($\lg P$)。取过量花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 分别加入到纯化水、pH 1.2 盐酸溶液、pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中, 涡旋混合 10 min, 置 37 °C 恒温振荡器中, 100 r/min 连续振荡 72 h, 在 3600 r/min 条件下离心 10 min, 取上清液加甲醇稀释适当倍数, 滤过, 进样测定, 计算花旗松素平衡溶解度。另取适量花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 分别加入上述溶液的饱和正辛醇中, 超声溶解、滤过 (0.45 μm 微孔滤膜) 得花旗松素正辛醇溶液。精密移取该溶液 5 mL, 与同体积正辛醇饱和纯化水及不同 pH 值缓冲溶液混合, 于 37 °C 恒温水浴振荡 24 h, 静置, 分别取上下层, 进样测定, 计算 $\lg P$ 。表 5 结果显示, Tax-PC/BSA NPs 在 Tax-PC 的基础上, 进一步提高了花旗松素的平衡溶解度, 在水、pH 1.2 盐酸溶液、pH 6.8 PBS 中

表 5 花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 的理化性质测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	介质	溶解度/(mg·mL ⁻¹)	$\lg P$
花旗松素	水	0.888 ± 0.009	0.79
	pH 1.2 盐酸溶液	0.785 ± 0.052	0.56
	pH 6.8 PBS	1.433 ± 0.005	0.75
TAX-PC	水	1.936 ± 0.018	1.41
	pH 1.2 盐酸溶液	1.743 ± 0.002	1.12
	pH 6.8 PBS	2.823 ± 0.035	1.30
Tax-PC/BSA NPs	水	34.167 ± 0.037	1.39
	pH 1.2 盐酸溶液	25.684 ± 0.003	1.15
	pH 6.8 PBS	69.230 ± 0.009	1.32

分别提高了 38.48、32.72、48.31 倍。经白蛋白纳米粒进一步包封后的花旗松素, 与磷脂复合物相比 $\lg P$ 值大于 1 且基本持平, 适宜于药物吸收, 亲脂性仍得到保留。

2.11 稳定性考察

2.11.1 储存稳定性 取 Tax-PC/BSA NPs 冻干粉密封于西林瓶中, 分别于 4 °C 和室温放置 3 个月, 观察放置前后的外观, 并测定放置前后渗漏率、粒径、PDI 和 ζ 电位, 以验证纳米粒稳定性。根据表 6 可知, Tax-PC/BSA NPs 经 4 °C 和室温条件下分别储存 3 个月后各项指标变化程度均在可控范围, 损伤较小, 表明纳米粒冻干粉的储存稳定性良好, 同时各指标结果均提示, 纳米粒在 4 °C 条件下储存优于室温, 提示 Tax-PC/BSA NPs 冻干粉应在 4 °C 进行储存。

2.11.2 氧化指数 取 Tax-PC/BSA NPs 溶于无水乙醇成澄清溶液, 分别测定其在波长 233 nm 及 215 nm 的吸光度, 计算氧化指数, 3 批 Tax-PC/BSA NPs 的氧化指数值分别为 0.179、0.179、0.181, 均在 0.2 以下, 符合脂质微粒制剂氧化程度。

2.12 体外模拟消化释放

参考文献报道^[16], 进行体外模拟消化释放。模拟消化液组成和消化条件如表 7 所示, 预先取 3 mL 花旗松素、Tax-PC 和 Tax-PC/BSA NPs 样品溶液 (均含花旗松素 5 mg) 分别与 3 mL 模拟胃液 (SGF) 充分混合, 调 pH 至 1.2, 装入透析袋 (M_{wco} 3500), 并置于存有 150 mL 释放介质 (乙醇与不含胃蛋白酶的 SGF 按 1:1 等体积混合) 的锥形瓶内, 恒温振荡消化 2 h 后完成。另取 6 mL 模拟肠液 (SIF) 继续添加至含有上述混合物的透析袋中, 调节 pH 值至 7.0, 置于存有 150 mL 释放介质 (乙醇与不含胰

表 6 纳米粒储存稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Storage stability of nanoparticles ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI	渗漏率/%
储存前	184.90 ± 0.98	-36.60 ± 0.53	0.275 ± 0.010	0.46 ± 0.10
4 °C 储存 3 个月	185.70 ± 0.33	-36.00 ± 0.24	0.280 ± 0.020	0.49 ± 0.08
室温储存 3 个月	188.10 ± 0.08	-35.20 ± 0.20	0.298 ± 0.040	0.61 ± 0.29

表 7 模拟消化液组成和消化条件

Table 7 Compositions and digestive conditions of simulated digestive fluid

模拟消化液	组成	操作条件
SGF pH 1.2	2 g·L ⁻¹ NaCl, 3.2 g·L ⁻¹ 胃蛋白酶, 7 mL·L ⁻¹ 盐酸	37 °C, 100 r·min ⁻¹ , 2 h
SIF pH 7.0	6.8 g·L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ , 1 g·L ⁻¹ 胰蛋白酶, 5 g·L ⁻¹ 胆酸盐	37 °C, 100 r·min ⁻¹ , 4 h

蛋白酶的 SIF 按 1:1 等体积混合) 的锥形瓶内, 恒温振荡消化 4 h; 全过程分别在 10、30 min 及 1、2、3、4、5、6 h 取适量释放介质, 并补充同温度同量的新鲜介质, 取样在 4 °C 下保存。图 8 结果显示, 经 2 h 胃部消化, 花旗松素、Tax-PC/BSANPs 累积释放率分别为 $(20.56 \pm 0.35) \%$ 、 $(18.89 \pm 0.37) \%$ 、 $(11.21 \pm 0.65) \%$, 胃部消化率均在 25% 以下, 药物在胃部的吸收强度较低。转移至肠道消化环境模拟消化时(共 4 h), 花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSANPs 的肠道消化释放明显增强, 花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSANPs 最终累积释放率可达 $(48.26 \pm 0.71) \%$ 、 $(71.86 \pm 1.83) \%$ 、 $(82.73 \pm 0.62) \%$ 。

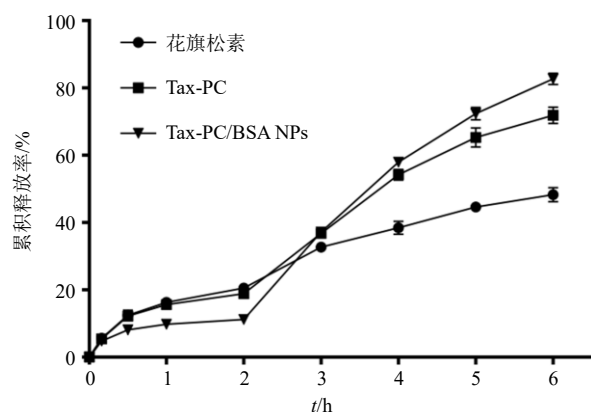


图 8 花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSANPs 在模拟胃-小肠消化液中的释放情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Release of taxifolin, Tax-PC, Tax-PC/BSANPs in simulated stomach-small intestine digestive fluid ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.13 大鼠在体肠吸收实验

2.13.1 供试品溶液的制备 Krebs-Ringer's (K-R) 试液: 取氯化钙 0.37 g、氯化钠 7.8 g、氯化钾 0.35 g、氯化镁 0.02 g、葡萄糖 1.4 g、碳酸氢钠 1.37 g、磷酸二氢钠 0.32 g, 纯化水定容至 1 L, 摇匀, 即得。

2.13.2 对照品溶液的制备 精密称取花旗松素对照品 5 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加适量 K-R 试液溶解并定容, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得花旗松素对照品溶液。

2.13.3 含药肠灌流供试液的制备 称取适量花旗松素、Tax-PC 及 Tax-PC/BSANPs 冻干粉, 加入 K-R 试液配制成含花旗松素相同质量浓度的花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSANPs 肠灌流供试液。

2.13.4 空白肠灌流液 取 37 °C 预热 K-R 试液, 进行在体肠灌流实验, 循环 2 h, 收集灌流液, 4 °C 冷藏备用。

2.13.5 专属性考察 取适量对照品溶液、含药肠灌

流供试液及空白肠灌流液、按“2.3.1”项下色谱条件进行分析, 记录色谱图, 结果见图 9。结果花旗松素色谱峰峰形良好, 灌流液中的内源性物质对花旗松素无干扰, 专属性良好。

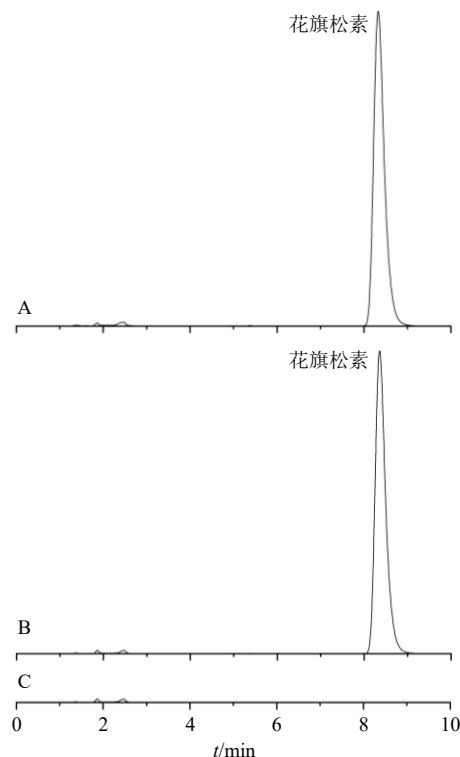


图 9 花旗松素对照品溶液 (A)、含药肠灌流供试液 (B) 和空白肠灌流液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 9 HPLC of taxifolin reference substance (A), drug-containing intestinal perfusion test solution (B) and blank intestinal perfusion solution (C)

2.13.6 线性关系考察 精密吸取一定量“2.13.2”项下对照品溶液, 加入 K-R 试液稀释成 115、52、25、14、7、1.4 $\mu\text{g/mL}$, 质量浓度的系列对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件测定各质量浓度下样品含量, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y=30\,446X-23\,658$, $R^2=0.999\,5$, 结果表明花旗松素在 1.4~117.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.13.7 精密度试验 取“2.13.3”项下含药肠灌流供试液适量, 分别加 K-R 试液稀释至质量浓度梯度为 75、50、25 $\mu\text{g/mL}$, 按“2.3.1”项下色谱条件 1 d 内测定 5 次, 日内精密度 RSD 分别为 0.87%、0.09%、0.07%, 表明日内精密度良好; 连续测定 5 d, 日间精密度 RSD 分别为 0.22%、0.10%、0.06%, 表明日间精密度良好。

2.13.8 稳定性试验 取“2.13.3”项下含药肠灌流

供试液适量, 分别在室温下放置 0、2、4、6、12、24 h, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, RSD 为 1.25% 表明稳定性良好。

2.13.9 重复性试验 取“2.13.3”项下含药肠灌流供试液适量 6 份, 按“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 结果花旗松素质量浓度的 RSD 为 0.97%, 表明该试验重复性良好。

2.13.10 加样回收率试验 取“2.13.3”项下含药肠灌流供试液适量, 分别加入低、中、高不同质量浓度的花旗松素对照品溶液, 得到含药质量浓度梯度为 60、50、40 $\mu\text{g/mL}$ 的回收率样品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 计算加样回收率, 花旗松素的加样回收率在 98%~102%, 平均加样回收率为 100.11%, RSD 为 1.50%, 结果表明该方法符合检测要求。

2.13.11 大鼠在体单向肠灌流实验 选取健康雄性 SD 大鼠 60 只, 随机分配各 20 只至花旗松素组、Tax-PC 组、Tax-PC/BSA NPs 组, 每组根据肠段再次随机分至十二指肠、空肠、回肠、结肠各 5 只。实验前 12 h 大鼠禁食不禁水, 采用 20% 乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠 (注射剂量 7 mL/kg), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温加热垫上固定。沿腹中线在腹腔中下部剪开 3 cm 的切口, 分离目标肠段 (十二指肠、空肠、回肠、结肠), 在肠段的上下两端分别切开一个足以插入 0.3 cm 直径玻璃管的小口, 并使用灭菌手术线结扎固定。通过导管注入生理盐水 (37 $^{\circ}\text{C}$ 预热) 以清理肠段内容物, 直至流出液无肉眼可见异物 (图 10)。将浸有生理盐水的脱脂棉覆盖在切断伤口处, 保持肠道湿润、避免腹膜中液体及热量损失。肠段上端导管连接恒流泵, 为平衡肠段, 以 0.2 mL/min 恒速

灌流 K-R 试液 15 min, 随后更换为花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 肠灌流液持续灌流肠段 1 h, 收集流出液。采用重量法对流出液体积进行校正。实验结束后, 剪取经灌流的肠段, 测量其长度与内径^[17]。

2.13.12 含药肠灌流液稳定性 取“2.13.3”项下含药肠灌流液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下孵育 0、30、60、90、120 min, 各时间点取样 1 mL, 进样测定, 将 0 min 时药物质量浓度视为 100%, 计算孵育后花旗松素药物剩余率 (即孵育前后供试溶液中花旗松素含量百分比)。结果, 花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 灌流液剩余药量分别为 (99.79 $\pm$ 1.96) %、(100.48 $\pm$ 1.42) %、(98.41 $\pm$ 1.50) %, RSD 分别为 0.97%、0.46%、1.05%, 表明含药灌流液在 K-R 试液中稳定性良好。

2.13.13 含药肠灌流液肠壁物理吸附 剪取肠段 10 cm, 生理盐水灌流冲洗, 将黏膜层翻出, 置于花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 含药肠灌流液中, 在 (37.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温孵育, 分别在 0、2 h 取样, 进样测定, 计算剩余率。结果表明, 2 h 内花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 灌流液的剩余药量分别为 (100.90 $\pm$ 0.60) %、(101.24 $\pm$ 0.75) %、(99.85 $\pm$ 0.98) %, RSD 分别为 0.43%、0.33%、0.62%, 表明肠壁对灌流液中药物基本无吸附作用, 对吸收测定无影响。

2.13.14 各肠段吸收情况 分别取花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 含药肠灌流液按照“2.13.6”项下方法操作, 考察花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 在十二指肠、空肠、回肠和结肠段的吸收状况。按公式计算药物吸收速率常数 (K_a) 和药物表观吸收系数 (P_{app})。结果显示, 花旗松素、Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 在整个肠段均有吸收, 且在十二指肠吸收最好, 空肠次之, 表明花旗松素主要吸收部位为肠道上部。形成 Tax-PC、Tax-PC/BSA NPs 后花旗松素在各肠段的吸收均得到显著增强 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 8。

$$K_a = (1 - C_{out}V_{in}/C_{in}V_{out})Q/\pi r^2 L$$

$$P_{app} = -Q \ln(C_{out}V_{in}/C_{in}V_{out})/2\pi r L$$

C_{in} 、 C_{out} 为进、出灌流液的质量浓度, V_{in} 、 V_{out} 为进、出灌流液的体积, Q 为灌流体积流量, r 和 L 分别为肠段的半径及长度

3 讨论

课题组前期考察了多种制备方法将 Tax-PC 载

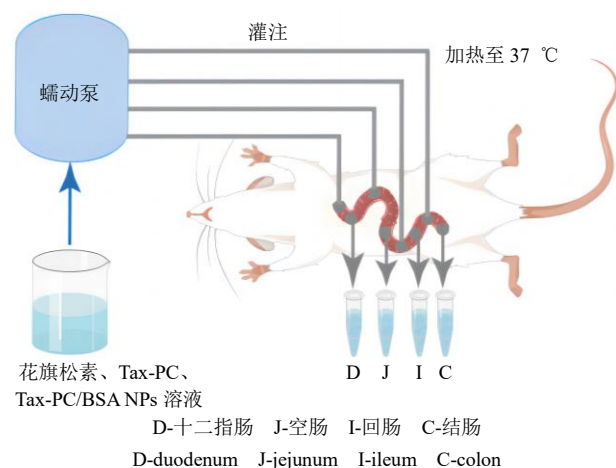


图 10 大鼠在体单向肠灌流模型

Fig. 10 *In vivo* unilateral intestinal perfusion model of rats

表 8 花旗松素及其不同制剂在不同肠段的 K_a 和 P_{app} ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 8 Absorption rate constants of taxifolin and its different preparations in different intestinal segments K_a and P_{app} ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

肠段	$K_a/(\times 10^{-3} \text{ min})$			$P_{app}/(\times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1})$		
	花旗松素	Tax-PC	Tax-PC/BSANPs	花旗松素	Tax-PC	Tax-PC/BSANPs
十二指肠	68.1 $\pm$ 4.5	120.9 $\pm$ 7.5**	137.6 $\pm$ 2.2**##	8.9 $\pm$ 0.8	23.0 $\pm$ 3.4**	31.9 $\pm$ 1.7***
空肠	60.2 $\pm$ 4.5	114.8 $\pm$ 8.5**	135.8 $\pm$ 2.1**##	7.6 $\pm$ 0.7	20.6 $\pm$ 3.0**	30.6 $\pm$ 1.4***
回肠	55.8 $\pm$ 2.1	90.2 $\pm$ 3.5**	131.3 $\pm$ 3.1**##	6.9 $\pm$ 0.3	13.3 $\pm$ 0.8**	27.9 $\pm$ 1.7***
结肠	28.1 $\pm$ 7.2	37.6 $\pm$ 2.0*	50.9 $\pm$ 4.5**#	4.2 $\pm$ 1.2	5.9 $\pm$ 0.4*	8.9 $\pm$ 1.2**

与花旗松素组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Tax-PC 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs taxifolin group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs Tax-PC group

入白蛋白纳米粒中,包括去溶剂化法、纳米沉淀法、热凝胶法、喷雾干燥法、自组装法、Nab™ 技术等。综合多种制备方法, Nab™ 技术展现出较为突出的优势,制备得到的纳米粒粒径小、无表面活性剂参与,同时规避高温对脂质类制剂的氧化影响、保护蛋白性质等。Nab™ 技术利用了白蛋白的结构特点,在高剪切力下产生了气穴空化效应-超氧化物离子,通过氧化巯基残基或断裂二硫键,围绕花旗松素交联搭建新的二硫键,形成聚合物壳体^[18]。目前, Nab™ 技术在白蛋白纳米粒的制备当中已获得广泛认可。

口服给药是最常用的临床给药方式,药物经口服后通常在小肠部位吸收,透过肠壁参与血液循环,进而发挥药物疗效。磷脂与药物结合,能够提高药物通过富含脂质的生物膜的能力, Tax-PC 明显提高了花旗松素的油水分配情况,而经过白蛋白纳米粒进一步包封后,其 $\lg P$ 值与磷脂复合物基本持平,仍适宜于药物吸收 ($\lg P > 1$),侧面证明磷脂的两亲性在 Tax-PC/BSA NPs 形成后得到保留,白蛋白纳米粒包封磷脂复合物,磷脂的 2 条长脂肪链不参与该过程,仍然能够自由转动,形成亲脂外观。Tax-PC/BSANPs 在 Tax-PC 的基础上,进一步提高了花旗松素的平衡溶解度,改善药物口服吸收。

体外模拟消化释放过程中, Tax-PC/BSANPs 的胃部累积释放率明显低于花旗松素,造成这种差异的原因可能是花旗松素经磷脂、牛血清白蛋白双层载体包封,在一定程度上维持了纳米粒结构的稳定性,经胃蛋白酶的消化作用后,部分 BSA 需逐步分解,花旗松素才能缓慢释放。因此在胃部消化阶段, Tax-PC/BSANPs 能够减缓花旗松素的释放,利于肠道对药物的吸收和利用。而在肠道消化环境模拟消化时, Tax-PC/BSA NPs 吸收状况明显优于花旗松

素、Tax-PC, BSA 需经胰蛋白酶水解,胆盐辅助氧化分解,使纳米粒的结构破坏,药物快速释放,而磷脂等脂类物质的存在,也能够加速肠道消化。因此认为 Tax-PC/BSA NPs 在一定程度上减少了药物在胃部吸收并增强了药物肠道定位释放,有效提高花旗松素的吸收状况。

基于此,本研究采用大鼠在体单向肠灌注模型,以更好地模拟体内肠道环境,比较不同剂型对花旗松素肠道吸收的改善状况,阐明其在各肠段吸收特征。结果表明,花旗松素在大鼠各肠段均有吸收,制备成磷脂复合物白蛋白纳米粒后,药物在各肠段的吸收均有显著提高 ($P < 0.05, 0.01$), Tax-PC/BSA NPs 相较花旗松素, K_a 在十二指肠、空肠、回肠、结肠分别提高 2.02、2.26、2.35、1.81 倍, P_{app} 分别提高 3.58、4.03、4.04、2.12 倍,说明 Tax-PC/BSA NPs 能够改善药物在体肠吸收状况,可为花旗松素新剂型的研发和临床合理应用提供新的选择。

此外,本课题组在后续研究中会进一步考察大鼠 ig Tax-PC/BSA NPs 后的生物利用度,以验证制剂的合理性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张星艳,李新,李虎玲,等. 花旗松素植物来源、提取方法和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 2214-2226.
- [2] Topal F, Nar M, Gocer H, et al. Antioxidant activity of taxifolin: An activity-structure relationship [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31(4): 674-683.
- [3] Galochkina A V, Anikin V B, Babkin V A, et al. Virus-inhibiting activity of dihydroquercetin, a flavonoid from *Larix sibirica*, against coxsackievirus B4 in a model of viral pancreatitis [J]. *Arch Virol*, 2016, 161(4): 929-938.
- [4] Zhan Z Y, Wu M, Shang Y, et al. Taxifolin ameliorate high-

- fat-diet feeding plus acute ethanol binge-induced steatohepatitis through inhibiting inflammatory caspase-1-dependent pyroptosis [J]. *Food Funct*, 2021, 12(1): 362-372.
- [5] Haque M W, Bose P, Siddique M U M, *et al*. Taxifolin binds with LXR (α & β) to attenuate DMBA-induced mammary carcinogenesis through mTOR/Maf-1/PTEN pathway [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2018, 105: 27-36.
- [6] Li Y, Su H, Wang W J, *et al*. Fabrication of taxifolin loaded zein-caseinate nanoparticles and its bioavailability in rat [J]. *Food Sci Hum Wellness*, 2023, 12(6): 2306-2313.
- [7] Kim A R, An H J, Jang E S, *et al*. Preparation, physical characterization, and *in vitro* skin permeation of deformable liposomes loaded with taxifolin and taxifolin tetraoctanoate [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2019, 121(6): 1800501.
- [8] Ding Q T, Liu W C, Liu X L, *et al*. Polyvinylpyrrolidone-modified taxifolin liposomes promote liver repair by modulating autophagy to inhibit activation of the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 860515.
- [9] Zu Y G, Wu W W, Zhao X H, *et al*. Enhancement of solubility, antioxidant ability and bioavailability of taxifolin nanoparticles by liquid antisolvent precipitation technique [J]. *Int J Pharm*, 2014, 471(1/2): 366-376.
- [10] 盘振杰, 杨敏芬, 韦龙山. 花旗松素包合物制备工艺及水溶性的研究 [J]. 广州化工, 2019, 47(22): 73-75.
- [11] 梅凯, 兰海, 李鑫, 等. 淫羊藿治疗化疗致周围神经病变有效部位磷脂复合物的制备、表征与评价 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3662-3669.
- [12] Li J, Wang X L, Zhang T, *et al*. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2015, 10(2): 81-98.
- [13] 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.
- [14] Telange D R, Jain S P, Pethe A M, *et al*. Use of combined nanocarrier system based on chitosan nanoparticles and phospholipids complex for improved delivery of ferulic acid [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 171: 288-307.
- [15] Gao S J, Chen J C, Peng W Q, *et al*. The preparation and relative bioavailability of an artemisin in self-emulsifying drug delivery system [J]. *Drug Deliv*, 2023, 30(1): 2168794.
- [16] Li W, Chen W X, Wang Z Y, *et al*. Preparation and characterization of beads of sodium alginate/carboxymethyl chitosan/cellulose nanofiber containing porous starch embedded with gallic acid: An *in vitro* simulation delivery study [J]. *Foods*, 2022, 11(10): 1394.
- [17] 朱君君, 沈成英, 王镜, 等. 甘草酸-F127/TPGS 混合纳米胶束的制备及其大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中草药, 2020, 51(7): 1845-1851.
- [18] 闫汉语, 张永萍, 徐剑, 等. 雷公藤红素白蛋白纳米粒的制备及抗类风湿性关节炎药效评价 [J]. 中国药房, 2022, 33(21): 2597-2602.

[责任编辑 郑礼胜]