

木犀草素磷脂复合物白蛋白纳米粒的制备及口服药动学评价

田 莉¹, 李伟宏², 张付利^{1,3*}

1. 郑州澍青医学高等专科学校, 河南 郑州 450064

2. 河南应用技术职业学院, 河南 郑州 450042

3. 河南大学, 河南 开封 475001

摘要: 目的 制备木犀草素磷脂复合物牛血清白蛋白纳米粒 (luteolin phospholipids complex bovine serum albumin nanoparticles, Lut-PC-BSA-NPs), 考察口服药动学行为。方法 乳化-高压均质法制备 Lut-PC-BSA-NPs, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法筛选 Lut-PC-BSA-NPs 最优处方, 测定包封率、载药量、粒径及 ζ 电位等。冷冻干燥法制备成冻干粉末, X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 法分析 Lut-PC-BSA-NPs 晶型, 测定溶解度, 考察在模拟胃肠液中的释药行为。SD 大鼠按 40 mg/kg 剂量 (以木犀草素计) ig 给予 Lut-PC-BSA-NPs 后采血, 计算 Lut-PC-BSA-NPs 主要药动学参数及相对生物利用度。结果 Lut-PC-BSA-NPs 最佳处方为水相与有机相体积比为 14.3:1、白蛋白浓度为 1.9%, 均质压力为 85 MPa。Lut-PC-BSA-NPs 包封率为 $(81.24 \pm 1.07)\%$, 载药量为 $(2.32 \pm 0.11)\%$, 平均粒径为 (153.64 ± 7.28) nm, ζ 电位为 (-16.43 ± 0.21) mV。木犀草素在 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉中存在状态为无定型, 在不同介质中溶解度均得到显著增加, 体外释药过程符合 Weibull 模型。口服药动学结果表明, Lut-PC-BSA-NPs 半衰期 ($t_{1/2}$) 增加至 (5.03 ± 0.97) h, 血药浓度 ($C_{\max}$) 增加至 (2220.85 ± 757.54) ng/mL, 口服相对生物利用度提高至 3.98 倍。结论 Lut-PC-BSA-NPs 显著增加了木犀草素溶解度及口服相对生物利用度。

关键词: 木犀草素; 磷脂复合物; 白蛋白纳米粒; Box-Behnken 设计-效应面法; Weibull 模型; 口服药动学; 生物利用度

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)10-3280-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.007

Luteolin phospholipids complex albumin nanoparticle: Preparation and oral pharmacokinetics evaluation

TIAN Li¹, LI Weihong², ZHANG Fuli^{1,3}

1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China

2. Henan Vocational College of Applied Technology, Zhengzhou 450042, China

3. Henan University, Kaifeng 475001, China

Abstract: Objective To optimize prescriptions of luteolin phospholipids complex bovine serum albumin nanoparticles (Lut-PC-BSA-NPs), and carry out its pharmacokinetic behavior *in vivo*. **Methods** Emulsification-high pressure homogenization method was employed to prepare Lut-PC-BSA-NPs. Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) was used to investigate its optimal prescriptions. Entrapment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were determined. Lyophilized powder of Lut-PC-BSA-NPs was prepared by freeze-drying method. Crystal of Lut-PC-BSA-NPs lyophilized powder was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD). Solubility and drug release behavior in gastrointestinal fluid were determined. SD rats were administered intragastrically at a dose of 40 mg/kg (luteolin) and blood samples were collected, main pharmacokinetic parameters and relative bioavailability of Lut-PC-BSA-NPs were also calculated. **Results** Optimal formulation of Lut-PC-BSA-NPs: Volume ratio of water phase to organic phase was 14.3:1, concentration of albumin was 1.9%, and the homogeneous pressure was 85 MPa. Envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were $(81.24 \pm 1.07)\%$, $(2.32 \pm 0.11)\%$, (153.64 ± 7.28) nm and (-16.43 ± 0.21)

收稿日期: 2023-10-23

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (23B320013); 妇科肿瘤科研创新团队 (2021-TD-02); 郑州澍青医学高等专科学校骨干教师 (2022zygg07)

作者简介: 田 莉 (1982—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为临床药学及妇科肿瘤。Tel: (0371)67673852 E-mail: tianli827206@126.com

*通信作者: 张付利 (1969—), 男, 学士, 教授, 研究方向为药学。Tel: (0371)23832109 E-mail: ZhangFL69@126.com

mV, respectively. Luteolin existed as an amorphous state in Lut-PC-BSA-NPs lyophilized powder. Solubility of luteolin was significantly increased in different media, and the release process *in vitro* conformed to the Weibull model. Results of oral pharmacokinetics showed that $t_{1/2}$ of Lut-PC-BSA-NPs was increased to (5.03 ± 0.97) h, $C_{\max}$ was enhanced to $(2\,220.85 \pm 757.54)$ $\mu\text{g/mL}$ and oral relative bioavailability was increased to 3.98 times. **Conclusion** Lut-PC-BSA-NPs significantly increased solubility and oral relative bioavailability of luteolin.

Key words: luteolin; phospholipids complex; albumin nanoparticles; Box-Behnken design-response surface methodology; Weibull model; oral pharmacokinetics; bioavailability

木犀草素(luteolin)属于多羟基黄酮类化合物,广泛存在于天南星科、伞形科、十字花科等植物^[1]中,具有抗肿瘤、抗菌消炎、护肝、心脑血管保护等活性^[1-3]。木犀草素对卵巢癌、乳腺癌、子宫癌、子宫内膜异位症等妇科肿瘤及疾病也具有较强活性,在妇科方面较大的应用潜力^[4-6]。木犀草素与化学类抗肿瘤药物相比毒性较低^[1],具备开发价值。课题组处方前期研究显示,木犀草素在 0.1 mol/L 盐酸水溶液、pH 4.5~7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)及水中溶解度均低于 100 $\mu\text{g/mL}$,油水分配系数 0.765 6^[7],表明该成分水溶性和脂溶性均较差。木犀草素在胃肠道中稳定性差^[8],易被代谢降解,SD 大鼠绝对口服生物利用度仅 5.57%^[9]。目前,已有木犀草素脂质体^[10]、固体脂质纳米粒^[11]、纳米结构脂质载体^[12]等报道,但存在辅料种类多、工艺复杂等缺陷。

药物与磷脂形成磷脂复合物(phospholipids complex, PC)后,在不影响药物化学结构的前提下可对药物脂溶性及水溶性等产生积极影响,利于增加药物体内吸收及药效^[13-14]。但磷脂复合物存在黏性大、疏水性强、体外溶出困难等缺陷,导致体内吸收及药效发挥受到较大限制,需联合其他制剂技术来加以改善^[15-16]。白蛋白亲水性强^[17-18],来源广泛,具有安全无毒、生物相容性良好等特点,可作为纳米制剂的载体及稳定剂^[17]。作为纳米载体时可有效解决磷脂复合物疏水性强等问题^[19],极大的比表面积提高了磷脂复合物分散性,利于进一步促进吸收、增强药效,目前,将磷脂复合物和白蛋白纳米技术联用还鲜见报道。

本研究首先制备了木犀草素磷脂复合物(luteolin phospholipids complex, Lut-PC),选用牛血清白蛋白作为载体,制备木犀草素磷脂复合物牛血清白蛋白纳米粒(luteolin phospholipids complex bovine serum albumin nanoparticles, Lut-PC-BSA-NPs)。对 Lut-PC-BSA-NPs 进行晶型、溶解度、微观外貌、体外释药及稳定性等进行评价,并考察 Lut-PC-BSA-NPs 体内口服药动学行为,期望为木犀草

素新型制剂研究提供新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;IT-09B5 型磁力搅拌仪,上海一恒科学仪器有限公司;SQP 型电子分析天平,赛多利斯科学仪器北京有限公司;DZF-60900 型真空干燥箱,上海目尼实验设备有限公司;RH-1200 型旋转蒸发仪,广州艾卡仪器设备有限公司;D-3L 型高压均质机,美国 PhD Technology 公司;U830 型立式超低温冰箱,上海昊扩科学器材有限公司;超滤离心管,美国 Millipore 公司;RCY-1400T 型智能溶出试验仪,欧莱博技术有限公司;Nano ZS90 型粒度仪,英国 Malvern 仪器公司;CTFD-12 型冷冻干燥机,青岛永合创信电子科技有限公司;D8 Venture 型 X 射线粉末衍射仪,瑞士 Bruker 仪器公司;DCY-12YD 型氮气吹扫仪,上海那艾精密仪器有限公司。

1.2 材料

木犀草素对照品,批号 111520-201605,质量分数 99.6%,中国食品药品检定研究院;木犀草素原料药,批号 200705,质量分数 98.0%,四川青益纯医药科技有限公司;黄芩素对照品,批号 211006,质量分数 98.2%,南京欣厚生物科技有限公司;磷脂,批号 PC2100815,上海辅必成医药科技有限公司;磷酸二氢钾,批号 20201015,国药集团化学试剂有限公司;磷酸,批号 C12747030,上海麦克林生化科技有限公司;牛血清白蛋白,批号 20220307,白蛋白质量分数 98.0%,上海蓝季生物科技有限公司;乳糖,批号 20221206,西安木成林药用辅料有限公司;模拟胃液(批号 20230515)、模拟肠液(批号 20230601),青岛捷世康生物科技有限公司。

清洁级 SD 大鼠,雌雄兼具,由河南省动物实验中心提供[SCXK(豫)2020-0001],选用体质量为 (220 ± 20) g 大鼠进行试验,实验前禁食 12 h。动物实验遵循郑州澍青医学高等专科学校有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 Lut-PC-BSA-NPs 的制备

2.1.1 Lut-PC 的制备及纯化工艺 取木犀草素原料药 0.5 g 和磷脂 1.5 g 置于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 200 mL 蒸馏后的四氢呋喃, 密封。于 50 °C 水浴中恒温搅拌 (700 r/min) 4 h 至溶液澄清, 减压旋蒸除去四氢呋喃, 即得 Lut-PC 粗品^[20]。加入二氯甲烷 50 mL, 震荡使之复溶, 过 0.22 μm 微孔滤膜除去未形成 Lut-PC 的木犀草素原料药, 收集有机溶液并减压旋蒸除去有机溶剂, 即得 Lut-PC。

2.1.2 Lut-PC-BSA-NPs 的制备 取 50 mg 的 Lut-PC, 加入适量二氯甲烷震荡溶解, 即得有机相。配制 20 mL 一定 pH 值的磷酸盐缓冲液 (PBS), 加入处方量牛血清白蛋白溶解, 作为水相。于 700 r/min 条件下将有机相滴加至水相中, 一定压力下循环均质数次, 置于 45 °C 水浴中减压旋蒸除去有机溶剂, 过 0.45 μm 微孔滤膜 (水膜) 即得 Lut-PC-BSA-NPs 混悬液。同法制备空白样品 (不含木犀草素)。

2.2 木犀草素含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent SB C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 流动相为甲醇-0.15%磷酸水溶液 (55:45); 检测波长 350 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL。以木犀草素计理论塔板数不低于 6 500。

2.2.2 对照品溶液的配制及标准曲线 精密称取木犀草素对照品 10.0 mg 转移至 50 mL 量瓶中, 加入约 40 mL 甲醇超声溶解, 甲醇稀释定容即得木犀草素对照品储备液, 质量浓度为 200 μg/mL。采用甲醇稀释成 10.0、5.0、1.0、0.5、0.05 μg/mL 系列对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定各对照品质量浓度 (C) 及峰面积 (A), 得线性回归方程为 $A = 16.1194C + 0.5006$, $r = 0.9999$, 结果表明木犀草素在 0.05~10.0 μg/mL 线性关系良好。

2.2.3 Lut-PC-ABS-NPs 供试品溶液的制备 精密取 1 mL 的 Lut-PC-ABS-NPs 混悬液至 100 mL 量瓶中, 加入 80 mL 甲醇超声 10 min, 加甲醇稀释定容, 13 000 r/min 高速离心 (离心半径为 5.4 cm) 20 min, 取上清液即得 Lut-PC-ABS-NPs 供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 取空白样品, 按“2.2.3”项下方法制备空白样品溶液。取空白样品溶液、木犀草素对照品溶液和 Lut-PC-ABS-NPs 供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 结果见图 1, 制剂中辅料未干扰木犀草素含量测定, 专属性高。

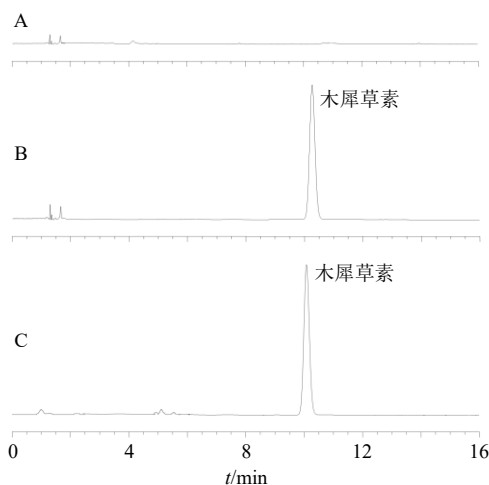


图 1 空白样品 (A)、木犀草素对照品 (B) 和 Lut-PC-ABS-NPs (C) 样品溶液 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of blank sample (A), luteolin reference substance (B) and Lut-PC-ABS-NPs sample solution (C)

2.2.5 精密度考察 取质量浓度为 0.05、1.00、10.00 μg/mL 木犀草素对照品溶液, 分别连续进样 6 次测定木犀草素峰面积, 计算得峰面积 RSD 分别为 0.48%、0.61%、0.52%, 表明精密度良好。

2.2.6 重复性考察 取同一份 Lut-PC-ABS-NPs 样品, 分别按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 测定木犀草素含量, 计算得质量分数的 RSD 为 1.46%, 表明重复性良好。

2.2.7 稳定性考察 取 Lut-PC-ABS-NPs 供试品溶液, 分别于制备后 0、3、6、12、18、24 h 测定木犀草素含量, 计算得木犀草素峰面积的 RSD 为 0.71%, 表明供试品溶液稳定性良好。

2.2.8 准确度考察 精密取 Lut-PC-ABS-NPs 混悬液 0.5 mL 至 100 mL 量瓶中, 共 9 份, 分为低、中、高 3 组, 分别加入木犀草素对照品储备液 1.0、1.5、2.0 mL, 按“2.2.1”项下色谱条件测定木犀草素含量, 计算木犀草素的加样回收率。计算结果显示平均加样回收率为 100.47%, RSD 为 1.32%, 表明该实验准确度较高。

2.3 Lut-PC-ABS-NPs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的测定

取 Lut-PC-BSA-NPs 混悬液 1 mL 至超滤离心管 (截留相对分子质量 10 000), 10 000 r/min 离心 (离心半径 5.4 cm) 15 min, 取外管滤液测定游离木犀草素的质量 ($m_{\text{游离}}$)。精密取 Lut-PC-BSA-NPs 混悬液 1 mL 按“2.2.3”项下操作测定总木犀草素质

量($m_{总}$)。精密取 Lut-PC-BSA-NPs 混悬液 1 mL(不加冻干保护剂)置于 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱下预冻 3 d,立即置于 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥机,抽真空至 0.1 mPa,冷冻干燥 2 d,取出称定质量($m_{总质量}$),计算 Lut-PC-BSA-NPs 包封率及载药量。

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

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

取 Lut-PC-BSA-NPs 混悬液 0.1 mL 加入蒸馏水 5 mL,震荡混匀,置于粒度仪上测定 Lut-PC-BSA-NPs 粒径和分散指数(polydispersity index, PDI)。取稀释后的 Lut-PC-BSA-NPs 混悬液置于电位样品池中,测定 ζ 电位。每份样品测试 3 次,取平均值。

2.4 Lut-PC-BSA-NPs 处方工艺单因素考察

2.4.1 水相 pH 值考察 固定 Lut-PC 用量为 50 mg、白蛋白浓度为 2% (水相体积为 20 mL),水相与有机相体积比为 14 : 1,均质压力为 80 MPa,均质次数为 8 次,考察水相 pH 值对 Lut-PC-BSA-NPs 的影响,结果见表 1。随着水相 pH 逐渐增大,Lut-PC-BSA-NPs 包封率和载药量均增加后下降,粒径呈下降趋势, ζ 电位绝对值增加后下降。可能是由于不同 pH 值会影响白蛋白的构象,在中性时白蛋白构象呈“N”型,pH 值增大时白蛋白逐渐转变为“F”型构象,在构象转变时白蛋白容易发生溶解度降低、变性等现象^[21],利于白蛋白载药。由于水相 pH 值为 8.5 时 Lut-PC-BSA-NPs 包封率、载药量和 ζ 电位绝对值相对较大,且粒径相对较小,故确定水相 pH 值为 8.5。

2.4.2 水相与有机相体积比的考察 固定 Lut-PC 用量为 50 mg、白蛋白浓度为 2%,均质压力为 80 MPa,均质次数为 8 次,水相 pH 值为 8.5,考察水相与有机相体积比对 Lut-PC-BSA-NPs 的影响,结果见表 2。随着有机相比比例的下降 Lut-PC-BSA-NPs 包封率和载药量均先增加后下降,可能是由于有机

表 2 水相与有机相体积比的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Investigation of water phase to organic phase volume ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水相与有机相体积比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
10 : 1	61.08 $\pm$ 1.09	1.72 $\pm$ 0.09	206.71 $\pm$ 13.83	-12.11 $\pm$ 1.31
12 : 1	64.02 $\pm$ 1.33	1.81 $\pm$ 0.14	186.29 $\pm$ 7.24	-14.27 $\pm$ 1.60
14 : 1	74.94 $\pm$ 1.06	2.07 $\pm$ 0.12	158.11 $\pm$ 7.85	-17.54 $\pm$ 1.34
16 : 1	71.68 $\pm$ 1.67	1.93 $\pm$ 0.13	163.96 $\pm$ 9.12	-14.89 $\pm$ 0.97
18 : 1	65.71 $\pm$ 0.92	1.84 $\pm$ 0.16	171.43 $\pm$ 8.16	-10.33 $\pm$ 1.21

相比比例过高时容易导致白蛋白沉淀,有机相比比例过低时影响体系乳化效果^[22],从而影响载药。粒径随着有机相比比例的下降呈下降后增大, ζ 电位绝对值增大后下降。可见水相与有机相体积比对 Lut-PC-BSA-NPs 影响较大,后续对水相与有机相体积比区间 12 : 1~16 : 1 进行优化。

2.4.3 白蛋白浓度的考察 固定 Lut-PC 用量为 50 mg、水相 pH 值为 8.5,水相与有机相体积比为 14 : 1,均质压力为 80 MPa,均质次数为 8 次,考察白蛋白浓度对 Lut-PC-BSA-NPs 的影响,结果见表 3。随着白蛋白浓度逐渐的增加 Lut-PC-BSA-NPs 包封率总体呈增加趋势,载药量总体呈下降趋势,粒径呈增大趋势,而 ζ 电位绝对值先增大后减小。可见白蛋白浓度对 Lut-PC-BSA-NPs 影响较大,后续对白蛋白浓度 1.5%~2.5%进行优化。

2.4.4 均质压力的考察 固定 Lut-PC 用量为 50 mg、白蛋白浓度为 2%,水相与有机相体积比为 14 : 1,水相 pH 值为 8.5,均质次数为 8 次,考察均质压力对 Lut-PC-BSA-NPs 的影响,结果见表 4。随着均质压力的增加 Lut-PC-BSA-NPs 包封率和载药量均增大后下降,可能是由于均质压力较小时影响白蛋白变性^[23],进而影响载药;均质压力过大时可能破坏已形成的 Lut-PC-BSA-NPs,导致药物泄露。粒

表 1 水相 pH 值的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Investigation of pH value of aqueous phase ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水相 pH 值	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
7.0	63.14 $\pm$ 1.58	1.78 $\pm$ 0.09	221.78 $\pm$ 11.85	-12.65 $\pm$ 1.70
7.5	66.85 $\pm$ 1.19	1.94 $\pm$ 0.15	196.43 $\pm$ 9.37	-16.22 $\pm$ 1.03
8.0	73.64 $\pm$ 0.97	2.03 $\pm$ 0.12	172.09 $\pm$ 8.44	-17.94 $\pm$ 1.26
8.5	75.49 $\pm$ 1.61	2.16 $\pm$ 0.16	150.66 $\pm$ 9.71	-17.89 $\pm$ 1.30
9.0	73.70 $\pm$ 0.95	2.04 $\pm$ 0.08	158.52 $\pm$ 8.86	-15.93 $\pm$ 0.97

表 3 白蛋白浓度的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

白蛋白浓度/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
1.0	60.88 $\pm$ 1.13	3.10 $\pm$ 0.15	148.43 $\pm$ 7.01	-14.67 $\pm$ 1.04
1.5	69.74 $\pm$ 1.02	2.44 $\pm$ 0.17	153.86 $\pm$ 8.71	-17.80 $\pm$ 1.25
2.0	76.93 $\pm$ 1.46	2.21 $\pm$ 0.14	157.71 $\pm$ 7.92	-18.04 $\pm$ 1.55
2.5	71.11 $\pm$ 1.78	1.69 $\pm$ 0.09	180.93 $\pm$ 9.27	-17.56 $\pm$ 1.18
3.0	76.24 $\pm$ 1.64	1.44 $\pm$ 0.10	214.75 $\pm$ 10.19	-15.20 $\pm$ 1.74

表 4 均质压力的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Investigation of homogenization pressure ($\bar{x} \pm s, n=3$)

均质压力/MPa	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
60	64.79 $\pm$ 1.07	1.68 $\pm$ 0.11	247.29 $\pm$ 13.51	-12.61 $\pm$ 1.35
70	67.22 $\pm$ 0.95	1.75 $\pm$ 0.13	202.79 $\pm$ 11.87	-15.29 $\pm$ 1.24
80	75.56 $\pm$ 1.73	2.11 $\pm$ 0.16	154.15 $\pm$ 9.95	-17.16 $\pm$ 1.07
90	79.37 $\pm$ 1.95	2.23 $\pm$ 0.10	148.20 $\pm$ 7.50	-18.29 $\pm$ 1.38
100	74.63 $\pm$ 1.77	2.06 $\pm$ 0.15	165.88 $\pm$ 8.97	-15.94 $\pm$ 0.98
110	70.18 $\pm$ 0.99	1.82 $\pm$ 0.12	192.43 $\pm$ 10.54	-15.03 $\pm$ 1.15

径随着均质压力增加呈先下降后增大趋势, ζ 电位绝对值先增大后下降。可见均质压力对 Lut-PC-BSA-NPs 影响较大, 后续对均质压力 70~100 MPa 进行优化。

2.4.5 均质次数的影响 固定 Lut-PC 用量为 50 mg、白蛋白浓度为 2%, 水相与有机相体积比为 14:1, 水相 pH 值为 8.5, 均质压力为 90 MPa, 考察均质次数对 Lut-PC-BSA-NPs 的影响, 结果见表 5。随着均质次数的增加, Lut-PC-BSA-NPs 包封率和载药量均增加后下降, 可能均值次数过少时影响白蛋白变性, 次数过多时对 Lut-PC-BSA-NPs 产生破坏作用。Lut-PC-BSA-NPs 粒径随着均质次数的增加呈

表 5 均质次数的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Investigation of homogenization times ($\bar{x} \pm s, n=3$)

次数	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
4	56.77 $\pm$ 1.15	1.66 $\pm$ 0.17	215.61 $\pm$ 10.80	-12.05 $\pm$ 0.82
6	68.43 $\pm$ 1.07	1.90 $\pm$ 0.14	180.79 $\pm$ 7.74	-15.77 $\pm$ 1.03
8	78.94 $\pm$ 1.84	2.21 $\pm$ 0.15	152.04 $\pm$ 8.13	-16.85 $\pm$ 1.14
10	74.37 $\pm$ 1.27	2.02 $\pm$ 0.16	166.89 $\pm$ 8.38	-15.02 $\pm$ 0.99
12	70.09 $\pm$ 0.96	1.94 $\pm$ 0.10	187.44 $\pm$ 9.07	-15.19 $\pm$ 1.17

表 6 BBD-RSM 优化 Lut-PC-BSA-NPs 处方工艺试验结果 ($n=3$)Table 6 Experiments results of BBD-RSM optimization of Lut-PC-BSA-NPs formulation process ($n=3$)

序号	X_1	$X_2/\%$	X_3/MPa	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD值	序号	X_1	$X_2/\%$	X_3/MPa	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD值
1	12:1(-1)	2.5(+1)	85(0)	67.55	1.52	249.18	0.000	10	16:1	2.0	100	64.84	1.84	227.15	0.234
2	14:1(0)	2.0(0)	85	77.82	1.97	155.82	0.743	11	14:1	1.5	70	66.36	2.31	206.94	0.451
3	16:1(+1)	2.0	70(-1)	63.68	1.74	190.68	0.243	12	14:1	2.0	85	77.56	2.20	161.73	0.830
4	14:1	2.0	85	79.35	2.14	160.07	0.840	13	16:1	1.5	85	70.22	2.44	230.58	0.444
5	12:1	2.0	100(+1)	61.87	1.71	244.74	0.000	14	14:1	2.0	85	79.15	2.44	150.89	0.900
6	14:1	1.5(-1)	100	63.81	2.26	197.65	0.357	15	16:1	2.5	85	71.04	2.47	194.24	0.664
7	14:1	2.0	85	77.17	2.23	153.67	0.860	16	12:1	1.5	85	65.92	2.19	204.15	0.421
8	12:1	2.0	70	65.79	1.82	189.78	0.350	17	14:1	2.5	70	62.83	2.13	187.46	0.281
9	14:1	2.5	100	70.22	1.58	238.97	0.146								

下降后增大趋势。由于均质次数为 8 次时 Lut-PC-BSA-NPs 包封率、载药量和 ζ 电位绝对值相对较大, 粒径相对较小, 故确定均质次数为 8。

2.5 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化 Lut-PC-BSA-NPs 处方工艺

2.5.1 试验方案 据“2.4”项下考察结果, 水相与有机相体积比、白蛋白浓度和均质压力对 Lut-PC-BSA-NPs 影响较大, 分别作为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 , 水平设置见表 6。采用包封率、载药量和粒径作为优化指标, 即因变量 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 。期望 Lut-PC-BSA-NPs 具有较高包封率及载药量, 同时粒径较小, 故将包封率、载药量和粒径作归一化处理, 采用归一值 (overall desirability, OD) 进行 Lut-PC-BSA-NPs 处方工艺优化。OD 值计算过程为①包封率和载药量计算公式为 $d_{\max}=(M_i-M_{\min})/(M_{\max}-M_{\min})$, M_i 为实际值, $M_{\max}$ 和 $M_{\min}$ 分别为最大值及最小值; ②粒径计算公式为 $d_{\min}=(M_{\max}-M_i)/(M_{\max}-M_{\min})$, ③ $OD=(d_1d_2d_3)^{1/3}$ 。分别测定 Lut-PC-BSA-NPs 不同处方工艺下包封率、载药量和粒径, 并计算 OD 值, 结果见表 6。

2.5.2 模型拟合、方差分析及优化结果 Design Expert V10.0.7 软件对表 6 数据进行二次多项式拟合, 得 OD 拟合方程: $OD=0.83+0.10X_1-0.07X_2+0.07X_3+0.16X_1X_2+0.09X_1X_3-9.98\times 10^{-3}X_2X_3-0.28X_1^2-0.17X_2^2-0.35X_3^2$, $R^2=0.9591$, $R_{\text{adj}}^2=0.9065$ 。方差分析见表 7, 该数学模型 $P=0.0005<0.01$, 具有极显著性差异。失拟项 $P=0.0887>0.05$, 表明未知因素干扰很小。所以建立的数学模型能较好地反映自变量与 OD 值之间的关系。方程中 X_1 、 X_3 、 X_1X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均有显著性差别 ($P<0.05$ 、

表 7 方差分析
 Table 7 Analysis of variance

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值	项目	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.37	9	0.15	18.24	0.000 5	X_1^2	0.32	1	0.32	38.61	0.000 4
X_1	0.08	1	0.08	9.89	0.016 3	X_2^2	0.13	1	0.13	15.40	0.005 7
X_2	0.04	1	0.04	5.05	0.059 4	X_3^2	0.52	1	0.52	61.90	0.000 1
X_3	0.05	1	0.05	5.25	0.047 5	残差	0.06	7	8.37×10^{-3}		
X_1X_2	0.10	1	0.10	12.30	0.009 9	失拟项	0.05	3	0.02	4.55	0.088 7
X_1X_3	0.03	1	0.03	3.48	0.104 4	绝对误差	0.01	4	0.32×10^{-3}		
X_2X_3	3.98×10^{-4}	1	3.98×10^{-4}	0.05	0.833 6	总和	1.43	16			

0.01), 交互作用响应面见图 2。选择 OD 值最大值为优化目标, 得 Lut-PC-BSA-NPs 最佳制备工艺为水相与有机相体积比为 14.26 : 1, 白蛋白浓度为
 1.93%, 均质压力为 84.70 MPa。预测 Lut-PC-BSA-NPs 包封率、载药量和粒径分别为 81.72%、2.41% 和 148.66 nm。

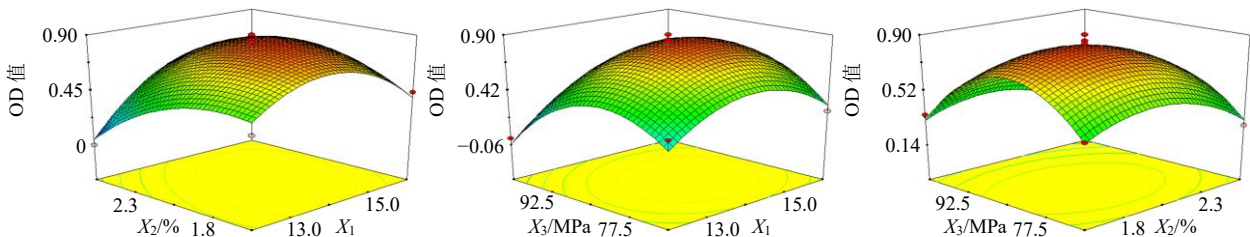


图 2 不同因素对 OD 值的效应面
 Fig. 2 Response surface of different factor on OD value

2.6 处方工艺验证

为便于操作, 对 Lut-PC-BSA-NPs 处方工艺略作调整(幅度<1%): 水相与有机相体积比为 14.3 : 1、白蛋白浓度为 1.9%, 均质压力为 85 MPa。平行制备 3 批 Lut-PC-BSA-NPs, 计算包封率、载药量及粒径相对偏差, 相对偏差=(测得值-预测值)/预测值, 结果见表 8。Lut-PC-BSA-NPs 各个指标相对偏差均小于±5%。Lut-PC-BSA-NPs 粒径分布图见图 3-A, PDI 值为 0.148±0.012, ζ 电位为 (−16.43±0.21) mV, 见图 3-B。

2.7 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉的制备及表征

取 Lut-PC-BSA-NPs 混悬液 2 mL 至西林瓶, 置于−50 ℃超低温冰箱下预冻 3 d, 立即置于−35 ℃冷冻干燥机, 抽真空至 0.1 mPa, 冷冻干燥 2 d, 即得 Lut-PC-BSA-NPs 直接冻干粉(不含乳糖)。于 Lut-

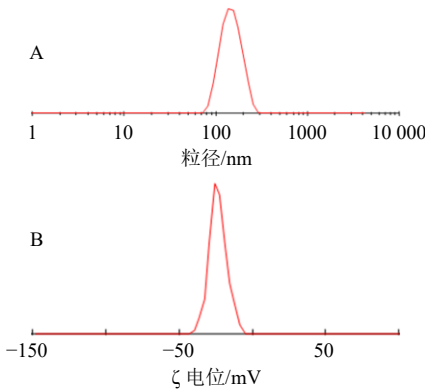


图 3 Lut-PC-BSA-NPs 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位分布 (B)
 Fig. 3 Particle distribution (A) and ζ potential (B) of Lut-PC-BSA-NPs

表 8 验证实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Results of confirmatory experiments ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

项目	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
测得值	81.24 ± 1.07	2.32 ± 0.11	153.64 ± 7.28
预测值	81.72	2.41	148.66
偏差/%	−0.59	−3.73	3.35

PC-BSA-NPs 混悬液加入质量分数为 2%乳糖, 同法制备 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉, 样品外观见图 4。Lut-PC-BSA-NPs 混悬液略带浅蓝色乳光, Lut-PC-BSA-NPs 直接冻干粉呈片状, 加入 2%乳糖制得的 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉外观饱满, 无分层现象。结果测得 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉的包封率、粒径、PDI 值、ζ 电位分别为 (80.19 ± 0.81) %、(164.07 ± 7.94) nm、 0.169 ± 0.015 、(-15.29 ± 0.20) mV。另测得木犀草素在 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉中的质量

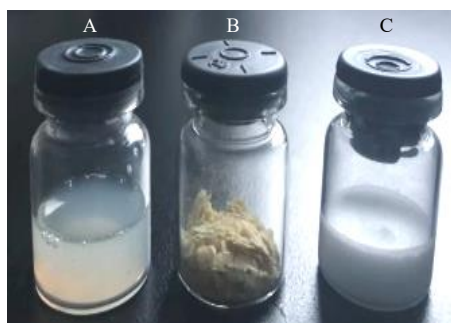


图 4 Lut-PC-BSA-NPs 混悬液 (A)、直接冻干粉 (B) 和冻干粉 (C) 外观

Fig. 4 Appearance of Lut-PC-BSA-NPs suspension (A), lyophilized powder without lactose (B) and lyophilized powder (C)

分数为 $(1.47 \pm 0.03) \%$ 。

2.8 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉溶解度测定

取过量的木犀草素原料药、物理混合物 (木犀草素 + 空白辅料, 比例同 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉) 和 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉, 分别置于 0.1 mol/L 盐酸水溶液及 pH 4.5、5.0、6.8、7.4 PBS 中, 200 W 功率超声 20 min。置于 25 °C 的恒温振荡器中振荡 3 d, 各样品于 13 000 r/min 离心 (离心半径为 5.4 cm) 20 min, 测定上清液中木犀草素浓度。结果 (表 9) 显示, 木犀草素在不同介质中溶解度均低于 100 $\mu\text{g/mL}$, 在物理混合物中溶解度有所增加, 可能与处方中磷脂等辅料增溶作用有关^[4]。木犀草素在 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉中不同介质溶解度均得到极显著性增加 ($P < 0.01$)。

2.9 Lut-PC-BSA-NPs 透射电镜

取 Lut-PC-BSA-NPs 混悬液, 蒸馏水稀释 50 倍,

表 9 不同介质中木犀草素溶解度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Results of luteolin solubility in different media ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

介质	木犀草素溶解度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		
	木犀草素原料药	物理混合物	Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉
0.1 mol·L ⁻¹ 盐酸水溶液	33.61 ± 0.26	36.07 ± 0.22	146.87 ± 1.06**
pH 4.5 PBS	35.18 ± 0.55	37.79 ± 0.31	160.04 ± 0.93**
pH 5.0 PBS	38.16 ± 0.47	42.68 ± 0.42	226.79 ± 2.02**
蒸馏水	40.26 ± 0.43	44.20 ± 0.34	408.73 ± 2.48**
pH 6.8 PBS	81.79 ± 0.49	86.77 ± 0.33	549.32 ± 2.65**
pH 7.4 PBS	84.86 ± 0.52	87.94 ± 0.40	693.44 ± 3.13**

与木犀草素原料药比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs luteolin raw materials.

滴至铜网上, 1.0% 磷钨酸钠溶液负染, 置于 40 °C 真空干燥箱 0.5 h, 取出置于透射电镜下, 放大后即可观察到 Lut-PC-ABS-NPs 基本外貌, 见图 5。Lut-PC-BSA-NPs 之间无黏连现象, 呈球形或椭圆形。

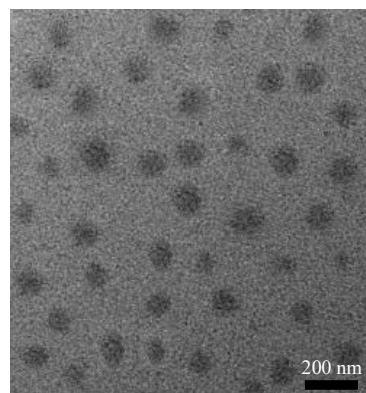


图 5 Lut-PC-BSA-NPs 的 TEM 图

Fig. 5 TEM picture of Lut-PC-BSA-NPs

2.10 晶型研究

取木犀草素原料药、磷脂、Lut-PC、物理混合物 (木犀草素 + 空白辅料, 比例同 Lut-PC-BSA-NPs 冻干粉)、Lut-PC-ABS-NPs 直接冻干粉和 Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉 (加乳糖) 适量作 XRPD 扫描, 测试条件: Cu-K α 靶, 扫描角度 (2θ) 为 3°~45°, 扫描速度为 4°/min, 结果见图 6。木犀草素原料药在 4.6°、9.6°、14.2°、14.9°、15.2°、16.3°、22.4°、25.5° 等处晶型峰相对较强, 磷脂在 3.6° 及 7.6° 等处出现特征晶型峰, 但形成 Lut-PC 后木犀草素和磷脂特征晶型峰均消失。在物理混合物中仍可观察到木犀草素在 4.6°、15.2°、25.5° 处特征晶型峰, 说明木犀草素可能仍以晶型状态存在。Lut-PC-ABS-NPs 直接冻干粉和 Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉 (加乳糖) 的 XRPD 中未观察到木犀草素晶型峰, 说明木犀草素转变成无定型状态。Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉 (加乳糖) XRPD 图谱中其他晶型峰可能是乳糖的晶型峰, 但强度下降。

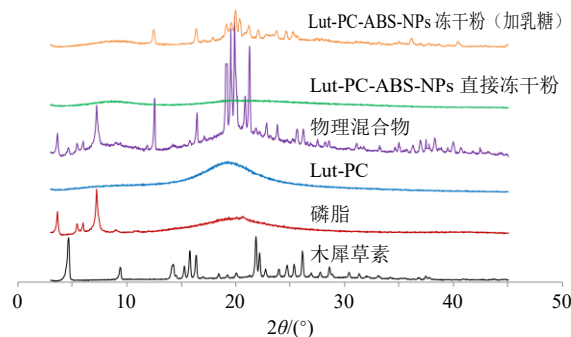


图 6 XRPD 结果

Fig. 6 XRPD results

2.11 Lut-PC-ABS-NPs 中 Lut-PC 保留率的测定

取新制备的 Lut-PC-ABS-NPs 约 20 mg, 加入 2 mL 蒸馏水复溶, 精密量取 0.1 mL 置于离心管中, 加入乙醇 10 mL, 超声 10 s 溶解, 置于 30 °C 减压旋蒸仪中除去溶剂得残渣, 测定木犀草素含量 (W_0)。于残渣中加入二氯甲烷 20 mL, 震荡复溶, 转移至 25 mL 量瓶中, 加入二氯甲烷稀释定容并摇匀。13 000 r/min 离心 (半径为 5.4 cm) 20 min, 收集上层有机相, 常温下减压旋蒸除去有机溶剂, 即得未解离的 Lut-PC, 进样测定木犀草素含量 (W_1), 计算 Lut-PC-ABS-NPs 中 Lut-PC 保留率 (保留率 = W_1/W_0)。结果显示, Lut-PC-ABS-NPs 中 Lut-PC 保留率为 $(81.24 \pm 0.71)\%$, 说明 Lut-PC-ABS-NPs 中大部分木犀草素仍以 Lut-PC 形式存在。

2.12 模拟胃肠液中释药行为研究

取木犀草素原料药、Lut-PC 和 Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉适量, 使木犀草素含量为 10 mg, 采用 8 mL 模拟胃液 (pH 2.0) 制备混悬液, 密封于活化后的透析袋中 (截留相对分子质量为 8 000~12 000)。置于 1 000 mL 模拟胃液 (pH 2.0), 待恒温至 37 °C 后于转速为 75 r/min 条件下进行考察, 在 0、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 h 取样 5 mL, 补加空白介质维持总体积不变。2 h 后将更换为 1 000 mL 模拟肠液 (pH 7.4), 在 3、4、6、8、12、18、24 h 同法取样并补加空白介质。各个样品与 12 500 r/min 离心 (离心半径为 5.4 cm) 20 min, 测定木犀草素含量, 结果见图 7。木犀草素在模拟胃肠液中 24 h 累积释放度仅为 $(10.54 \pm 0.84)\%$, 可能与原料药粒度大、易降解^[8]等有关, Lut-PC 累积释放度仅提高至 $(32.09 \pm 1.10)\%$, 而 Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉累积释放度增加至 $(78.24 \pm 2.68)\%$ 。Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉释药模型与 Weibull 模型拟合度最高 (表 10), 表明体外释药过程是典型的双相动力学特征。

2.13 稳定性考察

取 Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉密封置于 4 °C 冰箱, 分别于 0、1、3、6 个月取样, 测定包封率、粒径、

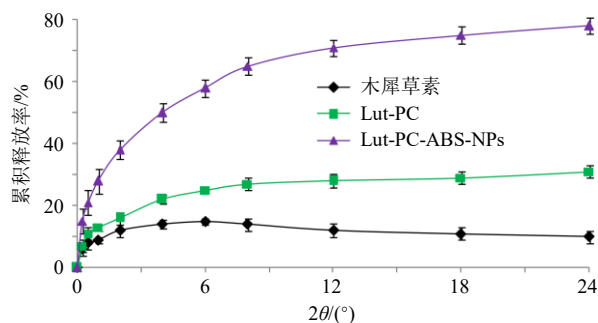


图 7 释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Release curve ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 10 Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉药物释放模型和相关系数
Table 10 Drug release model and correlation coefficient of Lut-PC-ABS-NPs lyophilized powder

模型	拟合方程	R^2
一级模型	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.0537t - 0.4143$	0.8784
Higuchi 模型	$M_t/M_\infty = 0.1371t^{1/2} + 0.1879$	0.9316
Weibull 模型	$\ln \ln[1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.5045 \ln t - 1.0876$	0.9940

t 为取样时间; M_t 为 t 时间累积释放度; M_∞ 为 ∞ 时累积释放度;

M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率。

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

PDI 值、 ζ 电位、溶解度、Lut-PC-ABS-NPs 中 Lut-PC 保留率及 24 h 累积释放度, 结果见表 11。放置 6 个月后 Lut-PC-ABS-NPs 包封率、 ζ 电位绝对值、溶解度、Lut-PC 保留率和 24 h 累积释放度均有所下降, 但幅度较小; 粒径和 PDI 值有所增大, 但粒径仍小于 180 nm, PDI 值仍小于 0.2, 表明 Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉在该储存条件下稳定性良好。

2.14 口服药动学研究

2.14.1 试验方案 取木犀草素原料药、Lut-PC 和 Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉适量, 使用 0.5% 的 CMC-Na 溶液分别配制 ig 液, 使木犀草素质量浓度均为 5 mg/mL, 临用现配。取 18 只大鼠随机分为 3 组 (每组雌雄各半), 按 40 mg/kg 剂量 ig 给药, 木犀草素原料药和 Lut-PC 组于 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0 h 于眼眶后静脉丛取血 0.2~0.3 mL,

表 11 Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Stability study of Lut-PC-ABS-NPs lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t /月	包封率/%	粒径/nm	PDI 值	ζ 电位/mV	溶解度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Lut-PC 保留率/%	24 h 累积释放度/%
0	80.54 ± 0.66	161.69 ± 7.41	0.173 ± 0.012	-15.58 ± 0.29	410.32 ± 2.90	80.95 ± 0.77	79.38 ± 2.52
1	80.60 ± 0.78	165.21 ± 8.33	0.167 ± 0.015	-15.17 ± 0.23	408.04 ± 2.76	80.07 ± 0.64	78.96 ± 2.73
3	80.32 ± 0.54	169.42 ± 7.98	0.178 ± 0.014	-15.03 ± 0.24	409.11 ± 2.83	79.26 ± 0.46	78.79 ± 2.48
6	80.14 ± 0.65	177.58 ± 7.54	0.189 ± 0.016	-14.82 ± 0.20	406.87 ± 2.34	78.82 ± 0.70	78.13 ± 2.85

Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉组增加 12 h 取血点, 将血样置于肝素浸润的离心管, 摇匀后 3 000 r/min 离心 (离心半径为 5.4 cm) 3 min, 吸取上层血浆, 冷冻保存。

2.14.2 血浆样品的处理^[9] 采用乙腈配制质量浓度为 2 000 ng/mL 黄芩素对照品溶液, 作为内标溶液。将血浆样品置于室温解冻, 取 100 μ L 置于离心管中, 加入内标溶液 50 μ L 和 100 μ L 5% 高氯酸-甲醇溶液涡旋 3 min。加入 0.5 mL 醋酸乙酯密封涡旋 5 min 进行提取, 6 000 r/min 离心 (离心半径为 5.4 cm) 15 min, 移取上层有机相层至另一离心管中, 置于 40 $^{\circ}$ C 水浴中氮气吹干, 加入 100 μ L 乙腈复溶, 6 000 r/min 离心 15 min, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定。

2.14.3 血浆对照品溶液的配制及标准曲线方程 采用乙腈配制质量浓度为 3 000、1 500、500、250、100、50 ng/mL 木犀草素对照品溶液, 各质量浓度取 100 μ L, 置于 40 $^{\circ}$ C 水浴中氮气吹干后加入空白血浆 100 μ L, 涡旋 5 min 复溶即得质量浓度为 3 000、1 500、500、250、100、50 ng/mL 欧前胡素血浆对照品溶液。按“2.14.2”项下方法操作, 按“2.2.1”项下色谱条件测定木犀草素和内标的峰面积, 采用两者比值 (Y) 作为纵坐标, 欧前胡素质量浓度 (X) 为横坐标, 得回归方程 $Y=0.0019X-0.4367$, $r=0.9952$, 可见, 木犀草素血浆对照品在 50~3 000 ng/mL 质量浓度区间线性关系良好。

2.14.4 专属性考察 取空白血浆、木犀草素+空白血浆 (含内标) 和原料药组 ig 给药 8 h 的血浆样品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 结果见图 8, 血浆内源性物质不干扰木犀草素和内标的色谱峰, 专属性较高。

2.14.5 稳定性考察 取血浆样品置于室温, 于 0、2、4、8、12、18 h 测定木犀草素和内标的峰面积, 计算得两者峰面积比值 RSD 为 5.48%, 表明稳定性良好。

2.14.6 精密度考察 取低质量浓度 (50 ng/mL)、中质量浓度 (500 ng/mL) 和高质量浓度 (3 000 ng/mL) 木犀草素血浆对照品溶液, 同一天内连续测定 6 次, 木犀草素与内标峰面积比值 RSD 分别为 4.04%、7.18%、5.17%, 表明精密度良好。

2.14.7 回收率考察 制备低质量浓度 (50 ng/mL)、中质量浓度 (500 ng/mL) 和高质量浓度 (3 000 ng/mL) 木犀草素对照品溶液, 按“2.14.2”项下方

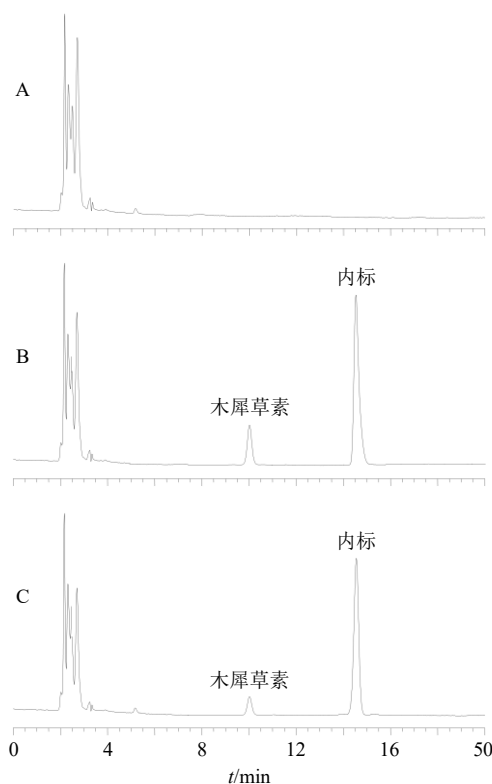


图 8 空白血浆 (A)、木犀草素+空白血浆 (B) 和血浆样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 8 HPLC of blank plasma (A), luteolin + blank plasma (B) and plasma sample (C)

法制备成血浆样品各 6 份, 分别进样测定木犀草素含量, 并计算回收率。结果显示, 木犀草素平均回收率为 96.14%, RSD 为 4.89%, 表明准确度较高。

2.14.8 定量限和检测限考察 取 50 ng/mL 木犀草素血浆对照品溶液逐步稀释, 采用信噪比为 3 时作为定量限, 信噪比为 10 时作为检测限, 结果表明定量限和检测限分别为 15 ng/mL 和 7.5 ng/mL。

2.14.9 药动力学结果 使用 DAS 3.0 药动力学软件进行拟合, 分别计算药动力学参数, 药-时曲线见图 9, 主要药动力学参数见表 12。与木犀草素原料药相比,

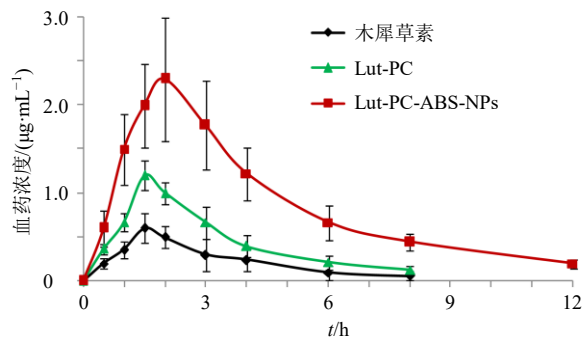


图 9 药时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

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

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	木犀草素	Lut-PC	Lut-PC-ABS-NPs
$t_{\max}$	h	1.44 ± 0.57	1.52 ± 0.61	$2.14 \pm 0.24^{* \#}$
$t_{1/2}$	h	3.07 ± 0.62	3.21 ± 0.71	$5.03 \pm 0.97^{* \#}$
$C_{\max}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	657.15 ± 201.96	$1\ 197.11 \pm 224.68^{*}$	$2\ 220.85 \pm 757.54^{* \# \#}$
$\text{AUC}_{0 \sim t}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$2\ 262.70 \pm 504.79$	$3\ 913.45 \pm 527.39^{*}$	$8\ 998.06 \pm 807.21^{* \# \#}$
$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	$2\ 706.85 \pm 516.23$	$3\ 717.27 \pm 563.84^{*}$	$8\ 116.92 \pm 828.73^{* \# \#}$

与木犀草素比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$; 与 Lut-PC 比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{\# \#}P < 0.01$ 。

$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs luteolin; $^{\#}P < 0.05$ $^{\# \#}P < 0.01$ vs Lut-PC.

Lut-PC 的 $t_{\max}$ 和 $t_{1/2}$ 均无显著性差异 ($P > 0.05$), 而 $C_{\max}$ 、 $\text{AUC}_{0 \sim t}$ 、 $\text{AUC}_{0 \sim \infty}$ 均有显著性提高 ($P < 0.05$), 相对口服吸收生物利用度提高至 1.73 倍。Lut-PC-ABS-NPs 的 $t_{\max}$ 和 $t_{1/2}$ 均有显著性差异 ($P < 0.05$), 而 $C_{\max}$ 、 $\text{AUC}_{0 \sim t}$ 、 $\text{AUC}_{0 \sim \infty}$ 均有极显著性提高 ($P < 0.01$), 相对口服吸收生物利用度提高至 3.98 倍。与 Lut-PC 相比, Lut-PC-ABS-NPs 的 $t_{\max}$ 和 $t_{1/2}$ 均有显著性差异 ($P < 0.05$), $C_{\max}$ 、 $\text{AUC}_{0 \sim t}$ 、 $\text{AUC}_{0 \sim \infty}$ 均有极显著性提高 ($P < 0.01$), 说明 Lut-PC-ABS-NPs 可进一步促进木犀草素口服吸收。

3 讨论

木犀草素脂溶性和水溶性均差, 故将其制备成 Lut-PC 来改善其溶解性质, 但 Lut-PC 为半固体状态, 黏性较大。有研究者通过引入纳米结构脂质载体^[24]、固体脂质纳米粒^[25]等来改善磷脂复合物不足, 但制备工艺复杂, 制剂载药量较低。白蛋白纳米粒制剂技术系采用亲水性强的白蛋白作为纳米载体, 且白蛋白本身可作为稳定剂、冻干保护剂等^[17], 有助于减少制剂辅料种类及用量。

前期曾采用去溶剂-高压均质法制备 Lut-PC-ABS-NPs, 但该法在制备过程中极易发生沉淀, 可能与 Lut-PC 在水相中稳定性不高有关, 故最终选用乳化-高压均质法进行制备。Lut-PC-ABS-NPs 形成机理可能是^[25-26]: 将溶有 Lut-PC 的反相有机溶剂以乳滴形式分散于白蛋白水相中, 在高速剪切力产生的空穴、热效应等作用下使白蛋白构象改变及变性 (形成二硫键桥联), 从而在 Lut-PC 周围形成纳米级别的交联聚合物壳体而实现载药, 该法避免使用戊二醛等交联剂, 安全性高。Lut-PC 在水相中易发生解离, 故本研究对 Lut-PC-ABS-NPs 中 Lut-PC 保留率进行了测定, 结果表明 Lut-PC-ABS-NPs 中大部分木犀草素仍以 Lut-PC 形式存在。由于木犀草素与白蛋白结合率几乎达 100%^[27], 故从 Lut-PC 中解离

出来的木犀草素可能直接与白蛋白载体形成了纳米粒, 示意图见图 10。Lut-PC-ABS-NPs 在模拟胃肠液中释药是双相动力学特点, 前期释药较快可能与表层或浅表层药物释放有关。随着白蛋白逐渐降解或溶蚀, Lut-PC-ABS-NPs 内部药物缓慢扩散出去, 从而出现持续、缓慢释放阶段^[28]。

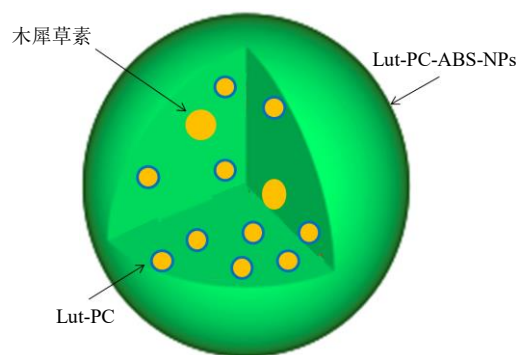


图 10 Lut-PC-ABS-NPs 示意图

Fig. 10 Schematic diagram of Lut-PC-ABS-NPs

Lut-PC 促进了木犀草素口服吸收可能是由于在一定程度上改善了药物溶解性质 (水溶性及脂溶性) 和溶出度等, 但由于 Lut-PC 疏水性强、分散性差、容易发生解离等, 影响了促吸收效果。Lut-PC-ABS-NPs 药动学行为发生了更大变化, $t_{\max}$ 延后可能与本身缓释作用有关。Lut-PC-ABS-NPs 的 $t_{1/2}$ 发生显著性延长, 有助于使木犀草素充分吸收、维持药效。Lut-PC-ABS-NPs 进一步提高了木犀草素的吸收程度可能是由于 Lut-PC-ABS-NPs 融合了磷脂复合物和白蛋白纳米粒双重优势, 使药物脂溶性、水溶性、释放度等均得到明显改善^[29]; 纳米级别的 Lut-PC-ABS-NPs 比表面积较大, 增加了药物与胃肠道黏膜接触几率, 利于药物经淋巴转运、胞间转运等吸收途径^[24-25], 提高吸收效率; Lut-PC-ABS-NPs 可对包裹的木犀草素提供保护作用, 降低在胃肠液中降解几率; 木犀草素在 Lut-PC-ABS-NPs 中以无定

型状态存在, 无定型药物比晶型药物更易吸收。综上, 本研究完成了 Lut-PC-ABS-NPs 冻干粉制备工艺研究, 木犀草素以无定型状态存在, 且储存稳定性良好。木犀草素在不同 pH 介质中溶解度得到明显改善, 有效提高了药物释放度及口服吸收生物利用度, 为继续评价其体内抗肿瘤药效等奠定了实验基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄龙岳, 宁洪鑫, 姚薛超, 等. 木犀草素提取和纯化工艺的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 1185-1192.
- [2] 胡泽香, 佟雷, 耿艳萌, 等. 木犀草素的药理活性及其制剂研究进展 [J]. 中医临床研究, 2022, 14(10): 141-145.
- [3] 陈娟, 邓敏, 周焕, 等. 木犀草素抑制 PKM2 继而促进自噬诱导肝癌细胞凋亡 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(11): 1103-1108.
- [4] 易均路, 侯科名, 陈蓉. 木犀草素对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(2): 125-133.
- [5] 史晓欣, 全文婕, 汤芊, 等. 木犀草素抗乳腺癌作用机制的研究进展 [J]. 肿瘤药学, 2018, 8(2): 135-138.
- [6] 杨玲. 基于 TGF- β 1/Smads 信号通路探讨木犀草素抑制子宫内异症纤维化的机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [7] 王兰. 木犀草素/SBE- β -CD 包合物的制备和生物利用度研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [8] 杨琳. 基于 HPLC-MS/MS 研究木犀草素在大鼠体内的代谢行为 [D]. 大连: 大连理工大学, 2016.
- [9] 涂亮星, 杨如月, 刘佳丽, 等. 不同剂量木犀草素在大鼠体内药动学的比较 [J]. 中成药, 2022, 44(12): 3753-3757.
- [10] 刘淼, 高悦, 李康帆, 等. 聚乙二醇修饰木犀草素脂质体的制备及其理化性质 [J]. 现代食品科技, 2021, 37(10): 118-125.
- [11] 杨娟, 尚曙玉, 贾安, 等. 木犀草素固体脂质纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2021, 43(9): 2281-2286.
- [12] 毛艳婷, 马姝丽, 白朝辉, 等. 木犀草素纳米结构脂质载体及其冻干粉的制备和体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(23): 2423-2429.
- [13] 刘会珍, 董丹丹, 范明松. 不同厚朴酚制剂的制备、表征及其在 SD 大鼠体内药动学行为比较 [J]. 中草药, 2020, 51(17): 4442-4448.
- [14] 陈晓敏, 曹伶俐, 崔伟峰. 鼠李素磷脂复合物的处方工艺优化、表征及体外溶出度考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(4): 399-403.
- [15] 邓向涛, 郝海军, 陈晓峰, 等. 木犀草素 2 种固体分散体制备、表征和大鼠体内药动学行为研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5787-5793.
- [16] 李伟宏, 郑伟, 王风云, 等. 金丝桃苷磷脂复合物及其介孔二氧化硅纳米粒的制备和口服药动学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4157-4167.
- [17] 张春燕, 李燕红, 陈乾, 等. 以牛血清白蛋白为稳定剂制备紫花苜蓿聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒及口服药动学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4481-4492.
- [18] 吕英淑, 董睿, 石双颖, 等. 基于抑癌基因和免疫功能探讨注射用紫杉醇(白蛋白结合型)联合卡铂与曲妥珠单抗治疗 HER-2 阳性乳腺癌患者的临床效果 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(2): 408-413.
- [19] 张佳慧, 孙敬蒙, 张鑫, 等. 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 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8043-8054.
- [20] 李阳杰, 周敬. 木犀草素磷脂复合物的制备、表征及体内药动学行为 [J]. 中成药, 2019, 41(6): 1381-1384.
- [21] 陈卫. 白蛋白纳米粒作为疏水性和亲水性药物的载体研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [22] 刘娇娇. 虾青素白蛋白纳米复合物的制备及其初步体内评价 [D]. 重庆: 西南大学, 2020.
- [23] 郭忠秋. 苜蓿酰胺白蛋白纳米粒的研究 [D]. 沈阳: 辽宁大学, 2020.
- [24] 邵娜, 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.
- [25] 杨金枝, 崔晓鸽, 郝海军. TPGS 表面修饰岩白菜素固体脂质纳米粒的制备与口服生物利用度研究 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4144-4156.
- [26] 张丽娟. 磺化酞菁与人血清白蛋白复合物的光动力活性研究 [J]. 化学研究与应用, 2022, 34(2): 233-239.
- [27] 周志芸. 黄酮类化合物对 UGTs 介导代谢的作用 [D]. 苏州: 苏州大学, 2022.
- [28] 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.
- [29] Lu C, Li X, Liang X, *et al.* Liver targeting albumin-coated silybin-phospholipid particles prepared by Nab TM technology for improving treatment effect of acute liver damage in intravenous administration [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2019, 20(7): 293-305.

[责任编辑 郑礼胜]