

负载胡桃醌的白及多糖-维生素 E 琥珀酸酯聚合物胶束的制备及表征

凌延文, 白丹妮, 胡艳秋, 平 洋, 王丽红, 苏 瑾*

佳木斯大学药学院 黑龙江省新药创制与药效毒理评价重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007

摘要: 目的 制备负载胡桃醌的白及多糖-维生素 E 琥珀酸酯聚合物胶束 (Jug/BSP-VES), 并进行表征和评价。方法 通过酯化反应合成白及多糖-维生素 E 琥珀酸酯聚合物 (BSP-VES) 载体, 采用溶剂挥发法制备胶束, 以包封率、载药量为指标, 采用单因素实验筛选胶束处方和工艺, 并用星点设计-效应面法确定其最优处方; 使用透射电子显微镜和 Zetasizer Nano ZSE 纳米粒度电位仪观察测定 Jug/BSP-VES 形态、粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 及 ζ 电位; 通过体外释药对 Jug/BSP-VES 进行评价, 并考察其稳定性。**结果** 成功合成 BSP-VES 聚合物, 其临界聚集浓度 (critical aggregation concentration, CAC) 值为 $5.95 \mu\text{g/mL}$; 以最优处方制备的 Jug/BSP-VES 胶束呈类球形, 外观澄清透明, 丁达尔效应明显; 粒径、PDI、 ζ 电位结果分别为 $(120.30 \pm 2.80) \text{ nm}$ 、 0.169 ± 0.014 、 $(-27.00 \pm 1.25) \text{ mV}$, 包封率 $(89.140 \pm 1.163) \%$, 载药量 $(6.493 \pm 0.087) \%$, 在含有 0.5% 聚山梨酯-80 的醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 中 48 h 累积释放率达到 $(82.13 \pm 2.51) \%$ 。在 4°C 下储存稳定性良好。**结论** 通过溶剂挥发法制备的 Jug/BSP-VES 胶束粒径均一, 包封率高, 稳定性较好, 具有一定缓释作用, 该研究为胡桃醌的递药系统设计提供了参考。

关键词: 胡桃醌; 白及多糖; 维生素 E 琥珀酸酯; 胶束; 制备工艺; 体外评价

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)11-3668-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.010

Preparation and characterization of *Bletilla striata* polysaccharide-vitamin E succinate polymer micelles loaded with juglone

LING Yanwen, BAI Danni, HU Yanqiu, PING Yang, WANG Lihong, SU Jin

Heilongjiang Provincial Key Laboratory of New Drug Development and Pharmacotoxicological Evaluation, Department of Pharmacy, Jamusi University, Jamusi 154007, China

Abstract: Objective *Bletilla striata* polysaccharide-vitamin E succinate polymeric micelles (Jug/BSP-VES) loaded with juglone were prepared, characterized and evaluated. **Methods** *Bletilla striata* polysaccharide-vitamin E succinate polymer (BSP-VES) carriers were synthesized by esterification reaction, and micelles were prepared by solvent evaporation method. The micellar prescriptions and processes were screened by single factor experiment using envelopment efficiency and drug loading as the indexes and the optimal prescription was determined by central composite design-response surface method. The morphology, particle size, polydispersity index (PDI) and ζ potential of Jug/BSP-VES were observed and determined by transmission electron microscope and Zetasizer Nano ZSE nanoparticle size potentiostat, and Jug/BSP-VES was evaluated by *in vitro* drug release and its stability was examined. **Results** The BSP-VES polymer was successfully synthesized, and its critical aggregation concentration (CAC) value was $5.95 \mu\text{g/mL}$. The Jug/BSP-VES micelles prepared with the optimal prescription were spherical in shape, with a clear and transparent appearance and obvious Tyndall effect. The results of particle size, PDI, and ζ potential were $(120.30 \pm 2.80) \text{ nm}$, 0.169 ± 0.014 , and $(-27.00 \pm 1.25) \text{ mV}$, respectively, with the envelopment efficiency of $(89.140 \pm 1.163) \%$, and the drug loading of $(6.493 \pm 0.087) \%$ and the cumulative release rates of $(82.13 \pm 2.51) \%$ for 48 h in acetic acid-sodium acetate buffer (pH 4.5) containing 0.5% polysorbate-80. Its storage was stable at 4°C . **Conclusion** The Jug/BSP-VES micelles prepared by solvent evaporation method had uniform particle size, high envelopment efficiency, good stability, and some slow release effects. This study provides a reference for the design of the delivery system of juglone.

收稿日期: 2023-11-04

基金项目: 黑龙江省省属高校基本科研业务费项目 (2020-KYYWF-0248); 佳木斯大学科技创新团队 (extd202103); 黑龙江省“双一流”特色学科北药与功能食品学科 (HLJTSXK-2022-03)

作者简介: 凌延文, 硕士研究生, 研究方向为缓释靶向给药系统研究及中药药动学。E-mail: L554421918@yeah.net

*通信作者: 苏 瑾, 博士, 副教授, 研究方向为缓释靶向给药系统研究及中药药动学。E-mail: sujin@jmsu.edu.cn

Key words: juglone; *Bletilla striata* polysaccharide; vitamin E succinate; micelles; preparation process; *in vitro* evaluation

青龙衣 green walnut husks 来源于胡桃科胡桃属植物胡桃和胡桃楸的未成熟果实的干燥外果皮。胡桃醌是青龙衣中的萜醌类化合物,也是主要活性成分^[1]。现代药理研究表明,胡桃醌具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等作用^[2-5],对多种肿瘤细胞增殖均有抑制作用。目前,已证实胡桃醌能抑制宫颈癌细胞生长,并诱导其凋亡、抑制细胞迁移、侵袭^[6-7]。其对肝癌 HepG2 细胞的体内外抑制活性显著,能够上调死亡受体 5 (death receptor 5, DR5) 表达,通过 ROS 介导的 p53 信号通路激活,促进自噬体形成,诱导细胞的凋亡与自噬^[8]。胡桃醌对人乳腺癌 MCF-7 细胞抑制生长效果明显,与时间和浓度呈正相关,同时使 Bcl-2 相关 X 蛋白/B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2 associated X protein/B-cell lymphoma-2, Bax/Bcl-2) 比值升高,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine-aspartate protease-3, Caspase-3)、Caspase-9 被激活,诱导细胞凋亡^[9]。但胡桃醌水溶性差,易升华,能随水蒸汽挥发,长期存放易发生氧化分解,限制了其在新药开发和在临床上的应用^[10],因此,针对其药理活性及潜在应用,设计一种可有效提高胡桃醌稳定性的递药体系具有重要意义。

两亲性嵌段共聚物是在自组装过程中将疏水性药物包覆或键合在聚合物中形成的载药纳米胶束,其能够弥补传统药物水溶性差、吸收率低等不足,可提高药物生物利用度,实现靶向控制释放,在抗癌药物递送中被广泛应用^[11]。白及多糖 (*Bletilla striata* polysaccharide, BSP) 是从兰科白及属植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎中提取得到的一类水溶性多糖,作为天然高分子材料,具有结构稳定、生物可降解、生物安全性高、易于修饰改造等特点,逐渐成为一种纳米药物递送系统的新型优良载体材料^[12]。维生素 E 琥珀酸酯 (vitamin E succinate, VES) 是维生素 E 的类似物,因具有较长的脂肪链而疏水性较强,将其和白及多糖连接可提高包载药物的稳定性。VES 还能够抑制肿瘤细胞生长和诱导肿瘤细胞凋亡,且只对肿瘤细胞有抑制作用,对正常的组织细胞无任何不良反应,因此 VES 具有药物和载体的双重作用^[13-14],在递送药物的同时达到辅助治疗的效果。

本实验以白及多糖为亲水端, VES 为疏水端,合成两亲性嵌段共聚物 BSP-VES,将其作为载体制

备胡桃醌载药胶束 (Jug/BSP-VES),同时考察制备过程中各因素对包封率和载药量的影响,采用星点设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 优化 Jug/BSP-VES 胶束的处方和工艺,并进行质量评价,为传统中药青龙衣及其活性成分胡桃醌的开发及临床应用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 Series 型高效液相色谱仪,美国安捷伦有限公司; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器,上海秋佐科学仪器有限公司; KQ-200KDB 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; UV-765 型紫外-可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司; Advantage 型台式托盘冻干机,美国 VirTis 公司; 80-2 型电动离心机,上海浦东物理光学仪器厂; Zetasizer Nano ZSE 型纳米粒度电位仪,英国马尔文公司; FTIR-650 型傅里叶变换红外光谱仪,天津港东科技股份有限公司; 970CRT 型荧光分光光度计,北京恒奥德仪器有限公司; Hula Dancer Digital 型涡旋混合器,德国 IKA 公司; Talos F200S G2 型透射电子显微镜 (TEM),赛默飞仪器公司。

1.2 试药

胡桃醌原料药 (批号 A2007171,质量分数 $\geq 97\%$)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP),上海阿拉丁试剂有限公司;白及多糖,批号 GH210721,西安国豪生物科技有限公司;胡桃醌对照品,批号 RFS-H07511804026,质量分数 $>98\%$,成都瑞芬思生物科技有限公司;VES,批号 VS1210200734,西安海斯夫生物科技有限公司;苾,分析纯,上海九鼎化学有限公司。

2 方法与结果

2.1 BSP-VES 聚合物的合成

称取 3.2 g BSP 超声溶解于 30 mL DMSO 中。另称取适量 VES、DMAP 和 EDC ($n_{\text{VES}}:n_{\text{DMAP}}:n_{\text{EDC}}=1:1:1.2$) 溶于 DMSO 后磁力搅拌活化 1 h, BSP 溶液缓慢滴入,密封圆底烧瓶,38 °C 水浴搅拌下反应 48 h,室温冷却后移至透析袋 (截留相对分子质量 3 500) 中用纯化水透析 2 d 以除去未反应

试剂。将溶液 3 500 r/min 离心 (离心半径 10 cm) 15 min 取上清液, -20°C 冰箱中预冻, 随后进行冷

冻干燥, 得到棕色絮状疏松固体, 置于 4°C 冰箱中冷藏备用, 反应式见图 1。

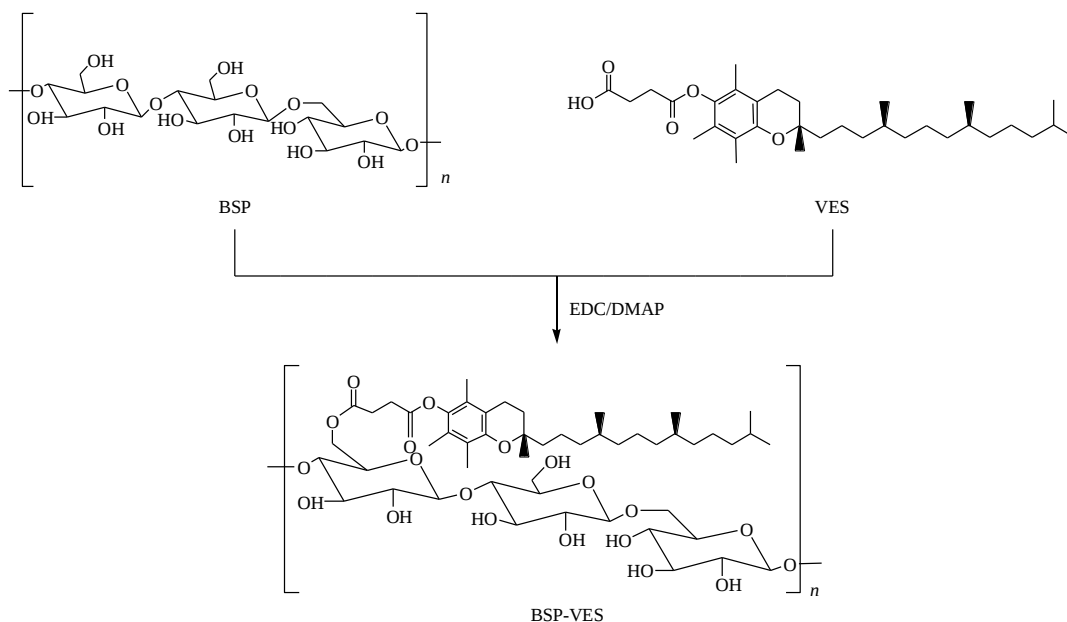


图 1 BSP-VES 合成路线图

Fig. 1 Synthesis process of BSP-VES

2.2 BSP-VES 的表征及结果

2.2.1 核磁共振氢谱 ($^1\text{H-NMR}$) 检测 以 D_2O 为溶剂, 对 BSP-VES 合成产物进行 $^1\text{H-NMR}$ 分析。结果如图 2 所示, δ 3.0~4.0 处宽峰为白及多糖上甘

露糖和葡萄糖单元中的亚甲基和次甲基 ($\text{CH}_2\text{-O}$ 和 CH-O) 的质子峰, δ 0.8~1.0 附近为 VES 中甲基(e)、亚甲基信号峰, δ 5.31 处为白及多糖 (1,6) 糖苷键 (a) 的质子化学位移。以上结果表明合成产物为 BSP-VES^[15]。

2.2.2 红外光谱 (IR) 检测 采用 IR 法分别对 BSP、VES、BSP-VES 进行表征, 红外扫描范围为 $4\,000\sim 500\text{ cm}^{-1}$, 结果如图 3 所示。BSP 的结果图 (图 3-a) 中, $3\,384.56$ 、 $2\,921.63\text{ cm}^{-1}$ 为 O-H 和 C-H 的伸缩振动峰, $1\,149.37$ 、 $1\,076.08$ 、 $1\,025.94\text{ cm}^{-1}$ 为吡喃糖苷构型的特征峰。VES 的结果图 (图 3-b) 中, $2\,923.56\text{ cm}^{-1}$ 为 $\text{-CH}_2\text{-}$ 、 -CH- 的伸缩振动峰, $1\,749.12$ 、

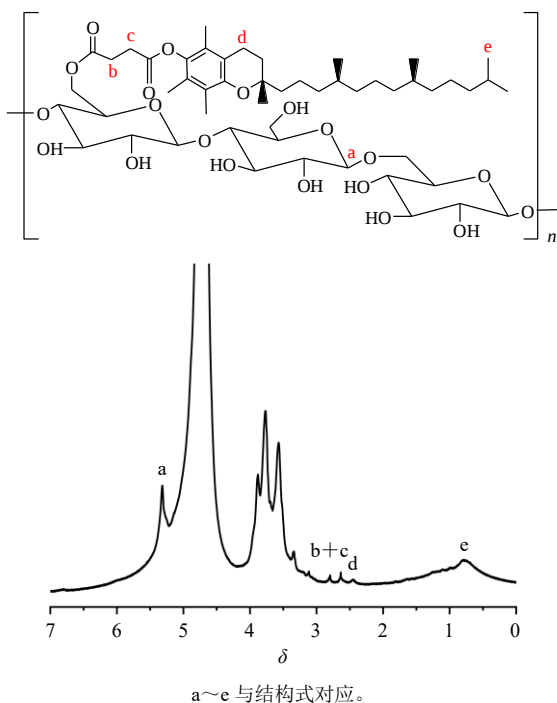


图 2 BSP-VES 的 $^1\text{H-NMR}$ 图

Fig. 2 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of BSP-VES

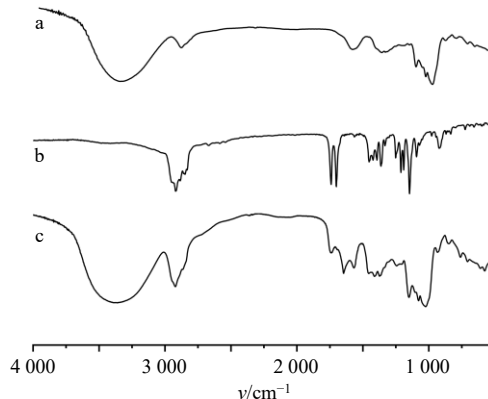


图 3 BSP (a)、VES (b)、BSP-VES (c) 的 IR 图

Fig. 3 IR spectra of BSP (a), VES (b) and BSP-VES (c)

1 710.55 cm^{-1} 为羧基和酯基中 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰, 1 373.07、1 157.08 cm^{-1} 为 $-\text{CH}_3$ 和 $\text{C}-\text{O}$ 的伸缩振动峰。BSP-VES 的结果图(图 3-c), 其中 2 921.63 cm^{-1} 处的 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动峰增强, 说明有 VES 中大量 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_3$ 的引入, 1 739.48 cm^{-1} 为酯基中 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰, 1 567.84 cm^{-1} 为 VES 中苯环骨架振动峰, 揭示了 VES 的引入^[16]。

2.3 Jug/BSP-VES 胶束的制备

采用溶剂挥发法制备 Jug/BSP-VES 胶束^[17]。称取 20 mg 的 BSP-VES 于 15 mL 水中, 称取 2 mg 胡桃醌溶于 3 mL 无水乙醇中, 在搅拌下将含药溶液滴加至水相中, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌 6 h, 有机溶剂挥发完全后即得 Jug/BSP-VES 胶束溶液。预冻后, 置于冻干机中, 取出即得冻干粉。

2.4 Jug/BSP-VES 中胡桃醌含量测定方法

2.4.1 色谱条件 色谱柱为依利特 Kromasil (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (70:30); 检测波长 248 nm; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 10 μL 。

2.4.2 溶液的配制

(1) 对照品溶液的配制: 精密称取胡桃醌对照品 5.0 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 得质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

(2) 供试品溶液的配制: 精密吸取 Jug/BSP-VES 胶束溶液 0.5 mL 至 10 mL 量瓶中, 甲醇破乳并定容至刻度, 摇匀, 即得 Jug/BSP-VES 供试品溶液。空白胶束供试品溶液同法操作。

2.4.3 专属性考察 分别取适量空白胶束供试液、适当浓度的胡桃醌对照品溶液及 Jug/BSP-VES 供试品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 按“2.4.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。结果见图 4, 空白胶束在胡桃醌处无干扰, 专属性良好。

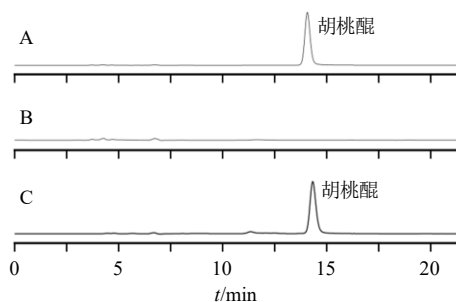


图 4 胡桃醌对照品溶液 (A)、BSP-VES 溶液 (B)、Jug/BSP-VES 溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of juglone reference solution (A), BSP-VES solution (B) and Jug/BSP-VES solution (C)

2.4.4 线性关系考察 取“2.4.2”项下对照品溶液适量, 加甲醇稀释, 得到系列质量浓度为 1、5、10、30、50、70、100 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性方程拟合, 得回归方程为 $Y=44.786 X-38.423$, $r=0.999 8$, 结果表明胡桃醌在 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4.5 精密度试验 取“2.4.4”项下低、中、高 3 个质量浓度 (分别为 5、30、70 $\mu\text{g/mL}$) 胡桃醌对照品溶液, 同 1 d 内各质量浓度分别进样 5 次, 计算日内精密度; 各质量浓度连续进样 5 d, 计算日间精密度。日内与日间精密度 RSD 均小于 2.0%, 表明仪器的精密度良好。

2.4.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液在 0、2、4、8、12、24 h 下, 按照“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 结果峰面积的 RSD 值为 0.596%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.7 重复性试验 取同一批 Jug/BSP-VES 6 份, 按“2.4.2”项方法制备供试品溶液, 按照“2.4.1”项下色谱条件进行测定, 计算胡桃醌质量浓度的 RSD 值为 1.03%, 表明测定方法的重复性良好。

2.4.8 加样回收率试验 精密量取 200 $\mu\text{g/mL}$ 胡桃醌对照品溶液 0.25、1.50、3.50 mL 各 3 份于 10 mL 量瓶中, 加入 BSP-VES 聚合物, 用甲醇定容, 分别得到胡桃醌质量浓度为 5、30、70 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 按“2.4.1”项下色谱条件测定胡桃醌的含量, 测得加样回收率均在 99%~102%, RSD 均小于 2.0%, 表明检测结果准确可靠。

2.5 胡桃醌包封率、载药量的测定

采用离心法进行聚合物胶束药物包封率和载药量的测定^[18]。精密吸取 Jug/BSP-VES 胶束溶液 1 mL 至 1.5 mL 离心管中, 3 000 r/min 离心 (离心半径 8 cm) 10 min, 除去游离药物, 吸取 0.5 mL 上清液, 甲醇破乳并定容至刻度, 摇匀, 按“2.4.1”项下色谱条件进样分析。另取 Jug/BSP-VES 胶束溶液 0.5 mL 至 10 mL 量瓶中, 甲醇破乳并定容至刻度, 摇匀, 按“2.4.1”项下色谱条件进样分析。将所得峰面积带入线性方程计算胡桃醌的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = W_{\text{胶束中药物量}} / W_{\text{总药量}}$$

$$\text{载药量} = W_{\text{胶束中药物量}} / W_{\text{胶束质量}}$$

2.6 单因素考察

2.6.1 有机溶剂种类考察 固定其他条件不变, 即有机溶剂用量为 3 mL, 挥发时间为 6 h, 制备温度

为 30 ℃, 载药比为 10:1, 水相用量为 15 mL, 分别加入有机溶剂氯仿、丙酮、甲醇、无水乙醇, 考察不同有机溶剂种类对载药量和包封率的影响。结果(表 1)显示, 以无水乙醇为溶剂时, 制备的胶束溶液包封率和载药量最高, 因此, 选择无水乙醇作为溶剂来制备 Jug/BSP-VES 胶束。

表 1 有机溶剂种类考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Survey of kinds of organic solvents ($\bar{x} \pm s, n=3$)

有机溶剂种类	包封率/%	载药量/%
甲醇	84.70±1.39	6.51±0.48
无水乙醇	88.21±0.48	6.85±0.37
氯仿	63.06±2.18	4.90±0.12
丙酮	55.12±2.37	4.35±0.53

2.6.2 有机溶剂用量考察 固定其他条件不变, 即有机溶剂为无水乙醇, 挥发时间为 6 h, 制备温度为 30 ℃, 载药比为 10, 水相用量为 15 mL, 加入一定量的 BSP-VES 和胡桃醌分别溶解于 1、2、3、4、5 mL 无水乙醇中, 考察不同有机溶剂用量对载药量和包封率的影响。结果(表 2)显示, 当有机溶剂用量为 3 mL 时胡桃醌的载药量和包封率最高, 因此, 选择 3 mL 作为有机溶剂用量。

表 2 有机溶剂用量考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Survey of organic solvent consumption ($\bar{x} \pm s, n=3$)

有机溶剂用量/mL	包封率/%	载药量/%
1	59.71±1.15	4.62±0.45
3	87.69±1.74	6.54±0.63
5	79.82±0.89	6.13±0.33
7	69.37±3.02	5.37±0.45
9	64.24±1.58	4.97±0.36

2.6.3 挥发时间考察 固定其他条件不变, 即有机溶剂为无水乙醇, 用量为 3 mL, 制备温度为 30 ℃, 载药比为 10, 水相用量为 15 mL, 考察挥发时间在 4、5、6、7、8 h 时, 不同挥发时间对载药量和包封率的影响。结果(表 3)显示, 当挥发时间为 6 h 时胡桃醌的载药量和包封率最高, 因此, 选择 6 h 作为挥发时间来制备 Jug/BSP-VES 胶束。

2.6.4 制备温度考察 固定其他条件不变, 即有机溶剂为无水乙醇, 用量为 3 mL, 挥发时间为 6 h, 载药比为 10, 水相用量为 15 mL, 考察制备温度在 25、30、35、40、45 ℃时, 不同制备温度对载药量和包封率的影响。结果(表 4)显示, 随着制备温度的增加, 胡桃醌的载药量与包封率先升高后降低,

表 3 挥发时间考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Survey of volatile time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

挥发时间/h	包封率/%	载药量/%
4	67.22±1.02	5.22±0.22
5	78.43±0.84	6.04±0.14
6	87.06±1.29	6.45±0.10
7	86.98±1.31	6.43±0.17
8	79.41±0.24	6.13±0.23

表 4 制备温度考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Survey of preparation temperature ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制备温度/℃	包封率/%	载药量/%
25	77.17±1.53	6.45±0.14
30	89.28±2.18	6.95±0.20
35	77.78±2.05	6.50±0.31
40	71.08±0.96	6.36±0.87
45	67.40±3.11	5.20±0.28

因此将 25~35 ℃的制备温度作为待优化项进行 CCD-RSM 实验。

2.6.5 载药比考察 固定其他条件不变, 即有机溶剂为无水乙醇, 用量为 3 mL, 挥发时间为 6 h, 制备温度为 30 ℃, 水相用量为 15 mL, 精密称取药物 2 mg, 加入不同质量的载体, 即载药比分别为 6、8、10、12、14 时, 考察不同载药比对载药量和包封率的影响。结果(表 5)显示, 随着载体量的增加, 胡桃醌的包封率先升高后降低, 因此将 8、10、12 的载药比作为待优化项进行 CCD-RSM 实验。

表 5 载药比考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Survey of drug loading ratio ($\bar{x} \pm s, n=3$)

载药比	包封率/%	载药量/%
6	59.87±2.87	7.27±0.43
8	77.57±1.74	7.23±0.21
10	87.12±3.41	6.49±0.18
12	77.17±2.17	5.76±0.51
14	70.52±2.25	4.01±0.47

2.6.6 水相用量考察 固定其他条件不变, 即有机溶剂为无水乙醇, 用量为 3 mL, 挥发时间为 6 h, 制备温度为 30 ℃, 载药比为 10, 考察水相用量在 5、10、15、20、25 mL 时, 不同水相用量对载药量和包封率的影响。结果(表 6)显示, 随着水相用量的增加, 胡桃醌的载药量与包封率先升高后降低, 因此将 10~20 mL 的水相用量作为待优化项进行 CCD-RSM 实验。

2.7 CCD-RSM 优化处方

在单因素考察实验基础上,进一步采用 CCD-RSM 优化制剂工艺。选取载药比 (X_1)、水相体积 (X_2)、制备温度 (X_3) 3 个因素,每个因素设定 5 个

表 6 水相用量考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Survey of water consumption ($\bar{x} \pm s, n=3$)		
水相用量/mL	包封率/%	载药量/%
5	57.83 $\pm$ 2.56	4.93 $\pm$ 0.46
10	78.96 $\pm$ 2.05	5.89 $\pm$ 0.39
15	87.62 $\pm$ 1.23	6.52 $\pm$ 0.17
20	80.94 $\pm$ 0.97	6.78 $\pm$ 0.23
25	67.12 $\pm$ 2.89	5.20 $\pm$ 0.18

水平 (−1.682、−1、0、+1、+1.682)。以胡桃醌包封率 (Y_1) 和胡桃醌载药量 (Y_2) 为考察指标进行 3 因素, 5 水平的 CCD-RSM 实验, 结果见表 7。采用 Design-Expert 统计软件对表 7 数据进行统计处理, 并获得 Y_1 、 Y_2 值对自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 的多元线性回归方程, 各考察指标的 2 项式拟合方程如下 $Y_1=90.010+0.165\ 9\ X_1+0.700\ 4\ X_2-0.107\ 1\ X_3-0.656\ 4\ X_1X_2-1.020\ X_1X_3-0.516\ 1\ X_2X_3-4.430\ X_1^2-3.520\ X_2^2-4.100\ X_3^2$; $Y_2=6.430-0.408\ 3\ X_1+0.288\ 5\ X_2-0.210\ 6\ X_3+0.251\ 8\ X_1X_2-0.380\ 1\ X_1X_3-0.374\ 7\ X_2X_3-0.004\ 7\ X_1^2-0.057\ 7\ X_2^2-0.111\ 9\ X_3^2$ 。各方程的方差分析结果见表 8, 结果表明该模型与实际试

表 7 CCD-RSM 安排与结果

Table 7 Arrangement and results of CCD-RSM

试验号	X_1	X_2 /mL	X_3 /°C	Y_1 /%	Y_2 /%	试验号	X_1	X_2 /mL	X_3 /°C	Y_1 /%	Y_2 /%
1	11.19 (+1)	12.03 (−1)	27.03 (−1)	78.72	5.61	11	12.00 (+1.682)	15.00 (0)	30.00 (0)	77.17	5.76
2	10.00 (0)	15.00 (0)	25.00 (−1.682)	78.98	6.52	12	11.19 (+1)	17.97 (+1)	32.97 (+1)	77.13	5.52
3	8.00 (−1.682)	15.00 (0)	30.00 (0)	77.57	7.23	13	10.00 (0)	15.00 (0)	35.00 (+1.682)	77.62	5.86
4	10.00 (0)	15.00 (0)	30.00 (0)	90.05	6.57	14	11.19 (+1)	12.03 (−1)	32.97 (+1)	77.85	5.24
5	10.00 (0)	15.00 (0)	30.00 (0)	90.23	6.58	15	11.19 (+1)	17.97 (+1)	27.03 (−1)	79.93	7.56
6	10.00 (0)	10.00 (−1.682)	30.00 (0)	78.96	5.90	16	10.00 (0)	15.00 (0)	30.00 (0)	90.86	6.43
7	10.00 (0)	20.00 (+1.682)	30.00 (0)	80.94	6.79	17	8.81 (−1)	12.03 (−1)	32.97 (+1)	77.92	7.20
8	10.00 (0)	15.00 (0)	30.00 (0)	89.24	6.51	18	10.00 (0)	15.00 (0)	30.00 (0)	90.27	6.59
9	10.00 (0)	15.00 (0)	30.00 (0)	89.46	6.52	19	8.81 (−1)	12.03 (−1)	27.03 (−1)	74.56	6.22
10	8.81 (−1)	17.97 (+1)	27.03 (−1)	78.54	6.99	20	8.81 (−1)	17.97 (+1)	32.97 (+1)	79.68	6.64

表 8 响应面拟合模型对包封率、载药量的方差分析

Table 8 Response surface fitting model on variance analysis of envelopment efficiency, drug loading

方差来源	自由度	Y_1				Y_2			
		平方和	均方	F 值	P 值	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	7.02	0.78	144.74	<0.000 1	609.56	67.73	186.79	<0.000 1
X_1	1	2.28	2.28	422.54	<0.000 1	0.38	0.38	1.04	0.332 7
X_2	1	1.14	1.14	210.98	<0.000 1	6.70	6.70	18.48	0.001 6
X_3	1	0.61	0.61	112.43	<0.000 1	0.16	0.16	0.43	0.525 7
X_1X_2	1	0.51	0.51	94.14	<0.000 1	3.45	3.45	9.51	0.011 6
X_1X_3	1	1.16	1.16	214.50	<0.000 1	8.31	8.31	22.93	0.000 7
X_2X_3	1	1.12	1.12	208.41	<0.000 1	2.13	2.13	5.88	0.035 8
X_1^2	1	0.00	0.00	0.06	0.812 8	282.63	282.63	779.49	<0.000 1
X_2^2	1	0.05	0.05	8.91	0.013 7	178.22	178.22	491.54	<0.000 1
X_3^2	1	0.18	0.18	33.46	0.000 2	242.40	242.40	668.55	<0.000 1
残差	10	0.05	0.01			3.63	0.36		
失拟项	5	0.04	0.01	1.97	0.237 9	1.89	0.38	1.09	0.465 0
纯误差	5	0.02	0.00			1.74	0.35		
总离差	19	7.07				613.18			

验拟合程度良好, 且各因素影响显著用该模型分析和预测胶束的制备工艺是合适的。

利用 Design-Expert 统计软件绘制自变量对因变量的效应面和等高线图, 结果见图 5。最终确定最佳条件范围得到的最优处方: BSP-VES 与胡桃醌的投药量分别为 20 mg 和 2 mg, 水相用量 15 mL,

制备温度 30 °C。预测在此条件下制备 Jug/BSP-VES 的包封率和载药量分别为 90.047%、6.559%。

2.8 最优处方的验证试验

按最优处方平行制备 3 批 Jug/BSP-VES 胶束溶液, 测定其中胡桃醌的包封率、载药量。胡桃醌的平均包封率为 $(88.44 \pm 1.24)\%$ 、RSD 值为 1.79%,

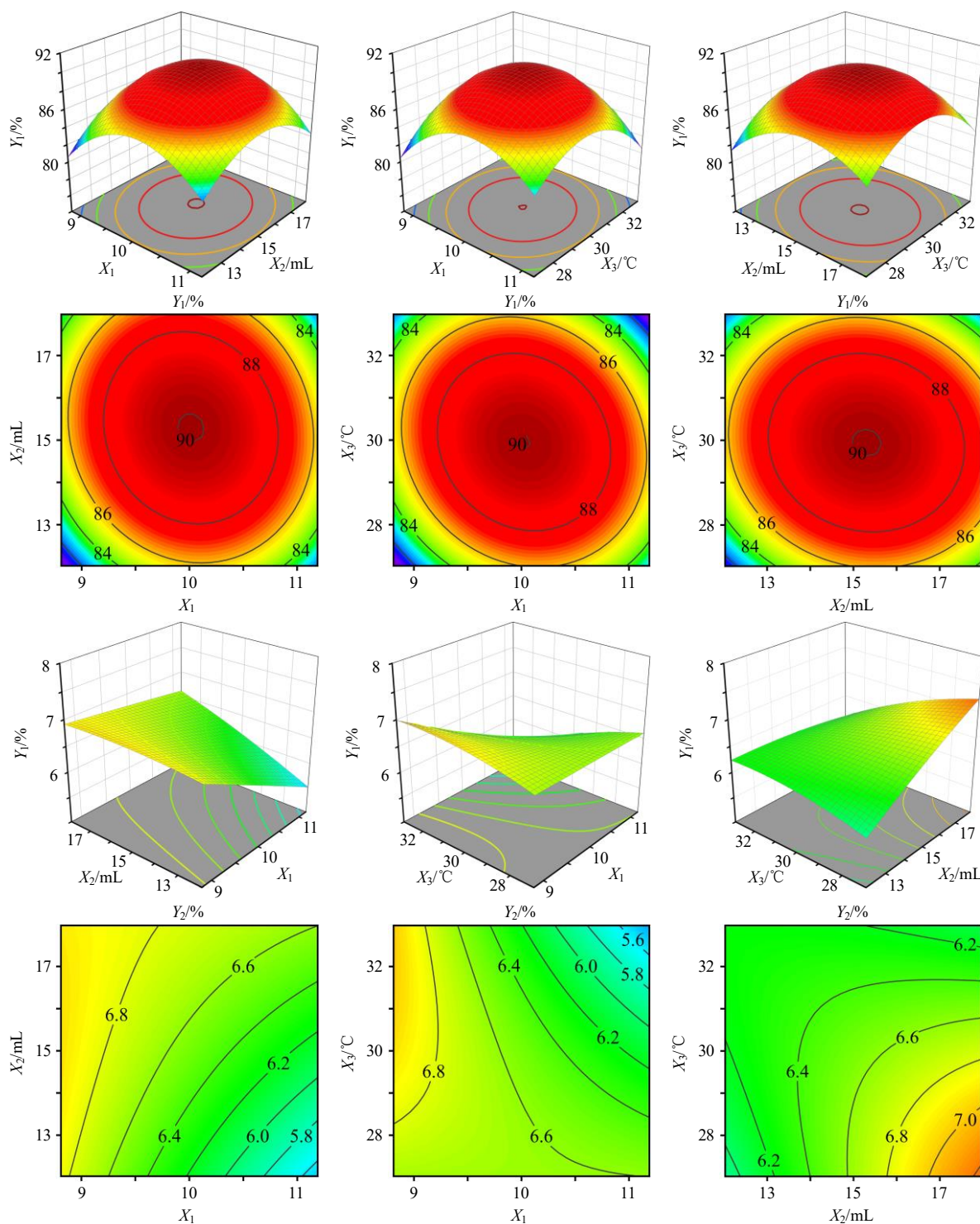


图 5 三维效应图和等高线图

Fig. 5 3D response surface and contour plot

胡桃醌平均载药量为 $(6.54 \pm 0.02)\%$ 、RSD 值为 1.90%，RSD 值均 $< 3\%$ ，表明模型预测可靠，工艺重现性较好。

2.9 Jug/BSP-VES 胶束的表征

2.9.1 Jug/BSP-VES 胶束溶液外观及形态观察 取制备好的 Jug/BSP-VES 溶液，观察外观及丁达尔现象；

取适量 Jug/BSP-VES 溶液纯水稀释，滴加至专用铜网上，待风干后，通过透射电子显微镜 (TEM) 观察形态并拍照。结果如图 6 所示，Jug/BSP-VES 胶束溶液为黄色澄清溶液，丁达尔效应明显；在 TEM 下观察到 Jug/BSP-VES 胶束呈类球形，分散均匀。

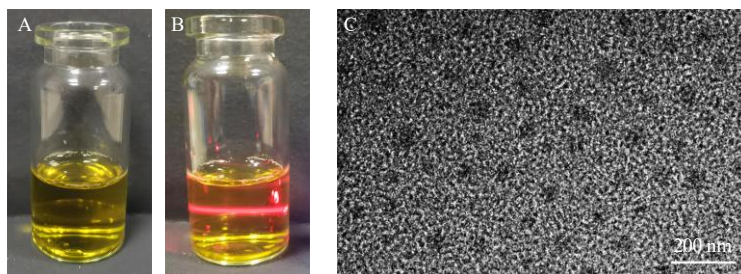


图 6 Jug/BSP-VES 胶束溶液外观 (A) 及其丁达尔效应图 (B) 和 TEM 图 (C)

Fig. 6 Appearance (A), Tyndall effect (B) and TEM (C) of Jug/BSP-VES micelles solution

2.9.2 BSP-VES 临界聚集浓度 (critical aggregation concentration, CAC) 的测定 采用苾荧光探针法检测聚合物的 CAC。配制质量浓度为 1 mg/mL 的苾溶液和 1 mg/mL 的 BSP-VES 母液。取 9 个西林瓶，各加入 0.25 mL 苾溶液，氮气吹干后各加入不同质量浓度的 1 mL BSP-VES 溶液。稀释后 BSP-VES 溶液的质量浓度分别为 100.00、50.00、10.00、5.00、1.00、0.50、0.10、0.05、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 。涡旋 5 min 后超声 30 min，室温避光静置 24 h。荧光分光光度计的激发波长为 330 nm，测定各溶液中苾的荧光吸收，以 373、384 nm 处样品的荧光光度值之比 (I_{373}/I_{384}) 对质量浓度的对数作图，两条切线的交点为 CAC 值。结果如图 7 所示，当 BSP-VES 质量浓度较低时， I_{373}/I_{384} 值较小，当 BSP-VES 质量浓度增大时， I_{373}/I_{384} 值增大，取图中两直线相交处为 BSP-VES 的 CAC 值，经计算，CAC 值为 5.95 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.9.3 包封率和载药量的测定 按最优处方制备

Jug/BSP-VES 胶束溶液，测定其包封率和载药量，方法同“2.5”项。结果发现 Jug/BSP-VES 胶束溶液的包封率为 $(89.140 \pm 1.163)\%$ ($n=3$)，载药量为 $(6.493 \pm 0.087)\%$ ($n=3$)。

2.9.4 粒径及 ζ 电位测定 按最优处方制备 Jug/BSP-VES 胶束溶液，Zetasizer Nano ZSE 纳米粒度电位仪测定其粒径、粒度分布及 ζ 电位。结果如图 8 所示，测得 Jug/BSP-VES 胶束溶液的平均粒径为 (120.30 ± 2.80) nm，PDI 为 0.169 ± 0.014 ， ζ 电位为 (-27.00 ± 1.25) mV。

2.9.5 差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 分别称取适量胡桃醌、BSP-VES、胡桃醌原料药物理混合物和 Jug/BSP-VES 胶

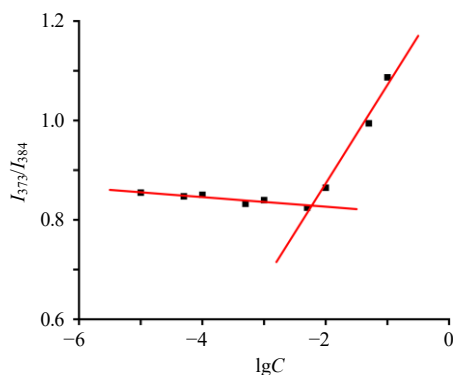


图 7 BSP-VES 的 CAC

Fig. 7 CAC of BSP-VES

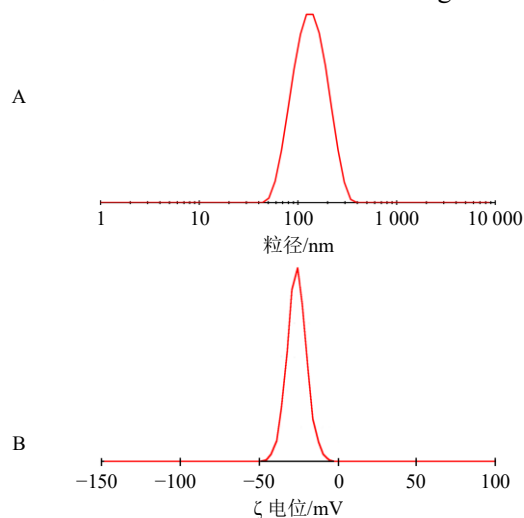


图 8 Jug/BSP-VES 胶束溶液粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 8 Particle sizes distribution (A) and ζ potential (B) of Jug/BSP-VES micelles solution

束样品置于铝制样品盘中压制, 氮气为保护气, 扫描范围 25~350 °C, 加热速率 10 °C/min。结果如图 9 所示。胡桃醌的特征吸收峰在 156 °C, BSP-VES 的特征吸收峰为 184 °C, 与胡桃醌的特征峰不重叠; 物理混合物中, 二者特征峰均出现, 而 Jug/BSP-VES 胶束的热量曲线上无胡桃醌的特征峰, 说明胡桃醌已被成功包载进载体, 特征吸收峰消失。

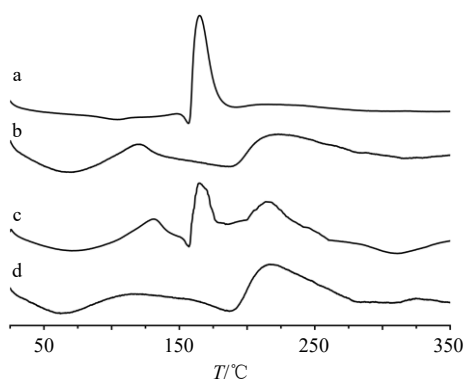


图 9 胡桃醌 (a)、BSP-VES (b)、物理混合物 (c)、Jug/BSP-VES 胶束 (d) 的 DSC 曲线

Fig. 9 DSC thermograms of juglone (a), BSP-VES (b), physical mixture (c) and Jug/BSP-VES micelles (d)

表 9 Jug/BSP-VES 胶束溶液的稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Stability of Jug/BSP-VES micelles solution ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	粒径/nm		PDI		包封率/%	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
1	125.40 ± 5.30	125.00 ± 4.48	0.157 ± 0.007	0.151 ± 0.012	90.03 ± 0.12	90.36 ± 0.48
3	126.18 ± 3.79	127.37 ± 4.82	0.151 ± 0.005	0.152 ± 0.012	89.40 ± 0.40	88.73 ± 0.27
7	127.77 ± 4.16	130.00 ± 3.46	0.160 ± 0.014	0.172 ± 0.015	88.42 ± 0.51	87.42 ± 0.63
15	128.63 ± 3.86	137.97 ± 4.91	0.163 ± 0.016	0.181 ± 0.010	88.13 ± 0.95	85.78 ± 0.58

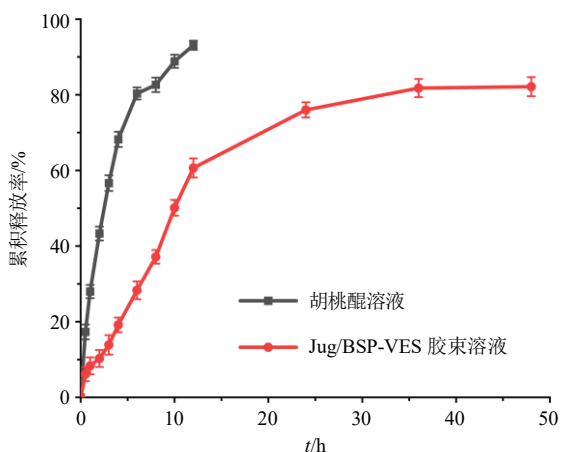


图 10 体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 In vitro release curves ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.9.6 储存稳定性考察 按最优处方制备 Jug/BSP-VES 胶束溶液, 在 pH 4.5, 4 °C 和 25 °C 条件下测定其在第 1、3、7、15 d 的粒径和包封率。结果如表 9 所示, 在 4 °C 下, Jug/BSP-VES 的粒径和包封率无较大变化, 说明储存稳定性较好; 在 25 °C 下储存效果相对较差, 随时间增加, 胶束溶液粒径变大, 包封率降低, 因此 4 °C 为 Jug/BSP-VES 胶束溶液的最优储存条件。

2.9.7 体外释放考察 采用透析法考察胡桃醌和 Jug/BSP-VES 胶束溶液的体外释药情况。分别将胡桃醌、Jug/BSP-VES 胶束溶液置于透析袋 (截留相对分子质量 3 500) 中, 透析袋两端夹紧, 分别浸没在含有 0.5% 聚山梨酯-80 的醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.5) 中; 恒温水浴 (37.0 ± 0.5) °C, 转速 100 r/min, 每组平行进行 3 组试验, 分别于选定的时间点收集 5 mL 样品, 收集后补加等量同温的释放介质, 所得到的样品经微孔滤膜滤过后进行 HPLC 分析, 体外释药曲线如图 10 所示。胡桃醌溶液在 6 h 时释放到 80% 左右, Jug/BSP-VES 胶束在 48 h 时的释放率为 (82.13 ± 2.51) %, 达到了明显的缓释作用, 表明将原料药制备成胶束可减缓药物的释放速度。

3 讨论

胡桃醌作为抗肿瘤活性成分具有一定的毒性, 对金鱼的半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀) 为 1.3 mg/L, 对小鼠 ig 给药、ip 的 LD₅₀ 值分别为 2.5、25.0 mg/kg^[19-20]。此外, 胡桃醌及其代谢产物能与肾脏细胞溶质蛋白共价结合, 造成肾脏毒性^[21]。研究表明, 酒精能使胡桃醌中的毒性成分转变为其他物质^[22], 以酒精作为溶剂的胡桃醌制剂通常不显毒性。本研究通过 BSP 与 VES 发生酯化反应成功制备了 BSP-VES 胶束, 以胡桃醌为模型药物, 通过溶剂挥发法制备了 Jug/BSP-VES 载药胶束。Jug/BSP-VES 载药胶束外观呈类球型, 粒度测定结果显示, Jug/BSP-VES 胶束溶液的粒径图显示峰形呈单

峰, 分布范围较窄, 说明胶束溶液粒径均一。TEM 下观察到的 Jug/BSP-VES 胶束, 其粒径比粒度仪测定结果较小, 可能是由于在制样过程中胶束水分的挥发导致粒子发生皱缩所致。BSP-VES 作为两亲性高分子材料, 在水相中的浓度超过临界胶束浓度后可形成胶束, 制备方法简便。

本实验设计了一种可提高胡桃醌稳定性的载药胶束, 拟制成温敏凝胶剂、采用阴道给药的方式, 用于治疗阴道炎症、宫颈癌术后等。正常人体阴道 pH 值范围在 3.5~4.8^[23], 因此, 体外释放实验采用的是 pH 4.5 并含有 0.5% 聚山梨酯-80 的醋酸-醋酸盐缓冲液^[24], 来模拟阴道中的酸性环境。在稳定性研究中, 也重点考察了上述条件下载药胶束的储存稳定性, 而并未采用通常的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 缓冲体系和含 10% FBS 的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 缓冲体系。另外, 本实验所制备的 Jug/BSP-VES 载药胶束处方中尽可能减少了辅料种类, 以避免阴道用药过程中的副作用及不良反应。

在单因素实验中, 本实验考察各因素对处方工艺的影响。制备温度的高低主要影响有机溶剂除去的速度, 温度过高或过低, 引起有机溶剂挥发速度过快或过慢, 均不利于胶束对药物的包载^[25]。因考虑到温度对制备的影响较大, 在 25~35 °C 时 Jug/BSP-VES 胶束中的胡桃醌含量不稳定, 因此, 对制备温度作进一步实验。

对有机溶剂用量的考察中, 有机溶剂用量过少时, 容易造成药物不能完全溶解, 随着有机溶剂用量的增加, 药物在溶剂中均匀分散, 能与胶束较好地结合, 当有机溶剂用量过多时, 在有限的时间内, 容易造成挥发不完全导致包封率降低^[25], 因此选择 3 mL 作为有机溶剂用量。

综上所述, 本研究制备的 Jug/BSP-VES 胶束, 通过单因素实验与 CCD-RSM 优化后, 包封率好, 粒径均一, 稳定性良好, 为胡桃醌制剂的应用开发奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 高山, 高娟娟, 于佳, 等. 核桃果实功能因子研究现状 [J]. 内蒙古农业大学学报: 自然科学版, 2022, 43(2): 115-120.

[2] Peng X H, Nie Y, Wu J J, *et al.* Juglone prevents metabolic endotoxemia-induced hepatitis and neuroinflammation via suppressing TLR4/NF- κ B

signaling pathway in high-fat diet rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 462(3): 245-250.

- [3] Fischer T C, Gosch C, Mirbeth B, *et al.* Potent and specific bactericidal effect of juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) on the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(49): 12074-12081.
- [4] 李文君, 王成章, 刘辰婧. 青龙衣中胡桃醌的提取及其抑菌活性研究 [J]. 林产化学与工业, 2019, 39(5): 95-100.
- [5] Tang Y T, Li Y, Chu P, *et al.* Molecular biological mechanism of action in cancer therapies: Juglone and its derivatives, the future of development [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, 148: 112785.
- [6] Lu Z, Chen H, Zheng X M, *et al.* Experimental study on the apoptosis of cervical cancer Hela cells induced by juglone through c-Jun N-terminal kinase/c-Jun pathway [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10(6): 572-575.
- [7] Zhao X Y, Zhu W H, Zhang R W, *et al.* Targeted juglone blocks the invasion and metastasis of HPV-positive cervical cancer cells [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 140(3): 211-217.
- [8] Wang P, Zhang S D, Jiao J, *et al.* ROS-mediated p53 activation by juglone enhances apoptosis and autophagy *in vivo* and *in vitro* [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 379: 114647.
- [9] Sun S H, Luo Q, Hu K, *et al.* Juglone induces michigan cancer foundation-7 human breast cancer cells apoptosis through Bcl-2-associated X protein/B-cell lymphoma/leukemia-2 signal way [J]. *Phcog Mag*, 2019, 15(65): 573.
- [10] 辛国松. 胡桃醌通过线粒体途径诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡机制研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2012.
- [11] 郭娜, 吕佳琦, 李云, 等. 聚合物胶束作为抗癌药物纳米递送载体的研究进展 [J]. 天津科技大学学报, 2022, 37(4): 71-80.
- [12] 郑荣, 李珍, 闵洁, 等. 双亲性多糖胶束的制备及作为纳米药物载体应用研究进展 [J]. 高分子通报, 2021(12): 1-12.
- [13] Majima D, Mitsuhashi R, Fukuta T, *et al.* Biological functions of α -tocopheryl succinate [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2019, 65(Supplement): S104-S108.
- [14] Savitskaya M A, Onischenko G E. α -Tocopheryl succinate affects malignant cell viability, proliferation, and differentiation [J]. *Biochemistry*, 2016, 81(8): 806-818.
- [15] Liang N, Sun S P, Li X F, *et al.* α -Tocopherol

- succinate-modified chitosan as a micellar delivery system for paclitaxel: Preparation, characterization and *in vitro/in vivo* evaluations [J]. *Int J Pharm*, 2012, 423(2): 480-488.
- [16] Emami J, Rezazadeh M, Rostami M, *et al*. Co-delivery of paclitaxel and α -tocopherol succinate by novel chitosan-based polymeric micelles for improving micellar stability and efficacious combination therapy [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(7): 1137-1147.
- [17] 吕金伟. 以天然苷类为载体的紫杉醇胶束的构建及其抗肿瘤作用研究 [D]. 开封: 河南大学, 2020.
- [18] Fang J Z, Chen Z, Li J X, *et al*. Self-assembled micellar glutaminase allosteric inhibitor for effective therapeutic intervention [J]. *Int J Nanomedicine*, 2022, 17: 213-225.
- [19] Ota A, Sivalingam P M, Lin S, *et al*. Isolation of naphthazarin from walnut “onigurumi” and its inhibitory action on oxidative phosphorylation in mitochondria [J]. *Toxicon*, 1973, 11(3): 235-241.
- [20] Westfall B A, Russell R L, Auyong T K. Depressant agent from walnut hulls [J]. *Science*, 1961, 134(3490): 1617.
- [21] Chen L J, Lebetkin E H, Burka L T. Metabolism and disposition of juglone in male F344 rats [J]. *Xenobiotica*, 2005, 35(10/11): 1019-1034.
- [22] 吴葆杰. 中草药药理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 85.
- [23] Chen J P, Zhou R, Li L, *et al*. Mechanical, rheological and release behaviors of a poloxamer 407/poloxamer 188/carbopol 940 thermosensitive composite hydrogel [J]. *Molecules*, 2013, 18(10): 12415-12425.
- [24] 王通. 两种载药温敏凝胶的制备及其对小鼠和犬阴道肿瘤的疗效 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
- [25] 黄淑玲. β -环糊精两亲性聚合物胶束的制备及活体成像考察 [D]. 广州: 广东药学院, 2015.

[责任编辑 郑礼胜]