

木犀草素纳米混悬剂的制备及其体外肠吸收研究

窦纪梁¹, 郭允², 李禄辉¹, 丁方¹, 黄敏¹, 蒲晓辉^{3*}

1. 河南应用技术职业学院, 河南 郑州 450007

2. 郑州卫生健康职业学院, 河南 郑州 450199

3. 河南大学, 河南 开封 475004

摘要: **目的** 通过制备木犀草素纳米混悬剂 (luteolin nano-suspension, LNS), 以提高木犀草素的水溶性、溶出速度和小肠吸收。**方法** 采用微沉淀-高压匀质法制备 LNS, 以粒径、稳定性、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位为考察指标, 通过单因素筛选法对方进行了初步优化。采用动态光散射法、差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC) 和 X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 对纳米混悬剂进行表征, 再采用桨法考察纳米混悬剂的体外溶出度, 通过大鼠外翻肠模型实验, 考察十二指肠、空肠、回肠和结肠不同部位的肠段对药物的吸收情况。**结果** 以维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (*D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS) 作为稳定剂, 稳定剂与药物质量比为 1:1 时, 可以制备得到粒径为 210 nm 左右, 分散性和储存稳定性良好的 LNS; 其 ζ 电位在 (-16.30 ± 0.78) mV, 透射电子显微镜图显示, LNS 呈均匀分散的球形或椭圆形纳米粒; DSC 和 XRPD 研究结果表明, 制备成 LNS 后, 没有改变木犀草素的结晶状态; 而体外溶出实验结果表明, LNS 可以明显提高木犀草素的过饱和溶出度; 外翻肠实验结果证实, LNS 虽然不能改变木犀草素在小肠中的吸收部位, 但可以大幅度提高木犀草素的吸收速率和吸收量。**结论** 所制备的 LNS 可以显著提高药物的水溶性、溶出速度和小肠吸收, 用于木犀草素口服给药的潜在剂型。

关键词: 木犀草素; 纳米混悬剂; 过饱和溶出; 口服吸收; 外翻肠实验; 微沉淀-高压匀质法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)12-3998-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.008

Preliminary study on preparation and *in vitro* intestinal absorption of luteolin nano-suspension

DOU Jiliang¹, GUO Yun², LI Luhui¹, DING Fang¹, HUANG Min¹, PU Xiaohui³

1. Henan Vocational College of Applied Technology, Zhengzhou 450007, China

2. Zhengzhou Health Vocational College, Zhengzhou 450199, China

3. Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract: Objective To improve the water solubility, dissolution rate and small intestine absorption of luteolin by preparing luteolin nano-suspension. **Methods** Luteolin nano-suspension was prepared by microprecipitation-high pressure homogenization method, and the prescription was optimized by single factor screening method with particle size, stability, polydispersity index (PDI) and ζ potential as indexes. The nano-suspensions were characterized by dynamic light scattering, differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray powder diffraction (XRPD), and then the dissolution rate of nano-suspensions *in vitro* was investigated by the oar method. The drug absorption in different parts of duodenum, jejunum, ileum and colon was investigated by rat valvaration intestinal model experiment. **Results** When *D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) with good biocompatibility were selected as stabilizer and the ratio of stabilizer to drug was 1:1, luteolin nano-suspensions with particle size of about 210 nm and good dispersion and storage stability could be prepared. The ζ potential was (-16.30 ± 0.78) mV. Transmission electron microscopy showed that the

收稿日期: 2023-12-25

基金项目: 河南应用技术职业学院青年骨干教师资助项目 (2020-GGJS-Y001); 河南省科技攻关项目 (232102311178); 开封市科学技术局科技攻关项目 (2303064); 河南省卫生健康委员会医学教育研究项目 (Wjlx2022262); 河南省卫生健康委员会第二批中医药青苗人才培养项目 (622)

作者简介: 窦纪梁 (1989—), 女, 汉, 硕士研究生, 河南开封人, 高校讲师, 主治医师, 研究方向为中医药。

Tel: 18739989327 E-mail: hnydou@163.com

***通信作者:** 蒲晓辉 (1980—), 男, 汉, 博士, 教授, 研究方向为药物新剂型及质量分析。E-mail: pgh425@163.com

nano-suspension were uniformly dispersed spherical or elliptical nanoparticles. The results of DSC and XRPD showed that the crystal state of luteolin was not changed after preparation of nano-suspension. The results of *in vitro* dissolution experiment showed that nano-suspension could greatly improve the supersaturated dissolution of luteolin. The results of eversion experiment confirmed that although the nano-suspension could not change the absorption site of luteolin in the small intestine, it could greatly improve the absorption rate and amount of luteolin. **Conclusion** The results of this study showed that the water solubility, dissolution rate and small intestinal absorption of luteolin nano-suspension prepared in this study could be significantly improved, which could be used as a potential dosage form for oral administration of luteolin.

Key words: luteolin, nanosuspension, supersaturated dissolution, oral absorption, everted intestinal sacs experiment; microprecipitation-high pressure homogenization method

木犀草素 (luteolin), 别称草木犀、黄示灵等, 大多以糖苷的形式广泛存在于多种中药材、天然药用植物^[1]及蔬菜^[2]中的一种黄酮类化合物, 是一种天然色素成分, 可以作为食用色素添加于食品中。木犀草素的化学名为 3',4',5,7-四羟基黄酮 (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone), 物理状态为淡黄色结晶状粉末, 熔点为 330 °C, 包含 4 个酚羟基, 具有弱酸性, 可溶于碱性溶液中, 因脂溶性高而难溶于水, 从而阻碍了其在体内的吸收与利用^[3]。木犀草素具有抗炎和抗菌^[4-5]、抗氧化^[6]、抗肿瘤^[7]、神经保护^[8]、抑制肺纤维化^[9]及肺癌^[10-11]和心血管疾病^[12]等多种药理作用。由于水溶性差 (仅为 6.0 mg/L)、生物利用率低等原因限制了其成药性和临床应用。针对这一问题, 近年来许多学者开展了增加木犀草素溶解度的研究, 如微球^[13]、纳米胶束^[14]、金属配合物^[15]、自微乳^[16]、脂质体^[17]等, 并明显提高了其生物利用率, 这表明木犀草素的肠道渗透性不是限制其生物利用率的关键因素, 其属于生物药剂学系统 II 类药物。因此, 采用制剂技术提高木犀草素的溶解性是可以改善其成药性和生物利用度的, 将有利于推广其临床应用。然而上述开发的剂型仍存在诸多的缺点, 如工艺复杂、载药量低、生物安全性差、成本高等, 难以大范围推广应用。近年来, 逐步发展成熟的纳米混悬剂^[18]作为一种新剂型, 与传统纳米制剂相比, 它具有载药量高、溶出度高、添加剂用量少、易于放大生产等优点。因此, 本实验尝试将难溶性木犀草素制备成纳米混悬剂以提高其水溶性和生物利用率, 改善其成药性和临床优势。

为此, 本实验首先采用微沉淀-高压匀质法制备口服木犀草素纳米混悬剂 (luteolin nano-suspension, LNS), 并以纳米粒的粒径、稳定性、多分散性指数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位等为考察指标, 采用单因素考察法筛选 LNS 的稳定剂和最优药物-稳定剂比; 接着, 对 LNS 的理化性质进行考察, 并

分析其物理状态和体外溶出行为; 最后通过大鼠外翻肠模型考察药物在肠道不同部位的吸收转运情况, 探索药物在肠道内的吸收速率和最佳部位, 预测纳米混悬剂可能存在的体内吸收行为, 既可以用于木犀草素口服给药的潜在剂型, 也为其进一步加工成其他剂型研究提供基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ZNCL-BS180 型恒温磁力搅拌器, 北京市永光明医疗仪器有限公司; AL104-1C 型精密分析天平, 上海鼎科科学仪器有限公司; NS1001L 型高压匀质机, 意大利 GEA Niro Soavi 公司; Nanotrac wave II 型激光粒度仪型激光粒度仪, 美国麦奇克有限公司; LC3100 型高效液相色谱仪, 安徽皖仪科技股份有限公司; ZWY-103D 型恒温振荡仪, 上海智诚分析仪器制造有限公司; H1650-W 型医用离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发公司; DZF-6030 型真空干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司。JEOL 2010 型透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司。

1.2 试剂

木犀草素原料药, 批号 JZ19021403, 质量分数 97.0%, 南京狄格尔医药科技有限公司; 木犀草素对照品, 批号 ps1032-0025, HPLC 质量分数 $\geq 98\%$, 成都普思生物科技有限公司; 十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulfonate, SDS), 医药级, 河南圣拓实业有限公司; 泊洛沙姆 188 (Poloxamer 188, Pluronic, F68), 医药级, 西安天正药用辅料有限公司; 维生素 E 聚乙二醇琥珀酸酯 (*D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS), 医药级, 上海惠诚生物科技有限公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 分析纯, 天津市德恩试剂有限公司。

1.3 动物

SD 大鼠购买于河南省实验动物中心, 体质量

(200±20) g, 合格证号: SCXK(豫)2017-0001。所有动物实验均经过河南大学动物伦理委员会审核批准(HUSOM2019-216)。

2 方法与结果

2.1 LNS 的制备

2.1.1 LNS 中稳定剂的选择 将 40 mg 木犀草素原料药超声溶解于 1 mL 的 DMSO 中作为有机相, 再取等量的稳定剂(SDS、F68、TPGS)溶解于纯水中(作为水相, 或称反溶剂相); 在室温下, 将有机相通过注射器快速注入转速为 1 800 r/min 的反溶剂相中, 继续搅拌 10 min, 得到预混悬剂; 将预混悬剂转移至高压匀质机中, 分别以 20.0、50.0、80.0 MPa 的压力循环匀质 5、5、25 次, 得到 LNS。

利用动态光散射仪分别考察 LNS 的粒径、多分散系数(polydispersity index, PDI)、表面电荷(ζ 电位)和稳定性。本实验以不同稳定剂(SDS、F68、TPGS)制备的 LNS 粒径大小、PDI、 ζ 电位结果如表 1 所示。3 种稳定剂所制备的粒径均在 100~500 nm。以 SDS 为稳定剂制备的纳米混悬剂粒径最大, 以 F68 为稳定剂制备的纳米混悬剂 PDI 最大, 以 TPGS 为稳定剂制备的纳米混悬剂 ζ 电位最大, 但是 3 者没有较大的差异, 因此对于预测稳定性来说, 上述结果难以判断哪个稳定剂制备的 LNS 会有良好的贮存稳定性。

因此, 本实验又对各种条件的贮存稳定性进行了研究, 结果见图 1。以 SDS、F68 为稳定剂制备的纳米混悬剂在 1 周内粒径呈现持续增长的趋势, 而以 TPGS 为稳定剂制备的 LNS 粒径未出现明显变动, 由此可知, 本实验中以 TPGS 为稳定剂制备的 LNS 具有较好的物理稳定性。

2.1.2 LNS 中药物-稳定剂质量比的筛选 将 40 mg 的木犀草素原料药超声溶解于 1 mL 的 DMSO 中作为有机相, 再分别按照木犀草素与 TPGS 的质量比为 1:2、1:1、2:1 称取 TPGS, 溶解于水中, 得到反溶剂相; 再按上述工艺制备 LNS, 得到不同药物-稳定剂质量比的 LNS。利用动态光散射仪分别考察表 1 不同稳定剂 LNS 的粒径、PDI 和 ζ 电位 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Particle size, PDI and zeta potential of LNS with different stabilizers ($\bar{x} \pm s, n=3$)

稳定剂	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
SDS	302.5±9.3	0.193±0.030	-27.60±0.85
F68	218.4±11.2	0.318±0.025	-30.30±0.92
TPGS	209.1±3.4	0.198±0.016	-16.30±0.78

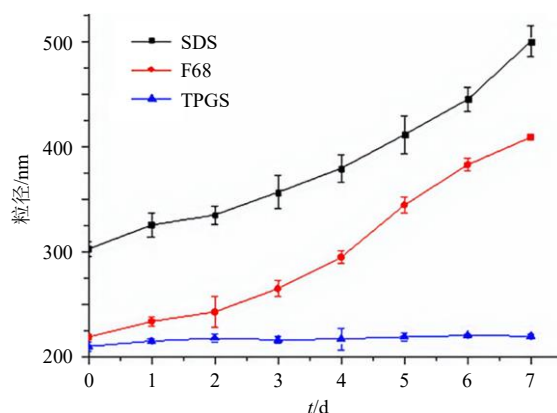


图 1 不同稳定剂对 LNS 稳定性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of different stabilizers on stability of LNS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

察纳米混悬剂的粒径、分布、 ζ 电位和稳定性。不同药物-稳定剂比制备的 LNS 的理化性质研究结果见表 2 和图 2。如表 2 所示, 3 种不同药物-稳定剂比制备的 LNS 的粒径分别为 (289.3±6.6)、(210.7±2.0)、(34.6±3.7) nm, 3 种 LNS 的 PDI 接近, 1:2 时 ζ 电位最大, 2:1 时 ζ 电位没测到。虽然药物与稳定剂的质量比为 2:1 时, 其粒径与 1:2、1:1 时相差较大, 但是粒径难以反映稳定性情况。因此, 接下来考察了 1:2、1:1、2:1 3 种不同比例下制备的 LNS 的稳定性, 结果如图 2 所示。当药物-稳定

表 2 药物-稳定剂质量比的筛选 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Screening of drugs and stabilizers with different mass ratios ($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量比	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
1:2	289.3±6.6	0.173±0.091	-25.30±0.81
1:1	210.7±2.0	0.196±0.018	-16.80±0.27
2:1	34.6±3.7	0.157±0.059	-14.10±0.17

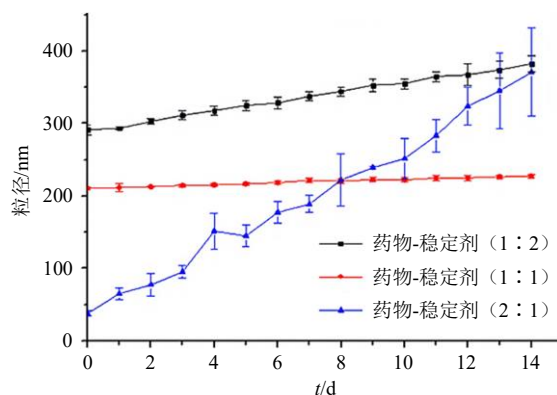


图 2 药物-稳定剂比对稳定性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of mass ratio of drugs-stabilizers on stability ($\bar{x} \pm s, n=3$)

剂比为 2 : 1 和 1 : 2 时, 在 2 周内粒径变化幅度都较为明显, 说明其稳定性表现均极差; 而当药物-稳定剂比为 1 : 1 时, 制备的纳米混悬剂的粒径基本保持稳定, 表明其稳定性较好。因此, 本实验最终选用药物-稳定剂比为 1 : 1。

2.1.3 最优制备处方和方法的确定 依照 LNS 的稳定剂及药物-稳定剂比的筛选结果, 初步确定 LNS 的最优制备处方与方法如下: 将精密称取 40 mg 的木犀草素原料药超声溶解于 1 mL 的 DMSO 中作为有机相; 将 40 mg TPGS 搅动溶解于 40 mL 纯水中作为水相, 将有机相快速注入转速为 1 800 r/min 的水相中, 搅动 10 min, 得到预混悬剂; 将制备的预混悬剂倒入高压匀质机的导入槽中, 分别以 20.0、50.0、80.0 MPa 的压力, 分别循环匀质 5、5、25 次, 得到 LNS。重复制备 3 批, 以粒径、PDI 和 ζ 电位考察制剂处方和制备工艺的稳定性。

2.2 LNS 的表征

2.2.1 粒径、 ζ 电位及形态分析 将最优处方制备的 3 批 LNS 分别通过激光粒度分析仪测定其粒径、PDI、 ζ 电位, 结果 LNS 的粒径为 (209.00 ± 3.24) nm ($n=3$), PDI 都低于 0.228 ± 0.013 ($n=3$), 粒径分布图见图 3; ζ 电位值为 (-16.80 ± 0.27) mV ($n=3$), 较小的 PDI 和绝对值较大的 ζ 电位, 意味着 LNS 可能具有较好的长期稳定性^[19]。

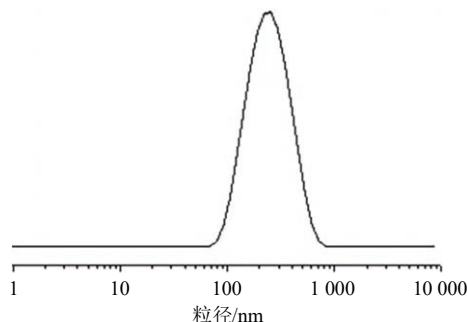


图 3 LNS 的粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of LNS

再取适量的 LNS 加蒸馏水稀释到适当倍数后, 滴在覆有支持膜的铜网上, 自然环境下干燥后, 通过 TEM 观察其形态特征及大小, 并成像, 结果见图 4。LNS 呈现均匀分散的球形或椭圆形颗粒, 粒径约为 180 nm, 比动态光散射测定结果较小, 这可能是由于 TEM 样品为干燥品, 导致粒子外层亲水部分失水而收缩^[20]。

2.2.2 储存稳定性 将制备的 LNS 分别放在 4 ℃和室温环境中, 在预定的时间点取样, 通过激光粒

度分析仪测定其粒径和 PDI, 连续考察 14 d, 每个样品平行操作 3 份, 结果见表 3。LNS 在 4 ℃和室温下储存 2 周后, 粒径和 PDI 稍有增加, 但变化范围都较小, 说明该 LNS 的储存稳定性较好。

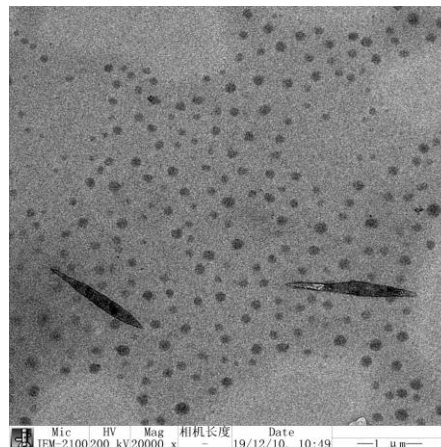


图 4 LNS 的 TEM 图

Fig. 4 TEM image of LNS

表 3 4 ℃和室温下储存 14 d 内 LNS 的粒径变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Size change of LNS stored at 4 ℃ and room temperature within 14 d ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

粒径/nm		粒径/nm	
t/d	室温	t/d	4 ℃
0	210.50 ± 2.01	8	226.57 ± 1.10
1	211.87 ± 1.42	9	226.93 ± 3.67
2	215.13 ± 0.45	10	226.63 ± 0.42
3	217.57 ± 1.30	11	227.97 ± 0.21
4	217.93 ± 5.36	12	229.20 ± 0.36
5	223.07 ± 2.68	13	229.67 ± 1.06
6	224.20 ± 1.18	14	230.97 ± 1.25
7	225.23 ± 2.36		227.23 ± 2.84

2.2.3 体外胃肠环境中的稳定性 以 pH 1.2 和 pH 6.8 的缓冲溶液模拟胃液和肠液, 将制备的 LNS 分别以 1 : 1 与上述 2 种缓冲溶液混合, 并于 37 ℃水浴中放置, 在预定的时间点 0、2、4、6、8、12、24 h 时取样, 通过激光粒度分析仪测定其粒径, 连续考察 24 h, 每个样品平行操作 3 份, 结果见表 4。在 2 种 37 ℃的缓冲溶液中孵育 24 h 内, LNS 的粒径和 PDI 几乎无变化, 表明 LNS 在 2 种环境中能保持稳定, 这表示 LNS 口服给药后, 在经胃肠道给药时能保持良好的稳定性, 这有利于木犀草素到达肠道后仍以纳米晶存在, 从而有利于木犀草素的快速释放而获得较高的生物利用度。

表 4 LNS 在 pH 1.2 和 pH 6.8 的缓冲溶液中的稳定性
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Stability of LNS in buffer solution with pH 1.2 and pH 6.8 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/h	pH 1.2		pH 6.8	
	粒径/nm	PDI	粒径/nm	PDI
0	210.40±1.80	0.198±0.020	207.80±1.80	0.189±0.019
2	210.60±1.80	0.187±0.022	207.40±1.90	0.181±0.020
4	211.10±2.00	0.195±0.019	209.10±1.80	0.199±0.016
6	213.50±2.10	0.202±0.021	208.80±2.00	0.192±0.019
8	214.70±2.00	0.208±0.025	210.30±1.90	0.208±0.022
12	214.90±2.20	0.211±0.015	211.90±2.10	0.199±0.021
24	216.80±2.40	0.223±0.019	213.60±2.00	0.212±0.025

2.2.4 纳米混悬剂的物理状态研究 本实验选用 DSC 来确定 LNS 中的木犀草素晶型是否发生了改变, 测试样品有木犀草素、TPGS、木犀草素与 TPGS 的物理混合物和 LNS。以空铝盘作为空白对照, 分别精密称取 3~5 mg 的木犀草素、TPGS、物理混合物(木犀草素+TPGS)、LNS 干粉放于差式扫描量热分析(differential scanning calorimetry, DSC)仪中, N₂ 流(40 mL/min)保护下, 以 10 °C/min 升温速度持续升温, 升温范围设置为 40~600 °C, 记录差式扫描量热分析图谱, 所有测试样品重复分析 3 批, 结果见图 5。木犀草素和 LNS、物理混合物均是结晶, 其熔融温度为 339.38 °C, 稳定剂对木犀草素的熔融温度基本无影响。这表明 LNS 中的木犀草素仍处于结晶状态, 稳定剂的存在不会改变木犀草素的晶型。在木犀草素和 LNS 中, 在 50~150 °C 出现了 1 个宽峰, 这可能是由于药物吸收了水分造成的。

再分别称取适量的木犀草素、TPGS、物理混合

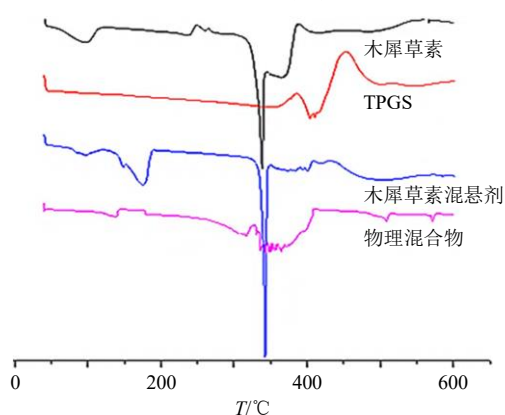


图 5 不同成分的差式扫描量热图

Fig. 5 DSC curve of different components

物(木犀草素+TPGS)、LNS 置于 X 射线粉末衍射(X-ray powder diffraction, XRPD)仪中, 以步进测定方式, 散射角扫描范围设为 5°~60°, 电压设为 40 kV, 电流为 30 mA, 结果见图 6。由图 6 可知, 木犀草素在 19.12、23.20、26.32 °C 有 3 个衍射峰, 衍射峰的峰形较为尖锐, 峰值较高, 表明木犀草素的晶型为结晶型。稳定剂 TPGS 在 15.72、17.48、22.86、25.60、29.26 °C 有衍射特征峰。制备成纳米混悬剂后, 虽然 LNS 图谱中木犀草素的特征峰有所减弱, 但与木犀草素相比, 在相应位置特征峰均存在, 进一步证实制备成 LNS 后木犀草素并未显著改变晶型, 说明稳定剂的加入不会影响木犀草素的晶型, 这与 DSC 分析的结果一致。

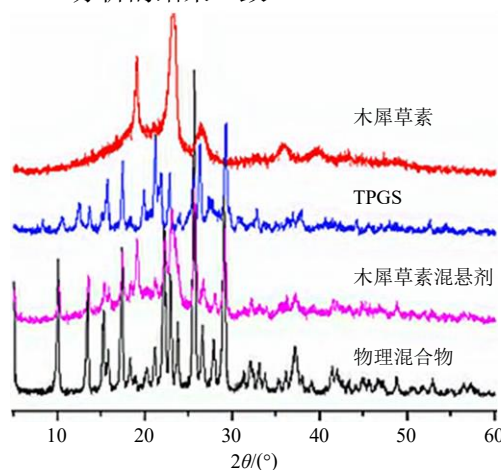


图 6 木犀草素混悬剂的 X 射线粉末衍射图

Fig. 6 X-ray powder diffraction of LNS

2.3 平衡溶解度与过饱和溶出度测试

为了测定木犀草素的平衡溶解度与木犀草素纳米混悬剂的过饱和溶出度, 本实验参考文献方法^[21]建立了 HPLC 法。

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Sino Chrom ODS-BP 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.3% 磷酸水溶液(60:40); 柱温 30 °C; 检测波长 350 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL。

2.3.2 对照品溶液的配制 精密称取木犀草素对照品 2.50 mg, 放入 100 mL 棕色量瓶中, 以适量色谱甲醇使之完全溶解, 并定容至刻度线, 摇匀得到质量浓度为 25 μg/mL 的木犀草素对照品储备液。

2.3.3 线性关系考察 采用色谱甲醇稀释成质量浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、7.0、10.0 μg/mL 系列的木犀草素对照品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进行分析, 以对照品质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得线性回归方程为

$Y=44\,670X-2\,498.3$, $R^2=0.999\,8$, 结果表明木犀草素在 $0.5\sim 10.0\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.3.4 专属性、精密度和准确度考察 在建立的 HPLC 色谱条件下, 木犀草素色谱峰不会受 pH 1.2 和 pH 6.8 的溶出介质、稳定剂 TPGS、Tyrode 液以及肠吸收液中所有成分的干扰 (图 7), 表明本实验所建立的含量测定方法具有较好的专属性, 能够满足体外溶出和肠吸收试验中木犀草素的含量测定要求。另外, 其精密度的 RSD 为 1.2%, 高、中、低 3 个质量浓度的样品加样回收率在 99.67%~101.47%, RSD 均小 2%, 符合《中国药典》2020 年版的规定。

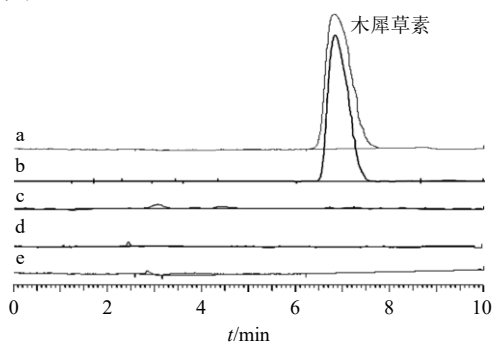


图 7 木犀草素对照品 (a)、木犀草素纳米混悬剂 (b)、TPGS 样品 (c)、LNS 在 pH 1.2、6.8 溶出介质 (d, e) 中溶出液的 HPLC 图

Fig. 7 HPLC of luteolin reference substance (a), luteolin nanosuspension (b), TPGS sample (c), dissolution solution of LNS in pH 1.2 and 6.8 dissolution media (d, e)

2.3.5 平衡溶解度的测定 为了测定木犀草素在 pH 值为 1.2、6.8 缓冲溶液中的平衡溶解度, 取 5 mL 2 种缓冲溶液各 3 份于西林瓶中, 加入过量的木犀草素, 将西林瓶置于恒温振荡箱中, 在温度为 $37\ ^\circ\text{C}$, 转速为 75 r/min 条件下振荡 24 h。取出各样品, 3 000 r/min 下离心 10 min 后取上清液, 然后用 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜滤过, 取续滤液于进样瓶中, 按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定, 并计算木犀草素的平衡溶解度, 结果可知, 木犀草素在 pH 值为 1.2、6.8 的缓冲溶液中的平衡溶解度分别为 (3.83 ± 0.23) 、 $(7.81\pm 0.13)\ \mu\text{g/mL}$ 。

2.3.6 过饱和溶出度的测定 为了考察 LNS 体外溶出行为, 参照《中国药典》2020 年版中桨法进行。具体操作如下: 在智能溶出仪中, 以 500 mL 模拟胃液为溶出介质, 温度为 $37\ ^\circ\text{C}$, 桨旋转速度为 75 r/min, 将 30 mL LNS 加入溶出介质中, 以相同质量浓度的木犀草素乙醇溶液作为对照, 二者均平行操

作 3 份。以药物刚接触溶出介质开始计时, 分别于 5、15、30、60、120、130、150、180、240、360、480 min 时取样 4 mL, 取完样后立即补充 4 mL 相应的新鲜溶出介质。另外, 于 120 min 取样后, 每个溶出杯中分别加入适量的 Na_3PO_4 溶液, 调节 pH 值为 6.8, 以模拟肠液。将所取样品溶液经 $0.2\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液置于进样瓶中, 照“2.3.1”项下色谱条件测定, 计算累积溶出度, 结果见图 8。为了测定过饱和和溶出水平, 在整个实验过程中, 介质中药物的质量浓度都应保持远远大于药物的饱和溶解度^[22]。结果如图 8 所示, 在 pH 1.2 和 pH 6.8 时, 木犀草素-原料药的过饱和和溶出始终低于对应的平衡溶解度, LNS 的过饱和和溶出始终高于对应的平衡溶解度, 说明制剂的过饱和度高; 在溶出介质的 pH 值调为 6.8 后, 过饱和和溶出水平明显下降, 在 150 min 后过饱和和溶出水平逐渐稳定, 说明 LNS 能维持较高的过饱和和溶出水平。

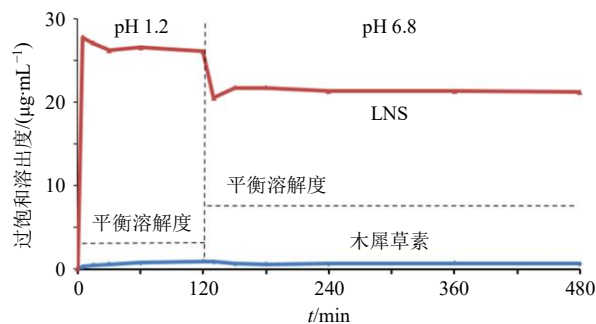


图 8 过饱和和溶出结果

Fig. 8 Supersaturated dissolution results

结果表明, LNS 较木犀草素原料药具有明显优势, 其饱和和溶出度约是木犀草素原料药的 15 倍, 过饱和度高并能维持较长时间, 可以延缓药物在体内因析出晶体而沉淀的过程, 从而使稳定剂在较小用量下也能保证药物分子成溶解态, 提高了原料药的溶解度, 有利于增加其生物利用度^[23]。

2.4 小肠吸收实验

为了探索 LNS 对木犀草素在胃肠道的吸收部位和吸收速率的影响, 采用外翻肠囊法^[24]研究 LNS 在肠道不同肠段的吸收特征, 以探究药物在肠道内的最佳吸收部位。

2.4.1 对照品溶液的制备 精密量取“2.3.1”项下相应体积的储备液, 置于 50 mL 棕色量瓶中, 用 Tyrode 液定容至刻度, 摇匀, 配制出质量浓度为 1、2、4、8、16、32、40 $\mu\text{g/mL}$ 木犀草素对照品溶液。

2.4.2 线性关系考察 按照“2.3.1”项下色谱条件

测定,以木犀草素对照品质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得到回归方程为 $Y=45\,475X-19\,575$, $R^2=0.999\,6$,结果表明木犀草素在 $1\sim 40\,\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4.3 供试品溶液的制备 大鼠按实验质量浓度随机分为 3 组,每组 4 只,实验前 12 h 禁食,自由饮水。颈椎脱臼处死,打开腹腔,小心分离出小肠,分别截取十二指肠、空肠、回肠、结肠相应肠段各 10 cm,用生理盐水冲洗至无内容物流出。将肠段放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ Tyrode 液中,冲洗,在不损伤肠管的情况下,小心剥离肠表面的脂肪及血管,取出,用滤纸吸干表面水分。

将肠管一端结扎,用光滑的玻璃棒外翻,用 Tyrode 液冲洗过后,向不同肠段中注入 3 mL 的空白 Tyrode 液后将另一端也进行结扎形成囊状的肠管。将肠管放入盛有 Tyrode 液的烧杯中,实验中始终保持 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温,并不断通入 $95\%\text{ O}_2/5\%\text{ CO}_2$ 的混合气体。平衡 5 min 后,将烧杯中的液体倒出,分别加入不同质量浓度(0.15 、 0.30 、 0.60 mg/mL)

的木犀草素及 LNS 药液。以肠囊和药液接触时开始计时,取样时间点分别为 15 、 30 、 45 、 60 、 75 、 90 、 105 、 120 min ,每个时间点从肠囊内取样 $500\text{ }\mu\text{L}$,同时补充同温同体积的空白 Tyrode 液。待试验结束后,将各段肠囊置于空白 Tyrode 液中孵育 1 h ,以清除掉肠囊及肠组织中残留的药物;随后将上述用于木犀草素和 LNS 吸收实验的各肠段互换,再按上述操作同法重复试验,以进行自身对照交叉试验的后段实验。取上述肠吸收液,加入甲醇 $500\text{ }\mu\text{L}$,超声混匀, $15\,898\times g$ 离心(离心半径 6.32 cm)2次,每次 15 min ,取上清液用 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜滤过,取续滤液适量即得。

按照“2.3.1”项下色谱条件测定,并计算药物在各时间点的累积吸收量(Q , μg)和药物吸收速率常数 $[K_a, \mu\text{g}/(\text{min}\cdot\text{cm}^2)]$,结果见图 9。

由公式计算不同质量浓度下木犀草素在各个时间点的累积吸收量(Q)。

$$Q=(C_1V_1+V_2\sum_{i=0}^{n-1}C_i)\times 2$$

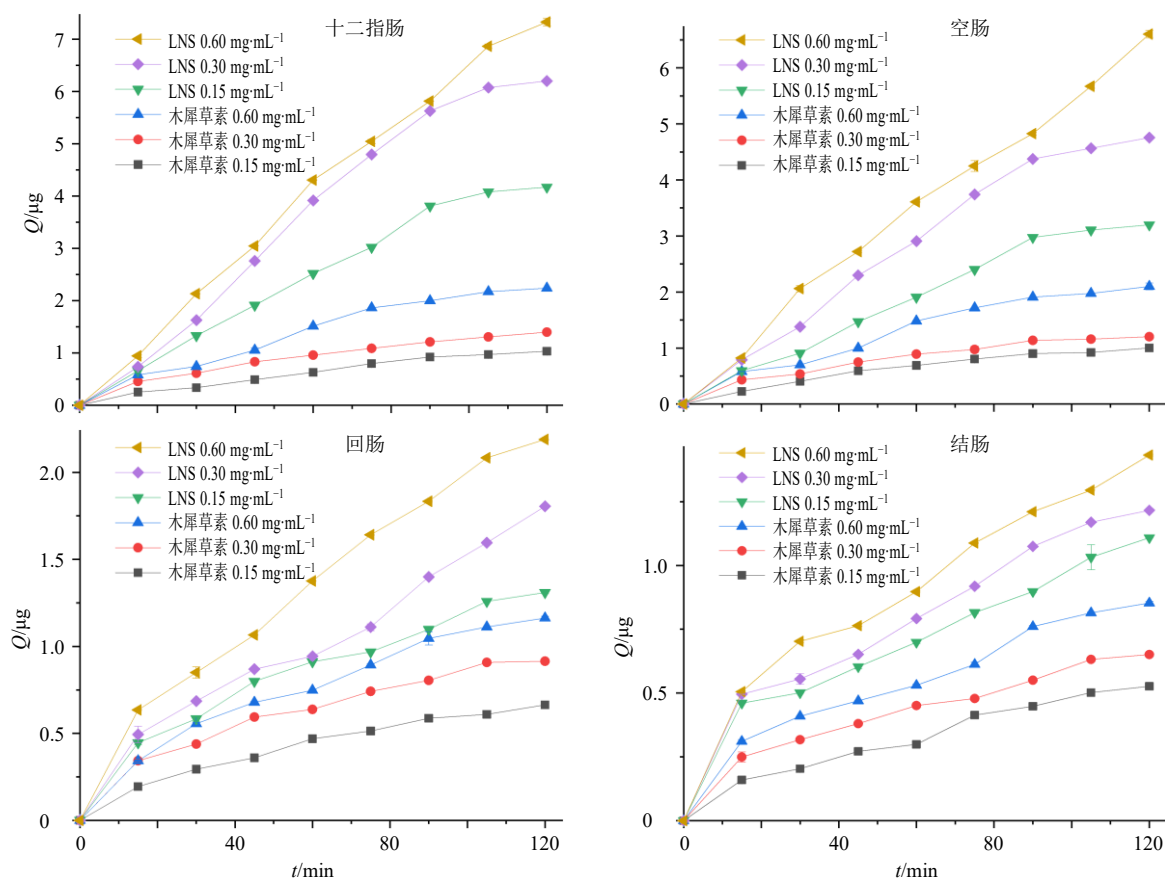


图 9 各肠段的 2 种剂型在不同给药质量浓度时的时间-累积吸收量曲线图 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 9 Time-cumulative absorption curve of two formulations in different intestinal segments at different concentrations ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Q 是每个时间点木犀草素的累积吸收量, C_i 是每个时间点的实际检测质量浓度, V_1 是加入肠囊内的空白 Tyrode 液, V_2 是每次取样的体积

由图 9 可知, 通过对比 2 种制剂在各肠段中不同质量浓度的药物吸收情况, 可以发现药物的同一时间点的吸收量表现出质量浓度相关性。相同质量浓度下, 在各肠段中 2 制剂组吸收量相比, LNS 组的药物累积吸收量显著大于木犀草素溶液组, 表明 LNS 相比于木犀草素溶液能够促进药物在肠道的吸收。

根据小肠内 (4 个肠段) 的 Q 值, 通过线性拟合, 由公式 $K_a=L$ (斜率) / A (肠管平铺面积) 求得吸收速率常数 (K_a) 和相关系数 (R^2), 结果见表 5。2 种制剂中木犀草素在肠道的不同部位中的吸收速率大小顺序均为十二指肠 > 空肠 > 回肠 > 结肠, 这可能归因于十二指肠和空肠肠段的吸收面积较大; 这一结果还表明 LNS 并没有改变木犀草素在肠道内的主要吸收部位和机制。对比相同质量浓度、相同肠段中 2 种制剂的吸收情况可以发现, LNS 中木

犀草素的吸收速率显著高于木犀草素溶液的情况, 尤其是十二指肠和空肠中 LNS 和木犀草素溶液的木犀草素吸收速率差异更加明显, 这表明 LNS 可以增加木犀草素的肠吸收, 且十二指肠和空肠是主要吸收部位。

另外, 还可以发现 2 种制剂在每一肠段中的吸收速率都存在显著的质量浓度相关性 ($P<0.01$), 但是 2 种制剂在同一肠段中的吸收速率随质量浓度增加而提高的程度有明显差异, 即木犀草素溶液随质量浓度的增加, 各肠段中吸收速率增幅增大, 而 LNS 随质量浓度的增加, 各肠段中吸收速率增幅减小, 这些结果表明 2 种制剂在各肠段中的吸收均有质量浓度相关性, 但其吸收速率与质量浓度之间均存在非线性关系, 且仅在 $K_a<0.052$ 时, 木犀草素的肠吸收过程可能只受木犀草素溶解度限制, 而不受吸收速度限制。然而, 木犀草素的实际口服吸收情况是否符合上述规律以及其具体吸收机制如何, 将有待于后期开展体内外吸收途径探索和体内药动学研究来进一步证实。

表 5 木犀草素溶液和 LNS 中木犀草素在 4 个肠段的 K_a 和 R^2 ($n=4$)

Table 5 K_a and R^2 of luteolin in four intestinal segments for the luteolin solution and LNS ($n=4$)

组别	质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	十二指肠		空肠		回肠		结肠	
		$K_a(\times 10^{-3})$	R^2	$K_a(\times 10^{-3})$	R^2	$K_a(\times 10^{-3})$	R^2	$K_a(\times 10^{-3})$	R^2
木犀草素溶液	0.15	7.50	0.977 3	7.64	0.947 9	4.71	0.972 3	2.55	0.981 7
	0.30	8.38	0.982 0	8.29	0.955 8	6.00	0.973 1	2.64	0.996 8
	0.60	16.25	0.957 7	16.93	0.949 8	8.29	0.976 3	3.64	0.984 2
LNS	0.15	33.13**	0.975 7	29.07**	0.969 7	8.79**	0.981 1	4.41**	0.992 7
	0.30	52.00**	0.963 0	43.14**	0.964 7	13.14**	0.985 3	5.14**	0.986 2
	0.60	57.56**	0.996 0	55.64**	0.992 0	16.64**	0.992 2	5.91**	0.991 5

与木犀草素溶液组在相应肠段中的 K_a 比较: ** $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs K_a of luteolin solution in the corresponding intestinal segment.

3 讨论

3.1 稳定剂的选择及药物-稳定剂比的确定

由于不同的稳定剂中化学基团的差异, 导致稳定剂与药物微粒之间的分子间作用力以及胶粒间的作用力都有明显差异, 所以稳定剂种类会影响到纳米混悬剂的稳定性^[25]。因此, 本实验首先以粒径和稳定性为考察指标, 通过单因素筛选法优化了 LNS 的稳定剂种类, 并确定了以 TP GS 作为稳定剂能达到较好的预期效果; 考虑到稳定剂用量对稳定效果的影响^[26], 随后本实验又考察了药物-稳定剂比对纳米混悬剂的粒径、稳定性、PDI、 ζ 电位的影响, 最终确定最佳药物-稳定剂比为 1:1。

3.2 LNS 体外分析方法的建立及研究

3.2.1 波长的选择 木犀草素对照品与稳定剂 TP GS 在紫外波长 200~800 nm 扫描, 结果显示木犀草素在 207、254、350 nm 3 处波长处有强吸收; 而 TP GS 在 219、286 nm 显示出强吸收, 350 nm 处没有显示出强吸收。为了排除稳定剂 TP GS 对木犀草素测定的干扰, 选用 350 nm 作为木犀草素的测定波长。

3.2.2 Tyrode 溶液的配制 在木犀草素的肠吸收情况研究中, 虽有文献报道了外翻肠囊模型和在体单向肠灌流模型^[27-29], 但关于木犀草素及其制剂在大鼠不同肠段中的吸收情况鲜有报道, 且大多数文献对其吸收情况所提甚少。

本实验采用离体外翻肠囊法, 可操作性强、重复性好; 能够保留较为完整的肠道组织和黏膜特性, 其实验结果与机体药物吸收水平比较接近, 具有说服力; 但肠外翻肠囊法也存在缺点, 如长时间暴露在体外, 肠管没有血管和神经的控制, 肠黏膜功能和形态会失去作用。因此, 本研究为解决这一问题, 利用 Tyrode 培养液改善肠管的存在环境, 具体配制方法如下: 将 NaCl (8.0 g/L)、KCl (0.2 g/L)、CaCl₂ (0.2 g/L)、NaHCO₃ (1 g/L)、NaH₂PO₄ (0.05 g/L)、MgCl₂ (0.1 g/L)、葡萄糖 (1.0 g/L), 用蒸馏水定容至 1 000 mL, 稀盐酸调 pH 值为 7.2~7.4, 由于 CaCl₂ 不好溶解, 应在其他无机盐溶解完全后再加入, 葡萄糖于临用前再加入。并且在实验过程中连续通入 95% O₂/5% CO₂, 保证了在实验期间肠管上肠黏膜的活性。实验证明用该模型了解药物的离体吸收, 其结果可靠。

3.3 LNS 的过饱和溶出

药物在纳米混悬剂中所处的物理状态关系着其粒径和溶出稳定性, 通常无定形药物微粒具有较高的饱和溶出度, 但其属于热力学不稳定状态, 因此物理稳定性差, 容易引起纳米混悬剂粒径分布发生变化, 同时溶出速率和溶出度下降; 而结晶型药物具有较好的热力学稳定性, 随着其粒径的减小, 其饱和溶出度会明显提高^[30]。根据本实验对 LNS 中木犀草素物理状态的研究结果可知, 本实验制备的 LNS 中木犀草素以结晶形式存在, 这表明 LNS 可能存在稳定的粒径和溶出度。

在过饱和溶出实验中发现, 相比于木犀草素原料药, LNS 具有显著的长期高过饱和和溶出水平, 这可归因于 LNS 中药物以粒径远小于原料药的状态存在, 正如开尔文定律所描述的小粒径药物具有高溶解度一样^[31]。药物的长期高过饱和和溶出水平将有助于避免或减少口服给药后因胃肠道 pH 变化而引起的析晶沉淀现象, 从而增加药物的吸收速度和时间, 提高药物的口服生物利用度。

综上所述, 本实验制备的 LNS, 分散性和储存稳定性良好, 方法也简单易行, 本实验建立的木犀草素体外分析方法, 经方法学验证可知, 该方法快速、可靠、准确度高, 适合 LNS 的体外溶出和翻肠囊吸收实验研究。

同时, 外翻肠实验表面, LNS 能促进药物在肠道的吸收, 可作为木犀草素口服给药的潜在剂型, 也为其进一步加工成其他剂型研究提供坚实基础。

同时, 在木犀草素肠道吸收的具体机制方面还有很大的研究空间。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Qing W X, Wang Y, Li H, *et al.* Preparation and characterization of copolymer micelles for the solubilization and *in vitro* release of luteolin and luteoloside [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2017, 18(6): 2095-2101.
- [2] Liu R, Meng F R, Zhang L, *et al.* Luteolin isolated from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* (Labiatae) prevents copper-mediated toxicity in β -amyloid precursor protein Swedish mutation overexpressing SH-SY5Y cells [J]. *Molecules*, 2011, 16(3): 2084-2096.
- [3] Chen Z J, Tu M J, Sun S Y, *et al.* The exposure of luteolin is much lower than that of apigenin in oral administration of *Flos Chrysanthemi* extract to rats [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 27(1): 162-168.
- [4] Caltagirone C, Cisari C, Schievano C, *et al.* Co-ultramicrosized palmitoylethanolamide/luteolin in the treatment of cerebral ischemia: From rodent to man [J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7(1): 54-69.
- [5] Zhang J X, Xing J G, Wang L L, *et al.* Luteolin inhibits fibrillary β -amyloid 1-40-induced inflammation in a human blood-brain barrier model by suppressing the p38 MAPK-mediated NF- κ B signaling pathways [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): E334.
- [6] Wang L, Zhong C, Zu Y G, *et al.* Preparation and characterization of luteolin nanoparticles for enhance bioavailability and inhibit liver microsomal peroxidation in rats [J]. *J Funct Foods*, 2019, 55: 57-64.
- [7] Wang H X, Luo Y J, Qiao T K, *et al.* Luteolin sensitizes the antitumor effect of cisplatin in drug-resistant ovarian cancer via induction of apoptosis and inhibition of cell migration and invasion [J]. *J Ovarian Res*, 2018, 11(1): 93.
- [8] Akinrinde A S, Adebisi O E. Neuroprotection by luteolin and gallic acid against cobalt chloride-induced behavioural, morphological and neurochemical alterations in Wistar rats [J]. *Neurotoxicology*, 2019, 74: 252-263.
- [9] 张国敏, 龚国清, 李林林, 等. 木犀草素对大鼠肺成纤维细胞增殖的作用 [J]. *中国天然药物*, 2009, 7(4): 297-300.
- [10] 任开明, 周兆丽, 石文君. 木犀草素对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移能力的影响 [J]. *解剖科学进展*, 2019, 25(4): 361-363.
- [11] Chen S L, Liu L L, Lu S X, *et al.* HBx-mediated decrease of AIM2 contributes to hepatocellular carcinoma

- metastasis [J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(9): 1225-1240.
- [12] 张燕坪, 唐夏莉, 占阮娟, 等. 木犀草素用于心血管疾病的药理研究 [A]. 2012 转化医学与中药现代化高峰论坛 [C]. 2012, 216-218.
- [13] Di Capua A, Adami R, Reverchon E. Production of luteolin/biopolymer microspheres by supercritical assisted atomization [J]. *Ind Eng Chem Res*, 2017, 56(15): 4334-4340.
- [14] Liu K, Zha X Q, Li Q M, *et al.* Hydrophobic interaction and hydrogen bonding driving the self-assembling of quinoa protein and flavonoids [J]. *Food Hydrocoll*, 2021, 118: 106807.
- [15] Sun X, Zhang J, Mi Y, *et al.* Synthesis, characterization, and antioxidant activity of carboxymethyl chitosan derivatives containing sulfonium salt [J]. *JOL*, 2022, 40(1): 284-295.
- [16] 杜成琨, 吴春. W/O 型木犀草素微乳液的制备 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2012, 28(1): 44-48.
- [17] Dang H, Meng M H W, Zhao H W, *et al.* Luteolin-loaded solid lipid nanoparticles synthesis, characterization, & improvement of bioavailability, pharmacokinetics *in vitro* and *vivo* studies [J]. *J Nanopart Res*, 2014, 16(4): 2347.
- [18] Dewangan H K. The emerging role of nanosuspensions for drug delivery and stability [J]. *Curr Nanomed*, 2021, 11(4): 213-223.
- [19] Zong L L, Li X H, Wang H Y, *et al.* Formulation and characterization of biocompatible and stable I.V. itraconazole nanosuspensions stabilized by a new stabilizer polyethylene glycol-poly(β -benzyl-L-aspartate) (PEG-PBLA) [J]. *Int J Pharm*, 2017, 531(1): 108-117.
- [20] Al-Bayaty F H, Kamaruddin A A, Ismail M A, *et al.* Formulation and evaluation of a new biodegradable periodontal chip containing thymoquinone in a chitosan base for the management of chronic periodontitis [J]. *J Nanomater*, 2013, 2013: 16.
- [21] Singhania A, Dutta M, Saha S, *et al.* Speedy one-pot electrochemical synthesis of giant octahedrons from *in situ* generated pyrrolidinyll PAMAM dendrimer [J]. *Soft Matter*, 2020, 16(39): 9140-9146.
- [22] 张欣华, 塔娜, 周雪梅, 等. 反向高效液相色谱法测定蒙药材蓝盆花中木犀草素含量 [J]. 中国民族医药杂志, 2022, 28(7): 28-29.
- [23] Zahiri S, Elsharkawy H. Towards energy-efficient retrofit of council housing in London: Assessing the impact of occupancy and energy-use patterns on building performance [J]. *Energy Build*, 2018, 174: 672-681.
- [24] Emoto C, Yamazaki H, Yamasaki S, *et al.* Use of everted sacs of mouse small intestine as enzyme sources for the study of drug oxidation activities *in vitro* [J]. *Xenobiotica*, 2000, 30(10): 971-982.
- [25] Pu X H, Sun J, Han J H, *et al.* Nanosuspensions of 10-hydroxycamptothecin that can maintain high and extended supersaturation to enhance oral absorption: Preparation, characterization and *in vitro/in vivo* evaluation [J]. *J Nanopart Res*, 2013, 15(11): 2043.
- [26] Mouri A, Legrand P, El Ghzaoui A, *et al.* Formulation, physicochemical characterization and stability study of lithium-loaded microemulsion system [J]. *Int J Pharm*, 2016, 502(1/2): 117-124.
- [27] 刘霞. 木犀草素对非酒精性脂肪肝病的干预及其结肠靶向纳米粒的制备研究 [D]. 青岛: 青岛科技大学, 2022.
- [28] 周萍, 蒋惠娣. 单向灌流模型研究木犀草素对大鼠在体肠的吸收 [J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(4): 29-32.
- [29] 郝悦. 抗痛风黄酮类化合物的筛选及木犀草素在体肠吸收研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [30] Onishi H, Nakamura M, Sasatsu M. Preparation and evaluation of quercetin-loaded MPEG-PLA nanoparticles [J]. *Curr Nanosci*, 2018, 14(5): 366-376.
- [31] Riva C, Porte C, Binelli A, *et al.* Evaluation of 4-nonylphenol *in vivo* exposure in *Dreissena polymorpha*: Bioaccumulation, steroid levels and oxidative stress [J]. *Comp Biochem Phys C*, 2010, 152(2): 175-181.

[责任编辑 郑礼胜]