

• 药剂与工艺 •

PEG 化壳聚糖葫芦素 B 纳米混悬剂的制备及其冻干粉药动学评价

李瑞华¹, 吴书凯², 孙 丽¹, 张国民^{3*}

1. 濮阳医学高等专科学校, 河南 濮阳 457000

2. 濮阳市质量技术监督检验测试中心, 河南 濮阳 457000

3. 上海市中药研究所, 上海 201401

摘要: 目的 采用 PEG 化壳聚糖制备葫芦素 B 纳米混悬剂 (cucurbitacin B nanosuspensions, CuB-NPs), 考察 CuB-NPs 冻干粉口服吸收生物利用度。方法 反溶剂-高压均质法制备 CuB-NPs, 单因素实验结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 优化 CuB-NPs 处方。测定粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 及 ζ 电位等, 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 CuB-NPs 微观形态。采用 5% 乳糖作为冻干保护剂制备冻干粉, X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 法分析晶型, 透析法考察 CuB-NPs 冻干粉在 pH 2.0 和 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的释药行为。ig 给予 SD 大鼠葫芦素 B 和 CuB-NPs 冻干粉, 测定血药浓度, 计算口服相对吸收生物利用度。结果 CuB-NPs 最佳处方工艺: 葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖用量比例为 1.95 : 1, 均质压力为 100 MPa, 均质次数为 11 次。CuB-NPs 粒径为 (265.71 ± 13.46) nm, PDI 值为 0.116 ± 0.012 , ζ 电位为 (33.14 ± 1.39) mV。CuB-NPs 微观形态为球形, 葫芦素 B 在 CuB-NPs 冻干粉中结晶度下降。CuB-NPs 在 pH 2.0 和 pH 7.4 PBS 中 2 h 溶出度均大于 90%, 溶解度提高至 58.58 倍。药动学显示, 新制备 CuB-NPs 和加速条件下储存 6 个月后相对生物利用度分别为 4.87 倍和 4.48 倍, 药动学参数之间无显著性差异。结论 CuB-NPs 提高了葫芦素 B 的溶解度及溶出度, 稳定性良好, 有效促进了口服吸收。

关键词: 葫芦素 B; 纳米混悬剂; PEG 化壳聚糖; Box-Behnken 设计-效应面法; 溶出度; 药动学; 口服生物利用度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)15-5050-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.15.005

Preparation of cucurbitacin B nanosuspensions with PEGylated chitosan and pharmacokinetics evaluation of its lyophilized powder

LI Ruihua¹, WU Shukai², SUN Li¹, ZHANG Guomin³

1. Puyang Medical College, Puyang 457000, China

2. Puyang Quality & Technology Supervision Inspection and Testing Center, Puyang 457000, China

3. Shanghai Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201401, China

Abstract: Objective To prepare cucurbitacin B nanosuspensions (CuB-NPs) with PEGylated chitosan as stabilizer, and oral bioavailability of its lyophilized powder was also investigated. **Methods** Antisolvent-high pressure homogenization method was used to prepare CuB-NPs. Single factor experiments combined with Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) was used to gain optimal prescriptions of CuB-NPs. Particle size, polydispersity index (PDI) value and ζ potential were determined, morphology was observed by transmission electron microscope (TEM). Lyophilized powder was prepared with 5% lactose as lyophilized protective agent, crystal form of CuB-NPs lyophilized powder was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD). Release behavior of CuB-NPs lyophilized powder in pH 2.0 and pH 7.4 phosphate buffers was investigated by dialysis method. SD rats were given cucurbitacin B and CuB-NPs lyophilized powder by instillation, concentration of cucurbitacin B was determined, and its relative bioavailability was also calculated. **Results** Optimal formulation of CuB-NPs: ratio of cucurbitacin B to PEGylated chitosan was

收稿日期: 2024-02-26

基金项目: 国家重大科技专项 (2018ZX09200109-002-009); 上海市科委项目 (21S21903400)

作者简介: 李瑞华 (1982—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为临床药学及人体解剖学。Tel: (0393)6915779 E-mail: 108099385@qq.com

*通信作者: 张国民 (1968—), 男, 硕士, 教授级工程师, 研究方向为中药制剂新技术。Tel: (021)37565589 E-mail: ZhangGM68@163.com

1.95:1, homogenization pressure was 100 MPa and homogenization times were 11. Particle size, PDI value and ζ potential were (265.71 ± 13.46) nm, 0.116 ± 0.012 , and (33.14 ± 1.39) mV, respectively. Morphology of CuB-NPs was spherical, crystallinity of cucurbitacin B decreased in lyophilized powder of CuB-NPs. Cumulative release rate was more than 90% within 2 h in pH 2.0 and pH 7.4 phosphate buffer, and the solubility increased to 58.58 times. Pharmacokinetic results showed that relative bioavailability of CuB-NPs (newly prepared) and CuB-NPs (accelerated storage for 6 months) were 4.87 times and 4.48 times, respectively. There was no significant difference in pharmacokinetic parameters between the two samples of CuB-NPs. **Conclusion** CuB-NPs increased solubility and dissolution of cucurbitacin B, its storage stability was good, and effectively promoted oral absorption.

Key words: cucurbitacin B; nanosuspensions; PEGylated chitosan; Box-Behnken design-surface response methodology; dissolution; pharmacokinetics; oral bioavailability

葫芦素 B (cucurbitacin B) 属于四环三萜类化合物, 可从葫芦科植物甜瓜 *Cucumis melo* L. 中提取得到, 具有抗肿瘤、抗炎、保肝等多种药理活性^[1-3]。据报道^[4]葫芦素 B 油水分配系数为 2.088 ± 0.04 , 具有一定的亲脂性, 课题组测得葫芦素 B 在 25 °C 水中溶解度仅 (9.64 ± 0.12) $\mu\text{g/mL}$, 极大地影响了药物溶出度。葫芦素 B 是 P-糖蛋白底物^[5], 在 Wistar 大鼠体内生物利用度仅 1.37%^[6], 导致药效大打折扣。目前, 葫芦素 B 有磷脂复合物、脂质纳米粒、固体分散体等研究^[4,6-7], 但磷脂复合物黏性大, 体内容易解离; 脂质纳米粒辅料种类多, 处方复杂, 载药量低; 固体分散体在胃肠道可能析晶, 从而限制了生物利用度提高幅度, 且本身易吸潮, 储存稳定性差。

纳米混悬剂 (nanosuspensions, NPs) 可显著提高难溶性药物溶解度、溶出速率及生物利用度^[8-11], 是纳米给药系统的研究重点。该剂型一般采用非离子型聚合物、表面活性剂等作为 NPs 的稳定剂, 但非离子型聚合物稳定效果欠佳, 而表面活性剂具有一定安全隐患。因此使用多效应的稳定剂来构建 NPs 具有较大意义, PEG 化壳聚糖 (PEGylated chitosan) 是一种安全性较高的聚合物, 亲水性良好, 通过物理吸附、提供空间位阻及静电排斥力等多效应稳定机制来维持 NPs 的稳定性^[12], 利于减少稳定剂种类及用量, 提高载药量。PEG 化壳聚糖本身也可有效抑制 P-糖蛋白对药物外排作用^[13-14], 增加药物吸收。但目前鲜见采用 PEG 化壳聚糖作为稳定剂制备 NPs 的报道, 本研究采用 PEG 化壳聚糖为稳定剂制备葫芦素 B 纳米混悬剂 (cucurbitacin B nanosuspensions, CuB-NPs)。

聚乙烯吡咯烷酮 K30 (PVP K30) 是 NPs 常用的一种稳定剂^[9-10], 且稳定效果优于其他种类的稳定剂^[15]。故本研究采用 PVP K30 为稳定剂制备 CuB-NPs (PVP K30), 并以 CuB-NPs (PVP K30) 为对

比来考察 CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 在储存稳定性及生物利用度等方面的优势。通过与公认稳定效果较佳的稳定剂 (PVP K30) 进行对比, 来揭示 PEG 化壳聚糖作为 NPs 稳定剂的潜力, 并为葫芦素 B 制剂革新及中药难溶性成分的 NPs 研究提供借鉴。

1 仪器、材料与动物

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (HPLC), 美国 Agilent 公司; Corona Veo 型电喷雾检测器、Thermo Finnigan LCQ 型液质联用仪, 赛默飞仪器公司; HJ-1 型恒温加热磁力搅拌器, 常州无有实验仪器有限公司; MSE 125P-CE 型电子天平, 德国 Sartorius 公司; JEM-2100 型透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; D8 型 X 射线粉末衍射仪, 意大利布鲁克仪器公司; BDF-86H50 型超低温冰箱, 山东博科生物产业有限公司; ZL-10TD 型冷冻干燥机, 上海左乐仪器有限公司; Nano-S90 型粒度分析仪, 英国马尔文帕纳科公司; AT612 型溶出仪, 上海卓光仪器科技有限公司; SHH-SD-2TA 型稳定性试验箱, 重庆康诚永生试验设备有限公司; Ti-Lab 型均质机, 上海泰坦科技股份有限公司; HNDK200-2 型氮气吹扫仪, 上海汗诺仪器有限公司。

葫芦素 B 对照品 (批号 980524, 质量分数 98.5%)、葫芦素 B 原料药 (批号 211224, 质量分数 97.5%), 西安汇林生物科技有限公司; PEG 化壳聚糖, 脱乙酰度/黏度=90/50, 批号 202205, 西安瑞禧生物科技有限公司; 雌酚酮对照品, 批号 20221017, 质量分数 99.0%, 成都德思特生物技术有限公司; PVP K30, 批号 20201101, 上海昌昱化工新材料有限公司; 乳糖, 批号 20200514, 郑州宇控生物科技有限公司。

36 只 SD 大鼠, 清洁级, 体质量为 (220 ± 20) g, 雌雄 SD 大鼠各 18 只, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 合格证编号为 SCXK (豫) 2020-0005。所有动物实验遵循濮阳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 CuB-NPs 制备工艺及指标测定

2.1.1 CuB-NPs 制备工艺 溶剂-高压均质法制备 CuB-NPs。取 30 mg 葫芦素 B 原料药置于烧杯,加入 20 mL 无水乙醇,超声溶解得有机相。称取处方量的稳定剂加至 50 mL 蒸馏水,置于 60 °C 水浴中磁力搅拌(600 r/min)至澄清得水相。将有机相滴加至水相,磁力搅拌 2 h,循环均质数次,0.45 μm 微孔滤膜滤过,补加蒸馏水至 50 mL 即得 CuB-NPs 混悬液。

2.1.2 CuB-NPs 粒径及ζ电位测定 取 CuB-NPs 混悬液适量,采用蒸馏水稀释 40 倍,置于 Nano-S90 型粒度分析仪测定粒径和分散指数(polydispersity index, PDI)值,另取适量 CuB-NPs 混悬液置于ζ电位样品池中,测定ζ电位。各样品测试 3 次,取平均值。

2.2 CuB-NPs 中葫芦素 B 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈(40:60);柱温为 30 °C;体积流量为 1.0 mL/min;波长为 228 nm;进样量为 10 μL;理论塔板数以葫芦素 B 计不低于 6 500。

2.2.2 线性关系考察 精密称取葫芦素 B 对照品 10.0 mg 置 50 mL 量瓶中,加乙腈超声溶解,得质量浓度为 200 μg/mL 葫芦素 B 对照品储备液。采用乙腈稀释成 0.05、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00 μg/mL 系列质量浓度,按“2.2.1”项下色谱条件测定葫芦素 B 各质量浓度(X)的峰面积(Y),以 Y 对 X 进行线性回归,得回归方程 $Y=35.37 X+2.69$, $r=1.000\ 0$,结果表明葫芦素 B 在 0.05~10.00 μg/mL 线性关系良好。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密取 CuB-NPs 混悬液 1.0 mL 置 50 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解并定容,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取 5 mL 置 10 mL 量瓶中,流动相稀释并定容即得 CuB-NPs 供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 取 PEG 化壳聚糖、乳糖等辅料配制阴性样品,按“2.2.3”项下方法配制阴性样品溶液。另取葫芦素 B 对照品溶液(质量浓度为 0.05 μg/mL)和“2.2.3”项下 CuB-NPs 供试品溶液,分别按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,结果见图 1,结果表明葫芦素 B 色谱峰不受其他杂质干扰,该方法专属性良好。

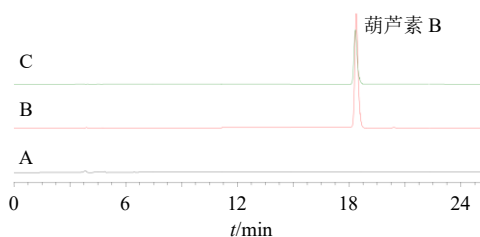


图 1 空白样品(A)、葫芦素 B 对照品(B)和 CuB-NPs 样品(C)溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectra of blank sample (A), cucurbitacin B reference substance (B) and CuB-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 葫芦素 B 对照品溶液,分别按“2.2.1”项下色谱条件连续测定 6 次,计算得葫芦素 B 峰面积的 RSD 分别为 0.63%、0.43%、0.82%,结果表明精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 CuB-NPs 供试品溶液,分别于制备后 0、4、8、12、18、24 h,按“2.2.1”项下色谱条件测定,计算得葫芦素 B 峰面积的 RSD 为 1.25%,结果表明 CuB-NPs 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取 CuB-NPs 混悬液,按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定,计算得葫芦素 B 质量分数的 RSD 为 1.50%,结果表明该实验重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密取 9 份体积均为 0.5 mL 的 CuB-NPs 混悬液,置于 50 mL 量瓶中,分为低、中、高 3 组,分别精密加入质量浓度为 200 μg/mL 葫芦素 B 对照品溶液 1.0 mL(低)、1.5 mL(中)、2.0 mL(高),按“2.2.1”项下色谱条件测定葫芦素 B 含量,计算得葫芦素 B 平均加样回收率为 99.48%,RSD 为 1.12%,结果表明该方法准确度较高。

2.3 单因素考察

2.3.1 稳定剂种类考察 在葫芦素 B 用量为 30 mg,稳定剂用量为 30 mg,均质压力为 100 MPa,均质次数为 10 次的条件下考察不同稳定性剂的影响,结果见表 1。采用 TPGS、磷脂或 PVP K30 作为稳定剂时

表 1 不同稳定剂的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of different types of stabilizers ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

稳定剂	粒径/nm	PDI 值	ζ 电位/mV
TPGS	866.78±56.17	0.496±0.022	-22.82±1.01
磷脂	1 181.24±78.49	0.558±0.030	-11.79±0.84
PVP K30	717.79±21.98	0.414±0.016	-15.92±0.95
PEG 化壳聚糖	344.83±13.12	0.190±0.017	33.27±1.78

CuB-NPs 粒径和 PDI 值均相对较大, ζ 电位绝对值均小于 30 mV。PEG 化壳聚糖作为稳定剂时 CuB-NPs 粒径和 PDI 值相对较小, ζ 电位为正电性, 且绝对值相对较大 (>30 mV), 故选择 PEG 化壳聚糖作为 CuB-NPs 稳定剂。

2.3.2 葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖用量比例的考察 在葫芦素 B 用量为 30 mg, 均质压力为 100 MPa, 均质次数为 10 次的条件下考察葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖用量比例的影响, 结果见表 2。PEG 化壳聚糖用量较大时 CuB-NPs 粒径和 PDI 值均较大, 可能是用量较大时 CuB-NPs 体系黏度较高, 影响了 CuB-NPs 的制备, 导致粒径较大且分布不均匀。PEG 化壳聚糖用量过小时 CuB-NPs 粒径和 PDI 值增大, ζ 电位绝对值减小。可见葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖比例对 CuB-NPs 影响较大, 后续对两者用量比 1:1~3:1 进行优化。

2.3.3 均质功率的考察 在葫芦素 B 用量为 30 mg, 葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖用量比例为 2:1, 均质次数为 10 次的条件下考察均质功率影响, 结果见表 3。随着均质功率的增加 CuB-NPs 粒径和 PDI 值均先下降后增大, 可能是均质功率较小时提供的能量不足, 导致 CuB-NPs 粒径和 PDI 值较大, 但均质功率达 120 MPa 时 CuB-NPs 粒径大于 300 nm, PDI 值大于 0.3, ζ 电位绝对值低于 30 mV。表明均质功率对 CuB-NPs 有较大影响, 后续可对均质功率 90~

110 MPa 进行优化。

2.3.4 均质次数的考察 在葫芦素 B 用量为 30 mg, 葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖用量比例为 2:1, 均质功率为 100 MPa 的条件下考察均质次数的影响, 结果见表 4。均值次数较少时 CuB-NPs 粒径及 PDI 均较大, 但均质次数过多时 CuB-NPs 粒径及 PDI 均出现增大趋势, 且 ζ 电位绝对值下降。可见, 均质次数对 CuB-NPs 有较大影响, 后续可对均质次数 8~12 次进行优化。

表 4 均质次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of homogeneous times ($\bar{x} \pm s, n=3$)

均质次数/次	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
6	368.74 $\pm$ 18.40	0.249 $\pm$ 0.011	29.93 $\pm$ 0.93
8	305.43 $\pm$ 17.65	0.197 $\pm$ 0.015	31.27 $\pm$ 1.24
10	282.90 $\pm$ 14.64	0.174 $\pm$ 0.013	32.45 $\pm$ 1.31
12	298.73 $\pm$ 13.71	0.188 $\pm$ 0.016	32.02 $\pm$ 1.48
14	329.46 $\pm$ 15.48	0.205 $\pm$ 0.019	28.73 $\pm$ 0.94

2.4 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化处方工艺

2.4.1 BBD-RSM 试验设计及结果 采用 PEG 化壳聚糖作为稳定剂前提下, 发现葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖用量比例 (X_1)、均质功率 (X_2 , MPa) 和均质次数 (X_3 , 次) 对 CuB-NPs 粒径 (Y , nm) 影响较大。根据单因素考察结果, 选择葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖用量优化范围为 1:1~3:1, 均质功率优化范围为 90~110 MPa, 均质次数优化范围为 8~12 次, 各因素水平设置见表 5。分别制备不同处方工艺的 CuB-NPs, 测定粒径, BBD-RSM 试验设计及结果见表 5。

2.4.2 二次多元回归模型的建立及显著性分析 使用 Design Expert V11.1.2.0 版本对自变量 (X_1 、 X_2 、 X_3) 和因变量 (Y) 进行拟合, 得二次多元回归方程为 $Y=279.33+0.45 X_1-6.20 X_2-15.58 X_3+10.52 X_1 X_2+13.01 X_1 X_3+1.82 X_2 X_3+47.92 X_1^2+34.13 X_2^2+30.14 X_3^2$, 根据拟合方程 X_1 、 X_2 、 X_3 系数大小可知, 自变量影响大小顺序为 $X_3>X_2>X_1$ 。模型 R^2 和 R_{adj}^2 分别为 0.992 9 和 0.983 8, 均大于 0.98, 证明模型预测值与实际值吻合度较高。模型的 P 值 $<0.000 1$, 具有极显著性差异, 而失拟项的 P 值 $=0.177 4>0.05$, 表明未知影响因素对结果干扰可忽略, 证明模型可信度较高, 可用于 CuB-NPs 处方工

表 2 稳定剂用量影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖比例	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
1:2	549.87 $\pm$ 64.26	0.279 $\pm$ 0.033	33.14 $\pm$ 1.49
1:1	448.18 $\pm$ 56.17	0.197 $\pm$ 0.021	31.99 $\pm$ 1.26
2:1	287.05 $\pm$ 39.41	0.172 $\pm$ 0.023	33.19 $\pm$ 1.24
3:1	334.84 $\pm$ 31.72	0.199 $\pm$ 0.020	28.08 $\pm$ 1.48
4:1	402.06 $\pm$ 13.82	0.254 $\pm$ 0.029	23.07 $\pm$ 0.95

表 3 均质功率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of homogeneous power ($\bar{x} \pm s, n=3$)

均质功率/MPa	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
80	340.65 $\pm$ 26.99	0.281 $\pm$ 0.015	32.54 $\pm$ 1.19
90	314.01 $\pm$ 29.58	0.226 $\pm$ 0.017	31.19 $\pm$ 0.92
100	287.05 $\pm$ 23.41	0.179 $\pm$ 0.025	32.44 $\pm$ 1.60
110	270.84 $\pm$ 19.20	0.207 $\pm$ 0.014	33.01 $\pm$ 1.14
120	302.90 $\pm$ 17.49	0.309 $\pm$ 0.018	29.76 $\pm$ 1.07

表 5 BBD-RSM 试验设计结果

Table 5 Experimental design results of BBD-RSM

试验号	X_1	X_2/MPa	$X_3/\text{次}$	Y/nm	试验号	X_1	X_2/MPa	$X_3/\text{次}$	Y/nm	试验号	X_1	X_2/MPa	$X_3/\text{次}$	Y/nm
1	2:1(0)	100(0)	10(0)	281.87	7	2:1	100	10	274.23	13	2:1	110	12	321.77
2	2:1	90(-1)	8(-1)	369.06	8	2:1	100	10	279.38	14	2:1	110	8	354.04
3	1:1(-1)	90	10	375.26	9	3:1	90	10	360.92	15	1:1	100	12	333.62
4	3:1(+1)	100	12(+1)	354.74	10	2:1	100	10	283.76	16	2:1	90	12	329.51
5	3:1	110(+1)	10	368.55	11	2:1	100	10	277.43	17	3:1	100	8	355.14
6	1:1	100	8	386.07	12	1:1	110	10	340.80					

艺优化及研究。方差分析见表 6, 其中 X_2 、 X_3 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具极显著差异 ($P < 0.01$)。

2.4.3 效应面结果及最佳处方工艺 自变量 (X_1 、 X_2 、 X_3) 与因变量 (Y) 三维曲面图见图 2, CuB-NPs 粒径随着另外 2 因素增加而呈现先下降后增大趋势, 说明采用 BBD-RSM 优化 CuB-NPs 处方工艺是

必要的。

设置 CuB-NPs 粒径最小为优化目标, 取值范围为 200~400 nm, 得 CuB-NPs 最佳处方: 葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖用量比例 X_1 为 1.95:1, 均质压力 X_2 为 100.92 MPa, 均质次数为 10.63 次, 预测粒径为 259.74 nm。

表 6 方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	23 823.77	9	2 647.09	108.90	<0.000 1	X_1^2	9 669.95	1	9 669.95	397.83	<0.000 1
X_1	1.62	1	1.62	0.07	0.803 7	X_2^2	4 903.37	1	4 903.37	201.73	<0.000 1
X_2	307.40	1	307.40	12.65	0.009 3	X_3^2	3 823.78	1	3 823.78	157.31	<0.000 1
X_3	1 942.83	1	1 942.83	79.93	<0.000 1	残差	170.15	7	24.31		
X_1X_2	442.89	1	442.89	18.22	0.003 7	失拟项	114.45	3	38.15	2.74	0.177 4
X_1X_3	677.30	1	677.30	27.86	0.001 1	纯偏差	55.70	4	13.92		
X_2X_3	13.25	1	13.25	0.55	0.484 3	总离差	23 993.92	16			

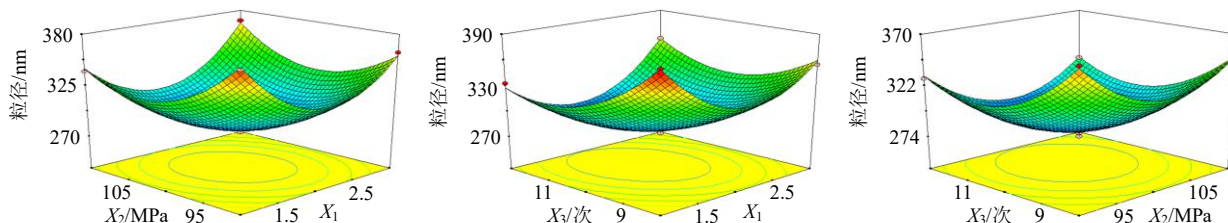


图 2 自变量与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plots of independent factors and response values

2.5 CuB-NPs 处方工艺确定及验证

为使操作便捷, 均质压力调整为 100 MPa, 均质次数调整为 11 次, 葫芦素 B 与 PEG 化壳聚糖用量比例 1.95:1 维持不变。平行制备 3 批 CuB-NPs, 测得平均粒径为 $(265.71 \pm 13.46) \text{ nm}$, RSD 为 1.19% (图 3)。

计算 CuB-NPs 粒径相对偏差 [相对偏差=(实际值-预测值)/预测值] 为 2.30%, 表明建立的数学模型可信度较高。另外, 测得 CuB-NPs 的平均 PDI

值为 0.116 ± 0.012 , RSD 为 0.67%; 平均 ζ 电位为 $(33.14 \pm 1.39) \text{ mV}$, RSD 为 0.77% (图 3)。

2.6 CuB-NPs 的 TEM 观察

取 CuB-NPs 混悬液 1 滴至 5 mL 蒸馏水中, 摇匀后滴至铜网上, 1.0% 磷钨酸钠染色, 置于 30 °C 真空干燥箱中 30 min, 置于 TEM 下观察 CuB-NPs 微观外貌 (放大倍数为 13 000 倍), 结果见图 4, 由于 PEG 化壳聚糖附着在 CuB-NPs 表面, 本身具有一定的黏性, 从而使 CuB-NPs 之间发生交联^[16]。

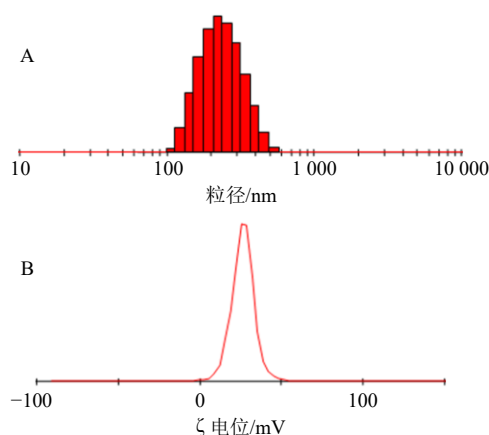


图 3 CuB-NPs 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 3 Pictures of particle size distribution (A) and ζ potential (B) of CuB-NPs

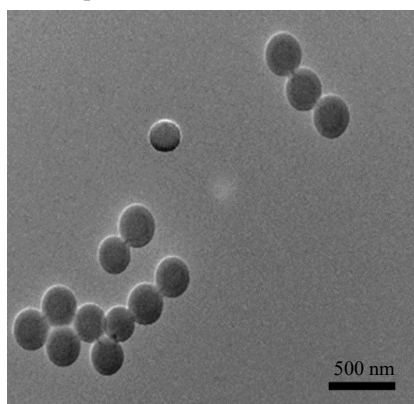


图 4 CuB-NPs 的 TEM 图

Fig. 4 TEM of CuB-NPs

2.7 CuB-NPs 混悬液冻干粉的制备及溶解度测定

2.7.1 冻干粉制备工艺 取乳糖加入适量蒸馏水溶解, 加至 CuB-NPs 混悬液中, 再补加蒸馏水使乳糖质量分数为 5%, 混匀后分装至西林瓶中, 使液面高度均约 1 cm。-50 °C 超低温冰箱中预冻 48 h, 置于 -35 °C 冷冻干燥机中冻干 48 h, 然后于 6 h 内缓慢升温至 25 °C, 取出即得 CuB-NPs 冻干粉, CuB-NPs 混悬液及其冻干粉外观见图 5。取 CuB-NPs 冻干粉, 用蒸馏水复溶后, 测得粒径为 (283.74 ± 14.06) nm ($n=3$), PDI 为 0.136 ± 0.012 ($n=3$), 平均 ζ 电位为 (31.85 ± 1.27) mV ($n=3$)。

2.7.2 CuB-NPs 冻干粉质量分数的测定 精密取 CuB-NPs 冻干粉 10 mg (M_1), 加入 50% 甲醇水溶液 10 mL, 超声 10 min 溶解, 精密量取 1 mL 置 50 mL 量瓶中, 流动相定容, 摇匀后测定葫芦素 B 含量 (M_2), 计算 CuB-NPs 冻干粉质量分数, 公式为 质量分数 = M_2/M_1 。结果显示, 3 批 CuB-NPs 冻干粉平均质量分数为 (1.17 ± 0.01) %。

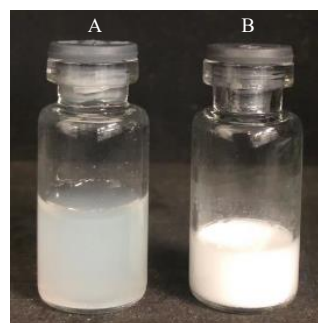


图 5 CuB-NPs 混悬液 (A) 及其冻干粉 (B) 外观

Fig. 5 Appearance of CuB-NPs suspensions (A) and its lyophilized powder (B)

2.7.3 溶解度测定 取过量葫芦素 B 原料药、物理混合物 (葫芦素 B + 空白冻干粉, 比例同 CuB-NPs 冻干粉) 和 CuB-NPs 冻干粉, 加 10 mL 蒸馏水得混悬液, 密封后固定在振荡器上 (保持温度为 25 °C), 60 r/min 振荡 2 d。取混悬液 12 500 r/min 离心 (离心半径为 8.6 cm) 20 min, 测定葫芦素 B 质量浓度。结果 (表 7) 显示, 葫芦素 B 在 CuB-NPs 冻干粉中溶解度提高至原料药的 58.58 倍, 而在物理混合物中溶解度仅有小幅度增加, 可能与 PEG 化壳聚糖增加了葫芦素 B 原料药的亲水性有关。

表 7 溶解度测定 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Solubility determination ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	溶解度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
葫芦素 B 原料药	9.64 ± 0.12
物理混合物	12.01 ± 0.18
CuB-NPs 冻干粉	564.75 ± 5.41

2.8 CuB-NPs 冻干粉晶型研究

X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 法条件: Cu-K α 靶, 扫描角度 (2θ) 为 3°~45°, 扫描速率为 4°/min。取葫芦素 B 原料药、空白冻干粉 (不含葫芦素 B, 辅料比例同 CuB-NPs 冻干粉)、物理混合物 (葫芦素 B + 空白冻干粉, 比例同 CuB-NPs 冻干粉) 和 CuB-NPs 冻干粉各约 30 mg, 置于 X 射线粉末衍射仪进行扫描, 结果见图 6。葫芦素 B 原料药在 7.8°、9.1°、11.5°、13.8°、17.0°、23.2°、25.0°、27.7° 等出现特征晶型峰, 在物理混合物 XRPD 中仍可观察到葫芦素 B 特征晶型峰, 表明简单混合后未影响葫芦素 B 晶型。在 CuB-NPs 冻干粉 XRPD 图谱中也可观察到葫芦素 B 在 7.8°、9.1°、11.5°、13.8°、17.0°、23.2°、25.0°、27.7° 等处的特征晶型峰, 但这些特征晶型峰强度明显下降 (与物理

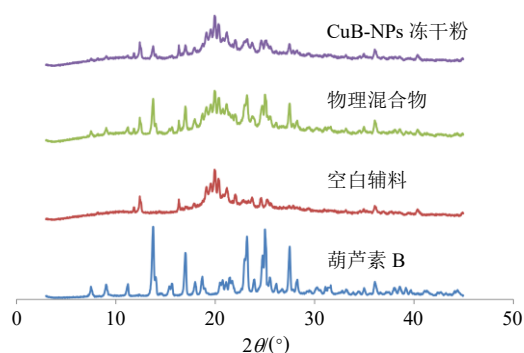


图 6 XRPD 结果
Fig. 6 Results of XRPD

混合物相比), 可能是葫芦素 B 在 CuB-NPs 冻干粉中转变成亚稳态结构造成的。

2.9 CuB-NPs 冻干粉体外释放考察

口服制剂主要经胃、肠道吸收, 故分别考察在 pH 2.0 和 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中释放情况。取葫芦素 B 原料药、物理混合物 (葫芦素 B+空白冻干粉, 比例同 CuB-NPs 冻干粉) 和 CuB-NPs 冻干粉适量 (葫芦素 B 含量均为 2 mg), 加入 pH 2.0 PBS (含 1% SDS) 5 mL, 密封于透析袋 (截留相对分子质量 8 000~12 000), 扎紧。采用 pH 2.0 PBS (含 1% SDS) 1 000 mL 为释药介质 (抽滤脱气), 转速设置为 75 r/min, 待释药介质恒温至 37 °C 时进行试验。分别于 0、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12 h 取样 3 mL, 并补加空白介质维持总释药介质体积不变, 样品经 0.45 μm 滤膜滤过后测定葫芦素 B 质量浓度。同法测定各样品在 pH 7.4 PBS (含 1% SDS) 中释药情况。

结果见图 7。葫芦素 B 原料药在 2 种介质中的 12 h 累积释放率均不足 55%, 可能与原料药粒度较大、疏水性强等缺陷有关^[7], 而 CuB-NPs 冻干粉在 pH 2.0 和 pH 7.4 PBS 中 2 h 累积释放率均大于 90%, 溶出速率和溶出度得到明显改善。

2.10 PVP K30 为稳定剂的 CuB-NPs 混悬液及其冻干粉制备工艺

为制得与 CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 相同粒径的 NPs, 在制备 CuB-NPs (PVP K30) 时增加了 PVP K30 用量, 其余制备工艺与 CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 保持一致。取 30 mg 葫芦素 B 置于烧杯, 加入 20 mL 无水乙醇, 超声溶解得有机相。称取 130 mg 的 PVP K30, 加入 50 mL 蒸馏水, 并于 60 °C 水浴中磁力搅拌 (600 r/min) 至澄清得水相。将有机相滴加至水相, 磁力搅拌 2 h, 100 MPa 均质压力下循

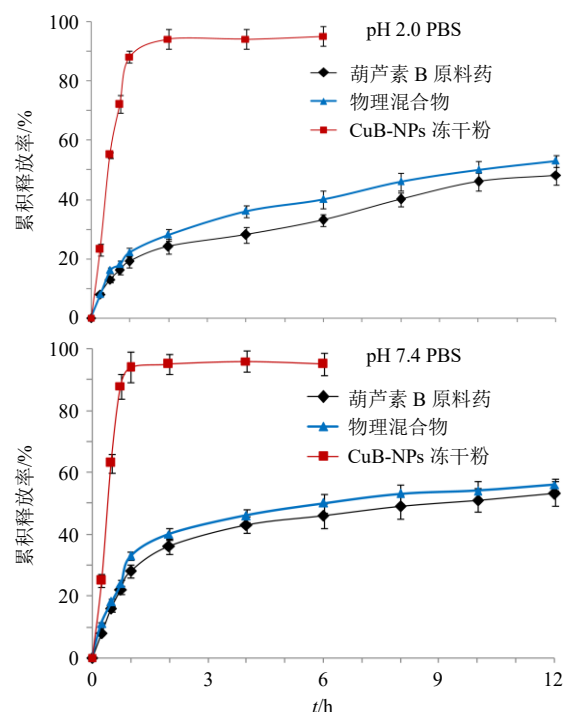


图 7 葫芦素 B、物理混合物、CuB-NPs 冻干粉在 pH 2.0 PBS 和 pH 7.4 PBS 中体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Release curves *in vitro* of cucurbitacin B, physical mixture and CuB-NPs lyophilized powder in pH 2.0 PBS and pH 7.4 PBS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

环均质 11 次, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 补加蒸馏水至 50 mL, 即得 CuB-NPs (PVP K30) 混悬液。

按“2.1.2”项下方法测得粒径为 (272.11 ± 15.38) nm ($n=3$), RSD 为 1.28%; PDI 值为 0.129 ± 0.014 ($n=3$), RSD 为 0.29%; 平均 ζ 电位为 (-30.64 ± 1.40) mV ($n=3$), RSD 为 0.53%。按照“2.7.1”项下同法制备 CuB-NPs (PVP K30) 冻干粉, 测得平均质量分数为 $(1.17 \pm 0.02)\%$ ($n=3$)。

2.11 2 种 CuB-NPs 冻干粉稳定性考察

分别取 CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 冻干粉和 CuB-NPs (PVP K30) 冻干粉密封于西林瓶中, 置于 8 °C 冰箱、室温 (温度 25 °C、相对湿度 45%) 和加速 (温度 40 °C、相对湿度 55%) 条件中, 于第 6 个月取各组样品, 加入蒸馏水复溶后测定粒径、溶解度和质量分数, 结果见表 8。CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 冻干粉在 8 °C 冰箱储存条件下粒径和溶解度变化最小, 这是由于制成冻干粉后抑制了纳米颗粒运动和聚集, 低温条件下可使过饱和度及成核速率下降, 导致晶体生长速度降低, 表明 CuB-NPs 冻干粉应在低温条件下储存。加速条件下 CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 冻干粉在第 6 个月外观仍饱满, 粒

表 8 2 种 CuB-NPs 冻干粉稳定性考察 (储存 6 个月, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Stability investigation of two kinds of CuB-NPs lyophilized powders (storage for six months, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

储存条件	CuB-NPs (PEG 化壳聚糖)			CuB-NPs (PVP K30)		
	粒径/nm	溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	质量分数/%	粒径/nm	溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	质量分数/%
8 °C 冰箱	281.43±33.61	558.07±5.12	1.17±0.01	670.15±78.74	467.77±5.03	1.14±0.02
室温	409.79±52.70	540.16±4.90	1.18±0.01	1 188.72±152.13	381.34±4.19	1.10±0.02
加速	493.06±57.34	508.29±4.86	1.15±0.02	1 516.48±178.96	276.05±3.80	1.02±0.03

径仍小于 500 nm, 质量分数基本未变, 但溶解度下降至 (508.29 ± 4.86) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。CuB-NPs (PVP K30) 冻干粉在相同储存条件下粒径增长远大于 CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 冻干粉, 且质量分数和溶解度也出现明显下降。

2.12 药动学研究

2.12.1 色谱及质谱条件 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈 (40 : 60); 色谱柱为 Perkin Elmer C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.9 μm); 柱温为 30 °C; 体积流量为 0.2 mL/min。电喷雾 (ESI⁺) 检测, 离子源温度为 450 °C, 喷雾电压为 5 000 V, 气帘气为 206.843 kPa (30 psi), 检测离子对分别为 m/z 581.2→521.3 (葫芦素 B) 和 m/z 269.3→145.2 (雌酚酮)。

2.12.2 给药及取血方案 采用 0.5% CMC-Na 水溶液配制葫芦素 B、CuB-NPs 冻干粉 (PVP K30) 和 CuB-NPs 冻干粉 (PEG 化壳聚糖) ig 液, 使葫芦素 B 质量浓度均为 0.8 mg/mL。取禁食 12 h 的 SD 大鼠 18 只, 分为 3 组, 按 5 mg/kg 剂量 (以葫芦素 B 含量计) ig 给药。于 0.5、1、1.5、2、2.5、3、4、6、8、12 h 取血约 200 μL 至离心管 (含 2 滴浓度为 0.5% 肝素钠溶液), 3 000 r/min 离心 (离心半径 5.5 cm) 4 min, 取出血浆并冷冻保存。同法考察加速条件下样品药动学行为。

2.12.3 血浆样品的处理 用乙腈配制 800 ng/mL 雌酚酮溶液作为内标溶液。取 50 μL 血浆样品至离心管中, 加入 50 μL 内标溶液和 0.5 mL 乙腈, 涡旋混匀 60 s, 加入醋酸乙酯 0.5 mL, 涡旋混匀 60 s, 6 500 r/min 离心 (离心半径 5.5 cm) 5 min。取上清液至离心管中, 于 35 °C 氮气流下吹干, 加 50 μL 乙腈涡旋 60 s 复溶, 6 500 r/min 离心 15 min, 取上清液密封, 即得。

2.12.4 线性关系考察 用乙腈配制 1 000、750、500、100、50、5 ng/mL 葫芦素 B 对照品溶液, 各质量浓度取 100 μL , 35 °C 氮气流下吹干, 加入 100 μL 空白血浆复溶, 即得质量浓度为 1 000、750、

500、100、50、5 ng/mL 葫芦素 B 血浆样品溶液。按“2.12.3”项下方法操作, 制备血浆对照品溶液, 以葫芦素 B 与内标峰面积比为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 得回归方程 $Y=0.003 X-0.172$, $r=0.998 2$, 结果表明葫芦素 B 血浆对照品溶液线性范围为 5~1 000 ng/mL。

2.12.5 专属性考察 取空白血浆、葫芦素 B ig 给药 8 h 血浆样品溶液和血浆对照品溶液 (葫芦素 B 质量浓度为 50 ng/mL), 按“2.12.1”项下色谱条件进行测定, 结果见图 8, 表明专属性较高。

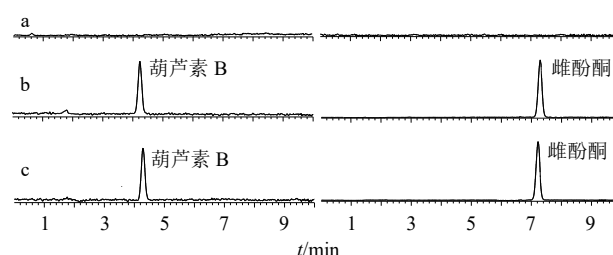


图 8 空白血浆 (a)、葫芦素 B ig 给药 8 h (含内标, b)、50 ng·mL⁻¹ 血浆对照品溶液 (含内标, c) 的 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 8 UPLC-MS/MS chromatograms of blank plasma (a), intra-gastric administration of cucurbitacin B for 8 h (including internal standard, b) and 50 ng·mL⁻¹ plasma reference solution (including internal standard, c)

2.12.6 精密度试验 取 5、500、1 000 ng/mL 血浆对照品溶液分别作为低、中、高质量浓度, 进样测试葫芦素 B 与内标峰面积, 重复 6 次, 计算得两者比值的 RSD 分别为 5.28%、1.68%、4.11%; 每天测试 1 次, 连续测试 6 d, 计算得两者比值的 RSD 分别为 3.79%、4.16%、4.82%, 表明日内、日间精密度良好。

2.12.7 稳定性试验 取血浆样品溶液于 0、3、6、9、12、24 h 进样测定, 计算得葫芦素 B 与内标峰面积比的 RSD 为 5.90%, 结果表明血浆样品溶液稳定性良好。

2.12.8 重复性试验 取 CuB-NPs 冻干粉 (PEG 化

壳聚糖)加速条件下 ig 1 h 的血浆样品,按“2.12.3”项下方法操作平行制备 6 份血浆样品溶液,进样测试。计算得葫芦素 B 质量浓度的 RSD 为 6.36%,表明该方法重复性良好。

2.12.9 提取回收率和基质效应试验 取 5、500、1 000 ng/mL 葫芦素 B 对照品溶液(含内标)作为低、中、高质量浓度,按“2.12.3”项下方法处理后测定峰面积(a);取 100 μ L 空白血浆,按“2.12.3”项下方法处理后得残渣,加入 5、500、1 000 ng/mL 葫芦素 B 对照品溶液和内标,涡旋 1 min 后进样测定峰面积(b),提取回收率= a/b 。结果显示低、中、高质量浓度葫芦素 B 及内标提取回收率分别为 98.04%、96.79%、97.32%和 95.99%,表明提取回收率较高。取质量浓度为 5、500、1 000 ng/mL 葫芦素 B 对照品溶液(含内标),测定峰面积(c),基质效应= b/c 。结果显示低、中、高质量浓度葫芦素 B 及内标基质效应分别为 101.08%、97.29%、99.48%和 101.76%,表明该法基质效应小。

2.12.10 药动学结果 葫芦素 B、CuB-NPs 冻干粉(PVP K30)和 CuB-NPs 冻干粉(PEG 化壳聚糖)新制备样品和加速条件下样品的药-时曲线见图 9,采用 DAS 2.0 软件非房室模型对药动学数据分别进行分析,结果见表 9。

与葫芦素 B 原料药相比,新制备及加速条件下的 CuB-NPs(PVP K30)和 CuB-NPs(PEG 化壳聚糖)样品的药动学行为均发生了较大变化,达峰时间($t_{\max}$)均显著性提前($P<0.05$)。2 种 CuB-NPs 新制备样品的最大血药浓度($C_{\max}$)、药时曲线下面积($AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$)均有极显著性提高($P<0.01$),相对生物利用度分别增加至 4.81 倍和 4.87 倍。2 种 CuB-NPs 各药动学参数之间无显著性差异($P>0.05$)。

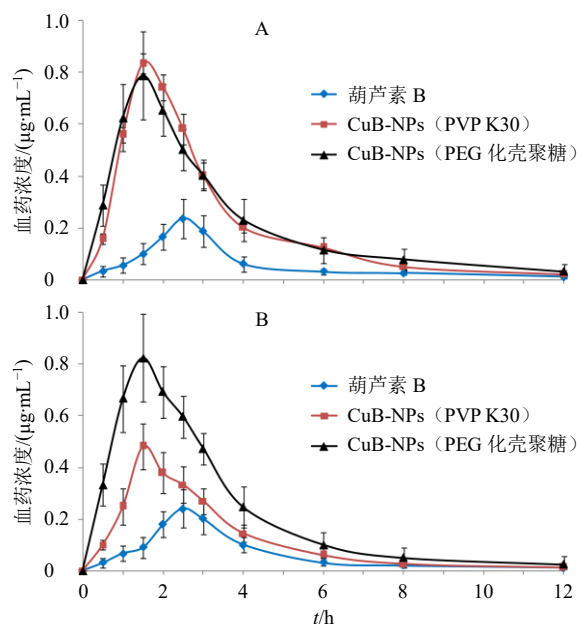


图 9 CuB-NPs 新制备样品 (A) 和加速条件下样品 (B) 的血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 9 Blood concentration-time curves of CuB-NPs newly prepared samples (A) and samples under accelerated condition (B) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

加速条件下储存 6 个月后, CuB-NPs(PVP K30)的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 仍有显著性提高 ($P<0.05$), 但相对生物利用度提高幅度下降, 仅增加至 2.30 倍; 而 CuB-NPs(PEG 化壳聚糖)的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 仍均有极显著性提高 ($P<0.01$), 相对生物利用度增加至 4.48 倍。

与新制备 CuB-NPs(PVP K30)相比, 加速条件下储存 6 个月后 CuB-NPs(PVP K30)的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$ 均出现显著性下降 ($P<0.05$)。与新制备 CuB-NPs(PEG 化壳聚糖)相比, 加速条件下储存 6 个月后 CuB-NPs(PEG 化壳聚糖)药动学参数仍无显著性差异 ($P>0.05$), 表明 CuB-NPs

表 9 CuB-NPs 新制备样品和加速条件下样品的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 9 Pharmacokinetic parameters of newly prepared samples and samples under accelerated condition ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	新制备样品			加速条件下样品		
		葫芦素 B 原料药	CuB-NPs (PVP K30)	CuB-NPs (PEG 化壳聚糖)	葫芦素 B 原料药	CuB-NPs (PVP K30)	CuB-NPs (PEG 化壳聚糖)
$t_{\max}$	h	2.58 ± 0.79	1.43 ± 0.48*	1.55 ± 0.51*	2.49 ± 0.63	1.50 ± 0.43*	1.56 ± 0.53*
$C_{\max}$	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	206.43 ± 54.71	834.59 ± 193.12**	787.33 ± 200.29**	213.58 ± 60.79	481.05 ± 95.14* ^Δ	826.11 ± 139.89** [#]
$AUC_{0\sim t}$	$\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	580.44 ± 138.90	2 791.18 ± 680.63**	2 826.47 ± 664.52**	612.19 ± 144.08	1 408.56 ± 403.27* ^Δ	2 551.63 ± 614.48** [#]
$AUC_{0\sim\infty}$	$\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	603.27 ± 152.16	2 849.92 ± 719.01**	2 960.54 ± 724.83**	623.81 ± 158.02	1 489.24 ± 419.90* ^Δ	2 796.75 ± 633.46** [#]

与葫芦素 B 原料药比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 CuB-NPs(PVP K30)比较: # $P<0.05$; 与新制备 CuB-NPs(PVP K30)比较: ^Δ $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs cucurbitacin B; # $P<0.05$ vs CuB-NPs(PVP K30); ^Δ $P<0.05$ vs newly prepared CuB-NPs(PVP K30)。

(PEG 化壳聚糖) 促吸收作用更加稳定可靠。

3 讨论

采用反溶剂-高压均质法制备了 CuB-NPs, 将溶有葫芦素 B 的有机相滴入溶有稳定剂的水相时, 由于药物溶解度极速降低, 从而析出形成微小晶核, 在稳定剂作用下最终形成 NPs^[7]。PEG 化壳聚糖具有多效应稳定机制, 可增加体系黏度并提供空间阻力及电荷排斥力, 有效防止纳米粒聚集。另外 PEG 化壳聚糖对药物的增溶作用远低于泊洛沙姆 188、聚山梨酯 80 等表面活性剂, 有助于减弱 Ostwald 熟化过程^[17], 从而增加制剂稳定性。CuB-NPs 有效提高了葫芦素 B 的溶解度, 可能与药物粒度极大减小、比表面积急剧增大等因素有关^[9-10], 也为提高其溶出速率及溶出度、促进吸收奠定基础。

前期对冻干保护剂种类进行了筛选, 研究显示甘露醇制得的冻干粉复溶较慢, 样品不澄清; 海藻糖效果较佳, 但价格昂贵, 故最终选择乳糖作为冻干保护剂。CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 冻干粉稳定性高于 CuB-NPs (PVP K30) 冻干粉, 可能是由于前者 ζ 电位绝对值大于后者, PEG 化壳聚糖通过物理吸附、提供空间位阻及静电排斥力等多效应稳定机制来维持体系稳定性^[12]。PVP K30 在疏水性药物表面吸附能力较弱^[18], 进而使 CuB-NPs (PVP K30) 易发生粒径增大、溶解度下降等情况。由于 CuB-NPs (PVP K30) 冻干粉中 PVP K30 用量较大, 导致冻干粉易吸潮, 制剂中水分达到一定量可使葫芦素 B 发生降解^[19], 最终使其质量分数下降。

CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 的 $t_{\max}$ 显著性提前 ($P < 0.05$), 可能是由于 CuB-NPs 极大地提高了葫芦素 B 溶出速率有关, 缩短了入血时间; $C_{\max}$ 和口服吸收生物利用度得到显著性增大 ($P < 0.01$), 可能有几方面原因^[11,20-21]: CuB-NPs 极大地增加了葫芦素 B 溶解度和溶出度, 解决了吸收瓶颈; 纳米药物具有极大的比表面积, 可与胃肠道充分接触, 有利于药物充分吸收; PEG 化壳聚糖抑制了葫芦素 B 外排作用^[13-14], 有利于增加吸收; 壳聚糖本身也具有促吸收作用^[22-23]。CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 在加速条件下储存 6 个月后仍具有显著促吸收作用, 且显著高于同条件储存的 CuB-NPs (PVP K30), 可能是 CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 具有较高的稳定性, 有利于发挥纳米制剂高效吸收机制^[21-22]; PEG 化壳聚糖辅料本身可有效抑制 P-糖蛋白对葫芦素 B 的外排作用, 增加体内吸收。通过与 CuB-NPs (PVP

K30) 对比可知, CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 贮存稳定性更高、促吸收作用更稳定可靠, 因而成药性更佳, 说明采用 PEG 化壳聚糖作为 NPs 稳定剂比 PVP K30 更具优势。

综上, 采用 PEG 化壳聚糖为稳定剂制备 CuB-NPs 可极大地减少稳定剂用量, 其冻干粉储存稳定性良好, 加速条件下储存 6 个月后仍具有显著的促吸收作用, 因而更具有研究、推广价值。本实验为 NPs 研究提供了有价值的参考资料, 后续将对该制剂毒理学、药效学等进行研究, 以便继续完善 CuB-NPs (PEG 化壳聚糖) 研究资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宫辰, 杨冰, 周钰通, 等. 葫芦素抗肿瘤作用及其机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(2): 452-461.
- [2] 付康. 葫芦素 B 和纤细薯蓣皂苷对癌细胞的抑制活性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2020.
- [3] 昌友权. 葫芦素 B 的保肝作用及其机制的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2006.
- [4] 万露, 肖云芝, 程玲, 等. 葫芦素 B 磷脂复合物制备、表征及体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(1): 48-54.
- [5] 郭梦鸿, 孙玉琦, 刘影, 等. 外翻肠囊法研究姜黄素促进葫芦素 B 肠段吸收作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(4): 281-285.
- [6] 肖娅. 葫芦素 B 固体分散体的制备及大鼠体内药代动力学研究 [D]. 承德: 承德医学院, 2018.
- [7] 方宁. 葫芦素 B-聚乳酸-羟基乙酸共聚物载药纳米粒的构建与药效学评价 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1557-1562.
- [8] 李茜, 张文周, 郝海军. 橙皮苷磷脂复合物纳米混悬剂的制备、表征及口服药动学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(24): 7740-7750.
- [9] 秦芳芳, 彭有梅, 苏海波, 等. 鞣花酸纳米混悬剂的制备、表征及其体内药动学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(13): 3980-3990.
- [10] 王柯静, 决利利, 常宝珠, 等. 柠檬苦素纳米混悬剂和冻干粉的制备及体外评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(13): 1471-1478.
- [11] 陈永顺, 李静, 蒋建平, 等. 叶黄素纳米混悬剂制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(10): 3180-3186.
- [12] 周愉淇. 多效应稳定剂构筑延胡索乙素纳米混悬剂的研究 [D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2017.
- [13] 谢青璇, 李小芳, 谢龙, 等. Box-Behnken 效应面法优化大黄素/小檗碱-壳聚糖双载药纳米粒的处方工艺研

- 究 [J]. 中草药, 2021, 52(6): 1614-1622.
- [14] Zhao M J, Lee S H, Song J G, *et al.* Enhanced oral absorption of sorafenib via the layer-by-layer deposition of a pH-sensitive polymer and glycol chitosan on the liposome [J]. *Int J Pharm*, 2018, 544(1): 14-20.
- [15] 张军. 基于微流控技术制备姜黄素纳米晶及其口服生物利用度研究 [D]. 大理: 大理大学, 2022.
- [16] Liu Y Y, Wang Y C, Zhao J. Design, optimization and *in vitro-in vivo* evaluation of smart nanocaged carrier delivery of multifunctional PEG-chitosan stabilized silybin nanocrystals [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 124: 667-680.
- [17] 黄雅菲, 俞平. 依折麦布纳米口崩片的制备与质量评价 [J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(8): 906-912.
- [18] 吕亚男, 王琳琳, 綦玉洁, 等. 稳定剂对不同药物纳米混悬剂性质的影响 [J]. 烟台大学学报: 自然科学与工程版, 2022, 35(4): 421-427.
- [19] 么焕开, 刘鲁, 王菊, 等. 葫芦素的研究概况 [J]. 齐鲁药事, 2005, 24(12): 737-739.
- [20] 毛艳婷, 陶兴茹, 张胜男, 等. 漆黄素纳米混悬剂和冻干粉末的制备及体外评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(4): 393-398.
- [21] 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.
- [22] 刘万路. 牛血清白蛋白/壳聚糖双层包覆染料木素脂质体的制备、表征和口服药动学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(24): 8018-8030.
- [23] 谭涛, 王梦洋, 陈承瑜, 等. 携 siRNA 的丙交酯乙交酯共聚物-壳聚糖纳米载体的制备与表征 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(8): 1558-1565.

[责任编辑 郑礼胜]