

基于分子模拟的黄芩苷/多糖复合物载体筛选及其制备和评价

陈怡健¹, 程晓敬¹, 邓琬亭¹, 胡巧红^{1,2*}

1. 广东药科大学药学院, 广东 广州 510006

2. 广东药科大学广东省药物新剂型重点实验室和广东省局部精准药物递药制剂工程技术研究中心, 广东 广州 510006

摘要: 目的 结合分子模拟和增溶实验筛选黄芩苷/多糖复合物的最适载体, 制备黄芩苷/透明质酸复合物 (baicalin/hyaluronic acid complex, Bai/HA Co), 以提高黄芩苷的水溶性、溶出度及生物利用度, 并探讨其增溶机制。方法 通过分子对接和分子模拟计算黄芩苷与不同多糖 (葡萄糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸) 的结合自由能, 并考察不同多糖对黄芩苷的增溶作用, 筛选出增溶效果最好的多糖。采用加热搅拌结合冷冻干燥法制备 Bai/HA Co, 以黄芩苷增溶倍数和载药量为指标, 通过单因素实验结合 Box-Behnken 设计-响应面法优化复合物的处方及工艺, 对其体外溶出和体内药动学进行研究, 并应用傅里叶变换红外光谱法 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)、差示扫描量热法 (differential scanning calorimeter, DSC)、粉末 X 射线衍射法 (powder X-ray diffraction, PXRD)、分子动力学 (molecular dynamics, MD) 模拟研究复合物中黄芩苷的存在状态及与透明质酸的相互作用, 探讨 Bai/HA Co 的增溶机制。结果 分子模拟和增溶实验结果表明, 透明质酸能更好地改善黄芩苷的水溶性, 增溶效果较好。透明质酸质量浓度和加热温度对 Bai/HA Co 的增溶倍数和载药量影响较大, 优化得到的处方工艺为透明质酸质量浓度 2 mg/mL、水浴加热温度 65 °C、搅拌速度 900 r/min、搅拌时间 1 h。制得的 Bai/HA Co 使增溶倍数达到 23.37 倍, 载药量为 17.09%。Bai/HA Co 能明显增加黄芩苷在 pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液和去离子水中的溶出度, 提高黄芩苷的生物利用度。FT-IR、DSC、PXRD 和 MD 模拟结果表明, 复合物中黄芩苷与透明质酸产生氢键相互作用使得黄芩苷能够以非结晶状态分散在透明质酸分子链中。结论 分子模拟结合增溶实验, 为复合物载体多糖的筛选提供了一种更加精准的方法, 加热搅拌结合冷冻干燥法制备的 Bai/HA Co 能够较好地改善黄芩苷的水溶性、溶出度和生物利用度。

关键词: 分子模拟; 黄芩苷; 多糖; 复合物; 增溶机制; 透明质酸; 水溶性; 溶出度; 生物利用度; Box-Behnken 设计-响应面法

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)19-6529-17

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.19.008

Carrier screening of baicalin / polysaccharide complex based on molecular simulation and its preparation and evaluation

CHEN Yijian¹, CHENG Xiaojing¹, DENG Wanting¹, HU Qiaohong^{1,2}

1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Advanced Drug Delivery Systems and Guangdong Provincial Engineering Center of Topical Precise Drug Delivery System, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To improve the water solubility, dissolution and bioavailability of baicalin and explore the solubilization mechanism, molecular simulation combined with a solubilization experiment was applied to screen the carrier material of baicalin/polysaccharide complex, and the baicalin/hyaluronic acid complex (Bai/HA Co) was prepared. **Methods** Firstly, the binding free energies of baicalin with different polysaccharides were calculated by molecular docking and simulation, and the solubilization effect of these polysaccharides on baicalin was evaluated by solubilization experiment to screen proper polysaccharide as carrier material of the complex. Secondly, Bai/HA Co was prepared by stirring under heating combined with the freeze-drying method. Using solubilization ratio of baicalin and drug loading as indicators, the process was optimized by single factor experiments combined with Box-Behnken design-response surface methodology. Thirdly, the *in vitro* dissolution of Bai/HA Co in different media and *in vivo*

收稿日期: 2024-02-01

作者简介: 陈怡健, 男, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型。E-mail: chen-yijian809@163.com

*通信作者: 胡巧红, 女, 教授, 研究方向为药物新剂型与新技术。E-mail: hu_qiaohong@163.com

pharmacokinetics in SD rats were investigated. Finally, the solubilization mechanism of Bai/HA Co was explored by Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR), differential scanning calorimetry (DSC), powder X-ray diffraction (PXRD) and molecular dynamics (MD) simulation. **Results** The results of molecular docking, molecular simulation and solubilization experiment showed that hyaluronic acid could improve the water solubility of baicalin and exhibited the best solubilization effect. The solubilization ratio and drug loading of Bai/HA Co were greatly affected by the heating temperature and the concentration of hyaluronic acid. The results showed that the optimal process for preparing Bai/HA Co was as follows: hyaluronic acid concentration of 2 mg/mL, heating temperature of 65 °C, stirring speed of 900 r/min and stirring time of 1 h. The Bai/HA Co prepared showed a great solubilization effect on baicalin, which was 23.37 times higher than that of baicalin, and its drug loading was 17.09%. The results of *in vitro* dissolution indicated that Bai/HA Co could significantly improve the dissolution of baicalin in pH 1.2, 4.5 media and deionized water, and the bioavailability of baicalin. The results of FT-IR, DSC, PXRD and MD simulations revealed that the H-bond interaction between baicalin and hyaluronic acid enabled baicalin to disperse into the hyaluronic acid molecular chain in an amorphous state. **Conclusion** Molecular simulation combined with solubilization experiment provides a more accurate method for screening polysaccharides as carrier materials for complex. The Bai/HA Co prepared by the method of stirring under heating combined with freeze-drying can improve the water solubility, dissolution of baicalin and bioavailability of baicalin.

Key words: molecular simulation; baicalin; polysaccharides; complex; solubilization mechanism; hyaluronic acid; water solubility; dissolution rate; bioavailability; Box-Behnken design-response surface methodology

据统计,目前上市的药品中有超过 40%是难溶性药物^[1]。近年来随着新化学实体的不断开发,难溶性药物的比例不断上升,因此,提高难溶性药物的溶解度和溶出速度一直是药剂学的研究热点之一。但目前的药物制剂研发通常仍采用传统的实验方法,研发耗时且费用高。随着计算机技术的飞速发展,将其引入药剂学领域已成为药物制剂研发的新范式,并且展现出巨大的潜力。研究表明,通过应用分子对接和分子动力学模拟,计算药物和载体之间的非共价键相互作用,能够很好地预测载体对药物的增溶能力和增溶机制^[2]。Andreas 等^[3]通过分子模拟评估塞来昔布和羟丙纤维素之间的潜在相互作用,揭示了药物-药物和药物-聚合物之间的相互竞争关系以及形成药物-聚合物超分子结构是增溶的主要机制。目前,分子模拟方法已成为现代药物发现和制剂研究的重要工具。

黄芩是双子叶唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,是一种传统中药,最早在《神农本草经》中有记载,中医常用于清热燥湿、泻火解毒、止血安胎^[4]。黄芩苷是黄芩的主要活性成分之一,毒性低,具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗菌和抗病毒等多种作用^[5],临床上被广泛应用。但是,黄芩苷水中溶性差,导致口服生物利用度低^[5-6],进而影响疗效,限制了它的应用,因此,开发可提高溶解度和生物利用度的黄芩苷新制剂具有重要意义。

目前,用于改善难溶性药物溶解度和溶出速度的制剂技术众多,包括微粉化、胶束增溶、包合技

术、纳米化、固体分散技术等。作为药剂学中广泛应用的辅料,聚合物在难溶性药物增溶方面也有较多的应用,常用的有羟丙甲纤维素、聚维酮、聚乙二醇和泊洛沙姆 188 等^[7-9]。天然多糖因来源广泛、生物相容性和可降解性良好^[10-11],在药用辅料中有广泛应用,近年来在改善难溶性药物溶解度和溶出度方面的研究报道越来越多^[12-13]。黄芪多糖可显著提高黄酮类化合物的溶解度和稳定性^[14]。醋柴胡多糖也显现出较好的增溶效果^[15]。有研究考察了 10 种多糖对淫羊藿黄酮低糖苷组分的溶解性的影响,发现三七粗多糖的增溶作用最好^[16]。可见不同天然多糖对难溶性药物的增溶能力存在较大差异。多糖类药用辅料种类众多,如果胶、纤维素衍生物、淀粉及其衍生物、葡聚糖、黄原胶、透明质酸等^[17]。为获得增溶效果最佳的载体多糖,通常需要从众多多糖中进行筛选,费时且昂贵,同时不同的多糖与药物相互结合的机制和能力不同,因此,通过模拟技术的应用将为载体精准快速的选择和机制研究提供一种新的方法。

本课题组以往开展了不同多糖对黄芩苷的增溶作用研究,发现不同多糖对黄芩苷的增溶效果存在明显差异。为了更进一步地从分子层面上研究多糖的增溶机制,本研究采用计算模拟与实验相结合的策略,为便于开展研究,选取结构单元较为单一、方便获取其单元结构模型以及具有代表性的 5 种多糖(葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸),利用分子对接和分子动力学模拟方法预测黄芩苷与 5 种天然多糖的相互作用能力,同时通过增溶

实验考察不同多糖(葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸)对黄芩苷的增溶作用,筛选出增溶效果较好的透明质酸作为载体,制备黄芩苷/透明质酸复合物(baicalin/hyaluronic acid complex, Bai/HA Co),并探讨透明质酸作为复合物载体在提高黄芩苷水溶性、溶出度和生物利用度方面的潜力,及其增溶机制。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司;AUW220D 型电子天平,日本岛津公司;DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限公司;DGJ-56T10NDP 型真空冷冻干燥机,北京赛欧华创科技有限公司;Ultima IV X 型射线粉末衍射仪,日本理学株式会社;DSC-4000 型差示扫描量热仪、Spectrum100 型傅里叶变换红外光谱仪,美国 PerkinElmer 股份有限公司;ZRS-8G 型智能溶出试验仪,天津市天大天发科技有限公司。

1.2 材料

黄芩苷原料药,批号 K2118268,质量分数 $\geq 95\%$,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;黄芩苷对照品(质量分数 98%,批号 D1204AS)、透明质酸(批号 M0504AA,平均相对分子质量 90 000)购自大连美仑生物技术有限公司;普鲁兰多糖(批号 Z1510X79740,平均相对分子质量 10 000)、菊糖(批号 J04AR577790,平均相对分子质量 2 000)购自上海源叶生物技术有限公司;黄原胶(批号 C10575246,平均相对分子质量 500~600 000)、葡聚糖(批号 C10629408,平均相对分子质量 500 000)和甲醇(色谱纯)购自上海麦克林生化科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

SD 大鼠 12 只,雄性,体质量(200 $\pm$ 20) g,购自南方医科大学实验动物中心,动物批号:44002100036205,生产许可证号:SCXK(粤)2021-0041,使用许可证号:SCXK(粤)2022-0125。所有动物实验遵循广东药科大学有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

2 方法和结果

2.1 黄芩苷含量测定^[18]

2.1.1 色谱条件 采用 HPLC 测定黄芩苷的含量。色谱柱为 Phenomenex C₁₈ 键合硅胶柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相为甲醇-2%冰醋酸水溶液

(50:50);体积流量 0.8 mL/min;检测波长 278 nm;柱温 25 $^{\circ}$ C;进样量 20 μ L。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取 10.00 mg 黄芩苷对照品于 25 mL 量瓶中,加入适量甲醇超声溶解后定容,得 400 μ g/mL 对照品储备液。分别吸取不同体积的对照品储备液,用甲醇稀释成 0.5、1.0、2.0、4.0、5.0、10.0、20.0、40.0、100.0、200.0 μ g/mL 的黄芩苷对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取黄芩苷/多糖(葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸)复合物 5.00 mg,置于 5 mL 量瓶中,加入甲醇溶解药物,定容,摇匀,15 000 r/min 离心(离心半径 8.2 cm)10 min 去除多糖,取上清液得供试品溶液。

2.1.4 专属性考察 称取适量黄芩苷对照品,加入甲醇超声溶解得黄芩苷对照液;分别称取适量葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸溶于水中得不同多糖溶液;分别取黄芩苷/多糖(葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸)供试品溶液;进样测定,黄芩苷、各多糖和黄芩苷/多糖复合物的 HPLC 图见图 1,黄芩苷出峰时间为 12.8 min,峰形良好,多糖对药物含量测定无干扰,黄芩苷含量测定方法专属性良好。

2.1.5 线性关系考察 取各质量浓度对照品溶液进样测定,记录峰面积,以峰面积为纵坐标(Y),对照品溶液质量浓度为横坐标(X)进行线性回归,得回归方程为 $Y=68.389X-11.044$, $R^2=0.9999$,结果表明黄芩苷在 0.5~200.0 μ g/mL 线性关系良好。

2.1.6 检测限和定量限 以黄芩苷峰面积与仪器噪音峰面积的比值等于 3 作为检测限,结果黄芩苷的检测限为 0.1 μ g/mL;以黄芩苷峰面积与仪器噪音峰面积的比值等于 10 作为定量限,结果黄芩苷的定量限为 0.2 μ g/mL。

2.1.7 精密度试验 分别吸取不同体积的对照品储备液,用甲醇稀释成 0.5、10.0、200.0 μ g/mL 的对照品溶液,1 d 内连续测定 3 次,连续测定 3 d,计算日内精密度和日间精密度,结果日内精密度 RSD 分别为 0.57%、0.55%、0.16%,日间精密度 RSD 分别为 1.77%、1.09%、0.82%,满足方法学要求。

2.1.8 稳定性试验 分别取黄芩苷/多糖(葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸)供试品溶液,于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定,记录峰面积。结果得黄芩苷/多糖(葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸)中黄芩苷峰面积的 RSD 分别为

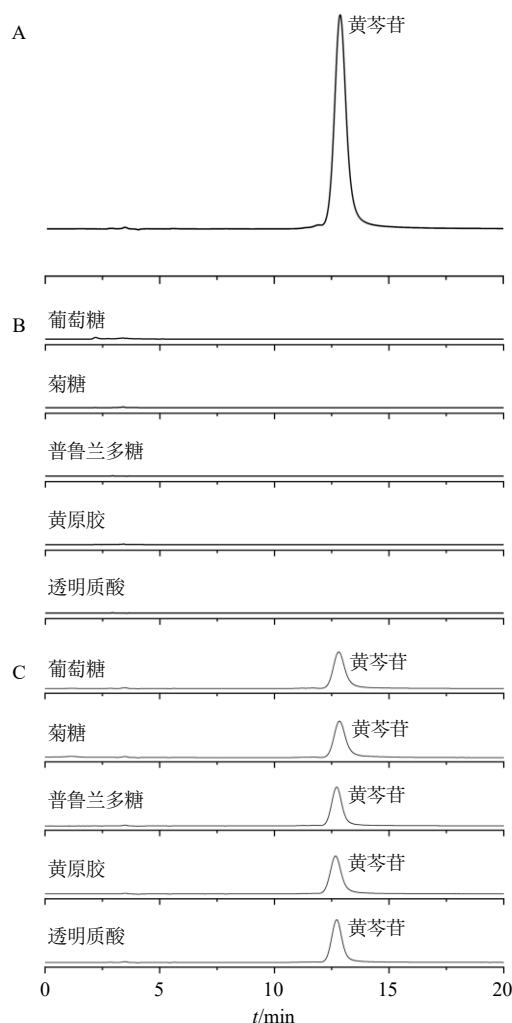


图 1 黄芩苷 (A)、多糖 (B)、黄芩苷/多糖复合物 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC diagram of baicalin (A), polysaccharide (B), baicalin/polysaccharide complex (C)

1.79%、1.18%、1.68%、1.64%、0.93%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好，满足方法学要求。

2.1.9 重复性试验 分别取黄芩苷/多糖（葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸）供试品溶液 6 份，进样测定，记录峰面积。结果得黄芩苷/多糖（葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸）中黄芩苷质量分数的 RSD 分别为 1.15%、0.86%、1.14%、0.96% 和 1.10%，表明该方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 分别取 1、20.0、400.0 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芩苷对照品溶液 500 μL ，加入 2 mg/mL 的葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸溶液至 1 mL，配制成质量浓度为 0.5、10.0、200.0 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液，每个质量浓度平行 3 份，进样测定，记录峰面积，计算平均加样回收率，结果见表 1，满足方法学要求。

2.2 Bai/HA Co 载体多糖的筛选

2.2.1 黄芩苷与多糖相互作用的分子模拟

(1) 分子对接：黄芩苷 (ID 64982) 和多糖 [葡聚糖 (ID 90478052)、菊糖 (ID 132932783)、普鲁兰多糖 (ID 481110437)、黄原胶 (ID 405234467)、透明质酸 (ID 453618)] 的结构均从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载获得，通过 MarvinSketch 23.8 软件以 Dreiding 力场对其进行结构优化获得对接初始结构。通过 AutoDock Tools^[19] 软件包，对上述分子结构进行加氢和电荷计算，将黄芩苷设定为配体，其可旋转单键等均为程序默认值，多糖分子为受体，均保存为 pdbqt 文件用于分子对接。使用 AutoDock Vina 程序^[20]，采用半柔性

表 1 加样回收率考察结果 ($n = 3$)

Table 1 Results of investigation of sample recovery rate ($n = 3$)

黄芩苷质量浓度/($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均加样回收率/%					RSD/%				
	葡聚糖	菊糖	普鲁兰多糖	黄原胶	透明质酸	葡聚糖	菊糖	普鲁兰多糖	黄原胶	透明质酸
0.5	100.92	99.07	99.17	99.75	101.51	0.60	0.74	1.14	1.68	0.83
10.0	100.83	100.13	101.02	100.16	99.66	0.66	0.21	0.33	0.40	0.83
200.0	99.97	99.87	99.96	100.68	100.71	0.52	0.21	0.44	0.22	0.35

对接方法，以多糖分子的几何中心为约束盒子中心，在 $6.0 \text{ nm} \times 6.0 \text{ nm} \times 6.0 \text{ nm}$ 大小的约束盒子中将黄芩苷与上述多糖分子进行对接，并计算对接自由能 ($\Delta G_{\text{对接}}$)。不同多糖和黄芩苷分子对接后的结果见图 2，计算得到的最低 $\Delta G_{\text{对接}}$ 见表 2。

(2) 分子动力学模拟：分别将上述能量最低的对接结果导出，使用 OpenBabel 软件改为 mol2 格式文件，使用 Sobotop^[21] 程序处理 mol2 文件并计算 MMFF94 分子电荷，导出为 Gromacs^[22] 软件可用的文件格式。采用 Gromacs 软件，使用用于液体模拟的全原子优化势能 (optimized potentials for liquid simulations all-atom, OPLS-AA) 力场，进行分子动力学模拟，首先将体系置于 spc216 水模型的立方体水盒中，盒子边界距体系 1.0 nm，添加 0.1 mol/L 的

式文件，使用 Sobotop^[21] 程序处理 mol2 文件并计算 MMFF94 分子电荷，导出为 Gromacs^[22] 软件可用的文件格式。采用 Gromacs 软件，使用用于液体模拟的全原子优化势能 (optimized potentials for liquid simulations all-atom, OPLS-AA) 力场，进行分子动力学模拟，首先将体系置于 spc216 水模型的立方体水盒中，盒子边界距体系 1.0 nm，添加 0.1 mol/L 的

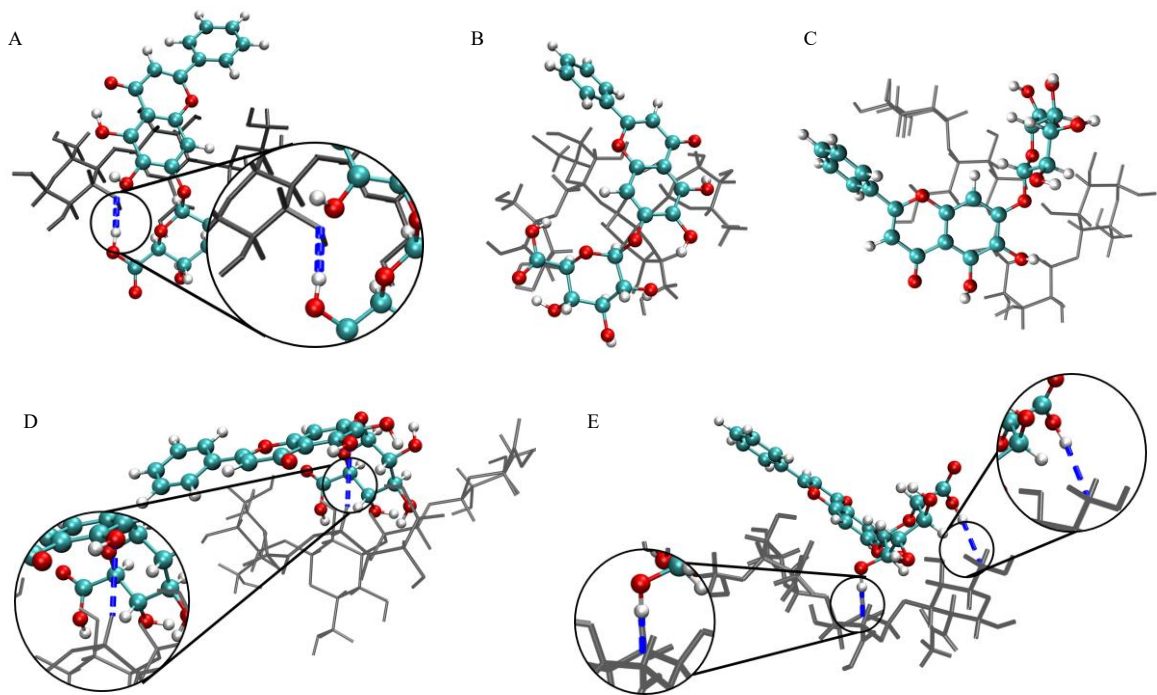


图 2 黄芩苷与葡聚糖 (A)、菊糖 (B)、普鲁兰多糖 (C)、黄原胶 (D) 和透明质酸 (E) 的分子对接图

Fig. 2 Docking diagrams of baicalin with dextran (A), inulin (B), pullulan (C), xanthan gum (D) and hyaluronic acid (E)

表 2 分子模拟和增溶作用结果

Table 2 Results of molecular simulation and solubilization

多糖	最低 $\Delta G_{\text{对接}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	$\Delta G_{\text{结合}}$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	增溶倍数
葡聚糖	-3.9	-4.22	1.14
菊糖	-4.6	-6.09	1.18
普鲁兰多糖	-4.8	-5.38	3.53
黄原胶	-5.5	-6.14	7.01
透明质酸	-5.1	-10.42	11.80

NaCl 平衡离子,接着进行体系能量最小化过程,在 NVT 系综下运行 0.25 ns 以达到设定温度和松弛体系,之后采用 NPT 系综、温度为 298 K、压力为 100.0 kPa,温度控制采用 V-rescale 方法,压力控制采用 Parrinello-Rahman 方法,步长为 2 fs,运行 20 ns 的分子动力学模拟。最后使用 gmx_MMPBSA 软件对模拟结果进行分析,分别计算黄芩苷与不同多糖之间的结合自由能。均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD) 分析结果见图 3,黄芩苷均方根波动 (root mean square fluctuation, RMSF) 结果见图 4,分子动力学模拟结合自由能结果见表 2。

2.2.2 不同多糖对黄芩苷的增溶作用 分别取 2 mg/mL 的多糖 (葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶、透明质酸) 水溶液 4 mL,加入 2 mg 黄芩苷,

在 75 °C 的水浴中加热 30 min,取出后涡旋 30 s,冷却至室温,4 000 r/min 离心 (离心半径 8.2 cm) 10 min,去除未溶解药物,将上清液过 0.45 μm 微孔滤膜。取 200 μL 滤液加入 800 μL 甲醇,涡旋 30 s,放置 10 min,15 000 r/min 离心 (离心半径 8.2 cm) 10 min,取上清液以 HPLC 法测定黄芩苷质量浓度,同法测定黄芩苷在蒸馏水中的质量浓度作为对照,计算增溶倍数,结果见表 2。

如图 2 所示,黄芩苷与葡聚糖、菊糖、普鲁兰多糖、黄原胶 4 种多糖分子之间的氢键个数在 0~1,与透明质酸分子之间能够形成 2 个氢键,分别位于其羟基和酮羰基上,氢键的相互作用较为稳定,同时,位于黄芩苷分子两端的氢键也能够更有效地固定住黄芩苷和透明质酸,结合增溶能力的不同,因此,黄芩苷与透明质酸之间的结合能大于其他 4 个多糖分子。

RMSD 常用来表明该模拟是否达到平衡,从图 3 可见,黄芩苷与 5 种多糖的 RMSD 值一直在一个较小的范围内波动,在模拟结束时也达到了一个较为稳定的状态,说明模拟时间已经足够长。黄芩苷与透明质酸的 RMSD 波动幅度明显小于其他 4 种多糖,黄芩苷与透明质酸在分子动力学模拟过程中的位置相对于最初的复合物结构并未发生较大改变,说明黄芩苷与透明质酸的体系更加稳定。黄芩

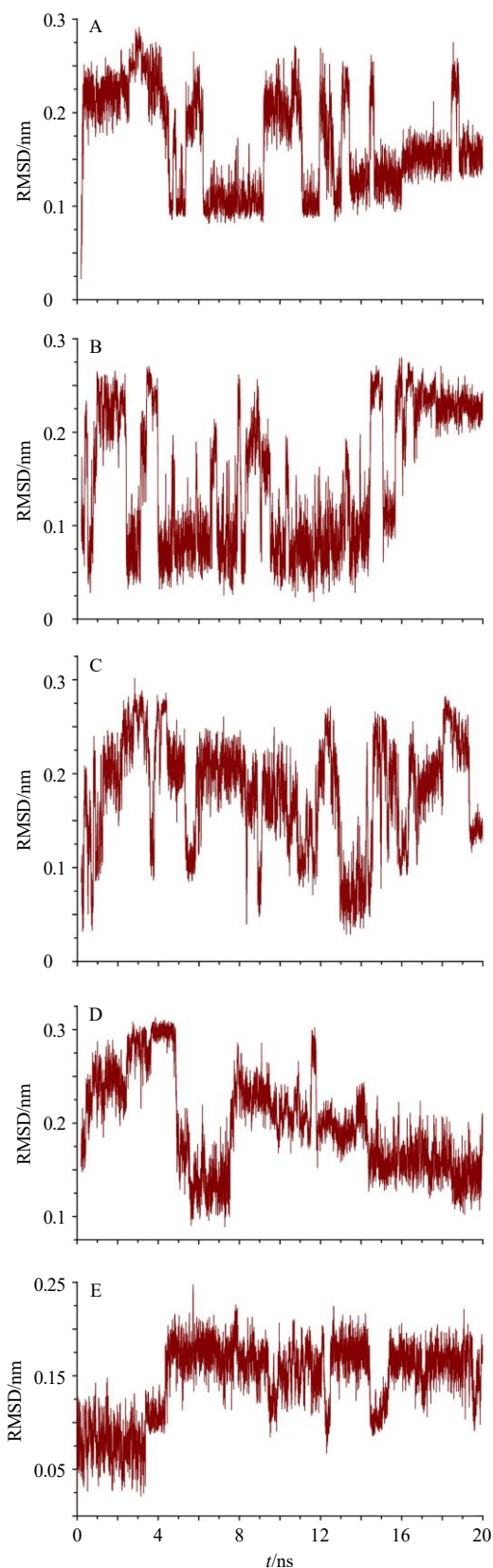


图 3 黄芩苷在葡聚糖 (A)、菊糖 (B)、普鲁兰多糖 (C)、黄原胶 (D) 和透明质酸 (E) 中的 RMSD 图

Fig. 3 RMSD of baicalin in dextran (A), inulin (B), pullulan (C), xanthan gum (D) and hyaluronic acid (E)

苷的 RMSF 图 (图 4) 可显示黄芩苷各个原子的位置变化情况, 5 种多糖中, 第 13~28 个原子的波动均比较小, 波动较大的原子集中在第 5~12 个和第 32~40 个, 这些原子多数为氢氧原子, 作为氢键的供体和受体, 更加容易与多糖分子形成氢键, 当黄芩苷与透明质酸相互作用时, 其对应原子的 RMSF 值显著降低, 说明黄芩苷与透明质酸之间形成的氢键更加稳定, 结合 RMSD 值, 可以推出黄芩苷与透明质酸之间更容易形成稳定的复合物。

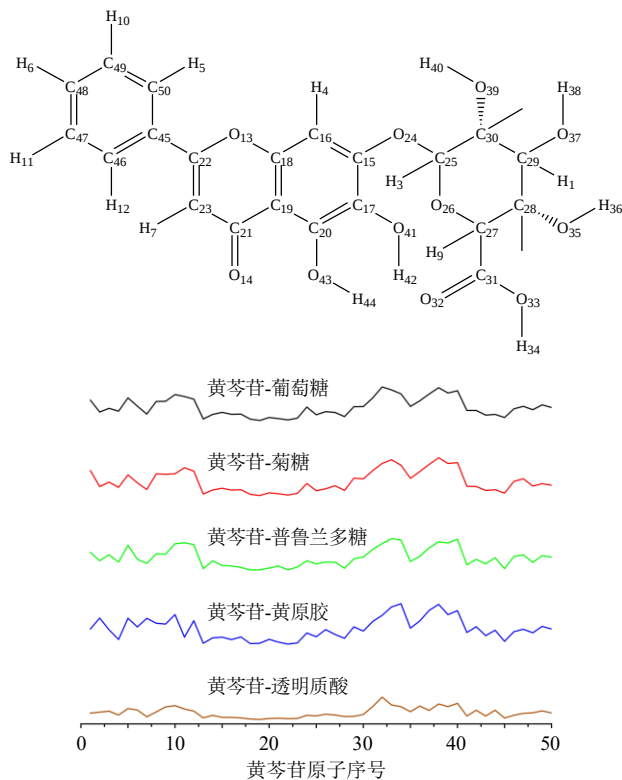


图 4 黄芩苷原子序号和在不同多糖中的 RMSF 图

Fig. 4 RMSF of baicalin atomic number in different polysaccharides

分子模拟计算的结合能结果和增溶实验的结果基本一致, 虽然同种多糖在不同相对分子质量下对药物的增溶能力可能会有一定程度的差异, 但所选多糖均为结构单元明确的均一多糖, 通过对多糖结构单元进行拟合的结果能够一定程度上反映出不同多糖的增溶效果差异。结果表明, 随着对接和结合自由能 ($\Delta G_{\text{对接}}$ 和 $\Delta G_{\text{结合}}$) 绝对值的增加, 多糖对黄芩苷的增溶效果越好。通过上述 RMSD、RMSF 的分析和 ΔG 的计算, 结合增溶实验的结果可知, 透明质酸对黄芩苷的结合能力和增溶能力均好于其他 4 种多糖, 因此, 选择透明质酸为黄芩苷/多糖复合物载体。

2.3 Bai/HA Co 的制备及处方工艺优化

2.3.1 Bai/HA Co 制备 取适量透明质酸溶于蒸馏水，配成一定质量浓度的透明质酸溶液。取该溶液 4 mL，加入 2 mg 黄芩苷，在一定温度水浴中以一定速度搅拌一定时间，取出后冷却至室温，4 000 r/min 离心（离心半径 8.2 cm）10 min 去除未溶解药物，上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，取滤液冷冻干燥，即得 Bai/HA Co。

2.3.2 Bai/HA Co 的载药量测定 精密称取 5 mg Bai/HA Co，置于 5 mL 量瓶中，加入甲醇溶解药物，定容，摇匀，15 000 r/min 离心（离心半径 8.2 cm）10 min 去除透明质酸，取上清液适当稀释后，以 HPLC 法测定黄芩苷质量浓度，按下式计算载药量。

载药量=复合物中药物的质量/复合物的总质量

2.3.3 单因素实验考察 Bai/HA Co 处方工艺 以增溶倍数和载药量为指标，分别考察透明质酸质量浓度（0.8~5.0 mg/mL，A）、加热温度（40~80 ℃，B）、搅拌速度（650~1 050 r/min，C）和搅拌时间（0.5~2.5 h，D）对 Bai/HA Co 处方工艺的影响，结果见表 3~6。透明质酸质量浓度、加热温度对增溶倍数和载药量均有明显影响。随着透明质酸质量浓

表 3 透明质酸质量浓度对 Bai/HA Co 增溶倍数和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of hyaluronic acid mass concentration on solubilization ratio and drug loading of Bai/HA Co ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

透明质酸/(mg·mL ⁻¹)	增溶倍数	载药量/%
0.8	15.38±0.37	22.56±0.55
1.0	18.37±0.28	22.78±0.35
2.0	19.35±0.23	13.89±0.17
3.0	21.04±0.07	9.17±0.03
4.0	23.93±0.79	7.59±0.25
5.0	29.05±0.09	7.81±0.02

表 4 加热温度对 Bai/HA Co 增溶倍数和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of heating temperature on solubilization ratio and drug loading of Bai/HA Co ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

加热温度/℃	增溶倍数	载药量/%
40	8.90±0.19	12.71±0.27
50	11.04±0.15	15.14±0.20
60	15.03±0.18	19.52±0.23
70	14.61±0.07	19.83±0.09
80	14.22±0.08	17.63±0.10

表 5 搅拌速度对 Bai/HA Co 增溶倍数和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of stirring speed on solubilization ratio and drug loading of Bai/HA Co ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌速度/(r·min ⁻¹)	增溶倍数	载药量/%
450	18.52±0.17	20.17±0.15
650	18.44±0.12	20.09±0.11
850	19.35±0.23	20.88±0.20
1 050	17.07±0.27	18.88±0.25
1 250	15.60±0.17	17.54±0.15

表 6 搅拌时间对 Bai/HA Co 增溶倍数和载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of stirring time on solubilization ratio and drug loading of Bai/HA Co ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌时间/h	增溶倍数	载药量/%
0.5	14.31±0.71	19.52±0.97
1.0	17.51±0.15	23.88±0.21
1.5	16.70±0.11	22.77±0.15
2.0	15.16±0.01	20.68±0.01
2.5	14.70±0.12	20.05±0.16

度增大，增溶倍数增大，但载药量却减低。随着加热温度升高，增溶倍数和载药量均呈现先增大后减小的现象。而搅拌速度和搅拌时间对增溶倍数和载药量的影响不如透明质酸质量浓度和加热温度明显。随着搅拌速度、搅拌时间增加，增溶倍数和载药量均呈现先逐渐增大后减小的现象。搅拌时间为 1 h 时，增溶倍数达到最大值 17.51 倍，载药量也最大，为 23.88%。考虑到搅拌时间对增溶倍数和载药量没有明显影响，且搅拌时间过长会影响复合物的结构稳定性，因此后续实验中搅拌时间固定为 1 h。

2.3.4 Box-Behnken 设计-响应面法（Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM）考察 Bai/HA Co 处方工艺 采用 BBD-RSM（Design-Expert 13 软件）对 Bai/HA Co 的处方工艺进行优化。以透明质酸质量浓度（X₁）、加热温度（X₂）、搅拌速度（X₃）为自变量，增溶倍数和载药量为响应值，3 个变量的因素水平、BBD-RSM 实验设计及结果见表 7。

通过方差分析，对实验数据进行多元二次回归模型拟合，拟合结果见表 8。增溶倍数为响应值时模型的 P 值为 0.000 2，载药量为响应值时模型的 P 值小于 0.000 1，其中 X₁ 的 P 值在 2 个表中均小于 0.000 1，说明透明质酸浓度对增溶倍数和载药量的

表 7 BBD-RSM 实验设计与结果
Table 7 Design and results of BBD-RSM

试验号	$X_1/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_2/^{\circ}\text{C}$	$X_3/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	增溶倍数	载药量/%	试验号	$X_1/(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	$X_2/^{\circ}\text{C}$	$X_3/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	增溶倍数	载药量/%
1	5.00 (+1)	60 (0)	650 (-1)	28.75	7.48	10	0.50	40	850	14.52	28.15
2	2.75 (0)	60	850 (0)	27.34	12.25	11	2.75	60	850	28.12	12.13
3	2.75	60	850	25.29	11.71	12	2.75	60	850	26.58	11.20
4	0.50 (-1)	60	650	16.46	32.85	13	0.50	80	850	15.88	35.7
5	5.00	60	1 050 (+1)	28.87	7.34	14	5.00	80	850	31.37	8.17
6	0.50	60	1 050	17.57	33.60	15	2.75	40	650	26.42	11.33
7	2.75	40 (-1)	1 050	22.08	10.36	16	2.75	60	850	27.43	13.55
8	5.00	40	850	28.06	7.19	17	2.75	80	650	18.90	8.94
9	2.75	80 (+1)	1 050	24.72	11.47						

表 8 方差分析结果
Table 8 Results of variance analysis

来源	增溶倍数					载药量				
	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	407.86	9	45.32	23.93	0.000 20	1 595.68	9	177.30	75.46	<0.000 10
X_1	320.30	1	320.30	169.13	<0.000 10	1 253.13	1	1 253.13	533.31	<0.000 10
X_2	0.61	1	0.61	0.32	0.59	6.58	1	6.58	2.80	0.14
X_3	0.92	1	0.92	0.48	0.51	0.59	1	0.59	0.25	0.63
X_1X_2	3.90	1	3.90	2.06	0.19	10.77	1	10.77	4.59	0.070
X_1X_3	0.24	1	0.24	0.13	0.73	0.20	1	0.20	0.08	0.78
X_2X_3	25.81	1	25.81	13.63	0.000 77	3.06	1	3.06	1.30	0.29
X_1^2	17.80	1	17.80	9.40	0.018	319.64	1	319.64	136.03	<0.000 10
X_2^2	15.82	1	15.82	8.36	0.023	4.91	1	4.91	2.09	0.19
X_3^2	16.57	1	16.57	8.75	0.021	1.34	1	1.34	0.57	0.48
残差	13.26	7	1.89			16.45	7	2.35		
失拟项	8.61	3	2.87	2.47	0.20	13.38	3	4.46	5.82	0.061
纯误差	4.64	4	1.16			3.06	4	0.77		
总差	421.12	16				1 612.13	16			

影响最显著。其中拟合缺失的 P 值分别为 0.201 2 和 0.060 9, 因此模型得到的数据与实验数据拟合良好。两者的拟合方程分别为增溶倍数 $=26.950+6.330 X_1-0.276 2 X_2+0.338 7 X_3+0.987 5 X_1X_2-0.247 5 X_1X_3+2.540 X_2X_3-2.060 X_1^2-1.940 X_2^2-1.980 X_3^2$, $R^2=0.97$, $R_{\text{adj}}^2=0.93$, 变异系数 (CV) $=5.70\%$; 载药量 $=-12.520 X_1+0.906 9 X_2+0.271 2 X_3-1.640 X_1X_2-0.222 5 X_1X_3+0.875 X_2X_3+8.710 X_1^2-1.080 X_2^2-0.563 4 X_3^2$, $R^2=0.99$, $R_{\text{adj}}^2=0.98$, CV $=9.89\%$ 。

依据拟合的数学模型, 分别绘制两两因素对评价指标的三维效应面图(图 5)。根据最终预测结果, 并结合实际情况, 确定处方工艺: 透明质酸质量浓度 2 mg/mL、加热温度 65 $^{\circ}\text{C}$ 、搅拌速度 900 r/min。

2.3.5 优化处方工艺验证 根据优化的处方工艺制备 3 批 Bai/HA Co, 对优化处方工艺进行验证。优化后处方工艺预测的增溶倍数为 24.48 倍、载药量为 17.71%。3 批样品测得的增溶倍数为 23.37 倍、载药量为 17.09%, 与模型预测的相对误差分别为 4.52% 和 3.50%, 说明通过响应面法进行的处方工艺优化和预测的处方工艺参数是准确可靠的。因此, 最终确定制备 Bai/HA Co 的处方工艺为透明质酸质量浓度 2 mg/mL、水浴加热温度 65 $^{\circ}\text{C}$ 、搅拌速度 900 r/min、搅拌时间 1 h。

2.4 Bai/HA Co 的体外溶出研究

2.4.1 不同溶出介质中黄芩苷质量浓度测定方法
(1) 色谱条件: 按“2.1.1”项下色谱条件, 测

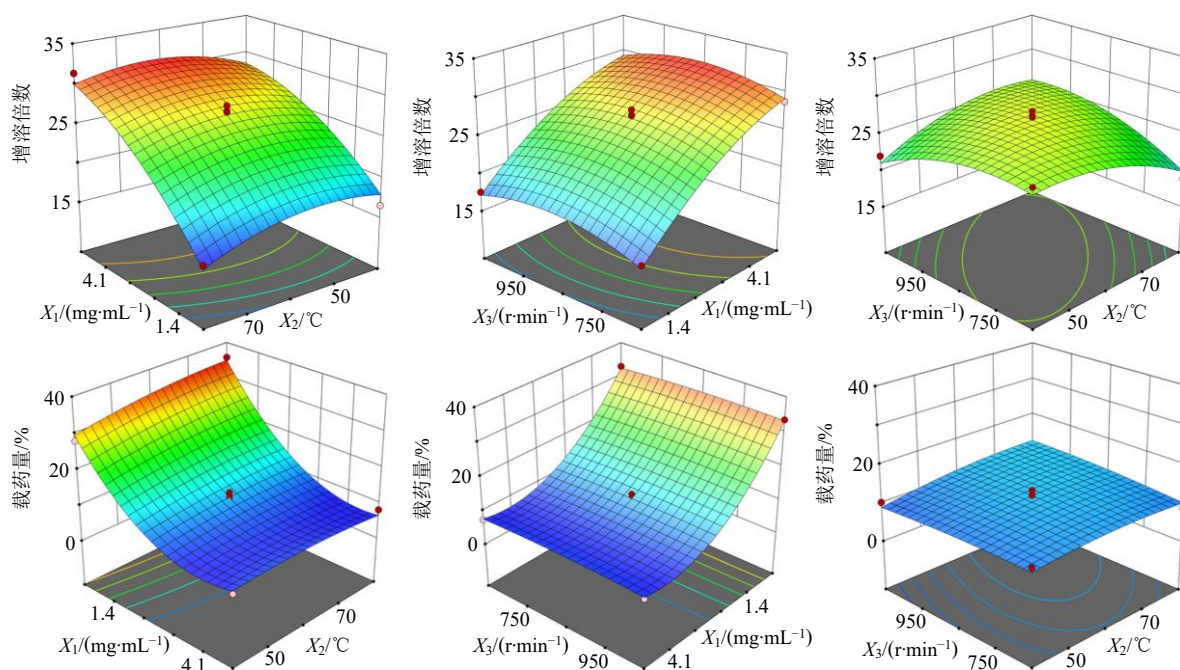


图 5 各因素对增溶倍数和载药量影响的响应面图

Fig. 5 Response surface diagrams of effect of factors on solubilization ratio and drug loading

定体外溶出样品中黄芩苷质量浓度。

(2) 对照品溶液的制备：分别精密称取 2.00 mg 黄芩苷对照品于 50 mL 量瓶中，加入少量乙醇溶解后分别以去离子水、pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (PBS) 定容，得 40 $\mu\text{g/mL}$ 黄芩苷对照品储备液。吸取不同体积的对照品储备液，分别用去离子水、pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 PBS 稀释成 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的不同溶出介质的黄芩苷对照品溶液。

(3) 供试品溶液的制备：取黄芩苷/透明质酸复合物 5.00 mg，置于 50 mL 量瓶中，分别用去离子水、pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 PBS 溶解药物，定容得供试品溶液。

(4) 专属性考察：分别称取适量黄芩苷对照品，加入少量乙醇溶解后以去离子水、pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 PBS 稀释，制备不同溶出介质的黄芩苷对照液；称取适量透明质酸，分别溶于去离子水、pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 PBS 中得不同溶出介质的透明质酸溶液；称取适量 Bai/HA Co，分别用去离子水、pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 PBS 溶解，得复合物样品液；进样测定，记录色谱图。不同溶出介质中各样品的 HPLC 图见图 6。去离子水、pH 1.2 盐酸液、pH 6.8 PBS 中黄芩苷出峰时间

均为 12.8 min，pH 4.5 醋酸盐缓冲液中黄芩苷出峰时间为 13.3 min，峰形均良好，透明质酸对黄芩苷测定无干扰，方法专属性良好。

(5) 线性关系考察：分别取不同介质的不同质量浓度对照品溶液进样测定，记录峰面积，以峰面积为纵坐标 (Y)，对照品溶液质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程：去离子水中的标准曲线方程为 $Y=90.043X-39.941$ ， $R^2=0.9997$ ，pH 1.2 盐酸液中的标准曲线方程为 $Y=61.516X-20.23$ ， $R^2=0.9991$ ，pH 4.5 醋酸盐缓冲液中的标准曲线方程为 $Y=77.872X+8.3554$ ， $R^2=0.9994$ ，pH 6.8 PBS 中的标准曲线方程为 $Y=80.174X-33.964$ ， $R^2=0.9990$ ，结果表明黄芩苷在 0.5~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系均良好。

(6) 检测限和定量限：以黄芩苷峰面积与仪器噪音峰面积的比值等于 3 作为检测限，结果在不同溶出介质中黄芩苷的检测限均为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ；以黄芩苷峰面积与仪器噪音峰面积的比值等于 10 作为定量限，结果在不同溶出介质中黄芩苷的定量限均为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

(7) 精密性试验：分别吸取各溶出介质的黄芩苷对照品储备液，用对应的溶出介质稀释成 0.5、5.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芩苷对照品溶液，1 d 内连续测定 3 次，连续测定 3 d，计算日内精密度和日间精密性。结果去离子水中，低、中、高质量浓度黄芩苷对照

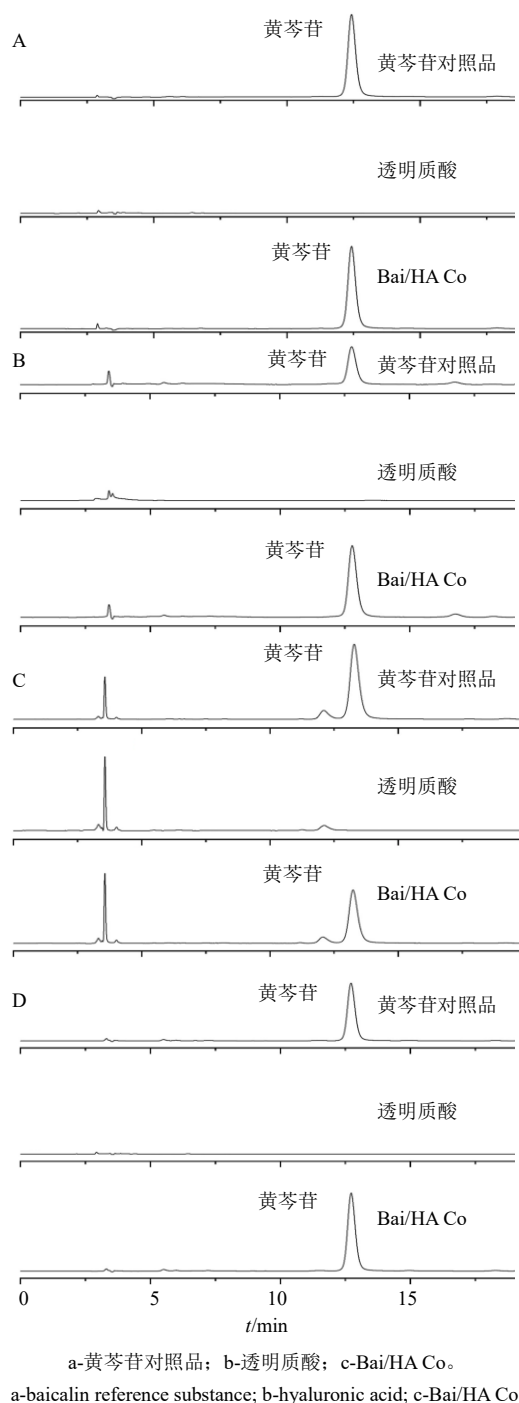


图 6 各样品在去离子水 (A)、pH 1.2 盐酸液 (B)、pH 4.5 醋酸盐缓冲液 (C) 和 pH 6.8 PBS (D) 中溶出实验的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC diagram of samples in deionized water (A), pH 1.2 hydrochloric acid solution (B), pH 4.5 acetate buffer solution (C) and pH 6.8 phosphate buffer solution (D)

品溶液的日内精密密度 RSD 分别为 0.26%、0.27%、0.05%，日间精密密度 RSD 分别为 0.86%、0.43%、1.65%；pH 1.2 盐酸液中，低、中、高质量浓度黄芩苷对照品溶液的日内精密密度 RSD 分别为 0.92%、

0.31%、0.55%，日间精密密度 RSD 分别为 1.08%、0.66%、0.43%；pH 4.5 醋酸盐缓冲液中，低、中、高质量浓度黄芩苷对照品溶液的日内精密密度 RSD 分别为 0.96%、0.66%、0.44%，日间精密密度 RSD 分别为 1.64%、0.83%、0.41%；pH 6.8 PBS 中，低、中、高质量浓度黄芩苷对照品溶液的日内精密密度 RSD 分别为 1.38%、0.34%、0.34%，日间精密密度 RSD 分别为 0.52%、0.33%、0.89%，均满足方法学要求。

(8) 稳定性试验：分别取黄芩苷/透明质酸供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，记录峰面积。结果得去离子水、pH 1.2 盐酸液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 PBS 中黄芩苷/透明质酸的黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.53%、1.36%、1.33%和 1.70%，均满足方法学要求。

(9) 加样回收率试验：分别取 1.0、10.0、40.0 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的各溶出介质黄芩苷对照品溶液 500 μL ，加入 2 mg/mL 的透明质酸溶液至 1 mL，配制成质量浓度为 0.5、5.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液，每个质量浓度平行 3 份，进样测定，记录峰面积，计算加样回收率。结果去离子水中，低、中、高质量浓度样品溶液的平均加样回收率分别为 101.45%、100.49%、100.20%，RSD 分别为 1.26%、1.16%、0.23%；pH 1.2 盐酸液中，低、中、高质量浓度样品溶液的平均加样回收率分别为 100.02%、100.19%、100.59%，RSD 分别为 0.93%、0.23%、0.95%；pH 4.5 醋酸盐缓冲液中，低、中、高质量浓度样品溶液的平均加样回收率分别为 100.88%、100.27%、99.72%，RSD 分别为 1.61%、0.58%、0.63%；pH 6.8 PBS 中，低、中、高质量浓度样品溶液的平均加样回收率分别为 99.69%、99.18%、99.05%，RSD 分别为 1.14%、0.84%、0.47%，均满足方法学要求。

2.4.2 体外溶出考察 参照《中国药典》2020 年版第四部溶出度与释放度测定法第二法（浆法）进行测定。溶出介质分别为 900 mL 去离子水、pH 1.2 盐酸溶液、pH 4.5 醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 缓冲液，转速为 50 r/min。精密称取黄芩苷、BA/HAPM、Bai/HA Co 适量（均相当于 6.0 mg 黄芩苷），进行实验，于 5、10、20、30、45 和 60 min 取样 10 mL，同时补加同体积同温度的新鲜溶出介质。取出的样品经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后，用 HPLC 法测定，计算黄芩苷的累积溶出率并绘制溶出曲线。各样品的体外溶出曲线如图 7 所示。在水中，5 min 时，复合物、物理混合物、黄芩苷原料药的溶出分别为 99.0%、

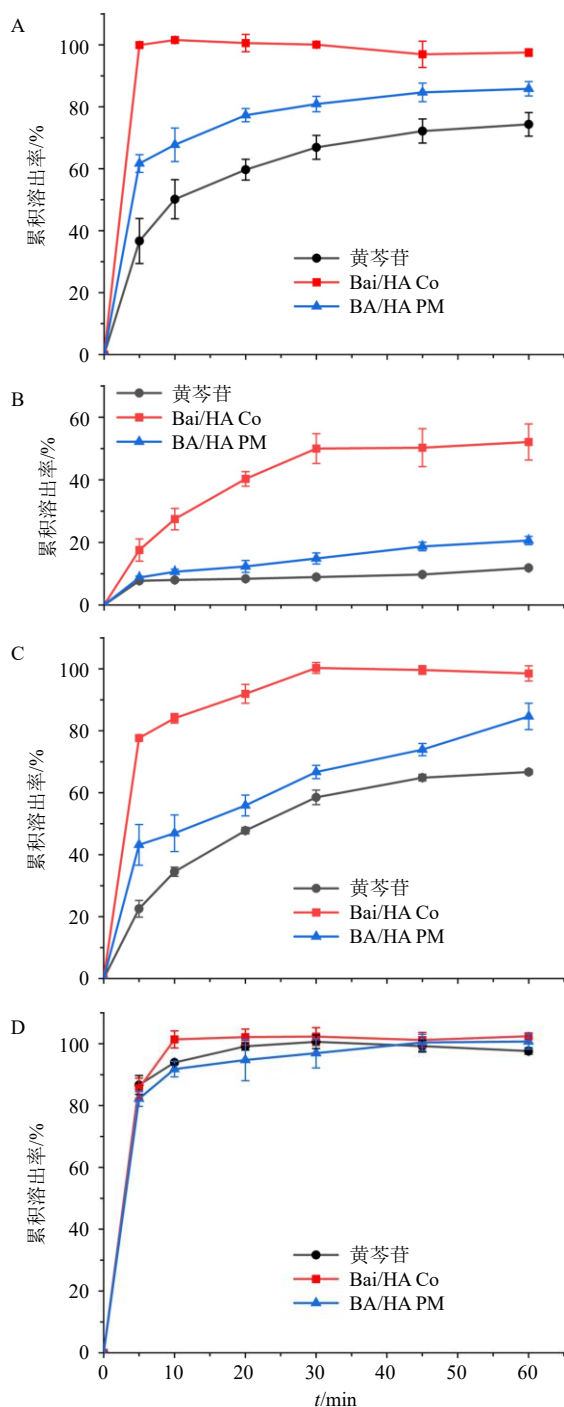


图 7 黄芩苷原料药、Bai/HA Co、BA/HA PM 在去离子水 (A)、pH 1.2 盐酸液 (B)、pH 4.5 醋酸盐缓冲液 (C)、pH 6.8 PBS (D) 中的体外溶出曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 *In vitro* dissolution curves of baicalin, Bai/HA Co, BA/HA PM in deionized water (A), pH 1.2 hydrochloric acid solution (B), pH 4.5 acetate buffer solution (C) and pH 6.8 phosphate buffer solution (D) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

61.7%、36.7%，复合物的溶出明显快于黄芩苷原料药和物理混合物，而物理混合物又快于原料药；60 min 时，物理混合物溶出率（85.8%）大于黄芩苷

（74.3%）。在胃肠道不同的 pH 环境下，黄芩苷分子以不同形式存在，吸收存在差异，因此在不同 pH 的溶出介质中考察黄芩苷的溶出有助于分析其在胃肠道不同阶段的溶出和吸收。由图 7 可知，随着 pH 升高，复合物、物理混合物、黄芩苷原料药的溶出均增加，且在 pH 1.2 和 4.5 介质中，复合物的溶出明显快于物理混合物和黄芩苷原料药，pH 6.8 介质中，三者溶出无明显差异，复合物中的黄芩苷也能快速溶出。可见形成复合物后，能够明显改善黄芩苷在 pH 1.2 和 4.5 条件下的溶出速度，增加药物溶出。

2.5 Bai/HA Co 的增溶机制探讨

2.5.1 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 分析 取透明质酸、黄芩苷、黄芩苷/透明质酸物理混合物 (baicalin/hyaluronic acid physical mixture, Bai/HA PM)、Bai/HA Co 适量，分别与溴化钾粉末研匀并压片，在 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 记录红外吸收光谱并进行分析，结果见图 8。透明质酸的特征峰主要在 3275 cm^{-1} 左右羧基的 -OH 伸缩振动吸收峰和 1604 cm^{-1} 处酰胺的羰基吸收峰。黄芩苷的特征峰为 3547 cm^{-1} 的游离羟基峰， 3488 、 3391 cm^{-1} 的分子间羟基结合峰。Bai/HA PM 在 3546 、 3486 、 3393 cm^{-1} 处出现了黄芩苷的特征吸收峰，在 3277 、 1604 cm^{-1} 处出现了透明质酸的特征吸收峰，表明 Bai/HA PM 中二者没有发生相互作用。而在 Bai/HA Co 的图谱中， 3546 、 3486 、 3393 cm^{-1} 处的黄芩苷特征峰消失了， 3275 cm^{-1} 处透明质酸-OH 的伸缩振动峰，红移至 3263 cm^{-1} 处，表明黄芩苷和透明质酸的羟基之间产生了相互作用，可能生成了氢键。

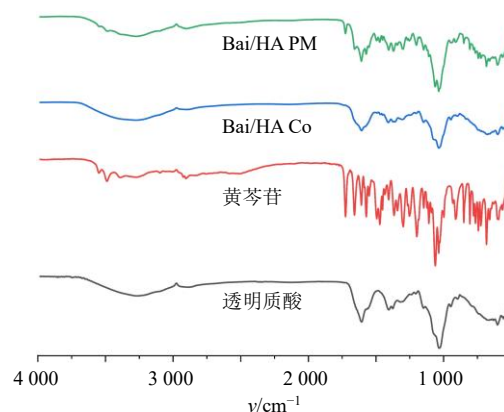


图 8 透明质酸、黄芩苷、Bai/HA Co、Bai/HA PM 的 FT-IR 图

Fig. 8 FT-IR spectra of hyaluronic acid, baicalin, Bai/HA Co, and Bai/HA PM

2.5.2 差示扫描量热 (differential scanning calorimeter, DSC) 分析 取黄芩苷、透明质酸、Bai/HA PM、Bai/HA Co 约 5 mg, 分别置于非密封压接的铝锅中, 于干燥氮气下在 30~300 °C 加热, 线性加热速率为 10 °C/min, 氮气体积流量为 20 mL/min, 结果见图 9。黄芩苷原料药在 220.15 °C 处有一明显的熔点峰, Bai/HA PM 在 220.63 °C 左右出现了黄芩苷的熔化吸热峰, 稍高于黄芩苷熔点峰, 这可能是由于在升温过程中, 黄芩苷和透明质酸在高温下发生了一定的相互作用。而 Bai/HA Co 的黄芩苷熔点峰消失, 说明药物以无定型状态存在。

2.5.3 粉末 X 射线衍射 (powder X-ray diffraction, PXRD) 分析 取黄芩苷、透明质酸、Bai/HA PM、Bai/HA Co 适量, 分别在 40 kV 的电压和 25 mA 的电流下测定, 以 2°/min 的扫描速率在 5°<2θ<90° 的扫描角度进行扫描, 结果见图 10。黄芩苷原料药

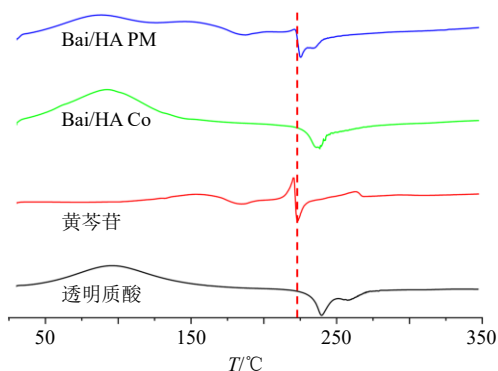


图 9 透明质酸、黄芩苷、Bai/HA Co、Bai/HA PM 的 DSC 图

Fig. 9 DSC thermographs of hyaluronic acid, baicalin, Bai/HA Co, and Bai/HA PM

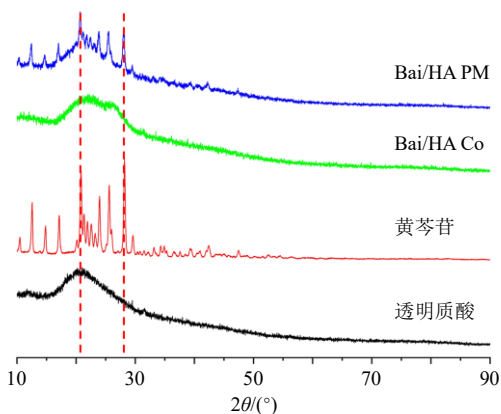


图 10 透明质酸、黄芩苷、Bai/HA Co、Bai/HA PM 的 PXRD 图

Fig. 10 PXRD spectra of hyaluronic acid, baicalin, Bai/HA Co, and Bai/HA PM

有明显的结晶特征峰, 与文献报道一致^[23]; Bai/HA PM 也出现了明显的黄芩苷结晶的特征峰, 说明简单的物理混合对药物晶型没有影响; 但 Bai/HA Co 未观察到黄芩苷结晶特征峰, 说明药物在复合物中以非晶态形式存在。

2.5.4 Bai/HA 分子动力学模拟

(1) 分子结构文件建立: 采用 GLYCAM 力场 (<http://legacy.glycam.org>) 工具构建透明质酸二糖单元, 对重复单元进行复制构建透明质酸分子链。透明质酸和黄芩苷分子拓扑参数由 Ambertools21^[24]软件包进行确定, 透明质酸分子采用 GLYCAM 06j^[25]力场, 药物小分子采用 GAFF 力场^[26], 使用 acpypes 转换为 GROMACS 格式, 分子动力学模拟均使用 GROMACS 2021.5 软件包进行计算, 结构图形观察使用 VMD 1.9.3^[27]软件。

(2) 分子动力学 (molecular dynamics, MD) 模拟: 使用 Packmol 软件将 10 个透明质酸分子链平行排布在 10 nm×10 nm×10 nm 的盒子中, 并在其中填充 20 个黄芩苷药物分子, 将体系置于 spc216 水模型的立方体水盒中, 盒子边界距体系 1.0 nm, 添加 0.1 mol/L 的 Na、Cl 平衡离子, 接着进行体系能量最小化过程, 在 NVT 系综下运行 0.25 ns 以达到设定温度和松弛体系, 之后采用 NPT 系综、温度为 298 K、压力为 100.0 kPa, 温度控制采用 V-rescale 方法, 压力控制采用 Parrinello-Rahman 方法, 步长为 2 fs, 运行 1 000 ns 的分子动力学模拟。提取轨迹文件, 使用 Gromacs 分别计算 Bai/HA Co 体系的均方根偏差 (root mean square deviation, RMSD)、溶剂可及表面积 (solvent-accessibility surface area, SASA) 和黄芩苷与透明质酸之间氢键数量。最初和最终构象结果如图 11 所示, 模拟分析结果如图 12 所示。由图 11 可见, 在 MD 最初时透明质酸和黄芩苷均相互分开, 没有相互接触, 在经过 1 000 ns

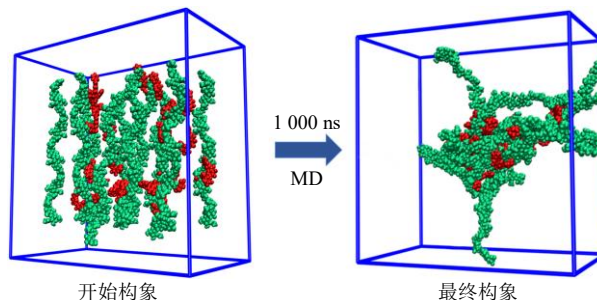
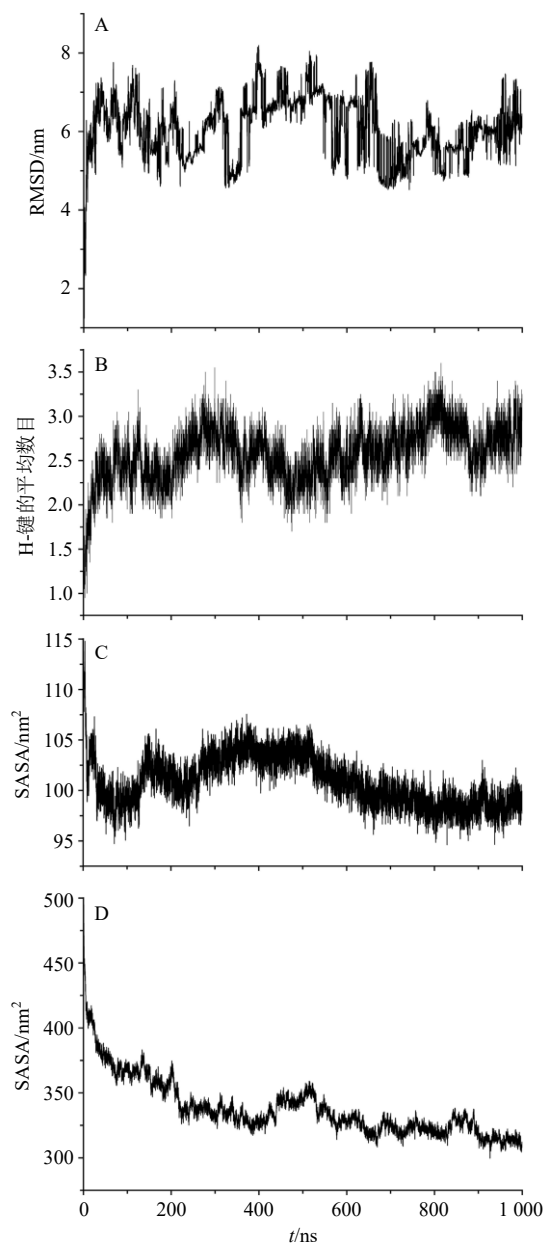


图 11 BA/HA 的 MD 模拟初始构象和最终构象

Fig. 11 MD simulates the initial and final conformation of baicalin/hyaluronic acid



A-黄芩苷/透明质酸体系的 RMSD; B-平均每个黄芩苷与透明质酸分子的氢键数量; C-黄芩苷体系的溶剂可及表面积; D-黄芩苷/透明质酸体系的溶剂可及表面积。

A-RMSD of baicalin/hyaluronic acid system; B-the average number of hydrogen bonds between each baicalin and hyaluronic acid molecule; C-the SASA of baicalin system; D-the SASA of baicalin/hyaluronic acid system.

图 12 MD 模拟分析结果

Fig. 12 MD simulation analysis results

的 MD 模拟后,透明质酸分子相互缠绕,黄芩苷分子分散在透明质酸分子之间,说明黄芩苷以非晶形态存在,这与 PXRD 和 DSC 结果相符。从图 12-A 中可以看出,在 MD 模拟过程中,体系的 RMSD 始终保持在 6 nm 左右波动,但波动范围较大,有多个平台期,这可能是由于透明质酸是一种相对分子质

量较大的长链柔性分子,在水溶液中具有较强的柔性所导致^[28-29],由轨迹中可以看出,未与黄芩苷结合或者与自身缠绕的透明质酸链端会在水溶液中不断摆动,或者因此整个体系的 RMSD 值都会持续波动;由图 12-B 可见,黄芩苷和透明质酸相互作用的氢键数量在模拟初期快速增加,最终稳定在平均每个黄芩苷与透明质酸形成 2.5 个氢键,这与分子对接结果类似;溶剂可及表面积(solvent-accessibility surface area, SASA)值是一种可以较好地反映药物分子暴露在溶剂中面积的指标,由黄芩苷和黄芩苷/透明质酸体系的 SASA 分析结果图 12-C 和 12-D 可见,黄芩苷/透明质酸体系在前 600 ns 内 SASA 值不断下降,说明体系之间相互接触,使能够与水接触的面积减少,在通过药物与药物、药物与透明质酸、透明质酸与透明质酸之间相互结合和缠绕过程后,600 ns 后体系的 SASA 值逐渐趋于稳定,同时正是由于药物分子在前 600 ns 与透明质酸分子相结合,药物分子的 SASA 值(图 12-C)也同时在 600 ns 后能够保持稳定,说明此时体系中的黄芩苷已与透明质酸达到较为稳定的结合状态,黄芩苷能够较好地埋藏在透明质酸结合位点中。因此,由以上 MD 模拟结果可见,该体系在相互作用后在水中可能是一个以药物分子使透明质酸相连的体系,摆动的透明质酸分子链又进一步地捕捉更多的药物和透明质酸,形成了更大的 Bai/HA Co 体系。这也解释了为什么多糖分子对黄芩苷结合能越大其对黄芩苷的增溶效果越强,更大的结合能数值使得反应越容易进行,黄芩苷/多糖复合物越容易形成,体系能够更加稳定。

2.6 Bai/HA Co 的体内药物动力学

2.6.1 黄芩苷的体内分析方法 参考文献方法^[18],采用 HPLC 测定黄芩苷的含量。

(1) 色谱条件:色谱柱为 Phenomenex C₁₈ 键合硅胶柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-2%冰醋酸水溶液(54:46);体积流量 0.8 mL/min;检测波长 278 nm;柱温 25 °C;进样量 20 μL。

(2) 黄芩苷对照品母液的制备:精密称取黄芩苷对照品 2.50 mg,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得 100 μg/mL 黄芩苷对照品母液。

(3) 内标溶液(对羟基苯甲酸甲酯溶液)的制备:精密称取对羟基苯甲酸甲酯 5.00 mg,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得 200 μg/mL 内标母液,精密吸取 1 mL 母液于 10 mL 量瓶中,加

甲醇定容, 得 20 $\mu\text{g/mL}$ 内标溶液。

(4) 黄芩苷对照品溶液: 精密吸取一定量黄芩苷对照品母液, 适当稀释后配制 1、4、8、12、16、20 $\mu\text{g/mL}$ 的黄芩苷对照品溶液。分别取该系列质量浓度黄芩苷对照品溶液 50 μL , 加入大鼠空白血浆至 100 μL , 配制成 0.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆黄芩苷对照品溶液。

(5) 血浆样品处理: 取 100 μL 血浆样品于 1.5 mL 离心管中, 加入 30 μL 1 mol/L 磷酸二氢钠将血浆预酸化, 涡旋 2 min, 再加入 20 μL 内标溶液, 涡旋 2 min, 加入 250 μL 甲醇, 涡旋 5 min, 在 15 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 (离心半径 8.2 cm) 15 min。取上清 100 μL , 得血浆样品, 按“2.6.1 (1)”项下色谱条件进样测定。

(6) 专属性考察: 按照“2.6.1 (5)”项下的样品处理方法, 制备空白血浆、空白血浆+内标+黄芩苷对照品的样品液, 另取给药后血浆样品, 进样测定, 考察该方法专属性。血浆样品黄芩苷的 HPLC 图如图 13 所示, 黄芩苷出峰时间为 9.8 min, 内标 (对羟基苯甲酸甲酯) 出峰时间为 8.4 min, 内标和黄芩苷分离度为 2.47, 内标以及血浆内源性物质对黄芩苷测定无干扰, 专属性良好。

(7) 线性关系考察: 取不同质量浓度的血浆黄芩苷对照品溶液, 按照“2.6.1 (5)”项下方法处理后, 进样测定, 以黄芩苷峰面积与内标峰面积之比 (A_B/A_i) 为纵坐标, 黄芩苷质量浓度 (C_B) 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $A_B/A_i = 0.434\ 4\ C_B - 0.112\ 9$, $R^2 = 0.999\ 6$ ($n = 3$), 结果表明黄芩苷在 0.5~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

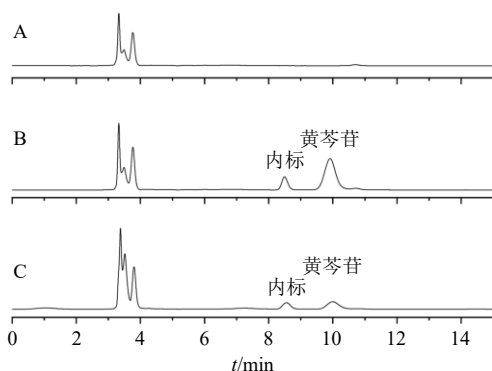


图 13 空白血浆 (A)、血浆黄芩苷对照品 (B)、ig 给药后 6 h 大鼠血浆样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 13 HPLC diagram of blank plasma (A), plasma baicalin reference substance (B) and plasma profile of experimental rats at 6 h in rat plasma (C)

(8) 检测限和定量限考察: 以黄芩苷峰面积与仪器噪音峰面积的比值等于 3 作为检测限, 结果为 0.2 $\mu\text{g/mL}$; 以黄芩苷峰面积与仪器噪音峰面积的比值等于 10 作为定量限, 结果为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

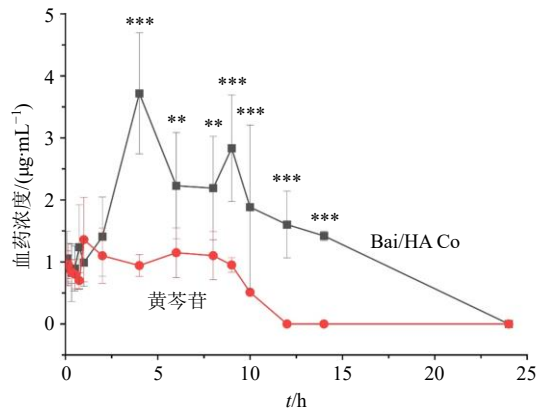
(9) 精密度试验: 分别制备黄芩苷质量浓度为 0.5、4.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品, 每个质量浓度平行 5 份, 按照“2.6.1 (5)”项下方法处理后, 进样测定, 1 d 内平行测定 5 次, 连续测定 3 d。日内精密度 RSD 分别为 2.38%、0.41%、0.14%, 日间精密度 RSD 分别为 1.84%、1.87%、1.22%, 均满足方法学要求。

(10) 稳定性试验: 取血浆样品按照“2.6.1 (5)”项下的方法处理后, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 结果黄芩苷和内标峰面积比值的 RSD 为 1.60%, 表明血浆样品溶液稳定性良好, 满足方法学要求。

(11) 重复性试验: 取血浆样品溶液 6 份, 按照“2.6.1 (5)”项下方法处理后, 进样测定。结果黄芩苷和内标峰面积比值的 RSD 为 1.32%, 表明该方法重复性良好。

(12) 萃取回收率考察: 分别制备黄芩苷质量浓度为 0.5、4.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的血浆样品溶液, 每个质量浓度平行 5 份, 按“2.6.1 (5)”项下方法处理后, 进样测定, 计算黄芩苷和内标峰面积的比值 (E); 另取相应质量浓度的黄芩苷和内标溶液, 进样测定, 得黄芩苷和内标峰面积比值 (F), 按公式萃取回收率 = E/F 计算萃取回收率。测得平均萃取回收率分别为 96.90%、97.60%、99.91%, RSD 分别为 4.08%、4.54%、2.82%, 均满足方法学要求。

2.6.2 药物动力学实验 取 12 只 SD 大鼠随机分为黄芩苷原料药组和 Bai/HA Co 组。于实验前 14 h 禁食不禁水。黄芩苷原料药组用 0.5% CMC-Na 水溶液配制黄芩苷质量浓度为 10 mg/mL 的混悬液, Bai/HA Co 组用蒸馏水配制成相当于黄芩苷质量浓度为 10 mg/mL 的溶液, 按 100 mg/kg 的剂量 ig 给药, ig 后于 5、10、20、30 min 和 1、2、4、6、8、9、10、12、14、24 h 眼眶取血 0.3 mL, 4 000 r/min 离心 (离心半径 8.2 cm) 10 min, 收集血浆, 血浆样品经处理后用 HPLC 法测定黄芩苷质量浓度。大鼠给药后, 黄芩苷和 Bai/HA Co 的血药浓度-时间曲线如图 14 所示。采用 DAS 2.0 软件计算药动学参数, 结果见表 9。从图 14 可以看出, Bai/HA Co 的血药浓度曲线并未出现规则的单一吸收峰, Bai/HA



与黄芩苷原料药比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs baicalin raw materials.

图 14 黄芩苷原料药及 Bai/HA Co 的血药浓度-时间曲线
($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 14 Plasma concentration-time curves of baicalin and Bai/HA Co ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 9 黄芩苷原料药和 Bai/HA Co 的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 9 Main pharmacokinetic parameters of baicalin and Bai/HA Co ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	黄芩苷	Bai/HA Co
血药浓度-时间曲线下面积 ($AUC_{0 \sim t}$)	$\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	9.51 ± 1.38	$26.06 \pm 2.00^{***}$
$AUC_{0 \sim \infty}$	$\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$	15.61 ± 1.66	$35.00 \pm 3.42^{**}$
时间与血药浓度的乘积-时间曲线下的面积 ($AUMC_{0 \sim t}$)		48.24 ± 9.81	$163.97 \pm 23.84^{***}$
$AUMC_{0 \sim \infty}$		141.96 ± 15.01	$289.48 \pm 75.57^*$
平均驻留时间 ($MRT_{0 \sim t}$)	h	4.61 ± 0.41	$6.28 \pm 0.58^{***}$
$MRT_{0 \sim \infty}$	h	7.88 ± 1.88	8.39 ± 2.33
平均驻留时间方差 ($VRT_{0 \sim t}$)	h^2	7.15 ± 0.79	9.71 ± 3.12
$VRT_{0 \sim \infty}$	h^2	60.23 ± 14.62	35.88 ± 13.54
消除半衰期 ($t_{1/2\alpha}$)	h	5.34 ± 0.64	3.65 ± 1.40
达峰时间 ($T_{\max}$)	h	2.18 ± 2.02	$5.67 \pm 2.66^*$
清除率 (CL_z/F)	$\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	4.06 ± 2.07	2.45 ± 1.11
表观分布容积 (V_z/F)	$\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$	66.04 ± 27.09	$20.18 \pm 13.44^{***}$
尾段斜率 (ζ)		0.08 ± 0.06	0.21 ± 0.20
尾段回归的尾点		—	—
尾点浓度 C_z (尾段回归方程预测值)	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.06 ± 0.62	2.57 ± 3.16
最大血药浓度 ($C_{\max}$)	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.60 ± 0.55	$4.15 \pm 0.70^{***}$

与黄芩苷原料药比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs baicalin raw materials.

效果最好。

在 Bai/HA Co 制备工艺优化的单因素实验中,随着透明质酸浓度增大,增溶倍数增大,但载药量却减低。这可能是因为随着透明质酸浓度不断提高,为黄芩苷提供更多的载药位点,使增溶倍数增大;但由于透明质酸的高相对分子质量,更多透明质酸分子的存在,使其在处方中的质量明显增加,载药

量降低。温度的影响可能是因为当温度较低时,随着温度的升高,黄芩苷更容易进入透明质酸链组成的结构中,但当温度过高时,形成的复合物结构不稳定。在复合物的制备中搅拌主要起促进黄芩苷进入透明质酸分子链中的作用,低速搅拌能够加快透明质酸和黄芩苷相互接触,而当搅拌速度过高时,体系始终处于不稳定状态,透明质酸结构更易被破

3 讨论

不同多糖对黄芩苷的增溶效果存在差异,分子动力学模拟结果显示随着多糖分子和黄芩苷分子之间对接和结合自由能 ($\Delta G_{\text{对接}}$ 和 $\Delta G_{\text{结合}}$) 绝对值的增加,多糖对黄芩苷的增溶效果越好,这可能是由于黄芩苷与多糖的结合作用是自发进行的,该过程越容易进行,其结合能力越强,形成的复合物越稳定,因此增溶效果越好,其中透明质酸对黄芩苷的增溶

坏,处于其中的黄芩苷分子也更难稳定结合。黄芩苷分子与透明质酸分子接触并发生相互作用形成复合物需要一定的时间才能完成,从而表现出在初期随着搅拌时间增加,溶解度增大,增溶倍数提高,载药量增大,在 1 h 时体系已经达到了一个相对稳定的状态,当进一步增加搅拌时间,可能对透明质酸的空间结构或复合物的结构稳定性产生影响,使溶解度减小,增溶倍数降低,载药量减小。

通过 FT-IR、DSC 和 PXRD 分析结果表明,药物在 Bai/HA Co 中以无定型状态存在。同时,黄芩苷/透明质酸的分子模拟结果显示黄芩苷分子分散在透明质酸的分子链中,二者相互作用的结合能绝对值较大,使得反应容易进行,Bai/HA Co 容易形成,体系较稳定,使透明质酸对黄芩苷的增溶效果较好。因此,在体外溶出实验中,Bai/HA Co 能够加快黄芩苷的溶出速度,这是因为当药物高度分散在亲水性的透明质酸中,能够使药物快速溶出;物理混合物中,药物以结晶形式分散在透明质酸中,透明质酸的亲水性有助于药物与水接触,可在一定程度上增加药物溶出,但效果不如 Bai/HA Co。在不同的 pH 环境中,随着 pH 升高,复合物、物理混合物、黄芩苷原料药的溶出均增加,这可能是由于黄芩苷属于弱酸性药物^[30],随着 pH 升高,解离程度增加,溶解度增大,溶出加快;当 pH 达到 6.8 时,黄芩苷原料药能较好地溶解,溶出快,因此与复合物、物理混合物的溶出没有显著差异。

药物动力学实验结果显示 Bai/HA Co 的血药浓度高于黄芩苷,这是由于在 Bai/HA Co 中,黄芩苷以无定型状态存在,溶解度增大;同时,黄芩苷高度分散在亲水性的透明质酸中,增加了药物与胃肠液接触面积,加快了药物的溶出,使吸收增加,从而提高生物利用度。有文献报道,黄芩苷的药动/药效模型(PK/PD modelling)研究显示黄芩苷抗氧化作用的发挥与黄芩苷的浓度呈正相关性^[31],其抗炎效果也由于黄芩苷血药浓度的提高而得到了明显改善^[32],因此 Bai/HA Co 对于黄芩苷生物利用度的提高将有助于改善黄芩苷的体内药效。同时,黄芩苷的血药浓度曲线呈现出的非单一吸收峰可能是由于黄芩苷存在肝肠循环,使得吸收入血的黄芩苷通过胆汁排入肠道,在肠道中又被重新吸收所导致。

本实验通过分子对接和分子动力学模拟黄芩苷与不同多糖的相互结合可以较好地预测多糖对难溶性药物的增溶能力,模拟结果与增溶实验结果一致。

以透明质酸为载体,采用加热搅拌结合冷冻干燥法成功制备了 Bai/HA Co。该法操作简单可行,制得的复合物质地疏松、水溶性好,可有效提高黄芩苷溶解度、溶出度和生物利用度。同时,透明质酸是一种天然存在于人体组织中的多糖,具有良好的生物相容性和生物可降解性,不引起明显毒副作用,Bai/HA Co 具有广阔的应用前景。Bai/HA Co 的 MD 模拟揭示了黄芩苷分子与透明质酸分子链形成 Bai/HA Co 的方式,可为后续相关研究提供指导。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 高绪洁,李梓铭,马源昌,等. 难溶性药物增溶技术研究现状 [J]. 山东化工, 2022, 51(23): 100-102.
- [2] Zhang S D, Wang T, Xue J J, *et al.* Hydrogen bonding principle-based molecular design of a polymer excipient and impacts on hydrophobic drug properties: Molecular simulation and experiment [J]. *Biomacromolecules*, 2023, 24(4): 1675-1688.
- [3] Andreas N, Edmont S, Martin K. Hydroxypropyl cellulose for drug precipitation inhibition: From the potential of molecular interactions to performance considering microrheology [J]. *Mol Pharm*, 2022, 19(2): 690-703.
- [4] 李伟,徐伟. 黄芩苷药理作用研究进展 [J]. 中西医结合研究, 2022, 14(3): 193-196.
- [5] 龙宇,向燕,谭裕君,等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 6142-6148.
- [6] Dinda B, Dinda S, DasSharma S, *et al.* Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 131: 68-80.
- [7] Zhao J J, Yang J, Xie Y. Improvement strategies for the oral bioavailability of poorly water-soluble flavonoids: An overview [J]. *Int J Pharm*, 2019, 570: 118642.
- [8] 吴玲. 淫羊藿素-泊洛沙姆 188 固体分散体的制备及溶出度研究 [J]. 中国药房, 2015, 26(19): 2702-2704.
- [9] D'Souza A A, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): A versatile polymer for pharmaceutical applications [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13(9): 1257-1275.
- [10] Zhang M, Zhao X. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 162: 1414-1428.
- [11] Marinho A, Nunes C, Reis S. Hyaluronic acid: A key ingredient in the therapy of inflammation [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(10): 1518.
- [12] Nai J J, Zhang C, Shao H L, *et al.* Extraction, structure, pharmacological activities and drug carrier applications of

- Angelica sinensis* polysaccharide [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 2337-2353.
- [13] Sohn J S, Choi J S. Solubilization of tadalafil using a tartaric acid and chitosan-based multi-system [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 168: 866-874.
- [14] Liu F, Sun L L, You G J, *et al.* Effects of *Astragalus* polysaccharide on the solubility and stability of 15 flavonoids [J]. *Int J Biol Macromol*, 2020, 143: 873-880.
- [15] 万鹏. 醋柴胡多糖增加难溶性药物溶解度作用及机制初探 [D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [16] 杨菊, 叶亮, 黄俊明, 等. 中药多糖改善淫羊藿黄酮低糖苷组分的溶解性及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(22): 6058-6065.
- [17] 胡川梅, 郑璐侠, 陈钢. 多糖类药用辅料的应用及其质量分析进展 [J]. *中国药品标准*, 2015, 16(1): 31-35.
- [18] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 773.
- [19] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16): 2785-2791.
- [20] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [21] Tian Lu, Sobtop, Version [1.0] [OL]. (2024-2-17) [2024-05-10]. <http://sobereva.com/soft/Sobtop>.
- [22] van der Spoel D, Lindahl E, Hess B, *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free [J]. *J Comput Chem*, 2005, 26(16): 1701-1718.
- [23] Cui L, Sune E, Song J, *et al.* Characterization and bioavailability study of baicalin-mesoporous carbon nanopowder solid dispersion [J]. *Pharmacogn Mag*, 2016, 12(48): 326-332.
- [24] Case D A, Cheatham T E, Darden T, *et al.* The Amber biomolecular simulation programs [J]. *J Comput Chem*, 2005, 26(16): 1668-1688.
- [25] Kirschner K N, Yongye A B, Tschampel S M, *et al.* GLYCAM06: A generalizable biomolecular force field. Carbohydrates [J]. *J Comput Chem*, 2008, 29(4): 622-655.
- [26] Wang J M, Wolf R M, Caldwell J W, *et al.* Development and testing of a general amber force field [J]. *J Comput Chem*, 2004, 25(9): 1157-1174.
- [27] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics [J]. *J Mol Graph*, 1996, 14(1): 33-38.
- [28] Taweechat P, Pandey R B, Sompornpisut P. Conformation, flexibility and hydration of hyaluronic acid by molecular dynamics simulations [J]. *Carbohydr Res*, 2020, 493: 108026.
- [29] Guvench O. Atomic-resolution experimental structural biology and molecular dynamics simulations of hyaluronan and its complexes [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7276.
- [30] 梁颖, 王雷, 杨新建. 在不同 pH 值下测定黄芩苷油/水分配系数及 pK_a 值的研究 [J]. *天津药学*, 2015, 27(3): 25-26.
- [31] 向燕, 冯玲玲, 龙宇, 等. 黄芩苷脂质体对脑缺血再灌注损伤大鼠药效学考察及 PK-PD 模型的建立 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(12): 2824-2827.
- [32] 杨七妹, 周明皓, 王鹏娇, 等. 基于 UPLC-MS/MS 和分子对接技术考察聚乙二醇 400 对黄芩苷药代动力学、抗炎作用的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(22): 131-138.

[责任编辑 郑礼胜]