

以甜菊糖苷为载体的二氢杨梅素纳米胶束的制备、表征及口服生物利用度评价

王彦阁¹, 陈晨¹, 丁林¹, 王丽君¹, 刘俊霞¹, 决利利^{1,2*}

1. 郑州工业应用技术学院, 河南 郑州 451100

2. 周口职业技术学院, 河南 周口 466022

摘要: 目的 以甜菊糖苷为载体制备二氢杨梅素纳米胶束 (dihydromyricetin stevioside nanomicelles, Dmy-Ste-NMs), 考察其体外释药行为及体内口服药动学行为。方法 在单因素考察的前提下, 选择药物质量浓度、甜菊糖苷质量浓度和搅拌时间为主要影响因素, Dmy-Ste-NMs 包封率和载药量为考察指标, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 Dmy-Ste-NMs 处方工艺, 直接冻干法制备 Dmy-Ste-NMs 粉末。透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 Dmy-Ste-NMs 微观形态, X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 法分析晶型, 透析法考察体外释药行为。SD 大鼠分别 ig 给予 Dmy 和 Dmy-Ste-NMs 粉末, 测定血药浓度, 比较药动学行为, 计算 Dmy-Ste-NMs 相对生物利用度。结果 Dmy-Ste-NMs 最佳处方为药物质量浓度 11.24 mg/mL, 甜菊糖苷质量浓度 79.75 mg/mL, 搅拌时间 1.36 h。包封率、载药量、粒径及 ζ 电位分别为 $(90.56 \pm 1.17)\%$ 、 $(10.92 \pm 0.16)\%$ 、 (7.17 ± 0.65) nm 和 (-17.53 ± 1.56) mV。TEM 结果显示 Dmy-Ste-NMs 外貌为类球形, XRPD 结果显示 Dmy 在 Dmy-Ste-NMs 粉末中转变为无定形态, 体外释药具有缓释特征。药动学结果显示, Dmy-Ste-NMs 的达峰时间 (t_{max}) 提前至 (0.71 ± 0.17) h, 而半衰期 ($t_{1/2}$) 延长至 (4.33 ± 0.59) h, 达峰浓度 (C_{max}) 和相对生物利用度分别增加至 3.83 倍和 4.60 倍。结论 采用甜菊糖苷制备的 Dmy-Ste-NMs 具有粒径小、载药量高、缓释特征明显等特点, 显著促进了 Dmy 体内吸收。

关键词: 二氢杨梅素; 甜菊糖苷; 纳米胶束; Box-Behnken 设计-效应面法; 药动学行为; 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)22-8011-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.22.009

Preparation, characterization and oral bioavailability evaluation of dihydromyricetin nanomicelles using stevioside as carriers

WANG Yange¹, CHEN Chen¹, DING Lin¹, WANG Lijun¹, LIU Junxia¹, JUE Lili^{1,2}

1. Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451100, China

2. Zhoukou vocational and technical college, Zhoukou 466022, China

Abstract: Objective To prepare dihydromyricetin nanomicelles using stevioside as carriers (Dmy-Ste-NMs), release behavior *in vitro* and oral pharmacokinetic behavior *in vivo* were also studied. **Methods** On the base of single factor investigation, drug concentration, stevioside concentration and stirring time were selected as main influencing factors, entrapment efficiency and drug loading were used as evaluation indexes, Box-Behnken design-response surface method (BBD-RSM) were employed to optimize prescriptions of Dmy-Ste-NMs. Powder of Dmy-Ste-NMs was prepared by direct lyophilization method. Transmission electron microscope (TEM) was employed to observe microscopic appearance of Dmy-Ste-NMs. The crystal form of the powder of Dmy-Ste-NMs was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD), and the *in vitro* release behavior of Dmy-Ste-NMs was investigated using dialysis method. SD rats were administered intragastrically with dihydromyricetin and Dmy-Ste-NMs suspension, respectively. Blood drug concentration was determined, pharmacokinetics was compared and relative oral bioavailability was also calculated. **Results** The optimal formulations of Dmy-Ste-NMs: dihydromyricetin concentration was 11.24 mg/mL, stevioside concentration was 79.75 mg/mL, and stirring time was 1.36 h. Envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were $(90.56 \pm 1.17)\%$, $(10.92$

收稿日期: 2024-06-15

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (23B310010); 河南省医学教育研究指导性项目 (WJLX2023148)

作者简介: 王彦阁 (1983—), 女, 汉族, 学士, 实验师, 主要从事临床药学及肿瘤护理研究。Tel: (0371)62623434 E-mail: wangyange0827@126.com

*通信作者: 决利利 (1984—), 女, 汉族, 硕士, 副教授, 主要从事药物代谢动力学及解剖学研究。Tel: (0371)62623434 E-mail: 147374991@qq.com

$\pm 0.16\%$), (7.17 ± 0.65) nm and (-17.53 ± 1.56) mV, respectively. TEM revealed that Dmy-Ste-NMs were spherical in appearance. XRPD results showed that dihydromyricetin transformed into an amorphous state in Dmy-Ste-NMs powder. Drug release *in vitro* had obvious sustained-release characteristics. Pharmacokinetics showed that t_{\max} of Dmy-Ste-NMs was shorten to (0.71 ± 0.17) h, $t_{1/2}$ was increased to (4.33 ± 0.59) h, C_{\max} and oral relative bioavailability were increased to 3.83-fold and 4.60-fold. **Conclusion** Dmy-Ste-NMs prepared with stevioside had the characteristics of small particle size, high drug loading and obvious sustained-release characteristics, which significantly promoted the absorption of dihydromyricetin *in vivo*.

Key words: dihydromyricetin; stevioside; nanomicelles; Box-Behnken response surface design method; pharmacokinetic behavior; bioavailability

二氢杨梅素 (dihydromyricetin, Dmy) 可从葡萄科蛇葡萄属植物中提取^[1], 属于二氢黄酮醇类成分, 具有抗肿瘤、消炎镇痛、神经保护、预防心脑血管疾病等作用^[2-4]。SD 大鼠对 Dmy 最大耐受量大于 5.0 g/kg ^[5], 表明 Dmy 安全性高。本课题组测得 Dmy 在 25°C 蒸馏水中的溶解度为 (246.19 ± 2.90) $\mu\text{g/mL}$, 在模拟胃液和模拟肠液中的油水分配系数分别为 1.53 和 0.93^[6], 属于《生物药剂学分类系统》中的 IV 类药物^[7], 体内外稳定性差, 在肠道中易降解^[6], 且易受 P-糖蛋白外排影响^[8], 导致大鼠口服生物利用度仅为 4.02%^[9]。目前, Dmy 有固体分散体、磷脂复合物、脂质纳米粒等研究^[10-12], 固体分散体和磷脂复合物稳定性差, 进入机体后容易重新解离, 影响促吸收效果。脂质纳米粒处方中辅料种类多, 工艺复杂, 在制备过程中需引入表面活性剂及有机溶剂等, 可能影响制剂的安全性。由于 Dmy 分子结构的特殊性, 导致其遇水、热时容易降解变质^[6], 故需开发一种处方工艺简单、制备条件温和、稳定性高的新型给药载体。

纳米胶束 (nanomicelles) 具有制备工艺简单、载药量高、稳定性好等优势, 因而备受医药研究者关注^[13-15], 但胶束常用载体材料往往存在潜在毒性、价格昂贵、溶剂残留、性质不稳定等缺陷^[16-17], 不利于纳米胶束在临床上的使用, 因而越来越多的研究者将目光转移至天然来源的载体材料。甜菊糖苷 (stevioside) 是一类天然的表面活性剂, 主要来源于甜叶菊、罗汉果、甜叶悬钩子等植物, 是常用的甜味剂, 但不会提高血糖水平^[18], 适用于糖尿病、肥胖等人群。甜菊糖苷结构中具有疏水性的萜糖苷配基和亲水性的葡萄糖基, 在水相中可自组装形成胶束结构, 本身也可作为冻干保护剂^[19-20], 可减少制剂中辅料用量。采用甜菊糖苷制备纳米胶束时无需引入有机溶剂^[21], 不存在有机溶剂残留问题, 可见甜菊糖苷作为胶束载体具有众多优势, 但目前鲜见相关应用的研究报道。

本研究使用甜菊糖苷作为载体, 将 Dmy 制备成二氢杨梅素甜菊糖苷纳米胶束 (dihydromyricetin stevioside nanomicelles, Dmy-Ste-NMs), 采用 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 Dmy-Ste-NMs 处方工艺, 并考察其在模拟胃、肠液中的释药情况, 以及 SD 大鼠 ig 后体内药动学行为, 为 Dmy 新型制剂研究提供新思路, 也为甜菊糖苷在纳米胶束中应用提供参考资料。

1 仪器与材料

1.1 仪器

XPR 型分析天平, 瑞士梅特勒托利多仪器有限公司; WH260-AH 型恒温磁力搅拌器, 北京维根技术有限公司; 1200 型高效液相色谱仪 (HPLC), 美国安捷伦公司; STRIKE 385 型旋转蒸发器, 北京优莱博技术有限公司; JEM-2100 型透射电子显微镜 (TEM)、Fringe EV 型 X 粉末衍射仪, 日本电子株式会社; Zetasizer Nono ZS-90 型粒度测定仪, 英国马尔文公司; Nicolet iS50 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; MDS-2008DS 型溶出仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; FD-1A50 型真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; F440 型超低温冰箱, 德国艾本德股份有限公司; LHS-150SC 型恒温恒湿箱, 上海康路仪器设备有限公司; GL-25MS 型高速离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 材料

Dmy 对照品, 批号 ALB-202209, 质量分数 98.0%, 美国 Albaugh 公司; Dmy 原料药, 批号 20221001, 质量分数 97.0%, 武汉曙尔生物科技股份有限公司; 二氢槲皮素对照品, 批号 BA09008, 质量分数 99.0%, 成都普思生物科技股份有限公司; 甜菊糖苷, 批号 YS20210801, 褚城市浩天药业有限公司; 溴化钾, 光谱纯, 批号 20240111, 上海安谱实验科技股份有限公司。

1.3 动物

SD大鼠(清洁级),雌雄各半,购自河南省动物实验中心,许可证编号SCXK-2020-0001,体质量为 (220 ± 20) g。郑州工业应用技术学院批准伦理号为2024061101,所有动物实验遵循郑州工业应用技术学院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 Dmy-Ste-NMs混悬液及其粉末的制备

取处方量Dmy和甜菊糖苷至20 mL蒸馏水中,得混悬液,置于一定温度的水浴中,600 r/min转速下磁力搅拌一定时间,采用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,续滤液即为Dmy-Ste-NMs混悬液。将Dmy-Ste-NMs混悬液于 $-45\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中冷冻3 d(不加冻干保护剂),于 $-30\ ^\circ\text{C}$ 冻干机中2 d(真空度为50 Pa),取出密封即得Dmy-Ste-NMs粉末,置于干燥器中保存。阴性样品(不含Dmy)同法制备。

2.2 Dmy-Ste-NMs包封率和载药量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Diamonsil C_{18} 柱($250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$);流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈(30:70);检测波长291 nm;进样体积 $10\ \mu\text{L}$;柱温 $30\ ^\circ\text{C}$;体积流量 $1.0\ \text{mL}/\text{min}$;理论塔板数以Dmy计不低于8 000。

2.2.2 线性关系考察 用乙腈配制Dmy质量浓度为 $2.00\ \text{mg}/\text{mL}$ 的对照品储备液,取适量,采用乙腈稀释配制成 8.00 、 4.00 、 2.00 、 0.50 、 0.10 、 $0.05\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 系列对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定Dmy各质量浓度(X)的峰面积(Y),得标准曲线方程 $Y=18.4265X-0.0973$, $r=0.9998$,表明Dmy在 $0.05\sim 8.00\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 存在良好的线性关系。

2.2.3 Dmy-Ste-NMs供试品溶液的制备 取Dmy-Ste-NMs混悬液1 mL至100 mL量瓶中,加乙醇60 mL,200 W功率超声6 min,放冷后加乙醇稀释定容。 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,精密取续滤液0.5 mL至50 mL量瓶中,加乙醇稀释定容即得Dmy-Ste-NMs供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 按“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液,另取Dmy对照品溶液和Dmy-Ste-NMs供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,结果见图1,Dmy色谱峰不受其他杂质干扰,专属性高。

2.2.5 精密度考察 取质量浓度为 0.05 、 2.00 、 $8.00\ \mu\text{g}/\text{mL}$ Dmy对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件

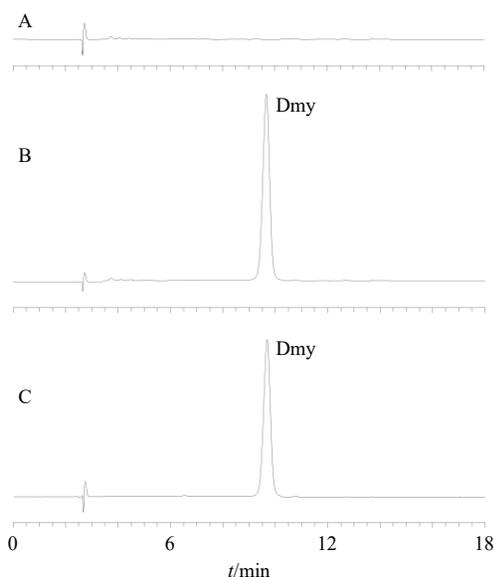


图1 阴性样品(A)、Dmy对照品(B)和Dmy-Ste-NMs样品(C)的HPLC图

Fig. 1 HPLC spectrum of negative sample (A), Dmy reference substance (B) and sample solution (C)

连续测定6次,计算得Dmy峰面积的RSD分别为0.83%、0.21%、0.24%,结果表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取Dmy-Ste-NMs供试品溶液置于室温(温度 $25\ ^\circ\text{C}$ 、相对湿度50%),分别于制备后0、2、6、12、18、24 h,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,计算得Dmy峰面积的RSD为0.90%,结果表明Dmy-Ste-NMs供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取Dmy-Ste-NMs混悬液,按“2.2.3”项下方法制备6份Dmy-Ste-NMs供试品溶液,并按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算得Dmy质量浓度的RSD为1.82%,结果表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 取Dmy-Ste-NMs混悬液 $0.5\ \text{mL}$,置100 mL量瓶中,共9份,分成低、中、高3组,分别加入Dmy对照品储备液(质量浓度为 $2.00\ \text{mg}/\text{mL}$) 2.5 、 5.0 、 $7.5\ \text{mL}$,按“2.2.3”项下方法制备Dmy-Ste-NMs供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别测定Dmy含量,计算加样回收率。结果显示,Dmy的平均加样回收率为100.43%,RSD为1.20%,结果表明该方法准确度较高。

2.2.9 包封率和载药量测定 精密取Dmy($m_{\text{投药量}}$),按“2.1”项下方法制备Dmy-Ste-NMs混悬液,过 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜,测定续滤液中Dmy质量($m_{\text{包封量}}$);取Dmy-Ste-NMs混悬液直接冷冻干燥,称定质量

($m_{总重量}$), 计算 Dmy-Ste-NMs 中 Dmy 的包封率和载药量^[19,21]。

$$\text{包封率} = m_{包载量} / m_{投药量}$$

$$\text{载药量} = m_{包载量} / m_{总质量}$$

2.3 Dmy-Ste-NMs 粒径和 ζ 电位测定

取 Dmy-Ste-NMs 混悬液蒸馏水稀释 20 倍, 于粒度测定仪上分别测定 Dmy-Ste-NMs 的粒径、PDI 值和 ζ 电位。

2.4 单因素考察 Dmy-Ste-NMs 处方工艺

2.4.1 药物质量浓度考察 固定甜菊糖苷质量浓度为 80 mg/mL, 水浴温度为 30 °C, 搅拌时间为 1 h 的条件下, 考察药物质量浓度对 Dmy-Ste-NMs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响, 结果见表 1。随着药物质量浓度的增加, Dmy-Ste-NMs 包封率和 ζ 电位绝对值逐渐下降; 载药量逐渐增加后趋稳, 说明甜菊糖苷在水相中自组装形成胶束后, 包载 Dmy 的量是有限的。药物质量浓度对 Dmy-Ste-NMs 包封率和载药量影响较大, 后续选择药物质量浓度 5~15 mg/mL 进行进一步优化。

表 1 药物质量浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
3	94.72±1.11	3.45±0.12	6.80±0.69	-18.24±1.06
5	94.58±1.43	5.62±0.16	6.81±0.52	-17.97±1.39
10	90.41±1.02	10.04±0.18	7.72±0.72	-17.69±2.01
15	72.69±0.87	10.98±0.13	6.64±0.48	-14.81±1.58
20	55.87±0.99	10.92±0.17	8.15±0.67	-14.56±1.26

2.4.2 甜菊糖苷质量浓度考察 固定药物质量浓度为 10 mg/mL, 水浴温度为 30 °C, 搅拌时间为 1 h 的条件下, 考察甜菊糖苷质量浓度对 Dmy-Ste-NMs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响, 结果见表 2。Dmy-Ste-NMs 包封率随着甜菊糖苷质量浓度增加而逐渐增加, 表明增加甜菊糖苷质量浓度利于增加 Dmy-Ste-NMs 包封率; 载药量随着甜菊糖苷质量浓度的增加, 呈现先增加后下降趋势, 表明甜菊糖苷质量浓度过大时影响 Dmy-Ste-NMs 载药量。Dmy-Ste-NMs 粒径随着甜菊糖苷质量浓度增加而有所波动, 但均小于 10 nm; 甜菊糖苷质量浓度对 ζ 电位影响相对较小, 其绝对值均在 17.00 mV 左右。可见甜菊糖苷质量浓度对 Dmy-Ste-NMs 包封率和载药量影响较大, 后续选择甜菊糖苷质量浓度 70~90 mg/mL 进行优化。

表 2 甜菊糖苷质量浓度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of stevioside mass concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

甜菊糖苷/ (mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
60	67.12±1.19	9.41±0.19	5.84±0.44	-16.87±0.89
70	83.29±0.97	10.53±0.14	4.27±0.66	-17.72±1.16
80	92.32±1.22	10.21±0.20	8.62±0.47	-17.50±1.24
90	94.06±1.54	9.31±0.15	6.91±0.52	-16.98±1.08
100	95.84±1.40	8.54±0.18	9.85±0.46	-16.72±0.96

2.4.3 水浴温度考察 固定药物质量浓度为 10 mg/mL, 甜菊糖苷质量浓度为 80 mg/mL, 搅拌时间为 1 h 的条件下, 考察水浴温度对 Dmy-Ste-NMs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响, 结果见表 3。随着水浴温度的增加, Dmy-Ste-NMs 包封率和载药量均呈先增加后下降趋势, 可能是温度对 Dmy 溶解度有一定影响, 温度升高时促使药物进入 Dmy-Ste-NMs 内部, 但 Dmy 在较高温度下发生不可逆氧化反应^[6,22], 最终使 Dmy-Ste-NMs 包封率和载药量下降。为降低温度对药物稳定性的影响, 故最终选择制备温度为 35 °C。

2.4.4 搅拌时间考察 固定药物质量浓度为 10 mg/mL, 甜菊糖苷质量浓度为 80 mg/mL, 水浴温度为 35 °C 条件下, 考察搅拌时间对 Dmy-Ste-NMs 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的影响, 结果见表 4。搅拌时间超过 2 h 后, Dmy-Ste-NMs 包封率和载药量出现明显下降情况, 可能是因为 Dmy 在含水溶剂中的热稳定性较差, 过长的搅拌时间导致药物降

表 3 水浴温度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

水浴温度/°C	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
25	82.44±0.96	9.07±0.22	4.97±0.39	-17.26±0.89
30	91.82±1.41	10.12±0.14	8.62±0.34	-17.47±0.97
35	94.73±1.36	10.47±0.16	5.78±0.34	-18.02±0.94
40	87.65±1.58	9.68±0.21	8.24±0.48	-16.79±1.12
45	80.26±0.98	8.73±0.17	6.92±0.53	-17.13±1.07

表 4 搅拌时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

搅拌时间/h	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	ζ 电位/mV
0.5	86.73±1.04	9.41±0.20	7.79±0.64	-15.85±0.87
1.0	91.17±0.96	10.02±0.18	6.67±0.28	-16.92±0.94
1.5	94.23±1.18	10.39±0.16	4.60±0.52	-17.53±0.56
2.0	89.70±1.34	10.09±0.19	5.19±0.44	-17.38±0.69
2.5	85.23±0.98	9.40±0.11	7.97±0.58	-16.89±0.78

解^[6,22],进而影响 Dmy-Ste-NMs 的包封率和载药量。可见搅拌时间对 Dmy-Ste-NMs 包封率和载药量的影响较大,后续选择搅拌时间 1.0~2.0 h 进行优化。

2.5 BBD-RSM 优化 Dmy-Ste-NMs 处方工艺

2.5.1 优化方案 Dmy-Ste-NMs 处方工艺单因素考察发现药物质量浓度、甜菊糖苷质量浓度和搅拌时间对 Dmy-Ste-NMs 包封率、载药量的影响较大,故

分别作为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 , 参考“2.4”项下单因素考察结果,各影响因素的水平设置见表 5。选择 Dmy-Ste-NMs 的包封率和载药量作为因变量 Y_1 和 Y_2 , 采用 BBD-RSM 优化 Dmy-Ste-NMs 处方工艺。按表 5 组合制备不同处方工艺的 Dmy-Ste-NMs (平行制备 3 批),测定其平均包封率和载药量,结果见表 5。

表 5 BBD-RSM 因素水平、试验设计和结果 ($n = 3$)

Table 5 BBD-RSM factor level, experimental design and results ($n = 3$)

序号	X_1 /(mg·mL ⁻¹)	X_2 /(mg·mL ⁻¹)	X_3 /h	Y_1 /%	Y_2 /%	序号	X_1 /(mg·mL ⁻¹)	X_2 /(mg·mL ⁻¹)	X_3 /h	Y_1 /%	Y_2 /%
1	5 (-1)	90 (+1)	1.5 (0)	91.89	4.77	10	5	80	2.0	80.26	4.68
2	10 (0)	70 (-1)	1.0 (-1)	82.74	10.32	11	15	70	1.5	72.69	12.29
3	5	80 (0)	1.0	90.21	5.22	12	10	90	2.0	72.02	7.15
4	10	70	2.0 (+1)	70.44	8.71	13	10	80	1.5	91.65	10.08
5	15 (+1)	90	1.5	79.23	11.01	14	10	80	1.5	93.04	10.41
6	10	80	1.5	94.14	10.56	15	15	80	2.0	70.43	10.94
7	10	80	1.5	92.98	10.21	16	15	80	1.0	77.14	11.76
8	5	70	1.5	88.87	5.79	17	10	80	1.5	91.87	10.30
9	10	90	1.0	85.62	8.46						

2.5.2 模型拟合及方差分析 采用 Design Expert V 10.0.3 软件对 Dmy-Ste-NMs 包封率 Y_1 和载药量 Y_2 进行拟合,得包封率 Y_1 方程 $Y_1 = 92.47 - 6.47 X_1 + 1.75 X_2 - 5.32 X_3 + 0.88 X_1 X_2 + 0.81 X_1 X_3 - 0.33 X_2 X_3 - 3.88 X_1^2 - 5.69 X_2^2 - 9.35 X_3^2$, 模型 $P < 0.000 1$, 失拟项 $P = 0.057 6$, R^2 和 R_{adj}^2 分别为 0.981 9 和 0.958 6。载药量 Y_2 方程 $Y_2 = 10.31 + 3.19 X_1 - 0.71 X_2 - 0.54 X_3 - 0.07 X_1 X_2 - 0.07 X_1 X_3 + 0.08 X_2 X_3 - 1.18 X_1^2 -$

$0.67 X_2^2 - 0.98 X_3^2$, 模型 $P < 0.000 1$, 失拟项 $P = 0.088 9$, R^2 和 R_{adj}^2 分别为 0.994 1 和 0.986 6。对于包封率 Y_1 和载药量 Y_2 方程来讲,分别仅有 4.14% 和 1.34% 变异不能用该模型解释,说明建立的包封率 Y_1 和载药量 Y_2 数学模型可用于 Dmy-Ste-NMs 处方工艺研究。

方差分析结果(表 6)显示,包封率 Y_1 模型中 X_1 、 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 具有极显著性差异,而 X_2 具

表 6 方差分析

Table 6 Analysis of variance

项目	自由度	Y_1				Y_2			
		平方和	均方	F值	P值	平方和	均方	F值	P值
模型	9	1 214.80	134.98	42.21	<0.000 1	101.07	11.23	131.69	<0.000 1
X_1	1	334.63	334.63	104.63	<0.000 1	81.54	81.54	956.15	<0.000 1
X_2	1	24.57	24.57	7.68	0.0276	4.09	4.09	47.96	0.000 2
X_3	1	226.42	226.42	70.80	<0.000 1	2.29	2.29	26.85	0.001 3
$X_1 X_2$	1	3.10	3.10	0.97	0.357 8	0.02	0.02	0.20	0.669 6
$X_1 X_3$	1	2.62	2.62	0.82	0.395 1	0.20	0.20	0.23	0.646 3
$X_2 X_3$	1	0.42	0.42	0.13	0.727 0	0.02	0.02	0.26	0.623 3
X_1^2	1	63.40	63.40	19.83	0.003 0	5.85	5.85	68.58	<0.000 1
X_2^2	1	136.10	136.10	42.56	0.000 3	1.88	1.88	22.07	0.002 2
X_3^2	1	367.74	367.74	114.99	<0.000 1	4.07	4.07	47.76	0.000 2
残差	7	22.39	3.20			0.60	0.09		
失拟相	3	18.33	6.11	6.03	0.057 6	0.46	0.15	4.54	0.088 9
总偏差	4	4.05	1.01			0.14	0.03		
总离差	16	1 237.19				101.67			

有显著性差异；载药量 Y_2 模型中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 具有极显著性差异。

2.5.3 响应面及处方工艺确定 根据建立的包封率和载药量数学模型分别绘制响应值与自变量的响应面图，结果见图 2。设置包封率和载药量均为望大

值，区间分别为 70%~95%和 4.5%~12.5%，得 Dmy-Ste-NMs 最佳处方工艺：药物质量浓度为 11.24 mg/mL，甜菊糖苷质量浓度为 79.75 mg/mL，搅拌时间为 1.36 h；根据“2.5.2”项下的拟合方程预测 Dmy-Ste-NMs 的包封率为 91.50%，载药量为 11.10%。

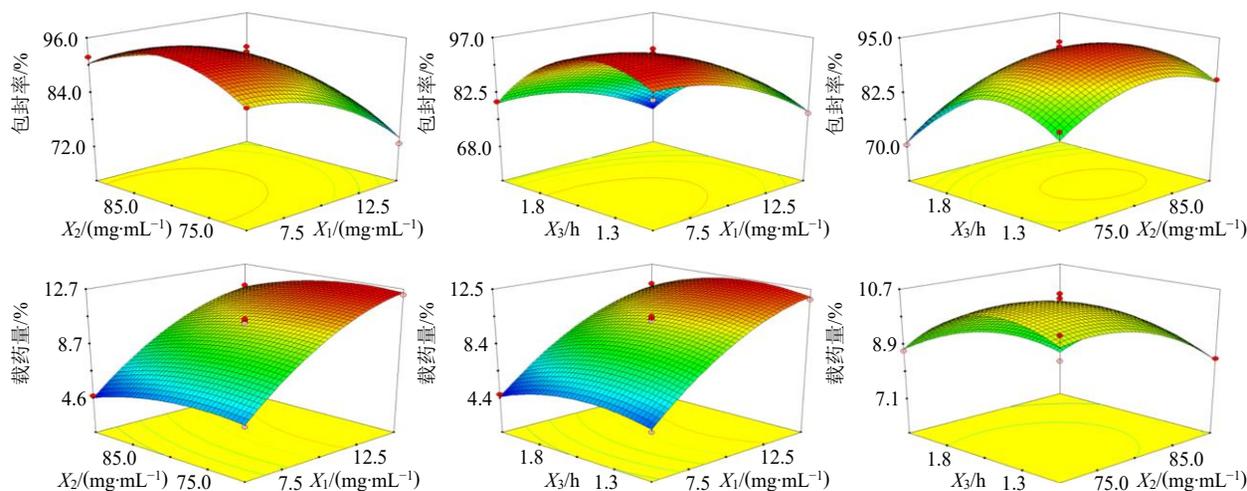


图 2 不同因素对包封率和载药量的效应面

Fig. 2 Response surface of different factor on envelopment efficiency and drug loading

2.6 Dmy-Ste-NMs 处方工艺验证

平行制备 3 批 Dmy-Ste-NMs，分别测定包封率和载药量，并计算相对偏差^[14-15]。结果见表 7，包封率和载药量相对偏差分别为-1.03%和-1.62%，绝对值均小于 2%，表明建立的包封率和载药量数学模型指导意义较强，精确度高。另测得 Dmy-Ste-NMs 的平均粒径为 (7.17 ± 0.65) nm，PDI 为 0.040 ± 0.008 ，粒径分布见图 3； ζ 电位为 (-17.53 ± 1.56) mV，电位分布见图 4。

2.7 TEM

将 Dmy-Ste-NMs 混悬液稀释 20 倍，取样品涂

敷在铜网上，1.5%磷钨酸钠染色，电烤灯烘干后用于 TEM 测定，其中 TEM 加速电压为 200 kV，放大倍数为 12 000。结果见图 5，可见，Dmy-Ste-NMs 的粒径与粒度测定仪测得粒径一致，均小于 10 nm，形状为类球形。

表 7 验证实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Results of confirmatory experiment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

项目	包封率/%	载药量/%
实际值	90.56 ± 1.17	10.92 ± 0.16
预测值	91.50	11.10
偏差/%	-1.03	-1.62

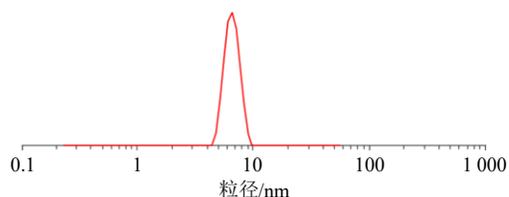


图 3 Dmy-Ste-NMs 粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of Dmy-Ste-NMs

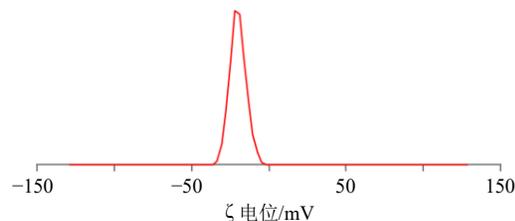


图 4 Dmy-Ste-NMs 的 ζ 电位

Fig. 4 ζ Potential of Dmy-Ste-NMs

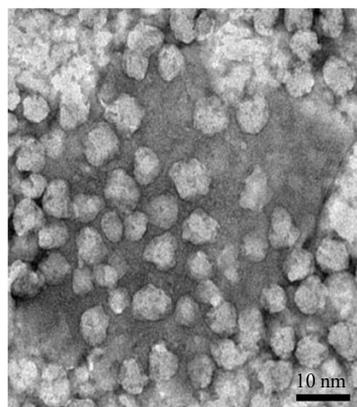


图 5 Dmy-Ste-NMs 的 TEM 图

Fig. 5 TEM diagram of Dmy-Ste-NMs

2.8 Dmy-Ste-NMs 样品外观及溶解度测定

按“2.1”项下方法将 Dmy-Ste-NMs 混悬液直接冻干制成粉末, Dmy-Ste-NMs 混悬液、Dmy-Ste-NMs 粉末及蒸馏水复溶后外观见图 6。复溶后 Dmy-Ste-NMs 的平均粒径为 (6.69 ± 0.67) nm, PDI 为 0.039 ± 0.006 , ζ 电位为 (-15.74 ± 1.60) mV。

分别取过量 Dmy 原料药和 Dmy-Ste-NMs 粉末置于模拟胃液(含胃蛋白酶, pH 2.0)、蒸馏水和模拟肠液(含胰蛋白酶, pH 7.4), 超声 20 min 后置于 25 °C 恒温振荡器中振摇 2 d, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 测定上清液中 Dmy 质量浓度。结果见表 8, Dmy-Ste-NMs 使 Dmy 在不同介质中的溶解度均得到极显著性提高 ($P < 0.01$)。

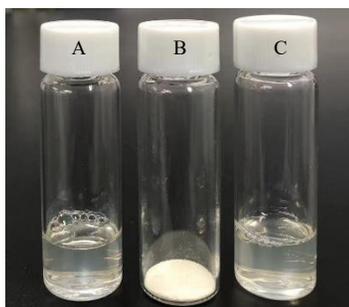


图 6 Dmy-Ste-NMs 混悬液 (A)、粉末 (B) 和复溶样品 (C) 外观

Fig. 6 Appearance of Dmy-Ste-NMs suspension (A), powder (B) and redissolved sample (C)

表 8 溶解度测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Determination results of solubility ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

介质	溶解度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	
	Dmy	Dmy-Ste-NMs 粉末
模拟胃液	194.82 ± 2.63	$1\ 847.91 \pm 14.25^{**}$
蒸馏水	246.19 ± 2.90	$2\ 006.58 \pm 11.68^{**}$
模拟肠液	306.43 ± 4.02	$1\ 648.02 \pm 15.77^{**}$

与 Dmy 比较: $^{**}P < 0.01$ 。

$^{**}P < 0.01$ vs dihydromyricetin.

2.9 晶型分析

X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 法扫描条件: Cu-K α 靶, 扫描速度和范围 (2θ) 分别为 $4^\circ/\text{min}$ 和 $3^\circ \sim 45^\circ$ 。取 Dmy 原料药、甜菊糖苷、物理混合物 (Dmy 与甜菊糖苷比例同 Dmy-Ste-NMs 粉末) 和 Dmy-Ste-NMs 粉末适量进行扫描, 结果见图 7。Dmy 在 16.8° 和 25.7° 2 处衍射峰最强, 在物理混合物 XRPD 图谱中仍可见, 表明简单混合并未使 Dmy 的晶型发生改变; 在 Dmy-Ste-NMs 粉末的图谱中, Dmy 的 2 处特征衍射峰均

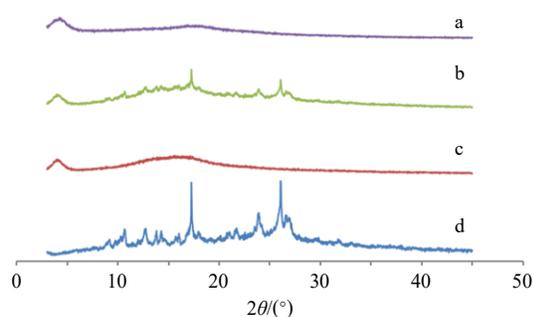


图 7 Dmy-Ste-NMs 粉末 (a)、物理混合物 (b)、甜菊糖苷 (c)、Dmy 原料药 (d) 的 XRPD 结果

Fig. 7 XRPD results of Dmy-Ste-NMs powder (a), physical mixture (b), stevioside (c) and Dmy bulk drug (d)

消失, 证明 Dmy 的晶型状态可能发生了改变。

2.10 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 分析

取 Dmy 原料药、甜菊糖苷、物理混合物 (Dmy 与甜菊糖苷比例同 Dmy-Ste-NMs 粉末) 和 Dmy-Ste-NMs 粉末适量, 与溴化钾按质量比 1 : 100 研磨均匀, 压片后立即测试。FT-IR 测试条件: 光阑为 100.0, 样品扫描次数为 16 次, 分辨率为 4.0。结果见图 8, 在甜菊糖苷 FT-IR 中, $3\ 399.14\ \text{cm}^{-1}$ 宽峰是羟基伸缩振动, $2\ 936.89\ \text{cm}^{-1}$ 是 C-H 伸缩振动, $1\ 735.04$ 、 $1\ 629.93\ \text{cm}^{-1}$ 分别是 C=O 和 C=C 伸缩振动; 在 Dmy 原料药 FT-IR 中, $3\ 480.82$ 、 $3\ 350.90\ \text{cm}^{-1}$ 是 Dmy 羟基伸缩振动 ($\nu_{\text{O-H}}$); 在物理混合物 FT-IR 中分别轻微移动至 $3\ 481.09$ 、 $3\ 351.07\ \text{cm}^{-1}$ 处, 但在 Dmy-Ste-NMs 粉末的 FT-IR 中消失, 在 $3\ 347.18\ \text{cm}^{-1}$ 处出现 1 个宽峰, 提示 Dmy 羟基与甜菊糖苷可能发生了氢键络合作用。

2.11 体外释药行为研究及模型拟合

取 Dmy 原料药和 Dmy-Ste-NMs 粉末适量 (使

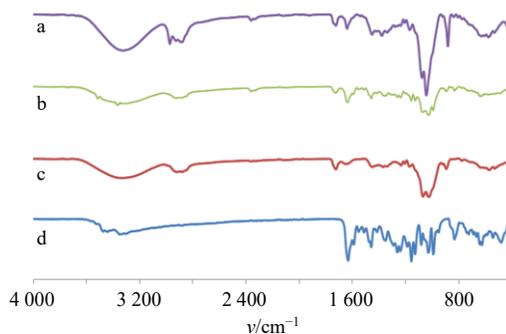


图 8 Dmy-Ste-NMs 粉末 (a)、物理混合物 (b)、甜菊糖苷 (c)、Dmy 原料药 (d) 的 FT-IR 图

Fig. 8 FT-IR spectroscopy of Dmy-Ste-NMs powder (a), physical mixture (b), stevioside (c) and Dmy bulk drug (d)

Dmy 质量为 40 mg), 加入 5 mL 模拟胃液 (含胃蛋白酶, pH 2.0) 得混悬液, 转移至透析袋 (截留相对分子质量 8 000~14 000) 中, 扎紧, 另取 Dmy 溶液 (乙醇溶解, Dmy 质量浓度 8.0 mg/mL) 5 mL 作为对比。采用模拟胃液 1 000 mL 作为介质 (37 °C), 转篮转速为 75 r/min。各时间点取样 5 mL 后立即补加 5 mL 空白释放介质, 0.22 μm 微孔滤膜滤过样品, 进样测定 Dmy 含量。同法考察在模拟肠液 (含胰蛋白酶, pH 7.4) 中的释药行为, 结果见图 9、10。Dmy 原料药在 2 种释放介质中的累积释放率均较低, Dmy 溶液在模拟肠液中的累积释放率在 3 h 后出现明显下降情况, 可能与 Dmy 在 pH 值较高的介质中容易降解有关^[6]。与 Dmy 原料药相比, Dmy-Ste-NMs 使 Dmy 累积释放率得到明显增加, 且具有缓释特征。释药模型的拟合结果见表 9, 根据 *r* 可知, Dmy-Ste-NMs 在模拟胃液和模拟肠液中释药分别符合 Higuchi 模型和 Weibull 模型。

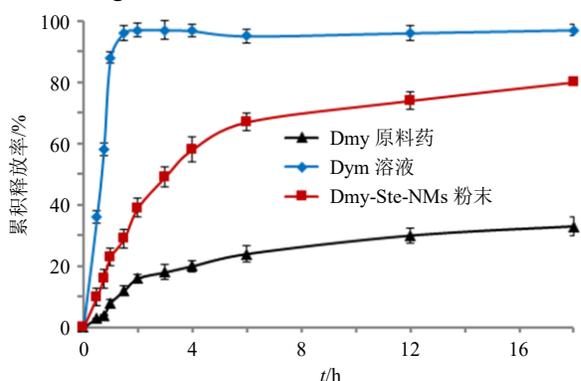


图 9 Dmy 原料药、Dmy 溶液和 Dmy-Ste-NMs 在模拟胃液中体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Release profiles *in vitro* of Dmy bulk drug, Dmy solution and Dmy-Ste-NMs in simulate gastric fluids ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

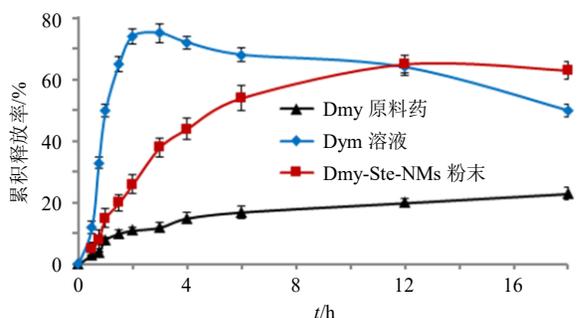


图 10 Dmy 原料药、Dmy 溶液和 Dmy-Ste-NMs 在模拟肠液中体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Release profiles *in vitro* of Dmy bulk drug, Dmy solution and Dmy-Ste-NMs in simulated intestinal fluids ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 9 Dmy-Ste-NMs 释放模型拟合结果

介质	模型	拟合方程	<i>r</i>
模拟胃液	一级	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.087t - 0.257$	0.905 8
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.201t^{1/2} + 0.064$	0.973 1
	Weibull	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.858 \ln t - 1.597$	0.901 3
模拟肠液	一级	$\ln(1-M_t/M_\infty) = -0.058t - 0.181$	0.864 9
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.173t^{1/2} + 0.012$	0.926 8
	Weibull	$\ln \ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.812 \ln t - 1.905$	0.945 4

t 代表时间; M_t 和 M_∞ 分别为 *t* 和 ∞ 时的累积释放率; M_t/M_∞ 为 *t* 时间累积释放百分率。

t is time, M_t and M_∞ were accumulative drug-release at time *t* and ∞, M_t/M_∞ is accumulative release rate at time *t*.

2.12 模拟胃、肠液消化考察

采用模拟胃液 (含胃蛋白酶, pH 2.0), 分别配制 Dmy 原料药、物理混合物 (Dmy 与甜菊糖苷比例同 Dmy-Ste-NMs 粉末) 和 Dmy-Ste-NMs 冻干粉的溶液 (Dmy 质量浓度均为 0.18 mg/mL), 于 37 °C 水浴中 600 r/min 磁力搅拌, 分别于 0、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 h 取样 1 mL, 立即置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释定容, 摇匀后过 0.22 μm 微孔滤膜, 测定 Dmy 含量, 计算保留率。同法考察各个样品在模拟肠液 (含胰蛋白酶, pH 7.4) 中的保留率, 各样品中 Dmy 质量浓度均为 0.30 mg/mL, 结果分别见图 11、12。Dmy 原料药在模拟胃液中稳定性较高, 6 h 保留率为 (85.57 ± 2.90)%; 但在模拟肠液中随着孵育时间的延长, Dmy 保留率逐渐下降, 6 h 保留率仅为 (21.12 ± 2.89)%, 说明 Dmy 在模拟肠液中稳定性较差。Dmy-Ste-NMs 在模拟肠液中 6 h 保留率为 (52.06 ± 3.12)%, 说明 Dmy-Ste-NMs 可增加 Dmy 在模拟肠液中的稳定性。

2.13 Dmy-Ste-NMs 粉末稳定性考察

取 Dmy-Ste-NMs 粉末, 加蒸馏水复溶, 过 0.22

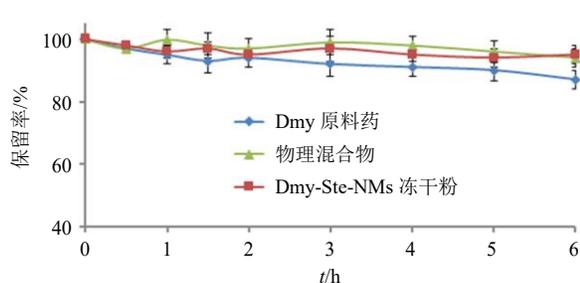


图 11 Dmy 原料药、物理混合物和 Dmy-Ste-NMs 冻干粉在模拟胃液中保留率变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Changes of retention rate of Dmy bulk drug, physical mixtures and Dmy-Ste-NMs freeze-dried powder in simulate gastric fluids ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

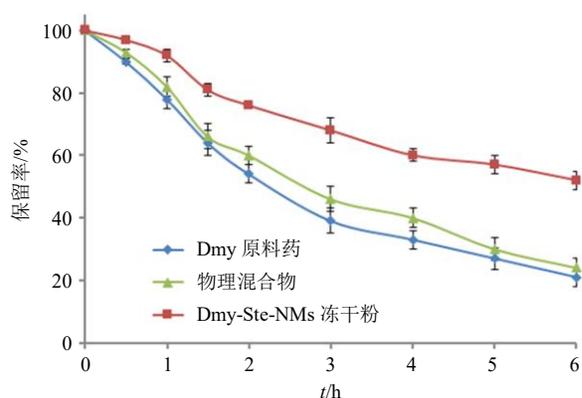


图 12 Dmy 原料药、物理混合物和 Dmy-Ste-NMs 冻干粉在模拟肠液中保留率变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Changes of retention rate of Dmy bulk drug, physical mixtures and Dmy-Ste-NMs freeze-dried powder in simulated intestinal fluids ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

μm 微孔滤膜, 取续滤液测定 Dmy-Ste-NMs 中 Dmy 的质量 ($m_{\text{放置后}}$), 并与新制备 Dmy-Ste-NMs 混悬液中药物质量 ($m_{\text{新制备}}$) 相比, 计算沉降率。

$$\text{沉降率} = (m_{\text{新制备}} - m_{\text{放置后}}) / m_{\text{新制备}}$$

取 Dmy-Ste-NMs 粉末密封置于恒温恒湿箱 (温度和相对湿度分别为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 55%), 分别于 0、1、2、3、6 个月取样, 测试沉降率、包封率、载药量、粒径及溶解度, 结果见表 10。Dmy-Ste-NMs 粉末 6 个月后沉降率仍小于 2%, 包封率大于 88%, 载药量大于 10%, 粒径小于 10 nm, 溶解度均在 $2\,000\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 左右, 表明 Dmy-Ste-NMs 粉末储存稳定性良好。

表 10 稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Results of stability study ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/月	沉降率/%	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	溶解度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
0	1.17 ± 0.09	88.63 ± 1.15	10.57 ± 0.22	6.02 ± 0.51	$1\,996.14 \pm 30.68$
1	1.08 ± 0.04	89.04 ± 0.89	10.52 ± 0.14	6.79 ± 0.39	$2\,007.43 \pm 35.14$
2	1.24 ± 0.10	88.37 ± 1.27	10.38 ± 0.16	6.09 ± 0.44	$1\,989.67 \pm 26.78$
3	1.59 ± 0.08	88.49 ± 0.75	10.29 ± 0.23	7.59 ± 0.76	$1\,994.02 \pm 36.46$
6	1.85 ± 0.12	88.16 ± 0.94	10.25 ± 0.18	6.77 ± 0.29	$1\,990.71 \pm 22.80$

2.14 口服药动力学研究

2.14.1 给药及采血方案 取 Dmy 原料药、物理混合物 (Dmy 与甜菊糖苷比例同 Dmy-Ste-NMs 粉末) 和 Dmy-Ste-NMs 粉末适量, 采用温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 0.5% CMC-Na 水溶液配制灌胃液。取 SD 大鼠 18 只, 随机平均分成 3 组, 标记, 称定质量后, 按 $80\text{ mg}/\text{kg}$ 剂量 (以 Dmy 计) ig 给药, 分别于给药后 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、12 h 眼眶后静脉丛采血约 0.25 mL, 置肝素化离心管中,

2 500 r/min 离心 (离心半径 8.6 cm) 2 min, 取上层血浆冷冻保存。

2.14.2 血浆样品处理 采用乙腈配制质量浓度为 $1\,000\text{ ng}/\text{mL}$ 的二氢槲皮素对照品溶液, 作为内标。精密取 $100\ \mu\text{L}$ 血浆样品置离心管中, 加入 $40\ \mu\text{L}$ 内标和 2 mL 1% 甲酸乙腈溶液, 涡旋 5 min, $8\,500\text{ r}/\text{min}$ 离心 (离心半径 8.6 cm) 5 min。取有机层至空白离心管中, 氮气吹干, 加 $100\ \mu\text{L}$ 乙腈复溶, 待测。

2.14.3 线性关系考察 采用空白血浆配制质量浓度为 2 000、1 000、500、250、100、33.33 ng/mL Dmy 血浆对照品溶液。按“2.14.2”项下方法操作, 进样 $20\ \mu\text{L}$, 测试 Dmy 和二氢槲皮素峰面积, 采用两者峰面积比为纵坐标 (Y), Dmy 质量浓度为横坐标 (X), 得标准曲线方程为 $Y = 0.003\,4X - 0.342\,6$, $r = 0.995\,3$, 结果表明 Dmy 血浆对照品溶液在 $33.33 \sim 2\,000.00\text{ ng}/\text{mL}$ 存在良好的线性关系。

2.14.4 专属性考察 取空白血浆、Dmy 血浆对照品溶液 (质量浓度为 $250\text{ ng}/\text{mL}$, 按“2.14.2”项下方法操作, 添加内标) 和血浆样品溶液 (Dmy 原料药给药 4 h, 按“2.14.2”项下方法操作, 添加内标), 分别进样 $20\ \mu\text{L}$ 测试, 结果见图 13, Dmy 和二氢槲皮素色谱峰均未受其他杂质干扰, 专属性较高。

2.14.5 精密度考察 取质量浓度分别为 33.33、500.00、2 000.00 ng/mL 的 Dmy 血浆对照品溶液, 按“2.14.2”项下方法操作, 添加内标, 连续进样测试 6 次, 记录 Dmy 和二氢槲皮素峰面积, 计算得两者峰面积比值的 RSD 分别为 9.45%、4.12%、3.95%; 各个质量浓度分别测试 6 d, 每天测试 1 次, 计算得两者峰面积比值的 RSD 分别为 7.42%、4.18%、4.80%, 表明日内、日间精密度良好。

2.14.6 稳定性考察 取物理混合物 ig 给药 1.5 h 血浆样品, 按“2.14.2”项下方法处理, 得 $200\ \mu\text{L}$ 血浆样品溶液, 分别于处理后 0、2、4、8、12、24 h 进样测试, 记录 Dmy 和二氢槲皮素峰面积, 计算得两者峰面积比值的 RSD 为 6.13%, 表明血浆样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.14.7 加样回收率考察 取质量浓度分别为 33.33、500.00、2 000.00 ng/mL 的血浆对照品溶液, 进样测定 Dmy 和二氢槲皮素的峰面积, 计算 Dmy 的测得质量浓度, 与配制质量浓度对比计算加样回收率。计算得平均加样回收率为 95.81%, RSD 为 7.02%, 表明回收率较高。

2.14.8 检测限与定量限考察 取 $50\text{ ng}/\text{mL}$ Dmy 血

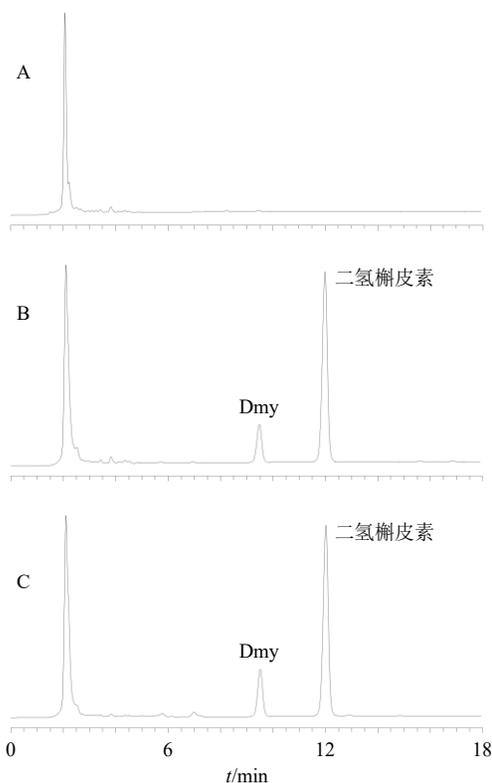


图 13 空白血浆 (A)、Dmy 血浆对照品溶液+内标 (B) 和血浆样品溶液+内标 (C) 的 HPLC 图

Fig. 13 HPLC of blank plasma (A), Dmy plasma reference solution + internal standard (B) and plasma sample solution + internal standard (C)

浆对照品溶液, 逐步稀释, 以信噪比为 10 : 1 和 3 : 1 分别确定定量限和检测限。结果表明, Dmy 定量限和检测限分别为 15、5 ng/mL。

2.14.9 药动力学考察结果 绘制 Dmy 原料药、物理混合物和 Dmy-Ste-NMs 粉末的药-时曲线, 结果见图 14。

采用 DAS 2.0 软件对血药浓度进行处理, 非房室模型法计算统计矩参数, 结果见表 11。物理混合物的半衰期 (half time, $t_{1/2}$)、达峰时间 (peak time, t_{max})、达峰浓度 (peak concentration, C_{max})、血药浓度-时间曲线下面积 (area under the curve, AUC) 等参数, 与 Dmy 相比均具有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明甜菊糖苷对 Dmy 的口服吸收有促进作用, C_{max} 和相对生物利用度提高至 1.47 倍和 1.41 倍。Dmy-Ste-NMs 药动力学参数与物理混合物相比, 均具有显著性或极显著性差异 ($P < 0.05$ 、0.01), t_{max} 提前至 (0.71 ± 0.17) h, $t_{1/2}$ 延长至 (4.33 ± 0.59) h, C_{max} 和相对生物利用度增加至 3.83 倍和 4.60 倍, 表明 Dmy-Ste-NMs 促吸收作用优于物理混合物。

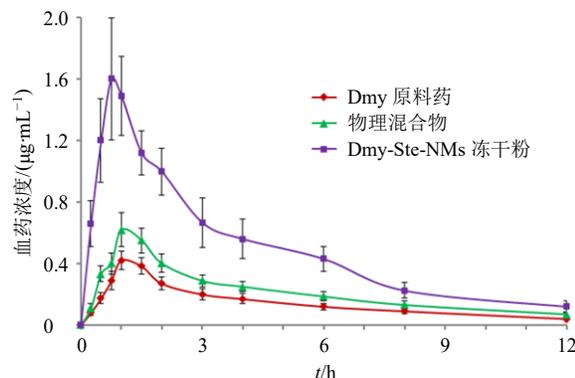


图 14 Dmy 原料药、物理混合物和 Dmy-Ste-NMs 冻干粉的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 14 Plasma concentration-time profiles of Dmy bulk drug, physical mixtures and Dmy-Ste-NMs freeze-dried powder ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 11 Dmy 原料药、物理混合物和 Dmy-Ste-NMs 冻干粉的主要药动力学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 11 Main pharmacokinetic parameters of Dmy bulk drug, physical mixtures and Dmy-Ste-NMs freeze-dried powder ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

参数	单位	Dmy 原料药	物理混合物	Dmy-Ste-NMs
t_{max}	h	1.11 ± 0.27	1.19 ± 0.24	0.71 ± 0.17 [#]
$t_{1/2}$	h	3.04 ± 0.62	3.65 ± 0.66	4.33 ± 0.59 ^{###}
C_{max}	ng·mL ⁻¹	426.63 ± 80.96	628.71 ± 168.80 [*]	1 633.91 ± 382.36 ^{**###}
AUC _{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	1 337.04 ± 156.56	1 879.38 ± 227.77 [*]	6 152.31 ± 812.79 ^{**###}
AUC _{0-∞}	ng·h·mL ⁻¹	1 381.76 ± 167.27	1 981.15 ± 246.82 [*]	6 429.98 ± 889.74 ^{**###}

与 Dmy 比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与物理混合物比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ 。

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs dihydroquercetin; [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ vs physical mixture.

3 讨论

本研究采用天然来源的甜菊糖苷作为纳米胶束载体, 成功制备了 Dmy-Ste-NMs, 与其他化学合成的高分子材料相比具有价格低廉、安全性好等优势, 更具有临床推广价值。推测 Dmy-Ste-NMs 形成过程为甜菊糖苷作为一种两亲性物质, 遇水后自组装形成亲水基团朝外、疏水基团在内的胶束结构。Dmy 疏水性较强, 在疏水力和浓度梯度驱使下使药物进入胶束疏水性核心, 从而实现载药并形成 Dmy-Ste-NMs。黄酮类化合物的稳定性与其分子结构 B 环中羟基数量有关, 羟基越多稳定性越低^[6]。Dmy 分子结构的 B 环上含 3 个羟基, 随着介质 pH 值升高, Dmy 脱质子趋势愈强, 故在 pH 值较高环境中容易发生降解、自氧化、异构化等。因而在制备 Dmy 制剂时应温度进行严格控制, 但这个关键点往往被制剂研究者忽略^[11-12], 本研究中 Dmy-Ste-NMs 制备

温度为 35 °C。

FT-IR 分析结果表明, Dmy 和甜菊糖苷之间可能发生了氢键络合作用, 使构成的核壳结构更为牢固, 有利于增加制剂稳定性^[23]。Dmy 以非结晶态或分子状态高度分散在 Dmy-Ste-NMs 粉末中, 可通过减小药物粒径、改变晶型等, 使 Dmy 溶解度及溶出度得到极大改善^[23], 解决了体内吸收瓶颈。

模拟肠液消化考察结果显示, Dmy-Ste-NMs 保留率高于 Dmy, 增加了 Dmy 在模拟肠液中的稳定性, 可能是由于 Dmy-Ste-NMs 的包载作用, 降低了药物在模拟肠液中的破坏几率, 有利于增加体内吸收量。体外释药考察结果显示, Dmy-Ste-NMs 在模拟胃、肠液介质中均具有缓释特点, 有助于包载在 Dmy-Ste-NMs 中的药物通过小肠上皮细胞以内吞作用进入体循环, 从而有助于避免首关效应等^[13], 增加 Dmy 口服吸收程度。

物理混合物的 C_{\max} 、 $AUC_{0\sim t}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ 等药动学参数均出现增加, 对 Dmy 体内吸收发挥了积极作用, 可能是甜菊糖苷具有表面活性剂作用, 增加了药物水溶性和溶出度; 甜菊糖苷可增强机体胃肠道蠕动^[24], 有利于增加药物吸收; 在胃肠道蠕动下, 甜菊糖苷可能和 Dmy 形成胶束^[25], 从而发挥胶束的促吸收作用。

与 Dmy 原料药混悬液相比, Dmy-Ste-NMs 的 t_{\max} 显著性提前至 (0.71 ± 0.17) h, 可能是 Dmy-Ste-NMs 显著提高了 Dmy 的溶解度和溶出度, 促使药物快速吸收, 且 Dmy-Ste-NMs 粒径较小, 有利于快速穿过胃肠上皮表面黏液层进入血液循环, 最终使 t_{\max} 提前。Dmy-Ste-NMs 的 $t_{1/2}$ 极显著性地延长至 (4.33 ± 0.59) h, 可能与 Dmy-Ste-NMs 中药物缓慢释药特点有关^[26-27]; Dmy 在肠道中稳定性差, Dmy-Ste-NMs 可对包裹的药物起到保护作用, 因而使后期 C_{\max} 水平及 $t_{1/2}$ 均增大。

Dmy-Ste-NMs 相对口服生物利用度增加至 4.60 倍, 显著增加了药物吸收, 可能是因为 Dmy-Ste-NMs 增加了 Dmy 的溶解度及溶出度; Dmy-Ste-NMs 使药物粒径极大下降, 促进了药物肠道渗透吸收^[28]; Dmy-Ste-NMs 增加了药物在肠道的稳定性, 增加了吸收量; Dmy-Ste-NMs 处方中甜菊糖苷具有增加 Dmy 体内吸收作用, 因此, Dmy-Ste-NMs 改变了 Dmy 口服药动学行为, 增加了体内吸收。

甜菊糖苷本身具有防腐性能^[18], 可提高制剂的储存稳定性及使用安全性。甜菊糖苷还具有降血糖、

调血脂、改善糖耐量与胰岛素分泌水平等作用, 可辅助治疗糖尿病及其心血管并发症^[29], 属于药食两用材料, 这些优势是常见胶束材料所不具备的, 因而将甜菊糖苷作为胶束载体使用具有极大研究开发价值和临床推广价值。但甜菊糖苷本身的甜后苦涩味, 会给口服制剂带来一定的不良口感, 需要进行制剂学研究并加以改善。

综上, Dmy-Ste-NMs 处方工艺简单, 载体辅料安全性好, 避免了有机溶剂的使用, 且 Dmy-Ste-NMs 粉末稳定性良好, 并显著增加了药物吸收, 为后续研究奠定了实验基础。本研究也为天然来源的甜菊糖苷用于递药系统研究提供了有价值的借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 樊庆涛, 罗微, 刘梁, 等. 来凤藤茶中二氢杨梅素的纯化工艺研究 [J]. 食品研究与开发, 2022, 43(3): 117-122.
- [2] 石依姗, 方建国, 施春阳, 等. 二氢杨梅素抗菌、抗病毒作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(2): 408-413.
- [3] Nie H, Ji T, Fu J, *et al.* Molecular mechanisms and promising role of dihydromyricetin in cardiovascular diseases [J]. *Physiol Res*, 2022, 71(6): 749-762.
- [4] Zhang R R, Zhang H, Shi H Y, *et al.* Strategic developments in the drug delivery of natural product dihydromyricetin: Applications, prospects, and challenges [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 3052-3070.
- [5] 苏东林, 黄继红, 姚茂君. 二氢杨梅素的急性毒理学评价及对酒精性肝损伤的防治效果 [J]. 湖南农业科学, 2009(11): 90-93.
- [6] 孙翠翠. 二氢杨梅素生物利用度的提高及改善阿尔茨海默症作用研究 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2021.
- [7] 王晨光. 基于药代动力学性质的藤茶中二氢杨梅素构型和晶型研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2016.
- [8] Huang Y X, Zhao J Y, Jian W, *et al.* Effects of verapamil on the pharmacokinetics of dihydromyricetin in rats and its potential mechanism [J]. *Xenobiotica*, 2018, 48(8): 839-844.
- [9] Liu L, Yin X L, Wang X, *et al.* Determination of dihydromyricetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 657-662.
- [10] 田茂仙, 李娟, 施春阳, 等. 制剂新技术与新剂型提高二氢杨梅素生物利用度的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(10): 1160-1164.
- [11] Du L X, Lu H L, Xiao Y F, *et al.* Protective effect and

- pharmacokinetics of dihydromyricetin nanoparticles on oxidative damage of myocardium [J]. *PLoS One*, 2024, 19(4): e0301036.
- [12] 郜娜, 范明松, 杨庆宇, 等. 二氢杨梅素磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备、表征及药动学研究 [J]. 中草药, 2019, 50(17): 4060-4067.
- [13] 尚慧杰, 杨金枝, 张付利. 岩白菜素 Soluplus/TPGS 混合胶束的制备、表征及体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(11): 1248-1254.
- [14] 董丹丹, 焦红军, 郝海军. 根皮素聚乙二醇-聚乳酸纳米胶束的制备、表征及口服药动学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 779-788.
- [15] 董亚楠, 任书强, 柳超, 等. 蒙花苷巯基化纳米胶束的制备、表征及其口服吸收生物利用度评价 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7776-7787.
- [16] 张嘉, 李贻奎, 李连达, 等. 聚山梨酯-80 和泊洛沙姆 188 等 4 种增溶剂对小鼠的急性毒性 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(17): 1491-1493.
- [17] Bauer T A, Alberg I, Zengerling L A, *et al.* Tuning the cross-linking density and cross-linker in core cross-linked polymeric micelles and its effects on the particle stability in human blood plasma and mice [J]. *Biomacromolecules*, 2023, 24(8): 3545-3556.
- [18] Luo S W, Yu L J, Song J F, *et al.* Hybridization of glucosyl stevioside and hydroxypropyl methylcellulose to improve the solubility of lutein [J]. *Food Chem*, 2022, 394: 133490.
- [19] 张童童. 甜菊糖苷的酶促糖基化及其表面活性的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- [20] Wang J, Li Q Q, Chen Z K, *et al.* Improved bioavailability and anticancer efficacy of hesperetin on breast cancer via a self-assembled rebaudioside A nanomicelles system [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 419: 115511.
- [21] 陈宁, 唐祉娟, 刘冰, 等. 海星皂苷类化合物抗肿瘤分子对接研究 [J]. 化学与生物工程, 2022, 39(10): 50-55.
- [22] 黄郁梅, 洪正善, 杨柯, 等. 二氢杨梅素稳定性影响因素及抑菌活性研究进展 [J]. 药学研究, 2017, 36(9): 531-533.
- [23] 王燕, 周应学. 单分子胶束的制备及应用研究进展 [J]. 化学研究与应用, 2024, 36(1): 10-27.
- [24] Han X F, Chen C X, Zhang X L, *et al.* Effects of dietary stevioside supplementation on feed intake, digestion, ruminal fermentation, and blood metabolites of goats [J]. *Animals*, 2019, 9(2): 32.
- [25] 李君霞, 曹亚蕊, 王金涛, 等. 延胡索乙素磷脂复合物及其固体分散体、油制剂、纳米混悬剂的制备及药动学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(14): 4307-4316.
- [26] 王慧弟, 张金坤, 郭进. 负载 α -常春藤皂苷聚合物胶束的制备与体内外评价 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(1): 123-129.
- [27] 叶世莉, 刘思美, 张丽华, 等. 款冬花多糖磁性纳米粒的制备工艺研究 [J]. 化学与生物工程, 2023, 40(11): 28-34.
- [28] 杨璞, 李晓, 宋亚琼, 等. 二氢杨梅素混合胶束的制备、表征及药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(10): 2351-2360.
- [29] 童红梅, 王保平, 宋巧, 等. 甜菊糖苷干预对高脂血 T2DM 大鼠生化指标的影响 [J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(7): 15-20.

[责任编辑 郑礼胜]