

马来酰亚胺修饰的柠檬苦素纳米粒的制备、表征及其口服药动力学研究

陈永顺¹, 杨 斌^{2*}

1. 商丘医学高等专科学校, 河南 商丘 476000

2. 广西医科大学, 广西 南宁 530021

摘要: 目的 制备马来酰亚胺修饰的柠檬苦素纳米粒 (maleimide-modified limonin nanoparticles, Mal-Lim-NPs), 对其理化性质进行表征, 并研究其口服药动力学行为。方法 单因素结合 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 Mal-Lim-NPs 处方工艺, 并制成冻干粉。X 射线粉末衍射法 (X-ray powder diffraction, XRPD) 分析柠檬苦素在 Mal-Lim-NPs 冻干粉中的晶型, 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察 Mal-Lim-NPs 微观外貌, 测定 Mal-Lim-NPs 冻干粉在 pH 2.0、5.0、6.8 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中的溶解度和释放度。SD 大鼠分别 ig 给予柠檬苦素和 Mal-Lim-NPs 冻干粉, 绘制血药浓度-时间曲线, 计算主要药动力学参数。结果 Mal-Lim-NPs 最佳处方: 马来酰亚胺-聚乙二醇-聚乳酸 [maleimide-methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid), Mal-PEG-PLA] 与柠檬苦素用量比为 7.5:1, 水相体积为 35 mL, 超声时间为 13 min。Mal-Lim-NPs 的平均包封率、载药量、粒径和 ζ 电位分别为 $(81.63 \pm 1.30)\%$ 、 $(9.32 \pm 0.24)\%$ 、 (171.56 ± 6.63) nm 和 (-16.60 ± 0.92) mV。柠檬苦素在 Mal-Lim-NPs 冻干粉中晶型状态可能发生了改变, 冻干粉复溶后 Mal-Lim-NPs 微观外貌仍近似球形。Mal-Lim-NPs 冻干粉在 pH 2.0、5.0、6.8 PBS 中的释药行为均符合 Weibull 模型。Mal-Lim-NPs 达峰时间 ($t_{\max}$) 延后至 (2.61 ± 0.40) h, 末端消除半衰期 ($t_{1/2}$) 延长至 (6.73 ± 1.54) h, 药峰浓度 ($C_{\max}$) 和时间曲线下面积 ($AUC_{0 \sim t}$ 、 $AUC_{0 \sim \infty}$) 分别提高至柠檬苦素的 4.01 倍和 5.65、5.89 倍。结论 Mal-Lim-NPs 改变了柠檬苦素体内药动力学行为, 显著增加了口服药物吸收, 为后续研究奠定基础。

关键词: 柠檬苦素; 纳米粒; 马来酰亚胺修饰; Box-Behnken 设计-效应面法; 体外释药; 口服药动力学

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)02-0487-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.012

Maleimide-modified limonin nanoparticles: Preparation, characterization and its oral pharmacokinetics study

CHEN Yongshun¹, YANG Bin²

1. Shangqiu Medical College, Shangqiu 476000, China

2. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Abstract: Objective To prepare maleimide-modified limonin nanoparticles (Mal-Lim-NPs), characterize its physicochemical properties, and study its oral pharmacokinetic behavior. **Methods** Single factor experiments combined with Box-Behnken response surface design method (BBD-RSM) was used to gain optimal prescriptions of Mal-Lim-NPs, and its lyophilized powder was prepared. Crystal form of limonin in lyophilized powder of Mal-Lim-NPs was analyzed by X-ray powder diffraction (XRPD), and microscopic appearance was observed by transmission electron microscope (TEM). Solubility and drug release rate of Mal-Lim-NPs in pH 2.0, 5.0, 6.8 phosphate buffers (PBS) were determined. SD rats in each group were administered intragastrically with limonin and Mal-Lim-NPs, respectively, blood drug concentration-time curve was plotted, and main pharmacokinetic parameters was also calculated. **Results** Optimal prescriptions of Lin-Mal-NP: Mal-PEG-PLA to limonin dosage ratio was 7.5:1, water phase volume was 35 mL and ultrasonic time was 13 min. Average envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were $(81.63 \pm 1.30)\%$, $(9.32 \pm 0.24)\%$, (171.56 ± 6.63) nm and (-16.60 ± 0.92) mV, respectively. The crystalline state of limonin maybe changed in Mal-Lim-NPs lyophilized powder. Microcosmic appearance of Mal-Lim-NPs was still nearly spherical after dissolved by water. The release behavior of Mal-

收稿日期: 2024-07-08

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (23B310015)

作者简介: 陈永顺 (1981—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为临床药理学与药理学。Tel: (0370)2850081 E-mail: sqzycys@126.com

*通信作者: 杨 斌 (1964—), 男, 博士, 教授, 研究方向为药物制剂及中药药理研究。Tel: (0771)5358272 E-mail: gxmu_yangbin@126.com

Lim-NPs in pH 2.0, 5.0, 6.8 PBS were in accordance with Weibull model. The $t_{\max}$ of Mal-Lim-NPs delayed to (2.61 ± 0.40) h, $t_{1/2}$ was increased to (6.73 ± 1.54) h, $C_{\max}$ and AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ were increased to 4.01-fold and 5.65, 5.89-fold, respectively. **Conclusion** Mal-Lim-NPs changed the pharmacokinetic behavior of limonin *in vivo* and significantly increased the oral absorption, which laid foundation for the following research.

Key words: limonin; nanoparticles; maleimide-modified; Box-Behnken response surface design method; release *in vitro*; oral pharmacokinetics

柠檬苦素 (limonin) 是一种含呋喃环的三萜类成分, 在楝科 (Meliaceae)、芸香科 (Rutaceae) 等药用植物均可提取得到^[1-2]。药理学研究显示柠檬苦素具有抗肿瘤、镇痛、抗焦虑、抗氧化、改善睡眠、保护神经等活性^[2-4], 具备一定的开发价值和临床使用价值。柠檬苦素溶解度仅为 $(6.12 \pm 0.08) \mu\text{g/mL}$ ^[5], 溶出度较低, 且体内受 P 糖蛋白外排作用和首关效应的影响^[6], 严重影响了其口服吸收, 柠檬苦素在大鼠体内生物利用度仅 5.43%^[7], 导致其药理活性无法充分发挥。目前柠檬苦素新型制剂研究报道的有磷脂复合物^[8]、脂质体^[9]等, 但磷脂复合物黏性较大, 制备时一般需采用毒性较大的四氢呋喃等有机试剂^[10-11], 成药性较差; 脂质体处方中辅料种类较多, 口服后胃肠道中的各种消化酶容易破坏脂质体结构^[12], 从而影响了其生物利用度提高幅度。

纳米技术在医药领域展现出巨大优势, 可极大地改善药物溶解度及溶出度, 降低不良反应, 为促进药物吸收、增强药效等奠定基础。其中, 生物黏附性纳米粒 (bioadhesive nanoparticles) 是纳米制剂研究热点之一^[13-14], 该给药系统系采用生物黏附性材料作为纳米载体, 利用载体的黏附性延长纳米药物在吸收部位的滞留时间, 从而增加药物吸收量, 提高生物利用度。壳聚糖常被作为生物黏附性材料, 但壳聚糖的酸膨胀性和碱难溶性容易影响纳米结构的稳定性^[13]。胃肠道黏液层中含有大量的黏蛋白, 而黏蛋白含大量游离巯基, 马来酰亚胺基团可选择性地与黏蛋白表面的巯基进行共价结合^[15-16], 从而赋予其生物黏附性。

本研究采用含有马来酰亚胺基团的马来酰亚胺-聚乙二醇-聚乳酸 [maleimide-methoxy poly (ethylene glycol)-poly(lactic acid), Mal-PEG-PLA] 作为载体, 制备马来酰亚胺修饰的柠檬苦素纳米粒 (maleimide-modified limonin nanoparticles, Mal-Lim-NPs), 并进行溶解度、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM)、体外释药行为等研究。采用聚乙二醇-聚乳酸 [poly(ethylene glycol)-poly (lactic acid), PEG-PLA] 为载体, 制备非生物黏附性

纳米粒, 即柠檬苦素纳米粒 (limonin nanoparticles, Lim-NPs), 比较 Mal-Lim-NPs 和 Lim-NPs 口服药动学行为和相对口服生物利用度, 期望为柠檬苦素及其他难溶性中药活性成分的开发提供研究思路。

1 仪器与试药

1.1 仪器

SQP 型电子天平, 赛多利斯科学仪器北京有限公司; 1290 Infinity II/G6470B 型高效液相-质谱联用仪、1200 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; KQ-300GTDV 型超声仪, 昆山市超声仪器有限公司; L6S 型紫外分光光度仪, 上海仪电分析仪器有限公司; TG16G 型台式高速离心机, 上海川纳实验仪器有限公司; 85-2B 型恒温磁力搅拌器, 常州迈科诺仪器有限公司; Zetasizer Nono ZS-90 型粒度测定仪, 英国马尔文公司; JEM-2100 型透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; DW-86L348 型超低温冰箱, 澳柯玛股份有限公司; MF600 型 X 射线粉末衍射仪, 日本理学 Rigaku 公司; RC-16MD 型溶出仪, 天津市精拓仪器科技有限公司; YTLG-10A 型真空冷冻干燥机, 上海叶拓科技有限公司; DN200-24A 型氮气吹扫仪, 上海左乐仪器有限公司。

1.2 材料

Mal-PEG₂₀₀₀-PLA₂₀₀₀ (批号 Y22P01S05)、PEG₂₀₀₀-PLA₂₀₀₀ (批号 Y23P9JSN1), 上海炎怡生物科技有限公司; 柠檬苦素对照品, 批号 20201002, 质量分数 98.6%, 西安开来生物科技有限公司; 柠檬苦素原料药, 批号 202008, 质量分数 97.0%, 湖北东康源科技有限公司; 多潘立酮对照品, 批号 S-024-230206, 质量分数 99.2%, 成都瑞芬思生物科技有限公司; 磷酸, 批号 C12747030, 上海麦克林生化科技有限公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS), 批号 20191120, 山东澳凯化工有限公司; 磷酸二氢钾, 批号 20201015, 国药集团化学试剂有限公司; 甘露醇, 批号 20220715, 湖南九典制药股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 Mal-Lim-NPs 的制备

薄膜-超声法制备 Mal-Lim-NPs。取柠檬苦素 10

mg 和处方量 Mal-PEG-PLA 置于圆底烧瓶中,加入 10 mL 丙酮后置于 40 °C 水浴中, 600 r/min 转速下磁力搅拌至溶解澄清。于旋转蒸发仪上缓慢除去有机溶剂(水浴温度为 40 °C), 在圆底烧瓶内壁留下一层柠檬苦素与 Mal-PEG-PLA 形成的均匀透明薄膜, 置于 40 °C 真空干燥箱中过夜, 以除尽残留溶剂。将圆底烧瓶置于 40 °C 水浴中, 加入 40 °C 的纯化水适量, 600 r/min 转速下磁力搅拌 30 min 使之充分水化, 于一定功率下超声一定时间(频率为 40 kHz), 迅速置于-10 °C 冰箱中固化 10 min, 采用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得 Mal-Lim-NPs。同法制备空白纳米粒(不加柠檬苦素)。

2.2 柠檬苦素定量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Dikma-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 流动相为甲醇-水(60:40); 进样体积 10 μL; 检测波长 220 nm。理论塔板数以柠檬苦素计不低于 5 000。

2.2.2 线性关系考察 精密称 10.48 mg 柠檬苦素对照品至 50 mL 量瓶中, 加甲醇约 40 mL 超声溶解, 继续加甲醇稀释定容, 即得柠檬苦素对照品储备液(质量浓度为 209.60 μg/mL)。采用甲醇稀释配制 5 240.0、2 620.0、1 310.0、524.0、104.8、52.4 ng/mL 系列柠檬苦素对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定不同质量浓度(X)柠檬苦素对照品溶液的峰面积(Y), 得线性回归方程: $Y=32.054X-6.981$, $r=0.9998$, 线性相关系数 r 接近 1, 结果表明柠檬苦素在 52.4~5 240.0 ng/mL 存在良好的线性关系。

2.2.3 Mal-Lim-NPs 供试品溶液的制备 精密吸取 1 mL Mal-Lim-NPs 至 10 mL 量瓶中, 加入 5 mL 甲醇-丙酮混合溶剂(4:1), 超声 5 min 破乳, 放置至室温后加入甲醇-丙酮混合溶剂(4:1)稀释定容, 摇匀后精密吸取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 流动相稀释定容, 即得 Mal-Lim-NPs 供试品溶液。取空白纳米粒 1 mL, 同法制备空白纳米粒溶液。

2.2.4 专属性考察 取空白纳米粒溶液、Mal-Lim-NPs 供试品溶液和柠檬苦素对照品溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 色谱图见图 1, 结果表明柠檬苦素色谱峰未受辅料等杂质干扰, 专属性高。

2.2.5 精密度考察 取质量浓度为 5 240.0 μg/mL (高)、1 310.0 μg/mL (中)、52.4 μg/mL (低) 柠檬

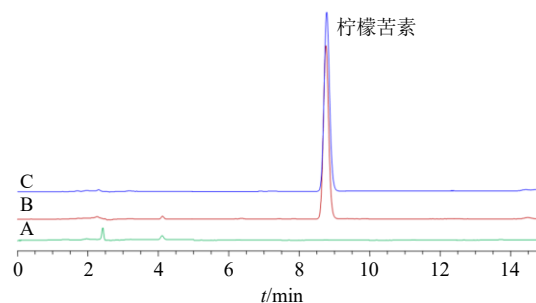


图 1 空白纳米粒样品 (A)、Mal-Lim-NPs 样品 (B) 和柠檬苦素对照品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of blank nanoparticles sample (A), Mal-Lim-NPs sample (B) and limonin reference substance (C)

苦素对照品溶液和 Mal-Lim-NPs 供试品溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 各测定 6 次, 计算得柠檬苦素高、中、低质量浓度对照品溶液和 Mal-Lim-NPs 供试品溶液峰面积的 RSD 分别为 0.20%、0.28%、0.24%、0.69%, 表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 Mal-Lim-NPs 供试品溶液, 分别于制备后 0、3、6、9、18、24 h, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算得柠檬苦素峰面积的 RSD 为 0.93%, 结果表明 Mal-Lim-NPs 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取 Mal-Lim-NPs 样品, 按“2.2.3”项下方法制备 6 份 Mal-Lim-NPs 供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算柠檬苦素质量分数的 RSD 为 1.76%, 结果表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 取 0.5 mL Mal-Lim-NPs 样品至 10 mL 量瓶中, 共 9 份, 分为高、中、低 3 组, 每组 3 份。分别精密加入柠檬苦素对照品储备液(质量浓度 209.60 μg/mL) 0.4、0.7、1.0 mL, 按“2.2.3”项下方法制备 Mal-Lim-NPs 供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定柠檬苦素总量, 计算其加样回收率和 RSD 值。结果显示, 柠檬苦素的平均加样回收率为 100.19%, RSD 为 1.64%, 结果表明该方法准确度较高。

2.3 包封率、载药量、粒径及 ζ 电位的测定

精密吸取 1 mL Mal-Lim-NPs 样品, 置于超滤管(截留相对分子质量 10 000)中, 12 000 r/min 离心(离心半径为 8.6 cm) 10 min, 取外管滤液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定游离药物量($m_{\text{游离}}$)。精密吸取 1 mL Mal-Lim-NPs 样品, 按“2.2.3”项下方法操作, 测定总药物量($m_{\text{总}}$)。精密吸取 1 mL

Mal-Lim-NPs 样品置-55 ℃冰箱中预冻 3 d, 置于冷冻干燥机(冷阱温度-30 ℃, 真空度为 5.0 Pa)中, 2 d 后取出, 取出称定质量(m_0)。计算 Mal-Lim-NPs 中柠檬苦素的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = (m_{\text{总}} - m_{\text{游离}}) / m_0$$

取 100 μL Mal-Lim-NPs 置于离心管中, 加 5 mL 纯化水震荡混匀。取适量稀释后的 Mal-Lim-NPs 置于比色皿中, 测定 Mal-Lim-NPs 的粒径(仪器参数: 折射率为 1.47, 遮光度为 5%, 吸收率为 0.01%), 平均粒径以强度径表示。另取适量稀释后的 Mal-Lim-NPs 至电槽中, 测定 ζ 电位。每份样品平行测试 3 次, 取平均值。

2.4 单因素实验考察 Mal-Lim-NPs 处方工艺

2.4.1 Mal-PEG-PLA 与柠檬苦素用量比考察 固定柠檬苦素用量为 10 mg, 水相体积为 30 mL, 超声功率为 200 W, 超声时间为 10 min 等条件不变, 考察载体材料 Mal-PEG-PLA 与柠檬苦素用量比对 Mal-Lim-NPs 包封率、载药量和粒径的影响, 结果见表 1。随着 Mal-PEG-PLA 用量增加, Mal-Lim-NPs 包封率先增加后趋稳; 载药量先增大后下降, 表明增加 Mal-PEG-PLA 用量有利于增加包封率, 但用量过大时使得 Mal-Lim-NPs 载药量下降; Mal-Lim-NPs 粒径随着 Mal-PEG-PLA 用量增加而增大, 可能是因为载体材料用量较大时体系黏度升高, 导致纳米粒子之间相互碰撞、融合等^[17], 进而使粒径增大。Mal-PEG-PLA 与柠檬苦素用量比为 3:1 时 Mal-Lim-NPs 包封率过低, 而用量比为 20:1 时载药量过低, 期望 Mal-PEG-PLA 同时具有较高的包封率和载药量, 故后续对两者用量比 5:1~15:1 进行优化。

表 1 Mal-PEG-PLA 与柠檬苦素用量比对 Mal-Lim-NPs 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effects of amounts ratio of Mal-PEG-PLA to limonin on encapsulation rate, drug loading and particle size of Mal-Lim-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Mal-PEG-PLA 与 柠檬苦素用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
3:1	36.92 $\pm$ 1.11	8.14 $\pm$ 0.21	163.11 $\pm$ 9.36
5:1	66.71 $\pm$ 0.92	10.47 $\pm$ 0.39	169.82 $\pm$ 8.20
10:1	82.55 $\pm$ 1.51	7.49 $\pm$ 0.26	179.42 $\pm$ 9.53
15:1	83.07 $\pm$ 1.03	5.19 $\pm$ 0.09	192.90 $\pm$ 15.16
20:1	83.92 $\pm$ 0.96	3.97 $\pm$ 0.16	224.87 $\pm$ 13.13

2.4.2 水相体积考察 固定柠檬苦素用量为 10 mg, Mal-PEG-PLA 与柠檬苦素用量比为 10:1, 超声功率为 200 W, 超声时间为 10 min 等条件不变, 考察水相体积对 Mal-Lim-NPs 包封率、载药量和粒径的影响, 结果见表 2。Mal-Lim-NPs 的包封率和载药量均随着水相体积的增加呈先增大后下降趋势, 可能是水相体积过小影响载体材料 Mal-PEG-PLA 水化的速度和程度, 进而影响 Mal-Lim-NPs 载药^[18]; 水相体积过大时, Mal-Lim-NPs 更大程度地暴露在水相环境中, 因而药物泄露几率也越大^[19]。Mal-Lim-NPs 粒径随着水相体积增加总体呈减小趋势, 可见水相体积对 Mal-Lim-NPs 包封率、载药量和粒径均有影响, 后续对水相体积 20~40 mL 进行优化。

2.4.3 超声功率考察 固定柠檬苦素用量为 10 mg, Mal-PEG-PLA 与柠檬苦素用量比为 10:1, 水相体积 30 mL, 超声时间为 10 min 等条件不变, 考察超声功率对 Mal-Lim-NPs 包封率、载药量和粒径的影响, 结果见表 3。随着超声功率的增大, Mal-Lim-NPs 包封率和载药量均呈先增大后下降趋势, 可能是适当的超声功率有利于载体材料 Mal-PEG-PLA 在水相中充分舒展并载药^[20], 但超声功率过大时可能影响

表 2 水相体积对 Mal-Lim-NPs 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effects of hydration volume on encapsulation rate, drug loading and particle size of Mal-Lim-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水相体积/mL	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
10	36.94 $\pm$ 0.67	3.37 $\pm$ 0.12	241.81 $\pm$ 16.34
20	67.23 $\pm$ 1.12	5.92 $\pm$ 0.15	206.22 $\pm$ 9.95
25	77.09 $\pm$ 0.95	6.84 $\pm$ 0.19	184.97 $\pm$ 8.44
30	81.97 $\pm$ 1.66	7.42 $\pm$ 0.20	172.33 $\pm$ 8.26
35	80.18 $\pm$ 1.04	7.24 $\pm$ 0.21	173.08 $\pm$ 7.58
40	74.73 $\pm$ 1.17	6.58 $\pm$ 0.13	164.89 $\pm$ 7.12
45	70.56 $\pm$ 0.89	5.92 $\pm$ 0.17	152.31 $\pm$ 6.93

表 3 超声功率对 Mal-Lim-NPs 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of ultrasonic power on encapsulation rate, drug loading and particle size of Mal-Lim-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声功率/W	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
100	75.16 $\pm$ 1.01	6.80 $\pm$ 0.09	224.69 $\pm$ 5.78
150	80.61 $\pm$ 1.42	7.06 $\pm$ 0.15	191.54 $\pm$ 7.67
200	82.04 $\pm$ 0.97	7.46 $\pm$ 0.12	170.02 $\pm$ 5.99
250	77.43 $\pm$ 1.19	6.85 $\pm$ 0.22	164.34 $\pm$ 6.78
300	70.28 $\pm$ 0.84	6.13 $\pm$ 0.21	160.55 $\pm$ 7.52

Mal-Lim-NPs 结构的稳定性,导致药物泄露^[18]。Mal-Lim-NPs 粒径随着超声功率增大而变小,可能是超声功率越大提供的能量越大,体系温度升高同时黏度下降,有利于 Mal-Lim-NPs 粒径变小。超声功率为 200 W 时 Mal-Lim-NPs 包封率和载药量均较高,粒径小于 200 nm,故采用超声功率为 200 W 制备 Mal-Lim-NPs。

2.4.4 超声时间考察 固定柠檬苦素用量为 10 mg, Mal-PEG-PLA 与柠檬苦素用量比为 10:1,水相体积 30 mL,超声功率为 200 W 等条件不变,考察超声时间对 Mal-Lim-NPs 包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 4。随着超声时间的延长, Mal-Lim-NPs 包封率和载药量均呈先增大后下降趋势,说明合适的超声时间有利于增加 Mal-PEG-PLA 水化程度,促使载体材料包载药物^[18];超声时间过长时包封率和载药量均出现下降情况,可能是超声时间过长时体系温度急剧升高,影响了 Mal-PEG-PLA 材料的稳定性,进而可能对 Mal-Lim-NPs 结构产生了影响,导致药物泄露。超声时间过长时 Mal-Lim-NPs 粒径也出现增长趋势,可见超声时间对 Mal-Lim-NPs 影响较大,后续对超声时间 10~20 min 继续优化。

表 4 超声时间对 Mal-Lim-NPs 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of ultrasonic time on encapsulation rate, drug loading and particle size of Mal-Lim-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
5	75.84±0.90	6.85±0.21	214.44±12.63
10	82.51±1.22	7.50±0.18	174.62±8.10
15	85.74±0.96	7.78±0.23	164.30±9.17
20	76.43±0.99	6.84±0.12	213.89±5.24
25	70.37±1.52	6.11±0.14	234.77±10.69

2.5 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 Mal-Lim-NPs 处方工艺

2.5.1 试验设计 单因素考察时发现, Mal-PEG-PLA 与柠檬苦素用量比、水相体积和超声时间是影响 Mal-Lim-NPs 包封率、载药量和粒径的主要因素,分别作为自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 , 筛选区间及水平见表 5。将 Mal-Lim-NPs 的包封率、载药量和粒径分别作为因变量 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 , 为了同时兼顾 3 个指标, 将包封率、载药量和粒径进行归一化处理, 采用总评归一值 (overall desirability, OD) 进行总体评价。

OD 具体计算过程为采用公式 $d_{\max}=(M_i-M_{\min})/(M_{\max}-M_{\min})$ 分别计算 $d_{\text{包封率}}$ 和 $d_{\text{载药量}}$, 采用公式 $d_{\min}=(M_{\max}-M_i)/(M_{\max}-M_{\min})$ 计算 $d_{\text{粒径}}$, 式中 $M_{\max}$ 、 $M_{\min}$ 和 M_i 分别为最大值、最小值和实际值; $OD=(d_{\text{包封率}} d_{\text{载药量}} d_{\text{粒径}})^{1/3}$ 。

Mal-Lim-NPs 不同处方工艺试验组合的 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 和 OD 见表 5。

表 5 试验结果 ($n=3$)

Table 5 Experiments results ($n=3$)

序号	X_1	X_2/mL	X_3/min	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	Y_3/nm	OD值
1	10:1 (0)	40 (+1)	20 (+1)	64.15	5.71	231.50	0.000
2	10:1 (0)	30 (0)	15 (0)	82.61	7.56	161.38	0.724
3	10:1 (0)	30 (0)	15 (0)	80.46	7.14	163.26	0.656
4	10:1 (0)	40 (+1)	10 (-1)	75.64	6.82	182.09	0.511
5	10:1 (0)	20 (-1)	10 (-1)	72.98	6.44	193.87	0.409
6	5:1 (-1)	40 (+1)	15 (0)	62.52	10.38	182.64	0.338
7	15:1 (+1)	30 (0)	10 (-1)	79.66	4.94	196.14	0.227
8	15:1 (+1)	40 (+1)	15 (0)	78.12	4.74	204.58	0.000
9	5:1 (-1)	20 (-1)	15 (0)	64.58	10.72	192.93	0.421
10	5:1 (-1)	30 (0)	10 (-1)	74.69	11.85	184.07	0.743
11	10:1 (0)	30 (0)	15 (0)	83.11	7.34	164.22	0.700
12	10:1 (0)	30 (0)	15 (0)	81.48	7.15	159.84	0.680
13	10:1 (0)	20 (-1)	20 (+1)	72.76	6.49	218.65	0.287
14	5:1 (-1)	30 (0)	20 (+1)	60.93	9.98	222.43	0.000
15	10:1 (0)	30 (0)	15 (0)	80.76	7.14	164.41	0.656
16	15:1 (+1)	30 (0)	20 (+1)	80.47	4.97	230.12	0.082
17	15:1 (+1)	20 (-1)	15 (0)	79.18	4.92	195.25	0.219

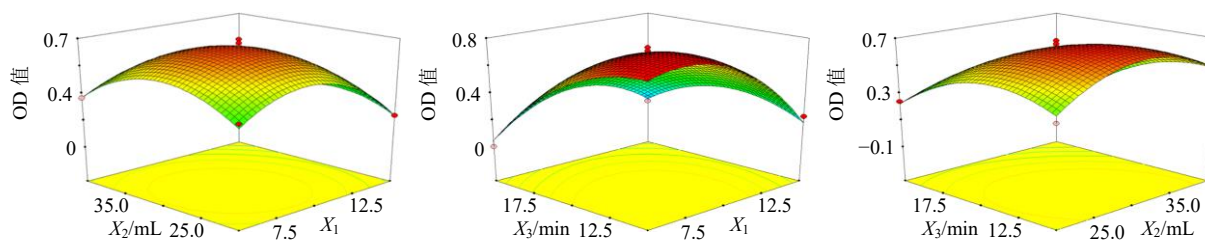
2.5.2 数学模型的建立、方差分析与最佳处方工艺确定 使用 Design Expert V10.0.3 软件对 OD 数据进行拟合, 得拟合方程为 $OD=0.680-0.120 X_1-0.061 X_2-0.190 X_3-0.034 X_1X_2+0.150 X_1X_3-0.097 X_2X_3-0.240 X_1^2-0.200 X_2^2-0.180 X_3^2$ 。方差分析结果见表 6, 表明建立的 OD 数学模型具有极显著性差异 ($P<0.000 1$), 方程的 R^2 和 R_{adj}^2 分别为 0.987 7 和 0.971 9; 失拟项 P 值为 0.094 4>0.05, 无统计学意义, 说明干扰因素对结果影响可忽略。拟合方程中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_1X_3 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 有极显著性差异 ($P<0.01$)。

响应面三维图见图 2, 表明随着其中 2 因素的增大 OD 均呈先上升后下降趋势。设置 OD 为望大值, 区间为 0~0.8, 得 Mal-Lim-NPs 最佳处方工艺: Mal-PEG-PLA 与柠檬苦素用量比为 7.53:1, 水相体积为 34.82 mL, 超声时间为 13.16 min, OD 预测值为 0.802。

表 6 方差分析

Table 6 Analysis of variance

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	1.18	9	0.13	62.49	<0.000 1
X_1	0.12	1	0.12	56.54	0.000 1
X_2	0.03	1	0.03	14.14	0.007 1
X_3	0.29	1	0.29	137.89	<0.000 1
X_1X_2	4.62×10^{-3}	1	4.62×10^{-3}	2.20	0.181 2
X_1X_3	0.09	1	0.09	42.63	0.000 3
X_2X_3	0.04	1	0.04	18.04	0.003 8
X_1^2	0.24	1	0.24	114.42	<0.000 1
X_2^2	0.17	1	0.17	80.29	<0.000 1
X_3^2	0.14	1	0.14	66.12	<0.000 1
残差	0.02	7	2.10×10^{-3}		
失拟项	0.01	3	3.74×10^{-3}	4.36	0.094 4
绝对误差	3.43×10^{-3}	4	8.59×10^{-4}		
总和	1.19	16			

图 2 自变量 (X_1 、 X_2 、 X_3) 与响应值 (OD) 的三维图Fig. 2 Three-dimensional plot of independent factors (X_1 , X_2 , X_3) and response values (OD)

2.7 Mal-Lim-NPs 冻干粉的制备及表征

2.7.1 Mal-Lim-NPs 冻干粉的制备 采用纯化水配制甘露醇质量分数为 15% 的溶液, 精密量取 10 mL, 加入 20 mL Mal-Lim-NPs, 混匀后分装至西林瓶中, 液面高度 1.5 cm 左右。-55 °C 超低温冰箱中预冻 3 d, 立即置于冷冻干燥机 (冷阱温度 -30 °C, 真空度为 5.0 Pa) 中, 2 d 后取出, 即得 Mal-Lim-NPs 冻干粉。同法制备 Mal-Lim-NPs 直接冻干粉 (不加甘露醇)。

取柠檬苦素原料药分散于纯化水, 即得混悬液, Mal-Lim-NPs 样品、Mal-Lim-NPs 冻干粉和 Mal-Lim-NPs 冻干粉纯化水复溶后的外观见图 3, 由于柠檬苦素较强的疏水性及较低的水溶性, 导致形成的混悬液均匀性极差, 而制备成 Mal-Lim-NPs 后均匀性良好, 可见蓝色乳光。Mal-Lim-NPs 冻干粉复溶后, 测得其平均包封率、粒径和 ζ 电位分别为 $(80.45 \pm 0.96) \%$ 、 $(178.87 \pm 7.04) \text{ nm}$ 和 $(-16.20 \pm 1.31) \text{ mV}$ 。

Mal-Lim-NPs 和冻干粉复溶后粒径分布见图 4-A, 冻干粉复溶后平均粒径略有增大; Mal-Lim-NPs

2.6 Mal-Lim-NPs 工艺验证

为便于操作, 将 Mal-Lim-NPs 处方略作调整 (调整幅度小于 2%): Mal-PEG-PLA 与柠檬苦素用量比为 7.5 : 1, 水相体积为 35 mL, 超声时间为 13 min。平行制备 3 批 Mal-Lim-NPs (批号分别为 20231227、20240111、20240118), 测定其平均包封率、载药量和粒径, 计算 OD 及其相对偏差 [相对偏差 = (实际值 - 预测值) / 预测值]。结果显示, 3 批 Mal-Lim-NPs 的平均包封率、载药量、粒径和 OD 分别为 $(81.63 \pm 1.30) \%$ 、 $(9.32 \pm 0.24) \%$ 、 $(171.56 \pm 6.63) \text{ nm}$ 和 0.795 ± 0.060 ($n=3$), 其中 OD 与预测值 (0.802) 较为接近, 相对偏差为 -0.87%, 表明建立的数学模型预测性能良好。

另测得 Mal-Lim-NPs 的多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.101 ± 0.009 ($n=3$), ζ 电位为 $(-16.60 \pm 0.92) \text{ mV}$ ($n=3$)。

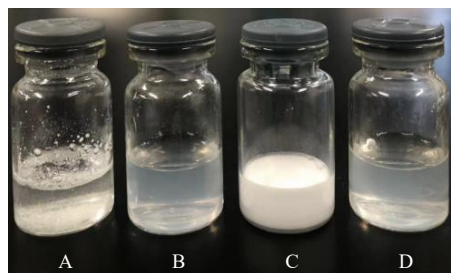


图 3 柠檬苦素混悬液 (A)、Mal-Lim-NPs 样品 (B)、冻干粉 (C) 和纯化水复溶后 (D) 的外观

Fig. 3 Appearance of limonin suspension (A), Mal-Lim-NPs (B), lyophilized powder (C) and redissolved by distilled water (D)

冻干粉复溶后 ζ 电位绝对值略有降低, ζ 电位见图 4-B。

2.7.2 TEM 观察 取 Mal-Lim-NPs, 采用纯化水稀释 30 倍, 滴 3 滴至铜网上, 轻微震荡使之铺展, 加 1.0% 磷钨酸钠, 置 35 °C 真空干燥箱中 30 min, 于 TEM 下观察 Mal-Lim-NPs 外貌 (测试参数: 点分辨率 0.23 nm, 加速电压 200 kV, 线分辨率 0.14 nm),

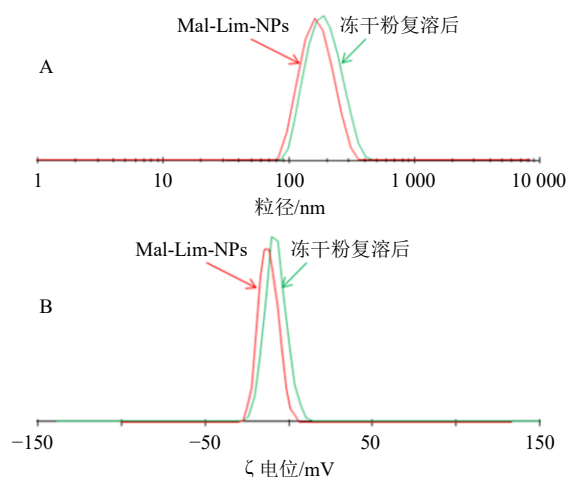


图 4 Mal-Lim-NPs 及其冻干粉复溶后样品的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 4 Particle size distribution diagram (A) and ζ potential (B) of Mal-Lim-NPs and its Freeze-dried powder redissolved samples

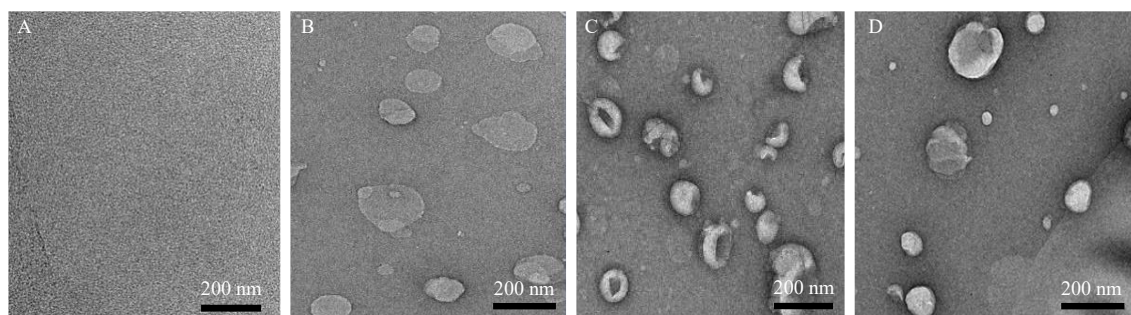


图 5 空白对照 (A)、Mal-Lim-NPs (B)、Mal-Lim-NPs 直接冻干粉 (C) 和 Mal-Lim-NPs 冻干粉 (D) 的 TEM 图
Fig. 5 TEM of blank control (A), Mal-Lim-NPs suspension (B), Mal-Lim-NPs direct lyophilized powder (C) and Mal-Lim-NPs lyophilized powder (D)

例同 Mal-Lim-NPs 冻干粉, 仅简单混合)、Mal-Lim-NPs 直接冻干粉 (不加甘露醇) 和 Mal-Lim-NPs 冻干粉适量, 置于 X 射线粉末衍射仪下测试, 结果见图 6。柠檬苦素原料药在 11.7° 、 12.0° 、 12.9° 、 13.9° 、 16.2° 、 18.7° 、 19.6° 和 20.4° 处出现特征晶型峰, 其中以 11.7° 、 12.0° 和 12.9° 等处较强。物理混合物样品中仍可观察到柠檬苦素部分特征晶型峰, 说明柠檬苦素晶型未改变。Mal-Lim-NPs 直接冻干后可观察到柠檬苦素特征晶型峰, 但峰强度明显下降。Mal-Lim-NPs 冻干粉 XRPD 图谱仅可观察到空白辅料晶型衍射峰, 说明柠檬苦素在 Mal-Lim-NPs 冻干粉中晶型可能发生了改变。

2.9 溶解度测定

取过量柠檬苦素原料药和 Mal-Lim-NPs 冻干粉分别置于 pH 2.0 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 超声 15 min 后, 置于 25°C 恒温振荡器振荡 48 h (转速为

用纯化水代替 Mal-Lim-NPs, 作为空白对照样品。

Mal-Lim-NPs 直接冻干粉 (不加甘露醇) 和 Mal-Lim-NPs 冻干粉, 加入纯化水复溶后同法观察 Mal-Lim-NPs 外貌, 结果见图 5。空白对照样品未观察到任何纳米粒形态 (图 5-A), 说明图 5-B~D 观察到的均是 Mal-Lim-NPs。Mal-Lim-NPs 外貌近似球形 (图 5-B), 将 Mal-Lim-NPs 的直接冻干粉复溶后纳米粒子破坏严重, 塌陷现象明显 (图 5-C), 而 Mal-Lim-NPs 冻干粉 (含甘露醇) 加纯化水复溶后未观察到纳米粒被破坏的现象 (图 5-D), 说明添加冻干保护剂甘露醇制备 Mal-Lim-NPs 冻干粉是必要的。

2.8 晶型研究

XRPD 测试条件: 角度 (2θ) 为 $3^\circ\sim 45^\circ$, Cu-K α 靶, 扫描速率为 $4^\circ/\text{min}$ 。取柠檬苦素原料药、空白辅料 (甘露醇与 Mal-PEG-PLA 简单混合, 比例同 Mal-Lim-NPs 冻干粉)、物理混合物 (药物与辅料比

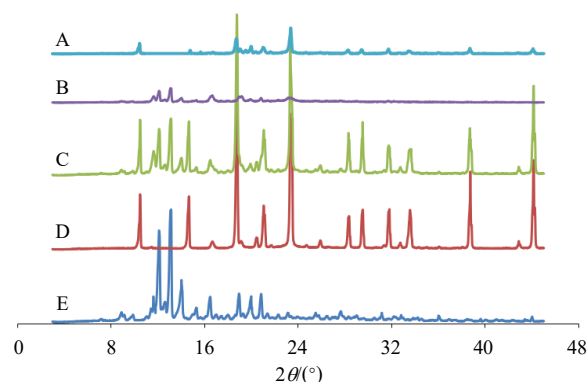


图 6 Mal-Lim-NPs 冻干粉 (A)、直接冻干粉 (不加甘露醇, B)、物理混合物 (C)、空白辅料 (D)、柠檬苦素原料药 (E) 的 XRPD 结果

Fig. 6 XRPD results of Mal-Lim-NPs lyophilized powder (A), direct lyophilized powder (without mannitol, B), physical mixture (C), blank excipient (D), and limonin raw material (E)

100 r/min), 8 000 r/min 离心 (离心半径 8.6 cm) 10 min, 取上清液测定柠檬苦素的溶解度。同法测定各样品在 pH 5.0、6.8 PBS 中的溶解度, 结果见表 7。Mal-Lim-NPs 冻干粉在 pH 2.0、5.0、6.8 PBS 中, 柠檬苦素的溶解度分别提高至其原料药的 33.71、78.21、41.16 倍。

表 7 溶解度测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

样品	介质	溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
柠檬苦素	pH 2.0 PBS	22.43 ± 0.32
	pH 5.0 PBS	6.95 ± 0.14
	pH 6.8 PBS	15.79 ± 0.27
Mal-Lim-NPs 冻干粉	pH 2.0 PBS	756.04 ± 4.12
	pH 5.0 PBS	543.54 ± 5.14
	pH 6.8 PBS	649.87 ± 3.76

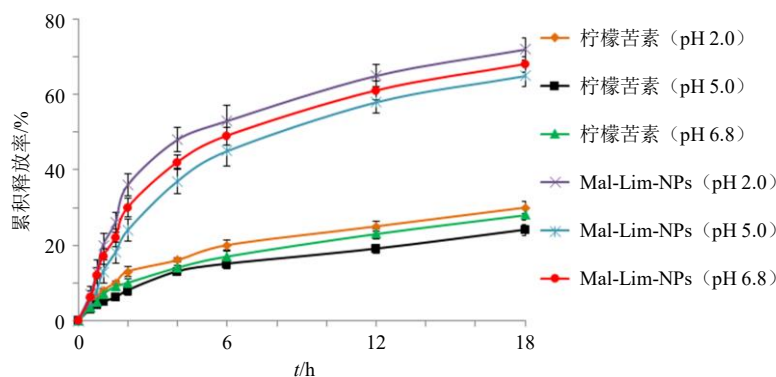


图 7 不同 pH 值 PBS 中体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Release profiles *in vitro* in different pH value phosphate buffer ($\bar{x} \pm s, n=6$)

PBS 中 18 h 累积释放率分别提高至 71.86%、65.66%、68.71%。分别采用一级释放、Higuchi、Weibull 模型对 Mal-Lim-NPs 冻干粉的体外释放曲线进行拟合, 拟合结果见表 8。Mal-Lim-NPs 在 pH 2.0、5.0、6.8 PBS 中的释药过程均与 Weibull 模型拟合度最高, 说明 Mal-Lim-NPs 释药过程分为快速、缓慢释药 2 个阶段, 符合双相动力学特征^[20]。

2.11 Mal-Lim-NPs 冻干粉沉降率测定及其稳定性考察

取新制备的 Mal-Lim-NPs 冻干粉, 加入纯化水复溶, 测定柠檬苦素含量 (M_0)。取储存不同时间的 Mal-Lim-NPs 冻干粉样品, 加入纯化水复溶, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 测定柠檬苦素的量 (M_1), 计算 Mal-Lim-NPs 冻干粉的沉降率。

$$\text{沉降率} = (M_0 - M_1) / M_0$$

取密封后的 Mal-Lim-NPs 冻干粉置于温度 30

2.10 体外释药情况比较

取柠檬苦素原料药和 Mal-Lim-NPs 冻干粉适量, 使柠檬苦素含量为 5 mg, 加入 pH 2.0 PBS (含 1% SDS) 8 mL 震荡混匀后转移至透析袋 (截留相对分子质量为 10 000) 中, 扎紧。采用《中国药典》2020 年版四部通则 0931 第二法浆法, 取 pH 2.0 PBS (含 1% SDS) 900 mL 作为介质, 介质温度为 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, 转速为 75 r/min, 取样点为 0、0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、4.00、6.00、12.00、18.00 h, 取样体积和补加空白介质均为 5 mL。8 500 r/min 离心 (离心半径为 8.6 cm) 15 min, 测定柠檬苦素含量。同法考察在 pH 5.0、6.8 PBS (含 1.0% SDS) 中的释药情况, 结果见图 7。柠檬苦素原料药在 pH 2.0、5.0、6.8 PBS 中 18 h 累积释放率分别为 30.50%、23.97%、28.66%。Mal-Lim-NPs 在 pH 2.0、5.0、6.8

表 8 Mal-Lim-NPs 冻干粉体外释放曲线的释放模型拟合结果

Table 8 Fitting results of release model of Mal-Lim-NPs freeze-dried powder *in vitro* release curves

介质	模型	拟合方程	R^2
pH 2.0 PBS	一级释放	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.068t - 0.177$	0.899 2
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.182t^{1/2} + 0.022$	0.938 0
	Weibull	$\ln\ln[1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.740\ln t - 1.660$	0.962 9
pH 5.0 PBS	一级释放	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.058t - 0.102$	0.915 4
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.170t^{1/2} + 0.023$	0.937 2
	Weibull	$\ln\ln[1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.823\ln t - 2.095$	0.9643
pH 6.8 PBS	一级释放	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.062t - 0.143$	0.907 1
	Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.174t^{1/2} + 0.004$	0.929 6
	Weibull	$\ln\ln[1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.753\ln t - 1.823$	0.959 7

M_t/M_∞ 为 t 时累积释放百分率, M_t 为 t 时累积释放率, M_∞ 为 ∞ 时累积释放率。

M_t/M_∞ is cumulative release percentage at time t , M_t is cumulative release rate at time t , and M_∞ is cumulative release rate at time ∞ .

℃、湿度 65%恒温恒湿箱中，分别于 0、15、30、60、90 d 取样，分别测定沉降率、包封率、粒径、不同介质（pH 2.0、5.0、6.8 PBS）中的溶解度和 XRPD，结果见表 9 和图 8。Mal-Lim-NPs 冻干粉在加速条件下储存 90 d 后沉降率小于 2.0%，包封率

仍大于 80%，粒径仍小于 200 nm，在不同 pH 值介质中溶解度无明显变化。XRPD 图谱（图 8）显示，各时间点的 Mal-Lim-NPs 冻干粉中未观察到柠檬苦素原料药在 11.7°、12.0°和 12.9°等处特征晶型峰，表明 Mal-Lim-NPs 冻干粉稳定性良好。

表 9 稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Experimental results of stability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	沉降率/%	包封率/%	粒径/nm	溶解度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
				pH 2.0	pH 5.0	pH 6.8
0	1.14±0.19	80.79±1.10	176.40±5.62	749.85±3.11	547.12±3.22	653.04±4.01
15	1.08±0.11	81.11±0.94	172.96±7.14	751.17±5.16	544.45±4.58	656.81±6.05
30	1.32±0.09	80.81±1.32	176.28±6.06	747.62±4.88	546.93±3.95	648.97±5.27
60	1.47±0.17	80.52±1.06	181.71±6.85	752.64±5.27	548.68±5.73	655.27±4.96
90	1.64±0.12	80.69±0.97	184.62±5.80	750.20±5.64	545.01±4.68	649.54±5.53

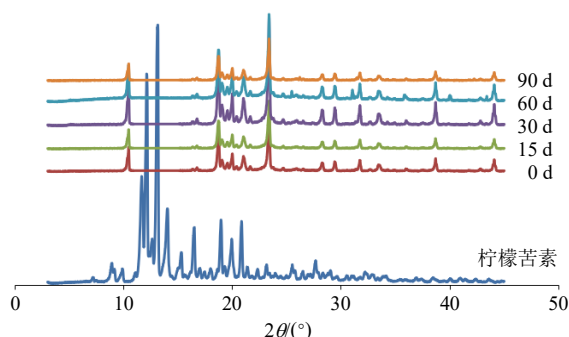


图 8 不同时间点的 XRPD 结果

Fig. 8 XRPD results at different time points

2.12 Lim-NPs 及其冻干粉的制备

参考 Mal-Lim-NPs 最佳处方工艺，采用 PEG-PLA 替换 Mal-PEG-PLA，同法制备 Lim-NPs。测得 Lim-NPs 的平均包封率、载药量、粒径和 ζ 电位分别为 $(78.16 \pm 1.17)\%$ 、 $(8.84 \pm 0.19)\%$ 、 (157.74 ± 6.63) nm、 (-22.06 ± 1.42) mV。按“2.7.1”项下操作制备 Lim-NPs 冻干粉，测得复溶后平均包封率、粒径和 ζ 电位分别为 $(76.90 \pm 0.90)\%$ 、 (163.48 ± 5.79) nm 和 (-20.31 ± 1.26) mV。

2.13 口服药动力学考察

2.13.1 试验方案 取柠檬苦素原料药、Lim-NPs 冻干粉和 Mal-Lim-NPs 冻干粉适量，加入 0.5% CMC-Na 水溶液制备 ig 液。取 18 只禁食 12 h 的 SD 大鼠，随机分为 3 组，按照 50 mg/kg（以柠檬苦素计）剂量 ig，于 0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 h 在大鼠眼眶后静脉丛取血约 250 μL ，置于抗凝剂（1.5%肝素钠溶液）浸润离心管中，震荡混匀后 3 000 r/min 离心（离心半径 8.6 cm）3 min，取淡黄色血浆冷冻保存。

2.13.2 内标溶液的配制和血浆样品处理过程^[8] 采用甲醇配制多潘立酮质量浓度为 800 ng/mL（内标溶液），取 25 μL 加至 50 μL 血浆样品中，再加入 200 μL 甲醇，涡旋混匀后加入 1.5 mL 醋酸乙酯，涡旋 5 min 充分提取多潘立酮和柠檬苦素。6 000 r/min 离心 10 min 沉淀蛋白，取上层有机相至离心管中，37 ℃氮气缓慢吹除有机溶剂，加入 50 μL 甲醇复溶，即得含内标物质的血浆样品溶液。

2.13.3 血药浓度分析方法 色谱柱为 Hypersil C₁₈（100 mm×2.1 mm，1.8 μm ）柱；流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液（1：1）；体积流量为 0.3 mL/min；测试时间 5 min；柱温为 30 ℃；进样体积为 5 μL 。采用正离子模式，电喷雾离子源（ESI），多级反应监测（multiple reaction monitoring, MRM），雾化气体流量 1.5 L/min，脱溶剂管温度和热模块温度分别为 250 ℃和 200 ℃，监测电压为 1.7 kV。定量分析时柠檬苦素和多潘立酮定量离子对分别为 m/z 471.2→161.1 和 m/z 426.3→175.2。

2.13.4 柠檬苦素血浆对照品溶液的配制及线性关系考察 取柠檬苦素对照品溶液（800 ng/mL）采用甲醇稀释至 400、200、100、10、5 ng/mL，分别取 50 μL 置于离心管中，37 ℃氮气缓慢吹除有机溶剂。分别加入空白血浆 50 μL ，按“2.13.2”项下方法操作制备血浆对照品溶液，按“2.13.3”项下分析条件进样测定。以柠檬苦素质量浓度（ C ）对柠檬苦素与多潘立酮峰面积比（ A_i/A_s ）进行线性回归，得回归方程 $C = 532.7 A_i/A_s - 12.49$ ， $r = 0.9962$ ，结果表明柠檬苦素血浆对照品溶液在 5~800 ng/mL 线性关系良好。

2.13.5 专属性考察 取空白血浆、血浆对照品溶液 (5 ng/mL) 和血浆样品溶液, 分别按“2.13.3”项下分析条件进样测定, 结果见图 9, 柠檬苦素保留时间为 3.38 min, 内标物质多潘立酮保留时间为 3.06 min, 分离度和专属性均较高。

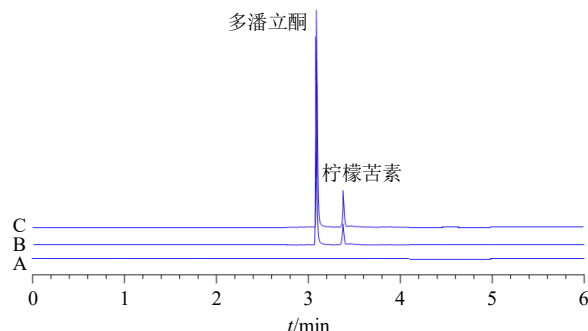


图 9 空白血浆 (A)、血浆对照品溶液 (B) 和血浆样品溶液 (C) 的提取离子流色谱图

Fig. 9 Extracted ion current chromatograms of blank plasma sample (A), standard plasma sample (B) and plasma sample (C)

2.13.6 精密度考察 取质量浓度为 5、400、800 ng/mL 柠檬苦素血浆对照品溶液, 按“2.13.3”项下分析条件连续测试 6 次, 计算得柠檬苦素与多潘立酮峰面积比 (A_i/A_s) 的 RSD 分别为 8.43%、4.06% 和 3.24%, 结果表明该仪器精密度良好。

2.13.7 稳定性考察 取血浆样品溶液, 分别于制备后 0、3、6、12、18、24 h, 按“2.13.3”项下分析条件进样测定, 计算得 A_i/A_s 的 RSD 为 5.60%, 结果表明血浆样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.13.8 重复性考察 取柠檬苦素原料药 ig 2 h 的血浆样品, 按“2.13.2”项下方法操作, 制备 6 份供试品溶液, 按“2.13.3”项下分析条件进样, 测定柠檬苦素与多潘立酮峰面积, 计算得柠檬苦素质量浓度的 RSD 为 4.18%, 结果表明该实验重复性良好。

2.13.9 基质效应与提取回收率考察 制备柠檬苦素质量浓度为 800、200、5 ng/mL 的质控样品 (均含内标), 按“2.13.2”项下方法处理, 按“2.13.3”项下分析条件进样测定峰面积 (A_1), 各质量浓度均为 3 个样本。取 50 μ L 空白血浆, 按“2.13.2”项下方法处理 (不加内标) 得残渣, 分别加入 800、200、5 ng/mL 的柠檬苦素对照品溶液和多潘立酮内标溶液, 各质量浓度均为 3 个样本, 按“2.13.3”项下分析条件测定峰面积 (A_2), 计算提取回收率。结果显示, 柠檬苦素和多潘立酮的平均提取回收率分别为 94.78% (RSD 为 5.52%, $n=9$) 和 97.01% (RSD 为

6.10%, $n=9$)。取 800、200、5 ng/mL 柠檬苦素溶液 (均含内标), 各质量浓度均为 3 个样本, 进样测定峰面积 (A_3), 计算基质效应。结果显示柠檬苦素及内标的基质效应分别为 93.74% (RSD 为 4.08%, $n=9$) 和 97.23% (RSD 为 7.24%, $n=9$)。表明柠檬苦素和多潘立酮的提取回收率高, 同时基质效应小, 可用于测定血药浓度。

$$\text{提取回收率} = A_1/A_2$$

$$\text{基质效应} = A_2/A_3$$

2.13.10 药动学结果比较 绘制柠檬苦素原料药、Lim-NPs 和 Mal-Lim-NPs 药-时曲线, 结果见图 10。用 DAS 2.0 软件非房室模型对数据进行分析, 结果见表 10。与柠檬苦素原料药相比, Lim-NPs 的药动学参数均有显著性改变 ($P<0.05$ 、 0.01), 其中达峰时间 ($t_{\max}$) 显著性延后, 末端消除半衰期 ($t_{1/2}$) 显著性延长, 药峰浓度 ($C_{\max}$) 和药-时曲线下面积 ($AUC_{0\sim t}$ 和 $AUC_{0\sim\infty}$) 分别增加至 3.69、3.24、3.32 倍。Mal-Lim-NPs 的药动学参数具有极显著性改变 ($P<0.01$), 其中 $t_{\max}$ 极显著性延后, $t_{1/2}$ 极显著性延长, $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 、 $AUC_{0\sim\infty}$ 分别提高至柠檬苦素原料药的 4.01、5.65、5.89 倍。与 Lim-NPs 相比, Mal-Lim-NPs 的 $t_{1/2}$ 进一步延长, $AUC_{0\sim t}$ 或 $AUC_{0\sim\infty}$ 进一步增加, 表明 Mal-Lim-NPs 能进一步增加柠檬苦素体内吸收。

3 讨论

薄膜-超声法操作简便, 无溶剂残留问题, 故采用薄膜-超声法制备 Mal-Lim-NPs。通过 BBD-RSM 筛选出 Mal-Lim-NPs 最佳处方工艺, 测得平均包封率为 $(81.63 \pm 1.30)\%$, 符合《中国药典》2020 年

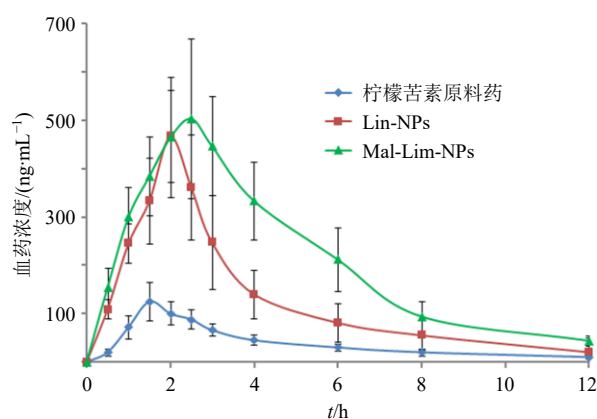


图 10 柠檬苦素、Mal-Lim-NPs、Mal-Lim-NPs 的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 10 Profiles of plasma concentration-time of limonin, Mal-Lim-NPs and Mal-Lim-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 10 主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Table 10 Main pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	柠檬苦素原料药	Lim-NPs	Mal-Lim-NPs
$t_{\max}$	h	1.46 ± 0.33	$1.97 \pm 0.27^*$	$2.61 \pm 0.40^{**\#}$
$t_{1/2}$	h	2.93 ± 0.46	$4.04 \pm 0.78^*$	$6.73 \pm 1.54^{**\#}$
$C_{\max}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	126.71 ± 40.39	$467.65 \pm 102.07^{**}$	$507.94 \pm 152.26^{**}$
$\text{AUC}_{0 \sim t}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	447.53 ± 82.11	$1\,450.01 \pm 479.57^{**}$	$2\,526.84 \pm 677.71^{**\#}$
$\text{AUC}_{0 \sim \infty}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	472.62 ± 88.73	$1\,568.13 \pm 524.34^{**}$	$2\,782.65 \pm 720.40^{**\#}$

与柠檬苦素原料药比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Lim-NPs 比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs limonin drug substance; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs Lim-NPs.

版四部 9014 项下微粒制剂对包封率的要求 (不得低于 80%)。柠檬苦素具有一定的脂溶性,在与载体材料 Mal-PEG-PLA 形成脂质薄膜时,柠檬苦素易与 Mal-PEG-PLA 亲脂性的 PLA 基团融合在一起,在水化作用下进而发生链间纠缠、缔合形成结构稳定的 Mal-Lim-NPs^[20]。

在测定饱和溶解度时,分别考察了 Mal-Lim-NPs 样品震荡 24、36、48、60 h 溶解度变化情况,发现震荡 48 h 后溶解度基本不再变化,为节约时间故确定震荡 48 h。考察发现柠檬苦素在物理混合物 (药物与辅料比例同 Mal-Lim-NPs 冻干粉) 中的溶解度也具有极显著性提高。这是由于 Mal-PEG-PLA 属于两亲性聚合物,在水相中通过自组装形成纳米胶束,从而对药物起到了增溶作用^[18,20]。Mal-Lim-NPs 冻干粉 XRPD 研究结果显示,柠檬苦素在 Mal-Lim-NPs 冻干粉中可能以无定型形式存在,有利于药物溶解度和累积释放率的改善,并促进药物体内吸收^[21-22]。Mal-Lim-NPs 在 pH 2.0、5.0、6.8 PBS 均具有双相动力学特征,快速释药有利于柠檬苦素体内快速吸收,缓慢释药有利于维持血药浓度,从而改变了口服药动学行为^[21]。

Mal-Lim-NPs 包封率略高于 Lim-NPs,可能是由于 Mal-Lim-NPs 表面修饰马来酰亚胺基团形成了一层保护层,阻止了 Mal-Lim-NPs 表层或浅表层药物泄露^[22],从而使 Mal-Lim-NPs 包封率略高于 Lim-NPs。Mal-Lim-NPs 的 ζ 电位绝对值不足 20 mV,会影响其储存稳定性,故将 Mal-Lim-NPs 制备成冻干粉。将 Mal-Lim-NPs 直接冻干成冻干粉时, Mal-Lim-NPs 微观外貌有塌陷、破坏等现象,而加入冻干保护剂甘露醇后, Mal-Lim-NPs 微观外貌保持良好,可能是由于甘露醇分子中含多个羟基,易与 Mal-Lim-NPs 表面基团之间形成氢键^[23],从而在冻干脱水过程中发挥保护作用,有利于维持纳米粒子微观外貌。

口服给药是患者最易于接受的给药途径,顺应性高,且经济安全,故本研究对 Mal-Lim-NPs 口服药动学进行了考察。据报道^[24],柠檬苦素 ig 剂量为 200 mg/kg 时基本无毒性反应,本研究采用柠檬苦素 ig 剂量为 50 mg/kg,因此,采用该剂量进行药动学研究具有一定的安全性。

Mal-Lim-NPs 的 $t_{\max}$ 发生显著性延后可能与双相动力学过程中的缓释阶段有关,另外 Mal-Lim-NPs 表面修饰马来酰亚胺基团可与胃肠道黏液层黏蛋白上的巯基进行共价结合,进而延长了 Mal-Lim-NPs 胃肠道滞留时间^[25],最终导致 $t_{\max}$ 显著性延后,同时也对其药动学参数 $t_{1/2}$ 产生了较大影响, Mal-PEG-PLA 结构中還含有 PEG 长链基团,当 Mal-Lim-NPs 以整体形式进入血液循环后可赋予长循环特点^[20],从而导致 $t_{1/2}$ 延长,利于药物在肠道充分吸收。Mal-Lim-NPs 进一步增加了 $\text{AUC}_{0 \sim t}$,可能是 Mal-PEG-PLA 对包裹的药物起到保护作用,降低了胃肠道消化酶、pH 值等因素对柠檬苦素的破坏几率^[26]; Mal-Lim-NPs 增加了柠檬苦素在不同 pH 值介质中的溶解度和释放度,改善了吸收瓶颈; Mal-PEG-PLA 中 PEG 长链可抑制 P-糖蛋白介导的外排作用^[22,27],增加药物体内吸收。

Mal-Lim-NPs 促吸收作用大于 Lim-NPs,这可能是由于 Mal-Lim-NPs 是一种黏附性纳米粒,降低药物在粪便中直接排泄几率^[27-28],延长了 $t_{1/2}$,从而使药物被充分吸收^[29]; Mal-Lim-NPs 的肠道黏附性可提高药物局部浓度,促进被动扩散,因而最终进一步增加了吸收,证明对纳米粒表面进行马来酰亚胺基团修饰是必要的。

综上,本研究采用单因素结合响应面优化筛选出 Mal-Lim-NPs 最佳处方工艺,包封率大于 80%,符合《中国药典》2020 年版对微粒制剂的要求,体外释药呈双相动力学特征,口服后 $\text{AUC}_{0 \sim t}$ 增加至 5.65 倍,显著增加了药物吸收量,本研究为后续

Mal-Lim-NPs 中试研究、药效学评价等奠定了研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王夜梅, 李江南, 尹会平, 等. 柑橘中类柠檬苦素的提取、分离纯化及检测技术研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 470-479.
- [2] 陈禹竹, 徐晓敏, 刘树民, 等. 白鲜皮及其有效成分的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(2): 409-418.
- [3] 李韶静, 汤建华. 木果楝属柠檬苦素类似物及其生物活性的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3178-3194.
- [4] Fan S M, Zhang C L, Luo T, *et al.* Limonin: A review of its pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics [J]. *Molecules*, 2019, 24(20): 3679.
- [5] 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.
- [6] Gu M, Sun J, Qi C, *et al.* The gastrointestinal fate of limonin and its effect on gut microbiota in mice [J]. *Food Funct*, 2019, 10(9): 5521-5530.
- [7] 姚迪, 孙晶晶, 刘雷, 等. LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中的吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸内酯及其生物利用度的研究 [J]. 华西药理学杂志, 2014, 29(3): 298-302.
- [8] 张伟利, 李晓婷, 决利利, 等. 柠檬苦素磷脂复合物制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(4): 1051-1057.
- [9] 李思敏, 吴文瀚, 高丽娜, 等. 柠檬苦素脂质体的制备和制剂学评价 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 5957-5962.
- [10] 陈晓敏, 曹伶俐, 崔伟峰. 鼠李素磷脂复合物的处方工艺优化、表征及体外溶出度考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(4): 399-403.
- [11] 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.
- [12] 张体鹏, 决利利. 白屈菜红碱 2 种脂质体的制备和口服生物利用度比较 [J]. 中草药, 2023, 54(17): 5568-5579.
- [13] 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.
- [14] 孙闫小凡, 柯悦, 魏团团, 等. 壳聚糖膜表面修饰脂质体研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(20): 331-338.
- [15] Liu Y, Zhao D Y, Sun M C, *et al.* Covalently mucoadhesive amphiphilic prodrug of 5-fluorouracil for enhanced permeation and improved oral absorption [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2018, 8(3): 645-656.
- [16] Kaldybekov D B, Filippov S K, Radulescu A, *et al.* Maleimide-functionalised PLGA-PEG nanoparticles as mucoadhesive carriers for intravesical drug delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, 143: 24-34.
- [17] 王楚文, 李玉林, 石盼盼, 等. 水包油型灵芝多糖纳米乳佐剂的制备及乳化方法探究 [J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(11): 65-71.
- [18] 尚慧杰, 杨金枝, 张付利. 岩白菜素混合胶束的制备、表征及体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(11): 1248-1254.
- [19] 幸瑞. 白藜芦醇季铵化壳聚糖脂质体的制备及其免疫佐剂效果评价 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2023.
- [20] 董亚楠, 任书强, 柳超, 等. 蒙花苷疏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.
- [21] 王丽, 黄一聆, 房伟. 柚皮素-mPEG-PLA 聚合物胶束的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2022, 44(4): 1052-1057.
- [22] 周敬, 郑宝玉, 李阳杰, 等. 聚乙二醇修饰高良姜素纳米结构脂质载体处方优化及口服药动学评价 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4455-4466.
- [23] 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.
- [24] 魏舒婷, 盛云华, 黄坚, 等. 吴茱萸指标成分体内外的肝损伤作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(2): 87-92.
- [25] Yabuuchi K, Katsumata T, Shimoboji T, *et al.* Variable swelling behavior of and drug encapsulation in a maleimide-modified hyaluronic acid nanogel-based hydrogel [J]. *Polym J*, 2024, 56(5): 505-515.
- [26] 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.
- [27] 李明, 辛娟, 王远侠, 等. 聚乙二醇修饰杨梅苷固体脂质纳米粒制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2024, 46(4): 1102-1109.
- [28] 周建锋. 槲皮素降低大鼠糖脂吸收及玉米醇溶蛋白纳米载体的构建 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2022.
- [29] Kharaziha M, Scheibel T, Salehi S. Multifunctional naturally derived bioadhesives: From strategic molecular design toward advanced biomedical applications [J]. *Prog Polym Sci*, 2024, 150(1): 101792-1101849.

[责任编辑 郑礼胜]