

叶酸修饰的藤黄酸纳米晶-磷脂复合递药系统的制备及评价

刘思卓, 吕佳蔚, 凌延文, 王琳翔, 曾熙雯, 王瑞平, 苏瑾*

佳木斯大学药学院 黑龙江省新药创制与药效毒理评价重点实验室, 黑龙江 佳木斯 154007

摘要: 目的 为改善藤黄酸原料药释放的靶向性, 设计制备一种由叶酸修饰的藤黄酸纳米晶-磷脂复合递药系统 (folic acid-modified gambogic acid nanocrystals-phospholipid composite drug delivery system, GA-NCs@PL-FA), 优化其处方工艺, 并考察 GA-NCs@PL-FA 的理化性质、体外抗肝癌活性及体内组织分布特征。方法 通过 CO₂ 辅助沉淀法制备藤黄酸纳米晶 (gambogic acid nanocrystals, GA-NCs), 再经薄膜水化法构建 GA-NCs@PL-FA。结合单因素考察和星点设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 优化处方工艺。透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察微观形态, 测定粒径、 ζ 电位、包封率、载药量及稳定性; 以透析袋法考察其在 pH 7.4、6.5 磷酸盐缓冲液 (PBS, 含 0.5% 聚山梨酯 80) 中的体外释放行为。利用细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 法和细胞划痕实验, 评价不同给药组对 HepG2 细胞活力和迁移能力的影响。采用超高效液相色谱-串联质谱法 (ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 测定荷瘤裸鼠各组织中藤黄酸含量, 分析其体内组织分布及肿瘤组织富集能力。结果 GA-NCs@PL-FA 呈类球形, 粒径为 (183.07 ± 0.55) nm, ζ 电位为 (-17.70 ± 0.17) mV, 包封率和载药量分别为 $(84.64 \pm 0.57)\%$ 和 $(4.33 \pm 0.07)\%$, 在 4、25 °C 条件下放置 7 d 后性质稳定; 在 2 种释放介质中, 均表现出明显的缓释效果。体外实验结果显示, 与藤黄酸、GA-NCs 及无叶酸修饰的藤黄酸纳米晶-磷脂复合递药系统 (folic acid-free gambogic acid nanocrystals-phospholipid composite drug delivery system, GA-NCs@PL) 相比, GA-NCs@PL-FA 对 HepG2 细胞增殖和迁移的抑制作用更强, 半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 降至 0.50 μ g/mL。组织分布实验证实, GA-NCs@PL-FA 可延长藤黄酸体内滞留时间, 并促进其在肿瘤组织中的富集, 具有良好的靶向性。结论 优化了 GA-NCs@PL-FA 的处方和制备工艺, 体系粒径均一、载药性能较好, 具有良好的缓释效果和体外抗肝癌活性, 并表现出较强的肿瘤组织富集能力, 可为藤黄酸的靶向制剂开发及临床应用提供参考。

关键词: 藤黄酸; 叶酸; 纳米晶; 制备工艺; 体外释放; 组织分布

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)16-6303-17

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.16.008

Preparation and evaluation of folic acid-modified gambogic acid nanocrystals-phospholipid composite drug delivery system

LIU Sizhuo, LYU Jiawei, LING Yanwen, WANG Linxiang, ZENG Xiwen, WANG Ruiping, SU Jin

Department of Pharmacy, Jiamusi University, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of New Drug Development and Pharmacotoxicological Evaluation, Jiamusi 154007, China

Abstract: Objective In order to improve the targeting release of gambogic acid, a folic acid-modified gambogic acid nanocrystals-phospholipid composite drug delivery system (GA-NCs@PL-FA) was designed and prepared, and its prescription process was optimized. The physicochemical properties, *in vitro* anti-hepatocarcinoma activity and *in vivo* tissue distribution characteristics of GA-NCs@PL-FA were investigated. **Methods** Gambogic acid nanocrystals (GA-NCs) were prepared by CO₂-assisted precipitation method, and then GA-NCs@PL-FA was constructed by thin film hydration method. The prescription process was optimized by single factor investigation and central composite design-response surface methodology (CCD-RSM). The microscopic morphology was observed by transmission electron microscopy (TEM), and the particle size, ζ potential, encapsulation efficiency, drug loading and

收稿日期: 2026-02-03

基金项目: 黑龙江省北药与功能食品特色学科项目 (HLJTSXK-2022-03); 黑龙江省自然科学基金项目 (LH2024H003); 国家大学生创新训练计划 (202510222166); 黑龙江省教育厅创新团队项目 (2024-KYYWF-0622); 佳木斯大学“东极”学术团队项目 (DIXSTD202414)

作者简介: 刘思卓, 硕士研究生, 研究方向为靶向递药系统。E-mail: 258073019@stu.jmsu.edu.cn

*通信作者: 苏瑾, 教授, 硕士生导师, 研究方向为缓释靶向给药系统研究及中药药理学。E-mail: sujjin@jmsu.edu.cn

stability were determined. The *in vitro* release behavior in pH 7.4, 6.5 phosphate buffer (PBS, containing 0.5% Tween 80) was investigated by dialysis bag method. The effects of different administration groups on the viability and migration ability of HepG2 cells were evaluated by cell counting kit-8 (CKK-8) method and cell scratch test. The content of gambogic acid in each tissue of tumor-bearing nude mice was determined by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), and its tissue distribution and tumor tissue enrichment ability were analyzed. **Results** The GA-NCs@PL-FA was spherical, the particle size was (183.07 ± 0.55) nm, the ζ potential was (-17.70 ± 0.17) mV, the encapsulation efficiency and drug loading were $(84.64 \pm 0.57)\%$ and $(4.33 \pm 0.07)\%$, respectively. The properties were stable after 7 d at 4, 25 °C. In both release media, it showed obvious sustained release effect. *In vitro* experiments showed that compared with gambogic acid, GA-NCs and folic acid-free gambogic acid nanocrystals-phospholipid composite drug delivery system (GA-NCs@PL), GA-NCs@PL-FA had a stronger inhibitory effect on the proliferation and migration of HepG2 cells, and the half inhibitory concentration (IC_{50}) was reduced to 0.50 $\mu\text{g/mL}$. The tissue distribution test confirmed that GA-NCs@PL-FA could prolong the retention time of gambogic acid *in vivo* and promote its enrichment in tumor tissues, with good targeting. **Conclusion** The formulation and preparation process of GA-NCs@PL-FA were optimized. The system had uniform particle size, good drug loading performance, good sustained release effect and *in vitro* anti-hepatoma activity, and showed strong tumor tissue enrichment ability. It can provide reference for the development and clinical application of gambogic acid targeted preparations.

Key words: gambogic acid; folic acid; nanocrystals; preparation technology; *in vitro* release; tissue distribution

藤黄酸是传统中药藤黄 *Garcinia hanburyi* Hook. f. 的主要活性成分, 外观呈黄色结晶粉末, 具有显著的抗肿瘤、抗增殖、抗炎及抗菌等多种药理活性^[1-2]。现代药理研究表明, 藤黄酸能通过诱导细胞凋亡、抑制血管生成及调控多种信号通路, 对肝癌、肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤展现出极强的杀伤效能^[3-4]。然而, 藤黄酸的强疏水性 (水溶解度 $< 0.5 \mu\text{g/mL}$) 导致口服生物利用度极低^[5], 且藤黄酸分子对环境 pH 值较为敏感, 难以维持有效的血药浓度, 严重限制了其临床应用^[6]。

针对藤黄酸的有关性质, 国内外学者尝试构建多种递送系统, 如脂质体、胶束、纳米粒等加以改进^[7]。尽管能在一定程度上改善藤黄酸的药动学行为, 但仍存在一定局限性, 如载药量低、药物泄漏、有机溶剂残留及潜在的辅料毒性问题。相比之下, 具有“无载体”特征的纳米晶技术展现出显著的递送优势。作为一种平均粒径在 1 000 nm 以下, 仅由活性药物和少量稳定剂组成的分散体系, 纳米晶不仅能有效规避大量辅料带来的安全性风险, 更凭借纯药物组分的特性, 表现出良好的载药能力^[8-9]。纳米晶的制备主要包括“自上而下 (top-down)”技术, 如高压均质法、介质研磨法, 利用机械剪切力将大颗粒药物粉碎至纳米级; 或采用“自下而上 (bottom-up)”技术, 如反溶剂沉淀法、超临界流体沉淀法、溶剂蒸发法等, 通过调控药物的沉淀与结晶, 将粒径精确控制在纳米范围。凭借粒径小、比表面积大的优势, 纳米晶能有效提高难溶性药物的溶解度和溶出速度, 促进药物吸收^[10]。

常规纳米晶在复杂生理环境中存在热力学不稳定性, 其高表面自由能易引发聚集或被免疫系统迅速清除^[11]。近年来, 纳米晶-磷脂复合物作为一种融合药物纳米晶与脂质载体优势的复合递药策略受到关注。该类体系通常以药物纳米晶作为主要载药单元, 通过磷脂、胆固醇及聚乙二醇化磷脂等两亲性材料在纳米晶表面形成脂质界面层^[12-13]。该结构既可保留纳米晶的高载药量和促进难溶性药物溶出的优势, 又可借助磷脂界面层改善体系分散稳定性, 并为后续配体修饰提供基础^[14]。同时有助于降低网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 的摄取和清除, 进而改善药物体内递送行为。

叶酸作为经典的主动靶向配体, 可与肝癌等多种肿瘤细胞表面高表达的叶酸受体特异性结合, 通过受体介导的胞吞作用, 促进递药系统跨越生物屏障直达病灶^[15-17]。与转铁蛋白、多肽及抗体类靶向分子相比, 叶酸具有相对分子质量小、结构稳定、免疫原性较低、化学修饰简便、来源易得及成本较低等优势^[18-19]。因此, 结合纳米晶-磷脂复合体系的处方特点, 选择叶酸作为主动靶向配体, 有利于在保持体系结构稳定和制备可控性的基础上, 提高肿瘤靶向递送能力。

本实验旨在构建一种由叶酸修饰的藤黄酸纳米晶-磷脂复合递药系统 (folic acid-modified gambogic acid nanocrystals-phospholipid composite drug delivery system, GA-NCs@PL-FA), 通过单因素考察结合星点设计-效应面法 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM) 系统评价各参数

对粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、包封率等理化性质的影响, 优化制备工艺并进一步考察其体外释放行为、抗肝癌细胞活性及体内组织分布特点, 以期对中药活性单体的肝癌靶向递药研究及藤黄酸的临床应用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1100 series 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦有限公司; FA2004N 型分析天平, 上海恒平仪器有限公司; UV-765 型紫外分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; RE-52A 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; Zetasizer Nano ZSE 型纳米粒度电位仪, 英国马尔文公司; TGL-20bR 型台式冷冻离心机, 上海安亭科学仪器有限公司; Talos F200S G2 型透射电子显微镜 (TEM), 赛默飞世尔上海仪器有限公司; SCIENTZ-950E 型超声波细胞粉碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; U3000-Q Exactive 型超高效液相色谱-串联质谱仪 (UPLC-MS/MS), 美国赛默飞世尔科技公司; Hula dancer digital 型涡旋混合器, 德国 IKA 公司; Envision 型多功能酶标仪, 美国 BioTek 公司。

1.2 试药

藤黄酸对照品, 批号 MUST-22093003, 质量分数 98.93%, 成都曼思特生物科技有限公司; 藤黄酸原料药, 批号 240310T, 质量分数 95.0%, 南京道斯夫生物科技有限公司; 柠檬酸 (批号 K2329141, 质量分数 99.5%)、维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯 (*D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS, 批号 J2227666, 试剂纯), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 大豆卵磷脂, 批号 C16684957, 质量分数 >90%, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP) K30, 成都市科龙化工试剂厂; 羟丙基甲基纤维素 (hydroxypropyl methylcellulose, HPMC)、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS), 安徽山河药用辅料股份有限公司; 碳酸氢钠 (NaHCO_3 , 批号 D01IS234101, 质量分数 99.8%)、胆固醇 (批号 S18IS226039, 质量分数 95.0%)、和厚朴酚 (批号 J02HB179506, 质量分数 $\geq 98.0\%$)、聚山梨酯 80 (批号 S15020, 化学纯), 上海源叶生物科技有限公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG₂₀₀₀, 批号 107191, 质量分数 $\geq 95.0\%$)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-叶酸 (DSPE-

mPEG₂₀₀₀-FA, 批号 109153, 质量分数 $\geq 90.0\%$), 上海芃硕生物科技有限公司; 4%多聚甲醛固定液、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 北京兰杰柯科技有限公司; DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8), 大连美仑生物技术有限公司; 胎牛血清, 浙江天杭生物科技股份有限公司; 甲醇 (色谱纯)、无水乙醇、甲醇、乙醚 (分析纯), 天津市科密欧化学试剂有限公司; 氯仿, 分析纯, 辽宁泉瑞试剂有限公司。

1.3 细胞与动物

人肝癌 HepG2 细胞, 武汉普诺赛生命科技有限公司; SPF 级雌性 BALB/c-Nude 裸鼠 36 只, 体重 16~18 g, 江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 许可证号 SCXK (苏) -2023-0009, 合格证号 B202409180338。本实验由佳木斯大学生物与医学伦理委员会批准, 实验动物伦理审批号为 JDYXY-2024001。

2 方法与结果

2.1 藤黄酸纳米晶 (gambogic acid nanocrystals, GA-NCs) 和 GA-NCs@PL-FA 的制备

2.1.1 GA-NCs 的制备 称取藤黄酸 3.0 mg、TPGS 6.0 mg 及柠檬酸 0.8 mg, 精密称定, 置于棕色圆底烧瓶中, 加入 3 mL 甲醇充分溶解, 于 40 °C 水浴中减压旋蒸, 形成均匀薄膜后, 加入 0.2 mg/mL NaHCO_3 溶液 5 mL, 于旋转蒸发器上进行水化处理, 即得 GA-NCs^[20-21]。

2.1.2 GA-NCs@PL-FA 的制备 采用薄膜水化法制备 GA-NCs@PL-FA。称取大豆卵磷脂 35.7 mg、胆固醇 10.5 mg、DSPE-mPEG₂₀₀₀ 3.2 mg 和 DSPE-PEG₂₀₀₀-FA 1.4 mg, 以适量无水乙醇溶解后, 于 40 °C 下避光减压旋蒸除去乙醇, 形成均匀薄膜。用 GA-NCs 水化, 120 W 探头超声 5 min 进行分散处理。所得分散液依次过 0.45、0.22 μm 微孔滤膜, 即得 GA-NCs@PL-FA^[21-22]。在不加原料药的条件下, 按 GA-NCs@PL-FA 的制备方法制备, 即得空白 NCs@PL-FA。以等物质的量 DSPE-mPEG₂₀₀₀ 代替 DSPE-PEG₂₀₀₀-FA, 按相同工艺制备无叶酸修饰的藤黄酸纳米晶-磷脂复合递药系统 (folic acid-free gambogic acid nanocrystals-phospholipid composite drug delivery system, GA-NCs@PL)。

2.2 藤黄酸 HPLC 体外分析方法的建立

2.2.1 测定紫外吸收波长的选择 称取适量藤黄酸对照品, 经甲醇溶解并稀释至设定浓度, 以甲醇空

白为参比,通过全波段紫外扫描(200~800) nm 测定其特征吸收峰。结果如图 1 所示,藤黄酸对照品在 361 nm 处有最大吸收峰且无其他干扰,故选择 361 nm 为藤黄酸的测定波长。

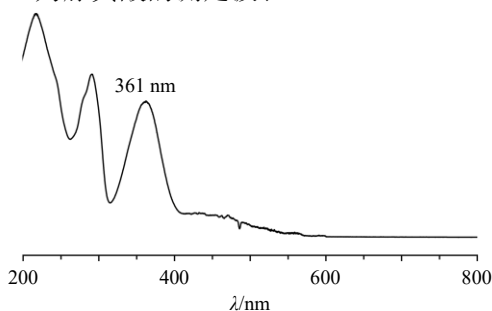


图 1 紫外-可见分光光度法测定藤黄酸的吸收波长

Fig. 1 Determination of absorption wavelength of gambogic acid by UV-Vis

2.2.2 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 甲醇-水(93:7); 柱温 35 °C; 检测波长 361 nm; 体积流量 1 mL/min; 进样量 20 μL。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取适量藤黄酸对照品, 甲醇溶解定容, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 的藤黄酸对照品溶液, 避光保存。

2.2.4 供试品溶液的制备 量取 GA-NCs@PL-FA 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声破乳后定容至刻度, 作为供试品溶液。取空白 NCs@PL-FA 按供试品溶液配制方法制备阴性对照溶液。

2.2.5 专属性考察 分别吸取一定量的藤黄酸对照品溶液、阴性对照溶液和供试品溶液, 甲醇定容后混匀, 按照“2.2.2”项下色谱条件进样测定并记录色谱图。结果如图 2 所示, 藤黄酸对照品保留时间为 8.74 min, 阴性对照溶液没有出现特征峰, 结果表明各辅料不干扰药物藤黄酸的测定, 该方法专属性良好。

2.2.6 线性关系考察 精密量取藤黄酸对照品溶液, 用甲醇逐级稀释, 配制成质量浓度分别为 1、5、10、30、50、70、100 μg/mL 的梯度对照品溶液, 以质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y) 进行线性方程拟合, 得回归方程 $Y=30.453X+0.124$, $r=0.9999$, 结果表明藤黄酸在 1~100 μg/mL 线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 分别吸取低、中、高质量浓度(5、30、70 μg/mL) 的藤黄酸对照品溶液, 各质量浓度平行制备 3 份。按照“2.2.2”项下色谱条件, 同 1 d 内各质量浓度分别进样 5 次, 连续测定 5 d,

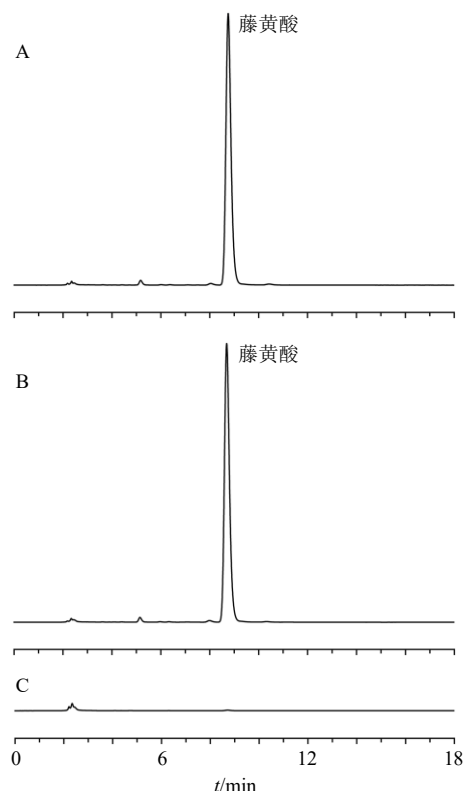


图 2 藤黄酸对照品溶液 (A)、GA-NCs@PL-FA 供试品溶液 (B)、阴性对照溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of gambogic acid reference substance solution (A), GA-NCs@PL-FA test solution (B), blank test solution (C)

计算日内和日间精密度。结果日内精密度的 RSD 分别为 0.37%、0.11%、0.02%, 日间精密度的 RSD 分别为 1.46%、1.69%、1.49%, 结果表明该方法精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 精密吸取质量浓度为 30 μg/mL 的供试品溶液, 按照“2.2.2”项下色谱条件, 分别于制备后 0、2、4、8、12 h 进样测定藤黄酸峰面积, 计算其 RSD 为 1.23%, 结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定性较好。

2.2.9 重复性试验 平行制备 6 份 GA-NCs@PL-FA 供试品溶液, 经超声处理后过 0.22 μm 微孔滤膜, 按照“2.2.2”项下色谱条件进样检测, 计算得藤黄酸质量浓度的 RSD 为 0.17%, 结果表明该方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密吸取适量已知藤黄酸含量的 GA-NCs@PL-FA, 分别加入质量浓度分别为 5、30、70 μg/mL 的藤黄酸对照品溶液适量, 平行制备 3 份。按照“2.2.2”项下色谱条件进样测定, 计算藤黄酸的加样回收率。藤黄酸的平均加样回收

率为 99.30%，RSD 为 0.65%，结果表明该方法准确度较高。

2.3 单因素考察 GA-NCs 处方工艺

GA-NCs 为后续构建 GA-NCs@PL-FA 的药物藤黄酸纳米晶核心，处方工艺优化的重点在于获得粒径较小、分布均一且分散性良好的体系。因此，本实验在 GA-NCs 单因素考察阶段，以粒径和 PDI 作为主要评价指标。

取 GA-NCs 适量，超纯水稀释至适宜浓度，混匀后置于样品池中，采用纳米粒度电位仪于 25 °C 测定粒径和 PDI，每个样品平行测定 3 次。

2.3.1 稳定剂种类考察 稳定剂可吸附于药物晶体表面，降低界面张力，并通过静电排斥或空间位阻作用抑制晶体聚集和过度生长，从而改善纳米晶的分散稳定性。固定“2.1.1”项下处方中其他条件不变，考察不同种类稳定剂（大豆卵磷脂、PVP K30、HPMC、SDS、TPGS）在 0、48 h 对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响，结果见表 1。稳定剂的种类对 GA-NCs 的稳定性具有明显影响，以 TPGS 为稳定剂制备的 GA-NCs 粒径最小、分布较窄，且放置 48 h 后粒径和 PDI 变化较小，未见明显沉淀或絮凝，说明 TPGS 可较好地维持 GA-NCs 的短期分散状态，故后续选择 TPGS 为稳定剂制备 GA-NCs。

表 1 稳定剂种类对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Effects of stabilizer type on particle size and PDI of GA-NCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

稳定剂种类	0 h		48 h	
	粒径/nm	PDI	粒径/nm	PDI
大豆卵磷脂	220.37±8.40	0.272±0.011	258.29±2.67	0.331±0.009
PVP K30	309.00±5.85	0.253±0.010	325.02±3.82	0.287±0.008
HPMC	542.87±5.85	0.419±0.007	567.65±4.82	0.531±0.023
SDS	149.37±0.65	0.225±0.002	178.52±1.63	0.292±0.016
TPGS	127.10±0.72	0.205±0.008	128.34±0.95	0.209±0.012

2.3.2 药物用量考察 固定“2.1.1”项下处方中其他条件不变，考察药物藤黄酸用量（1、2、3、4 mg）对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响，结果见表 2。随着药物用量的增加，GA-NCs 的粒径和 PDI 均呈先减小后增大的趋势。这可能是由于在低质量浓度下晶核形成速率较慢，体系稳定性欠佳；而当药物过量时（>3 mg），体系饱和度过高，易引发晶体生长或聚集。当药物用量为 3 mg 时，粒径和 PDI 均达最小值，后续选择药物用量 3 mg 进一步优化。

表 2 药物用量对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effects of drug dosage on particle size and PDI of GA-NCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

药物用量/mg	粒径/nm	PDI
1	283.67±2.19	0.323±0.019
2	183.13±2.14	0.267±0.011
3	123.83±1.77	0.218±0.011
4	140.00±0.92	0.242±0.008

2.3.3 藤黄酸与 TPGS 质量比考察 固定“2.1.1”项下处方中其他条件不变，考察藤黄酸与 TPGS 质量比（4：1、2：1、1：1、1：2、1：3）对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响，结果见表 3。随着质量比减小，粒径和 PDI 也相应减小，当质量比 1：2 再减小时，GA-NCs 的粒径和 PDI 变化不大，故最终确定质量比为 1：2。

2.3.4 有机溶剂种类考察 固定“2.1.1”项下处方中其他条件不变，考察有机溶剂种类（无水乙醇、乙醚、甲醇、氯仿）对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响，结果见表 4。使用不同有机溶剂制备 GA-NCs 的粒径差异较小。以氯仿为溶剂时粒径和 PDI 最小，但考虑到氯仿的生物安全性较低且毒性较大，不宜作为首选。相比之下，甲醇能快速溶解药物及辅料，且具有较低沸点，便于后续旋蒸除去。因此，综合考虑安全性与操作便捷性，选择甲醇作为有机溶剂制备 GA-NCs。

表 3 藤黄酸与 TPGS 质量比对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effects of mass ratio of gambogic acid to TPGS on particle size and PDI of GA-NCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

药载比	粒径/nm	PDI
4：1	245.43±6.22	0.212±0.022
2：1	219.63±5.18	0.307±0.027
1：1	179.03±0.42	0.197±0.007
1：2	120.27±0.15	0.166±0.010
1：3	117.60±0.92	0.164±0.036

表 4 有机溶剂种类对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Effects of organic solvents type on particle size and PDI of GA-NCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

有机溶剂种类	粒径/nm	PDI
无水乙醇	129.30±2.31	0.206±0.003
乙醚	124.93±4.12	0.189±0.062
甲醇	120.13±0.67	0.183±0.005
氯仿	113.73±1.50	0.164±0.006

2.3.5 有机溶剂用量考察 固定“2.1.1”项下处方中其他条件不变,考察甲醇用量(1、3、5、7 mL)对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响,结果见表 5。当甲醇用量为 3 mL 时,粒径和 PDI 表现最优,故后续选择甲醇用量 3 mL 制备 GA-NCs。

表 5 有机溶剂用量对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of organic solvent dosage on particle size and PDI of GA-NCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

有机溶剂用量/mL	粒径/nm	PDI
1	143.76 $\pm$ 2.55	0.316 $\pm$ 0.036
3	125.86 $\pm$ 4.97	0.178 $\pm$ 0.003
5	135.22 $\pm$ 3.79	0.270 $\pm$ 0.020
7	141.26 $\pm$ 0.98	0.286 $\pm$ 0.009

2.3.6 柠檬酸用量考察 柠檬酸主要作为 CO₂ 辅助沉淀体系的酸源,与水化液中的 NaHCO₃ 发生酸碱反应并原位产生 CO₂ 微气泡,从而增强体系微观混合,促进有机相与水相快速均匀接触,有利于藤黄酸快速成核并抑制晶体过度生长和颗粒聚集^[23]。固定“2.1.1”项下处方中其他条件不变,考察柠檬酸用量(0.4、0.8、1.2、1.6 mg)对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响,结果见表 6。当柠檬酸用量为 0.8 mg 时,GA-NCs 粒径最小且分布最窄;而柠檬酸用量过高时,可能因反应过剧或局部 pH 值波动较大,破坏体系稳定性,导致粒径增大,后续需进一步优化柠檬酸用量。

表 6 柠檬酸用量对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effects of citric acid dosage on particle size and PDI of GA-NCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

柠檬酸用量/mg	粒径/nm	PDI
0.4	139.37 $\pm$ 0.72	0.218 $\pm$ 0.015
0.8	121.00 $\pm$ 1.43	0.184 $\pm$ 0.017
1.2	129.30 $\pm$ 1.44	0.228 $\pm$ 0.024
1.6	136.14 $\pm$ 1.82	0.246 $\pm$ 0.011

2.3.7 水化体积考察 固定“2.1.1”项下处方中其他条件不变,考察不同水化体积(2、5、8、11 mL)对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响,结果见表 7。当水化体积为 5 mL 时粒径和 PDI 最小,故后续选择水化体积为 5 mL 进一步优化。

2.4 CCD-RSM 优化 GA-NCs 处方工艺

在单因素实验考察基础上,以药物用量(X_1)、柠檬酸用量(X_2)和水化体积(X_3)为考察因素,

表 7 水化体积对 GA-NCs 粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effects of hydration volume on particle size and PDI of GA-NCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化体积/mL	粒径/nm	PDI
2	141.16 $\pm$ 1.07	0.342 $\pm$ 0.069
5	124.05 $\pm$ 3.36	0.216 $\pm$ 0.007
8	129.47 $\pm$ 2.58	0.260 $\pm$ 0.009
11	138.10 $\pm$ 1.92	0.313 $\pm$ 0.013

分别设定 5 个水平(−1.682、−1、0、+1、+1.682)。以粒径(Y_1)和 PDI(Y_2)为评价指标,进行 3 因素 5 水平的中心复合设计优化处方和工艺^[24]。

由于 2 个指标取值越小越好,因此,采用综合归一化评分值(overall desirability, OD)进行评价。粒径(d_1)=($Y_{1\max} - Y_1$)/($Y_{1\max} - Y_{1\min}$); PDI(d_2)=($Y_{2\max} - Y_2$)/($Y_{2\max} - Y_{2\min}$)。式中, $Y_{1\max}$ 和 $Y_{1\min}$ 分别为粒径的最大值和最小值, $Y_{2\max}$ 和 $Y_{2\min}$ 分别为 PDI 的最大值和最小值,OD 计算公式为 OD=($d_1 d_2$)^{1/2},结果见表 8。对表 8 中数据拟合,可得 2 次多元回归方程: OD=0.058 5−0.107 8 X_1 −0.055 9 X_2 −0.068 7 X_3 −0.044 9 $X_1 X_2$ −0.045 7 $X_1 X_3$ +0.004 5 $X_2 X_3$ +0.130 7 X_1^2 +0.086 4 X_2^2 +0.150 1 X_3^2 , R^2 =0.943 3。对回归方程进行方差分析,结果见表 9。模

表 8 CCD 安排与结果

Table 8 Arrangement and results of CCD

试验号	X_1 /mg	X_2 /mg	X_3 /mL	Y_1 /nm	Y_2	OD
1	4.00 (+1.682)	0.80 (0)	5.00 (0)	133.61	0.246	0.36
2	2.41	1.04 (+1)	6.78 (+1)	138.18	0.265	0.53
3	3.00 (0)	0.80	2.00 (−1.682)	132.22	0.336	0.59
4	2.41 (−1)	0.56 (−1)	6.78	136.49	0.269	0.51
5	3.00	0.80	5.00	124.92	0.218	0.10
6	2.41	0.56	3.22 (−1)	143.59	0.271	0.65
7	3.00	0.80	5.00	124.62	0.215	0.03
8	3.59 (+1)	0.56	3.22	130.78	0.314	0.49
9	3.59	0.56	6.78	134.30	0.227	0.28
10	3.00	0.80	5.00	125.46	0.218	0.10
11	2.00 (−1.682)	0.80	5.00	147.52	0.244	0.55
12	3.00	0.80	5.00	125.08	0.213	0.04
13	3.59	1.04	3.22	127.42	0.292	0.31
14	3.00	0.80	5.00	124.17	0.22	0.00
15	2.41	1.04	3.22	141.22	0.256	0.54
16	3.00	0.80	8.00 (+1.682)	133.40	0.264	0.42
17	3.00	0.80	5.00	125.67	0.216	0.08
18	3.00	1.20 (+1.682)	5.00	132.40	0.229	0.26
19	3.59	1.04	6.78	135.92	0.204	0.00
20	3.00	0.40 (−1.682)	5.00	133.31	0.253	0.38

表9 方差分析结果

Table 9 Analysis of variance results

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	0.878 5	0.097 6	18.49	<0.000 1
X_1	1	0.159 8	0.159 8	30.28	0.000 3
X_2	1	0.042 3	0.042 3	8.01	0.017 8
X_3	1	0.064 6	0.064 6	12.24	0.005 7
X_1X_2	1	0.016 2	0.016 2	3.06	0.110 8
X_1X_3	1	0.016 7	0.016 7	3.17	0.105 6
X_2X_3	1	0.000 2	0.000 2	0.031 3	0.863 0
X_1^2	1	0.252 6	0.252 6	47.84	<0.000 1
X_2^2	1	0.104 5	0.104 5	19.80	0.001 2
X_3^2	1	0.326 8	0.326 8	61.90	<0.000 1
残差	10	0.052 8	0.005 3		
失拟项	5	0.044 0	0.008 8	4.98	0.051 3
纯误差	5	0.008 8	0.001 8		
总离差	19	0.931 3			

型具有极显著性差异 ($F=18.49$, $P<0.000 1$); 方程失拟项差异无统计学意义 ($F=4.98$, $P=0.051 3$), 表明模型拟合程度良好, 试验误差较小, 可用于预测和优化 GA-NCs 的处方。从该模型中可以看出, 3 个因素的影响程度为药物用量 (X_1) > 水化体积 (X_3) > 柠檬酸用量 (X_2)。各因素交互作用对 OD 影响的响应面图和等高线图见图 3。

以 OD 最大化为优化目标, 在设定的因素范围内进行数值优化, 得到最优处方条件为藤黄酸 3.3 mg, 柠檬酸 0.9 mg, 水化体积 5.5 mL。

2.5 GA-NCs 最优处方验证

根据单因素实验和 CCD-RSM 优化结果, 按最优处方工艺平行制备 3 批 GA-NCs 测定粒径和 PDI。按公式 [相对偏差 = (预测值 - 实测值) / 预测值] 计算相对偏差, 以评估模型方程的可靠性。结果见表 10, 粒径和 PDI 的相对偏差分别为 0.46% 和 0.96%,

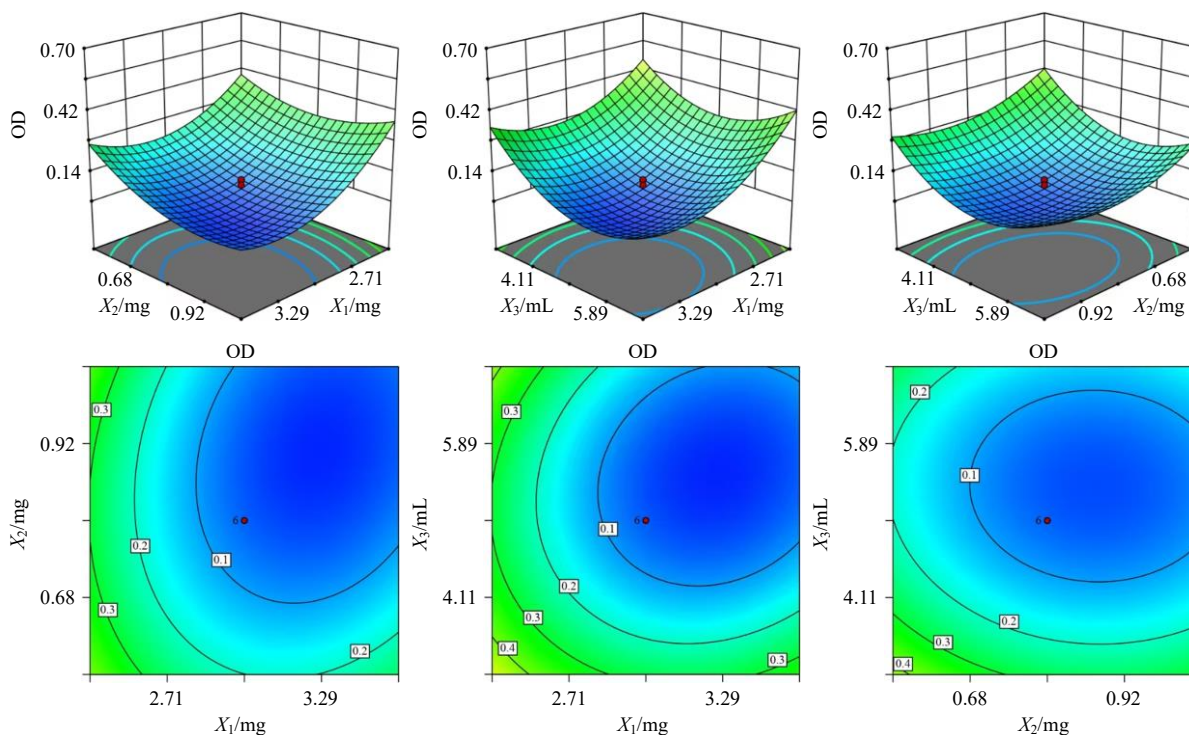


图3 三维效应图和等高线图

Fig. 3 3D response surface and contour plots

均 < 5%, 证明所建立的模型具有良好的预测性, 处方设计科学合理。

2.6 GA-NCs 的评价

2.6.1 外观形态考察 GA-NCs 在室温下长期静置后仍保持透明、均一的黄色胶体分散状态 (图 4)。经光源照射可观察到明显的丁达尔效应, 呈现清晰的光路, 证实藤黄酸在水相中分布均匀且不易聚

集, 具有良好的物理稳定性。

2.6.2 粒径、PDI 及 ζ 电位测定 按最优处方制备 GA-NCs, 测定其粒径、PDI 及 ζ 电位, 结果粒径为 (126.63 ± 0.42) nm, PDI 为 0.214 ± 0.003 , ζ 电位为 (-10.63 ± 0.31) mV ($n=3$), GA-NCs 粒径分布和 ζ 电位见图 5。各参数表现出良好的重现性, 证明该工艺可靠。体系表面带负电荷, 有助于通过静电斥

表 10 验证实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Experimental results are verified ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	Y_1/nm	Y_2
第 1 批	125.21 ± 1.34	0.215 ± 0.031
第 2 批	124.44 ± 0.65	0.211 ± 0.004
第 3 批	126.17 ± 0.97	0.206 ± 0.012
预测值	125.81	0.209

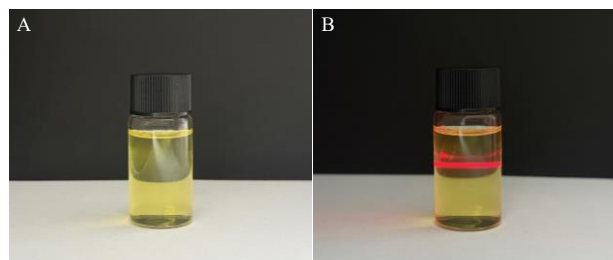


图 4 GA-NCs 的外观 (A) 和丁达尔效应 (B)

Fig. 4 Appearance (A) and Tyndall effect (B) of GA-NCs

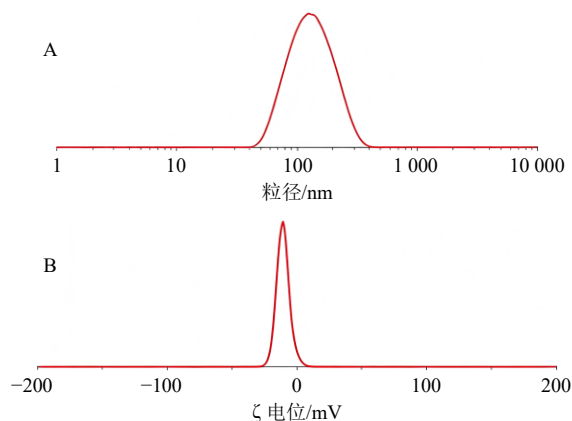


图 5 GA-NCs 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 5 Particle sizes distribution (A) and ζ potential (B) of GA-NCs

力防止聚集,从而确保 GA-NCs 在贮存过程中的物理稳定性。

2.6.3 包封率和载药量的测定 精密吸取 GA-NCs 5 mL,置于截留相对分子质量 (M_w) 为 3 000 的超滤管中,于 6 000 r/min 条件下离心 5 min (离心半径为 6 cm),收集滤液测定游离藤黄酸的质量浓度 ($C_{\text{游离}}$)。平行 3 次,结合初始投药量 (W),按公式计算包封率。结果 GA-NCs 中藤黄酸的包封率为 $(95.25 \pm 0.39) \%$ 。

$$\text{包封率} = 1 - C_{\text{游离}} / W$$

精密吸取 GA-NCs 5 mL,在不加保护剂条件下直接冷冻干燥,精密称定冻干粉总质量 (W_1);加入 5 mL 甲醇充分溶解,于 13 000 r/min 条件下离心 10 min (离心半径为 6 cm),取上清液经 0.22 μm 微孔

滤膜滤过后测定藤黄酸含量,计算冻干粉中藤黄酸质量 (W_2),平行 3 次,按照公式计算载药量。经计算 GA-NCs 中藤黄酸的载药量为 $(20.46 \pm 0.42) \%$ 。

$$\text{载药量} = W_2 / W_1$$

2.7 单因素考察 GA-NCs@PL-FA 处方工艺

2.7.1 制备温度的考察 固定“2.1.2”项下处方工艺其他条件不变,考察制备温度 30、40、50、55、60 $^{\circ}\text{C}$ 对 GA-NCs@PL-FA 粒径和包封率的影响,结果见表 11。随着制备温度的升高,GA-NCs@PL-FA 的粒径呈减小趋势,包封率先升高后降低,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时达到峰值 $(80.93 \pm 0.44) \%$ 。考虑到粒径与包封率的平衡,初步确定 30~50 $^{\circ}\text{C}$ 为理想温度范围,后续再进一步优化。

表 11 制备温度对 GA-NCs@PL-FA 粒径和包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Effects of preparation temperature on particle size and encapsulation efficiency of GA-NCs@PL-FA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

制备温度/ $^{\circ}\text{C}$	粒径/nm	包封率/%
30	232.43 ± 1.11	68.41 ± 0.57
40	196.93 ± 1.59	80.93 ± 0.44
50	202.47 ± 0.91	76.53 ± 0.76
55	194.90 ± 0.85	70.69 ± 0.70
60	191.47 ± 1.15	66.33 ± 0.61

2.7.2 脂药比的考察 固定“2.1.2”项下处方工艺其他条件不变,考察脂药比 6:1、9:1、12:1、15:1、18:1 对 GA-NCs@PL-FA 粒径和包封率的影响,结果见表 12。随着脂药比的增加,GA-NCs@PL-FA 的粒径逐渐增大,这可能与磷脂用量增加导致包材层增厚有关。包封率在脂药比为 12:1 时最高。综合考虑粒径的可控性与较高的包封率,初步选定脂药比在 9:1~15:1 进行后续优化。

2.7.3 磷胆比的考察 固定“2.1.2”项下处方工艺其他条件不变,考察磷胆比 2:1、3:1、4:1、5:

表 12 脂药比对 GA-NCs@PL-FA 粒径和包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 12 Effects of lipid-drug ratio on particle size and encapsulation efficiency of GA-NCs@PL-FA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂药比	粒径/nm	包封率/%
6:1	163.20 ± 0.87	65.30 ± 0.32
9:1	168.23 ± 3.62	81.06 ± 0.90
12:1	194.67 ± 0.57	83.96 ± 0.57
15:1	225.67 ± 4.70	77.48 ± 0.39
18:1	221.50 ± 1.11	83.68 ± 0.07

1、6:1对GA-NCs@PL-FA粒径和包封率的影响,结果见表13。随着磷脂与胆固醇比例的增加,GA-NCs@PL-FA的粒径总体呈波动上升趋势,包封率在2:1时最高。考虑到胆固醇含量过高可能影响脂质层的柔韧性,故选择磷胆比为3:1~5:1进一步优化。

表13 磷胆比对GA-NCs@PL-FA粒径和包封率的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 13 Effects of phospholipid-cholesterol ratio on particle size and encapsulation efficiency of GA-NCs@PL-FA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

磷胆比	粒径/nm	包封率/%
2:1	157.47±1.46	84.10±0.68
3:1	163.20±0.87	78.78±0.35
4:1	195.40±0.44	82.35±0.39
5:1	183.93±1.34	75.91±0.25
6:1	208.30±4.06	77.84±0.06

2.7.4 DSPE-mPEG₂₀₀₀用量考察 固定“2.1.2”项下处方工艺其他条件不变,考察DSPE-mPEG₂₀₀₀用量5%、7%、9%(以其与总脂质质量比表示)对GA-NCs@PL-FA粒径和包封率的影响,结果见表14。随着DSPE-mPEG₂₀₀₀用量的增加,粒径先减小后增大,而包封率则先升高后降低。当DSPE-mPEG₂₀₀₀用量达7%时,GA-NCs@PL-FA表现出最小的粒径和最佳包封率,这可能是由于适量的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)修饰增强了体系的稳定性并防止了粒子聚集。因此,确定DSPE-mPEG₂₀₀₀用量为7%。

2.7.5 DSPE-PEG₂₀₀₀-FA用量考察 固定“2.1.2”项下处方工艺其他条件不变,考察DSPE-PEG₂₀₀₀-FA用量1%、3%、5%(以其与总脂质质量比表示)对GA-NCs@PL-FA粒径和包封率的影响,结果见表15。随着DSPE-PEG₂₀₀₀-FA用量的增加,GA-NCs@PL-FA的粒径逐渐增大,包封率则先升高后降低,在3%达峰值。为兼顾靶向配体与载药性能,故后续

表14 DSPE-mPEG₂₀₀₀用量对GA-NCs@PL-FA粒径和包封率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 14 Effects of DSPE-mPEG₂₀₀₀ dosage on particle size and encapsulation efficiency of GA-NCs@PL-FA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

DSPE-mPEG ₂₀₀₀ 用量/%	粒径/nm	包封率/%
5	205.50±1.15	78.88±0.59
7	196.07±2.22	82.76±0.75
9	210.20±3.60	70.16±0.18

表15 DSPE-PEG₂₀₀₀-FA用量对GA-NCs@PL-FA粒径和包封率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 15 Effects of DSPE-PEG₂₀₀₀-FA dosage on particle size and encapsulation efficiency of GA-NCs@PL-FA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

DSPE-PEG ₂₀₀₀ -FA用量/%	粒径/nm	包封率/%
1	188.27±0.59	78.00±0.87
3	196.43±1.16	81.63±0.56
5	205.03±2.63	79.56±0.32

选择用量为3%进行制备。

2.7.6 超声功率考察 固定“2.1.2”项下处方工艺其他条件不变,考察超声功率(60、120、180 W)对GA-NCs@PL-FA粒径和包封率的影响,结果见表16。随着超声功率的增加,GA-NCs@PL-FA的粒径逐渐减小,包封率在120 W时最高,而在180 W时由于超声产热或能量过高可能导致部分结构破坏,包封率反而下降,综合考虑后选择120 W作为超声功率。

表16 超声功率对GA-NCs@PL-FA粒径和包封率的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 16 Effects of ultrasonic power on particle size and encapsulation efficiency of GA-NCs@PL-FA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声功率/W	粒径/nm	包封率/%
60	229.30±7.56	71.66±0.54
120	194.17±1.31	81.60±0.33
180	184.73±2.90	77.95±0.33

2.7.7 超声时间考察 固定“2.1.2”项下处方工艺其他条件不变,考察超声时间(3、5、7 min)对GA-NCs@PL-FA粒径和包封率的影响。结果见表17,超声时间在5 min时性能最优,故后续选择超声时间5 min制备GA-NCs@PL-FA。

2.8 CCD-RSM优化GA-NCs@PL-FA处方工艺

在单因素实验基础上,以制备温度(X_1)、脂药比(X_2)和磷胆比(X_3)为考察因素,分别设定5个水平(-1.682、-1、0、+1、+1.682),以粒径(Y_1)

表17 超声时间对GA-NCs@PL-FA粒径和包封率的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 17 Effects of ultrasound time on particle size and encapsulation efficiency of GA-NCs@PL-FA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间/min	粒径/nm	包封率/%
3	240.47±7.81	79.43±0.42
5	195.97±3.27	81.41±0.08
7	171.83±0.85	72.50±0.33

和包封率 (Y_2) 为评价指标, 利用 Design Expert 13 软件进行 3 因素 5 水平的实验优化, 结果见表 18。

由于粒径趋小, 包封率趋大, 采用归一化法对 2 项指标进行无量纲化处理: 粒径 (d_1) = $(Y_{1\max} - Y_1) / (Y_{1\max} - Y_{1\min})$; 包封率 (d_2) = $(Y_2 - Y_{2\min}) / (Y_{2\max} - Y_{2\min})$, 并按 $OD = (d_1 d_2)^{1/2}$ 计算综合评分值。OD 值越大, 表明处方的综合性能越优, 结果见表 18。式中, $Y_{1\max}$ 和 $Y_{1\min}$ 分别为粒径的最大值和最小值, $Y_{2\max}$ 和 $Y_{2\min}$ 分别为包封率的最大值和最小值。

表 18 CCD 安排与结果

Table 18 Arrangement and results of CCD

试验号	$X_1/^\circ\text{C}$	X_2	X_3	Y_1/nm	$Y_2/\%$	OD
1	40.00 (0)	12.00 (0)	4.00 (0)	196.02	82.66	0.72
2	40.00	12.00	3.00 (-1.682)	164.54	85.56	1.00
3	34.05 (-1)	13.78 (+1)	3.41 (-1)	211.73	83.74	0.61
4	34.05	10.22 (-1)	4.59 (+1)	206.87	71.61	0.35
5	40.00	12.00	4.00	194.92	81.07	0.69
6	45.95 (+1)	13.78	3.41	191.68	83.53	0.77
7	40.00	12.00	4.00	194.20	81.65	0.71
8	40.00	9.00 (-1.682)	4.00	170.81	80.24	0.81
9	40.00	12.00	5.00 (+1.682)	205.28	76.81	0.52
10	34.05	10.22	3.41	171.40	74.68	0.62
11	40.00	15.00 (+1.682)	4.00	221.52	85.35	0.54
12	40.00	12.00	4.00	195.65	83.39	0.74
13	45.95	13.78	4.59	205.33	75.28	0.48
14	40.00	12.00	4.00	195.14	82.48	0.72
15	45.95	10.22	3.41	174.29	76.11	0.66
16	30.00 (-1.682)	12.00	4.00	234.50	66.65	0.00
17	40.00	12.00	4.00	195.71	80.86	0.68
18	34.05	13.78	4.59	246.63	71.07	0.00
19	45.95	10.22	4.59	188.82	79.37	0.69
20	50.00 (+1.682)	12.00	4.00	201.10	72.04	0.40

对表 18 中数据拟合, 可得 2 次多元回归方程: $OD = 0.7087 + 0.1219X_1 - 0.0669X_2 - 0.1434X_3 + 0.0324X_1X_2 + 0.0765X_1X_3 - 0.0829X_2X_3 - 0.1830X_1^2 - 0.0134X_2^2 + 0.0146X_3^2$, $R^2 = 0.9960$ 。

对回归方程进行方差分析, 结果见表 19。模型具极显著性差异 ($F = 276.00$, $P < 0.0001$); 方程失拟项差异无统计学意义 ($F = 1.00$, $P = 0.4987$), 表明模型拟合程度良好, 试验误差较小, 可用于预测和优化 GA-NCs@PL-FA 的处方。从该模型中可以看出, 3 个因素影响程度为磷胆比 (X_3) > 制备温度 (X_1) > 脂药比 (X_2)。

各因素交互作用对 OD 影响的响应面图和等高

表 19 方差分析结果

Table 19 Analysis of variance results

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	1.150 0	0.128 1	276.00	<0.000 1
X_1	1	0.202 9	0.202 9	436.99	<0.000 1
X_2	1	0.061 1	0.061 1	131.54	<0.000 1
X_3	1	0.280 9	0.280 9	604.94	<0.000 1
X_1X_2	1	0.008 4	0.008 4	18.07	0.001 7
X_1X_3	1	0.046 9	0.046 9	100.91	<0.000 1
X_2X_3	1	0.055 0	0.055 0	118.38	<0.000 1
X_1^2	1	0.482 6	0.482 6	1 039.47	<0.000 1
X_2^2	1	0.002 6	0.002 6	5.56	0.040 1
X_3^2	1	0.003 1	0.003 1	6.57	0.028 2
残差	10	0.004 6	0.000 5		
失拟项	5	0.002 3	0.000 5	1.00	0.498 7
纯误差	5	0.002 3	0.000 5		
总离差	19	1.160 0			

线图见图 6。以 OD 最大化为优化目标, 在设定的因素范围内进行数值优化, 得到最优处方条件为制备温度 43°C 、脂药比 12.5:1、磷胆比 3.6:1。

2.9 GA-NCs@PL-FA 最优处方验证

按最优处方平行制备 3 批 GA-NCs@PL-FA, 验证方法同“2.5”项。结果见表 20, 粒径及包封率的相对偏差分别为 0.67% 和 0.50%, 实测值与预测值吻合度较高 (相对偏差均 < 5%), 表明所建立的回归模型具有良好的预测能力, 所得处方参数准确、可靠。

2.10 GA-NCs@PL-FA 的评价

2.10.1 外观形态考察 室温环境下, GA-NCs@PL-FA 呈现与 GA-NCs 相同颜色, 体系均匀透明, 无肉眼可见沉淀或聚集; 当入射光照射时, 可观察到清晰的丁达尔现象。利用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 考察 GA-NCs@PL-FA 微观形态 (图 7), GA-NCs@PL-FA 外观呈类球形, 分散度较好, 粒径分布均一。

2.10.2 粒径、PDI 及 ζ 电位测定 方法同“2.6.2”项, 结果 GA-NCs@PL-FA 的粒径为 (183.07 ± 0.55) nm, PDI 为 0.296 ± 0.006 , ζ 电位为 (-17.70 ± 0.17) mV ($n = 3$), GA-NCs 粒径分布和 ζ 电位如图 8 所示。GA-NCs@PL-FA 表现出良好的批间重复性, 粒径分布曲线呈规整的单峰分布, 表明制剂粒径分布较为均一; 明显增加的表面负电位有助于增强颗粒间静电排斥作用, 从而提高其在水相介质中的物理稳定性。

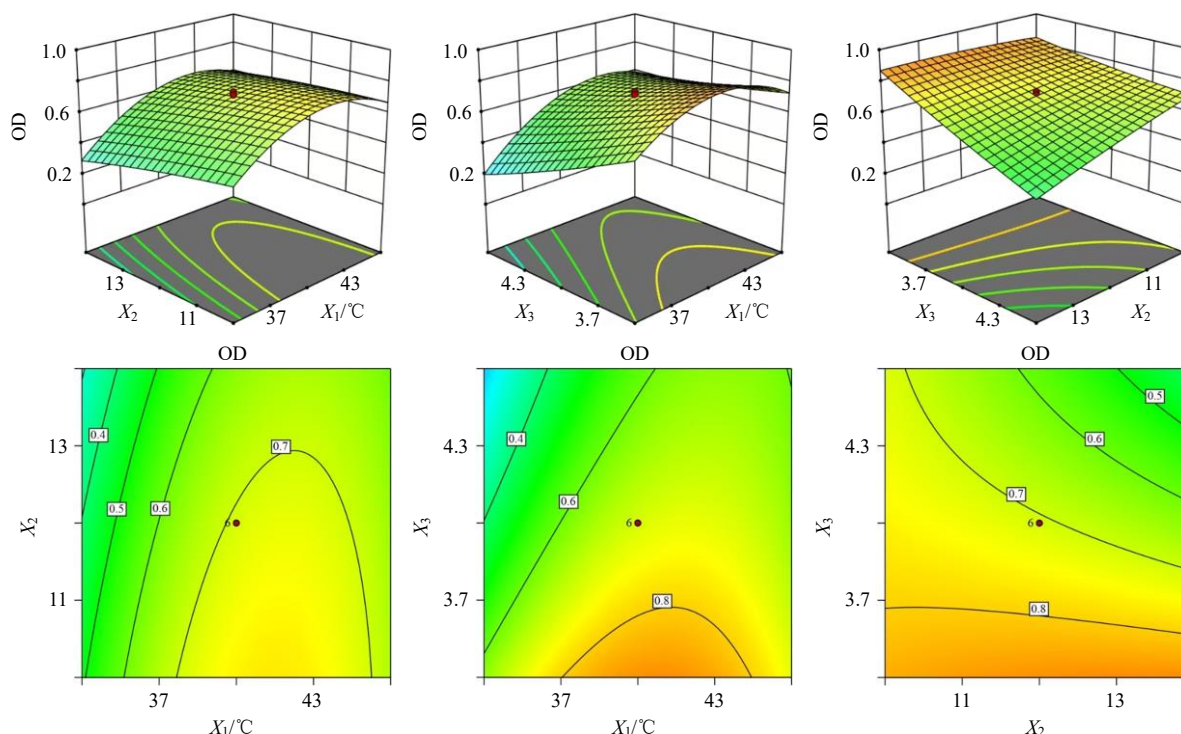


图 6 三维效应图和等高线图

Fig. 6 3D response surface and contour plots

表 20 验证实验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 20 Results of validation experiments ($\bar{x} \pm s, n=3$)

批次	粒径/nm	包封率/%
第 1 批	181.18 $\pm$ 1.21	82.45 $\pm$ 0.21
第 2 批	183.54 $\pm$ 3.75	82.31 $\pm$ 0.35
第 3 批	180.69 $\pm$ 2.34	80.87 $\pm$ 0.27
预测值	180.59	81.47

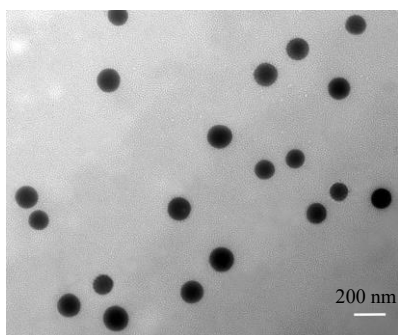


图 7 GA-NCs@PL-FA 的 TEM 照片

Fig. 7 TEM photos of GA-NCs@PL-FA

2.10.3 包封率和载药量的测定 精密量取 1 mL GA-NCs@PL-FA 及一定质量的冻干粉末, 分别加入甲醇定容至 10 mL 进行破乳, 静置后用 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液测定药物含量, 按公式分别计算 GA-NCs@PL-FA 中藤黄酸的包封率和载药量, 结果包封率为 (84.64 $\pm$ 0.57) %, 载药量为 (4.33 $\pm$

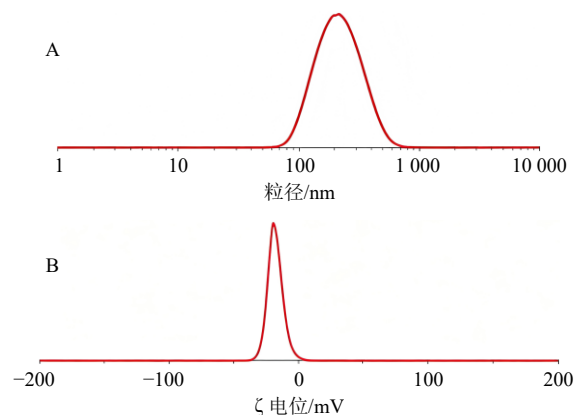


图 8 GA-NCs@PL-FA 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 8 Particle sizes distribution (A) and ζ potential (B) of GA-NCs@PL-FA

0.07) % ($n=3$)。

包封率 = 药物实际质量 / 药物的投入量

载药量 = 药物实际质量 / 制剂的总质量

2.10.4 稳定性考察 取 GA-NCs、GA-NCs@PL 及 GA-NCs@PL-FA 适量, 分别于 4、25 $^{\circ}$ C 避光放置, 在 0、1、3、5、7 d 取样 200 μ L, 测定粒径, 考察贮存稳定性。另取各制剂 4 mL, 与 8 mL PBS (pH 7.4, 含 10% 血清) 混合, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育, 同样时间点取样 200 μ L 测定粒径, 以评价血浆稳定性, 结果见表 21。GA-NCs@PL 和 GA-NCs@PL-FA 均表现

表 21 不同条件下 GA-NCs、GA-NCs@PL 及 GA-NCs@PL-FA 的稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 21 Stability investigation results of GA-NCs, GA-NCs@PL and GA-NCs@PL-FA under different conditions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	4 °C 下粒径/nm			25 °C 下粒径/nm			PBS 下粒径/nm		
	GA-NCs	GA-NCs@ PL	GA-NCs@ PL-FA	GA-NCs	GA-NCs@ PL	GA-NCs@ PL-FA	GA-NCs	GA-NCs@ PL	GA-NCs@ PL-FA
0	126.73±1.78	164.80±2.35	184.33±1.12	126.73±1.78	164.80±2.35	184.33±1.12	127.73±1.07	165.07±1.19	183.40±0.76
1	128.13±4.78	165.17±1.91	185.17±1.85	128.20±1.59	166.20±3.34	185.13±2.51	133.43±1.91	166.00±0.78	184.43±1.19
3	132.70±2.07	164.97±3.81	186.03±2.15	134.53±1.67	165.97±2.73	185.07±1.80	143.77±3.42	167.67±0.55	185.43±0.64
5	134.63±1.72	164.43±0.85	186.63±1.75	141.10±2.10	167.90±1.32	186.63±2.52	157.97±4.92	168.27±1.01	187.27±1.04
7	139.03±3.31	164.87±2.60	185.23±1.65	142.37±2.65	166.10±2.56	185.33±1.40	186.50±4.85	172.47±1.00	188.83±0.81

出优异的稳定性, 7 d 内粒径无显著变化; 而 GA-NCs 的粒径呈增大趋势。这可能与 PEG 链在 GA-NCs 表面形成的“空间位阻”效应有关, 提高了体系稳定性。此外, 叶酸的修饰未对 GA-NCs@PL-FA 的稳定性产生不利影响。

2.11 GA-NCs@PL-FA 体外释放度考察

采用 pH 7.4、6.5 的 PBS 作为释放介质(含 0.5% 聚山梨酯 80)。为排除释放介质对藤黄酸含量测定的干扰, 分别取藤黄酸对照品溶液、pH 7.4 空白释放介质、pH 7.4 释放样品溶液、pH 6.5 空白释放介质和 pH 6.5 释放样品溶液, 按照“2.2.2”项下色谱条件进样检测。结果见图 9, 2 种空白释放介质在藤黄酸保留时间处均未出现干扰峰, 释放样品溶液中藤黄酸色谱峰峰形良好, 表明释放介质不干扰藤黄酸的测定。

同时, 对该方法在释放介质中的线性关系考察、精密度、稳定性和加样回收率进行考察。结果显示, 藤黄酸在 0.5~32 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好 ($r>0.9990$); 各项方法学指标的 RSD 均符合要求, 表明该方法专属性、准确性和稳定性良好, 适用于 GA-NCs@PL-FA 体外释放样品中藤黄酸含量的测定。

分别量取游离藤黄酸溶液、GA-NCs、GA-NCs@PL 和 GA-NCs@PL-FA 各供试液 3 mL (藤黄酸质量浓度均为 0.6 mg/mL), 置于 M_w 14 000 透析袋中, 将透析袋两端封口投入 150 mL 的 2 种 PBS 释放介质中, (37.0±0.5) °C、100 r/min 条件下避光恒温振荡。分别于 0、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48、72、96 h 准确移取 1 mL 释放介质, 并立即补充等量同步温育的空白释放介质。

采用 HPLC 法测定各时间点介质中藤黄酸质量浓度, 并计算累积释放率。藤黄酸组配制方法为将 3.00 mg 藤黄酸用 0.2% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)

溶液溶解稀释至藤黄酸质量浓度为 0.6 mg/mL。同时, 用 0.2% CMC-Na 溶液分别稀释 GA-NCs、GA-NCs@PL 和 GA-NCs@PL-FA, 使各组藤黄酸的最终质量浓度均为 0.6 mg/mL。

模拟正常生理环境 (pH 7.4) 及肿瘤弱酸微环境 (pH 6.5) 下的体外释放曲线如图 10 所示, 藤黄酸组在 12 h 内药物累积释放率已达 (91.60±2.73) %, 表现出明显的药物溶出特征。相比之下, GA-NCs、GA-NCs@PL 和 GA-NCs@PL-FA 在 2 种 pH 条件下的释放过程均较为平缓, 表明将藤黄酸制成 GA-NCs 并进一步构建磷脂复合体系后, 可在一定程度上延缓药物释放。

在 pH 7.4 条件下, GA-NCs@PL 与 GA-NCs@PL-FA 的释放速率均低于 GA-NCs, 这可能与 PEG 化磷脂材料在纳米晶表面形成了亲水界面层有关, 在一定程度上增加了药物向释放介质扩散的阻力, 从而延缓藤黄酸释放^[25]。在 pH 6.5 条件下, GA-NCs、GA-NCs@PL 和 GA-NCs@PL-FA 的累积释放率整体均高于 pH 7.4 条件下对应制剂。对 96 h 累积释放数据进行统计分析后发现, 3 种制剂在不同 pH 条件下均存在显著性差异。其中, GA-NCs@PL-FA 在 96 h 的累积释放率为 (86.86±2.59) %, 高于 pH 7.4 条件下的 (73.56±1.69) % ($P<0.01$), 说明弱酸环境可在一定程度上影响 GA-NCs@PL-FA 体系膜层结构的稳定性及药物扩散行为。此外, GA-NCs@PL 与 GA-NCs@PL-FA 在 2 种 pH 值条件下的释放曲线整体接近, 表明叶酸配体的引入对纳米制剂的释药行为为无显著影响 ($P>0.05$)。与藤黄酸组相比, 各纳米制剂在考察时间内均未出现明显突释, 表现出较好的缓释特征。

2.12 GA-NCs@PL-FA 体外抗肝癌活性

2.12.1 HepG2 细胞的培养 将 HepG2 细胞置于 37

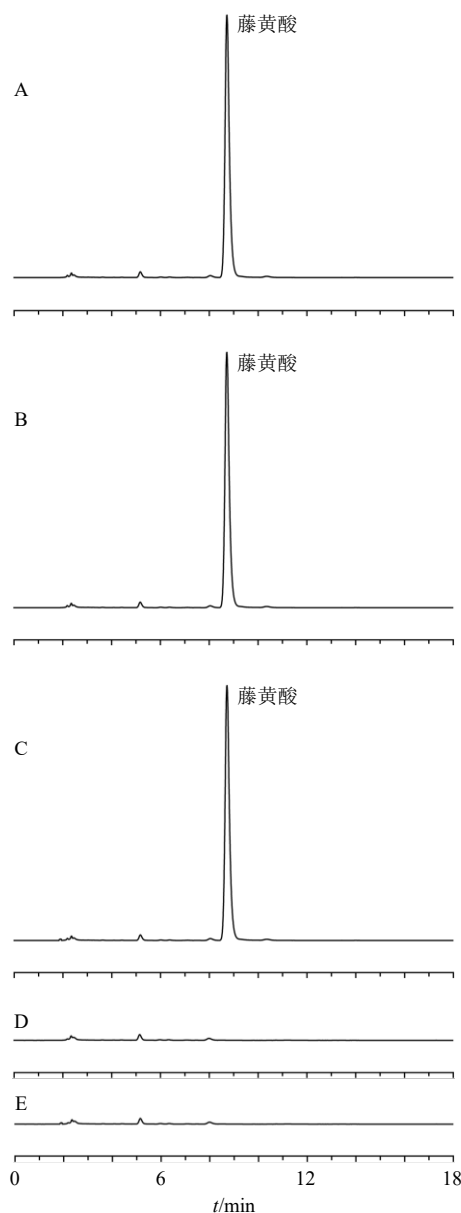


图 9 藤黄酸对照品溶液 (A), pH 7.4、6.5 释放样品溶液 (B, C) 和 pH 7.4、6.5 空白释放介质 (D, E) 的 HPLC 图

Fig. 9 HPLC of gambogic acid reference substance solution (A), pH 7.4, 6.5 release sample solution (B, C), pH 7.4, 6.5 blank release medium (D, E)

℃、5% CO₂、95% 相对湿度的培养箱中，采用完全培养基进行培养。细胞复苏后贴壁生长至融合度达 80%~90%，采用 0.25% 胰酶消化传代，取对数生长期细胞用于后续实验。

2.12.2 空白载体生物相容性评价 细胞贴壁后，实验组分别加入不同质量浓度 (8.75~140.00 μg/mL) 的空白 NCs@PL-FA 分散液，阴性对照组加入等体积完全培养基，空白组不接种细胞，仅加入等体积完全培养基。处理 24 h 后，加入 CCK-8 试剂，孵

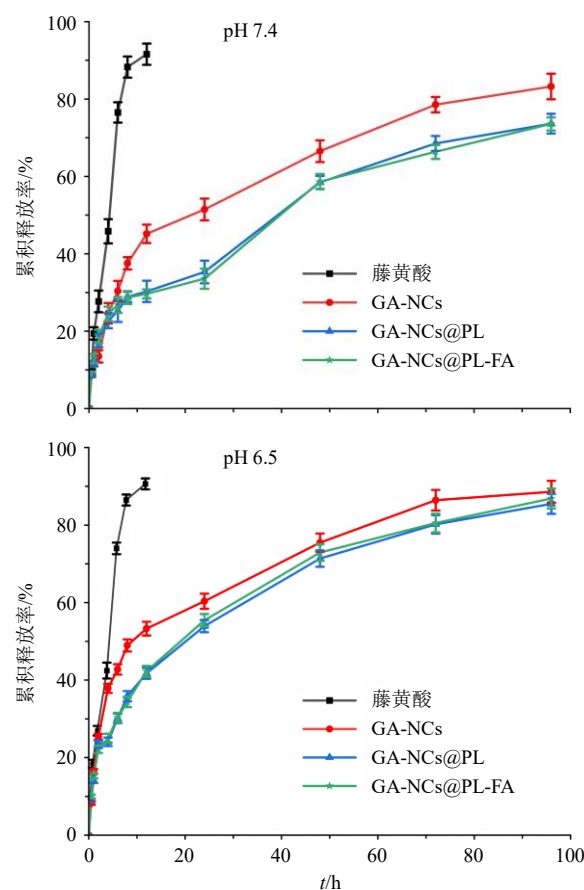


图 10 各制剂在 pH 7.4、6.5 PBS 释放介质下的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 *In vitro* release curves of each preparation at pH 7.4, 6.5 PBS release media ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

育后于 450 nm 波长处测定各孔吸光度 (A) 值，计算细胞存活率。结果见表 22，空白载体对 HepG2 细胞活力无明显影响，最高质量浓度下仍保持 90% 以上存活率，且随质量浓度升高，未观察到明显抑制趋势，说明空白载体在考察质量浓度范围内具有良好的生物相容性。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{阴性}} - A_{\text{空白}})$$

2.12.3 细胞划痕实验 HepG2 细胞贴壁形成单层后，使用无菌枪头制备划痕模型。藤黄酸、GA-NCs、GA-NCs@PL 和 GA-NCs@PL-FA 分别用含 2% 胎牛

表 22 空白载体对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 22 Effects of blank carrier on viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/ %	质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/ %
8.75	96.53 ± 1.63	70.00	91.01 ± 2.78
17.50	92.39 ± 2.72	140.00	90.85 ± 2.93
35.00	94.32 ± 2.04		

血清的 DMEM 培养基稀释后加入各孔, 与细胞共孵育 (各给药组均以藤黄酸计, 质量浓度为 0.4 $\mu\text{g/mL}$); 对照组加入等体积含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基。于 0、24、48 h 拍摄划痕图像, 测量划痕面积并计算愈合率。观察显示对照组细胞随时间延长逐渐向划痕中心迁移, 划痕区域明显缩小; 而给药后各实验组划痕愈合均受到不同程度抑制。结果见表 23, GA-NCs@PL-FA 组在 2 个时间点均表现出最低的划痕愈合率, 对 HepG2 细胞迁移的抑制作用最为明显。从不同制剂的比较结果可以看出, 纳米晶化处理后藤黄酸对细胞迁移的干预作用有所增强, 而叶酸修饰后这一效应进一步提高, 说明叶酸表面修饰有助于改善制剂与肿瘤细胞之间的相互作用。

2.12.4 细胞毒性实验 在明确不同制剂对细胞迁移存在差异后, 进一步评价其对 HepG2 细胞活力的影响。分别给予藤黄酸、GA-NCs、GA-NCs@PL 及 GA-NCs@PL-FA (藤黄酸质量浓度为 0.4~6.4 $\mu\text{g/mL}$)

表 23 不同处理组对 HepG2 细胞划痕愈合率影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 23 Effects of different groups on scratch closure rates of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	划痕愈合率/%	
	24 h	48 h
对照	34.14 $\pm$ 2.63	57.26 $\pm$ 1.76
藤黄酸	24.69 $\pm$ 1.39	39.31 $\pm$ 0.50
GA-NCs	13.15 $\pm$ 0.21	21.88 $\pm$ 0.58
GA-NCs@PL	12.34 $\pm$ 3.79	17.83 $\pm$ 2.69
GA-NCs@PL-FA	8.52 $\pm$ 1.58	11.50 $\pm$ 1.34

处理 24 h。加入 CCK-8 3 h 后测定 A 值, 计算细胞存活率并确定半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50})。结果见表 24, 各给药组均具有抑制 HepG2 细胞的作用, 且随给药质量浓度的增加抑制效果逐渐增强。GA-NCs@PL-FA 的 IC_{50} 值为 0.50 $\mu\text{g/mL}$, 表现出最强抑制作用, 说明叶酸修饰提高了藤黄酸在细胞内的积累。

表 24 不同药物组对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 24 Effects of different drug groups on viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	细胞存活率/%					$\text{IC}_{50}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
	0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	1.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	3.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	6.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
藤黄酸	98.08 $\pm$ 1.48	93.21 $\pm$ 2.44	68.00 $\pm$ 3.95	35.81 $\pm$ 3.12	19.67 $\pm$ 3.33	2.45
GA-NCs	73.11 $\pm$ 3.18***	53.04 $\pm$ 2.12***	42.73 $\pm$ 5.61***	30.69 $\pm$ 3.83	14.33 $\pm$ 3.10*	1.12
GA-NCs@PL	66.10 $\pm$ 3.59***##	50.28 $\pm$ 2.52***	40.12 $\pm$ 2.77***	22.80 $\pm$ 2.74***##	9.48 $\pm$ 3.45***	0.89
GA-NCs@PL-FA	56.25 $\pm$ 1.54***###+++	40.35 $\pm$ 1.82***###+++	24.87 $\pm$ 2.91***###+++	16.89 $\pm$ 2.20***###+	4.61 $\pm$ 0.88***###	0.50

与藤黄酸组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与 GA-NCs 组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与 GA-NCs@PL 组比较: + $P < 0.05$ +++ $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs gambogic acid group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs GA-NCs group; + $P < 0.05$ +++ $P < 0.001$ vs GA-NCs@PL group.

2.13 组织分布实验

单剂量给予荷瘤裸鼠 GA-NCs@PL-FA 后, 于不同时间点采集心、肝、脾、肺、肾及肿瘤组织, 采用 UPLC-MS/MS 法测定各组织中藤黄酸含量, 以评价其体内组织分布情况并考察靶向性。

2.13.1 UPLC-MS/MS 分析方法的建立

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Hypersil Gold C_{18} 柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μm); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液 (90:10); 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μL [26]。

(2) 质谱条件: 采集方式为单离子检测扫描与平行反应监测扫描; 检测方式为正/负离子检测; 离子源为电喷雾离子化源。以藤黄酸为待测物, 和厚朴酚为内标物进行定量分析, 二者质荷比分别为藤黄酸 m/z 627.3、和厚朴酚 m/z 265.1。鞘气压力 3.5

MPa (35 bar), 毛细管电压分别为 +3.5 kV 和 -3.2 kV, 辅助气压力 1.0 MPa (10 bar); 雾化气体温度为 350 $^{\circ}\text{C}$; 离子传输管温度 320 $^{\circ}\text{C}$ [26]。

2.13.2 GA-NCs@PL-FA 的组织分布 实验组裸鼠在给药后 2、4、8 h 实施处死, 每组 3 只, 采集心、肝、脾、肺、肾及肿瘤组织, 按 1 g 组织加 3 mL 生理盐水比例称定质量后匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 13 000 r/min 离心 15 min (离心半径为 5.9 cm), 取上清液 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。空白组荷瘤裸鼠未给药, 依上述方法处理空白组织上清液, 同条件冻存待测。

取上清液 100 μL 至离心管, 加 10 μL 内标液混匀, 加入 390 μL 甲醇沉淀蛋白, 涡旋 1 min, 静置 30 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 15 min, 取上清液采用 UPLC-MS/MS 检测藤黄酸含量。结果 (表 25) 表明, 不同制剂给药后藤黄酸在各组织中的分布特

表 25 不同时间点藤黄酸在各组织中的分布情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 25 Distribution of gambogic acid in different tissues at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	2 h 时藤黄酸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	心脏	肝脏	脾脏	肺	肾脏	肿瘤
藤黄酸	93.02 $\pm$ 10.51	473.69 $\pm$ 42.31	163.67 $\pm$ 16.78	113.08 $\pm$ 8.30	342.32 $\pm$ 46.45	256.13 $\pm$ 23.27
GA-NCs	116.63 $\pm$ 10.93	331.43 $\pm$ 18.16**	104.33 $\pm$ 29.93*	134.41 $\pm$ 14.32	250.16 $\pm$ 21.16*	403.17 $\pm$ 20.52**
GA-NCs@PL	132.89 $\pm$ 9.08	146.19 $\pm$ 26.93***	135.30 $\pm$ 16.31	117.65 $\pm$ 20.06	144.63 $\pm$ 24.65**	386.31 $\pm$ 21.93**
GA-NCs@PL-FA	143.37 $\pm$ 9.11**	137.73 $\pm$ 34.15***	145.09 $\pm$ 17.08	113.30 $\pm$ 16.95	156.64 $\pm$ 15.94**	418.57 $\pm$ 23.28**
组别	4 h 时藤黄酸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	心脏	肝脏	脾脏	肺	肾脏	肿瘤
藤黄酸	46.39 $\pm$ 9.51	390.66 $\pm$ 50.88	213.64 $\pm$ 24.88	97.26 $\pm$ 11.96	330.32 $\pm$ 58.15	198.71 $\pm$ 16.35
GA-NCs	104.18 $\pm$ 9.26**	262.06 $\pm$ 19.92*	92.44 $\pm$ 36.21**	157.93 $\pm$ 21.57*	232.99 $\pm$ 12.62*	287.64 $\pm$ 26.24**
GA-NCs@PL	113.43 $\pm$ 9.55***	111.13 $\pm$ 18.92***	159.29 $\pm$ 21.90*	88.56 $\pm$ 24.20	102.16 $\pm$ 16.77**	403.42 $\pm$ 17.18***
GA-NCs@PL-FA	117.44 $\pm$ 8.77***	91.08 $\pm$ 14.12***	168.56 $\pm$ 21.97	79.61 $\pm$ 19.82	75.37 $\pm$ 12.56**	455.96 $\pm$ 27.10***#
组别	8 h 时藤黄酸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	心脏	肝脏	脾脏	肺	肾脏	肿瘤
藤黄酸	31.37 $\pm$ 10.99	339.71 $\pm$ 45.36	155.52 $\pm$ 18.15	74.54 $\pm$ 15.82	268.41 $\pm$ 50.79	161.24 $\pm$ 11.93
GA-NCs	86.34 $\pm$ 9.71**	151.66 $\pm$ 15.55**	72.47 $\pm$ 8.03**	91.64 $\pm$ 22.60	142.99 $\pm$ 11.75*	205.89 $\pm$ 25.68
GA-NCs@PL	78.22 $\pm$ 11.64**	111.43 $\pm$ 19.68**	93.61 $\pm$ 10.13**	37.59 $\pm$ 12.56*	46.54 $\pm$ 15.58**	313.77 $\pm$ 19.74***
GA-NCs@PL-FA	70.44 $\pm$ 10.98*	142.55 $\pm$ 16.15**	113.45 $\pm$ 7.00**	17.23 $\pm$ 15.18*	30.31 $\pm$ 12.27**	385.53 $\pm$ 17.93***#

与藤黄酸组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 GA-NCs@PL 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs gambogic acid group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs GA-NCs@PL group。

征存在明显差异。

与藤黄酸组相比, GA-NCs、GA-NCs@PL 和 GA-NCs@PL-FA 组藤黄酸在肝脏和肾脏中的分布显著降低 ($P < 0.05$), 而在肿瘤组织中的分布明显增强 ($P < 0.001$)。2 h 时 GA-NCs@PL-FA 组肿瘤组织中, 藤黄酸质量浓度高于 GA-NCs@PL 组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 仅表现出一定升高趋势。这可能由于给药早期药物在肿瘤组织中的分布主要受血液循环、组织灌注及纳米制剂被动蓄积等因素影响, 叶酸介导的特异性受体识别与组织滞留作用尚未充分发挥^[27]。

随着时间延长, GA-NCs@PL-FA 在 4、8 h 时肿瘤组织中藤黄酸浓度显著高于 GA-NCs@PL 组 ($P < 0.05$ 、0.01), 说明叶酸修饰有助于增强纳米制剂在肿瘤组织中的富集和滞留, 提高其对 HepG2 荷瘤组织的靶向递送能力。组织分布结果也证实, GA-NCs@PL-FA 具有主动靶向 HepG2 肝癌组织的能力, 同时有效降低游离药物在肝、肾等主要正常组织中的暴露, 为其作为安全、高效的靶向递送系统提供了有力的实验依据。

3 讨论

藤黄酸属于典型难溶性药物, 溶解度低、分散

性差; 纳米晶作为一类以药物自身为主体的胶体分散体系, 能够在减少辅料用量的同时提高药物分散性, 为改善藤黄酸成药性不足及后续递药系统构建提供基础^[28]。然而, 单纯药物纳米晶在复杂生理环境中可能存在界面稳定性不足、颗粒聚集及体内分布选择性有限等问题。因此, 本实验在制备 GA-NCs 的基础上, 进一步通过薄膜水化法在其表面引入 DSPE-PEG₂₀₀₀-FA, 构建纳米晶-磷脂复合递药体系。GA-NCs@PL-FA 外观呈类球形, 粒径分布曲线呈对称单峰, 分布区间较窄, 说明所制备的纳米晶粒径均一。TEM 观察到的 GA-NCs@PL-FA 粒径略小于粒度仪测定结果, 可能是由于在制样过程中水分的挥干导致粒子发生皱缩。 ζ 电位较 GA-NCs 显著降低说明增加了粒子间的静电排斥, 有利于维持体系的稳定性。

在制备工艺选择上, 相较于传统的高压均质法、介质研磨法等物理粉碎技术存在耗能高、易破坏药物晶型及易引入介质污染等缺点。本研究选用的 CO₂ 辅助沉淀法条件温和, 能够有效避免物理研磨中的产热效应, 保护了对酸碱敏感且受热易降解的藤黄酸分子。此外, 利用 CO₂ 良好的渗透性与溶剂效应, 结合单因素考察与 CCD-RSM 优化, 较好

地调控 GA-NCs@PL-FA 粒径、PDI 及包封率等关键质量指标,明确了各工艺因素间的交互作用,为 GA-NCs@PL-FA 的制备与质量评价提供依据。

叶酸修饰进一步赋予了纳米制剂主动靶向的能力,叶酸通过 DSPE-PEG₂₀₀₀-FA 嵌入磷脂界面层,使靶向配体暴露于颗粒表面,从而为后续与肿瘤细胞表面叶酸受体识别及受体介导内吞提供结构基础。与部分蛋白类或多肽类配体相比,叶酸分子结构简单、稳定性较好,对纳米递药系统理化性质的影响较小。

通过体外释放试验发现,GA-NCs@PL-FA 与 GA-NCs@PL 的释放行为较为接近,说明叶酸修饰并未破坏脂质层的完整性。由于藤黄酸具有较强的细胞毒性,且 iv 给药后直接进入体循环,因此提高肿瘤部位选择性分布对增强药效和降低非靶组织暴露具有重要意义。本实验通过体外细胞实验及体内组织分布实验评估了 GA-NCs@PL-FA 的靶向递送效能,研究结果证实纳米晶-磷脂复合化与叶酸修饰在藤黄酸肿瘤递送过程中呈现协同增效特征,共同促进藤黄酸递送性能的改善。

目前,针对藤黄类难溶性成分的纳米递药研究多集中于脂质体、胶束等外源性载体系统。例如,已有研究报道了叶酸修饰的载新藤黄酸纳米结构脂质载体,并验证了叶酸修饰脂质载体的递药优势^[29]。该研究与本实验均围绕藤黄类难溶性成分的靶向递送展开,说明叶酸介导的主动靶向策略在该类药物递送中具有应用价值。然而,既往研究主要依赖脂质基质对藤黄酸进行包载,而本实验以 GA-NCs 为主体,使体系在保持纳米晶高药物占比和少辅料特征的同时,利用外层磷脂改善界面稳定性和释放行为,并通过叶酸修饰赋予其主动靶向潜力。同时采用 UPLC-MS/MS 直接测定荷瘤裸鼠各组织中藤黄酸含量,从药物本身的组织暴露水平定量评价其体内分布和肿瘤富集能力。相较于单纯依赖荧光探针示踪的分布观察,该方法更有助于反映活性成分递送后的真实组织分布特征。

鉴于藤黄酸对肝癌、肺癌、结直肠癌及乳腺癌等多种癌症的抗肿瘤活性和多靶点抑癌机制,本文构建了一种兼具缓释特性与主动靶向潜力的纳米晶-磷脂复合递药体系,为解决难溶性药物成分的递送提供了有效策略。随着主动靶向技术与无载体纳米技术的协同发展,GA-NCs@PL-FA 在实现肿瘤精准治疗方面展现出良好应用前景。后续可进一步开

展体内抗肝癌活性研究,以验证 GA-NCs@PL-FA 在病灶部位的靶向富集效能,从而为 GA-NCs@PL-FA 的体内外应用提供依据和参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 丁欢欢,姜先梅,刘红梅,等. 藤黄酸和雷帕霉素共载脂质体的制备及协同抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 2896-2911.
- [2] 熊嫣,胡逸灵,熊洁,等. 藤黄属药用植物活性成分的药理作用及其机制研究新进展 [J]. 中国野生植物资源, 2024, 43(6): 85-90.
- [3] 孙强,涂柯蓉,姜先梅,等. 藤黄酸抗肿瘤作用机制及联合用药研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2423-2432.
- [4] Liu X, Hu Q, Wang W Y, *et al.* A protein-fragment complementation assay reveals that celastrol and gambogic acid suppress ER α mutants in breast cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 188: 114583.
- [5] Zhang Z, Qian H Q, Yang M, *et al.* Gambogic acid-loaded biomimetic nanoparticles in colorectal cancer treatment [J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 1593-1605.
- [6] Du Q, Lv F N, Huang J, *et al.* A multiple environment-sensitive prodrug nanomicelle strategy based on chitosan grafted for enhanced tumor therapy of gambogic acid [J]. *Carbohydr Polym*, 2021, 267: 118229.
- [7] 赵广超,庄婕. 藤黄酸的制剂研究进展 [J]. 中国药师, 2020, 23(7): 1404-1408.
- [8] 吕春艳,信文婧,崔闻宇,等. 基于药物纳米晶的肿瘤靶向纳米递药系统研究进展 [J]. 医药导报, 2026, 45(1): 100-108.
- [9] Dhibar M, Chakraborty S, Kundu A, *et al.* Chemistry characterization and application of nanocrystals-based drug delivery system: Present to future perspective [J]. *Pharm Nanotechnol*, 2023, 11(3): 265-275.
- [10] Rana S, Tomar D, Kaushik P, *et al.* Targeted approach to enhance the solubility of weakly soluble drugs by nanocrystal technology [J]. *Pharm Nanotechnol*, 2023, 11(5): 425-432.
- [11] Wang Y, Tan X Y, Fan X Y, *et al.* Current strategies for oral delivery of BCS IV drug nanocrystals: Challenges, solutions and future trends [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2021, 18(9): 1211-1228.
- [12] Liang H M, Zou F M, Liu Q W, *et al.* Nanocrystal-loaded liposome for targeted delivery of poorly water-soluble antitumor drugs with high drug loading and stability towards efficient cancer therapy [J]. *Int J Pharm*, 2021, 599: 120418.

- [13] Xiao Y X, Liu Q T, Clulow A J, *et al.* PEGylation and surface functionalization of liposomes containing drug nanocrystals for cell-targeted delivery [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, 182: 110362.
- [14] Lu L W, Xu Q Z, Wang J, *et al.* Drug nanocrystals for active tumor-targeted drug delivery [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(4): 797.
- [15] 高娟, 李伟宏, 李秀芬, 等. pH 敏感/叶酸修饰白藜芦醇脂质体的制备、表征及对子宫内腺癌荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用 [J]. *中草药*, 2025, 56(20): 7368-7383.
- [16] 顾永卫, 姜良弟, 杜月, 等. 叶酸介导的雷公藤甲素外泌体靶向给药系统抗恶性黑色素瘤体内外评价 [J]. *药学报*, 2021, 56(12): 3224-3232.
- [17] 杨坤, 张海珠, 张月辉, 等. 叶酸修饰的 pH 值响应型去甲斑蝥素脂质体的制备及促 HepG2 细胞凋亡研究 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(6): 1529-1545.
- [18] Yoo J, Park C, Yi G, *et al.* Active targeting strategies using biological ligands for nanoparticle drug delivery systems [J]. *Cancers*, 2019, 11(5): 640.
- [19] Ibrahim M A I, Othman R, Chee C F, *et al.* Evaluation of folate-functionalized nanoparticle drug delivery systems: Effectiveness and concerns [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(7): 2080.
- [20] Han X F, Wang M L, Ma Z H, *et al.* A new approach to produce drug nanosuspensions CO₂-assisted effervescence to produce drug nanosuspensions [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 143: 107-110.
- [21] Zeng X W, Liu S Z, He Q H, *et al.* Preparation and antitumor activity evaluation of folic acid-modified phospholipid-gambogic acid nanocrystals [J]. *Pharmaceutics*, 2026, 18(2): 253.
- [22] 杜建靓. 叶酸修饰紫杉醇纳米晶制备及抗乳腺癌作用研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2020.
- [23] 田阳, 彭一凡, 张志伟, 等. 纳米晶体药物制备技术的研究进展 [J]. *药学报*, 2021, 56(7): 1902-1910.
- [24] 毕建云, 王嘉驿, 刘善新. 基于星点设计-响应面优化法的川芎挥发油二元醇质体制备及性能表征 [J]. *中国医院药学杂志*, 2025, 45(14): 1569-1577.
- [25] 余红玲, 周丹, 葛均友, 等. 喜树碱衍生物 T030 长循环脂质体的制备及药效评价 [J]. *华西药学杂志*, 2025, 40(5): 502-506.
- [26] 白皎皎. 藤黄酸纳米制剂的制备及体内药代动力学和急性毒性研究 [D]. 成都: 电子科技大学, 2019.
- [27] Xu Y L, Wu H, Huang J, *et al.* Probing and enhancing ligand-mediated active targeting of tumors using sub-5 nm ultrafine iron oxide nanoparticles [J]. *Theranostics*, 2020, 10(6): 2479-2494.
- [28] 欧阳振, 王利利, 张志浩, 等. 纳米晶药物技术创新、稳定机制与应用研究进展 [J]. *聊城大学学报: 自然科学版*, 2026, 39(5): 777-788.
- [29] 闫宏丽. 叶酸靶向修饰载新藤黄酸纳米结构脂质载体的研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2020.

[责任编辑 郑礼胜]