

金丝桃苷混合纳米胶束的制备及其肠吸收研究[△]

张宇航*, 邱智东, 邱野, 王伟楠, 刁元元, 石羽文, 姜孟成, 刘伟朋, 贾艾玲[#](长春中医药大学中药有效成分省部共建教育部重点实验室, 长春 130117)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)10-1189-09
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.10.07



摘要 目的 制备金丝桃苷混合纳米胶束(Hyp-F127/TPGS)并优化其制备工艺,考察其肠吸收特性。方法 采用薄膜分散法制备Hyp-F127/TPGS。在单因素实验和Plackett-Burman实验设计的基础上,结合Box-Behnken响应面法,以包封率和载药量为考察指标,以F127-TPGS质量比、水化时间、Hyp投药量为因素,优化其制备工艺并验证;观察按最优工艺所制Hyp-F127/TPGS的外观、微观形态并测定其粒径、多分散性指数(PDI)和Zeta电位;考察空白胶束(F127/TPGS)的临界胶束浓度(CMC)、Hyp-F127/TPGS的体外释放行为和初步稳定性,利用大鼠在体单向肠灌流模型评价Hyp-F127/TPGS肠吸收特性。结果 Hyp-F127/TPGS的最优制备工艺为:F127-TPGS质量比2:1、水化时间2 h、Hyp投药量9 mg;3次验证实验结果显示,所制Hyp-F127/TPGS的包封率为(87.20±0.99)%,载药量为(5.02±1.20)%,与预测值的偏差分别为0.92%和2.39%。按最优工艺所制胶束为黄色澄清透明溶液,具有良好的丁达尔效应;透射电子显微镜下呈球形,形态完整且分布均匀,粒径为(15.02±0.16)nm,PDI为0.092±0.031,Zeta电位为(-6.67±1.47)mV;F127/TPGS的CMC为21 μg/mL,Hyp-F127/TPGS在4℃下存放4周的稳定性良好;Hyp-F127/TPGS和Hyp对照品的累积释放率分别为(66.30±2.93)%(96 h)、(99.24±0.27)%(60 h);Hyp-F127/TPGS和Hyp对照品在各肠段均有吸收,主要吸收部位分别为空肠和十二指肠,前者的药物吸收速率常数和表观吸收系数均显著高于后者($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 优化所得Hyp-F127/TPGS制备工艺稳定、可行;所制Hyp-F127/TPGS具有缓释效果,并在一定程度上促进了Hyp的肠吸收。

关键词 金丝桃苷;混合纳米胶束;制备工艺;肠吸收特性;Plackett-Burman设计;Box-Behnken响应面法;单向肠灌流模型

Study on the preparation of hyperoside mixed nanomicelles and its intestinal absorption

ZHANG Yuhang, QIU Zhidong, QIU Ye, WANG Weinan, DIAO Yuanyuan, SHI Yuwen, JIANG Mengcheng, LIU Weipeng, JIA Ailing (Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Active Ingredient of Ministry of Education, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare hyperoside mixed nanomicelles (Hyp-F127/TPGS) and optimize its preparation technology, and to investigate its intestinal absorption characteristics. **METHODS** Hyp-F127/TPGS was prepared by thin film dispersion method. Based on single factor test and Plackett-Burman design, combined with Box-Behnken response surface method, the preparation process was optimized and validated using entrapped efficiency (EE) and drug loading (DL) as evaluation indexes, F127-TPGS mass ratio, hydration time and the amount of Hyp as factors. The appearance and microscopic morphology of Hyp-F127/TPGS obtained by the optimal technology were observed, and the particle size, polydispersity index (PDI) and Zeta potential were also determined. The critical micelle concentration (CMC) of blank micelle (F127/TPGS), *in vitro* release behavior and preliminary stability of Hyp-F127/TPGS were investigated, and absorption characteristics of Hyp-F127/TPGS were investigated by *in situ* unidirectional intestinal perfusion model. **RESULTS** The optimal preparation technology of Hyp-F127/TPGS included F127-TPGS mass ratio of 2:1, hydration time of 2 h, and Hyp amount of 9 mg. Results of three validation tests showed that the EE of Hyp-F127/TPGS was (87.20±0.99)%, and the DL was (5.02±1.20)%, deviations from predicted values were 0.92% and 2.39%. The micelles prepared by optimal technology were yellow, clear and transparent solution, with good Tyndall effect; under transmission electron microscope, they were spherical, complete and evenly distributed; the particle size was (15.02±0.16) nm, the PDI was 0.092±0.031, and the Zeta potential was (-6.67±1.47) mV. The CMC of F127/TPGS was 21 μg/mL, Hyp-F127/TPGS was stable after 4 weeks of storage at 4℃, and the cumulative release rates of Hyp-F127/TPGS and Hyp control were (66.30±2.93)%(96 h) and (99.24±0.27)%(60 h), respectively. Hyp-F127/TPGS and Hyp reference were absorbed in each

[△] 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.20210204004YY, No.20200602034ZP);长春中医药大学“杏林学者工程”——青年科学家项目(No.QNKXJ2-2021ZR26)

* 硕士研究生。研究方向:中药制剂新技术与新产品开发。E-mail:zhangyuhangxz@163.com

[#] 通信作者:硕士生导师,副教授。研究方向:中药制剂新技术与新产品开发。E-mail:cczyyj@163.com

intestinal segment, and the main absorption sites were jejunum and duodenum respectively; drug absorption rate constant and apparent absorption coefficient of the former were significantly higher than those of the latter ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** The optimized preparation technology of Hyp-F127/TPGS is stable and feasible; prepared Hyp-F127/TPGS shows a sustained-release effect, which promotes the

intestinal absorption of Hyp to a certain extent.

KEYWORDS hyperoside; mixed nanomicelles; preparation technology; intestinal absorption characteristics; Plackett-Burman design; Box-Behnken response surface method; unidirectional intestinal perfusion model

金丝桃苷(hyperoside, Hyp)为天然黄酮类化合物,广泛存在于各种植物体内,具有治疗心血管疾病、抗氧化应激、抗肿瘤、抗炎等作用^[1]。但该成分水溶性差、口服吸收不佳、生物利用度低,极大影响了其临床疗效,也限制了其开发应用^[2]。有学者指出,探讨药物在肠道内的吸收情况是评价生物利用度、改良剂型、提高临床疗效的有效手段^[3]。将Hyp制成新剂型来改善其肠道吸收,对提高Hyp生物利用度、增强疗效具有重要意义。

作为一种新型给药系统,纳米胶束在水中能自组装形成“核-壳”结构,从而实现对脂溶性药物的包载,是提高难溶性药物口服吸收的有效途径^[4]。普朗尼克F127(pluronic F127, F127)是一种ABA型三嵌段共聚物,因具有优异的生物相容性、能增加蛋白的稳定性且不具有肌毒性和免疫毒性,现已被广泛应用于生物医学领域^[5]。聚乙二醇1000维生素E琥珀酸酯(D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS)是具有代表性的两亲性维生素E琥珀酸酯衍生物,是美国食品药品监督管理局(U.S. Food and Drug Administration, FDA)批准的安全药物辅助剂之一,在给药系统中应用广泛^[6]。TPGS具有表面活性剂的特性,可提高水溶性较差药物的溶解度,并可通过抑制P糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)外排泵来增强机体对药物的吸收能力^[7]。本研究首次将Hyp载入F127和TPGS中,并采用Plackett-Burman(PB)实验设计和Box-Behnken设计(Box-Behnken Design, BBD)响应面法优化Hyp混合纳米胶束(Hyp-F127/TPGS)的制备工艺,并对其进行质量评价;同时,通过大鼠在体单向肠灌注模型来评价Hyp-F127/TPGS的肠道吸收特性,为Hyp制剂的进一步研发和应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有LC-15型高效液相色谱仪[岛津企业管理(中国)有限公司]、Zetasizer Nano ZS90型激光粒度仪(英国Malvern公司)、SpectraMax Paradigm型多功能酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]、JEM-1200EX型透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)(日本JEOL公司)、DF-101Z型集热式恒温加热磁力搅拌器(上海科升仪器有限公司)、KQ-500B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、Sigma 4K15型台式高速冷冻离心机(德国Sigma公司)、MD200-2型氮吹仪(杭州奥盛仪器有限公司)、RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、BS100-1A型恒流泵(保定思诺流体科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

Hyp对照品(批号AF2020041503,纯度 $\geq 98\%$)购自

成都埃法生物科技有限公司;F127(批号RA0213008)、TPGS(批号RJ0210731)均购自西安瑞禧生物科技有限公司;尼罗红(批号S15GS161316)购自上海源叶生物科技有限公司;磷酸二氢钾(批号20190219)、无水磷酸氢二钠(批号20200106)、氯化钾(批号20190215)、氯化钠(批号20200210)均购自国药集团化学试剂有限公司;乙腈、甲醇、磷酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 实验动物

本研究所用实验动物为SPF级雄性SD大鼠,月龄为2~3个月,体质量为180~220 g,购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,动物生产许可证号为SCXK-(吉)2020-0002。本研究方案经长春中医药大学动物伦理委员会审核批准,批准号为2021199。

2 方法与结果

2.1 Hyp-F127/TPGS的制备

采用薄膜分散法制备Hyp-F127/TPGS。分别将一定量的Hyp对照品、F127和TPGS溶于丙酮中,超声(功率250 W,频率50 kHz,下同)溶解5 min,置于100 mL茄形瓶中,于45 °C水浴中减压旋转蒸发以去除有机溶剂,直至在瓶壁形成一层均匀、蜂窝状的薄膜。将茄形瓶置于真空干燥器(室温)中静置过夜,加入自行配制的pH(7.4 \pm 0.1)磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)3 mL,于50 °C下搅拌水化,再于4 °C下以10 000 r/min离心10 min,取上清液,经0.22 μ m微孔滤膜滤过,即得。同法制备不含Hyp的空白胶束(F127/TPGS)。

2.2 Hyp含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(18:82, V/V);检测波长为360 nm;柱温为30 °C;流速为1 mL/min;进样量为10 μ L。

2.2.2 溶液的制备 (1)对照品溶液:精密称取Hyp对照品,加甲醇制成质量浓度为0.100 5 mg/mL的Hyp对照品溶液。(2)供试品溶液与空白胶束溶液:精密移取所制Hyp-F127/TPGS 200 μ L,置于10 mL量瓶内,加甲醇适量,超声处理10 min,甲醇定容,摇匀,经0.22 μ m微孔滤膜过滤,即得。精密移取所制F127/TPGS,同法制备空白胶束溶液。

2.2.3 方法学考察 参照2020年版《中国药典》(四部)相关通则进行方法学考察^[8]。

(1)专属性考察:分别按“2.2.2”项下方法制备对照品、供试品和空白胶束溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并记录色谱图,结果见图1。由图1所示,在该色谱条件下,Hyp色谱峰峰形较好,且F127和TPGS对其

测定无干扰。(2)线性关系考察:精密吸取“2.2.2(1)”项下Hyp对照品溶液,加入甲醇制成质量浓度分别为80.40、50.25、25.125、10.05、5.025、1.005 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液。取“2.2.2(1)”项下对照品溶液和上述系列对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,以峰面积为纵坐标(Y)、Hyp质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线,得Hyp的线性回归方程为 $Y=20\ 893X-2\ 396.5$ ($R^2=0.999\ 9$),提示Hyp检测质量浓度的线性范围为1.005~100.50 $\mu\text{g/mL}$ 。(3)精密度考察:按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件平行进样6次,得Hyp峰面积的RSD为0.25%($n=6$),表明该方法精密度良好。(4)重复性考察:按“2.2.2(2)”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并代入线性回归方程计算含量,得Hyp含量的RSD为0.97%($n=6$),表明该方法重复性良好。(5)稳定性考察:取“2.2.2(2)”项下供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24、48 h时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,得Hyp峰面积的RSD为0.68%($n=9$),表明该样品在室温下放置48 h内稳定性良好。(6)加样回收率试验:平行取9份经稀释的已知质量浓度的Hyp-F127/TPGS溶液(0.02 mg/mL)各1 mL,按质量比0.5:1、1:1、1.5:1分别加入Hyp对照品溶液0.1、0.2、0.3 mL,按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。每个质量浓度样品平行制备3份,测得平均加样回收率为100.35%(RSD=1.01%, $n=9$),表明该方法准确度良好。

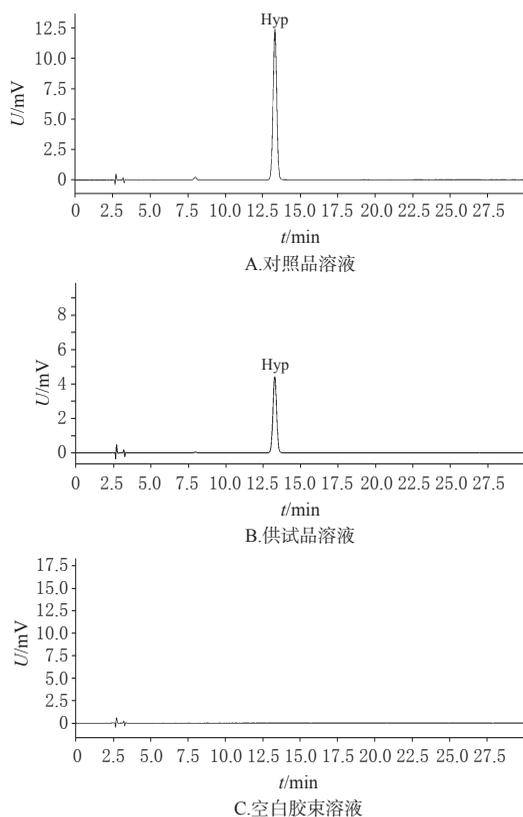


图1 Hyp含量测定专属性考察的高效液相色谱图

2.3 包封率和载药量测定

按“2.2.2(2)”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算包封率(entrapped efficiency, EE): $[EE(\%) = \text{胶束中Hyp的质量} / \text{Hyp投药量} \times 100\%]$ 。

将Hyp-F127/TPGS置于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中预冻3 h,放入冷冻干燥机(温度 $<-40\text{ }^\circ\text{C}$,真空度 $<20\text{ Pa}$)12 h后取出,称定质量,即得胶束冻干粉。称取上述胶束冻干粉2 mg,置于10 mL量瓶内,加入适量甲醇超声10 min以破坏胶束结构,甲醇定容,摇匀,经0.22 μm 微孔滤膜滤过,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算载药量(drug loading, DL): $[DL(\%) = \text{冻干胶束中Hyp的质量} / \text{冻干胶束的质量} \times 100\%]$ ^[9-10]。

2.4 PB实验设计优化Hyp-F127/TPGS制备的主要影响因素

2.4.1 PB实验设计 参考现有研究^[11-12],以EE为考察指标,对F127-TPGS质量比、聚合物质量浓度(以固体材料总量计)、Hyp投药量、水化温度、水化时间进行单因素考察,各因素水平平均平行操作3次。最终确定F127-TPGS质量比为2:1、聚合物质量浓度为50 mg/mL、Hyp投药量为9 mg、水化温度为50 $^\circ\text{C}$ 、水化时间为2 h,以进行后续PB实验设计。根据单因素考察结果,利用Mintab 18软件设计PB实验,以EE(Y)为响应值,对影响胶束的5个因素[F127-TPGS质量比(A)、聚合物质量浓度(B)、Hyp投药量(C)、水化温度(D)、水化时间(E)]进行显著性验证。每个因素设计2个水平,即高水平(+1)和低水平(-1),高水平约为低水平的1.5~2倍。PB实验设计的因素与水平见表1,实验设计的安排与结果见表2。

表1 PB实验设计的因素与水平

水平	A	B/(mg/mL)	C/mg	D/ $^\circ\text{C}$	E/h
-1	2:1	40	9	25	1
+1	4:1	60	15	50	2

表2 PB实验设计的安排与结果

试验号	A	B/(mg/mL)	C/mg	D/ $^\circ\text{C}$	E/h	Y/%
1	4:1	40	9	25	1	79.35
2	4:1	40	9	50	2	71.73
3	4:1	60	15	25	2	65.69
4	2:1	60	9	50	1	86.94
5	4:1	40	15	50	2	65.70
6	2:1	60	15	25	2	75.32
7	4:1	60	9	25	1	79.68
8	2:1	60	9	50	2	82.71
9	2:1	40	15	50	1	83.18
10	2:1	40	9	25	2	79.84
11	2:1	40	15	25	1	80.50
12	4:1	60	15	50	1	73.46

2.4.2 数据分析 采用Minitab 18软件根据表2实验结果进行回归分析,得到回归方程为 $Y=0.770\ 08-0.044\ 07A+0.002\ 92B-0.030\ 33C+0.002\ 78D-0.035\ 10E$ 。该模型的 R^2 为0.983 8,表明其拟合度良好;

校正决定系数(R^2_{adj})为0.970 3,说明该模型能够适用于97.03%的效应值。由方差分析结果(表3)可知, F 检验的 $P < 0.001$,说明该模型在统计学上具有显著性,能准确预测具有显著性的影响因素。采用Minitab 18软件绘制标准化效应的帕累托(Pareto)图(图2A)和正态图(图2B)(正态图中不显著指标无标记),结合方差分析结果可知,对EE影响较大的因素依次为F127-TPGS质量比、水化时间、Hyp投药量($P < 0.001$),而水化温度和聚合物质量浓度对EE无显著影响($P > 0.05$)。

表3 PB实验设计的方差分析结果

来源	自由度	调整后的偏差平方和	调整后的平均偏差平方和	F	P
模型	5	0.049 3	0.009 9	72.86	<0.001
A	1	0.023 3	0.023 3	172.12	<0.001
B	1	0.000 1	0.000 1	0.75	0.419
C	1	0.011 0	0.011 0	81.55	<0.001
D	1	0.000 1	0.000 1	0.69	0.439
E	1	0.014 8	0.014 8	109.20	<0.001
残差误差	6	0.000 8	0.000 1		
总离差	11	0.050 1			

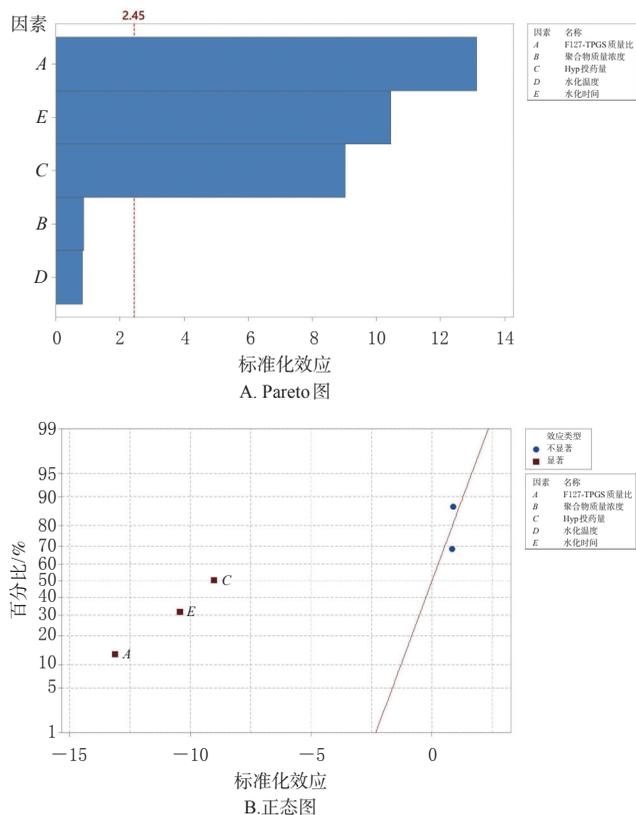


图2 PB实验设计的标准化效应Pareto图和正态图

2.5 BBD响应面法优化Hyp-F127/TPGS的制备工艺

2.5.1 BBD实验设计 在PB实验的基础上,以EE(Y_1)和DL(Y_2)为评价指标,固定水化温度为50℃、聚合物质量浓度为50 mg/mL,选择其余3个对EE有显著影响的因素[即F127-TPGS质量比(A)、水化时间(B)、Hyp投药量(C)]进行3因素3水平的分析实验。BBD实验设计的因素与水平见表4,实验设计的安排与结果见表5。

2.5.2 BBD实验设计数据分析 使用Design-Expert 12

表4 BBD实验设计的因素与水平

水平	A	B/h	C/mg
-1	1:1	1	6
0	2:1	2	9
1	3:1	3	12

表5 BBD实验设计的安排与结果

试验号	A	B/h	C/mg	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	1:1	1	9	69.18	3.90
2	3:1	1	9	75.42	2.96
3	2:1	2	9	89.82	5.14
4	1:1	2	12	58.29	4.93
5	2:1	3	6	60.27	2.32
6	2:1	2	9	88.45	5.02
7	3:1	2	12	50.91	2.86
8	2:1	2	9	86.96	4.94
9	1:1	3	9	66.78	3.81
10	3:1	3	9	67.10	3.78
11	2:1	3	12	59.73	4.45
12	2:1	1	6	70.34	2.72
13	2:1	1	12	60.75	3.17
14	2:1	2	9	87.75	4.97
15	1:1	2	6	49.93	1.92
16	2:1	2	9	90.50	5.13
17	3:1	2	6	65.06	2.52

软件对表5数据进行统计分析,得到 Y_1 和 Y_2 的二次多项式回归方程分别为: $Y_1 = 88.70 + 1.79A - 2.73B - 1.99C - 1.48AB - 5.63AC + 2.26BC - 12.90A^2 - 6.18B^2 - 19.75C^2$ ($R^2 = 0.996 3, R^2_{adj} = 0.991 6$), $Y_2 = 5.04 - 0.31A + 0.20B + 0.74C + 0.23AB - 0.67AC + 0.42BC - 0.77A^2 - 0.66B^2 - 1.21C^2$ ($R^2 = 0.992 9, R^2_{adj} = 0.983 8$)。对回归方程进行方差分析,结果如表6、表7所示,两个模型的 P 均小于0.000 1,说明该模型具有统计学意义。失拟项的 $P > 0.05$,说明模型拟合度良好。EE、DL的 R^2_{adj} 分别为0.991 6、0.983 8,说明此模型与真实数据拟合程度良好,具有指导意义,可用于分析和预测最优工艺。采用Design-Expert 12软件绘制等高线图和三维响应面图,结果见图3、图4。由图3、图4所示, A 与 C 的交互作用较强,等高线图呈明显椭圆形。根据Design-Expert 12软件对上述二次多项式回归方程求解,确定最优工艺为:F127-TPGS质量比1.923:1、水化时间2.014 h、Hyp投药量9.349 mg。在此条件下,模型预测的EE为88.00%,DL为5.14%。

2.6 最优处方工艺的验证

根据软件预测结果,结合实际工艺的可行性,最终以F127-TPGS质量比2:1、水化时间2 h、Hyp投药量9 mg进行3次验证实验。结果显示,3次验证实验得EE为(87.20 ± 0.99)%,DL为(5.02 ± 1.20)%,与模型预测值的偏差分别为0.92%和2.39%,表明所得最优处方工艺稳定、可行。

2.7 Hyp-F127/TPGS的质量评价

2.7.1 形态观察 Hyp-F127/TPGS呈黄色,澄清透明;在激光照射下,溶液中可见一条明显的光路,具有良好的丁达尔效应(图5A)。将样品稀释至1 mg/mL,取10 μL

表6 BBD实验设计的方差分析结果(Y_1)

方差来源	平方和	自由度	方差	F	P
回归模型	3 005.48	9	333.94	211.83	<0.000 1
A	25.60	1	25.60	16.24	0.005 0
B	59.49	1	59.49	37.72	0.000 5
C	31.68	1	31.68	20.10	0.002 9
AB	8.76	1	8.76	5.56	0.050 5
AC	126.68	1	126.68	80.35	<0.000 1
BC	20.48	1	20.48	12.99	0.008 7
A ²	700.73	1	700.73	444.48	<0.000 1
B ²	160.58	1	160.58	101.86	<0.000 1
C ²	1 642.04	1	164 2.04	1 041.57	<0.000 1
残差	11.04	7	1.58		
失拟项	2.55	3	0.849 5	0.400 4	0.701 6
纯误差	8.49	4	2.12		
合计	3 016.52	16			

表7 BBD实验设计的方差分析结果(Y_2)

方差来源	平方和	自由度	方差	F	P
回归模型	19.81	9	2.20	108.80	<0.000 1
A	0.744 2	1	0.744 2	36.80	0.000 5
B	0.324 0	1	0.324 0	16.02	0.005 2
C	4.40	1	4.40	217.34	<0.000 1
AB	0.207 0	1	0.207 0	10.24	0.015 1
AC	1.78	1	1.78	88.12	<0.000 1
BC	0.705 6	1	0.705 6	34.89	0.000 6
A ²	2.48	1	2.48	122.63	<0.000 1
B ²	1.83	1	1.83	90.69	<0.000 1
C ²	6.22	1	6.22	307.33	<0.000 1
残差	0.141 6	7	0.020 2		
失拟项	0.108 2	3	0.036 1	4.32	0.095 7
纯误差	0.033 4	4	0.008 3		
合计	19.95	16			

滴于铜网上,静置 10 min 后吸走多余样品,再滴加磷钨酸染液 10 μL 负染 1 min,吸走多余染液,晾干,置于 TEM 下观察,可见 Hyp-F127/TPGS 呈球形,不粘连,形态完整且分布均匀(图 5B)。

2.7.2 粒径、多分散性指数及 Zeta 电位测定 取 Hyp-F127/TPGS 适量,加水适量稀释,采用激光粒度仪测定该纳米胶束的粒径、多分散性指数(polydispersity index, PDI)和 Zeta 电位。结果显示,纳米胶束的粒径为 (15.02 ± 0.16) nm, PDI 为 0.092 ± 0.031 , Zeta 电位为 (-6.67 ± 1.47) mV, 详见图 6。

2.7.3 临界胶束浓度测定 将 F127/TPGS 加 PBS 制备成质量浓度为 500、100、50、10、5、1、0.5、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的胶束溶液。取脂溶性尼罗红适量作为荧光标记物,用丙酮溶解后制备成浓度为 1×10^{-5} mol/L 的尼罗红溶液。在棕色西林瓶内加入上述尼罗红溶液 0.1 mL,用氮吹仪吹干,使丙酮挥发完全。每个西林瓶内分别加入配制好的 0.1~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胶束溶液 2 mL,在避光条件下室温搅拌 12 h 以上,用酶标仪测定荧光强度(激发波长 550 nm,发射波长 630 nm),结果见图 7。由图 7 可知,曲线呈“S”形,其中尼罗红的荧光强度随胶束质量浓度的增加而增强,两拐点处切线交点即为 F127/TPGS 的临界胶束浓度(critical micelle concentration, CMC),为 21 $\mu\text{g}/\text{mL}$,提示其具有较强的热力学稳定性^[13]。

2.7.4 初步稳定性实验 取 3 份 Hyp-F127/TPGS,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存 4 周,分别于放置第 0、3、5、7、14、21、28 天时观察其外观状态,按“2.3”项下方法测定其 EE 和

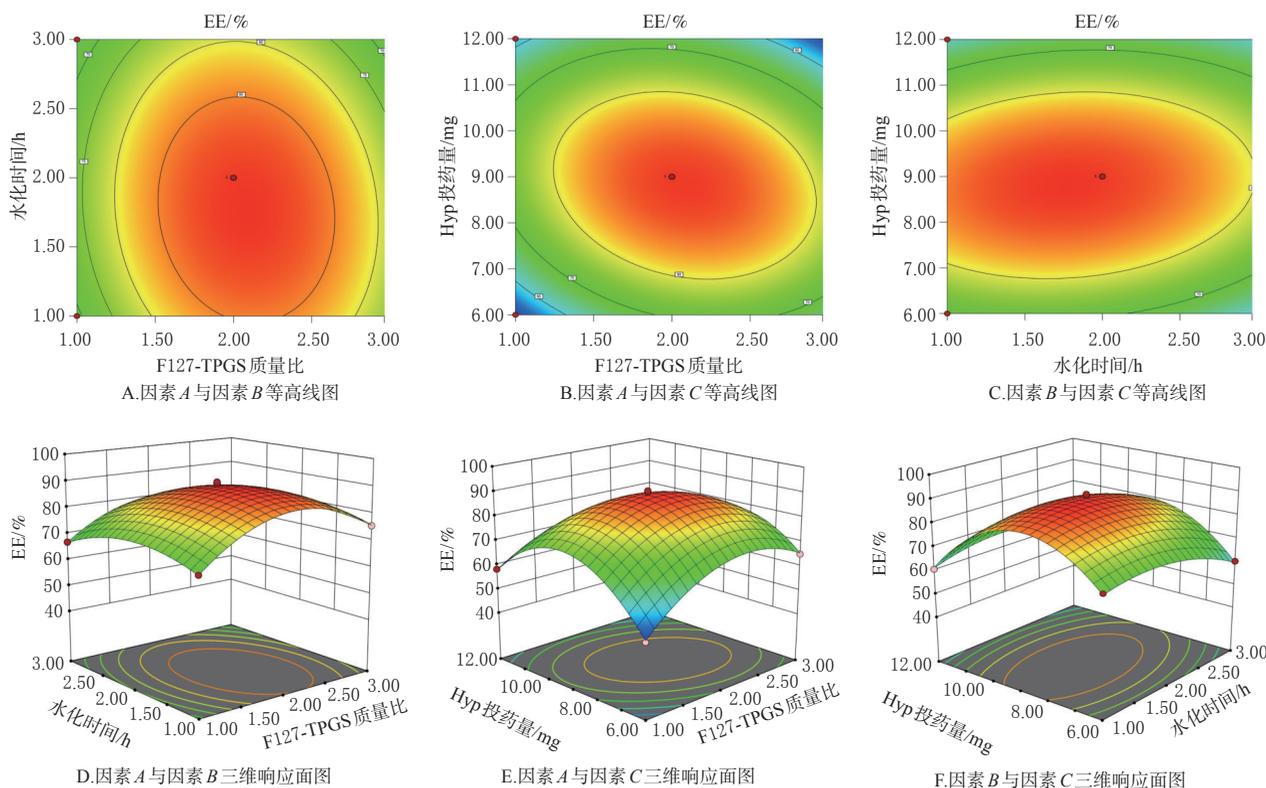


图3 各因素对 EE 影响的等高线图和三维响应面图

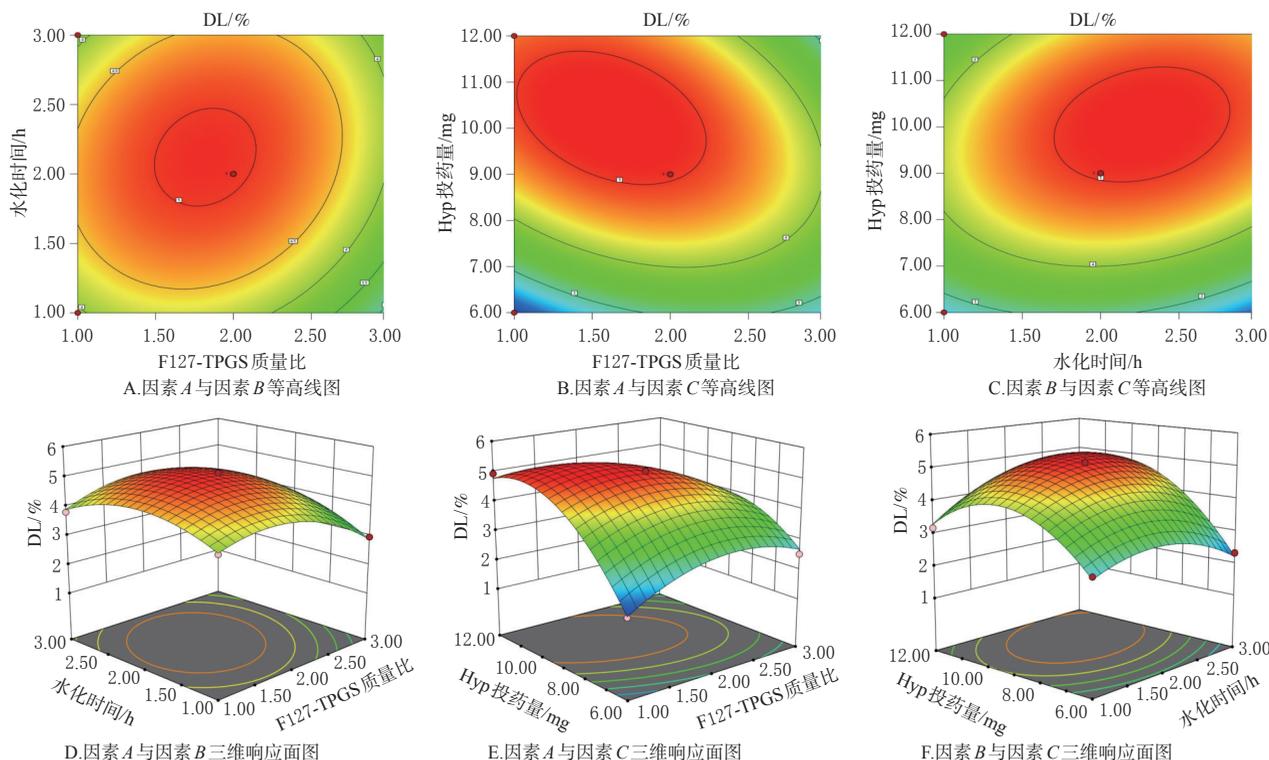
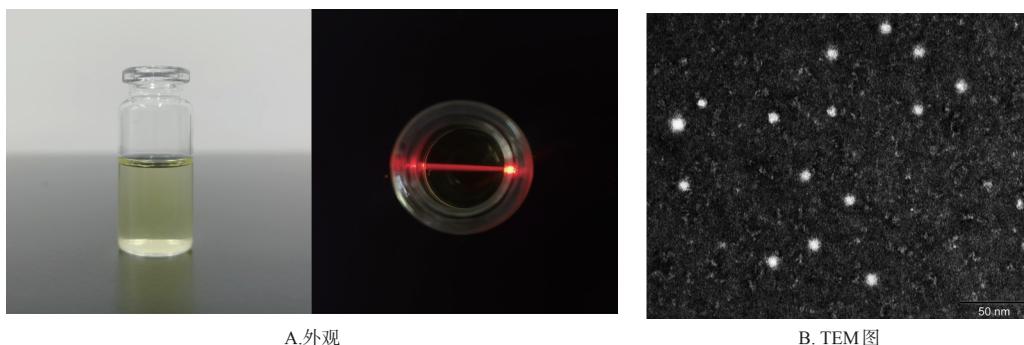


图4 各因素对DL影响的等高线图和三维响应面图



A.外观 B. TEM图

图5 Hyp-F127/TPGS的外观和TEM图

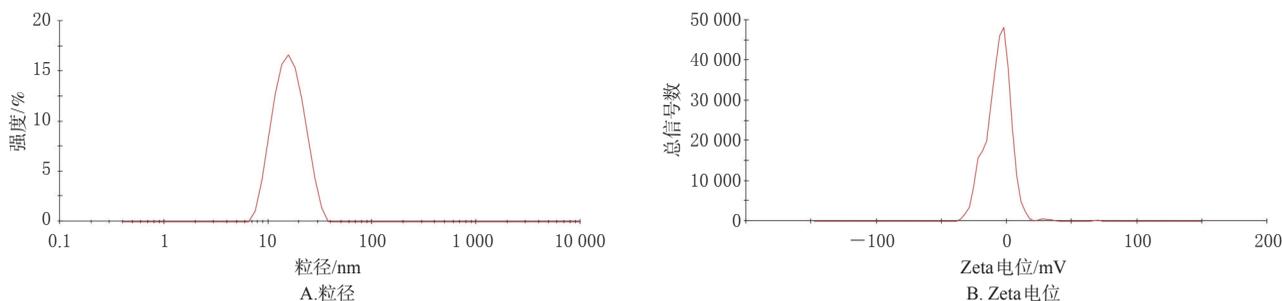


图6 Hyp-F127/TPGS的粒径和Zeta电位

DL。结果显示,Hyp-F127/TPGS放置4周,其外观无明显变化,仍为黄色澄清透明溶液,无絮状沉淀析出,且与第0天相比,EE、DL变化不大,说明Hyp-F127/TPGS在低温下储存较为稳定。结果见表8。

2.7.5 体外释放实验 采用透析法进行体外释放研究^[14]。精密称定含Hyp 5 mg的Hyp-F127/TPGS冻干粉,加PBS溶胀并定容至5 mL,制备成1 mg/mL的胶束溶

液。精密称定Hyp对照品5 mg,同法制得相同质量浓度的Hyp混悬液。分别取上述溶液各2 mL置于透析袋(截留分子量为8 000~14 000 Da)内,随后置于装有释放介质(PBS)50 mL的锥形瓶内。由于Hyp为难溶性药物,故为使其达到漏槽条件,需加入1%聚山梨酯80溶液作为表面活性剂^[15]。将锥形瓶置于摇床中振摇(37 ℃,100 r/min),分别于0.5、1、1.5、2、4、6、8、10、12、

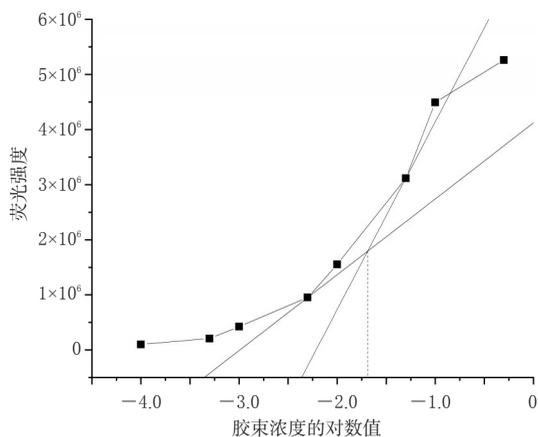


图7 F127/TPGS的CMC测定结果

表8 Hyp-F127/TPGS的初步稳定性考察结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

储存时间/d	EE/%	DL/%
0	87.99±1.44	5.12±0.10
3	87.72±0.86	5.09±0.08
5	86.78±2.50	5.04±0.09
7	86.75±1.94	4.97±0.13
14	86.07±1.25	4.94±0.07
21	85.89±1.20	4.96±0.12
28	85.13±1.41	4.87±0.27

24、32、48、60、72、96 h时取样 500 μ L,同时补充相同体积的释放介质。取样溶液按“2.2”项下方法测定溶液中Hyp的含量,再按下式计算各时间点的累积释放率(Q_n): $Q_n(\%) = (V_e \sum_{i=0}^{n-1} C_i + V_0 C_n) / M_{药}$ (式中, V_e 为释放介质的置换体积, C_i 为第*i*次取样时取样溶液中的药物浓度, V_0 为释放介质体积, C_n 为第*n*次取样时释放介质中的药物浓度, $M_{药}$ 为胶束中Hyp的含量),采用Origin 2019软件绘制累积释放曲线,再分别进行零级动力学、一级动力学和Higuchi方程拟合。每组样品平行制备3份。结果显示,Hyp混悬液在60 h内基本释放完全,累积释放率达到(99.24±0.27)%;Hyp-F127/TPGS胶束溶液的释放明显减缓,96 h内的累积释放率为(66.30±2.93)%,且更符合Higuchi方程($R^2=0.9058$),说明该胶束具有缓释作用,能延长药物作用时间。结果见图8、表9。

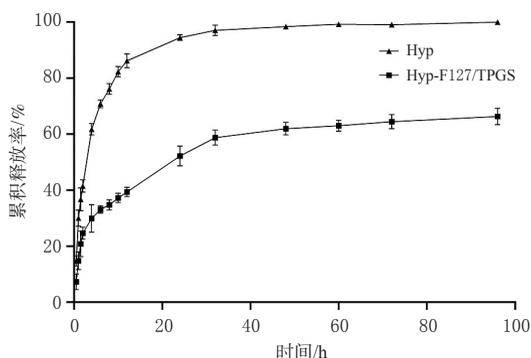


图8 Hyp和Hyp-F127/TPGS的体外释放曲线($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表9 Hyp-F127/TPGS体外释放模型拟合结果

拟合模型	拟合方程	R^2
零级动力学	$Q_t=0.558t+26.543$	0.7333
一级动力学	$Q_t=61.218(1-e^{-0.123t})$	0.8907
Higuchi方程	$Q_t=6.271t^{1/2}+14.733$	0.9058

2.8 大鼠在体肠吸收实验

2.8.1 供试溶液的制备 参照孙慧园等^[16]方法配制Krebs-Ringer's(K-R)营养液。分别称取Hyp对照品和Hyp-F127/TPGS冻干粉适量,用K-R营养液定容至50 mL,制备成含Hyp 30 μ g/mL的Hyp溶液和Hyp-F127/TPGS溶液。

2.8.2 灌流液中Hyp含量的测定 精密吸取供试溶液或流出液200 μ L置于2 mL EP管内,加甲醇800 μ L,于4 $^{\circ}$ C下以10 000 r/min离心10 min,取上清液,过0.22 μ m微孔滤膜,取续滤液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。参照2020年版《中国药典》(四部)相关通则进行方法学考察^[8]。结果显示,Hyp检测质量浓度的线性范围为1.251~125.1 μ g/mL,其回归方程为 $Y=16701X-4089.4$ ($R^2=0.9998$);方法精密性、重复性、稳定性(24 h)均良好,灌流液中的内源性物质对Hyp无干扰。

2.8.3 大鼠在体单向肠灌流实验 取“2.8.1”项下供试溶液50 mL置于离心管内,于(37.0±0.5) $^{\circ}$ C水浴中预热。选择健康雄性SD大鼠,禁食、不禁水18~24 h,称定质量后,腹腔注射20%乌拉坦溶液(6.5 mL/kg)麻醉,沿其腹中线剪开约3 cm,分离肠段(空肠自幽门15 cm处往下约10 cm,回肠自盲肠上行20 cm处往下约10 cm),在肠段两端切口,并插入3 mm玻璃管结扎。先用37 $^{\circ}$ C生理盐水清理盲肠内容物,再排净生理盐水,更换K-R营养液,打开恒流泵以0.2 mL/min灌流15 min以平衡肠段,再换成预热好的供试溶液平衡30 min,最后在灌注口换上已知质量的装有供试溶液5 mL的EP管进行灌注,同时在出液口换上已知质量的EP管收集流出液。每隔15 min更换一次灌注口的EP管,同时收集流出液,称定质量并计算灌流前后EP管质量差异。实验共灌注90 min。将供试溶液和流出液按“2.8.2”项下方法进行处理并分析。在整个实验过程中,大鼠腹部需覆盖用生理盐水浸润的脱脂棉以避免腹膜中液体蒸发和热量损失。大鼠处死后,将各肠段剪下,测量其长度与内径^[17-18]。

2.8.4 Hyp-F127/TPGS溶液稳定性考察 按“2.8.1”项下方法平行制备Hyp-F127/TPGS溶液5份,置于(37.0±0.5) $^{\circ}$ C水浴锅中,分别于0、30、60、90、120 min各取样1 mL,按“2.8.2”项下方法处理并分析。结果表明,在(37.0±0.5) $^{\circ}$ C下,Hyp-F127/TPGS溶液中Hyp的含量在2 h内无明显变化(RSD=1.06%, $n=5$),稳定性良好。

2.8.5 肠壁物理吸附考察 剪取清洗后的相应肠段各10 cm,用玻璃管将黏膜层翻出,分别置于30 μ g/mL的Hyp-F127/TPGS供试溶液中,在(37.0±0.5) $^{\circ}$ C水浴中恒

温孵育,分别于0、2 h取样,按“2.8.2”项下方法处理并分析,计算剩余率(即孵育2 h后Hyp-F127/TPGS供试溶液中Hyp含量相对于0 h时供试溶液中Hyp含量的百分比)。上述实验重复操作5次。结果显示,2 h内十二指肠、空肠、回肠、结肠对Hyp基本无吸附,详见表10。

表10 各肠段对Hyp-F127/TPGS中Hyp吸附情况($\bar{x} \pm s, n=5$)

肠段	剩余率/%	肠段	剩余率/%
十二指肠	98.77±0.88	回肠	98.95±0.97
空肠	99.31±0.75	结肠	98.05±0.60

2.8.6 各肠段吸收情况 取SD大鼠40只,随机分为Hyp十二指肠组、Hyp空肠组、Hyp回肠组、Hyp结肠组、Hyp-F127/TPGS十二指肠组、Hyp-F127/TPGS空肠组、Hyp-F127/TPGS回肠组、Hyp-F127/TPGS结肠组,每组5只。按照“2.8.3”项下方法进行操作,并每隔15 min取样1次,共灌注90 min,按“2.8.2”项下方法进行处理并分析。参照质量法^[19],按下式计算药物吸收速率常数(K_a)和药物表观吸收系数(P_{app}):

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{out}}{C_{in}} \times \frac{V_{out}}{V_{in}}\right) \times \frac{v}{\pi^2 L}$$

$$P_{app} = \frac{-v \times \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}} \times \frac{V_{out}}{V_{in}}\right)}{2\pi r L}$$

[式中, V_{in} 和 V_{out} 分别为灌入和收集的供试溶液体积(mL), v 为灌流速度(0.2 mL/min), C_{in} 和 C_{out} 分别为供试溶液和流出液中药物的质量浓度($\mu\text{g/mL}$); L 和 r 分别为被灌流肠段的长度(cm)和横截面半径(cm)]。

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析比较组间差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结果显示,Hyp和Hyp-F127/TPGS在整个肠段均有吸收,且在十二指肠、空肠吸收较好。制备成纳米胶束后,Hyp-F127/TPGS在各肠段的 K_a 和 P_{app} 均显著高于Hyp($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中空肠为Hyp-F127/TPGS的主要吸收部位。结果见表11。

表11 Hyp和Hyp-F127/TPGS在不同肠段的吸收参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

肠段	Hyp		Hyp-F127/TPGS	
	$K_a / (\times 10^{-2} / \text{min})$	$P_{app} / (\times 10^{-2} \text{ cm} / \text{min})$	$K_a / (\times 10^{-2} / \text{min})$	$P_{app} / (\times 10^{-2} \text{ cm} / \text{min})$
十二指肠	8.80±0.52	1.36±0.04	10.01±0.22 ^a	1.80±0.06 ^a
空肠	8.19±0.42	1.16±0.25	11.83±1.08 ^a	2.01±0.04 ^a
回肠	5.07±0.55	0.90±0.04	9.80±0.33 ^a	1.69±0.56 ^b
结肠	5.59±0.65	0.61±0.06	8.44±1.86 ^a	1.40±0.04 ^a

a: 与Hyp比较, $P < 0.01$; b: 与Hyp比较, $P < 0.05$

3 讨论

口服是最为常见的给药方式,肠吸收是其主要吸收途径^[20]。以往的研究结果表明,Hyp作为黄酮苷类成分在各肠段均有吸收,如Li等^[21]研究发现,Hyp在小鼠体内的口服药动学特征为达峰时间短,绝对口服生物利用度仅为1.2%,提示口服吸收差,推测其原因可能与Hyp自身结构及其吸收过程有关。纳米胶束是一种新型给

药系统,其亲脂性内核的存在增加了低水溶性分子的溶解度,并提供了控制药物释放的可能性;而亲水外壳能够保护药物免受调理素吸附的影响,防止药物与等离体成分相互作用,从而具有一定的体内长循环特性^[22];此外,较小的粒径延长了药物在血液循环中的停留时间,增强了其被细胞摄取和跨越上皮屏障的能力^[23]。

F127由聚环氧乙烷-聚环氧丙烷-聚环氧乙烷{poly(ethylene oxide)-poly[oxy(methyl-1,2-ethanediyl)]-poly(ethylene oxide)}, PEO-PPO-PEO}组成,其中PPO是疏水段,占嵌段共聚物的30%;PEO是亲水段,占嵌段共聚物的70%。F127具有低CMC(0.003 1%, m/m)、优良的生物相容性和令人满意的安全性,是理想的胶束载体^[5,24]。然而,因F127相对亲水的特性,对P-gp外排泵的影响很小,不利于药物的跨膜运送^[25-26]。因此,为了充分利用该材料的优势并克服上述缺点,由F127和另一种具有生物修饰性的亲脂性共聚物组成的混合胶束值得进一步研究。TPGS作为一种有效的生物反应调节剂,能够抑制P-gp外排泵,减少药物从细胞流出,增强药物通过细胞屏障的能力^[27]。但有研究指出,TPGS的CMC相对较高(0.02%, m/m),这可能导致TPGS胶束在血浆中解离^[28]。同时,本课题组结合预实验和相关报道发现,当F127比例较高时,胶束CMC相对较低,更为稳定^[27,29]。因此,本研究首先采用薄膜分散法制备Hyp-F127/TPGS,通过PB实验设计联合BBD实验设计优化得胶束最优制备工艺为:F127-TPGS质量比2:1、水化时间2 h、Hyp投药量9 mg。3次验证实验结果表明,Hyp-F127/TPGS的EE为(87.20±0.99)%,DL为(5.02±1.20)%,与预测值相近,证明该制备工艺稳定、可行。按上述工艺所制Hyp-F127/TPGS粒径小、形态完整、分布均匀且能缓慢释放药物。

郝旭亮等^[30]研究表明,Hyp在大鼠胃肠道均有吸收,但在肠部吸收效果更好。基于此,本研究采用大鼠在体单向肠灌流模型,以更好地模拟体内肠道环境,避免胃内容物排出及消化管运动的影响,较好地反映药物在小肠内吸收情况^[31]。由实验结果可知,Hyp-F127/TPGS在肠灌流液中稳定性良好,且在各肠段无吸附现象。和Hyp对照品相比,Hyp-F127/TPGS的 K_a 和 P_{app} 均显著升高;主要吸收部位由十二指肠变为空肠。同时,结合前期体外释放研究结果表明,Hyp-F127/TPGS体外释放缓慢且肠吸收较高,说明制备成混合胶束后,Hyp能被胃肠壁摄取,吸收有所提高,可为Hyp制剂的进一步研发提供实验数据和理论基础。但本研究仅考察了肠壁对Hyp吸收的影响,因冲洗了肠道内容物,对于肠道菌群的影响尚有待验证。因此,本课题组正在进行肠道菌群对Hyp吸收的影响研究,以更好地阐明Hyp-F127/TPGS的体内过程;此外,本课题组在后续研究中会进一步考察大鼠灌胃Hyp-F127/TPGS后的生物利用度,以验证制剂的合理性。

参考文献

- [1] JANG S A, PARK D W, SOHN E H, et al. Hyperoside suppresses tumor necrosis factor α -mediated vascular inflammatory responses by downregulating mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B signaling[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 294: 48-55.
- [2] 范颖.表面修饰金丝桃苷纳米微球的心肌靶向性研究[D]. 南宁:广西医科大学, 2015.
- [3] 万悦,申雨檬,邹俊凤,等.理中汤提取物中5种主要活性成分在体肠吸收特征研究[J]. *药学学报*, 2021, 56(6): 1689-1695.
- [4] 张倩,杨坛,黎枰坪,等.左旋肉碱修饰的壳聚糖-硬脂酸协载槲皮素口服紫杉醇纳米胶束的制备、表征及在体肠循环研究[J]. *中草药*, 2020, 51(21): 5440-5446.
- [5] GAO L, WANG X Q, MA J L, et al. Evaluation of TPGS-modified thermo-sensitive Pluronic PF127 hydrogel as a potential carrier to reverse the resistance of P-gp-over-expressing SMMC-7721 cell lines[J]. *Colloids Surf B Bio-interfaces*, 2016, 140: 307-316.
- [6] LIANG L N, QIU L Y. Vitamin E succinate with multiple functions: a versatile agent in nanomedicine-based cancer therapy and its delivery strategies[J]. *Int J Pharm*, 2021, 600: 120457.
- [7] YANG C L, WU T T, QI Y, et al. Recent advances in the application of vitamin E TPGS for drug delivery[J]. *The-ranostics*, 2018, 8(2): 464-485.
- [8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社, 2020: 466-472, 480-482.
- [9] 唐岚,吕龙飞,沈丽婷,等.染料木素-维生素E琥珀酸酯-聚乙二醇1000维生素E琥珀酸酯纳米胶束的制备研究[J]. *中草药*, 2017, 48(9): 1766-1772.
- [10] 陈洋洋,耿雪,屈子卉,等.熊果酸/PF127/TPGS-多柔比星混合纳米胶束的制备及其体外释药特性研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(20): 2789-2795.
- [11] 朱君君,沈成英,王镜,等.甘草酸-F127/TPGS混合纳米胶束的制备及其大鼠在体肠吸收研究[J]. *中草药*, 2020, 51(7): 1845-1851.
- [12] 周佳莹,周立宏,张晓君,等.阿霉素-五味子乙素pH敏感聚合物胶束的制备与制剂学性质[J]. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33(9): 686-695.
- [13] 宗玲,袁安然,朱耀,等.负载吡啶菁绿和多柔比星的温敏胶束在MCF-7肿瘤细胞治疗中的联合应用[J]. *药学学报*, 2018, 53(7): 1169-1176.
- [14] 季鹏,张进香,王祥龙,等.芹菜素丝素蛋白纳米粒的制备及其安全性、抗肿瘤活性研究[J]. *中国药房*, 2022, 33(1): 58-63.
- [15] 冯宇飞,常书源,秦国昭,等.星点设计-效应面法优化pH值响应及线粒体靶向双功能金丝桃苷脂质体的处方及其体外评价[J]. *中草药*, 2020, 51(23): 5934-5942.
- [16] 孙慧园,陈浩,梅朝叶,等.白及醇提物中5种主要活性成分的在体肠吸收特征研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(6): 757-764.
- [17] 欧水平,任丽,王玉和,等.虎杖提取物中虎杖苷及白藜芦醇在大鼠胃肠道吸收的动力学分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(3): 30-35.
- [18] 熊晶晶.虎杖总蒽醌固体脂质纳米粒的制备及在体肠吸收研究[D]. 郑州:河南中医学院, 2015.
- [19] 沈成英,李小芳,朱君君,等.芍药甘草汤中自组装纳米粒形成对甘草主要成分体外释放和肠吸收的影响[J]. *中国药房*, 2022, 33(3): 338-343.
- [20] 王堃.肠道CYP3A和P-gp:口服药物的吸收屏障[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(11): 1216-1219.
- [21] LI Z, MENG F, ZHANG Y, et al. Simultaneous quantification of hyperin, reynoutrin and guaijaverin in mice plasma by LC-MS/MS: application to a pharmacokinetic study[J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(7): 1124-1130.
- [22] LU Y, PARK K. Polymeric micelles and alternative nano-sized delivery vehicles for poorly soluble drugs[J]. *Int J Pharm*, 2013, 453(1): 198-214.
- [23] PEPIĆ I, LOVRIĆ J, FILIPOVIĆ-GRČIĆ J. How do polymeric micelles cross epithelial barriers? [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 50(1): 42-55.
- [24] WEI Z, HAO J G, YUAN S, et al. Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: formulation, optimization and *in vitro* characterization[J]. *Int J Pharm*, 2009, 376(1/2): 176-185.
- [25] BATRAKOVA E V, KABANOV A V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers[J]. *J Control Release*, 2008, 130(2): 98-106.
- [26] DEGHAN KELISHADY P, SAADAT E, RAVAR F, et al. Pluronic F127 polymeric micelles for co-delivery of paclitaxel and lapatinib against metastatic breast cancer: preparation, optimization and *in vitro* evaluation[J]. *Pharm Dev Technol*, 2015, 20(8): 1009-1017.
- [27] MENG X, LIU J S, YU X R, et al. Pluronic F127 and D- α -tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) mixed micelles for targeting drug delivery across the blood brain barrier[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2964.
- [28] ZHANG Z P, TAN S W, FENG S S. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(19): 4889-4906.
- [29] SUN C Y, LI W J, MA P, et al. Development of TPGS/F127/F68 mixed polymeric micelles: enhanced oral bio-availability and hepatoprotection of syringic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity[J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 137: 111126.
- [30] 郝旭亮,张素琼,刘聪,等.罗布麻总黄酮主要成分在大鼠胃肠道吸收的初步探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(17): 121-124.
- [31] 胡坤霞,焦莹,巨红叶,等.穿山龙薯蓣苷纳米结构脂质载体的大鼠在体肠吸收特性研究[J]. *中国新药杂志*, 2020, 29(9): 1045-1051.

(收稿日期:2021-12-27 修回日期:2022-03-19)
(编辑:曾海蓉)