

· 工艺研究 ·

叶酸修饰的槐属二氢黄酮 G 壳聚糖纳米粒的制备研究

杨志欣¹, 张丽芬¹, 邢希旺², 汤海霞¹, 刘佳佳¹, 王艳宏¹(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 天津科伦药物研究有限公司, 天津 300457)

摘要: 目的 制备叶酸(FA)修饰的槐属二氢黄酮 G(SFG)壳聚糖(CTS)纳米给药系统, 以期实现其靶向、缓释作用效果。方法 采用离子交联法制备 FA-SFG-CTS 纳米粒, 以 Design-Expert 8.0 软件进行星点设计, 考察三聚磷酸钠(TPP)与 CTS 质量比、SFG 用量等因素对包封率和载药量的影响。采用冷冻干燥工艺制备冻干粉, 从粒径、电位、包封率、体外释药等对复溶后的纳米粒进行表征。结果 最优处方投药量为 4.70 mg, TPP 与 CTS 质量比为 0.1, TPP 体积为 4.0 mL(浓度为 2.0 mg·mL⁻¹), CTS 浓度为 2.0 mg·mL⁻¹, 叶酸 8.0 mL(浓度为 1.0 mg·mL⁻¹)。纳米粒平均粒径为(169.03±1.89)nm, 分散系数(PDI)为(0.18±0.01), Zeta 电位为(-35.2±0.99)mV, 包封率为(68.74±1.35)%, 载药量为(8.25±0.16)%。以 4%的甘露醇为冻干保护剂, 在-40℃下预冻 8 h, -10℃下升华干燥 25 h, 25℃下解吸干燥 5 h, 即得冻干制剂。FA-SFG-CTS 纳米粒复溶后粒径为(177.70±2.11)nm, PDI 为(0.20±0.02), Zeta 电位为(-34.9±1.16)mV, 包封率为(67.34±1.41)%, 载药量为(7.82±0.18)%。体外释放结果表明, SFG 原料药 6 h 基本释放完全, 平均累积释放率达到 98.34%; FA-SFG-CTS 纳米粒 6 h 平均累积释放率达到 71.34%, 36 h 累积释放率达到 88.94%。结论 星点效应面法用于 FA-SFG-CTS 纳米粒处方优化适用性好, 优化后的 FA-SFG-CTS 纳米粒处方粒径适宜, 包封率高, 缓释效果显著。**关键词:** 槐属二氢黄酮 G; 叶酸; 壳聚糖; 纳米粒; 星点设计-效应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)04-0558-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.04.017

Study on Sophoraflavonone G Chitosan Nanoparticles Modified by Folic Acid

YANG Zhixin¹, ZHANG Lifan¹, XING Xiwang², TANG Haixia¹, LIU Jiajia¹, WANG Yanhong¹(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040 Heilongjiang, China; 2. Tianjin Kelun Pharmaceutical Research Co., Ltd, Tianjin 300457, China)

Abstract: Objective The preparation of folic acid(FA)-modified locust Sophoraflavonone G(SFG) chitosan(CTS) nano drug delivery system is expected to achieve the targeted and sustained release effects. **Methods** FA-SFG-CTS nanoparticles were prepared by ion crosslinking method, and Design-Expert 8.0 software with central composite design and response surface methodology was used to design experiments for investigating the effects of mass ratio of sodium tripolyphosphate(TPP) and chitosan, SFG dosage, and other factors on the encapsulation rate and drug loading. Freeze-drying process was used to prepare the lyophilized powder, and the re-dissolved nanoparticles were characterized from the aspects of particle size, electric potential, encapsulation rate and *in vitro* drug release. **Results** The optimal dosage was 4.70 mg, the mass ratio of TPP to CTS was 0.1, the volume of TPP was 4.0 mL (with a concentration of 2.0 mg·mL⁻¹), the concentration of CTS was 2.0 mg·mL⁻¹, and the volume of folic acid was 8.0 mL(concentration 1.0 mg·mL⁻¹). The average particle size of the nanoparticles was(169.03±1.89) nm, PDI was

收稿日期: 2020-11-09

作者简介: 杨志欣, 女, 博士, 研究方向: 新剂型与新药开发。Email: zhixin.y@163.com。通信作者: 王艳宏, 女, 教授, 研究方向: 新药开发与研究。Email: 799378826@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82074025); 黑龙江省自然科学基金(H2016057); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目(2018)。

(0.18 ± 0.01), Zeta potential was (-35.2 ± 0.99) mV, the encapsulation rate was (68.74 ± 1.35) %, and the drug loading was (8.25 ± 0.16) %. The lyophilized preparation was obtained by using 4% mannitol as the protective agent, pre-freezing for 8 h at -40 °C, sublimation drying at -10 °C for 25 h, and final desorption drying at 25 °C for 5 h. After FA-SFG-CTS redissolved, the particle diameter was (177.70 ± 2.11) nm, PDI was (0.20 ± 0.02), Zeta potential was (-34.9 ± 1.16) mV, the encapsulation rate was (67.34 ± 1.41) %, and the drug loading was (7.82 ± 0.18) %. *In vitro* release results showed that SFG was almost released completely after 6 h, and the average cumulative release rate reached 98.34%. The average cumulative release rate of FA-SFG-CTS reached 71.34% at 6 h and 88.94% at 36 h.

Conclusion The central composite design and response surface methodology has good applicability in the optimization of FA-SFG-CTS prescription. The optimized FA-SFG-CTS prescription has appropriate particle size, high encapsulation rate and significant sustained release effect.

Keywords: Sophoraflavanone G; folic acid; chitosan; nanoparticles; central composite design and response surface methodology

肝癌属恶性肿瘤, 手术切除效果差且复发率高, 化疗等综合治疗效果不明显, 发病率逐年提高^[1-2], 寻找精准打击癌细胞且低毒副作用的药物, 尤其是天然植物提取分离的有效成分成为研究热点。槐属二氢黄酮 G (Sophoraflavanone G, SFG) 是临床常用中药苦参 (*Sophora flavescens* Ait.) 根中的黄酮类成分, 为 A 环 C-8 位连有薰衣草烷基的异戊烯二氢黄酮^[3-4], 药理研究^[5-8]表明 SFG 对多种肿瘤细胞均有良好的抑制作用, 尤其是人肝癌 HepG2 细胞, 其半抑制浓度为 $13.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 可通过抑制细胞分化和促进凋亡发挥作用。然而, 本课题组前期研究^[9]发现 SFG 体内肝靶向较差。

壳聚糖 [$\alpha(1-4)2$ -氨基 2-去氧 β -D 葡萄糖] 为天然的碱性多糖, 生物相容性和生物降解性均优良^[10]。壳聚糖制成载药纳米粒后, 一方面延缓药物释放, 另一方面更有助于肝选择性吞噬^[11-15]。肝肿瘤细胞表面叶酸受体处于高表达状态, 提示结合叶酸的载体可更有效地通过受体介导内吞被细胞吸收到达细胞核^[16-17]。基于此, 本实验在制备 SFG 壳聚糖纳米粒的基础上进行叶酸修饰, 并进一步表征其理化性质。

1 仪器与材料

Waters 2996-2695 高效液相色谱仪系统, 美国 Waters 公司; 色谱柱: DIKMA C₁₈ (250 mm×4.6mm, 5 μm), 美国迪马公司; TGL-16C 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; DF-101Z 集热式恒温加热磁力搅拌器, 郑州长城科工贸有限公司; Nano-ZS90 型 Zetasizer 粒径分析仪, 英国马尔文仪器有限公司。槐属二氢黄酮 G (SFG) 对照品 (自制, 质量分数 $\geq 98\%$,

批号: 20190526); SFG 原料药 (自制, 质量分数 $\geq 95\%$, 批号: 20190411); 叶酸 (FA, 质量分数 $\geq 99.8\%$, 上海源叶生物科技有限公司, 批号: T26M8Y36848); 壳聚糖 (脱乙酰度 $\geq 95\%$, 上海博奥生物技术有限公司, 批号: 20190323); 三聚磷酸钠 (TPP, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20190706); 甲醇 (色谱纯, 美国迪马公司, 批号: R141306)。

2 方法与结果

2.1 叶酸修饰的槐属二氢黄酮 G 壳聚糖 (FA-SFG-CTS) 纳米粒的制备方法 在 55 °C 水浴、 $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下, 精密称取 23.50 mg 槐属二氢黄酮 G (SFG) 加入到 200.0 mL 壳聚糖 (CTS) 醋酸溶液中 (浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 1% 醋酸溶液), 然后以每秒 1 滴的速度滴加 40.0 mL 叶酸 (FA) 溶液 ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 最后以相同速度滴加 20.0 mL 的三聚磷酸钠 (TPP) 溶液 ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 继续搅拌一段时间, 得带有淡蓝色乳光的 FA-SFG-CTS 纳米粒溶液。空白纳米粒不加 SFG, 以同样方法制得。

取反应产物使用溴化钾压片法对其进行红外谱图的扫描, 结果见图 1。叶酸修饰的壳聚糖纳米粒中 $1\ 633 \text{ cm}^{-1}$ 处是叶酸上的羧基与壳聚糖上氨基反应生成的酰胺键的特征峰, $1\ 082 \text{ cm}^{-1}$ 处是壳聚糖上六元单氧环的吸收峰, $1\ 554 \text{ cm}^{-1}$ 处是叶酸上苯环骨架伸缩振动的吸收, $1\ 281 \text{ cm}^{-1}$ 处是三聚磷酸钠上 P=O 伸缩振动的吸收; 叶酸偶联壳聚糖载药纳米粒中 $1\ 083 \text{ cm}^{-1}$ 处是壳聚糖上六元单氧环的吸收峰, $1\ 598 \text{ cm}^{-1}$ 、 $1\ 602 \text{ cm}^{-1}$ 等处是叶酸上苯环骨架伸缩振

动的吸收, $1\ 280\ \text{cm}^{-1}$ 处是三聚磷酸钠上 P=O 伸缩振动的吸收, $1\ 643\ \text{cm}^{-1}$ 是槐属二氢黄酮 G 上羰基的吸收, 表明 FA 成功对壳聚糖载药纳米粒进行了修饰。

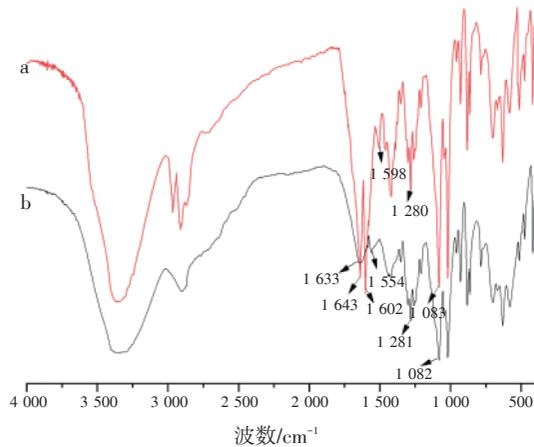


图1 FA-SFG-CTS(a)、FA-CTS(b) 红外谱图

Figure 1 The IR spectra of FA-SFG-CTS (a) and FA-CTS (b)

精密称取 FA 27.40 mg 溶于 100.00 mL 的稀氨水中, 得到浓度为 $274.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 FA 母液, 稀释得到最终浓度为 2.74、5.48、10.96、21.92、 $27.40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以稀氨水作为空白溶液, 使用紫外可见分光光度计分别测定上述溶液在 260 nm 处的吸光度, 并以浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标绘制标准工作曲线: $A=0.050\ 1C+0.007\ 2$, $r=0.999\ 6$; 表明 FA 在 $2.74\sim 27.40\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。取一定量 FA-CTS 离心($5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 min), 上清液用蒸馏水稀释, 所有吸光度值以不含 FA 的 CTS 溶液为参比, 经测定, 在纳米粒中, FA:CTS=15:1, 即 1 分子 CTS 与 15 分子 FA 静电结合形成聚电解质。公式如下: $\frac{FA}{CTS} = \frac{W_{\text{总}} - W_{\text{FA}}}{W_{\text{CTS}}}$ 。

式中 $W_{\text{总}}$ 为 FA-CTS 中 FA 总物质的量, W_{FA} 为上清液中 FA 物质的量, W_{CTS} 为 FA-CTS 中 CTS 物质的量。

2.2 HPLC 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Dikma C_{18} (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(85:15); 检测波长为 294 nm; 流速为 $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温为 $30\ ^\circ\text{C}$; 进样量为 10 μL 。

2.2.2 对照品溶液的配制 取 SFG 适量, 精密称定为 11.34 mg, 置 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得 $453.60\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 SFG 对照品储备液。精密吸取 SFG 对照品储备液 0.2、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分别置于 100 mL 量瓶中, 甲醇定

容后摇匀, 即得浓度为 0.91、4.54、9.07、13.61、18.14、 $22.68\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列 SFG 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的配制 精密量取 FA-SFG-CTS 纳米粒溶液 1.0 mL 于 10 mL 容量瓶, 甲醇定容后超声 10 min, 使纳米粒中的 SFG 释出, 用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 按照“2.2.1”项下色谱条件, 以 HPLC 法测定空白纳米粒、SFG 对照品及样品溶液中 SFG 色谱图的出峰时间, 结果见图 2。结果提示空白纳米粒对 SFG 没有影响, 说明本方法专属性良好。

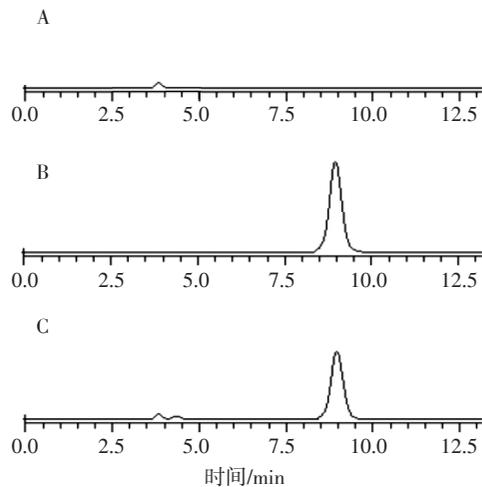


图2 空白纳米粒(A)、SFG 对照品(B)和 FA-SFG-CTS 纳米粒(C)的 HPLC 色谱图

Figure 2 HPLC chromatograms of blank nanoparticle(A), SFG standard(B), FA-SFG-CTS(C)

2.2.5 线性关系的考察 分别精密移取“2.2.2”项下的 SFG 对照品系列溶液, HPLC 法检测, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制 SFG 标准工作曲线, 回归方程为: $Y=979.8X+59.52$, $r=0.999\ 7$, 表明 SFG 在 $0.91\sim 22.68\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 取 SFG 对照品溶液适量, 按“2.2.1”项下色谱条件, 1 d 内测定 6 次及连续 6 d 每天测定 1 次, 记录峰面积并计算日内、日间精密度。结果日内精密度的 RSD 为 0.27%, 日间精密度的 RSD 为 0.40%。

2.2.7 重复性试验 取同一批次的 FA-SFG-CTS 纳米粒供试品 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定峰面积, 计算得样品中 SFG 质量浓度的 RSD 为 1.16%。

2.2.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液于 0、2、4、8、10、12 h 进样, 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 记录 SFG 峰面积。结果峰面积的 RSD 为 0.78%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.9 加样回收率试验 分别精密量取 1.0 mL 已知浓度供试品溶液 6 份, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 各精密加入 1.0 mL 的 SFG(9.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)对照品溶液, 用甲醇定容至刻度, 按“2.2.1”项下条件进行检测, 测定 SFG 含量, 计算回收率。结果平均回收率为 99.98%, RSD 为 0.95%。

2.3 包封率和载药量的测定 将在室温下用生理盐水浸泡 24 h 后的 Sephadex G-50 装填于 1.5 cm \times 30 cm 凝胶柱, 装填高度 18.0 cm, 由柱上方加入 FA-SFG-CTS 溶液 2.0 mL, 洗脱液流速控制在 1.0 mL \cdot min $^{-1}$, 用 60.0 mL 生理盐水洗脱, 经洗脱曲线考察: 纳米粒洗脱在 18~30 min, 游离药物洗脱在 38~50 min, 分离完全。收集纳米粒部分, 甲醇定容至 25 mL, 超声破乳, 0.22 μm 滤膜滤过; 另精密吸取 2.0 mL FA-SFG-CTS 纳米粒溶液甲醇直接定容至 25 mL, 超声破乳, 0.22 μm 滤膜滤过, 以 HPLC 法测定两种样品。包封率(%) = $(W_{\text{包}}/W_1) \times 100\%$ 。载药量(%) = $(W_{\text{包}}/W) \times 100\%$ 。

$W_{\text{包}}$ 为 FA-SFG-CTS 纳米粒通过 Sephadex G-50 柱的 SFG 的质量, W_1 为甲醇破乳后 SFG 的质量, W 为纳米粒的质量。

2.4 效应面法优化 FA-SFG-CTS 纳米粒处方

2.4.1 因素水平的确定 预实验采用单因素试验法。以 40.0 mL CTS(浓度 2.0 mg \cdot mL $^{-1}$)溶液为底液, 考察了水浴温度、搅拌速度、SFG 用量、TPP 与 CTS 质量比、FA 浓度及体积等因素对粒径、包封率等指标的影响。

通过单因素考察得到最优条件: 水浴温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 搅拌速度 1 000 r \cdot min $^{-1}$, 以每秒 1 滴的速度滴加 FA 溶液和 TPP 溶液, FA 体积为 8.0 mL(为 CTS 体积的 20%), TPP 浓度为 2.0 mg \cdot mL $^{-1}$ 。研究发现对包封率影响较大的 3 个因素为 SFG 用量、TPP 与 CTS 质量比和 FA 浓度。在此基础上进一步以包封率(Y_1)和载药量(Y_2)为评价指标, 以 SFG 用量(A)、TPP 与 CTS 质量比(B)和 FA 浓度(C)为考察因素, 采用 Design-Expert 8.0 软件进行试验设计, 各因素水平见表 1, 试验设计及结果见表 2。

2.4.2 数学模型拟合与分析 对 Y_1 、 Y_2 模型进行回归方差分析和显著性检验。 Y_1 模型的 F 值为 43.39, $P < 0.000 1$, 表明模型差异非常显著; 模型的确定系数(Radj 2)值为 0.952 6, 即表明 Y_1 值的变化有 95.26%来源于 SFG 用量(A)、TPP 与 CTS 质量比(B)和 FA 浓度(C)3 个自变量, 方程的因变量与全体自变量间具有显著的关系。从回归系数的显著性检验

表 1 星点设计的因素水平

Table 1 The factor levels and codes of CCD

因素	水平				
	-1.682	-1	0	+1	+1.682
SFG 用量/mg	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
TPP/CTS	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14
FA 浓度/(mg \cdot mL $^{-1}$)	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50

表 2 试验设计与结果($n=3$)

Table 2 Experimental design and results($n=3$)

序号	A/mg	B	C/(mg \cdot mL $^{-1}$)	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	4.5	0.10	1.00	69.81	8.73
2	5.0	0.08	1.25	62.81	5.84
3	4.5	0.06	1.00	45.12	4.58
4	5.0	0.08	0.75	56.92	6.62
5	4.5	0.14	1.00	43.56	5.69
6	4.5	0.10	1.00	68.88	7.74
7	4.5	0.10	1.00	67.91	9.31
8	5.0	0.12	1.25	52.81	6.84
9	4.5	0.10	1.00	70.79	8.87
10	3.5	0.10	1.00	28.08	3.96
11	4.5	0.10	1.50	55.97	6.02
12	5.5	0.10	1.00	62.31	5.93
13	4.0	0.12	0.75	46.62	5.01
14	4.5	0.10	1.00	68.85	8.93
15	4.0	0.08	0.75	34.02	6.26
16	4.5	0.10	1.00	65.87	9.02
17	4.0	0.08	1.25	45.74	5.68
18	4.5	0.10	0.50	53.86	5.92
19	5.0	0.12	0.75	56.92	6.62
20	4.0	0.12	1.25	46.74	5.68

注: A: SFG 用量; B: TPP 与 CTS 质量比; C: FA 浓度; Y_1 : 包封率; Y_2 : 载药量

可知 A、A 2 、B 2 、C 2 项差异非常显著($P < 0.000 1$), AB、BC 项具有显著差异($P < 0.05$), 其他项不显著, 方程的失拟项 F 值为 3.69, $P = 0.089 2 > 0.05$ 。失拟项不显著, 说明回归方程区域的拟合情况良好, 可用该回归模型代替实验真实点对实验结果进行分析。利用 Design-Expert 实验软件对数据进行回归分析, 得二次多元回归模型为 $Y_1=68.31+15.60A+0.06B+2.23C-11.80AB-5.03AC-10.80BC-24.75A^2-25.60B^2-15.03C^2, r=0.987 4$; Y_2 模型的 F 值为 25.68, $P < 0.000 1$, 表明模型非常显著。模型的 Radj 2 值为 0.921 2, 即表明 Y_2 值的变化有 92.12%来源于此 3 个因素。从回归系数的显著性检验可知 A 2 、B 2 、C 2 项差异非常显著($P < 0.000 1$), A 项具有显著差异($P < 0.05$), 其他项不显著, 方程失拟项 F 值为 0.36,

$P = 0.8564 > 0.05$ 。失拟项不显著，说明回归方程区域的拟合情况良好。对实验数据进行回归分析，得二次多元回归模型为 $Y_2 = 8.74 + 0.90A + 0.25B - 0.034C + 1.13AB - 0.32AC + 1.13BC - 3.87A^2 - 3.68B^2 - 2.85C^2$ ， $r = 0.9790$ 。

2.4.3 效应面优化与预测 由回归模型处理得到 SFG 用量、TPP 与 CTS 质量比、FA 浓度交互作用对纳米粒包封率及载药量影响的三维曲面图，见图 3 和图 4。

从响应面分析图上可以形象地看出各因素的相互作用。预测的最佳处方工艺为 SFG 用量为 4.70 mg，TPP 与 CTS 质量比为 0.1，FA 浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以此为最佳工艺进行验证试验，结果包封率和载药量的实测值与预测值的相差较小，各项指标偏差均小于 5%，说明模型拟合较好，可以成功地用于进行预测。结果见表 3。

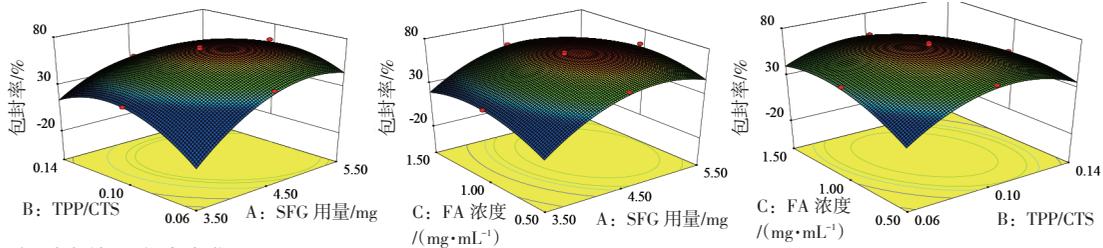


图 3 响应面包封率的三维响应曲面图

Figure 3 Response surface Y_1 3D curved

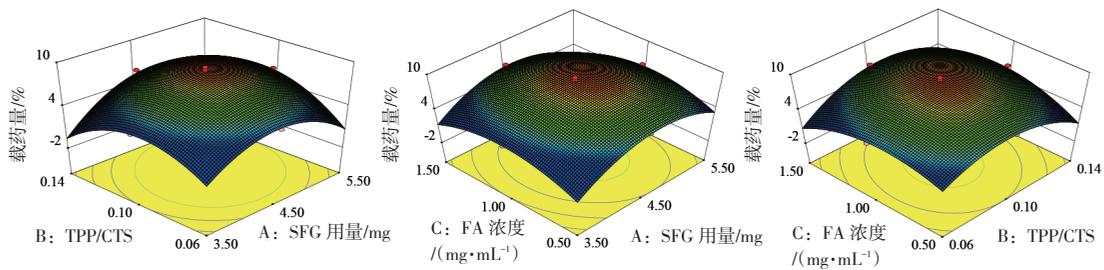


图 4 响应面载药量的三维响应曲面图

Figure 4 Response surface Y_2 3D curved

表 3 预测和观察响应的比较 ($\bar{x} \pm s$; $n=3$)

Table 3 The comparison of the predicted and observed responses ($\bar{x} \pm s$; $n=3$)

指标	预测值/%	测量值/%	RSD/%
包封率	70.40	69.26 ± 1.34	2.36
载药量	8.77	8.26 ± 0.14	2.07

2.4.4 纳米粒的表征 按照最优的处方条件制备 FA-SFG-CTS 纳米粒，由图 5 可见 FA-SFG-CTS 纳米粒

溶液的外观为带有均匀的淡蓝色乳光。溶液粒径、Zeta 电位等指标的结果见表 4。数据表明纳米粒的包封率及载药量均较高；当纳米粒表面 Zeta 电位绝对值大于 25 mV 时，由于静电力的排斥作用，纳米粒可以以一种稳定的形态存在，不会发生聚集。数据表明纳米粒 Zeta 电位为 -35.2 mV ，绝对值大于 25 mV，粒子可以以稳定的形态存在；粒径为 169.03 nm，分散系数(PDI)为 0.19，表明此纳米粒分散较好。Zeta 电位图和粒径分布见图 6、图 7。



图 5 纳米粒外观状态图

Figure 5 The appearance of nanoparticles

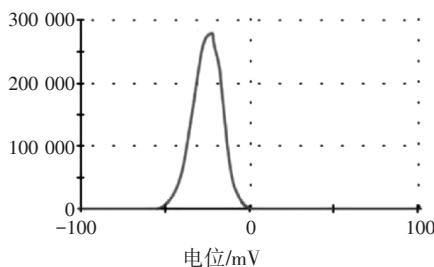


图 6 Zeta 电位图($n=3$)

Figure 6 Zeta potential

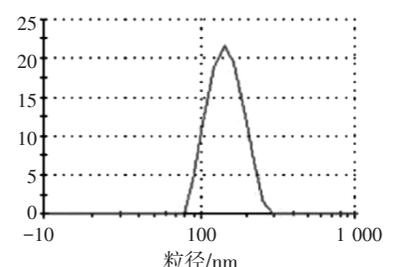


图 7 平均粒径分布($n=3$)

Figure 7 Mean particle size distribution

表 4 FA-SFG-CTS 纳米粒溶液的特征值(n=3)

Table 4 Results of FA-SFG-CTS solution determination(n=3)

指标	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
粒径/nm	169.03 ± 1.89	2.74
分散系数	0.18 ± 0.01	4.21
电位/mV	-35.2 ± 0.99	3.93
包封率/%	68.74 ± 1.35	2.41
载药量/%	8.25 ± 0.16	2.38

表 5 FA-SFG-CTS 纳米粒在 15 d 内的稳定性试验结果(n=3)

Table 5 Results of stability tests of FA-SFG-CTS within 15 days(n=3)

温度/℃	0 d		1 d		3 d		7 d		15 d	
	外观	包封率/%	外观	包封率/%	外观	包封率/%	外观	包封率/%	外观	包封率/%
25	-	68.74	-	68.28	-	67.25	±	67.09	+	63.18
4	-	68.74	-	68.69	-	68.70	-	68.46	±	66.35
-4	-	68.74	-	68.72	-	68.71	-	68.67	-	68.08

注：“-”表示不分层，无沉淀；“±”表示不分层，有少许絮凝，振摇后可复原；“+”表示分层，有不可逆沉淀

2.5 FA-SFG-CTS 纳米粒冻干工艺研究

2.5.1 冻干保护剂的选择 冻干保护剂的类型和用量直接影响样品冻干效果，外观以可基本保持原液体积、不塌陷、不结块者为佳；色泽以呈淡黄色、无色差者为佳；再分散性以轻轻振摇后很快分散成带乳光的溶液者为佳。各指标以 10 分制进行评分，评分标准见表 6。本研究考察了 2%、4%、8%、10% 的葡萄糖、蔗糖、海藻糖和甘露醇的冻干效果。结果表明，4%甘露醇冻干效果最好，见表 7。

表 6 指标评分标准

Table 6 Score standard of indexes

分值/分	外观	色泽	再分散性/s
0-2	冲瓶、严重萎缩	色差极其显著	> 90
3-5	塌陷、分层、结块	色差显著	60-90
6-8	外观较好、离壁	色差不显著	30-60
9-10	外观饱满、体积不变	均匀无色差	< 30

表 7 FA-SFG-CTS 纳米粒与不同冷冻保护剂的冻干结果(n=3, 分)

Table 7 Lyophilization result of FA-SFG-CTS with different cryoprotectant(n=3, scores)

	葡萄糖/%				蔗糖/%				海藻糖/%				甘露醇/%			
	2	4	8	10	2	4	8	10	2	4	8	10	2	4	8	10
外观	5	7	7	8	4	5	6	4	5	6	5	7	3	8	4	5
色泽	5	6	9	4	3	4	7	3	3	6	4	3	9	9	9	4
再分散性	4	8	3	7	2	4	4	3	5	5	6	4	8	10	3	2
综合评价	14	21	19	19	9	13	17	10	13	17	15	14	20	27	16	11

2.5.2 冻干工艺的建立 预试验对预冻温度、升华干燥温度、解吸干燥温度及时间进行了冻干工艺考察。

2.4.5 稳定性考察 将 3 批 FA-SFG-CTS 纳米粒样品于室温(25 ℃)、4 ℃及-4 ℃冰箱冷藏保存，分别于 0、1、3、7、15 d 取样，肉眼观察外观，并检测其包封率，考察稳定性。FA-SFG-CTS 纳米粒在 15 d 内的外观、包封率变化结果见表 5。结果表明团聚的倾向很小。

以冻干品外观、再分散性为指标，最终确定冻干工艺为：将 FA-SFG-CTS 纳米粒溶液与 4%甘露醇充分溶解混匀后装入安瓿瓶中，在-40 ℃的温度下预冻 8 h，调节冻干机使其在 2 h 内处于真空状态并升温至-10 ℃，保持 25 h；然后在 2 h 内将温度升至 25 ℃并维持 5 h 进行解吸干燥；最后压塞，出箱密封，即得 FA-SFG-CTS 纳米粒冻干制剂。

2.5.3 冻干纳米粒的表征 在 FA-SFG-CTS 纳米粒溶液中加入 4%甘露醇，按照冻干工艺进行冻干。由图 8 可见冻干制剂外观色泽均匀，呈淡黄色，质地疏松，表面平整。由图 9 可见纳米粒呈椭圆类球形。测定复溶后的粒径、Zeta 电位等指标，结果见表 8。与“2.4.4”项下的指标数值相比，复溶后的冻干制剂的包封率与载药量虽有降低，但变化不显著，表明冻干纳米粒没有漏药等情况；纳米粒的 Zeta 电位绝对值虽略有变小，但大于 25 mV，表明可稳定存在；粒径虽略有变大，但分散系数几乎没有变化。Zeta 电位图和粒径分布见图 10、图 11。

2.5.4 冻干纳米粒体外释放研究 精密称取 FA-SFG-CTS 纳米粒冻干制剂 43.57 mg(相当于 SFG2.03 mg)



图 8 冻干制剂外观

Figure 8 The appearance of freeze-dried preparation

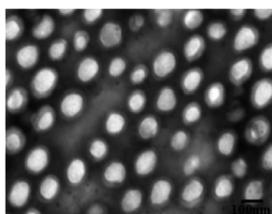


图9 冻干制剂透射电镜图(×87 000)

Figure 9 FA-SFG-CTS under transmission electron microscopy (×87 000)

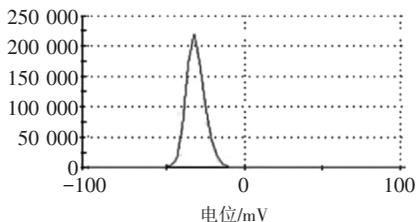


图10 冻干制剂 Zeta 电位图(n=3)

Figure 10 Zeta potential(n=3)

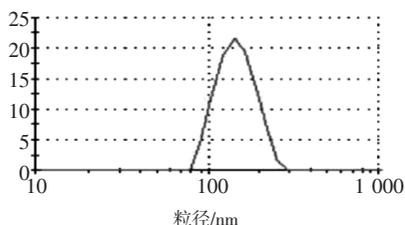


图11 冻干制剂平均粒径分布(n=3)

Figure 11 Mean particle size distribution(n=3)

表8 FA-SFG-CTS 纳米粒冻干制剂的特征值(n=3)

Table 8 The results of FA-SFG-CTS freeze-dried powder(n=3)

指标	$\bar{x} \pm s$	RSD/%
粒径/nm	177.70 ± 2.11	2.30
分散系数	0.20 ± 0.02	4.45
电位/mV	-34.9 ± 1.16	4.66
包封率/%	67.34 ± 1.41	2.57
载药量/%	7.82 ± 0.18	2.95

溶于 20.0 mL 生理盐水分散，配制浓度相同的 SFG 溶液并精密吸取 20.0 mL，分别置于透析袋中。以 100.0 mL 的 PBS 溶液 (pH=7.4) 为溶出介质，温度为

(37±0.5) °C，转速为 100 r·min⁻¹，分别于 0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、36 h 取样品液 3 mL。并及时补充同体积的 PBS 溶液，经 0.22 μm 微孔滤膜滤过，续滤液按照“2.2.1”项下进行 HPLC 分析，计算累积释放率(Q)。Q(%)=(V₀C₁+V_∑ⁱ⁼¹C_i)×100%。

式中 C_i 为每个时间点测量的释放介质中的药物浓度 (mg·mL⁻¹)，W 为投入药物的总重量 (mg)，V₀ 是释放介质的总体积 (mL)，V 是取样体积 (mL)。累积释放率曲线图见图 12。

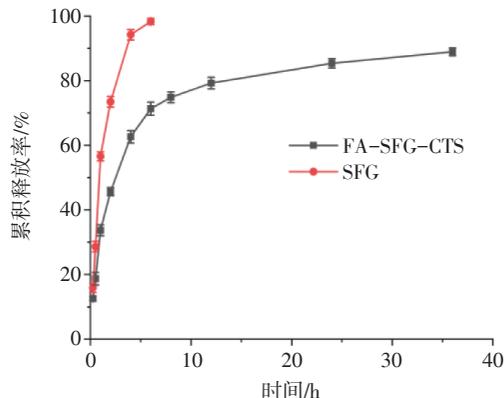


图12 FA-SFG-CTS 纳米粒和 SFG 的体外累积释药百分率 (n=3)

Figure 12 The cumulative drug release rate of FA-SFG-CTS and SFG in vitro(n=3)

SFG 原药在介质中释放较快，1 h 累积释放率达到 (56.58±1.39)%，至 6 h 达到 (98.34±0.95)%，已经基本释放完全；FA-SFG-CTS 纳米粒在 1 h 累积释放率为 (33.69±1.71)%，6 h 达到 (71.34±2.00)%，36 h 累积释放率达到 (88.94±1.20)%，表明 FA-SFG-CTS 纳米粒有良好的缓释作用。

采用零级释药模型、一级释药模型、Higuchi 方程模型和 Weibull 方程模型对 FA-SFG-CTS 纳米粒冻干粉及原料药进行体外释放率的方程拟合，得到相关模型方程，拟合优度以相关系数(r)进行判断。方程拟合结果表明，FA-SFG-CTS 纳米粒冻干粉体外释放与 Weibull 方程一致，SFG 原料药体外释放与一级方程基本一致，见表 9。

表9 FA-SFG-CTS 纳米粒冻干制剂对累积释放量的拟合方程

Table 9 The fitting equations of FA-SFG-CTS powder on quantity of accumulation delivery

释药模型	FA-SFG-CTS 纳米粒	SFG
零级方程	Q=1.784t+40.58, r=0.721	Q=13.46t+30.33, r=0.877
一级方程	Q=82.23(1-e ^{-0.4090t}), r=0.984	Q=98.99(1-e ^{-0.7430t}), r=0.995
Higuchi 方程	Q=13.61t ^{1/2} +22.84, r=0.877	Q=34.06t ^{1/2} +11.16, r=0.964
Weibull 方程	Q=8 786{1-e ^{-(0.343 3(1-0.095 88)t)^{0.662 6}} }, r=0.995	Q=101.49{1-e ^{-0.7764(1-0.1072)t^{0.832 6}} }, r=0.989

3 讨论

在体外释放实验中, FA-SFG-CTS 纳米粒可将药物的释放时间延长数小时。药物的释放由突释和缓慢释放两部分组成, SFG 原药 2 h 累积释放率达 $(73.75 \pm 2.04)\%$ 。而 FA-SFG-CTS 纳米粒在 2 h 时释放率为 $(45.65 \pm 1.26)\%$, 最开始的突释可能是由于吸附在纳米粒表面或者靠近纳米粒表面的药物暴露在释放介质中, 但在 4 h 后呈现缓慢释放状态。

纳米粒包封率测定的常用方法有葡聚糖凝胶过滤法、超速低温离心法、透析法等。本研究用上述 3 种方法考察了该纳米粒包封率。根据测定结果选择葡聚糖凝胶过滤法。超速低温离心法虽然具有省时的优点, 但因超速产生的离心力造成纳米粒中药物的溢出, 测得的包封率较低; 透析法的实验周期相对较长, 并且测得的包封率最低; 葡聚糖凝胶柱时间相对较短, 实验仪器及条件较简单, 对纳米粒和游离药物有较好的分离效果, 平均回收率为 98.70%, RSD=1.65%。故本研究选择葡聚糖凝胶柱层析法来测定包封率。

本研究考察了 3 种 SFG 加入方式对评价指标的影响, ①SFG 加入到壳聚糖底液后加入叶酸氨水溶液, 再滴加 TPP 溶液; ②SFG 先与 TPP 溶液混合, 叶酸氨水滴加到壳聚糖底液中, 再滴加 SFG 混合溶液; ③SFG 先与叶酸氨水混合后再加入到壳聚糖底液中, 再滴加 TPP 溶液。由于 SFG 结构的 7-和 4'-位同时具有酚羟基, 在 p- π 共轭效应的影响下显酸性, 所以在碱性环境中较不稳定, 后两种方式中药物处于碱性环境, 因此猜测 SFG 还没被包封就已经部分开环, 有所损失, 加上 TPP 水溶液的碱性比叶酸氨水溶液的碱性强 ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TPP 溶液的 pH 值为 9.1, 呈碱性; 滴加氨水量恰好使溶液澄清透明的 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的叶酸氨水溶液的 pH 值为 7.2, 近中性), 这与本试测得的方式③包封率高于方式②包封率数据一致, 因此制备纳米粒过程中选择包封率最高的方式①加入 SFG。

本研究以星点效应面法应用于 FA-SFG-CTS 纳米粒处方优化, 适用性好, 优化后的 FA-SFG-CTS 纳米粒处方粒径适宜, 包封率高, 缓释效果显著。

参考文献:

[1] 任翠, 贾丹, 吴霞, 等. 新型厚朴酚-二甲双胍缀合物对 HepG2 移

植瘤小鼠抗肿瘤作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(3): 257-263.

[2] 张聪, 盛磊, 杨恬, 等. 尿石素 A 通过 AKT/SREBP-1c/FASN 信号通路调节肝癌细胞 Huh-7 脂代谢的作用研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(8): 891-898.

[3] 杨志欣, 单柏松, 李霞, 等. 槐属二氢黄酮 G 的药理活性及构效关系评述 [J]. 中药材, 2016, 39(2): 457-461.

[4] 杨志欣, 程静, 张文君, 等. 苦参总黄酮磷脂复合物的制备及优化 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(3): 342-346.

[5] HUANG W C, GU P Y, FANG L W, et al. Sophoraflavanone G from *Sophora flavescens* induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells [J]. *Phytomed*, 2019, 61: 152852

[6] KIM B H, WON C, LEE Y H, et al. Sophoraflavanone G induces apoptosis of human cancer cells by targeting upstream signals of STATs [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2013, 86(7): 950-959.

[7] KANG T H, JEONG S J, KO W G, et al. Cytotoxic lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens* [J]. *Nat Prod*, 2000, 63(5): 680-681.

[8] KO W G, KANG T H, KIM N Y, et al. Lavandulyl flavonoids: a new class of *in vitro* apoptogenic agents from *Sophora flavescens* [J]. *Toxicol In Vitro*, 2000, 14(5): 429-433.

[9] 杨洁. 三种药用植物的抗肿瘤活性及分子机制研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2018.

[10] 孙静, 张小飞, 唐志书. 表没食子儿茶素没食子酸酯壳聚糖纳米粒的制备及其药剂学性质研究 [J]. 中草药, 2016, 47(5): 741-747.

[11] 王娟. 基于壳聚糖三氧化二砷肝靶向载体的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2016.

[12] BOWMAN K, LEONG K W. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery [J]. *Int J Nanomedicine*, 2006, 1(2): 117-128.

[13] 林爱华, 平其能. 壳聚糖载药纳米粒研究进展 [J]. 药学专论, 2006, 15(21): 25-27.

[14] BHUNCHU S, ROJSITTHISAK P. Biopolymeric alginate-chitosan nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy [J]. *Die Pharmazie*, 2014, 69(8): 563-570.

[15] PARKER N, TURK M J, WESTRICK E, et al. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay [J]. *Analytical Biochemistry*, 2005, 338(2): 284-293.

[16] MC CARRON, CROWLEY, O' SHEA D, et al. Targeting the Folate Receptor: improving efficacy in inorganic medicinal chemistry [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(23): 2675-2708.

[17] SUN Y, ZHAO Y, TENG S, et al. Folic acid receptor-targeted human serum albumin nanoparticle formulation of cabazitaxel for tumor therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 14: 135-148.

(编辑: 梁进权)