

芒果苷固体脂质纳米粒的制备及其体内药动学研究

吕东霞¹, 禹 瑞¹, 屈战果², 范明松^{2*}

(1. 郑州澍青医学高等专科学校, 河南 郑州 450064; 2. 上海雷允上药业有限公司, 上海 201401)

摘要: **目的** 制备芒果苷固体脂质纳米粒, 并考察其体内药动学。**方法** 乳化-超声法制备固体脂质纳米粒, 检测其形态、包封率、载药量、粒径、Zeta 电位、体外释药。大鼠随机分为 2 组, 分别灌胃给予芒果苷及其固体脂质纳米粒混悬液 (20 mg/kg), 于 0.167、0.33、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12 h 采血, HPLC 法测定芒果苷血药浓度, 计算主要药动学参数。**结果** 所得固体脂质纳米粒呈类球形或椭圆形, 无粘连, 平均包封率为 80.61%, 载药量为 3.16%, 粒径为 178.63 nm, Zeta 电位为 -18.2 mV, 4 h 内累积释放度在 90% 以上, 体外释药符合 Weibull 模型 ($R^2=0.9725$)。纳米粒 t_{max} 、 C_{max} 、 AUC_{0-t} 、 $AUC_{0-\infty}$ 高于原料药 ($P<0.01$), 相对生物利用度提高至 216.69%。**结论** 固体脂质纳米粒可促进芒果苷体内吸收, 提高其口服生物利用度, 能作为该成分的药物递送系统。

关键词: 芒果苷; 固体脂质纳米粒; 制备; 体内药动学; 乳化-超声法; HPLC

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)11-2835-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.002

Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of mangiferin solid lipid nanoparticles

LÜ Dong-xia¹, YU Rui¹, QU Zhan-guo², FAN Ming-song^{2*}

(1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China; 2. Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201401, China)

ABSTRACT: **AIM** To prepare mangiferin solid lipid nanoparticles and to investigate their *in vivo* pharmacokinetics. **METHODS** For the solid lipid nanoparticles prepared by emulsification-ultrasonic method, their morphology, encapsulation efficiency, drug loading, particle size, Zeta potential and *in vitro* drug release were detected. Rats were randomly assigned into two groups and given intragastric administration of the suspensions of mangiferin and its solid lipid nanoparticles (20 mg/kg), respectively, after which blood collection was performed at 0.167, 0.33, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h. HPLC was adopted in the plasma concentration determination of mangiferin, and the main pharmacokinetic parameters were calculated. **RESULTS** The obtained solid lipid nanoparticles were spherical-like or elliptical without adhesion, demonstrating the average encapsulation efficiency of 80.61%, drug loading of 3.16%, particle size of 178.63 nm, Zeta potential of -18.2 mV, and more than 90% of accumulative release rate within 4 h. The *in vitro* drug release accorded with Weibull model ($R^2=0.9725$). The nanoparticles displayed higher t_{max} , C_{max} , AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ than the raw medicine ($P<0.01$), and the relative bioavailability was increased to 216.69%. **CONCLUSION** Solid lipid nanoparticles can promote the *in vivo* absorption of mangiferin and enhance its oral bioavailability, thus can be taken as the drug delivery system of this constituent.

KEY WORDS: mangiferin; solid lipid nanoparticles; preparation; *in vivo* pharmacokinetics; emulsification-ultrasonic method; HPLC

收稿日期: 2020-02-26

作者简介: 吕东霞 (1984—), 女, 讲师, 从事药物疗效及护理研究。Tel: (0391) 7366100, E-mail: lvdongxia1116@126.com

* 通信作者: 范明松 (1973—), 男, 博士, 高级工程师, 从事药物研发工作。Tel: (021) 51801316, E-mail: fanmingsong007@126.com

芒果苷是芒果叶主要活性成分之一，也可从知母中提取得到^[1]，具有抗糖尿病及其并发症、调节脂代谢、抗肿瘤、心血管保护等多种药理作用^[2-4]，应用前景广阔，具有一定研发价值，但该成分口服吸收生物利用度仅为 1.2%^[5]，导致其药效发挥大打折扣。纳米技术在提高药物生物利用度方面的作用得到了医药工作者的公认，目前已有采用自微乳提高芒果苷生物利用度的报道^[6]，但该方法需使用大量表面活性剂，存在溶血等风险^[7]，故开发一种安全性较高的纳米给药系统具有重要意义。

如今，对固体脂质纳米粒^[8-11]的研究较多，技术也较为成熟，该方法采用生理相容性良好的载体材料将药物包裹于其中，从而起到改变药动学、促进吸收、提高生物利用度的目的，而且表面活性剂用量远低于自微乳。因此，本实验制备芒果苷固体脂质纳米粒，并对其体内药动学进行考察，以期为其他相关制剂的开发提供参考。

1 材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪，配置二极管阵列检测器（美国 Agilent 公司）；TM-14SB 型集热式磁力搅拌器（上海沉汇仪器有限公司）；FA1004B 型电子天平（上海精密科学仪器有限公司）；MD200-5 型氮气吹扫仪（杭州奥威仪器有限公司）；AllegraTMX-22R 型台式高速冷冻离心机（美国 Beckman 公司）；H-7650 型透射电镜（日本日立公司）；MixMax 型涡旋混合器（合肥艾本森科研仪器有限公司）；Master-sizer 型粒度分析仪（英国马尔文仪器有限公司）。

芒果苷原料药（批号 110331，纯度>98%，天津市中新药业集团有限公司）；芒果苷对照品（批号 111558-201608，纯度 99.2%，中国食品药品检定研究院）；大豆卵磷脂（批号 PC-98T，上海辅必成医药科技有限公司）；单硬脂酸甘油酯（批号 161025，北京凤礼商贸有限公司）；超滤离心管（30 kDa，美国 Millipore 公司）；泊洛沙姆 188（WPPE587E，德国巴斯夫公司）。其他试剂均为分析纯。

SD 大鼠，体质量（300±20）g，购自上海斯莱克实验动物有限公司，动物生产许可证号 SCXK（沪）2012-0002。

2 方法与结果

2.1 芒果苷含量测定

2.1.1 色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱（250 mm×2836

4.6 mm，5 μm）；流动相甲醇-0.1% 磷酸（40：60）；体积流量 1.0 mL/min；柱温 35 ℃；检测波长 258 nm。

2.1.2 线性关系考察 将 10 mg 芒果苷对照品溶于 100 mL 甲醇中，得到 100 μg/mL 贮备液，甲醇依次稀释至 20.0、5.0、1.0、0.1、0.05 μg/mL，作为对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行回归，得方程为 $Y=30.1158X+5.2174$ （ $r=0.9998$ ），在 0.05~20.0 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.3 方法学考察 取“2.1.2”项下 20.0、5.0、0.05 μg/mL 对照品溶液适量，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得芒果苷峰面积 RSD 分别为 0.12%、0.24%、0.18%，表明仪器精密密度良好。取 1 mL 纳米混悬液至 10 mL 量瓶中，加入 5 mL 甲醇超声提取后流动相定容至刻度，过 0.45 μm 微孔滤膜，即得供试品溶液，平行制备 6 份，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得芒果苷峰面积 RSD 为 1.38%，表明该方法重复性良好。取同一份供试品溶液，于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得芒果苷峰面积 RSD 为 0.72%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。取 1.0 mL 空白固体脂质纳米粒混悬液至 10 mL 量瓶中，共 9 份，加入“2.1.2”项下 100 μg/mL 对照品溶液 0.5、1.0、1.5 mL 各 3 份，再加入 5 mL 甲醇超声提取后流动相定容至刻度，过 0.45 μm 微孔滤膜，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得芒果苷平均加样回收率为 99.31%，RSD 为 1.78%。

2.2 芒果苷固体脂质纳米粒制备 参考文献 [8] 报道的方法。取芒果苷 10 mg、大豆磷脂 30 mg、单硬脂酸甘油酯 200 mg，置于 10 mL 无水乙醇中，70 ℃水浴溶解，作为油相；配制 30 mL 0.5% 泊洛沙姆 188 溶液，置于 70 ℃水浴中加热，作为水相，在 800 r/min 搅拌速度下将油相滴加到水相中，继续搅拌 3 h 后超声（200 W）提取 10 min（每提取 3 s，间隔 2 s），低温固化，过 0.45 μm 微孔滤膜，0.5% SDS 溶液补充体积至 30 mL，即得。同法制备空白纳米粒混悬液。

2.3 包封率、载药量测定 取 1 mL 芒果苷固体脂质纳米粒混悬液至 25 mL 量瓶中，加入 15 mL 甲醇超声提取后流动相定容至刻度，过 0.45 μm 微孔滤膜，平行 3 份，HPLC 法测得芒果苷平均总质量

为 332.86 μg ；取纳米粒混悬液 1 mL，置于超滤管中，12 000 r/min 离心 30 min，合并滤液，取 1 mL 至 5 mL 量瓶中，平行 3 份，HPLC 法测得游离芒果苷平均质量为 64.54 μg 。按照文献 [8] 报道的方法测定包封率、载药量，测得 3 批纳米粒平均包封率为 80.61%，载药量为 3.16%。

2.4 形态观察 取芒果苷固体脂质纳米粒混悬液适量，蒸馏水稀释 50 倍后滴加于铜网上，自然干燥，2% 磷钨酸染色 6 min 后置于透射电镜 (TEM) 下观察其形态，结果见图 1。由此可知，纳米粒呈类球形或椭圆形，粒子之间无粘连。

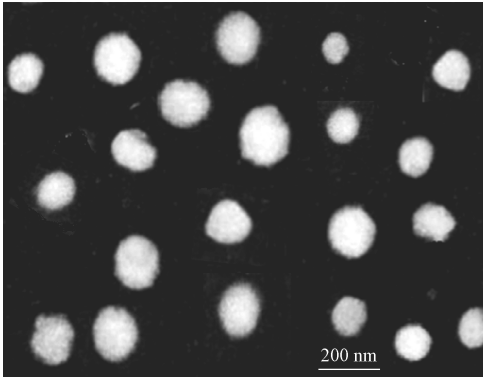


图 1 纳米粒 TEM 图
Fig. 1 TEM image for nanoparticles

2.5 粒径、Zeta 电位测定 取 3 批芒果苷固体脂质纳米粒混悬液，蒸馏水稀释 50 倍后测定其粒径、Zeta 电位，结果见图 2~3。由此可知，纳米粒平均粒径为 178.63 nm，PDI 为 0.083，Zeta 电位为 -18.2 mV。

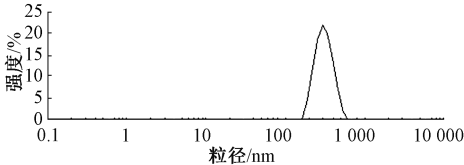


图 2 纳米粒粒径分布
Fig. 2 Particle size distribution of nanoparticles

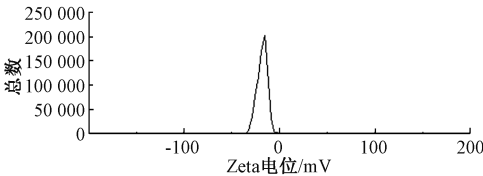


图 3 纳米粒 Zeta 电位
Fig. 3 Zeta potential of nanoparticles

2.6 冻干粉制备 为了增加芒果苷固体脂质纳米粒稳定性，并便于大鼠灌胃给药，本实验将其进一

步制成冻干粉。在纳米粒混悬液中加入 5% 乳糖后混匀，分装于 2 mL 西林瓶中，置于 -60 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中预冻 2 d 后迅速冷冻干燥 2 d (15 Pa、-20 $^{\circ}\text{C}$)，缓慢升温至 25 $^{\circ}\text{C}$ 并保持 2 h，即得 (芒果苷质量分数为 0.578%)。

2.7 体外释药 采用透析袋法。以 900 mL 水 (pH 1.2) 为释放介质^[12]，设定温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ ，转速为 75 r/min，取适量芒果苷固体脂质纳米粒冻干粉至 3 mL 释药介质中 (以芒果苷计质量为 20 mg)，以 3 mL 含相同原料药的甲醇为对照，置于透析袋中 (截留分子量 8 000~14 000 Da)，于 0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、8、12、24、36 h 各取样 2 mL，并自动补加 2 mL 空白溶出介质，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，绘制体外释药曲线，见图 4，可知原料药在 4 h 内基本释放完全，而纳米粒在前 4 h 属于快速释药期，4 h 后属于缓慢释药期。再分别采用零级、一级、Higuchi、Weibull 模型对纳米粒体外释药进行拟合，结果见表 1，可知其更符合 Weibull 模型。

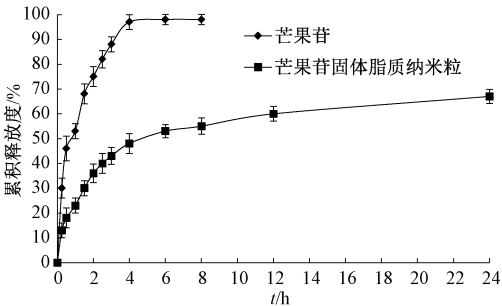


图 4 芒果苷体外释药曲线
Fig. 4 In vitro drug release curves for mangiferin

表 1 模型拟合结果

Tab. 1 Results of model fitting		
模型	拟合方程	R^2
零级	$M_t/M_{\infty} = 0.023\ 0t + 0.233\ 5$	0.634 7
一级	$\ln(1 - M_t/M_{\infty}) = -0.141\ 3t - 0.280\ 7$	0.761 7
Higuchi	$M_t/M_{\infty} = 0.137\ 8t^{1/2} + 0.104\ 2$	0.881 7
Weibull	$\ln\ln[1/(1 - M_t/M_{\infty})] = 0.474\ 0\ln t - 1.238\ 9$	0.972 5

注： M_t 为 t 时间累积释放量， M_{∞} 为 ∞ 时间累积释放量， M_t/M_{∞} 为 t 时间累积释放率， t 为时间。

2.8 体内药动学研究

2.8.1 分组、给药及采血 12 只大鼠随机分为 2 组，每组 6 只，给药前禁食 12 h，自由饮水。将芒果苷及其固体脂质纳米粒冻干粉分别用 0.5% CMC-Na 溶液和纯化水制成 2 mg/mL 混悬液，灌胃给予 2 组大鼠，给药剂量均为 20 mg/kg (以芒果苷计)，

于 0.167、0.33、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12 h眼眶采血，3 500 r/min 离心 3 min 后取上层血浆，低温保存。

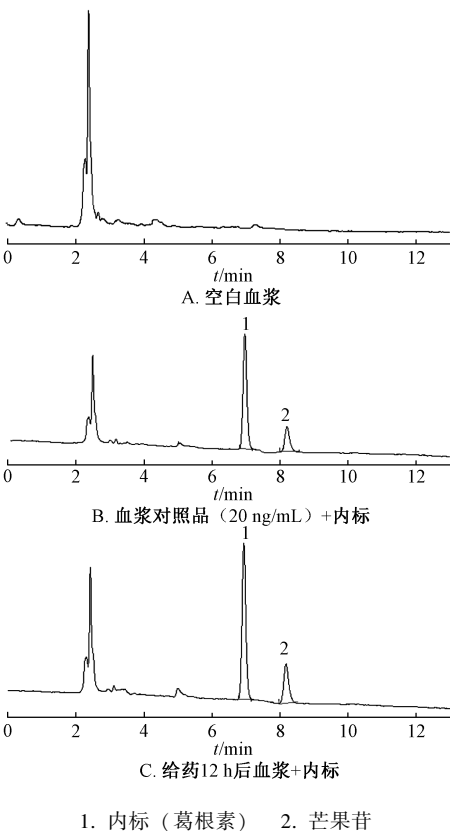
2.8.2 血浆样品处理 将 10 mg 葛根素对照品溶于 50 mL 甲醇中，甲醇稀释至 200 ng/mL，即得内标溶液。取“2.8.1”项下血浆样品 100 μL，加入内标溶液 20 μL、甲醇 1.0 mL，涡旋混合沉降蛋白，10 000 r/min 离心 15 min 后取上层有机相，氮气吹除有机溶剂，加入 100 μL 甲醇复溶，置于带有内衬管的液相瓶中。

2.8.3 线性关系考察 取“2.1.2”项下 20.0 μg/mL 对照品溶液，甲醇依次稀释至 2 000、1 000、500、250、100、20 ng/mL，各取 100 μL，氮气吹干后加入 100 μL 空白血浆，作为血浆对照品溶液，混匀，按“2.8.2”项下方法处理，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标 (X)，芒果苷、内标峰面积比值为纵坐标 (Y) 进行回归，得方程为 $Y = 0.240\ 9X + 0.084\ 2$ ($r = 0.992\ 9$)，在 20~2 000 ng/mL 范围内线性关系良好。

2.8.4 专属性试验 取血浆对照品 (20 ng/mL) (按“2.8.3”项下方法制备) + 内标、给药 12 h 后血浆+内标、空白血浆溶液，按“2.8.2”项下方法处理，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 5。由此可知，芒果苷与内标分离度良好，血浆内源性物质不干扰测定。

2.8.5 方法学考察 取“2.8.3”项下 20、1 000、2 000 ng/mL 对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得芒果苷、内标峰面积比值 RSD 分别为 8.67%、3.06%、4.14%，表明仪器精密度良好。另取上述 3 个质量浓度对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得加样回收率在 85.11%~92.39% 之间。取含药血浆样品溶液适量，室温下于 0、2、6、12、18、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，测得芒果苷、内标峰面积比值 RSD 为 8.17%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。取不含内标的对照品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下进样测定，以 S/N 约为 10 为定量限，约为 3 为检测限，测得两者分别为 5.0、2.0 ng/mL。

2.8.6 分析结果 采用 3P97 程序统计矩模型计算主要药动学参数，结果见表 2，血药浓度-时间曲线见图 6。由此可知，纳米粒 $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 、 $AUC_{0\sim \infty}$ 高于原料药 ($P < 0.01$)，相对生物利用度 2838



1. 内标 (葛根素) 2. 芒果苷
1. internal standard (puerarin) 2. mangiferin

图 5 芒果苷 HPLC 色谱图
Fig. 5 HPLC chromatograms of mangiferin

提高至 216.69%。

表 2 芒果苷主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Tab. 2 Main pharmacokinetic parameters for mangiferin ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

参数	单位	芒果苷	芒果苷固体脂质纳米粒
$t_{\max}$	h	1.18±0.28	2.25±0.41**
$C_{\max}$	ng·mL ⁻¹	405.92±83.42	844.43±152.48**
$AUC_{0\sim t}$	ng·mL ⁻¹ ·h	1 344.13±158.65	2 912.64±276.13**
$AUC_{0\sim \infty}$	ng·mL ⁻¹ ·h	1 557.33±192.17	3 335.79±324.50**

注:与芒果苷比较,** $P < 0.01$ 。

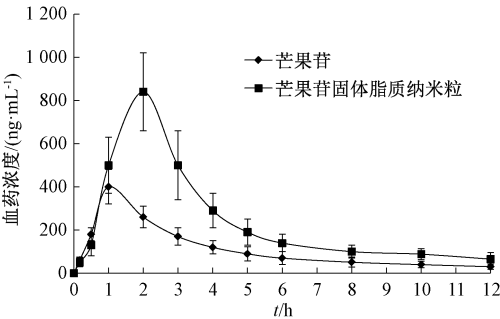


图 6 芒果苷血药浓度-时间曲线
Fig. 6 Plasma concentration-time curves for mangiferin

3 讨论

本实验制备芒果苷固体脂质纳米粒时，采用磷

脂、单硬脂酸甘油酯作为混合载体，可防止药物被排挤出晶格，有助于增加其包封率、稳定性等^[8,13]。张杰等^[14]研究认为，在制备有机相时磷脂可能会与药物形成一种亲脂的药物-磷脂复合物^[15-16]，可增加药物与载体的相容性^[17]，从而提高其包封率；文献 [18] 报道，联合使用乳化剂有利于提高稳定性，降低纳米制剂粒径；本实验所用的泊洛沙姆 188 可提供空间位阻，防止纳米粒聚集，并且磷脂可能也会起到降低油水界面张力、提高乳化效率的作用。综上所述，磷脂在固体脂质纳米粒处方中具有多重作用。

芒果苷水溶性、脂溶性均较差^[14]，从而影响了该成分溶出及透膜吸收，而且胃肠道菌群也会影响其稳定性^[12,19]，导致其吸收生物利用度不理想。固体脂质纳米粒可显著增加芒果苷口服吸收，其原因可能为①纳米制剂可增加药物与胃肠道黏膜的接触几率，有助于其经胞间、淋巴转运等途径吸收；②将芒果苷包裹进纳米粒后可减少与各种酶的接触，从而起到保护作用；③处方中磷脂的存在有助于增加胃肠道渗透性^[20]，增加纳米粒与胃肠道的生物黏附性^[21-22]，最终增加药物被吸收进入血液循环的几率。

参考文献：

[1] 邓俊杰. HPLC 双波长法同时测定炎热清片中 6 种有效成分的含量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(9): 1329-1332.

[2] 唐绍微, 窦茜茜, 莫金秋, 等. 芒果苷及其衍生物对糖尿病小鼠的降糖作用[J]. 医药导报, 2018, 37(4): 441-444.

[3] 任晓光, 李东伟, 何彩梅, 等. 芒果苷药理活性研究进展[J]. 中成药, 2011, 33(5): 860-863.

[4] 杨海光, 赵 赢, 杨世颖, 等. 芒果苷 3 种晶型在大鼠体内药动学[J]. 医药导报, 2019, 38(2): 208-212.

[5] Li Y J, Sui Y J, Dai Y H, *et al.* LC determination and pharmacokinetics study of mangiferin in rat plasma and tissues[J]. *Chromatographia*, 2008, 67(11-12): 957-960.

[6] 轩肖玉, 王亚静, 张伟玲, 等. 芒果苷自微乳给药系统的制备及其大鼠体内药动学研究[J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 166-170.

[7] 刁兆玉, 成 朋, 王仲妮. 表面活性剂溶血作用的研究进展[J]. 食品与药品, 2010, 12(3): 125-129.

[8] 杨金枝, 孙文霞, 王姣姣, 等. 白杨素固体脂质纳米粒的制备及其药动学行为[J]. 中成药, 2018, 40(1): 76-80.

[9] 赵 爽, 季宇彬, 王向涛, 等. 多烯紫杉醇纳米粒的制备、表征及其抗肿瘤作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(2): 153-158.

[10] 杨毛毛, 罗花彩, 沙 玫, 等. 藤茶总黄酮固体脂质纳米粒处方的优化及其体外释药行为[J]. 中成药, 2019, 41(8): 1941-1945.

[11] 陈 奋, 杨 月, 张 玲, 等. 姜黄素纳米制剂在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(21): 2731-2737.

[12] 熊万娜, 岳桂华, 叶美麟, 等. 芒果苷 PVP 固体分散体的制备和表征及在体外肠道菌群模型中的代谢[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(11): 1028-1032.

[13] 李 丽. 大豆磷脂及其在药剂中的应用[J]. 黑龙江医药, 2010, 23(2): 178-182.

[14] 张 杰, 孙敏捷, 平其能, 等. 芒果苷-磷脂复合物的油制剂在大鼠灌胃后的生物利用度[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(9): 1092-1098.

[15] 付金芳, 高 青, 胡瑞瑞, 等. 蒙花苷磷脂复合物的制备及其药动学评价[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(16): 2039-2043.

[16] 刘蒸生, 郝海军, 马进安. 高乌甲素磷脂复合物及其固体分散体在大鼠体内的药动学[J]. 医药导报, 2018, 37(4): 449-452.

[17] 李月灵, 王丽华, 周 竞. 青藤碱磷脂复合物纳米结构脂质载体的制备、表征及药动学研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(4): 669-674.

[18] 侯文书, 张丹参, 张 力, 等. PEG 修饰姜黄素固体脂质纳米粒的制备、表征及溶出特征[J]. 中草药, 2019, 50(8): 1927-1934.

[19] 黄慧学, 谭珍媛, 邓家刚, 等. 人肠道菌群对芒果苷体外代谢转化的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(4): 443-445.

[20] 姚艳胜, 季 鹏, 刘 畅, 等. 柚皮素固体脂质纳米粒冻干粉制备及其大鼠肺部给药药动学研究[J]. 中草药, 2016, 47(4): 591-598.

[21] 高 青, 马记平. 异甘草素聚乳酸纳米粒的制备及在大鼠体内药动学[J]. 医药导报, 2020, 39(1): 85-89.

[22] 王 喻, 饶跃峰, 杨惠卿, 等. pH 敏感型热休克蛋白纳米载体的构建及其理化性质评价[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(17): 2113-2118.