

葛根素纳米粒的亚临界水-反溶剂制备及 体内外性能

孙梦雨¹, 刘 蓓¹, 赵文英¹, 张 玉¹, 朱庆书^{2*}

(1. 青岛科技大学 化工学院, 山东 青岛 266061; 2. 青岛科技大学 高密校区, 山东 高密 265601)

摘要: 为改善葛根素的理化性质, 提高其水溶性、膜渗透性和生物利用度, 采用亚临界水-反溶剂法制备了葛根素纳米粒。采用 SEM、DSC、FTIR 对其进行了表征。通过纳米粒度及 Zeta 电位分析仪考察了不同因素对葛根素纳米粒粒径和多分散指数 (PDI) 的影响。通过体外释放和透皮实验探究了葛根素纳米粒体内外性能。结果表明, 在液料比 (mL : g) 220 : 1、亚临界水温度 125 °C、提取时间 20 min、亚临界水与接收溶剂 (含稳定剂的超纯水) 体积比为 1 : 1、稳定剂为质量分数 0.08% 的乳糖的最佳工艺条件下, 制得的葛根素纳米粒平均粒径为 89.94 nm, 得率为 94.01%。葛根素纳米粒凝胶的 12 h 累积释放率为 90.0%, 48 h 累积释放率升至 96.7%, 葛根素纳米粒凝胶的释放过程符合一级释放模型。葛根素纳米粒凝胶的 12 h 累积渗透量为 1323.64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 其药代动力学参数比葛根素有所改善, 半衰期延长, 峰质量分数降低。

关键词: 葛根素; 亚临界水; 纳米粒; 透皮吸收; 药动学参数; 医药原料

中图分类号: TQ460.1; TB383.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2026) 05-1112-09

Preparation of puerarin nanoparticles in subcritical water-antisolvent and its *in vitro* and *in vivo* properties

SUN Mengyu¹, LIU Bei¹, ZHAO Wenying¹, ZHANG Yu¹, ZHU Qingshu^{2*}

(1. College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266061, Shandong, China; 2. Qingdao University of Science and Technology Gaomi Campus, Gaomi 265601, Shandong, China)

Abstract: In order to improve the physicochemical properties of puerarin and enhance its water solubility, membrane permeability and bioavailability, puerarin nanoparticles were prepared by subcritical water-anti-solvent method, and characterized by SEM, DSC, and FTIR. The effect of different factors for preparation of puerarin nanoparticles on the particle size and polydispersity index (PDI) of puerarin nanoparticles were evaluated *via* nanoparticle size and Zeta potential analyzer. The *in vitro* and *in vivo* properties of puerarin nanoparticles were analyzed through *in vitro* release and transdermal experiments. The results showed that under the optimal process conditions of liquid-material ratio (mL : g) 220 : 1, subcritical water temperature 125 °C, extraction time 20 min, volume ratio of subcritical water to anti-solvent (ultrapure water containing stabilizer) 1 : 1, and lactose with a mass fraction of 0.08% as stabilizer, the prepared puerarin nanoparticles exhibited an average particle size of 89.94 nm, a yield of 94.01%. The puerarin nanoparticles gel had a cumulative release rate of 90.0% within 12 h and up to 96.7% within 48 h with the release process conforming to the first-order release model, and a cumulative permeability of 1323.64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ at 12 h. Its pharmacokinetic parameters were improved compared with those of puerarin, with the half-life prolonged and the peak mass fraction decreased.

Key words: puerarin; subcritical water; nanoparticles; transdermal absorption; pharmacokinetic parameters; drug materials

葛根素是葛根提取物的主要活性成分,具有多种药理作用,包括抗氧化、抗炎、调节血液循环、抑制血小板聚集、扩张血管和降低心肌耗氧量等药理活性^[1]。葛根素口服给药时,在肠道中被 β -葡萄糖苷酶迅速水解为苷元后吸收,再经肝脏 CYP450 酶和 UGT 酶代谢后失活,之后代谢产物主要通过肾脏和肝脏排泄。这些因素共同导致了葛根素在体内具有代谢快、半衰期短的缺点^[2-3]。此外,葛根素的异黄酮结构导致其水溶性和渗透性较差,限制了其临床应用^[3]。为改善难溶性药物的溶解性,研究人员尝试了多种方法,包括使用助溶剂、调节 pH 以及制备固体分散体、包合物和纳米制剂(纳米悬浮剂、纳米粒、纳米脂质体、微乳剂等)^[2]。其中,纳米化是一种很有前景且广泛采用的提高药物水溶性和生物利用度的方法,具有改善药物半衰期和负载能力等功效^[4-5]。目前,纳米粒的制备方法主要有自上而下法和自下而上法两种。自上而下法一般是通过研磨过程将大颗粒减小到纳米级颗粒^[6-7],其方法简单,但所得颗粒形状不规则,而且制备小颗粒的效果有限。相比之下,自下而上的方法可以精细控制产品的形态和结晶度^[8]。目前,已开发出许多不同的纳米粒制备技术,如溶剂-反溶剂沉淀法、超临界流体法、喷雾干燥法等^[9-10]。其中,溶剂-反溶剂沉淀法是一种常用方法,具有操作简单、低成本、高效益、易推广等优点^[11]。然而,这种制备方法通常使用有机溶剂,对环境污染较大^[12]。这些局限性促使研究人员致力于开发替代有机溶剂的绿色溶剂,如使用超临界二氧化碳和亚临界水。亚临界水是通过将温度提高到水的沸点以上、临界点(374 °C)以下,并调节系统压力使其保持液态来实现的^[13]。亚临界水的溶解性随温度的升高而提高,可作为非极性有机化合物的溶剂^[14]。亚临界水-反溶剂法主要是以亚临界水代替有机溶剂与反溶剂(通常是水)混合,利用两相极性和介电常数差异诱导溶质快速沉淀,从而实现纳米粒的可控制备^[15]。在反溶剂介质中,溶解性较差的成分会迅速脱溶,瞬间沉淀^[15-16]。SAYYAR 等^[17]将亚临界水与反溶剂沉淀法相结合,开发了一种制备姜黄素(疏水性成分)纳米粒的绿色方法。与传统的溶剂-反溶剂沉淀法相比,通过亚临界水-反溶剂法处理获得的纳米粒不含有机溶剂,提高了纳米药物生产的经济效益^[18]。因此,亚临界水-反溶剂工艺是一种低成本、环境友好的制备药物纳米粒的技术。

本文拟采用亚临界水-反溶剂法来制备葛根素纳米粒,考察影响其粒径的因素,探究其体内外性能。以期改善葛根素的理化性质,提高其水溶性和膜渗透性,从而提高其生物利用度。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

葛根素(质量分数 98%),陕西东禾福生物科技有限公司;甲醇(色谱纯)、NaCl、聚乙烯吡咯烷酮 K30(PVPK-30)、氮酮,AR,国药集团化学试剂有限公司;冰醋酸,色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;乳糖,AR,盛世天元生物科技有限公司;羟丙基甲基纤维素(HPMC),AR,山东光大科技发展有限公司;聚乙二醇 4000(PEG-4000)、十二烷基硫酸钠(SDS),AR,天津博迪化工股份有限公司;卡波姆 980,药用辅料,上海昌为辅料技术有限公司;丙三醇,AR,西陇科学股份有限公司;肝素钠,AR,天津市北联精细化学品开发有限公司;超纯水(电阻率 18.2 M Ω ·cm),自制。

UV-6000 型紫外-可见分光光度计(UV-Vis),上海元析仪器有限公司;KQ-100 型超声波清洗机,福洋超声仪器有限公司;Nicolet iS10 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;DSC 204 F1 Phoenix 型差示扫描量热仪(DSC),德国 Netzsch 公司;戴安 U3000 型高效液相色谱仪(HPLC),戴安中国有限公司;Zetasizer Nano ZS90 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(DLS),英国马尔文仪器有限公司;JSM-7500F 型场发射扫描电子显微镜(SEM),日本电子株式会社。

1.2 方法

1.2.1 葛根素纳米粒的制备

按照液料比(mL:g,下同)为 220:1,称取 1 g 葛根素加入 220 mL 超纯水,转移至实验室自制的加压提取器中,将压力设置为 0.5 MPa,升至设定温度 125 °C 开始计时,保温保压 20 min 后,打开取样口将釜中的溶液匀速加入含反溶剂(接收溶剂)(质量分数 0.08%乳糖超纯水溶液)的收集器中,最后以 500 r/min 转速搅拌 1 h,得到葛根素纳米粒混悬液(质量分数为 0.45%)。

1.2.2 凝胶的制备

在体积均为 100 mL 葛根素混悬液(将葛根素以液料比为 220:1 直接溶于超纯水中制得)和葛根素纳米粒混悬液中加入卡波姆 980(质量分数为 0.7%)和丙三醇(体积分数为 5%),制备了葛根素凝胶和葛根素纳米粒凝胶。

1.2.3 定量检测标准曲线的绘制

使用 UV-Vis 对葛根素进行定量检测,检测波长为 250 nm。以吸光度(A)为纵坐标 y ,葛根素质量浓度(ρ , mg/L)为横坐标 x ,得到线性回归方程为 $y=0.0764x-0.02$ ($R^2=0.9991$)。葛根素在质量浓度 3~10 mg/L 表现出良好的线性关系。

使用 HPLC 对葛根素进行定量检测。色谱柱 (Supersil ODS, 5 μm ×4.6 mm×250 mm) 的温度设定为 25 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相为甲醇和质量分数 0.2% 乙酸水溶液 (体积比 65 : 35), 流速为 1.0 mL/min。进样量为 25 μL , 检测波长为 250 nm。以峰面积 (A') 为纵坐标, 质量浓度 (ρ' , mg/L) 为横坐标, 得到线性回归方程为 $y=9.1071x-0.1393$ ($R^2=0.9988$)。葛根素在质量浓度为 0.1~80 mg/L 表现出良好的线性关系。

1.2.4 葛根素纳米粒得率的计算

移取葛根素纳米粒混悬液 1 mL 至 500 mL 容量瓶中, 甲醇定容, 用紫外-可见分光光度计进行吸光度检测, 将结果代入标准曲线方程 ($y=0.0764x-0.02$) 计算葛根素质量浓度, 根据式 (1) 计算葛根素纳米粒得率:

$$W/\% = \left(\frac{\rho \times V}{m} \right) \times 100 \quad (1)$$

式中: W 为葛根素纳米粒得率, %; ρ 为样品溶液中葛根素的质量浓度, mg/L; V 为制得葛根素纳米粒混悬液的总体积, mL; m 加入葛根素的质量, g。

1.3 结构表征与性能测试

1.3.1 粒径和多分散指数 (PDI) 的测定

使用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定纳米粒粒径和 PDI。测试前, 所有样品均用超纯水稀释 10 倍。测量温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 平衡时间 120 s, 平行测定 3 次, 结果取算术平均值。

1.3.2 SEM 测试

将葛根素纳米粒混悬液滴加到硅片上, 风干后黏贴到导电胶上, 照灯烘干。作为对照, 葛根素直接黏贴到导电胶上, 进行喷金, 用 SEM 观测形态。低位二次电子 (LEI) 模式, 工作电流 20 μA , 电子加速电压 5.0 kV。

1.3.3 DSC 测试

采用 DSC 分析葛根素和葛根素纳米粒的特性。氮气气氛, 流速 20 mL/min, 升温速率 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 温度范围 25~200 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.4 FTIR 测试

KBr 压片法, 波数范围 4000~400 cm^{-1} , 分辨率 2 cm^{-1} , 扫描次数 32 次。

1.4 因素实验

探讨装置中液料比、温度、时间、溶剂与反溶剂体积比、稳定剂类型及质量分数等因素对混悬液中葛根素纳米粒的影响。

按照 1.2.1 节的制备方法和步骤, 保持温度 (125 $^{\circ}\text{C}$) 和时间 (20 min) 不变, 在无反溶剂的条件下, 考察液料比 (160 : 1、180 : 1、200 : 1、220 : 1、240 : 1) 对葛根素纳米粒粒径的影响。

按照 1.2.1 节的制备方法和步骤, 保持液料比 (220 : 1) 和时间 (20 min) 不变, 在无反溶剂的条件下, 考察亚临界水温度 (120、125、130、135、140 $^{\circ}\text{C}$) 对葛根素纳米粒粒径的影响。

按照 1.2.1 节的制备方法和步骤, 保持液料比 (220 : 1) 和温度 (125 $^{\circ}\text{C}$) 不变, 在无反溶剂的条件下, 考察反应时间 (10、15、20、25、30、35 min) 对葛根素纳米粒粒径的影响。

按照 1.2.1 节的制备方法和步骤, 保持液料比 (220 : 1)、温度 (125 $^{\circ}\text{C}$) 和时间 (20 min) 不变, 考察溶剂与反溶剂体积比 (1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4、1 : 5) 对葛根素纳米粒粒径的影响。

按照 1.2.1 节的制备方法和步骤, 保持液料比 (220 : 1)、温度 (125 $^{\circ}\text{C}$) 和时间 (20 min)、稳定剂质量分数 (0.2%) 不变, 考察反溶剂中稳定剂类型 (乳糖、HPMC、PVPK-30、PEG-4000、SDS) 对葛根素纳米粒粒径的影响。

按照 1.2.1 节的制备方法和步骤, 保持液料比 (220 : 1)、温度 (125 $^{\circ}\text{C}$) 和时间 (20 min) 不变, 考察反溶剂中稳定剂质量分数 (0.04%、0.08%、0.20%、0.40%) 对葛根素纳米粒粒径的影响。

1.5 体内外性能评价

1.5.1 体外释放实验

采用透析袋法^[19]测定药物的体外释放行为, 各取葛根素纳米粒凝胶和葛根素凝胶 4 mL (相当于葛根素 11.12 mg), 将两者分别装入经过预处理的透析袋内, 浸泡在 100 mL 生理盐水溶液中, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下以 150 r/min 进行搅拌, 于 0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、24、36、48 h 从每个样品池中取 3 mL 样品, 再加入 3 mL 的生理盐水透析液, 样品过 0.45 μm 滤膜, 经甲醇稀释, 再经 UV-Vis 检测, 计算各个时刻葛根素的质量浓度。最终, 计算累积释放率, 构建释药曲线, 同时进行模型 (零级释放模型、一级释放模型、Higuchi 模型) 拟合, 通过决定系数 (R^2) 大小确定最佳的释放模型。

1.5.2 体外透皮实验

以鼠皮为半透膜, 采用 Franz 扩散池法^[20]考察葛根素纳米粒透皮吸收性能。取葛根素凝胶和葛根素纳米粒凝胶各 3 mL (相当于葛根素 8.34 mg), 加入氮酮作促渗剂。加入到供给池, 真皮层朝向接收液并与其相接, 于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h 取样 1 mL, 再加入 1 mL 接收液, 根据式 (2) 计算单位面积累积渗透量 (J , $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), 以 J 为纵坐标、时间 (t , h) 为横坐标, 构建药物累积渗透曲线, 拟合线性回归方程:

$$J = \frac{V \times \rho_n + V_0 \sum \rho_i}{S} \quad (2)$$

式中: V 为接收池体积, mL; V_0 为取样体积, mL; S 为有效经皮吸收面积, cm^2 ; ρ_n 为第 n 个取样点测得的接收液中的药物质量浓度, mg/L; ρ_i 为第 $n-1$ 个取样点测得的接收液中的药物质量浓度, mg/L。

1.5.3 体内药代动力学

选健康雄兔 (1.0~1.5 kg) 9 只 (青岛大任富城畜牧有限公司) 用于体内实验, 实验前禁食 12 h, 禁水 6 h。所有的实验步骤遵循《实验动物护理和使用指南: 第八版》, ISBN-10: 0-309-15396-4, 由青岛科技大学动物伦理委员会批准。研究随机分为 3 组, 每组 3 只: A 组通过透皮途径接收葛根素纳米粒凝胶; B 组通过注射途径接收葛根素原料药; C 组通过口服途径接收葛根素原料药。在用药后 0.5、1、2、4、6、8、10、12 和 24 h 从心脏采集 2 mL 血液样本, 并将其置于涂有硫酸肝素钠 (质量分数为 1%) 的离心管中。血液样本以 12000 r/min 的转速在 4 °C 低温环境下离心 15 min, 然后保存在 -20 °C 下。使用 HPLC 对血浆中的葛根素质量浓度进行定量 (同 1.2.3 节)。

以血液中药物的质量浓度为纵坐标、时间为横坐标构建药时曲线, 通过 DAS 2.0 软件对数据进行分析处理。

1.6 数据处理

使用 SPSS 软件进行统计学分析, 使用 t 检验来评估不同组之间的显著性, $P < 0.05$ 表示差异显著, 实验数据以“算术平均值 $\pm$ 标准差”形式体现, 结果讨论时, 以算术平均值表示。

2 结果与讨论

2.1 因素实验结果

2.1.1 液料比的影响

液料比是影响葛根素纳米粒粒径和分散性的关键参数。图 1 为液料比对葛根素纳米粒粒径的影响。

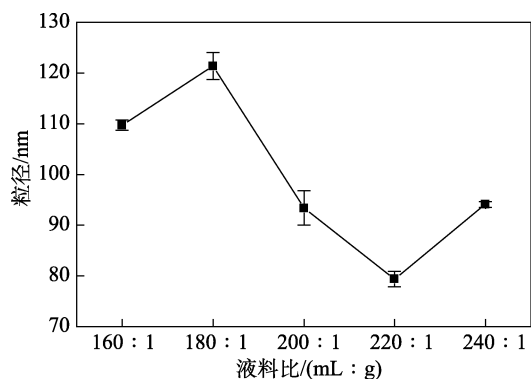


图 1 液料比对葛根素纳米粒粒径的影响

Fig. 1 Effect of liquid-to-material ratio on particle size of puerarin nanoparticles

从图 1 可以看出, 当液料比从 180:1 增加到 220:1 时, 葛根素纳米粒的粒径持续减小。当液料

比为 220:1 时, 葛根素纳米粒的粒径最小, 为 79.40 nm。这是因为, 较低的葛根素含量可有效减小颗粒尺寸并缩小尺寸分布范围, 而较高的含量则会导致较高的颗粒生长率和颗粒间的聚集。然而, 当液料比提高至 240:1 时, 葛根素含量降低, 导致形成的晶核数量减少, 从而减少了晶核之间的碰撞机率, 溶质更有可能附着在已经形成的晶核上, 从而加速药物晶体的生长, 并增大葛根素纳米粒的粒径 (94.07 nm)。因此, 选择 220:1 作为使用亚临界水制备葛根素纳米粒的最佳液料比。

2.1.2 亚临界水温度的影响

亚临界水温度主要影响颗粒的形成过程, 其对药物溶解度、成核和过饱和度都有影响。图 2 为亚临界水温度对葛根素纳米粒粒径的影响。

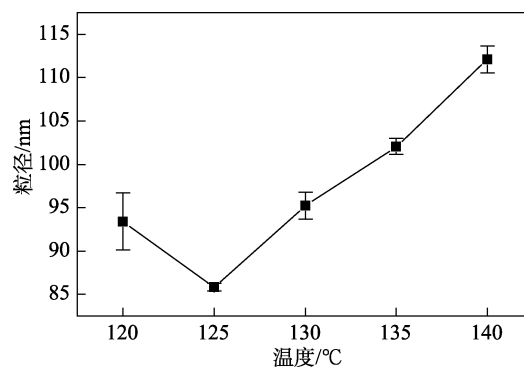


图 2 亚临界水温度对葛根素纳米粒粒径的影响

Fig. 2 Effect of subcritical water temperature on particle size of puerarin nanoparticles

从图 2 可以看出, 随着亚临界水温度的上升, 葛根素纳米粒粒径先减小后增大, 温度为 125 °C 时, 葛根素纳米粒平均粒径最小, 为 85.83 nm。这是因为, 温度变化对粒径有双重反作用, 一方面, 随亚临界水温度的提高, 葛根素的溶解性也随之提升, 导致溶液的过饱和程度提高, 根据成核理论, 溶解度的升高导致溶质的高过饱和度和低临界能垒, 从而导致成核速率的提高, 同时随着温度的升高, 颗粒扩散也会增加, 从而导致颗粒粒径减小; 另一方面, 较高的温度会导致较高的颗粒生长率和颗粒间的聚集, 加速凝聚并促进较大颗粒的产生。因此, 选择 125 °C 作为使用亚临界水制备葛根素纳米粒的最佳温度。

2.1.3 提取时间的影响

图 3 为提取时间对葛根素纳米粒粒径的影响。

从图 3 可以看出, 当提取时间 ≤ 20 min, 随着时间的延长, 葛根素纳米粒粒径从提取时间 10 min 的 115.60 nm 逐渐减小到 93.03 nm, 继续延长提取时间, 葛根素纳米粒粒径又逐渐增大。这是因为, 较短的提取时间会导致葛根素溶解不完全, 引起粒径变大; 随着提取时间的增加, 葛根素完全溶解, 达

到过饱和度, 晶体成核速率加快, 析出纳米粒; 而随着提取时间的进一步增加, 沉淀晶体颗粒之间的碰撞和聚集加速, 导致葛根素纳米粒粒径又增大。因此, 选择 20 min 作为使用亚临界水制备葛根素纳米粒的最佳提取时间。

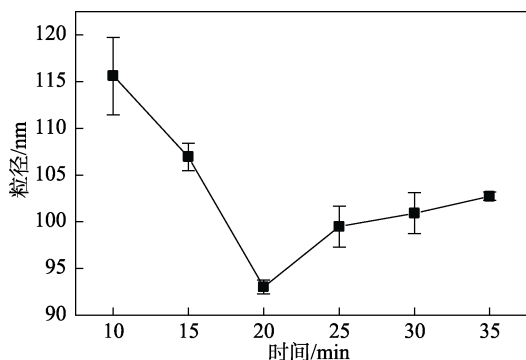


图 3 提取时间对葛根素纳米粒粒径的影响

Fig. 3 Effect of extraction time on particle size of puerarin nanoparticles

2.1.4 溶剂与反溶剂体积比的影响

表 1 为溶剂与反溶剂体积比对葛根素纳米粒粒径和 PDI 的影响。

表 1 溶剂与反溶剂体积比对葛根素纳米粒粒径和 PDI 的影响

Table 1 Effect of solvent-to-anti-solvent volume ratio on nanoparticles size and PDI of puerarin nanoparticles

$V(\text{溶剂}) : V(\text{反溶剂})$	粒径/nm	PDI
1 : 1	98.70±1.68	0.363
1 : 2	99.80±3.13	0.612
1 : 3	89.50±1.50	0.824
1 : 4	70.40±2.62	1.000
1 : 5	159.70±2.35	0.540

从表 1 可以看出, 当 $V(\text{溶剂}) : V(\text{反溶剂})$ 由 1 : 1 降至 1 : 3, 葛根素纳米粒粒径由 98.70 nm 变为 89.50 nm, 增加反溶剂的比例会导致粒径减小^[21-22]。这是因为, 接收溶剂少导致不能迅速稀释瞬间形成的大量晶核, 引发晶核之间的碰撞, 进而团聚成大颗粒。但当 $V(\text{溶剂}) : V(\text{反溶剂})$ 从 1 : 3 降至 1 : 5, 葛根素纳米粒粒径先变小后增大, 当 $V(\text{溶剂}) : V(\text{反溶剂}) = 1 : 4$ 时, 葛根素纳米粒粒径为 70.4 nm。这可能是因为, 溶剂与反溶剂极易混合不均匀, 影响了药物的成核速率, 当 $V(\text{溶剂}) : V(\text{反溶剂}) = 1 : 4$ 时, 溶质过饱和度急剧升高, 引发爆发式成核, 生成大量小尺寸晶核, 而由于反溶剂过量导致溶剂扩散速率过快, 新生成的晶核无法稳定生长, 反而通过奥斯特瓦尔德熟化溶解重组, 最终形成亚稳态的小颗粒; 当 $V(\text{溶剂}) : V(\text{反溶剂}) = 1 : 5$ 时, 溶剂体系

的介电常数/极性显著改变, 溶质溶解度进一步降低, 但此时由于溶质含量被过度稀释, 过饱和度反而下降, 导致成核速率骤降, 少量晶核通过定向聚集或二次生长形成大颗粒, 且粒径分布广泛 ($\text{PDI} = 0.540$), 与不加反溶剂相比并没有优势。综合粒径分布及粒径大小, 选择 $V(\text{溶剂}) : V(\text{反溶剂}) = 1 : 1$ 。

2.1.5 稳定剂的影响

为了使纳米混悬液保持稳定, 常在接收溶剂中加入适量稳定剂, 稳定剂可以降低体系的自由能和颗粒的界面张力, 其稳定机制包括静电稳定和空间稳定, 能够为纳米混悬液中的纳米粒子之间提供空间或电荷排斥所需要的稳定作用。合适的稳定剂和加入量能稳定纳米混悬液中的纳米粒, 防止纳米粒聚集和沉淀。表 2 为质量分数 0.2% 的稳定剂对葛根素纳米粒粒径和 PDI 的影响。

表 2 稳定剂对葛根素纳米粒粒径和 PDI 的影响

Table 2 Effect of stabilizer on particle size and PDI of puerarin nanoparticles

稳定剂	粒径/nm	PDI
无稳定剂	94.60±1.45	0.384
乳糖	140.40±1.93	0.458
HPMC	277.30±3.58	0.641
PVPK-30	19.73±2.70	0.597
PEG-4000	132.40±4.16	0.580
SDS	205.90±2.38	0.652

从表 2 并结合实验情况, 以 PVPK-30 为稳定剂时, 体系呈稀胶体溶液状, 已严重影响葛根素纳米粒混悬液状态, 由于纳米粒粒径过大, 不能通过 0.45 μm 膜, 过膜后测得粒径 (19.73 nm) 严重失真; 以 HPMC 为稳定剂的混悬液中的颗粒粒径则增大到 277.30 nm。因此, 初步选择乳糖、PEG-4000、SDS 为稳定剂。

表 3 为乳糖、PEG-4000、SDS 3 种稳定剂的质量分数对葛根素纳米粒粒径和 PDI 的影响。

从表 3 可以看出, 在混悬液添加质量分数 0.08% 的乳糖后, 葛根素纳米粒的粒径减至 83.80 nm, 且粒径分布较窄 ($\text{PDI} = 0.819$)。这是因为, 乳糖分子吸附在颗粒表面, 降低了颗粒的表面能, 从而有效阻止了葛根素纳米粒的生长和聚集。但当反溶剂中的乳糖质量分数过高 (0.20%、0.40%) 时, 颗粒之间的黏附力增加也会导致纳米粒聚集。此外, 经实际测试, 乳糖还表现出最佳的长期稳定效果, 在室温下储存 7 d 后, 使用质量分数 0.08% 乳糖稳定的混悬液获得的葛根素纳米粒粒径为 100.90 nm。

表 3 稳定剂的质量分数对葛根素纳米粒粒径和 PDI 的影响

Table 3 Effect of mass fraction of stabilizer on particle size and PDI of puerarin nanoparticles

稳定剂	稳定剂质量分数/%	粒径/nm	PDI
乳糖	0.04	96.20±1.67	0.702
	0.08	83.80±2.30	0.819
	0.20	141.60±2.42	0.554
	0.40	124.10±3.73	0.761
PEG-4000	0.04	100.40±2.08	0.769
	0.08	127.70±3.21	0.319
	0.20	142.20±4.49	0.532
	0.40	134.40±3.16	0.391
SDS	0.04	187.20±1.15	0.499
	0.08	179.80±2.54	0.419
	0.20	270.90±3.19	0.630
	0.40	141.60±2.27	0.408

2.1.6 验证实验

按照制备葛根素纳米粒最佳条件, 即液料比 220 : 1、亚临界水温度 125 ℃、提取时间 20 min、溶剂与反溶剂体积比为 1 : 1、稳定剂为质量分数 0.08% 的乳糖, 进行 3 次平行实验, 结果如表 4 所示。

表 4 实验验证
Table 4 Experimental verification

序号	得率/%	平均得率/%	粒径/nm	平均粒径/nm	预测值/nm	标准差/%
1	91.39	94.01±2.68	85.51	89.94±3.83	78.675	4.26
2	96.75		92.20			
3	93.87		92.10			

从表 4 可以看出, 葛根素纳米粒的平均得率为 94.01%, 平均粒径为 89.94 nm, 与预测值 78.675 nm 相差不大, 标准差为 4.26%。

2.2 葛根素纳米粒的表征

2.2.1 SEM 分析

图 4 为葛根素和葛根素纳米粒的 SEM 图。

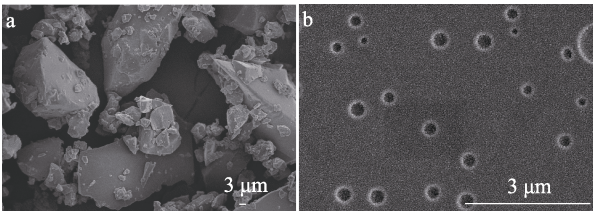


图 4 葛根素 (a) 和葛根素纳米粒 (b) 的 SEM 图
Fig. 4 SEM images of puerarin (a) and puerarin nanoparticles (b)

从图 4 可以看到, 葛根素具有不规则的块状结构, 颗粒大小为微米级, 尺寸分布较广 (图 4a)。

而葛根素纳米粒呈球形, 大小分布均匀 (图 4b)。减小颗粒尺寸可增加表面吉布斯自由能, 从而提高药物颗粒的溶解速率, 改善通过生物膜的药物输送。

2.2.2 DSC 分析

图 5 为葛根素和葛根素纳米粒的 DSC 曲线。

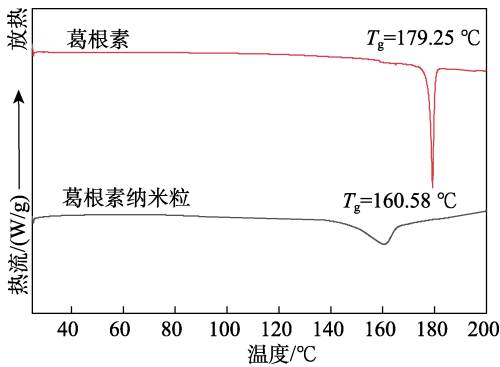


图 5 葛根素和葛根素纳米粒的 DSC 曲线
Fig. 5 DSC curves of puerarin and puerarin nanoparticles

从图 5 可以看出, 葛根素在玻璃化转变温度 (T_g) 179.25 ℃有显著的熔点峰, 尖锐且强, 表明其以稳定的晶体形式存在; 葛根素纳米粒的 T_g 为 160.58 ℃, 相比于葛根素有所降低。这是因为, 熔点与微观结构中物质间的作用力大小有关, 熔点降低说明纳米粒的微观结构发生了改变, 主要是超分子组装层面的变化, 熔点降低符合 Thomson-Gibbs 方程^[23], 意味着纳米粒粒径减小导致表面原子比例升高, 晶体完整性下降。相比于葛根素, 葛根素纳米粒的熔点峰峰强显著降低、熔距增长, 表明葛根素纳米粒的结晶度下降。这是因为, 葛根素部分区域从完整晶态向亚稳态或无定形态转变, 可能形成表面非晶层包裹的核-壳结构。药物的物理状态转变为无定形态会导致能量状态升高和无序度增加, 从而提高其溶出率^[24]。

2.2.3 FTIR 分析

图 6 为葛根素和葛根素纳米粒的 FTIR 谱图。

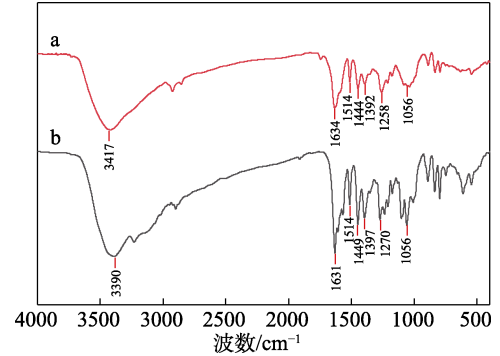


图 6 葛根素 (a) 和葛根素纳米粒 (b) 的 FTIR 谱图
Fig. 6 FTIR spectra of puerarin (a) and puerarin nanoparticles (b)

从图 6 可以看出, 3400 cm^{-1} 处为 —OH 的伸缩振动吸收峰; 1630 cm^{-1} 处为 C=O 键的伸缩振吸收峰; $1560\sim 1350\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为芳环骨架的伸缩振动; $1280\sim 1050\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰为 C—O—C 键的伸缩振动, 符合葛根素结构。葛根素和葛根素纳米粒在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰的形状和位置相同, 表明葛根素和葛根素纳米粒的官能团结构没有差异。说明在用亚临界水处理前后, 葛根素的分子结构没有发生变化。

2.3 葛根素的体内外性能分析

2.3.1 体外释放性能

图 7 为葛根素凝胶和葛根素纳米粒凝胶的体外释放曲线。表 5 为模型 (零级释放模型、一级释放模型、Higuchi 模型) 拟合方程结果。

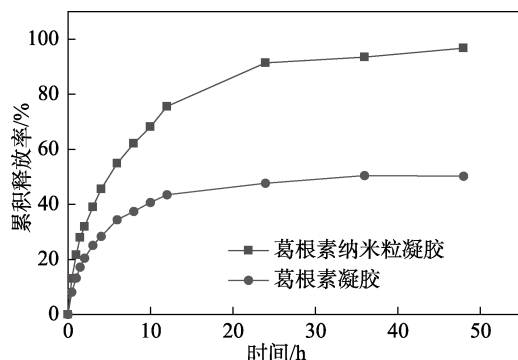


图 7 葛根素凝胶和葛根素纳米粒凝胶的体外释药曲线
Fig. 7 *In vitro* drug release curves of puerarin and puerarin nanoparticles gels

从图 7 可以看出, 在 $0.5\sim 48\text{ h}$ 内, 葛根素纳米粒凝胶的累积释放率始终超过葛根素凝胶。12 h 后, 纳米粒凝胶的累积释放率达到 90.0%, 而葛根素凝胶的累积释放率仅为 40.0%。48 h 后, 葛根素纳米粒凝胶的累积释放率继续升至 96.7%, 而葛根素凝胶的累积释放率约为 50%。

表 5 体外释放模型拟合
Table 5 *In vitro* release model fitting

组别	释放模型	拟合方程	R^2
葛根素纳米粒凝胶	零级	$Q=1.7789t+31.6955$	0.7116
	一级	$Q=92.1265(1-e^{-0.1644t})$	0.9748
	Higuchi	$Q=14.5881t^{1/2}+12.1200$	0.9163
葛根素凝胶	零级	$Q=0.8642t+20.1463$	0.6099
	一级	$Q=47.8081(1-e^{-0.2359t})$	0.9799
	Higuchi	$Q=7.3646t^{1/2}+9.8871$	0.8481

注: Q 为累积释放量, %; t 为释放时间, h 或 min。

从表 5 可以看出, 葛根素凝胶和葛根素纳米粒凝胶的释放过程均符合一级释放模型, 方程为 $Q=47.8081(1-e^{-0.2359t})$, $R^2=0.9799$ 和 $Q=92.1265(1-e^{-0.1644t})$, $R^2=0.9748$, 即药物释放速率取决于药物含量。采用亚临界水-反溶剂法对葛根素进行纳米化可以减小粒

径, 提高葛根素在水中的溶解速率。相比之下, 葛根素的水溶性差, 药物溶解率低, 导致释放率较低。

2.3.2 体外透皮分析

图 8 为葛根素凝胶和葛根素纳米粒凝胶的体外透皮曲线。

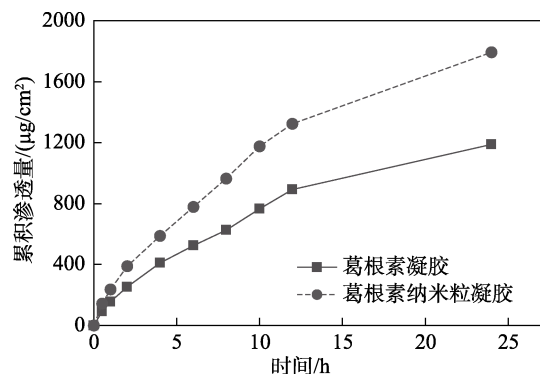


图 8 葛根素凝胶和葛根素纳米粒凝胶的体外透皮曲线
Fig. 8 *In vitro* transdermal absorption curves puerarin and puerarin nanoparticles gels

从图 8 可以看出, 在 $0.5\sim 24\text{ h}$ 内, 葛根素纳米粒凝胶的累积渗透量均高于葛根素凝胶。12 h 时, 葛根素纳米粒凝胶的累积渗透量为 $1323.64\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 而葛根素凝胶的累积渗透量为 $894.22\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。在 24 h 内, 葛根素纳米粒凝胶的累积渗透量是葛根素凝胶的 1.8 倍。王丹等^[25]以月桂氮酮为促渗剂、卡波姆 980 为凝胶基质制备葛根素经皮给药系统, 发现葛根素凝胶在改良 Franz 扩散池中 32 h 对离体鼠皮的累积渗透量为 $335.18\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 远小于本文葛根素纳米粒凝胶的累积渗透量。表明纳米化对药物透过生物膜屏障有利, 改善了葛根素生物利用度。

2.3.3 体内药代动力学

图 9 为葛根素注射剂和葛根素纳米粒凝胶药时曲线, 表 6 为其药代动力学参数。葛根素属于生物制药分类系统 (BCS) 的第四类, 在水中的溶解性和渗透性较差。

结果表明, 葛根素纳米粒凝胶的药动力学过程与双室模型相符, 而葛根素注射剂的药动力学过程则与三室模型相符, 两者的血液中药物的质量浓度达峰时间 ($T_{\max}$) 分别为 0.083 和 8.000 h, 后者是前者的 96 倍。葛根素纳米粒凝胶缓慢、平稳地释放药物大大延长了葛根素在体内的作用时间。葛根素注射剂的分布半衰期 ($t_{1/2\alpha}$) 和消除半衰期 ($t_{1/2\beta}$) 均为 0.165 h; 而葛根素纳米粒凝胶的药代动力学曲线显示, 血液中药物的质量浓度的变化更为渐进, $t_{1/2\alpha}$ 为 2.463 h, $t_{1/2\beta}$ 为 4.023 h, 分别是葛根素注射剂的 15 倍和 24 倍。表明药物纳米化可以改变葛根素的特性, 克服其消除快、半衰期短的问题。葛根素注射剂的药代动力学曲线显示出很高的药峰质量浓度

($\rho_{\max}$ =95.829 mg/L)。然而, 以往有研究发现^[27], 过量摄入葛根素可导致溶血, 症状的发生和严重程度取决于摄入的剂量和持续时间。

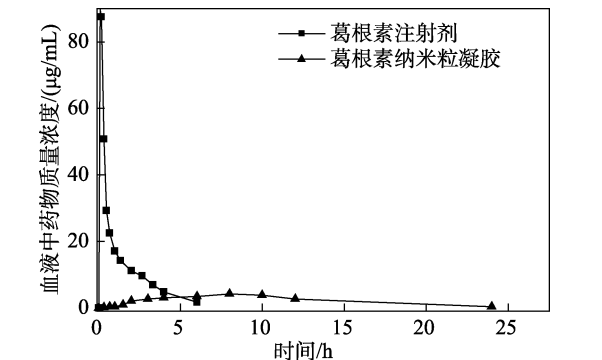


图 9 葛根素注射剂和葛根素纳米颗粒凝胶剂药时曲线
Fig. 9 Dosage curves of puerarin injection and puerarin nanoparticles gel

表 6 葛根素注射剂和葛根素纳米颗粒凝胶的药代动力学参数

参数	单位	葛根素注射剂	葛根素纳米颗粒凝胶剂
$t_{1/2\alpha}$	h	0.165±0.031	2.463±0.108
$t_{1/2\beta}$	h	0.165±0.031	4.023±0.288
$t_{1/2\gamma}$	h	1.979±0.560	—
$T_{\max}$	h	0.083±0	8.000±0
$\rho_{\max}$	mg/L	95.829±2.843	4.253±0.171**
$AUC_{(0-t)}$	mg·h/L	85.493±1.285	53.333±2.159**
$AUC_{(0-\infty)}$	mg·h/L	99.379±2.781	56.482±2.452**
$MRT_{(0-t)}$	h	1.326	9.282**
$MRT_{(0-\infty)}$	h	1.564	10.254**

注: “*”表示数据差异显著 ($P<0.05$); “**”表示数据差异非常显著 ($P<0.01$); “—”代表无; $AUC_{(0-t)}$ 代表给药时间 t 时药时曲线下面积; $AUC_{(0-\infty)}$ 代表药时曲线下面积; $MRT_{(0-t)}$ 为给药时间 t 时平均滞留时间; $MRT_{(0-\infty)}$ 为平均滞留时间。

因此, 通过透皮途径给药的葛根素的血浆含量仍然很低, 无法测量。因为葛根素口服给药的达峰时间 ($T_{\max}$) 大概在 0.5 h^[26], 而该剂量条件下口服给药 0.5、1.0 h 后的血浆样品在该液相条件下出峰时间 9.4 min 附近无响应 (图 10), 因此, 不再对口服给药进行测试。

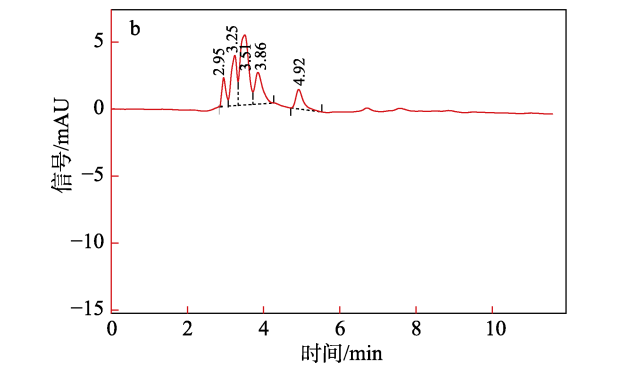
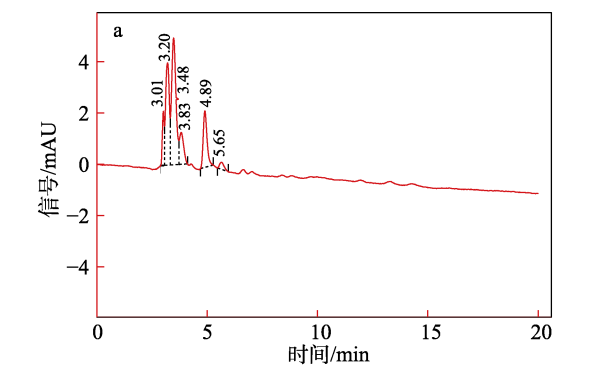
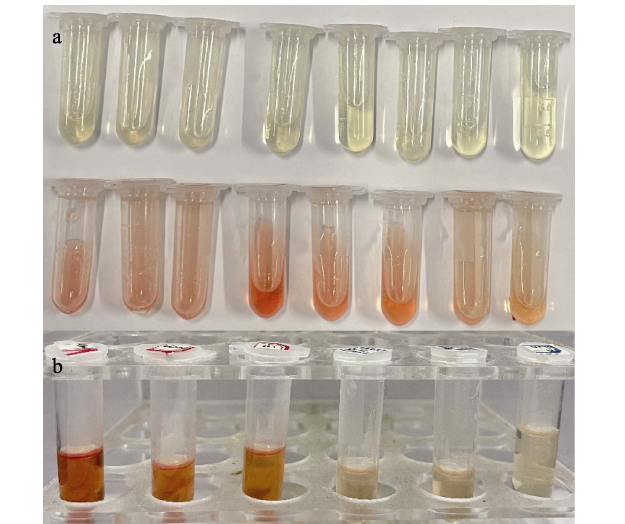


图 10 口服给药 0.5 h (a) 和 1 h (b) HPLC 谱图
Fig. 10 HPLC chromatograms of oral administration 0.5 h (a) and 1.0 h (b)

图 11 为葛根素注射剂与葛根素纳米颗粒凝胶剂给药后血浆样品的照片。



a 的上行为葛根素纳米颗粒凝胶剂, 下行葛根素注射剂; b 的左三为葛根素注射剂, 右三为葛根素纳米颗粒凝胶剂

图 11 葛根素注射剂与葛根素纳米颗粒凝胶剂给药后血浆样品的照片

Fig. 11 Photos of plasma samples after puerarin injection and puerarin nanoparticle gel administration

从图 11 可以看出, 这种不良反应与葛根素注射剂引起溶血的临床报告一致。经皮给药葛根素纳米粒的 $\rho_{\max}$ 为 4.253 mg/L, 明显低于原料药注射剂的 (95.829 mg/L)。但两者的 $AUC_{(0-\infty)}$ 差异不显著, 葛根素原料药注射剂的 $AUC_{(0-\infty)}$ 为 99.379 mg·h/L, 仅为葛根素纳米粒 (56.482 mg·h/L) 的 1.76 倍。葛根素注射剂的 $MRT_{(0-\infty)}$ 为 1.564 h, 明显小于葛根素纳米颗粒凝胶剂 (10.254 h), 说明纳米颗粒凝胶剂能使药物在体内停留更长时间, 有助于实现药物的缓释效果。家兔的药动力学参数结果整体表明, 纳米化极大地促进了葛根素的透皮吸收, 有利于其透皮应用。

3 结论

利用亚临界水-反溶剂法成功制备了均匀的葛

根素纳米粒。考察了影响粒径的因素,探究其体内外性能。

(1) 葛根素纳米粒制备的最佳条件为:液料比 220:1、亚临界水温度 125℃、提取时间 20 min、溶剂与反溶剂体积比为 1:1、稳定剂为质量分数 0.08% 的乳糖,此工艺条件下制得的葛根素纳米粒平均粒径为 89.94 nm,平均得率为 94.01%。

(2) 葛根素纳米粒凝胶的 12 h 累积释放率为 90.0%, 48 h 累积释放率升至 96.7%;葛根素纳米粒凝胶的释放过程均符合一级释放模型,方程为 $Q=92.1265(1-e^{-0.1644t})$, $R^2=0.9748$;葛根素纳米粒的凝胶的 12 h 累积渗透量为 1323.64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。

本文制备的葛根素纳米粒具有良好的透皮吸收特性,其生物利用度优于葛根素。亚临界水-反溶剂法为制备葛根素纳米粒提供了一种高效可行的方法。

参考文献:

- [1] SINGH H, KRIPLANI P, GUARVE K K. Puerarin: An anticancer and anti-inflammatory agent[J]. Recent Patents on Anti-cancer Drug Discovery, 2024, 19(1): 18-36.
- [2] ZHANG L. Pharmacokinetics and drug delivery systems for puerarin, a bioactive flavone from traditional Chinese medicine[J]. Drug Delivery, 2019, 26(1): 860-869.
- [3] WANG D, BU T, LI Y Q, *et al.* Pharmacological activity, pharmacokinetics, and clinical research progress of puerarin[J]. Antioxidants, 2022, 11(11): 2121.
- [4] PETROVIC S, BITA B, BARBINTA-PATRASCU M E. Nanoformulations in pharmaceutical and biomedical applications: Green perspectives[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(11): 5842.
- [5] MORADI S Z, MOMTAZ S, BAYRAMI Z, *et al.* Nanoformulations of herbal extracts in treatment of neurodegenerative disorders[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 238.
- [6] ARORA D, KHURANA B, RATH G, *et al.* Recent advances in nanosuspension technology for drug delivery[J]. Current Pharmaceutical Design, 2018, 24(21): 2403-2415.
- [7] FU X X, CAI J X, ZHANG X, *et al.* Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2018, 132: 169-187.
- [8] DU J, LI X G, ZHAO H X, *et al.* Nanosuspensions of poorly water-soluble drugs prepared by bottom-up technologies[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 495(2): 738-749.
- [9] VERMA V, RYAN K M, PADRELA L. Production and isolation of pharmaceutical drug nanoparticles[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2021, 603: 120708.
- [10] INDIARTO R, INDRIANA L P A, ANDOYO R, *et al.* Bottom-up nanoparticle synthesis: A review of techniques, polyphenol-based core materials, and their properties[J]. European Food Research and Technology, 2022, 248(1): 1-24.
- [11] SINHA B, MÜLLER R H, MÖSCHWITZER J P. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: Formulations and factors affecting particle size[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2013, 453(1): 126-141.
- [12] ZHANG J, LIU M Z, ZENG Z H. The antisolvent coprecipitation method for enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, 626: 122043.
- [13] NIU Z H (牛振怀), HOU W S (侯文生), SHI S (史晟), *et al.* Study on the subcritical water hydrolysis of waste polyethylene terephthalate[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2015, 32(2): 126-132.
- [14] MOHAMMADI H S, ASL A H, KHAJENOORI M. Production of pharmaceutical micro and nano particles by subcritical water based technologies: A review[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2023, 85: 104621.
- [15] CHEN X Y, SHANG Y L, LI Y H, *et al.* Green preparation of uniform prednisolone nanoparticles using subcritical water[J]. Chemical Engineering Journal, 2015, 263: 20-26.
- [16] PU Y, WANG J X, WANG D, *et al.* Subcritical water processing for nanopharmaceuticals[J]. Chemical Engineering and Processing-Process Intensification, 2019, 140: 36-42.
- [17] SAYYAR Z, JAFARIZADEH-MALMIRI H. Effectiveness of temperature and preparation method on stability kinetic of curcumin nanodispersion: Cytotoxicity and *in vitro* release assessment[J]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2023, 80: 104190.
- [18] ALJVANIEH M G, GEÇGEL C, YABALAK E. Hydrochar synthesis from waste corn cob using subcritical water and microwave-assisted carbonization methods and ammonium enrichment of synthesized hydrochars[J]. Environmental Research, 2023, 226: 115715.
- [19] LYU Z Y (吕志阳), CHEN J (陈静), CHEN J (陈璟), *et al.* Study on preparation technology and *in vitro* release of puerarin total flavonoids self-microemulsion[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (时珍国医医药), 2022, 33(11): 2658-2661.
- [20] XIE G J (谢桂杰), LIANG R (梁蓉), YANG C (杨成). Effect of solid lipids on transdermal delivery of coenzyme Q10 nanocapsules[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2020, 37(6): 1242-1248.
- [21] PU Y, LI Y H, WANG D, *et al.* A green route to beclomethasone dipropionate nanoparticles *via* solvent anti-solvent precipitation by using subcritical water as the solvent[J]. Powder Technology, 2017, 308: 200-205.
- [22] PU Y, WEN X F, LI Y H, *et al.* Ultrafine clarithromycin nanoparticles *via* anti-solvent precipitation in subcritical water: Effect of operating parameters[J]. Powder Technology, 2017, 305: 125-131.
- [23] PAWLOW P. Über die Abhängigkeit des Schmelzpunktes Von der Oberflächenenergie eines festen Körpers[J]. Zeitschrift für Physikalische Chemie, 1909, 65U(1): 1-35.
- [24] ZHANG H X, WANG J X, ZHANG Z B, *et al.* Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 374(1): 106-113.
- [25] WANG D (王丹), SHI L F (石力夫), HU J H (胡晋红), *et al.* Skin penetration test for a puerarin transdermal drug delivery system *in vitro*[J]. Pharmaceutical Care and Research (药学服务与研究), 2009, 9(2): 104-106.
- [26] LI J M (李津明), YE J (野津), YU S S (于姗姗), *et al.* Studies on preparation and pharmacokinetics of puerarin solid dispersions *in vivo*[J]. Chinese Journal of New Drugs and Clinical (中国新药与临床杂志), 2011, 30(4): 294-297.
- [27] HOU S Z, SU Z R, CHEN S X, *et al.* Role of the interaction between puerarin and the erythrocyte membrane in puerarin-induced hemolysis [J]. Chemico-Biological Interactions, 2011, 192(3): 184-192.