

不同粒径聚乙二醇化维生素K₁脂质体的制备及体内外评价

储晓婷¹, 周梅¹, 汪康¹, 丁帅¹, 吴宗好², 聂久胜¹, 桂双英^{1, 3, 4, 5*}, 李真宝^{1, 3, 4, 5*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

2. 合肥华方医药科技有限公司, 安徽 合肥 230088

3. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽 合肥 230012

4. 现代药物制剂安徽省工程技术研究中心, 安徽 合肥 230012

5. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012

摘要: 目的 制备不同粒径聚乙二醇化维生素K₁ (VK₁) 脂质体, 并对其进行制剂学表征, 考察体内药动学和促凝药效。方法 采用薄膜分散法制备不同粒径的VK₁脂质体, 采用马尔文粒径仪测定粒径、聚合物分散性指数(PDI)、Zeta电位; 透射电子显微镜观察形态; 以粒径为指标, 考察脂质体在4℃下储存1个月、在磷酸缓冲液(PBS, pH 6.8)及pH 1.2水溶液中48 h的稳定性; 采用超速离心法测定包封率与载药量; 采用大鼠在体肠吸收模型考察肠吸收特性; ig给药考察脂质体在大鼠体内药动学行为; 以华法林钠诱导大鼠低凝血酶原血症, 采用ELISA试剂盒检测血浆中凝血因子II、V、VII和IX含量, 检测凝血酶原时间(PT), 评价不同粒径VK₁脂质体(2 mg·kg⁻¹)促凝效果。结果 制备了3种VK₁脂质体(Lip-180、Lip-120、Lip-60), 粒径分别为(182.40±2.17) nm、(114.38±0.60) nm和(68.42±0.73) nm, PDI分别为0.21±0.01、0.12±0.00和0.17±0.01, 电位分别为(-27.67±1.58)、(-22.93±1.81)、(-26.63±1.37) mV, 脂质体均呈球形, 分布均匀, 包封率均>90%, 载药量均>2.90%, 稳定性良好。与Lip-180相比, Lip-120和Lip-60表现出更缓慢的释放性能和更好的跨膜吸收速率。Lip-120及Lip-60的药时曲线下面积(AUC_{0-∞})分别是Lip-180的1.52和1.80倍, 并且Lip-120与Lip-60的AUC_{0-∞}分别是维生素K₁注射剂(市售对照)的1.24与1.46倍。与低凝血酶原血症模型大鼠比较, 经ig给药Lip-180、Lip-120、Lip-60及维生素K₁注射剂后, PT显著降低(P<0.001), 凝血因子II、VII、IX、X水平均升高, 其中, Lip-60作用最显著, 除给药后6 h的凝血因子X外, 均差异显著(P<0.05、0.01、0.001)。结论 聚乙二醇化VK₁脂质体分布均匀, 稳定性高, 释放缓慢, 口服生物利用度高, 体内促凝效果较好, 优选粒径最小的Lip-60。

关键词: 维生素K₁; 聚乙二醇化; 脂质体; 粒径; 口服生物利用度; 促凝血

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2022)07-1323-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.013

Preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation of PEGylated vitamin K₁ liposomes with different particle sizes

CHU Xiaoting¹, ZHOU Mei¹, WANG Kang¹, DING Shuai¹, WU Zonghao², NIE Jiusheng¹, GUI Shuangying^{1,3,4,5}, LI Zhenbao^{1,3,4,5}

1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, 230012, China

2. Hefei Huafang Pharmaceutical Science & Technology Co., Ltd., Hefei, 230088, China

3. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei, 230012, China

4. Engineering Technology Research Center of Modernized Pharmaceutics, Anhui Education Department(AUCM), Hefei, 230012, China

5. Anhui Province Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application, Hefei, 230012, China

Abstract: Objective To formulate and characterize the PEGylated Vitamin K₁ (VK₁) liposomes with different particle sizes, and investigate the corresponding pharmacokinetics and coagulation-promoting activity. **Methods** VK₁ liposomes with different particle

收稿日期: 2022-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(82003675); 安徽中医药大学培育项目(2020py04, 2021py05)

第一作者: 储晓婷, 女, 在读研究生, 专业方向为药剂学。E-mail: 1332188653@qq.com

*共同通信作者: 桂双英, 教授, 博士生导师, 主要从事制剂新技术、新剂型与中药新制剂研究。E-mail: guishy0520@126.com

李真宝, 研究员, 博士生导师, 主要从事智能纳米药物递送研究。E-mail: lizhenbao@ahtcm.edu.cn

sizes were prepared by thin film dispersion method. Particle size, polymer dispersion index (PDI) and Zeta potential were measured by Malvern particle size analyzer. The morphology was observed by transmission electron microscope. The stability of liposomes at 4 °C for one month and in phosphoric acid buffer solution (PBS, pH 6.8) and pH 1.2 aqueous solution within 48 h were investigated using particle size as index. The encapsulation rate and drug load were determined by ultrafiltration centrifugation. *In vivo* intestinal absorption model of rats was used to investigate intestinal absorption characteristics. Pharmacokinetic behavior of liposome in rats was investigated by ig administration. The contents of plasma coagulation factors II, V, VII and IX were detected by ELISA kit, and the prothrombin time (PT) was detected in rats with hypothermia induced by warfarin sodium, to evaluate the effect of VK₁ liposomes (2 mg·kg⁻¹) with different particle sizes on promoting coagulation. **Results** Three kinds of VK₁ liposomes were prepared, termed as Lip-180, Lip-120 and Lip-60, with a uniform particle size distribution of (182.40±2.17), (114.38±0.60) and (68.42±0.73) nm, and Zeta potentials of (-27.67±1.58), (-22.93±1.81) and (-26.63±1.37) mV, PDI were 0.21±0.01, 0.12±0.00 and 0.17±0.01, respectively. Meanwhile, these as-formulated liposomes were uniformly spherical shape of good stability with a satisfied encapsulation efficiency of 90% and a drug loading capability of 2.90% of the drug load. Compared with Lip-180, the *in vitro* release and *in situ* intestinal perfusion results demonstrated that Lip-120 and Lip-60 achieved a superior release performance and transmembrane absorption rate. In consistence with the *in vitro* results, the area under the drug time curve (AUC_{0-∞}) of Lip-120 and Lip-60 were 1.52 and 1.80 times of Lip-180, respectively. Lip-120 and Lip-60 generated 1.24- and 1.46-fold higher bioavailability than commercial VK₁ solution. After oral administration, all of these liposomes and commercial solution were able to decrease plasma PT, and enhance the produce of coagulation factors II, V, VII and IX in warfarin-triggered anticoagulant rat models, where Lip-60 exerted the best procoagulant efficiency. **Conclusion** Pegylated VK₁ liposomes have uniform distribution, high stability, slow release, high oral bioavailability, and wonderful *in vivo* coagulation effect, and Lip-60 with the smallest particle size is preferred.

Key words: vitamin K₁; polyethylene glycol; liposomes; particle size; oral bioavailability; coagulation

维生素K₁(VK₁),也称为植物甲萘醌、叶绿醌,是脂溶性维生素,天然存在于植物中。VK₁在血液凝固中有至关重要的作用,可促进凝血因子前体(II、VII、IX、X)形成γ-羧基谷氨酸^[1]。VK₁在临床上用于VK₁吸收或合成障碍或其他药物治疗引起的维生素缺乏疾病^[1-2]和新生儿出血性疾病^[3]。目前国内外上市的VK₁制剂有注射剂和片剂等,VK₁注射剂在临床上应用较多,但患者顺应性差,同时存在不同程度的不良反应如面部潮红、腹痛、恶心、呕吐、呼吸困难,甚至可能导致死亡^[4-5]。VK₁片剂存在口服生物利用度低^[6],治疗效果差,对于婴儿而言还存在吞咽困难的难题。因此,亟需开发一种高效安全的VK₁制剂。

脂质体是具有类似生物膜结构的磷脂组成的双分子层囊泡,由于其可包载亲水性和疏水性药物、生物相容性高、可增加药物生物利用度、不良反应少低等^[7-8],脂质体递送系统受到越来越多的关注。当脂质体表面被聚乙二醇(PEG)化时,可以增强脂质体互相排斥作用,防止聚集,防止被酶水解,增强稳定性^[9-11]。近来研究表明,脂质体的粒径是影响药物口服吸收的重要因素^[12-13]。因此,为了增加VK₁口服生物利用度,本研究制备不同粒径的PEG化胆盐VK₁脂质体,并对其表征,评估稳定性和体外释放,考察不同粒径脂质体的在体肠吸

收、药动学和促凝效果,筛选治疗效果最佳的PEG化VK₁脂质体。

1 材料

1.1 主要仪器

Zetasizer3000HS 马尔文粒径仪,英国Malvern公司;ME204E/02 万分之一电子天平,上海梅特勒托利多国际贸易有限公司;EX125ZH 十万分之一电子天平,常州奥豪斯仪器有限公司;LF-1 脂质体挤出器,加拿大AVESTIN公司;JEOL-2010 高分辨透射电子显微镜,日本电子公司;ZPX-150 恒温振荡培养箱,厦门科析仪器有限公司;HL-2 恒流泵,上海嘉鹏科技有限公司;UltiMate3000 型高效液相色谱仪,赛默飞世尔科技公司;Waters TQ-S 型超高效液相色谱-串联质谱,沃特世科技有限公司。

1.2 主要试剂

VK₁,质量分数98%,批号C12205921;甘氨酸,质量分数97%,批号C12013303,均购自上海麦克林生化科技有限公司。维生素K₁注射剂,批号20201209,规格1 mL:10 mg,浙江诚意药业股份有限公司;华法林钠片,批号22201101,规格每片2.5 mg,上海上药信谊药厂有限公司;高纯度蛋黄卵磷脂,批号AL18012,上海艾伟拓医药科技有限公司;二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-mPEG_{2K}),批号RM0210626,西安瑞喜生物科技有

限公司;RC透析袋,上海绿鸟科技发展有限公司;乙醇,色谱级,罗恩试剂;大鼠凝血因子(II、VII、IX、X)酶联免疫吸附剂测定(ELISA)试剂盒,睿信生物科技有限公司;3.2%柠檬酸钠真空采血管,江苏宇力医疗器械有限公司。

1.3 实验动物

健康雄性SPF级SD大鼠,体质量(200±20)g,由邳州东方繁育中心和郑州惠济区华兴实验动物农场提供,实验动物生产许可证号分别为SCXK(苏)2017-0003和SCXK(豫)2019-0002,实验遵守安徽中医药大学动物中心指导方针,并经安徽中医药大学动物伦理委员会正式批准,动物伦理编号为AHUCM-rats-2021060。

2 方法

2.1 脂质体的制备

采用薄膜水化-挤出法制备不同尺寸大小的脂质体^[14]。称取0.1 g的VK₁溶解于5 mL的CH₂Cl₂中。取浓盐酸36.5 μL于装有200 mL纯水的250 mL量瓶中,定容,摇匀。称取60 mg蛋黄卵磷脂和20 mg的DSPE-mPEG_{2K}置于250 mL茄形瓶中,加入2 mL乙醇溶解,再加入200 μL上述VK₁溶液。称取1.8 mg的NaOH与21.8 mg甘氨酸,溶解于1 mL纯水中,超声溶解,再加入上述盐酸溶液625 μL。将二者混合,减压旋转蒸发除去液体,制成均匀的脂质体膜,25 °C真空过夜干燥,加入8 mL去离子水溶液,磁力搅拌2 h,即得到粗制的VK₁脂质体。将其过3次0.22 μm滤膜,即得到粒径约180 nm的脂质体(Lip-180);采用脂质体挤出器(100 nm膜)挤出20次,即得到粒径约120 nm的脂质体(Lip-120);采用脂质体挤出器(50 nm膜)挤出40次,即得到粒径约60 nm的脂质体(Lip-60)。整个实验在铝薄膜避光下操作。

2.2 脂质体的制剂学评价

2.2.1 粒径、聚合物分散性指数(PDI)与Zeta电位 分别取Lip-180、Lip-120和Lip-60适量稀释10倍,采用马尔文粒径仪测定脂质体的粒径、PDI与Zeta电位。

2.2.2 形态 分别取适量Lip-180、Lip-120和Lip-60,用去离子水将其稀释100倍后,滴到200目的碳膜覆盖的铜网上,静置1 min,用滤纸吸走多余液体,自然干燥后,用2%磷钨酸染液负染2 min,吸走多余液体后晾干,置于透射电子显微镜观察。

2.2.3 稳定性 将Lip-180、Lip-120和Lip-60用纯水稀释10倍,在4 °C下储存1个月,以粒径为指标,考察其长期稳定性。分别将9 mL的pH 6.8磷酸盐

缓冲液(PBS 6.8)或pH 1.2水溶液与1 mL的脂质体均匀混合后,置于摇床(100 r·min⁻¹、37 °C)中,并在0.5、2、4、8、12、24和48 h的各时间点测定脂质体粒径,以粒径为指标,考察Lip-180、Lip-120和Lip-60在PBS 6.8及pH 1.2水溶液中的稳定性。

2.2.4 包封率与载药量 采用超滤离心法分别测定Lip-180、Lip-120和Lip-60的包封率^[15]。精密量取2 mL载药脂质体于超滤离心管中,以4 000 r·min⁻¹的转速离心15 min,后将上层滤液加入乙醇破乳,定容,用于测定包封的药物质量($W_{\text{包封}}$)。另取2 mL载药脂质体加入适量乙醇超声破乳,定容,用于测定药物总质量($W_{\text{总}}$)。参考文献报道^[14,16-17]的高效液相色谱(HPLC)法测定乙醇中VK₁浓度,实验平行3份。VK₁的包封率和载药量分别按照下式计算:

$$\text{包封率} = W_{\text{包封}} / W_{\text{总}}$$

$$\text{载药量} = W_{\text{包封}} / W_{\text{脂质体}}$$

$W_{\text{脂质体}}$ 为脂质体的总质量

2.2.5 体外释放 采用透析法考察Lip-180、Lip-120和Lip-60的体外释放特性。分别量取Lip-180、Lip-120和Lip-60各2 mL,置于已预处理好的透析袋中,平行3份,透析袋两端系紧,放入30 mL的50%乙醇的释放介质中。在37 °C、100 r·min⁻¹的恒温摇床中振荡,分别在设定的时间点取样2 mL,并补充2 mL新鲜的释放介质,各时间点样品采用HPLC测定VK₁浓度,计算累积释放率。

累积释放率 = $\{C_1 \times V_1 + (C_1 + C_2 + \dots + C_{i-1} + C_i) \times V_2\} / M$
 C_1 、 C_2 、 C_{i-1} 、 C_i 分别为第1、2、 $i-1$ 、 i 个时间点释放介质中VK₁浓度; V_1 为释放介质的总体积, V_2 为所取样的体积; M 为加入透析袋中VK₁总质量

2.3 脂质体的在体肠吸收考察

采用原位单向肠灌注模型探究脂质体在大鼠肠道吸收效果^[18]。取雄性SD大鼠,术前禁食12 h,ip 10%水合氯醛(3.4 mL·kg⁻¹)进行麻醉后,沿腹中线剪3~4 cm的切口,分别取十二指肠、空肠、回肠、结肠,长约10 cm,两端进行插管,并结扎于导管上。大鼠各肠段置于腹腔内,避免扭折,用含有生理盐水的湿纱布覆盖并保持纱布湿润,大鼠体温保持在37 °C。在使用生理盐水通过蠕动泵排出肠内容物后,用含有维生素K₁注射剂、Lip-180、Lip-120或Lip-60的供试液(VK₁质量浓度为30 μg·mL⁻¹)分别以0.5 mL·min⁻¹的体积流量饱和30 min,之后分别以0.2 mL·min⁻¹的体积流量灌流相对应的供试液90 min。每15分钟收集1次灌流液,灌流实验结束后,测量肠段的长度和直径。灌注样品的VK₁浓度通过HPLC法测定^[14,16-17]。在本实验中,对灌注样

品用质量法校正体积。采用下列校正公式计算药物吸收速率常数(K_a, min^{-1})和表观渗透系数($P_{\text{app}}, \text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$)。

$$K_a = \left(1 - \frac{C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \frac{m_{\text{out}}}{m_{\text{in}}}\right) \frac{Q}{\pi r^2}$$

$$P_{\text{app}} = -\frac{Q \ln\left(\frac{C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \frac{m_{\text{out}}}{m_{\text{in}}}\right)}{2\pi r l}$$

C_{in} 和 C_{out} 为进、出口灌注样品 VK_1 的浓度, m_{in} 和 m_{out} 分别为入口和出口灌注液样品的质量, 其中 r 和 l 是每个肠段的半径和长度, Q 是灌注体积流量

2.4 脂质体的药动学考察

取健康的20只雄性SD大鼠,随机分成4组,每组5只。给药前禁食12 h,分别ig给予大鼠维生素 K_1 注射剂、Lip-180、Lip-120及Lip-60,剂量为 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。于给药后0.17、0.50、1.00、2.00、4.00、6.00、8.00、12.00、24.00 h从大鼠眼眶取血0.5 mL置涂有肝素钠的试管中,震荡,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,取上清液冻存于 -80°C 。参考文献报道^[15,19]的 VK_1 血浆前处理和 VK_1 的含量测定方法,采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法检测血药浓度。

2.5 脂质体的促凝药效学考察

取18只雄性SD大鼠,随机分成6组:对照组、模型组、维生素 K_1 注射剂组、Lip-180组、Lip-120组及Lip-60组,每组3只。实验前禁食12 h,可自由饮水,除对照组外,各组大鼠ig给予华法林钠溶液($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[20],18 h后各给药组分别ig维生素 K_1 注射剂、Lip-180、Lip-120及Lip-60, VK_1 剂量为 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[21],对照组及模型组给予生理盐水,于给药后6、12 h,从大鼠眼眶取血,置2 mL枸橼酸钠抗凝管的刻度线位置,上下颠倒,缓慢振摇,立即于 4°C 4000 min^{-1} 离心12 min,取上清液冻存于 -80°C 。采用试剂盒并按照说明书操作来检测血浆凝血因子II、VII、IX和X水平,凝血酶原时间(PT)委托武汉赛维尔生物科技有限公司检测。

2.6 数据处理

数据应用GraphPad Prism 6处理分析并绘图,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经过单因素方差分析判断是否具有显著性差异。

3 结果

3.1 脂质体的表征

3.1.1 粒径、PDI与Zeta电位测定结果 Lip-180、Lip-120和Lip-60的平均粒径分别为(182.40 ± 2.17)、(114.38 ± 0.60)、(68.42 ± 0.73) nm, PDI分别为 0.21 ± 0.01 、 0.12 ± 0.00 、 0.17 ± 0.01 , 电位分别为(-27.67 ± 1.58)、(-22.93 ± 1.81)、($-26.63 \pm$

1.37) mV。粒径分布图见图1,结果表明脂质体粒径分布窄,电位绝对值较大,均大于20,脂质体粒子间排斥较大,对于脂质体的稳定性具有重要作用。

3.1.2 形态观察结果 采用透射电镜观察脂质体的形态,与动态光散射结果一致,结果显示Lip-180、Lip-120和Lip-60形态均呈完整的球形,分布均匀(图2)。

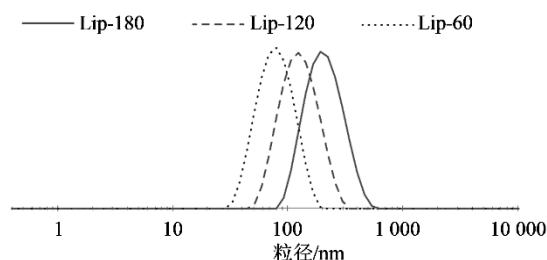


图1 Lip-180、Lip-120和Lip-60的粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of Lip-180, Lip-120 and Lip-60

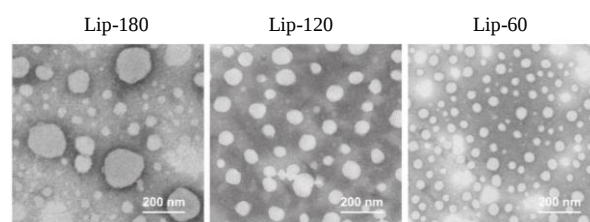


图2 Lip-180、Lip-120和Lip-60的透射电镜图

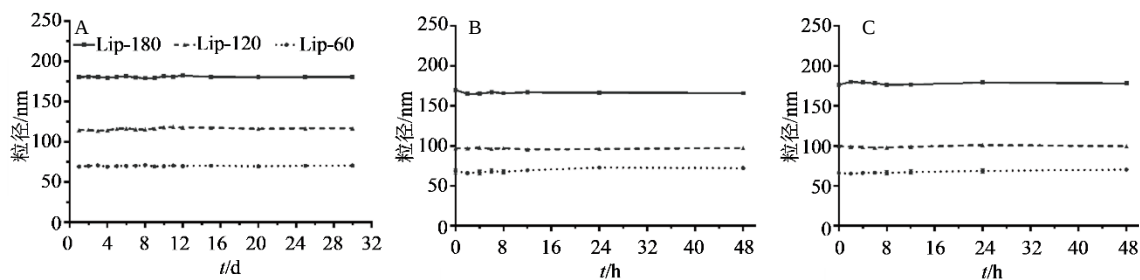
Fig. 2 TEM images of Lip-180, Lip-120 and Lip-60

3.1.3 稳定性结果 考察脂质体在 4°C 储存的长期稳定性及在模拟胃肠道的pH条件下的平均粒径的变化。如图3-A所示,Lip-180、Lip-120和Lip-60在 4°C 条件下30 d内平均粒径基本稳定,表现出较好的长期稳定性;如图3-B、C所示,在48 h内,在PBS 6.8以及pH 1.2水溶液中的平均粒径均较为稳定,表明Lip-180、Lip-120和Lip-60在低pH条件下的稳定性依然较好,一定程度维持了脂质体在口服过程中的完整。

3.1.4 包封率与载药量的测定结果 结果显示,Lip-180、Lip-120和Lip-60的包封率分别为(91.82 ± 0.84)%、(91.72 ± 0.09)%和(93.53 ± 1.96)%,载药量分别为(2.92 ± 0.03)%、(2.92 ± 0.00)%和(2.97 ± 0.06)%。结果表明脂质体对 VK_1 有很好的包封效果。

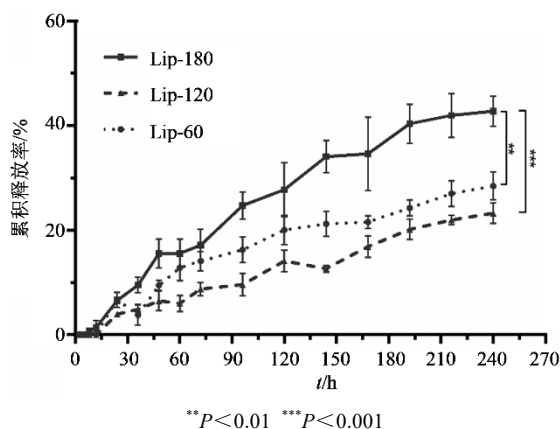
3.2 脂质体的体外释放

采用透析法考察Lip-180、Lip-120和Lip-60的体外释药行为,以50%乙醇为释放介质,如图4所示,3者释放速率都很缓慢,Lip-180的累积释放率达43%左右,Lip-120和Lip-60的累积释放率分别约



A-长期; B-pH 1.2 水溶液; C-PBS 6.8

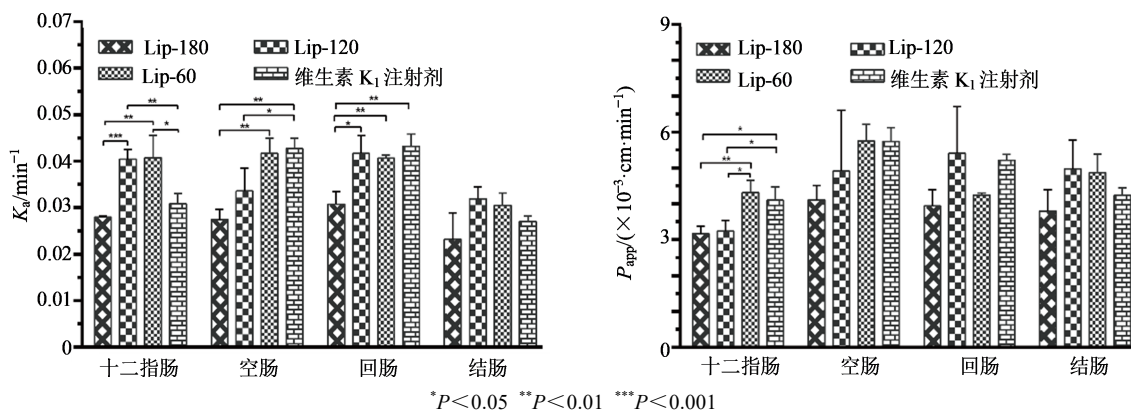
A-long-term; B-pH 1.2 aqueous solution; C-PBS 6.8

图3 Lip-180、Lip-120和Lip-60的稳定性($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Stability of Lip-180, Lip-120 and Lip-60 ($\bar{x} \pm s, n=3$)图4 Lip-180、Lip-120和Lip-60的累积释放曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Cumulative release profiles of Lip-180, Lip-120 and Lip-60 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

为23%和28%, Lip-120和Lip-60的释放速率显著低于Lip-180 ($P<0.01, 0.001$)。

3.3 脂质体的在体肠吸收考察

Lip-180、Lip-120、Lip-60及维生素K₁注射剂在肠道各段的 K_a 和 P_{app} 见图5。在十二指肠和回肠, Lip-120和Lip-60的吸收效果显著优于Lip-180, 在十二指肠, Lip-60和Lip-120的 K_a 值分别是Lip-180的1.46和1.45倍, 差异显著 ($P<0.01, 0.001$); 在回肠, Lip-60和Lip-120的 K_a 值分别是Lip-180的1.32倍和1.36倍, 差异显著 ($P<0.05, 0.01$); Lip-60在空肠的吸收优于其他2种脂质体, Lip-60的 K_a 值分别是Lip-180和Lip-120的1.52倍 ($P<0.01$)和1.24倍。此外, Lip-120和Lip-60在十二指肠的吸收效果优于

图5 Lip-180、Lip-120和Lip-60在大鼠体内不同肠段的 K_a 和 P_{app} 值($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 5 K_a and P_{app} values of Lip-180, Lip-120 and Lip-60 in rats with different intestinal segments ($\bar{x} \pm s, n=3$)

维生素K₁注射剂, 其中Lip-60和Lip-120的 K_a 值分别是市售溶液的1.32和1.31倍。在回肠和空肠中, Lip-60的吸收与维生素K₁注射剂相当。脂质体和维生素K₁注射剂在结肠中的吸收均较少。每种制剂在空肠、回肠和结肠中的 P_{app} 值没有显著差异。在十二指肠, 与Lip-180、Lip-120相比, Lip-60与维生素K₁注射剂 P_{app} 值显著升高 ($P<0.05, 0.01$)。总

体而言, Lip-120与Lip-60吸收均较好。

3.4 脂质体的药动力学考察

采用DAS 2.0软件按非房室模型统计矩的方法得到维生素K₁注射剂、Lip-180、Lip-120及Lip-60组VK₁的药动力学参数, 结果如表1所示, Lip-120及Lip-60的药时曲线下面积($AUC_{0-\infty}$)分别是Lip-180的1.52和1.80倍, 并且Lip-120与

表1 VK₁的药动学参数($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 1 Pharmacokinetic parameters of VK₁($\bar{x} \pm s, n=5$)

参数	单位	Lip-180	Lip-120	Lip-60	维生素K ₁ 注射剂
AUC _{0-t}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	1 957.56±274.84	2 984.06±271.04 [#]	3 485.06±693.65 ^{*###}	2 385.96±359.03
AUC _{0-∞}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	1 999.84±267.47	3 044.91±242.71 [#]	3 593.28±732.61 ^{*###}	2 463.17±355.09
MRT _{0-t}	h	5.17±0.43	5.37±0.46	5.254±0.26	4.56±0.27
MRT _{0-∞}	h	5.95±0.64	6.16±0.83	6.10±0.62	5.75±0.72
<i>t</i> _{1/2}	h	4.23±1.22	4.06±1.30	4.75±1.27	4.93±1.77
CL	$\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$	2.04±0.30	1.32±0.10 ^{##}	1.16±0.24 ^{*###}	1.66±0.24
<i>C</i> _{max}	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	451.03±52.42	688.63±58.20 ^{###}	716.80±55.80 ^{###}	709.99±31.10 ^{###}
<i>F</i> _{rel}	%	81.19	123.62	145.88	100

与维生素K₁注射剂比较: **P*<0.05; 与Lip-180比较: [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 ^{###}*P*<0.001^{*}*P*<0.05 vs Vitamin K₁ Injection; [#]*P*<0.05 ^{##}*P*<0.01 ^{###}*P*<0.001 vs Lip-180

Lip-60的AUC_{0-∞}分别是维生素K₁注射剂的1.24与1.46倍。同时,与维生素K₁注射剂相比,Lip-60的清除率(CL)显著降低(*P*<0.05)。与在体肠吸收结果一致,Lip-120与Lip-60能够提高VK₁的口服生物利用度(*F*_{rel}),其中Lip-60的生物利用度最高。

3.5 脂质体的促凝药效考察

华法林钠是维生素环氧化还原酶的阻断剂,可阻碍体内的VK₁循环,从而阻碍凝血因子II、VII、IX、X的转录后修饰^[22],因此ig给予华法林钠后,通过给药VK₁,检测凝血因子及PT,可以进一步评价VK₁脂质体在大鼠体内的促凝疗效。结果如图6所示,与对照组比较,模型组大鼠在给予华法林钠后24、30 h,PT显著增高,凝血因子II、VII、IX、X水平显著降低(*P*<0.05、0.01、0.001);与模型组比较,经ig给药Lip-180、Lip-120、Lip-60及维生素K₁注射剂6、12 h后,PT显著降低(*P*<0.001),凝血因子II、VII、IX、X水平呈升高趋势,其中,Lip-60作用最显著,除给药后6 h的凝血因子X外,均差异显著(*P*<0.05、0.01、0.001)。

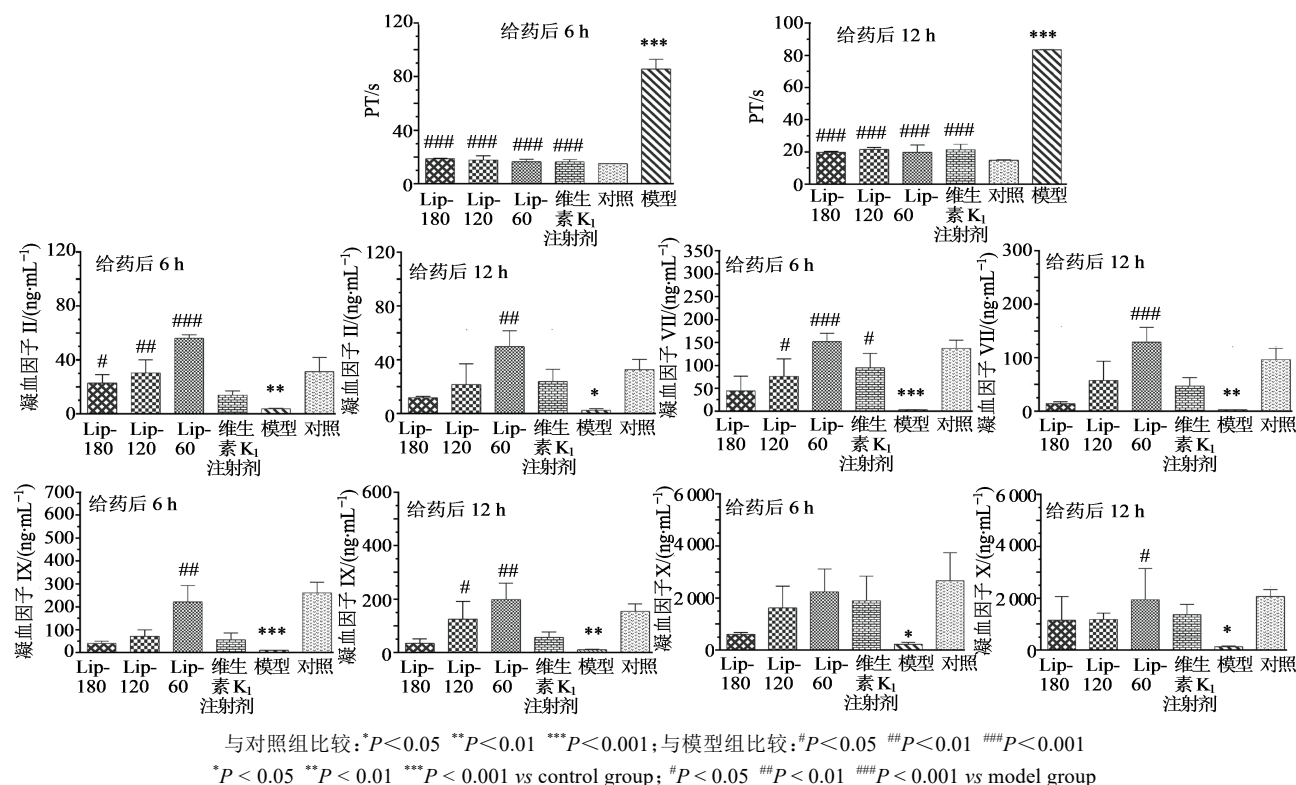
4 讨论

VK₁是人体必需物质,在临床上应用广泛。口服VK₁可有效降低服用华法林钠后的国际标准化值^[23],可以治疗VK₁吸收或合成或是其他药物引起的VK₁缺乏。此外,VK₁可预防或治疗新生儿或幼儿出血,由于生理上维生素K血浆浓度低导致的维生素K缺乏性出血(VKDB)对新生儿和幼儿是一个具有严重风险的疾病^[24]。文献报道^[25]有效合适的口服维生素K给药方案可预防纯母乳喂养新生儿的晚期VKDB。且孕妇口服VK₁也可有效预防和治疗新生儿维生素K缺乏症^[26]。国内临床上应用广

泛的VK₁普通注射液含有聚山梨酯80等增溶剂,其可能是VK₁注射液会引起不良反应的重要原因^[27]。VK₁片剂对于婴幼儿服用不便,对于需要及时补充VK₁的患者不是首选剂型。因此,开发生物相容性好、生物利用度高VK₁制剂是急需解决的问题。

脂质体具有类生物膜结构,生物相容性好,免疫原性低,可包封脂溶性药物,可作为口服载药递送系统,且胆盐脂质体可有效提高药物生物利用度^[28-29]。因此,本研究制备了3种粒径的PEG化VK₁脂质体Lip-180、Lip-120和Lip-60,粒径分布均匀,稳定性好,且包封率较高。高精密度的聚碳酸酯(PC)膜具有各种明确大小的孔径,将脂质体用装有一定大小孔径的PC膜的脂质体挤出器中反复缓慢挤压,其粒径会基本稳定,趋于PC膜孔径大小且分布均匀^[30]。本研究制备的粗制脂质体粒径小于200 nm,可直接采用不同孔径的PC膜,在挤压一定次数后,制备出所需粒径的VK₁脂质体。经过前期研究,本研究使用100 nm膜挤出了20次制备Lip-120,使用50 nm的膜挤出40次制备Lip-60。此外,脂质体表面PEG的引入,不仅增加了脂质体在低pH下的稳定性,这与文献报道一致^[31-32],同时,脂质体表面的PEG与胃肠道壁的黏液层相互作用^[33],PEG化可增加脂质体于小肠的停留时间,增加接触时间^[34],且PEG化能抵抗生理胆盐对脂质体磷脂的双分子层的侵蚀^[35],这些可能是PEG化脂质体备受青睐的重要原因。另外,有研究结果表明^[36]胆汁盐可增强脂质体穿过生物膜的渗透性,甘胆酸盐能稳定脂质体在低pH或胃肠道生理性胆汁盐条件下的大小分布,对脂质体有保护作用^[37],因此,胆盐是提高药物口服生物利用度的原因之一。

理想的载药颗粒应具有合适的尺寸(1~100 nm),尤

图6 大鼠血浆凝血参数($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 6 Plasma coagulation parameters of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

其是口服脂质体,粒径是影响脂质体穿过肠道黏液层,跨过肠道细胞的重要因素^[38]。本研究发现PEG化VK₁脂质体在粒径为60 nm时达到了最高的生物利用度,基本与文献报道一致^[39],这还可能是由于60 nm粒径具有更有好的黏液穿透和跨肠道细胞能力^[9]。

本研究结果表明PEG化胆盐VK₁脂质体不仅具有分散均匀、稳定性较好、包封率高、体外缓释释放等优点,同时还可实现快速跨过肠道屏障,进而增加体内口服生物利用度和体内促凝效果,尤其是最小粒径的脂质体Lip-60,体内外效果最好。本研究设计的Lip-60具有强的临床应用前景,为VK₁新制剂的研发奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Furumi Y, Shimizu S, Ogawa Y, et al. A suspicious case of coagulation disorder caused by vitamin K deficiency associated with fasting and antibiotics [J]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*, 2019, 56(2): 204-208.
- [2] Sakaguchi Y, Suga S, Oshida K, et al. Anticoagulant effect of sodium dehydroacetate (DHA-S) in rats [J]. *J Appl Toxicol*, 2008, 28(4): 524-529.
- [3] Ardell S, Offringa M, Ovelman C, et al. Prophylactic vitamin K for the prevention of vitamin K deficiency bleeding in preterm neonates [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 2(2): Cd008342.
- [4] Britt R B, Brown J N. Characterizing the severe reactions of parenteral vitamin K₁ [J]. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2018, 24(1): 5-12.
- [5] 王晓燕. 儿童静滴维生素K₁注射液引起的17例药物不良反应分析 [J]. *药学研究*, 2018, 37(9): 555-558.
Wang X Y. Analysis of 17 cases of adverse drug reactions in children caused by Vitamin K₁ Injection [J]. *J Pharm Res*, 2018, 37(9): 555-558.
- [6] van Rein N, Gebuis E P, Lijfering W M, et al. Vitamin K1 in oral solution or tablets: A crossover trial and two randomized controlled trials to compare effects [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(12): 2017-2023.
- [7] Li M Y, du C Y, Guo N, et al. Composition design and medical application of liposomes [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 164: 640-653.
- [8] Yazdi J R, Tafaghodi M, Sadri K, et al. Folate targeted PEGylated liposomes for the oral delivery of insulin: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 194: 111203.
- [9] Liu W J, Li D, Dong Z R, et al. Insight into the *in vivo* translocation of oral liposomes by fluorescence resonance

- energy transfer effect [J]. *Int J Pharm*, 2020, 587: 119682.
- [10] Sun Y, Zhao Y Y. Enhanced pharmacokinetics and anti-tumor efficacy of PEGylated liposomal rhaponticin and plasma protein binding ability of rhaponticin [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2012, 12(10): 7677-7684.
- [11] 王文俊, 严晓敏, 陈自强, 等. 木香炔内酯与去氢木香内酯共包封聚乙二醇化长循环脂质体的制备及表征 [J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4068-4075.
Wang W J, Yan X M, Chen Z Q, et al. Preparation and characterization of PEGylated long-circulating liposomes encapsulating costunolide and dehydrocostus lactone [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(17): 4068-4075.
- [12] Verma D D, Verma S, Blume G, et al. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin [J]. *Int J Pharm*, 2003, 258(1/2): 141-151.
- [13] Wu L, Zhao L, Su X T, et al. Repaglinide-loaded nanostructured lipid carriers with different particle sizes for improving oral absorption: Preparation, characterization, pharmacokinetics, and in situ intestinal perfusion [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 400-409.
- [14] 全永涛. 维生素K₁固体自乳化缓释片成型技术与生物药剂学评价研究 [D]. 北京: 军事科学院, 2019: 8-22, 72-75.
Tong Y T. The study on molding technology and biopharmaceutical evaluation of vitamin K₁ solid self-emulsifying sustained release tablets [D]. Beijing: Academy of Military Sciences, 2019: 8-22, 72-75.
- [15] Wang W X, Feng S S, Zheng C H. A comparison between conventional liposome and drug-cyclodextrin complex in liposome system [J]. *Int J Pharm*, 2016, 513(1/2): 387-392.
- [16] 周朝阳. 基于红细胞载维生素K₁的长循环系统的制备与评价 [D]. 咸宁: 湖北科技学院, 2020: 8-15.
Zhou C Y. Preparation and evaluation of long circulation system based on vitamin K₁ in red blood cells [D]. Xianning: Hubei University of Science and Technology, 2020: 8-15.
- [17] Sun F L, Jaspers T C, van Hasselt P M, et al. A mixed micelle formulation for oral delivery of vitamin K [J]. *Pharm Res*, 2016, 33(9): 2168-2179.
- [18] Song J, Shi F, Zhang Z H, et al. Formulation and evaluation of celastrol-loaded liposomes [J]. *Molecules*, 2011, 16(9): 7880-7892.
- [19] Ducros V, Pollicand M, Laporte F, et al. Quantitative determination of plasma vitamin K₁ by high-performance liquid chromatography coupled to isotope dilution tandem mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2010, 401(1): 7-14.
- [20] Ding T G, Zhang Y J, Chen A, et al. Effects of cucurbitacin e, a tetracyclic triterpene compound from Cucurbitaceae, on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015, 116(5): 385-389.
- [21] Ma L, Cao Y, Chen L, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of two vitamin K₁ formulations in rats [J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2015, 65(3): 125-132.
- [22] Wu S, Chen X J, Jin D Y, et al. Warfarin and vitamin K epoxide reductase: A molecular accounting for observed inhibition [J]. *Blood*, 2018, 132(6): 647-657.
- [23] Harrell C C, Kline S S. Oral vitamin K₁: An option to reduce warfarin's activity [J]. *Ann Pharmacother*, 1995, 29(12): 1228-1232.
- [24] Mihatsch W A, Braegger C, Bronsky J, et al. Prevention of vitamin K deficiency bleeding in newborn infants: A position paper by the ESPGHAN committee on nutrition [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2016, 63(1): 123-129.
- [25] Ipema H J. Use of oral vitamin K for prevention of late vitamin K deficiency bleeding in neonates when injectable vitamin K is not available [J]. *Ann Pharmacother*, 2012, 46(6): 879-883.
- [26] 魏超平, 郭金将, 吕 滕, 等. 638例孕妇及其新生儿维生素K₁应用情况调查分析 [J]. *山东医药*, 2021, 61(36): 1-4.
Wei C P, Guo J J, Lü M, et al. Investigation and analysis on usage of vitamin K₁ in 638 cases of pregnant women and their neonates [J]. *Shandong Med J*, 2021, 61(36): 1-4.
- [27] Mi Y N, Ping N N, Xiao X, et al. The severe adverse reaction to vitamin K₁ injection is anaphylactoid reaction but not anaphylaxis [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e90199.
- [28] Fan Q Y, Zhang Y T, Hou X F, et al. Improved oral bioavailability of notoginsenoside R₁ with sodium glycocholate-mediated liposomes: Preparation by supercritical fluid technology and evaluation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Pharm*, 2018, 552(1/2): 360-370.
- [29] 吴斯宇, 曾盈蓉, 唐 聘, 等. RGD环肽修饰的姜黄素/黄芩苷靶向共递送纳米脂质体的制备工艺优化及表征 [J]. *中草药*, 2021, 52(22): 6834-6844.
Wu S Y, Zeng Y R, Tang P, et al. Preparation process optimization and characterization of RGD cyclopeptide modified curcumin/baicalin co-delivery targeted liposomes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(22): 6834-6844.
- [30] Zhang H W. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1522: 17-22.
- [31] Cieślak A, Wauthoz N, Nieto Orellana A, et al. Stealth

- nanocarriers based sterosomes using PEG post-insertion process [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2017, 115: 31-38.
- [32] 国瑞琪, 王秋红, 王向涛, 等. 和厚朴酚脂质体的制备及其体内外抗乳腺癌作用研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(01): 48-53.
- Guo R Q, Wang Q H, Wang X T, et al. Preparation of honokiol liposomes and their *in vitro* and *in vivo* suppression on breast cancer [J]. Drug Eval Res, 2017, 40 (1): 48-53.
- [33] Minato S, Iwanaga K, Kakemi M, et al. Application of polyethyleneglycol (PEG) -modified liposomes for oral vaccine: Effect of lipid dose on systemic and mucosal immunity [J]. J Control Release, 2003, 89(2): 189-197.
- [34] Iwanaga K, Ono S, Narioka K, et al. Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: Effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin [J]. J Pharm Sci, 1999, 88(2): 248-252.
- [35] Wong C Y, Al-Salami H, and Dass C R. Recent advancements in oral administration of insulin-loaded liposomal drug delivery systems for diabetes mellitus [J]. Int J Pharm, 2018, 549(1/2): 201-217.
- [36] Niu M M, Tan Y N, Guan P P, et al. Enhanced oral absorption of insulin-loaded liposomes containing bile salts: A mechanistic study [J]. Int J Pharm, 2014, 460(1/2): 119-130.
- [37] Hu S W, Niu M M, Hu F Q, et al. Integrity and stability of oral liposomes containing bile salts studied in simulated and ex vivo gastrointestinal media [J]. Int J Pharm, 2013, 441(1/2): 693-700.
- [38] Eskandari Z, Bahadori F, Celik B, et al. Targeted nanomedicines for cancer therapy, from basics to clinical trials [J]. J Pharm Pharm Sci, 2020, 23(1): 132-157.
- [39] Ong S G, Ming L C, Lee K S, et al. Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of griseofulvin-loaded liposomes [J]. Pharmaceutics, 2016, 8(3): E25.

【责任编辑 兰新新】