

基于微流控技术制备天麻素多囊脂质体及脑靶向评价

罗永明, 车 鑫, 王红伟, 康致超, 王立红*

贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 运用微流控技术制备天麻素(GAS)多囊脂质体(GAS-MVLs), 考察GAS-MVLs在小鼠体内药动学及脑靶向性。方法 以成形性为评价指标, 通过单因素实验筛选GAS-MVLs成形工艺; 以包封率为指标, 以药脂比(GAS:卵磷脂)、醇脂比(胆固醇:卵磷脂)、卵磷脂与三油酸甘油酯的质量比、聚山梨酯80的质量浓度为变量, 正交试验优化GAS-MVLs处方; 对GAS-MVLs进行包封率、粒径、聚合物分散性指数(PDI)、形态进行表征, 进行体外累积释放率及初步稳定性试验。采用HPLC法测定小鼠给予GAS、GAS-MVLs(30 mg·kg⁻¹)后5、15、30、60、90、120、150、180、240、300 min血浆及脑组织中GAS的浓度, 以相对摄取率(Re)、靶向效率(Te)及脑内峰浓度比(Ce)评价GAS-MVLs脑靶向性。结果 优化处方为药脂比为1:2, 醇脂比为1:1, 卵磷脂与三油酸甘油酯为1:1.5, 聚山梨酯80质量浓度为6%。精密称取处方量的卵磷脂、胆固醇、三油酸甘油酯溶于氯仿-乙醚(2:1)混合溶剂为脂相, 精密称取GAS溶于水作为内水相, 内水相与脂相体积比为2:3, 将内水相加入到脂相中, 在冰水浴下超声3 min, 形成初乳; 以6%聚山梨酯80为外水相, 与初乳从不同入口注入微流控装置中, 通过Y型芯片, 设置总体积流量(18.78 mL·h⁻¹)和体积流量比(外水相:初乳=23:1), 经氮气去除有机溶剂, 得GAS-MVLs。GAS-MVLs平均粒径为(2.09±0.14) μm, PDI为0.258±0.013, 平均包封率为(34.47±0.39)%, 分布均匀, 形态圆整, 结构致密。GAS在溶出介质中迅速溶解, 6 h的释放量接近90%; GAS-MVLs在前6 h释放速度较快, 随后接近平衡, 72 h最大累积释放率在65%左右。稳定性试验中GAS-MVLs的平均粒径缓慢增大, 包封率缓慢下降。药动学试验Re为5.70、Te为0.37、Ce为2.04。结论 采用微流控技术成功制备GAS-MVLs, 可显著提高GAS的脑内富集程度。

关键词: 微流控技术; 多囊脂质体; 天麻素; 脑靶向; 药动学

中图分类号: R94 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)09-2058-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.09.013

Preparation of gastrodin multivesicular liposomes based on microfluidic technology and evaluation of brain targeting

LUO Yongming, CHE Xin, WANG Hongwei, KANG Zhichao, WANG Lihong

Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: **Objective** Microfluidic technology was used to prepare Gastrodin (GAS) multivesicular liposomes (GAS-MVLs), and to investigate the pharmacokinetic and brain targeting properties of GAS-MVLs in mice. **Methods** Using the formability as the evaluation index, a single-factor experiment was conducted to select the GAS-MVLs forming process; using the encapsulation rate as the index, the orthogonal experiment was conducted to optimize the GAS-MVLs formula with the variables of the ratio of GAS to lecithin, the ratio of cholesterol to lecithin, the ratio of lecithin to triolein, and the concentration of polyoxyethylene sorbitan monolaurate. The GAS-MVLs were characterized by encapsulation rate, particle size, polymer dispersion index (PDI), and morphology, and the *in vitro* cumulative release rate and initial stability were tested. The GAS concentration in the plasma and brain tissue of mice given GAS or GAS-MVLs (30 mg·kg⁻¹) at 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, and 300 min was determined by HPLC, and the brain targeting of GAS-MVLs was evaluated by relative uptake rate (Re), targeting efficiency (Te) and peak concentration ratio (Ce). **Results** The optimized formula was a ratio of GAS to lecithin of 1:2, a ratio of cholesterol to lecithin of 1:1, a ratio of lecithin to triolein of 1:2, and a concentration of polyoxyethylene sorbitan monolaurate of 6%. The egg yolk was prepared by dissolving the specified amount of lecithin, cholesterol, and triolein in a chloroform-ethanol (2:1) mixture as the lipid phase, and

收稿日期: 2024-04-25

基金项目: 贵州省自然科学基金项目(贵州省科技基金-ZK[2021]-524); 贵州省卫健委科技基金项目(GZWKJ2022-233)

第一作者: 罗永明(1999—), 男, 硕士研究生, 专业方向为中药及民族药物新制剂及新剂型。

*通信作者: 王立红(1979—), 女, 副教授, 博士, 硕士研究生导师, 从事新药开发与药物新剂型研究。 E-mail: 315656071@qq.com

dissolving GAS in water as the internal aqueous phase. The internal aqueous phase was added to the lipid phase in a ratio of 2:3, and the mixture was sonicated for 3 minutes in an ice bath to form an emulsion. The external aqueous phase was prepared by adding 6% polyoxyethylene sorbitan monolaurate as the aqueous phase, and the emulsion and the external aqueous phase were injected from different inlets into a micro, by using a Y-type chip, the total volumetric flow rate ($18.78 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$) and the volume flow ratio (external aqueous phase : colloidal dispersion = 23 : 1) were set, and the organic solvent was removed by nitrogen, resulting in GAS-MVLs. The average particle size of GAS-MVLs was $(2.09 \pm 0.14) \mu\text{m}$, the PDI was (0.258 ± 0.013) , and the average encapsulation rate was $(34.47 \pm 0.39)\%$. The distribution was uniform, the morphology was round and compact, and the structure was dense. GAS dissolved rapidly in the release medium, and the release amount after 6 hours was close to 90%. In the stability test, the average particle size of GAS-MVLs slowly increased, and the encapsulation rate slowly decreased. In the pharmacokinetics test, Re was 5.70, Te was 0.37, and Ce was 2.04. **Conclusion** The preparation of GAS-MVLs by microfluidic technology can significantly improve the degree of intracerebral enrichment of GAS, which lays the foundation for further development of GAS brain-targeted formulations.

Key words: microfluidic technology; multivesicular liposomes; gastrodin; brain targeting; pharmacokinetics

天麻素(GAS)是天麻中关键的有效成分^[1],具有镇静催眠、抗抑郁和神经保护等多种药理作用^[2-4]。GAS作为药物可用于神经衰弱、头晕、头痛以及癫痫治疗^[5]。GAS水溶性高、脂溶性弱,在中枢神经系统疾病的防治中面临的最大问题是其透过血脑屏障的能力较弱。研究表明^[6],脂质体作为GAS递药载体可提高GAS的脑靶向性。

脂质体是由类似生物膜的脂质双分子层构成的球形囊泡,具有高度细胞亲和性和组织相容性^[7]。尽管传统脂质体在药物递送方面取得了成功,但在口服给药途径中仍存在挑战,如易被胃酸、肠黏液层破坏和被酶降解等^[8]。而多囊脂质体(MVLs)是1种新型脂质体,内部具有众多水性腔室的蜂窝状结构,当MVLs部分腔室破裂后,磷脂膜结构会重新排列和融合,MVLs不会完全解体^[9],稳定性明显优于普通脂质体。制备MVLs的常用方法是复乳法,步骤为先通过超声、高速剪切分散等方法制备水包油(W/O)型初乳,初乳与外水相在一定条件下涡旋或机械剪切再次乳化,形成水包油包水(W/O/W)型复乳,除去有机溶剂得MVLs,该方法存在重复性差、批间差异大等缺点^[10]。

微流控技术是一项新的药物制剂技术,可基于微流控芯片在微观尺度下操纵复杂流体^[11],已在微球、脂质体、纳米粒、复乳等制备过程中得到了成功应用^[12-15]。与传统方法相比,微流控技术可实现不间断的连续化生产,通过调控流体参数影响成形过程^[15],对制剂的粒径、形态、结构等做到精确控制^[16]。本研究采用微流控技术制备GAS-MVLs,对芯片结构、流体体积流量、制剂处方等进行考察,对其小鼠口服给药的体内药动学进行研究,以GAS水溶液为对照,采用靶向效率(Te)、相对摄取率(Re)和峰浓度比(Ce)3个参数对GAS-MVLs的脑靶向性

进行评价。

1 材料

1.1 主要试剂

GAS(质量分数98%,批号C14569077)、三油酸甘油酯(TO,质量分数60%,批号1718692),上海麦克林生化科技有限公司;卵磷脂(PC70,质量分数70%,批号B2215456)、胆固醇(Chol,批号808T031)、聚山梨酯80(批号1230828221),北京索莱宝科技有限公司。

1.2 主要仪器

LC-100高效液相色谱仪(上海伍丰科学仪器有限公司);EX20显微镜[舜宇光学科技(集团)有限公司];透析袋(北京索莱宝科技有限公司,截留相对分子质量8 000~140 000);DelsaMax PRO 贝克曼粒径仪(Beckman Coulter Life Sciences);MTN-2800D 氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司);JY92-2D 细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);TG16-WS 台式离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司)。

1.3 实验动物

昆明小鼠60只,体质量 $(30 \pm 2) \text{ g}$,购自贵州医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号SYXK(黔)2021-0002。实验动物通过贵州中医药大学动物伦理审查,编号为20230169。

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品储备液 精密称取9.96 mg GAS原料药至10 mL量瓶中,加流动相溶解并定量稀释制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的GAS的对照储备液。

2.1.2 供试品溶液 精密量取1.0 mL GAS-MVLs于10 mL量瓶中,加等量乙腈涡旋3 min,破乳,加流

动相定容,滤过,取续滤液即得

2.1.3 空白对照溶液 按“2.1.2”项制备方法,使用不含GAS的空白MVLs进行制备。

2.2 色谱条件

色谱柱:supersil ods2-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(13:87)进行等度洗脱;检测波长220 nm;体积流量1 mL·min⁻¹;进样量20 μL。

2.3 标准曲线的绘制

精密量取适量储备液,加流动相配制80、160、300、400、1 000 μg·mL⁻¹系列浓度的溶液,按“2.2”项下色谱条件测定。以质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=34.013X-46.472$, $r=0.9998$,在80~1 000 μg·mL⁻¹内具有良好的线性关系。

2.4 体外方法学考察

参考《中国药典》2020年版四部通则,对分析方法进行验证^[17]。取“2.1”项下溶液,按“2.2”项下色谱条件进样分析,考察该方法学的专属性。按照“2.1.2”项方法平行制备低、中、高(160、400、800 μg·mL⁻¹)质量浓度的供试品溶液6份,进样检测,考察重复性;分别取低、中、高(160、400、800 μg·mL⁻¹)3种质量浓度对照品溶液,分别进行平行进样6次测定并计算各

峰面积的RSD值,对方法学进行精密度考察;将上述溶液于4℃存放,分别于第0、2、4、6、8、12、24小时和第2、3、4、5、7天测定,计算各峰面积的RSD值,考察供试品溶液的稳定性;精密量取空白MVLs溶液10 mL,分别加入不同质量的对照品溶液,配成低、中、高(160、400、800 μg·mL⁻¹)3种质量浓度溶液,按“2.2”项下方法进行测定,考察其回收率。

专属性结果如图1所示,表明辅料对GAS的测定无干扰。重复性、精密度、稳定性RSD均小于2%,表明该方法重复性、精密度良好,供试品溶液在4℃放置7 d内稳定。低、中、高3个质量浓度回收率分别为100.06%、98.91%、99.95%,RSD值均小于2%,结果均表明该方法学满足样品中GAS的分析。

2.5 GAS-MVLs的制备

微流控技术制备GAS-MVLs过程如图2。精密称取处方量的卵磷脂、胆固醇、三油酸甘油酯溶于氯仿-乙醚(2:1)混合溶剂为脂相,精密称取GAS溶于水作为内水相,内水相与脂相体积比为2:3,将内水相加入到脂相中,在冰水浴下超声3 min,形成初乳。以6%聚山梨酯80为外水相,与初乳从不同入口注入微流控装置中,通过Y型芯片,设置总体积流量(18.78 mL·h⁻¹)和体积流量比(外水相:初乳=23:1),经氮气去除有机溶剂,得GAS-MVLs。

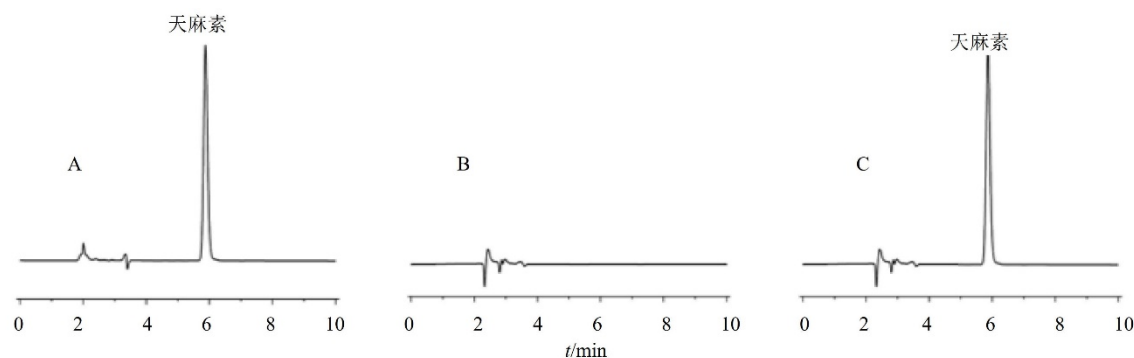


图1 GAS对照品(A)、空白多囊脂质体(B)、GAS-MVLs(C)高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC diagram of GAS reference (A), blank polycystic liposomes (B), and GAS-MVLs (C)

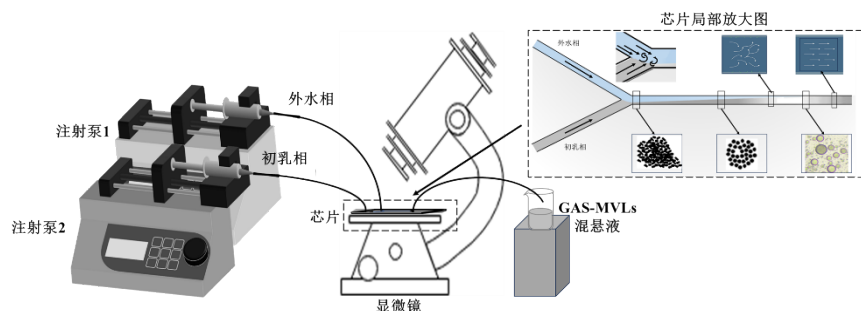


图2 GAS-MVLs制备示意图

Fig. 2 Schematic of GAS-MVLs preparation

2.5.1 芯片结构 分别对微流控芯片(T和Y字型)进行考察(管路内径均为100 μm),微流控芯片结构如图3所示。

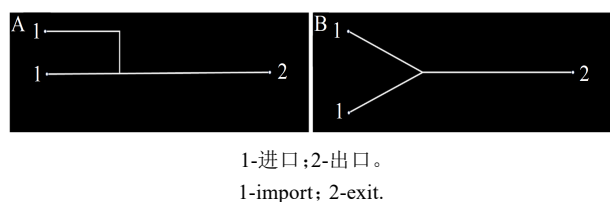


图3 微流控T字型(A)、Y字型(B)芯片示意图

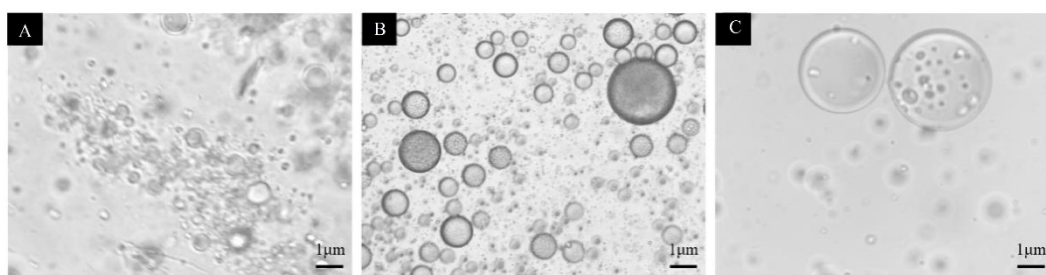
Fig. 3 Schematic diagram of microfluidic T-font (A) and Y-font (B) chips

采用T字型芯片制备时,在混合通道内初乳与外水相无法实现充分混合,无法制备GAS-MVLs。采用Y字型芯片制备时,初乳与外水相混合均匀,可充分乳化,所得GAS-MVLs形态圆整。该结果提示流体进入混合通道的角度对混合效果有显著影响。所以选择Y字型芯片进行GAS-MVLs的制备。

2.5.2 体积流量考察 初乳体积流量固定为

0.6 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$,设置体积流量比间隔为1,通过对外水相体积流量的调控,观察不同体积流量比(外水相:初乳)为10、20、23、25对GAS-MVLs成型性的影响。确定体积流量比后,再考察总体积流量分别为14.40、18.78、21.60 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 对GAS-MVLs成型性的影响。

结果表明,当体积流量比小于10时,初乳相占据微通道,流体无法通过微通道,故外水相初始体积流量为6 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 。外水相体积流量从6 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 增加至15 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$,结果如图4,当体积流量比小于20时,乳化不完全(图4-A);体积流量比为23时,GAS-MVLs的成型性好,结构致密(图4-B);体积流量比大于25时,虽然GAS-MVLs也能成型,但结构松散,不致密(图4-C)。以体积流量比为23,调控总体积流量从14.40 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$ 增加至18.78 $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}$,流体能在通道内充分乳化,形成GAS-MVLs;随总体积流量的继续增大,在微通道上游及管道中发生堵塞现象。



A-体积流量比为20; B-体积流量比为23; C-体积流量比为25。

A- volume flow ratio of 20; B-volume flow ratio is 23; C-volume flow ratio is 25.

图4 体积流量比的考察($\times 400$)

Fig. 4 Examination of flow rate ratios ($\times 400$)

2.6 正交实验优化处方

在预试验基础上,选择对GAS-MVLs成型性影响较大的4个因素,即药脂比(GAS:PC70)(A)、醇脂比(Chol:PC70)(B)、PC70与中性脂质的质量比(PC70:TO)(C)、聚山梨酯80的质量分数(D)为变量设计正交实验,选择的因素水平见表1。

正交实验结果如表2所示,以包封率(检测方法见“2.7.1”项)为指标,极差分析结果显示,各因素对

包封率的影响为 $D>A>B>C$;优化处方为 $A_2B_1C_2D_3$,即药脂比为1:2,醇脂比为1:1,PC70:TO为1:1.5,聚山梨酯80浓度为6%。

2.7 GAS-MVLs的表征

2.7.1 包封率测定 按“2.1.2”项下的方法,测得GAS-MVLs中总GAS含量,记 $W_{\text{总}}$ 。精密量取GAS-MVLs的混悬溶液1 mL,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,测定GAS含量,记 $W_{\text{游}}$ 。计算药物包封率。

$$\text{包封率} = W_{\text{总}} - W_{\text{游}}$$

按最优处方制备3批GAS-MVLs样品,包封率分别为34.20%、35.03%、34.19%,RSD小于5%,表明制备工艺条件稳定可靠。

2.7.2 粒径、PDI测定及形态观察 将制备的GAS-MVLs样品采用贝克曼粒径仪测定GAS-MVLs的粒

表1 因素水平表

Table 1 List of factor levels

水平	A	B	C	D/%
1	1:1	1:1	1:2	2
2	1:2	2:1	1:1.5	4
3	1:3	5:1	1:1	6

表2 正交实验设计及结果					
Table 2 Orthogonal Trial Design and Results					
实验号	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	26.12
2	1	2	2	2	5.53
3	1	3	3	3	20.18
4	2	1	2	3	38.09
5	2	2	3	1	17.12
6	2	3	1	2	15.19
7	3	1	3	2	4.31
8	3	2	1	3	16.36
9	3	3	2	1	3.97
K_1	51.83	68.52	57.67	47.21	
K_2	70.40	39.01	47.59	25.03	
K_3	24.64	39.34	41.61	74.63	
R	15.25	9.84	5.35	16.53	

径和聚合物分散性指数(PDI)。通过光学显微镜观察其形态。

按最优处方制备3批 GAS-MVLs 样品,测得平均粒径为 $(2.09 \pm 0.14) \mu\text{m}$,如图5所示,PDI为 (0.258 ± 0.013) 。表明所制备的 GAS-MVLs 的粒径分布较均匀。GAS-MVLs 形态如图6所示,在光学显微镜下的囊形圆整、结构致密、粒径均匀、无黏连,可见明显的多囊结构。

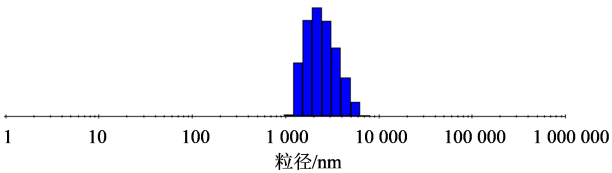


图5 GAS-MVLs 粒径分布
Fig. 5 GAS-MVLs particle size distribution

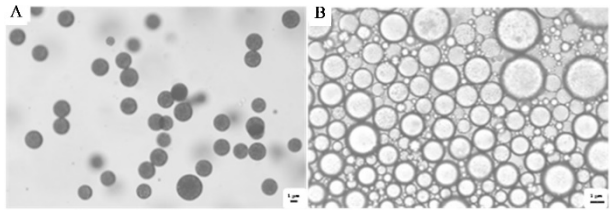


图6 GAS-MVLs 显微镜下照片(A:×200;B:×400)
Fig. 6 Roscopic photographs of GAS-MVLs (A: ×200; B: ×400)

2.8 体外释放

取 GAS-MVLs 3 mL 置于透析袋中,放入 10 mL 溶出介质(PBS, pH 7.4)中,恒温(37℃)水浴振荡,恒速(50 r·min⁻¹),分别于 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0、36.0、48.0、72.0 h 取样 1 mL,同时补加等

温同体积的溶出介质。另设等量的原料药平行组,分别于 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h 取样,同法操作。样品经“2.2”项方法分析,并计算累计释药量。

累计释放曲线见图7,GAS 水溶性较好,在溶出介质中迅速溶解,6 h 的释放量接近 90%。GAS-MVLs 在前 6 小时释放速度较快,随后接近平衡,72 h 最大累积释放率在 65% 左右。该实验结果表明,所制备的 MVLs 可以包封 GAS,使其在一定时间内维持以 GAS-MVLs 的状态存在,这有利于提高 GAS 的血脑屏障透过效率。

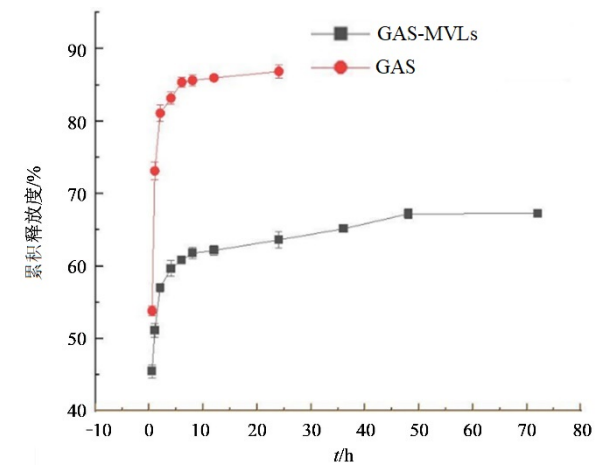


图7 体外释放曲线(n=3)
Fig. 7 In vitro release profiles (n=3)

2.9 初步稳定性

平行制备3批 GAS-MVLs 于室温下保存,分别在 7 d 内取样考察粒径、包封率随着时间的变化情况。结果见表3,GAS-MVLs 的平均粒径缓慢变化,约增大 34%,但无沉淀出现;包封率缓慢下降约 11.2%,表明制备的 GAS-MVLs 稳定性不够理想。在后续开发工作中应重点研究如何增加 GAS-MVLs 的稳定性问题。

表3 GAS-MVLs 稳定性考察($\bar{x} \pm s, n=3$)		
Table 3 GAS-MVLs stability study ($\bar{x} \pm s, n=3$)		
t/d	平均粒径/ μm	包封率/%
0	2.09±0.01	34.47±0.23
1	2.14±0.01	34.30 ±0.23
3	2.36±0.02	33.82 ±0.22
5	2.65±0.02	32.67 ±0.22
7	2.80±0.02	30.58±0.20

2.10 体内药动学研究

2.10.1 组织样品处理 血样处理:摘除小鼠眼球取血 0.5 mL 于抗凝试管中,12 000 r·min⁻¹ 离心

10 min, 取上清液 200 μL , 加入 3 倍量体积的甲醇沉淀蛋白, 涡旋 3 min, 于 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 氮气挥干, 残渣用 100 μL 流动相复溶, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液进样^[18]。

脑组织样处理: 取血后处死小鼠, 分离脑组织并称质量, 加 2 倍量 0.9% 氯化钠溶液制匀浆, 然后按血样方法处理。

2.10.2 色谱条件 色谱柱: supersil ods2- C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 以流动相为乙腈: 0.1% 磷酸水溶液 (3:97) 进行等度洗脱; 检测波长 220 nm; 体积流量 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量 20 μL 。

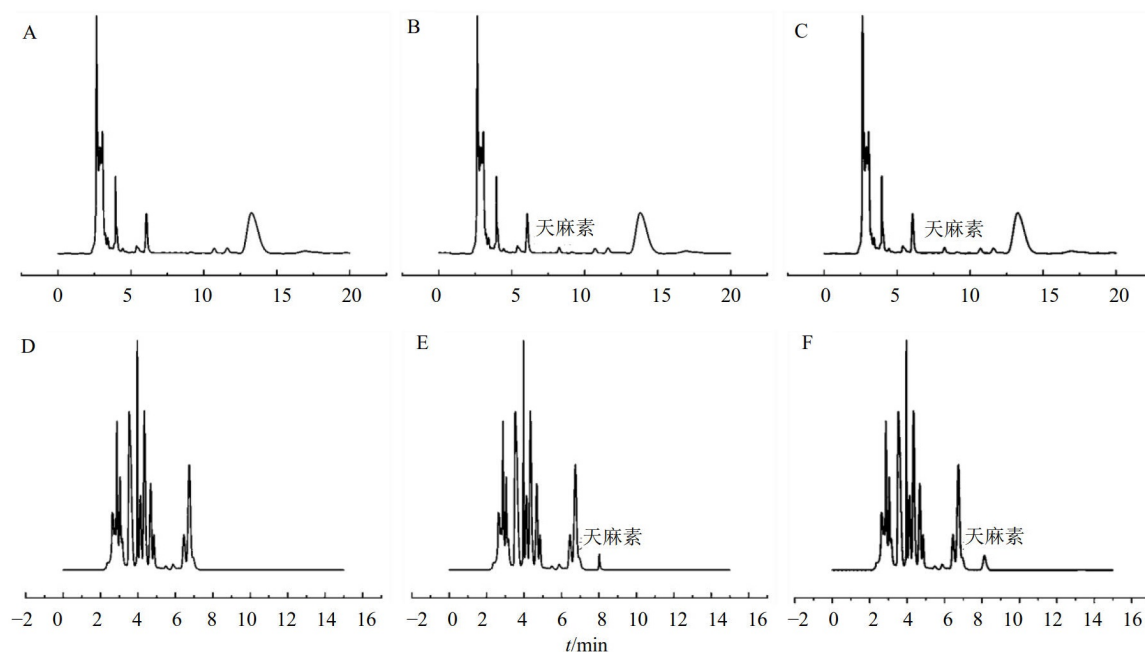
2.10.3 标准曲线的建立 血浆样品标准曲线的建立: 精密吸取空白血浆 200 μL , 加入 GAS 储备液, 配制相当于 1.0、2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GAS 血浆样品, 以 GAS 质量浓度为横坐标, 相应峰面积作纵坐标进行线性回归, 得 GAS 血浆样品回归方程 $y=20.866x+47.93$, $r=0.9994$, 在 1~40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 具有良好的线性关系。

脑组织样品标准曲线的建立: 取小鼠脑空白组织匀浆样品 200 μL , 加入 GAS 储备液, 配制相当于 1、2、3、4、5、6、7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 GAS 脑组织样品, 以 GAS 质量浓度为横坐标, 以相应峰面积作纵坐标进行线性回归, 得 GAS 脑组织样品回归方程 $C=$

$21.082A+19.998$, $r=0.9994$ 。在 1~7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 具有良好的线性关系。

2.10.4 体内方法学考察 参考《中国药典》2020 年版四部通则生物样品定量分析方法, 对血样、脑组织样品的分析方法进行验证^[17]。通过考察空白组织样品与空白组织样品加对照品溶液, 确认本研究方法的专属性。通过精密量取储备液适量加入空白组织样品中, 分别配制成低、中、高质量浓度 (2.5、10、30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的小鼠血样及 3、4、5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的小鼠脑组织样品, 进样分析, 记录峰面积 (A), 考察其稳定性, 日内、日间精密度和回收率^[20]; 相应浓度的对照品溶液进样分析, 记录峰面积 (B), 以 A/B 计算基质效应^[19]。平行制备 5 份低、中、高 (2.5、10、30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 浓度的小鼠血样及 (3、4、5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 浓度的小鼠脑组织样品, 进样分析, 记录峰面积 (A), 考察其重复性。最后根据信噪比法考察检测限和定量限。

专属性考察见图 8, 表明在该方法下内源性杂质及辅料对 GAS 的测定无干扰。样品 7 d 内稳定性 RSD、日内精密度 RSD、日间精密度 RSD、重复性 RSD 值均小于 3.5%, 回收率为 87.24%~100.69%, 基质效应为 86.11%~94.61%, 符合生物样品的分析要求。最低检测限为 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最低定量限为



A-空白血浆加空白MVLs; B-空白血浆加对照品; C-给药后的血浆样品; D-空白脑组织加空白MVLs; E-空白脑组织加对照品; F-给药后的脑组织样品。

A- blank plasma plus blank MVLs; B- blank plasma plus control; C- Plasma sample after administration; D- blank brain tissue plus blank MVLs; E- blank brain tissue plus control substance; F- Sample of brain tissue after dosing.

图 8 小鼠血浆及脑组织样品色谱图

Fig. 8 Chromatograms of mouse plasma and brain tissue sample

0.8 μg·mL⁻¹。表明该方法用于 GAS 的体内分析可行。

2.10.5 脑靶向性评价 取小鼠 60 只,随机分为 2 组:GAS 组、GAS-MVLs 组,以 30 mg·kg⁻¹ 的剂量分别给小鼠 ig 给药,在 5、15、30、60、90、120、150、180、240、300 min 分别眼球取血 0.5 mL,然后立即脱颈处死,取脑组织,每个时间点 3 只。按“2.10.1”项下方法处理血样和脑组织样,进行 HPLC 分析,所得数据经 DAS 2.0 药动力学软件计算,然后计算 Te、Re、Ce 值,对 GAS-MVLs 的脑靶向性进行评价^[20-21]。

$$Te = AUC_{\text{脑}} / (AUC_{\text{脑}} + AUC_{\text{血}})$$
$$Re = AUC_{\text{脑 MVLs}} / AUC_{\text{脑 GAS}}$$
$$Ce = C_{\text{max MVLs}} / C_{\text{max GAS}}$$

药-时曲线见图 9,主要药动力学参数见表 4。GAS-MVLs 的脑组织 AUC 为 GAS 水溶液的 5.68 倍,脑组织 C_{max} 为 GAS 水溶液组的 2.04 倍。GAS-MVLs 的脑组织相对摄取率 Te 值大于其水溶液;GAS-MVLs 的脑内靶向效率 Re 值远大于 1;GAS-MVLs 的脑内峰浓度比 Ce 值远大于 1。结果均表明 GAS-MVLs 能显著提高药物的脑靶向性。

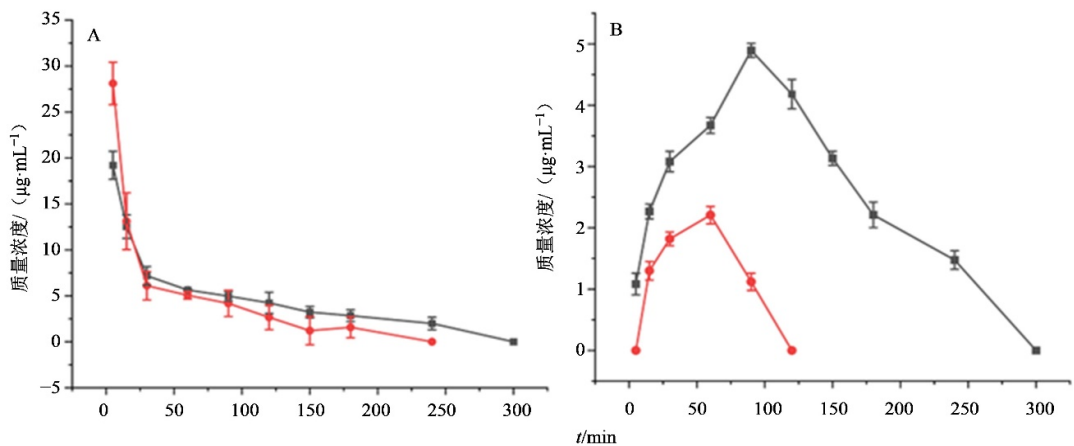


图 9 小鼠给药后的血浆(A)、脑组织(B)药-时曲线 (n=3)
Fig. 9 Plasma (A) and brain tissue (B) drug-time curve after drug administration in mice (n=3)

表 4 GAS 血浆及脑组织中的主要药动力学参数及靶向参数
Table 4 Main pharmacokinetic and targeting parameters of GAS in plasma and brain tissue

参数	单位	GAS-MVLs		GAS 水溶液	
		血浆	脑组织	血浆	脑组织
AUC _{0-∞}	mg·L·h ⁻¹	25.22	14.95	18.03	2.63
t _{max}	h	0.083	1.50	0.083	1.00
C _{max}	mg·h ⁻¹	19.21	4.50	28.11	2.21
Te	—	—	0.37	—	0.13
Re	—	—	5.70	—	—
Ce	—	0.68	2.04	—	—

3 讨论

本研究以三油酸甘油酯、卵磷脂、胆固醇和聚山梨酯 80 为辅料,基于微流控技术采用 Y 型微流控芯片制备了 GAS-MVLs,设置体积流量比为 23,总体积流量为 18.78 mL·h⁻¹,获得了形态圆整、结构致密的 GAS-MVLs。药动力学实验表明,采用 MVLs 荷载 GAS 可提高口服给药途径中 GAS 的脑靶向性,提高 GAS 透过血脑屏障的效率,使 GAS 更多的富集于脑部。这为 GAS 在中枢神经系统疾病的防治中提供了 1 种脑靶向给药的可能,为进一步开发

GAS 口服脑靶向制剂奠定了基础。
MVLs 利用脂质体具有天然血脑屏障渗透性和生物相容性的特性,被动靶向递药实现药物在脑内富集^[21]。GAS-MVLs 透过 BBB 原因可能为:(1)以 MVLs 作为药物载体可以使 GAS 吸附在脑毛细血管壁上,延长了药物在吸收部位的滞留时间,从而提高血管内外药物的浓度梯度,有利于药物通过血管内皮进入脑内;(2)MVLs 产生表面活性作用,增加了血管内皮细胞膜脂质的溶解度,导致膜流动性增加,对药物的通透性也增加,使药物容易透过血

脑屏障;(3)能被脑血管内皮细胞胞饮,将药物传递入脑;(4)聚山梨酯80作为多囊脂质体的稳定剂亦可以抑制某些外排转运体,尤其是P-糖蛋白;这4种机制也可能联合发挥作用^[22-24]。本研究将在下一步采用小鼠脑微细血管内皮细胞及星型胶质细胞共培养建立血脑屏障模型,进一步考察MVLs对血脑屏障的促渗作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] Liu B, Li F, Xu Y Y, et al. Gastrodin improves cognitive dysfunction in REM sleep-deprived rats by regulating TLR4/NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling pathways [J]. Brain Sci, 2023, 13(2): 179.
- [3] 刘海艳, 冯斌, 王济, 等. 天麻素对抑郁症模型小鼠抑郁行为及其相关细胞因子表达的影响 [J]. 中南药学, 2018, 16(2): 166-170.
Liu H Y, Feng B, Wang J, et al. Effect of gastrodin on the depression-like behaviors and the expression of inflammatory factors in mice [J]. Cent South Pharm, 2018, 16(2): 166-170.
- [4] 于涵, 张俊, 陈碧清, 等. 天麻化学成分分类及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5553-5564.
Yu H, Zhang J, Chen B q, et al. Research progress on classification of chemical constituents from *Gastrodia elata* and their pharmacological effects [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(17): 5553-5564.
- [5] 北京脑血管病防治协会, 天麻素制剂临床应用专家共识写作组, 赵性泉, 等. 天麻素制剂临床应用中国专家共识(2021) [J]. 中华老年医学杂志, 2021, 7(4): 407-415.
Beijing Stroke Association, Writing Group of Expert Consensus on Clinical Application of Gastrodin Preparations, Zhao X Q, et al. Chinese expert consensus on clinical application of Gastrodin preparations (2021) [J]. Chin J Geriatr, 2021, 7(4): 407-415.
- [6] 黄静, 何文, 李秀芳, 等. 天麻素纳米脂质体的研制及其脑靶向性的初步研究 [J]. 广东药学院学报, 2011(4): 345-350.
Huang J, He W, Li X F, et al. Study on the preparation and brain targeting property of gastrodin nanoliposomes [J]. Acad J Guangdong Coll Pharm, 2011(4): 345-350.
- [7] Bangham A D, Standish M M, Watkins J C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids [J]. J Mol Biol, 1965, 13(1): 238-252.
- [8] 张晨曦, 董露, 卢雨洁, 等. VC脂质体水凝胶的制备及其消化特性研究 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 80-88.
Zhang C X, Dong L, Lu Y J, et al. Preparation and digestibility of VC-loaded liposomal hydrogels [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2021, 21(2): 80-88.
- [9] Luo Y L, Liu Z B, Zhang X Q, et al. Effect of a controlled-release drug delivery system made of oleanolic acid formulated into multivesicular liposomes on hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 3111-3129.
- [10] Hall J S, Turnbull D J, Grigsby Jr J J, et al. Manufacturing of bupivacaine multivesicular liposomes: US11185506 [P]. 2021-11-30.
- [11] Riordon J, Sovilj D, Sanner S, et al. Deep learning with microfluidics for biotechnology [J]. Trends Biotechnol, 2019, 37(3): 310-324.
- [12] Deng N N, Yelleswarapu M, Huck W T S. Monodisperse uni- and multicompartment liposomes [J]. J Am Chem Soc, 2016, 138(24): 7584-7591.
- [13] Luo S C, Wang Y, Kankala R K, et al. Fabricating highly open porous microspheres (HOPMs) via microfluidic technology [J]. J Vis Exp, 2022(183): e63971.
- [14] Mohd Isa N S, El Kadri H, Vigolo D, et al. Optimisation of bacterial release from a stable microfluidic-generated water-in-oil-in-water emulsion [J]. RSC Adv, 2021, 11(13): 7738-7749.
- [15] 王哲豪, 周靖娥, 王镜. 微流控技术用于制备稳定核酸脂质纳米粒(SNALP) [J]. 实验技术与管理, 2022, 39(7): 57-62.
Wang Z H, Zhou J E, Wang J. Microfluidic technology for preparation of stable nucleic acid lipid nanoparticles (SNALP) [J]. Exp Technol Manag, 2022, 39(7): 57-62.
- [16] Zhang H, Yang J, Sun R Z, et al. Microfluidics for nano-drug delivery systems: From fundamentals to industrialization [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(8): 3277-3299.
- [17] 中国药典[S]. 四部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020.
- [18] 高羚毓, 贾瑞欣, 毕野, 等. 丹参酮II_A聚合物脂质纳米粒制备及脑部药物递送研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 909-917.
Gao L Y, Jia R X, Bi Y, et al. Study on preparation of tanshinone II_A polymer lipid nanoparticles and brain delivery [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(5): 909-917.
- [19] 印登阳, 黄继勋, 陈凯霞, 等. 人血浆中枸橼酸HPLC测定方法建立及其在连续性肾脏替代疗法患者行局部枸橼酸钠抗凝中的应用 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(2): 384-389.
Yin D Y, Huang J X, Chen K X, et al. Establishment of

- HPLC method for determination of citric acid in human plasma and its application in local sodium citric acid anticoagulation in patients with continuous renal replacement therapy [J]. Drug Eval Res, 2023, 46(2): 384-389.
- [20] 韩德恩, 辛玉凤, 田萍, 等. 甘草次酸修饰大黄素纳米结构脂质载体制备及药动学和肝靶向评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(2): 136-141.
- Han D E, Xin Y F, Tian P, et al. Preparation of glycyrrhetic acid modified emodin nanostructured lipid carrier and its pharmacokinetic and liver targeting evaluation [J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(2): 136-141.
- [21] 杨旭, 邹灵辉, 丁文雅, 等. 跨血脑屏障脂质体与纳米胶束靶向载药系统的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 5965-5977.
- Yang X, Zou L H, Ding W Y, et al. Research progress on liposome and nanomicelle targeted drug delivery system across blood-brain barrier [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(22): 5965-5977.
- [22] Ghosh S, Lalani R, Patel V, et al. Surface engineered liposomal delivery of therapeutics across the blood brain barrier: Recent advances, challenges and opportunities [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2019, 16(12): 1287-1311.
- [23] 高科攀, 蒋新国. 载药纳米粒的脑内递药系统 [J]. 中国新药与临床杂志, 2004, 23(4): 246-250.
- Gao K P, Jiang X G. Brain-targeted drug delivery system of drug-loading nanoparticles [J]. Chin J N Drugs Clin Remedies, 2004, 23(4): 246-250.
- [24] 王永辉, 翟建国. 脑靶向药物递送的原理与方法 [J]. 医学理论与实践, 2013, 26(2): 164-165, 173.
- Wang Y H, Zhai J G. Principles and methods of brain-targeted drug delivery [J]. J Med Theory Pract, 2013, 26(2): 164-165, 173.

[责任编辑 兰新新]