

藤黄酸长循环脂质体制备及药动学研究

王立英, 刘雨萌, 吴丽艳, 赵成国, 王艳珍, 金元宝*

吉林大学珠海学院, 广东 珠海 519041

摘要:目的 优化藤黄酸长循环脂质体制备工艺, 并对其体外释放及体内药动学进行研究。方法 建立藤黄酸定量测定方法; 以藤黄酸包封率作为考察指标, 采用 Box-Behnken 试验设计优化脂质体组方, 得到藤黄酸包封率最高的处方; 采用电镜扫描观察藤黄酸脂质体表面形态, 采用透析法对脂质体体外释放进行研究, 测定藤黄酸在 15 d 内的稳定性; 雄性 Wistar 大鼠尾静脉分别注射 1 mg/mL 藤黄酸、藤黄酸脂质体后, 采用 UPLC-MS/MS 方法测定血药浓度, 比较 2 种药物药动学参数差异。结果 Box-Behnken 优化后脂质体最优处方为胆固醇 444 mg、蛋黄磷脂酰胆碱 1 823 mg 和二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 705 mg, 脂质体包封达到 92.3%, 脂质体粒径均一, 表面光滑; 体外释放结果表明脂质体可以平缓释放, 且具有长效作用, 在 15 d 内储存稳定; 脂质体中藤黄酸的体内半衰期为 9.97 h, 是藤黄酸的 4.43 倍; 脂质体中藤黄酸的 AUC_{0-24h} 为 22.55 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, 是藤黄酸的 4.73 倍。结论 藤黄酸脂质体与原料药相比具有长循环、血药浓度高、释放平缓等特点。

关键词: 藤黄酸; 长循环脂质体; 中心组合; 药动学; Box-Behnken 试验设计; 体外释放; UPLC-MS/MS

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)08-1309-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.010

Preparation and pharmacokinetics of gambogic acid long-circulating liposomes

WANG Li-ying, LIU Yu-meng, WU Li-yan, ZHAO Cheng-guo, WANG Yan-zhen, JIN Yuan-bao

Zhuhai College of Jilin University, Zhuhai 519041, China

Abstract: Objective To optimize the preparation process of gambogic acid (GA) liposomes and study the *in vitro* and *in vivo* release. **Methods** The detection method of GA was established, using the Box-Behnken experiment design to optimize liposomes formula, GA liposomes were obtained with the highest encapsulation efficiency; Using scanning electron micrographs (SEM) to observe liposome surface morphology, using the dialysis method to study the liposome release *in vitro*, we also measured the stability of liposome in 15 d; Male Wistar rats were injected with GA or GA liposomes (1 mg/mL) via tail vein, UPLC-MS/MS method was used to determine the drug concentration, and differences in pharmacokinetic parameters of the two drugs were compared. **Results** After Box-Behnken optimization, the encapsulation efficiency of liposomes was 92.3%, and the optimized liposomes formula is cholesterol of 440 mg, egg phosphatidylcholine of 1823 mg, and istearoyl phosphoethanolamine-PEG 2000 of 705 mg, liposomes had uniform particle size and smooth surface; *In vitro* release results showed that the liposomes could be gentle and slowly release and had a long-term effect. The liposomes were stable keeping in 4 °C within 15 d; In *in vivo* study, the half-life of GA liposome was 9.97 h, 4.43 times of GA; AUC_{0-24h} of GA liposome was 22.55 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, 4.73 times of GA. **Conclusion** Compared with GA, GA liposome has the characteristics of long-circulating, high blood drug concentration, and could release smoothly.

Key words: gambogic acid; long-circulating liposome; central composite design; pharmacokinetics; Box-Behnken test design; *in vitro* release; UPLC-MS/MS

天然产物及其衍生物在人类健康与医药发展方面扮演着越来越重要的作用, 藤黄是藤黄科植物藤黄树干经切伤后所分泌的干燥树脂, 藤黄酸 (GA) 作为藤黄的主要成分具有多种生物活性, 包括维持机体稳态、抗炎、解毒^[1], 近年来发现藤黄酸对多种肿瘤具有显著的抑制作用, 如肝癌^[2]、胃癌、乳腺

癌^[3]、肺癌、鼻咽癌和胰腺癌, 藤黄酸通过抑制细胞蛋白酶体活性, 抑制核因子- κB (NF- κB) 信号通路^[2], 抑制肿瘤血管内皮细胞增生^[4]等机制抑制肿瘤生长。然而藤黄酸在水中溶解度很小, 仅为 10 $\mu\text{g/mL}$ ^[5-6], 藤黄酸对高温、稀碱、有机溶剂等环境条件敏感, 在其常用溶解溶剂乙醇中 8 h 也会降解 20%。藤黄

收稿日期: 2015-11-28

作者简介: 王立英, 硕士研究生, 实验师, 主要研究方向为微生物与生物技术制药。Tel: 13631272000 E-mail: 65100784@qq.com

*通信作者 金元宝, 硕士研究生, 实验师, 主要研究方向为天然药物提取及剂型开发。Tel: 13425058878 E-mail: 52699501@qq.com

酸口服生物利用度极低, 静脉给药藤黄酸在大鼠体内消除半衰期为 15 min, 藤黄酸的血浆蛋白结合率为 31.1%, 血浆清除速率快, 组织分布广泛, iv 给药后藤黄酸主要通过胆汁排泄, 在大鼠的胆汁中检测到藤黄酸的 4 个代谢物, 给药后 16 h 内藤黄酸在胆汁中的平均累积排泄百分率为 36.5%^[7]; 藤黄酸静脉直接注射时存在血管刺激性^[8], 病人顺应性差。

虽然目前已经有文献报道藤黄酸胶束、磁性 Fe₃O₄ 粒子、混悬制剂、口服乳铁蛋白等剂型^[9-12], 但它们与脂质体相比存在不能静脉给药、粒径大、血液循环时间短、制剂稳定性差、药物包封率低等缺点, 因此本实验制备长循环脂质体制剂^[13]以改善藤黄酸原料药的制剂学缺点, 同时进行了处方优化和大鼠体内药动学评价。

1 仪器与材料

TQ-S 三重四级杆质谱仪、Acquity UPLC 超高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; 恒温水浴, 江苏金坛医疗仪器厂; Mini spin 型高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; MD-200-2 型氮气吹干仪, 杭州奥盛仪器有限公司; BS224S 型电子分析天平, 德国赛多利斯公司; Nicomp 380DLS 激光粒度分析仪, 美国 PSS 公司; JSM-6700F 扫描电子显微镜(SEM), 日本 JEOL 公司; 高效液相色谱仪, 日本岛津 LC-solution; 切向流超滤系统, Sartorius Stedim Biotech; Optima MAX-XP 超速离心机, Beckman Coulter Inc., Pasadena, CA, 美国。

藤黄酸对照品(批号 ZL20150713, 质量分数 98%)、雷公藤红素对照品(批号 ZL20150615, 质量分数 98%), 藤黄酸原料药(95%, 批号 20150409)、雷公藤红素原料药(95%, 批号 20150326), 深圳市牌牌科技有限公司; 蛋黄磷脂酰胆碱(PC), 质量分数 80% 以上, 广州汉方现代中药研究开发有限公司; 胆固醇, 上海宝曼生物科技有限公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG 2000), 西安瑞禧生物科技有限公司; 聚乙二醇 400 (PEG 400), 辽宁奥克医药辅料有限公司; 羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 国药集团化学试剂有限公司; 醋酸乙酯(质量分数 99.9%)、乙腈(色谱级)、甲醇(色谱级)、甲酸(质量分数 99.9%), 美国 Sigma 公司; 盐酸、乙醇等化学试剂均为分析纯, 化学试剂国药控股有限公司。健康成年雄性 Wistar 大鼠, (250±5) g, 购自吉林大学实验动物中心, 许可证号 SCXK-(辽)2013-0003。

2 方法与结果

2.1 藤黄酸长循环脂质体制备

称取不同处方量的胆固醇、PC、DSPE-PEG 2000 等成膜材料和藤黄酸 300 mg, 溶于 160 mL 有机溶剂乙醇中作为有机相; 在 35 °C 水浴下, 将上述有机相注入到磷酸缓冲溶液(PBS, 水相)中, 按 1:10 油水比进行混合, 混合后继续搅拌 30 min, 除去残留乙醇, 超滤法将体积浓缩至 300 mL, 得到藤黄酸长循环脂质体混悬液^[14-15]。

2.2 粒径及表面形态测定

采用 Nicomp 电位/粒度仪来测量藤黄酸长循环脂质体粒径大小。测定温度 23 °C, 黏度设置 1.333 cP, 采用高斯分布测定粒径值。激光粒度分析结果显示其平均粒径为 (121.7±11.2) nm, 多分散系数(PDI)为 0.153±0.017, 脂质体粒径分布较窄。粒径分布如图 1 所示。

将脂质体溶液滴加到大小适中的硅片上, 室温干燥。在硅片样品表面镀金增强导电性, 贴上导电胶后置于样品室, 选择加速电压为 3.0 kV, 采用扫描电镜观察前体脂质体的表面形态。SEM 观察结果如图 2 所示, 藤黄酸脂质体近似于球形, 大小均一, 表面光滑。

2.3 脂质体包封率、载药量测定

采用超速离心法分离脂质体与游离药物, 测定

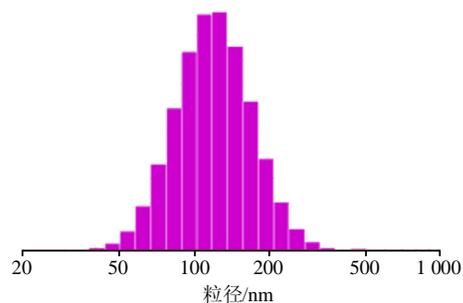


图 1 藤黄酸脂质体粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of GA liposomes

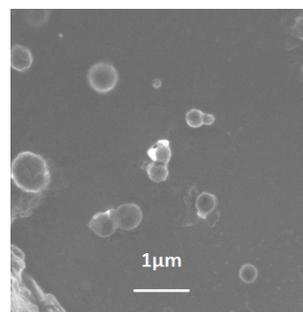


图 2 藤黄酸脂质体 SEM 图 (×10 000)

Fig. 2 SEM of GA liposomes (×10 000)

药物包封率^[15]，先将藤黄酸长循环脂质体混悬液用盐酸调至 pH 值约 1.2，使脂质体凝聚，然后 4 ℃、200 000×g 超速离心 30 min，上清液为游离药物，沉淀为脂质体。按“2.4”项色谱条件测定上清液中游离藤黄酸的质量浓度 (C₁)。

取脂质体溶液 1 mL 加入 0.5 mL 乙腈，涡旋 1 min 使脂质体完全破乳，按“2.4”项色谱条件测定溶液中藤黄酸的总质量浓度 (C₀)。超滤后藤黄酸脂质体体积为 V₀，脂质体组方中加入的脂质体质量为 W₀。

$$\text{包封率} = 1 - C_1/C_0$$

$$\text{载药量} = (C_0 - C_1)V_0/W_0$$

2.4 藤黄酸的测定方法

色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；以甲醇-0.1%冰醋酸溶液 (93:7) 为流动相；检测波长为 360 nm，柱温 35 ℃，总运行时间 10 min，进样量为 20 μL，理论塔板数按藤黄酸计算应不低于 3 000^[16]。以 50% 乙腈溶液作为溶剂制备供试品，以藤黄酸峰面积为纵坐标 (Y)，藤黄酸质量浓度为横坐标 (X)，通过外标法绘制标准曲线，藤黄酸在质量浓度为 5~100 μg/mL 线性良好，线性回归方程为 Y=182 534 X+86 228, R²=0.999 1；在已知量的藤黄酸溶液 (45 μg/mL) 中加入 100% 的藤黄酸对照品，计算加样回

收率为 101.60%，RSD 值为 0.57%；45 μg/mL 的供试品溶液连续 6 次测定精密密度 RSD 值为 0.62%；45 μg/mL 的供试品溶液分别配制 6 次测定重复性 RSD 值为 0.76%；分别于供试品 (45 μg/mL) 制备后 0、0.5、1、1.5、2、4 h 测定其稳定性，RSD 值为 0.79%。

2.5 脂质体处方优化

在单因素试验的基础上，固定藤黄酸加入量 300 mg，对 3 个影响藤黄酸包封率 (Y) 的主要因素进行优化，即胆固醇用量 (X₁)、PC 用量 (X₂)、DSPE-PEG 2000 用量 (X₃)。采用 Box-Behnken 设计 (BBD) 3 因素 3 水平共 15 组试验，如表 1 所示。测定不同实验条件对包封率影响，然后建立数学模型优化影响包封率的实验因素得到最优组方。利用响应面方法 (RSM) 分析 3 个因素之间的相互影响关系，最后验证试验得到的最优组合。BBD 方案及试验结果采用 SAS 9.2 软件计算。

BBD 方案的 15 组试验结果见表 1，回归分析结果见表 2。模型 P 值小于 0.01, R²=97.48%，表明模型具有一定的准确性和可行性，该模型拟合程度良好，实验误差很小，可以用此模型进行分析和预测。得到多元二次回归方程为 Y=92.45-3.85 X₁+2.20 X₂-0.12 X₃-4.61 X₁²+1.77 X₁X₂-4.00 X₁X₃-8.59 X₂²-1.09 X₂X₃-3.61 X₃²。

由表 2 可知，模型的 1 次项 X₁、X₂，交互项 X₁X₃，

表 1 BBD 方案及试验结果

Table 1 Matrix of BBD and corresponding test results

试验号	X ₁ /mg	X ₂ /mg	X ₃ /mg	Y/%	试验号	X ₁ /mg	X ₂ /mg	X ₃ /mg	Y/%	试验号	X ₁ /mg	X ₂ /mg	X ₃ /mg	Y/%
1	300 (-1)	1 400 (-1)	600 (0)	83.11	6	600 (0)	1 400 (-1)	1 000 (1)	80.41	11	300 (-1)	1 800 (0)	1 000 (1)	90.11
2	300 (-1)	2 200 (1)	600 (0)	84.65	7	600 (0)	2 200 (1)	200 (-1)	82.26	12	900 (1)	1 800 (0)	1 000 (1)	75.97
3	900 (1)	1 400 (-1)	600 (0)	70.31	8	600 (0)	2 200 (1)	1 000 (1)	81.96	13	600 (0)	1 800 (0)	600 (0)	93.02
4	900 (1)	2 200 (1)	600 (0)	78.91	9	300 (-1)	1 800 (0)	200 (-1)	84.48	14	600 (0)	1 800 (0)	600 (0)	91.98
5	600 (0)	1 400 (-1)	200 (-1)	76.35	10	900 (1)	1 800 (0)	200 (-1)	86.35	15	600 (0)	1 800 (0)	600 (0)	92.34

表 2 回归分析结果

Table 2 Statistical results of regression analysis

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值	方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	P 值
X ₁	1	118.66	118.66	38.47	0.001 60	回归	9	595.83	66.20	21.46	0.001 80
X ₂	1	38.72	38.72	12.55	0.017 00	线性	3	157.50	52.50	17.02	0.004 70
X ₃	1	0.12	0.12	0.04	0.850 00	平方	3	357.04	119.01	38.58	0.000 70
X ₁ ²	1	78.46	78.46	25.44	0.004 00	交互	3	81.29	27.10	8.79	0.019 00
X ₁ X ₂	1	12.46	12.46	4.04	0.100 00	参差	5	15.42	3.08		
X ₁ X ₃	1	64.08	64.08	20.78	0.006 10	失拟项	3	14.86	4.95	17.76	0.054 00
X ₂ ²	1	272.58	272.58	88.37	0.000 23	纯误差	2	0.56	0.28		
X ₂ X ₃	1	4.75	4.75	1.54	0.270 00	总离差	14	611.26			
X ₃ ²	1	48.11	48.11	15.60	0.011 00						

2 次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)，表明各个自变量与因变量之间不是简单的线性关系，具有一定的交互作用，可以优化得到最优的 Y ；失拟项检验不显著，表明该回归模型没有过拟合，能够准确地预测不同条件下藤黄酸长循环脂质体的 Y 。

回归分析结果的响应曲面图如图 3 所示。从图 3 中可以在检测范围内观测到 3 个响应曲面均为开口向下的凸形曲面，在优化参数范围内响应值 (Y) 存在极高值，说明脂质体包封率的最优条件存在于所设计的因素水平范围之内。图 3-B 中等高线呈椭圆形，且坐标轴与椭圆形的轴线之间存在着显著的夹角，表明这 2 个因素 (X_1X_3) 之间存在显著的交互作用。计算得到最优提取条件的编码值为 $X_1 =$

-0.52079 ， $X_2 = 0.057861$ ， $X_3 = 0.26286$ ，即最佳处方为胆固醇 444 mg、PC 1 823 mg 和 DSPE-PEG 2000 705 mg，同时由回归方程得到包封率的预测值为 93.5%。为进一步检验 BBD 试验模型预测的准确性与可行性，采用最优处方配比制备藤黄酸长循环脂质体，进行 3 次平行的验证试验，包封率分别为 92.8%、91.9%、92.2%，平均包封率为 92.3%，与预测值的相对误差为 1.28%。藤黄酸质量浓度分别为 0.97、0.95、0.98 mg/mL，载药量分别为 8.81%、8.58%、8.82%。

2.6 体外释放研究

采用透析法研究脂质体体外释放情况，用 NaHCO_3 和 EDTA 溶液洗去透析袋（相对分子质量

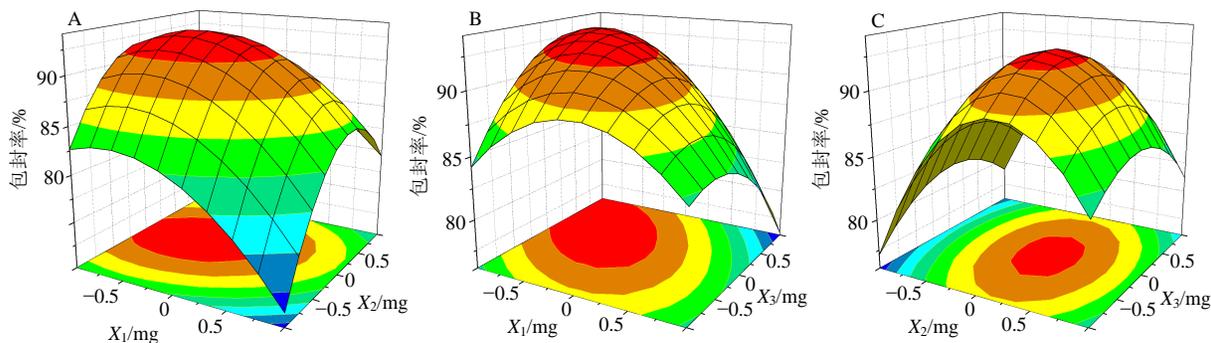


图 3 响应面和等高线图

Fig. 3 Response surfaces and contours

截留量 12 000~14 000) 上残留的甘油和杂质，取 2 mL 脂质体悬浮液置于透析袋中并加入 0.2% 的 CMC-Na，释放介质为 5% 牛血清的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 500 mL，37 °C 恒温，搅拌速度 300 r/min。在固定的时间点吸取 1 mL 透析溶液，同等数量的新鲜释放介质补充到缓冲溶液中。

2.6.1 供试品溶液制备 脂质体溶液制备：在质量浓度为 1 mg/mL 的藤黄酸脂质体中加入 0.2% 的 CMC-Na 配制成供试品溶液，在“2.6”项条件下测定其释放率。对照品溶液制备：对照样品采用 0.2% 的 CMC-Na 配制成 1 mg/mL 藤黄酸溶液，并在与脂质体相同条件下测定其释放率。

2.6.2 UPLC-MS/MS 方法测定藤黄酸^[17-18]

(1) 质谱条件：ESI 电离源，正离子扫描，喷雾电压 3.0 kV，碰撞电压 30 V，源温度 150 °C，源温度 500 °C，锥孔气体体积流量 150 L/h，碰撞气体体积流量 0.15 mL/min，扫描方式为多反应监测 (MRM)，用于检测的离子为 m/z 451.3→201.1 (雷公藤红素，内标)^[19]， m/z 629.1→573.2 (藤黄酸)^[18]。

(2) 液相条件：流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液，用 0.22 μm 滤膜滤过；流动相以 0.35 mL/min 的体积流量通过 Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司)，柱温为 30 °C。0~1 min, 10%~90% 甲醇；1~4 min, 90% 甲醇；4~5 min, 90%~10% 甲醇；自动进样器温度为 10 °C，进样量为 5 μL。

(3) 线性关系及方法学考察：以藤黄酸峰面积积分值/雷公藤红素峰面积积分为纵坐标 (Y)，藤黄酸质量浓度为横坐标 (X)，采用内标法绘制标准曲线，藤黄酸在 5~5 000 ng/mL 线性关系良好，回归方程为 $Y = 0.0049X + 0.0052$ ， $R^2 = 0.9993$ ；在已知量的藤黄酸溶液 (2 000 ng/mL) 中加入 100% 的藤黄酸对照品，计算加样回收率为 98.30%，RSD 值为 1.62%；低、中、高质量浓度 (10、1 000、4 800 ng/mL) 样品的准确度 (分别制备了 6 个供试品，然后测定其质量浓度，计算测定值与理论值间的差异) 分别为 97.65%、98.47%、100.10% ($n = 6$)，精密密度 RSD 为 1.48%、1.25%、0.63% ($n = 6$)。

2.6.3 体外释放测定结果 脂质体与原料药在 PBS 中释放如图 4 所示, 脂质体 48 h 累积释放率大于 95%, 4 h 累积释放率约为 50%, 与原料药相比释放平缓、长效。0~5 h 内脂质体释放较快, 5~12 h 释放速度减慢, 初始释放较快可能是因为脂质体制剂中存在一定量的游离药物所致。

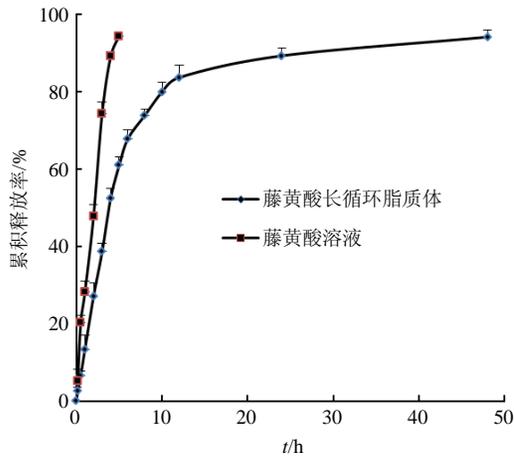


图 4 藤黄酸脂质体体外累积释放率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 4 Release of GA liposomes *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.7 脂质体稳定性考察

将 3 批藤黄酸长循环脂质体封于西林瓶中, 在温度 4 °C 条件下保存, 连续考察 15 d, 每 5 天取样测定包封率、平均粒径、藤黄酸质量浓度。结果如表 3 所示。3 批藤黄酸长循环脂质体在温度 4 °C 条件下保存 15 d 后, 外观无明显变化, 粒径无明显变大, 脂质体渗漏、藤黄酸降解均小于 5%, 说明脂质体可以提高藤黄酸的稳定性。

表 3 藤黄酸脂质体稳定性
Table 3 Stability of GA liposomes

t/d	平均粒径/nm	包封率/%	藤黄酸/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
0	119.2 \pm 10.4	92.4 \pm 0.3	0.99 \pm 0.03
5	121.6 \pm 11.2	91.8 \pm 0.4	0.99 \pm 0.06
10	126.8 \pm 13.7	89.2 \pm 0.6	0.97 \pm 0.04
15	130.4 \pm 12.1	88.1 \pm 0.6	0.95 \pm 0.07

2.8 体内药动学研究

将藤黄酸溶于乙醇中制成质量浓度 100 mg/mL 溶液, 再用 PEG 400 稀释至 1 mg/kg^[18], 将 12 只雄性 Wistar 大鼠随机分成 2 组, 一组尾 iv 藤黄酸溶液 1 mg/kg, 另一组尾 iv 藤黄酸长循环脂质体溶液 1 mg/kg, 给药后 5、10、20、30 min 及 1、2、4、6、8、10、12、24 h 大鼠眼眶采血 0.2 mL, 加入肝素钠抗凝, 2 827 \times g 离心 10 min, 分离血浆, 备用。

取血浆 50 μL , 加入 300 ng/mL 雷公藤红素内标溶液 10 μL , 漩涡混合 2 min, 加入醋酸乙酯 1 mL, 漩涡混合 1 min, 6 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层有机相, 37 °C 氮气吹干, 加入 50% 甲醇 100 μL 复溶, 6 000 r/min 离心 10 min, 取 80 μL 样品待测。

采用“2.6.2”项 UPLC-MS/MS 方法测定血浆中藤黄酸。对 UPLC-MS/MS 方法可行性进行验证, 方法专属性良好, 无内源性干扰; 最低定量限 5 ng/mL; 以藤黄酸峰面积积分值/雷公藤红素峰面积积分为纵坐标 (Y), 藤黄酸质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 藤黄酸在 5~1 000 ng/mL 线性关系良好, 回归方程为 $Y=0.0034X+0.0137$, $R^2=0.9996$; 低、中、高质量浓度 (10、40、800 ng/mL) 样品的准确度分别为 91.54%、104.58%、101.05% ($n=6$), 精密度 RSD 分别为 3.87%、6.19%、6.02% ($n=6$); 平均回收率分别为 71.79%、69.93%、68.88% ($n=6$); 基质效应 (对照品峰面积为 A, 相同质量浓度的对照品加入到处理过的血浆中测得的峰面积为 B, B 与 A 的比值为基质效应, 通过基质效应评价血浆中内源性物质对检测的影响) 结果分别为 95.31%、90.48%、94.31% ($n=6$); 内标 (300 ng/mL) 的平均回收率和基质效应分别为 76.78% 和 96.77% ($n=6$)。

大鼠尾 iv 藤黄酸溶液和与藤黄酸长循环脂质体的药时曲线见图 5。采用 Winnonlin 5.2 药动学分析软件计算药动学参数, 主要药动学参数以非房室模型计算结果见表 4。结果表明, 藤黄酸长循环脂质体血药浓度明显高于普通制剂, 半衰期为 9.97 h, 是藤黄酸的 4.43 倍; 脂质体中藤黄酸的 $\text{AUC}_{0\sim 24\text{h}}$ 为 22.55 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$, 是藤黄酸的 4.73 倍。

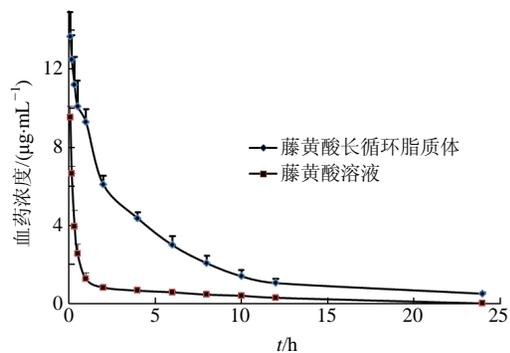


图 5 大鼠 iv 藤黄酸溶液和藤黄酸长循环脂质体药时曲线 ($n = 6$)
Fig. 5 Concentration-time curves of rats after administration with GA long-circulating liposomes or GA in rats ($n = 6$)

表 4 藤黄酸及藤黄酸长循环脂质体在大鼠体内主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Main pharmacokinetic parameters after administration with GA long-circulating liposomes or GA in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	藤黄酸	藤黄酸脂质体
$t_{1/2\alpha}$	h	2.25 ± 0.15	9.97 ± 1.83
V	mL	66.64 ± 4.94	56.40 ± 13.57
CL	mL·h ⁻¹	20.52 ± 0.62	3.89 ± 0.40
AUC _{0~24h}	μg·h·mL ⁻¹	12.17 ± 0.35	57.62 ± 6.34

3 讨论

藤黄酸在抗炎、抗肿瘤、自身免疫疾病等领域具有良好的效果,但其水溶性差、稳定性低、血浆清除快、组织分布广和血管刺激性劣势限制其临床应用。本实验通过乙醇注入法将藤黄酸制成长循环脂质体制剂,以改进其治疗效果。采用 BDD 和 RSM 用来分析 3 个对脂质体包封率影响较大的因素,得到最优的藤黄酸脂质体组方,包封率为 92.3%。脂质体平均粒径为 121.7 nm,呈正态分布且分布较窄,电镜扫描结果表明,脂质体形态较好呈圆形或椭圆形微粒,体外释放研究表明,脂质体释放稳定、平缓。

藤黄酸脂质体采用聚乙二醇修饰,制成“隐形”脂质体,在体内减少被吞噬细胞识别的几率,相对于藤黄酸具有较长的半衰期、较高的血药浓度和较低的清除率。藤黄酸长循环脂质体水溶性较好,与藤黄酸相比在外周室分布的药物较少,初始血药浓度较高。本实验制备的藤黄酸长循环脂质体包封率高、体外释放稳定、体内循环时间长,具有良好的临床应用前景。

参考文献

[1] 杨企铮,贾淑杰,李德华. 中药藤黄的近代研究 [J]. 中国肿瘤临床, 1994(6): 464-466.

[2] Park M S, Kim N H, Kang C W, *et al.* Antimetastatic effects of gambogic acid are mediated via the actin cytoskeleton and NF-κB pathways in SK-HEP1 cells [J]. *Drug Develop Res*, 2015, 76(3): 132-142.

[3] Wang S P, Wang L, Chen M W, *et al.* Gambogic acid sensitizes resistant breast cancer cells to doxorubicin through inhibiting P-glycoprotein and suppressing survivin expression [J]. *Chem-Biol Interact*, 2015, 235: 76-84.

[4] Lu N, Hui H, Yang H, *et al.* Gambogic acid inhibits angiogenesis through inhibiting PHD2-VHL-HIF-1α pathway [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 49(2): 220-226.

[5] Yin D K, Yang Y, Cai H X, *et al.* Gambogic acid-loaded

electrosprayed particles for site-specific treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Pharm*, 2014, 11(11): 4107-4117.

[6] 侯文洁,陈保来,赵祎武,等. 藤黄酸稳定性研究 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1755-1758.

[7] 郝琨,柳晓泉,王广基. 藤黄酸在大鼠体内的药代动力学 [J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(4): 338-341.

[8] Yao J, Li Y K, Sun X J, *et al.* Nanoparticle delivery and combination therapy of gambogic acid and all-trans retinoic acid [J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9(1): 3313-3324.

[9] 张文君,吴凡,王鑫,等. 星点设计-效应面法优化藤黄酸纳米混悬剂处方 [J]. 中国药剂学杂志: 网络版, 2014, 12(2): 43-51.

[10] 王盈. 用于口服给药的藤黄酸-乳铁蛋白纳米粒 [J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(4): 332.

[11] Zhu X, Zhang C, Wu X L, *et al.* Preparation, physical properties, and stability of gambogic acid-loaded micelles based on chitosan derivatives [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2008, 34(1): 2-9.

[12] Wang C L, Zhang H J, Chen Y, *et al.* Gambogic acid-loaded magnetic Fe₃O₄ nanoparticles inhibit Panc-1 pancreatic cancer cell proliferation and migration by inactivating transcription factor ETS1 [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 781-787.

[13] 程怡,吴琼,余秋强,等. Box-Behnken 效应面法优化多西他赛长循环脂质体处方 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 1946-1950.

[14] 方玲,孟楣,夏伦祝,等. 新藤黄酸脂质体冻干粉的制备及其包封率测定 [J]. 安徽医药, 2009, 13(6): 596-598.

[15] 王淑娟. 雷公藤甲素脂质体的制备及质量的初步研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2010.

[16] 张文君,寇永强,朱鹏举. 藤黄有效成分——藤黄酸的研究进展 [J]. 中国药剂学杂志, 2013, 11(6): 121-129.

[17] Zheng B, Teng L R, Xing G Y, *et al.* Proliposomes containing a bile salt for oral delivery of *Ginkgo biloba* extract: Formulation optimization, characterization, oral bioavailability and tissue distribution in rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2015, 77: 254-264.

[18] Hua X D, Liang C, Dong L, *et al.* Simultaneous determination and pharmacokinetic study of gambogic acid and gambogic acid in rat plasma after oral administration of *Garcinia hanburyi* extracts by LC-MS/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 29(4): 545-551.

[19] Zhang J, Li C Y, Xu M J, *et al.* Oral bioavailability and gender-related pharmacokinetics of celastrol following administration of pure celastrol and its related tablets in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(1): 195-200.