

藤黄酸 B 聚乙二醇单甲醚化脂质体的制备及大鼠体内药动学的研究

吴培云, 李国转, 姚 亮, 贾步云, 李 睿, 陈卫东, 彭代银*

安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

摘要:目的 优化藤黄酸 B (morellic acid B, MAB) 聚乙二醇单甲醚 (mPEG) 化脂质体 (MAB-mPEG-LPS) 的制备工艺, 并对其体外释放及大鼠体内药动学行为进行研究。方法 建立藤黄酸 B 定量分析方法, 以包封率、粒径分布作为考察指标, 采用正交试验设计优化 MAB-mPEG-LPS 处方, 得到 MAB-mPEG-LPS 包封率最高的制备工艺; 采用透射电镜下观察 MAB-mPEG-LPS 表面形态, 考察 MAB-mPEG-LPS 在 60 d 内的稳定性, 采用透析法对 MAB-mPEG-LPS 体外释放行为进行研究, 雄性 SD 大鼠尾静脉分别注射 1.50 mg/kg 的 MAB、MAB 脂质体 (MAB-LPS)、MAB-mPEG-LPS, 比较 MAB、MAB-LPS、MAB-mPEG-LPS 药动学行为。结果 正交试验优化后 MAB-mPEG-LPS 的最优处方为氢化大豆卵磷脂 (HSPC) 128 mg, mPEG 的用量为 10 mg, HSPC-胆固醇 (CH) 质量比 8 : 1, MAB-mPEG-LPS 包封率达到 83.21%, MAB-mPEG-LPS 外观表面光滑, 粒径均匀; 体外释放结果表明 MAB-mPEG-LPS 具有缓释且长效作用, 在 60 d 内储存稳定; MAB-mPEG-LPS 中 MAB 在大鼠体内 $t_{1/2\beta}$ 为 66.925 min, 是 MAB 的 4.43 倍, 是 MAB-LPS 的 3.29 倍; $AUC_{0-\infty}$ 为 241.372 mg·min/L, 是 MAB 在大鼠体内 3.64 倍, 是 MAB-LPS 的 1.99 倍。结论 MAB-mPEG-LPS 可延长 MAB 在大鼠体内的循环时间, 增加体内 $AUC_{0-\infty}$ 等特性。

关键词: 藤黄酸 B; 聚乙二醇单甲醚化脂质体; 正交试验; 体外释放; 药动学; 包封率; 稳定性; 透析法; 缓释; 长效

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)08-1553-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.012

Study on preparation and *in vivo* pharmacokinetics in rats of morellic acid B mPEG liposome

WU Peng-yun, LI Guo-zhuan, YAO Liang, JIA Bu-yun, LI Rui, CHEN Wei-dong, PENG Dai-yin

School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

Abstract: Objective To optimize the preparation process of morellic acid B (MAB) mPEG liposomes (MAB-mPEG-LPS), and to study the *in vitro* release behavior and pharmacokinetics of MAB-mPEG-LPS in rats. **Methods** The analytical method of MAB was established; Encapsulation efficiency and particle size were used as the indexes to optimize the mPEG liposomes by orthogonal test, and the highest encapsulation efficiency of MAB-mPEG-LPS was obtained; Transmission electron microscope was used to observe the surface morphology of MAB-mPEG-LPS, and the stability of MAB-mPEG-LPS was measured in 60 d. Dialysis method was also adopted to study the MAB-mPEG-LPS release *in vitro*; Male SD rats were injected with MAB (1.50 mg/kg), MAB-LPS (1.50 mg/kg), MAB-mPEG-LPS (1.50 mg/kg) via tail vein, and differences in pharmacokinetics parameters of MAB, MAB-LPS, and MAB-mPEG-LPS were compared. **Results** The optimized formula of MAB-mPEG-LPS: HSPC was 128 mg, mPEG was 10 mg, HSPC-CHOL was 8 : 1. Encapsulation efficiency of MAB-mPEG-LPS was 83.21%. MAB-mPEG-LPS had uniform particle size and smooth surface; *In vitro* release results showed that the MAB-mPEG-LPS had slow release and long-term effect. It was stable in 60 d; *In vivo* study showed that $t_{1/2\beta}$ of MAB in MAB-mPEG-LPS was 66.925 min, which was 4.43 fold to MAB. MAB-mPEG-LPS was 3.29 fold to MAB-LPS; $AUC_{0-\infty}$ of MAB in MAB-mPEG-LPS was 241.372 mg·min/L, which was 3.64 fold to MAB. MAB-mPEG-LPS was 1.99 fold to MAB-LPS. **Conclusion** MAB-mPEG-LPS could prolong the circulation time and increase $AUC_{0-\infty}$ of MAB in rats. **Key words:** morellic acid B; mPEG liposome; orthogonal test; *in vitro* release; pharmacokinetics; encapsulation efficiency; stability; dialysis method; sustained release; long-term

收稿日期: 2017-01-02

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09103-399); 国家自然科学基金面上项目 (81473387); 国家中医药管理局中药标准化项目 (国中医药办科技函[2016]154号); 安徽省科技攻关计划项目 (1301042099)

作者简介: 吴培云, 女, 副教授, 主要研究方向为中药化学。Tel: 15655190006 E-mail: anzhongwupyun@163.com

*通信作者 彭代银, 男, 教授, 主要研究方向为中药质量控制研究。Tel: (0551)68129007 E-mail: pengdaiyin@163.com

藤黄中具有抗癌活性物质被国内外研究者高度关注,但是研究者多集中于藤黄酸^[1-2](gambogic acid)和新藤黄酸^[3-4](gambogenic acid, GNA)的研究,而对化合物的藤黄酸 B (morellic acid B, MAB) 研究较少。研究表明 MAB 具有抗癌谱广、抗癌活性强的特点^[5-6],相比较于藤黄酸和新藤黄酸, MAB 有望解决细胞耐受性和减少血管刺激性等问题^[7]。

本课题组前期从藤黄中分离、纯化 MAB,然后对其进行结构确定^[8]。因 MAB 具有与藤黄其他活性成分相同的结构母核,故具有相似的性质,如水溶性差^[7](油水分配系数 $\lg P=4.15$),半衰期短^[7](大鼠体内 $t_{1/2\beta}$ 为 16.40 min),生物利用度低^[7](大鼠体内 $AUC_{0-\infty}$ 为 66.358 mg·min/L),不易达到有效治疗浓度等问题。因此,对于 MAB 进行药剂学处理就显得尤为重要,包括固体脂质纳米粒、纳米脂质载体、微球、泡囊等多种微载体形式^[9-23]。上述微载体各有所长,均能够显著改善药物的溶解性、延长半衰期、提高生物利用度等,但是距离上市应用的要求尚有差距,而聚乙二醇单甲醚(methoxypolyethylene glycols, mPEG)是在聚乙二醇的基础上形成的一端为甲氧基,另一端为羟基的结构,具有良好的生物相容性、被美国 FDA 认可, mPEG 分子可对生物材料进行表面修饰,能减少血蛋白/血细胞附着的位点,因此,可作生物材料的表面改性^[24-30]。mPEG 也是脂质体长循环的常用修饰材料^[29,31],能明显优化脂质体的缺陷。所以本课题以 MAB 为模型药物,制备 MAB mPEG 化脂质体(MAB-mPEG-LPS),对其进行表征,并研究其在大鼠体内的药动学行为,为 MAB 的研究及纳米载体的临床应用提供理论基础。

1 仪器和材料

LC-15C 高效液相色谱仪,含 SPD-15C 紫外检测器,日本岛津; AB135-S 型十万分之一电子分析天平,德国 Mettler Toledo 公司; R-1001N 旋转蒸发器,郑州长城科工贸有限公司; KQ-300B 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; XW-80A 微型涡旋混合器,上海沪西分析仪器厂有限公司; DF-101B 数显恒温磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司; LC-4016 型低速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司; Cascada 超纯水仪,美国 PALL 公司; Zetasizer3000HS 型激光粒度仪, Malvern 公司。

MAB 对照品(批号 20160308,质量分数 99%),

安徽中医药大学新藤黄酸课题组提供; MAB 原料药(批号 20160205,质量分数 95%),实验室自制; GNA 对照品(批号 20160201,质量分数 99%),安徽中医药大学新藤黄酸课题组提供; 氢化大豆卵磷脂(HSPC,质量分数 94%),上海太伟药业有限公司; 胆固醇(CH,质量分数 97%),国药集团化学试剂有限公司; 磷脂酰胆碱(PC),分析级,安徽丰原药业有限公司; mPEG,分析级,成都艾科达化学试剂有限公司; 葡聚糖凝胶 G-50(分析级),北京恒辉科技有限公司; 甲醇,分析纯,上海星可高纯溶剂有限公司; 无水乙醇、四氢呋喃,分析纯,上海润捷化学试剂有限公司; 大鼠由安徽医科大学实验动物中心提供,生产许可证号 SCXK(皖)2011-001。

2 方法与结果

2.1 MAB 的测定方法^[7]

2.1.1 色谱条件 岛津 LC-15C 高效液相色谱系统: LC-15C 高压输液泵、SPD-15C 紫外检测器; 色谱柱为 COSMOSIL C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(85:15); 柱温 30 ℃; 进样量 20 μL; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 360 nm; 理论板数以 MAB 色谱峰计算大于 5 000。

2.1.2 对照品储备液的制备 精密称取 MAB 对照品 5.00 mg,置 100 mL 量瓶中,加分析纯甲醇溶解并定容,摇匀即得 50.00 μg/mL 的 MAB 对照品储备液,于冰箱 4 ℃ 存放。

2.1.3 线性关系考察 从 MAB 对照品储备溶液中精密吸取一定体积的药物溶液,加入分析甲醇,配制成 MAB 终质量浓度分别为 0.05、0.125、0.5、2.0、5.0、15.0、20.0 μg/mL 的系列溶液,按“2.1.1”项色谱条件进样分析,以峰面积(Y)对 MAB 的质量浓度(C)进行线性回归,得到回归方程 $Y=33\,225\,C-61.952$, $r=0.999\,8$,结果表明 MAB 在 0.05~20 μg/mL 线性关系良好。

2.1.4 日内和日间精密度 配制质量浓度分别为 0.10、4.00、16.00 μg/mL 的对照品溶液各 3 份,计算日内和日间精密度 RSD 分别为 1.32%、2.42%、2.98%和 1.18%、3.27%、2.64%。

2.2 包封率及载药量的测定

2.2.1 微柱的制备 先将 2.5 mL 注射器内活塞去除,在底部垫一略小于其内径的圆形定性滤纸,备用。再将事前用蒸馏水充分溶胀好的 Sephadex G-50(不得有气泡)装入 2.5 mL 注射器内,用蒸馏水平

衡微柱(2~3 个柱体积)后离心(1 000 r/min)2 min, 除去部分水分, 使得凝胶体积缩减, 形成与注射器管内壁紧密粘连, 分布均匀且距上端 1.00 cm 刻度的凝胶柱, 表面用膜封口以防干胶, 置 4 °C 冰箱中保存备用。

2.2.2 洗脱曲线绘制 采用微柱离心法用于 MAB-mPEG-LPS 包封率及载药量的测定, 吸取 200 μ L MAB-mPEG-LPS, 缓慢均匀滴加到微柱(葡聚糖凝胶 G-50 装的微柱)顶部中心, 3 500 r/min 离心 5 min, 收集滤液。再加入 700 μ L 的蒸馏水, 重复操作并收集滤液。连续洗脱 22 次后, 按“2.1”项下条件操作, 测定滤液中 MAB 的量, 绘制洗脱曲线(图 1)。结果可知微柱能够实现游离药物和 MAB-mPEG-LPS 的完全分离, 这说明微柱离心法可以用于 MAB-mPEG-LPS 包封率的测定。

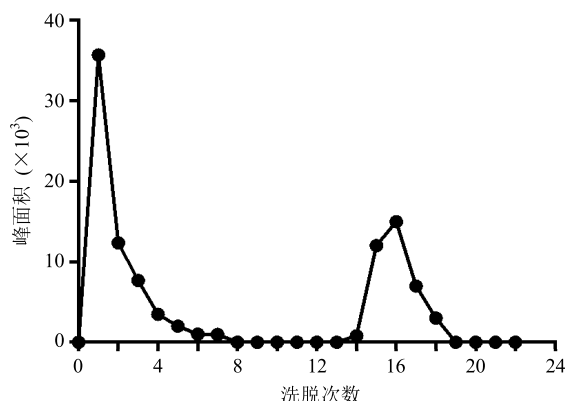


图 1 MAB-mPEG-LPS 的微柱洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of MAB-mPEG-LPS

2.2.3 包封率及载药量的测定 取 MAB-mPEG-LPS 溶液 200 μ L, 按“2.2.2”项所述操作, 收集合并 1~8 管全部滤液并混合均匀, 吸取 100 μ L 滤液加入 900 μ L 甲醇破乳, 以 HPLC 法计算脂质体内被包封药物的质量 (M_1)。另取未过柱的 MAB-mPEG-LPS 溶液 200 μ L, 加入 4 200 μ L 蒸馏水混匀, 吸取 100 μ L 混匀液加入 900 μ L 甲醇破乳, 进样分析, 计算体系中总 MAB 的质量 (M_0), 根据公式计算 MAB-mPEG-LPS 的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = M_1 / M_0$$

$$\text{载药量} = W_{\text{投药}} \times \text{包封率} / (W_{\text{投药}} \times \text{包封率} + W_{\text{脂}})$$

$W_{\text{投药}}$ 是处方中投入的 MAB 药物的总质量, $W_{\text{脂}}$ 是处方中投入的脂质材料 (CH、HSPC、mPEG) 的总质量

2.3 MAB 脂质体 (MAB-LPS) 及 MAB-mPEG-LPS 的制备^[7,32]

通过预实验, 精密称取 HSPC 107 mg、mPEG 18

mg 和 MAB 6 mg 溶于 2 mL 乙醇和 1 mL 四氢呋喃混合组成的有机溶剂中, 水浴加热构成油相。在 1 000 r/min 的条件下搅拌 2 h, 保持恒定的 70 °C 不变, 用 1 mL 注射器将溶解完全的油相匀速注入到 24 mL 水相中, 1 000 r/min 的条件下继续搅拌 3 h 至有机溶剂挥发完全, 即得 MAB-LPS。

通过预实验, 精密称取不同处方量的 CH 13 mg、HSPC 107 mg、mPEG 18 mg 和 MAB 6 mg 溶于 2 mL 乙醇和 1 mL 四氢呋喃混合的组成的有机溶剂中, 水浴加热构成油相。在 1 000 r/min 的条件下搅拌 2 h, 保持恒定的 70 °C 不变, 用 1 mL 注射器将溶解完全的油相匀速注入到 24 mL 水相中, 1 000 r/min 的条件下继续搅拌 3 h 至有机溶剂挥发完全, 即得 MAB-mPEG-LPS。

2.4 MAB-mPEG-LPS 的处方优化

决定 MAB-mPEG-LPS 成功与否的指标为包封率、平均粒径、多分散系数 (PDI)、外观及稳定性, 通过单因素考察, 选择影响比较大的因素 HSPC 与 CH 的比例 (质量比, A)、HSPC 的用量 (B)、mPEG 的用量 (C) 和空白对照 (D) 来进行正交试验, 每个因素设置 3 个水平, 按照 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行实验。以包封率和平均粒径来评价实验结果。正交设计各因素水平和结果见表 1, 极差和方差分析结果见表 2、3。

以平均粒径和包封率为指标对数据进行综合分析, 由表 2 中 K 值大小和表 3 中方差分析结果显示, 当以包封率为考察指标, 因素 A 在统计学上具有显著性差异 ($P < 0.01$)。而以平均粒径为考察指标, 各因素在统计学上均没有显著性差异, 综上情况考虑, 确定最佳处方为 $A_1B_2C_2$ 。

初步确定 MAB-mPEG-LPS 的最佳制备处方工

表 1 正交试验设计与结果

Table 1 Results of orthogonal experiment

试验号	A	B/mg	C/mg	D(空白)	包封率/%	平均粒径/nm
1	8 : 1 (1)	120 (1)	5 (1)	(1)	73.52	119.7
2	8 : 1 (1)	128 (2)	10 (2)	(2)	82.84	108.1
3	8 : 1 (1)	136 (3)	15 (3)	(3)	75.28	113.4
4	10 : 1 (2)	120 (1)	10 (2)	(3)	59.45	116.2
5	10 : 1 (2)	128 (2)	15 (3)	(1)	64.98	102.8
6	10 : 1 (2)	136 (3)	5 (1)	(2)	59.03	119.8
7	12 : 1 (3)	120 (1)	15 (3)	(2)	72.89	114.7
8	12 : 1 (3)	128 (2)	5 (1)	(3)	76.35	110.3
9	12 : 1 (3)	136 (3)	10 (2)	(1)	76.88	107.6

表 2 正交试验极差分析结果

Table 2 Range analysis of orthogonal experiment results					
指标	因素	K_1	K_2	K_3	R
包封率	A	231.64	183.46	226.12	48.18
	B	205.86	224.17	211.19	18.31
	C	208.90	219.17	213.15	10.27
	D	215.38	214.76	211.08	4.30
平均粒径	A	341.2	338.8	332.6	8.6
	B	350.6	321.2	340.8	29.4
	C	349.8	331.9	330.9	18.9
	D	330.1	342.6	339.9	12.5

表 3 方差分析

Table 3 Results of variance analysis				
误差来源		偏差平方和	自由度	F 值 显著性
包封率	A	463.518	2	128.684 $P < 0.01$
	B	59.127	2	16.415
	C	17.753	2	4.929
	D (误差)	3.602	2	
平均粒径	A	13.129	2	0.455
	B	149.396	2	5.180
	C	75.402	2	2.614
	D (误差)	28.842	2	

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

艺为 HSPC 128 mg, mPEG 的用量为 10 mg, HSPC-CH 质量比 8:1, 四氢呋喃 1 mL, 有机溶剂乙醇 2 mL, 有机相与水相体积比为 1:8, 搅拌时间为 3 h, 制备温度为 70 °C。

按最优处方平行制备 3 批 MAB-mPEG-LPS, 分别测定 3 批 MAB-mPEG-LPS 的包封率, 结果为 83.21%、83.45%、82.98%, 平均包封率 83.21%, 平均粒径为 (151.70 ± 0.95) nm, 结果显示, 优化后的工艺重现性好, 满足《中国药典》2015 年版对于脂质体包封率的要求 (大于 80%)。

2.5 平均粒径及形态测定

取一定量的 MAB-mPEG-LPS, 在室温条件下, 采用蒸馏水稀释, 用 Zetasizer3000HS 型激光粒度仪测定 MAB-mPEG-LPS 平均粒径及 Zeta 电位, 结果见图 2。本实验通过单因素考察和正交试验得到的最优处方制得的 MAB-mPEG-LPS 平均粒径为 (151.70 ± 0.95) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.185 ± 0.030 , 平均 Zeta 电位为 (-41.90 ± 0.31) mV ($n=3$)。由结果可看出, 所制得的 MAB-mPEG-LPS 粒

径分布较窄而且较小, 稳定性好。

取稀释后的 MAB-mPEG-LPS 1 滴, 滴加在具有碳膜覆盖的铜网上, 用滤纸吸去旁边大部分液滴然后放于红外灯下烤干, 在透射电子显微镜 (TEM) 下观察 MAB-mPEG-LPS 的外观形态 (图 3)。由图 3 可以看出, 制备的 MAB-mPEG-LPS 呈近似椭圆形, 表面光滑、无粘连。

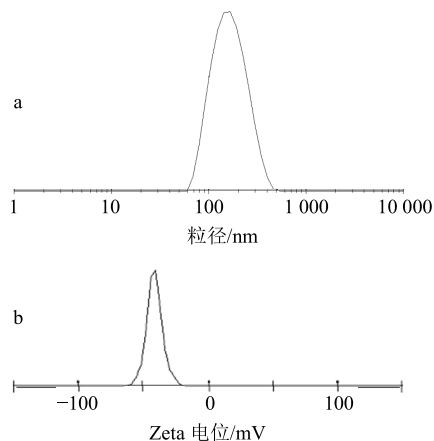


图 2 MAB-mPEG-LPS 粒径分布图 (a) 及 Zeta 电位图 (b)
Fig. 2 Particle size distribution (a) and Zeta potential (b) of MAB-mPEG-LPS

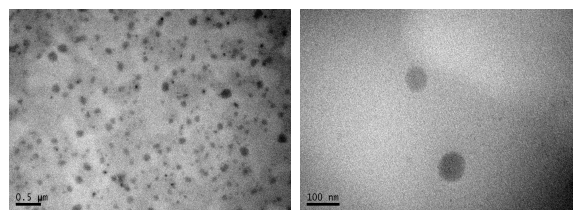


图 3 MAB-mPEG-LPS 的透射电镜图
Fig. 3 TEM photographs of MAB-mPEG-LPS

2.6 MAB-mPEG-LPS 的稳定性考察

脂质体属于热力学不稳定胶体分散系统, 常见的不稳定现象表现为药物泄露、粒径增大、沉淀、絮凝及分层^[18], 温度是影响脂质体稳定性的主要因素之一。所以本实验对在不同温度下最佳条件制备的 MAB-mPEG-LPS 的稳定性进行了考察。将 MAB-mPEG-LPS 分别放置于 4 °C 及 25 °C 条件下 (每组平行 6 份), 考察 0、10、20、60 d 时制剂的外观形态, 并取样测定 MAB-mPEG-LPS 的包封率、平均粒径、渗漏率, 初步评价 MAB-mPEG-LPS 的稳定性, 根据公式计算脂质体的渗漏率, 结果见表 4。

$$\text{渗漏率} = (W_{\text{总游}} - W_{\text{始游}}) / W_{\text{包}}$$

$W_{\text{总游}}$ 为每隔一段时间测得的游离药物的总量, $W_{\text{始游}}$ 为制备时测得游离药物的量, $W_{\text{包}}$ 为制备时的包封量

表 4 MAB-mPEG-LPS 在不同温度下稳定性考察 ($n=6$)
Table 4 Physical stability of MAB-mPEG-LPS at different temperatures ($n=6$)

温度/℃	时间/d	平均粒径/nm	包封率/%	渗漏率/%
4	0	123.60±1.12	80.24±1.34	0
	10	125.60±1.32	79.48±0.54	0.95±0.54
	20	124.00±1.02	77.54±0.48	3.36±0.48
	60	125.30±0.41	76.52±0.68	4.64±0.68
25	0	124.70±0.63	83.22±0.54	0
	10	121.50±1.37	74.35±0.24	10.66±0.24
	20	123.60±0.25	66.32±0.56	20.31±0.56
	60	128.50±0.24	63.35±0.32	23.88±0.32

无论是在 4℃ 还是在 25℃ 下, MAB-mPEG-LPS 的外观都没有显著的变化, 呈现淡黄色的胶体状态, 无沉淀、絮凝及分层现象。从平均粒径、包封率、渗漏率可以看出, MAB-mPEG-LPS 在 4℃ 环境中 60 d 内的平均粒径基本保持不变, 包封率有下降趋势, 渗漏率随之增加。25℃ 环境中平均粒径也没有显著变化, 包封率和渗漏率的下降趋势大于 4℃ 下的样品。由此得出 MAB-mPEG-LPS 在 4℃ 条件下储存, 稳定性较好。

2.7 体外释放研究

采用透析法对所制备的 MAB-mPEG-LPS 进行体外的释药性能研究, 并与 MAB-LPS、MAB 进行对比, 考察 MAB-mPEG-LPS 的释放行为。分别取 1 mL MAB-mPEG-LPS 和相等 MAB 量的 MAB-LPS、MAB 溶液转移到提前处理好的透析袋中, 两端扎紧, 放入含有 100 mL 释放介质为磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) + 0.6% 聚山梨酯 80 的烧杯中。控制在 37℃, 200 r/min 低速搅拌, 平行操作 6 份。在设定的时间点上, 取样 1 mL, 同时补加相同体积的释放介质, 过 0.22 μm 的滤膜, 进样 20 μL, HPLC 测定, 并计算累积释放率。

2.7.1 线性关系考察 从 MAB 对照品储备溶液中精密吸取一定体积的药物溶液, 加入分析甲醇, 配制成 MAB 终质量浓度分别为 0.05、0.125、0.5、2.0、5.0、15.0、20.0 μg/mL 的溶液, 按“2.1.1”项色谱条件进样分析, 对峰面积 (Y) 和 MAB 质量浓度 (X) 进行线性回归, 得到回归方程为 $Y=24\ 201.41 X+2\ 658.30$, $r=0.999\ 3$, MAB 在 0.05~20.00 μg/mL 峰面积与质量浓度线性关系良好。

2.7.2 日内和日间精密度的考察 配制质量浓度分

别为 0.10、4.00、16 μg/mL 的对照品溶液各 3 份, 计算日内和日间精密度 RSD 为 3.37%、2.46%、1.87% 和 4.21%、3.32%、1.59%。

2.7.3 体外释放测定结果 MAB-mPEG-LPS 的体外释放曲线见图 4, 由结果可知, MAB 从溶液中释放迅速, 8 h 后累积释放率达到 (99.58±3.30)%。在 48 h 时, 药物累积释放率为 (85.26±3.24)%, 而 MAB-LPS 和 MAB-mPEG-LPS 都释放呈现 2 种状态, 即在 0~8 h 的快速释放相和 8 h 以后的缓释相, MAB-LPS 在 48 h 后累积释放率为 (85.26±3.24)%, MAB-mPEG-LPS 在 48 h 后累积释放率为 (72.47±3.15)%。MAB-LPS 和 MAB-mPEG-LPS 在 48 h 以后药物进一步释放, 但是释放很慢。MAB-LPS 和 MAB-mPEG-LPS 对比发现, MAB-mPEG-LPS 缓释最明显。

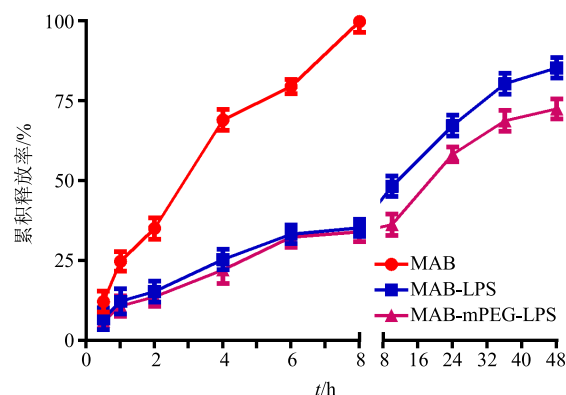


图 4 MAB、MAB-LPS 和 MAB-mPEG-LPS 体外释药曲线
Fig. 4 In vitro release profiles of MAB from MAB solution, MAB-LPS, and MAB-mPEG-LPS

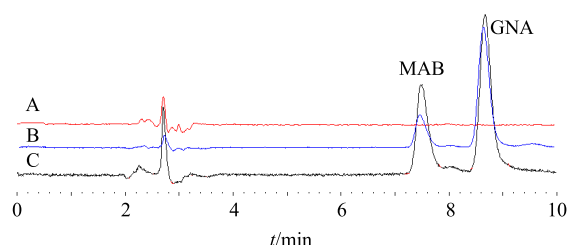
2.8 体内药动学研究

2.8.1 实验分组 雄性 SD 大鼠 18 只, 禁食 12 h 后随机分成 3 组 (给药剂量为 1.50 mg/kg), 称体质量标记后计算给药体积, 以静脉方式给药。MAB 组: 尾 iv 上述配制的 MAB 溶液; MAB-LPS 组: 尾 iv MAB-LPS 溶液; MAB-mPEG-LPS 组: 尾 iv MAB-mPEG-LPS 溶液。根据预实验结果, 分别于给药后 3、5、10、20、40、60、120、240 min 时眼眶静脉丛取血 0.3 mL, 滴加到肝素处理过的 EP 管内, 3 500 r/min 离心 15 min 后取出上层全部血浆, 冷冻避光条件下, 保存备用。

2.8.2 内标溶液的制备 精密称取 GNA 对照品 35.00 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加分析纯甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得 350.00 μg/mL 的 GNA 对照品储备液, 于冰箱 4℃ 存放。

2.8.3 血浆样品处理 精密吸取大鼠血浆 (100 μL)、内标采用 MAB 结构类似物 GNA 溶液 10 μL (质量浓度为 35 $\mu\text{g/mL}$) 共同置于 1.5 mL EP 管内, 涡旋 30 s, 加入 1 mL 醋酸乙酯, 之后涡旋 5 min, 离心 10 min (3 500 r/min), 取上清置于 4 mL 离心管中, 在氮吹浓缩仪中 (40 $^{\circ}\text{C}$) 挥干, 残留物用 200 μL 的流动相复溶后, 涡旋 5 min, 于 12 000 r/min 高速离心 10 min 取上清, 按“2.1.1”项下色谱条件进样, 分别记录 MAB 及 GNA 峰面积。

2.8.4 专属性考察 采用“2.1.1”项下色谱条件测定大鼠血浆中的 MAB, 对方法学进行验证, 方法专属性良好, 无内源性物质干扰, MAB 出峰时间为 7.4 min, GNA 的出峰时间为 10.3 min, 见图 5。



A-空白血浆 B-MAB+GNA 溶液 C-MAB+GNA 血浆样品
A-blank plasma B-MAB + GNA C-MAB + GNA plasma sample

图5 MAB 血浆中选择性试验

Fig. 5 Selectivity test of MAB in plasma

2.8.5 线性关系考察 从 MAB 对照品储备溶液 (GNA 为 350 $\mu\text{g/mL}$) 中精密吸取一定体积的药物溶液, 加入空白不含药的 SD 大鼠血浆, 配制成 MAB 终质量浓度分别为 0.05、0.125、0.5、2.0、5.0、15.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 的一系列不同质量浓度的标准血浆样本, 采用“2.1.1”项下色谱条件测 MAB 和 GNA 的峰面积, 以 MAB 与 GNA 的峰面积的比值 A_i 对相应质量浓度进行加权 ($1/X$) 线性回归, 得到回归方程为 $Y=0.452\ 3X+0.064\ 5$, $r=0.999\ 6$, 结果表明 MAB 在 0.05~20 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度与峰面积比值线性关系良好。

2.8.6 日内和日间精密度的考察 配制质量浓度分别为 0.10、4.00、16.00 $\mu\text{g/mL}$ 的样品溶液各 3 份, 计算日内和日间精密度 RSD 为 3.89%、3.12%、2.13%和 5.35%、4.22%、6.10%。

2.8.7 数据处理 按“2.8.3”项方法处理血浆样品并进样分析。测定样品中药物 MAB 的量, 将 MAB 原料药、MAB-LPS、MAB-mPEG-LPS iv 后血浆中 MAB 质量浓度进行分析比较, 拟合药时曲线, 结

果见图 6。选用 DAS 2.0 药动学软件, 对上述 3 组血药浓度结果进行药动学基本参数拟合, 结果见表 5。结果显示, MAB-mPEG-LPS 组的 AUC 显著大于 MAB-LPS 和 MAB 原料药组, MAB-LPS 组的 AUC 显著大于 MAB 原料药组, 驻留时间明显延长、最大血药浓度明显增高。

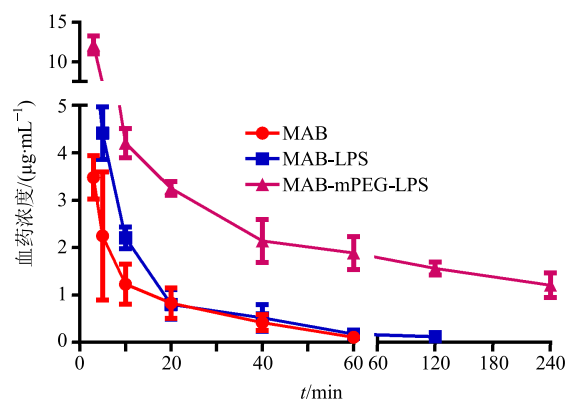


图6 SD 大鼠单次尾静脉给药 MAB、MAB-LPS、MAB-mPEG-LPS 后不同时间点平均血药浓度-时间曲线 ($n=6$)

Fig. 6 Average plasma concentration-time curves after a single iv administration of MAB, MAB-LPS, and MAB-mPEG-LPS ($n=6$)

3 讨论

3.1 体外释放介质的筛选

MAB 基本不溶于水, 所以本实验选择 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液和 pH 7.4 磷酸盐缓冲液作为释放介质, 然后加入不同类型的表面活性剂来提高 MAB 的溶解度以达到漏槽条件。本实验考察了聚山梨酯 80 和十二烷基硫酸钠 (SDS) 的增溶效果, 进一步又考察了增溶剂聚山梨酯 80 用量 (0.6%、1.0%) 和 SDS 用量 (0.6%、1.0%), 结果显示聚山梨酯 80 (0.6%) 增溶效果相对较好, 所以体外释放的介质最终为磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) + 0.6% 聚山梨酯 80。

3.2 脂质体

脂质体粒子的均匀程度和粒径会对其包封率和稳定性造成直接的影响, 因此, 脂质体的形态和粒径是其评价的重要参数之一。本实验采用 Zetasizer 3000HS 型激光粒度仪测定粒径, 同时也测了 PDI, PDI 是脂质体粒子分布均匀性的直观呈现。为了确保脂质体在体内行为的一致性, PDI 以小于 0.2 为宜。化学稳定性、物理稳定性和生物稳定性是影响脂质体的稳定性的 3 个大方面。其中化学稳定性主要研究脂质体构成材料磷脂的氧化水解问题, 一般可通过加入抗氧化剂来改善; 物理稳定性是指脂质

表 5 尾 iv MAB 溶液、MAB-LPS 溶液和 MAB-mPEG-LPS 溶液后的血浆药动学基本参数 ($n=6$)Table 5 Pharmacokinetic parameters of MAB in plasma after administration with MAB solution, MAB-LPS, and MAB-mPEG-LPS ($n=6$)

药动学参数	单位	MAB 组	MAB-LPS 组	MAB-mPEG-LPS 组
$C_{\max}$	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	3.275	6.287*	9.578*
$t_{1/2\alpha}$	min	1.231	2.123	3.879
$t_{1/2\beta}$	min	16.402	20.324	66.925 ^a
MRT_{0-t}	min	11.313	15.239	30.146 ^a
$\text{MRT}_{0-\infty}$	min	13.254	30.213	42.358*
AUC_{0-t}	$\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$	48.468	90.213*	175.217*
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$	66.358	121.322*	241.372 ^a

与 MAB 组比较: * $P<0.05$; 与 MAB-LPS 组比较: ^a $P<0.05$ * $P<0.05$ vs MAB group; ^a $P<0.05$ vs MAB-LPS group

体在放置过程中出现的凝聚、聚沉及泄漏等现象。一般由制备方法、制备材料的组成及储存温度等决定。生物稳定性是指在生物环境（体液、血液）中耐生物老化性，是保证药物发挥作用的关键^[13]；本实验主要考察了 MAB-mPEG-LPS 的放置稳定性，通过 4℃ 和 25℃ 对比可以发现，温度对脂质体稳定性影响很大。

稳定将是本课题组以后主要考虑的问题，可以通过加入抗氧化剂或者更换脂质体的材料来增强脂质体的稳定性。对 MAB-mPEG-LPS 的体外释放行为进行方程拟合，拟合结果显示大部分属于双相模式。脂质体 0.5 h 累积释放率为 5.96%，低于《中国药典》2015 年版中规定的 40% 的限度，表明本实验制备的脂质体突释不明显。通过大鼠体内 MAB-mPEG-LPS 与 MAB 的药动学参数的对比，表明制备的脂质体能进一步延长药物半衰期，增加生物利用度，为 MAB 的研究及纳米载体的临床应用提供理论基础。

参考文献

- [1] 王立英, 刘雨萌, 吴丽艳, 等. 藤黄酸长循环脂质体制备及药动学研究 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1309-1314.
- [2] 吕磊, 袁敬东, 黄韬, 等. 藤黄酸对膀胱癌 BIU-87 细胞侵袭及迁移能力的影响 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(10): 2369-2371.
- [3] 陆莹, 李庆林. 新藤黄酸诱导黑色素瘤 B16 细胞线粒体自噬的机制研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(19): 2079-2082.
- [4] 黄霞, 朱婷婷, 罗晴, 等. 新藤黄酸纳米脂质载体制备及其药剂学性质研究 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1400-1406.
- [5] Han Q B, Wang Y L, Yang L, et al. Cytotoxic

polyprenylated xanthenes from the resin of *Garcinia hanburyi* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2006, 54(2): 265-267.

- [6] Sukpondma Y, Rukachaisirikul V, Phongpaichit S. Antibacterial caged-tetraprenylated xanthenes from the fruits of *Garcinia hanburyi* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2005, 53(7): 850-852.
- [7] 贾步云. 藤黄酸 B 分离纯化、纳米脂质载体制备及初步药效学研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2015.
- [8] 贾步云, 彭代银, 李珊珊, 等. 藤黄中 MA 的制备分离方法优选及结构确证 [J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34(1): 77-81.
- [9] 黄霞, 罗晴, 朱婷婷, 等. 新藤黄酸固体脂质纳米粒在大鼠体内药物代谢动力学研究 [J]. 安徽中医学院学报, 2013, 32(3): 68-71.
- [10] 林雅铃, 张安强, 王炼石. 磷酸川芎嗪星型聚乳酸缓释微球的制备与体外释放研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1627-1631.
- [11] Lin T, Fang Q, Peng D, et al. PEG ylated non-ionic surfactant vesicles as drug delivery systems for gambogic acid [J]. *Drug Deliv*, 2013, 20(7): 277-284.
- [12] 丁倩, 李寒梅, 孙逊. 环巴胺固体脂质纳米粒的研究 [J]. 华西药学杂志, 2017, 32(1): 9-12.
- [13] 管庆霞, 王利萍, 刘振强, 等. 马钱子碱固体脂质纳米粒的细胞毒性及细胞摄取试验 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 1-6.
- [14] 王晶. 叶酸偶联聚合物修饰的紫杉醇纳米脂质载体制备及性质研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(5): 1-4.
- [15] 黄瑞, 郭盼, 刘勃纓, 等. 藤黄酸纳米结构脂质载体的制备及抗肿瘤作用初步评价 [J]. 天津中医药, 2017, 34(1): 62-65.
- [16] 代文婷, 陈进, 何争民, 等. 脱甲氧基姜黄素纳米脂质载体冻干工艺的优化 [J]. 现代医药卫生, 2017,

- 33(1): 27-29.
- [17] 薛雨晨, 苏 菊, 姜 丰, 等. 灯盏花乙素缓释微球的制备及药剂学性能考察 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 7-12
- [18] 冯 超, 王群星, 熊雪丰, 等. 延胡索乙素胃漂浮缓释微球的制备 [J]. 中成药, 2017, 39(2): 291-296.
- [19] 崔 青, 赵 红, 张长桥, 等. 壳聚糖功能微球负载贵金属的研究进展 [J]. 化工进展, 2017, 36(2): 595-601.
- [20] 殷启凤, 杨 鹏, 王玉娟, 等. 新型羧甲基壳聚糖包裹C-藻蓝蛋白负载 CD59 配体的靶向纳米微球的制备及其对 HeLa 细胞的杀伤作用 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(2): 1-7.
- [21] 刘 迪, 杨 红, 吕小燕, 等. 载碳菁类染料泡囊的制备和表征及其光热效应研究 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25(11): 1275-1280.
- [22] 黄天擎, 何瑞曦, 陈贺骏涛, 等. 丹皮酚泡囊乳膏的制备及其体外透皮吸收考察 [J]. 安徽中医药大学学报, 2016, 35(3): 79-83.
- [23] 何瑞曦. 丹皮酚聚乙二醇化非离子表面活性剂泡囊的制备、表征、及其初步药动-药效学研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2016.
- [24] 张海燕, 齐 云, 廖永红, 等. 注射剂常用增溶性药用辅料的安全与增溶研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 1-4.
- [25] Harris J M, Hundley N H, Shannon T G, *et al.* Polyethylene glycols as soluble, recoverable, phase-transfer catalysts [J]. *JAMA*, 1982, 47(24): 4789-4791.
- [26] 陆丽华, 李芸芸, 纪丹妮, 等. 聚乙二醇电解质散剂用于术前肠道准备的安全性与其有效性 [J]. 护士进修杂志, 2010, 25(5): 427-428.
- [27] 梁 博, 孙 璐, 孙树东, 等. 聚乙二醇刷型聚合物在聚砜膜上的光化接枝 [J]. 高分子材料科学与工程, 2008, 24(10): 163-166.
- [28] 张 璇, 潘仕荣, 吕 澍, 等. 聚乙二醇-聚乙烯亚胺共聚物的制备及其表征 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2006, 45(6): 53-57.
- [29] 李 睿. 新藤黄酸 mPEG 化脂质体的制备、大鼠体内药动学参数及体外抑制 HepG2 细胞活性研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2016.
- [30] 袁 松, 孙会敏, 丁丽霞. 脂质体物理化学稳定性研究进展 [J]. 中国药事, 2011, 25(4): 384-388.
- [31] 黄兴亮. 达托霉素长循环脂质体抗耐甲氧西林金葡菌的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [32] 丁 倩, 李寒梅, 孙 逊. 环巴胺固体脂质纳米粒的研究 [J]. 华西药学杂志, 2017, 32(1): 9-12.