

和厚朴酚长循环脂质体的制备及药动学研究

陈一桢, 张文娟, 唐兰如, 刘红*, 陈勇*

湖北大学 中药生物技术湖北省重点实验室, 湖北大学生物资源绿色转化协同创新中心, 湖北 武汉 430062

摘要: 目的 优化和厚朴酚长循环脂质体(HLCL)制备工艺, 并考察其体外释放及体内药动学特征。方法 以和厚朴酚包封率为指标, 通过正交试验优化 HLCL 组方, 并对优化组方采用透射电子显微镜(TEM)扫描观察 HLCL 表面形态, 透析法研究 HLCL 体外释放情况, UPLC-MS/MS 法研究大鼠分别 ig 等剂量和厚朴酚及 HLCL (20 mg/kg 和厚朴酚) 后的血浆药动学参数。结果 HLCL 的最优制备条件为大豆磷脂酰胆碱-胆固醇-mPEG2000-DSPE 的质量比为 8 : 1 : 1、药脂质量比为 1 : 10、超声时间为 12 min。在此条件下, HLCL 在 TEM 下为圆球, 包封率 84.7%、载药量 10.4%、平均粒径 121.5 nm、Zeta 电位-30.8 mV。HLCL 体外释放缓慢, 24 h 在 pH 1.2 和 pH 6.9 释放介质中的累积释放率分别为 80%和 71%。大鼠 ig 给药后, HLCL 组和厚朴酚的 $C_{\max}$ 、 $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 分别为 (23.29±11.76) ng/mL、(0.13±0.05) h 和 (10.59±5.72) h, 和厚朴酚组的 $C_{\max}$ 、 $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 分别为 (79.34±56.32) ng/mL、(0.30±0.07) h 和 (4.44±3.14) h, 两组的 $AUC_{0-\infty}$ 无显著差异。结论 与游离和厚朴酚相比, HLCL 体外释放缓慢, 体内吸收迅速、消除缓慢。

关键词: 和厚朴酚; 长循环纳米脂质体; 体外释放; 药动学; 包封率; 正交试验; 透析法; UPLC-MS/MS; 累积释放率

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)18-3720-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.009

Preparation and pharmacokinetics of honokiol long-circulating liposomes

CHEN Yi-zhen, ZHANG Wen-juan, TANG Lan-ru, LIU Hong, CHEN Yong

Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Hubei University, Wuhan 430062, China

Abstract: Objective To optimize the preparation process of honokiol long-circulating liposomes (HLCL) and study the *in vitro* and *in vivo* release. **Methods** An orthogonal experiment was designed to optimize the composition of HLCL using entrapment efficiency as evaluation indicator. The liposome surface morphology was observed by transmission electron microscope (TEM), and the liposome release *in vitro* was studied by dialysis method. The concentration of honokiol in rat plasma was determined by the established LC-MS/MS method, and the differences in pharmacokinetic parameters were compared after honokiol and HLCL (20 mg/kg) were orally administered to SD male rats, respectively. **Results** The optimal composition of HLCL was 8 : 1 : 1 for soya phosphatidyl choline-cholesterol-mPEG2000-DSPE, and 1 : 10 for honokiol-liposome materials with the ultrasonic time of 12 min. Under the optimized conditions, HLCL was sphere with mean particle size of 121.5 nm and mean Zeta potential of -30.8 mV, the encapsulation efficiency and drug-loading content was 84.7% and 10.4%, respectively. *In vitro* release results showed that the liposomes could be gently and slowly release with the 24 h cumulative release rate at pH 1.2 and pH 6.9 dissolve medium of 80% and 71%, respectively. Based on the pharmacokinetic results, $C_{\max}$, $t_{\max}$, and $t_{1/2}$ were (23.29 ± 11.76) ng/mL, (0.13 ± 0.05) h and (10.59 ± 5.72) h for HLCL, and (79.34 ± 56.32) ng/mL, (0.30 ± 0.07) h and (4.44 ± 3.14) h for honokiol, respectively. There was no significant difference about the $AUC_{0-\infty}$ following oral administration of honokiol and HLCL at isodose honokiol (20 mg/kg). **Conclusion** Compared with honokiol, HLCL was released gently and slowly *in vitro*, absorbed rapidly and eliminated slowly *in vivo*.

Key words: honokiol; long-circulating liposome; *in vitro* release; pharmacokinetics; encapsulation rate; orthogonal test; dialysis method; UPLC-MS/MS; cumulative release rate

收稿日期: 2017-04-11

基金项目: 湖北省技术创新专项重大项目 (2016ACA140)

作者简介: 陈一桢 (1989—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物制剂。Tel: 15827574909 E-mail: 742858080@qq.com

*通信作者 刘红 (1969—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向为药物制剂。Tel: (027)88661237-8227 E-mail: 16914848@qq.com
陈勇 (1966—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为药动学。Tel: (027)88661237-8067 E-mail: 1740952455@qq.com

和厚朴酚(honokiol)是中药厚朴的主要活性成分之一,具有多种重要药理作用,如抑制微生物、抑制血小板聚集、抗氧化和抗肿瘤等^[1-3]。和厚朴酚水溶性差且易被氧化降解^[4],口服生物利用度低且体内消除半衰期较短^[5],限制了其临床应用。作为药物传递系统,脂质体能够提高水溶性与稳定性差的药物的跨膜能力与口服生物利用度^[6]。但普通脂质体能被血液中的白蛋白、抗体、酶等各种调理素破裂,也易被网状内皮系统识别、吸收,降低了其应用价值。长循环脂质体(long-circulating liposome, LCL)是一种表面含有天然或合成聚合物修饰(如聚乙二醇)的新型脂质体,其表面有一层亲水性聚合物形成的立体柔性表面,可防止生物分子、细胞与脂质体发生作用,使脂质体不易被血液中的调理素识别及被网状内皮系统清除,增加了其在体内环境中的稳定性^[7-9]。研究表明,经mPEG2000-DSPE修饰的脂质体药物制剂较游离药物在大鼠体内半衰期延长、生物利用度增加^[10-11]。目前,已有和厚朴酚胶束^[12]、 β -环糊精纳米粒^[13]、脂质体^[10]、固体脂质纳米粒^[14]等新型型的研究报道,但给药途径均为注射给药,尚未见有关和厚朴酚口服脂质体的文献报道。本实验优化了经mPEG2000-DSPE修饰的和厚朴酚长循环脂质体(HLCL)制备工艺,并考察了其体外释放和体内药动学特征。

1 仪器与材料

LCMS-8040 三重四极杆液相色谱质谱联用仪, Shimadzu 公司; RE-2000A 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; DF-101S 集热式恒温加热磁力加热搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; JY92-II 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; BP211D 电子天平, 德国 Sartorius 公司; 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; ZS90 激光粒度分析仪, 英国 MALVEN 公司; Tecnai G20 透射电子显微镜, 美国 FEI 公司; LC-20AD 高效液相色谱仪, Shimadzu 公司; DSHZ-300 旋转式恒温振荡器, 太仓市实验设备厂。

大豆磷脂酰胆碱(soya phosphatidyl choline, SPC), 批号 579010-1140043-06/903, 德国 Lipoid 公司; 和厚朴酚, 质量分数 $\geq 98\%$, 武汉泰凯塞科技有限公司; 胆固醇(cholesterol HP), 批号 B41239, 上海艾韦特医药科技有限公司; 聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(mPEG2000-DSPE), 批号 B50845, 上海艾韦特医药科技有限公司; 和厚朴酚对照品,

质量分数 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司; 芹菜素对照品, 批号 D15122101, 质量分数 98%, 南京狄尔格医药科技有限公司; 葡聚糖凝胶 G-50 (Sephadex G-50), 批号 R17M7D10259, 上海厉鼎生物技术有限公司; 分析纯磷酸水合物, 批号 C10057312, MACKLIN 公司; 聚山梨酯 80, 分析纯, BIOSHARP 公司; 超纯水(18.2 M Ω ·cm), Milli-Q 纯水器制备; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 美国 Tedia 公司; 氯仿、甲醇, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。雄性 SD 大鼠, 体质量 200~210 g, 购于湖北省疾病预防控制中心实验动物研究中心, 许可证号 SCXK(鄂)2011-0012。

2 方法与结果

2.1 HLCL 的制备

HLCL 的制备采用薄分散法, 称取成膜材料(大豆磷脂酰胆碱、胆固醇和 mPEG2000-DSPE)适量与和厚朴酚 2 mg 溶于 10 mL 氯仿-甲醇混合液(1:4)中, 40 °C 减压旋转蒸发除去有机溶剂直至在瓶内壁形成一层薄膜, 继续抽真空除去残余有机溶剂后加入 20 mL 超纯水, 60 °C 搅拌水化 1 h, 随后于冰浴中超声(功率 80 W, 每间隔 4 s 超声 4 s)若干时间, 并过 0.22 μ m 微孔滤膜整粒得到 HLCL 混悬液^[11], 最后加入保护剂蔗糖 0.6 g 并真空冷冻干燥(-50 °C, 20 Pa), 密封储存于-4 °C 冰箱待用。

除加主药和厚朴酚外, 空白脂质体的制备同上。

2.2 HLCL 中和厚朴酚的测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex ODS 分析柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)接保护柱(30 mm $\times$ 10 mm, 3 μ m); 以乙腈-水(80:20)为流动相; 检测波长为 294 nm; 柱温 40 °C; 体积流量 1 mL/min; 总运行时间 8 min, 进样量 10 μ L。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取和厚朴酚对照品 2.00 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 得质量浓度为 20 μ g/mL 的对照品储备液。取对照品储备液按要求稀释, 即得不同质量浓度的和厚朴酚对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 取 0.5 mL HLCL 混悬液(批号 20160409), 经甲醇(2 mL)涡旋 20 min 完全破乳, 稀释成 20 μ g/mL 的供试品溶液储备液。

2.2.4 专属性试验 分别以空白脂质体、和厚朴酚对照品溶液和 HLCL 供试品溶液在“2.2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 1。和厚朴酚的保留时间为 2.60 min, 结果表明处方中辅料对和厚朴酚测

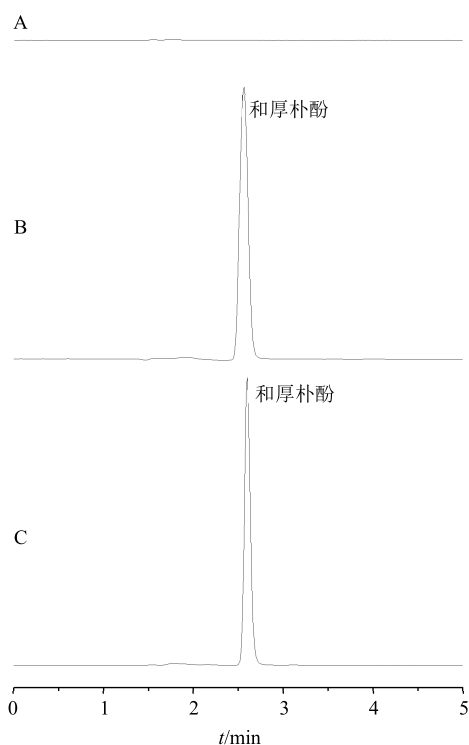


图 1 空白脂质体 (A)、和厚朴酚对照品溶液 (B) 和 HLCL 供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank liposomes (A), honokiol reference substance (B), and HLCL sample (C)

定无干扰。

2.2.5 线性关系考察 精密量取储备液适量, 分别用甲醇稀释成质量浓度为 0.312 5、0.625、1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下进行测定, 以和厚朴酚峰面积积分值为纵坐标 (Y), 和厚朴酚质量浓度为横坐标 (X) 制备标准曲线, 和厚朴酚标准曲线的回归方程为 $Y=11\,590 X+1\,058.2$, $R^2=0.999\,9$ 。结果表明, 和厚朴酚在 0.312 5~20 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

检测限按信噪比 3:1 计为 0.03 $\mu\text{g/mL}$; 定量限按信噪比 10:1 计为 0.08 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.6 精密度试验 分别取“2.2.5”项下的 0.312 5、1.25、20 $\mu\text{g/mL}$ 和厚朴酚对照品溶液, 每份平行测定 6 次, 精密度试验平均 RSD 为 0.58%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取同一批号 (批号 20160409) 脂质体 6 份, 用甲醇破乳, 稀释成 0.312 5、1.25、20 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液 6 份, 测定 6 次 RSD 为 0.62%, 表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 精密量取供试品溶液储备液分

别用甲醇稀释成 0.312 5、1.25、20 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、12、24 h 测定, 平均 RSD 为 1.24%, 表明供试品溶液稳定性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密称取和厚朴酚对照品适量, 加入空白脂质体, 并用甲醇溶解, 配制成质量浓度为 0.312 5、1.25、20 $\mu\text{g/mL}$ 溶液, 测定和厚朴酚的质量浓度, 计算平均回收率为 98.2%, RSD 为 0.30%。

2.3 脂质体包封率和载药量测定

采用 Sephadex G-50 柱 (15 cm $\times$ 1.5 cm) 测定 HLCL 中和厚朴酚包封率, 即取 0.50 mL HLCL 上样, 用水洗脱、体积流量 1 mL/min, 收集洗脱液 (每管 1 mL), 按“2.2.1”项色谱条件测定每管和厚朴酚质量浓度, 绘制洗脱曲线, 计算和厚朴酚的质量浓度 (C_1)。另取 0.50 mL 同批次 HLCL 混悬液经甲醇 (2 mL) 涡旋 20 min 完全破乳, 按“2.2.1”项色谱条件测定 HLCL 混悬液中和厚朴酚的总质量浓度 (C_0) [14-15]。

精密量取适量 (V_0) HLCL 混悬液, 冷冻干燥后称量固体粉末质量 (W_0)。根据公式计算包封率 (包封率= C_1/C_0) 和载药量 (载药量= $C_0 V_0 \times$ 包封率/ W_0)。

2.4 HLCL 处方优化

参考文献报道, 本实验以包封率为指标 (在所设计的正交试验条件下粒径和电位差别不大, 于是未将粒径和电位作为筛选指标), 考察了成膜材料大豆磷脂酰胆碱-胆固醇-mPEG2000-DSPE 的质量比例 (A)、药脂 (和厚朴酚-成膜材料) 的质量比例 (B) 与超声时间 (C) 3 因素、4 水平 (表 1) 对 HLCL 制备的影响 [10-11, 16-18]。

正交试验设计与结果见表 1, 方差分析见表 2。直观分析 (表 1) 表明 3 因素对包封率影响的大小次序为 B>A>C, 但对粒径分布和 Zeta 电位的影响均较小。方差分析 (表 2) 表明药-脂比对包封率有极显著影响, 成膜材料 (大豆磷脂酰胆碱、胆固醇和 mPEG2000-DSPE) 的比例对包封率有显著影响。经综合分析得到的 HLCL 制备最佳条件为 A₄B₂C₃, 即大豆磷脂酰胆碱、胆固醇与 mPEG2000-DSPE 的质量比为 8:1:1、药脂的质量比为 1:10、超声时间为 12 min。按上述最优处方, 平行制备了 3 批 HLCL, 测定最优处方下脂质体的包封率为 (80.4 $\pm$ 0.3)%, 载药量为 (9.9 $\pm$ 0.1)%, 平均粒径为 (116.1 $\pm$ 2.0) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.201 $\pm$

表 1 $L_{16}(4^3)$ 正交试验设计与结果
Table 1 Results of $L_{16}(4^3)$ orthogonal-design test and analysis

试验号	A	B	C/min	D (误差)	E (误差)	包封率/%	平均粒径/nm	Zeta 电位/mV
1	1 : 1 : 1 (1)	1 : 20 (1)	3 (1)	(1)	(1)	42.6	108.8	-35.1
2	1 : 1 : 1 (1)	1 : 10 (2)	6 (2)	(2)	(2)	27.5	100.8	-35.2
3	1 : 1 : 1 (1)	1 : 5 (3)	12 (3)	(3)	(3)	12.5	81.0	-34.8
4	1 : 1 : 1 (1)	1 : 2.5 (4)	24 (4)	(4)	(4)	9.0	91.2	-30.8
5	2 : 1 : 1 (2)	1 : 20 (1)	6 (2)	(3)	(4)	21.8	110.0	-37.9
6	2 : 1 : 1 (2)	1 : 10 (2)	3 (1)	(4)	(3)	18.2	120.2	-39.9
7	2 : 1 : 1 (2)	1 : 5 (3)	24 (4)	(1)	(2)	10.0	82.2	-35.7
8	2 : 1 : 1 (2)	1 : 2.5 (4)	12 (3)	(2)	(1)	6.0	101.8	-40.2
9	4 : 1 : 1 (3)	1 : 20 (1)	12 (3)	(4)	(2)	40.2	106.5	-32.0
10	4 : 1 : 1 (3)	1 : 10 (2)	24 (4)	(3)	(1)	48.3	99.3	-32.6
11	4 : 1 : 1 (3)	1 : 5 (3)	3 (1)	(2)	(4)	11.4	103.4	-31.4
12	4 : 1 : 1 (3)	1 : 2.5 (4)	6 (2)	(1)	(3)	4.5	107.5	-33.7
13	8 : 1 : 1 (4)	1 : 20 (1)	24 (4)	(2)	(3)	68.4	92.5	-29.6
14	8 : 1 : 1 (4)	1 : 10 (2)	12 (3)	(1)	(4)	79.4	114.4	-31.4
15	8 : 1 : 1 (4)	1 : 5 (3)	6 (2)	(4)	(1)	20.6	110.7	-30.8
16	8 : 1 : 1 (4)	1 : 2.5 (4)	3 (1)	(3)	(2)	8.0	102.8	-30.8
K_1	91.6	173.0	80.2	136.5	117.5			
K_2	56.0	173.4	74.4	113.3	85.7			
K_3	104.4	54.5	138.1	90.6	103.6			
K_4	176.4	27.5	135.7	88.0	121.6			
R	120.4	145.9	63.7	48.5	35.9			

表 2 方差分析
Table 2 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1 915.310	3	6.580	$P < 0.05$
B	4 460.355	3	15.325	$P < 0.01$
C	892.965	3	3.068	
D (误差)	384.965	3		
E (误差)	197.155	3		
总误差	582.12	6		

$$F_{0.05}(3, 6) = 4.760 \quad F_{0.01}(3, 6) = 9.780$$

0.008, Zeta 电位为 (-30.4 ± 0.5) mV ($n=3$)。脂质体经冷冻干燥后的包封率为 $(84.7 \pm 0.8)\%$ 、载药量为 $(10.4 \pm 0.1)\%$ 、平均粒径 (121.5 ± 1.5) nm、PDI 为 0.176 ± 0.009 、Zeta 电位为 (-30.8 ± 0.6) mV ($n=3$)。

2.5 粒径及表面形态测定

采用马尔文 ZS90 纳米激光粒度分析仪进行 HLCL 粒度分析及 Zeta 电位测定。每个样品重复测

定 3 次。测得最优处方下 HLCL 的平均粒径为 (121.5 ± 1.5) nm、PDI 为 0.176 ± 0.009 和 Zeta 电位为 (-30.80 ± 0.55) mV ($n=3$)。由此可见, 在所选择的制备工艺条件下, 所制备的 HLCL 粒度分布窄, 大小分布均匀, 见图 2。

将最优处方下 HLCL 分散在去离子水中, 经磷钨酸复染, 采用透射电子显微镜 (TEM) 观察微粒的形状和结构。TEM 观察结果如图 3 所示, HLCL 表现为圆形或椭圆形, 大小基本均匀一致。

2.6 体外释药研究

2.6.1 透析法测定 HLCL 的体外释放 将含 0.50 mL HLCL 混悬液的透析袋 (截留相对分子质量 8 000~14 000) 置于 20 mL 释放介质 [分别为含 0.5% 聚山梨酯 80 的 0.1 mol/L HCl (pH 1.2) 和含 0.5% 聚山梨酯 80 的磷酸盐缓冲液 (PBS) (pH 6.9)] 中, 在 37 °C、100 r/min 条件下震荡, 分别于不同透析时间点 (0、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、96、120、144、168 h) 取样并采用同上 HPLC

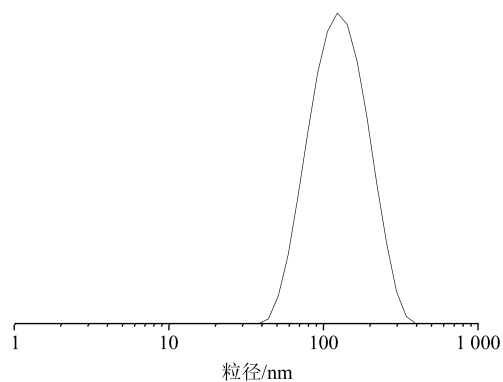


图2 HLCL的粒径分布

Fig. 2 Particle size distribution of HLCL

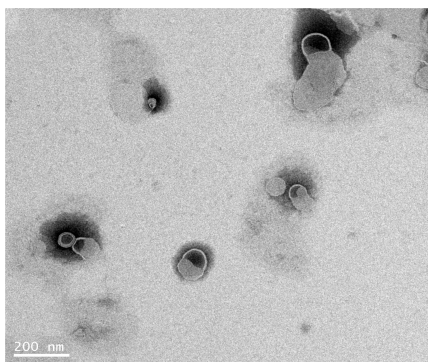


图3 HLCL的TEM图

Fig. 3 TEM photograph of HLCL

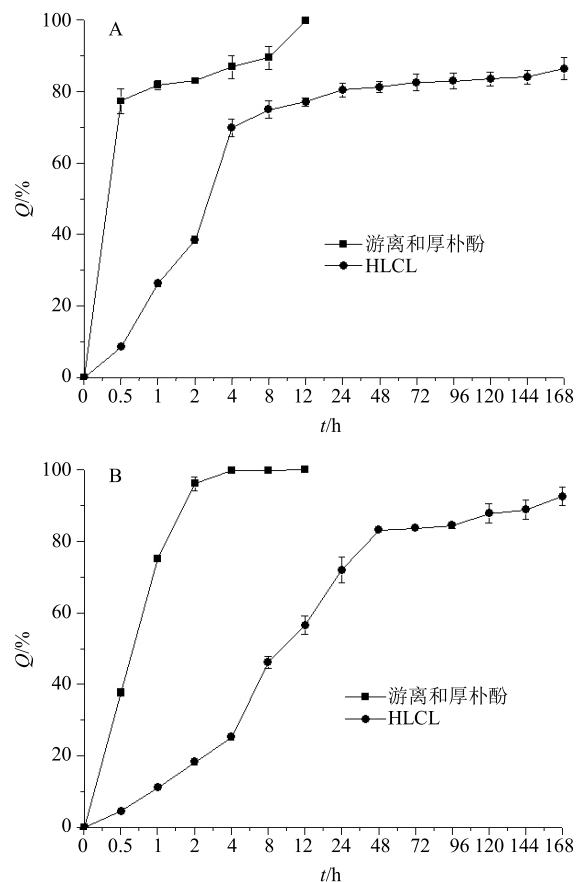
法测定释药介质中和厚朴酚的量, 计算累积释放率(Q)。每次取样后立即补加等量 37 °C 释药介质^[13]。对照品溶液采用 DMSO 配制成 1 mg/mL 和厚朴酚溶液, 并在与 HLCL 相同条件下测定其释放率。

$$Q_t = [V_1(C_1 + C_2 + \dots + C_{t-1}) + V_2 C_t] / (V_0 C_0)$$

V_1 为每个时间点的取样量, V_2 为透析介质体积, $C_1, \dots, C_t$ 为每个时间点测得的和厚朴酚质量浓度, V_0 和 C_0 分别为透析袋中加入的 HLCL 体积与质量浓度

2.6.2 体外释放测定结果 游离和厚朴酚与 HLCL 在不同释放介质中的释药曲线如图 4 所示。结果表明, 在 pH 1.2 释放介质中, 游离和厚朴酚 1 h Q_1 约 80%, 12 h 释放完全; HLCL 1 h Q_1 26%, 12 h Q_{12} 77%, 24 h Q_{24} 约 80%。在 pH 6.9 释放介质中, 游离和厚朴酚 1 h Q_1 75%, 12 h 释放完全; HLCL 1 h Q_1 11%, 12 h Q_{12} 56%, 24 h Q_{24} 约 71%。

2.6.3 HLCL 释药机制研究 对 HLCL 的体外释放曲线分别用零级释放模型、一级释放模型及 Higuchi 模型进行拟合。结果表明, HLCL 的体外释放在 pH 1.2 HCl 溶液以 Higuchi 模型拟合度最高($r=0.7289$), 在 pH 6.9 PBS 溶液中以一级动力学模型拟合度最高($r=0.9263$), 见表 3。



A-透析介质为含 0.5% 聚山梨酯 80 的 0.1 mol/L HCl (pH 1.2)

B-透析介质为含 0.5% 聚山梨酯 80 的磷酸盐缓冲液 (pH 6.9)

A-the dialysis tubes were incubated in 20 mL of hydrochloride solution (pH 1.2) containing 0.5% Tween 80; B-the dialysis tubes were incubated in 20 mL of phosphate buffer (pH 6.9) containing 0.5% Tween 80

图4 HLCL 体外 Q 值 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 *In vitro* release profiles of HLCL ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.7 UPLC-MS/MS 法测定血浆中和厚朴酚

2.7.1 UPLC 色谱条件 Shimadzu ODS 色谱柱 (150.0 mm×2.0 mm, 4.6 μm) 接 Shim-pack Column Holder 保护柱 (5.0 mm×2.0 mm, 4.6 μm), 柱温 40 °C; 以水-甲醇为流动相, 梯度洗脱: 0~5 min, 60%~85% 甲醇; 5~11 min, 60% 甲醇; 体积流量 0.2 mL/min; 进样体积 10 μL。

2.7.2 质谱条件 ESI 离子源, 加热块温度 400 °C, DL 管加热温度 250 °C, 雾化气 (N_2) 体积流量 3.0 L/min, 干燥气 (N_2) 体积流量 15.0 L/min, 离子喷雾电压 -4.5 V。采用负离子多反应监测模式 (MRM) 检测, 用于定量分析的离子对分别为和厚朴酚 m/z 265.0→224.5, 芹菜素 (内标) m/z 269.0→ m/z 117.2^[17]。

表 3 HLCL 的释药动力学方程及相关系数

Table 3 Drug release kinetics equation and correlation coefficients of HLCL

溶出介质	数学模型	方程
pH 1.2 HCl	零级动力学	$Q=0.002\ 6\ t+0.535\ 2, r=0.603\ 2$
	一级动力学	$\ln(1-Q)=-0.007\ 6\ t-0.925\ 7, r=0.720\ 9$
	Higuchi	$Q=0.041\ 9\ t^{1/2}+0.424\ 2, r=0.728\ 9$
pH 6.9 PBS	零级动力学	$Q=0.004\ 5\ t+0.339\ 4, r=0.813\ 8$
	一级动力学	$\ln(1-Q)=-0.013\ 8\ t-0.462\ 7, r=0.926\ 3$
	Higuchi	$Q=0.067\ 8\ t^{1/2}+0.175\ 9, r=0.916\ 8$

2.7.3 血浆样品的预处理 取 50 μL 血浆, 加入甲醇和内标溶液 (0.5 $\mu\text{g/mL}$ 芹菜素溶液) 各 10 μL , 涡旋混匀后再加入 100 μL 乙腈, 涡旋混匀 5 min、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 100 μL 于 1.5 mL 离心管中, 冷冻挥干, 再用 100 μL 流动相复溶, 震荡 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 10 μL 进样分析。

2.7.4 对照品溶液制备 精密称取和厚朴酚对照品 5.12 mg 于 100 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得和厚朴酚质量浓度为 51.2 $\mu\text{g/mL}$ 对照品储备液 I; 精密量取 10.0 mL 对照品储备液 I 于 100 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即得质量浓度为 5.12 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液 II。随后用甲醇稀释和厚朴酚对照品储备液 II, 配制成含和厚朴酚质量浓度为 10、20、40、80、1 000、1 280 ng/mL 的系列对照品工作液。

2.7.5 内标溶液制备 精密称取芹菜素对照品 5.0 mg, 加 100 mL 甲醇定容至刻度, 即得芹菜素质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 对照品储备液 I; 精密量取 1.00 mL 对照品储备液 I, 于 100 mL 量瓶中甲醇定容至刻度, 即得质量浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液 II。

2.7.6 供试品溶液制备 取血浆样品, 按“2.7.3”项下方法操作, 即得。

2.7.7 专属性试验 在上述 LC-MS 条件下, 取空白血浆、加入和厚朴酚及芹菜素 (内标) 的空白血浆和血浆样品, 进样分析。由图 5 可知, 和厚朴酚与内标芹菜素的保留时间分别为 8.74、4.95 min, 待测物和内标分离良好。与空白血浆色谱图比较, 血浆中的内源性物质不干扰待测物和内标的测定, 具有良好的专属性。

2.7.8 标准曲线的绘制 取空白 SD 大鼠血浆 50 μL , 加 10 μL 内标芹菜素溶液, 分别依次加入各质量浓度混合和厚朴酚对照品工作溶液 10 μL , 配制成相当于和厚朴酚质量浓度为 2、4、8、16、200、

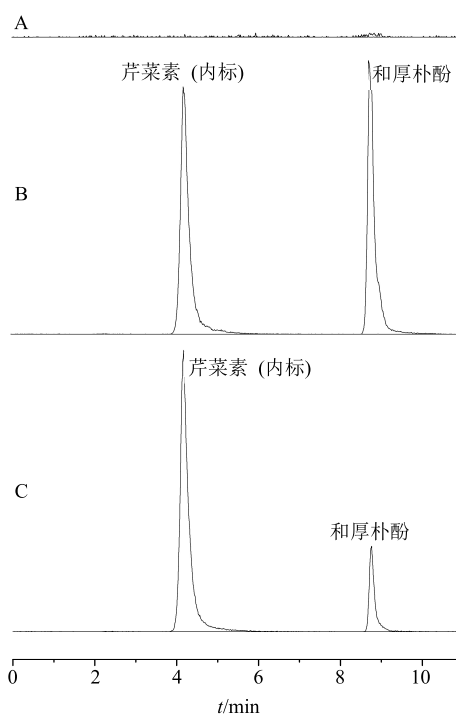


图 5 空白血浆 (A)、和厚朴酚+芹菜素 (内标)+空白血浆 (B) 和血浆样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of blank plasma (A), honokiol + apigenin (internal standards) + blank plasma (B), and plasma sample (C)

256 ng/mL 的含药血浆样品。以待测物色谱峰面积与内标色谱峰面积之比为纵坐标 (Y), 待测物质量浓度为横坐标 (X) 制备标准曲线, 采用内标法绘制标准曲线, 回归方程为 $Y=0.001\ 9\ X-0.004\ 3$, $R^2=0.999\ 7$, 线性范围 2~256 ng/mL。

2.7.9 精密度试验 制备低、中、高 (4、32、200 ng/mL) 血浆质控样本 6 份, 并按照“2.7.6”项方法操作, 在同一检测条件下测定待测物和内标峰面积, 带入标曲线求得实测质量浓度, 考核分析方法的日内、日间 (连续 3 d) 精密度。和厚朴酚的日内精密度 RSD 分别为 8.2%、11.3%、2.0%, 日间精密度 RSD 分别为 7.0%、5.8%、8.3%。

2.7.10 回收率和基质效应 配制上述低、中、高 3 种质量浓度的和厚朴酚血浆质控样本各 6 份, 并按照“2.7.6”项方法操作, 在同一检测条件下测定待测物峰面积 A_1 和内标峰面积 A_2 。用流动相配制低、中、高 3 种不同质量浓度的和厚朴酚对照品溶液, 进样测定, 在同一检测条件下测定待测物峰面积 B_1 和内标峰面积 B_2 。同时, 空白血浆经前处理后, 用上述流动相配制的待测物对照品溶液复溶, 进样测定, 在同一检测条件下测定待测物峰面积 C_1 和内标峰面积 C_2 。计算回收率(回收率= A/C)和基质效应(基质效应= C/B)。结果表明, 和厚朴酚的回收率分别为 113.5%、90.4%、97.8%, 基质效应分别为 99.8%、98.6%、99.0%。内标的平均回收率和基质效应分别为 83.2%、104.5%。

2.7.11 稳定性试验 将血浆样品反复冻融 3 次; 室温放置 24 h; -20°C 冷冻放置 5 d。结果表明药物在放置和测定过程中均稳定, 满足分析要求。

2.8 HLCL 体内药动学研究

10 只雄性 SD 大鼠随机分成和厚朴酚(2 mg/mL 混悬于 0.5%羧甲基纤维素钠溶液)给药组(ig 20 mg/kg)与 HLCL 组(质量浓度 2 mg/mL, ig 20 mg/kg), 每组 5 只^[19]。ig 给药后, 和厚朴酚给药组于 5、10、20、40、60、90、120、180、360、480、720 min, HLCL 组于 3、6、10、20、40、60、120、180、240、720、1 440 min, 经眼底静脉丛取血约 0.5 mL。血样置肝素化 1.5 mL EP 管中, 轻摇混匀、静置 30 min 后, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上层血浆 150 μL , 于 -80°C 保存。并按照“2.7.6”项方法操作, 在同一检测条件下从测定待测物和内标峰面积, 带入标曲线求得和厚朴酚的血浆药物浓度。和厚朴酚的血浆药物浓度-时间曲线如图 6 所示, 血药浓度数据运用 DAS3.0 软件(中国药理学会专业委员会)以非房室模型进行拟合、统计矩法计算得到的药动学参数见表 4。结果表明, 与游离和厚朴酚相比, 等剂量 HLCL 在大鼠体内的 $t_{1/2}$ 约为游离组的 2 倍, MRT_{0-t} 显著延长($P<0.01$), $t_{\max}$ 及 $C_{\max}$ 显著降低($P<0.05$), AUC_{0-t} 虽有降低但无显著差异。

3 讨论

一般来说, 脂溶性高的药物采取被动载药法装载药物可获得较高的包封率^[18]。和厚朴酚的脂溶性较强、水溶性较低, 所以本实验采用薄膜分散法制备 HLCL。脂质体的成膜材料比例对药物的包封率也有很大影响^[20], 本实验通过调整胆固醇和磷脂在

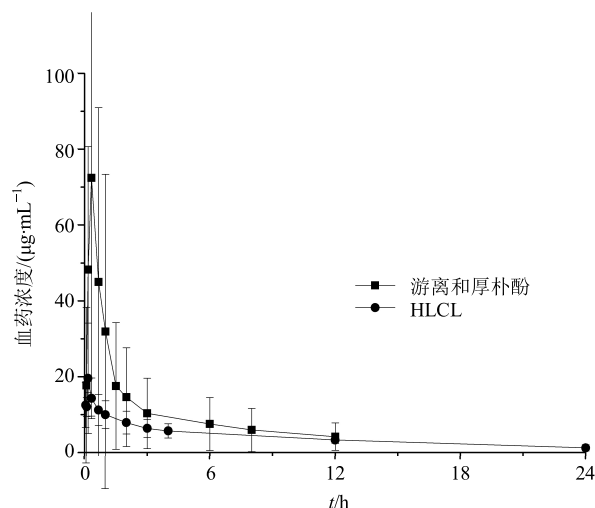


图 6 大鼠 ig 游离和厚朴酚与 HLCL 药-时曲线 ($n=5$)
Fig. 6 Mean plasma concentration-time curves of HLCL and free honokiol after oral administration of a single dose of honokiol (20 mg/kg) ($n=5$)

表 4 游离和厚朴酚与 HLCL 在大鼠体内主要非房室药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Table 4 Main non-compartmental pharmacokinetic parameters of HLCL and free honokiol in rat plasma after oral administration ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

参数	单位	HLCL	游离和厚朴酚	t 检验
AUC_{0-t}	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	97.52 ± 12.31	139.00 ± 90.22	
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$	121.38 ± 37.53	153.07 ± 89.35	
$t_{1/2}$	h	10.59 ± 5.72	4.44 ± 3.14	
$t_{\max}$	h	0.13 ± 0.05	0.30 ± 0.07	*
$C_{\max}$	$\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	23.29 ± 11.76	79.34 ± 56.32	*
MRT_{0-t}	h	7.32 ± 1.31	3.76 ± 1.11	**

与游离和厚朴酚组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs free honokiol group

脂质体中的比例, 最终优化得到 HLCL 的包封率可达 79.4%, 经冷冻干燥后包封率提高到 84.7%, 这与文献报道的冷冻干燥工艺可以提高脂质体的包封率相一致^[21]。

体外释放实验证明 HLCL 在 pH 1.2 HCl 和 pH 6.9 PBS 释放介质中的药物释放较游离和厚朴酚的释放更加平缓, 具有缓释特点; 且在 pH 1.2 HCl 透析介质中释放较在 pH 6.9 PBS 透析介质中的释放更快, 这可能是因为脂质体的磷脂双层在酸性环境中被破坏, 释放出了更多游离药物所致。

药动学研究表明, HLCL 在大鼠体内的 $t_{1/2}$ 和 MRT 较游离和厚朴酚的明显延长, 说明脂质体制剂中的和厚朴酚在大鼠体内的消除变慢, 驻留的时间

更长,亦具有体内缓释特点。此外,脂质体中和厚朴酚的 $t_{\max}$ 及 $C_{\max}$ 较游离和厚朴酚显著降低,说明其吸收更迅速且平缓。虽然脂质体AUC与游离组相比有一定程度降低,但无显著性差异,说明脂质体制剂对和厚朴酚的吸收及体内暴露量没有明显影响。本实验制备的口服HLCL吸收快,释放平缓,延长药物在体内的驻留时间,减少服药次数,可为临床提供安全、有效、作用持久的和厚朴酚新制剂。

参考文献

- [1] Arora S, Singh S, Piazza G A, *et al.* Honokiol: A novel natural agent for cancer prevention and therapy [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(10): 1244-1252.
- [2] 秦洁,李晓庆,赵春娟,等. 厚朴酚与和厚朴酚抗鼻咽癌作用机制研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(2): 226-230.
- [3] 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(1): 48-53.
- [4] Zheng X L, Kan B, Gou M L, *et al.* Preparation of MPEG-PLA nanoparticle for honokiol delivery *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 2010, 386(1): 262-267.
- [5] Wang J J, Miao L, Chen J Y, *et al.* The pharmacokinetics and tissue distribution of honokiol and its metabolites in rats [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2016, 41(5): 587-594.
- [6] 阙慧卿,彭华毅,钱丽萍,等. 雷公藤内酯醇纳米脂质体的处方及制备工艺研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(13): 2277-2282.
- [7] Allen T M, Cullis P R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(1): 36-48.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Wang X H, Cai L L, Zhang X Y, *et al.* Improved solubility and pharmacokinetics of PEGylated liposomal honokiol and human plasma protein binding ability of honokiol [J]. *Int J Pharm*, 2011, 410(1): 169-174.
- [11] Yang G, Yang T, Zhang W D, *et al.* *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of folate-targeted ursolic acid stealth liposome [J]. *J Agr Food Chem*, 2014, 62(10): 2207-2215.
- [12] Gong C Y, Wei X W, Wang X H, *et al.* Biodegradable self-assembled PEG-PCL-PEG micelles for hydrophobic honokiol delivery: I. Preparation and characterization [J]. *Nanotechnology*, 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/21/215103.
- [13] Wang X H, Deng L Y, Cai L L, *et al.* Preparation, characterization, pharmacokinetics, and bioactivity of honokiol-in-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-in-liposome [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(8): 3357-3364.
- [14] 张卿,张良珂,袁佩,等. 和厚朴酚固体脂质纳米粒的制备及性质研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(4): 691-693.
- [15] Qiu N, Cai L L, Wang W W, *et al.* Barbigerone-in-hydroxypropyl- β -cyclodextrin-liposomal nanoparticle: Preparation, characterization and anti-cancer activities [J]. *J Incl Phenom Macro*, 2015, 82(3/4): 505-514.
- [16] Cheng N, Xia T, Han Y, *et al.* Synergistic antitumor effects of liposomal honokiol combined with cisplatin in colon cancer models [J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(5): 957-962.
- [17] Sheng Y L, Xu J H, Shi C H, *et al.* UPLC-MS/MS-ESI assay for simultaneous determination of magnolol and honokiol in rat plasma: Application to pharmacokinetic study after administration emulsion of the isomer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(3): 1568-1574.
- [18] 杨光. 叶酸受体靶向熊果酸长循环脂质体的制备及其抑瘤作用的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
- [19] Han M H, Yu X, Guo Y F, *et al.* Honokiol nanosuspensions: Preparation, increased oral bioavailability and dramatically enhanced biodistribution in the cardio-cerebro-vascular system [J]. *Colloid Surface B*, 2014, 116: 114-120.
- [20] 张丹,廖芳,周洁,等. Box-Behnken Design-响应面优化法优化芍药总苷脂质体的制备工艺及体外释放研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(3): 359-364.
- [21] Pattni B S, Chupin V V, Torchilin V P. New developments in liposomal drug delivery [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(19): 10938-10966.