

• 药剂与工艺 •

二氢杨梅素长循环纳米脂质体的制备及大鼠体内药动学研究

张文娟, 陈一桢, 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 筛选二氢杨梅素(DMY)长循环纳米脂质体的最佳处方和制备工艺, 研究其体外释放特性和大鼠体内药动学特征。方法 采用薄膜超声法制备脂质体, 通过单因素和正交试验优化脂质体处方和制备工艺; 采用透射电子显微镜观察脂质体的外观形态, 激光粒径分析仪测定脂质体的粒径和 Zeta 电位; 采用透析法研究脂质体体外释放特性, LC-MS/MS 法测定大鼠血药浓度。结果 优化的 DMY 脂质体制备条件为大豆磷脂酰胆碱-胆固醇-DSPE-mPEG2000 物质的量比为 75 : 20 : 5, DMY 与类脂的质量比为 1 : 12, 载药温度为 60 °C, 载药介质为 pH 5.0 PBS 缓冲液, 超声时间为 20 min。在此条件下, DMY 的包封率为 $(54.7 \pm 3.3) \%$, 载药量为 $(4.3 \pm 0.2) \%$, 粒径为 $(117.9 \pm 5.5) \text{ nm}$, Zeta 电位为 $(-2.6 \pm 1.7) \text{ mV}$ 。48 h 在 pH 1.2 和 pH 6.8 释放介质中的累积释放率均为 86%。DMY 脂质体在大鼠体内的 $t_{1/2z}$ 和 $AUC_{0 \sim \infty}$ 分别是游离 DMY 的 2.7 倍和 1.8 倍。结论 与游离 DMY 相比, DMY 脂质体体外释放缓慢, 体内消除减缓, 口服生物利用度提高。

关键词: 二氢杨梅素; 薄膜超声法; 长循环纳米脂质体; 累积释放率; 药动学; LC-MS/MS

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)04-0806-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.009

Preparation of long-circulating dihydromyricetin liposomes and its pharmacokinetics in rats

ZHANG Wen-juan, CHEN Yi-zhen, 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 prepare dihydromyricetin (DMY) long-circulating liposomes and evaluate *in vitro* release dynamics and *in vivo* pharmacokinetics in rats. **Methods** Film-ultrasonic method was used to prepare DMY liposomes by single factor experiment and orthogonal test to optimize the formulation and preparation of DMY liposomes. The particle size and zeta potential of liposomes were determined by laser particle size analyzer. The morphological examination of liposomes was performed by using transmission electron microscopy. The liposome release *in vitro* was studied using dialysis method. DMY concentration in rat plasma was determined by the established LC-MS/MS method. **Results** The optimal prescription was 75 : 20 : 5 for soybean phospholipid-cholesterol-mPEG 2000-DSPE, and 1 : 12 for DMY-lipid (wt/wt) with the ultrasonic time of 20 min and loading temperature of 60 °C in pH 5.0 PBS buffer. Under the optimized conditions, DMY liposomes was sphere with mean particle size of $(117.9 \pm 5.5) \text{ nm}$ and mean zeta potential of $(-2.6 \pm 1.7) \text{ mV}$, the encapsulation efficiency and drug-loading content was $(54.7 \pm 3.3) \%$ and $(4.3 \pm 0.2) \%$, respectively. The *in vitro* accumulative release rate of 48 h was 86% in pH 1.2 and pH 6.8 dissolve medium. Compared with free DMY, the $t_{1/2z}$ and $AUC_{0 \sim \infty}$ of DMY liposome were increased by 2.7-fold and 1.8-fold, respectively. **Conclusion** Compared with free DMY, DMY liposomes released gently and slowly *in vitro*, eliminated slowly *in vivo*, and had higher bioavailability of oral administration.

Key words: dihydromyricetin; film-ultrasonic method; long-circulating liposome; cumulative release rate; pharmacokinetics; LC-MS/MS

收稿日期: 2017-10-19

基金项目: 湖北省技术创新专项重大项目 (2016ACA140); 教育部创新创业联合基金 (201601031004)

作者简介: 张文娟 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物制剂。Tel: 15527193435 E-mail: 1848234682@qq.com

*通信作者 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

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

二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)又称蛇葡萄素,是一种二氢黄酮醇类化合物,广泛存在于蛇葡萄科葡萄属植物中。研究表明二氢杨梅素具有抗肿瘤^[1-2]、抗炎^[3]、改善非酒精性脂肪性肝炎^[4-5]及调血脂^[5]等多方面的药理作用,还具有降血压^[6]、降血糖^[7]等生物活性。但其水溶性差且易被氧化^[8],生物膜渗透性低^[9]且口服生物利用度低^[10-11],限制了其临床应用。

脂质体是常见的药物传递系统之一^[12]。经脂质体包裹的药物,不仅可以提高药物的稳定性^[13],还可以提高水溶性及渗透性差的药物的口服生物利用度^[14]。但普通脂质体进入血液循环后易被血液中的各种调理素破裂,也易被网状内皮细胞吞噬,降低了其应用价值。长循环脂质体是一种表面含有天然或合成聚合物修饰的新型脂质体,因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,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^[15-16]。研究表明,二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-mPEG2000)修饰的脂质体制剂能延长药物在大鼠体内的半衰期、提高生物利用度^[17]。近年来有许多文献报道了DMY的新制剂,如DMY的固体分散体^[8]、脂质体^[13]、微乳^[18]、微囊^[19]、包合物^[20]、纳米胶束^[21]等剂型,但这些文献均侧重于DMY新制剂的制备与表征,缺乏体内药动学研究。本实验采用薄膜超声法制备了DMY长循环纳米脂质体,研究了影响DMY长循环纳米脂质体封装率的各种因素,优化了处方组成与制备工艺,并考察了其体外释放及体内药动学性质,为进一步开发DMY长循环纳米脂质体提供实验参考。

1 仪器与材料

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;马尔文ZS90纳米激光粒度分析仪,英国MALVERN公司;Tecnai G20透射电子显微镜,美国FEI公司;液质联用仪,包括LC-30AD二元高压泵、8040三重四极杆质谱检测器、CTO-20AC柱温箱、SIL-30AC自动进样器、DGU-20A5在线真空脱气机、电喷雾离子化源、Las-Solution工作站,Shimadzu公司。

大豆磷脂酰胆碱(SPC),批号579010-1140043-06/903,德国Lipoid公司;胆固醇(CHO),批号

B41239,上海艾韦特医药科技有限公司;二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-mPEG2000),批号B50845,上海艾韦特医药科技有限公司;DMY,批号Y25A6K1,质量分数≥98%,上海源叶科技有限公司;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;羧甲基纤维素钠,批号SCRC30036361,SCR沪市公司;实验用水为Milli-Q生产的超纯水;分析纯氯仿,国药集团化学试剂有限公司;色谱纯乙腈、甲醇, Fischer公司。

雄性SD大鼠,体质量200~250 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)2015-0018。

2 方法与结果

2.1 脂质体中DMY的HPLC测定方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Diamonsil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水溶液(含0.1%甲酸, 35:65);体积流量1.0 mL/min;检测波长290 nm;柱温40℃;进样量10 μL。色谱图见图1。

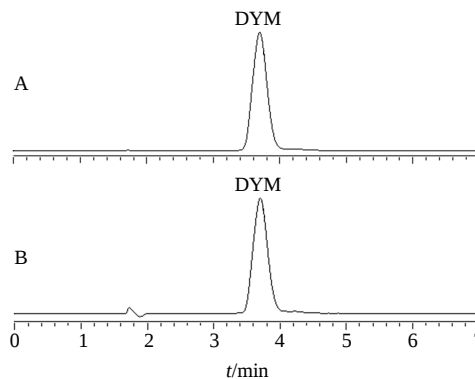


图1 DMY对照品(A)和样品(B)的HPLC图

Fig. 1 HPLC of DMY reference substance (A) and sample (B)

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取DMY对照品2.00 mg,置于10 mL量瓶中,甲醇稀释至刻度,得200 μg/mL的对照品储备液。取储备液适量按要求稀释成不同质量浓度的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 取0.5 mL DMY脂质体混悬液,用2 mL甲醇完全破乳,12 000 r/min离心10 min后,稀释成200 μg/mL的供试品溶液储备液。取储备液适量按要求稀释成不同质量浓度的供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取DMY对照品储备液,用甲醇稀释成1、2、5、10、25、50、100 μg/mL

的 DMY 对照品溶液,按色谱条件依次进样测定峰面积。以峰面积(Y)对进样质量浓度(X)进行线性回归,线性范围 1~100 $\mu\text{g/mL}$,DMY 标准曲线线性回归方程为 $Y=16\,747X-6\,375.5$, $r=1.000\,0$ 。

2.1.5 精密度试验 精密吸取 DMY 对照品储备液用甲醇稀释成 50 $\mu\text{g/mL}$ 对照品溶液,连续进样 6 次,按色谱条件测定峰面积,计算精密度,其 RSD 为 0.22%,表明仪器精密度良好。

2.1.6 重复性试验 精密吸取 DMY 供试品储备液,用甲醇破乳,稀释成 50 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液 6 份,按色谱条件测定峰面积,计算脂质体中 DMY 的量,其 RSD 为 0.42%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 稳定性试验 精密吸取供试品储备液分别用甲醇稀释成 50 $\mu\text{g/mL}$ 供试品溶液,分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 按色谱条件测定峰面积,考察稳定性,其 RSD 为 2.51%,表明供试品溶液稳定性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密吸取 DMY 供试品储备液用甲醇稀释成供试品溶液 6 份,分别加入适量 DMY 对照品,经甲醇破乳后稀释制成新的供试品溶液,按色谱条件测定其峰面积,计算加样回收率,得 DMY 平均加样回收率为 96.8%,RSD 为 1.45%。

2.2 包封率和载药量的测定

取 1 mL DMY 脂质体,用甲醇破乳后,12 000 r/min 离心 10 min,取上清按色谱条件测定 DMY 质量浓度(C_0)。另取 1 mL 脂质体置于透析袋内,在 20 mL 纯水中透析 12 h,按色谱条件测定透析介质中 DMY 质量浓度(C_1),计算 DMY 的包封率与载药量。

$$\text{包封率} = 1 - C_1/C_0$$

C_1 为游离 DMY 质量浓度, C_0 为 DMY 总质量浓度

$$\text{载药量} = W_d/W_p$$

W_d 为脂质体中的药物质量, W_p 为脂质体的总质量

2.3 DMY 长循环纳米脂质体的制备

SPC、CHO、DSPE-mPEG2000 溶于氯仿,DMY 溶于甲醇。取上述甲醇-氯仿溶液(4:1) 10 mL 混合于 100 mL 梨形瓶中,于旋转蒸发器上减压旋蒸(40 $^{\circ}\text{C}$, 80 r/min) 45 min。然后加入一定量 PBS 缓冲液(pH 7.0)洗膜,再依次经恒温搅拌水化 20 min,超声一定时间,过 0.22 μm 膜 3 次后,即得 DMY 长循环纳米脂质体。最后,加入脂质体质量 3% 的蔗糖冷冻干燥 24 h,得冻干脂质体。在上述制备流程下,分别对脂质体制备工艺进行了单因素考察和正交试验优化。

2.4 单因素考察脂质体制备的因素

2.4.1 水化温度 在 DMY 与脂类质量比为 1:8、SPC 与 CHO 物质的量比为 55:40、DSPE-mPEG 2000 占脂类物质的量 5%、水化介质为 PBS 缓冲液(pH 7.0)、超声时间为 30 min 条件下,考察了水化温度 30、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 对脂质体制备的影响,结果不同温度下的包封率分别为 8.4%、14.5%、24.2%、31.3%、19.9%。结果表明,随着水化温度的增加包封率先增大后减小,60 $^{\circ}\text{C}$ 时包封率最大。可能因为当脂质体处于相变温度之上时,脂质体膜由“胶晶”态变为“液晶”态,膜的横切面增加、厚度减小、流动性增加^[22],DMY 易于透过脂质体膜而被包封。

2.4.2 不同 pH 值水化介质的选择 在药物与脂类质量比为 1:8、SPC 与 CHO 物质的量比为 55:40、DSPE-mPEG2000 占脂类物质的量 5%、水化温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 、超声时间为 30 min 条件下,考察了水化介质 PBS 缓冲液的 pH 值 4.0、5.0、5.8、7.0、8.0 对脂质体制备的影响,结果不同 pH 值水化介质的包封率分别为 27.2%、38.8%、34.3%、31.5%、23.8%。结果表明,随着 pH 值的增加包封率先增大后减小,pH 值 5.0 时包封率最大。可能因为随着 pH 值升高,DMY 酚羟基更容易电离而以离子形态存在于脂质体中,不易透过膜。但 DMY 在碱性环境中稳定性较差^[23],故选取水化介质为 pH 5.0 PBS 缓冲液。

2.4.3 超声时间 在 DMY 与脂类质量比为 1:8、SPC 与 CHO 物质的量比为 55:40、DSPE-mPEG2000 占脂类物质的量 5%、水化温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.0 PBS 缓冲液条件下,考察了超声时间 5、10、25、30、50 min 对脂质体制备的影响,结果不同超声时间的包封率分别为 20.1%、23.3%、42.6%、39.4%、19.8%。结果表明,随着超声时间的增加包封率先增大后减小,超声 25 min 时包封率最大。可能是因为超声时间过长会引起磷脂相变,破坏脂质体的结构,使得包封的 DMY 泄露;超声时间太短,脂质体粒径较大且不够均匀稳定。

2.4.4 mPEG2000-DSPE 的用量 在 DMY 与脂类质量比为 1:8、SPC 与 CHO 物质的量比为 55:40、水化温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.0 PBS 缓冲液及超声时间为 25 min 条件下,考察了 DSPE-mPEG2000 用量(占脂类物质的量 1%、3%、5%、10%、20%)对脂质体制备的影响,结果不同 DSPE-mPEG2000 用量的包封率分别为 33.9%、34.1%、41.2%、40.7%、39.3%。

结果表明, DSPE-mPEG2000 的用量对包封率的影响不大, 超过 5% 脂类物质的量时, 包封率基本不变。由于 DSPE-mPEG2000 较贵, 故选取其用量为脂类物质的量 5%。

2.4.5 SPC 与 CHO 的比例 在 DMY 与脂类质量比 1:8、DSPE-mPEG2000 占脂类物质的量的 5%, 水化温度 60 °C、pH 5.0 PBS 缓冲液、超声时间 25 min 条件下, 考察了 SPC 与 CHO 物质的量比 40:55、55:40、65:30、75:20、85:10 对脂质体制备的影响, 结果不同 SPC 与 CHO 物质的量比的包封率分别为 17.5%、40.3%、43.2%、50.6%、21.4%。结果表明, 随着 CHO 用量的减少包封率先增大后减小, SPC-CHO 为 75:20 时包封率最大。CHO 可以增加脂质体双分子膜排列的紧密度而稳定脂质体膜, 在相同质量的脂质中减少 CHO 的相对用量, 膜的刚性降低、总表面积增大, 所包裹的药物量增加; 但随着磷脂用量的进一步增加, 脂质双分子膜的不对称性和通透性增大, 药物渗漏较多, 包封率下降。

2.4.6 药脂比 在 SPC 与 CHO 物质的量比 75:20、DSPE-mPEG2000 占脂类物质的量 5%、水化温度 60 °C、pH 5.0 PBS 缓冲液、超声时间 25 min 条件下, 考察了 DMY 与脂类质量比 1:1、1:4、1:8、1:12、1:16、1:20 对脂质体制备的影响, 结果不同 DMY 与脂类质量比的包封率分别为 9.9%、22.1%、49.7%、54.7%、40.9%、28.4%。结果表明, 随着 DMY 用量的增加包封率先增大后减小, 药脂比在 1:12 时包封率最大。这可能是因为 DMY 较多时, 其在 PBS 缓冲液中不能完全溶解, 故包封率较低。

2.5 脂质体制备的正交试验优化

根据上述单因素实验结果, 以包封率为指标, 选取影响脂质体制备的 3 个重要因素, 即药脂比 (A)、SPC 与 CHO 的比例 (B) 和水化温度 (C), 进行 3 因素 3 水平正交试验 (表 1), 优化处方组成与制备工艺。

正交试验直观分析表明 3 因素对包封率影响的大小次序为 A>B>C (表 1)。方差分析表明药脂比对包封率有极显著影响 (表 2, $P<0.01$)。经综合分析得到的最佳条件为 SPC-CHO-DSPE-mPEG 2000 (物质的量比) 75:20:5, DMY-脂类 (质量比) 1:12, 水化温度 60 °C, 水化介质 pH 5.0 PBS 缓冲液, 超声时间 25 min。

表 1 $L_9(3^3)$ 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of $L_9(3^3)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D (误差)	包封率/%
1	1:10 (1)	70:25 (1)	55 (1)	(1)	34.9
2	1:12 (2)	75:20 (2)	60 (2)	(2)	37.5
3	1:14 (3)	80:15 (3)	65 (3)	(3)	31.4
4	1:10 (1)	70:25 (1)	60 (2)	(3)	52.6
5	1:12 (2)	75:20 (2)	65 (3)	(1)	53.6
6	1:14 (3)	80:15 (3)	55 (1)	(2)	45.0
7	1:10 (1)	70:25 (1)	65 (3)	(2)	32.3
8	1:12 (2)	75:20 (2)	55 (1)	(3)	36.2
9	1:14 (3)	80:15 (3)	60 (2)	(1)	29.7
K_1	103.8	119.8	116.1	118.2	
K_2	151.2	127.3	119.8	114.8	
K_3	98.2	106.1	117.3	120.2	
R	53.0	21.2	3.7	5.4	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
A	565.235 6	2	113.754 7	$P<0.01$
B	77.042 2	2	15.504 9	
C	2.375 6	2	0.478 1	
D (误差)	4.968 9	2		

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

2.6 工艺验证与脂质体表征

按照优化处方和制备工艺制备了 3 批脂质体样品, 并对其外观、粒径和包封率等进行考察。

2.6.1 外观 采用磷钨酸染色法-透射电子显微镜 (TEM) 观察 DMY 脂质体, 其形态为球状或类球状粒子 (图 2)。

2.6.2 粒径与 Zeta 电位 用激光粒径分析仪测定脂质体的平均粒径和 Zeta 电位, 结果平均粒径为 (117.9 ± 5.5) nm、分散系数 (PDI) 为 0.19 ± 0.02 、Zeta 电位为 (-2.6 ± 1.7) mV ($n=3$) (图 3)。

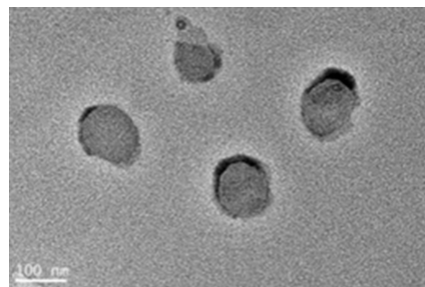


图 2 DMY 脂质体 TEM 图

Fig. 2 TEM photograph of DMY liposomes

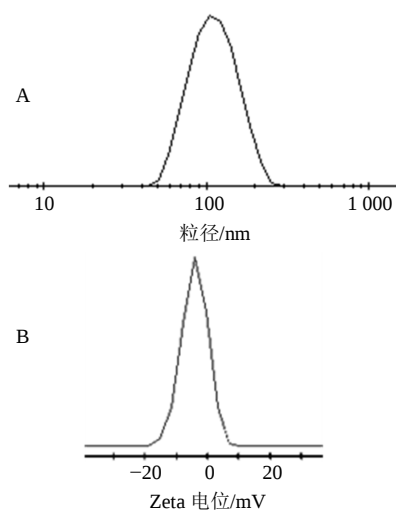


图 3 DMY 脂质体的粒径分布 (A) 和 Zeta 电位 (B)

Fig. 3 Size distribution (A) and Zeta potential (B) of DMY liposomes

2.6.3 包封率与载药量 按“2.1”项方法测定 DMY 脂质体的包封率与载药量分别为 $(54.7 \pm 3.3)\%$ 和 $(4.3 \pm 0.2)\%$ ($n=3$)。

2.6.4 脂质体稳定性 分别将 3 批 DMY 脂质体溶液和冻干粉封于西林瓶中, 在温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 分别于 0、7、15、30 d 取脂质体溶液和冻干粉, 测定包封率。结果表明, DMY 脂质体在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 30 d, 脂质体溶液与冻干粉的渗漏分别约为 5% 和 2%, 有统计学差异 ($P < 0.05$), 说明冻干后可以提高脂质体的稳定性 (表 3)。

表 3 DMY 脂质体的稳定性 ($n=3$)

Table 3 Stability of DMY liposomes ($n=3$)

t/d	脂质体溶液		冻干脂质体	
	包封率/%	DMY/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	包封率/%	DMY/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
0	53.6 ± 3.2	65.2 ± 3.7	49.3 ± 3.9	56.8 ± 4.5
7	52.6 ± 3.3	60.6 ± 3.8	48.8 ± 3.9	56.3 ± 4.5
15	50.7 ± 2.6	58.5 ± 3.0	48.5 ± 3.9	55.9 ± 4.5
30	48.2 ± 2.0	55.5 ± 2.3	$48.0 \pm 3.9^*$	55.3 ± 4.5

与脂质体溶液比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs liposome solution

2.7 体外释放度考察

采用平衡透析法测定脂质体的体外释放情况, 即将含 1.0 mL pH 5.0 PBS 缓冲液复溶的冻干脂质体 (DMY 质量浓度为 1 mg/mL) 于透析袋 (截留相对分子质量 $8\ 000\sim 14\ 000$), 并置于 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 PBS 缓冲液, pH

6.8) 中, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 100 r/min 条件下震荡, 分别于不同时间点替换等体积的新透析介质并采用 HPLC 法测定释放介质中 DMY 的量, 计算累积释放率 (Q)。参比溶液为含 1 mg/mL DMY 的二甲基亚砷溶液, 并在与脂质体相同条件下测定其释放率。

$$Q_i = (C_1 + C_2 + \dots + C_i) V / C_0 V_0$$

V_0 和 C_0 分别为透析袋中加入的脂质体或参比溶液的体积与质量浓度, V 为透析介质体积, C_i 为每个时间点测得的 DMY 质量浓度

游离 DMY 与 DMY 脂质体在不同释放介质中的释药曲线见图 4, DMY 脂质体的释药动力学方程及相关系数 (r) 见表 4。结果表明, 在 pH 1.2 释放介质中, 游离 DMY 1 h 的 Q 为 67%, 8 h 释放完全; DMY 脂质体 1 h 的 Q 为 26%, 8 h 的 Q 为 60%, 24 h 的 Q 为 86% (图 4-A)。在 pH 6.8 释放介质中, 游离 DMY 1 h 的 Q 为 60%, 12 h 释放完全; DMY 脂质体 1 h 的 Q 为 18%, 12 h 的 Q 为 66%, 48 h 的 Q 为 86% (图 4-B)。

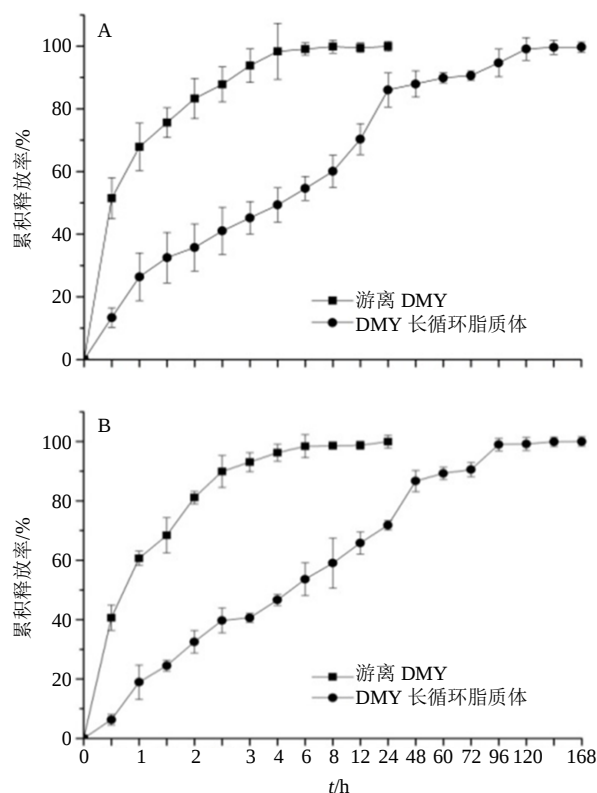


图 4 DMY 脂质体在 0.1 mol/L HCl (pH 1.2)-0.5% 聚山梨酯 80 (A) 及 PBS 缓冲液 (pH 6.8)-0.5% 聚山梨酯 80 (B) 中的体外释放曲线 ($n=3$)

Fig. 4 *In vitro* release profiles of DMY liposomes in 0.1 mol/L HCl (pH 1.2)-0.5% Tween 80 (A) and PBS buffer (pH 6.8)-0.5% Tween 80 (B) ($n=3$)

表 4 DMY 脂质体的释药动力学方程及相关系数

Table 4 Drug release kinetics equation and correlation coefficients of DMY liposomes

溶出介质	数学模型	方程	<i>r</i>
pH 1.2	零级动力学	$Q=0.465 t+42.992$	0.795 0
	一级动力学	$\ln(1-Q)=-0.032 7 t+4.157 8$	0.982 0
	Higuchi	$Q=0.067 8 t_{1/2}+0.29$	0.907 4
pH 6.8	零级动力学	$Q=0.503 7 t+38.674$	0.819 0
	一级动力学	$\ln(1-Q)=-0.048 2 t+4.488 5$	0.966 0
	Higuchi	$Q=7.259 3 t+23.938$	0.923 7

2.8 体内药动学研究

2.8.1 色谱条件 Shim-pack Xp-ODSIII 色谱柱 (75 mm×2.0 mm, 1.6 μm) 接 Shim-pack Column Holder 保护柱 (5.0 mm×2.0 mm, 4.6 μm); 柱温 40 ℃; 以乙腈-水 (含 0.1% 甲酸) 为流动相进行梯度洗脱: 0~0.50 min, 10% 乙腈; 0.51~2.2 min, 10%~70% 乙腈; 2.21~4.00 min, 70% 乙腈; 4.01~4.10 min, 70%~10% 乙腈; 4.11~6.00 min, 10% 乙腈。体积流量 0.3 mL/min; 进样体积 5 μL。

2.8.2 质谱条件 ESI 离子源, 加热块温度 400 ℃, DL 管加热温度 250 ℃, 雾化气 (N₂) 体积流量 3.0 L/min, 干燥气 (N₂) 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 *m/z* 319.00→193.00 (DMY), *m/z* 269.00→*m/z* 116.95 (内标芹菜素, IS)。

2.8.3 血浆样品预处理方法 取空白血浆、内标 (100 ng/mL) 及 DMY 工作液各 50 μL 混匀后, 加入 400 μL 醋酸乙酯涡旋混匀萃取 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min 取上清 300 μL 挥干, 再用 100 μL 流动相复溶, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 75 μL, 进样检测。

2.8.4 定量方法学考察 在上述 LC-MS/MS 条件下, DMY 与内标芹菜素 (IS) 的保留时间分别为 2.29、2.98 min, 血浆中的内源性物质不干扰待测物和内标的测定 (图 5)。DMY 在 10~1 000 ng/mL 线性关系良好, 回归方程为 $Y=0.003 62 X-0.004 45$, $r=0.999$, 其中 *Y* 为 DMY 与 IS 峰面积比, *X* 为 DMY 质量浓度 (ng/mL); 定量下限为 10 ng/mL; 低、中、高 (20、100、800 ng/mL) DMY 质控 (QC) 样品的准确度分别为 109.9%、113.4%、102.3%, RSD 分别为 6.51%、2.25%、4.20%; 批内精密度 (RSD) 分别为 4.20%、2.25%、6.51%; DMY 低、高质量

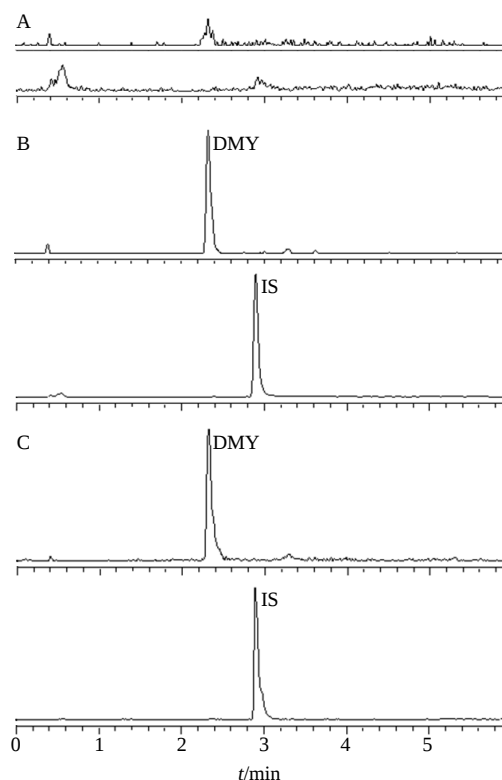


图 5 空白血浆 (A)、空白血浆加 DMY 和内标芹菜素 (B) 以及 ig 给药后 30 min 血浆加内标芹菜素 (C) 的 MRM 色谱图

Fig. 5 Chromatograms of DMY and apigenin (IS) detected by MRM in blank plasma (A), DMY + IS + blank plasma (B), and plasma sample collected at 30 min after oral administration + IS (C)

浓度 QC 样品的相对回收率分别为 63%和 61%, RSD 分别为 10.43%、5.43%; 基质效应分别为 64%和 64% ($n=6$), RSD 分别为 4.96%、2.61%; 内标的平均回收率和基质效应分别为 67%和 59%, RSD 分别为 4.93%、6.44% ($n=6$)。

2.8.5 血浆中 DMY 的 LC-MS/MS 测定方法 按“2.8.3”项方法, 取血浆、甲醇及 DMY 工作液稀释液各 50 μL 混匀后, 在上述 LC-MS/MS 条件下进样检测。

2.8.6 动物分组与给药 12 只雄性 SD 大鼠随机分成 DMY (10 mg/mL 混悬于 0.5%羧甲基纤维素钠溶液) 给药组 (100 mg/kg) 与 DMY 脂质体给药组 (DMY 质量浓度 10 mg/mL, 100 mg/kg), 每组 6 只^[7]。ig 给药后, DMY 给药组 (5、10、15、30、45、60、120、240、480、720、1 440 min) 和 DMY 长循环脂质体给药组 (1、3、5、10、15、45、90、180、240、720、1 440、2 880 min) 每个时间点经

眼底静脉丛取血约 0.5 mL。血样经 4 000 r/min 离心 10 min 取上层血浆 150 μ L, 于-80 $^{\circ}$ C 保存。

2.8.7 药时曲线与药动学参数 DMY 的药时曲线如图 6 所示, 血药浓度数据应用 DAS3.0 软件(中国药理学会专业委员)以非房室模型进行拟合、统计矩法计算得到药动学参数(表 5)。与游离 DMY 相比, 等剂量 DMY 脂质体在大鼠体内的 $AUC_{0\sim\infty}$ 增大了 1.8 倍, 有显著性差异 ($P<0.05$), $MRT_{0\sim\infty}$ 与 $t_{1/2z}$ 分别延长了 2.2 倍和 2.7 倍, 有显著性差异 ($P<0.05$)。

3 讨论

影响脂质体包封率的因素有很多, 但最主要的是药物本身的性质。对于极性药物, 其在水相中浓

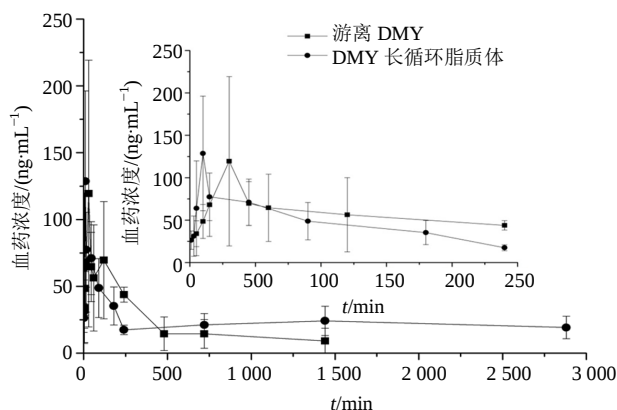


图 6 大鼠 ig 等剂量 (100 mg/kg) DMY 与 DMY 长循环脂质体的药时曲线 ($n=6$)

Fig. 6 Mean plasma concentration-time curves of DMY liposomes and DMY after a single oral administration (100 mg/kg) ($n=6$)

表 5 游离 DMY 与 DMY 长循环脂质体在大鼠体内的主要药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Main pharmacokinetic parameters of DMY liposomes and DMY in rats after a single oral administration (100 mg/kg) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	DMY 脂质体	DMY
$AUC_{0\sim t}$	$ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	$135.58 \pm 291.13^{**}$	512.32 ± 118.06
$AUC_{0\sim\infty}$	$ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	$562.80 \pm 368.11^*$	840.46 ± 659.41
$MRT_{0\sim t}$	h	$21.64 \pm 2.61^{**}$	7.06 ± 2.94
$MRT_{0\sim\infty}$	h	$43.82 \pm 23.12^*$	19.76 ± 23.02
$t_{1/2z}$	h	$38.16 \pm 16.46^*$	14.07 ± 15.03
t_{max}	h	0.25 ± 0.25	0.65 ± 0.01
C_{max}	$ng \cdot mL^{-1}$	138.50 ± 57.82	138.36 ± 77.82

与 DMY 比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs DMY group

度越高, 包封容积越大, 包封的极性药物就越多。对于非极性药物, 其脂溶性越大, 脂质体双分子层中包封的量就越多。一般用药物在辛醇-水两相中的分配系数 (P) 来表示这种性质, 只有 $\log P$ 大于 4.5 的脂溶性药物或 $\log P$ 小于-0.3 的水溶性药物才能被制备成具有较高包封率的脂质体^[24]。DMY 在正辛醇-水 (pH 5.0) 中的 $\log P$ 仅为 0.45^[25], 属于难包封的药物^[26]。本实验采用薄膜超声法制备 DMY 长循环脂质体, 采用单因素实验和正交实验优化了处方与制备工艺, 在优化条件下 DMY 脂质体平均粒径为 (117.9 ± 5.5) nm, 包封率为 $(54.7 \pm 3.3)\%$ 。体外释放研究表明 DMY 脂质体在 pH 1.2 和 pH 6.8 释放介质中均以一级动力学模型拟合度 (r) 最高(表 4), 释放稳定、平缓。体内药动学研究表明, DMY 脂质体在大鼠体内的 $MRT_{0\sim\infty}$ 和 $t_{1/2z}$ 是游离 DMY 的 2.2 倍和 2.7 倍, 有显著性差异, 说明脂质体制剂中的 DMY 在大鼠体内的消除变慢, 驻留时间延长, 具有体内缓释的特点; $AUC_{0\sim\infty}$ 是游离 DMY 的 1.8 倍, 有显著性差异, 说明脂质体制剂更易于吸收, 能减少巨噬细胞的吞噬, 所以包封 DMY 后, 可以延长它在大鼠体内的滞留时间与消除半衰期, 提高生物利用度。

参考文献

- [1] Zhang Q, Jie L, Liu B, et al. Dihydromyricetin promotes hepatocellular carcinoma regression via a p53 activation-dependent mechanism [J]. *Sci Rep*, 2014, 4(4): 4628-4637.
- [2] 侯小龙, 王文清, 施春阳, 等. 二氢杨梅素药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(4): 603-609.
- [3] Qi S, Xin Y, Guo Y, et al. Ampelopsin reduces endotoxic inflammation via repressing ROS-mediated activation of PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 12(1): 278-287.
- [4] Xie C F, Chen Z, Zhang C F, et al. Dihydromyricetin ameliorates oleic acid-induced lipid accumulation in L02 and HepG2 cells by inhibiting lipogenesis and oxidative stress [J]. *Life Sci*, 2016, 157: 131-139.
- [5] Chen S, Zhao X, Jing W, et al. Dihydromyricetin improves glucose and lipid metabolism and exerts anti-inflammatory effects in nonalcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 99: 74-81.
- [6] 张秀桥, 沈伟, 陈树和, 等. 大叶蛇葡萄提取物对肾性高血压大鼠降压作用的实验研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(24): 2095-2096.

- [7] Chen J, Wu Y, Zou J, *et al.* α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* and the flavonoid derivatives [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(7): 1488-1494.
- [8] Ruan L, Yu B, Fu G, *et al.* Improving the solubility of ampelopsin by solid dispersions and inclusion complexes [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(3): 457-464.
- [9] Ruan L P, Chen S, Yu B Y, *et al.* Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model [J]. *Eur J Med Chem*, 2006, 41(5): 605-610.
- [10] Tong Q, Hou X, Fang J, *et al.* Determination of dihydromyricetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 114: 455-461.
- [11] 向东, 熊微, 王文清, 等. 二氢杨梅素制剂新技术与新剂型的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 689-694.
- [12] 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.
- [13] 齐娜, 黄凤香, 廖迎, 等. 二氢杨梅素脂质体的处方优化及性质考察 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(6): 1427-1433.
- [14] Teixeira M C, Carbone C, Souto E B. Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery [J]. *Prog Lipid Res*, 2017, 68: 1-11.
- [15] 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.
- [16] 陈一桢, 张文娟, 唐兰如, 等. 和厚朴酚长循环脂质体的制备及药动学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3720-3727.
- [17] Yang G, Yang T, Zhang W, *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.
- [18] Solanki S S, Sarkar B, Dhanwani R K. Microemulsion drug delivery system: For bioavailability enhancement of ampelopsin [J]. *ISRN Pharm*, 2012, doi:10.5402/2012/108164.
- [19] 叶勇, 欧贤红, 黄秋洁, 正交法优选二氢杨梅素微囊的制备工艺 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2251-2252.
- [20] 白秀秀, 夏广萍, 赵娜夏, 等. 羟丙基- β -环糊精对二氢杨梅素的增溶作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 12-14.
- [21] 黄仁杰, 鄢雪梨, 狄万鹏, 等. 蛇葡萄素纳米胶束含量与包封率的测定 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 261-265.
- [22] 张斌, 谷克仁, 潘丽, 等. 脂质体的性质及制备方法的研究进展 [J]. 粮食与油脂, 2015, 28(10): 17-20.
- [23] 何桂霞, 裴刚, 李斌, 等. 二氢杨梅素的稳定性研究 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(22): 1888-1890.
- [24] 邓英杰, 史淑芬, 顾学裘. 油酸多相脂质体 (139) 注射液包封率测定方法的研究 [J]. 药学报, 1988, 23(7): 539-544.
- [25] 向东, 熊微, 王文清, 等. 二氢杨梅素制剂新技术与新剂型的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(4): 689-694.
- [26] 何欢, 陈惠杰, 刁磊, 等. 大豆异黄酮脂质体的包封率测定及其物理性质检测 [J]. 吉林农业, 2017(10): 55-56.