

白屈菜红碱 2 种脂质体的制备和口服生物利用度比较

张体鹏¹, 决利利^{2*}

1. 郑州澍青医学高等专科学校, 河南 郑州 450064

2. 郑州工业应用技术学院, 河南 郑州 451150

摘要: 目的 制备白屈菜红碱脂质体(chelerythrine liposomes, Che-Lip)和聚乙二醇修饰白屈菜红碱脂质体(PEGylated chelerythrine liposomes, PEG-Che-Lip), 考察其体外释药和体内口服药动学行为。方法 薄膜超声法制备 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip。单因素考察结合 Box-Behnken 响应面法优化 Che-Lip 处方, 引入二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-mPEG2000) 制备 PEG-Che-Lip。比较 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 在模拟胃肠液中溶解度、稳定性和体外释药情况。按 20 mg/kg ig 给药(以白屈菜红碱计), 测定血药浓度, 计算 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 主要药动学参数及其相对口服吸收生物利用度。结果 最优处方下制备的 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 外观为球形及类球形。Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 包封率分别为 $(82.54 \pm 0.62)\%$ 和 $(91.13 \pm 1.04)\%$, 载药量为 $(7.64 \pm 0.11)\%$ 和 $(7.55 \pm 0.18)\%$, 平均粒径分别为 (148.15 ± 7.63) nm 和 (159.37 ± 8.14) nm, ζ 电位分别为 (-34.2 ± 1.1) mV 和 (-4.2 ± 0.3) mV。PEG-Che-Lip 在模拟胃肠液稳定性高于 Che-Lip, Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 释药过程均符合 Weibull 模型。药动学结果显示, Che-Lip 的达峰浓度($C_{\max}$)和相对口服吸收生物利用度分别增加至 1.55 倍和 2.45 倍, PEG-Che-Lip 的 $C_{\max}$ 和相对口服吸收生物利用度分别增加至 2.08 倍和 5.04 倍。结论 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 可有效促进口服吸收, PEG-Che-Lip 优势更明显。

关键词: 白屈菜红碱; 脂质体; 薄膜超声法; Box-Behnken 响应面法; 模拟胃肠液; 口服生物利用度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)17-5568-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.011

Preparation of two kinds of chelerythrine liposomes and oral bioavailability comparison

ZHANG Ti-peng¹, JUE Li-li²

1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China

2. Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451150, China

Abstract: Objective To prepare chelerythrine liposomes (Che-Lip) and PEGylated chelerythrine liposomes (PEG-Che-Lip), and to study drug release *in vitro* and oral pharmacokinetic behavior *in vivo*. **Methods** Film-ultrasonic method was used to prepare Che-Lip and PEG-Che-Lip. Single factor investigation method combined with Box-Behnken response surface design method was used to investigate the optimal prescriptions of Che-Lip. PEG-Che-Lip was prepared by introducing polyethylene glycol phosphatidylethanolamine 2000 (DSPE-MPEG 2000). Solubility, stability and *in vitro* drug release of Che-Lip and PEG-Che-Lip in simulate gastrointestinal fluid were compared. Blood samples were collected after gastric administration at a dose of 20 mg/kg (chelerythrine), and plasma concentration was determined. Main pharmacokinetic parameters and relative oral bioavailability of Che-Lip and PEG-Che-Lip were also calculated. **Results** Under the optimal formulation, the appearance of Che-Lip and PEG-Che-Lip were spherical or nearly spherical, entrapment efficiency respectively were $(82.54 \pm 0.62)\%$ and $(91.13 \pm 1.04)\%$, drug loading were $(7.64 \pm 0.11)\%$ and $(7.55 \pm 0.18)\%$, average particles size were (148.15 ± 7.63) nm and (159.37 ± 8.14) nm, and ζ potential were (-34.2 ± 1.1) mV and (-4.2 ± 0.3) mV. The stability of PEG-Che-Lip in simulated gastrointestinal fluid was higher than that of Che-Lip. The drug release process of Che-Lip and PEG-Che-Lip both conformed to Weibull model. Pharmacokinetic results showed that $C_{\max}$ and relative oral bioavailability of Che-Lip was enhanced to 1.55 times and 2.45 times, and PEG-Che-Lip was enhanced to 2.08

收稿日期: 2023-03-04

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (23B310010)

作者简介: 张体鹏 (1984—), 男, 汉族, 讲师, 研究方向为临床药学及肿瘤治疗。Tel: (0371)86156352 E-mail: zhangtipeng2023@126.com

*通信作者: 决利利 (1984—), 女, 汉族, 硕士, 副教授, 从事中药药学及药理学研究。Tel: (0371)62623452 E-mail: 147374991@qq.com

times and 5.04 times, respectively. **Conclusion** Both Che-Lip and PEG-Che-Lip could promote oral absorption effectively, and the effect of PEG-Che-Lip was more obvious.

Key words: chelerythrine; liposomes; film-ultrasonic method; Box-Behnken response surface design method; simulated gastrointestinal fluid; oral bioavailability

白屈菜红碱(chelerythrine, Che)是飞龙掌血、白屈菜、两面针、血水草、博落回等中药植物的活性成分之一^[1-2],属于异喹琳类生物碱。药效学研究显示,白屈菜红碱具有抗肿瘤、镇痛、抗炎、抗肝纤维化、抗菌、止咳等多种活性,具有较大的临床使用价值^[3-5]。白屈菜红碱在水中的溶解度为 0.098 mg/L^[6],较强的疏水性导致溶出度较低,课题组测得白屈菜红碱油水分配系数为 1.13 ± 0.06 ,具有一定的亲脂性。另据研究显示^[7-8],白屈菜红碱胃肠道稳定性差,容易降解,口服吸收生物利用度仅为 7.46%^[8],限制了白屈菜红碱药效发挥及临床应用。白屈菜红碱新制剂研究有固体分散体^[6]、PLGA 纳米粒^[9]、mPEG-PLGA 纳米粒^[10]等。固体分散体容易发生析晶,失去增溶作用^[11]。PLGA 纳米粒疏水性强,易被高度黏弹性的肠道黏膜阻挡而限制了吸收程度^[12]。刘万路^[10]对白屈菜红碱 mPEG-PLGA 纳米粒进行了研究,但纳米粒表面 PEG 的修饰过度也会影响纳米粒体内吸收^[13]。

脂质体(liposomes, Lip)是将药物包裹在类脂质双分子层而形成的一种纳米囊泡,可提高药物溶解度、增加稳定性、促进吸收、增强药效等^[14-18]。但脂质体体内稳定性差,结构容易被破坏,体内循环时间不足等缺陷限制了生物利用度提高幅度^[19]。聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)是一种亲水性聚合物,PEG 修饰脂质体(PEGylated liposomes, PEG-Lip)可在表面形成一层水化膜及“构象云”^[20],有助于防止脂质体双分子层膜溶蚀及结构破坏,从而解决普通脂质体的稳定性问题;同时 PEG 修饰脂质体可赋予一定的亲水性,使其更易于透过胃肠道黏膜实现高效吸收^[20-22]。

本研究以磷脂和胆固醇作为载体材料制备了白屈菜红碱脂质体(chelerythrine liposomes, Che-Lip),引入二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-mPEG2000)制备聚乙二醇修饰白屈菜红碱脂质体(PEGylated chelerythrine liposomes, PEG-Che-Lip),比较 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 稳定性、体外释药及口服吸收生物利用度,为白屈菜红碱纳米制剂研究提供新思路,也为下一步抗肿瘤药效学评价奠定实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

FA2204N 型电子分析天平,赛多利斯仪器公司;1200 型高效液相色谱仪(HPLC),美国安捷伦公司;Nano Series-2590 型激光粒度仪,英国马尔文有限公司;CD-X15 型超声仪,深圳市亦为实业有限公司;HS-100 型离心机,德国 THF 科学仪器公司;UV-1900 型紫外可见分光光度计,日本岛津仪器有限公司;HB10 型旋转蒸发仪,德国 IKA 仪器公司;HHS-2 型电热数字显示恒温水浴锅,上海浦东荣丰科学仪器有限公司;SH-2-001 型磁力搅拌器,常州市亿能实验仪器厂;PLATILAB 340 型超低温冰箱,杭州俊升科学器材有限公司;JEM-F200 型透射电镜,日本电子株式会社;HD-E702-150B7 型恒温恒湿试验箱,昆山海达精密仪器有限公司;LGJ-12 型冻干机,深圳市三莉科技有限公司;RCZ-8N 型智能溶出试验仪,杭州俊升科学器材有限公司;NEC160-2A 型氮气吹扫仪,星辰科技山东有限公司。

1.2 试药与动物

白屈菜红碱对照品,批号 B042021,质量分数 98.0%,成都瑞芬思生物科技有限公司;白屈菜红碱原料药,批号 20200722,质量分数 96.4%,上海同田生物技术股份有限公司;延胡索乙素对照品,批号 110726-201617,质量分数 99.8%,中国食品药品检定研究院;胆固醇,批号 20201012,克拉玛尔公司;磷脂(型号 PC-98T,批号 20210318)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-mPEG2000,批号 B67412),上海辅必成医药科技有限公司;三氟乙酸,批号 20201022,上海坤桔化工有限公司;模拟胃液(批号 220714)、模拟肠液(批号 220620),东莞市创峰自动化科技有限公司;乳糖,批号 191120,北京艾普迪医药科技有限公司;甘露醇,批号 20200626,四川博利恒药业有限公司。

SD 大鼠,清洁级,雌雄兼用,购自河南省动物实验中心提供[SCXK(豫)2020-0001],实验室饲养至体质量 220~240 g 后进行药动学研究。动物实验遵循郑州澍青医学高等专科学校有关实验动物管理和使用的规定,均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 的制备^[23]

取 20 mg 白屈菜红碱溶于 5 mL 无水乙醇, 取处方量的磷脂和胆固醇溶于 10 mL 氯仿, 两者合并后超声 5 min (功率为 200 W), 置于圆底烧瓶, 于旋转蒸发仪上减压旋蒸除去有机溶剂 (温度为 45 °C, 转速为 60 r/min), 得一层均匀透明薄膜。加入 30 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 值为 6.8), 45 °C 恒温水化一定时间, 超声 (功率为 200 W), 过 0.45 μm 微孔滤膜, 即得 Che-Lip 混悬液。PEG-Che-Lip (含 DSPE-mPEG2000) 和空白脂质体同法制备。

2.2 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 中白屈菜红碱含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长为 282 nm; 流动相为甲醇-0.05 mol/L 的 KH₂PO₄ 溶液 (35 : 65); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C, 进样体积为 20 μL。理论塔板数以白屈菜红碱峰计不低于 8000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 20 mg 白屈菜红碱对照品至 100 mL 量瓶中, 加入适量甲醇超声溶解 (功率为 200 W), 甲醇稀释定容, 摇匀, 即得 200 μg/mL 白屈菜红碱对照品储备液。

2.2.3 线性关系考察 取适量白屈菜红碱对照品储备液, 以流动相作为稀释液, 稀释配制成质量浓度分别为 10.00、5.00、1.00、0.50、0.10、0.05 μg/mL 的一系列白屈菜红碱对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。以白屈菜红碱质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=22.3672X+0.6144$, $r=0.9995$, 结果表明白屈菜红碱的线性范围为 0.05~10.00 μg/mL。

2.2.4 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 供试品溶液的制备 精密量取 Che-Lip 混悬液 1 mL 至 50 mL 量瓶中, 加 40 mL 甲醇超声 5 min (功率为 200 W), 加入甲醇稀释定容, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 得续滤液。取续滤液 2.5 mL 至 10 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 摇匀即得 Che-Lip 供试品溶液。PEG-Che-Lip 和空白脂质体的供试品溶液同法制备。

2.2.5 专属性考察 取空白脂质体供试品溶液、白屈菜红碱对照品溶液、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 供试品溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 结果见图 1。试验结果表明白屈菜红碱色谱峰峰形良好, 保留时间约 7.6 min, 制剂辅料未干扰色谱峰, 专属性较高。

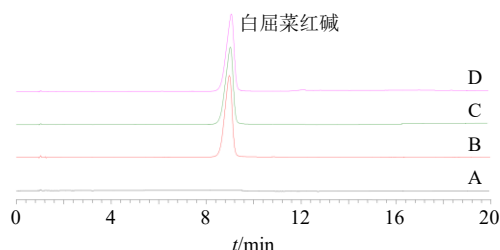


图 1 空白脂质体样品 (A)、白屈菜红碱对照品 (B)、Che-Lip 供试品 (C) 和 PEG-Che-Lip 供试品 (D) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of blank liposome sample (A), chelerythrine reference substance (B), Che-Lip sample (C) and PEG-Che-Lip sample (D)

2.2.6 稳定性考察 取“2.2.4”项下 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 供试品溶液, 分别于 0、2、6、12、24、48 h 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得白屈菜红碱峰面积的 RSD 分别为 0.47%、0.85%, 结果表明稳定性良好。

2.2.7 精密度考察 取 0.05 μg/mL (低)、1.00 μg/mL (中) 和 10.00 μg/mL (高) 白屈菜红碱对照品溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件测定 6 次, 计算得低、中、高质量浓度白屈菜红碱峰面积的 RSD 分别为 0.42%、0.36%、0.26%, 表明仪器精密度良好。

2.2.8 重复性考察 按“2.2.4”项下方法操作, 分别平行制备 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 供试品溶液 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得白屈菜红碱质量浓度的 RSD 分别为 0.94% 和 1.16%, 表明该实验重复性良好。

2.2.9 加样回收率考察 考察精密吸取 0.5 mL 的 Che-Lip 混悬液置于 50 mL 量瓶中, 共 9 份, 分为低、中、高质量浓度各 3 组, 分别加入白屈菜红碱对照品储备液 (质量浓度 200 μg/mL) 0.8、1.6、2.4 mL, 后续按“2.2.3”项下方法制备 Che-Lip 供试品溶液, 进样测定, 计算得平均加样回收率为 100.67%, RSD 为 1.60%。

同法考察 PEG-Che-Lip 的加样回收率, 计算得其平均加样回收率为 99.14%, RSD 为 0.83%, 试验结果表明准确度较高。

2.3 包封率、载药量、粒径和 ζ 电位的测定

精密取 1 mL 的 Che-Lip 混悬液至超滤管 (平均截留相对分子质量 10 000), 8000 r/min 离心 10 min (离心半径为 8.6 cm, 温度为 4 °C), 取续滤液测定游离白屈菜红碱量 (W_1)。取 1 mL 的 Che-Lip 按“2.2.4”项下方法测定总白屈菜红碱的量 (W_0), 另取 1 mL 的 Che-Lip 直接冻干, 称定质量 (W)。计

算 Che-Lip 包封率和载药量^[24]。

$$\text{包封率} = (W_0 - W_1) / W_0$$

$$\text{载药量} = (W_0 - W_1) / W$$

PEG-Che-Lip 的包封率和载药量同法测定。

取 Che-Lip 混悬液 0.1 mL, 加入蒸馏水稀释 40 倍, 涡旋 3 s 混匀, 取适量于粒径分析仪上测定 Che-Lip 粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位。PEG-Che-Lip 的粒径、PDI 和 ζ 电位同法测定。

2.4 Che-Lip 处方工艺单因素考察

2.4.1 磷脂与胆固醇比例的考察 白屈菜红碱投药量为 20 mg, 脂药比为 10:1 (脂总量代表磷脂与胆固醇总量), 水化时间为 25 min, 超声时间为 20 min 条件下考察磷脂与胆固醇比例对 Che-Lip 包封率和载药量的影响, 结果见表 1。随着磷脂比例的增加 Che-Lip 包封率和载药量均先增加后下降, 可能是胆固醇用量过多时, 胆固醇与白屈菜红碱共同竞争磷脂双分子层空间^[14], 不利于载药。胆固醇用量不足时 Che-Lip 稳定性差^[16,25], 药物容易泄露。不同磷脂与胆固醇比例制得 Che-Lip 的粒径均小于 200 nm。综合考虑, 选择磷脂与胆固醇比例 4:1~6:1 进行优化。

2.4.2 脂药比的考察 白屈菜红碱投药量为 20 mg, 磷脂与胆固醇比例为 5:1, 水化时间为 25 min, 超声时间为 20 min 条件下考察脂药比对 Che-Lip 包封率和载药量的影响, 结果见表 2。随着脂质用量的增加 Che-Lip 包封率逐渐增加, 载药量呈先下降后增大, 而后再下降。这是由于适量增加脂质用量利于增加 Che-Lip 包封率, 但脂质用量过多时会降低 Che-Lip 载药量。不同脂药比制得 Che-Lip 的粒径小于 200 nm。综合考虑, 选择脂药比 8:1~12:1 进行优化。

2.4.3 水化时间的影响 白屈菜红碱投药量为 20

表 1 磷脂与胆固醇比例的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Investigation of phospholipids to cholesterol ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂与胆固醇比例	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm
3:1	50.21±0.92	4.03±0.27	198.73±9.23
4:1	58.09±1.19	4.72±0.18	183.09±7.80
5:1	71.94±1.38	5.54±0.24	164.24±8.11
6:1	69.02±1.23	5.47±0.20	179.75±7.72
7:1	61.88±0.99	4.80±0.19	182.22±8.98

表 2 脂药比的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Investigation of lipids-drug ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂药比	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm
6:1	56.14±1.08	6.21±0.22	183.16±8.47
8:1	62.96±1.12	5.76±0.28	188.89±7.27
10:1	77.09±1.30	6.16±0.19	173.23±8.19
12:1	82.82±1.47	5.68±0.24	162.90±8.22
14:1	83.98±1.64	4.99±0.20	175.15±7.56

mg, 磷脂与胆固醇比例为 5:1, 脂药比为 10:1, 超声时间为 20 min 条件下考察水化时间对 Che-Lip 包封率和载药量的影响, 结果见表 3。Che-Lip 包封率和载药量随着水化时间的延长呈现先增加后下降情况, 可能是由于水化时间较短时脂质膜未能充分溶胀, 不利于包裹药物^[26], 磷脂稳定性不高, 水化时间过长时容易导致磷脂氧化变质, 导致药物泄露, 从而影响 Che-Lip 包封率和载药量。在水化时间 15~45 min 时粒径均小于 200 nm, 综合考虑, 选择水化时间 15~45 min 进行优化。

2.4.4 超声时间的影响 白屈菜红碱投药量为 20 mg, 磷脂与胆固醇比例为 5:1, 脂药比为 10:1, 水化时间为 25 min 条件下考察超声时间 Che-Lip 包封率和载药量的影响, 结果见表 4。随着超声时间增加 Che-Lip 包封率和载药量均增加后下降, 超声时间愈长, 包封率和载药量下降越大, 说明过长超声时间可能会对 Che-Lip 产生破坏作用, 导致药物泄露。粒径随着超声时间增加呈先减小后增大趋势,

表 3 水化时间的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Investigation of hydration time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化时间/min	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm
5	60.32±1.42	5.21±0.28	227.84±11.11
15	75.18±1.08	6.06±0.19	182.17±6.97
25	83.74±1.36	6.59±0.23	170.75±8.44
45	74.06±1.65	5.96±0.27	172.92±7.86
55	70.87±1.49	5.64±0.24	185.56±9.13

表 4 超声时间考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Investigation of ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm
15	80.40±1.67	6.26±0.25	203.29±12.05
20	85.12±1.43	6.55±0.20	165.71±8.12
25	83.04±1.29	6.42±0.28	176.72±9.36
30	73.09±1.31	6.16±0.18	208.02±9.93
35	66.65±1.07	5.34±0.19	231.64±10.84

由于超声时间为 20 min 时 Che-Lip 包封率和载药量相对较大,粒径相对较小,故确定超声时间为 20 min。

2.5 Box-Behnken 响应面法优化 Che-Lip 处方

2.5.1 试验方案 据“2.4”项下单因素考察结果,发现磷脂与胆固醇比例(X_1)、脂药比(X_2)和水化时间(X_3)对 Che-Lip 包封率(Y_1)和载药量(Y_2)

影响较大,故选择 X_1 、 X_2 和 X_3 为自变量, Y_1 和 Y_2 为因变量,设计 Box-Behnken 响应面优化 Che-Lip 处方。结合单因素考察结果各自变量水平见表 5,根据 Box-Behnken 响应面法给出的试验方案制备不同处方 Che-Lip,各个处方均平行 3 份,分别测定 Che-Lip 包封率和载药量,取平均值,结果见表 5。

表 5 Box-Behnken 试验设计结果 ($n=3$)

Table 5 Experimental design results of Box-Behnken ($n=3$)

序号	X_1	X_2	X_3/min	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	序号	X_1	X_2	X_3/min	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	序号	X_1	X_2	X_3/min	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	5 (0)	10 (0)	30 (0)	85.17	6.63	7	5	10	30	82.74	6.63	13	5	8	15	70.44	7.14
2	4 (-1)	10	15 (-1)	72.56	6.04	8	5	8	45	65.87	5.64	14	5	10	30	84.67	6.61
3	6 (+1)	8 (-1)	30	69.83	6.42	9	6	10	15	70.42	5.89	15	5	12	45	76.98	4.92
4	4	12 (+1)	30	74.53	5.34	10	5	12	15	73.81	5.39	16	6	10	45	72.82	5.26
5	5	10	30	83.25	6.52	11	5	10	30	82.45	6.54	17	6	12	30	76.45	5.14
6	4	10	45 (+1)	69.63	5.21	12	4	8	30	68.99	6.47						

2.5.2 模型的建立以及分析 根据表 5 实验数据,得包封率 Y_1 二次多元回归方程为 $Y_1=83.66+0.48X_1+3.33X_2-0.24X_3+0.27X_1X_2+1.33X_1X_3+1.94X_2X_3-5.81X_1^2-5.39X_2^2-6.49X_3^2$, $R^2=0.9887$, $R_{\text{adj}}^2=0.9743$, 模型 P 值 <0.0001 , 失拟 F 值=0.8504; 载药量 Y_2 二次多元回归方程为 $Y_2=6.59-0.04X_1-0.61X_2-0.43X_3-0.04X_1X_2+0.05X_1X_3+0.26X_2X_3-0.46X_1^2-0.29X_2^2-0.53X_3^2$, $R^2=0.9937$, $R_{\text{adj}}^2=0.9857$, 模型 P 值 <0.0001 , 失拟 F 值=

0.0942)。方程 Y_1 和 Y_2 的 R^2 和 R_{adj}^2 值均大于 0.95, 模型 P 值均具极显著性差异, 失拟 F 值均大于 0.05 (无显著性差异), 可见建立的 Y_1 和 Y_2 数学模型可用于 Che-Lip 处方工艺研究, 可靠性高。方程分析结果见表 6, 对于 Y_1 来讲, 方程中 X_2 、 X_1X_3 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具显著性差异; 对于 Y_2 来讲, 方程中 X_2 、 X_3 、 X_2X_3 、 X_1^2 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具显著性差异。

2.5.3 效应面优化与预测 固定 X_1 、 X_2 和 X_3 因素

表 6 包封率和载药量方差分析

Table 6 Analysis of variance of entrapment efficiency and drug loading

项目	自由度	包封率				载药量			
		离均差平方和	均方	F 值	P 值	离均差平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	606.83	67.43	68.29	<0.0001	7.40	0.82	123.33	<0.0001
X_1	1	1.81	1.81	1.84	0.2173	0.02	0.02	2.30	0.1735
X_2	1	88.71	88.71	89.85	<0.0001	2.98	2.98	446.25	<0.0001
X_3	1	0.47	0.47	0.47	0.5144	1.47	1.47	220.46	<0.0001
X_1X_2	1	0.29	0.29	0.30	0.6037	6.25×10^{-3}	6.25×10^{-3}	0.84	0.3890
X_1X_3	1	7.10	7.10	7.19	0.0314	0.01	0.01	1.50	0.2604
X_2X_3	1	14.98	14.98	15.17	0.0059	0.27	0.27	39.76	0.0004
X_1^2	1	142.22	142.22	144.03	<0.0001	0.88	0.88	132.40	<0.0001
X_2^2	1	122.53	122.53	124.08	<0.0001	0.34	0.34	51.45	0.0002
X_3^2	1	177.16	177.16	179.44	<0.0001	1.17	1.17	175.97	<0.0001
残差	10	6.91	0.99			0.05	6.67×10^{-3}		
失拟项	5	1.13	0.38	0.26	0.8504	0.04	0.01	4.37	0.0942
纯误差	5	5.78	1.44			0.01	2.73×10^{-3}		
总差	19	613.74				7.45			

中之一,采用 Design Expert V8.0.6 对各因素之间的交互作用进行分析,绘制两两因素对包封率和载药量的三维曲面图,结果见图 2。随着磷脂与胆固醇

比例、脂药比或水化时间的增加,Che-Lip 包封率和载药量均呈现先增大后减小趋势。选择包封率和载药量最大值为优化目标,得到 Che-Lip 最佳处方为

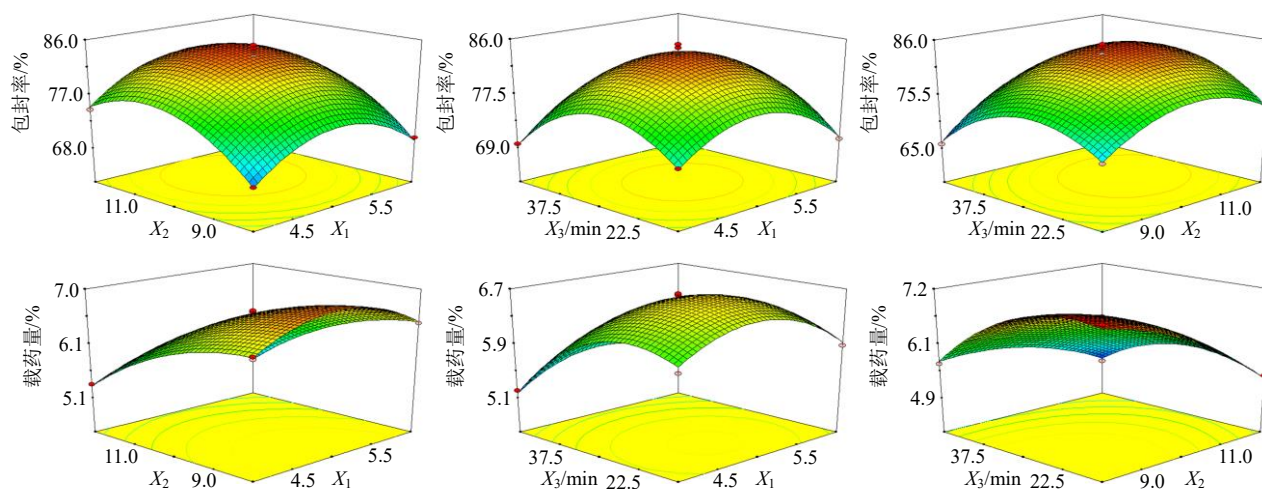


图 2 各因素与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plot of independent factors and response values

磷脂与胆固醇比例为 4.91 : 1, 脂药比为 9.58 : 1, 水化时间为 26.69 min。模型预测的包封率和载药量分别为 82.70%和 7.79%。

2.6 Che-Lip 最佳工艺确认及偏差

为便于操作,将 Che-Lip 最佳处方略作调整(调整幅度小于 $\pm 1\%$),即磷脂与胆固醇比例调整为 4.9 : 1, 脂药比为 9.6 : 1, 水化时间为 26.7 min。制备 3 批 Che-Lip 样品,测定包封率和载药量。按公式[相对偏差=(实测值-预测值)/预测值]计算相对偏差,结果表明见表 7,实际值与数学模型的预测值相对偏差绝对值均小于 5%,说明该数学模型对 Che-Lip 处方工艺研究具有较强的指导意义。

2.7 PEG-Che-Lip 的制备

参考“2.6”项下确定的 Che-Lip 处方,按照磷脂物质的量百分比(0.5%、2.5%、5%、7.5%、10%)加入 DSPE-mPEG2000,后续按“2.2”项所述方法制备 PEG-Che-Lip,测定包封率和载药量,结果见表 8。随着 DSPE-mPEG2000 用量的增加,PEG-Che-Lip 包封率和载药量均呈现先增加后下降趋势,可

表 7 包封率和载药量相对偏差结果

Table 7 Results of relative deviation for envelopment efficiency and drug loading

项目	包封率/%	载药量/%
预测值	82.70	7.79
实测值	82.54 $\pm$ 0.62	7.64 $\pm$ 0.11
偏差	-0.19	-1.92

表 8 DSPE-PEG2000 用量的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Investigation of DSPE-PEG2000 dose ($\bar{x} \pm s, n=3$)

DSPE-PEG2000 用量/%	包封率/%	载药量/%
0.5	80.19 $\pm$ 1.16	7.27 $\pm$ 0.21
2.5	84.07 $\pm$ 1.03	7.33 $\pm$ 0.18
5.0	90.98 $\pm$ 1.57	7.56 $\pm$ 0.23
7.5	86.12 $\pm$ 1.38	6.72 $\pm$ 0.17
10.0	82.46 $\pm$ 1.25	6.24 $\pm$ 0.18

能是由于 Che-Lip 表面经适量的 DSPE-mPEG2000 修饰后可阻止表层及浅表层药物泄露^[23],利于提高包封率及载药量。但 DSPE-mPEG2000 用量过大时脂质体表面 PEG 长链之间的排斥作用改变了脂质体表面的致密性,药物可能发生泄露,使包封率及载药量下降。当 DSPE-mPEG2000 加入量为 5%时 PEG-Che-Lip 包封率和载药量均相对最高,故确定 DSPE-mPEG2000 用量为磷脂物质的量的 5%。

2.8 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 表征

2.8.1 粒径及 ζ 电位的测定 按“2.3”项下测试方法,测得 Che-Lip 平均粒径为 (148.15 $\pm$ 7.63) nm, PDI 值为 0.106 $\pm$ 0.011, ζ 电位为 (-34.2 $\pm$ 1.1) mV。PEG-Che-Lip 平均粒径为 (159.37 $\pm$ 8.14) nm, PDI 值 0.940 $\pm$ 0.012, ζ 电位为 (-4.2 $\pm$ 0.3) mV。粒径分布和 ζ 电位分别见图 3、4。

2.8.2 紫外吸收光谱考察 取白屈菜红碱原料药、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 混悬液,适量甲醇溶解,置于紫外分光光度计中进行扫描,扫描范围为 200~

400 nm, 结果见图 5。白屈菜红碱制备成 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 后紫外吸收光谱未发生改变, 说明其化学结构仍保持不变。

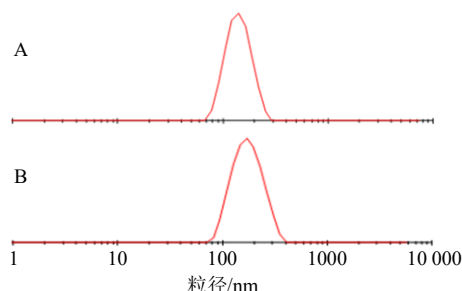


图 3 Che-Lip (A) 和 PEG-Che-Lip (B) 的粒径分布
Fig. 3 Particle size distribution of Che-Lip (A) and PEG-Che-Lip (B)

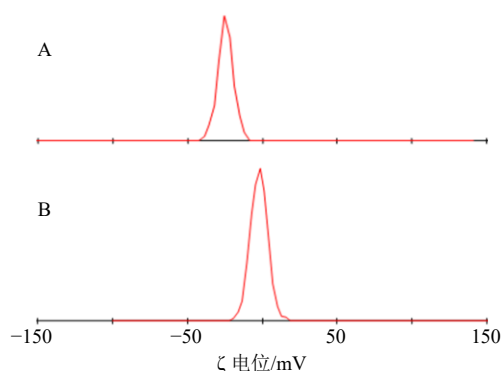


图 4 Che-Lip (A) 和 PEG-Che-Lip (B) 的 ζ 电位
Fig. 4 ζ potential of Che-Lip (A) and PEG-Che-Lip (B)

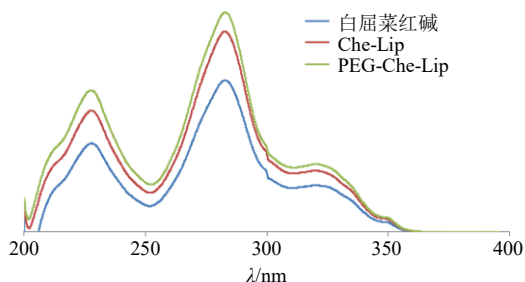


图 5 紫外吸收光谱
Fig. 5 Ultraviolet absorption spectrum

2.8.3 透射电镜观察微观形态 分别取 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 混悬液 0.1 mL, 加入蒸馏水稀释 40 倍, 涡旋 3 s 混匀, 滴至铜网上, 铺展后静置 10 min, 采用 2% 磷钨酸钠染色, 自然晾干后置于透射电镜上, 放大至 14 000 倍观察 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 微观形态。结果见图 6, Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 呈圆形或椭圆形囊泡状。

2.9 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉末的制备

取冻干保护剂 (甘露醇-乳糖 2:1, 质量比) 至适量蒸馏水中, 涡旋 30 s 至溶解澄清, 加入 Che-Lip

混悬液, 继续加入适量蒸馏水使冻干保护剂最终质量浓度为 4%。分装至西林瓶中, $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻 2 d, 立即冷冻干燥 2 d, 取出即得 Che-Lip 冻干粉, 密封。同法制备 PEG-Che-Lip 冻干粉, 外观见图 7。Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 混悬液均呈淡蓝色乳光, Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉外观均饱满, 色泽均一。

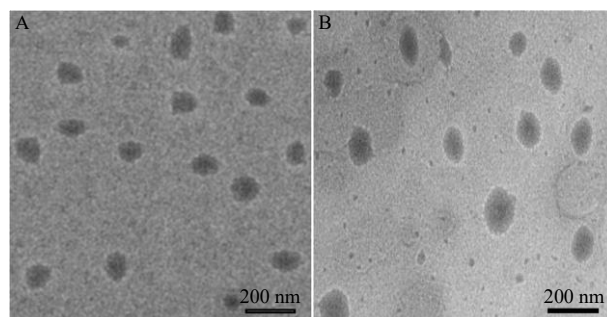


图 6 Che-Lip (A) 和 PEG-Che-Lip (B) 的透射电镜图
Fig. 6 Transmission electron microscope for Che-Lip (A) and PEG-Che-Lip (B)



图 7 Che-Lip (A)、PEG-Che-Lip (B)、Che-Lip 冻干粉 (C) 和 PEG-Che-Lip 冻干粉 (D) 外观
Fig. 7 Appearance of Che-Lip (A), PEG-Che-Lip (B), Che-Lip lyophilized powder (C) and PEG-Che-Lip lyophilized powder (D)

2.10 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 在模拟胃、肠液中溶解度及稳定性考察

2.10.1 模拟胃、肠液中溶解度考察^[16] 取过量的白屈菜红碱原料药、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的模拟胃液中 (pH 2.0), 75 r/min 磁力搅拌 24 h。取出样品于 12 500 r/min 离心 30 min (离心半径为 6.8 cm, 温度为 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 取上清液进样测定白屈菜红碱浓度^[9]。白屈菜红碱原料药、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的模拟肠液 (pH 6.8) 溶解度同法考察, 结果见表 9。Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉均可大幅度提高原料药在模拟胃肠液中溶解度^[10]。

2.10.2 模拟胃、肠液中稳定性考察 取白屈菜红碱原料药、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉适量, 加入模拟胃液 (pH 2.0) 使白屈菜红碱质量浓度为 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中进行孵育, 分别于 0、0.5、

表 9 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 的溶解度考察结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 9 Results of solubility test of Che-Lip and PEG-Che-Lip ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

样品	溶解度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	
	模拟胃液	模拟肠液
白屈菜红碱原料药	156.74 $\pm$ 1.62	59.68 $\pm$ 0.94
Che-Lip 冻干粉	716.98 $\pm$ 3.73	607.61 $\pm$ 3.13
PEG-Che-Lip 冻干粉	757.45 $\pm$ 3.61	630.42 $\pm$ 3.29

1、1.5、2 h 取样测定白屈菜红碱质量浓度，计算剩余白屈菜红碱质量分数，结果见图 8。

同法考察白屈菜红碱原料药、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 在 37 °C 模拟肠液 (pH 6.8) 稳定性，取样点为 0、2、4、6、8、10、12 h，结果见图 8。白屈菜红碱、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 在模拟胃液中 2 h 后含量分别下降至 91.47%、93.34%、97.22%；在模拟肠液中 12 h 后含量分别下降至 66.08%、76.95%、93.27%，说明 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 均可增加白屈菜红碱在模拟胃肠液中的稳定性，但 PEG-Che-Lip 优势更大。

2.11 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 在模拟胃、肠液中粒径稳定性情况

取 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉适量加入蒸馏水，得混悬液，置于 37 °C 模拟胃液 (pH 2.0) 中进行孵育，分别于 0.5、1、1.5、2 h 取样测定粒径。2 h 后换成 37 °C 模拟肠液 (pH 6.8)，分别于 4、6、8、12 h 取样测定粒径。结果见图 9，Che-Lip 在 8 h

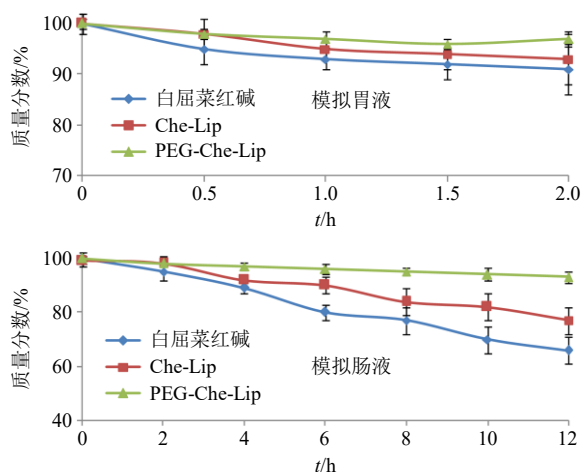


图 8 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 在模拟胃、肠液中白屈菜红碱含量变化情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Chelerythrine content changes in simulated gastrointestinal fluid of Che-Lip and PEG-Che-Lip ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

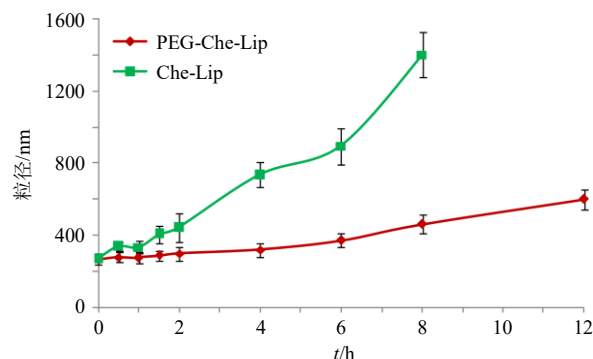


图 9 模拟胃肠液中粒径稳定性比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Comparison of particle size stability in simulated gastrointestinal fluid ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

时粒径大于 1000 nm，故后续不再测定；PEG-Che-Lip 在 12 h 时平均粒径为 (594.79 $\pm$ 84.13) nm，说明 PEG-Che-Lip 在模拟胃、肠液中粒径稳定性高于 Che-Lip。

2.12 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 体外释药行为比较及模型拟合

取白屈菜红碱原料药、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉适量 (白屈菜红碱含量均为 20 mg)，加入 5 mL 空白介质得混悬液，分别置于透析袋中 (截留相对分子质量 8000~14 000)，尼龙绳扎紧。取 900 mL 模拟胃液 (pH 2.0) 作为释药介质，温度为 37 °C，转速为 75 r/min，于 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 h 取样 5 mL，并补加空白模拟胃液 5 mL。2 h 后将释药介质替换为体积为 900 mL、温度为 37 °C 的模拟肠液 (pH 6.8)，于 3、4、6、8、10、12、18 h 同法取样。样品于 12 500 r/min 离心 (离心半径为 6.8 cm，温度为 4 °C) 30 min，取上清液测定白屈菜红碱含量，结果见图 10。白屈菜红碱原料药、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 在 18 h 累积释放率分别为 35.20%、62.89% 和 72.58%。Che-Lip 前 10 h 各点累积释放率均高于

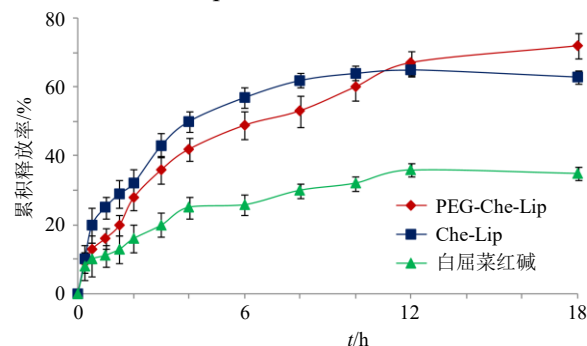


图 10 模拟胃、肠液中释放曲线的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 Comparison of drug release profiles in simulated gastric and intestinal fluids ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

PEG-Che-Lip, 但 18 h 累积释放率低于 PEG-Che-Lip。Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 释药模型拟合结果见表 10, 由相关系数 R^2 大小可知, Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 释药过程与 Weibull 模型拟合度最高, 属于典型的双相动力学特征^[27-28]。

2.13 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉稳定性研究

取 Che-Lip 冻干粉和 PEG-Che-Lip 冻干粉分别密封置于温度为 4 ℃ 冰箱中, 于 0、5、15、30、45、

60、75、90 d 取样分别测定包封率和粒径。结果见表 11, Che-Lip 冻干粉在 90 d 时, 包封率下降至 $(70.91 \pm 0.79)\%$, 粒径增长至 $(215.96 \pm 9.02) \text{ nm}$; 而 PEG-Che-Lip 冻干粉的包封率和粒径波动幅度明显较小, 可见 PEG-Che-Lip 冻干粉储存稳定性优于 Che-Lip 冻干粉, 可能是由于 PEG-Che-Lip 表面的 PEG 长链提供了空间位阻作用, 可阻止脂质体之间聚集、融合, 进而提高了稳定性。

表 10 药物释放模型和相关系数

Table 10 Fitting release model and correlation coefficient

样品	模型	拟合方程	R^2
Che-Lip	零级模型	$M_t/M_\infty = 0.029 t + 0.253$	0.618 7
	一级模型	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.052 t - 0.318$	0.6963
	Higuchi 模型	$M_t/M_\infty = 0.157 t^{1/2} + 0.099$	0.869 4
	Weibull 模型	$\ln[-\ln(1 - M_t/M_\infty)] = 0.484 \ln t - 1.172$	0.918 6
PEG-Che-Lip	零级模型	$M_t/M_\infty = 0.036 t + 0.173$	0.831 7
	一级模型	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.069 t - 0.164$	0.938 0
	Higuchi 模型	$M_t/M_\infty = 0.179 t^{1/2} + 0.018$	0.977 4
	Weibull 模型	$\ln[-\ln(1 - M_t/M_\infty)] = 0.683 \ln t - 1.648$	0.987 2

t 为时间, M_t/M_∞ 为 t 时间累积释放百分率, M_∞ 为 ∞ 时累积释放率, M_t 为 t 时间累积释放率

t is time, M_t/M_∞ is accumulative release rate at time t , M_∞ is accumulative drug-release at time ∞ , M_t is accumulative drug-release at time t

表 11 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉的稳定性考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 11 Stability testing of Che-Lip and PEG-Che-Lip lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	Che-Lip 冻干粉		PEG-Che-Lip 冻干粉	
	包封率/%	平均粒径/nm	包封率/%	平均粒径/nm
0	79.64 $\pm$ 1.06	161.04 $\pm$ 6.89	88.59 $\pm$ 0.95	172.90 $\pm$ 8.05
5	79.92 $\pm$ 1.58	161.77 $\pm$ 7.50	88.03 $\pm$ 1.32	177.54 $\pm$ 7.65
15	79.57 $\pm$ 1.92	162.80 $\pm$ 7.41	88.48 $\pm$ 0.96	175.68 $\pm$ 9.24
30	79.08 $\pm$ 0.63	166.56 $\pm$ 7.57	88.06 $\pm$ 1.05	178.22 $\pm$ 8.26
45	77.97 $\pm$ 0.74	169.11 $\pm$ 8.16	87.69 $\pm$ 1.17	180.56 $\pm$ 7.93
60	76.62 $\pm$ 1.28	180.58 $\pm$ 7.99	87.37 $\pm$ 1.82	181.63 $\pm$ 9.40
75	72.40 $\pm$ 0.87	193.42 $\pm$ 8.17	87.41 $\pm$ 1.06	183.47 $\pm$ 7.63
90	70.91 $\pm$ 0.79	215.96 $\pm$ 9.02	86.87 $\pm$ 1.26	189.58 $\pm$ 8.68

2.14 口服药动力学研究

2.14.1 试验方案 取白屈菜红碱原料药、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 冻干粉适量, 加入 0.5% 的 CMC-Na 制备灌胃液。将禁食 12 h 的 18 只 SD 大鼠随机平均分为 3 组, 每组实验动物雌雄大鼠各半, 记录各组 SD 大鼠体质量后, 使用灌胃针按 20 mg/kg (以白屈菜红碱计) ig 给药。白屈菜红碱原料药组和 Che-Lip 组分别于给药后 0.167、0.5、0.75、1、1.5、2、

4、6、8、10、12 h 乙醚麻醉大鼠, 立即于眼眶后静脉丛取血约 0.25 mL。PEG-Che-Lip 组分别于给药后 0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、6、8、10、12、18 h 同法取血, 血样置于肝素浸润离心管中, 混匀后 3000 r/min 离心 2 min, 取上层淡黄色血浆至空白离心管中, 冷冻保存。

2.14.2 血浆样品的处理过程^[29] 取血浆室温解冻, 精密取 100 μL 至离心管中, 加入 20 μL 内标和 0.8 mL 含 10% 三氟乙酸的乙腈, 涡旋 30 s 得混悬液, 超声 5 min (功率为 200 W)。8500 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 5 min, 取上层有机相采用氮气缓慢吹干 (温度为 40 ℃)。加入 100 μL 甲醇复溶, 8500 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 5 min, 取上清液进样测定。

2.14.3 血药浓度测定色谱条件 色谱柱为 Waters C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 检测波长为 282 nm; 流动相为甲醇-0.05 mol/L 的 KH₂PO₄ 溶液 (33:67); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 35 ℃, 进样体积为 20 μL 。

2.14.4 线性关系考察 甲醇配制质量浓度为 1200 ng/mL 延胡索乙素对照品溶液, 作为内标溶液。取质量浓度为 1600、800、400、200、100、40 ng/mL

的系列白屈菜红碱对照品溶液，各质量浓度分别精密取 100 μL 至离心管中，氮气缓慢吹干（温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ ），加入 100 μL 空白血浆涡旋 30 s，按照“2.14.2”项下处理方法制备血浆对照品溶液，分别按“2.14.3”项下色谱条件进样测定。采用白屈菜红碱质量浓度为横坐标（ X ），白屈菜红碱与延胡索乙素峰面积比为纵坐标（ Y ），进行线性回归，得回归方程 $Y=0.0025X-0.1671$ ， $r=0.9962$ ，表明白屈菜红碱在 40~1600 ng/mL 线性关系良好。

2.14.5 专属性考察 取空白血浆、白屈菜红碱血浆对照品溶液（含延胡索乙素内标溶液）和 Che-Lip 12 h 血浆样品（含延胡索乙素内标溶液），分别进样，按“2.14.3”项下色谱条件测定，色谱图见图 11，延胡索乙素和白屈菜红碱色谱峰均不受其他杂质影响，表明专属性高。

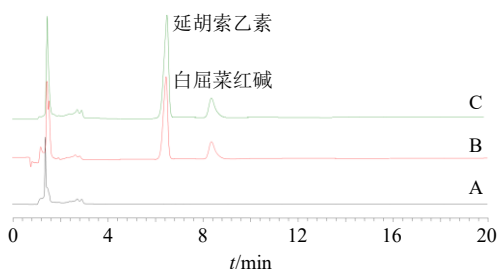


图 11 空白血浆 (A)、血浆样品 (B) 和血浆对照品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 11 HPLC chromatogram of blank plasma (A), plasma sample (B) and plasma reference substance (C)

2.14.6 稳定性考察 取血浆样品溶液置于室温环境，分别于 0、2、4、6、12、18 h 按“2.14.3”项下色谱条件进样测定，记录白屈菜红碱和延胡索乙素峰面积，计算得峰面积比值的 RSD 为 9.07%，表明血浆样品溶液稳定性良好。

2.14.7 精密度考察 取白屈菜红碱质量浓度为 40、400、1600 ng/mL 的血浆对照品溶液，按“2.14.3”

项下色谱条件连续测试 6 次，记录白屈菜红碱和延胡索乙素峰面积，计算得峰面积比值的 RSD 分别为 6.54%、3.67%、5.11%，表明仪器精密度良好。

2.14.8 准确度考察 分别取质量浓度为 40、400、1600 ng/mL 的白屈菜红碱对照品溶液 100 μL ，每个质量浓度 3 份，40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干，分别加入空白血浆 100 μL ，按“2.14.2”项下方法操作并按“2.14.3”项下色谱条件测定延胡索乙素和白屈菜红碱，带入“2.14.4”项下血浆对照品回归方程计算白屈菜红碱测得质量浓度，与实际质量浓度对比计算回收率。结果显示，平均回收率为 96.46%，RSD 为 7.06%，表明准确度较高。

2.14.9 药动力学结果 白屈菜红碱原料药、Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 药动力学曲线见图 12。使用 3P97 药动力学软件对实验数据进行处理，血药浓度（ C_{max} ）和药-时曲线下面积（AUC）对数转换后进行独立样本 t 检验，非参数法秩和检验对达峰时间（ t_{max} ）及半衰期（ $t_{1/2}$ ）检验，结果见表 12。与白屈菜红碱相比，Che-Lip 的 t_{max} 和 $t_{1/2}$ 无显著性变化（ $P>0.05$ ），但 C_{max} 、 $\text{AUC}_{0\sim t}$ 、 $\text{AUC}_{0\sim\infty}$ 均有显著性增加（ $P<0.05$ ）， C_{max} 和相对口服吸收生物利用度分别增加至 1.55 倍和 2.45 倍。PEG-Che-Lip 的 t_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 C_{max} 、 $\text{AUC}_{0\sim t}$ 、

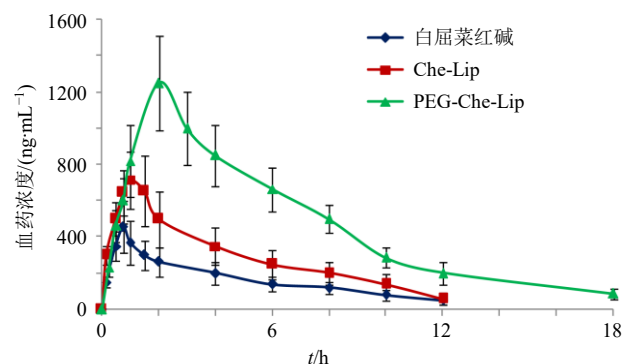


图 12 药-时曲线（ $\bar{x} \pm s$, $n=6$ ）

Fig. 12 Profiles of plasma concentration-time ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 12 药动力学参数（ $\bar{x} \pm s$, $n=6$ ）

Table 12 Pharmacokinetic parameters ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

参数	单位	白屈菜红碱	Che-Lip	PEG-Che-Lip
t_{max}	h	0.76 ± 0.19	1.08 ± 0.32	$1.94 \pm 0.41^{**\#}$
$t_{1/2}$	h	2.67 ± 0.34	2.81 ± 0.37	$4.55 \pm 0.73^{**\#}$
C_{max}	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	462.14 ± 72.55	$715.23 \pm 134.61^*$	$1296.08 \pm 312.87^{**\#}$
$\text{AUC}_{0\sim t}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	1604.10 ± 226.79	$3936.47 \pm 672.92^*$	$8098.69 \pm 1021.64^{**\#}$
$\text{AUC}_{0\sim\infty}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	1682.63 ± 243.64	$4204.31 \pm 703.40^*$	$8249.41 \pm 1179.85^{**\#}$

与白屈菜红碱组比较：* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 Che-Lip 组比较：# $P<0.05$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Che group；# $P<0.05$ vs Che-Lip group

$AUC_{0\sim\infty}$ 均有极显著性变化 ($P<0.01$), $C_{\max}$ 和相对口服吸收生物利用度增加至 2.08 倍和 5.04 倍。与 Che-Lip 相比, PEG-Che-Lip 的 $t_{\max}$ 、 $t_{1/2}$ 、 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 、 $AUC_{0\sim\infty}$ 均有显著性变化 ($P<0.05$), 说明 PEG-Che-Lip 促吸收作用更具优势。

3 讨论

普通脂质体在机体胃肠道中稳定性差, 被坏后导致药物泄露, 不能充分发挥纳米制剂优势, 因而增加普通脂质体在胃、肠道的稳定性是脂质体近几年重点研究方向^[20,22]。本研究在 Che-Lip 处方中引入 DSPE-mPEG2000 材料成功制备了 PEG-Che-Lip, 结果显示 PEG-Che-Lip 在模拟胃、肠液结构稳定性高于 Che-Lip, 可能是由于 DSPE-mPEG2000 结构中的 PEG 长链具有较高的柔顺性, 覆盖在脂质体表面形成一层水化膜及“构象云”^[20], 有助于维持脂质体结构免受破坏。白屈菜红碱在 Che-Lip 与 PEG-Che-Lip 模拟胃、肠液中稳定性实验也表明, PEG-Che-Lip 比 Che-Lip 更能降低药物降解, 这可能是由于 PEG-Che-Lip 稳定性更高, 对包裹于内部的药物起到了保护作用^[20], 从而有助于增加药物口服吸收生物利用度。

模拟胃、肠液体外释药结果显示, Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 提高了白屈菜红碱在模拟胃、肠液中的累积释放率, 可能是由于白屈菜红碱原料药粒度较大、疏水性强等限制了药物溶出速率及溶出度。制备成 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 后药物粒径、溶解性质等发生了较大改变^[10,30], 从而促进了白屈菜红碱释放。PEG-Che-Lip 前期累积释放率低于 Che-Lip, 可能是由于 DSPE-mPEG2000 在脂质体表面形成一层保护膜, 延缓了药物释放所致^[23]。但 PEG-Che-Lip 后期累积释放率高于 Che-Lip, 可能是由于白屈菜红碱在模拟肠液中稳定性较差^[7-8], 而 PEG-Che-Lip 稳定性高于 Che-Lip, 所以更能发挥保护作用, 降低被包裹药物降解速率, 最终增加了累积释放率。

白屈菜红碱在碱性环境中稳定性较差, 血浆 pH 值一般在 7.0 左右, 因此血浆样品需及时检测。前期对乙腈、甲醇、1%乙酸的乙腈、10%三氟乙酸的乙腈等蛋白沉淀剂进行考察, 结果发现 10%三氟乙酸的乙腈作为蛋白沉淀剂时白屈菜红碱回收率最高。Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 相对口服吸收生物利用度增加分别至 2.45 倍和 5.04 倍, 均有效促进了药物吸收, 可能是由于 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 均

改善了白屈菜红碱的溶解度及溶出度等^[16], 为体内吸收奠定基础; Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 粒径较小, 增加了药物与胃、肠道接触面积, 利于药物透膜吸收; 药物被包裹于脂质体后降低了胃、肠道各种酶对白屈菜红碱代谢、降解等, 最终增加了白屈菜红碱的口服吸收。

与 Che-Lip 相比, PEG-Che-Lip 的 $t_{\max}$ 发生了显著性延后, 可能是由于 DSPE-mPEG2000 高分子材料赋予 PEG-Che-Lip 一定的胃肠道黏附性^[20,22], 影响了吸收速度, 在 PEG-Che-Lip 缓释作用下最终使 $t_{\max}$ 发生延后^[10]。PEG-Che-Lip 的 $t_{1/2}$ 显著性延长, 可能是由于 PEG-Che-Lip 在胃、肠道一定时间内可保持其纳米结构, 可能以整体形式吸收进入血液循环^[32], 从而对 $t_{1/2}$ 产生影响。据报道^[13], PEG 修饰量对药物口服药动学及相对生物利用度会产生一定影响, 本研究证明了 DSPE-mPEG2000 用量为磷脂物质的量的 5%时可显著促进白屈菜红碱口服吸收, 至于不同 DSPE-mPEG2000 用量对口服吸收的影响仍有待于进一步研究。本研究完成了 Che-Lip 和 PEG-Che-Lip 制备工艺及药动学研究, 后续将对 DSPE-mPEG2000 用量对口服吸收的影响、注射药动学、抗肿瘤等药效进行研究, 以丰富该纳米制剂的研究资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 周佳, 邱智东, 王雨辰, 等. 白屈菜红碱的研究进展 [J]. 人参研究, 2022, 34(6): 46-49.
- [2] 宋伶俐, 赵征, 王强, 等. 博落回化学成分和药理活性研究 [J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(1): 95-98.
- [3] 都姝麟, 李丽荣, 顾硕, 等. 白屈菜药理作用综合研究进展 [J]. 吉林中医药, 2022, 42(1): 84-87.
- [4] 章亮, 陈泽慧, 陈韩英, 等. 基于网络药理学的白屈菜抗肿瘤分子机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 646-657.
- [5] 李磊, 杨学亮, 张云, 等. 白屈菜红碱对腺样囊性癌细胞生长的抑制作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(7): 1361-1367.
- [6] 王云, 李平平, 高振坤, 等. 白屈菜红碱固体分散体的制备及其理化性质和抗氧化活性研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(9): 1054-1061.
- [7] Zhou Q H, Liu Y P, Wang X, et al. A sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of five isoquinoline alkaloids from *Chelidonium majus* L. in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Mass*

- Spectrum*, 2013, 48(1): 111-118.
- [8] Lin Q Y, Ma C, Guan H D, *et al.* Metabolites identification and reversible interconversion of chelerythrine and dihydrochelerythrine *in vitro/in vivo* in rats using ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 189: 113462.
- [9] 徐志杰. 白屈菜红碱 PLGA 纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2022, 44(10): 3091-3097.
- [10] 刘万路. Box-Behnken 设计-效应面法优化白屈菜红碱 mPEG-PLGA 纳米粒处方制备工艺及其药动学研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(23): 7361-7371.
- [11] 欧丽泉, 蔡萍, 赵国巍, 等. 载体材料对延胡索乙素固体分散体成型性与稳定性的影响 [J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41(18): 1830-1835.
- [12] 黄华婷, 蔡梦如, 付京, 等. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒载中药抗肿瘤成分的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(22): 7295-7306.
- [13] 王乐健. 沙奎那韦固体脂质纳米粒的制备及口服吸收研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [14] 周伟成, 刘宇灵, 陈颖翀, 等. 去氢骆驼蓬碱包合物脂质体的制备及体外性质评价 [J]. *中草药*, 2022, 53(24): 7696-7705.
- [15] Duong T T, Isomäki A, Paaver U, *et al.* Nanoformulation and evaluation of oral berberine-loaded liposomes [J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2591.
- [16] 禹瑞, 吕东霞, 谈秀凤. 橙皮苷脂质体的制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2022, 44(8): 2443-2449.
- [17] 陈江丽, 邱智东, 金媛媛, 等. 水飞蓟素脂质体的制备、质量评价及其对 HaCaT 细胞增殖和摄取的影响 [J]. *中草药*, 2022, 53(12): 3614-3624.
- [18] 王佳辉, 陈麟, 孙平, 等. 黄芩苷脂质体凝胶制备、质量评价及其对痤疮的药效学评价 [J]. *中草药*, 2021, 52(16): 4860-4872.
- [19] Zhang A L, Li J B, Wang S S, *et al.* Rapid and improved oral absorption of *N*-butylphthalide by sodium cholate-appended liposomes for efficient ischemic stroke therapy [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 2469-2479.
- [20] Yamazoe E, Fang J Y, Tahara K. Oral mucus-penetrating PEGylated liposomes to improve drug absorption: Differences in the interaction mechanisms of a mucoadhesive liposome [J]. *Int J Pharm*, 2021, 593: 120148.
- [21] 张雅雯, 尹丽娜, 黄夏樱, 等. PEG 化脂质纳米粒促进积雪草酸口服吸收研究 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(14): 2784-2788.
- [22] Singh A, Neupane Y R, Shafi S, *et al.* PEGylated liposomes as an emerging therapeutic platform for oral nanomedicine in cancer therapy: *In vitro* and *in vivo* assessment [J]. *J Mol Liq*, 2020, 303: 112649.
- [23] 张文娟, 陈一桢, 唐兰如, 等. 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 [J]. *中草药*, 2018, 49(4): 806-813.
- [24] 王利媛, 林华庆, 刘荣, 等. 盐酸多柔比星脂质体的制备及体外质量评价 [J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(8): 892-896.
- [25] 董荧荧, 余陈欢, 俞冰, 等. 土贝母皂苷甲长循环脂质体的制备及体外性质考察 [J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(7): 832-836.
- [26] 刘淼, 高悦, 李康帆, 等. 聚乙二醇修饰木犀草素脂质体的制备及其理化性质 [J]. *现代食品科技*, 2021, 37(10): 118-125.
- [27] 卢慧芳, 刘艳美, 王荷香, 等. 穿心莲内酯甲氧基聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸纳米粒处方优化及体外释药考察 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(19): 2034-2039.
- [28] 尹元元, 耿燕娜, 范明松. Box-Behnken 设计-效应面法优化延胡索乙素聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方和体外释药行为研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(22): 6806-6815.
- [29] Hu N X, Chen M, Liu Y S, *et al.* Pharmacokinetics of sanguinarine, chelerythrine, and their metabolites in broiler chickens following oral and intravenous administration [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2019, 42(2): 197-206.
- [30] 吕东霞, 禹瑞, 屈战果, 等. 芒果苷固体脂质纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. *中成药*, 2020, 42(11): 2835-2839.
- [31] Yin X Y, Luo L H, Li W, *et al.* A cabazitaxel liposome for increased solubility, enhanced antitumor effect and reduced systemic toxicity [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2019, 14(6): 658-667.
- [32] Sarhadi S, Moosavian SA, Mashreghi M, *et al.* B12-functionalized PEGylated liposomes for the oral delivery of insulin: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2022, 69(1): 103141-103151.

[责任编辑 郑礼胜]