

牛血清白蛋白/壳聚糖双层包覆染料木素脂质体的制备、表征和口服药动学研究

刘万路

威海海洋职业学院, 山东 威海 264300

摘要:目的 制备牛血清白蛋白/壳聚糖双层包覆染料木素脂质体(genistein liposomes bilayer-coated by bovine serum albumin/chitosan, BSA/CS-Gen-Lip), 并考察口服药动学行为。方法 单因素考察结合 Box-Behnken 设计-响应面法筛选染料木素脂质体(genistein liposomes, Gen-Lip)最佳处方工艺, 并进一步制备成 BSA/CS-Gen-Lip。透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察微观形貌, X 射线粉末衍射法(X-ray powder diffraction method, XRPD)分析晶型, 比较不同 pH 值释放介质中的释药情况。以染料木素原料药为参考, 比较 BSA/CS-Gen-Lip 在体内药物代谢动力学行为。结果 BSA/CS-Gen-Lip 最佳制备条件为磷脂与胆固醇比为 10.1:1, 脂药比 20.7:1, 水化时间为 1.5 h, 壳聚糖质量浓度为 0.2%, BSA 质量浓度为 0.5%。BSA/CS-Gen-Lip 封装率为 $(89.53 \pm 1.60)\%$, 载药量为 $(1.87 \pm 1.41)\%$, 粒径为 (303.84 ± 23.67) nm, ζ 电位为 (-13.27 ± 0.89) mV。TEM 显示 BSA/CS-Gen-Lip 无黏连现象, XRPD 分析表明染料木素在 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉中以无定型状态存在。BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉在 pH 2.0 或 pH 7.4 磷酸盐缓冲液中体外释药过程均符合 Weibull 模型。药动学结果显示, BSA/CS-Gen-Lip 的达峰时间(time to peak, $t_{\max}$)延后至 (2.17 ± 0.71) h, 半衰期(half-life period, $t_{1/2}$)延长至 (6.89 ± 1.12) h, 达峰浓度(peak concentration, $C_{\max}$)和相对口服吸收生物利用度分别提高至 2.33 倍和 4.00 倍。结论 BSA/CS-Gen-Lip 显著改变了染料木素药动学行为, 增加了口服吸收生物利用度。

关键词: 染料木素; 脂质体; Box-Behnken 设计-响应面法; 壳聚糖; 牛血清白蛋白; 累积释放度; 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)24-8018-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.007

Genistein liposomes bilayer-coated by bovine serum albumin/chitosan: Preparation, characterization and oral pharmacokinetics study

LIU Wan-lu

Weihai Ocean Vocational College, Weihai 264300, China

Abstract: Objective To prepare genistein liposomes bilayer-coated by bovine serum albumin/chitosan (BSA/CS-Gen-Lip), and study its oral pharmacokinetic behavior. **Methods** Single factor investigation method combined with Box-Behnken design-response surface method was used to investigate the optimal prescriptions of genistein liposomes (Gen-Lip), and then BSA/CS-Gen-Lip was prepared. The morphology of BSA/CS-Gen-Lip was observed by transmission electron microscopy (TEM), crystal forms were analyzed by X-ray powder diffraction method (XRPD). Drug release in different pH media was compared. Using genistein as a reference, pharmacokinetics behavior *in vivo* of BSA/CS-Gen-Lip was compared. **Results** The optimal prescriptions for BSA/CS-Gen-Lip: phospholipids to cholesterol ratio was 10.1:1, lipids to drug ratio was 20.7:1, hydration time was 1.5 h, chitosan concentration was 0.2% and BSA concentration was 0.5%. Encapsulation efficiency, drug loading, particle size and ζ potential were $(89.53 \pm 1.60)\%$, $(1.87 \pm 1.41)\%$, (303.84 ± 23.67) nm, (-13.27 ± 0.89) mV, respectively. TEM showed no adhesion in BSA/CS-Gen-Lip, and XRPD analysis showed that genistein existed as an amorphous state in BSA/CS-Gen-Lip lyophilized powder. *In vitro* release of BSA/CS-Gen-Lip lyophilized powder in pH 2.0 or pH 7.4 phosphate buffer (PBS) was in accordance with Weibull model. Pharmacokinetic result showed that time to peak ($t_{\max}$) of BSA/CS-Gen-Lip was delayed to (2.17 ± 0.71) h, time to peak ($t_{1/2}$) prolonged to (6.89 ± 1.12) h, peak concentration ($C_{\max}$) and oral bioavailability increased to 2.33 times and 4.00 times. **Conclusion** BSA/CS-Gen-Lip significantly altered the pharmacokinetic behavior of genistein and increased its oral bioavailability effectively.

收稿日期: 2023-05-08

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目(51804021); 山东省高等学校海洋食品药品资源开发新技术研发中心科研专项资金项目(SDSY20230011)

作者简介: 刘万路(1981—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为现代给药系统。Tel: (0631)7697687 E-mail: liuwlanlu2010@126.com

Key words: genistein; liposome; Box-Behnken design-response surface method; chitosan; bovine serum albumin; cumulative release rate; oral bioavailability

染料木素又称染料木黄酮,属于异黄酮类化合物,可从葛根、三叶草、槐角、山豆根等植物中提取得到^[1],该成分具有抗肿瘤、降血糖、抗菌、抗动脉粥样硬化等活性^[2-4]。研究表明^[5],口服染料木素基本无毒副作用,安全性高,具备开发及临床使用价值^[1]。染料木素溶解度仅为 $(3.07 \pm 0.01) \text{ mg/L}$ ^[6],油水分配系数($\lg P$)为 1.45 ^[7],属于生物药剂学分类系统中 II 类药物^[6]。染料木素胃肠道内易被代谢^[8],稳定性差,绝对生物利用度仅为 6.8% ^[9],严重影响药效及临床应用。目前染料木素制剂研究报道有包合物^[10]、固体分散体^[11]、自微乳^[12]等,但包合物或固体分散体在改善药物生物利用度或药效等方面低于纳米制剂^[13],而染料木素纳米自微乳处方中存在大量表面活性剂,安全性存疑,故需要开发一种安全性好、生物利用度高的染料木素纳米制剂。

普通脂质体是一种具有磷脂双层分子层结构、类生物膜的纳米囊泡,可在一定程度上提高生物利用度^[14-17]。但普通脂质体易受胃肠道 pH 值、各种酶及胆盐破坏^[18],从而发生乳化、水解等,导致药物泄露,因此对脂质体表面修饰是提高体内稳定性及储存稳定性的有效方法^[18-19]。壳聚糖具有良好生物可降解性和生物相容性,其正电荷可与带负电荷的脂质体表面相互作用,进而实现有效包覆^[20]。但壳聚糖的酸膨胀性和碱不溶性容易导致壳聚糖包覆脂质体结构不稳定^[21],为解决壳聚糖修饰脂质体的缺陷,本研究利用白蛋白负电荷性质与壳聚糖正电性进行静电组装^[22],进一步修饰脂质体,进而实现双层修饰,赋予脂质体更好的生物相容性、结构稳定性及缓释效果。

Box-Behnken 设计-响应面法(Box Behnken design-response surface method, BBD-RSM)作为一种工艺优化工具,具有精确、高效等特点。本研究采用 BBD-RSM 优化染料木素脂质体(genistein liposomes, Gen-Lip)处方,并进一步制备成壳聚糖包覆染料木素脂质体(chitosan-coated genistein liposomes, CS-Gen-Lip)和牛血清白蛋白/壳聚糖双层包覆染料木素脂质体(bovine serum albumin/chitosan-coated genistein liposomes, BSA/CS-Gen-Lip),示意图见图 1。对 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉中药物晶型、体外释药行为、储存稳定性等进行考察,

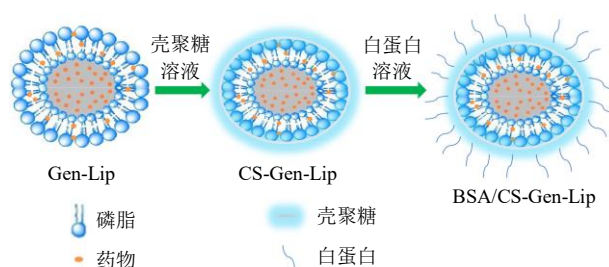


图 1 BSA/CS-Gen-Lip 制备工艺示意图

Fig. 1 Schematic diagram of BSA/CS-Gen-Lip preparation

并以染料木素原料药为参考,比较 BSA/CS-Gen-Lip 相对口服生物利用度,为下一步研究工作奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1200 型高效液相色谱仪(HPLC),美国 Agilent 公司; RE-52AA 型旋转蒸发仪,绍兴上虞艾科仪器设备有限公司; MS205DU 型电子分析天平,美国 Mettler Toledo 公司; RC12A 型溶出试验仪,上海沪粤明科学仪器有限公司; Mastersizer 3000E 型动态光散射粒度仪,英国马尔文公司; CU-600 型电热恒温水浴锅,上海福玛实验设备有限公司; SH-2 型磁力搅拌器,常州市亿能实验仪器厂; JEM-2010F 型透射电镜(TEM),日本日立株式会社; D8 Advance 型 X 射线粉末衍射仪,瑞士布鲁克公司; NEC160-2A 型氮气流扫仪,山东星辰科技有限公司; DW-FL450 型超低温冰箱,上海沛升仪器设备有限公司; FD-1D-80 型冷冻干燥机,上海贺帆仪器有限公司。

1.2 材料与动物

染料木素对照品,批号 K18642,质量分数 98.9%,西安开来生物工程有限公司;磺胺甲噁唑,批号 100025-200904,质量分数 99.6%,中国食品药品检定研究院;磷脂,批号 20200811,上海辅必成医药科技有限公司;胆固醇,批号 20200719,克拉玛尔公司;壳聚糖,批号 20210714,相对分子质量 100 000,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;染料木素原料药(批号 200528,质量分数 97.1%)、牛血清白蛋白(批号 20221106),湖北帝柏化工有限公司;乳糖,批号 20191105,国药集团化学试剂有限公司。

清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,河南省动物实验中心[SCXK(豫)2020-0001],体质量为 180~220

g. 所有动物实验遵循威海海洋职业学院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 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 制备过程

薄膜分散法制备 Gen-Lip^[16-17]。精密取染料木素 20 mg 和处方量脂质载体(磷脂和胆固醇)置于圆底烧瓶中, 加入 50 mL 的无水乙醇-三氯甲烷(6:4)溶剂, 于 50 °C 下磁力搅拌(800 r/min)至溶解澄清, 置于 45 °C 旋蒸仪中(30 r/min)缓慢除去有机溶剂, 即在圆底烧瓶壁上形成均匀薄膜。加入一定 pH 值水相溶液 50 mL, 于一定温度下磁力搅拌(800 r/min), 使之充分水化, 超声 15 min(功率为 200 W), 使用 0.45 μm 水膜滤过, 即得 Gen-Lip 混悬液。加入一定质量浓度壳聚糖溶液制备 CS-Gen-Lip 混悬液^[20], 加入一定质量浓度的牛血清白蛋白制备 BSA/CS-Gen-Lip 混悬液^[22]。空白脂质体同法制备(不含染料木素)。

2.2 染料木素含量的测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温为 30 °C; 流动相为甲醇-水(30:70); 检测波长为 260 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μL; 理论塔板数以染料木素计不低于 6000。

2.2.2 线性关系考察 精密称取染料木素对照品 20 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加入 80 mL 甲醇超声溶解, 静置 10 min, 用甲醇稀释至刻度得 200 μg/mL 染料木素对照品储备液。用流动相稀释配制 10.00、5.00、2.00、1.00、0.50、0.02 μg/mL 一系列染料木素对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定染料木素各个质量浓度(X)的峰面积(Y), 以峰面积对质量浓度进行线性回归, 得线性回归方程 $Y=13.6827X+0.8243$, $r=0.9999$, 结果表明染料木素在 0.02~10.00 μg/mL 线性关系良好。

2.2.3 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 供试品溶液的制备 精密量取 Gen-Lip 混悬液 1 mL, 加至 50 mL 容量瓶中, 加入 40 mL 甲醇超声 5 min 后定容, 过 0.45 μm 微孔滤膜(前 3 滴弃去)。取 5 mL 续滤液置于 10 mL 量瓶中, 加入流动相稀释定容, 即得 Gen-Lip 供试品溶液。CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 供试品溶液同法制备。

2.2.4 专属性考察 按“2.2.3”项下方法制备阴性供试品溶液。另取染料木素对照品溶液、Gen-Lip、

CS-Gen-Lip、BSA/CS-Gen-Lip 供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 色谱图见图 1。发现该色谱条件专属性较高。

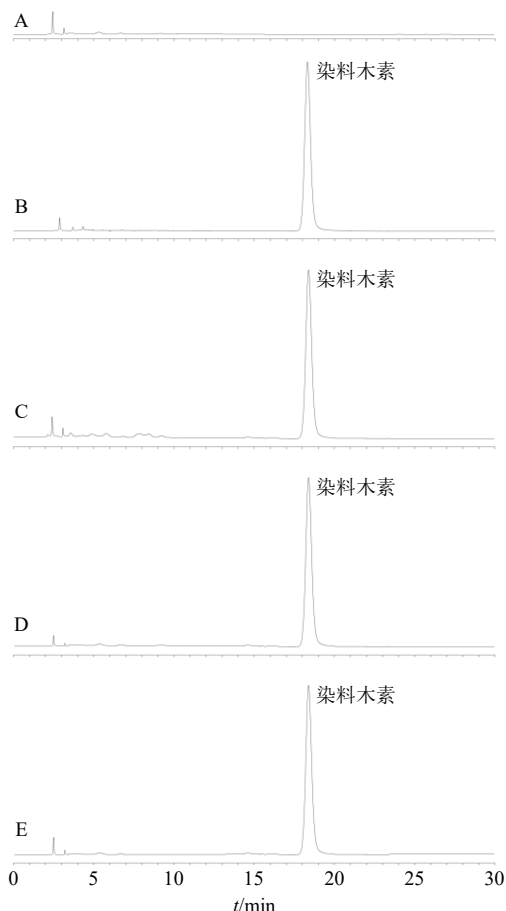


图 1 空白辅料 (A)、染料木素对照品 (B)、Gen-Lip (C)、CS-Gen-Lip (D)、BSA/CS-Gen-Lip (E) 供试品溶液的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank excipients (A), genistein reference substance (B), Gen-Lip (C), CS-Gen-Lip (D), BSA/CS-Gen-Lip (E) sample solution

2.2.5 精密度考察 取低、中、高质量浓度(0.02、2.00、10.00 μg/mL)染料木素对照品溶液各 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 测得染料木素峰面积的 RSD 分别为 0.36%、0.28%、0.20%, 表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 Gen-Lip、CS-Gen-Lip、BSA/CS-Gen-Lip 供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、6、12、24 h 进样测定, 计算得染料木素峰面积的 RSD 分别为 0.92%、1.17%、1.24%, 结果表明 3 种供试品溶液稳定性均良好。

2.2.7 重复性考察 按照“2.2.3”项下方法分别制备 6 份 Gen-Lip、CS-Gen-Lip、BSA/CS-Gen-Lip 供

试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,测得 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 中染料木素质量分数的 RSD 分别为 1.72%、1.34%、0.96%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 精密取 9 份体积为 0.5 mL 的 Gen-Lip 混悬液,分别加入染料木素储备液(质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$) 0.5、1.0、1.5 mL 制备供试品溶液,分别平行 3 份。CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 同法操作,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,测得 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 中染料木素的平均加样回收率分别为 99.40%、100.89%、99.79%,RSD 分别为 1.47%、0.94%、1.11%,结果表明该实验准确度较高。

2.3 包封率、载药量、粒径及 ζ 电位的测定

精密取 Gen-Lip 混悬液 2 mL,离心机温度为 4 $^{\circ}\text{C}$,于 12 500 r/min 离心(离心半径 6.8 cm) 30 min。取上清液测定游离染料木素量(记作 W_1)。按照“2.2.3”项下方法处理样品,进 HPLC 测定染料木素总量(W_0)。CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 的 W_1 和 W_0 同法测定,按下式计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_0 - W_1) / W_0$$

$$\text{载药量} = (W_0 - W_1) / W$$

W 代表染料木素、脂质材料和修饰材料总量

取 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 混悬液各 0.1 mL,蒸馏水稀释 50 倍,取适量置于比色皿中,于粒径分析仪上分别测定粒径、多分散指数(polydispersity index, PDI)及 ζ 电位。

2.4 单因素考察 Gen-Lip 处方工艺

2.4.1 脂药比的考察 固定染料木素投药量为 20 mg,磷脂与胆固醇比例为 10:1,水相 pH 值为 6.5,水化温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,水化时间为 1.5 h 条件下考察脂药比的影响,结果见表 1。随着脂质用量增加,Gen-Lip 包封率呈增加后趋稳情况,说明磷脂用量对药物的包载程度是有限的^[16],过多脂质用量也会影响

Gen-Lip 载药量。Gen-Lip 粒径在 200~250 nm, PDI 值均小于 0.3,可见脂药比对 Gen-Lip 包封率和载药量影响较大,需继续优化。

2.4.2 磷脂与胆固醇比例的考察 固定染料木素投药量为 20 mg,脂药比 20:1,水相 pH 值为 6.5,水化温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,水化时间为 1.5 h 条件下考察磷脂与胆固醇比例的影响,结果见表 2。随着磷脂比例增加,Gen-Lip 包封率和载药量均先增加后下降,可能是由于胆固醇比例过大时导致脂质体超负荷,影响囊泡结构的形成^[17];胆固醇比例较小时脂质体稳定性差,药物易泄露。Gen-Lip 粒径在 200~250 nm, PDI 值均小于 0.3,可见磷脂与胆固醇比例对 Gen-Lip 包封率和载药量有较大影响,需继续优化。

2.4.3 水相 pH 值的考察 固定染料木素投药量为 20 mg,脂药比 20:1,磷脂与胆固醇比例 10:1,水化温度为 40 $^{\circ}\text{C}$,水化时间为 1.5 h 条件下考察水相 pH 值影响,结果见表 3。随着水相 pH 值的增加 Gen-Lip 包封率和载药量总体呈增加趋势,可能是由于脂质体主要材料在低 pH 值中稳定性较差,进而影响载药,但水相 pH 值过高时会使 Gen-Lip 粒径和 PDI 值增大^[23]。综合考虑,确定 pH 值为 6.5。

2.4.4 水化温度的影响 固定染料木素投药量为 20 mg,脂药比 20:1,磷脂与胆固醇比例 10:1,水相 pH 值为 6.5,水化时间为 1.5 h 条件下考察水化温度的影响,结果见表 4。随着水化温度的升高

表 2 磷脂与胆固醇比例的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

磷脂与胆固醇比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI
5:1	54.75 $\pm$ 1.11	2.78 $\pm$ 0.24	229.14 $\pm$ 13.04	0.257 $\pm$ 0.019
7.5:1	63.91 $\pm$ 1.26	3.06 $\pm$ 0.16	211.67 $\pm$ 9.55	0.208 $\pm$ 0.021
10:1	78.46 $\pm$ 1.46	3.72 $\pm$ 0.18	207.82 $\pm$ 10.61	0.152 $\pm$ 0.019
12.5:1	76.12 $\pm$ 1.50	3.60 $\pm$ 0.20	206.94 $\pm$ 9.74	0.176 $\pm$ 0.024
15:1	70.95 $\pm$ 1.79	3.32 $\pm$ 0.17	210.58 $\pm$ 10.28	0.219 $\pm$ 0.018

表 3 水相 pH 值的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Investigation of aqueous pH value ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水相 pH 值	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI
5.5	70.77 $\pm$ 1.70	3.38 $\pm$ 0.14	209.23 $\pm$ 8.95	0.277 $\pm$ 0.017
6.0	74.54 $\pm$ 1.26	3.56 $\pm$ 0.21	214.75 $\pm$ 10.24	0.201 $\pm$ 0.023
6.5	79.12 $\pm$ 1.14	3.80 $\pm$ 0.16	208.80 $\pm$ 8.46	0.147 $\pm$ 0.015
7.0	78.99 $\pm$ 1.27	3.74 $\pm$ 0.13	234.64 $\pm$ 14.15	0.186 $\pm$ 0.014

表 1 脂药比的考察 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Investigation of lipid-drug ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂药比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI
10:1	40.18 $\pm$ 0.89	3.57 $\pm$ 0.21	238.53 $\pm$ 11.87	0.245 $\pm$ 0.037
15:1	52.84 $\pm$ 1.04	3.17 $\pm$ 0.15	209.40 $\pm$ 10.65	0.214 $\pm$ 0.035
20:1	76.16 $\pm$ 1.56	3.78 $\pm$ 0.14	214.35 $\pm$ 9.14	0.147 $\pm$ 0.024
25:1	77.87 $\pm$ 1.33	3.01 $\pm$ 0.19	211.17 $\pm$ 10.50	0.143 $\pm$ 0.020
30:1	78.23 $\pm$ 1.27	2.54 $\pm$ 0.12	204.63 $\pm$ 8.62	0.194 $\pm$ 0.027

表 4 水化温度的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Investigation of hydration temperature ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化温度/℃	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI
30	65.41±1.20	3.07±0.24	192.44±9.11	0.229±0.018
35	69.78±1.36	3.36±0.17	204.81±10.25	0.194±0.015
40	78.85±1.51	3.77±0.20	209.07±11.01	0.157±0.024
45	75.24±1.17	3.59±0.25	223.83±10.45	0.186±0.021
55	68.96±1.08	3.43±0.15	239.41±13.84	0.219±0.023

Gen-Lip 包封率和载药量呈先增加后下降趋势,可能是由于水化温度较低时无法引发磷脂相变^[17],脂质膜吸水溶胀较差,不利于 Gen-Lip 载药。水化温度过高时可能会影响磷脂稳定性,同时脂质体膜通透性及流动性均易增大^[20],进而影响载药,且粒径和 PDI 值变大。综合考虑,确定水化温度为 40 ℃。

2.4.5 水化时间的影响 固定染料木素投药量为 20 mg,脂药比 20:1,磷脂与胆固醇比例 10:1,水相 pH 值为 6.5,水化温度为 40 ℃条件下分别考察水化时间的影响,结果见表 5。随着水化时间的增加 Gen-Lip 包封率和载药量先增加后下降,可能是由于水化时间较短时磷脂吸水溶胀不充分,影响 Gen-Lip 载药。水化时间过长可能会影响磷脂稳定

表 5 水化时间的考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Investigation of hydration time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化时间/h	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI
0.5	55.14±1.04	2.59±0.14	198.17±9.17	0.249±0.026
1.0	59.87±0.99	2.86±0.20	210.55±10.52	0.191±0.015
1.5	80.04±1.18	3.80±0.17	203.68±11.07	0.160±0.013
2.0	77.89±1.40	3.63±0.22	214.94±11.99	0.192±0.017
2.5	74.16±1.69	3.51±0.15	238.03±12.51	0.241±0.023

性,进而影响载药^[17],同时粒径和 PDI 值有变大趋势。可见水化时间对 Gen-Lip 包封率和载药量有较大影响,故需继续优化。

2.5 BBD-RSM 优化 Gen-Lip 处方

2.5.1 试验方案 根据“2.4”项下考察结果,发现脂药比、磷脂与胆固醇比及水化时间对 Gen-Lip 包封率和载药量影响较大,故将脂药比、磷脂与胆固醇比及水化时间分别作为自变量 X_1 、 X_2 和 X_3 ,包封率和载药量分别作为响应值 Y_1 和 Y_2 ,设计 BBD-RSM 优化 Gen-Lip 处方工艺。各个自变量水平见表 6,分别制备不同处方工艺下的 Gen-Lip (分别平行制备 3 批),测定包封率及载药量,取平均值 (RSD 值大于 2%时重新进行实验),结果见表 6。

表 6 BBD-RSM 试验设计与结果 ($n=3$)Table 6 Experiment designs and results of Box-Behnken ($n=3$)

序号	X_1	X_2	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$	序号	X_1	X_2	X_3/h	$Y_1/\%$	$Y_2/\%$
1	25:1 (+1)	7.5:1 (-1)	1.5 (0)	76.43	2.93	10	20:1	10:1	1.5	83.17	4.02
2	15:1 (-1)	10:1 (0)	1.0 (-1)	54.31	3.07	11	20:1	10:1	1.5	80.89	3.84
3	15:1	10:1	2.0 (+1)	60.54	3.52	12	20:1	7.5:1	2.0	63.53	2.84
4	20:1 (0)	10:1	1.5	80.95	3.81	13	25:1	12.5:1	1.5	77.25	2.91
5	20:1	10:1	1.5	82.82	3.95	14	20:1	7.5:1	1.0	65.13	3.02
6	25:1	10:1	2.0	76.23	2.88	15	20:1	12.5:1	2.0	64.86	3.08
7	20:1	10:1	1.5	81.66	3.91	16	25:1	10:1	1.0	77.83	3.09
8	15:1	12.5:1 (+1)	1.5	56.82	4.14	17	15:1	7.5:1	1.5	57.35	3.17
9	20:1	12.5:1	1.0	69.21	3.26						

2.5.2 模型的建立以及分析 利用 Design Expert V 8.0.6 软件进行多元回归拟合,得 Gen-Lip 包封率 Y_1 的二次多元回归方程为 $Y_1=81.900+9.840 X_1+0.710 X_2-0.160 X_3+0.340 X_1 X_2-1.960 X_1 X_3-0.690 X_2 X_3-6.70 X_1^2-8.240 X_2^2-7.980 X_3^2$, 方程 $R^2=0.9868$, $R_{adj}^2=0.9699$; Gen-Lip 载药量 Y_2 的二次多元回归方程为 $Y_2=3.91-0.140 X_1+0.054 X_2-0.015 X_3+2.50 \times 10^{-3} X_1 X_2-0.170 X_1 X_3+0.001 X_2 X_3-0.390 X_1^2-0.480 X_2^2-0.380 X_3^2$ 方程 $R^2=0.9609$, $R_{adj}^2=$

0.9507。方程拟合相关系数均高于 0.9,模型 P 值均具极显著性差异 ($P<0.01$),失拟 F 值均无显著性差异 ($P>0.05$),故建立的包封率 Y_1 和载药量 Y_2 数学模型可用来预测响应值与参数之间的关系。方程分析结果见表 7,方程 Y_1 中 X_1 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具显著性差异;方程 Y_2 中 X_1 、 $X_2 X_3$ 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具显著性差异。

2.5.3 效应面优化与最佳处方工艺确定 根据建立的数学模型绘制响应值与自变量的响应面图,结果

表 7 方差分析
Table 7 Analysis of variance

项目	自由度	Y ₁				Y ₂			
		平方和	均方	F值	P值	平方和	均方	F值	P值
模型	9	1 625.39	180.60	58.21	<0.000 1	2.74	0.30	19.12	0.000 4
X ₁	1	774.60	774.60	249.65	<0.000 1	0.15	0.15	9.33	0.018 5
X ₂	1	4.06	4.06	1.31	0.290 2	0.02	0.02	1.45	0.267 4
X ₃	1	0.22	0.22	0.07	0.798 7	1.80×10 ⁻³	1.80×10 ⁻³	0.11	0.746 5
X ₁ X ₂	1	0.46	0.46	0.15	0.712 9	2.50×10 ⁻⁵	2.50×10 ⁻⁵	1.57×10 ⁻³	0.969 5
X ₁ X ₃	1	15.33	15.33	4.94	0.061 6	0.11	0.11	6.84	0.034 6
X ₂ X ₃	1	1.89	1.89	0.61	0.460 6	0.01	0.01	0.01	0.999 8
X ₁ ²	1	188.74	188.74	60.83	0.000 1	0.64	0.64	40.07	0.000 4
X ₂ ²	1	285.90	285.90	92.14	<0.000 1	0.97	0.97	60.74	0.000 1
X ₃ ²	1	267.81	267.81	86.31	<0.000 1	0.60	0.60	37.54	0.000 5
残差	7	21.72	3.10			0.11			
失拟项	3	17.28	5.76	5.19	0.072 8	0.08		3.88	0.111 8
总偏差	4	4.44	1.11			0.03			
总离差	16	1 647.11							

见图 2。当固定某一因素不变时（取中间值），随着脂药比（X₁）、磷脂与胆固醇比（X₂）及水化时间（X₃）增加，染料木素脂质体包封率 Y₁ 和载药量 Y₂ 均呈先增大后减小趋势。选择 Gen-Lip 包封率（区间为 50%~100%）和载药量（区间为 2%~5%）最大值作为优化目标，得到 Gen-Lip 最佳处方为脂药比 20.7:1，磷脂与胆固醇比 10.13:1，水化时间 1.48 h，该数学模型预测包封率和载药量分别为 83.2%和 3.9%。

2.6 Gen-Lip 最佳工艺确认及偏差计算

为便于操作，将磷脂与胆固醇比调整为 10.1:1，水化时间调整为 1.5 h，而脂药比 20.7:1 保持不变。按调整后的处方工艺平行制备 3 批 Gen-Lip 样品，按“2.3”项下测定包封率和载药量，并计算实测值与预测值的相对偏差[相对偏差=(实测值-预测值)/预测值]。结果见表 8，实测值与预测值相对偏差绝对值均小于±5%，证明建立的包封率和载药量数学模型对 Gen-Lip 处方工艺优化具有较高的指

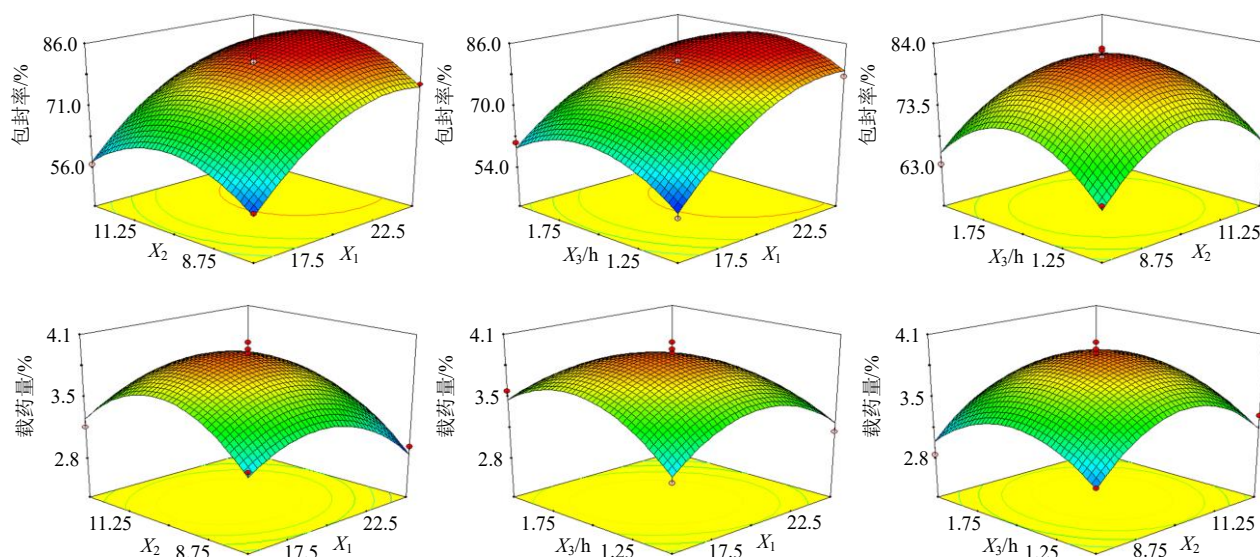


图 2 自变量与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plots of independent variables and response values

表 8 相对偏差结果

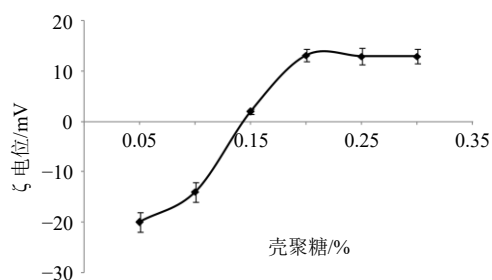
Table 8 Results of relative deviation

检查项目	预测值/%	实测值/%	偏差/%
包封率	83.2	82.84±1.37	-0.43
载药量	3.9	3.82±0.21	-2.05

导意义。

2.7 CS-Gen-Lip 的制备^[24]

采用 1%乙酸溶液配制不同质量浓度的壳聚糖溶液, 备用。精密取 Gen-Lip 混悬液 50 mL, 缓慢加入等体积的壳聚糖溶液, 于 600 r/min 磁力搅拌 2 h, 12 500 r/min 离心(离心半径 6.8 cm) 20 min, 弃去上清液, 加入 pH 值为 6.5 磷酸盐缓冲液(PBS)至 50 mL, 取适量测定 CS-Gen-Lip 的 ζ 电位, 结果见图 3。壳聚糖溶液质量浓度大于 0.2% 后 CS-Gen-Lip 的 ζ 电位基本恒定, 故确定壳聚糖溶液质量浓度为 0.2%。

图 3 壳聚糖质量浓度对 ζ 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Effects of chitosan concentration on ζ potential ($\bar{x} \pm s, n=3$)表 9 质量指标的测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 9 Determination results of quality indicators ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
Gen-Lip	82.84±1.37	3.82±0.21	196.12±10.64	0.165±0.015	-20.14±0.92
CS-Gen-Lip	89.21±1.45**	3.37±0.23*	265.36±13.80**	0.238±0.024**	12.94±1.13**
BSA/CS-Gen-Lip	89.53±1.60**	1.87±1.41**	303.84±23.67**	0.246±0.021**	-13.27±0.89**

与 Gen-Lip 比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Gen-Lip

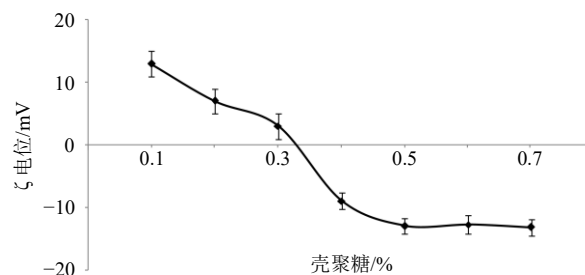
CS-Gen-Lip 载药量下降 ($P<0.05$ 、0.01)。CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 粒径极显著性增大 ($P<0.01$), 结果见图 5-A, 这与壳聚糖和牛血清白蛋白包覆在 Gen-Lip 表面有关, 同时 PDI 值也出现显著性增大 ($P<0.05$)。CS-Gen-Lip ζ 电位转变为正电性 ($P<0.01$), 结果见图 5-B, 这是由于壳聚糖本身带正电荷, 包覆于 Gen-Lip 表面后改变了 ζ 电位的电性。BSA/CS-Gen-Lip 又转变为负电性 ($P<0.01$), 这与牛血清白蛋白本身带负电荷有关^[18]。

2.8 BSA/CS-Gen-Lip 的制备

精密称取一定量的牛血清白蛋白至 CS-Gen-Lip 混悬液中, 于 600 r/min 磁力搅拌 2 h, 取适量测定 BSA/CS-Gen-Lip 的 ζ 电位, 结果见图 4。随着牛血清白蛋白质量浓度的逐渐增加, ζ 电位由正转负, 当其质量浓度大于 0.5% 时 ζ 电位基本保持不变, 为减少辅料用量, 故确定牛血清白蛋白质量浓度为 0.5%。

2.9 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 表征

2.9.1 质量指标的测定 取 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 混悬液, 分别按照“2.3”项下方法测定包封率、载药量、粒径、PDI、 ζ 电位, 结果见表 9。CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 的包封率显著增加 ($P<0.01$), 可能是由于壳聚糖和牛血清白蛋白的包覆作用, 减少了表层或浅表层药物泄露, 同时由于辅料用量的增加导致 CS-Gen-Lip 和 BSA/

图 4 牛血清白蛋白质量浓度对 ζ 电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Effects of bovine serum albumin concentration on ζ potential ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.9.2 TEM 观察 3 种脂质体微观形态 取 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 混悬液采用蒸馏水稀释 50 倍, 分别滴至碳膜涂覆的铜网, 静置 10 min, 滴加浓度为 1.5% 磷钨酸钠溶液进行染色。置于 TEM 下观察微观形貌, 结果见图 6, Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 均无黏连现象。

2.10 冻干粉制备

精密量取 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 混悬液 50 mL, 分别加入 2 g 乳糖, 震荡溶解,

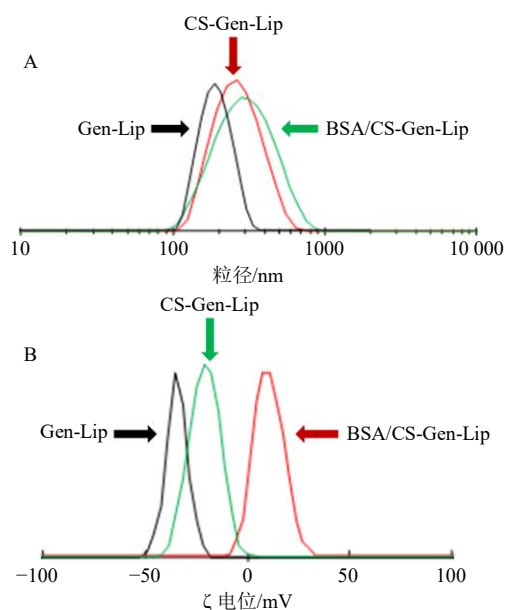


图 5 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 5 Particle size distributions (A) and ζ potentials (B) of Gen-Lip, CS-Gen-Lip and BSA/CS-Gen-Lip

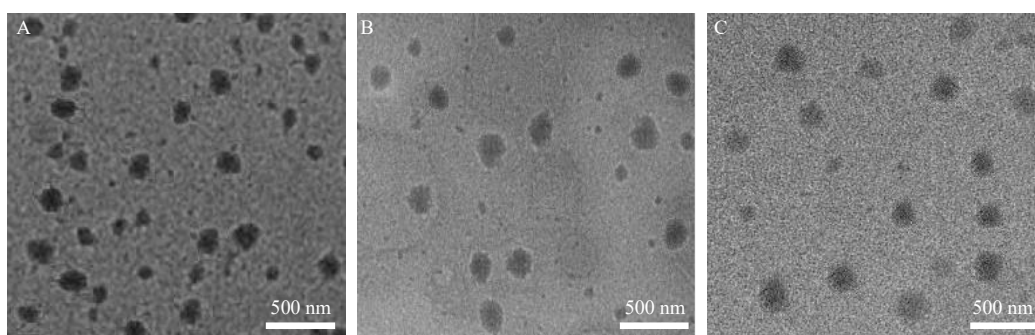


图 6 Gen-Lip (A)、CS-Gen-Lip (B) 和 BSA/CS-Gen-Lip (C) 的 TEM 图

Fig. 6 TEM image of Gen-Lip (A), CS-Gen-Lip (B) and BSA/CS-Gen-Lip (C)



图 7 Gen-Lip (A)、CS-Gen-Lip (B) 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉 (C) 外观

Fig. 7 Appearance of Gen-Lip (A), CS-Gen-Lip (B) and BSA/CS-Gen-Lip lyophilized powder (C)

度 (2θ) 为 $3^\circ \sim 45^\circ$, Cu-K α 靶, 扫描速度为 $3^\circ/\text{min}$, 见图 8。染料木素原料药在 7.4° 、 11.1° 、 11.5° 、 14.0° 、 14.8° 、 15.4° 、 16.2° 、 17.7° 、 22.5° 、 24.7° 等处晶型峰较强, 在物理混合物 XRPD 图谱中仍可观察到染料

混匀后分装至西林瓶中。置于 -45°C 超低温冰箱中冷冻 2 d, 立即置于冷阱温度为 -25°C 的冻干机中, 抽真空至 0.1 mPa , 冷冻 2 d 即得冻干粉, 外观见图 7, 制得的冻干粉外形均饱满, 色泽均一。

Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉复溶后平均包封率分别为 $(80.04 \pm 1.62)\%$ 、 $(87.13 \pm 1.84)\%$ 和 $(87.02 \pm 0.96)\%$; 粒径分别为 (223.89 ± 12.15) 、 (289.13 ± 27.36) 、 (294.35 ± 24.16) nm; ζ 电位分别为 (-17.68 ± 1.01) 、 (10.77 ± 0.95) 、 (-9.90 ± 0.86) mV。测得 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉中染料木素质量分数分别为 $(0.82 \pm 0.03)\%$ 、 $(0.78 \pm 0.02)\%$ 和 $(0.68 \pm 0.02)\%$ 。

2.11 晶型研究

取染料木素原料药、空白辅料、物理混合物 (染料木素与空白辅料比例同 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉)、Gen-Lip 冻干粉、CS-Gen-Lip 冻干粉、BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉和 BSA/CS-Gen-Lip 直接冻干粉 (不加乳糖) 适量进行 XRPD 扫描, 测试条件: 扫描角

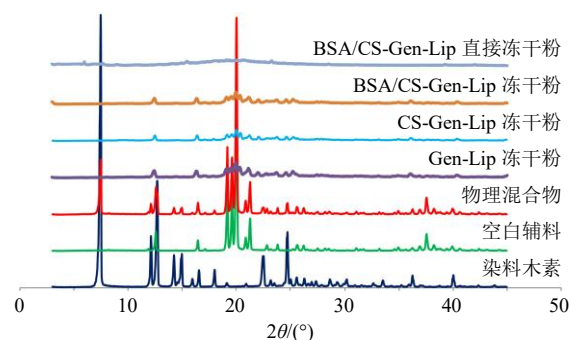


图 8 XRPD 结果

Fig. 8 XRPD results

木素晶型衍射峰, 说明仍以晶型状态存在。在 Gen-Lip 冻干粉、CS-Gen-Lip 冻干粉、BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉和 BSA/CS-Gen-Lip 直接冻干粉 XRPD 图谱中, 染料木素原料药晶型衍射峰均消失, 说明染料

木素均以无定形态存在。冻干粉中乳糖在 18°~22°的晶型峰强度明显下降,可能是乳糖与脂质体表面形成氢键所致^[17]。

2.12 体外释药及释药机制研究

取染料木素原料药、Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉适量(染料木素含量均为 10 mg),加入模拟胃液(pH 1.2,含胃蛋白酶)制备混悬液,转移至活化后的透析袋中(截留相对分子质量为 10 000),扎紧。采用 900 mL 模拟胃液(pH 1.2,含胃蛋白酶,含 1%聚山梨酯 80)作为释药介质,介质温度为 37 °C,搅拌桨转速为 75 r/min,于 0、0.5、1.0、1.5、2.0 h 取样 3 mL,取样后及时补进 3 mL 空白介质。2 h 后立即将释药介质更换为 900 mL 模拟肠液(pH 6.8,含胰蛋白酶,含 1%聚山梨酯 80),于 3、4、6、8、12、18、24 h 取样。样品经 12 500 r/min 离心(离心半径 6.8 cm)30 min 进样测定,结果见图 9。染料木素原料药由于溶解度较差、颗粒较大等原因导致溶出度很低^[11]。Gen-Lip 冻干粉在模拟胃肠液中 24 h 累积释放度为 64.17%,后期出现累积释放度下降情况,可能与 Gen-Lip 稳定性较差、染料木素易被降解等因素有关^[8,18]。CS-Gen-Lip 冻干粉和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉在模拟胃肠液中 24 h 累积释放度分别为 72.04%和 68.33%,而 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉效果更为明显,可能与壳聚糖和牛血清白蛋白双层修饰有关^[22]。释药模型拟合见表 10,Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉体外释药均符合 Weibull 模型。

2.13 储存稳定性考察

2.13.1 渗漏率的测定 采用渗漏率来评价稳定性。取 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉密封置于在 4 °C 冰箱中,于 0、5、10、15、30、45、60、90 d 取样,加入蒸馏水复溶后测定渗漏率

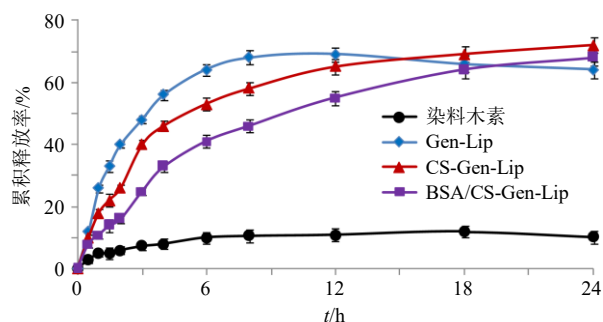


图 9 体外释放曲线的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Comparison of drug release profiles *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 10 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 的 Weibull 模型方程

Table 10 Weibull model equations of Gen-Lip, CS-Gen-Lip and BSA/CS-Gen-Lip

样品	拟合方程	R^2
Gen-Lip	$\ln \ln [1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.384 \ln t - 0.920$	0.774 3
CS-Gen-Lip	$\ln \ln [1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.597 \ln t - 1.500$	0.956 7
BSA/CS-Gen-Lip	$\ln \ln [1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.744 \ln t - 2.104$	0.979 1

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

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

[渗漏率=(新制备测得的包封率-储存过程中测得的包封率)/新制备测得的包封率]。结果见表 11, Gen-Lip 冻干粉 90 d 渗漏率达 $(9.46 \pm 0.38)\%$, 而 CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉渗漏率不足 1%, 表明两者储存稳定性相对较高。

2.13.2 氧化指标的测定 取 4 °C 条件下放置 90 d 后的 Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉,分别用无水乙醇溶解,使磷脂质量浓度约为 0.5 mg/mL,分别测定在波长 215 nm 和 233 nm 的吸光度(A),并计算氧化指数(氧化指数= A_{233}/A_{215})。结果见表 12,在该存放条件下 Gen-Lip 冻干粉氧化指

表 11 渗漏率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Determination results of leakage rate ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	Gen-Lip 冻干粉	CS-Gen-Lip 冻干粉	BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉
0	0	0	0
5	0.62 ± 0.14	0.59 ± 0.14	0.61 ± 0.12
10	1.32 ± 0.21	0.64 ± 0.12	0.62 ± 0.08
15	3.16 ± 0.24	0.72 ± 0.10	0.69 ± 0.09
30	4.95 ± 0.29	0.85 ± 0.19	0.74 ± 0.11
45	5.58 ± 0.32	0.89 ± 0.14	0.78 ± 0.13
60	7.37 ± 0.34	0.92 ± 0.15	0.80 ± 0.09
90	9.46 ± 0.38	0.93 ± 0.18	0.81 ± 0.13

表 12 磷脂氧化指数测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 12 Determination results of phospholipids oxidation index ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	磷脂氧化指数
Gen-Lip 冻干粉	0.221 ± 0.017
CS-Gen-Lip 冻干粉	$0.084 \pm 0.008^{**}$
BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉	$0.082 \pm 0.006^{**}$

与 Gen-Lip 比较: $^{**}P < 0.01$

$^{**}P < 0.01$ vs Gen-Lip

数大于 0.2, CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉氧化指数极显著性低于 Gen-Lip 冻干粉 ($P<0.01$), 表明两者稳定性优于 Gen-Lip 冻干粉。

2.14 药动学研究

2.14.1 给药及取血方案 取染料木素原料药、Gen-Lip、CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉, 采用 0.5% 的 CMC-Na 水溶液配制 ig 液, 临用现配。取 18 只 SD 大鼠禁食 12 h, 禁食期间可自由饮水, 随机分为 3 组, 每组 6 只。记录各只 SD 大鼠体质量, 按 40 mg/kg 剂量 ig。于 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、12 h 采用乙醚麻醉大鼠, 于眼眶后静脉丛采血约 0.25 mL 至肝素浸润离心管中, 震荡摇匀后 3000 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 3 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^[25] 取出血浆室温解冻, 精密量取血浆样品 100 μ L 和 50 μ L 磺胺甲噁唑 (1000 ng/mL) 至 5 mL 离心管中, 加 1 mL 乙腈涡旋 3 min, 8500 r/min 离心 10 min。取上清液至空白离心管中, 40 $^{\circ}$ C 氮气流下缓慢吹除有机溶剂, 加入 100 μ L 乙腈, 涡旋 3 min, 8500 r/min 离心 (离心半径 6.8 cm) 10 min, 取上清液进样分析。

2.14.3 血浆对照品标准曲线 甲醇配制质量浓度为 1000 ng/mL 的磺胺甲噁唑溶液, 作为内标。取质量浓度为 2 μ g/mL 的染料木素对照品溶液, 甲醇稀释至 1000、500、250、100、50 ng/mL, 分别取 100 μ L 至离心管中, 40 $^{\circ}$ C 温度下缓慢吹除有机溶剂, 加入 100 μ L 空白血浆, 涡旋 3 min 即得质量浓度为 2000、1000、500、250、100、50 ng/mL 一系列染料木素血浆对照品溶液。按“2.14.2”项下方法处理后进样分析。染料木素质量浓度为横坐标 (X), 染料木素和磺胺甲噁唑峰面积比为纵坐标 (Y) 作线性回归, 得血浆对照品标准曲线方程: $Y=0.015\ 2\ X+16.994\ 3$, 相关系数 $r=0.995\ 8$, 表明染料木素血浆对照品在 50~2000 ng/mL 线性关系良好。

2.14.4 专属性试验 取空白血浆、血浆对照品 (染料木素质量浓度为 50 ng/mL) 和血浆样品 (Gen-Lip 冻干粉 ig 给药 12 h), 按“2.14.2”项下方法处理, 按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 色谱图见图 10, 血浆内源性杂质未对染料木素和磺胺甲噁唑产生干扰, 专属性较高。

2.14.5 精密度考察 分别取质量浓度为 50、500、2000 ng/mL 血浆对照品溶液各 6 份, 分别按“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 计算得染料木素和磺胺甲

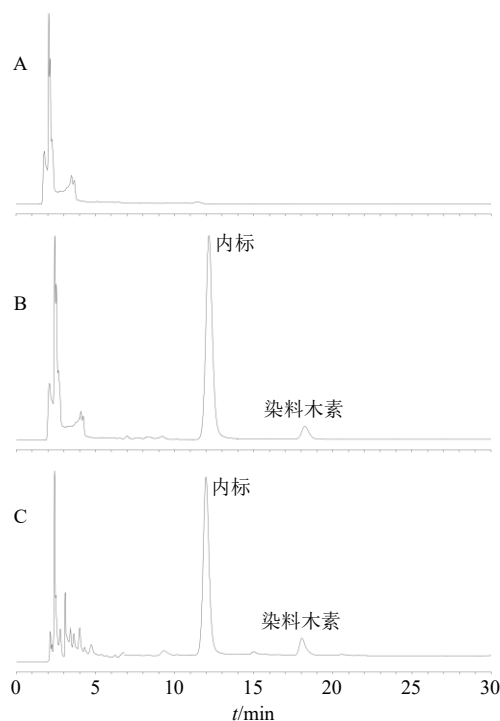


图 10 空白血浆 (A)、血浆对照品 (B)、血浆样品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 10 HPLC of blank plasma (A), plasma reference (B) and plasma sample solution (C)

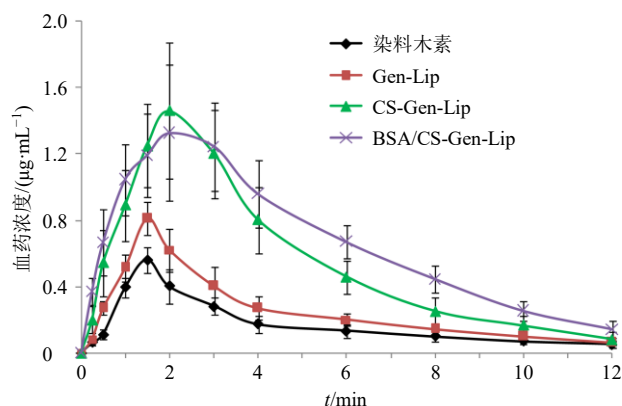
噁唑峰面积比值的 RSD 分别为 2.12%、3.25%、2.81%, 结果表明仪器精密度良好。

2.14.6 重复性考察 取质量浓度为 500 ng/mL 血浆样品 (含内标), 按“2.14.2”项下方法平行处理 6 份, 分别按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算得染料木素和磺胺甲噁唑峰面积比值的 RSD 为 8.94%, 结果表明该方法重复性良好。

2.14.7 稳定性考察 取 Gen-Lip 冻干粉 ig 给药 12 h 的血浆样品溶液, 分别于 0、1、3、6、9、12 h 进样测定染料木素和磺胺甲噁唑峰面积, 计算得两者峰面积比值的 RSD 为 7.69%, 结果表明血浆样品溶液在 18 h 内稳定性良好。

2.14.8 加样回收率考察 配制质量浓度分别为 50、500、2000 ng/mL 的染料木素对照品溶液, 按“2.14.2”项下方法操作, 测定染料木素和磺胺甲噁唑的峰面积, 并计算染料木素加样回收率, 结果表明染料木素的平均加样回收率为 95.20%, RSD 为 6.85%, 表明该方法准确度较高。

2.14.9 药动学结果 血药浓度-时间曲线见图 11。使用 DAS 3.0 软件非房室模型计算主要药动学参数, 结果见表 15。与染料木素相比, Gen-Lip 的 $C_{\max}$ 、 $AUC_{0\sim t}$ 及 $AUC_{0\sim\infty}$ 有显著性改变 ($P<0.05$), $C_{\max}$

图 11 血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 11 Drug concentration-time curves ($\bar{x} \pm s, n=6$)表 15 药动学结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 15 Pharmacokinetic results ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	染料木素	Gen-Lip	CS-Gen-Lip	BSA/CS-Gen-Lip
$t_{\max}$	h	1.47 ± 0.37	1.41 ± 0.43	$2.09 \pm 0.60^{* \#}$	$2.17 \pm 0.71^{* \#}$
$t_{1/2}$	h	3.15 ± 0.68	3.34 ± 0.75	$5.61 \pm 1.01^{* \#}$	$6.89 \pm 1.12^{* \# \Delta}$
$C_{\max}$	$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	568.11 ± 108.43	$806.47 \pm 197.61^{*}$	$1459.88 \pm 412.86^{* \# \#}$	$1325.71 \pm 457.06^{* \# \#}$
AUC_{0-t}	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	2023.06 ± 361.94	$2940.12 \pm 452.70^{*}$	$6642.83 \pm 813.71^{* \# \#}$	$8098.47 \pm 926.52^{* \# \# \Delta}$
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	2094.75 ± 392.71	$3058.06 \pm 490.38^{*}$	$6768.02 \pm 846.79^{* \# \#}$	$8309.76 \pm 958.18^{* \# \# \Delta}$

与染料木素比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$; 与 Gen-Lip 比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$; 与 CS-Gen-Lip 比较: $^{\Delta}P<0.05$ $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs genistein; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ vs Gen-Lip; $^{\Delta}P<0.05$ vs CS-Gen-Lip

3 讨论

壳聚糖是一种带正电荷的天然阳离子多糖, 包覆在 Gen-Lip 表面后会使电荷性质发生改变, 因而本研究通过测定 ζ 电位来筛选壳聚糖溶液的质量浓度。壳聚糖与脂质体的结合除了静电作用外, 还存在疏水作用^[26-27], 疏水作用促进了壳聚糖材料在脂质体表面的吸附及沉积, 因而两者结合较为紧密。在 CS-Gen-Lip 表面继续包覆牛血清白蛋白制备成 BSA/CS-Gen-Lip, 白蛋白可利用自身多个疏水性位点及二硫键形成共价交联^[28], 从而在脂质体表面形成稳定的白蛋白修饰层, 利于抵抗胃肠道 pH 值、胃蛋白酶、胰蛋白酶等对脂质体的破坏^[29], 进一步增加稳定性、提高缓释效果。

前期试验结果显示, 采用蔗糖制备冻干粉时粒径较大, 而甘露醇可能由于自身具有结晶型针状结构^[30], 导致冻干粉包封率下降幅度远大于乳糖, 故最终选择乳糖作为冻干保护剂。染料木素在 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉以无定型状态存在, 利于改善药物的溶解度及生物利用度。BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉在各个时间点累积释放度略低于 Gen-Lip 和 CS-Gen-Lip 冻干粉, 这可能是由于 Gen-Lip 磷脂双分

和相对口服吸收生物利用度分别提高至 1.42 倍和 1.45 倍。CS-Gen-Lip 的药动学参数有显著性或极显著性改变 ($P<0.05$ 、 0.01), $t_{\max}$ 延后至 (2.09 ± 0.60) h, $t_{1/2}$ 延长至 (5.61 ± 1.01) h, $C_{\max}$ 和相对口服吸收生物利用度分别提高至 2.57 倍和 3.28 倍。BSA/CS-Gen-Lip 的药动学参数也有显著性或极显著性改变 ($P<0.05$ 、 0.01), $t_{\max}$ 延后至 (2.17 ± 0.71) h, $t_{1/2}$ 延长至 (6.89 ± 1.12) h, $C_{\max}$ 和相对口服吸收生物利用度分别提高至 2.33 倍和 4.00 倍。与 CS-Gen-Lip 相比, BSA/CS-Gen-Lip 的 $t_{1/2}$ 、 AUC_{0-t} 、 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 存在显著性差异 ($P<0.05$), 说明 BSA/CS-Gen-Lip 促吸收作用更大。

子层处于液晶相^[27], 药物释放相对容易, 而壳聚糖包覆的 CS-Gen-Lip 可以减缓药物释放, 表现出一定的缓释特征。BSA/CS-Gen-Lip 由于牛血清和壳聚糖双层包覆作用从而使药物的缓释特征更为明显。稳定性结果显示, CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉渗漏率和氧化指标均明显低于 Gen-Lip 冻干粉, 说明两者稳定性优于 Gen-Lip 冻干粉。可能是由于未修饰的 Gen-Lip 在储存过程中易发生氧化、聚集、融合等现象而导致药物泄露, 修饰后的 CS-Gen-Lip 和 BSA/CS-Gen-Lip 通过增加机械稳定性、降低双分子层膜流动相、阻止磷脂双分子层向流体液晶相的转变、增加双分子层膜致密性等机制^[26], 从而提高了储存稳定性。

与染料木素原料药相比, BSA/CS-Gen-Lip 的 $C_{\max}$ 及口服生物利用度显著性提高, 可能是由于 BSA/CS-Gen-Lip 改善了染料木素溶解度及溶出度, 解决了药物体内吸收瓶颈; 染料木素由晶态转变为无定型态, 更易于体内吸收^[13,17]; 染料木素胃肠道稳定性较差, 制备成 BSA/CS-Gen-Lip 后提高了胃肠道稳定性, 更能发挥纳米粒子特殊的吸收机制, 增加了药物吸收量; BSA/CS-Gen-Lip 粒径较小, 与

胃肠道接触面较大,促进了药物体内吸收^[31-33]; BSA/CS-Gen-Lip 处方中的壳聚糖、牛血清白蛋白等辅料本身具有促吸收作用^[26,34-35]。另外, BSA/CS-Gen-Lip 的 $t_{1/2}$ 和口服吸收生物利用度均高于 Gen-Lip 和 CS-Gen-Lip,可能是由于白蛋白包覆后降低胃肠道各种酶、pH 值等因素对脂质体结构的破坏几率,更利于跨膜递送^[35],说明 BSA/CS-Gen-Lip 更具有开发研究价值。

综上,本研究完成了 BSA/CS-Gen-Lip 及其冻干粉处方工艺研究,染料木素在 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉中以无定型形式存在,且缓释作用明显,储存稳定性较高,促吸收作用较大,后续可对 BSA/CS-Gen-Lip 冻干粉药效、毒性评价等进一步研究,为染料木素制剂开发提供有价值的参考资料。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 管咏梅, 龚丽霞, 姜鄂, 等. 葛根及其主要成分安全性研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(3): 12-18.
- [2] 邹靖培, 钱晶晶, 刘珊鸣, 等. 染料木素结构修饰及活性研究进展 [J]. 西北民族大学学报: 自然科学版, 2022, 43(4): 7-16.
- [3] 田建明, 韦康, 宋莲莲, 等. 染料木素铬配合物改善 2 型糖尿病大鼠模型糖尿病相关生化指标及靶器官损害作用的研究 [J]. 吉林中医药, 2018, 38(10): 1193-1195.
- [4] 金峰, 祁昊. 染料木素对野百合碱诱导的大鼠肺动脉高血压的保护作用 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(4): 695-699.
- [5] 许建宁, 王全凯, 李忠生, 等. 染料木素对大鼠生殖毒性的实验研究 (II) 致畸敏感期毒性 [J]. 中草药, 2004, 35(8): 914-915.
- [6] 李慧芳, 张冬, 曲文君, 等. 4 种黄酮类中药有效成分 BCS 分类及吸收机制的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7): 1198-1203.
- [7] 韩嘉骏, 郭寅龙. 黄酮类化合物油水分分配系数的实验测定值和软件估算值的比较研究 [J]. 化学世界, 2019, 60(9): 611-617.
- [8] 胡会玲. 经胃液处理的粪样微生物菌群在模拟肠道中与淡豆豉异黄酮代谢的相互作用 [D]. 太原: 山西中医药大学, 2021.
- [9] Coldham N G, Zhang A Q, Key P, et al. Absolute bioavailability of [^{14}C]genistein in the rat; plasma pharmacokinetics of parent compound, genistein glucuronide and total radioactivity [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2002, 27(4): 249-258.
- [10] 邓凤, 贾运涛, 田睿, 等. 染料木素磺丁基醚- β -环糊精包合物的研制 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(18): 1646-1650.
- [11] 钱亚琴, 刘雪城, 何凌云. 星点设计优化染料木素固体制剂分散体生产工艺及体外评价 [J]. 广东化工, 2022, 49(23): 69-72.
- [12] 王智勇, 陈岩, 连红. 染料木素自微乳给药系统的处方研究 [J]. 黑龙江医药, 2012, 25(5): 675-677.
- [13] 王震芳, 张智强, 葛振华. 蛇床子素 3 种制剂的制备、表征及药动学比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3615-3621.
- [14] 李思敏, 吴文瀚, 高丽娜, 等. 柠檬苦素脂质体的制备和制剂学评价 [J]. 中草药, 2019, 50(24): 5957-5962.
- [15] 张颖, 许霞青, 丁孝良, 等. 光敏性多西他赛脂质体的制备、处方优化和体外释放度研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(24): 2514-2518.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 胡熙曦, 邓璐璐, 陈倩. 西吡氯铵修饰的脂质体用于氯诺昔康的经皮局部递送 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(4): 376-382.
- [19] 于洋, 孔亮, 刘婉滢, 等. Angiopep-2 修饰白藜芦醇脂质体的处方优化与体外评价 [J]. 中草药, 2022, 53(24): 7706-7713.
- [20] 王基源, 吴妍纯, 吴文浩, 等. 壳聚糖/氟苯尼考脂质体的制备及响应面优化 [J]. 广东化工, 2022, 49(22): 57-59.
- [21] 宁粤. 甜菜红素的纳米脂质体的构建和体外释放活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2022.
- [22] 魏征, 杨森, 罗正康, 等. 牛血清白蛋白/壳聚糖双层修饰载肉桂醛脂质体的制备 [J]. 中国药房, 2022, 33(7): 848-852.
- [23] 李传灵, 石晓晴, 黄月英, 等. 星点设计-效应面法优化叶黄素脂质体的处方及制备工艺 [J]. 药学服务与研究, 2019, 19(4): 244-249.
- [24] 葛亮, 钱海, 高昊, 等. N-酰化壳聚糖的合成及其修饰多西他赛脂质体的体外性质研究 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(6): 519-523.
- [25] 寇应琳, 徐向宇, 孙宁. 染料木素纳米混悬剂制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(4): 1045-1051.
- [26] 陈悦, 王琨, 张凌琳. 壳聚糖包覆脂质体递药系统的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(10): 1251-1256.
- [27] 赵振刚, 刘爽, 游丽君. 壳聚糖修饰甜菜红素脂质体的制备与抗肿瘤活性 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2022, 50(1): 16-22.
- [28] 王风云, 李伟宏. 黄芩素磷脂复合物白蛋白纳米粒的

- 制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2021, 43(11): 2939-2944.
- [29] Ding R H, Zhao Z Y, He J B, *et al.* Preparation, drug distribution, and *in vivo* evaluation of the safety of protein Corona liposomes for liraglutide delivery [J]. *Nanomaterials*, 2023, 13(3): 540.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Murthy A, Ravi P R, Kathuria H, *et al.* Self-assembled lecithin-chitosan nanoparticles improve the oral bioavailability and alter the pharmacokinetics of raloxifene [J]. *Int J Pharm*, 2020, 588: 119731.
- [33] Tian M P, Song R X, Wang T, *et al.* Inducing sustained release and improving oral bioavailability of curcumin via chitosan derivatives-coated liposomes [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt A): 702-710.
- [34] 辛娟, 易华, 李明, 等. 蛇床子素白蛋白纳米粒的制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2022, 44(10): 3104-3110.
- [35] 张春燕, 李燕红, 陈乾, 等. 以牛血清白蛋白为稳定剂制备紫檀芪聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒及口服药动学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(14): 4481-4492.

[责任编辑 郑礼胜]

• 公益广告 •

