

红花黄色素纳米柔性脂质体的制备研究

张雅筠¹, 程玉钊^{1#}, 李伟泽², 赵琳儒⁴, 李杰¹, 蒋境兴³, 倪艳¹, 郝旭亮^{3*}

1. 山西省中医药研究院中药方剂研究所, 山西 太原 030012

2. 西安医学院, 陕西 西安 710021

3. 山西中医药大学附属医院, 山西 太原 030024

4. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619

摘要: 目的 制备红花黄色素(safflower yellow pigment, SY)纳米柔性脂质体(nano-flexible liposome, NFL)(SY-NFL)以提高 SY 的黏膜透过率, 并考察 SY-NFL 的药剂学相关性质。方法 采用薄膜分散法制备 SY-NFL, 以包封率和载药量为指标, 通过单因素试验及 Box-Behnken 设计-响应面法(Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM)优化 SY-NFL 最佳处方, 再以包封率、粒径及多分散指数(polydispersity index, PDI)值优化其成型工艺; 对 SY-NFL 进行结构、 ζ 电位、粒径等药剂学性质进行考察; 采用水平扩散池法考察 SY-NFL 对 SY 黏膜透过率的影响。结果 当脂药比 65.68:1、脂胆比 31.88:1、丙二醇质量分数 15%, 经探头超声转速 8 000 r/min、超声 5 min, 可制备包封率为 $(81.440 \pm 4.250)\%$ 、载药量为 $(1.510 \pm 1.450)\%$ 、粒径为 (534.500 ± 1.960) nm, PDI 为 0.110 ± 0.010 的 SY-NFL。不同温度放置 4 周后, SY-NFL 渗漏率始终低于 SY 的普通脂质体(common liposome, SY-CL), SY-NFL 变形性也高于 SY-CL; SY-NFL 的累积透过量始终高于 SY-CL 和 SY 原料药的 1.38 倍和 1.65 倍。结论 采用薄膜分散法可制备性能良好的 SY-NFL, 其具有较高的包封率、变形性及稳定性, 可作为递送 SY 透黏膜吸收的纳米载体。

关键词: 红花黄色素; 纳米柔性脂质体; 药剂学性质; 透黏膜吸收; 薄膜分散法; Box-Behnken 设计-响应面法; 羟基红花黄色素 A

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)20-6909-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.20.008

Preparation of nanoscale flexible liposomes in safflower

ZHANG Yajun¹, CHENG Yuchuan¹, LI Weize², ZHAO Linru⁴, LI Jie¹, JIANG Jingxing³, NI Yan¹, HAO Xuliang³

1. Institute of Traditional Chinese Medicine Prescriptions, Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China

2. Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

3. Affiliated Hospital of Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China

4. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective Safflower yellow pigment (SY) nano-flexible liposome (NFL) (SY-NFL) was prepared to improve the mucosal permeability of SY, and the pharmaceutical properties of SY-NFL were investigated. **Methods** SY-NFL was prepared by thin film dispersion method. Single factor test and Box-Behnken design-response surface method were used to optimize the optimum formulation of SY-NFL, and then the forming process was optimized according to the encapsulation rate, particle size and PDI. The structure, potential and particle size of SY-NFL were investigated. The effect of SY-NFL on the mucosa permeability of SY was investigated by

收稿日期: 2024-03-25

基金项目: 山西省卫生健康委科研课题: 红花黄色素纳米柔性脂质体的制备及评价(2022146); 山西省卫生健康委员会重点实验室建设: 山西省“四个一批”科技兴医创新计划项目“中药新产品关键技术开发省级重点培育实验室项目”(2020SYS09); 山西省技术创新中心项目: 中药制剂研发省技术创新中心(202104010911024); 山西省科技创新人才团队专项: 中药制剂研发(202204051002028)

作者简介: 张雅筠(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新药研发。Tel: 15735641307 E-mail: 1907321238@qq.com

#共同第一作者: 程玉钊(1981—), 女, 副主任药师, 研究方向为中药新剂型与新制剂。E-mail: 15235105416@163.com

***通信作者:** 郝旭亮(1975—), 男, 博士, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向为中药作用物质基础及作用机制研究。

E-mail: hxliang-01@163.com

horizontal diffusion cell. **Results** When the ratio of lipid to drug was 65.68:1, the ratio of lipid to cholesterol was 31.88:1, the mass fraction of propylene glycol was 15%, and the ultrasonic speed of the probe was 8 000 r/min and the ultrasonic speed was 5 min, the encapsulation rate of SY-NFL was $(81.440 \pm 4.250)\%$, the drug loading was $(1.510 \pm 1.450)\%$, and the particle size was (534.500 ± 1.960) nm. The PDI was 0.110 ± 0.010 . After four weeks at different temperatures, the leakage rate of SY-NFL was always lower than that of SY's ordinary liposomes (SY-CL), and the deformation of SY-NFL was also higher than that of SY-CL. The cumulative permeability of SY-NFL was always higher than that of SY-CL and SY. At 4 h, the cumulative through rate of hydroxyl safflower yellow A (HSYA) in SY-NFL was 1.38 times and 1.65 times of that of SY-CL and SY, respectively. **Conclusion** SY-NFL can be prepared by thin film dispersion method, which has high encapsulation rate, deformation and stability, and can be used as a nanometer carrier to deliver SY through mucosal absorption.

Key words: safflower yellow pigment; nano-flexible liposomes; pharmacological properties; transmucosal absorption; thin film dispersion method; Box-Behken design-response surface method; hydroxyl safflower yellow A

红花黄色素 (safflower yellow pigment, SY) 是菊科红花属植物红花 *Caethamus tinctorius* L.^[1] 中的黄酮类药效成分, 常用于治疗冠心病、心绞痛等心血管疾病且效果显著^[2-5]。SY 中羟基红花黄色素 A (hydroxysafflor yellow A, HSYA) 含量最高, 常作为药效指标成分^[6-11]。但是, HSYA 易受温度、pH 值与光照等影响而降解变质, 且水溶性较强而透黏膜性差, 因此, 其生物利用度较低, 只能通过静脉注射 (intravenous injection, iv) 给药^[12]; 有研究表明, HSYA 是 P-糖蛋白的底物类似物, 易受 P-糖蛋白外排效应影响^[13], 同时, HSYA 易与血浆蛋白产生约 78% 的结合而导致体内活性游离药物较少^[14], 因此, HSYA 在体内易排泄不易吸收而消除较快, 临床上必须频繁给药或增大给药剂量以维持其有效浓度^[15]。

然而, iv 给药的安全性低、使用不便与患者顺应性较差, 加之 HSYA 水溶性极强且生物利用度低而属于生物药剂学分类系统 (biopharmaceutical classification system, BSC) III 类药物, 因此, 亟需开发一种新型高效的 SY 递送系统 (如口服或黏膜给药), 以便更好地服务于临床。纳米柔性脂质体 (flexible nano-liposomes, NFL) 是将柔软剂如乙醇、丙二醇等加至脂质双分子层中, 提高了脂质体的柔软性、变形性和稳定性, 可显著促进水溶性药物通过黏膜, 如鼻黏膜、阴道黏膜而吸收, 且生物相容性好^[16-19], 是透黏膜给药的新型载体。本研究将 SY 包封于 NFL 的内水相中, 既可显著提高其黏膜渗透性, 也可避免其被体内 p-糖蛋白识别, 同时磷脂为生物膜的组成成分, 且具有改善血液循环、预防心血管疾病的作用, 可协同 HSYA 发挥药效^[20]。因此, 将 SY 制备成红花黄色素纳米柔性脂质体 (SY-NFL), 并进一步考察 SY-NFL 的药剂学性质及透黏

膜情况, 为 SY 非 iv 给药途径的新剂型制剂开发提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

RE-5250 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; IKA® T25 Digital VLTRA-TURRAX 型高速匀浆机, 德国 IKA 公司; SIGMA1-14K 型高速离心机, 美国 Sigma 公司; ZEN-3690 型马尔文粒径电位测定仪, 英国马尔文公司; DHAUS® 型电子分析天平, 美国 OHAUS 公司; UltiMate 3000 系列高效液相色谱仪, 美国 Thermo Scientific Technologies 公司; Multimode 8 型激光扫描共聚焦显微镜, 德国 Bruker 公司。

1.2 材料

无水乙醇, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇 (分析纯、色谱纯)、乙腈 (色谱纯), 西陇科学股份有限公司; 二氯甲烷, 天津市大茂化学试剂厂; 鱼精蛋白、曲拉通 X-100, 美国 Sigma 公司; 生理盐水, 石家庄四药有限公司; 胆固醇, 上海麦克林生物科技有限公司; 注射用卵磷脂, 上海太伟药业有限公司; SY 原料药, 批号 1907002, HSYA 质量分数 76.66%, 山西德元堂药业有限公司; 1,2-丙二醇, 天津市凯通化学试剂有限公司; HSYA 对照品, 批号 111637-200704, 质量分数 95.80%, 中国食品药品检定研究院; 尼罗红 (Nile red)、钙黄绿素 (calcein), 美国 Sigma 公司。

2 方法与结果

2.1 NFL 的制备

2.1.1 SY-NFL 的制备 根据预实验结果, 采用薄膜分散法, 精确称取处方量的蛋黄卵磷脂、胆固醇、SY 置于茄型瓶中, 加 50 mL 无水乙醇充分溶解, 得油相; 另取 1,2-丙二醇 7.2 mL 加入 38 mL 蒸馏水混合均匀, 得水相。将油相在 50 °C 减压旋转蒸发

除去无水乙醇,得到干膜,取 15 mL 50 °C 预热过的水相倒入薄膜介质中,加入小玻璃珠旋转水化 1 h,过 0.22 μm 聚丙烯滤膜,加入剩余水相,混合均匀,即得,于 4 °C 下保存。

2.1.2 空白 NFL 的制备 方法同 SY-NFL,只是不加入 SY。

2.1.3 SY 普通脂质体 (SY common liposome, SY-CL) 的制备 方法同 SY-NFL 的制备,只是不加入 1,2-丙二醇。

2.2 HSYA 含量测定

2.2.1 色谱条件^[1] 色谱柱为 Symmetry C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-乙腈-0.7% 磷酸水溶液 (26:2:72), 等度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 403 nm; 进样量 10 μL ; 柱温 30 °C; 理论塔板数以 HSYA 峰计算,不低于 3 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 HSYA 对照品 148.40 mg 于 10 mL 量瓶中,加入流动相 5 mL,超声溶解并混合均匀,加入流动相稀释至刻度,得 14.840 mg/mL 的 HSYA 对照品储备液,置于 4 °C 冰箱中保存,备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“2.1”项下制备的 SY-NFL 2 mL 于 5 mL 量瓶中,加 12% 曲拉通甲醇溶液混匀并稀释至刻度线,即得。

2.2.4 专属性考察 取 HSYA 对照品溶液、SY-NFL 供试品溶液、空白 NFL 供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图,结果见图 1。空白 NFL 供试品溶液、SY-NFL 供试品溶液、HSYA 对照品溶液中 HSYA 的保留时间为 (11.054 $\pm$ 0.064) min,峰形对称性良好,且溶剂和辅料对其色谱峰无干扰,表明方法专属性较好。

2.2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2.2”项下对照品溶液适量,分别稀释成质量浓度为 148.4、296.8、742.0、1 484.0、2 226.0、2 968.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,得各质量浓度对照品峰面积,以质量浓度为横坐标 (X),峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归分析,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=49.880X-0.7168$, $r=0.9991$,结果表明 HSYA 在 148.4~2 968.0 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

2.2.6 精密度考察 精密量取质量浓度为 742.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件重复测定 6 次,测定 HSYA 峰面积,得 RSD 为 0.79%,结果表明仪器精密度良好。

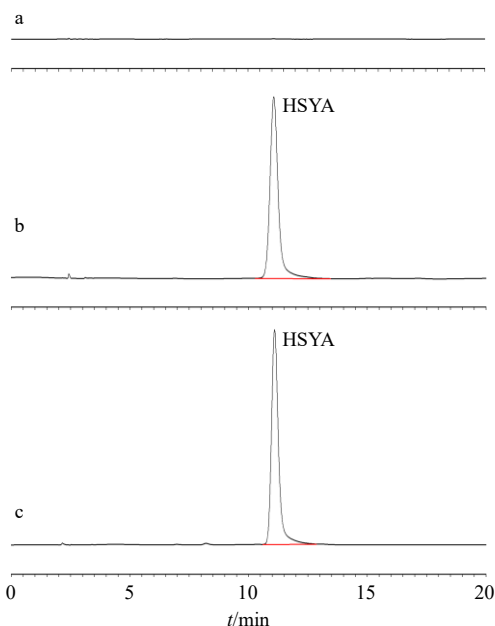


图 1 空白 NFL 溶液 (a)、SY-NFL 供试品溶液 (b)、HSYA 对照品溶液 (c) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank NFL solution (a), SY-NFL test solution (b) and HSYA reference substance solution (c)

2.2.7 重复性考察 精密量取 6 份 SY-NFL,按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件重复测定 HSYA 峰面积,得 RSD 为 1.86%,结果表明该方法的重复性良好。

2.2.8 稳定性考察 取“2.2.7”项下的供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10 h 取样测定 HSYA 峰面积,得 RSD 为 0.49%,结果表明供试品溶液在室温下放置 10 h 内稳定性良好。

2.2.9 加样回收率考察 精密量取适量 SY-NFL,精密加入供试品溶液中 HSYA 质量浓度 80%、100%、120% 的对照品溶液,按“2.2.3”项下方法制备为供试品溶液,备用。每个质量浓度同法配制 3 份,按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积,计算加样回收率,3 个质量浓度的平均加样回收率为 99.01%,平均 RSD 为 1.61%,表明该方法的准确度良好。

2.3 包封率、载药量的测定

采用鱼精蛋白凝聚法分离脂质体和游离药物,HPLC 法测定 HSYA^[13]。具体操作方法如下: a) 分别精密吸取自制的脂质体混悬液 0.1 mL 于 5 mL 离心管中,加入 0.1 mL 鱼精蛋白溶液 (10 mg/mL) 静置 3 min,加入 3 mL 生理盐水,于 14 800 r/min 离心 30 min; b) 将上述沉淀加入 12% 的曲拉通 X-100 甲醇溶液至 3.2 mL 破乳,充分破乳后,吸取溶液,HPLC 法测定,记录 HSYA 峰面积,按式 (1) 计算

包封率,按式(2)计算载药量。

$$\text{包封率} = \frac{\text{脂质体包封的 HSYA 质量}}{\text{加入的药物中 HSYA 总质量}} \quad (1)$$

$$\text{载药量} = \frac{\text{脂质体包封的 HSYA 质量}}{\text{脂质体的总质量}} \quad (2)$$

2.4 SY-NFL 制备处方的单因素考察

采用薄膜分散法制备 SY-NFL,并考察脂药比、脂胆比、丙二醇质量分数对 SY-NFL 包封率和载药量的影响,单因素试验的固定因素选择为脂药比 50:1,脂胆比 20:1,丙二醇质量分数 15%。

2.4.1 脂药比的考察 称取胆固醇 24 mg、SY 20 mg,丙二醇适量(使最终质量分数为 15%),生理盐水 3 mL,分别称取蛋黄卵磷脂 0.200 g(脂药比 10:1)、0.400 g(脂药比 20:1)、1.000 g(脂药比 50:1)、2.000 g(脂药比 100:1)、3.000 g(脂药比 150:1),设定鱼精蛋白-脂质 1:1。按“2.1.1”项下方法制备 SY-NFL,并考察不同脂药比对 SY-NFL 包封率和载药量的影响,结果见表 1,脂质体包封率和载药量随着脂药比的增加先增大后减小,脂药比为 50:1 时为最大值。

表 1 脂药比对脂质体包封率、载药量的结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Results of lipid drug ratio on liposome encapsulation rate and drug loading ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂药比	包封率/%	载药量/%
10:1	15.308±0.349	0.173±0.083
20:1	55.914±0.515	0.407±0.004
50:1	71.372±1.507	0.954±0.020
100:1	60.358±2.478	0.456±0.036
150:1	58.746±0.686	0.314±0.062

2.4.2 脂胆比的考察 称取胆固醇 24 mg,SY 20 mg,丙二醇适量(使最终质量分数为 15%),生理盐水 3 mL,分别称取蛋黄卵磷脂 0.048 g(脂胆比 2:1)、0.120 g(脂胆比 5:1)、0.240 g(脂胆比 10:1)、0.480 g(脂胆比 20:1)、1.200 g(脂胆比 50:1),设定鱼精蛋白-脂质 1:1。按“2.1.1”项下方法制备 SY-NFL,并考察不同脂胆比对 SY-NFL 包封率和载药量的影响,结果见表 2,脂质体包封率和载药量随着脂胆比的增加先增大后减小,脂药比为 20:1 时为最大值。

2.4.3 柔软剂丙二醇质量分数的考察 称取蛋黄卵磷脂 1 g,胆固醇 50 mg,SY 20 mg,生理盐水 3 mL,加入丙二醇使其质量分数分别为 10%、15%、20%、25%、30%,设定鱼精蛋白-脂质 1:1。按“2.1.1”

项下方法制备 SY-NFL,并考察不同丙二醇质量分数对 SY-NFL 包封率和载药量的影响,结果见表 3,脂质体包封率和载药量随着丙二醇质量分数的升高先增大后减小,丙二醇质量分数为 15%时为最大值。

表 2 脂胆比对脂质体包封率、载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of lipid-bile ratio on liposome encapsulation rate and drug loading ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂胆比	包封率/%	载药量/%
2:1	57.661±0.419	0.571±0.004
5:1	57.099±0.346	0.694±0.004
10:1	68.097±1.622	0.916±0.022
20:1	71.462±0.834	1.115±0.013
50:1	12.468±0.353	0.189±0.005

表 3 丙二醇质量分数对脂质体包封率、载药量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of propylene glycol mass fraction on liposome encapsulation efficiency and drug loading ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

丙二醇质量分数/%	包封率/%	载药量/%
10	72.930±0.477	1.060±0.069
15	83.190±0.195	1.209±0.003
20	73.438±0.368	1.068±0.005
25	71.147±0.412	1.034±0.006
30	57.606±0.312	0.837±0.005

2.5 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 试验优化 SY-NFL 的制备工艺

根据预实验及单因素实验,选择对 SY-NFL 包封率和载药量影响较大的 3 个因素脂药比 (X_1)、脂胆比 (X_2)、丙二醇质量分数 (X_3) 进行 3 因素 3 水平的响应面试验设计。

2.5.1 响应面回归模型建立及方差分析 运用 Design Expert 8.0.6 Trial 设计软件进行 BBD-RSM 试验设计及水平编码,试验设计与结果见表 4,包封率、载药量回归方程的方差分析见表 5。

包封率、载药量模型的 $P < 0.01$,表明试验所得拟合方程回归模型具有高度显著性;失拟项 $P > 0.05$,不显著,表明该模型稳定性较好。

2.5.2 等高线及响应面图分析 运用 Design Expert 8.0.6 软件对 SY-NFL 包封率响应值分析作图,得到由响应值、 X_1 、 X_2 、 X_3 因素所构成的三维空间图及其三维空间在二维平面上的等高线图,各因素间交互作用对包封率影响的拟合模型见图 2,对载药量影响的拟合模型见图 3。

表 4 响应面试验设计模型及响应值

Table 4 Experimental design model and response value of response surface

序号	X_1	X_2	$X_3/\%$	包封率/%	载药量/%	序号	X_1	X_2	$X_3/\%$	包封率/%	载药量/%
1	50 : 1	10 : 1	20	53.827 5	0.512 3	10	100 : 1	10 : 1	15	47.161 6	0.468 6
2	50 : 1	10 : 1	10	57.534 1	0.963 5	11	100 : 1	50 : 1	15	61.480 8	0.715 2
3	50 : 1	20 : 1	15	72.943 9	1.295 3	12	50 : 1	20 : 1	15	73.891 5	1.366 2
4	50 : 1	50 : 1	20	25.772 1	0.109 5	13	100 : 1	20 : 1	10	56.477 4	0.877 4
5	20 : 1	20 : 1	20	33.158 7	0.295 2	14	50 : 1	20 : 1	15	78.786 9	1.945 8
6	50 : 1	20 : 1	15	73.891 5	1.328 8	15	20 : 1	50 : 1	15	15.978 9	0.079 0
7	50 : 1	50 : 1	10	69.562 1	1.214 3	16	50 : 1	20 : 1	15	72.662 9	1.294 8
8	100 : 1	20 : 1	20	67.741 8	0.940 9	17	20 : 1	20 : 1	10	55.476 9	0.610 6
9	20 : 1	10 : 1	15	44.085 8	0.405 3						

表 5 SY-NFL 包封率和载药量方差分析结果

Table 5 ANOVA results of SY-NFL encapsulation ratio and drug loading

项目	自由度	包封率/%					载药量/%				
		平方和	均值	F 值	P 值	显著性	平方和	均值	F 值	P 值	显著性
模型	9	5 289.70	587.74	87.65	<0.000 1	极显著	3.800	0.420	6.920	0.009 2	极显著
X_1	1	1 220.88	1220.88	182.08	<0.000 1	极显著	0.380	0.380	6.260	0.040 9	显著
X_2	1	48.10	48.10	7.17	0.031 6	极显著	1.677×10^{-3}	1.677×10^{-3}	0.027	0.873 1	
X_3	1	546.20	546.20	81.46	<0.000 1	极显著	0.490	0.490	7.940	0.025 8	显著
X_1X_2	1	456.61	456.61	68.10	<0.000 1	极显著	0.060	0.060	0.990	0.353 0	
X_1X_3	1	304.91	304.91	45.47	0.000 3	极显著	0.058	0.058	0.950	0.363 1	
X_2X_3	1	490.09	490.09	73.09	<0.000 1	极显著	0.200	0.200	3.270	0.113 4	
X_1^2	1	1 319.22	1319.22	196.74	<0.000 1	极显著	1.340	1.340	22.020	0.002 2	极显著
X_2^2	1	841.20	841.20	125.45	<0.000 1	极显著	0.900	0.900	14.660	0.006 5	极显著
X_3^2	1	115.26	115.26	17.19	0.004 3	极显著	0.230	0.230	3.760	0.093 6	显著
残差	7	46.94	6.71				0.430	0.061			
失拟项	3	22.04	7.35	1.18	0.422 1	不显著	0.110	0.037	0.470	0.717 1	不显著
净误差	4	24.89	6.22				0.320	0.079			
总离差	16	5 336.64					4.230				

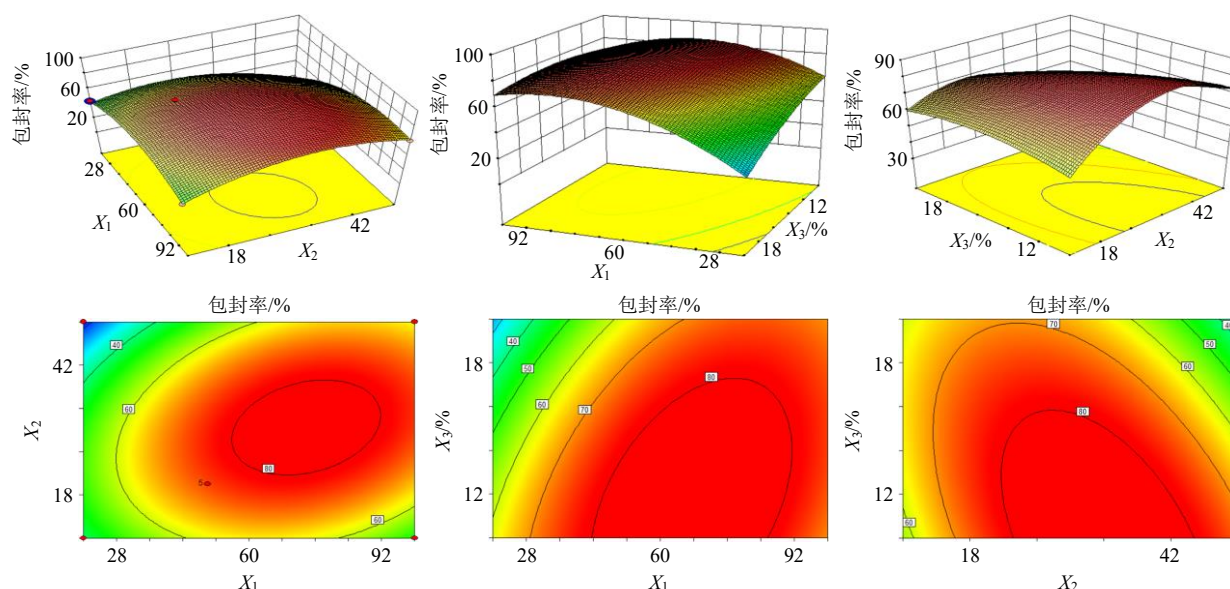
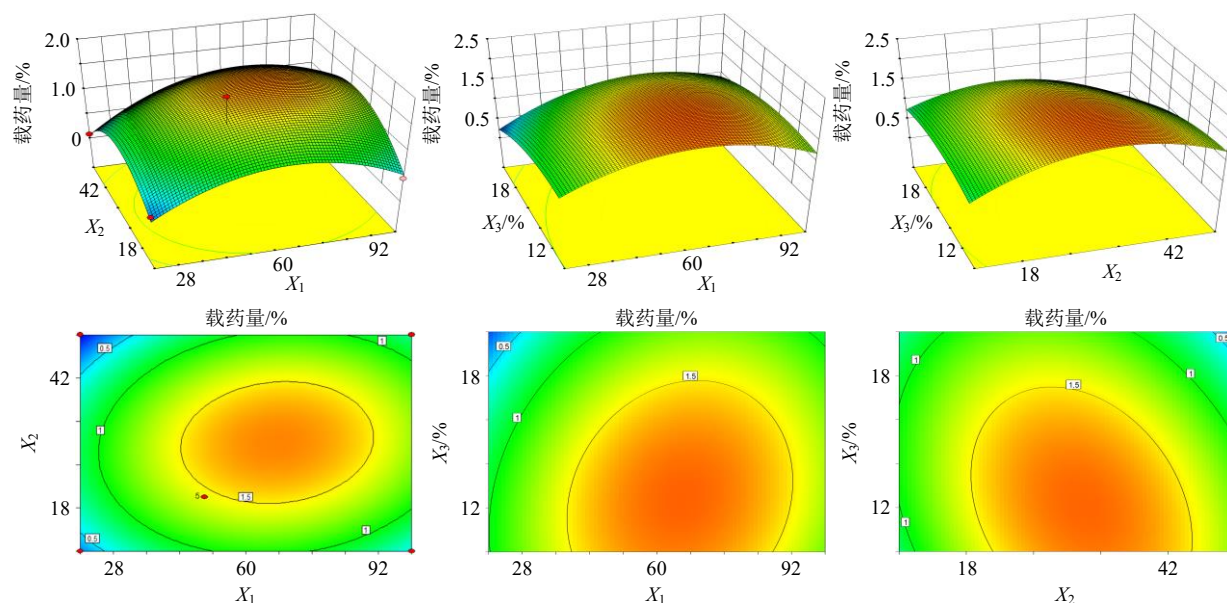
由图 2、3 可以看出,固定其中 1 个因素,另外 2 个因素的交互作用对脂质体的包封率和载药量均有影响且都呈现先增加后降低的趋势(3D 图存在最高点即等高线图椭圆的中心点),可能的原因是过多的胆固醇会使得脂质体膜刚性增大而易于破裂,而过低的胆固醇会使得脂质体膜稳定性降低而发生药物泄露。利用响应面试验分析法优化得出的 SY-NFL 最佳制备条件(脂药比 65.66 : 1, 脂胆比 31.85 : 1, 丙二醇质量分数 12.15%)制备的 SY-NFL 包封率和载药量分别为 85.79%和 1.77%,表明 NFL 对 SY 具有较好的载药性能。

2.5.3 验证试验 按照上述优化的条件,制备 SY-NFL 3 批,结果见表 6,结果表明该处方和成型工艺重现性良好。

2.6 成型工艺优化

以包封率、粒径大小、PDI 值为考察指标,考察探头超声时间和转速的影响。设定探头超声转速为 8 000 r/min,探头超声时间对 SY-NFL 粒径和包封率的影响结果见表 7。设定探头超声时间为 5 min,探头超声转速对脂质体粒径和包封率的影响见表 8。由表 7、8 可知,随着转速及超声时间的增加,SY-NFL 的包封率和粒径均减小,且超声转速对 SY-NFL 包封率的影响大于超声时间对 SY-NFL 包封率的影响。综合考虑,在包封率降低较小的情况下,采用 8 000 r/min 超声 5 min 优化 SY-NFL 的粒径。

根据表 7、8 结果显示,超声前脂质体的包封率为 $(84.673 \pm 2.456)\%$,粒径为 $(1\,235.800 \pm 3.615)$ nm, PDI 为 0.157 ± 0.314 。由于载药量与包封率变

图 2 X_1 与 X_2 、 X_1 和 X_3 、 X_2 和 X_3 对 SY-NFL 包封率影响的响应面与等高线图Fig. 2 Response surface and contour plot of effect of X_1 and X_2 , X_1 and X_3 , X_2 and X_3 on encapsulation efficiency of SY-NFL图 3 X_1 与 X_2 、 X_1 与 X_3 、 X_2 与 X_3 对 SY-NFL 载药量影响的响应面与等高线图Fig. 3 Response surface and contour plot of effect of X_1 and X_2 , X_1 and X_3 , X_2 and X_3 on drug loading of SY-NFL表 6 验证试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Results of verification tests ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批号	包封率/%	载药量/%
1	85.080 ± 1.726	1.535 ± 1.275
2	81.010 ± 2.495	1.529 ± 1.987
3	78.230 ± 4.233	1.494 ± 1.427

化呈正相关, 故在保证上述 SY-NFL 包封率变化较小的基础上, 利用探头 8 000 r/min 超声 5 min 时, 脂质体的粒径与 PDI 值明显减小。故以此工艺为最佳工艺, 利用该工艺制得的 SY-NFL, 其包封率为

表 7 探头超声时间对脂质体的结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 7 Results of probe ultrasonic time on liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

探头超声 时间/min	包封率/%	粒径/nm	PDI
0	84.673 ± 2.456	1 235.800 ± 3.615	0.157 ± 0.314
2	81.673 ± 2.783	1 004.500 ± 2.593	0.372 ± 0.349
5	81.320 ± 1.782	596.800 ± 0.125	0.112 ± 0.432
10	75.063 ± 3.568	501.200 ± 1.349	0.458 ± 0.295
15	65.832 ± 2.569	490.400 ± 3.569	0.327 ± 0.312

表 8 探头超声转速对脂质体的结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 8 Results of ultrasonic speed of probe on liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

探头超声转速/(r·min ⁻¹)	包封率/%	粒径/nm	PDI
5 000	84.002±2.456	1 132.000±3.238	0.518±0.129
8 000	83.138±3.109	549.650±2.673	0.286±0.385
10 000	56.128±1.481	479.300±1.250	0.210±0.202
15 000	19.618±2.348	442.200±3.460	0.213±0.130
20 000	8.467±4.272	286.900±2.560	0.477±0.239

(81.440±4.250) %，载药量为 (1.510±1.450) %，粒径为 (534.500±1.960) nm，PDI 为 0.110±0.010。

2.7 SY-NFL 药剂学性质研究

2.7.1 结构观察 加入 SY 制备脂质体时另将脂溶性荧光探针尼罗红和水溶性荧光探针钙黄绿素分别加入乙醇相和水相制备 SY-NFL 和 SY-CL，观察荧光分布情况并拍照记录，见图 4。柔性脂质体的水溶性探针 (A-2) 和脂溶性探针 (A-1) 及普通脂质体水溶探针 (B-2) 能均匀地分布在整个脂质体空间，普通脂质体的脂溶性探针 (B-1) 则不能均匀分散于普通脂质体中，说明柔软剂丙二醇的加入可使 SY 在柔性脂质体内分布更均匀，且稳定性提高而无聚集现象。

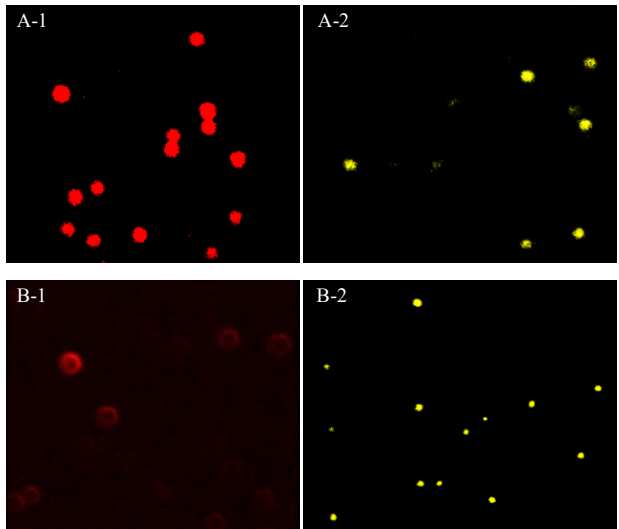


图 4 荧光探针在脂质体中的激光共聚焦显微镜图 (10×100)

Fig. 4 Laser confocal microscopy of fluorescent probes in liposomes (10×100)

2.7.2 SY-NFL 与 SY-CL 的粒径和 ζ 电位分布 由表 9 可知，SY-NFL 比 SY-CL 粒径稍大，且 PDI 更小，柔软剂丙二醇可以使脂质体膜具有较大的变形性且易于降低粒径并使粒径分布均匀。

表 9 SY-NFL 和 SY-CL 粒径、PDI 和 ζ 电位测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂质体	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
SY-NFL	534.500±1.960	0.110±0.010	-13.430±0.510
SY-CL	527.100±10.500	0.690±0.041	-10.730±0.450

2.7.3 SY-NFL 与 SY-CL 的稳定性及变形性考察 按式 (3) 计算渗漏率，按式 (4) 计算相对透过速率。温度对脂质体稳定性的影响结果见表 10，尽管相对透过率显示 SY-NFL 的变形性高于 SY-CL，但是常温下 SY-CL 渗漏率接近 100%，而不同温度下 SY-NFL 渗漏率均低于 SY-CL。结果表明，SY-NFL 比 SY-CL 具有更高的膜稳定性而能够降低药物的泄露。

脂质体的渗漏率=(初始脂质体的包封率-贮藏后脂质体的包封率)/初始脂质体的包封率 (3)

脂质体的相对透过速率= V_1/V_2 (4)

V_1 为 0.8 MPa 下 SY-NFL 通过 0.45 μ m 微孔滤膜的滤过速度， V_2 为 0.8 MPa 下在 SY-NFL 在 5 mL 水中，通过 0.45 μ m 微孔滤膜的滤过速度

表 10 温度对 SY-NFL 和 SY-CL 稳定性及变形性的影响结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

脂质体	渗漏率/%		相对透过速率/%
	25 $^{\circ}$ C 放置 4 周	4 $^{\circ}$ C 放置 4 周	
SY-NFL	89.250±1.980	13.370±2.360	3.640
SY-CL	97.580±2.370	68.490±2.850	2.920

2.8 离体透黏膜试验^[21]

2.8.1 离体大鼠小肠黏膜的制备 取 SD 大鼠，麻醉后取得小肠，将小肠剪开后利用生理盐水冲洗干净，置于 4 $^{\circ}$ C 的生理盐水中备用。

2.8.2 透黏膜试验 参照文献方法^[22]，在供给池中分别加入 SY-NFL 和 SY 原料药溶液各 5 mL，在接收池中加入 18 mL 生理盐水作为接收液。分别于实验开始后 0.5、1、2、3、4 h 取样 2 mL，并加入等量的 37 $^{\circ}$ C 预热过的接收液，样品经 0.45 μ m 滤膜滤过，利用 HPLC 于 403 nm 下测定 HSYA 的含量，重复 3 次，按式 (5) 计算累积透过率。

累积透过率= $\sum CV/A_{et}$ (5)

V 为接收液的体积 (mL)， C 为接收液中的药物质量浓度 (μ g/mL)， A_e 为扩散池的有效面积 (cm^2 ，本实验所用扩散池

有效面积为 3.14 cm^2), t 为累积透过时间

结果见图 5, 可以看出在整个透黏膜给药过程中, SY-NFL 的累积透过率始终高于 SY-CL 和 SY 原料药; 4 h 时, SY-NFL 中 HSYA 的累积透过率分别为 SY-CL 和 SY 原料药的 1.38 倍和 1.65 倍。结果表明, NFL 能够提高水溶性 SY 的黏膜渗透性, 进而提高其生物利用度和临床疗效。

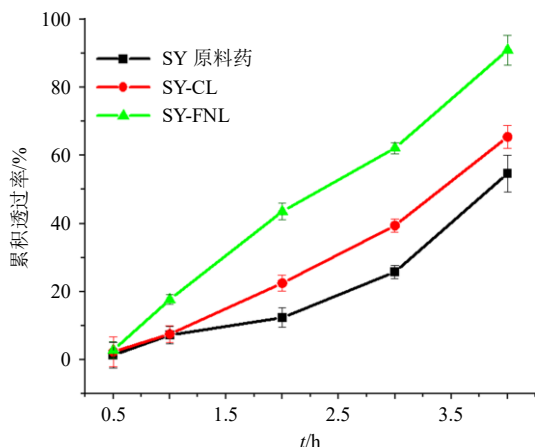


图 5 SY 原料药、SY-CL 及 SY-NFL 的黏膜累积透过率

Fig. 5 Cumulative mucosal transmittance of SY drug substance, SY-CL, and SY-NFL

3 讨论

在包封率测定试验中, 对于脂质体微粒与游离药物的分离方法, 预实验筛选比较了透析法、超滤离心法及鱼精蛋白凝聚法, 其中透析法耗时较长, 超滤膜因对游离药物的吸附作用较大而影响结果的准确性, 鱼精蛋白凝聚法能够有效实现游离药物 SY 和脂质体的分离且用时短、结果可靠, 因此选择鱼精蛋白凝聚法分离脂质体和游离药物; 在破乳剂种类筛选过程中, 分别对甲醇、甲醇-二氯甲烷 (1:1)、12% 曲拉通 X-100 甲醇溶液进行考察, 其中 12% 曲拉通 X-100 甲醇溶液能够完全破坏 SY-NFL 的结构而释放 SY, 故选择其为破乳剂; 在脂质体制备过程中, 由于 SY 受温度影响较大, 当温度超过 50°C 时会发生降解^[23], 温度过低不利于无水乙醇蒸发与磷脂膜的水合过程, 因此, 选择旋转蒸发温度及水合温度均为 50°C 。

脂质体制备的单因素实验中, 脂质体包封率的影响随着卵磷脂、胆固醇和丙二醇质量分数的增加呈现出先增加后降低的趋势, 分析其原因可能是由于脂质体为热力学不稳定体系, 当卵磷脂含量超过合适的用量时, 脂质体颗粒间的碰撞几率增大引起融合并析出; 胆固醇分子掺入磷脂分子中可使脂质

体内水相体积增大, 在一定范围内, 水溶性成分的包封率随着胆固醇含量的增大而增加, 同时胆固醇也会增加磷脂膜表面的黏度, 进而降低磷脂膜对内部水溶性成分的透过性, 但大量的胆固醇反而会使脂质体的刚性增加而易于破裂、药物渗漏; 丙二醇的加入能够提高脂质体内水相的溶解能力进而增加对 SY 的包封率, 然用量过高时较多的丙二醇分子掺入磷脂分子中可增加双分子层的亲水性, 进而降低了其脂溶性屏障作用使包封率下降。因此, SY-NFL 的包封率随着卵磷脂、胆固醇和丙二醇质量分数的增加呈现先增加后降低的趋势。

在脂质体药剂学性质考察试验中, 加入柔软剂丙二醇的脂质体的稳定性、变形性及对 SY 的包载性^[24-25]显著增加; 本实验所制备的 SY-NFL 能够提高水溶性 SY 的透黏膜吸收, 其机制可能是被肠黏膜上皮细胞特别是 M 细胞吞噬、抑制 p-糖蛋白外排、与黏膜上皮细胞吸附融合或通过变形渗透进入黏膜组织。本研究为进一步开发 SY-NFL 的前体脂质体冻干粉肠溶胶囊或舌下速崩片等新型非 iv 黏膜递送制剂奠定了良好的基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 157.
- [2] 李洪峥, 滕羽鸥, 杨光, 等. 联用不同主要有效成分的注射用红花黄色素对冠心病患者血脂指标的影响: 基于 11 项随机对照试验的 Meta 分析 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(8): 77-84.
- [3] 杨雅清, 杨志稳, 曾玉平, 等. 红花黄色素治疗稳定性心绞痛的 Meta 分析 [J]. 中国药物评价, 2021, 38(5): 431-440.
- [4] 刘发, 魏苑, 杨新中, 等. 红花黄素对高血压大鼠的降压作用及对肾素-血管紧张素的影响 [J]. 药学报, 1992, 27(10): 785-787.
- [5] 许星明, 周芳丽, 孙敏燕, 等. 红花黄色素对心肌梗死后的室室重构及 MAPK/mTOR 信号通路的影响 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(6): 58-63.
- [6] 牛芬溪, 刘悦, 刘雅楠, 等. 羟基红花黄色素 A 的药理作用及研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2021, 56(17): 1372-1377.
- [7] Wu Y, Wang L, Jin M, et al. Hydroxysafflor yellow A alleviates early inflammatory response of bleomycin-induced mice lung injury [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(4): 515-522.
- [8] 沈冰冰, 张松, 朱启仁, 等. 羟基红花黄色素 A 减轻大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤 [J]. 基础医学与临床, 2018,

- 38(4): 480-484.
- [9] 何瑶, 江华娟, 成颜芬, 等. 基于 Box-Behnken 设计-响应面法与质量综合评价优化经典名方桃红四物汤煎煮工艺 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6845-6855.
- [10] Fan L H, Dang X Q, Shi Z B, *et al.* Hydroxysafflor yellow A protects PC12 cells against the apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(8): 1187-1194.
- [11] Yang F F, Li J M, Zhu J H, *et al.* Hydroxysafflor yellow A inhibits angiogenesis of hepatocellular carcinoma via blocking ERK/MAPK and NF- κ B signaling pathway in H22 tumor-bearing mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 754: 105-114.
- [12] 石明芯, 郭绮, 黄钰茹, 等. 羟基红花黄色素 A 油包水型纳米乳的药动学研究 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(24): 2108-2112.
- [13] 马冠男. 羟基红花黄色素 A 口服制剂的设计与评价 [D]. 武汉: 武汉工程大学, 2014.
- [14] 王建明, 邹恬, 张媛媛, 等. 红花黄色素粉针剂中羟基红花黄色素 A 血浆蛋白结合率的研究 [J]. 中成药, 2011, 33(6): 947-949.
- [15] 田云, 杨志福, 杨静, 等. 羟基红花黄色素 A 在健康人体内的药动学研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(10): 781-783.
- [16] 崔雪惠, 陈世洪, 邱金娣, 等. 欧前胡素柔性脂质体凝胶的制备及质量评价 [J]. 中国药房, 2020, 31(9): 1074-1079.
- [17] 杨志欣, 卞士嘉, 王闻文, 等. 苦参总黄酮脂质体凝胶剂的制备工艺研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(11): 2201-2206.
- [18] Zhang W G, Li M L, Du W D, *et al.* Tissue distribution and anti-lung cancer effect of 10-hydroxycamptothecin combined with *Platycodonis Radix* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* [J]. *Molecules*, 2019, 24(11): 2068.
- [19] Wu Z Z, Li S, Cai Y Y, *et al.* Synergistic action of doxorubicin and 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin polyphosphorylcholine polymer prodrug [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2020, 189: 110741.
- [20] Bangham A D, Standish M M, Watkins J C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids [J]. *J Mol Biol*, 1965, 13(1): 238-252.
- [21] 李伟泽, 付丽娜, 赵宁, 等. 黄藤素纳米柔性脂质体的制备及体外透黏膜给药研究 [J]. 中国药学杂志, 2015, 50(24): 2139-2145.
- [22] 李伟泽, 赵宁, 梁泽, 等. 连翘挥发油纳米胶束对其水溶性成分连翘苷体外透皮、透黏膜吸收的影响 [J]. 中药材, 2016, 39(1): 134-137.
- [23] 金鸣, 臧宝霞, 李金荣, 等. 羟基红花黄色素 A 热稳定性的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 97-98.
- [24] Elsayed M M A, Abdallah O Y, Naggar V F, *et al.* Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research [J]. *Int J Pharm*, 2007, 332(1/2): 1-16.
- [25] Elsayed M M A, Abdallah O Y, Naggar V F, *et al.* Deformable liposomes and ethosomes: Mechanism of enhanced skin delivery [J]. *Int J Pharm*, 2006, 322(1/2): 60-66.

[责任编辑 郑礼胜]