

聚乙二醇和八聚精氨酸双修饰漆黄素脂质体的制备、表征及体内外评价

姚杰¹, 姬新颖¹, 张体鹏¹, 时艳华¹, 杜娟¹, 张付利^{1,2*}

1. 郑州澍青医学高等专科学校, 河南 郑州 450064

2. 河南大学, 河南 开封 475001

摘要: 目的 制备聚乙二醇(PEG)和八聚精氨酸(R8)双修饰漆黄素脂质体(PEG and R8 co-modified fisetin liposomes, PEG/R8-Fis-Lips), 对其进行理化表征, 并考察其口服相对生物利用度和改善急性肝损伤作用。方法 合成二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-八聚精氨酸(DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8)并进行核磁共振氢谱(¹H-NMR)确认。采用后插入法制备 PEG/R8-Fis-Lips; HPLC 法测定漆黄素含量并计算包封率及载药量; 单因素考察 PEG/R8-Fis-Lips 处方工艺, 采用 Box-Behnken 设计-响应面法(Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM)优化 PEG/R8-Fis-Lips 处方, 并采用乳糖将 PEG/R8-Fis-Lips 混悬液制备成冻干粉; 透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)观察其形态, X 射线粉末衍射法考察冻干粉晶型, 考察 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉在模拟消化液中的稳定性、体外释药行为及贮存稳定性。SD 大鼠 ig 给予 PEG/R8-Fis-Lips 后采血, 考察其口服药动学行为; 建立急性肝损伤模型, 考察 PEG/R8-Fis-Lips 改善急性肝损伤作用。结果 成功合成了 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8。PEG/R8-Fis-Lips 最佳处方: 磷脂与胆固醇用量比为 6.0:1, 总脂质与药物用量比为 12.5:1, DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度为 0.26 mg/mL; PEG/R8-Fis-Lips 的包封率、载药量、粒径和 ζ 电位分别为 (86.17±0.20)%, (6.01±0.10)%, (253.75±13.14) nm、(-14.16±0.82) mV, PEG/R8-Fis-Lips 外观为球形及类球形。漆黄素在 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉中以无定型状态存在, PEG/R8-Fis-Lips 在模拟消化液中的稳定性及累积释放率均高于漆黄素原料药及其普通脂质体(Fis-Lips), 其体外释药过程符合 Weibull 模型; 贮存稳定性也明显提高。药动学结果显示, PEG/R8-Fis-Lips 达峰浓度(C_{max})增加至(604.05±166.73) ng/mL, 半衰期(t_{1/2})延长至(5.04±0.63) h, 相对生物利用度提高至 7.71 倍; 且 PEG/R8-Fis-Lips 减轻了对乙酰氨基酚所致的急性肝损伤。结论 PEG/R8-Fis-Lips 极大地促进了漆黄素口服吸收, 并增强了漆黄素改善急性肝损伤作用。

关键词: 漆黄素; 脂质体; 修饰; 后插入法; Box-Behnken 设计-响应面法; 模拟消化液; 药动学; 口服生物利用度; 急性肝损伤

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)05-1564-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.05.008

PEG and R8 co-modified fisetin liposomes: Preparation, characteration and *in vivo* evaluation

YAO Jie¹, JI Xinying¹, ZHANG Tipeng¹, SHI Yanhua¹, DU Juan¹, ZHANG Fuli^{1,2}

1. Zhengzhou Shuqing Medical College, Zhengzhou 450064, China

2. Henan University, Kaifeng 475001, China

Abstract: Objective To prepare PEG and R8 co-modified fisetin liposomes (PEG/R8-Fis-Lips), and to investigate its relative bioavailability and protective effects on acute liver injury in SD rats after oral administration. **Methods** DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 was synthesized and confirmed by ¹H-NMR method. Post-insertion method was used to prepare PEG/R8-Fis-Lips, HPLC method was used to determine the content of fisetin and calculated the encapsulation efficiency and drug loading. Single factor experiments were used to study the prescription process of PEG/R8-Fis-Lips, Box-Behnken design-response surface method (BBD-RSM) was employed to investigate the optimal prescriptions of PEG/R8-Fis-Lips, and its lyophilized powder was prepared using lactose. Morphology of PEG/R8-Fis-Lips was observed by transmission electron microscopy (TEM), crystal form of its lyophilized powder was analyzed by

收稿日期: 2024-08-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(81670088); 郑州澍青医学高等专科学校教学创新团队项目(2024jxcxtd01)

作者简介: 姚杰(1982—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为临床药学及中医学。Tel: (0371)86176371 E-mail: haihai2008001@126.com

*通信作者: 张付利(1965—), 男, 学士, 副教授, 研究方向为药学。Tel: (0371)23832014 E-mail: ZhangFL@126.com

X-ray powder diffraction (XRPD). Stability of PEG/R8-Fis-Lips lyophilized powder in simulated digestive fluid, in vitro drug release behavior and storage stability were also examined, respectively. SD rats were orally administered of PEG/R8-Fis-Lips, and pharmacokinetic behavior was also investigated. The model of acute liver injury was established and then investigated the protective effects of PEG/R8-Fis-Lips on acute liver injury. **Results** DSPE-mPEG2000-R8 was synthesized successfully. Optimal prescriptions of PEG/R8-Fis-Lips: phospholipids-cholesterol ratio was 6.0:1, total lipids-drug ratio was 12.5:1 and the concentration of DSPE-MPEG₂₀₀₀-R8 was 0.26 mg/mL. Envelopment efficiency, drug loading, particle size and ζ potential of PEG/R8-Fis-Lips were $(86.17 \pm 0.20)\%$, $(6.01 \pm 0.10)\%$, (253.75 ± 13.14) nm, and (-14.16 ± 0.82) mV, respectively. The appearance of PEG/R8-Fis-Lips were spherical or nearly spherical, fisetin was present in an amorphous state in the PEG/R8-Fis-Lips lyophilized powder. The stability and cumulative release rate of PEG/R8-Fis-Lips in simulated digestive fluid were higher than those of fisetin and conventional liposomes (Fis-Lips). Release process of PEG/R8-Fis-Lips accorded with Weibull model, and its storage stability was also significantly improved. Pharmacokinetic results showed that C_{\max} of PEG/R8-Fis-Lips was enhanced to (604.05 ± 166.73) ng/mL, $t_{1/2}$ was prolonged to (5.04 ± 0.63) h, and relative oral bioavailability of PEG/R8-Fis-Lips was enhanced to 7.71 times. PEG/R8-Fis-Lips alleviated acute liver injury induced by paracetamol. **Conclusion** PEG/R8-Fis-Lips greatly promoted the oral absorption of fisetin, and enhanced its protective effects on acute liver injury.

Key words: fisetin, liposomes, modified, post-insertion method, Box-Behnken design-response surface method, simulated digestive fluids, pharmacokinetics, oral bioavailability, acute liver injury

漆黄素 (fisetin, Fis) 属于四羟基黄酮化合物, 可从黄栌、漆树等中药植物以及水果、蔬菜中提取得到。现代药理学研究表明, 漆黄素具有抗炎、抗氧化、改善肝损伤等活性^[1-3]; 此外, 小鼠急性毒性和长期毒性试验结果表明漆黄素基本无毒性^[2], 其使用安全性高, 具备开发及临床应用潜力。但漆黄素存在以下几方面局限性: 漆黄素在水中溶解度仅约 $80 \sim 90 \mu\text{g/mL}$ ^[4], 溶出度较低; 易受各种消化酶 (如唾液酶、胃蛋白酶等) 及 pH 值等影响^[5], 导致药物在消化道中严重降解。作为 P-糖蛋白底物^[1], 其口服吸收困难, 在大鼠体内漆黄素绝对生物利用度仅 7.8% ^[6], 限制了其药效及临床上的广泛应用。

口服制剂具有顺应性高、携带方便等优势, 是患者用药的主要剂型。目前, 已有漆黄素自微乳^[7]、固体分散体^[8]、纳米混悬剂^[9]、胶束^[3]等研究。但自微乳制剂中需用到大量的表面活性剂, 易引发胃肠道刺激等不良反应^[10], 存在安全性问题; 固体分散体和纳米混悬剂无需使用脂质等载体, 但由于缺乏载体对药物的保护作用, 将漆黄素制备成固体分散体或纳米混悬剂可能会加剧漆黄素在机体消化道中的降解; 胶束载体价格昂贵, 研发成本较高, 且可能存在一定毒性^[10]。因此, 开发一种安全性好、生物利用度高的漆黄素纳米制剂十分必要。

脂质体 (liposomes, Lips) 常用脂质载体有磷脂、胆固醇等, 辅料安全性好, 在医药领域研究热度较高^[11]。但脂质体极易受各种消化酶、肠道 pH 值等因素影响破坏其结构的稳定性, 致药物泄露^[12], 通过表面修饰是解决脂质体缺陷的有效方法^[12-13]。

聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 是一种亲水性聚合物, 将其修饰到脂质体表面后可形成一层水化膜及“构象云”, 可有效改善普通脂质体的稳定性问题^[12]。但 PEG 修饰的脂质体透过胃肠道黏液层及上皮屏障速度较慢^[14], 延长了脂质体在消化道滞留时间, 仍存在被破坏的风险。

八聚精氨酸 (octaarginine, R8) 是一种由 8 个精氨酸构成的穿膜肽, 能够快速穿过与之相接触的生物膜^[15-17], 可减少载药脂质体在消化道停留时间, 且 R8 还具有抑制药物外排作用^[15], 因此, 近年来 R8 在促进药物口服吸收应用逐渐增多。鉴于 PEG 和 R8 基团各具优势, 为达到优势互补目的, 本研究在脂质体处方中引入二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-八聚精氨酸 (DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8) 来制备 PEG 和 R8 双修饰的漆黄素脂质体 (PEG and R8 co-modified fisetin liposomes, PEG/R8-Fis-Lips), 采用 Box-Behnken 设计-效应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 PEG/R8-Fis-Lips 处方工艺; 在模拟消化液中比较其与漆黄素脂质体 (fisetin liposomes, Fis-Lips) 的稳定性、释药情况和口服药动学行为, 并评价 PEG/R8-Fis-Lips 改善急性肝损伤作用等, 为漆黄素纳米制剂研究提供新思路。

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; U3000 型高效液相色谱仪、Corona Veo 型电喷雾检测器、Thermo Finnigan LCQ 型液质联用仪, 赛默飞

仪器公司; SH-2-001 型磁力搅拌器, 常州市亿能实验仪器厂; Avance II 型核磁共振波谱仪, 600 MHz, 德国 Bruker 公司; B-3000Plus 型激光粒度仪, 丹东百特仪器有限公司; HB10 型旋转蒸发仪, 德国 IKA 仪器公司; P4 型紫外可见分光光度仪, 广州仪人分析仪器有限公司; CD-X15 型超声仪, 深圳市亦为实业有限公司; JEM-2100 型透射电子显微镜, 日本 LEOL 公司; LGJ-12 冻干机, 深圳市三莉科技有限公司; HS-100 型离心机, 德国 THF 科学仪器公司; 2014DS 智能溶出试验仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; SmartLab SE 型 X 射线粉末衍射仪, 日本 Rigaku 公司; KZ-II 型高速组织研磨仪, 武汉赛维尔生物科技有限公司; NEC160-2A 型氮气吹扫仪, 星辰科技山东有限公司; SKZ-2 型光学显微镜, 德国 Carl Zeiss 公司; Chemray-240 型全自动生化分析仪, 深圳雷杜生命科学股份有限公司。

1.2 材料

漆黄素对照品, 批号 k295520, 质量分数 98.1%, 西安开来生物工程有限公司; 特非那定对照品, 批号 240222, 质量分数 99.5%, 成都彼样生物科技有限公司; 漆黄素原料药, 批号 20210302, 质量分数 97.5%, 武汉华玖医药科技有限公司; 胆固醇, 批号 20201012, 克拉玛尔公司; 磷脂, 批号 20210318, 上海辅必成医药科技有限公司。

二硬脂酰磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000-马来酰亚胺 (DSPE-mPEG₂₀₀₀-Mal), 批号 211215, 上海艾伟拓医药科技有限公司; 半胱氨酸-八聚精氨酸

(cysteine-octaarginine, Cys-R8), 质量分数 >98%, 上海吉尔生化有限公司; 乳糖, 批号 20191120, 北京艾普迪医药科技有限公司; 氘代二甲基亚砜, 批号 58Q25162, 美国 Sigma 公司; 模拟唾液 (批号 231014)、模拟胃液 (批号 230801)、模拟肠液 (批号 231002), 武汉卡诺斯科技有限公司; 对乙酰氨基酚, 批号 20240602, 上海源叶生物科技有限公司; 血清丙氨酸转氨酶 (ALT, 批号 C009-2-1) 和天冬氨酸转氨酶 (AST, 批号 C010-2-1) 检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

1.3 动物

SD 大鼠购自河南省动物实验中心提供, SCXK (豫) 2020-0001, 雌雄兼用, 体质量 200~220 g。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, 动物伦理号 LL202312-3, 均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 的合成及确认

2.1.1 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 合成工艺 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 合成路线见图 1。精密称取 100 mg 的 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 和 75 mg Cys-R8, 溶于 60 mL 有机溶剂 (氯仿-甲醇 2:1), 于 45 °C 水浴中避光磁力搅拌 12 h (600 r/min), 旋蒸除去有机溶剂。残留物置于透析袋 (截留相对分子质量 1500) 中, 加入纯化水溶解后两端扎紧, 并于纯化水中透析 3 d 除去未参加反应的 Cys-R8, 所得产物冷冻干燥后即得 DSPE-PEG₂₀₀₀-R8 粉末。

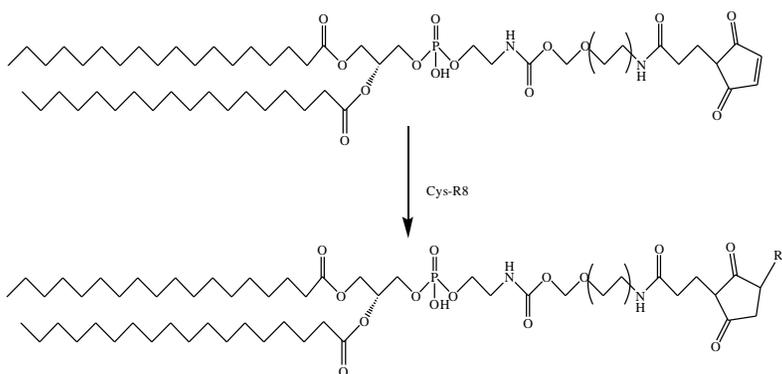


图 1 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 的合成

Fig. 1 Synthesis of DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8

2.1.2 核磁共振氢谱 (¹H-NMR) 确证 取 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 和 DSPE-PEG₂₀₀₀-R8 溶于氘代二甲基亚砜中, 转移至核磁管 (外管直径 5 mm) 后分别测试氢谱。DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 核磁共振图谱显示 (图 2), 在 δ 6.26 处出现马来酰亚胺基团上烯氢特征峰。

DSPE-PEG₂₀₀₀-R8 核磁共振图谱中 δ 6.26 处的马来酰亚胺基团烯氢消失, 推测可能是 Cys-R8 结构上的巯基和 SPE-PEG₂₀₀₀-Mal 结构上的马来酰亚胺基团双键发生加成反应^[18], 表明成功合成了 DSPE-PEG₂₀₀₀-R8。

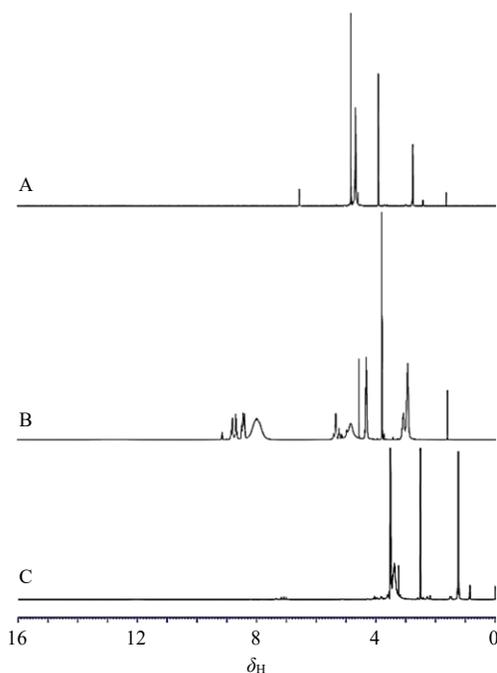


图2 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal (A)、Cys-R8 (B) 和 DSPE-PEG₂₀₀₀-R8 (C) 的 ¹H-NMR 谱图

Fig. 2 ¹H-NMR spectrum of DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal (A), Cys-R8 (B) and DSPE-PEG₂₀₀₀-R8 (C)

2.2 PEG/R8-Fis-Lips 的制备

采用后插入法制备 PEG/R8-Fis-Lips。取 20 mg 漆黄素置于茄形瓶中，加入处方量的磷脂和胆固醇，溶于 20 mL 混合物有机溶剂（氯仿-无水乙醇 1：2）中，置于 45 °C 水浴中减压条件下缓慢旋蒸除去有机溶剂，即在茄形瓶内壁留下一层均匀、透明的薄膜，置于真空干燥箱中过夜。加入体积为 50 mL、含一定浓度的 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 的磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4），室温下缓慢磁力搅拌 12 h（转速为 300 r/min），200 W 功率下超声一定时间，补加 PBS（pH 7.4）至 50 mL，置 -10 °C 冰箱中 10 min，取出过 0.45 μm 微孔滤膜，即得 PEG/R8-Fis-Lips 混悬液。不含漆黄素的阴性样品同法制备。

2.3 PEG/R8-Fis-Lips 中漆黄素定量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters C₁₈ 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长为 364 nm；流动相为甲醇-0.2%甲酸水溶液（60：40）；柱温为 30 °C；进样体积为 10 μL。理论塔板数以漆黄素峰计不低于 8 000。

2.3.2 PEG/R8-Fis-Lips 供试品溶液的制备 精密吸取 PEG/R8-Fis-Lips 混悬液 1 mL 置于 50 mL 量瓶中，加 10 mL 甲醇，200 W 功率下超声 5 min，继续加甲醇稀释定容。精密吸取 2.5 mL 置于 10 mL

量瓶中，使用甲醇-0.2%甲酸水溶液（60：40）稀释定容，即得 PEG/R8-Fis-Lips 供试品溶液。不含漆黄素阴性样品的供试品溶液同法制备。

2.3.3 线性关系考察 使用甲醇配制质量浓度为 200.00 μg/mL 的漆黄素对照品溶液，作为储备液。取适量漆黄素对照品储备液，使用甲醇-0.2%甲酸水溶液（60：40）稀释成质量浓度为 10.00、5.00、1.00、0.50、0.10、0.05 μg/mL 系列对照品溶液，分别进样 10 μL，按“2.3.1”项下色谱条件测定漆黄素各质量浓度（X）的峰面积（Y），进行线性回归，得回归方程 $Y=23.6675X+0.7843$ ， $r=0.9998$ ，结果表明漆黄素在 0.05~10.00 μg/mL 线性关系良好。

2.3.4 专属性考察 取阴性样品供试品溶液、漆黄素对照品溶液、PEG/R8-Fis-Lips 供试品溶液，分别按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，结果见图 3。漆黄素色谱峰峰形对称，专属性较高。

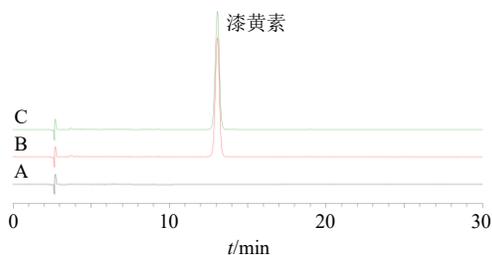


图3 阴性样品 (A)、漆黄素对照品 (B) 和 PEG/R8-Fis-Lips 样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of negative sample (A), fisetin reference substance (B) and PEG/R8-Fis-Lips sample (C)

2.3.5 精密度考察 取质量浓度分别为 0.05、1.00、10.00 μg/mL 的漆黄素对照品溶液，分别按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定 6 次，结果漆黄素峰面积的 RSD 分别为 0.77%、0.36%、0.55%，结果表明该仪器精密度良好。

2.3.6 稳定性考察 取“2.3.2”项下 PEG/R8-Fis-Lips 供试品溶液，按照“2.3.1”项下色谱条件分别于制备后 0、2、6、9、12、24 h 进样测定，结果漆黄素峰面积的 RSD 为 0.49%，结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.7 重复性考察 取 PEG/R8-Fis-Lips 混悬液，按照“2.3.2”项下方法操作，平行制备供试品溶液 6 份，分别按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定，结果漆黄素质量浓度的 RSD 为 1.60%，结果表明该实验方法重复性良好。

2.3.8 加样回收率考察 分别取 9 份 PEG/R8-Fis-Lips 混悬液，每份 0.5 mL，分别置于 9 个 50 mL 量

瓶中,分成低、中、高3个质量浓度组,分别加入漆黄素对照品储备液(质量浓度 200.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 0.5、1.0、1.5 mL,按照“2.3.2”项下方法制备 PEG/R8-Fis-Lips 供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件进样测定,计算得漆黄素的平均加样回收率为 98.69%,RSD 为 1.57%,结果表明该实验准确度较高。

2.3.9 样品测定 取各待测样品,按照“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定,计算漆黄素含量。

2.4 PEG/R8-Fis-Lips 指标的测定

精密吸取 PEG/R8-Fis-Lips 混悬液 1 mL,按照“2.3.2”项下方法测定漆黄素总量($W_{\text{总药量}}$)。精密吸取 1 mL PEG/R8-Fis-Lips 混悬液,置于超滤管内管(截留相对分子质量 10 000),待离心机腔体温度恒定至 4 $^{\circ}\text{C}$ 后,8 000 r/min 离心(离心半径 6.0 cm) 10 min,取外管液测定游离漆黄素量($W_{\text{游离药量}}$)。精密吸取 PEG/R8-Fis-Lips 混悬液 1 mL 预冻 3 d 后冷冻干燥,称定质量($W_{\text{总}}$),即为漆黄素、脂质载体和 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 的总质量,计算 PEG/R8-Fis-Lips 中漆黄素的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_{\text{总药量}} - W_{\text{游离药量}}) / W_{\text{总药量}}$$

$$\text{载药量} = (W_{\text{总药量}} - W_{\text{游离药量}}) / W_{\text{总}}$$

取 5 mL 蒸馏水,加入 100 μL PEG/R8-Fis-Lips 混悬液后摇匀,于粒径分析仪上测定 ζ 电位(使用电位样品池)和粒径(使用比色皿)及多分散指数(polydispersity index, PDI),各样品测定 3 次,记录均值。

2.5 PEG/R8-Fis-Lips 处方工艺单因素考察

2.5.1 磷脂与胆固醇用量比考察 漆黄素投药量为 20 mg、总脂质(磷脂与胆固醇总量)与药物用量比为 10:1、DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度为 0.4 mg/mL、超声时间为 10 min 条件下考察磷脂与胆固醇用量比对 PEG/R8-Fis-Lips 包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 1。PEG/R8-Fis-Lips 包封率和载药量随着磷脂用量比的增加呈先增加后下降趋势,可能是胆固醇用量比较大时胆固醇占据了磷脂的载药空间^[11],导致包封率与载药量较低;胆固醇主要用于稳定脂质体结构,当用量比较小时影响了 PEG/R8-Fis-Lips 结构稳定性^[11],导致药物易泄露。胆固醇用量比越大,PEG/R8-Fis-Lips 粒径越大,可能是胆固醇填充到磷脂分子间的空隙及分子内载药空间所致^[12]。可见磷脂与胆固醇用量比对 PEG/R8-Fis-Lips 影响较大,当磷脂与胆固醇用量比为

表 1 磷脂与胆固醇用量比对 PEG/R8-Fis-Lips 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of phospholipids-cholesterol ratio on encapsulation efficiency, drug loading and particle size of PEG/R8-Fis-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂与胆固醇用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
4:1	55.60 \pm 1.17	4.53 \pm 0.19	272.18 \pm 12.23
5:1	62.79 \pm 0.95	5.04 \pm 0.23	269.90 \pm 12.77
6:1	74.69 \pm 1.34	6.12 \pm 0.12	259.77 \pm 10.16
7:1	65.13 \pm 1.09	5.56 \pm 0.26	244.39 \pm 8.86
8:1	60.27 \pm 1.42	4.91 \pm 0.15	240.45 \pm 10.15

6:1 时包封率相对较高,故选择磷脂与胆固醇用量比 5:1~7:1 继续优化。

2.5.2 总脂质与药物用量比考察 漆黄素投药量为 20 mg、磷脂与胆固醇用量比为 6:1、DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度为 0.4 mg/mL、超声时间为 10 min 条件下考察总脂质与药物用量比对 PEG/R8-Fis-Lips 包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 2。PEG/R8-Fis-Lips 包封率随着总脂质用量增加而增加,而载药量逐渐下降,这是由于增加总脂质用量为药物提供了更多载药空间,有利于 PEG/R8-Fis-Lips 载药,但总脂质用量过多时造成材料浪费,导致 PEG/R8-Fis-Lips 载药量下降。PEG/R8-Fis-Lips 粒径随着总脂质用量增加而变大,可能是总脂质用量越大时体系质量浓度越大,因而 PEG/R8-Fis-Lips 越易发生融合、聚集等现象^[12]。总脂质与药物用量比在 8:1~16:1 时包封率和载药量呈现相反的变化趋势,期望 PEG/R8-Fis-Lips 具有相对理想的包封率和载药量,故以总脂质与药物用量比 12:1 为中心,将优化区间缩小至 10:1~14:1 进行后续优化。

2.5.3 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度考察 漆黄素投药量为 20 mg、磷脂与胆固醇用量比为 6:1、总脂质与药物用量比 12:1、超声时间为 10 min 条件

表 2 总脂质与药物用量比对 PEG/R8-Fis-Lips 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of total lipids-drug ratio on encapsulation efficiency, drug loading and particle size of PEG/R8-Fis-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

总脂质与药物用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
8:1	68.42 \pm 1.16	6.79 \pm 0.14	246.92 \pm 12.16
10:1	75.17 \pm 0.95	6.16 \pm 0.13	252.77 \pm 14.22
12:1	80.14 \pm 1.43	5.70 \pm 0.19	263.16 \pm 10.81
14:1	82.66 \pm 1.01	5.13 \pm 0.21	274.90 \pm 13.67
16:1	83.05 \pm 1.24	4.69 \pm 0.15	295.87 \pm 16.74

下考察 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度对 PEG/R8-Fis-Lips 包封率、载药量和粒径的影响, 结果见表 3。PEG/R8-Fis-Lips 包封率和载药量随着 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度增加先增加而下降, 可能是适当对脂质体进行修饰可减少浅表层药物泄露^[12], 因而包封率和载药量增加。但 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 的 R8 肽链具有正电荷, 对脂质体的结构稳定性有一定影响^[15], 因而 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 用量过大时造成药物泄露及包封率和载药量下降。PEG/R8-Fis-Lips 粒径随着 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度增加而

表 3 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度对 PEG/R8-Fis-Lips 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 mass concentration on encapsulation efficiency, drug loading and particle size of PEG/R8-Fis-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

DSPE-mPEG ₂₀₀₀ -R8 质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0	76.16±1.17	5.52±0.13	221.18±9.94
0.1	78.66±1.11	5.82±0.17	239.03±10.88
0.2	81.94±1.33	6.04±0.20	247.05±13.16
0.3	85.03±0.92	6.16±0.23	258.67±9.96
0.4	79.89±0.99	5.43±0.13	265.41±11.85
0.5	68.44±1.41	4.11±0.12	289.13±20.37

变大, 这是由于 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 修饰至脂质体表面后 PEG 和 R8 基团增加了脂质体表面水化层厚度^[17], 导致粒径变大。可见, DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度对 PEG/R8-Fis-Lips 影响较大, 由于 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度为 0.3 mg/mL 时包封率和载药量相对较大, 故后续选择 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度 0.2~0.4 mg/mL 进行优化。

2.5.4 超声时间考察 漆黄素投药量为 20 mg、磷脂与胆固醇用量比为 6 : 1、总脂质与药物用量比 12 : 1、DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度为 0.3 mg/mL 条件下考察超声时间对 PEG/R8-Fis-Lips 包封率、

载药量和粒径的影响, 结果见表 4。当不进行超声处理时 PEG/R8-Fis-Lips 粒径接近 300 nm, 随着超声时间增加 PEG/R8-Fis-Lips 包封率和载药量总体呈下降趋势, 说明超声处理对 PEG/R8-Fis-Lips 产生一定的破坏作用。适当超声可使 PEG/R8-Fis-Lips 粒径下降, 但超声时间过长反而使粒径增长, 由于超声时间为 5 min 时 PEG/R8-Fis-Lips 具有相对较高的包封率和载药量, 同时粒径也较小, 故确定 PEG/R8-Fis-Lips 的超声时间为 5 min。

表 4 超声时间对 PEG/R8-Fis-Lips 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of ultrasonic time on encapsulation efficiency, drug loading and particle size of PEG/R8-Fis-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
0	84.95±0.93	6.17±0.17	293.56±23.17
5	85.58±1.43	6.23±0.15	246.15±9.91
10	84.06±1.24	5.90±0.10	262.64±13.16
15	79.77±0.98	5.74±0.24	279.43±21.52
20	72.43±1.51	4.84±0.13	304.65±29.69

2.6 BBD-RSM 优化 PEG/R8-Fis-Lips 处方

2.6.1 试验方案 《中国药典》2020 年版四部 9014 项下要求微粒制剂的包封率不得低于 80%, 可见包封率对微粒制剂的重要性。前期研究发现, 将载药量和粒径一同纳入优化指标时会对包封率最大化的处方筛选带来影响, 因此, 本研究对 PEG/R8-Fis-Lips 处方筛选时仅将包封率作为优化指标。磷脂与胆固醇用量比 (X_1)、总脂质与药物用量比 (X_2) 和 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度 (X_3) 对 PEG/R8-Fis-Lips 包封率 (Y) 影响较大, 故选择 X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量, Y 为因变量, 采用 BBD-RSM 优化 PEG/R8-Fis-Lips 处方。 X_1 、 X_2 、 X_3 自变量水平见表 5, 各个 PEG/R8-Fis-Lips 处方测得的包封率结果见表 5。

2.6.2 模型的建立及分析 根据表 5 中所得实验数

表 5 BBD-RSM 试验设计与结果 ($n = 3$)

Table 5 Design and results of BBD-RSM test ($n = 3$)

序号	X_1	X_2	X_3 /(mg·mL ⁻¹)	Y/%	序号	X_1	X_2	X_3 /(mg·mL ⁻¹)	Y/%	序号	X_1	X_2	X_3 /(mg·mL ⁻¹)	Y/%
1	6 : 1 (0)	12 : 1 (0)	0.3 (0)	84.17	7	6 : 1 12 : 1		0.3	85.73	13	5 : 1 10 : 1		0.3	75.62
2	6 : 1	12 : 1	0.3	83.53	8	6 : 1 12 : 1		0.3	85.15	14	6 : 1 10 : 1		0.2	74.34
3	5 : 1	12 : 1	0.4 (+1)	68.25	9	7 : 1 14 : 1		0.3	76.97	15	6 : 1 14 : 1		0.4	73.77
4	5 : 1 (-1)	12 : 1	0.2 (-1)	73.37	10	6 : 1 14 : 1		0.2	77.83	16	7 : 1 12 : 1		0.2	76.98
5	5 : 1	14 : 1 (+1)	0.3	76.73	11	6 : 1 12 : 1		0.3	84.55	17	6 : 1 10 : 1		0.4	69.54
6	7 : 1 (+1)	12 : 1	0.4	67.41	12	7 : 1 10 : 1 (-1)		0.3	73.46					

据, 采用 Design Expert 软件 (版本为 V10.0.3) 拟合出二次多元回归方程为 $Y = 84.630 + 0.110 X_1 + 1.540 X_2 - 2.940 X_3 + 0.600 X_1 X_2 - 1.110 X_1 X_3 + 0.180 X_2 X_3 - 5.650 X_1^2 - 3.280 X_2^2 - 7.470 X_3^2$, 方差分析结果见表 6。

模型 P 值 < 0.0001 , 失拟项 F 值 $= 0.1167$ ($P > 0.05$), $R^2 = 0.9803$, 说明构建的包封率 Y 二次多元回归方程是有效的。另外方程的 $R_{adj}^2 = 0.9550$, 说明仅有 4.5% 数据出现异常, 表明该模型可用于 PEG/R8-Fis-Lips 处方研究。包封率 Y 二次多元回归方程 X_2 具显著性差异 ($P < 0.01$), 而 X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、

X_3^2 具极显著性差异 ($P < 0.001$)。

2.6.3 效应面优化与预测 采用 Design Expert 软件 (版本为 V10.0.3) 绘制各自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 对包封率的三维曲面图, 结果见图 4。随着 X_1 、 X_2 或 X_3 中任意 2 因素的增加, PEG/R8-Fis-Lips 包封率均呈现先增大后减小的趋势。设置包封率优化区间为 50%~100%, 选择包封率最大值为优化目标, 得到 PEG/R8-Fis-Lips 最佳处方为 X_1 (磷脂与胆固醇用量比) 6.04 : 1, X_2 (总脂质与药物用量比) 12.47 : 1, X_3 (DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度) 0.26 mg/mL, 模型预测包封率为 86.69% ($> 80%$), 符合设计要求。

表 6 BBD-RSM 试验方差分析

Table 6 Variance analysis of BBD-RSM test

误差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值	误差来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
模型	9	552.50	61.39	38.69	<0.0001	X_1^2	1	134.37	134.37	84.68	<0.0001
X_1	1	0.09	0.09	0.06	0.8183	X_2^2	1	45.35	45.35	28.58	0.0011
X_2	1	19.03	19.03	12.00	0.0105	X_3^2	1	235.22	235.22	148.23	<0.0001
X_3	1	69.33	69.33	43.69	0.0003	残差	10	11.11	1.59		
$X_1 X_2$	1	1.44	1.44	0.91	0.3725	失拟项	5	8.20	2.73	3.76	0.1167
$X_1 X_3$	1	4.95	4.95	3.12	0.1207	纯误差	5	2.91	0.73		
$X_2 X_3$	1	0.14	0.14	0.09	0.7775	总差	19	563.60			

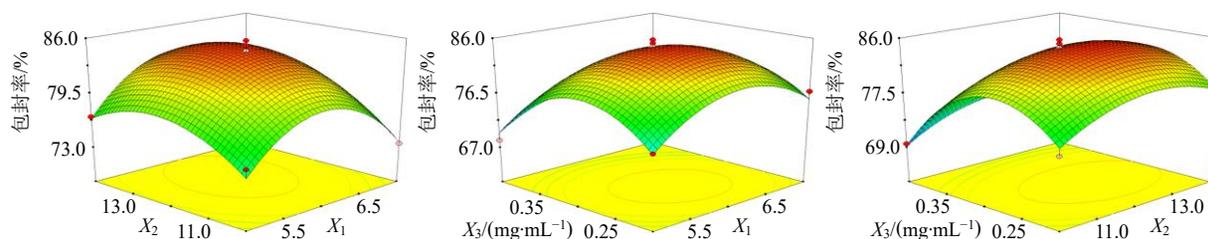


图 4 自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 对包封率的三维图

Fig. 4 Three-dimensional plot of independent factors X_1 , X_2 , X_3 to entrapment efficiency

2.7 PEG/R8-Fis-Lips 最佳处方的修正及实验验证

为方便实际操作, 将“2.6.3”项下筛选出的 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 最佳处方略作修正 (修正幅度绝对值 $< 1%$), 即磷脂与胆固醇用量比修正为 6.0 : 1, 总脂质与药物漆黄素用量比修正为 12.5 : 1, DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量浓度 0.26 mg/mL 保持不变。按修正后的 PEG/R8-Fis-Lips 处方, 平行制备 3 批样品, 测得其平均包封率为 $(86.17 \pm 0.20) \%$, 与预测包封率 (86.69%) 相比, 实测包封率相对偏差为 $-0.60%$, 说明构建的包封率数学模型具有较强的指导意义。

2.8 Fis-Lips 的制备及其与 PEG/R8-Fis-Lips 各项指标比较

2.8.1 Fis-Lips 的制备 除不加 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 外, 参考“2.7”项下修正后的 PEG/R8-Fis-Lips 处

方制备 Fis-Lips。为使 Fis-Lips 包封率与 PEG/R8-Fis-Lips 包封率接近, 将 Fis-Lips 中总脂质与药物漆黄素用量比调整至 13.5 : 1, 具体制备过程为取 20 mg 漆黄素置于茄形瓶中, 加入磷脂和胆固醇 (磷脂与胆固醇用量比为 6.0 : 1, 总脂质与漆黄素用量比为 13.5 : 1), 溶于 20 mL 有机溶剂混合物 (氯仿-无水乙醇 1 : 2) 中, 置于 45 °C 水浴中减压条件下缓慢旋蒸除去有机溶剂, 即在茄形瓶内壁留下一层均匀、透明的薄膜, 置于真空干燥箱中过夜。加入体积为 50 mL PBS (pH 7.4) 中, 室温下磁力搅拌 1.5 h (转速为 300 r/min), 200 W 功率下超声 5 min, 补加 PBS (pH 7.4) 至 50 mL, 置 -10 °C 冰箱中 10 min, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 即得 Fis-Lips 混悬液。

2.8.2 各项指标比较 PEG/R8-Fis-Lips 和 Fis-Lips

各项指标测定结果见表 7, 两者包封率和载药量基本一致。PEG/R8-Fis-Lips 粒径大于 Fis-Lips (表 7 和图 5-A), 这与 PEG/R8-Fis-Lips 表面修饰 PEG 和 R8 基团有关。PEG/R8-Fis-Lips 的 PDI 值大于 Fis-Lips, 表明 PEG/R8-Fis-Lips 粒径均一性比 Fis-Lips

稍差。PEG/R8-Fis-Lips 的 ζ 电位由 Fis-Lips 的 (-28.12 ± 1.12) mV 增加至 (-14.16 ± 0.82) mV, 这是由于 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 材料上 R8 基团具有正电性, 中和了脂质体表面部分负电荷所致^[17], 结果见表 7 和图 5-B。

表 7 PEG/R8-Fis-Lips 和 Fis-Lips 各项指标比较结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Comparison indicators results of PEG/R8-Fis-Lips and Fis-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

指标	包封率/%	载药量/%	粒径/nm	PDI值	ζ 电位/mV
Fis-Lips	85.36 \pm 0.27	5.94 \pm 0.13	203.19 \pm 10.84	0.113 \pm 0.011	-28.12 \pm 1.12
PEG/R8-Fis-Lips	86.17 \pm 0.20	6.01 \pm 0.10	253.75 \pm 13.14	0.184 \pm 0.019	-14.16 \pm 0.82

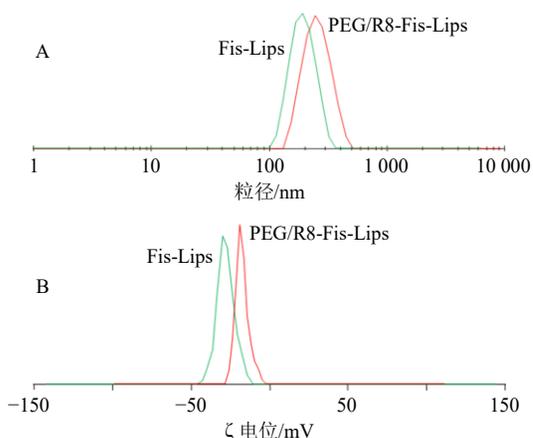


图 5 PEG/R8-Fis-Lips 和 Fis-Lips 的粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 5 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of PEG/R8-Fis-Lips and Fis-Lips

2.8.3 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察微观形态 分别吸取 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 混悬液各 100 μ L, 用蒸馏水稀释 50 倍, 滴至铜网上, 铺展后使用 1% 磷钨酸钠染色, 置于 30 $^{\circ}$ C 真空干燥箱中 0.5 h。于 TEM 上观察 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 形貌 (放大倍数为 13 000)。结果见图 6, Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips

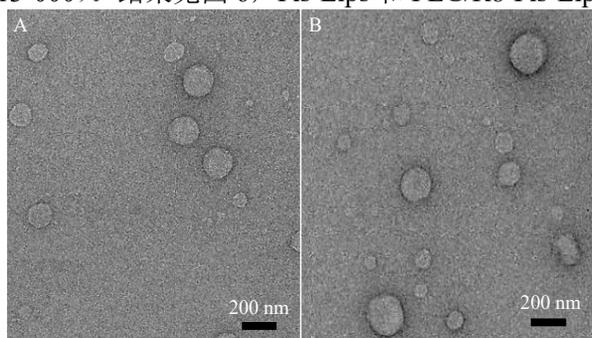


图 6 Fis-Lips (A) 和 PEG/R8-Fis-Lips (B) 的 TEM 图 ($\times 13\ 000$)

Fig. 6 TEM of Fis-Lips (A) and PEG/R8-Fis-Lips (B) ($\times 13\ 000$)

为类似球形的囊泡状。

2.9 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉的制备

将乳糖加至 Fis-Lips 混悬液中, 使乳糖最终质量浓度为 4%, 溶解澄清后分装至西林瓶中 (规格为 2 mL/瓶), 于 -50 $^{\circ}$ C 超低温冰箱预冻 3 d, 迅速置于冻干机中, 抽至真空后冷冻干燥 3 d。于 6 h 内缓慢升温至 25 $^{\circ}$ C, 保持 6 h 后取出即得 Fis-Lips 冻干粉。同法将 PEG/R8-Fis-Lips 混悬液制成冻干粉。外观见图 7。结果表明, Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉外观色泽均一。

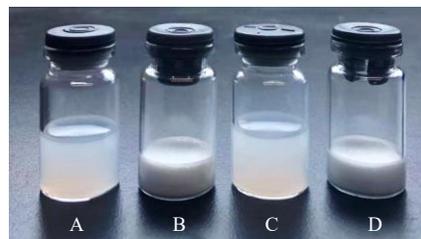


图 7 Fis-Lips (A) 及其冻干粉 (B) 和 PEG/R8-Fis-Lips (C) 及其冻干粉 (D) 外观

Fig. 7 Appearance of Fis-Lips (A) and its lyophilized powder (B), PEG/R8-Fis-Lips (C) and its lyophilized powder (D)

2.10 X 射线粉末衍射 (X-ray powder diffraction, XRPD) 法研究冻干粉晶型

采用 Cu-K α 靶测试, X 射线粉末衍射仪的扫描角度 (2θ) 为 3 $^{\circ}$ ~45 $^{\circ}$, 步长为 0.02 $^{\circ}$, 扫描速率为 4 $^{\circ}$ /min。取漆黄素原料药、空白辅料 (脂质、DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 与乳糖等辅料比例同 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉)、物理混合物 (漆黄素与空白辅料比例同 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉)、Fis-Lips 冻干粉和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉各约 30 mg, 置于玻璃板凹槽中, 玻璃片将样品压平整后扫描, 结果见图 8。漆黄素在 11.0 $^{\circ}$ 、11.8 $^{\circ}$ 、12.5 $^{\circ}$ 、14.1 $^{\circ}$ 、15.7 $^{\circ}$ 、17.8 $^{\circ}$ 、24.3 $^{\circ}$ 、26.2 $^{\circ}$ 、28.2 $^{\circ}$ 等处出现特征晶型峰, 在物理混合物

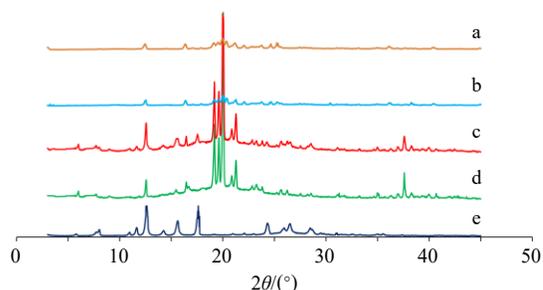


图8 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉 (a)、Fis-Lips 冻干粉 (b)、物理混合物 (c)、空白辅料 (d) 和漆黄素原料药 (e) 的 XRPD 结果

Fig. 8 XRPD results of PEG/R8-Fis-Lips freeze-dried powder (a), Fis-Lips freeze-dried powder (b), physical mixture (c), blank adjuvant (d) and fisetin bulk drug (e)

XRPD 中仍可观察到 12.5°、17.8°、24.3°等处漆黄素特征晶型峰, 其他特征晶型峰被辅料掩蔽, 表明漆黄素在物理混合物中仍以结晶状态存在。在 Fis-Lips 冻干粉和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉 XRPD 图谱中, 在无辅料干扰区域也观察不到漆黄素特征晶型峰, 推测漆黄素在 Fis-Lips 冻干粉和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉中可能以无定型状态存在。

2.11 模拟消化液中稳定性考察

2.11.1 模拟消化液中药物保留率测定 取漆黄素原料药、Fis-Lips 冻干粉和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉适量, 加入模拟唾液适量 (含 α-淀粉酶, pH 6.5), 使漆黄素质量浓度为 20 μg/mL, 置于 37 °C 水浴中孵育 20 min, 计算剩余漆黄素质量分数。同法考察各个样品在模拟胃液 (含胃蛋白酶, pH 2.0) 和模拟肠液 (含胰蛋白酶, pH 7.4) 中的稳定性, 孵育时间分别为 2、12 h, 结果见表 8。漆黄素原料药在模拟唾液、胃液和肠液中均出现降解现象, 说明漆黄素稳定性较差。Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 均增加了

表 8 漆黄素原料药、Fis-Lips、PEG/R8-Fis-Lips 在模拟消化液中保留率变化情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Retention rate of fisetin bulk drug, Fis-Lips and PEG/R8-Fis-Lips in simulated digestive fluids ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

介质	保留率/%		
	漆黄素原料药	Fis-Lips	PEG/R8-Fis-Lips
模拟唾液	88.16 ± 2.15	90.74 ± 0.84	95.82 ± 0.91**
模拟胃液	65.77 ± 3.59	73.26 ± 4.03*	88.19 ± 1.53***
模拟肠液	15.68 ± 1.14	22.45 ± 0.79**	38.94 ± 2.02***

与漆黄素原料药比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Fis-Lips 比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs fisetin bulk drug; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs Fis-Lips.

漆黄素在各介质中的保留率, 而 PEG/R8-Fis-Lips 在模拟唾液、胃液和肠液在的保留率均极显著高于 Fis-Lips ($P < 0.01$)。

2.11.2 模拟消化液中粒径稳定性考察 取 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉各 100 mg, 加入蒸馏水复溶, 转移至透析袋 (截留相对分子质量 8 000~14 000) 中, 尼龙绳扎紧。置于 37 °C 模拟唾液中孵育, 分别于 0、0.3 h 取样测定粒径。将介质换成温度为 37 °C 的模拟胃液, 分别于 0.5、1.0、1.5、2.0 h 取样测定粒径。再将介质换成温度为 37 °C 的模拟肠液, 分别于 3.0、4.0、8.0、12.0、16.0 h 取样测定粒径。结果见图 9。Fis-Lips 在 4 h 时粒径已达微米级别, 表明 Fis-Lips 在模拟消化液中稳定性较差。PEG/R8-Fis-Lips 在 12 h 时粒径达微米级别, 表明 PEG/R8-Fis-Lips 在模拟消化液中结构稳定性高于 Fis-Lips, 可能与 PEG/R8-Fis-Lips 表面 PEG 和 R8 双修饰基团有关, 有效抵抗了消化酶等对脂质体的破坏。

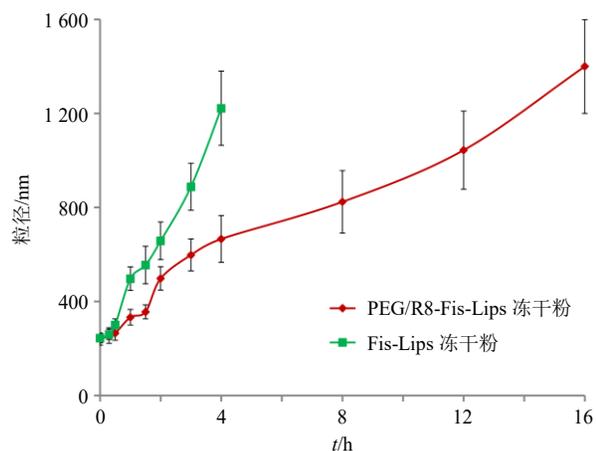


图 9 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 在模拟消化液中粒径稳定性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Comparison of particle size stability of Fis-Lips and PEG/R8-Fis-Lips in simulated digestive fluids ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.12 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 在模拟消化液体外释药行为及模型拟合

取漆黄素原料药、Fis-Lips 冻干粉和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉适量, 漆黄素含量均为 20 mg, 加入 5 mL 蒸馏水复溶得混悬液, 分别置于透析袋 (截留相对分子质量 8 000~14 000) 中, 尼龙绳扎紧。取 1 000 mL 模拟唾液作为释药介质, 搅拌桨转速为 75 r/min, 模拟唾液温度为 37 °C, 于 0.3 h 取样 5 mL, 并补加模拟唾液 5 mL。0.3 h 取样后将介质换成温度为 37 °C 的模拟胃液, 分别于 0.5、1.0、1.5、2.0

h 同法取样并补液。2.0 h 取样后再将介质换成温度为 37 °C 的模拟肠液，分别于 3.0、4.0、8.0、12.0、18.0 h 同法取样并补液。样品于 10 000 r/min 离心（离心半径为 6.0 cm）10 min，测定漆黄素含量，结果见图 10。

漆黄素原料药在 18 h 累积释放率仅 11.5%，可能是受消化道 pH 值、各种消化酶的影响，导致漆黄素降解严重，使累积释放率出现下降情况^[5]。Fis-Lips 在 18 h 累积释放率为 20.17%，在一定程度上增加了药物累积释放率，但后期累积释放率下降幅度仍较大，可能与普通脂质体稳定性较差有关^[12]。PEG/R8-Fis-Lips 在 18 h 累积释放率为 56.81%，远高于漆黄素原料药和 Fis-Lips。

PEG/R8-Fis-Lips 在模拟消化道的释药模型拟合结果见表 9，其释药过程与 Weibull 模型拟合度最高。Fis-Lips 在模拟消化道中的释药行为，与表 6 中释药模型的相关系数 r 均小于 0.2，故不再进行释药机制研究。

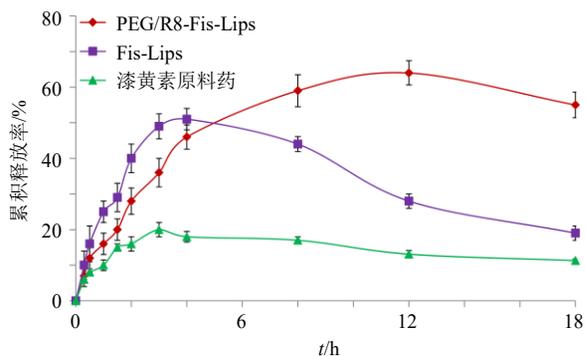


图 10 漆黄素原料药、Fis-Lips、PEG/R8-Fis-Lips 在模拟消化液中释放曲线的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Drug release profiles comparison of fisetin bulk drug, Fis-Lips and PEG/R8-Fis-Lips in simulated digestive fluids ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 9 PEG/R8-Fis-Lips 药物释放模型和相关系数

Table 9 PEG/R8-Fis-Lips drug release modeling and correlation coefficients

模型	拟合方程	r
零级释药	$M_t/M_\infty = 0.0287t + 0.2182$	0.7681
一级释药	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.0468t - 0.2747$	0.7864
Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.1529t^{1/2} + 0.0687$	0.9135
Weibull	$\ln \ln[1/(1 - M_t/M_\infty)] = 0.5860 \ln t - 1.5115$	0.9284

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 .

2.13 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉贮存稳定性研究

2.13.1 贮存稳定性考察 取 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉密封置于 4 °C 冰箱中，分别于 0、1、2、3、6 个月取样，加蒸馏水复溶冻干品，测定包封率和渗漏率^[12]，结果见表 10。Fis-Lips 冻干粉 6 个月后包封率低于 80%，渗漏率大于 4%，表明 Fis-Lips 冻干粉储存稳定性不高。PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉 6 个月后包封率大于 80%，渗漏率仍小于 1%，可见 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉储存稳定性高于 Fis-Lips 冻干粉，可能是由于 PEG/R8-Fis-Lips 表面双修饰基团提供了较大的空间位阻作用，阻止脂质体之间的聚集、融合等^[12,18]，提高了其稳定性。

渗漏率 = (新制备样品包封率 - 实验过程中样品包封率) / 新制备样品包封率

表 10 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉贮存稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Stability of Fis-Lips and PEG/R8-Fis-Lips lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/月	Fis-Lips 冻干粉		PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉	
	包封率/%	渗漏率/%	包封率/%	渗漏率/%
0	82.11 ± 1.01	—	82.46 ± 0.91	—
1	82.37 ± 0.95	0.49 ± 0.08	82.23 ± 1.22	0.41 ± 0.10
2	80.40 ± 1.37	1.35 ± 0.11	82.41 ± 1.16	0.72 ± 0.14
3	79.14 ± 0.93	2.56 ± 0.21	82.07 ± 0.95	0.83 ± 0.16
6	77.50 ± 1.07	4.42 ± 0.26	81.19 ± 1.10	0.94 ± 0.13

2.13.2 磷脂氧化指标的测定 取 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉，加入乙醇溶解，使磷脂最终质量浓度为 0.5 mg/mL，于紫外可见分光光度仪上分别测定 215 nm 和 233 nm 处吸光度 (A) 值，各样品平行 3 次，计算氧化指数。新制备 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉磷脂氧化指标分别为 0.006 ± 0.002 和 0.008 ± 0.002 ，两者无显著性差异 ($P > 0.05$)。放置 6 个月后测得 Fis-Lips 冻干粉和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉磷脂氧化指标分别为 0.261 ± 0.023 和 0.094 ± 0.017 ，两者具有极显著性差异 ($P < 0.01$)，说明 PEG/R8-Fis-Lips 贮存稳定性高于 Fis-Lips。

氧化指数 = A_{233}/A_{215}

2.14 口服药动力学研究

2.14.1 试验方案 取漆黄素原料药加入 0.5% CMC-Na 溶液配制 ig 液（漆黄素质量浓度为 10 mg/mL），取 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 冻干粉 ig 样品同法配制。取 SD 大鼠 18 只，随机分成 3 组，

每组雌雄大鼠各半,按 150 mg/kg (以漆黄素含量计) 进行 ig。漆黄素组于 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8 h 眼眶后静脉丛取血约 150 μ L,置于肝素化离心管中。根据前期预实验检测情况, Fis-Lips 组增加 10 h 取血点, PEG/R8-Fis-Lips 组增加 10、12 h 取血点。血浆样品均 3 500 r/min 离心 (离心半径为 10 cm) 2 min,取上层含药血浆,密封后置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

2.14.2 血浆样品的处理 精密称取特非那定对照品适量,使用甲醇溶解并稀释成 0.4 μ g/mL,作为测定血浆中漆黄素质量浓度的内标溶液。精密取 50 μ L 特非那定内标溶液和 50 μ L 血浆样品,涡旋 3 min 使之混匀,加入 1.0 mL 乙腈再次涡旋 3 min,即得混悬液。8 000 r/min 离心 (离心半径为 10 cm) 10 min,使蛋白等杂质沉淀于底部,取上清液置于氮吹仪中吹干,加入 50 μ L 乙腈涡旋 3 min,8 000 r/min 离心 10 min,即得含 0.4 μ g/mL 特非那定的血浆样品溶液^[6]。

2.14.3 色谱及质谱条件 色谱柱为 Waters Acquity BEH C₁₈ 柱 (50 mm \times 2.1 mm, 1.9 μ m); 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液 (40:60); 体积流量为 0.25 mL/min; 柱温为 30 $^{\circ}$ C。电喷雾 (ESI⁺) 检测,气帘气为 206.843 kPa (30 psi),离子源温度为 400 $^{\circ}$ C,电压为 5 500 V,检测离子对分别为 m/z 472.0 \rightarrow 436.2 (特非那定) 和 m/z 286.9 \rightarrow 137.0 (漆黄素)^[6]。

2.14.4 线性关系考察 取健康 SD 大鼠 1 只,注射 3%戊巴比妥钠溶液麻醉后立即心脏取血,置于肝素化离心管中 3 500 r/min 离心 (离心半径为 10 cm) 2 min,淡黄色分层即为空白血浆。空白血浆适量,将漆黄素配制成质量浓度分别为 800、400、200、100、20、5 ng/mL 系列血浆对照品溶液,各质量浓度分别取 50 μ L,按“2.14.2”项下方法处理,按“2.14.3”项下色谱及质谱条件测定漆黄素与特非那定峰面积,计算二者峰面积比值 (Y),与漆黄素质量浓度 (X) 进行线性回归,得漆黄素血浆对照品标准曲线的线性回归方程 $Y=0.0034X-0.1734$, $r=0.9980$,结果表明漆黄素在 5~800 ng/mL 呈良好的线性关系。

2.14.5 专属性考察 取空白血浆、漆黄素血浆对照品溶液 (特非那定质量浓度为 0.4 μ g/mL) 和血浆样品溶液 (特非那定质量浓度为 0.4 μ g/mL),按“2.14.3”项下色谱及质谱条件进行测定,结果见图 11,可见,血浆中其他物质对漆黄素和特非那定的

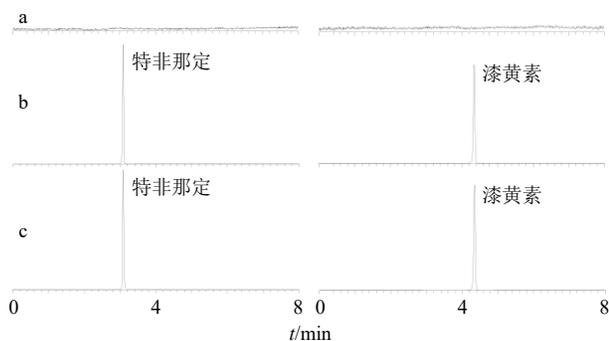


图 11 空白血浆 (a)、血浆样品 (含特非那定, b)、血浆对照品 (含特非那定, c) 的 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 11 UPLC-MS/MS chromatograms of blank plasma (a), plasma sample (including terfenadine, b) and plasma reference (including terfenadine, c)

测定无干扰,结果表明该实验专属性较高。

2.14.6 精密度考察 取漆黄素质量浓度分别为 5、200、800 ng/mL 血浆对照品溶液,1 d 内按“2.14.3”项下色谱及质谱条件连续测定 6 次,计算得漆黄素与特非那定峰面积比值的 RSD 分别为 4.04%、2.94%、5.17%,表明该仪器日内精密度良好。采用相同的漆黄素血浆对照品溶液,每天按“2.14.3”项下色谱及质谱条件测定 1 次,连续测定 6 d,计算得漆黄素与特非那定峰面积比值的 RSD 分别为 5.02%、3.45%、2.97%,表明该仪器日间精密度良好。

2.14.7 稳定性考察 将血浆样品溶液置于温度为 25 $^{\circ}$ C 温控进样盘中,于放置 0、3、6、9、12、24 h 分别按“2.14.3”项下色谱及质谱条件进样测定,计算得漆黄素与特非那定峰面积比值的 RSD 为 7.11%,表明血浆样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.14.8 重复性考察 取 Fis-Lips ig 给药 2 h 的血浆样品,按“2.14.2”项下方法操作,制备 6 份血浆样品溶液 (特非那定质量浓度为 0.4 μ g/mL),按“2.14.3”项下色谱及质谱条件进样测定,计算得漆黄素质量浓度的 RSD 为 4.16%,表明该实验重复性良好。

2.14.9 提取回收率和基质效应考察 取空白血浆,配制漆黄素质量浓度分别为 5、200、800 ng/mL 血浆对照品溶液,且各质量浓度均含 0.4 μ g/mL 的特非那定,按“2.14.2”项下方法操作制备血浆样品溶液,按“2.14.3”项下色谱及质谱条件进样测定并分别记录峰面积 (A_1); 空白血浆按“2.14.2”项下方法处理,加入质量浓度分别为 5、200、800 ng/mL 漆黄素对照品溶液,均含 0.4 μ g/mL 的特非那定,按“2.14.3”项下色谱及质谱条件进样测定并分别记

录峰面积 (A_2), 计算提取回收率。结果显示, 漆黄素和特非那定的平均提取回收率分别为 94.56% 和 96.27%, RSD 分别为 5.44% 和 6.02%, 表明提取回收率较高。采用甲醇配制 5、100、600 ng/mL 漆黄素对照品溶液, 且各质量浓度均含 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 的特非那定, 分别记录峰面积 (A_3), 计算基质效应。结果显示, 漆黄素和特非那定基质效应分别为 93.99% 和 100.73%, RSD 分别为 7.19% 和 6.69%, 表明基质效应小。

$$\text{提取回收率} = A_1/A_2$$

$$\text{基质效应} = A_2/A_3$$

2.14.10 血浆样品测定 取各待测血浆样品, 按照“2.14.2”项下方法处理, 按“2.14.3”项下色谱及质谱条件测定, 根据回归方程计算各待测血浆样品中漆黄素的质量浓度。

2.14.11 药动学行为比较 采用 DAS 2.0 软件非房室模型对漆黄素原料药、Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 的药动学数据进行处理, 药-时曲线见图 12, 结果见表 11。

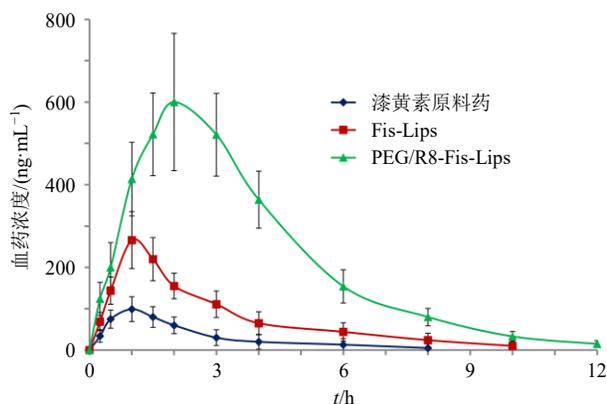


图 12 漆黄素原料药、Fis-Lips、PEG/R8-Fis-Lips 的药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 12 Plasma concentration-time profiles of fisetin bulk drug, Fis-Lips and PEG/R8-Fis-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

采用 AIC 法 (Akaike's information criterion) 判定漆黄素原料药、Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 药动学特征均为二室模型。与漆黄素原料药相比, Fis-Lips 的达峰浓度 (C_{\max})、药-时曲线下面积 ($AUC_{0\sim t}$ 、 $AUC_{0\sim\infty}$) 均显著性增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其中

表 11 漆黄素原料药、Fis-Lips、PEG/R8-Fis-Lips 的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 11 Pharmacokinetic parameters of fisetin bulk drug, Fis-Lips and PEG/R8-Fis-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	漆黄素原料药	Fis-Lips	PEG/R8-Fis-Lips
t_{\max}	h	0.96 \pm 0.25	1.06 \pm 0.28	2.14 \pm 0.42 [#]
$t_{1/2}$	h	2.89 \pm 0.37	3.17 \pm 0.46	5.04 \pm 0.63 ^{###}
C_{\max}	ng·mL ⁻¹	102.38 \pm 26.91	266.54 \pm 74.67 [*]	604.05 \pm 166.73 ^{**###}
$AUC_{0\sim t}$	ng·h·mL ⁻¹	318.56 \pm 57.00	798.85 \pm 166.96 ^{**}	2 455.16 \pm 617.19 ^{**###}
$AUC_{0\sim\infty}$	ng·h·mL ⁻¹	327.43 \pm 61.62	824.31 \pm 178.04 ^{**}	2 521.90 \pm 642.37 ^{**###}

与漆黄素原料药组相比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 Fis-Lips 相比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs fisetin; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ vs Fis-Lips.

$AUC_{0\sim t}$ 增加至 2.51 倍, 但 Fis-Lips 的达峰时间 (t_{\max}) 和半衰期 ($t_{1/2}$) 无显著性变化 ($P > 0.05$)。

与漆黄素原料药相比, PEG/R8-Fis-Lips 的 C_{\max} 增加至 (604.05 \pm 166.73) ng/mL ($P < 0.01$), $t_{1/2}$ 延长至 (5.04 \pm 0.63) h ($P < 0.01$), $AUC_{0\sim t}$ 增加至 7.71 倍 ($P < 0.01$)。

与 Fis-Lips 相比, PEG/R8-Fis-Lips 药动学参数仍均有显著性变化 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明 PEG 和 R8 双修饰的 PEG/R8-Fis-Lips 对漆黄素药动学行为的影响更大, 促吸收作用更显著。

2.15 急性肝损伤保护作用比较

2.15.1 样品配制 采用生理盐水配制 40 mg/mL 的对乙酰氨基酚注射液。漆黄素原料药、N-乙酰半胱氨酸、Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 给药组均采用

0.5% CMC-Na 溶液配制 ig 液。

2.15.2 分组及给药 设置阳性药组 (N-乙酰半胱氨酸, 200 mg/kg)、漆黄素原料药组 (150 mg/kg)、Fis-Lips 组 (150 mg/kg)、PEG/R8-Fis-Lips 低剂量组 (50 mg/kg)、PEG/R8-Fis-Lips 中剂量组 (100 mg/kg) 和 PEG/R8-Fis-Lips 高剂量组 (150 mg/kg), 固定每天 8:00 点对各组进行 ig 给药, 连续 7 d, 最后一次给药前 12 h 禁食。另设置对照组 (ig 生理盐水) 和模型组 (ig 生理盐水), 各组小鼠均 8 只。最后一次给药 2 h 后, 对照组 ip 生理盐水, 其余各组均按 400 mg/kg ip 乙酰氨基酚溶液进行造模。6 h 后采用异氟烷对各组小鼠进行麻醉, 摘除眼球取血, 收集血液样品。记录各只小鼠体质量, 脱颈处死小鼠后迅速取出肝脏和脾脏, 并记录质量。一部分肝

脏组织浸泡于 4%多聚甲醛，石蜡包埋，制备切片，脱水，二甲苯透明处理，苏木素-伊红 (HE) 染色，中性树胶封固后观察各个样本肝组织病理变化。

2.15.3 肝脏系数和脾脏系数的计算及结果 用生理盐水清洗肝脏和脾脏，置于滤纸上吸干表面水分，计算肝脏系数和脾脏系数，并进行统计分析，结果见表 12。与对照组相比，模型组肝脏系数和脾脏系数均极显著性增加 ($P < 0.01$)，说明模型组肝脏和脾脏都受到损伤，造模成功。与模型组相比，阳性药组、漆黄素原料药组 (150 mg/kg)、Fis-Lips 组 (150 mg/kg)、PEG/R8-Fis-Lips 中剂量组 (100

mg/kg) 和 PEG/R8-Fis-Lips 高剂量组 (150 mg/kg) 的肝脏系数和脾脏系数均有显著性或极显著性下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)，但 PEG/R8-Fis-Lips 低剂量组 (50 mg/kg) 无显著性差异 ($P > 0.05$)。与漆黄素原料药组 (150 mg/kg) 相比，Fis-Lips 组 (150 mg/kg) 的肝脏系数和脾脏系数均有显著性下降 ($P < 0.05$)，而 PEG/R8-Fis-Lips 高剂量组 (150 mg/kg) 有极显著性下降 ($P < 0.01$)，表明 PEG/R8-Fis-Lips 肝损伤保护效果比 Fis-Lips 更具优势，可能与 PEG/R8-Fis-Lips 具有更高生物利用度有关^[3]。

$$\text{脏器系数} = \frac{\text{脏器质量}}{\text{体质量}}$$

表 12 各组小鼠肝脏系数、脾脏系数、ALT 和 AST 结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 12 Liver index, spleen index, ALT and AST of each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝脏系数	脾脏系数	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)
对照	—	4.45 ± 0.40	0.33 ± 0.04	11.16 ± 2.01	9.54 ± 1.84
模型	—	7.12 ± 0.98**	0.53 ± 0.07**	814.82 ± 56.18**	759.83 ± 74.05**
阳性药	—	4.73 ± 0.81##	0.35 ± 0.06##	22.06 ± 2.95##	25.44 ± 2.36##
漆黄素原料药	150	6.47 ± 0.89#	0.48 ± 0.09#	554.13 ± 63.54##	486.57 ± 55.02##
Fis-Lip	150	5.81 ± 0.57###	0.43 ± 0.06###	349.68 ± 42.68###	364.98 ± 39.87###
PEG/R8-Fis-Lips	50	6.94 ± 0.89	0.54 ± 0.09	598.07 ± 55.87##	521.61 ± 46.54##
	100	5.85 ± 0.77###	0.40 ± 0.05###	303.45 ± 40.36###	380.09 ± 32.10###
	150	4.72 ± 0.71###	0.36 ± 0.04###	48.91 ± 3.15###	44.10 ± 2.77###

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与漆黄素原料药组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs fisetin group.

2.15.4 谷丙氨酸转氨酶 (glutalanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 的测定与结果 取血液样品置于离心机中，3 500 r/min 离心 (离心半径为 6.0 cm) 10 min，用移液枪取出淡黄色的上清液，于全自动生化分析仪检测上检测 ALT 和 AST。正常情况下血液中 ALT 和 AST 含量很低，当肝脏受到损伤导致肝细胞坏死时，细胞膜透性增加，造成 ALT 和 AST 进入血液循环，这是急性肝损伤特征之一^[3]。

测定结果见表 12，与对照组相比，模型组 ALT 和 AST 均极显著性增加 ($P < 0.01$)，说明造模成功。与模型组相比，阳性组、漆黄素原料药组 (150 mg/kg)、Fis-Lips 组 (150 mg/kg)、PEG/R8-Fis-Lips 低剂量组 (50 mg/kg)、PEG/R8-Fis-Lips 中剂量组 (100 mg/kg) 和 PEG/R8-Fis-Lips 高剂量组 (150 mg/kg) 的 ALT 和 AST 均极显著性下降 ($P < 0.01$)。与漆黄素原料药组 (150 mg/kg) 相比，Fis-Lips 组 (150 mg/kg)、PEG/R8-Fis-Lips 中剂量组 (100 mg/kg) 和 PEG/R8-Fis-Lips 高剂量组 (150 mg/kg) 均有极显著性下降 ($P < 0.01$)，且 PEG/R8-Fis-Lips

高剂量组 (150 mg/kg) 的 ALT 和 AST 下降幅度比 Fis-Lips 组 (150 mg/kg) 更大，因而肝损伤保护效果更强。

2.15.5 各组小鼠肝脏病理切片观察结果 结果见图 13。对照组小鼠肝细胞排列整齐，轮廓清晰，肝小叶清晰，无炎症细胞浸润；模型组小鼠肝组织病理可见大量炎症细胞浸润 (箭头所示)，细胞紊紊乱，表明肝组织受到损伤；阳性药组肝组织病理结果可见肝细胞排列较规则，趋向于对照组小鼠；漆黄素原料药组 (150 mg/kg) 可改善肝组织病变，虽存在水肿现象及一定数量的变形细胞，但未见炎症细胞浸润，表明漆黄素可改善肝损伤；Fis-Lips 组 (150 mg/kg) 明显改善了肝损伤，但仍存在一定数量的变形细胞；PEG/R8-Fis-Lips 低剂量组 (50 mg/kg)、PEG/R8-Fis-Lips 中剂量组 (100 mg/kg) 和 PEG/R8-Fis-Lips 高剂量组 (150 mg/kg) 病理切片结果可见，均改善了肝组织病变，随着 PEG/R8-Fis-Lips 剂量的增加肝损伤改善效果愈佳。PEG/R8-Fis-Lips 高剂量组 (150 mg/kg) 无变形细胞，药效优于 Fis-Lips 组 (150 mg/kg)。

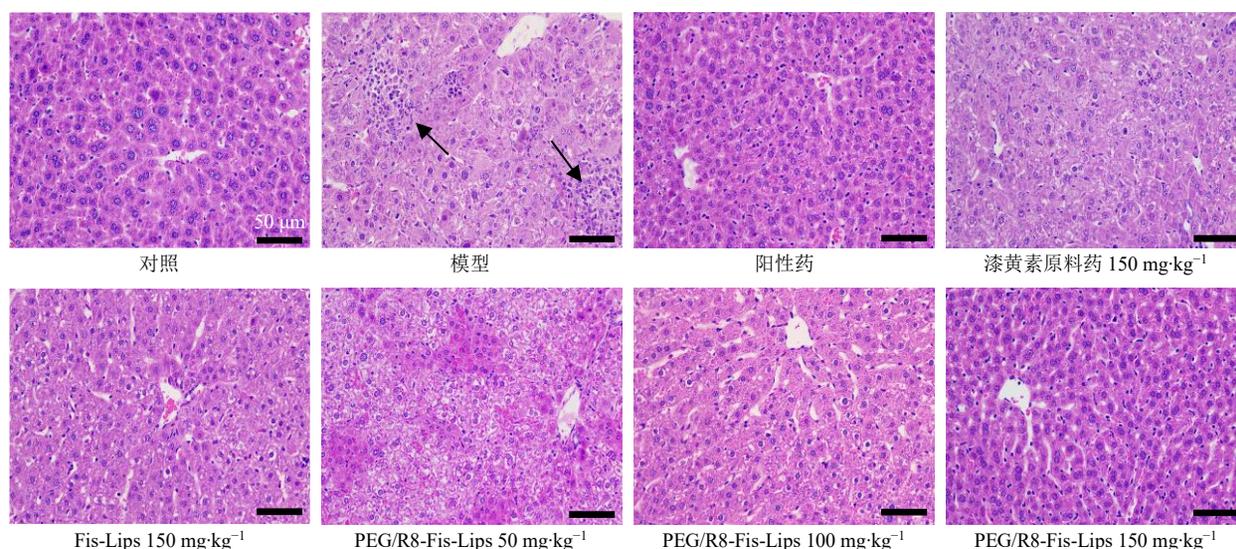


图 13 各组小鼠肝脏病理切片

Fig. 13 Hepatic pathologic sections of various groups of rats

3 讨论

采用定量核磁共振法对 DSPE-mPEG₂₀₀₀-Mal 含量进行测定^[19], 进而计算出 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 纯度。透析法除去 Cys-R8 后, 剩余产物为 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8、DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal、水分等混合物。由于 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 结构式上马来酰亚胺烯氢专属性高, 通过加入内标物质(苯二甲酸二甲酯)来测定混合物中 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal 含量。结果显示, δ 6.26 处未检测到马来酰亚胺烯氢, 推测混合物中基本不含 DSPE-PEG₂₀₀₀-Mal。另测得含水量为 2.62%, 因此, DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 质量分数约为 97.38%。

前期分别采用薄膜超声法和后插入法制备了 PEG/R8-Fis-Lips, 结果发现薄膜超声法制得的 PEG/R8-Fis-Lips 包封率远低于后插入法。这可能是因为 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 上的 R8 基团携带正电荷, 对脂质体的双分子层稳定性干扰较大^[15], 导致药物容易泄露。后插入法包封率较高, 可能是因为 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 结构上的 DSPE 基团与磷脂的亲脂性基团结构极为相似^[20], DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 可以缓慢插入脂质体囊材磷脂的分子间隙^[21], 降低了 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 上的正电荷 R8 基团在制备过程中对脂质体的双分子层稳定性的影响。

考虑到纳米制剂的包封率对释药行为、生物利用度等有较大影响, 为在相同条件下比较 Fis-Lips 和 PEG/R8-Fis-Lips 两者之间的优劣, 故通过增加 Fis-Lips 脂质总量使其包封率与 PEG/R8-Fis-Lips 接近。PEG/R8-Fis-Lips 平均粒径和 PDI 值均大于 Fis-

Lips, 可能是由于 DSPE-mPEG₂₀₀₀-R8 结构上的 PEG 长链和 R8 基团包覆在脂质体表面形成修饰层^[12,18], 因而使 PEG/R8-Fis-Lips 平均粒径增大, 且粒径均一度下降。PEG/R8-Fis-Lips 的 ζ 电位绝对值下降, 这与 PEG/R8-Fis-Lips 表层正电荷 R8 基团中和了脂质体的负电荷有关^[22]; 另外 PEG 长链也对脂质体表面电荷有一定的屏蔽作用^[20], 因而导致 PEG/R8-Fis-Lips 的 ζ 电位绝对值较低。

模拟消化液中稳定性考察结果显示, 漆黄素在消化道中降解较为严重, 这可能是漆黄素口服生物利用度极低的原因之一。Fis-Lips 和 PEG-Che-Lip 均有助于提高漆黄素在消化道中的稳定性, 主要与脂质体保护作用有关。由于表面修饰后的 PEG/R8-Fis-Lips 具有更高的稳定性, 因而使 PEG/R8-Fis-Lips 在模拟胃液和肠液中的保留率均有极显著性增加 ($P < 0.01$)。模拟消化液释药结果显示, Fis-Lips 在一定程度上增加了药物累积释放率, 但由于普通脂质体结构稳定性较差, 影响了其对药物保护作用, 导致 4 h 后累积释放率逐渐下降。PEG/R8-Fis-Lips 累积释放率远高于漆黄素原料药和 Fis-Lips, 主要与 PEG/R8-Fis-Lips 结构稳定性更高有关^[12], 降低了 pH 值和消化酶的破坏几率。但 PEG/R8-Fis-Lips 在后期累积释放率也出现下降情况, 可能是由于 PEG/R8-Fis-Lips 在消化液中一定时间后脂质体结构开始被破坏, 对药物保护作用能力下降, 同时释放出去的药物也被逐渐降解, 因而使其累积释放率出现下降情况。

与漆黄素原料药相比, Fis-Lips 的 AUC_{0~t} 增加

至 2.51 倍, 表明 Fis-Lips 促进了漆黄素口服吸收, 但提高幅度不大。PEG/R8-Fis-Lips 的 $t_{1/2}$ 发生极显著性延后 ($P < 0.01$), 一方面 PEG/R8-Fis-Lips 具有缓释作用, 从而影响了 $t_{1/2}$; 另一方面, PEG/R8-Fis-Lips 可降低漆黄素降解几率, 使后期有更多药物被吸收进入血液循环, 因而使 $t_{1/2}$ 延长; PEG/R8-Fis-Lips 结构稳定性较高, 可能以整体形式吸收进入血液循环, PEG 修饰赋予了脂质体长循环作用^[23], 因而也会对 PEG/R8-Fis-Lips 的 $t_{1/2}$ 产生影响。PEG/R8-Fis-Lips 的 C_{max} 极显著性增大, 可能与 PEG/R8-Fis-Lips 表面修饰的 R8 基团有关, R8 作为一种穿膜肽促进了药物快速透过胃肠道黏膜^[17-18], 减少了 PEG/R8-Fis-Lips 在消化道滞留时间, 降低了药物降解几率, 进而使 C_{max} 增加。PEG/R8-Fis-Lips 促吸收作用更大, 可能是由于 PEG/R8-Fis-Lips 增加了漆黄素在消化道的稳定性及释放率等^[24-25], 有利于增加药物吸收量; PEG/R8-Fis-Lips 表面的双修饰作用降低了各种消化酶对漆黄素的降解几率, 增加了漆黄素吸收量; 穿膜肽 R8 有助于减少 PEG/R8-Fis-Lips 在消化道中滞留时间^[15-16], 降低了其被消化酶破坏几率^[21]; 且穿膜肽 R8 具有降低药物外排作用^[15], 也有利于增加吸收量。PEG/R8-Fis-Lips 相对生物利用度的显著增加, 也为增强漆黄素改善急性肝损伤作用奠定了基础。

综上, 本研究完成了 PEG/R8-Fis-Lips 处方工艺研究, 考察发现 PEG/R8-Fis-Lips 可增加漆黄素在模拟消化液中的稳定性及累积释放率, 极大地促进了漆黄素口服吸收, 促吸收作用和改善急性肝损伤作用远大于无表面修饰的 Fis-Lips。本研究评价了 PEG/R8-Fis-Lips 理化性质、药动学、药效学等, 为评价其成药性提供了参考数据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhong R T, Farag M A, Chen M W, *et al.* Recent advances in the biosynthesis, structure-activity relationships, formulations, pharmacology, and clinical trials of fisetin [J]. *eFood*, 2022, 3(1/2): 3-26.
- [2] 杨慧. 负载漆黄素的纳米药物制备及其对小鼠急性肝损伤的保护作用研究 [D]. 青岛: 青岛科技大学, 2022.
- [3] Currais A, Prior M, Dargusch R, *et al.* Modulation of p25 and inflammatory pathways by fisetin maintains cognitive function in Alzheimer's disease transgenic mice [J]. *Aging Cell*, 2014, 13(2): 379-390.
- [4] 王蓓蓓. 漆黄素脂质体的制备及其体内外研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2022.
- [5] de Andrade E W V, Dupont S, Beney L, *et al.* Sonoprocessing enhances the stabilization of fisetin by encapsulation in *Saccharomyces cerevisiae* cells [J]. *Int Microbiol*, 2024, 27(2): 513-523.
- [6] Jo J H, Jo J J, Lee J M, *et al.* Identification of absolute conversion to geraldol from fisetin and pharmacokinetics in mouse [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1038: 95-100.
- [7] Kumar R, Kumar R, Khurana N, *et al.* Enhanced oral bioavailability and neuroprotective effect of fisetin through its SNEDDS against rotenone-induced Parkinson's disease rat model [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 144: 111590-11600.
- [8] Rosiak N, Tykarska E, Cielecka-Piontek J. Mechanochemical approach to obtaining a multicomponent fisetin delivery system improving its solubility and biological activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(7): 3648-3669.
- [9] 毛艳婷, 陶兴茹, 张胜男, 等. 漆黄素纳米混悬剂和冻干粉末的制备及体外评价 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42(4): 393-398.
- [10] 裴泽荣, 李凤云, 龚珈苒, 等. 中药抗肿瘤活性成分纳米递送系统的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(24): 7658-7667.
- [11] 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.
- [12] 刘万路. 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 [J]. *中草药*, 2023, 54(24): 8018-8030.
- [13] 黄思成, 柯瑾, 金文彬, 等. 脂质体修饰性材料应用研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(19): 2567-2572.
- [14] 曾诚, 郑瑞芳, 都研文, 等. TAT 和 PEG 双修饰田蓟苷复合磷脂脂质体的工艺优化及体外评价 [J]. *中草药*, 2018, 49(21): 5061-5069.
- [15] Li M M, Sun Y S, Ma C J, *et al.* Design and investigation of penetrating mechanism of octaarginine-modified alginate nanoparticles for improving intestinal insulin delivery [J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110(1): 268-279.
- [16] Wang Y, Hao Z W, Li B S, *et al.* A novel octa-arginine-modified injectable self-assembling peptide hydrogel for multidrug-resistant cancer therapy [J]. *Mater Des*, 2024, 237: 112564-112572.
- [17] Liu Y D, Long M Z, Wang Y Z, *et al.* Chitosan-alginate/R8 ternary polyelectrolyte complex as an oral protein-based vaccine candidate induce effective mucosal immune responses [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 275(Pt 2): 133671-133683.

- [18] 吕凤梅, 梁会敏, 随力, 等. 细胞穿膜肽修饰的缩宫素脂质体的制备及经鼻入脑的靶向性研究 [J]. 药学学报, 2022, 57(2): 500-506.
- [19] 王江洪, 宋亚男, 李莹, 等. 核磁共振波谱法对利托那韦片定性和定量分析 [J]. 化学研究与应用, 2024, 36(6): 1349-1355.
- [20] 刘炎清, 李瀚旻, 常明向, 等. 甘草次酸修饰的姜黄素阳离子脂质体肝靶向性和抗肝癌作用研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(4): 754-764.
- [21] 李漫漫. R8 修饰的海藻酸钠载胰岛素纳米口服递药及其穿膜机制的研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2019.
- [22] Liu J J, Tang W, Fu M, *et al.* Development of R₈ modified epirubicin-dihydroartemisinin liposomes for treatment of non-small-cell lung cancer [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1947-1960.
- [23] 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.
- [24] 杨璞, 李晓, 宋亚琼, 等. 二氢杨梅素混合胶束的制备、表征及药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(10): 2351-2360.
- [25] 李华榕, 郑品劲, 孔松芝, 等. N-乙酰-D-半乳糖胺修饰头孢克洛-壳聚糖纳米乳的制备及释药性能研究[J]. 化学与生物工程, 2023, 40(9): 51-55.

[责任编辑 郑礼胜]