

冰片修饰金丝桃苷脂质体的制备及经鼻给药药动学行为和脑靶向性考察

陈晨¹, 王彦阁¹, 宋亚男¹, 丁林¹, 赵新永¹, 决利利^{1*}, 崔锋^{2*}

1. 郑州工业应用技术学院, 河南 郑州 451100

2. 亳州高新科创医药产业技术研究院有限公司, 安徽 亳州 236839

摘要: 目的 制备冰片修饰的金丝桃苷脂质体 (borneol modified hyperoside liposomes, BM-Hyp-Lips), 并进行其脑靶向性考察。方法 单因素分别考察处方工艺对 BM-Hyp-Lips 包封率的影响, 选择磷脂与药物用量比、磷脂与胆固醇用量比、药物与冰片用量比作为主要影响因素, 采用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 BM-Hyp-Lips 处方。测定包封率、载药量、粒径和 ζ 电位, 透射电子显微镜观察 BM-Hyp-Lips 形貌, 透析袋法考察 BM-Hyp-Lips 释药行为。以金丝桃苷原料药 iv 为参考, 考察 BM-Hyp-Lips 经鼻给药的药动学行为与脑靶向性。结果 BM-Hyp-Lips 最佳处方为金丝桃苷用量 30 mg, 磷脂与药物用量比 11.3:1, 磷脂与胆固醇用量比 6.2:1, 药物与冰片用量比 8.7:1。BM-Hyp-Lips 的平均包封率、载药量、粒径和 ζ 电位分别为 $(86.54 \pm 0.96)\%$ 、 $(5.89 \pm 0.13)\%$ 、 (208.71 ± 7.83) nm 和 (-20.94 ± 1.26) mV。BM-Hyp-Lips 外貌呈圆形或椭圆形囊泡状, BM-Hyp-Lips 释药行为符合 Weibull 模型, 方程为 $\ln[-\ln[1/(1-M_t/M_\infty)]] = 0.5982 \ln t - 1.1588$ 。与金丝桃苷原料药经鼻给药相比, BM-Hyp-Lips 经鼻给药的相对生物利用度提高至 2.39 倍, 脑组织 C_{\max} 和 AUC_{0-t} 分别提高至 3.91 倍和 5.87 倍, 脑靶向指数和鼻-脑直接转运率分别提高至 313.26% 和 68.08%。结论 BM-Hyp-Lips 包封率较高, 缓释作用明显, 储存稳定性良好, 经鼻给药后显著提高了金丝桃苷的生物利用度, 并具有较强脑靶向性。

关键词: 金丝桃苷; 冰片; 脂质体; Box-Behnken 响应面法; 药动学; 脑靶向指数; 鼻-脑直接转运率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)06-1967-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.06.010

Preparation of borneol modified hyperoside liposomes and investigate of pharmacokinetic behavior and brain-targeting effects through transnasal administration

CHEN Chen¹, WANG Yange¹, SONG Yanan¹, DING Lin¹, ZHAO Xinyong¹, JUE Lili¹, CUI Feng²

1. Zhengzhou University of Industrial Technology, Zhengzhou 451100, China

2. Bozhou Hi-tech Innovation Pharmaceutical Industry Technology Research Institute Co., Ltd., Bozhou 236839, China

Abstract: Objective To prepare borneol modified hyperoside liposomes (BM-Hyp-Lips), and to investigate its brain-targeting characteristic *in vivo*. **Methods** The effects of formulations on the encapsulation rate of BM-Hyp-Lips were investigated by single factor. Phospholipids to drug ratio, phospholipids to cholesterol ratio, and borneol to drug ratio were used as main influencing factors, Box-Behnken design-response surface method (BBD-RSM) was employed to optimize prescriptions of BM-Hyp-Lips. Encapsulation rate, drug loading, particle size and ζ potential were determined. The appearance of BM-Hyp-Lips was observed by transmission electron microscopy (TEM), and the drug release behavior was investigated by dialysis bag method. Compared with hyperoside bulk drug injection, the pharmacokinetic behavior and brain-targeting characteristic of BM-Hyp-Lips by transnasal administration were studied. **Results** Optimal formulation of BM-Hyp-Lips was as follows: hyperoside dose was 30 mg, ratio of phospholipids to drug was 11.3:1, ratio of phospholipids to cholesterol was 6.2:1, and the ratio of drug to borneol was 8.7:1. Encapsulation efficiency, drug loading, particle size and ζ potential of BM-Hyp-Lips were $(86.54 \pm 0.96)\%$, $(5.89 \pm 0.13)\%$, (208.71 ± 7.83) nm and (-20.94 ± 1.26) mV. BM-Hyp-Lips

收稿日期: 2024-10-09

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目计划 (23B310010); 亳州市重点研发计划 (bzzc2021044); 河南省医学教育研究项目 (WJLX2023148); 教育部产学研合作协同育人项目 (231107272082803)

作者简介: 陈晨 (1993—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向为临床药理学与基础医学。Tel: (0371)62623434 E-mail: 1916423416@qq.com

*通信作者: 决利利 (1984—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为药物代谢动力学与药理学。Tel: (0371)62623434 E-mail: 1473749916@qq.com

崔锋 (1982—), 男, 学士, 副研究员, 研究方向为制药新技术。Tel: (0558)5180295 E-mail: CuiF1982@qq.com

are round or oval vesicles in appearance, release behavior of BM-Hyp-Lips accorded with Weibull model, and the equation was $\ln\ln[1/(1-M_t/M_\infty)] = 0.5982 \ln t - 1.1588$. Compared with hyperoside bulk drug, relative bioavailability of BM-Hyp-Lips was increased to 2.39 times, C_{\max} and AUC_{0-t} of brain tissue of BM-Hyp-Lips were increased to 3.91 and 5.87 times, respectively. What's more, brain-targeting index and nose-to-brain direct transport percentage of BM-Hyp-Lips were increased to 313.26% and 68.08%, respectively.

Conclusion BM-Hyp-Lips had high encapsulation rate, obvious sustained-release effect, good storage stability, could significantly improve the bioavailability of hypericin after transnasal administration, and had a good characteristic of brain-targeting.

Key words: hyperoside; borneol; liposomes; Box-Behnken response surface method; pharmacokinetic; brain-targeting index; nose-to-brain direct transport percentage

阿尔茨海默病、帕金森综合征、脑胶质瘤、脑卒中中等脑部疾病的发病率呈逐年增长趋势，给人类健康及生命安全带来严重威胁。脑部疾病的治疗一般有手术治疗和化疗2种，但脑部禁区多，手术难度极大；化疗药物存在不良反应比较大、临床应用风险高等缺陷，因而选用不良反应小、安全性高的中药活性成分来治疗脑部疾病成为新的研究开发方向。

金丝桃苷 (hyperoside, Hyp) 可从金丝桃科、五加科等植物中提取得到，属于黄酮醇类成分^[1]。药效学研究显示^[2-3]，金丝桃苷可用于治疗帕金森综合征、防治脑缺血再灌注损伤、抑制脑质瘤增殖等，在脑部疾病治疗领域具有较高的临床使用价值。为了提高脑部疾病的治愈率，一般采用鼻腔给药的方式，药物制剂经鼻黏膜给药时可通过鼻-脑通道透过血脑屏障，进而将药物靶向递送至脑组织^[4]。药物自身的溶解度和油水分配系数极大地影响药物的血脑屏障渗透能力^[4]，但金丝桃苷溶解度仅为 224.97 mg/L^[5]，在 pH 2.0~7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中油水分配系数在 0.03~0.52^[5]，属于生物药剂学分类系统 IV 类药物，导致金丝桃苷经生物膜渗透能力极差。另外，血脑屏障内皮细胞间紧密连接构成的“物理屏障”、外排转运蛋白构成的“运输屏障”、神经血管单元构成的“免疫屏障”等，增加了金丝桃苷进入脑组织的难度^[6]。因此，增加金丝桃苷血脑屏障渗透能力，是金丝桃苷治疗脑部疾病的关键。

纳米粒子可辅助药物跨越血脑屏障，是一种安全有效的治疗手段^[6]。脂质体 (liposomes, Lips) 是将药物包裹于磷脂的容纳空间而制得的一种纳米囊泡，对药物的溶解度、油水分配系数、经生物膜渗透能力等具有较大的改善作用^[7-8]，从而为增强药效奠定基础。但脂质体受限于血脑屏障的阻碍作用，穿透血脑屏障能力较弱。冰片是一种脂溶性的芳香开窍药，与磷脂、胆固醇等脂质载体相容性良

好，利于修饰至脂质体表面^[9]，进而可提高血脑屏障通透性、协助载药脂质体穿透血脑屏障并进入脑组织。叶晓莉等^[9]通过在葛根素脂质体上修饰冰片，促进了血脑屏障开放，进而延长药物在脑组织中的滞留时间，增强了脑靶向性。Yi 等^[10]以冰片为脑靶向增强剂制备了葛根素自微乳纳米制剂，极大提高了葛根素血脑屏障穿透力，从而提高了药物在脑部的蓄积量。本研究使用薄膜超声法制备冰片修饰的金丝桃苷脂质体 (borneol modified hyperoside liposomes, BM-Hyp-Lips)，并采用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM) 优化 BM-Hyp-Lips 处方。以金丝桃苷经鼻给药和 iv 为参考，采用经鼻给药脑靶向指数 (drug targeting index, DTE) 和鼻-脑直接转运率 (nose-to-brain direct transport percentage, DTP) 为考察指标，对 BM-Hyp-Lips 经鼻给药的脑组织靶向性进行考察，期望为金丝桃苷的脑靶向纳米制剂研发提供参考资料。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪、1260-iQ 型液质联用仪，美国安捷伦公司；H-2 型恒温水浴锅，上海浦东荣丰科学仪器有限公司；HB10 型旋转蒸发器，德国 IKA 仪器公司；CD-X15 型超声仪，深圳市亦为实业有限公司；Nano Series-2590 型激光粒度仪，英国马尔文有限公司；MSE125P-CE 型电子分析天平，瑞士赛多利斯仪器公司；JEM-2100LaB6 型透射电子显微镜 (TEM)，日本 JEOL 公司；SH-2-001 型磁力搅拌器，常州市亿能实验仪器厂；7890B 型气相色谱仪，美国安捷伦公司；400 R 型高速离心机，美国 Kendro 公司；04727-02 型匀浆器，北京中科科尔仪器有限公司；RCZ-8N 型智能溶出试验仪，杭州俊升科学器材有限公司；DS-1 型组织匀浆机，上海净信实业发展有限公司；Nikon Eclipse CI 型光学显微镜，日本尼康公司。

1.2 材料

金丝桃苷对照品,批号 nk1-00045230812,质量分数 98.0%,成都钠钶锂生物科技有限公司; 梔子苷对照品,批号 DSTDH004401,质量分数 99.2%,北京乐天美医药科技公司; 乌拉坦,批号 20221105,质量分数 98.5%,武汉华玖医药科技有限公司; 金丝桃苷原料药,批号 202206,质量分数 97.2%,湖北麦凯斯精化科技有限责任公司; 胆固醇,批号 201-0320-01,西安晋湘药用辅料有效公司; 冰片,批号 B2020039,质量分数 55.0%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 磷脂,批号 20220318,质量分数 92.0%,上海辅必成医药科技有限公司。

1.3 动物

清洁级 SD 大鼠,雌雄兼用,体质量(200±20)g,河南省动物实验中心提供,SCXK(豫)2020-0001,实验通过郑州工业应用技术学院动物伦理委员会审批,编号为 20240108012。

2 方法

2.1 BM-Hyp-Lips 混悬液的制备

取金丝桃苷原料药 30 mg,处方量的磷脂、胆固醇置于茄形瓶中,加入 10 mL 无水乙醇溶解,置于 40 °C 水浴中旋转蒸发除去有机溶剂(转速为 30 r/min),得均匀透明薄膜,置于真空干燥箱中 12 h。取处方量冰片溶于一定体积的 PBS(pH 7.4)中,加至上述附有脂质薄膜的茄形瓶中,通氮气条件下磁力搅拌一定时间使薄膜充分水化,依次过 0.80 μm 及 0.45 μm 微孔滤膜,即得 BM-Hyp-Lips。

除不加金丝桃苷原料药外,同法制备阴性样品。

2.2 BM-Hyp-Lips 混悬液中金丝桃苷含量测定

2.2.1 色谱条件 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液(25:75);体积流量为 1.0 mL/min;色谱柱为 Waters C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);进样量为 10 μL;检测波长为 360 nm;柱温为 30 °C。

2.2.2 BM-Hyp-Lips 供试品溶液的制备 取 BM-Hyp-Lips 混悬液 1 mL 至 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释定容,超声 5 min 后过 0.45 μm 微孔滤膜,取 2.5 mL 续滤液至 10 mL 量瓶中,流动相稀释定容,即得 BM-Hyp-Lips 供试品溶液。阴性样品溶液同法制备。

2.2.3 线性关系考察 精密称取金丝桃苷对照品 20.00 mg 至 100 mL 量瓶中,加入约 80 mL 甲醇超声溶解,继续加甲醇稀释定容,即得 200.00 μg/mL 金丝桃苷对照品储备液。精密吸取适量对照品储备液,甲醇稀释配制制成 10.00、5.00、1.00、0.50、0.10、

0.05 μg/mL 的系列对照品溶液,分别测定金丝桃苷各质量浓度(X)对应的峰面积(Y),以 Y 对 X 进行线性回归,得回归方程 $Y=22.3481X-1.4453$, $r=0.9999$,结果表明金丝桃苷在 0.05~10.00 μg/mL 呈良好的线性关系。

2.2.4 专属性考察 取阴性样品溶液、金丝桃苷对照品溶液(0.50 μg/mL)和 BM-Hyp-Lips 供试品溶液,分别进样测定,结果见图 1,可见金丝桃苷色谱峰无杂质干扰,专属性较高。

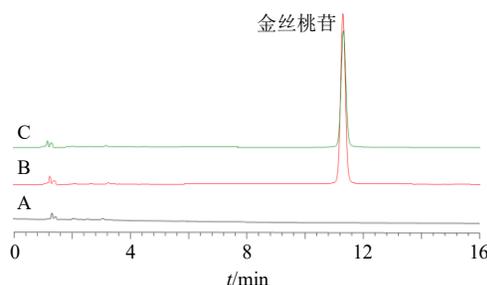


图 1 阴性样品(A)、金丝桃苷对照品(B)和 BM-Hyp-Lips 供试样品(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of negative sample (A), hyperoside reference substance (B) and BM-Hyp-Lips test sample solution (C)

2.2.5 精密度考察 取 10.00、1.00、0.05 μg/mL 的金丝桃苷对照品溶液,分别按“2.2.1”项下色谱条件进样测定 6 次,测得金丝桃苷峰面积的 RSD 分别为 0.22%、0.19%、0.43%,结果表明该仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取 BM-Hyp-Lips 供试品溶液,分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 进样测定,结果金丝桃苷峰面积的 RSD 为 0.66%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取 BM-Hyp-Lips 混悬液 6 份,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,测得金丝桃苷质量浓度的 RSD 为 1.30%,结果表明该实验重复性良好。

2.2.8 加样回收率考察 取 9 份 BM-Hyp-Lips 混悬液各 0.5 mL,置于 9 个 100 mL 量瓶中,分为低、中、高质量浓度组,每组各 3 份,分别按 BM-Hyp-Lips 混悬液中金丝桃苷含量的 50%、100%、150% 加入金丝桃苷对照品,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件测定金丝桃苷总含量,计算得金丝桃苷的平均加样回收率为 101.16%,RSD 为 1.15%,结果表明该实验加样回收率较高,可用于测定 BM-Hyp-Lips 混悬液中金丝桃苷含量。

2.3 包封率、载药量、粒径和ζ电位的测定方法

取葡聚糖凝胶 G-50 置于纯化水中溶胀后装柱，加 BM-Hyp-Lips 混悬液 0.2 mL，3 000 r/min 离心（离心半径 6.8 cm）1 min，分别加 0.2 mL 纯化水洗脱 4 次，合并洗脱液至 10 mL 量瓶中，加 5 mL 无水乙醇超声 10 min 后稀释定容，测定被包封金丝桃苷的量 ($M_{\text{包封}}$)。按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液后测定金丝桃苷总量 ($M_{\text{总量}}$)，取 BM-Hyp-Lips 混悬液直接冻干，称定质量 (W_0)，分别按公式 (1) (2) 计算 BM-Hyp-Lips 的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = M_{\text{包封}} / M_{\text{总量}} \quad (1)$$

$$\text{载药量} = M_{\text{包封}} / W_0 \quad (2)$$

取 4 mL 纯化水至离心管中，加入 BM-Hyp-Lips 混悬液 0.1 mL，混匀后置于激光粒度仪中测定 BM-Hyp-Lips 的多分散指数 (polydispersity index, PDI)、粒径和 ζ 电位，各个样品均测试 3 次，取平均值。

2.4 单因素考察 BM-Hyp-Lips 处方及工艺

2.4.1 磷脂与药物用量比考察 固定磷脂和胆固醇用量比 6 : 1、药物与冰片用量比 9 : 1、水相体积 30 mL、水化时间 45 min 的条件下，考察磷脂与药物用量比 (4 : 1~16 : 1) 对 BM-Hyp-Lips 包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 1。随着磷脂与药物用量比的增加，BM-Hyp-Lips 包封率和载药量均先增加后下降，这是由于磷脂是脂质体主要囊材，增加磷脂用量可为药物提供更多的容纳空间，有利于药物包载进入 BM-Hyp-Lips；但磷脂用量过大时导致脂质体膜稳定性下降^[15-16]，药物易泄露，从而影响了 BM-Hyp-Lips 的包封率和载药量。BM-Hyp-Lips 的粒径随着磷脂与药物用量比的增加而增大，这可能是因为磷脂用量越大，BM-Hyp-Lips 发生融合或粘连几率越大，导致粒径逐渐增大。因此磷脂与药物用量比对 BM-Hyp-Lips 影响较大，当磷脂与药物用量比为 10 : 1 时，BM-Hyp-Lips 的包封率大

表 1 磷脂与药物用量比对 BM-Hyp-Lips 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of phospholipids to drug dosage ratio on encapsulation efficiency, drug loading and particle size of BM-Hyp-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

磷脂与药物用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
4 : 1	42.44 ± 1.19	7.01 ± 0.22	167.42 ± 7.25
6 : 1	68.72 ± 0.98	8.04 ± 0.26	173.50 ± 7.92
10 : 1	81.58 ± 1.30	5.99 ± 0.15	195.17 ± 10.56
14 : 1	77.68 ± 1.21	4.29 ± 0.19	204.93 ± 9.74
16 : 1	75.70 ± 1.27	3.64 ± 0.13	218.04 ± 10.73

于 80%，后续以磷脂与药物用量比 10 : 1 为中心，对 6 : 1~14 : 1 区间继续进行优化。

2.4.2 磷脂与胆固醇用量比考察 固定磷脂与药物用量比 10 : 1、药物与冰片用量比 9 : 1、水相体积 30 mL、水化时间 45 min 的条件下，分别考察磷脂与胆固醇用量比 (2 : 1~10 : 1) 对 BM-Hyp-Lips 包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 2。随着磷脂与胆固醇用量比的增加，BM-Hyp-Lips 的包封率和载药量均先增加后下降趋势。仅由磷脂构成的脂质体膜的稳定性较差，引入胆固醇后可与磷脂的亲油基团发生作用，从而增强脂质体膜的韧性。当胆固醇比例较低时，BM-Hyp-Lips 稳定性差，药物易泄露^[8]；胆固醇比例较大时会与药物竞争磷脂双分子层的容纳空间^[17]，导致 BM-Hyp-Lips 的包封率和载药量下降。由于磷脂与胆固醇用量比为 6 : 1 时，BM-Hyp-Lips 包封率和载药量均相对较大，且平均粒径小于 200 nm，故以磷脂与胆固醇用量比 6 : 1 为中心，选择 4 : 1~8 : 1 区间继续进行优化。

表 2 磷脂与胆固醇用量比对 BM-Hyp-Lips 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of phospholipids to cholesterol dosage ratio on encapsulation efficiency, drug loading and particle size of BM-Hyp-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
2 : 1	60.87 ± 1.12	3.46 ± 0.12	240.17 ± 10.05
4 : 1	75.16 ± 0.94	5.17 ± 0.19	214.96 ± 9.64
6 : 1	82.24 ± 1.27	6.08 ± 0.22	192.47 ± 8.31
8 : 1	77.66 ± 1.18	5.79 ± 0.15	179.81 ± 7.20
10 : 1	73.15 ± 0.92	5.44 ± 0.18	171.41 ± 7.75

2.4.3 药物与冰片用量比考察 固定磷脂与药物用量比 10 : 1、磷脂和胆固醇用量比 6 : 1、水相体积 30 mL、水化时间 45 min 的条件下，分别考察药物与冰片用量比 (3 : 1~15 : 1) 对 BM-Hyp-Lips 包封率、载药量和粒径的影响，结果见表 3。BM-Hyp-Lips 的包封率和载药量随着药物与冰片用量比增加呈现先增加后下降趋势。脂质体中引入适量冰片时可以提高脂质体膜的致密性^[18]，在一定程度上可提高 BM-Hyp-Lips 的包封率；但冰片用量过大时可能会影响脂质体结构的稳定性^[18]，导致药物泄露及包封率下降。由于药物与冰片用量比为 9 : 1 时，BM-Hyp-Lips 包封率和载药量均相对较大，且平均粒径小于 200 nm，故以药物与冰片用量比 9 : 1 为中心，选择 6 : 1~12 : 1 继续进行优化。

2.4.4 水相体积考察 固定磷脂与药物用量比 10 : 1、

表3 药物与冰片用量比对 BM-Hyp-Lips 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of drug to borneol dosage ratio on encapsulation efficiency, drug loading and particle size of BM-Hyp-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物与冰片用量比	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
3 : 1	62.91 ± 1.17	4.14 ± 0.16	214.09 ± 8.65
6 : 1	74.34 ± 1.06	5.43 ± 0.19	205.75 ± 9.87
9 : 1	82.16 ± 1.23	6.03 ± 0.11	196.64 ± 8.89
12 : 1	79.82 ± 0.96	5.92 ± 0.15	190.21 ± 7.75
15 : 1	79.25 ± 1.30	5.99 ± 0.10	194.35 ± 9.92

磷脂和胆固醇用量比 6 : 1、药物与冰片用量比 9 : 1、水化时间 45 min 的条件下,考察水相体积 (20 ~ 40 mL) 对 BM-Hyp-Lips 包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 4。随着水相体积的增加,BM-Hyp-Lips 的包封率和载药量呈先增加后下降趋势,可能是水相体积较小时影响了 BM-Hyp-Lips 囊材的水化效果^[16],导致 BM-Hyp-Lips 载药能力下降,进而影响了其包封率和载药量;水相体积较大时,药物易进入水相。BM-Hyp-Lips 的粒径随着水相体积增加而下降,这可能是由于水相体积较大时降低了 BM-Hyp-Lips 之间的融合、粘连几率等。当水相体积为 30 mL 时,BM-Hyp-Lips 的包封率和载药量均较高,且粒径小于 200 nm,故确定 PBS (pH 7.4) 水相体积为 30 mL。

表4 水相体积对 BM-Hyp-Lips 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of water phase volume on encapsulation efficiency, drug loading and particle size of BM-Hyp-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水相体积/mL	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
20	71.79 ± 0.99	5.41 ± 0.18	221.23 ± 7.74
25	76.54 ± 1.27	5.64 ± 0.10	210.75 ± 8.62
30	82.74 ± 1.03	5.96 ± 0.15	195.26 ± 9.54
35	79.93 ± 1.18	5.67 ± 0.13	189.76 ± 10.92
40	77.09 ± 0.96	5.32 ± 0.26	184.46 ± 9.22

表6 BBD-RSM 试验设计与结果 ($n = 3$)

Table 6 Experiments design and results of Box-Behnken ($n = 3$)

序号	X_1	X_2	X_3	Y/%	序号	X_1	X_2	X_3	Y/%	序号	X_1	X_2	X_3	Y/%
1	10 : 1 (0)	6 : 1 (0)	9 : 1 (0)	83.92	7	10 : 1	6 : 1	9 : 1	82.79	13	6 : 1	6 : 1	6 : 1	72.40
2	14 : 1 (+1)	8 : 1 (+1)	9 : 1	80.47	8	10 : 1	6 : 1	9 : 1	83.42	14	10 : 1	6 : 1	9 : 1	84.83
3	10 : 1	6 : 1	9 : 1	84.52	9	14 : 1	6 : 1	6 : 1 (-1)	78.24	15	10 : 1	8 : 1	6 : 1	74.19
4	14 : 1	4 : 1 (-1)	9 : 1	73.13	10	6 : 1	8 : 1	9 : 1	71.66	16	10 : 1	4 : 1	12 : 1	72.22
5	14 : 1	6 : 1	12 : 1 (+1)	76.86	11	6 : 1	4 : 1	9 : 1	73.22	17	10 : 1	8 : 1	12 : 1	73.26
6	6 : 1 (-1)	6 : 1	12 : 1	71.47	12	10 : 1	4 : 1	6 : 1	76.94					

2.4.5 水化时间考察 固定磷脂与药物用量比 10 : 1、磷脂和胆固醇用量比 6 : 1、药物与冰片用量比 9 : 1、水相体积 30 mL 的条件下,分别考察水化时间 (25 ~ 55 min) 对 BM-Hyp-Lips 包封率、载药量和粒径的影响,结果见表 5。BM-Hyp-Lips 的包封率和载药量随着水化时间的增加呈先增大后下降趋势,可能是水化时间较短时磷脂的水化效果较差^[8],进而影响了 BM-Hyp-Lips 的载药效果;水化时间较长时可能影响磷脂及 BM-Hyp-Lips 的稳定性,导致药物泄漏。由于水化时间为 35 min 时,BM-Hyp-Lips 的包封率和载药量均较高,故确定水化时间为 35 min。

表5 水化时间对 BM-Hyp-Lips 包封率、载药量和粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of hydration time on encapsulation efficiency, drug loading and particle size of BM-Hyp-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水化时间/min	包封率/%	载药量/%	粒径/nm
25	75.49 ± 1.15	5.28 ± 0.18	206.58 ± 9.96
35	84.10 ± 1.26	6.09 ± 0.14	200.85 ± 7.99
45	82.15 ± 0.96	5.74 ± 0.19	198.77 ± 6.69
55	79.73 ± 1.14	5.51 ± 0.20	190.80 ± 10.17

2.5 BBD-RSM 优化 BM-Hyp-Lips 混悬液处方

2.5.1 BBD-RSM 实验设计与结果 选择磷脂与药物用量比 (X_1)、磷脂与胆固醇用量比 (X_2) 和药物与冰片用量比 (X_3) 为主要影响因素,采用 3 因素 3 水平试验对 BM-Hyp-Lips 处方进行进一步优化,各因素水平设置见表 6。由于包封率影响着制剂的安全性、有效性,是纳米制剂最重要的质量指标,故选择包封率作为 BM-Hyp-Lips 的优化指标。根据 BBD-RSM 试验设计分别制备不同处方的 BM-Hyp-Lips,测定包封率,结果见表 6。

2.5.2 模型的建立及分析 对因变量 X_1 、 X_2 、 X_3 和自变量 Y 进行拟合,得包封率 Y 的二次多元回归方程为 $Y = 83.90 + 2.49 X_1 + 0.51 X_2 - 0.99 X_3 + 0.22$

$X_1X_2 - 0.11 X_1X_3 + 0.94 X_2X_3 - 4.43 X_1^2 - 4.93 X_2^2 - 4.81 X_3^2$ 。方程 $R^2=0.970 8$, $R_{adj}^2=0.933 2$, R^2 和 R_{adj}^2 值均大于 0.93, 说明该回归方程可信度较高。模型的 P 值=0.000 1, 具有极显著性差异, 说明构建的包封率 Y 数学模型具有研究意义及指导价值; 失拟项 F 值=0.089 5 ($P>0.05$), 未知因素干扰可忽略, 说明构建的包封率 Y 数学模型可用于 BM-Hyp-Lips 处方研究。

方差分析见表 7, 包封率 Y 二次多元回归方程中 X_3 、 X_1X_2 具显著性差异 ($P<0.05$), X_1 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 均具有极显著性差异 ($P<0.01$)。

2.5.3 效应面法优化与最佳处方确定 采用 Design Expert V12.0 软件绘制两两因素对包封率的三维曲面图, 结果见图 2。随着任意两因素的增加, BM-Hyp-Lips 的包封率均呈现先增大后减小的趋势, 且三维曲面图的坡度变化较大, 对包封率影响较为明显, 说明通过采用 BBD-RSM 优化 BM-Hyp-Lips 处方是必要的。选取 BM-Hyp-Lips 包封率的望大值作为优化目标, 得 BM-Hyp-Lips 最佳处方: 金丝桃苷 30 mg、磷脂与药物用量比 11.3:1、磷脂与胆固醇用量比 6.2:1、药物与冰片用量比 8.7:1, 预测最大包封率为 87.71%。

表 7 包封率方差分析

Table 7 Analysis of variance of entrapment efficiency

误差来源	自由度	离均差平方和	均方	F 值	P 值	误差来源	自由度	离均差平方和	均方	F 值	P 值
模型	9	395.22	43.91	25.82	0.000 1	X_1^2	1	79.42	79.42	46.69	0.000 2
X_1	1	49.75	49.75	29.25	0.001 0	X_2^2	1	102.46	102.46	60.24	0.000 1
X_2	1	2.07	2.07	1.22	0.306 4	X_3^2	1	97.44	97.44	57.28	0.000 1
X_3	1	8.92	8.92	5.18	0.037 8	残差	10	11.91	1.70		
X_1X_2	1	19.80	19.80	11.61	0.011 3	失拟项	5	9.19	3.06	4.52	0.089 5
X_1X_3	1	0.05	0.05	0.03	0.867 9	纯误差	5	2.71	0.68		
X_2X_3	1	3.59	3.59	2.11	0.189 5	总差	19	407.13			

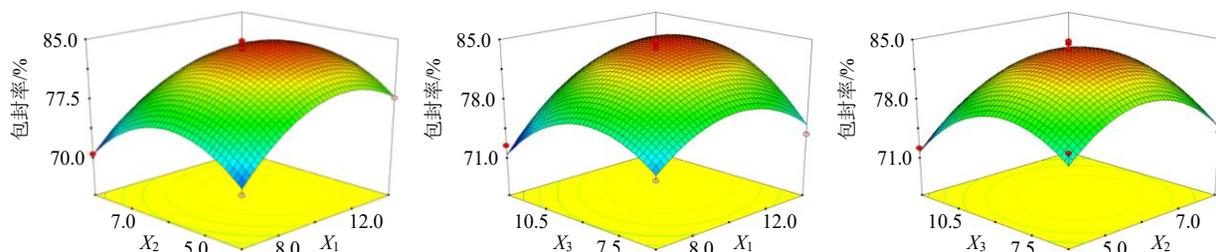


图 2 影响因素对包封率的响应面图

Fig. 2 Response surface picture of influence factors on encapsulation efficiency

2.5.4 BM-Hyp-Lips 最佳处方工艺验证及包封率相对偏差测定 按照“2.4.4”“2.4.5”“2.5.3”项下确定的最佳处方工艺平行制备 3 批 BM-Hyp-Lips, 测得其平均包封率为 (86.54±0.96)%。以预测包封率 (87.71%) 为参考, 计算得 BM-Hyp-Lips 实测包封率的相对偏差为-1.33%, 说明建立的数学模型具有较强的指导意义。

$$\text{相对偏差} = (\text{实测值} - \text{预测值}) / \text{预测值} \quad (3)$$

2.6 BM-Hyp-Lips 的载药量、粒径、 ζ 电位测定及微观形貌观察

2.6.1 BM-Hyp-Lips 的载药量、粒径、 ζ 电位测定 按“2.4.4”“2.4.5”“2.5.3”项下确定的最佳处方工艺平行制备 3 批 BM-Hyp-Lips, 按“2.3”项下测定方法, 测得 BM-Hyp-Lips 的平均载药量为 (5.89±

0.13)% , 平均粒径为 (208.71±7.83) nm, 平均 PDI 值为 0.145±0.019, 平均 ζ 电位为 (-20.94±1.26) mV。BM-Hyp-Lips 的粒径分布和 ζ 电位见图 3。

2.6.2 BM-Hyp-Lips 微观形貌观察 取 4 mL 纯化水至离心管中, 加入 BM-Hyp-Lips 混悬液 0.1 mL, 摇匀, 滴至铜网上, 加入 2% 磷钨酸钠染色, 晾干后采用 TEM 观察形貌。TEM 观察结果见图 4, BM-Hyp-Lips 微观形貌呈圆形或椭圆形的囊泡状。

2.7 BM-Hyp-Lips 中冰片修饰率的测定

2.7.1 GC 条件 色谱柱为 DB-1701P (30 m×0.32 mm×0.15 μ m) 柱; 检测器为火焰离子检测器; 检测器温度为 250 $^{\circ}$ C; 载气为氮气; 进样口温度为 200 $^{\circ}$ C; 柱温为 130 $^{\circ}$ C; 进样体积为 1 μ L。

2.7.2 线性关系考察 采用无水乙醇配制质量浓度

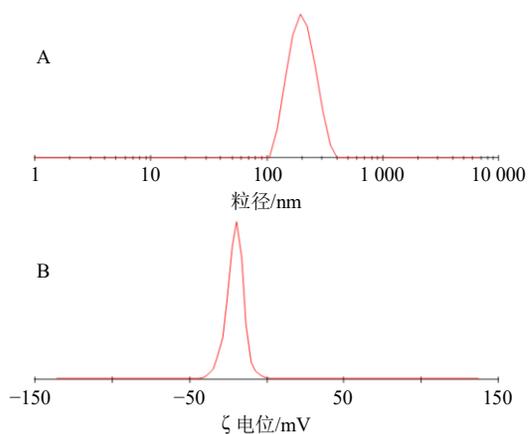


图3 BM-Hyp-Lips 粒径分布 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 3 Particle size distribution (A) and ζ potential (B) of BM-Hyp-Lips

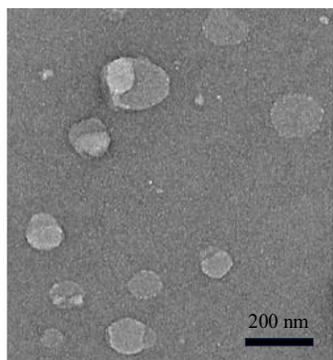


图4 BM-Hyp-Lips 的 TEM 图

Fig. 4 TEM of BM-Hyp-Lips

分别为 5 000、2 500、1 250、1 000、500、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列冰片对照品溶液，按“2.7.1”项下 GC 条件测定不同冰片质量浓度 (X) 对应的峰面积 (Y)，以 Y 对 X 进行线性回归后得回归方程 $Y=2.006 X-29.112$ ， $r=0.999 9$ ，结果表明冰片在 50~5 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

2.7.3 专属性考察 参考 BM-Hyp-Lips 最佳处方工艺，制备不含冰片的阴性样品。按“2.3”项下方法制备阴性样品溶液。取阴性样品溶液、冰片对照品溶液和 BM-Hyp-Lips 供试品溶液各 1 μL 进样测定。色谱图见图 5，乙醇溶剂峰未干扰冰片色谱峰的测定，表明该方法专属性高。

2.7.4 精密度考察 取 5 000、1 250、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 冰片对照品溶液，按“2.7.1”项下 GC 条件进样测定，计算得冰片峰面积的 RSD 分别为 0.40%、0.24%、0.89%，结果表明该仪器精密度良好。

2.7.5 稳定性考察 取 BM-Hyp-Lips 供试品溶液密封，分别于制备后 0、0.1、1.0、1.5、2.0、4.0 h 进样测定，计算得冰片峰面积的 RSD 为 1.44%，结

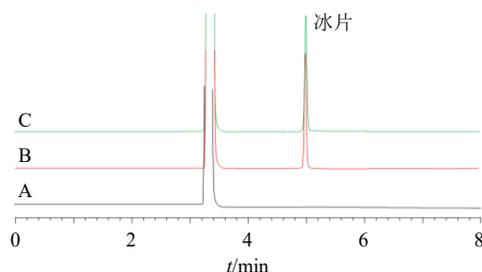


图5 阴性样品 (A)、冰片对照品 (B) 和 BM-Hyp-Lips 样品 (C) 的 GC 图

Fig. 5 GC of negative sample (A), borneol reference substance (B) and BM-Hyp-Lips sample (C)

果表明供试品溶液在 4.0 h 内稳定性良好。

2.7.6 重复性考察 取 BM-Hyp-Lips 混悬液 6 份，分别按照“2.3”项下方法制备 BM-Hyp-Lips 供试品溶液，按照“2.7.1”项下 GC 条件进样测定，计算得冰片质量分数的 RSD 为 1.36%，结果表明该实验重复性良好。

2.7.7 加样回收率考察 精密吸取 9 份 BM-Hyp-Lips 混悬液各 0.1 mL，按“2.3”项下方法操作得到 9 份洗脱液，分成低、中、高质量浓度 3 组，分别按冰片含量的 50%、100%、150% 加入冰片对照品溶液，并制备成供试品溶液后测定冰片总含量。结果显示，冰片的平均加样回收率为 98.89%，RSD 为 1.73%，结果表明该实验加样回收率较高。

2.7.8 BM-Hyp-Lips 中冰片修饰率的测定 取“2.3”项下无水乙醇破乳后的洗脱液，精密吸取 1 μL 按“2.7.1”项下 GC 条件测定冰片含量，根据 BM-Hyp-Lips 中磷脂和胆固醇囊材总量，并按公式 (4) 计算 BM-Hyp-Lips 的冰片修饰率。

$$\text{修饰率} = \text{冰片总量} / (\text{磷脂} + \text{胆固醇总量}) \quad (4)$$

2.7.9 BM-Hyp-Lips 中冰片修饰率的测定结果 按“2.4.4”“2.4.5”“2.5.3”项下确定的最佳处方工艺平行制备 3 批 BM-Hyp-Lips，按“2.7.8”项下方法操作，测得 BM-Hyp-Lips 的平均冰片修饰率为 $(0.82 \pm 0.04)\%$ 。根据实际冰片投药量，按公式 (4) 计算得 BM-Hyp-Lips 的理论值修饰率 0.88%，实际测得冰片修饰率略低于理论修饰率，分析原因可能是由于冰片具有一定的挥发性，在制备 BM-Hyp-Lips 的过程中损失了一定量的冰片所致。

2.8 BM-Hyp-Lips 体外释药行为及模型拟合

取金丝桃苷原料药分散于 pH 7.4 PBS 中，另取 BM-Hyp-Lips 混悬液置于透析袋 (截留相对分子质量 10 000) 中，密封。取体积为 900 mL 的 pH 7.4

PBS 置于溶出杯中，开启溶出仪，水浴温度为 37 °C，搅拌桨转速为 75 r/min，恒温后进行试验。分别于 0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12 h 取样 3 mL，同时补进 pH 7.4 PBS 3 mL。将样品 12 500 r/min 离心（离心半径 6.8 cm）10 min，测定金丝桃苷含量。BM-Hyp-Lips 体外释药行为结果见图 6，金丝桃苷原料药 12 h 累积释放率仅 40.17%，主要与金丝桃苷原料药溶解度差、疏水性强等因素有关^[4]。BM-Hyp-Lips 在 0~4 h 释药相对较快，4 h 后表现出明显的缓释特征，12 h 累积释放率为 81.85%，远高于金丝桃苷原料药累积释放率。

分别采用零级模型、一级模型、Higuchi 模型、Weibull 模型对 BM-Hyp-Lips 释药行为进行拟合，释药模型拟合结果见表 8，BM-Hyp-Lips 释药过程与 Weibull 模型拟合度最高，说明 BM-Hyp-Lips 释药过程包含快速释放期和缓慢释放期。

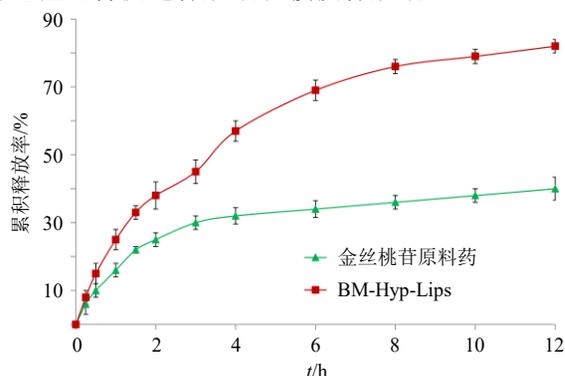


图 6 金丝桃苷原料药和 BM-Hyp-Lips 释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Drug release profiles of hyperoside bulk drug and BM-Hyp-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 8 BM-Hyp-Lips 释药模型拟合结果

Table 8 Drug release model fitting results of BM-Hyp-Lips

模型	拟合方程	R ²
零级释药	$M_t/M_\infty = 0.038 1 t + 0.259 9$	0.828 9
一级释药	$\ln(1 - M_t/M_\infty) = -0.084 7 t - 0.289 1$	0.895 9
Higuchi	$M_t/M_\infty = 0.193 5 t^{1/2} + 0.081 6$	0.939 8
Weibull	$\ln[-\ln[1/(1 - M_t/M_\infty)]] = 0.598 2 \ln t - 1.158 8$	0.984 7

2.9 BM-Hyp-Lips 稳定性考察

取新制备的 BM-Hyp-Lips，按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，并测定金丝桃苷总含量 (M_0)。将 BM-Hyp-Lips 充氮气后密封于西林瓶中，并置于 8 °C 冰箱中，分别于 1、2、3、6 个月取样，过 0.45 μm 微孔滤膜除去析出的药物，取续滤液按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，并测定放置

一定时间后金丝桃苷含量 (M_t)，按公式 (5) 计算 BM-Hyp-Lips 各个时间点的泄漏率，通过监控泄漏率来考察 BM-Hyp-Lips 的储存稳定性。

$$\text{泄漏率} = (M_0 - M_t) / M_0 \quad (5)$$

BM-Hyp-Lips 处方中的磷脂含不饱和类脂，可被氧化、分解生成丙二醛，丙二醛在酸性条件下可与硫代巴比妥酸反应生成红色络合物^[11]，该络合物在 532 nm 波长处有最大吸收，因而通过监控该波长下的吸光度 (A) 变化来考察 BM-Hyp-Lips 储存稳定性。BM-Hyp-Lips 稳定性考察结果见表 9，8 °C 冰箱中放置 6 个月后 BM-Hyp-Lips 泄漏率小于 1%，第 6 个月的 A 值与新制备 BM-Hyp-Lips 的 A 值相比，无明显变化 ($P > 0.05$)，结果表明 BM-Hyp-Lips 稳定性良好。

表 9 BM-Hyp-Lips 稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Stability results of BM-Hyp-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/个月	泄漏率/%	A 值
0	0.00 ± 0.00	0.162 ± 0.009
1	0.71 ± 0.09	0.161 ± 0.011
2	0.63 ± 0.17	0.157 ± 0.008
3	0.90 ± 0.13	0.168 ± 0.013
6	0.96 ± 0.11	0.173 ± 0.012

2.10 BM-Hyp-Lips 药动学行为及脑靶向性评价

2.10.1 色谱及质谱条件

(1) 色谱条件：色谱柱为 Poroshell C₁₈ 柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)；柱温为 40 °C；体积流量为 0.2 mL/min；流动相为 0.1% 甲酸水溶液-甲醇 (40 : 60)；进样体积为 2 μL。

(2) 质谱条件：电喷雾源为负电离模式^[12]，喷雾电压为 -4 500 V，碰撞能量为 -30 V，去簇电压为 -60 V，离子源温度为 450 °C，检测离子对分别为 m/z 463.0 → 300.2 (金丝桃苷) 和 m/z 387.0 → 225.1 (梔子苷)。

2.10.2 试验方案 将禁食过夜的 SD 大鼠随机分为金丝桃苷原料药经鼻给药组、BM-Hyp-Lips 经鼻给药组和金丝桃苷原料药 iv 组，每组大鼠均 54 只，雌雄各半，给药剂量均为 0.5 mg/kg (以金丝桃苷计)。乙醚麻醉待鼻腔给药大鼠，置于实验桌上呈仰卧位，双侧鼻腔进行给药，分别于给药 5、15、30 min 及 1、2、4、6、8、12 h ip 20% 乌拉坦 (注射量为 5 mL/kg) 麻醉后腹主动脉取血 0.5 mL，置于肝素浸润的离心管中，3 500 r/min 离心 5 min (离心半径 6.8 cm)，得血浆。同时将大鼠脱臼处死，取出脑

组织,使用生理盐水冲洗后保存。取待 iv 大鼠,固定后酒精棉球擦拭大鼠尾部,暴露尾静脉后 iv,分别于 5、15、30 min 及 1、2、4、6、8、12 h ip 20% 乌拉坦(注射量为 5 mL/kg)麻醉后同法取血浆和脑组织,待测。

2.10.3 血浆样品处理 精密称取栀子苷对照品 10.08 mg 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解得质量浓度为 1.008 mg/mL,作为内标溶液。精密吸取大鼠血浆 50 μ L 置于离心管中,加入 50 μ L 内标溶液和 1 mL 醋酸乙酯后涡旋 3 min,12 500 r/min 离心(离心半径 6.8 cm) 5 min,取上清液置于离心管中,37 $^{\circ}$ C 氮气吹干,加入 50 μ L 甲醇复溶,得血浆样品溶液。

2.10.4 脑组织样品处理 取脑组织置于离心管中,加入 5 mL 乙醇溶液,快速匀浆 5 min,12 500 r/min 离心(离心半径 6.8 cm) 5 min。精密量取上清液 50 μ L 置于离心管中,加入栀子苷内标溶液 50 μ L 和 1 mL 醋酸乙酯后涡旋 3 min,12 500 r/min 离心(离心半径 6.8 cm) 5 min,取上清液置于离心管中,37 $^{\circ}$ C 氮气吹干,加入甲醇 50 μ L 复溶后即得脑组织样品溶液。

2.10.5 线性关系考察 取健康 SD 大鼠,注射 3% 戊巴比妥钠溶液并心脏取血,置肝素浸润离心管中,3 500 r/min 离心(离心半径为 6.8 cm) 5 min,上分层即为空白血浆。另取出脑组织置离心管中,加入 5 mL 乙醇溶液,快速匀浆 5 min,12 500 r/min 离心(离心半径 6.8 cm) 5 min,上分层即为空白脑组织液。采用空白血浆配制金丝桃苷质量浓度分别为 1 000、500、250、50、10、5 ng/mL 的血浆对照品溶液,按“2.10.3”项下方法处理,并按“2.10.1”项下色谱及质谱条件进样测定。

采用空白脑组织液配制金丝桃苷质量浓度分别为 500、250、100、50、10、5 ng/mL 的脑组织对照品溶液,按“2.10.4”项下方法处理,并按“2.10.1”项下色谱及质谱条件进样测定。

以金丝桃苷质量浓度为横坐标(X),金丝桃苷和栀子苷的峰面积比为纵坐标(Y),得金丝桃苷血浆对照品线性回归方程为 $Y=0.0094X+0.0281$, $r=0.9969$,表明金丝桃苷血浆对照品线性范围为 5~1 000 ng/mL;金丝桃苷脑组织对照品线性回归方程为 $Y=0.0087X-0.0336$, $r=0.9970$,表明金丝桃苷脑组织对照品线性范围为 5~500 ng/mL。

2.10.6 专属性考察 取空白血浆样品、金丝桃苷血浆对照品溶液(5 ng/mL)和 BM-Hyp-Lips 鼻腔

给药 6 h 的血浆样品溶液,分别按“2.10.1”项下色谱及质谱条件进样测定,色谱图见图 7。

取空白脑组织样品、金丝桃苷脑组织对照品溶液(5 ng/mL)和 BM-Hyp-Lips 鼻腔给药 6 h 的脑组织样品溶液,分别按“2.10.1”项下色谱及质谱条件进样测定,色谱图见图 8。结果表明金丝桃苷色谱峰未受血浆及脑组织内源性杂质干扰,专属性高。

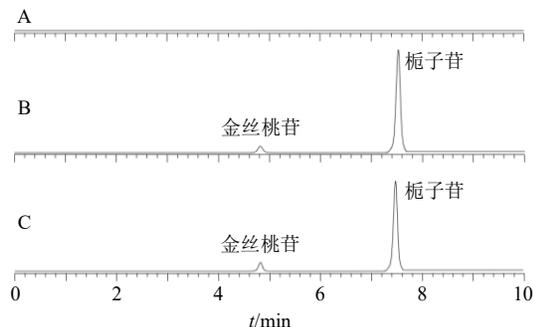


图 7 空白血浆(A)、金丝桃苷血浆对照品溶液(B)和 BM-Hyp-Lips 鼻腔给药 6 h 的血浆样品溶液(C)的 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 7 HPLC-MS/MS chromatograms of blank plasma solution (A), hyperoside blood plasma reference substance solution (B) and plasma sample solution for 6 h after transnasal administration of BM-Hyp-Lips (C)

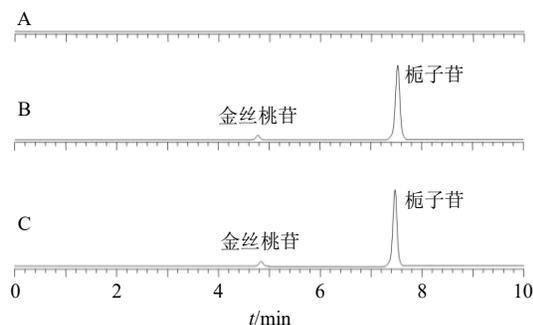


图 8 空白脑组织(A)、金丝桃苷脑组织对照品溶液(B)和 BM-Hyp-Lips 鼻腔给药 6 h 的脑组织样品溶液(C)的 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 8 HPLC-MS/MS chromatograms of blank brain tissue solution (A), hyperoside brain tissue reference substance solution (B) and brain tissue sample solution for 6 h after transnasal administration of BM-Hyp-Lips (C)

2.10.7 精密度试验 取质量浓度为 5、500、1 000 ng/mL 血浆对照品溶液,分别作为低、中、高质量浓度样品,进样测试金丝桃苷与栀子苷峰面积,重复 6 次,计算得两者比值的 RSD 分别为 2.18%、3.04%、2.85%;每天测试 1 次,连续测试 6 d,计算得金丝桃苷与栀子苷峰面积比值的 RSD 分别为 5.14%、3.50%、4.14%,结果表明血浆对照品溶液日

间、日间精密度均良好。

同法测得质量浓度为 5、100、500 ng/mL 脑组织对照品溶液，同 1 d 内金丝桃苷与栀子苷峰面积比值的 RSD 分别为 4.82%、2.97%、3.33%；连续测试 6 d，计算得金丝桃苷与栀子苷比值的 RSD 分别为 5.80%、4.77%、4.23%，结果表明脑组织对照品溶液日间、日间精密度均良好。

2.10.8 稳定性试验 取 BM-Hyp-Lips 鼻腔给药 6 h 的血浆样品溶液和脑组织样品溶液，分别于制备后 0、3、6、9、12、24 h 进样测定，计算得金丝桃苷与栀子苷峰面积比值的 RSD 分别为 3.11% 和 2.68%，结果表明血浆样品溶液和脑组织样品溶液在 24 h 内稳定性均良好。

2.10.9 重复性试验 取 BM-Hyp-Lips 鼻腔给药 6 h 的血浆样品，按“2.10.3”项下方法操作，平行制备 6 份血浆样品溶液，测算得金丝桃苷质量浓度的 RSD 为 4.79%，表明该血浆样品实验重复性良好。取金丝桃苷鼻腔给药 6 h 的脑组织样品，按“2.10.4”项下方法操作，平行制备 6 份脑组织样品溶液，测算得金丝桃苷质量浓度的 RSD 为 5.16%，表明该脑组织样品实验重复性良好。

2.10.10 提取回收率和基质效应试验 取 5、500、1 000 ng/mL 金丝桃苷对照品溶液，作为低、中、高质量浓度（含栀子苷），按“2.10.3”项下方法处理后测定峰面积（*a*）；取 100 μL 空白血浆，按“2.10.3”项下方法处理后得残渣，加入 5、500、1 000 ng/mL 金丝桃苷对照品溶液和栀子苷，涡旋 1 min 后进样测定峰面积（*b*），提取回收率=*a/b*。结果显示低、中、高质量浓度金丝桃苷及栀子苷在血浆中的提取回收率分别为 97.19%、100.14%、98.69% 和 96.71%，表明提取回收率较高。

取 5、500、1 000 ng/mL 金丝桃苷对照品溶液（含栀子苷），测定峰面积（*c*），基质效应=*b/c*。结果显示低、中、高质量浓度金丝桃苷及栀子苷在血浆中的基质效应分别为 100.10%、101.72%、99.34% 和 99.06%，结果表明基质效应小。

取 5、100、500 ng/mL 金丝桃苷对照品溶液作为低、中、高质量浓度（含栀子苷），并按“2.10.4”项下方法处理，同法考察脑组织样品中金丝桃苷及栀子苷的提取回收率和基质效应。结果显示低、中、高质量浓度金丝桃苷及栀子苷在脑组织中的提取回收率分别为 96.94%、98.11%、99.04% 和 100.27%；基质效应分别为 99.82%、100.10%、98.77% 和

101.36%，表明提取回收率较高，且基质效应小。因此建立的定量测定方法可用于大鼠血浆和脑组织中金丝桃苷的定量测定。

2.10.11 BM-Hyp-Lips 脑靶向性评价方法 采用经鼻给药 DTE 和 DTP 来评价 BM-Hyp-Lips 经鼻给药的脑靶向性^[13-14]，计算公式分别见公式（6）（7）。

$$DTE = (AUC_{\text{脑}} / AUC_{\text{血浆}})_{\text{鼻腔}} / (AUC_{\text{脑}} / AUC_{\text{血浆}})_{\text{静脉}} \quad (6)$$

$$DTP = [(AUC_{\text{脑}})_{\text{鼻腔}} - (AUC_{\text{脑}})_{\text{静脉}}] / [(AUC_{\text{血浆}})_{\text{鼻腔}} - (AUC_{\text{血浆}})_{\text{静脉}}] \quad (7)$$

2.10.12 药动学及脑靶向性评价结果

(1) 药动学结果：金丝桃苷血浆药-时曲线和脑组织药-时曲线见图 9，药动学参数见表 10。与金丝桃苷原料药经鼻给药相比，BM-Hyp-Lips 经鼻给药组血浆的 C_{\max} 和 AUC_{0-t} 具有极显著性提高（ $P < 0.01$ ），分别提高至 2.45 倍和 2.39 倍，说明 BM-Hyp-Lips 极大地改变了金丝桃苷药动学行为，并促进了药物吸收^[10]。BM-Hyp-Lips 经鼻给药组脑组织的 C_{\max} 和 AUC_{0-t} 也具有极显著性提高（ $P < 0.01$ ），分别提高至 3.91 倍和 5.87 倍，说明 BM-Hyp-Lips 也同时极大地提高了脑组织对金丝桃苷的摄取^[10]。

(2) 脑靶向性评价结果：BM-Hyp-Lips 脑靶向性评价结果见表 11。金丝桃苷 iv 药动学数据主要用于计算 DTE 和 DTP。与金丝桃苷原料药经鼻给药相

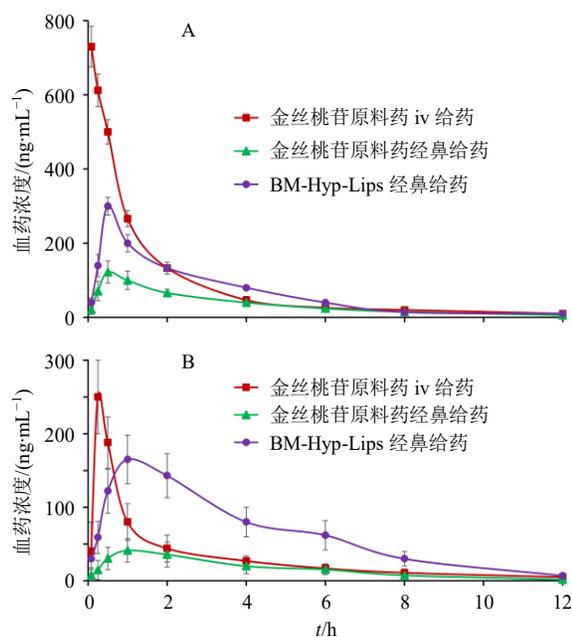


图 9 金丝桃苷原料药和 BM-Hyp-Lips 的血浆药-时曲线 (A) 和脑组织药-时曲线 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Plasma concentration-time curves (A) and brain tissue concentration-time curves (B) of hyperoside bulk drug and BM-Hyp-Lips ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 10 金丝桃苷原料药和 BM-Hyp-Lips 的药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 10 Pharmacokinetic parameters for hyperoside bulk drug ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

参数	单位	金丝桃苷原料药经鼻给药		BM-Hyp-Lips 经鼻给药		金丝桃苷原料药 iv	
		血浆	脑组织	血浆	脑组织	血浆	脑组织
t_{max}	h	0.50 ± 0.10	0.95 ± 0.15	0.50 ± 0.10	1.04 ± 0.16	0.08 ± 0.00	0.25 ± 0.10
$t_{1/2}$	h	3.14 ± 0.55	4.28 ± 0.63	3.25 ± 0.49	4.56 ± 0.70	1.06 ± 0.14	0.68 ± 0.12
C_{max}	ng·mL ⁻¹	122.77 ± 28.74	42.59 ± 23.19	300.96 ± 50.68**	166.41 ± 35.54**	734.79 ± 104.27	251.70 ± 43.84
AUC_{0-t}	ng·h·mL ⁻¹	287.21 ± 33.45	127.17 ± 29.11	686.34 ± 70.58**	746.24 ± 102.65**	1 109.14 ± 134.29	384.85 ± 45.68

与金丝桃苷原料药经鼻给药比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs hyperoside bulk drug given by transnasal administration.

表 11 脑靶向评价结果

Table 11 Results of brain-targeting evaluation

参数	$AUC_{0-t}/(ng \cdot h \cdot mL^{-1})$		DTE/ DTP/	
	脑组织	血浆	%	%
金丝桃苷原料药经鼻给药	127.17 ± 29.11	287.21 ± 33.45	127.67	21.63
BM-Hyp-Lips 经鼻给药	746.24 ± 102.65	686.34 ± 70.58	313.26	68.08

比, BM-Hyp-Lips 经鼻给药后 DTE 由 127.67% 提高至 313.26%, DTP 由 21.63% 提高至 68.08%, 说明 BM-Hyp-Lips 显著提高了金丝桃苷的脑靶向作用, 为发挥其药效奠定了基础。

3 讨论

测定纳米制剂包封率的常用方法有超滤离心法、透析袋法、高速离心法、葡聚糖凝胶柱法等。前期通过比较发现高速离心法和超滤离心法均可能破坏 BM-Hyp-Lips 结构, 造成金丝桃苷泄漏, 从而影响测定结果的准确性。透析袋法重现性较差, 需要较长时间才能将 BM-Hyp-Lips 和游离金丝桃苷有效分离。葡聚糖凝胶柱法需要的实验仪器及条件相对简单, 该法是基于分子筛原理使 BM-Hyp-Lips 和游离药物实现分离, 具体分离过程为游离药物由于分子较小, 易进入凝胶内部, 因而洗脱出来需较长时间; BM-Hyp-Lips 分子较大, 无法进入凝胶内部, 在凝胶柱中保留时间短, 因而被快速洗脱出来, 但葡聚糖凝胶柱法所需时间也较长。本研究采用葡聚糖凝胶微柱与低速离心法联用来测定 BM-Hyp-Lips 的包封率, 极大缩短了分离时间, 且低速离心不易造成 BM-Hyp-Lips 结构破坏, 从而为准确测定包封率奠定基础^[19]。

前期曾将载药量也作为 BM-Hyp-Lips 的优化指标, 但得到的最佳处方的包封率低于 80%, 不符合《中国药典》2020 年版四部 9014 项下微粒制剂对包封率的要求(不得低于 80%)。考虑到包封率影响着微粒制剂的安全性及有效性^[8], 故仅将包封率作为优化指标。BM-Hyp-Lips 的 ζ 电位绝对值小于

30 mV, 这是由于冰片本身带正电荷^[14], 中和了脂质体表面的负电荷所致。稳定性考察结果显示, BM-Hyp-Lips 仍具有较高的储存稳定性, 可能是 BM-Hyp-Lips 表面修饰的冰片提高了脂质体膜的致密性, 从而阻止了脂质体表层及浅表层药物泄漏, 冰片表面修饰也极大地影响了 BM-Hyp-Lips 内部的药物释放, 使之表现出明显的缓释特征。鼻腔可耐受的 pH 值范围为 4.0~8.5^[20], 故本研究采用 pH 7.4 PBS 作为水相制备 BM-Hyp-Lips^[9], 并考察了 BM-Hyp-Lips 在 pH 7.4 PBS 条件下的释药特征, 符合鼻腔 pH 值耐受范围。

金丝桃苷和栀子苷在相同条件下可从生物样品中被有效提取出来, 进而为准确测定金丝桃苷含量奠定基础, 故药动学实验的定量中选择栀子苷作为内标。金丝桃苷经鼻给药后血浆和脑组织中 AUC_{0-t} 均较低, 说明有大量药物并未被鼻黏膜或血脑屏障吸收, 主要与金丝桃苷本身渗透性较差、药物难以滞留于鼻腔、药物易被鼻纤毛清除等因素有关^[11]。

经鼻给药的 BM-Hyp-Lips 脑组织 AUC_{0-t} 提高至其原料药的 5.87 倍, 主要是由于脂质体脂溶性良好, 生物相容性高, 可通过脂质体吸附介导的融合、胞饮等作用来提高药物透过血脑屏障的能力^[18-19, 21]; BM-Hyp-Lips 表面修饰了冰片, 冰片可发挥“性善走窍, 无往不达”的作用^[9], 通过提高血脑屏障的通透性进一步增加了药物进入脑组织的量^[22]; 纳米制剂粒径较小, 可通过发挥独特的吸收机制促进药物吸收^[23-24]; 经鼻给药方式本身可提高药物的脑靶向作用^[4], 因而使 BM-Hyp-Lips 中金丝桃苷的 DTE 和 DTP 得到明显提高^[25]。BM-Hyp-Lips 将金丝桃苷的 DTP 提高至 68.08%, 表明有一半以上的药物由鼻腔直接进入脑组织, 为进一步增强金丝桃苷在脑部疾病中的治疗效果奠定了基础。

本研究完成了 BM-Hyp-Lips 制备工艺、储存稳定性、药动学及脑靶向性评价等研究, 发现 BM-Hyp-

Lips 包封率较高, 储存稳定性良好, 极大提高了金丝桃苷的脑靶向作用, 为评价 BM-Hyp-Lips 成药性提供了有价值的参考资料, 也为金丝桃苷应用于帕金森综合征、脑质瘤等脑部疾病的治疗提供了一种新型给药制剂。但本研究暂未对 BM-Hyp-Lips 使用的安全性进行评价, 后续将从鼻黏膜刺激性、细胞溶血性等评价 BM-Hyp-Lips 鼻腔给药的安全性, 并结合药效学研究深入评价 BM-Hyp-Lips 优势。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 孙增红, 张莎, 王丽娃, 等. 黄蜀葵花提取物中总黄酮与总多酚含量测定及体外抑菌与抗氧化活性研究 [J]. 化学与生物工程, 2024, 41(2): 26-32.
- [2] 徐幸杰, 潘涛, 樊慧杰, 等. 金丝桃苷对帕金森病模型小鼠小胶质细胞 M1/M2 极化和 LPS 诱导的 BV2 细胞极化的调节作用研究 [J]. 环球中医药, 2022, 15(8): 1350-1358.
- [3] 侯悦, 张金仿, 马开慧, 等. 金丝桃苷通过 miR-155/c-MYB 通路抑制脑胶质瘤 U251 细胞增殖、侵袭及迁移作用 [J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(19): 2390-2394.
- [4] 杨冰, 陆洋, 杜守颖, 等. 基于“鼻-脑”通路细胞模型组探索相对分子质量及粒径因素对药物制剂经鼻入脑的影响 [J]. 中草药, 2020, 51(22): 5748-5753.
- [5] 李伟宏, 郑伟, 王风云, 等. 金丝桃苷磷脂复合物及其介孔二氧化硅纳米粒的制备和口服药动学研究 [J]. 中草药, 2023, 54(13): 4157-4167.
- [6] Tong Z R, Jie X L, Chen Z W, *et al.* Borneol and lactoferrin dual-modified crocetin-loaded nanoliposomes enhance neuroprotection in HT22 cells and brain targeting in mice [J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 276: 116674.
- [7] 季玮. 基于 DNA 支持的脂质膜工程化研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2024, 41(4): 1-8.
- [8] 尚慧杰, 王颖慧, 郝海军. 三叶苷-磷脂复合物处方工艺优化及理化性质的初步研究 [J]. 化学研究与应用, 2024, 36(11): 2724-2730.
- [9] 叶晓莉, 吴梅君, 王丛瑶, 等. 冰片修饰的葛根素脂质体的制备及脑组织分布研究 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(5): 632-637.
- [10] Yi T, Tang D D, Wang F, *et al.* Enhancing both oral bioavailability and brain penetration of puerarin using borneol in combination with preparation technologies [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 422-429.
- [11] 丁欢欢, 姜先梅, 刘红梅, 等. 藤黄酸和雷帕霉素共载脂质体的制备及协同抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(9): 2896-2911.
- [12] Yuan W J, Wang J J, An X F, *et al.* UPLC-MS/MS method for the determination of hyperoside and application to pharmacokinetics study in rat after different administration routes [J]. *Chromatographia*, 2021, 84(3): 249-256.
- [13] 陈筱瑜, 冯连晶, 黄庆德, 等. 石杉碱甲二元醇质体温敏凝胶大鼠鼻腔给药药动学及脑靶向性研究 [J]. 中成药, 2022, 44(2): 350-356.
- [14] Shen X, Cui Z X, Wei Y D, *et al.* Exploring the potential to enhance drug distribution in the brain subregion via intranasal delivery of nanoemulsion in combination with borneol as a guider [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2023, 18(6): 100778.
- [15] 王晓萍, 李丹, 张恩南. Box-Behnken 设计-效应面法优化 pH 敏感主动靶向紫杉醇脂质体处方和体外细胞毒性研究 [J]. 中国药剂学杂志: 网络版, 2023, 21(6): 299-306.
- [16] 马晓星, 隋小宇, 刘畅, 等. Box-Behnken 响应面法优化厚朴酚与小檗碱共载脂质体的处方工艺 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(7): 796-801.
- [17] 廉唱唱, 周梅, 彭成军, 等. 磷脂种类对吡啶菁绿脂质体制剂学性质的影响 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(3): 524-530.
- [18] 霍雨佳, 谷娟, 呼胜楠, 等. 冰片修饰的胡椒碱脂质体的制备、表征及透皮吸收研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(6): 663-670.
- [19] 柳超, 董亚楠, 李伟宏, 等. 冰片修饰根皮素醇质体凝胶的制备、表征及其离体皮肤渗透特性研究 [J]. 中草药, 2024, 55(21): 7288-7299.
- [20] 陈伟. 细辛脑亚微乳及其鼻腔喷雾系统的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.
- [21] Tang S N, Wang A P, Yan X J, *et al.* Brain-targeted intranasal delivery of dopamine with borneol and lactoferrin co-modified nanoparticles for treating Parkinson's disease [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 700-707.
- [22] Song H, Wei M, Zhang N, *et al.* Enhanced permeability of blood-brain barrier and targeting function of brain via borneol-modified chemically solid lipid nanoparticle [J]. *Int J Nanomedicine*, 2018, 13: 1869-1879.
- [23] 张亚林, 郭志刚, 王丹凤, 等. 鞣花酸自胶束化固体分散体制备及口服药动学行为研究 [J]. 中草药, 2024, 55(13): 4350-4360.
- [24] 王涛丽, 李登云, 张莉, 等. 壳聚糖包覆芒果苷脂质体的制备、表征及口服药动学评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(18): 2122-2128.
- [25] Yu S M, Wang X Y, Lv L L, *et al.* Borneol-modified PEGylated graphene oxide as a nanocarrier for brain-targeted delivery of ginsenoside Rg₁ against depression [J]. *Int J Pharm*, 2023, 643: 123284.

[责任编辑 郑礼胜]