

冰片修饰的葛根素脂质体的制备及脑组织分布研究

叶晓莉¹, 吴梅君¹, 王丛瑶², 王晓楠¹, 封菲¹, 高越^{1*} (1.杭州市第一人民医院, 杭州 310006; 2.杭州市萧山区第一人民医院, 杭州 311200)

摘要: 目的 制备冰片(borneol, BO)修饰的葛根素(puerarin, Pue)脂质体(BO-Pue-Lips), 进行理化性质考察及大鼠体内脑组织分布研究。方法 采用薄膜分散法制备 BO-Pue-Lips, 通过正交设计, 以包封率和载药量为评价指标优化处方工艺。以 Pue 混悬液和(BO-Pue)混悬液为对照组, 测定大鼠尾静脉给药 BO-Pue-Lips 的脑组织浓度。结果 制备 BO-Pue-Lips 的优化条件为 Pue 与卵磷脂质量比为 1:10, 胆固醇与卵磷脂质量比为 1:4, 制备温度为 40℃。按优化条件所制备的 BO-Pue-Lips 粒径为(112.97±0.89)nm, Zeta 电位为(-7.48±0.49)mV, 包封率为(73.47±1.75)%, 载药量为(5.55±0.13)%, 药物释放曲线符合 Weibull 方程模型。脑组织分布结果显示, Pue、BO-Pue 和 BO-Pue-Lips 的 $T_{1/2}$ 分别为(0.61±0.22)h, (0.55±0.27)h 和(1.80±0.17)h, $AUC_{0 \rightarrow t}$ 分别为(68.59±1.09) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$, (72.70±2.63) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$ 和(137.68±10.17) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$, CL 分别为(0.29±0.01) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, (0.27±0.02) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和(0.13±0.01) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, MRT 分别为(0.93±0.05)h, (0.97±0.02)h 和(1.80±0.05)h。结论 采用薄膜分散法成功制备了 BO-Pue-Lips, 确定了最优制备处方和制备工艺。BO-Pue-Lips 给药后显著提高葛根素脑组织蓄积量, 延长药物在脑中的滞留时间, 具有良好的脑靶向性。

关键词: 冰片; 葛根素; 脂质体; 正交设计; 脑组织分布

中图分类号: R944 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)05-0632-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221082

引用本文: 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.

Preparation and Brain Distribution of Borneol Modified Puerarin Liposomes

YE Xiaoli¹, WU Meijun¹, WANG Congyao², WANG Xiaonan¹, FENG Fei¹, GAO Yue^{1*} (1.Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China; 2.The First People's Hospital of Xiaoshan District, Hangzhou 311200, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare borneol modified puerarin liposomes(BO-Pue-Lips) with optimization, and evaluate the concentration in brain of the drug liposomes in rats. **METHODS** The BO-Pue-Lips were prepared with the thin-film rehydration method and were optimized through orthogonal test according to entrapment efficiency and drug loading of BO-Pue-Lips. Using puerarin(Pue) suspension and borneol puerarin(BO-Pue) suspension as control, the concentration in brain of BO-Pue-Lips after intravenous administration in rats were studied. **RESULTS** The optimal conditions for preparation of BO-Pue-Lips were Pue-soybean phospholipids(1:10), cholesterol-soybean phospholipids(1:4), and the hydration temperature was 40℃. The mean particle size of the resulted BO-Pue-Lips was (112.97±0.89)nm and Zeta potential was (-7.48±0.49)mV, the average entrapment efficiency and drug-loading was (73.47±1.75)% and (5.55±0.13)%, respectively. The profiles of release *in vitro* was expressed well by Weibull equation. Results of distribution in brain showed that $T_{1/2}$ of Pue, BO-Pue and BO-Pue-Lips were (0.61±0.22)h, (0.55±0.27)h and (1.80±0.17)h, $AUC_{0 \rightarrow t}$ were (68.59±1.09) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$, (72.70±2.63) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$ and (137.68±10.17) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{g}^{-1}$, CL were (0.29±0.01) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, (0.27±0.02) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ and (0.13±0.01) $\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$, MRT were (0.93±0.05)h, (0.97±0.02)h and (1.80±0.05)h. **CONCLUSION** An optimized liposomes drug delivery system is obtained by thin-film rehydration method. The preparation and preparation process are selected and optimized. The liposomes after intravenous administration might increase the concentration, prolong circulation time and have a good targeting efficiency in brain.

KEYWORDS: borneol; puerarin; liposomes; orthogonal design; brain distribution

葛根素(puerarin, Pue)是从豆科植物野葛根中得到的一种黄酮类化合物,具有抗血栓、抗氧化^[1]、清除氧自由基、改善微循环^[2]、扩张冠脉和脑血管等作用^[3-4],可通过多途径、多环节、多靶点起到

防治脑缺血再灌注损伤作用,用于预防和治疗缺血性脑血管方面疾病。但 Pue 水溶性与脂溶性较差,不易被胃肠等生物膜吸收,不易透过血脑屏障,生物利用度低,体内消除半衰期较短,需频

基金项目: 杭州市医学重点学科(OO20200055); 浙江省中医药科技计划项目(2014ZA083, 2021ZA111); 浙江省卫生健康科技计划项目(2021KY865); 杭州市卫生科技计划项目(A20210186); 浙江省药学会医院药学专项科研基金项目(2020ZY28)

作者简介: 叶晓莉,女,硕士,副主任药师 E-mail: 176056953@qq.com *通信作者: 高越,男,主任医师 E-mail: gy9821@sina.com

繁给药。临床多以静脉注射给药,但又由于存在中药注射剂不稳定、用药不便和易出现血管内溶血等不良反应,限制了Pue的临床应用^[5-8]。

“生物导弹”脂质体(liposomes, Lips)是由磷脂和胆固醇组成的类生物细胞膜结构,具有靶向释药、增强疗效、提高生物利用度等优点。“芳香开窍”药冰片(borneol, BO)是一种单萜类化合物,具有通过改善血脑屏障的渗透性达到“通诸窍”的功能,可以通过促进生物膜的渗透性来提高脂质体的吸收率和转运效率,与其他药物配伍提高药物的生物利用度、促进开放血脑屏障、增加药物在脑组织中的分布,促进药物吸收入脑^[9]。

为延长Pue生物半衰期,延缓其在体内作用的时间,本课题以脂质体为载体,以具有“芳香走窜,引药上行”之效的冰片作为修饰,介导脂质体携带药物入脑发挥疗效,制备新型脑内递药系统冰片修饰的Pue脂质体(borneol puerarin liposomes, BO-Pue-Lips),形成“药物导弹”后并考察其脑组织分布特征,赋予药物脑部“归巢”靶向性,提高Pue在脑组织内的蓄积量。

1 材料

1.1 仪器

ISO9001 电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司);LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);Optima Max 型高速冷冻离心机(美国Beckman公司,半径为37 cm);Nano-ZS90 激光粒径分析仪(英国Marlvern公司);14000 Da 透析袋(上海源叶生物科技有限公司);JEM-1200EX 型透射电子显微镜(日本JEOL公司)。

1.2 药品和试剂

Pue 原料药(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度>98%,批号:K1925030);Pue 对照品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度≥98%,批号:J2009307);胆固醇(上海艾伟拓医药科技有限

公司,批号:B61251);大豆卵磷脂(上海艾伟拓医药科技有限公司,批号:SY-SI-181201);BO(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,纯度55%,批号:B2010039);乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯,其余为分析纯。

1.3 动物

清洁级SD大鼠,雌雄各半,体质量(200±10)g,杭州医学院实验动物中心[生产许可证号:SCXK(浙)2019-0011]。所有动物实验均符合杭州医学院动物饲养和使用指南。

2 方法与结果

2.1 BO-Pue-LiPs 的制备

采用薄膜分散法制备BO-Pue-Lips。称取卵磷脂、胆固醇适量,加入10 mL 氯仿中,形成澄清溶液,置于茄型瓶中,一定温度下水浴旋转蒸发除去有机溶剂,至瓶壁上形成均匀透明的薄膜。另取处方量的Pue及BO溶于20 mL PBS 缓冲溶液(pH 7.4),加入上述附有薄膜的茄型瓶中,使薄膜溶解,形成混悬液,过0.80, 0.45, 0.22 μm 微孔滤膜,即得BO-Pue-Lips。

2.2 Pue 含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为Diamonsil™ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸水(20:80);流速为1.0 mL·min⁻¹;柱温为30℃;检测波长为250 nm;进样量为20 μL。

2.2.2 专属性考察 取Pue对照品溶液、空白脂质体及Pue-Lips混悬液,在“2.2.1”色谱条件下进样分析,结果显示,色谱峰专一性良好,辅料对药物测定无干扰,Pue的保留时间约为5.45 min。结果见图1。

2.2.3 标准曲线的建立 精密称取Pue对照品适量,甲醇定容得5.3, 10.6, 21.2, 42.4, 63.6, 84.8, 106.0 μg·mL⁻¹ 系列浓度的对照品溶液,取20 μL进样,以峰面积(y)对药物浓度(x)进行线性回归,

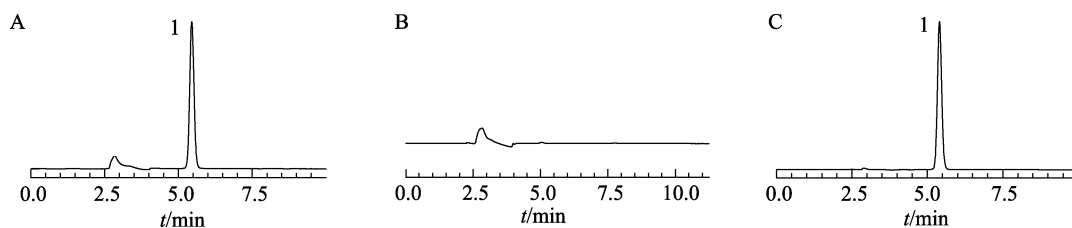


图1 高效液相色谱图

A-Pue 对照品溶液; B-空白脂质体; C-Pue-Lips 混悬液; 1-Pue。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-Pue standard solution; B-Lips; C-Pue-Lips; 1-Pue.

得回归方程 $y=69\,074x+20\,086$, $R^2=0.999\,7(n=3)$ 。表明 Pue 浓度在 $5.3\sim106.0\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

2.2.4 精密度与回收率试验 取 Pue 对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续测定 6 次,峰面积 RSD 为 $0.53\%(n=6)$ 。

精密量取 Pue-Lips 混悬液加甲醇破乳,并用流动相定容,配制成浓度分别为 12.50 , 50.00 , $80.00\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分析计算回收率。平均回收率分别为 99.28% , 99.66% , $100.06\%(n=3)$, 结果见表 1。

表 1 方法回收率($n=6$)

Tab. 1 Method recovery rate($n=6$)

加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	测定量/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
12.50	12.41 ± 0.09	99.28	0.71
50.00	49.83 ± 0.06	99.66	0.12
80.00	80.04 ± 0.02	100.06	0.01

2.2.5 重复性试验 取同一批 Pue-Lips 样品,测定其含量 6 次,计算其 RSD 为 $1.03\%(n=6)$ 。

2.2.6 稳定性试验 取同一批 Pue-Lips 样品,分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进样,测定 RSD 值为 0.83% , 表明样品在 12 h 内稳定性良好。

2.3 指标考察

2.3.1 脂质体形态学考察 透射电镜样品采用磷钨酸负染法制备。取适量 BO-Pue-Lips 混悬液滴于铜网, 2.0% 磷钨酸染色,透射电镜观察。

2.3.2 脂质体粒径测定 取 BO-Pue-Lips 混悬液适量,粒径分析仪测定。

2.3.3 脂质体包封率与载药量测定 采用超滤离心法测定 BO-Pue-Lips 的包封率。取 BO-Pue-Lips 混悬液超速离心($40\,000\,\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\,^{\circ}\text{C}$)30 min,取上清液加甲醇定容测定 Pue 含量,记作 W_1 ;取离心后沉淀物,真空冷冻干燥称定总质量,记作 W 。另取 $1\,\text{mL}$ BO-Pue-Lips 甲醇超声定容破乳,HPLC 测定脂质体中 Pue 总含量,记作 W_0 ,分别计算包封率 $[(W_0-W_1)/W_0]$ 和载药量 $[(W_0-W_1)/W]$ 。

2.4 BO-Pue-Lips 最佳处方工艺

2.4.1 正交试验设计 本实验根据单因素考察结果,以包封率和载药量为指标,选择 Pue 与卵磷脂质量比(A)、胆固醇与卵磷脂质量比(B)、制备温度(C)为考察因素,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优化处方,制备脂质体,测定包封率和载药量,其中

Pue : BO=2 : 1 固定不变以保持 BO 的含量。因素水平见表 2,采用综合加权评分法对正交结果进行分析,包封率(y_1)和载药量(y_2)分别按 50% , 50% 的系数积分,综合评分值(y)= $50y_1/y_{1\text{max}}+50y_2/y_{2\text{max}}$,正交试验结果见表 3。方差分析结果见表 4。

表 2 正交试验因素水平表

Tab. 2 Factors and levels in the orthogonal design

水平	因素		
	Pue 与卵磷脂质量比	胆固醇与卵磷脂质量比	制备温度/ $^{\circ}\text{C}$
	A	B	C
1	1 : 5	1 : 2	35
2	1 : 7.5	1 : 4	40
3	1 : 10	1 : 6	45

表 3 正交试验设计和结果

Tab. 3 Design and results of orthogonal test

序号	A	B	C	包封率(y_1)/%	载药量(y_2)/%	y
1	1	1	1	54.71	4.80	64.22
2	1	2	2	60.30	6.80	79.32
3	1	3	3	56.52	6.84	76.98
4	2	1	2	62.10	5.23	71.65
5	2	2	3	66.41	6.61	82.38
6	2	3	1	63.90	6.19	78.30
7	3	1	3	66.52	5.98	78.89
8	3	2	1	73.80	7.57	92.82
9	3	3	2	68.71	8.84	96.55
K_1	73.51	71.59	78.45			
K_2	77.44	84.84	82.51			
K_3	89.42	83.94	79.42			
R	15.91	13.25	4.06			

表 4 方差分析

Tab. 4 Analysis of variance

差异来源	偏差平方和	自由度	F	F 临界值	均方	P 值
A	412.17	2	51.97	19.000	206.06	$P<0.05$
B	329.14	2	41.50	19.000	164.57	$P<0.05$
C	26.97	2	3.40	19.000	13.49	
D(误差)	7.93	2	1.00	19.000	3.97	

从直观分析和方差分析可知,以包封率和载药量为指标的各因素中,影响程度依次为 Pue 与卵磷脂质量比(A)>胆固醇与卵磷脂的质量比(B)>制备温度(C)。Pue 与卵磷脂质量比是影响 BO-Pue-Lips 包封率和载药量的第一因素,其次是胆固醇与卵磷脂质量比,而制备温度影响最小,且无显著差异。最佳处方为 $A_3B_2C_2$,即 Pue 与卵磷脂质量比为 1 : 10,胆固醇与卵磷脂质量比为 1 : 4,制备温度为 $40\,^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.2 最佳工艺验证 按上述最佳处方工艺制备 3 批 BO-Pue-Lips, 粒径为 $(112.97\pm0.89)\text{nm}$, Zeta 电位为 $(-7.48\pm0.49)\text{mV}$, 包封率为 $(73.47\pm1.75)\%$, 载药量为 $(5.55\pm0.13)\%(n=3)$, 结果见表 5。脂质体呈圆球形, 粒径大小相对均一, 无团聚, 结果见图 2。BO-Pue-Lips 粒径分布和 Zeta 电位数据结果见图 3~4。

表 5 验证试验结果
Tab. 5 Results of validation

批次	粒径/nm	Zeta/mV	包封率/%	载药量/%
1	113.78	-7.14	71.70	5.42
2	112.01	-7.26	73.50	5.55
3	113.11	-8.05	75.20	5.67
$\bar{x} \pm s$	112.97 ± 0.89	-7.48 ± 0.49	73.47 ± 1.75	5.55 ± 0.13

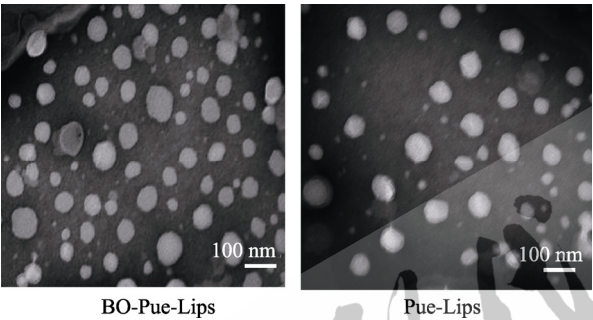


图 2 BO-Pue-Lips 和 Pue-Lips 透射电镜照片(80 000 $\times$)
Fig. 2 TEM photograph of BO-Pue-Lips and Pue-Lips (80 000 $\times$)

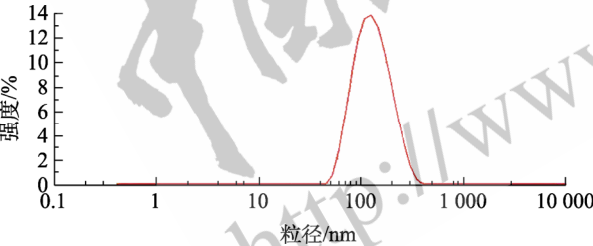


图 3 BO-Pue-Lips 粒径分布
Fig. 3 Particle size of BO-Pue-Lips

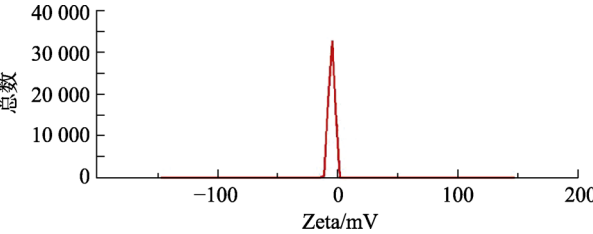


图 4 Zeta 电位分布
Fig. 4 Zeta potential distribution

2.5 体外释放度测定
透析法考察 BO-Pue-Lips 体外释药特性。

pH 7.4 PBS 溶液为释放介质, Pue 原料药与 BO-Pue-Lips(均含 Pue 1 mg)各 3 份, 分散于 2 mL 释放介质, 转移至预处理透析袋中, 确保透析袋全部浸没在介质中。开启恒温振荡仪, $(37\pm0.5)^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴振荡($50\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 定时取样并补加等量同温释放介质, 样品经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液测定释放介质中 Pue 含量, 计算累积释药率(Q%)。

在 PBS 溶液(pH 7.4)的释放介质中, Pue 体外释放曲线见图 5。Pue 原药 2 h 累积释药百分率为 79.81%, 4 h 已基本释放完全, 累积释放百分率为 94.50%, 表明 Pue 原药在释放介质中释药较快。而 BO-Pue-Lips 体外释放缓慢, 在 8 h 累积释药百分率只有 67.43%, 24 h 累计释放 86.82%, 具有显著缓释特征。BO-Pue-Lips 在 2 h 内释药较快, 由于药物吸附在脂质体表面造成 36.31%药物突释, 随后 BO-Pue-Lips 释药曲线渐趋平稳, 体现较好的缓释性能。

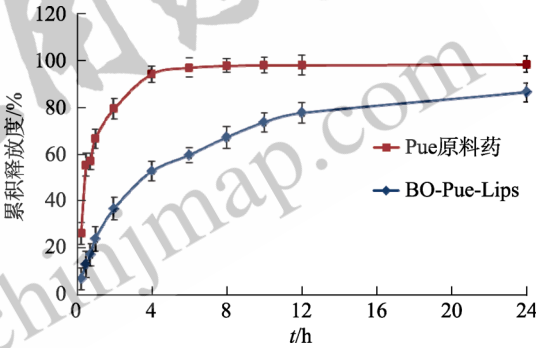


图 5 Pue-Sol 和 BO-Pue-LiPs 体外释药曲线($n=3$)
Fig. 5 *In vitro* release profiles of Pue-Sol and BO-Pue-LiPs ($n=3$)

分别用零级、一级动力学模型、Weibull 模型、Higuchi 模型对 BO-Pue-Lips 拟合释药行为, 结果表明, BO-Pue-Lips 在释放介质中的释药行为符合 Weibull 方程。结果见表 6。

表 6 BO-Pue-Lips 体外释放曲线拟合结果
Tab. 6 Fitting results of release curve of BO-Pue-Lips

模型	回归方程	R^2
零级动力学模型	$Q=0.034\ 7t+0.250\ 4$	0.742\ 6
一级动力学模型	$\ln(1-Q)=-0.086\ 4t-0.257\ 6$	0.914\ 6
Higuchi 模型	$Q=0.201t^{1/2}+0.040\ 8$	0.928\ 8
Weibull 模型	$\ln\ln(1/(1-Q))=0.758\ 3\ln t-1.474\ 5$	0.987\ 4

2.6 BO-Pue-Lips 脑组织分布研究
84 只 SD 大鼠随机分为 Pue 组、BO-Pue 组和 BO-Pue-Lips 组, 给药剂量为 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Pue。给

药后按不同时间点(0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 h)颈动脉放血处死, 采集完整大脑并用生理盐水洗净血迹。取完整大鼠大脑至 10 mL 离心管中, 加入 1 : 1(g : mL)的 50% 甲醇水溶液组织匀浆机匀浆 5 min, 取 1 mL 匀浆液至 1.5 mL 离心管中, 2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后取上清匀浆液; 精密移取 50 μL 匀浆液置于离心管并加乙腈溶液 200 μL 沉淀蛋白, 涡旋振荡, 13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 上清液进样。

数据处理分析采用 DAS2.0 药动学软件进行统计矩分析处理, 计算药动学参数, 并采用 prism 软件进行 *T* 检验, *P*<0.05 认为有显著性差异。

尾静脉给药后脑药-时曲线图见图 6, 药动学参数见表 7。结果显示, 与 Pue 比较, BO-Pue-Lips 提高了 AUC, 减慢了 CL, 从而提高了 Pue 在脑组织的吸收程度, 减缓了药物在脑部的清除速率。可能原因如下: ①脂质体在给药后的一段时间内通过细胞间隙进入脑内, 双分子膜能够延缓药物的释放, 使药物在脑组织中缓慢降解。②冰片发挥了促渗透作用, 介导脂质体携带药物入脑发挥疗效, 提高了血脑屏障的通透性, 从而进一步增加脑部对 Pue 的摄取。

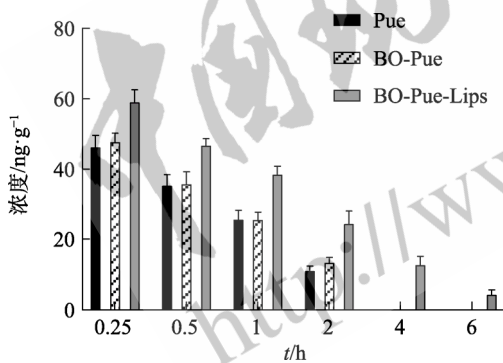


图 6 尾静脉给药后脑药-时曲线图(*n*=4)

Fig. 6 Brain concentration-time curves after intravenous injection(*n*=4)

表 7 尾静脉给药后大鼠脑药动学参数($\bar{x} \pm s$, *n*=4)

Tab. 7 Brain tissue pharmacokinetic parameters after intravenous injection($\bar{x} \pm s$, *n*=4)

药动学参数	BO-Pue-Lips	BO-Pue	Pue
<i>T</i> _{1/2} /h	1.80±0.17 ¹⁾	0.55±0.27	0.61±0.22
AUC _{0→t} /μg·h·g ⁻¹	137.68±10.17 ¹⁾	72.70±2.63	68.59±1.09
CL/L·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	0.13±0.01 ¹⁾	0.27±0.02	0.29±0.01
MRT/h	1.80±0.05 ¹⁾	0.97±0.02	0.93±0.05

注: 与 Pue 组比较, ¹⁾*P*<0.05。

Note: Compared with Pue group, ¹⁾*P*<0.05.

3 讨论

本实验以“脂质体”作为脑靶向给药系统的研究载体, 将《本草纲目》中记载有“通窍窍、散郁火”之功效的冰片作为开窍药和佐使药, 通过传统的中药有效成分和新型的给药技术结合, 形成“魔法子弹”脂质体改善血脑屏障的通透性, 使 Pue 克服体内“物理屏障”定向输送到靶器官。本实验通过逆向蒸发法、乙醇注入法、薄膜分散法等几种常用的方法制备脂质体, 发现薄膜分散法制备 Pue 工艺具有较大优势, 通过旋转蒸发可有效除去制剂中有机溶剂, 保证其残留量符合要求, 形成均匀稳定的薄膜, 并通过微孔滤膜过滤减小了脂质体的粒径。

研究发现药脂比是影响冰片修饰的 Pue 脂质体包封率和载药量的最主要因素, 由于卵磷脂对药物的承载能力有限, 在实验范围下, 卵磷脂含量越高, 脂质体包封率越高^[10]。但 Pue 投药量太大, 超过饱和状态后, 脂质囊材没有足够的空间来包封大量的药物, 造成包封率降低, 甚至导致药物析出。薄膜分散法制备脂质体的另一关键是膜的形成, 膜的组成与膜的形成密切相关。仅有卵磷脂时脂质体形成的膜很不稳定, 胆固醇分子具有稳定脂质体的目的, 减缓 Pue 从膜内向膜外释放, 能与卵磷脂的亲水和亲油基团作用, 填充磷脂分子间的空隙, 增强膜的强度, 调节膜流动性和通透性^[11-13], 胆固醇与卵磷脂作为内源性物质共同构成脂质体, 两者比例是影响包封率和载药量的主要因素, 随着胆固醇与卵磷脂质量比从 1 : 6 增加到 1 : 4 时, 结果随着比例的增大, 冰片修饰的 Pue 脂质体包封率也相应地提高, 但当胆固醇与卵磷脂的比例达到 1 : 2 时, 包封率不再升高, 反而有下降的趋势。由于难溶性的 Pue 和胆固醇都是嵌合在磷脂双分子层之间, 当胆固醇比例增加到一定程度后, 与 Pue 竞争磷脂双分子层区域, 占据了有限的脂质双分子层空间位置, 抑制了药物的插入, 阻碍 Pue 的包载, 干扰脂质囊泡的形成, 相应的包封率出现降低趋势。同时胆固醇含量过大时会造成脂质体成膜困难且不牢固。适当提高水化温度有利于脂质体的形成。但过高的温度易导致卵磷脂氧化变性, 导致制备的脂质体膜不稳定, 发生降解, 药物流出。正交试验发现 40 ℃的水化温度较适宜, 既能得到理想的包封率, 又能通过增加膜的流动性和柔韧性, 让

更多的Pue进入脂质双分子层^[14]。

通过DAS软件求得药动学参数,脑组织分布结果表明,将Pue制备成BO-Pue-LiPs后AUC_{0→t}值明显提高、T_{1/2}延长,说明药物释放更稳定,并通过脂质体蓄积于脑部发挥药物贮库作用^[15-17],具有缓释长效作用,明显提高了Pue的生物利用度^[18]。与Pue组和BO-Pue组相比,BO-Pue-LiPs的清除率CL下降、MRT延长,说明脂质体能促进Pue对生物膜的转运,通过延长脑组织滞留时间来增加药物吸收进入脑部的有效浓度和循环时间,改善药物的吸收特性。原因可能:①由于Pue以分子或粒子形式包封于磷脂双分子层,BO-Pue-LiPs通过吸附介导的融合、吞噬或胞饮等作用来增加药物透过细胞膜的能力,从而使药物高效转运吸收通过血脑屏障,靶向进入脑组织。②《本草经疏》称冰片“性善走窍,无往不达”有“率领群药”的作用,可通过提高血脑屏障通透性来增加脑部的药物摄取量,能够显著促进小粒径脂质体的摄取率和转运效率。

REFERENCES

- [1] WANG J W, WANG H D, CONG Z X, et al. Puerarin ameliorates oxidative stress in a rodent model of traumatic brain injury[J]. J Surg Res, 2014, 186(1): 328-337.
- [2] CHEN R, XUE J, XIE M L. Puerarin prevents isoprenaline-induced myocardial fibrosis in mice by reduction of myocardial TGF- β 1 expression[J]. J Nutr Biochem, 2012, 23(9): 1080-1085.
- [3] LIU Y, XUE Q, LI X, et al. Amelioration of stroke-induced neurological deficiency by lyophilized powder of catapal and puerarin[J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(4): 448-456.
- [4] JU A X, ZHENG C Y, ZHENG Y, et al. Correlation of puerarin concentrations between plasma and saliva at different doses in rats[J]. Chin J Clin Pharm(中国临床药理学杂志), 2014, 23(4): 203-207.
- [5] WU J R, ZHANG X M, ZHANG B. Efficacy and safety of puerarin injection in treatment of diabetic peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. J Tradit Chin Med, 2014, 34(4): 401-410.
- [6] HUANG Z Y, SUN Y Q, HU H Y, et al. Techniques and methods evaluation on pharmaceutical stability of liposomes[J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2016, 51(3): 356-361.
- [7] GUO Y J, LIANG D L, XU Z S, et al. *In vivo* inhibitory effects of puerarin on selected rat cytochrome P450 isoenzymes[J]. Pharmazie, 2014, 69(5): 367-370.
- [8] LUO C F, HOU N, TIAN J, et al. Metabolic profile of puerarin in rats after intragastric administration of puerarin solid lipid nanoparticles[J]. Int J Nanomedicine, 2013(8): 933-940.
- [9] ZHANG Q L, FU B M, ZHANG Z J. Borneol, a novel agent that improves central nervous system drug delivery by enhancing blood-brain barrier permeability[J]. Drug Deliv, 2017, 24(1): 1037-1044.
- [10] GAO J Z, JIAO A N, YU M, et al. Study on preparation and storage stability of ginsenoside Re liposomes[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49(2): 330-336.
- [11] KADDAH S, KHREICH N, KADDAH F, et al. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule[J]. Food Chem Toxicol, 2018(113): 40-48.
- [12] ZHANG R, YUAN L L, SUN K Y, et al. Preparation and partition coefficient determination of nano-resveratrol liposomes[J]. Acta Phys-Chim Sin(物理化学学报), 2020, 36(6): 70-76.
- [13] CHEN C J, HAN D D, CAI C F, et al. An overview of liposome lyophilization and its future potential[J]. J Control Release, 2010, 142(3): 299-311.
- [14] XING Y, LI X, YU Y. Study on formulation and preparation process of ginkgolide B liposome[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(6): 697-703.
- [15] JU R J, LI X T, SHI J F, et al. Liposomes, modified with PTD(HIV-1) peptide, containing epirubicin and celecoxib, to target vasculogenic mimicry channels in invasive breast cancer[J]. Biomaterials, 2014, 35(26): 7610-7621.
- [16] LI N, FENG L L, TAN Y J, et al. Preparation, characterization, pharmacokinetics and biodistribution of baicalin-loaded liposome on cerebral ischemia-reperfusion after i.v. administration in rats[J]. Molecules, 2018, 23(7): 1747.
- [17] WANG J, CAI J, WANG X, et al. An injectable liposome for sustained release of tanshinone IIA to the treatment of acute blunt muscle injury by augmenting autophagy and alleviating oxidative stress[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(8): 4189-4203.
- [18] VIEIRA D B, GAMARRA L F. Getting into the brain: Liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier[J]. Int J Nanomedicine, 2016(11): 5381-5414.

收稿日期: 2022-03-29

(本文责编: 蔡珊珊)