

DOI: 10.11830/ISSN.1000-5013.202204005



# 雨生红球藻油柔性纳米脂质体 冻干粉的制备与评价

张雨凝<sup>1</sup>, 郑茗冉<sup>1</sup>, 贾海强<sup>1</sup>, 吴振<sup>2</sup>, 刘智阳<sup>3</sup>, 王立强<sup>1</sup>

(1. 华侨大学 医学院, 福建 泉州 362021;

2. 厦门大学 药学院, 福建 厦门 361100;

3. 贵州中铭生物科技有限公司, 贵州 贵阳 550001)

**摘要:** 采用熔融乳化法与冷冻干燥法制备雨生红球藻油柔性纳米脂质体冻干粉(Hpo-FNL-LP), 并研究其包封率、载药量、粒径、Zeta 电位、微观形态及稳定性. 采用桨法测定 Hpo-FNL-LP 体外累积溶出率, 扩散池法测定皮肤累计渗透量, 高效液相色谱法(HPLC)法测定虾青素血药质量浓度. 结果表明: Hpo-FNL-LP 的包封率为 $(89.16 \pm 1.21)\%$ , 载药量为 $(1.34 \pm 0.04)\%$ , 粒径为 $(165.75 \pm 0.11)$  nm, Zeta 电位为 $(-18.45 \pm 0.48)$  mV, 微观形态为双层膜的圆形结构, 稳定性较好; 与雨生红球藻油乙醇溶液相比, Hpo-FNL-LP 具有一定的缓释效果; Hpo-FNL-LP 中虾青素 24 h 的皮肤累计渗透量达到 $(12.84 \pm 0.36)$   $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , 显著高于雨生红球藻油普通脂质体; 与虾青素油溶液相比, Hpo-FNL-LP 的  $t_{1/2}$  延长,  $\rho_{\text{max}}$  与  $\text{AUC}_{0-t}$  增大, 相对生物利用度高达 $(422.53 \pm 3.30)\%$ .

**关键词:** 雨生红球藻油; 柔性纳米脂质体; 冻干粉; 体外评价; 药动学

**中图分类号:** Q 949.212.05; R 94 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2022)06-0769-08

## Preparation and Evaluation of Flexible Nano Liposome Lyophilized Powder of Haematococcus Pluvialis Oil

ZHANG Yuning<sup>1</sup>, ZHENG Mingran<sup>1</sup>, JIA Haiqiang<sup>1</sup>,  
WU Zhen<sup>2</sup>, LIU Zhiyang<sup>3</sup>, WANG Liqiang<sup>1</sup>

(1. School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. College of Pharmacy, Xiamen University, Xiamen 361000, China;

3. Guizhou Zhongming Biotechnology Limited Company, Guiyang 550001, China)

**Abstract:** The flexible nano liposome lyophilized powder of haematococcus pluvialis oil (Hpo-FNL-LP) was prepared by melt emulsification method and lyophilization method, and the encapsulation rate, drug loading amount, particle size, Zeta potential, microscopic morphology and stability were investigated. The cumulative dissolution rate of Hpo-FNL-LP *in vitro* was determined by paddle method. The cumulative skin penetration amount was determined by diffusion chamber method. The blood mass concentration of astaxanthin was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) method. The results show that, the encapsulation rate of Hpo-FNL-LP is  $(89.16 \pm 1.21)\%$ , the drug loading amount is  $(1.34 \pm 0.04)\%$ , the particle size is  $(165.75 \pm 0.11)$  nm, and the Zeta potential is  $(-18.45 \pm 0.48)$  mV. The microscopic morphology shows a

收稿日期: 2022-04-05

通信作者: 王立强(1970-), 男, 博士, 教授, 主要从事药剂学和创新药物的研究. E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFE0101700); 福建省高校产学研合作重大项目(2019Y4007)

double-layer circular structure with good stability. Compared with haematococcus pluvialis oil ethanol solution, Hpo-FNL-LP has a certain sustained release effect. The cumulative penetration amount of astaxanthin in Hpo-FNL-LP at 24 h reaches  $(12.84 \pm 0.36) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ , which is significantly higher than that of haematococcus pluvialis oil ordinary liposome. Compared with the astaxanthin oil solution, the  $t_{1/2}$  of Hpo-FNL-LP extends,  $\rho_{\text{max}}$  and  $\text{AUC}_{0-1}$  both increase, and the relative bioavailability rate is as high as  $(422.53 \pm 3.30)\%$ .

**Keywords:** haematococcus pluvialis oil; flexible nano liposome; lyophilized powder; *in vitro* evaluation; pharmacokinetics

雨生红球藻油(haematococcus pluvialis oil,Hpo)是通过对雨生红球藻生物精炼除杂后得到的富含虾青素(Astaxanthin, ASTA)的深红色油状液体,不仅含有丰富的 ASTA,而且还含有叶黄素<sup>[1]</sup>、生育酚<sup>[2]</sup>、植物甾醇<sup>[3]</sup>、大量的不饱和脂肪酸<sup>[4]</sup>,是一种强效的抗氧化剂,具有丰富的生物活性,如抗癌、抗糖尿病、抗炎,以及保护神经、心血管、眼睛和皮肤等<sup>[5]</sup>,可应用于化妆品、功能性食品、医药制剂、饲料等领域中,营养与药用价值极高.然而,Hpo 及其有效成分 ASTA 不溶于水、稳定性<sup>[6]</sup>与皮肤渗透性差、生物利用度低等,严重限制了它的应用.

药物纳米载体不仅具有通过口服输送难溶性药物的潜力,而且在皮肤给药领域同样也具有很强的优势<sup>[7]</sup>,特别是基于脂质的药物纳米载体<sup>[8]</sup>. 柔性纳米脂质体(flexible nano liposomes,FNL)指的是在普通脂质体磷脂双分子层的基础上加入不同的膜柔软剂,获得高度变形能力的一种新型脂质体<sup>[9]</sup>. FNL 作为一种生物相容纳米载体,本身安全无毒,不仅可以提高难溶性药物的溶解度,达到药物控释缓释的目的,促进药物的吸收,提高口服生物利用度,还可以利用其变形性,提高药物在皮肤角质层的透过率,可作为不同药物的透皮载体.基于此,本文制备一种雨生红球藻油柔性纳米脂质体冻干粉(Hpo-FNL-LP),为功能性油脂与 ASTA 纳米载体的研发与应用提供参考.

1 实验部分

1.1 实验仪器

1200 型高效液相色谱仪(图像二极管阵列(DAD)检测器,美国安捷伦公司);超声波清洗仪(河南省巩义市予华仪器有限责任公司);VS-2500M 型漩涡混合器(江苏省无锡市沃信仪器制造有限公司);真空干燥箱(广东省广州市深华生物技术有限公司);台式高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);紫外可见分光光度计(日本岛津公司);RYJ-6B 型药物透皮扩散试验仪(上海市黄海药检仪器有限公司);RC-806D 型溶出实验仪(天津市天大天发科技有限公司);纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(美国布鲁克海文仪器公司);真空冷冻干燥机(北京市松源华兴生物技术有限公司)

1.2 实验试剂

雨生红球藻油、虾青素微囊粉(合肥省安徽省德宝生物科技有限公司);虾青素对照品、胆固醇、吐温-80、胰蛋白酶、胃蛋白酶、蔗糖、海藻糖、甘露醇、葡萄糖、乳糖、三氯醋酸钠、硫代巴比妥酸(上海市易恩化学技术有限公司);甲醇、石油醚、丙酮、正己烷、无水乙醚(广东省汕头市西陇化工股份有限公司);二氯甲烷、盐酸(北京市国药集团化学试剂有限公司);磷酸盐缓冲盐溶液、PEG-400(上海市阿拉丁生化科技有限公司);蛋黄卵磷脂 PC-98T(上海市艾伟拓医药科技有限公司);氢氧化钠(上海市麦克林生化科技有限公司).

1.3 实验材料

27 只 SD 大鼠(雄性大鼠,质量为 200~250 g,购自福建省福州市吴氏试验动物研究中心,试验动物使用许可证号为 SCXK(闽)2016-0002).

2 实验结果与分析

2.1 Hpo-FNL-LP 的制备

采用熔融乳化法制备 Hpo-FNL,将  $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (在磷酸盐缓冲溶液中,下同)的蛋黄卵磷脂与  $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的胆固醇放入烧杯中,加入 5 mL 无水乙醇超声溶解.将烧杯置于 65 ℃ 水浴锅中,加热至溶剂完

全挥发,加入  $2.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Hpo 与  $12.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  吐温-80,充分搅拌均匀后,再加入  $50\text{ mL } 0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲溶液( $\text{pH}=7.4$ ).溶液超声至分散均匀后,将烧杯置于磁力搅拌器上恒温,搅拌  $30\text{ min}$ ,过  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜整粒,即得 Hpo-FNL.将 Hpo-FNL 转入样品瓶中,加入  $160.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  甘露醇,经  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  的冰箱冷冻  $24\text{ h}$  后,放入真空冷冻干燥机中干燥  $36\text{ h}$ ,即得 Hpo-FNL-LP.

2.2 ASTA 体外质量浓度测定

2.2.1 吸收波长的测定 将甲醇-二氯甲烷( $V(\text{甲醇}):V(\text{二氯甲烷})=4:1$ )溶液作为空白对照,使用紫外可见分光光度计对  $10.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 ASTA 对照品溶液与 Hpo-FNL-LP 供试品溶液进行  $200\sim 800\text{ nm}$  范围内扫描,测得 ASTA 的最大吸收波长为  $477\text{ nm}$ ,且 Hpo-FNL-LP 中的其他成分对 ASTA 的吸收波长无干扰.

2.2.2 高效液相色谱条件 色谱柱为依利特 Sino Chrom ODS-BP( $4.6\text{ mm}\times 250.0\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$ ),流动相为纯乙腈,检测波长为  $477\text{ nm}$ ,流速为  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,进样量为  $20\text{ }\mu\text{L}$ .

2.2.3 专属性的考察 分别取 ASTA 对照品溶液、FNL-LP 空白溶液和 Hpo-FNL-LP 供试品溶液,过  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜后,在节 2.2.2 色谱条件下检测,测得 ASTA 在对照品与供试品溶液中的保留时间基本一致,且空白对照无干扰.

2.2.4 线性关系 精密量取  $2.5\text{ mg}$  的 ASTA 对照品,用甲醇-二氯甲烷溶液溶解并定容至  $50\text{ mL}$ ,得到  $50.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 ASTA 对照品储备液.精密移取适量储备液,并加入甲醇-二氯甲烷溶液,依次稀释至  $4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

在节 2.2.2 色谱条件下进样检测,以峰面积为纵坐标( $Y$ ),以 ASTA 质量浓度为横坐标( $x$ )进行线性回归,绘制标准曲线,线性回归方程为  $Y=284.26x+5.649\text{ }2$ ,相关系数  $R^2=0.999\text{ }8$ .结果表明,ASTA 在  $1.5\sim 4.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  质量浓度范围内线性关系良好.

2.2.5 方法的考察 制备质量浓度为  $4.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 ASTA 对照品溶液,在节 2.2.2 色谱条件下进行检测,连续测定  $6$  次,测定的相对标准偏差为  $0.09\%$ ,这说明该仪器精密度良好.平行配制  $6$  份  $4.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 ASTA 对照品溶液,在节 2.2.2 色谱条件下进行检测,测得的相对标准偏差为  $1.33\%$ ,说明该方法具有较好的重现性.制备空白 FNL-LP 并分别加入适量 ASTA 对照品溶液,配制质量浓度分别为  $1.5, 3.0$  和  $4.5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的回收率供试品溶液各  $3$  份,过滤后,在节 2.2.2 色谱条件下进样检测,测得的回收率分别为  $(100.64\pm 0.97)\%$ ,  $(99.99\pm 1.17)\%$ ,  $(100.13\pm 1.19)\%$ ,相对标准偏差分别为  $0.96\%$ ,  $1.17\%$ ,  $1.19\%$ ,说明该方法较准确.

2.3 Hpo-FNL-LP 的质量评价

2.3.1 包封率 精密量取  $2.0\text{ mL}$  Hpo-FNL-LP 复溶液于  $15\text{ mL}$  离心管内,加入  $3.0\text{ mL}$  石油醚,涡旋  $30\text{ s}$  后,在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}, 2\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  的条件下离心  $5\text{ min}$ ,取下清液加适量甲醇和二氯甲烷溶液破乳,在节 2.2.2 色谱条件下进行检测,根据标准曲线计算 ASTA 质量浓度,得到包封在脂质体里的药物质量浓度( $\rho(\text{包})$ );另取同样量 Hpo-FNL-LP 直接加适量甲醇和二氯甲烷溶液破乳,在节 2.2.2 色谱条件下进行检测,根据标准曲线计算 ASTA 质量浓度,得到总的 ATSA 质量浓度( $\rho(\text{总})$ ).Hpo-FNL-LP 的包封率( $\delta_{\text{E}}$ )的计算公式为

$$\delta_{\text{E}}=\frac{\rho(\text{包})}{\rho(\text{总})}\times 100\%.$$
 (1)

测得的 Hpo-FNL-LP 的包封率为  $(89.16\pm 1.21)\%$ . 2.3.2 载药量 量取一定质量的 Hpo-FNL-LP,在一定体积( $V$ )的  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  蒸馏水中复溶,待其完全溶解后,在节 2.2.2 色谱条件下进行检测,其载药量( $W$ )的计算公式为

$$W=\frac{\rho(\text{包})V}{m}\times 100\%.$$
 (2)

测得 Hpo-FNL-LP 的载药量为  $(1.34\pm 0.04)\%$ . 2.3.3 粒径及 Zeta 电位 粒径分布图,如图 1 所示.图 1 中: $I$  为强度; $d$  为粒径.通过纳米粒度及 Zeta 电位分析仪,直接测定复溶后的 Hpo-FNL-LP 的粒径、Zeta 电

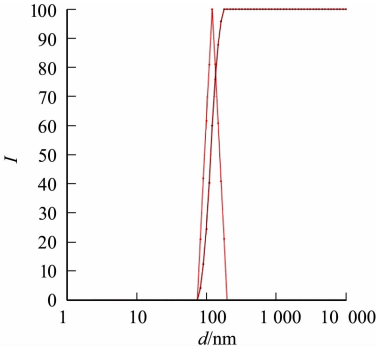
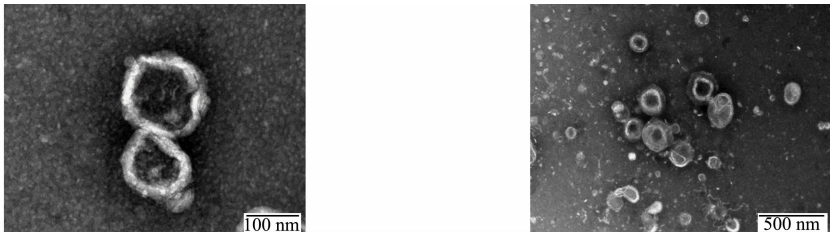


图 1 粒径分布图

Fig. 1 Particle size distribution

位. 测定得到的 Hpo-FNL-LP 的粒径为 $(165.75 \pm 0.11)$  nm, 聚合物分散性的指数为 $(0.132 \pm 0.016)$ , Zeta 电位为 $-(18.45 \pm 0.48)$  mV.

2.3.4 形态的观察 Hpo-FNL 与 Hpo-FNL-LP 的透射电镜图, 如图 2 所示. 由图 2 可知: Hpo-FNL 外观为双层膜的圆形结构; Hpo-FNL-LP 复溶后颗粒完整, 粒径大小与冷冻干燥前无明显差别.



(a) Hpo-FNL (b) Hpo-FNL-LP

图 2 Hpo-FNL 与 Hpo-FNL-LP 透射电镜图

Fig. 2 Transmission electron microscope diagram of Hpo-FNL and Hpo-FNL-LP

2.3.5 稳定性 将 Hpo-FNL 与 Hpo-FNL-LP 在 4 ℃ 和 25 ℃ 条件下放置 30 d, 并分别在 0, 5, 10, 20, 30 d 时进行渗漏率、粒径、丙二醛(MDA)质量浓度的测定, 以考察稳定性. 按 2.3.1 包封率测定方法计算 Hpo-FNL-LP 内包封的 ASTA 质量浓度, 渗漏率( $\delta_P$ )计算公式为

$$\delta_P = \frac{\rho_0 - \rho_t}{\rho_0} \times 100\%.$$
 (3)

式(3)中:  $\rho_0$  为 0 d 时的 Hpo-FNL 内包封的 ASTA 质量浓度,  $\rho_t$  为  $t$  d 时的 Hpo-FNL 内包封的 ASTA 质量浓度.

Hpo-FNL, Hpo-FNL-LP 稳定性结果, 如表 1 所示. 表 1 中:  $t_s$  为储藏时间;  $\theta$  为储藏温度;  $\delta_P$  为泄漏率;  $c$  为浓度.

表 1 Hpo-FNL, Hpo-FNL-LP 稳定性结果

Tab. 1 Hpo-FNL, Hpo-FNL-LP stability test results

$t_s/d$	$\theta/^\circ\text{C}$	Hpo-FNL			Hpo-FNL-LP		
		$\delta_P$	$d/\text{nm}$	$c(\text{MDA})/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$\delta_P$	$d/\text{nm}$	$c(\text{MDA})/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
0	—	0	$138.13 \pm 0.40$	0.41	0	$165.75 \pm 0.11$	0.45
5	4	$0.99 \pm 0.40$	$137.22 \pm 0.52$	0.65	$0.49 \pm 0.15$	$167.99 \pm 0.32$	0.52
	25	$1.05 \pm 0.27$	$133.90 \pm 0.77$	0.78	$3.31 \pm 0.62$	$174.38 \pm 0.93$	0.56
10	4	$1.39 \pm 0.13$	$139.08 \pm 0.55$	0.85	$0.90 \pm 0.13$	$180.71 \pm 1.15$	0.58
	25	$14.89 \pm 0.11$	$130.21 \pm 0.36$	0.92	$3.56 \pm 0.39$	$196.12 \pm 2.46$	0.64
20	4	$1.90 \pm 0.27$	$140.18 \pm 0.91$	1.11	$1.63 \pm 0.31$	$187.79 \pm 1.13$	0.67
	25	$20.04 \pm 0.42$	$125.52 \pm 0.61$	1.36	$4.82 \pm 0.60$	$207.44 \pm 0.47$	0.72
30	4	$3.35 \pm 0.26$	$143.19 \pm 1.76$	1.37	$2.32 \pm 0.34$	$194.67 \pm 1.59$	0.71
	25	$25.88 \pm 0.45$	$120.80 \pm 0.69$	1.65	$7.62 \pm 0.73$	$206.77 \pm 4.95$	0.78

由表 1 可知: 在 4 ℃ 条件下储藏 30 d 时, Hpo-FNL 的泄漏率与粒径均无明显变化, MDA 的浓度增加  $0.96 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而 Hpo-FNL-LP 泄漏率无明显变化, 粒径随储藏时间延长稍有增大, MDA 的浓度增加  $0.26 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 在 25 ℃ 条件下储藏 30 d 时, Hpo-FNL 泄漏率高达  $(25.88 \pm 0.45)\%$ , 粒径减小, MDA 的浓度增加  $1.24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 而 Hpo-FNL-LP 泄漏率为  $(7.62 \pm 0.73)\%$ , 粒径随储藏时间延长稍有增大, MDA 浓度仅增加  $0.33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 与 Hpo-FNL 相比, Hpo-FNL-LP 的泄漏率与 MDA 浓度均降低, 稳定性明显提高, 可有效延长 Hpo-FNL 的储藏时间.

2.4 体外溶出评价

根据 2020 版《中华人民共和国药典》四部通则 0931 项溶出度和释放度测定法第 2 法(浆法)<sup>[10]</sup> 进行体外溶出度测定. 制备并精密量取 Hpo-FNL-LP 复溶液与雨生红球藻油乙醇溶液(Hpo-ES)各 10.0 mL, 将其装于预处理好的透析袋(相对分子质量为 14 000)内. 将透析袋分别置于装有 400.0 mL 释放介质的溶出仪中, 释放介质为人工胃液(SGF, 含质量分数为 2.0% 的吐温-80)与人工肠液(SIF, 含质量

分数为 2.0%吐温-80),温度设定为 $(37.0\pm0.5)^\circ\text{C}$ ,搅拌速度设定为  $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ .

依次在 0.25,0.5,1,2,4,8,12,24,48 h 取样,每次取样 2.0 mL 并过  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  微孔滤膜,同时补充等量释放介质,按照节 2.2.1 条件取滤液进行检测,并计算药物累计释放率.体外累计释放曲线,如图 3 所示.图 3 中: $t_r$  为释放时间; $Q$  为累计释放量.由图 3 可知:在 SIF,SGF 中,Hpo-FNL-LP 的释放明显较 Hpo-ES 缓慢( $P<0.05$ ),24 h 释放比较迅速,6 h 时累计释放率分别达到 $(45.89\pm1.83)\%$ 与 $(38.45\pm2.03)\%$ ,48 h 累计释放率达到 $(93.71\pm1.21)\%$ , $(55.15\pm1.47)\%$ .

2.5 体外透皮评价

2.5.1 离体皮肤的准备 将 SD 大鼠断颈处死后,先使用脱毛膏脱掉其腹部皮肤表面的毛发,脱毛过程不宜过长,否则会损伤皮肤,再使用刮毛刀剔除未脱净的毛发.剔除完毕后,剪下大鼠完整的腹部皮肤,将皮下脂肪组织全部切除,并保持整个皮肤的完整性.用生理盐水将皮肤洗净后浸泡其中,放入  $4^\circ\text{C}$  的冰箱内保存,24 h 内使用.

2.5.2 体外透皮试验 使用扩散池法测定体外透皮.将节 2.5.1 得到的大鼠腹部皮肤夹在立式扩散池中间,其角质层面朝释放池,真皮层面朝接受池.释放液分别为 2.0 mL 等质量浓度的 Hpo-FNL-LP 复溶液、雨生红球藻油普通脂质体冻干粉复溶液、雨生红球藻油(Hpo-OS)溶液,而接收液为质量分数 40%的 PEG-400 生理盐水溶液.扩散池温度设定为 $(32.0\pm0.5)^\circ\text{C}$ ,搅拌速度设定为  $300\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ .

分别在 1,2,3,4,6,8,10,12,24 h 吸取接收液 0.7 mL,并过  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  滤膜,同时,补加等量接收液,取滤液在节 2.2.2 色谱条件下进行检测,并计算各时间的单位累计渗透量  $Q_n(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$ .

单位累计渗透量曲线图,如图 4 所示.图 4 中: $t_p$  为渗透时间.由图 4 可知:Hpo-FNL-LP 在前 4 h 内透皮迅速,24 h 后单位累计渗透量达到 $(12.84\pm0.36)\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,显著高于 Hpo-LPO-LP 与 Hpo-OS 组,说明用柔性纳米脂质体包载 Hpo 后更利于 ASTA 透过皮肤.

2.5.3 皮肤滞留试验 将完成体外透皮实验后的大鼠腹部皮肤取出,用生理盐水溶液反复进行冲洗,去除皮肤表面残留的接收液和样品溶液,用滤纸吸干表面水分.剪碎鼠皮,并将其放入 15 mL 离心管中,加入 3.0 mL 甲醇-二氯甲烷溶液,涡旋 30 s 后,水浴超声 30 min, $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,重复 3 次,合并上清液,在节 2.2.2 色谱条件下进行检测,并计算皮肤滞留量  $Q_s(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^2)$ .

皮肤滞留量实验结果,如表 2 所示.表 2 中: $\sigma$  为标准差; $\bar{Q}_s$  为平均滞留量;与 Hpo-OS 组比较,其他组 \* 表示  $P<0.05$ .由表 2 可知:Hpo-FNL-L 较 Hpo-OS 显著增加了 ASTA 的皮肤滞留量( $P<0.05$ ).

表 2 皮肤滞留量实验结果

Tab. 2 Results of skin retention amount test				
组别	$Q_{s1}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	$Q_{s2}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	$Q_{s3}/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	$(\bar{Q}_s\pm\sigma)/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$
Hpo-FNL-LP	4.52	4.38	4.57	$4.49\pm0.10^*$
Hpo-LPO-LP	3.41	3.16	3.56	$3.38\pm0.20$
Hpo-OS	2.37	2.20	2.57	$2.38\pm0.18$

2.6 ASTA 体内质量浓度测定方法

2.6.1 高效液相色谱条件 色谱柱为依利特 SinoChrom ODS-BP( $4.6\text{ mm}\times250.0\text{ mm},5\text{ }\mu\text{m}$ ),流动相为  $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=90:10$ ,检测波长为  $477\text{ nm}$ ,流速为  $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,进样量为  $20\text{ mL}$ .

2.6.2 血浆样品的处理 取  $0.6\text{ mL}$  大鼠眼眶的血,将其置于  $1.5\text{ mL}$  含有肝素钠的离心管(EP)中,

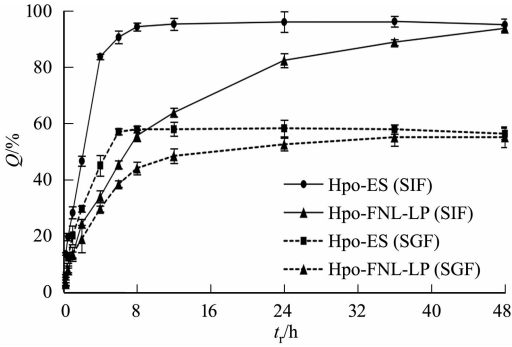


图 3 体外累计释放曲线图

Fig. 3 Cumulative release curves *in vitro*

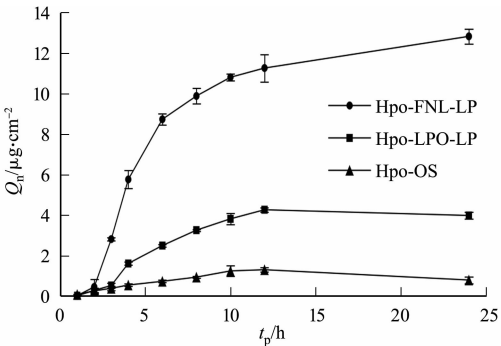


图 4 单位累计渗透量曲线

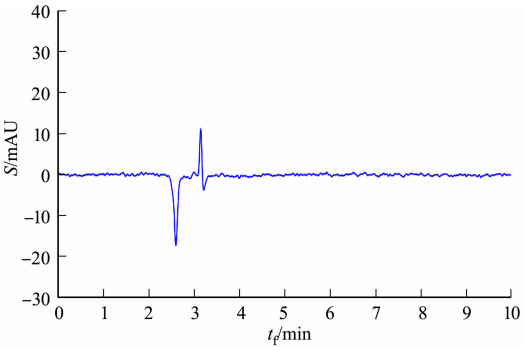
Fig. 4 Unit cumulative permeation curves

在 4 ℃, 3 500 r · min<sup>-1</sup> 条件下离心 10 min, 取上清液, 即得血浆, 放 -20 ℃ 的冰箱储藏备用.

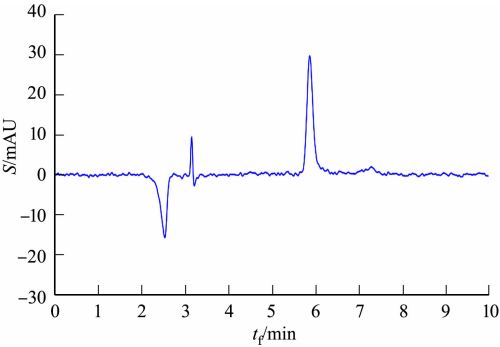
取 200.0 μL 血浆置于 1.5 mL 的离心管中, 加入 1.0 mL 的丙酮-正己烷(V(丙酮) : V(正己烷) = 1 : 1) 溶液, 涡旋 1 min 后, 10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液于 3 mL 离心管中, 继续向残渣沉淀中加入 1.0 mL 丙酮-正己烷溶液, 重复操作一次, 合并上清液. 在 25 ℃ 下真空干燥至完全, 用 50 μL 的甲醇-二氯甲烷溶液复溶, 10 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取 40.0 μL 上清液进样检测.

2.6.3 专属性的考察 将大鼠空白血浆、含药血浆与体内血浆按节 2.6.2 方法处理后, 在节 2.6.1 色谱条件下进样分析, 空白血浆、含药血浆与体内血浆的 HPLC 图, 分别如图 5 所示. 图 5 中: S 为电信号;  $t_f$  为色谱柱流出物的流出时间.

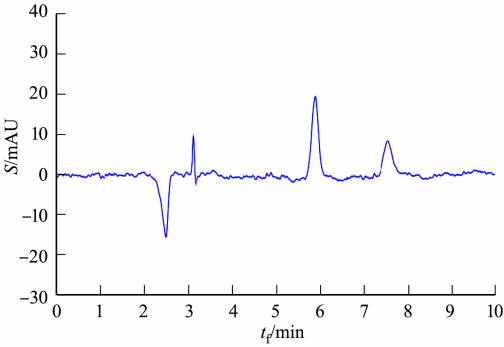
由图 5 可知: ASTA 在 6 min 左右出现峰值, 且血



(a) 空白血浆



(b) 含药血浆



(c) 体内血浆

图 5 大鼠血浆的 HPLC 图  
Fig. 5 HPLC diagram of rat plasma

浆对其测定无干扰, 峰型较好, 表明该色谱条件下的体内分析方法专属性良好.

2.6.4 线性关系 配制质量浓度为 0.012 5, 0.025, 0.075, 0.125, 0.175, 0.250, 0.375, 0.500 μg · mL<sup>-1</sup> 的大鼠含药血浆, 经处理后分别在节 2.6.1 色谱条件下进样检测. 以峰面积为纵坐标(Y), 以 ASTA 质量浓度为横坐标(x) 进行线性回归, 线性回归方程为  $Y=354.37x+4.4665$ ,  $R^2=0.9991$ , 表明体内血浆中 ASTA 在 0.012 5~0.500 0 μg · mL<sup>-1</sup> 质量浓度范围内线性关系良好.

2.6.5 方法的考察 制备质量浓度分别为 12.5, 125.0, 500.0 ng · mL<sup>-1</sup> 的 3 种低、中、高大鼠含药血浆, 按节 2.6.2 方法处理血浆后, 在节 2.6.1 色谱条件下进样分析. 根据色谱条件进样检测, 连续测定了 6 次, 测定其相对标准偏差分别为 1.76%, 0.54%, 1.33%, 连续测定 6 d, 测定其相对标准偏差分别为 3.25%, 1.53%, 0.91%, 表明该方法日内、日间精密度良好.

制备上述 3 种质量浓度大鼠含药血浆各 5 份, 分别于室温存放 12 h, 在 -20 ℃ 的冰箱连续冻融 3 次, 存放一个月后, 按节 2.6.2 方法处理血浆后, 在节 2.6.1 色谱条件下进样检测, 测定其相对标准偏差分别为 0.87%~4.35%, 1.80%~3.91%, 0.81%~3.78%, 表明该方法稳定性良好. 制备上述 3 种质量浓度的含药血浆各 3 份, 按节 2.6.2 方法处理血浆后, 在节 2.6.1 色谱条件下进样检测, 测得血浆中 ASTA 回收率为 100.47%~103.28%, 相对标准偏差为 1.37%~2.27%, 表明该方法回收率良好, 方法较准确, 符合体内方法学的要求.

2.7 动物实验

精密量取适量 ASTA 对照品溶于植物油中, 配制成质量浓度为 3.0 g · L<sup>-1</sup> 的 ASTA-OS; 精密量取适量 Hpo 溶于植物油中, 配制质量浓度为 3.0 g · L<sup>-1</sup> 的 Hpo-OS; 精密量取适量市售虾青素微囊粉 (ASTA-MSP), 用蒸馏水溶解并定容至 100 mL.

将 24 只健康的雄性 SD 大鼠随机分为 4 组 (ASTA-OS 组、Hpo-OS 组、Hpo-FNL-LP 组、ASTA-

MSP 溶液组,  $n=6$ ), 前两组按 ASTA 质量与大鼠的质量比为  $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃给药, 后两组按 ASTA 质量与大鼠的质量比为  $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃给药, 分别在 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60 h 时, 取眼眶血, 按节 2.6.2 方法处理血浆后, 在节 2.6.1 色谱条件下进样检测, 大鼠体内的平均血药质量浓度-时间曲线, 如图 6 所示. 图 6 中: 重复次数  $n=6$ ;  $\rho_{\text{ave}}$  为大鼠体内的平均血药质量浓度.

大鼠药代动力学参数, 如表 3 所示. 表 3 中:  $t_{1/2}$  为半衰期;  $\rho_{\text{max}}$  为血药达峰的质量浓度; AUC 为给药时曲线下面积;  $t_{\text{max}}$  为达峰时间;  $t_{\text{mr}}$  为平均滞留时间;  $F$  为生物利用率; 与 ASTA-OS 组相比, 其他组 a 表示  $P>0.05$ ; 与 Hpo-OS 组相比, 其他组 b 表示  $P<0.01$ ; 与 ASTA-MSP 组相比, 其他组 c 表示  $P<0.01$ . 由表 3 可知: 大鼠口服 Hpo-FNL-LP 与口服 ASTA-OS, Hpo-OS, ASTA-MSP 相比, 消除半衰期  $t_{1/2}$  延长,  $\rho_{\text{max}}$ ,  $t_{\text{max}}$ ,  $\text{AUC}_{0-60}$  均增大, 相对生物利用度高达  $(422.53\pm3.30)\%$ , 显著高于 ASTA-MSP 与 Hpo-OS 组, 说明 Hpo-FNL-LP 有效提高了 ASTA 的口服生物利用度.

表 3 大鼠药代动力学参数

Tab. 3 Pharmacokinetic parameters of rats

参数	ASTA-OS	Hpo-OS	Hpo-FNL-LP	ASTA-MSP
$t_{1/2}/\text{h}$	$13.91\pm0.98$	$15.65\pm1.83^{\text{a}}$	$43.86\pm1.62^{\text{b}}$	$28.28\pm1.73^{\text{b}}$
$\rho_{\text{max}}/\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$116.30\pm1.60$	$130.40\pm6.07^{\text{a}}$	$255.64\pm6.21^{\text{b}}$	$195.47\pm4.54^{\text{b}}$
$t_{\text{max}}/\text{h}$	4	4	6	8
$\text{AUC}_{0-t}/\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	$1\,493.67\pm39.11$	$1\,717.33\pm105.99^{\text{a}}$	$6\,310.33\pm116.47^{\text{b}}$	$4\,344.33\pm62.12^{\text{b}}$
$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{ng}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$	$1\,566.55\pm50.45$	$1\,835.89\pm143.94^{\text{a}}$	$9\,890.26\pm197.31^{\text{b}}$	$5\,538.93\pm165.03^{\text{b}}$
$t_{\text{mr}}/\text{h}$	$34.56\pm1.08$	$37.28\pm2.47^{\text{a}}$	$55.42\pm0.28^{\text{b}}$	$48.93\pm1.16^{\text{b}}$
$F/\%$	—	$115.04\pm8.03$	$422.53\pm3.30^{\text{b,c}}$	$291.04\pm11.06^{\text{b}}$

2.8 数据分析

应用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析, 数据以  $(\bar{Q}_s\pm\sigma)$  表示, 组间数据的比较采用单因素方差分析和 T 检验,  $P<0.05$  认为差异具有统计学意义.

3 讨论

脂质体为液体制剂, 在长期储藏中存在磷脂氧化水解、芯材药物泄露、颗粒聚集产生沉淀等<sup>[11]</sup>现象, 文献[12]表明, 将脂质体通过冷冻干燥法固化成冻干粉, 可有效提高其稳定性. 稳定性实验结果表明, 与冻干前的 Hpo-FNL 相比, Hpo-FNL-LP 的泄漏率与脂质氧化程度明显降低, 可有效延长 Hpo-FNL 的储藏时间.

体外溶出的实验结果表明, Hpo-FNL-LP 的释放明显较 Hpo-ES 缓慢 ( $P<0.01$ ), 不存在突释现象. 这是由于体外释放曲线最符合一级动力学, 具有一定缓释效果, 且释放机制主要以 Fick 扩散机制为主<sup>[13-14]</sup>. 体外透皮与皮肤滞留量的实验结果表明, Hpo-FNL-LP 在 24 h 的皮肤累计渗透量为  $(12.84\pm0.36)\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 皮肤滞留量为  $(4.49\pm0.10)\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ . 与 Hpo-OS 与 Hpo-LPO-LP 相比, Hpo-FNL-LP 显著提高了 ASTA 的皮肤渗透性且增加了 ASTA 的皮肤滞留量, 有利于其作为外用皮肤制剂, 可预防皮肤老化与损伤, 提高皮肤对紫外线的免疫功能.

口服药动力学研究发现, 即使 ASTA-OS 与 Hpo-OS 给药浓度是其他制剂的 6 倍, Hpo-FNL-LP 与 ASTA-MSP 的  $\rho_{\text{max}}$ ,  $t_{1/2}$  和  $\text{AUC}_{0-60}$  仍显著大于 ASTA-OS 与 Hpo-OS ( $P<0.01$ ), 表明两种制剂均极大延长了 ASTA 的体内吸收时间, 并提高了吸收能力, 在体内实现缓慢的释放, 克服了 ASTA 口服生物利用度低的缺点, 且 Hpo-FNL-LP 的相对生物利用度优于 ASTA-MSP. 原因可能是 Hpo 及其有效成

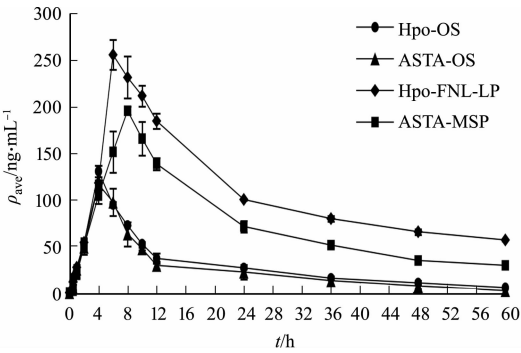


图 6 大鼠体内的平均血药质量浓度-时间曲线  
Fig. 6 Mean plasma mass concentration-time curve in rats

分 ASTA 难溶于水,体内代谢快,不易被胃肠吸收.制成 Hpo-FNL-LP 或 ASTA-MSP 后,ASTA 被脂膜或囊壳包裹,在水中以胶束的形式分散,极大提高了其水溶性,促进其吸收.其中,Hpo-FNL-LP 特有的磷脂双分子层膜是一种类生物膜,具有极强的生物相容性,且其粒径比 ASTA-MSP 小,更容易分散,因此,生物利用度更高,将其以口服给药的方式应用,具有更广阔的前景.

制备的 Hpo-FNL-LP 显著提高了 Hpo 及其有效成分 ASTA 的水溶性、稳定性、皮肤渗透性,以及口服生物利用度,为功能性油脂与 ASTA 纳米载体的研究开发与应用提供参考.下一步将对其安全性进行研究,以确保 Hpo-FNL-LP 可安全地应用于各种领域中.

参考文献:

[1] FAKHRI S,ABBASZADEH F,DARGAHI L,*et al.* Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits[J]. *Pharmacognosy Reviews*,2018,136:1-20. DOI:10. 1016/j. phrs. 2018. 08. 012.

[2] SHAH M,YUANMAI L,CHENG J J,*et al.* Astaxanthin-producing green microalga haematococcus pluvialis: From single cell to high value commercial products[J]. *Frontiers in Plant Science*,2016,7: 531-541. DOI:10. 3389/fpls. 2016. 00531.

[3] SANZO G D,MEHARIYA S,MARTINO M,*et al.* Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin, lutein, and fatty acids from haematococcus pluvialis microalgae [J]. *Marine Drugs*, 2018, 16 (9): 334. DOI: 10. 3390/md16090334.

[4] BUSTAMANTE A,MASSON L,VELASCO J,*et al.* Microencapsulation of haematococcus pluvialis oleoresins with different fatty acid composition: Kinetic stability of astaxanthin and alpha-tocopherol[J]. *Food Chemistry*,2016, 190:1013-1021. DOI:10. 1016/j. foodchem. 2015. 06. 062.

[5] 邹书慧. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取雨生红球藻中虾青素等有效成分的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古工业大学,2009. DOI:10. 7666/d. D403239.

[6] PARK S A,AHN J B,CHOI S H,*et al.* The effects of particle size on the physicochemical properties of optimized astaxanthin-rich Xanthophyllomyces dendrorhous-loaded microparticles [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014,55(2):638-644. DOI:10. 1016/j. lwt. 2013. 09. 021.

[7] CEVC G,VIERL U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal[J]. *Journal Control Release*,2010,141(3):277-299. DOI:10. 1016/j. jconrel. 2009. 10. 016.

[8] KHATOON M,SHAH KU,DIN FU,*et al.* Proniosomes derived niosomes: Recent advancements in drug delivery and targeting[J]. *Drug Delivery*,2017,24(1):56-69. DOI:10. 1080/10717544. 2017. 1384520.

[9] 王维,黄巧玲. 柔性脂质体在经皮给药系统中的研究进展[J]. *中国现代应用药学*,2021,38(4):495-502. DOI:10. 13748/j. cnki. issn1007-7693. 2021. 04. 021.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.

[11] 王永利,王立华,张江伟,等. 大黄酚冻干脂质体的制备工艺研究[J]. *中草药*,2013,44(8):960-964. DOI:10. 7501/j. issn. 0253-2670. 2013. 08. 008.

[12] 陈亮. 杜仲籽油脂质体制备及其理化性质研究[D]. 吉首:吉首大学,2020. DOI:10. 27750/d. cnki. gjsdx. 2020. 000096.

[13] LIANG Li,ZHANG Xiaoyun,WANG Xingguo,*et al.* Influence of dairy emulsifier type and lipid droplet size on GASTAintestinal fate of model emulsions: *In vitro* digestion study[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2018,66(37):9761-9769. DOI:10. 1021/acs. jafc. 8b02959.

[14] DASH S,MURTHY P N,NATH L,*et al.* Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems [J]. *Acta Poloniae Pharmaceutica*,2010,67(3):217. DOI:10. 1038/aps. 2010. 43.

(责任编辑: 陈志贤      英文审校: 刘源岗)