叶黄素酯冻干亚微乳的制备及体内外评价

马　晴[1,3]，金美熹[2,3]，王晓丽[3]，甘　勇[1,3,4]*

（1. 南京中医药大学新中药学院，江苏南京 210023；2. 中国药科大学药学院，江苏南京 211198；
3. 中国科学院上海药物研究所，新药研究国家重点实验室药物制剂研究中心，上海 201203；4. 中国科学院大学，北京 100049）

摘要：采用高速剪切 - 高压均质法制备了叶黄素酯（**1**）亚微乳，再进一步冷冻干燥制成 **1** 冻干亚微乳（F-**1**-SME）。所得 F-**1**-SME 复溶后均匀性良好，平均粒径为（181.33±1.29）nm，包封率为（97.17±0.79）%；在高温、高湿和强光试验中均保持着良好的稳定性（10 d 内 **1** 含量下降≤ 5%），在模拟胃肠液中至少可稳定 24 h。并且，F-**1**-SME 经体外模拟消化后，仍有（72.95±0.05）%的 **1** 溶于水相中，说明亚微乳暴露于胃肠液后，对 **1** 仍具有一定的增溶作用，有利于其口服递送。大鼠药动学试验结果显示，按同等剂量灌胃给药后，**1** 冻干乳剂组大鼠血浆中的 c_{max} 和 $AUC_{0\rightarrow 24\,h}$ 分别为 **1** 市售片剂组的 2.7 和 2.8 倍，提示 F-**1**-SME 的口服生物利用度显著提高。在大鼠视网膜蓝光损伤模型中，口服 F-**1**-SME 可有效保护视网膜细胞，说明 **1** 冻干乳剂在缓解视网膜蓝光损伤方面具有良好的应用前景。

关键词：叶黄素酯；亚微乳；冷冻干燥；口服生物利用度；稳定性；蓝光防护

中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2023）10-1450-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.10.008

Preparation, *in vitro* and *in vivo* Evaluation of Lutein Ester Freeze-dried Submicron Emulsion

MA Qing[1,3], JIN Meixi[2,3], WANG Xiaoli[3], GAN Yong[1,3,4]*

(*1. School of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023; 2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; 3. State Key Lab. of Drug Research and Center of Pharmaceutics, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049*)

ABSTRACT: Lutein ester (**1**) submicron emulsion was prepared via high-speed shear high-pressure homogenization method, and further combined with freeze-drying method to prepare **1** freeze-dried submicron emulsion. The freeze-dried submicron emulsion of **1** (F-**1**-SME) demonstrated good uniformity, with a particle size of (181.33±1.29) nm and an encapsulation efficiency of (97.17±0.79)%. The F-**1**-SME maintained good stability (with a content decrease no more than 5% within 10 days) under high temperature, high humidity, and strong light conditions, and it was stable in simulated gastrointestinal fluid for at least 24 hours. After being treated with simulated gastrointestinal fluid, (72.95±0.05)% of **1** was detected dissolving in the aqueous phase, indicating that the submicron emulsion still had a certain solubilizing effect on **1** after exposure to gastrointestinal fluid, which was conducive to enhancing oral absorption. Furthermore, pharmacokinetic test results of F-**1**-SME in rats showed that the c_{max} in rat plasma and $AUC_{0\rightarrow 24\,h}$ of F-**1**-SME group were 2.7- and 2.8-times higher than those of the commercially available tablets group after gavage administration of the same dose, indicating a significant increase in the oral bioavailability of F-**1**-SME. Finally, in a rat model of retinal blue light-induced damage, oral administration of the F-**1**-SME demonstrated effective protection of retinal cells, indicating its potential for protecting retinal from blue light damage.

Key Words: lutein ester; submicron emulsion; freeze-drying; oral bioavailability; stability; blue light protection

叶黄素是一种天然的含氧类胡萝卜素，也是人眼视网膜黄斑区域的重要色素，其含有的独特紫罗酮环二羟基结构，可作为蓝光过滤器和淬灭单线态氧的强抗氧化剂，具有抗氧化、保护视网膜等

收稿日期：2023-03-09

作者简介：马　晴（1997—），女，硕士研究生，专业方向：脂质制剂的设计及其在药物递送中的应用。

通信作者：甘　勇（1975—），男，研究员，博士生导师，从事药物载体高效递送的物理药剂学研究，新型功能性药物载体设计及其克服关键生理屏障机制的研究，具有显著临床价值高端创新制剂的转化研究。

E-mail：ygan@simm.ac.cn

生物学作用[1—3]。人体无法自行合成叶黄素及其酯类，主要通过饮食或膳食补充剂进行补充[4]。在植物组织中，叶黄素主要与脂肪酸结合并以叶黄素酯（lutein ester，**1**）的形式存在，**1** 在人体内的代谢过程中再次转化为叶黄素[5]。文献[5—6]报道：**1** 晶体不溶于水，室温下微溶于油，在消化道内难以完全释放，口服生物利用度较低；同时，**1** 结构内有一条含 18 个碳原子的共轭长链和位于两侧的 2 个被酯化的紫罗酮环，易受光、热、氧、湿等的影响而发生降解，从而失去生物活性。

通过设计高效口服制剂可提高 **1** 的稳定性和口服吸收效率，从而改善其临床应用。目前，国内上市的含 **1** 制剂主要为保健品及食品，已上市的 **1** 口服剂型有软胶囊、片剂、口服液等。但上述固体和液体制剂均存在口服生物利用度低和药物稳定性差的问题。近年来，亚微乳等纳米递送系统在改善口服药物水溶性、吸收效果方面表现出巨大潜力[6—8]，有望用于 **1** 类化合物的高效口服递送。然而，亚微乳属于热力学不稳定系统，在长期放置过程中会发生物理性质（如分层、絮凝，甚至破乳）和化学性质（如磷脂及油相发生氧化、水解等反应而生成游离脂肪等物质）的变化，且 **1** 结构中含有酯键，对湿不稳定、易降解。冷冻干燥[9]是一种基于低温和低压条件进行升华、脱水的技术，已被广泛用于制备组织工程和生物应用的多孔材料，并在制药工业中用于提高不稳定药物的稳定性[10]。冻干亚微乳有望解决药物易水解、贮存稳定性较差的问题，从而提高制剂中 **1** 的稳定性。冻干亚微乳可以粉末形式直接口服，遇水后也可快速复溶成均匀乳剂，其独特的磷脂单分子层乳滴，可提高药物的吸收效率和生物利用度[7]。

因此，本研究先采用高速剪切 - 高压均质法制备了 **1** 亚微乳（**1**-SME），再制备冻干亚微乳（F-**1**-SME），表征其形貌、粒径、稳定性，并评价体外模拟消化时的基本理化性质和大鼠体内的药动学与药效学特征。

1 仪器与试药

T25 型高速剪切机（广州 IKA 有限公司）；APV2000 型高压均质机（德国 APV 有限公司）；Pilot1-4M 型冻干机（博医康仪器有限公司）；ZetaSizer Nano ZS 型粒度仪（英国马尔文仪器有限公司）；EXPRESS 20 型超纯水仪（美国 Millipore 有限公司）；1260 型高效液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；T50 型电位滴定仪（瑞士 Mettler Toledo 有限公司）；Tecnai G2 Spirit 120 kV 型透射电镜（美国 FEI 有限公司）；Allegra 64R 型高速冷冻台式离心机（美国 Beckman Coulter 有限公司）。

1 原料药［欧米埃（OmniActive）健康科技有限公司，含量 15%，批号 0000055552］；叶黄素标准品（上海诗丹德生物技术有限公司批号，含量 98%，批号 10935）；汤臣倍健® 蓝莓叶黄素酯咀嚼片（汤臣倍健股份有限公司，规格每片含 **1** 3.4 mg，批号 20220702）；磷脂（上海太伟药业股份有限公司）；藻油［挪亚圣诺（太仓）生物饲料有限公司］；蔗糖脂肪酸酯（日本三菱工业株式会社）；牛黄胆酸钠（上海源叶生物科技有限公司）；海藻糖（日本林原株式会社）；丙二醛（MDA）试剂盒（成都瀚鸿生物科技有限公司，批号 230103）；超氧化物歧化酶（SOD）检测试剂盒（北京盒子生工科技有限公司，批号 10122121510）；谷胱甘肽过氧化物酶（北京雷根生物技术有限公司，批号 0104A23）。

Sprague-Dawley（SD）大鼠［雄性，SPF 级，(200±20) g，购自上海斯莱克实验动物有限公司，生产许可证编号 SCXK（沪）2017-005］，由中国科学院上海药物研究所动物实验中心提供并饲养，所有的动物试验均符合上海药物研究所实验动物管理与使用委员会（Institutional Animal Care & Use Committee，IACUC）的规定。

2 方法与结果

2.1 F-**1**-SME 的制备

称取处方量（以下均为质量分数）的 **1** 原料药（0.16%）、藻油（2%）、抗氧化剂（0.01%），混匀，预热至 70 ℃；另称取磷脂（0.60%）、蔗糖脂肪酸酯（0.15%）溶解于处方量的水相（97.08%）中，预热至 70 ℃。在高剪切力作用下，将油相缓慢加至水相中，70 ℃下以 7 000 ～ 7 500 r/min 的转速剪切，制备粗乳，接着采用高压均质机以 50 ～ 60 MPa 的压力将所得粗乳均质，得 **1**-SME。

以海藻糖为冻干保护剂进行亚微乳的冻干。先在上述亚微乳中加入 10%的海藻糖，轻轻振摇使溶

解，然后置冻干机中，照表 1 中的程序进行冷冻干燥。所得 F-**1**-SME 密封后于 4 ℃、避光环境保存。

表 1　制备 F-1-SME 的冷冻干燥程序

Tab.1　Freeze-drying Process for Preparation of the F-**1**-SME

阶段名称	区段	温度/℃	升温或降温斜率/(℃·min^{-1})	保温时间/min	真空度/Pa
预冻	1	－45.0	0	240	/
升华干燥	1	－35.0	30	1 200	9
	2	－10.0	30	240	9
	3	0.0	30	180	0
	4	10.0	30	180	0
	5	20.0	30	180	0

2.2　F-1-SME 体外基本性能评价

2.2.1　外观形貌及复溶特性

干燥后的 F-**1**-SME 外观如图 1 所示，该冻干粉末色泽均匀。取冻干粉末 0.3 g，加入与原液态亚微乳等量的去离子水 6 mL，振摇使复溶，观察到粉末在 5 s 内迅速分散均匀，得到橘黄色、均一性良好的亚微乳液（以下简称“复溶液”）。



A　　B　　C

A—**1**-SME；B—F-**1**-SME；C—F-**1**-SME 复溶液。

图 1　1-SME 冻干前、冻干后和复溶后的外观

Fig.1　Appearances of **1**-SME before Freeze-drying, after Freeze-drying, and after Reconstruction

2.2.2　平均粒径及分布、电位

分别吸取一定量的 **1**-SME 和 F-**1**-SME 样品，用去离子水稀释或复溶并稀释至澄清透明，利用粒度仪在 25 ℃下测定平均粒径、多分散性指数（PDI）和 ζ 电位，重复测定 3 次，结果如表 2 所示。

结果显示，二者均具有较好的稳定性，粒度分布均一。此外，复溶液中亚微乳乳滴的粒径和 ζ 电位测定值与冻干前的 **1**-SME 无显著性差异，表明冻干过程没有破坏亚微乳的结构。

表 2　1-SME 和 F-1-SME 的粒度分布和 ζ 电位

($\bar{x}\pm s$，n=3)

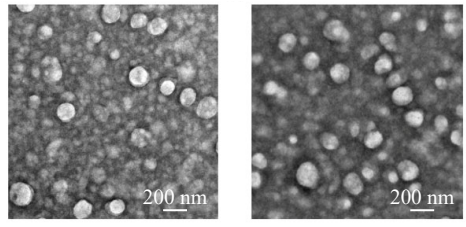
Tab.2　Particle Size Distribution and ζ Potential of **1**-SME and F-**1**-SME ($\bar{x}\pm s$, n=3)

制剂	粒径/nm	PDI	ζ电位/mV
1-SME	181.07±0.59	0.18±0.04	－40.63±1.11
F-**1**-SME复溶液	181.33±1.29	0.17±0.01	－37.47±1.05

2.2.3　透射电镜（TEM）下的形态

利用 TEM 观察 **1**-SME 和 F-**1**-SME 复溶后的显微形态，各自吸取少量样品滴加至铜网上，停留 1 min 后吸弃样品，滴加少量乙酸铀溶液负染，停留 1 min 后吸弃，于红外灯下干燥 5 min 后置通风处自然干燥，然后置透射电镜下观察微观形态并拍照，加速电压为 120 kV。

结果如图 2 所示，**1**-SME 和 F-**1**-SME 复溶液中的乳滴在 TEM 下均呈球形，形态完整；粒径均在 180 nm 左右，粒度分布均一，与上述动态光散射法测定结果相近。上述试验表明，冻干粉末复溶后，乳滴形态没有发生明显改变。



A　　B

图 2　1-SME（A）和 F-1-SME 复溶后（B）的 TEM 照片（×50 000）

Fig.2　TEM Images of **1**-SME (A) and Reconstructed F-**1**-SME (×50 000)

2.2.4　包封率和载药量

用混合溶剂［v（正己烷）∶v（乙酸乙酯）=7∶3］配制叶黄素质量浓度为 40 μg/mL 的叶黄素对照品溶液。

叶黄素的含量测定：色谱柱 Agilent ZORBAX® 硅胶柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相 正己烷与乙酸乙酯（体积比 70∶30）；检测波长 445 nm；

柱温 40 ℃；流速 1.5 mL/min；进样量 20 μL。在本色谱条件下，叶黄素的峰面积 A 与质量浓度 c 线性关系良好，线性回归方程为 A=123.5c+16.14（R^2=1.000 0）。本法线性范围为 7.92 ～ 79.20 μg/mL；低、中、高浓度样品中叶黄素的回收率分别为 100.7%、102.1%和 99.70%，RSD 分别为 0.26%、0.71%和 0.27%；低、中、高浓度叶黄素对照品溶液的日内 RSD 分别为 1.70%、0.12%和 1.03%，日间 RSD 分别为 1.90%、1.20%和 1.30%。上述结果表明，建立的 HPLC 法线性、回收率和精密度良好，可用于 **1** 的定量分析。

精密吸取 **1**-SME 和经原处方比例去离子水复溶的 F-**1**-SME 供试品各 2 mL，加入混合溶剂［v（正己烷）：v（异丙醇）=1 ：2］15 mL 破乳后旋干。加入 HEAT 试剂［将正己烷、无水乙醇、丙酮和甲苯按体积比 10 ：6 ：7 ：7 混匀，即得］6 mL，充分溶解残渣，加入 40%氢氧化钾的甲醇溶液 0.5 mL，置 56 ℃水浴中皂化 12 min，然后冷却至室温并转移至 20 mL 量瓶中，加入正己烷 6 mL 摇匀，再用 10%无水硫酸钠溶液定容，剧烈振摇 2 min，于暗处静置 1 h，使分层。取上层清液过 0.45 μm 滤膜，取滤液采用 HPLC 法进行含量分析（全程避光），记录色谱峰面积 A_0。

精密移取上述 **1**-SME 和复溶后的 F-**1**-SME 供试品各 2 mL，经 0.45 μm 滤膜过滤，同上进行水解。采用 HPLC 法进行含量分析（全程避光），记录色谱峰面积 A_1。

精密吸取上述供试品各 2 mL，离心（6 000×g）10 min 后取上层清液，采用 HPLC 法进行含量分析（全程避光），记录色谱峰面积 A_2。

照下式计算包封率（EE）和载药量（DL）。

$$EE=(A_1-A_2)/A_0\times100\%$$

DL= 包封药量 / 制剂总量 ×100%

经重复测定 3 次，计算得 **1**-SME 的包封率为（98.00±1.02）%，载药量为（0.024±0.002）%；用原处方比例去离子水复溶的 F-**1**-SME 包封率为（97.17±0.79）%，载药量为（0.023±0.001）%。可见，冻干前后载药量和包封率没有发生显著变化。

2.2.5 稳定性试验

2.2.5.1 影响因素试验

高温试验：分别取 **1**-SME 和 F-**1**-SME 适量，置棕色西林瓶中，充氮密封后置恒温恒湿箱中，设定为 60 ℃，放置 10 d，于 0、5、10 d 时取样检测。

高湿试验：分别取 **1**-SME 和 F-**1**-SME 适量，置棕色西林瓶中，充氮密封后置恒湿密闭的干燥器（25 ℃，相对湿度 92.5%）中，放置 10 d，于 0、5、10 d 时取样检测。

强光照射试验：分别取 **1**-SME 和 F-**1**-SME 适量，置棕色西林瓶中，充氮密封后置强光稳定性试验箱中，设定光照度为（4 500±500）lx，放置 10 d，于 0、5、10 d 时取样检测。

以上影响因素试验中，除高温和强光照射试验中放置 10 d 的 **1**-SME 样品的颜色转变为淡黄色以外，其他 **1**-SME 和 F-**1**-SME 复溶液样品的外观未发生变化，均呈现为橘黄色、均匀的乳液；其他评价指标的测定结果如表 3 所示。

试验结果显示，F-**1**-SME 复溶液的粒径和 ζ 电位未发生显著变化，表明其在高温、高湿和强光条

表 3 影响因素试验结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Results of the Stress Tests（$\bar{x}\pm s$, n=3）

试验项目	放置时间/d	粒径/nm		ζ电位/mV		**1**含量/%	
		1-SME	F-**1**-SME复溶液	**1**-SME	F-**1**-SME复溶液	**1**-SME	F-**1**-SME复溶液
初始	0	180.5±1.0	181.4±0.8	－40.63±1.11	－37.47±1.05	97.02±0.01	96.39±0.02
高温试验	5	182.5±0.9	181.5±0.4	－39.24±2.12	－37.24±1.24	84.13±0.56	95.52±0.72
	10	185.5±0.7[1)]	181.7±0.3	－38.45±1.05	－38.52±1.20	61.71±0.42[3)]	94.31±0.76
高湿试验	5	180.7±0.8	181.8±0.4	－40.12±1.11	－37.52±1.32	93.70±0.35	96.35±0.26
	10	180.6±1.0	181.6±0.5	－39.54±2.42	－38.24±0.82	84.47±0.33[2)]	95.80±0.34
强光试验	5	181.6±0.6	181.5±0.5	－39.68±1.25	－37.80±0.65	93.27±1.19	96.21±0.47
	10	182.4±0.9	181.8±0.4	－39.72±1.10	－38.25±1.26	83.04±0.81[2)]	95.53±0.75

注：与 F-**1**-SME 复溶液相比，[1)] P<0.05，[2)] P<0.001，[3)] P<0.000 1。

件下仍保持良好的稳定性。高温条件下放置 10 d，F-**1**-SME 复溶液中 **1** 的含量为 (94.31±0.76)%，而 **1**-SME 中 **1** 的含量降幅约 35%；高湿条件下放置 10 d，F-**1**-SME 复溶液中 **1** 的含量为 (95.80±0.34)%，**1**-SME 中 **1** 的含量降幅约 13%；强光条件下放置 10 d，F-**1**-SME 复溶液中 **1** 的含量为 (95.53±0.75)%，而 **1**-SME 中 **1** 的含量降幅约 14%。上述结果表明，将 **1**-SME 进一步制备成 F-**1**-SME，有利于提高 **1** 的稳定性。

2.2.5.2　在模拟胃肠道消化液中的稳定性考察

首先，根据《中华人民共和国药典》2020 年版要求配制模拟胃液（SGF）和模拟肠液（SIF）。取稀盐酸 8.2 mL，加水约 400 mL 与胃蛋白酶 5 g，摇匀后，加水稀释成 500 mL，即得人工胃液。取磷酸二氢钾 3.4 g，加水 250 mL 使溶解，用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 6.8；另取胰酶 5 g，加水适量使溶解，将两液充分混匀后，加水稀释至 500 mL，即得人工肠液。将 F-**1**-SME 0.1 g 分别加至上述 2 种缓冲液介质 8 mL 中，可观察到粉末快速溶解。接着，将样品置恒温摇床中，以 100 r/min 的转速进行孵育，分别于 0、2、4、8、12、24 h 时取样，测定混合体系中乳滴的平均粒径和 PDI。

试验结果如图 3 所示，24 h 内 F-**1**-SME 复溶液在模拟胃肠道消化液中的粒径及 PDI 虽略有增大，但均无显著性变化。这表明 F-**1**-SME 在模拟胃肠道消化液中均保持着较高的稳定性，有利于 **1** 的口服递送。

2.2.6　体外消化特征

体外模拟消化试验已被证明可较好地模拟脂质制剂在胃肠道中的药物释放行为，并用于预测其在体内的吸收行为[11]。本研究采用 pH-stat 法进行 F-**1**-SME 的体外模拟肠道消化。脂质在消化过程中会产生游离脂肪酸，氢氧化钠可不断中和脂肪酸，维持 pH 值为 7.50±0.05。首先开启滴定仪，建立 pH 自动滴定方法。将预热至 37 ℃的缓冲液（分别称取 Tris 1.211 4 g、氯化钠 1.753 2 g、$CaCl_2$ 0.111 0 g、牛磺胆酸钠 0.537 7 g、磷脂 0.141 1 g，加入纯水 100 mL，超声至充分溶解，以马来酸水溶液调至 pH 7.50±0.05）10 mL、水 9 mL 和 F-**1**-SME 粉末 0.1 g 加至滴定杯中，可以观察到 F-**1**-SME 迅速复溶，水浴搅拌并预热至 37 ℃，预滴定至 pH 值为 7.50±0.05。加入 10%脂肪酶溶液 1 mL，启动消化反应。以 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液滴定，使体系 pH 值维持在 7.50±0.05，每间隔 5 min 记录消耗的氢氧化钠溶液体积，绘制消化曲线，如图 4A 所示，可见 F-**1**-SME 消化 16 min 后基本达到平台期。

待反应停止后，取下滴定杯，加入适量草酸盐抑制脂肪酶的活性，然后在快速搅拌状态下，取消化液 1 mL，离心后取上清液置电镜下观察，结果如图 4B 所示，可见消化后大部分乳滴仍能维持原有形态，小部分呈不规则聚集形态。

另吸取消化液 5 mL，立即进行高速离心

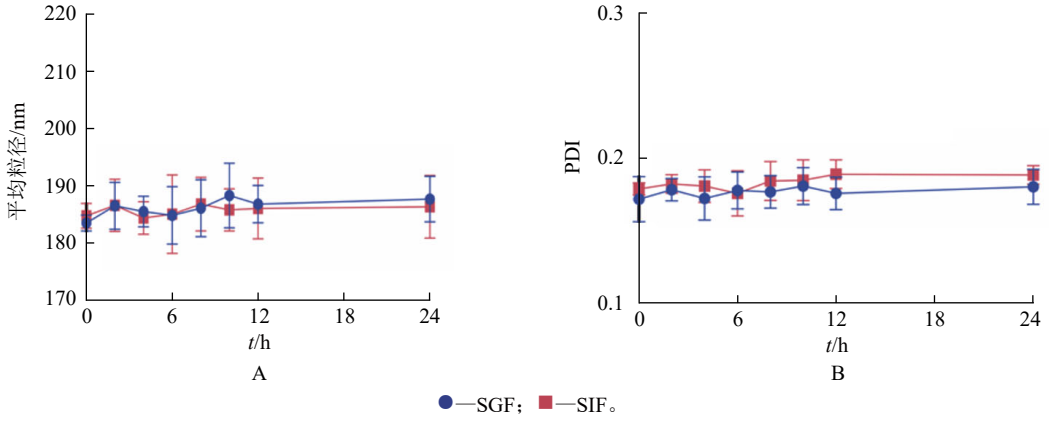


图 3　24 h 内 F-1-SME 在 SGF 和 SIF 中平均粒径（A）和 PDI（B）的变化（*n*=3）

Fig.3　Changes of Average Particle Size (A) and PDI (B) of F-**1**-SME in SGF and SIF within 24 h (*n*=3)

(9 000×*g*)10 min，分别收集上清液和沉淀，以HPLC法测定各相中**1**的含量。结果表明，有(72.95±0.05)%的**1**仍溶解在消化液中。制剂形式会影响药物在胃肠道消化液的分配行为，继而影响药物最终的口服生物利用度。**1**难溶于水，进入胃肠液后易产生沉淀，口服生物利用度低。一般来说，脂质制剂经过消化后，活性成分以溶解状态存在于胃肠道中，有利于吸收。上述试验结果提示F-**1**-SME进入人体胃肠道后，大部分**1**仍能呈现溶解状态而被机体吸收，有助于提高口服生物利用度。

2.3 F-**1**-SME的体内药动学评价

进一步考察F-**1**-SME在大鼠体内的药动学特征，以验证F-**1**-SME改善**1**口服吸收的实际效果。已证实**1**在体内的消化和吸收过程中会被水解成叶黄素单体。本研究以**1**市售片剂（汤臣倍健®蓝莓叶黄素酯咀嚼片，**1**-TAB）和F-**1**-SME一次灌胃后血液中叶黄素的药时曲线为参比，评价F-**1**-SME的口服相对生物利用度。

2.3.1 体内叶黄素分析方法的建立

2.3.1.1 色谱条件

色谱柱 Agilent ZORBAX硅胶柱（4.6 mm×150 mm，5 μm）；流动相 正己烷与乙酸乙酯（体积比70∶30）；检测波长445 nm；柱温40 ℃；流速1.5 mL/min；进样量20 μL。

2.3.1.2 血浆样品处理方法

取洁净的干燥具塞玻璃试管，加入血浆300 μL，再加入含2,6-二叔丁基对甲酚（BHT，作抗氧剂）的甲醇溶液［将BHT 12.5 mg置500 mL量瓶中，用甲醇溶解并定容，即得］0.4 mL，振摇30 s；然后加入流动相0.6 mL，振摇10 min，离心（2 400×*g*）6 min，收集上清液，置已加入少量无水硫酸钠粉末的洁净进样小瓶中（全程避光操作）。

2.3.1.3 线性试验及方法学考察

精密称取叶黄素对照品10 mg，置250 mL量瓶中，加流动相溶解并定容，作为对照品贮备液；用流动相稀释成叶黄素质量浓度分别为0.24、1、4、8和20 μg/mL的线性标准溶液。取洁净的干燥具塞玻璃试管，分别加入上述线性标准溶液各200 μL，氮气吹干后，加入空白血浆300 μL，涡旋混合1 min，照“**2.3.1.2**”项下方法操作，再照“**2.3.1.1**”项下色谱条件进样分析。结果表明，叶黄素质量浓度*c*在0.36～57.60 μg/mL范围内与其峰面积*A*线性关系良好，标准曲线方程为*A*=30.542*c*+10.582（R^2=0.999 9）。低、中、高浓度（1.40、11.20和28.00 μg/mL）样品中叶黄素的回收率分别为108.5%、107.0%和108.5%，表明此方法符合生物样品分析的要求。

2.3.2 动物试验

SD大鼠在试验前一晚称重，然后作禁食、不禁水处理。按体质量分为2组（分别为**1**-TAB对照组和F-**1**-SME试验组），每组6只，保证每组大鼠体质量均值相似。分别将**1**-TAB（先用研钵研磨成粉末）和F-**1**-SME制成3 mg/mL的水混悬液或乳液，给药剂量为10 mL/kg（相当于**1** 30 mg/kg），进行灌

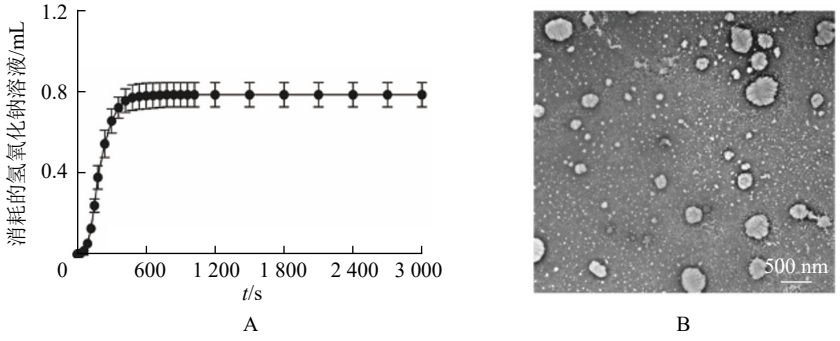


图4 F-1-SME的体外消化曲线（A；*n*=3）**及其消化后的TEM照片**（B；×50 000）

Fig.4 *In vitro* Digestion Profile of F-**1**-SME (A; *n*=3) and a TEM Image of F-**1**-SME after *in vitro* Digestion (B; ×50 000)

胃给药。

将 1.5 mL 离心管、取血毛细管等提前用含 1% 肝素钠的 PBS 润洗。分别在给药后 0、1、2、3、4、6、8、12 及 24 h 时从大鼠眼眶取血 0.75 mL，于 4 ℃ 离心（1 500×*g*）10 min，取上清液，照“**2.3.1.2**”项下方法处理后将进样分析。通过 GraphPad（Version 9）软件计算平均值并绘制大鼠血浆药物浓度 - 时间曲线，结果如图 5 所示。2 种 **1** 制剂的体内药动学参数结果如表 4 所示。

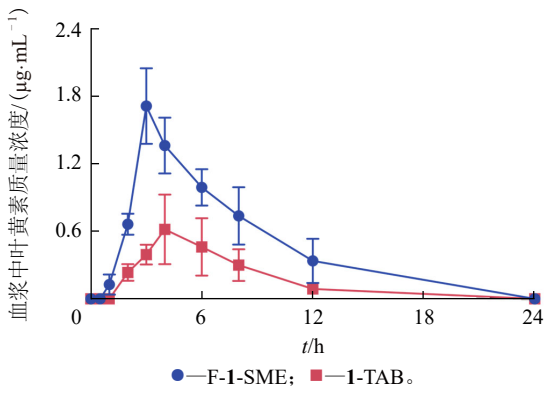


图 5　大鼠灌胃给予 1-TAB 或 F-1-SME 后血浆中的药 - 时曲线（*n*=6）

Fig.5　Plasma Drug Concentration-time Curves of Rats after Gavage Administration of **1**-TAB or F-**1**-SME (*n*=6)

表 4　大鼠灌胃给予 1-TAB 或 F-1-SME 后叶黄素的药动学参数（$\bar{x}\pm s$，*n*=6）

Tab.4　Pharmacokinetic Parameters of Lutein in Rats after Gavage Administration of **1**-TAB or F-**1**-SME ($\bar{x}\pm s$, *n*=6)

药动学参数	**1**-TAB	F-**1**-SME
$AUC_{0\to 24\,h}$/(μg·h·mL^{-1})	4.09±1.61	11.40±2.50[1)]
t_{max}/h	4.40±0.89	3.40±0.55
c_{max}/(μg·mL^{-1})	0.64±0.28	1.72±0.32[1)]
F_{rel}/%	—	279

注：与 **1**-TAB 组相比，[1)]*P*<0.001。

药动学试验结果显示，F-**1**-SME 组的 c_{max} 和 $AUC_{0\to 24\,h}$ 分别约为 **1**-TAB 组的 2.7 和 2.8 倍，说明 **1** 经乳化、冻干后可显著提高口服生物利用度。

2.4　F-**1**-SME 的体内药效学评价

本试验采用发光二极管（light-emitting diode，LED）蓝光暴露建立 SD 大鼠视网膜损伤模型。大鼠适应性饲养 1 周后，随机分为 6 组（每组 10 只）：空白对照组，模型对照组，**1**-TAB 组，低、中、高剂量 F-**1**-SME 组。空白对照组和模型对照组给予水，给药容积为 10 mL/kg；**1**-TAB 组灌胃给予 **1**-TAB 的水混悬液（3 mg/mL），给药容积为 10 mL/kg，**1** 剂量为 30 mg/kg；低、中、高剂量 F-**1**-SME 组均给予 F-**1**-SME 复溶液，给药容积分别为 3.3、6.7 和 10 mL/kg，**1** 剂量分别为 10、20 和 30 mg/kg。各组均持续给药 30 d。灌胃结束后，除空白对照组外，将其余各组大鼠放入光损伤装置（将 LED 灯固定在铁架上，使灯光到每个笼子的距离都相等）中进行光暴露。光损伤工作参数为：LED 蓝光灯带波长为 400 ～ 420 nm、光照度为 1 400 ～ 1 500 lx、光暴露时间为 12 h。光暴露结束后将大鼠放回暗室中继续饲养，营造蓝光照射 12 h、黑暗 12 h 的交替光照环境，连续 20 d。在末次给药 12 h 后处死、取眼球。

2.4.1　氧化应激相关指标的测定

去除眼前节及晶状体，剥离视网膜，以精密天平称定视网膜湿重，再照相应试剂盒说明书，在冰环境下手动匀浆，离心，取上清液分别测定丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）含量。通过 GraphPad（Version 9）软件计算，结果如图 6 所示。

与空白对照组相比，大鼠接受 LED 蓝光损伤后，眼球中 MDA 的含量显著增加，SOD、GSH-Px 含量显著下降。与模型对照组相比，低、中、高剂量 F-**1**-SME 组大鼠眼球中 MDA 含量分别减少了约 12%、30%、24%，而 SOD 含量分别增加了约 25%、41%、49%，GSH-Px 含量分别增加了约 37%、44%、51%。此外，与 **1**-TAB 组相比，不同剂量 F-**1**-SME 组大鼠眼球中 MDA 含量的降幅和 SOD、GSH-Px 含量的增幅变大。上述结果提示，F-**1**-SME 可能通过抑制大鼠视网膜的脂质过氧化和改善视网膜氧化应激水平来保护视网膜细胞。

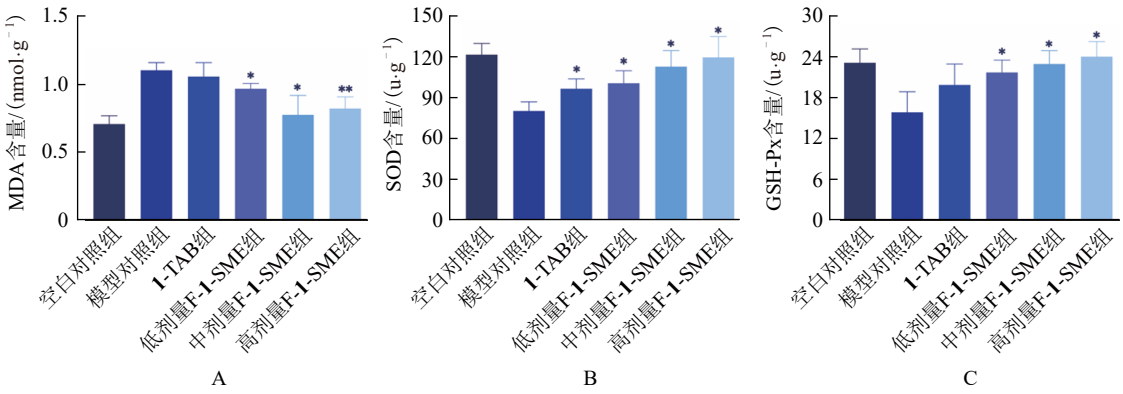
2.4.2　视网膜细胞形态观察

将保存在眼球固定液里的大鼠眼球取出，脱水处理后进行石蜡切片，采用苏木精 - 伊红染色法（H&E）染色。结果（图 7）显示，空白对照组大鼠

视网膜各层结构排列规整，细胞形态均一。与正常组相比，模型对照组大鼠视网膜各层结构排列紊乱，内核层和外核层的细胞较空白对照组大鼠减少，内核层多处出现空泡（如图中蓝色箭头所示）。与模型对照组相比，不同剂量 F-**1**-SME 组大鼠视网膜各层结构排列较规整、细胞形态较均一，但各组变化程度不同，给药剂量越高，视网膜细胞形态的改善效果越好，内核层和外核层的细胞数量增多。此外，与 **1**-TAB 组相比，不同剂量 F-**1**-SME 组大鼠视网膜细胞形态改善效果较好，内核层和外核层的细胞数量更多。上述结果说明，F-**1**-SME 有助于增强 **1** 的抗氧化等作用，从而实现对 LED 蓝光损伤的视网膜细胞更强的保护作用。

3 讨论

大量研究表明，叶黄素及其酯类衍生物可在一定程度上缓解视网膜蓝光损伤。本研究根据目标物 **1** 的特性，设计制备了 F-**1**-SME。该冻干亚微乳包封效果优异，复溶后乳滴呈球状、形态完整、粒度



A—MDA 含量；B—SOD 含量；C—GSH-Px 含量。

图 6 各组抗氧化指标的测定结果（与模型对照组比，*P<0.05，**P<0.01；n=10）

Fig.6 Determination Results of Antioxidant Indexes (Compared with the Model Group, * Represents P<0.05, *** Represents P<0.01; n=10)

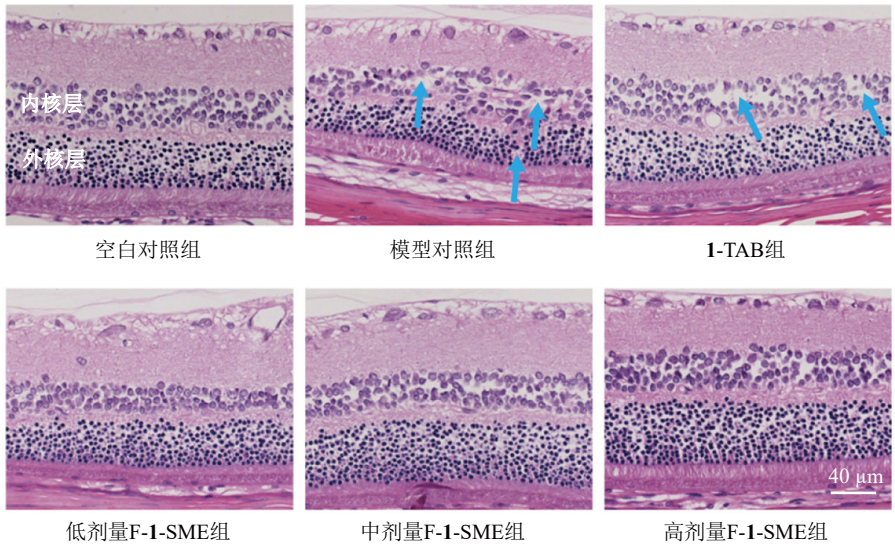


图 7 不同制剂处理的大鼠眼球组织切片的 H&E 染色结果（×40）

Fig.7 H&E Stained Histologic Images of Eye Slices of Rats Treated with Different Formulations (×40)

分布均一。并且，F-**1**-SME 在高温、高湿和强光条件下均可保持良好的稳定性（10 d 内 **1** 含量下降≤5.0%），在模拟胃肠液中至少可稳定 24 h。经体外模拟消化后，仍有（72.95±0.05）%的 **1** 溶于水相中，说明 F-**1**-SME 暴露于胃肠液后，对 **1** 仍具有一定的增溶作用，有利于药物的口服递送。

大鼠体内药动学研究结果显示，按同等剂量口服给药，F-**1**-SME 组的 c_{max} 和 $AUC_{0\to 24\ h}$ 分别为市售片剂组的 2.7 和 2.8 倍，表明相同剂量下 F-**1**-SME 的生物利用度更高。在大鼠视网膜蓝光损伤模型中，F-**1**-SME 可有效提高视网膜组织中 SOD 和 GSH-Px 的水平，并抑制大鼠视网膜的脂质过氧化，从而保护视网膜细胞。

本试验中，**1**-SME 冻干后获得了无水或几乎无水的质地疏松的多孔产品。与常规乳液相比，冻干品具有以下几项优势：更高的药物稳定性以及更长的保质期；运输方便且成本较低；因水活性极低而抑制细菌生长[10,12]。F-**1**-SME 处方简单、制备工艺成熟，有利于中试放大和临床转化。与现有的市售制剂相比，F-**1**-SME 解决了 **1** 水溶性差和生物利用度低的问题，不仅为 **1** 口服制剂的研发提供了新思路，对其他载药口服冻干亚微乳的研究也具有借鉴意义。在后续工作中，需要研究 F-**1**-SME 的规模化生产条件，并对所得制品的稳定性和抗蓝光损伤效果进行更全面的研究和验证。

参考文献：

[1] DEMMIG-ADAMS B, LÓPEZ-POZO M, STEWART J J, *et al*. Zeaxanthin and lutein: photoprotectors, anti-inflammatories, and brain food [J]. *Molecules*, 2020, **25**(16): 3607.

[2] LEM D W, DAVEY P G, GIERHART D L, *et al*. A systematic review of carotenoids in the management of age-related macular degeneration [J]. *Antioxidants* (Basel), 2021, **10**(8): 1255.

[3] MROWICKA M, MROWICKI J, KUCHARSKA E, *et al*. Lutein and zeaxanthin and their roles in age-related macular degeneration-neurodegenerative disease [J]. *Nutrients*, 2022, **14**(4): 827.

[4] 尤　新. 叶黄素和叶黄素酯的护眼功能[J]. 中国食物与营养, 2015, **21**(7): 79-80.

[5] KHALIL M, RAILA J, ALI M, *et al*. Stability and bioavailability of lutein ester supplements from *Tagetes* flower prepared under food processing conditions [J]. *J Funct Foods*, 2012, **4**(3): 602-610.

[6] ALGAN A H, GUNGOR-AK A, KARATAS A. Nanoscale delivery systems of lutein: an updated review from a pharmaceutical perspective [J]. *Pharmaceutics*, 2022, **14**(9): 1852.

[7] LO J T, LEE T M, CHEN B H. Nonionic microemulsions as solubilizers of hydrophobic drugs: solubilization of paclitaxel [J]. *Materials* (Basel), 2016, **9**(9): 761.

[8] SALVIA-TRUJILLO L, MARTÍN-BELLOSO O, MCCLEMENTS D J. Excipient nanoemulsions for improving oral bioavailability of bioactives [J]. *Nanomaterials* (Basel), 2016, **6**(1): 17.

[9] QIAN L, ZHANG H F. Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2011, **86**(2): 172-184.

[10] ABLA K K, MEHANNA M M. Freeze-drying: a flourishing strategy to fabricate stable pharmaceutical and biological products [J]. *Int J Pharm*, 2022, **628**: 122233.

[11] PORTER C J, KAUKONEN A M, BOYD B J, *et al*. Susceptibility to lipase-mediated digestion reduces the oral bioavailability of danazol after administration as a medium-chain lipid-based microemulsion formulation [J]. *Pharm Res*, 2004, **21**(8): 1405-1412.

[12] LANGFORD A, BHATNAGAR B, WALTERS R, *et al*. Drying technologies for biopharmaceutical applications: recent developments and future direction [J]. *Dry Technol*, 2018, **36**(6): 677-684.