技术方法

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000879

透明质酸修饰的尿酸酶多囊脂质体体外稳定性初步研究

谢江川[1]，何　丹[1]，胡雪原[1]，周云莉[1]，晏子俊[1]，陈　薇[2]，张景勋[1]

（1. 重庆医科大学药学院重庆药物高校工程研究中心，重庆　400016；2. 重庆市中医院药剂科，重庆　400010）

【摘　要】**目的**：制备了透明质酸修饰的尿酸酶多囊脂质体（hyaluronic acid-uricase liposomes，UHMVL），并且对尿酸酶（uricase，UC）以及 UHMVL 在体外的活性和稳定性进行了初步的研究。**方法**：采用复乳法制备了 UHMVL，并且测定了其包封率。然后从最适温度（n=3）、最适 pH（n=3）、体外稳定性（n=3）初步考察了 UHMVL 和 UC 的差异。**结果**：UHMVL 的包封率为（62.48 ± 3.87）%。UHMVL 及 UC 最适温度均为 40 ℃；UHMVL 的最适 pH 值为 8.0，UC 的最适 pH 值为 8.5。稳定性测定结果表明，UHMVL 体外稳定性均比 UC 好。UHMVL 在提高了 UC 在体外活性的同时，也明显地增强了 UC 在体外的稳定性。**结论**：UHMVL 在提高了 UC 体外活性的同时，也明显地增强了游离酶 UC 在体外的稳定性。

【关键词】尿酸酶；透明质酸；多囊脂质体；最适温度；最适 pH；稳定性

【中图分类号】944.9　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-09-07

Preliminary study on the stability of hyaluronic acid-uricase multivesicular liposomes

Xie Jiangchuan[1], He Dan[1], Hu Xueyuan[1], Zhou Yunli[1], Yan Zijun[1], Chen Wei[2], Zhang Jingqing[1]

(1. Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering in University, College of Pharmacy, Chongqing Medical University; 2. Department of Pharmacy, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital)

【Abstract】***Objective***: To preparare hyaluronic acid-uricase liposomes (UHMVL), and then to investigate the activity and stability difference between UHMVL and UC *in vitro*. ***Methods***: UHMVL was prepared by double emulsion method. The optimum temperature (n=3), optimum pH (n=3), stability (n=3) on UC and UHMVL were primarily examined. ***Results***: The encapsulation efficiency of UHMVL was (62.48 ± 3.87)%. The optimum temperature of UHMVL was 40 ℃; the optimum pH of UHMVL was 8.0; the optimun pH of UC was 8.5. Stability of UHMVL was better than that of UC. UHMVL can improve the activity and enhances the stability of UC *in vitro*. ***Conclusion***: UHLP can improve the activity, and significantly enhance the stability of free UC *in vitro*.

【Key words】uricase; hyaluronic acid; liposomes; optimum temperature; optimum pH; stabilities

嘌呤的代谢会产生尿酸（uric acid，UA），血液中过量的 UA 积累会使尿酸单钠结晶在远端关节周围相对缺乏血管的组织中沉积，从而导致痛风性关节炎[1-2]。尿酸酶（uricase，UC）能够催化氧气和 UA，生成尿囊素、二氧化碳、过氧化氢[3]。但人体缺乏 UC，只能将 UA 作为终产物由肾脏排出体外。在临床上，UC 主要用于 UA 水平的诊断以及与 UA 水平升高相关疾病的治疗[3]。但是 UC 具有生物利用度低，半衰期短和稳定性差等缺点，因此较大程度上限制了 UC的临床使用[3]。

为了克服 UC 上述缺点，本实验将 UC 包载于透明质酸修饰的多囊脂质体（hyaluronic acid-uricase multivescular liposomes，UHMVL）中，希望能提高 UC 的活性和治疗效果，使 UC 产生缓释以及长效的作用，提高 UC 的生物利用度低以及延长 UC 半衰期[4-6]；希望在经 HA 修饰后，UHMVL 能够靶向到 HA 的 CD44 和 CD168 受体，减少炎性细胞的数量，调整细胞因子的表达，从而起到抗炎的作用[7-8]，同时希望 UHMVL可提供外源性 HA，通过促进内源性 HA 合成来改善痛风性关节液的性状，达到持续缓解症状、延缓病情的效果[9-11]。本实验初步研究结果表明，UHMVL 明显增强了游离 UC 的活性和体外稳定性。

作者介绍：谢江川，Email：15828676406@163.com，研究方向：药物新剂型与新技术。

通信作者：张景勋，Email：zjqrae01@163.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30973645）；重庆市教委资助项目（编号：高校优秀人才资助项目）。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160314.1725.004.html（2016-03-14）

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器和动物

尿酸酶（美国 Sigma 公司，批号：批号 SLBC3289）；尿酸（购自英国 Alfa Aesar 公司批号 20100B15）；HA（曲阜市广龙生物制品厂，分量子：12000，批号：20131027）；大豆卵磷脂（德国 Lucas Meyer 公司，批号：20120706，BR）；胆固醇（广州天马精细化工厂，批号：20110307，AR）；批号：20101109，AR）；Bicine（美国 Amresco 公司，批号：20120614，AR）；1-乙基-3-[3-（二甲胺基）丙基]碳化二亚胺盐酸盐（成都格雷西亚化学技术有限公司，纯度≥99%，批号：F7944）；氢氧化钠、乙醚、氯仿（重庆川东化工集团有限公司，批号 20100B15，AR）；胰蛋白酶、PEG2000（国药集团化学试剂有限公司）；D-山梨醇、吐温-80（成都市科龙化工试剂厂）；氯化钾（重庆北碚化学试剂厂）；Bicine（美国 Amresco 公司）；硼酸、氟化钠（重庆博艺化学试剂有限公司）；硼砂（江苏强盛化工有限公司）；其余试剂均为分析纯。

AB204S 电子分析天平，瑞士 Mettler Toledo 仪器公司；RE 52 AA 旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂；TGL-16B 台式高速离心机，上海安亭科学仪器厂；SHZ-D（Ⅲ）型循环水式真空泵，巩义市予华仪器有限责任公司；UV-7504 PC 型紫外分光光度计，上海欣茂仪器有限公司；ZS90 型激光粒度电位仪，英国马尔文公司，PHS-3C 型 pH 计，上海精密科学仪器有限公司；KQ-2200B 型水浴型超声仪，江苏昆山市超声仪器有限责任公司；Sephadex G-200 层析柱，上海楷洋生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 UHMVL 和 UC 的制备

1.2.1.1 UHMVL 的制备 称取适量卵磷脂、胆固醇、三油酸甘油酯，加入适量乙醚使其充分溶解后，加入等体积 3%葡萄糖溶液涡旋形成油包水型初乳。使用注射器将初乳快速注入 10 mL 含 L-赖氨酸的 4%葡萄糖水溶液中，用高速分散均质机剪切得到复乳。将复乳转移至磨口圆底烧瓶，减压旋转蒸发除去有机溶剂。将适量 HA 的 Bicine-NaOH 溶液在 pH 6.0 条件下用 1-乙基-3-[3-（二甲胺基）丙基]碳化二亚胺盐酸盐在 37 ℃孵育预活化[12]。将已激活的 HA 加入到复乳溶液中，调节 pH 为 8.5，并在 37 ℃条件下与复乳溶进行孵化。UHMVL 通过离心（1.3×10^5 g，4 ℃，5 min）从过量的试剂和副产物中分离，用 pH 8.5 的 Bicine-NaOH 洗涤，即可[12-13]。重复 3 次得到 3 批 UHMVL。

1.2.1.2 UC 的制备 称取 UC 溶解于 Bicine-NaOH 缓冲液（50 mmol/L，pH 8.5）中，重复 3 次得到 3 批 UC 样品。

1.2.2 UHMVL 的粒径分布 按照邓雪[14]和 Zhong[15]等的方法测定 UHMVL 的粒径分布。

1.2.3 UHMVL 的形态 取适量的 UHMVL 混悬液于载玻片上，盖上盖玻片后使用光镜显微镜观察其外观形态。

1.2.4 UHMVL 的包封率的测定 使用凝胶柱-考马斯亮蓝法[16]测定 UHMVL 的包封率。用移液枪吸取 0.5 mL 的 UHMVL，加入 Sephadex G-200 层析柱中。用 Bicine-NaOH 缓冲液（50 mmol/L，pH 8.5）洗脱分离 UHMVL 和 UC。接收 UHMVL 部分，并取 100 μL 的 UHMVL，加入乙醚破乳后，加入考马斯亮蓝，于 595 nm 波长处测定吸收度值（AUHMVL）。以同法处理未过柱的 UHMVL，测定吸光度（absorbance，A）值。包封率（%）= AUHMVL/A 总 × 100%，重复 3 次即可。

1.2.5 UC 活性测定方法的建立 用 Bicine-NaOH 缓冲液（50 mmol/L，pH 8.5）配制得到 75 μmol/L 的 UA 溶液，将上述 UA 溶液作为测定 UC 活性的底物。参照王娜等[17]的方法测定 UC 的活性：在 1.18 mL 的 UA 溶液中分别加入 20 μL 的 UC 和 20 μL UHMVL 破乳后的上清液，然后在 293 nm 处测定并记录 UC 和 UHMVL 的紫外吸收变化值。

1.2.6 最适温度的测定 将 UA 溶液分别在不同温度的水浴中（20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃以及 70 ℃）保温预热 10 min 后，在室温（25 ℃）条件下，按照“1.2.3”所述的方法测定游离 UC 和 UHMVL 中 UC 的活性。

1.2.7 最适 pH 的测定 将不同 pH 值（6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 以及 9.5）的 UA 溶液（Bicine-NaOH，50 mmol/L）在 UC 的最适温度下保温预热 10 min 后，按照“1.2.3”所述的方法测定游离 UC 和 UHMVL 中 UC 的活性。

1.2.8 热稳定性的测定 分别取 2 mL UC 以及 2 mL UHMVL（UC 的浓度均为 0.1 mg/mL），放置于 55 ℃的水浴中，在 0、1、2、3、4 与 5 h 时分别用移液枪取出 20 μL，按照“1.2.3”所述的方法测定游离 UC 和 UHMVL 中 UC 的活性。

1.2.9 贮存稳定性的测定 将 UC 和 UHMVL（UC 的浓度均为 0.1 mg/mL）放置于 4 ℃的冰箱中，分别于第 0、1、2、4、7、10、14、20、28 d 时取 20 μL UC 和 20 μL UHMVL，并且按照“1.2.3”所述的方法测定游离 UC 和 UHMVL 中 UC 的活性。

1.2.10 酸碱稳定性的测定 将 100 μL 的 UC 和 100 μL 的 UHMVL（UC 的浓度均为 0.3 mg/mL），分别用 pH 5.0，5.5，6.0，6.5，7.0，7.5，8.0，8.5，8.0，9.5 的 Bicine-NaOH（50 mmol/L）缓冲液稀释为原体积的 3 倍后，在 40 ℃水浴条件下放置 40 min 取出，按照“1.2.3”所述的方法测定游离 UC 和 UHMVL 中 UC 的活性。

1.2.11 胰蛋白酶的影响 取 1 mL UC 和 1 mL UHMVL 混悬液（UC 的浓度均为 0.2 mg/mL），加入 Bicine-NaOH 缓冲液（50 mmol/L，pH 8.5）溶解的胰蛋白酶溶液（0.2 mg/mL）将 UC 和 UHMVL 稀释为原体积的 2 倍后，混合均匀放置于 37 ℃条件下的水浴中，分别在 0、10、20、30、40、50、60 min 时对 UC 和 UHMVL 取样，并且按照“1.2.3”所述方法测定游离 UC 和 UHMVL 中 UC 的活性。

1.2.12 部分金属离子和有机化合物能力的影响 取 200 μL UC 和 200 μL UHMVL（UC 浓度均为 0.3 mg/mL），分别加入 200 μL 山梨醇（2.0 mmol/L）、200 μL KCl（2.0 mmol/L）和 200

μL NaF(2.0 mmol/L)混匀，于 25 ℃水浴中放置 1 h 后，按照“1.2.3”所述的方法测定游离 UC 和 UHMVL 中 UC 的活性。

2 结 果

2.1 UHMVL 的粒径分布范围

通过测定与计算后得到 UHMVL 的粒径大小为(23.09 ± 1.71) μm，且粒径分布范围符合正态分布。

2.2 UHMVL 形态

通过显微镜能观察到 UHMVL 呈圆球形，大小较均匀，见图 1。

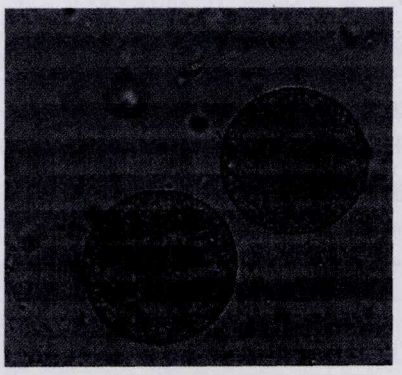


图 1 UHMVL 的光学显微照片（400×）

Fig.1 Light micrograph of UHMVL（400×）

2.3 UHMVL 的包封率

经检测，制备的 3 批 UHMVL，平均包封率为(62.48 ± 3.87)%(n=3)。

2.4 最适温度的测定

最适温度的测定结果见图 2 和表 1。如图 2 和表 1 所示，游离 UC 和 UHMVL 中 UC 的最适温度均为 40 ℃，在 40 ℃时 UHMVL 中 UC 的活性时游离 UC 的 1.12 倍，UHMVL 中 UC 的活性在温度 20 ℃~70 ℃时均较游离 UC 的活性高，且在 40 ℃~50 ℃条件下 UHMVL 中 UC 活性比游离 UC 在最适温度下(40 ℃)的活性高。此时活性主要受温度的影响。UHMVL 中 UC 和游离 UC 表现出不同的最适温度，可能是因为UHMVL 的包裹改变了 UC 的构象，对 UC 的生物活性带来了一定的影响。

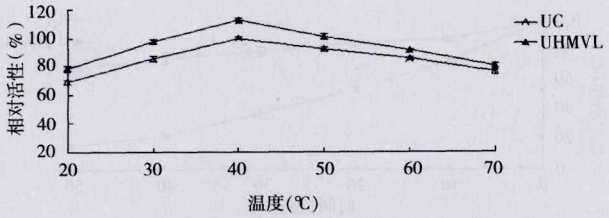


图 2 UC 和 UHMVL 的最适温度（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Fig.2 Optimum temperature of free UC and UHMVL（$\bar{x} \pm s$，n=3）

表 1 UC 和 UHMVL 的最适温度（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Tab.1 Optimum temperature of free UC and UHMVL($\bar{x} \pm s$，n=3)

温度(℃)	UC	UHMVL
20	69.36 ± 1.13	78.72 ± 1.53
30	85.67 ± 2.01	95.60 ± 0.98
40	100.00 ± 1.13	112.77 ± 1.13
50	92.62 ± 1.37	98.58 ± 2.14
60	85.53 ± 1.13	88.94 ± 2.21
70	76.45 ± 1.61	78.72 ± 1.19

2.5 最适 pH 的测定

最适 pH 的测定结果见图 3 和表 2。如图 3 和表 2 所示，在 37 ℃，pH 6.5~9.5 条件下，游离 UC 的最适 pH 为 8.5，UHMVL 中 UC 的最适 pH 为 8.0。UHMVL 中 UC 在其最适 pH (pH 8.0)时的活性约是游离 UC 在其最适 pH 时活性的 1.19 倍。在 pH 6.5~9.5 时，UHMVL 都增加了 UC 的活性。结果表明在 37 ℃条件下经过纳米粒修饰的 UHMVL 能明显提高 UC 的活性。此时活性主要受 pH 值的影响。UHMVL 中 UC 和游离 UC 表现出不同的最适 pH，可能是因为 UHMVL 的包裹改变了 UC 的构象，对 UC 的生物活性带来了一定的影响。

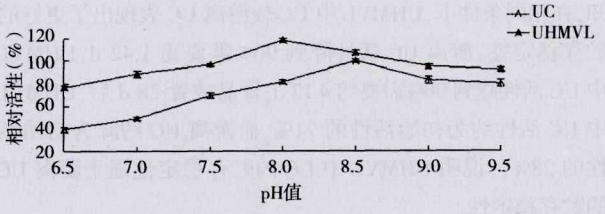


图 3 UC 和 UHMVL 的最适 pH（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Fig.3 Optimum pH of free UC and UHMVL（$\bar{x} \pm s$，n=3）

表 2 UC 和 UHMVL 的最适 pH（$\bar{x} \pm s$，n=3）

Tab.2 Optimum pH of free UC and UHMVL（$\bar{x} \pm s$，n=3）

pH	UC	UHMVL
6.5	39.04 ± 2.30	76.74 ± 1.50
7.0	48.84 ± 1.50	88.87 ± 2.74
7.5	69.44 ± 2.46	97.01 ± 1.25
8.0	81.73 ± 1.32	118.60 ± 1.32
8.5	100.00 ± 1.44	107.31 ± 1.75
9.0	83.55 ± 3.32	95.35 ± 1.89
9.5	79.90 ± 3.24	92.52 ± 1.52

2.6 热稳定性的测定

热稳定性的测定结果见图 4 和表 3。如图 4 和表 3 所示，55 ℃时，相同条件下，UHMVL 中 UC 较游离 UC 表现出了较好的热稳定性：游离 UC 活性降低到 90%需要的时间约为 0.60 h，UHMVL 中 UC 活性降低到 90%所需时间约为 1.92 h；在 5 h 时 UHMVL 中 UC 保留的活性约高达 81%，而游离 UC 只保留了初始活性的 17%。

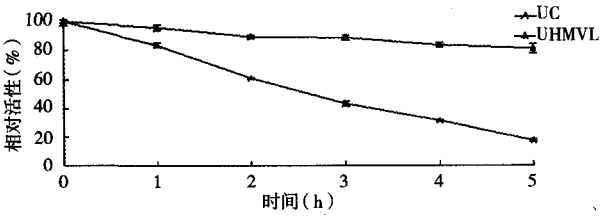


图 4 游离 UC 和 UHMVL 在 55 ℃的热稳定性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.4 Time courses of remaining activity of free UC and UHMVL at 55 ℃（$\bar{x}\pm s$，n=3）

表 3 游离 UC 和 UHMVL 在 55 ℃的热稳定性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.3 Time courses of remaining activity of free UC and UHMVL at 55 ℃（$\bar{x}\pm s$，n=3）

时间	UC	UHMVL
0	100.00 ± 1.25	100.00 ± 2.94
1	83.55 ± 1.52	95.80 ± 2.01
2	60.96 ± 0.76	89.50 ± 1.19
3	43.19 ± 1.60	88.93 ± 1.75
4	31.40 ± 0.50	83.59 ± 1.51
5	17.44 ± 1.00	81.30 ± 2.97

2.7 贮存稳定性的测定

贮存稳定性测定结果见图 5 和表 4。由图 5 和表 4 可知，在相同条件下，UHMVL 中 UC 较游离 UC 表现出了更好的贮存稳定性：游离 UC 活性降到 90%需要约 1.42 d，UHMVL 中 UC 活性降到 90%需要约 4.13 d；样品放置 28 d 后，UHMVL 中 UC 活性约为初始活性的 71%，而游离 UC 约降为初始活性的 28%。说明 UHMVL 中 UC 的贮存稳定性强于游离 UC 的贮存稳定性。

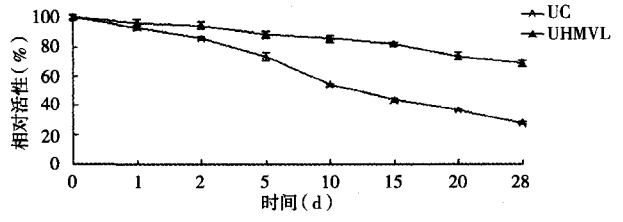


图 5 游离 UC 和 UHMVL 在 4 ℃的贮存稳定性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.5 Time courses of remaining activity of free UC and UHMVL during storage at 4 ℃（$\bar{x}\pm s$，n=3）

表 4 游离 UC 和 UHMVL 在 4 ℃的贮存稳定性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4 Time courses of remaining activity of free UC and UHMVL during storage at 4 ℃（$\bar{x}\pm s$，n=3）

时间(d)	UC	UHMVL
0	100.00 ± 1.54	100.00 ± 1.32
1	93.11 ± 1.44	96.50 ± 2.29
2	85.63 ± 1.29	94.50 ± 2.18
5	73.46 ± 2.45	88.17 ± 2.25
10	54.25 ± 0.92	85.67 ± 2.36
15	43.84 ± 0.92	81.83 ± 1.26
20	36.80 ± 0.67	73.67 ± 2.08
28	27.86 ± 1.11	69.08 ± 2.95

2.8 酸碱稳定性的测定

酸碱稳定性测定结果见图 6 和表 5。由图 6 和表 5 可知，在 pH 5.5~9.0 条件下，UHMVL 中 UC 的活性比游离 UC 的活性高。根据变化趋势可以得出：游离 UC 的活性比 UHMVL 中 UC 更容易受到 pH 变化的影响。本结果表明 UHMVL 中 UC 较游离 UC 有更好的耐溶液酸碱变化的能力。

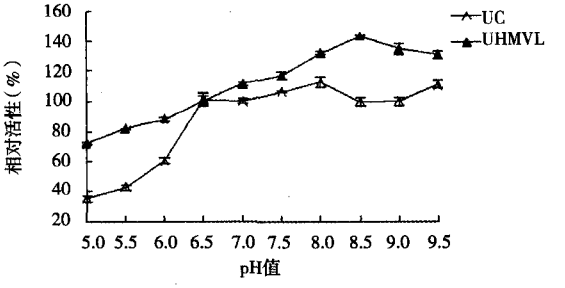


图 6 游离 UC 和 UHMVL 的酸碱稳定性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.6 pH stabilities of free UC and UHMVL（$\bar{x}\pm s$，n=3）

表 5 游离 UC 和 UHMVL 的酸碱稳定性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.5 pH stabilities of free UC and UHMVL（$\bar{x}\pm s$，n=3）

pH	UC	UHMVL
5	35.17 ± 2.23	72.25 ± 0.98
5.5	43.01 ± 1.47	81.99 ± 0.64
6	60.59 ± 2.04	88.35 ± 1.27
6.5	101.48 ± 4.23	100.64 ± 2.88
7	100.21 ± 1.60	111.65 ± 1.60
7.5	106.57 ± 0.73	117.16 ± 2.65
8	112.71 ± 3.50	132.20 ± 1.27
8.5	100.00 ± 2.57	143.43 ± 0.97
9	100.21 ± 2.65	134.75 ± 3.96
9.5	111.02 ± 2.23	131.14 ± 2.57

2.9 胰蛋白酶的影响

抗蛋白酶水解能力的测定结果见图 7 和表 6。由图 7 和表 6 可知，游离 UC 的活性呈快速下降的趋势：游离 UC 活性降低为 90%所需的时间约为 3.8 min；活性降低为 50%所需的时间约为 22.8 min。同等条件下，UHMVL 中 UC 活性的保持时间明显延长，有更好的抗酶解能力：UHMVL 中 UC 活性降低为 90%所需的时间约为 8.6 min；直到 50.0 min，UHMVL中 UC 仍有 68%的活性。表明 UHMVL 中 UC 抗蛋白酶水解能力优于游离 UC。

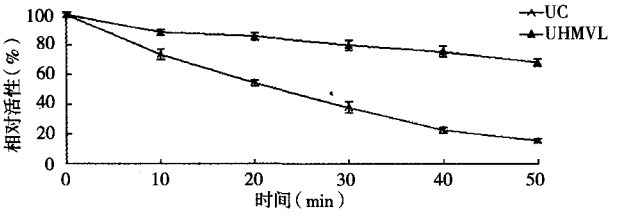


图 7 游离 UC 和 UHMVL 抗胰蛋白酶水解的稳定性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.7 Proteolytic stabilities of free UC and UHMVL（$\bar{x}\pm s$，n=3）

表 6 游离 UC 和 UHMVL 抗胰蛋白酶水解的稳定性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.6 Proteolytic stabilities of free UC and UHMVL（$\bar{x}\pm s$，n=3）

时间	UC	UHMVL
0	100.00 ± 1.24	100.00 ± 2.19
10	73.52 ± 3.81	88.42 ± 1.81
20	54.52 ± 1.95	85.38 ± 2.23
30	38.16 ± 3.63	79.74 ± 3.48
40	23.05 ± 1.89	75.40 ± 3.64
50	15.58 ± 1.18	68.02 ± 2.76

2.10 部分金属离子和有机化合物的影响

抗部分金属离子和有机化合物能力的测定结果见图 8 和表 7。由图 8 和表 7 可知，加入山梨醇后，UHMVL 中 UC 活性降低至约 98%，UC 活性保留为约 91%；加入聚乙二醇 2000 后，UHMVL 中 UC 活性降低至约 90%，游离 UC 活性保留为约 97%；氯化钾、Tween-80、氟化钠对 UHMVL 中 UC 及游离 UC 影响不大。

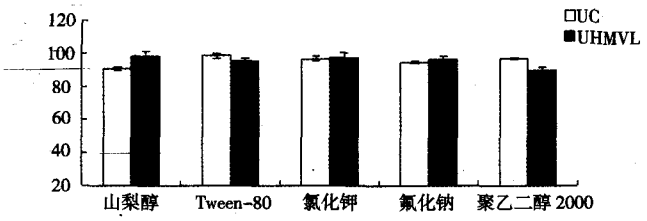


图 8 部分金属离子和有机化合物对游离 UC 和 UHMVL 的活性影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig.8 Effect of several metal ions and organic compounds on activity of free UC and UHMVL（$\bar{x}\pm s$，n=3）

表 7 游离 UC 和 UHMVL 抗抗部分金属离子和有机化合物能力的稳定性（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.7 Effect of several metal ions and organic compounds on activity of free UC and UHMVL（$\bar{x}\pm s$，n=3）

时间	UC	UHMVL
初始活性	100.00 ± 1.24	100.00 ± 2.88
山梨醇	90.97 ± 1.43	98.46 ± 1.41
Tween-80	98.91 ± 1.43	95.70 ± 3.00
KCl	96.73 ± 0.54	98.00 ± 1.62
NaF	94.70 ± 0.71	96.77 ± 2.11
PEG2000	97.35 ± 3.11	89.86 ± 1.38

3 讨 论

酶的理化性质、酶的活性、酶的稳定性都与温度和 pH 密切相关：酶在其最适温度和最适 pH 时，活性最高，酶促反应的速度最快。本实验测定了游离 UC 和 UHMVL 中 UC 的最适温度、最适 pH，结果表明：UHMVL 中 UC 及游离 UC 最适温度均为 40 ℃，游离 UC 的最适 pH 为 8.5，UHMVL 中 UC 的最适 pH 为 8.0，UHMVL 中 UC 较游离 UC 更有能有效发挥酶促反应。而测定酸碱稳定性、部分金属离子及有机化合物对活性等的影响的目的在于考察 UHMVL 中 UC 与游离 UC 的体外稳定性，考察 UHMVL 中 UC 与游离 UC 相比是否能够提高 UC 的体外稳定性：热稳定性的测定结果表明，UC 被包封在 UHMVL 中以后，对抗外界温度变化的能力有了明显的提高，即在相同的条件下，UHMVL 中 UC 较游离UC 表现出更好的热稳定性；在 55 ℃的加热条件和 4 ℃的贮存条件下，UHMVL 均能很好的保持 UC 的活性，这表明 UC 被包封在 UHMVL 内部之后，具有了更好的对抗外界温度变化的能力；酸碱稳定性测定的结果充分说明，当外界溶液的 pH 值变化时，UHMVL 能很好地保护 UC，使 UC 免受外界 pH 变化的干扰；抗酶解能力的结果也可充分说明，UHMVL 能很好地保护 UC，以减少 UC 被胰蛋白酶水解。

从本文实验数据可以看出，UHMVL 有增强 UC 的活性和提高 UC 的体外稳定性的优点。本实验为 UHMVL 的体内研究奠定了良好的基础。在理论上，UHMVL 还应具有在动物体内提高 UC 生物利用度等特点，UHMVL 在体情况有待进行深入和全面的研究。

参 考 文 献

[1] Sakai H, Tsutamoto T, Tsutsui T, et al. Sermn level of uric acid, partly secreted from the failing heart is a prognostic marker in patients with congestive hean failure[J]. Cir J, 2006, 70(8): 1006-1011.

[2] Krishnan E, Kwoh CK, Schumacher HR, et al. Hyperuricemia and incidence of hypertension among men without metabolic syndrome[J]. Hypertension, 2007, 49(2): 298-303.

[3] Freitas DS, Spencer PJ, Vassão RC, et al. Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2010, 387(1-2): 215-222.

[4] Manrtipragada S. A lipid based depot (DepoFoam technology) for sustained release drug delivery[J]. Progress In Lipid Research, 2002, 41(5): 392-406.

[5] Katre NV. Liposom-based depot injection technologies[J]. Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery, 2004, 2(4): 213-227.

[6] Huang S, Wu T. Modified colorimetric assay for uricase activity and a screen for mutant Bacillus subtilis uricase genes following StEP mutagensis[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004, 271(3): 517-523.

技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000924

吴茱萸碱水包油型纳米乳在大鼠体内的药代动力学及生物等效性研究

石明芯[1],胡江波[2],张 馨[1],王 薛[1],张景勋[1]
(1. 重庆医科大学药学院重庆药物高校工程研究中心,重庆 400016;
2. 重庆市南岸区妇幼保健计划生育服务中心药剂科,重庆 400060)

【摘 要】目的:研究吴茱萸碱的水包油型纳米乳(evodiamine nanoemulsion,EDN)在大鼠体内的药动学特征与生物等效性。**方法**:本试验将 12 只雄性大鼠随机分成 2 组,分别灌胃给予吴茱萸碱(evodiamine,ED)或 EDN,并于给药后 0、5、15、30、45 min、1、2、5、8、12、24、48、72 h 时对大鼠眼底取血,用 HPLC 法测定 ED 的血药浓度,用 DAS 软件分析药动学参数,并经方差分析和双单侧检验进行生物等效性评价。**结果**:EDN 的主要药动学参数:血药浓度-时间曲线下面积(area under concentration-time curve,$AUC_{(0\sim72\ h)}$)、药峰浓度(peak concentration,C_{max})和药峰时间(peak time,T_{max})分别为(3 636.79 ± 1 642.94) μg/L*h、(192.49 ± 37.68) μg/L 和(4.94 ± 1.67) h。EDN 的大鼠口服生物利用度约为 ED 的 4.66 倍。$AUC_{(0\sim72\ h)}$的 90%置信区间超出所规定的生物等效性标准区间。**结论**:EDN 明显提高了 ED 的口服生物利用度。ED 和 EDN 的生物不等效性。

【关键词】吴茱萸碱;纳米乳;高效液相色谱法;药动学;生物等效性
【中图分类号】R944.9 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2016-01-29

作者介绍:石明芯,Email:874992850@qq.com,
研究方向:药物新剂型与新技术研究。
通信作者:张景勋,Email:zjqrae01@163.com。
基金项目:重庆市科委资助项目(编号:cstc2015jcyjBX0027)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160503.1058.002.html (2016-05-03)

[7] Huang MH,Yang RC,Lee CL,et al. Preliminary results of integrated therapy for patients with knee osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum,2005,53(6):812-820.

[8] Moreland LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action[J]. Arthritis Research & Therapy,2003,5(2):54-67.

[9] Asari A,Miyauchi S,Matsuzaka S,et al. Molecular weight-dependent effects of hyaluronate on the arthritic synovium[J]. Arch Histol Cytol,1998,61(2):125-135.

[10] Ghosh P. The role of hyaluronic acid(hyaluronan) in health and disease:interactions with cells,cartilage and components of synovial fluid[J]. Clinical Experiment Rheumatol,1994,12(1):75-82.

[11] Monfort J,Nacher M,Montell E,et al. Chondroitin sulfate and hyaluronic acid(500-730 kda) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes[J]. Drugs Experiment Clinical Research,2005,31(2):71-76.

[12] 方奕巍,尹宗宁. 透明质酸修饰的白蛋白纳米粒的制备及抗肿瘤作用的初步评价[J]. 四川大学学报(医学版),2011,42(4):480-484.

[13] Peer D,Margalit R. Loading mitomycin C inside long circulating hyaluronan targeted nano-liposomes increases its antitumor activity in three mice tumor models[J]. International Journal of Cancer,2004,108(5):780-789.

[14] 邓 雪,何 丹,熊华蓉,等. 静脉注射尿酸酶多囊脂质体的药代动力学和药效学研究[J]. 四川大学学报(医学版),2015,46(5):688-691.

[15] Zhong M,Feng Y,Liao H,et al. Azithromycin cationic non-lecithoid nano/microparticles improve bioavailability and targeting efficiency[J]. Pharmaceutical Research,2014,31(10):2857-2867.

[16] Tan Q,Zhang J,Wang N,et al. Uricase from Bacillus fastidious loaded in alkaline enzymosomes:enhanced biochemical and pharmacological characteristics in hypouricemic rats[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,2012,82(1):43-48.

[17] 王 娜,赵春景,黄开顺,等. 产朊假丝酵母尿酸酶脂质纳米粒的制备及其药效学特性分析[J]. 中国生物制品学杂志,2013,26(8):1147-1150.

(责任编辑:张辉洁)