

法定量。本试验中采用淫羊藿苷(5号色谱峰)对其其他5种成分进行定量分析,首先考虑到其他5种成分的化学性质与淫羊藿苷接近、化学结构母核相似、检测器最大吸收位置一致的情况下,采用光谱叠加、相似度评价和光谱纯度考察等方法对色谱峰进行识别分析,确定该色谱峰纯度(表2);其次,通过加入定量的淫羊藿苷对照品溶液进行自身对照,计算稀释同比例的供试品溶液色谱峰峰面积增加值与其他5种成分建立定量校正因子,采用三个浓度级别验证校正因子的适用性,校正因子的相对标准偏差均小于2.0%(表3)符合《中国药典》2010年版HPLC定量测定内标法的要求。

与“一测多评法”不同的是该方法为内加对照品校正,内标物为本身含有的成分,再加入相同的该成分时不会与其他化合物发生化学反应,保证了内标物的稳定性,由于内标的参与可以抵消色谱系统

操作带来的误差,故而没有选择多色谱仪器、色谱柱进行验证;该方法的局限性在于只能测定化学环境相同的一类成分,如最大吸收一致、化学结构母核相同等。而“一测多评法”首先要有对照品进行系统适用性考察,建立使用多对照品和单一对照品定量的校正因子,并采用多检测仪器、多色谱柱考察系统适用性的稳健性,最终确定校正因子<sup>[5]</sup>。

#### 参 考 文 献

- 1 中国药典临床用药须知(中药饮片卷)[S]. 2010年版. 1050-1054
- 2 周一帆, 胡昌江, 张雪洁, 等. 淫羊藿炮制前后在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2717-2720
- 3 中国药典[S]. 2010年版. 一部. 附录VI D. 36-38
- 4 黄朝瑜, 赵陆华, 梅玲华, 等. 淫羊藿药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国天然药物, 2003, 1(3): 146-150
- 5 朱粉霞, 张亚丽, 汪晶, 等. 一测多评法测定金银花复方制剂中新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2666-2671 (2014-12-08 收稿 2015-02-13 修回)

## 重楼总皂苷长循环脂质体的制备与表征

张小飞<sup>1</sup> 果秋婷<sup>2</sup> 王昌利<sup>1</sup> (1. 陕西中医学院药学院 陕西省中药制药重点学科 陕西咸阳 712046; 2. 咸阳职业技术学院医学系)

**摘 要** 目的: 制备重楼总皂苷长循环脂质体, 并对其表征。方法: 以粒径、PDI、Zeta 电位及包封率为评价指标, 考察制备重楼总皂苷长循环脂质体的各个因素。并采用 Malvern 粒度仪测定脂质体的粒径分布、PDI 及 Zeta 电位, 透射电镜考察其形态, 并考察长脂质体的稳定性。结果: 重楼总皂苷长循环脂质体的平均粒径为(109.4 ± 32.7) nm, PDI 为(0.171 ± 0.036), Zeta 电位为(-36.7 ± 4.5) mV, 包封率为(93.5 ± 3.2)%; 透射电镜显示脂质体粒径均一, 成球状分布; 长期稳定性研究表明, 长循环脂质体在 4 °C 条件下放置 3 个月稳定。结论: 重楼总皂苷长循环脂质体制备工艺简单易行, 可以得到包封率高、稳定性好的脂质体制剂。

**关键词** 重楼总皂苷; 长循环脂质体; 稳定性

中图分类号: R944.9 文献标识码: A 文章编号: 1008-049X(2015)06-0907-06

## Preparation and Characterization of Long Circulating Liposomes Containing Total Saponins of *Paris Polyphylla Smith*

Zhang Xiaofei<sup>1</sup>, Guo Qiuting<sup>2</sup>, Wang Changli<sup>1</sup> (1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Key Discipline of Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China; 2. School of Medicine Xianyang Vocational College)

**ABSTRACT Objective:** To prepare and characterize the PEGylated liposomes containing total saponins of *Paris Polyphylla*. **Methods:** Using the size, PDI, zeta potential and encapsulation efficiency of the liposomes as the indicators, the influencing factors in the preparation were optimized. The particle size, PDI and zeta potential were studied by a Malvern Zetasizer, the morphology was observed under a TEM, and the stability was studied as well. **Results:** The particle size, PDI, zeta potential and encapsulation efficiency of the PEGylated liposomes was (109.4 ± 32.7) nm, (0.171 ± 0.036), (-36.7 ± 4.5) mV and (93.5 ± 3.2)%, respectively. The liposomes were small spheres with smooth surface under the TEM. The long term stability studies showed that the liposomes were stable in 3 months after stored at 4 °C. **Conclusion:** The preparation technology of the PEGylated liposomes containing total saponins of *Paris Polyphylla* is feasible, which can obtain liposomal preparations with high entrapment efficiency and good stability.

**KEY WORDS** Total saponins of *Paris Polyphylla Smith*; PEGylated liposomes; Stability

重楼(*Paris polyphylla Smith*) 属百合科(Liliaceae), 又名蚤休。药用部分为重楼属植物的干燥根茎

部, 形状呈团块状圆柱形。现代药理研究表明, 重楼具有抗菌、抗病毒、止血、镇静、镇痛、止咳、平喘、抗

基金项目: 陕西教育厅项目(编号: 2013JK0816)  
通讯作者: 张小飞 Tel: (029) 38185175 E-mail: zhangxiaofei830@163.com

肿瘤、免疫调节等作用等。近年来,该药在抗肿瘤方面的研究,引起学者的广泛关注<sup>[1]</sup>。由于重楼总皂苷为脂溶性物质,其普通的溶液制剂存在吸收差、生物利用率低等缺点,因此本研究考虑将其制成长循环脂质体,使其具有被动靶向性、毒性小、生物利用度高等优势,从而使其在肿瘤组织中聚集,达到抑制及杀灭肿瘤细胞的作用,同时增强患者的生活质量、降低不良反应、增强患者的身体抵抗力的作用。

## 1 仪器与材料

陕西产重楼总皂苷(实验室提取纯化,批号: SX20140502,纯度 > 95.0%); 重楼皂苷 I 对照品(中国食品药品检定研究院,批号: 111591-200402,纯度 > 98%), 重楼皂苷 II 对照品(中国食品药品检定研究院,批号: 111590-200402,纯度 > 98%); 氢化大豆磷脂(注射级,上海东尚实业有限公司,批号: L8127394-1); 胆固醇(日本油脂公司,批号: 7296281); 聚乙二醇 2000-磷脂酰乙醇胺(PEG2000-DSPE,上海东尚实业有限公司,批号: PE1328301)。

脂质体挤出器(EmulsiFlex-C3,美国 Genizer 公司); Agilent1200 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); Mastersizer 2000 粒度分析仪(英国马尔文公司); Zetasizer Nano 电位分析仪(英国马尔文公司); JM21200EX 透射电镜(日本电子公司); GC2120GX 日立冷冻离心机(日本日立公司); PVDF 膜(规格: 0.22 μm/0.08 μm,密理博中国公司)。

## 2 方法与结果

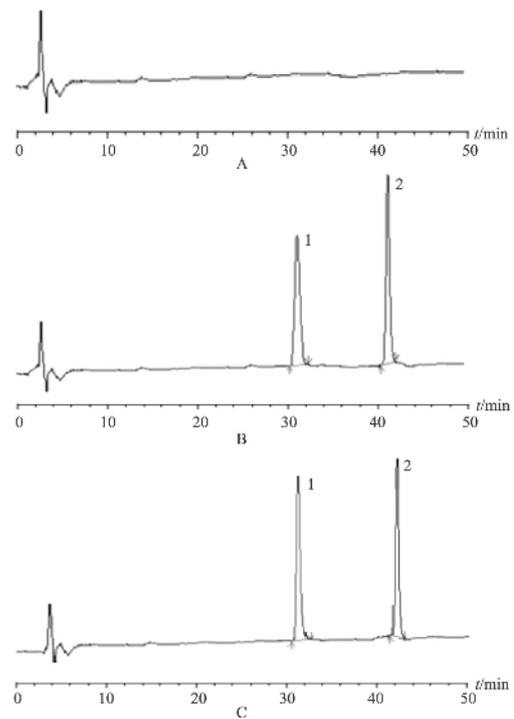
### 2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件<sup>[2]</sup> 色谱柱: Hypersil ODS C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(40:60); 流速: 1.0 ml · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 210 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μl。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取减压干燥至恒重的对照品重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 各 10.0 mg, 置 100 ml 量瓶中, 加入流动相超声(200 W, 20/40 kHz) 使溶解, 放冷至室温, 作对照品贮备液(重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 浓度均为 100 μg · ml<sup>-1</sup>)。

2.1.3 供试品溶液制备 称取 5 ml 重楼总皂苷长循环脂质体置于 100 ml 量瓶中, 加入少量甲醇振荡破乳, 加入流动相, 水浴超声(200 W, 20/40 kHz) 后, 放冷至室温, 摇匀, 过滤。另取处方量的辅料混合均匀, 按供试品溶液处理方法, 处理空白辅料, 得到空白辅料供试品溶液。液相图谱见图 1。

2.1.4 线性关系考察 精密量取对照品贮备液用流动相稀释成 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg · ml<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 摇匀, 滤过, 精密吸取 20 μl, 按



A. 空白溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液  
1. 重楼皂苷 I 2. 重楼皂苷 II  
图 1 HPLC 色谱图

“2.1.1”色谱条件测定。以对照品质量浓度( $C$ , μg · ml<sup>-1</sup>) 对峰面积( $A$ ) 作线性回归, 绘制标准曲线。结果: 重楼皂苷 I 回归方程为  $A = 53\ 218C - 8\ 725$ ,  $r = 0.999\ 9$ , 重楼皂苷 II 回归方程  $A = 21\ 848C + 4\ 749$ ,  $r = 0.999\ 9$ , 表明重楼皂苷 I 在 1.0 ~ 20.0 μg · ml<sup>-1</sup> 范围内, 重楼皂苷 II 在 1.0 ~ 20.0 μg · ml<sup>-1</sup> 范围内质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度试验 按“2.1.2”项下制备 6 份对照品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 进行重复性试验。结果, 重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 峰面积的  $RSD$  分别为 0.97% 和 1.01% ( $n = 6$ )。

2.1.6 重复性试验 按“2.1.3”项下制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件测定, 结果重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的平均含量为 0.11 mg · ml<sup>-1</sup> 和 0.19 mg · ml<sup>-1</sup>,  $RSD$  分别为 0.87% 和 0.68% ( $n = 6$ )。

2.1.7 稳定性试验 按“2.1.3”项下制备一份样品溶液, 室温放置, 分别于 0, 2, 4, 8, 24, 48 h 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 记录重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的峰面积, 结果: 重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的峰面积的  $RSD$  分别为 1.02% 和 0.67% ( $n = 6$ )。表明样品溶液在室温下放置 48 h 稳定。

2.1.8 回收率试验 分别精密量取对照品贮备液 0.25, 0.5, 1.0 ml, 置于 10 ml 量瓶中(各 3 份), 加入辅料, 溶解, 稀释定容, 摇匀, 制成低、中、高浓度的

回收率试验溶液,按“2.1.1”项下方法进样测定,计算回收率。结果重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 平均回收率分别为 101.4% 和 99.9%,RSD 分别为 0.81% 和 1.12% (n=9)。

### 2.2 重楼总皂苷长循环脂质体制备

本文采用薄膜分散挤出法(membrane extrusion)制备重楼总皂苷长循环脂质体。称取处方量的重楼总皂苷,氢化大豆磷脂,胆固醇及 PEG2000-DSPE 溶于适量氯仿中,置于 250 ml 茄形瓶中,在 45℃ 减压除去有机溶剂,得到透明均匀薄膜,继续抽真空 1 h,加入磷酸盐缓冲液(pH 为 6.5) 55℃ 水化 30 min 得到重楼总皂苷长循环脂质体初品。将长循环脂质体初品分别经过 0.22 μm 微孔滤膜的脂质体挤出器挤出 2 次,0.08 μm 微孔滤膜的脂质体挤出器挤出 5 次,即得带有乳光重楼总皂苷长循环脂质体混悬液,于 4℃ 下保存。

### 2.3 包封率的测定方法

采用低温超速离心法测定包封率。取 2.0 ml 脂质体加到超速离心管中,在 50 000 r·min<sup>-1</sup> 的条件下离心 1 h,吸取上清液;同时精密移取重楼总皂苷长循环脂质体 0.5 ml 于 10 ml 量瓶中,用甲醇破坏脂质体定容,采用 HPLC 测定脂质体中的重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 含量。计算公式为:

$$EE\% = \frac{C_{总} - C_{游离}}{C_{总}} \times 100$$

其中: C<sub>总</sub> 代表脂质体溶液中重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的总浓度; C<sub>游离</sub> 代表脂质体溶液中未被包封的重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的浓度。

### 2.4 重楼总皂苷长循环脂质体处方考察

2.4.1 氢化大豆磷脂浓度考察 在预试验的基础上,初步得到长循环脂质体处方的比例范围,固定处方中药脂比为 1:30,氢化大豆磷脂:胆固醇的摩尔质量比为 10:1,PEG2000-DSPE 的摩尔浓度百分含量为 5%。按照“2.2”项下制备氢化大豆磷脂浓度分别为 5,10,15,20 mg·ml<sup>-1</sup> 的长循环脂质体。以长循环脂质体平均粒径, PDI, Zeta 电位,包封率为评价指标,筛选出合适的氢化大豆磷脂浓度。结果见表 1。

表 1 氢化大豆磷脂浓度筛选 (n=3)

| 评价指标         | 氢化大豆磷脂浓度 (mg·ml <sup>-1</sup> ) |               |               |               |
|--------------|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|
|              | 5                               | 10            | 15            | 20            |
| 外观           | 溶液均一,带乳光                        | 溶液均一,带乳光      | 溶液均一          | 有磷脂块状物        |
| 粒径分布 (nm)    | 86.3 ± 21.2                     | 91.9 ± 24.1   | 171.5 ± 62.1  | 259.9 ± 62.6  |
| PdI          | 0.151 ± 0.071                   | 0.168 ± 0.043 | 0.221 ± 0.082 | 0.262 ± 0.089 |
| Zeta 电位 (mV) | -37.3 ± 6.3                     | -36.9 ± 4.6   | -37.8 ± 4.8   | -36.2 ± 5.2   |
| 包封率 (%)      | 84.5 ± 5.3                      | 96.4 ± 5.7    | 93.1 ± 5.3    | 94.2 ± 6.9    |

氢化大豆磷脂属于饱和磷脂,与不饱和磷脂相比,氢化大豆磷脂刚性增加,柔性降低,使得脂质双分子层更加稳固与致密,可减少药物泄漏,因此氢化大豆磷脂的用量决定脂质体的理化性质。实验结果显示,当氢化大豆磷脂浓度较低时,制备的长循环脂质体粒径小而均匀,澄明度好,稳定性高,但包封率不高;当氢化大豆磷脂浓度增大时,包封率有所提高,但制备的长循环脂质体粒径较大,浊度较大,偶见磷脂块,4℃ 放置 1 d 后脂质体出现融合,絮凝现象,说明物理稳定性较差。综合考虑脂质体的各项性质,最后确定氢化大豆磷脂浓度为 10 mg·ml<sup>-1</sup>。

2.4.2 胆固醇用量考察 固定处方中氢化大豆磷脂浓度为 10 mg·ml<sup>-1</sup>,药脂比为 1:30,PEG2000-DSPE 的摩尔浓度百分含量为 5%,按照“2.2”项下制备氢化大豆磷脂:胆固醇的摩尔质量比分别为 2:1,3:1,5:1,7:1,10:1 的长循环脂质体,以长循环脂质体平均粒径, PDI, Zeta 电位,包封率为评价指标,筛选出合适的胆固醇用量。结果见表 2。

胆固醇对于脂质体的磷脂双层膜流动性可起到调节剂作用<sup>[3]</sup>。试验结果显示,胆固醇用量较大(2:1 和 3:1) 时,长循环脂质体的粒径明显增大,乳光不明显,4℃ 放置 1 周后脂质体即发生融合,絮凝现象,且包封率不高;胆固醇用量较低(10:1) 时,长循环脂质体粒径小而均匀,澄明度好,稳定性高,4℃ 放置 2 周,脂质体未发现聚集及药物析出现象。因此确定处方中氢化大豆磷脂:胆固醇的摩尔质量比为 10:1。

2.4.3 PEG2000-DSPE 用量考察 固定处方中氢化大豆磷脂浓度为 10 mg·ml<sup>-1</sup>,药脂比为 1:30,氢化

表 2 胆固醇用量筛选 (n=3)

| 评价指标         | 氢化大豆磷脂与胆固醇的摩尔质量比 |               |               |               |               |
|--------------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|              | 2:1              | 3:1           | 5:1           | 7:1           | 10:1          |
| 粒径分布 (nm)    | 253.2 ± 48.1     | 196.9 ± 37.2  | 115.6 ± 35.4  | 108.2 ± 33.7  | 91.9 ± 24.1   |
| PdI          | 0.229 ± 0.043    | 0.197 ± 0.051 | 0.201 ± 0.069 | 0.179 ± 0.050 | 0.168 ± 0.043 |
| Zeta 电位 (mV) | -37.200 ± 4.8    | -36.1 ± 6.3   | -38.4 ± 5.9   | -39.1 ± 7.9   | -36.9 ± 4.6   |
| 包封率 (%)      | 89.1 ± 3.7       | 91.6 ± 5.1    | 94.4 ± 4.2    | 95.1 ± 3.9    | 96.4 ± 5.7    |

大豆磷脂:胆固醇的摩尔质量比为 10:1,按照“2.2”项下制备 PEG2000-DSPE 摩尔浓度百分含量分别为 2.5% 5% 7.5% 10% 的长循环脂质体,以长循环脂质体平均粒径, PDI, Zeta 电位,包封率为评价指标,筛选出合适的 PEG2000-DSPE 用量。结果见表 3。

表 3 PEG2000-DSPE 用量筛选 ( $n=3$ )

| 评价指标         | PEG2000-DSPE 的摩尔浓度百分含量(%) |               |               |               |
|--------------|---------------------------|---------------|---------------|---------------|
|              | 2.5                       | 5.0           | 7.5           | 10.0          |
| 粒径分布 (nm)    | 108.2 ± 33.7              | 91.9 ± 24.1   | 95.6 ± 33.9   | 98.2 ± 32.1   |
| PdI          | 0.179 ± 0.050             | 0.168 ± 0.043 | 0.171 ± 0.046 | 0.162 ± 0.046 |
| Zeta 电位 (mV) | -39.1 ± 7.9               | -36.9 ± 4.6   | -35.1 ± 3.7   | -37.2 ± 6.2   |
| 包封率 (%)      | 95.1 ± 3.9                | 96.4 ± 5.7    | 93.4 ± 4.8    | 94.2 ± 4.2    |

表 4 药脂比筛选 ( $n=3$ )

| 评价指标         | 药脂比 ( $w/w$ ) |               |               |               |               |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|              | 1:10          | 1:20          | 1:30          | 1:40          | 1:50          |
| 粒径分布 (nm)    | 93.2 ± 28.6   | 96.9 ± 32.2   | 91.9 ± 24.1   | 98.2 ± 33.7   | 92.2 ± 31.3   |
| PdI          | 0.184 ± 0.033 | 0.177 ± 0.043 | 0.168 ± 0.043 | 0.173 ± 0.038 | 0.189 ± 0.035 |
| Zeta 电位 (mV) | -33.1 ± 3.9   | -35.2 ± 5.3   | -36.9 ± 4.6   | -36.9 ± 5.2   | -35.7 ± 4.1   |
| 包封率 (%)      | 84.2 ± 5.4    | 90.1 ± 4.6    | 96.4 ± 5.2    | 96.1 ± 3.7    | 94.5 ± 4.7    |

试验结果显示,随着药脂比的降低,脂质体包封率成增加趋势,但对脂质体的其他各项评价指标无显著影响。故确定长循环脂质体的药脂比为 1:30。

2.4.5 水化介质 pH 考察 固定处方中氢化大豆磷脂浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,氢化大豆磷脂:胆固醇的摩尔质量比为 10:1,PEG2000-DSPE 摩尔浓度百分含量为 5%,药脂比为 1:30,分别加入缓冲液 pH 5.5 6.5 7.4 进行水化磷脂膜,按照“2.2”项下制备长循环脂质体,以长循环脂质体平均粒径, PDI, Zeta 电位,包封率为评价指标,筛选水化介质 pH。结果见表 5。

表 5 水化介质 pH 筛选 ( $n=3$ )

| 评价指标         | 水化介质 pH       |               |               |
|--------------|---------------|---------------|---------------|
|              | 5.5           | 6.5           | 7.4           |
| 粒径分布 (nm)    | 103.9 ± 33.9  | 97.1 ± 27.2   | 91.4 ± 31.0   |
| PdI          | 0.173 ± 0.042 | 0.171 ± 0.039 | 0.172 ± 0.047 |
| Zeta 电位 (mV) | -35.1 ± 4.9   | -37.3 ± 5.2   | -36.2 ± 3.9   |
| 包封率 (%)      | 94.2 ± 4.5    | 93.1 ± 3.6    | 95.4 ± 4.1    |

试验结果显示, pH 对脂质体的各项评价指标无显著影响。根据文献<sup>[5,6]</sup>报道,氢化大豆磷脂的水解与 pH 有很大相关性,当 pH 6.5 左右水解速率最小,因此制备脂质体时使用缓冲液来维持介质 pH 的恒定。考虑氢化大豆磷脂稳定性,确定 pH 6.5 磷酸盐作为水化介质。

## 2.5 重楼皂苷长循环脂质体制备工艺考察

2.5.1 水化温度对长循环脂质体包封率、粒径的影响 按照“2.4”项下优化的长循环脂质体处方,选

试验结果表明,PEG2000-DSPE 的用量对脂质体的各项评价指标无显著影响。有文献<sup>[4]</sup>报道,当 PEG2000-DSPE 摩尔浓度百分含量为 5% 时长循环在体内最稳定。因此本文采用加入摩尔浓度百分含量为 5% 的 PEG2000-DSPE 制备长循环脂质体。

2.4.4 药脂比考察 固定处方中氢化大豆磷脂浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,氢化大豆磷脂:胆固醇的摩尔质量比为 10:1,PEG2000-DSPE 摩尔浓度百分含量为 5%,分别按药脂比为 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 投药,按照“2.2”项下制备长循环脂质体,以长循环脂质体平均粒径, PDI, Zeta 电位,包封率为评价指标,筛选出合适的药脂比。结果见表 4。

择水化温度分别在为 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C 5 个不同温度下水化磷脂膜,制备长循环脂质体初乳,将脂质体初乳分别经过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜挤出 2 次, 0.08  $\mu\text{m}$  微孔滤膜挤出 5 次后,考察水化温度对长循环脂质体包封率、粒径的影响。结果见图 2。

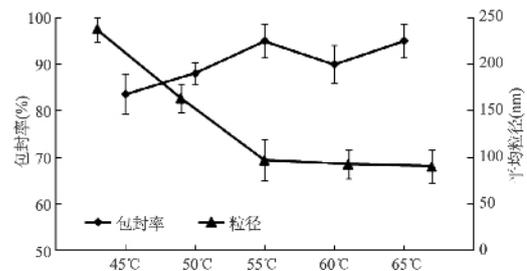


图 2 水化温度对长循环脂质体包封率和粒径的影响

试验结果表明,当在温度为 45 °C, 50 °C 条件下水化磷脂膜,制得的长循环脂质体初品经脂质体挤出器挤出后,所得到的脂质体粒径较大;而当制备温度升高至 55 °C 以上时,制备得到的脂质体粒径较为适中;而再升高温度,制备得到的脂质体粒径有一定程度的降低,但是考虑到大豆磷脂在高温条件下不稳定<sup>[7]</sup>,因此选择水化磷脂膜温度为 55 °C。

2.5.2 挤出次数对长循环脂质体包封率、粒径的影响 按照“2.4”项下优化的长循环脂质体处方和“2.2”项下制备工艺制备长循环脂质体,通过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜挤出 1, 2, 3, 4, 5 次, 0.08  $\mu\text{m}$  微孔

滤膜挤出 1 2 3 4 5 6 7 8 次时分别取样测定样品包封率和粒径,考察挤出次数对长循环脂质体包封率和粒径的影响。结果见图 3、图 4。

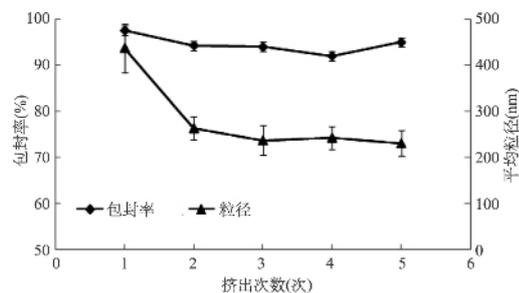


图 3 长循环脂质体初品经脂质体挤出器挤出 (0.22 μm) 次数对包封率和粒径的影响

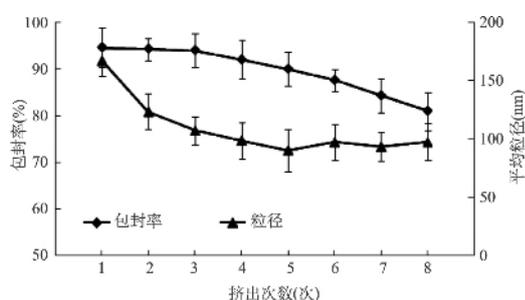


图 4 长循环脂质体经脂质体挤出器挤出 (0.08 μm) 次数对包封率和粒径的影响

试验结果表明,长循环脂质体初品经脂质经 0.22 μm 微孔滤膜挤出 1 次后脂质体的粒径即可显著降低,挤出 3 次后脂质体粒径不再降低;经 0.08 μm 微孔滤膜挤出 5 次后粒径不再减小。由于挤出次数的增加除会使生产时间延长以及生产成本增加之外,还可能会导致磷脂氧化程度的增加。故确定先经 0.22 μm 微孔滤膜挤出 2 次,再过 0.08 μm 微孔滤膜挤出 4 次。放大生产时挤出次数可通过在线监测脂质体的粒径来作适当调整。

## 2.6 重楼总皂苷长循环脂质体制备工艺验证与表征

### 2.6.1 长循环脂质体粒径分布及 Zeta 电位测定

按照“2.4”项下优化的长循环脂质体处方和“2.5”项下优化的制备工艺制备 3 批重楼总皂苷长循环脂质体,以验证所优化的处方和制备工艺的可行性。采用 Mastersizer 2000 粒度分析仪测定长循环脂质体的粒径分布;Zetasizer Nano 电位分析仪测定 Zeta 电位。结果见图 5。

由试验结果可知,长循环脂质体平均粒径在 (109.4 ± 32.7) nm, PDI 为 (0.171 ± 0.036),说明长循环脂质体粒径分布比较均匀;Zeta 电位为 (-36.7 ± 4.5) mV,说明长循环脂质体表面荷负电,微粒间的静电排斥提高了长循环脂质体的分散性,有助于

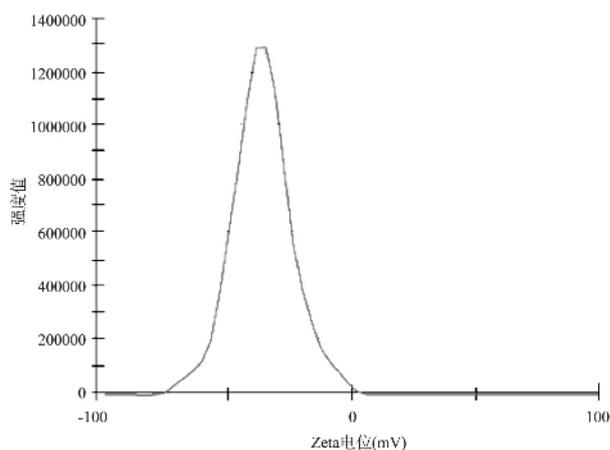
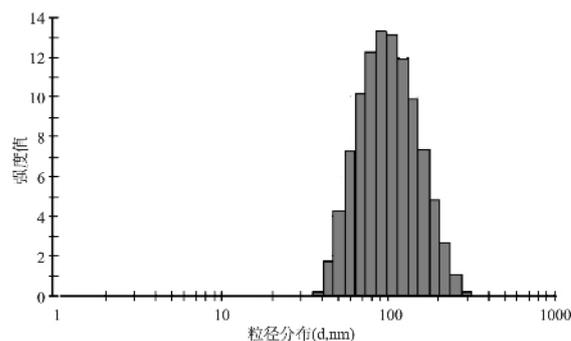


图 5 长循环脂质体粒径分布及 Zeta 电位

脂质体的稳定。

2.6.2 长循环脂质体透射电镜观察 采用磷钨酸负染法制备透射电镜样品。将样品稀释适当倍数后,取适量滴于火棉胶作为支持膜的铜网上,浸泡于 2% 磷钨酸溶液(氢氧化钠调至 pH 7.0) 中染色 2~5 min。待铜网烘干后用透射电镜观察脂质体的形态。见图 6。透射电镜照片显示,可清晰看到脂质体双层结构明显,粒子大小分布较均匀,粒径大小与 Mastersizer 2000 粒度分析仪测定结果一致。

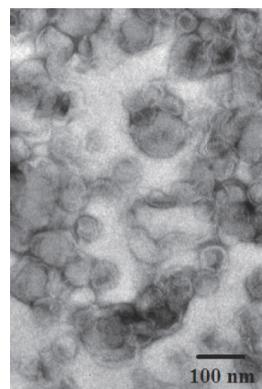


图 6 长循环脂质体透射电镜照片

### 2.7 稳定性考察

将长循环脂质放置在低温 (4 ℃) 条件下 3 个月,分别在 0.5, 1, 2, 3 个月取样检测样品的平均粒径, PDI, Zeta 电位和包封率,考察长循环脂质的稳定性。结果见表 6。

表6 长循环脂质稳定性实验结果 (n=3)

| 评价指标         | 时间(月)         |               |               |               |               |
|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|              | 0             | 0.5           | 1             | 2             | 3             |
| 外观           | 溶液均一带乳光       | 溶液均一带乳光       | 溶液均一带乳光       | 溶液均一带乳光       | 溶液均一带乳光       |
| 粒径分布 (nm)    | 109.4 ± 32.7  | 99.4 ± 42.2   | 103.4 ± 36.8  | 111.9 ± 27.7  | 112.1 ± 37.4  |
| PdI          | 0.171 ± 0.036 | 0.182 ± 0.042 | 0.189 ± 0.032 | 0.179 ± 0.053 | 0.177 ± 0.029 |
| Zeta 电位 (mV) | -36.7 ± 4.5   | -37.2 ± 3.8   | -35.7 ± 3.6   | -38.5 ± 4.7   | -37.1 ± 5.2   |
| 包封率 (%)      | 93.5 ± 3.2    | 94.1 ± 2.3    | 94.6 ± 2.8    | 92.2 ± 4.6    | 91.5 ± 3.6    |

试验结果表明,长循环脂质在低温(4℃)条件下放置3个月,平均粒径、PdI、Zeta 电位包封率基本未发生变化,说明长循环脂质体在低温(4℃)条件下放置可提高脂质体的稳定性。

### 3 讨论

3.1 长循环脂质体又称立体稳定脂质体或空间稳定脂质体或隐形脂质体,它是通过在脂质体的成分中加入一定比例的糖脂(如单唾液神经节苷脂 GM1)或 PEG-Lipid 衍生物,使脂质体表面暴露出一些亲水性的多糖或多羟基基团等方式,减少与血浆中调理成分的结合,从而增加其在血液中的稳定性。长循环脂质体能更持久地延长药物在血流中的时间,避免 RES 的吞噬,以获得更充足的时间到达靶向部位,提高药物的疗效。脂质体制剂的评价指标主要以包封率、粒径大小和稳定性。

3.2 脂质体粒径 本文制备重楼总皂苷长循环脂质体平均粒径约为 100 nm。据文献<sup>[8,9]</sup>报道,粒径大于 100 nm 的脂质体,在体内循环时易被单核巨噬细胞系统捕获,然后在肝、脾组织处聚集,循环时间较短;而粒径小于 100 nm 的脂质体,能穿过肝窦状毛细血管的间隙(平均粒径为 100 nm)到达肝实质细胞,进而被其摄取。另外肿瘤组织中的血管形状构造不规则,管壁缺失,内皮细胞排列疏松,内皮细胞连接间隙宽大,脂质体较易通过肿瘤血管壁进入肿瘤内部,而与小粒径的脂质体相比,100 nm 左右的脂质体不易在组织液静水压的驱动下在毛细血管静脉端从肿瘤内部回流入血,药物滞留量多。

3.3 脂质体 Zeta 电位 通常来说静电作用、空间位阻及溶剂化作用是体系获得稳定性的来源。对于静电作用 Zeta 电位绝对值在 30 ~ 60 mV 时,体系稳定;Zeta 电位绝对值小于 30 mV 时,体系不稳定。本文测定的重楼总皂苷长循环脂质体 Zeta 电位为 -37.5 mV,表明脂质体比较稳定;另外,PEG 链长

度和分子质量与脂质体的稳定性密切相关,PEG2000-DSPE 以一定的空间构象覆盖在脂质体表面,使得脂质体间排斥力增大,脂质体间距离也就增大,从而防止了脂质体聚集的发生,也提高了脂质体稳定性。

### 参 考 文 献

- 1 夏亚飞,阎姝. 重楼抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9): 304-307
- 2 高超,陈建秋,孙文芳,等. HPLC 法测定骨风宁胶囊中重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 含量[J]. 海峡药学,2011,23(5): 58-60
- 3 Gabizon A, Papahadjopoulos D. The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance *in vivo* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1103(1): 94-100
- 4 Kim MS, Kim JS, You YH, et al. Development and optimization of a novel oral controlled delivery system for tamsulosin hydrochloride using response surface methodology [J]. *International Journal of Pharmaceutics* 2007, 341(1): 97-104
- 5 Zhang A, Pawelchak J. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions Part 1: Lipid hydrolysis [J]. *Eur J Pharmaceut Biopharmaceut*, 2000, 50(5): 357-364
- 6 Mustafa G, Daan JA. The effect of surface charge on the hydrolysis kinetics of partially hydrogenated egg phosphatidylcholine and egg phosphatidylglycerol in aqueous liposome dispersions [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1993, 116(1): 49-55
- 7 邓意辉,徐辉. 脂质体[M]. 北京:化学工业出版社,2007. 128-147
- 8 Nagayasu A, Uchiyama K, Kiwada H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1999, 40(1): 75-87
- 9 Ken-ichi O, Keita U, Keiko M, et al. Determinants for *in vivo* anti-tumor effects of PEG liposomal doxorubicin: Importance of vascular permeability within tumors [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, 359(2): 234-240

(2014-09-03 收稿 2014-12-31 修回)