

- 扎贝特渗透泵片处方[J]. 中国药房, 2009, 20(13): 1002-1004.
- [14] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学: 药学分册, 2000, 27(5): 292-298.
- [15] 郭秀花, 杨兴华, 罗艳侠, 等. 均匀设计定量资料有多个应变变量时的分析方法[J]. 解放军药学报, 2005, 21(5): 391-393.
- [16] 尹雅姝, 陈大为, 乔明曦, 等. 凝集素修饰乳酸-羟甲基酸共聚物纳米粒的制备及体外黏附性能评价[J]. 药学学报, 2007, 42(5): 550-556.
- [17] 魏国栋, 李夏兰, 王昭晶, 等. 均匀设计法优化芥菜多糖的提取工艺及其神经网络模型的研究[J]. 食品与发酵工程, 2006, 32(2): 53-56.

制备工艺和包封材料对3种成分脂质体包封率的影响

王理想^{1,2}, 瞿鼎^{1,2}, 刘聪燕^{1,2}, 刘明健^{1,2}, 范晨怡^{1,2}, 陈彦^{1,2*}

(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏南京 210023; 2. 江苏省中医药研究院, 江苏南京 210028)

摘要: 目的 制备雷公藤红素、丹参酮ⅡA、丹参酮ⅡA磺酸钠脂质体, 并评价制备工艺和包封材料对其包封率的影响。方法 分别以薄膜分散法和逆向蒸发法制备3种成分脂质体, 以50%大豆卵磷脂、80%蛋黄卵磷脂、92%大豆卵磷脂和复合磷脂(二棕榈酰磷脂酰胆碱与50%大豆卵磷脂比例5:1)为包封材料, 测定所得脂质体的平均粒径和多分散系数, 再计算其包封率。结果 雷公藤红素和丹参酮ⅡA磺酸钠脂质体采用逆向蒸发法制备时的包封率均高于薄膜分散法, 而且雷公藤红素高于丹参酮ⅡA磺酸钠, 并分别以80%蛋黄卵磷脂和92%大豆卵磷脂包封时最高。丹参酮ⅡA脂质体采用薄膜分散法制备, 并以50%大豆卵磷脂包封时的包封率最高, 但远低于其他2种脂质体。结论 含有多氢键的脂溶性雷公藤红素和不含氢键的水溶性丹参酮ⅡA磺酸钠适合逆向蒸发法制备其脂质体, 而无氢键的脂溶性丹参酮ⅡA适合薄膜分散法。

关键词: 雷公藤红素; 丹参酮ⅡA; 丹参酮ⅡA磺酸钠; 脂质体; 包封率; 制备工艺; 包封材料

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)01-0060-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.01.011

Effects of preparation technologies and entrapment materials on encapsulation efficiencies of three constituents' liposomes

WANG Li-xiang^{1,2}, QU Ding^{1,2}, LIU Cong-yan^{1,2}, LIU Ming-jian^{1,2}, FAN Chen-yi^{1,2}, CHEN Yan^{1,2*}

(1. Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

ABSTRACT: AIM To prepare the liposomes loaded with celastrol, tanshinone II A and tanshinone II A sodium sulfonate and to evaluate the effects of preparation technologies and entrapment materials on the encapsulation efficiencies. **METHODS** The liposomes for three constituents were prepared by film dispersion method and reverse phase evaporation method, respectively. 50% Lecithin high potency, 80% egg yolk lecithin, 92% lecithin high potency and complex phospholipid (5:1 for ratio of dipalmitoyl phosphatidylcholine to 50% lecithin high potency) were served as entrapment materials. The encapsulation efficiencies were thus calculated based on the measured

收稿日期: 2016-05-03

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81503264); 江苏省自然科学基金(BK20151038); 中国中医科学院肿瘤专项(ZZ08080015)

作者简介: 王理想(1991—)男, 硕士生, 研究方向为中药新型给药系统。Tel: 15861816883, E-mail: wanglixiangnjutcm@163.com

*通信作者: 陈彦, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新型给药系统及生物药剂学。Tel: 13805157904, E-mail: ychen202@hotmail.com

mean sizes and polydispersity of the liposomes. **RESULTS** Celastrol and tanshinone II A sodium sulfonate liposomes accomplished by reverse phase evaporation method got the highest encapsulation efficiency when entrapped with 80% egg yolk lecithin and 92% lecithin high potency, respectively, which were higher than those prepared by film dispersion method. And celastrol liposomes exhibited an even superior performance than tanshinone II A sodium sulfonate liposomes. Tanshinone II A liposome prepared by film dispersion method and then entrapped with 50% lecithin high potency obtained its the highest value of encapsulation efficiency, which was much lower than those of another two liposomes. **CONCLUSION** Reverse phase evaporation method is appropriate for hydrophobic celastrol with multiple hydrogen bonds and hydrophilic sodium tanshinone II A without hydrogen bonds to prepare their liposomes, while film dispersion method is applicable to hydrophobic tanshinone II A without hydrogen bonds.

KEY WORDS: celastrol; tanshinone II A; tanshinone II A sodium sulfonate; liposomes; encapsulation efficiencies; preparation technologies; entrapment materials

脂质体是一类纳米级别生物可降解的给药系统, 可以用作靶向细胞特定给药, 减少系统毒副作用^[1]。通过脂质体包封技术, 可以提高药效, 并减少药物毒性, 已经被广泛应用于抗肿瘤化疗中, 比如抑制细胞生长的阿霉素^[2], 而且脂质体在治疗炎症方面也有着潜在优势^[3]。目前, 国内上市的脂质体制剂共8个, 剔除不同厂家的同一药物和同一厂家同一药物的不同剂量, 仅有盐酸多柔比星脂质体注射液、注射用紫杉醇脂质体、注射用两性霉素B脂质体和榄香烯注射液4个国产药物, 而国外共15个药物(剔除部分相同成分者)^[4]。理论上, 脂质体既能搭载难溶性药物在磷脂双分子层中, 又能包封水溶性药物在较大的亲水内腔中, 具有与多种理化性质药物组成纳米递送系统的优势, 但在难溶性/水溶性中药单体中, 可被有效包封进脂质体中以进行广泛研究的只占一小部分, 大多数化合物与脂质体系统的兼容性较差, 其原因主要在于不同化学实体的结构差别较大, 诸如亲水性、疏水性、结构中氢键数目等因素将直接影响药物与磷脂材料的物理结合, 其次是制备方法选择、后处理工艺以及制剂储存, 也与脂质体系统制剂学性质密切相关。而且, 目前研究鲜有从包封材料-制备工艺相关性的角度给出指导性结果。

雷公藤红素是从卫茅科雷公藤属植物雷公藤 *Triperygium wilfordii* Hook f. 中分离提纯得到的三环萜醌类化合物^[5], 分子式 $C_{29}H_{38}O_4$, 相对分子质量 450.62; 丹参酮 II A 是《中国药典》收录的丹参药材指标成分之一, 也是其主要脂溶性有效成分^[6], 分子式 $C_{19}H_{18}O_3$, 相对分子质量 294.33; 丹参酮 II A 磺酸钠是丹参酮 II A 经磺化后形成的水溶性钠盐, 增加了有效成分的水溶性^[7], 分子式

$C_{19}H_{17}NaO_6S$, 相对分子质量 396.39, 三者结构见图1。本实验将以其为研究对象, 分别采用薄膜分散法和逆向蒸发法制备, 不同纯度磷脂包封, 比较各因素对药物包封率的影响, 可为提高中药单体的脂质体系统构建成功率提供参考。

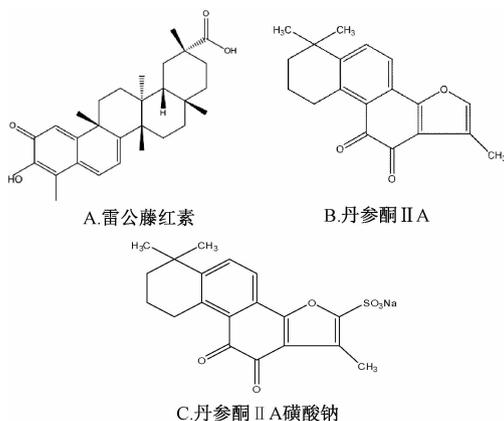


图1 3种成分的结构

Fig. 1 Structures of three constituents

1 材料

Nano-ZS 马尔文粒径测定仪(英国马尔文公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); 电子分析天平(百万分之一, 瑞士 Mettler-Toledo 公司); Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司); 超声波细胞粉碎机(南京先欧仪器制造有限公司); 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); TG16W 台式高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司)。大豆卵磷脂(上海太伟药业有限公司, 含有量 50%); 蛋黄卵磷脂(含有量 80%); 大豆卵磷脂(含有量 92%)(上海艾伟特医药科技有限公司); 胆固醇(分析纯, 上海惠兴生化试剂有限

公司);雷公藤红素(即泽医药科技有限公司,含有量 $\geq 99\%$);丹参酮II A、丹参酮II A 磺酸钠(西安鸿生生物技术有限公司,含有量均 $\geq 98\%$);0.45、0.80 μm 混合膜(上海密粒膜分离给水有限公司)。甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 薄膜分散法制备脂质体 精密称取药物、磷脂及胆固醇适量,溶于10 mL氯仿中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴100 r/min旋转减压蒸发除去有机溶剂至形成均匀薄膜,置于真空干燥器中,静置过夜。加入10 mL去离子水,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴旋转水合1 h,以使脂质体膜脱落,得到混悬液,冰浴探头超声5 min(每超声2 s后间歇3 s,功率200 W),得到澄清透明、具有乳光的脂质体溶液。

2.2 逆向蒸发法制备脂质体 精密称取药物、磷脂及胆固醇适量,置于茄形瓶中,加9 mL氯仿溶解,再加3 mL去离子水,超声3~5 min,得W/O型乳浊液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发至瓶壁上形成凝胶后,继续处理以使其脱落,再蒸发15~20 min,得到均匀的脂质体混悬液。加入7 mL去离子水,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴继续旋转水合1 h,冰浴探头超声5 min(每超声2 s后间歇3 s,功率200 W),得到澄清透明、具有乳光的脂质体溶液。

2.3 雷公藤红素、丹参酮II A 和丹参酮II A 磺酸钠含有量测定

2.3.1 对照品贮备液制备 精密称取雷公藤红素3.90 mg,加甲醇制得0.390 mg/mL贮备液;精密称取丹参酮II A 2.60 mg,甲醇制得0.260 mg/mL贮备液;精密称取丹参酮II A 磺酸钠10.01 mg,甲醇制得1.001 mg/mL贮备液。

2.3.2 供试品溶液制备 量取雷公藤红素脂质体、丹参酮II A 脂质体、丹参酮II A 磺酸钠脂质体各1.0 mL,置于10 mL量瓶中,甲醇破乳后稀释至刻度,即得。

2.3.3 色谱条件 参考文献[7-9]并加以优化。雷公藤红素分析采用Agilent SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μm);柱温30 $^{\circ}\text{C}$;流动相甲醇-2%醋酸(90:10);体积流量1 mL/min;检测波长426 nm;进样量10 μL 。丹参酮II A 分析采用Agilent SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μm);柱温30 $^{\circ}\text{C}$;流动相甲醇-2%醋酸(90:10);体积流量1 mL/min;检测波长271 nm;进样量10 μL 。丹参酮II A 磺酸钠分析采用Agilent SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μm);柱温30 $^{\circ}\text{C}$;流动相甲醇-2%醋酸(70:30);体积流量1 mL/min;检测波长271 nm;进样量5 μL 。取空白脂质体破乳溶液,雷公藤红素、丹参酮II A、丹参酮II A 磺酸钠对照品及三者脂质体破乳溶液进样分析,结果见图2,可知空白脂质体对药物测定无干扰,雷公藤红素、丹参酮II A、丹参酮II A 磺酸钠色谱峰的保留时间分别为6.531、4.431、4.618 min。

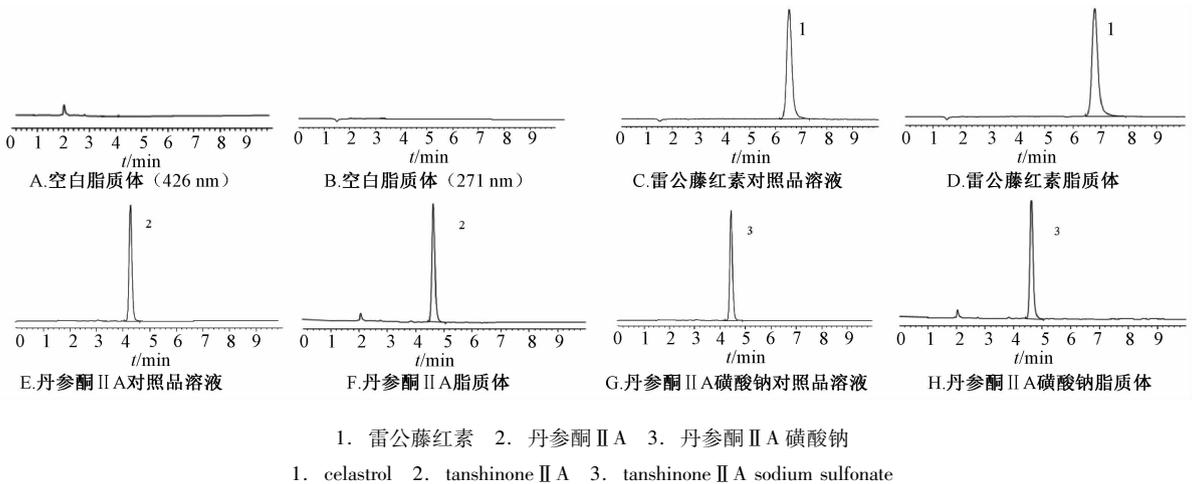


图2 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms

2.3.4 标准曲线绘制 精密吸取雷公藤红素对照品贮备液适量,甲醇稀释成39.00、19.50、9.750 0、4.875 0、2.437 5、1.218 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液;精密吸

取丹参酮II A 对照品贮备液适量,甲醇稀释成0.816、1.632、3.264、6.528、8.160、16.320、32.640 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液;精密吸取丹参酮II A 磺酸钠对

照品贮备液适量，甲醇稀释成 100.12、50.06、25.03、12.515、6.257 5、3.128 8、1.564 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列对照品溶液。在“2.3.3”项色谱条件下测定，以峰面积为纵坐标 (X)，溶液质量浓度为横坐标 (Y) 进行回归，得雷公藤红素、丹参酮 II A、丹参酮 II A 磺酸钠回归方程分别为 $Y = 7.355X - 2.115$ ($r = 0.999 8$)、 $Y = 53.42X + 4.389$ ($r = 0.999 8$)、 $Y = 18.78X - 8.85$ ($r = 0.999 9$)，分别在 1.218 7 ~ 39.00、0.816 ~ 32.640、1.564 4 ~ 100.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

2.4 包封率测定方法建立 采用过膜法^[8]去除游离的雷公藤红素和丹参酮 II A，取其脂质体混悬液，0.22 μm 微孔滤膜过滤，精密吸取续滤液 1.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇破乳定容后，测定雷公藤红素和丹参酮 II A 含量。采用透析法去除未包封的丹参酮 II A 磺酸钠，透析袋规格相对

分子质量 13 000，取其脂质体混悬液 1 mL，置于煮过的透析袋中，两头夹紧，流水透析 6 h，倾入 10 mL 量瓶中，少量水润洗，甲醇破乳定容，测定丹参酮 II A 磺酸钠含量。计算三者包封率，公式为包封率 = $(W_{\text{包}}/W_{\text{总}}) \times 100\%$ ，其中 $W_{\text{包}}$ 和 $W_{\text{总}}$ 分别表示脂质体包载量和总投料量。

2.5 包封率比较

2.5.1 雷公藤红素 固定处方中其他因素不变(雷公藤红素与磷脂比例 1:30，胆固醇与磷脂比例 1:4)，取不同磷脂 [50% 大豆卵磷脂、80% 蛋黄卵磷脂、92% 大豆卵磷脂、复合磷脂 (二棕榈酰磷脂酰胆碱与 50% 大豆卵磷脂比例 5:1)]，分别采用薄膜分散法和逆向蒸发法制备脂质体，过膜法测定包封率，结果见表 1。由表可知，雷公藤红素脂质体采用逆向蒸发法制备时的包封率高于薄膜分散法，并以 80% 蛋黄卵磷脂包封时最高。

表 1 雷公藤红素脂质体包封率比较结果 (%)

Tab. 1 Comparison results of encapsulation efficiencies of celastrol liposomes (%)

方法	包封材料			
	50% 大豆卵磷脂	80% 蛋黄卵磷脂	92% 大豆卵磷脂	复合磷脂
薄膜分散法	81.73	60.47	50.22	80.63
逆向蒸发法	87.62	91.63	89.52	82.64

2.5.2 丹参酮 II A 除丹参酮 II A 与磷脂比例固定为 1:30 外，其他同“2.5.1”项，结果见表 2。由表可知，两种制备方法下丹参酮 II A 脂质体包封率均

较低(小于 10%)，并以薄膜分散法制备，50% 大豆卵磷脂包封时最高。

表 2 丹参酮 II A 脂质体包封率比较结果 (%)

Tab. 2 Comparison results of encapsulation efficiencies of tanshinone II A liposomes (%)

方法	包封材料			
	50% 大豆卵磷脂	80% 蛋黄卵磷脂	92% 大豆卵磷脂	复合磷脂
薄膜分散法	5.40	2.10	2.61	4.54
逆向蒸发法	1.76	4.55	2.04	4.93

2.5.3 丹参酮 II A 磺酸钠 除丹参酮 II A 磺酸钠与磷脂比例固定为 1:30 外，其他同“2.5.1”项，结果见表 3。由表可知，丹参酮 II A 磺酸钠脂质体

包封率采用逆向蒸发法时高于薄膜分散法，并以 92% 大豆卵磷脂包封时最高。

表 3 丹参酮 II A 磺酸钠脂质体包封率比较结果 (%)

Tab. 3 Comparison results of encapsulation efficiencies of tanshinone II A sodium sulfonate liposomes (%)

方法	包封材料			
	50% 大豆卵磷脂	80% 蛋黄卵磷脂	92% 大豆卵磷脂	复合磷脂
薄膜分散法	55.01	48.69	67.08	44.48
逆向蒸发法	59.23	50.47	73.74	51.55

2.6 粒径、Zeta 电位和多分散系数测定 脂质体平均粒径和多分散系数采用马尔文激光粒度仪测定。固定药物与磷脂比例 1:30，胆固醇与磷脂比例 1:4，采用 92% 大豆卵磷脂，制备雷公藤红素、丹参酮 II A、丹参酮 II A 磺酸钠脂质体溶液，各取

0.4 mL，加水稀释至 4 mL，测得平均粒径分别为 (98.3 ± 0.9) 、 (100.8 ± 1.2) 、 (89.5 ± 0.6) nm，Zeta 电位分别为 (-51.6 ± 1.0) 、 (-50.5 ± 0.2) 、 (-48.7 ± 2.1) mV，多分散系数分别为 0.239 ± 0.011 、 0.224 ± 0.012 、 0.233 ± 0.014 。粒径分布

图见图3,可知3种脂质体粒径分布较均匀。

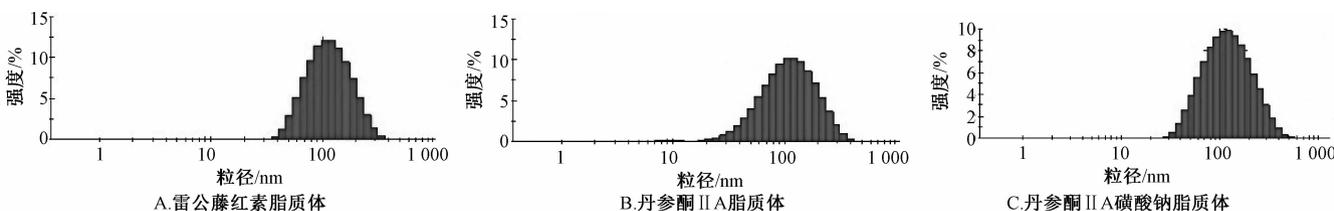


图3 3种脂质体的粒径分布

Fig. 3 Particle size distributions of three liposomes

3 讨论

前期采用摇瓶结合 LC 法测定雷公藤红素、丹参酮 II A 油水分配系数时,发现两相分离平衡后未能在水相中检测出两者,故通过 ChemDraw 软件读取化合物的二维结构式,预测了雷公藤红素、丹参酮 II A、丹参酮 II A 磺酸钠的分配系数,测得三者 $\log P$ 分别为 5.078、3.877、1.558。脂溶性或水溶性很强 ($\log P > 4.5$ 或 $\log P < -0.3$) 的药物可包封成较高包封率的脂质体,而 $\log P$ 中等的药物就难于形成理想脂质体^[10-12]。雷公藤红素属于脂溶性较高的药物,无论是采用薄膜分散法还是逆向蒸发法制备,其脂质体整体包封率均高于丹参酮 II A 磺酸钠、丹参酮 II A 脂质体,它作为一种疏水型成分,理论上可以与脂质及胆固醇很好地溶于氯仿中,并且分子结构中多个氢键还能进一步与磷脂亲水基发生氢键作用力,两种因素相互协同,保证了雷公藤红素无论以何种制备方式包封都能达到较高的包封率;对于丹参酮 II A 磺酸钠来说,由于其在氯仿中溶解性不理想,故本实验采用其水溶液水合薄膜的方法进行包封,主要是通过超声粉碎时脂质膜瞬间开放,将药物载入脂质体亲水内腔中,但由于没有氢键作用力协助进入脂质体,故其包封率低于雷公藤红素;对丹参酮 II A 而言,尽管在氯仿中溶解度较好,但与磷脂的相互相容性差,一旦水合后,只有一小部分通过疏水作用力可被包封在脂质双分子层中,可能是造成丹参酮 II A 包封率低下的主要原因。

文献 [13] 报道,脂溶性药物通过薄膜分散法制备,并以复合磷脂包封时的包封率高于单一磷脂,而本实验中的雷公藤红素和丹参酮 II A 也属于脂溶性药物,结果也与文献报道一致。但采用逆向蒸发法制备脂质体以及水溶性药物脂质体的包封率不一定遵循这个规律,本实验中丹参酮 II A 磺酸钠

以 92% 大豆卵磷脂包封时的包封率最高。综上所述,制备工艺和包封材料是影响脂质体包封率的主要因素,选择针对特定类型药物最匹配的方法制备高包封率的脂质体系统有着重要意义。

参考文献:

- [1] Bartneck M, Scheyda K M, Warzecha K T, et al. Fluorescent cell-traceable dexamethasone-loaded liposomes for the treatment of inflammatory liver diseases [J]. *Biomaterials*, 2015, 37: 367-382.
- [2] Goram A L, Richmond P L. Pegylated liposomal doxorubicin: tolerability and toxicity [J]. *Pharmacotherapy*, 2001, 21 (6): 751-763.
- [3] Crielaard B J, Lammers T, Schifflers R M, et al. Drug targeting systems for inflammatory disease: One for all, all for one [J]. *J Controlled Release*, 2012, 161 (2): 225-234.
- [4] 柯刚,伍振峰,杨明,等. 脂质体技术的转化应用分析及关键问题研究 [J]. *世界中医药*, 2015, 10 (3): 331-336.
- [5] 袁菱,周蕾,陈彦,等. 雷公藤红素纳米结构脂质载体的制备及其理化性质考察 [J]. *中成药*, 2013, 35 (9): 2023-2027.
- [6] 范广俊,范青,赵珊,等. 丹参酮 II A 理化性质的研究 [J]. *药学服务与研究*, 2008, 8 (4): 295-296.
- [7] 游本刚,陆晓文,许苗松,等. 喷雾干燥法制备丹参酮 II A 磺酸钠微球 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20 (20): 1966-1971.
- [8] 吴军,吴明,刘荻,等. 雷公藤红素醇质体的制备及体外透皮性能研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2015, 32 (5): 929-933.
- [9] 李军,张英,张永东. 丹参酮 II A 磺酸钠有关物质和含量测定方法研究 [J]. *中南药学*, 2006, 4 (4): 291-293.
- [10] 叶兆伟,承伟. 脂质体包封率测定方法及影响因素 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2007, 20 (10): 789-792.
- [11] 孙庆雪,邵伟,黄桂华. 脂质体制备方法的选择 [J]. *中成药*, 2010, 32 (8): 1397-1401.
- [12] 张兆颖,储婷,马伟从,等. 丹参酮 II A 脂质体的制备及对 HepG₂/ADR 细胞增殖的抑制作用 [J]. *华西药理学杂志*, 2014, 29 (1): 33-35.
- [13] 曾诚,黄伟,何承辉,等. 复合磷脂脂质体的研究进展 [J]. *国际药学研究杂志*, 2015, 42 (1): 91-95.