

人参皂苷 Re 冻干脂质体的制备及贮存稳定性研究

高金芝^{1,2}, 焦安妮³, 于敏², 郝悦¹, 焦连庆^{1,2*}, 田义新^{1*}

1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林省中医药科学院植物化学所, 吉林 长春 130012

3. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021

摘要: 目的 建立并优化人参皂苷 Re (Re) 脂质体制备工艺, 提高 Re 脂质体贮藏稳定性。方法 薄膜分散-机械震荡法制备 Re 脂质体, 透析法分离脂质体与未包封的游离药物, HPLC 法测定包封率, 冷冻干燥技术制备冻干脂质体制剂; 以包封率为主要筛选指标, 采用正交试验设计优选脂质体处方及冻干工艺。结果 薄膜分散-机械震荡法制备的 Re 脂质体包封率最高, 最佳处方工艺为药物与磷脂质量比 1 : 30, 磷脂与胆固醇质量比 16 : 1, 冰水浴超声 30 min, 双蒸水为水化液; 最佳冻干工艺为以蔗糖为冻干保护剂, 二糖-水质量比为 1 : 10, -20 °C 为预冻温度, 0.9% 的生理盐水为再水化液。结论 Re 脂质体制备工艺稳定可行, 以蔗糖为冻干保护剂制得的 Re 脂质体各指标良好, 显著延长贮存时间。

关键词: 人参皂苷 Re; 脂质体; 冷冻干燥技术; 包封率; 正交试验; 贮存稳定性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)02-0330-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.011

Study on preparation and storage stability of ginsenoside Re liposomes

GAO Jin-zhi^{1,2}, JIAO An-ni³, YU Min², HAO Yue¹, JIAO Lian-qing^{1,2}, TIAN Yi-xin¹

1. College of TCM Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Institute of Phytochemical, Jilin Academy of Chinese Medicine Sciences, Changchun 130012, China

3. College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China

Abstract: Objective To establish and optimize preparation technology of ginsenoside Re liposomes, therefore to improve storage stability. **Methods** Ginsenoside Re liposomes were prepared by the method of film dispersion-mechanical vibration, which were collected by separating liposome from disclosed free drug by dialysis method. Measure entrapment efficiency by HPLC. Prepare freeze-dried liposome preparations by freezing-drying technology. Taking entrapment efficiency as the main screening index, optimize liposome formulation and freezing-drying technology by orthogonal test design. **Results** The entrapment efficiency of ginsenoside Re liposomes prepared by the method of film dispersion-mechanical vibration is the highest. The best formulation technology is: Mass ratio of drug and phospholipid is 1 : 30, mass ratio of phospholipid and cholesterol is 16 : 1, ice-water bath ultrasound is 30 min, and double distilled water is hydration solution; The best freezing-drying technology is: Taking sucrose as the freeze-drying protective agent, mass ratio of disaccharide-water is 1 : 10, pre-freezing temperature is -20 °C, and normal saline of 0.9% is reconstitution solution. **Conclusion** The preparation technology of liposome is stable and practicable. The ginsenoside Re liposome prepared by taking the sucrose as the freeze-drying protective agent has good indexes, which can extend the storage period.

Key words: ginsenoside Re; liposomes; freezing-drying technology; entrapment efficiency; orthogonal test; storage stability

人参皂苷 Re (Re) 为原人参三醇型人参皂苷的主要代表性成分, 约占总皂苷量的 30%。据研究 Re 可显著降低血糖, 改善糖耐量水平^[1], 可抗心肌缺血及抗炎、抗氧化^[2-6], 还具有明显的神经保护作用^[7-9]。

但 Re 口服溶出速率较慢, 生物利用度极低^[10], 限制了临床应用。据报道^[11], 参麦注射液中 Re 以 15.9 mg/kg 剂量口服后的最大血药浓度值 (C_{max}) 仅为 2.644 mg/L; ig 藤珠胃康颗粒后, Re 口服吸收

收稿日期: 2017-09-20

作者简介: 高金芝 (1992—), 女, 硕士研究生。E-mail: 760184055@qq.com

*通信作者 田义新, 博士, 教授, 主要从事中药材栽培研究。E-mail: y.x.tian2003@163.com

焦连庆, 博士, 主任药师, 主要从事天然药物化学及代谢研究。E-mail: jlq51@tom.com

极低^[12]。因此需寻求一种可改善 Re 生物利用度的剂型,提高 Re 的疗效。脂质体作为新型药物载体,在改善药物溶解速率,增强药物靶向性、缓释性、低毒性等方面具有良好的效果^[13]。有报道将人参皂苷 Rg₁^[14]、Rg₃^[15]等制备成脂质体,具有长效缓释作用,可明显提高体内生物利用度。本实验拟将 Re 制备成脂质体,以期增强疗效。

文献报道脂质体制备方法有薄膜分散法、反相蒸发法、乙醇注入法等。由于脂质体混悬液稳定性较差,贮存时间较短,在储存过程中存在聚集、融合、药物泄露、水解、氧化等问题,采用冷冻干燥技术,在冻干过程中加入有效的冻干保护剂,最终得到稳定性较好的脂质体冻干粉,可显著延长贮存时间^[16-17]。因此,本实验对 Re 脂质体制备方法、制备工艺及贮存稳定性进行探索,以期提高 Re 的药用价值。

1 仪器与材料

BT-25S 电子天平,德国赛多利斯科学仪器有限公司;SH-III 真空泵,上海豫康科教仪器设备有限公司;RE-2000A 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;KQ-500E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;SPLab06 注射泵,保定申辰泵业有限公司;FD-1B-50 真空冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;LC-20A 高效液相色谱仪,SPD-M20A 二极管阵列检测器,SIL-10AF 自动进样器,日本岛津公司;Zetasizer-nano-zs90 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪,马尔文仪器有限公司。

Re 样品,批号 16011201,质量分数 97.67%,长春吉科生物技术有限公司;Re 对照品,批号 16012701,质量分数 99.52%,北京恒元启天化工技术研究院;大豆卵磷脂,注射级,上海太伟药业有限公司,批号 201603012;胆固醇,注射级,上海惠世生化试剂有限公司,批号 140808;水为双蒸水,乙腈为色谱纯,其他试剂及药品均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体制备方法考察

2.1.1 乙醇注入法^[18] 准确称取处方量的注射用大豆卵磷脂、胆固醇和 Re,于适量乙醇中溶解,将乙醇溶液通过注射泵缓慢注入恒温至 60 ℃ 的 50 mL 双蒸水中,磁力搅拌 1 h,转移至 500 mL 茄形瓶中,减压蒸发除去剩余乙醇,定容,以冰水浴环境下超声 30 min 进一步均匀加工处理,即得乳白色的 Re 脂质体混悬液(样品 1),4 ℃ 保存备用。

2.1.2 薄膜分散-机械震荡法^[19] 准确称取处方量的注射用大豆卵磷脂、胆固醇和 Re,于 500 mL 茄形瓶中加入适量溶剂超声溶解(溶剂为氯仿-甲醇 5:1),在旋转蒸发仪上减压除去有机溶剂,待瓶壁上形成均匀透明的薄膜,室温条件下继续抽真空 30 min,除尽痕量有机溶剂。加入双蒸水水化薄膜至完全脱落后,以冰水浴环境下超声 30 min 进一步均匀加工处理,即得乳白色的 Re 脂质体混悬液(样品 2),4 ℃ 保存备用。

2.1.3 反相蒸发法^[20] 准确称取处方量的注射用大豆卵磷脂、胆固醇和 Re,置于 500 mL 茄形瓶中,加入适量乙醚超声溶解,于瓶中加入 20 mL 双蒸水,冰水浴下超声直至形成均匀的有乳光的分散体,减压蒸发除去乙醚,直至于茄形瓶表面形成凝胶,加入剩余 30 mL 双蒸水,继续旋转蒸发 30 min,以冰水浴环境下超声 30 min 进一步均匀加工处理,即得乳白色的 Re 脂质体混悬液(样品 3),4 ℃ 保存,备用。

2.2 Re 定量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 参考《中国药典》方法^[21]并进行改进,使保留时间提前。色谱柱为 Wonda Cract ODS-2 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液(24:76);检测波长 203 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 35 ℃;进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取 Re 对照品 5.00 mg,加甲醇溶解于 50 mL 量瓶中,定容,制得质量浓度为 100 μg/mL 的 Re 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 精密移取载药脂质体 5 mL,加甲醇于 50 mL 量瓶中摇匀破乳,定容,制得供试品溶液。

2.2.4 线性范围考察 精密移取 Re 对照品溶液 2、4、6、8、10 mL 置于 10 mL 量瓶中,分别用甲醇稀释成 20、40、60、80、100 μg/mL 的系列对照品溶液。另精密移取对照品溶液 0.1 mL 置于 5 mL 量瓶中甲醇定容,溶液质量浓度为 2 μg/mL。按“2.2.1”项下色谱条件测定,以进样质量浓度为横坐标(X),色谱峰面积积分为纵坐标(Y),绘制标准曲线并进行线性回归,得回归方程 $Y=5\,741.2X-5\,362.5$, $r=0.999\,7$ 。表明 Re 在质量浓度为 2~100 μg/mL 呈现良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取质量浓度为 100 μg/mL 的 Re 对照品溶液 20 μL,按“2.2.1”项色谱条件测定,重复进样 6 次,结果 Re 色谱峰面积的

RSD 为 0.21%，表明仪器精密度良好。

2.2.6 专属性考察 按“2.1.2”项下方法制备空白脂质体，精密吸取空白脂质体液体 5 mL，同供试品溶液相同方法，制得空白脂质体阴性对照溶液。分

别精密吸取 Re 对照品、Re 脂质体供试品及空白脂质体阴性对照溶液各 20 μ L，进样并记录色谱图，结果表明，脂质体中 Re 达到基线分离且对称性良好，阴性对照对 Re 测定无干扰，见图 1。

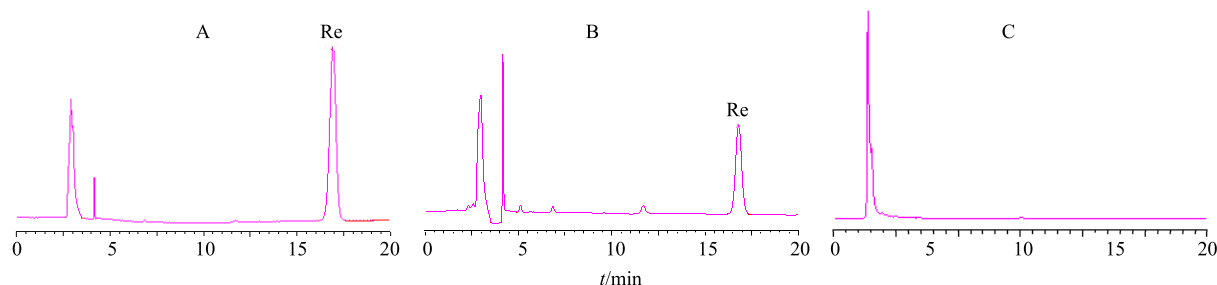


图 1 Re 对照品溶液 (A)、Re 脂质体样品 (B) 和空白脂质体阴性对照 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of Re contrast solution (A), Re liposome sample (B), and blank liposome negative control (C)

2.2.7 稳定性试验 吸取上述同一供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件测定，在 0、1、3、9、18、24 h 分别测定 Re 的峰面积，考察样品稳定性，计算其 RSD 为 0.68%，结果表明 24 h 内供试品溶液有良好的稳定性。

2.2.8 加样回收率试验 按“2.1.2”项下方法制备空白脂质体，加入含有处方量药物的量瓶中，加甲醇破乳并稀释，使药物质量浓度为 20、40、60 μ g/mL，按“2.2.1”项色谱条件测定峰面积，计算得平均加样回收率为 101.58%，RSD 为 0.32%。

2.3 包封率的测定

2.3.1 透析时间的考察 准确移取 Re 脂质体混悬液 1.0 mL，置于截留相对分子质量为 10 000 的透析袋中作为内相，双蒸水为外相，将透析袋浸入 100 mL 双蒸水中，于 25 $^{\circ}$ C 恒温磁力搅拌并计时，每小时吸取并更换外相溶液，HPLC 测定透析平衡液中 Re 质量浓度。确定透析平衡时间 7 h，结果见图 2。

2.3.2 Re 脂质体包封率的测定 精确量取 1.0 mL

Re 脂质体混悬液（样品 1~3），分别置于提前处理好的透析袋中，按“2.3.1”项下处理样品，直到透析 7 h 结束。透析介质中游离 Re 的质量浓度为 C_1 。另精确移取脂质体样品 5 mL，于 50 mL 量瓶中，加甲醇超声破乳，并定容至刻度，此为 Re 总质量浓度 C_0 ，按下式计算包封率和载药量。3 种制备方法所测包封率结果分别为 44.9%、75.3%、68.8%，载药量分别为 1.33%、3.04%、2.12%，结果表明，薄膜分散-机械震荡法制备脂质体包封率及载药量较高，乙醇注入法结果最低。

$$\text{包封率} = 1 - C_1/C_0$$

$$\text{载药量} = W_1/W_{\text{总}}$$

C_1 为透析介质中游离药物质量浓度， C_0 为脂质体中包封与游离药物质量浓度总和， W_1 为脂质体中药物量， $W_{\text{总}}$ 为脂质体总质量

2.4 正交试验优化处方工艺

根据文献及前期预试验结果，选择对 Re 脂质体制备影响较为显著的 3 个因素作为考察对象，即卵磷脂与药物质量比 (A)、卵磷脂与胆固醇质量比 (B)、超声时间 (C)。各个因素分别选取 3 个水平，采用薄膜分散-机械震荡法制备脂质体，双蒸水为水化液，包封率为评价指标，按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。表 1 为正交试验设计及结果，表 2 为方差分析结果。由正交试验方差分析结果可知，各因素对 Re 脂质体包封率的主次顺序为 $A > C > B$ ，最佳处方工艺为 $A_3B_3C_1$ ，即卵磷脂与药物质量比为 30:1，卵磷脂与胆固醇质量比为 16:1，冰水浴超声 15 min，双蒸水为水化液时所制备的 Re 脂质体包封率最高。

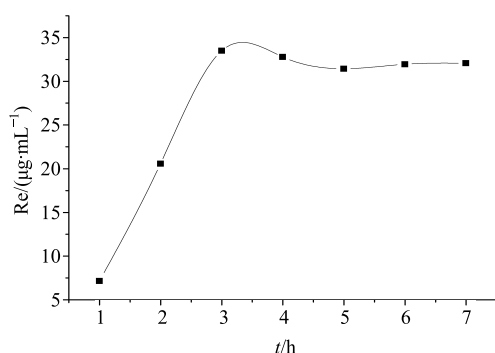


图 2 Re 脂质体透析平衡曲线

Fig. 2 Dialysis equilibrium curve of Re liposome

表 1 Re 脂质体混悬液 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果
Table 1 $L_9(3^4)$ orthogonal design and results of Re liposome suspension

试验号	A	B	C/min	D (误差)	包封率/%
1	10 : 1 (1)	4 : 1 (1)	15 (1)	(1)	69.38
2	10 : 1 (1)	8 : 1 (2)	30 (2)	(2)	65.37
3	10 : 1 (1)	16 : 1 (3)	45 (3)	(3)	59.69
4	20 : 1 (2)	4 : 1 (1)	30 (2)	(3)	71.48
5	20 : 1 (2)	8 : 1 (2)	45 (3)	(1)	67.24
6	20 : 1 (2)	16 : 1 (3)	15 (1)	(2)	77.01
7	30 : 1 (3)	4 : 1 (1)	45 (3)	(2)	73.83
8	30 : 1 (3)	8 : 1 (2)	15 (1)	(3)	77.64
9	30 : 1 (3)	16 : 1 (3)	30 (2)	(1)	81.86
K_1	194.44	214.69	224.03	218.48	
K_2	215.73	210.25	218.71	216.21	
K_3	233.33	218.56	200.76	208.81	
R	39.89	8.31	23.27	9.67	

表 2 Re 脂质体混悬液方差分析
Table 2 Re liposome suspension analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	252.828 5	2	14.831 3	无
B	11.527 4	2	0.676 2	无
C	99.110 9	2	5.814 0	无
D (误差)	17.046 9	2		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

2.5 脂质体质量评价

2.5.1 包封率和载药量的考察 根据最佳处方制备工艺制备 5 批 Re 脂质体样品, 包封率结果分别为 79.90%、80.17%、80.59%、79.98%、80.96%, 载药量结果分别为 3.09%、3.11%、3.16%、3.13%、3.21%。测定结果无显著差异。

2.5.2 粒径分布与 Zeta 电位考察 室温条件下, 分别吸取上述最优条件制备的脂质体样品适量, 适当蒸馏水稀释, 于测量池中, 平行测定 4 次, 结果脂质体的平均粒径为 (152.81 ± 14.20) nm, PDI 为 0.218 ± 0.021 , Zeta 电位为 (-35.52 ± 1.51) mV。结果表明, 由最佳处方及工艺制备的 Re 脂质体粒径较小且分布均匀, Zeta 电势结果表明该制剂体系稳定性较好, 如图 3 所示。

2.6 脂质体冻干工艺研究

2.6.1 预冻时间的考察 量取最佳工艺制备的脂质体混悬液 50 mL 于烧杯中, 加入 5 g 蔗糖超声溶解,

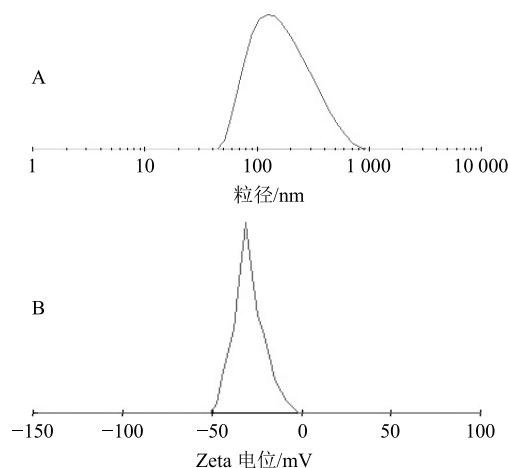


图 3 Re 脂质体粒径分布 (A) 和 Zeta 电位 (B)

Fig. 3 Size distribution (A) and Zeta potential distribution (B) of Re liposomes

分别移取 10 mL 液体分装于西林瓶中, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 环境下, 分别对预冻时间为 6、12、24、48 h 冻干产品进行考察, 预冻时间为 6、12 h 组有气泡, 外观较差, 24、48 h 组外观饱满, 平整且无气泡。因此本实验选择 24 h 以上为预冻时间, 可保证样品均已冻实。

2.6.2 干燥时间的选择 干燥过程分为升华干燥和解析干燥 2 个阶段。本实验将升华干燥温度设为 -47 $^{\circ}\text{C}$, 解析干燥温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 考察总干燥时间 (升华干燥时间-解吸干燥时间 6 : 1) 为 24、48、72 h 时产品外观及包封率, 结果产品外观分别为白色疏松且略有皱缩、表面平整饱满光洁、表面平整饱满光洁; 包封率分别为 74.22%、82.41%、76.90%。综合结果选择 48 h 为总干燥时间。

2.6.3 正交试验优化冻干工艺 通过预试验筛选出冻干工艺的主要影响因素, 即预冻温度 (A)、保护剂种类 (B) 及二糖-水质量比 (C), 每个因素选取 3 个水平, 以包封率为评价指标, 按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。正交试验设计及结果见表 3, 方差分析结果见表 4。

由正交试验方差分析结果可知, 影响 Re 脂质体冻干因素的主次顺序为 $C > B > A$, 最优冻干工艺为 $A_2B_1C_2$, 即预冻温度为 -20 $^{\circ}\text{C}$, 蔗糖为保护剂, 二糖-水质量比为 1 : 10。

2.6.4 再水化液种类考察 按照最优冻干工艺制备冻干脂质体, 以双蒸水、5%葡萄糖溶液及 0.9%生理盐水为再水化液, 单位时间内复溶性为考察指标。结果 0.9%生理盐水溶解速率最快, 且溶液均匀透明

表 3 冻干脂质体 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 3 $L_9(3^4)$ orthogonal design and results of freeze-dried liposomes

试验号	A/℃	B	C	包封率/%
1	-10 (1)	蔗糖 (1)	1 : 5 (1)	77.89
2	-10 (1)	麦芽糖 (2)	1 : 10 (2)	76.91
3	-10 (1)	乳糖 (3)	1 : 15 (3)	70.05
4	-20 (2)	蔗糖 (1)	1 : 10 (2)	80.76
5	-20 (2)	麦芽糖 (2)	1 : 15 (3)	69.98
6	-20 (2)	乳糖 (3)	1 : 5 (1)	78.34
7	-50 (3)	蔗糖 (1)	1 : 15 (3)	75.26
8	-50 (3)	麦芽糖 (2)	1 : 5 (1)	72.43
9	-50 (3)	乳糖 (3)	1 : 10 (2)	79.59
K_1	224.85	233.91	228.66	
K_2	229.08	219.32	237.26	
K_3	227.28	227.98	215.29	
R	4.23	14.59	21.97	

表 4 冻干脂质体方差分析

Table 4 Freeze-dried liposomes analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	3.004 2	2	0.338 1	无
B	35.892 1	2	4.039 7	无
C	81.710 9	2	9.196 6	无
D (误差)	8.884 9	2		

 $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

带有乳光；5%葡萄糖溶液溶解速率次之，且溶液透明度较 0.9%生理盐水稍差；双蒸水复溶时需借助超声溶解，溶液均匀。

2.7 冻干脂质体质量评价

2.7.1 脂质体外观及再分散性考察 Re 脂质体冻干后呈白色紧实，表面平整饱满光洁，可整块脱落且不散碎，质地细腻。加入 10 mL 0.9%生理盐水，轻轻振摇，1 min 内完全分散为均匀的乳白色混悬液，说明冻干脂质体再分散性良好。

2.7.2 包封率和载药量的考察 根据最优冻干工艺制备 5 批 Re 冻干脂质体样品，再水化后测得包封率分别为 80.61%、80.03%、79.62%、79.56%、80.15%；载药量分别为 3.05%、3.09%、3.10%、3.06%、3.15%。结果表明，5 批冻干脂质体再水化后的包封率与载药量无显著差异。

2.7.3 脂质体粒径分布与电位考察 在室温条件下，分别取上述最优冻干工艺制备的冻干脂质体，

以 0.9%生理盐水再水化，吸取混悬液，适当蒸馏水稀释，于测量池中，平行测定 3 次，结果 Re 脂质体冻干再水化后平均粒径为 (171.32 ± 10.71) nm，PDI 为 0.215 ± 0.024 ，Zeta 电势为 (-31.45 ± 0.92) mV，如图 4 所示。结果表表明，冻干后的脂质体与冻干前脂质体相比较，粒径与电位影响均较小，此冻干工艺适用于 Re 冻干脂质体的制备。

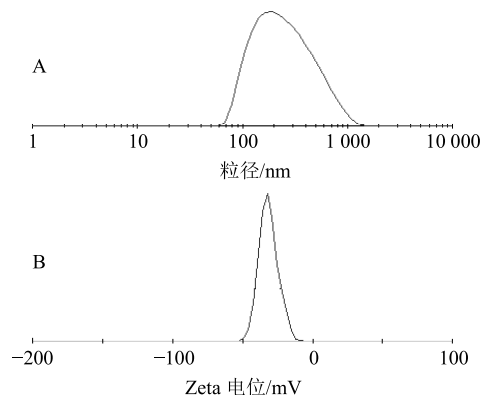


图 4 再水化后粒径分布 (A) 和 Zeta 电位 (B)

Fig. 4 Particle size distribution (A) and Zeta potential (B) after rehydration

2.8 冻干脂质体稳定性考察

2.8.1 影响因素实验 按照最优冻干工艺制备 3 批 Re 冻干脂质体，批号分别为 20170319、20170320、20170321。随机抽取冻干脂质体分别置于 4℃、室温 (25 ± 5) ℃、40℃、60℃及光照条件下，于第 0、1、3、5、10 天取样，以 0.9%生理盐水复溶，考察外观，测定粒径、电位及包封率，结果见表 5。由表 5 可知，60℃条件下放置数天，冻干脂质体各指标稳定性较差；光照条件下放置，粒径有所增加；40℃条件下放置 10 d，冻干脂质体各指标均有波动；4℃及室温条件下放置，冻干脂质体各指标无明显变化。

2.8.2 加速实验 取冻干脂质体 3 批，于温度 (25 ± 5) ℃、相对湿度 $(60 \pm 5)\%$ 条件下放置 6 个月，于 1、3、6 月取样，以 0.9%生理盐水复溶，测定结果与 0 月样品比较，结果见表 6。

加速实验结果表明，冻干脂质体在温度 (25 ± 5) ℃、相对湿度 $(60 \pm 5)\%$ 条件下放置 6 个月，各指标无明显变化，稳定性较好。

2.8.3 长期稳定性实验 取冻干脂质体 3 批，密封后置于 4℃冰箱冷藏室，于 0、1、3、6 个月取样，以 0.9%生理盐水复溶，考察各项指标，结果见表 7。长期稳定性实验结果表明，冻干脂质体于 4℃冰箱

表 5 冻干脂质体影响因素实验结果

Table 5 Experimental results of influencing factors of freeze-dried liposome

t/d	环境	冻干脂质体			
		外观	粒径/nm	电位/mV	包封率/%
0		+++	166.7	-35.5	80.5
1	4 °C	+++	170.1	-36.1	80.9
	(25±5) °C	+++	169.5	-31.8	80.4
	40 °C	+++	188.3	-30.9	81.3
	60 °C	++	210.4	-21.5	79.1
	光照	+++	188.6	-30.1	80.6
3	4 °C	+++	170.1	-34.3	82.7
	(25±5) °C	+++	169.8	-33.2	82.0
	40 °C	+++	171.0	-32.9	80.4
	60 °C	++	207.4	-27.4	70.5
	光照	+++	201.1	-29.6	78.1
5	4 °C	+++	172.4	-32.7	80.3
	(25±5) °C	+++	181.5	-30.8	79.6
	40 °C	+++	250.9	-27.0	78.8
	60 °C	++	311.3	-22.2	51.2
	光照	++	226.4	-30.1	66.6
10	4 °C	+++	173.5	-31.2	80.1
	(25±5) °C	+++	171.6	-31.6	81.3
	40 °C	+	238.1	-29.8	63.6
	60 °C	+	—	—	—
	光照	++	224.6	-30.0	50.8

冻干脂质体评价指标: +++-白色, 表面平整且无皱缩, 易分散, 溶液透明; ++-略有皱缩, 溶解困难, 需超声溶解, 半透明混悬液; +-皱缩严重且贴壁, 溶解极困难且不完全, 液体黏稠浑浊; —-外观不好或数据测不到; 下同

Evaluation index for freeze-dried liposomes: +++-white, smooth surface and no shrinkage, easy dispersion, transparent solution; ++-slightly shrink, dissolve difficult, need ultrasonic dissolve, semitransparent suspension; +-shrinking and collapse seriously, dissolving extremely difficult and incomplete, liquid sticky and cloudy; —-appearance is not good, or it can't be measured; same as below

冷藏室放置 6 个月, 各项指标无明显变化, 稳定性较好, 可继续留样观察。

3 讨论

本实验中分别采用乙醇注入法、薄膜分散-机械震荡法、反相蒸发法 3 种方法制备人参皂苷 Re 脂质体, 乙醇注入法中乙醇难以完全除去, 且除乙醇过程中会带走部分水分, 易造成误差, 导致包封率较低。反相蒸发法中同样存在着乙醚难以完全除去的问题, 因此最终采用薄膜分散-机械震荡相结合的

表 6 冻干脂质体加速实验结果

Table 6 Accelerated test results of freeze-dried liposome

批次	t/月	冻干脂质体			
		外观	粒径/nm	电位/mV	包封率/%
20170319	0	+++	169.4	-35.4	81.2
	1	+++	171.5	-30.2	80.4
	3	+++	175.6	-31.3	82.1
	6	+++	177.7	-34.9	80.9
20170320	0	+++	173.1	-31.2	81.9
	1	+++	176.4	-33.2	82.6
	3	+++	169.9	-32.9	83.0
	6	+++	172.3	-33.1	80.1
20170321	0	+++	174.4	-30.4	81.3
	1	+++	173.8	-31.6	80.9
	3	+++	167.9	-32.6	81.3
	6	+++	172.1	-31.7	82.2

表 7 冻干脂质体长期稳定性实验结果

Table 7 Long term stability test results of freeze-dried liposome

批次	时间/月	冻干脂质体			
		外观	粒径/nm	电位/mV	包封率/%
20170319	0	+++	179.1	-30.4	81.2
	1	+++	180.0	-32.5	80.9
	3	+++	173.4	-31.9	79.9
	6	+++	177.5	-34.1	80.3
20170320	0	+++	170.3	-33.8	81.4
	1	+++	169.8	-34.2	82.0
	3	+++	172.2	-32.7	80.7
	6	+++	177.6	-33.2	81.6
20170321	0	+++	168.8	-30.6	81.1
	1	+++	171.0	-30.3	80.8
	3	+++	169.3	-31.4	82.0
	6	+++	176.4	-32.1	81.6

方法作为脂质体的制备方法。此法可迅速挥发有机溶剂, 形成均匀的脂质薄膜, 水化后经冰水浴超声, 可减少因温度升高而引起的磷脂氧化。单纯的薄膜分散法制备的脂质体粒径较大且不均匀, 为使粒径更小、更均匀, 本实验采用了冰水浴超声的方式, 有效改善脂质体粒径的问题。

包封率是评价脂质体的重要指标, 本实验采用透析法与高效液相色谱法相结合的方法测定脂质体包封率, 透析法是利用脂质体不能透过半透膜而游

离药物可透过的原理,从而达到分离效果;高效液相色谱法可精确测定包封率。

通过前期预试验,筛选出对制备 Re 脂质体影响较大的因素,采用正交试验设计,以包封率为脂质体最主要考察目标,优选出最佳处方及制备工艺。本实验证明,药脂比是影响 Re 脂质体包封率的最主要因素,在实验范围下,磷脂含量越高,脂质体包封率越高,较低的磷脂浓度虽然载药量较高,但包封率过低,未达到药典要求;磷脂比例较低,相对胆固醇含量过大,造成脂质体成膜困难且不牢固。实验观察发现,Re 脂质体混悬液在 4℃ 下密封保存会出现沉淀现象,可能存在药物泄露或凝聚等问题,说明液体脂质体贮存稳定性较差,不适宜长时间保存。通过查阅文献及对实验的相关验证,选择冷冻干燥技术制备冻干脂质体,以提高脂质体存放时间。在预试验的基础上,通过正交试验,确定了最佳处方及冻干工艺,全面考察冻干脂质体的贮存稳定性,结果显示冷冻干燥技术能显著延长 Re 冻干脂质体贮存稳定性。

本实验对 Re 脂质体的处方、制备工艺、贮藏方式及时间进行了较为全面的考察,满足《中国药典》2015 年版对脂质体包封率达到 80% 以上的要求。首次以冷冻干燥技术改善 Re 脂质体贮藏稳定性。本课题组将对 Re 脂质体进一步进行药动学及组织分布研究,以期为其他类人参皂苷脂质体的开发提供参考。

参考文献

- [1] 薛涛,夏朝霞,郭丽莎,等. 人参降糖作用的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2014, 16(5): 428-432.
- [2] 方芳,邱莉,繆剑华,等. 人参皂苷 Re 抗结肠缺血/再灌注致肺损伤机制中抗炎抗氧化作用研究 [J]. 中南药学, 2014, 12(6): 521-524.
- [3] Xue J T, Mehendale S R, Li X, et al. Anti-diabetic effect of ginsenoside Re in ob/ob mice [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1740(3): 319-325.
- [4] 宋志斌,朱成琳,师方园,等. 人参皂苷 Re 体外抗氧化能力及其对血清剥夺神经细胞作用的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 225-228.
- [5] Cho W C S, Chung W S, Lee S K W, et al. Ginsenoside Re of *Panax ginseng* possesses significant antioxidant and antihyperlipidemic efficacies in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 550(1/3): 173-179.
- [6] Attele A S, Zhou Y P, Xie J T, et al. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component [J]. *Diabetes*, 2002, 51(6): 1851-1858.
- [7] 汪婷婷,董宪喆,刘婉婉,等. 人参皂苷 Rb₁, Rg₁ 和 Re 调控 Raf-CREB, Akt-CREB, CaMK II-CREB 信号转导通路的体外研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(11): 2065-2070.
- [8] Ma J, Li W, Tian R, et al. Ginsenoside Rg₁ Promotes peripheral nerve regeneration in rat model of nerve crush injury [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 478(2): 66-71.
- [9] Xie J T, Shao Z H, Vanden hoek T L, et al. Antioxidant effects of ginsenoside Re in cardiomyocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 532(3): 201-207.
- [10] 彭纓. 人参皂苷 Re 及其固体分散物药动力学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2001.
- [11] 马静,李学林,唐进法,等. 不同途径给药参麦注射液中人参皂苷 Rg₁ 及 Re 在大鼠体内药代动力学研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(2): 9-11.
- [12] 胡锦苹,黎丹,王小平,等. 藤珠胃康颗粒中 4 种皂苷成分的大鼠体内药代动力学研究 [J]. 中南药学, 2017, 15(6): 790-793.
- [13] 许营营,范云鹏,麻武仁,等. 正交试验优选隐丹参酮脂质体的制备工艺 [J]. 西北农业学报, 2014, 23(8): 106-111.
- [14] 梁平. 人参皂苷 Rg₁ 脂质体肺部给药研究 [D]. 昆明: 昆明医学院, 2009.
- [15] 于欢. 人参皂苷 Rg₃ 脂质体的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [16] 杨鹏波,张华. 脂质体的研究新进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2013, 37(7): 936-939.
- [17] 袁松,孙会敏,丁丽霞. 脂质体物理化学稳定性研究进展 [J]. 中国药事, 2011, 25(4): 384-388.
- [18] 李志浩,李鹏,朱雪松,等. 藁本内酯脂质体制备工艺的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 564-568.
- [19] 杨培. 黄褐毛忍冬总皂苷脂质体的制备工艺及质量研究 [D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2010.
- [20] 王文节,盛皓宇,杨进孙,等. 脂质体的制备及相关性质的研究 [J]. 皖南医学院学报, 2014, 33(3): 202-204.
- [21] 中国药典 [S]. 一部. 2015.