

盐酸阿霉素和知母皂苷 AIII 共载脂质体的制备及包封率的测定

马宁辉, 路璐, 丁越*, 张立涓, 陈依, 张彤

上海中医药大学, 上海 200120

摘要: 目的 建立盐酸阿霉素和知母皂苷 AIII 共载脂质体包封率的测定方法。方法 采用薄膜分散法制备盐酸阿霉素和知母皂苷 AIII 共载脂质体, 分别用透析法、微柱离心法和超高速离心法分离脂质体和游离药物, 采用 HPLC 法测定游离药物含量和脂质体中的药物含量, 计算得出盐酸阿霉素和知母皂苷 AIII 的包封率。**结果** 确定盐酸阿霉素和知母皂苷 AIII 共载脂质体处方为 DPPC-DSPE-PEG2000-TAIII-DOX 比例为 5 : 1 : 1 : 1, 采用薄膜分散法制备的脂质体大小适中, 粒径为 (55.4 ± 0.40) nm, PDI 为 0.20 ± 0.02 , 电位为 (-17.4 ± 0.6) mV; 在所选的色谱条件下, 脂质体的其他组分不干扰样品的测定, 盐酸阿霉素在 $24.9 \sim 498.0$ $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9999$), 知母皂苷 AIII 在 $50.55 \sim 1011.00$ $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9996$) 线性关系良好。研究表明微柱离心法能有效地将盐酸阿霉素和知母皂苷 AIII 双载脂质体与游离药物分离, 测得的包封率分别为 $(85.12 \pm 1.27)\%$ 、 $(76.51 \pm 0.46)\%$ 。**结论** 薄膜分散法可用于盐酸阿霉素和知母皂苷 AIII 共载脂质体的制备; 微柱离心法准确度高、重复性好并快捷方便, 可用于包封率的测定。

关键词: 盐酸阿霉素; 知母皂苷 AIII; 脂质体; 透析法; 微柱离心法; 超高速离心法; 包封率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)01-0069-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.01.012

Preparation of doxorubicin hydrochloride and timosaponin AIII co-loaded liposomes and determination of encapsulation efficiency

MA Ning-hui, LU Lu, DING Yue, ZHANG Li-juan, CHEN Yi, ZHANG Tong

Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China

Abstract: Objective To develop a method to determine the encapsulation efficiency of doxorubicin hydrochloride and timosaponin AIII co-loaded liposomes. **Methods** In this paper, the thin-film rehydration method was used to prepare doxorubicin hydrochloride and timosaponin AIII co-loaded liposomes. Liposomes and free drugs were separated by dialysis, gel microcolumn centrifugation, and ultra-high speed centrifugation. The content of free drugs and drugs in liposomes was determined by HPLC, and the entrapment efficiency of doxorubicin hydrochloride and timosaponin AIII co-loaded liposomes was calculated. **Results** The optimal formulation of doxorubicin hydrochloride and timosaponin AIII co-loaded liposomes was DPPC-DSPE-PEG2000-TAIII-DOX with a molar ratio of 5 : 1 : 1 : 1. The liposomes prepared using thin-film rehydration method had a well-defined spherical shape with a size of (55.4 ± 0.40) nm, a PDI of (0.20 ± 0.02) , and a weakly negative zeta potential of (-17.4 ± 0.6) mV. The excipients in the liposomal formulation can be well separated from doxorubicin hydrochloride and timosaponin AIII in the selected chromatographic conditions. The calibrated linear curve of doxorubicin hydrochloride was within $24.9 \sim 498.0$ $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9999$) and that of timosaponin AIII was within $50.55 \sim 1011.0$ $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9996$). Free doxorubicin hydrochloride and timosaponin AIII were well separated from liposome by gel microcolumn centrifugation, and the encapsulation efficiency of doxorubicin hydrochloride and timosaponin AIII was $(85.12 \pm 1.27)\%$ and $(76.51 \pm 0.46)\%$ respectively. **Conclusion** The thin-film dispersion- method can be used for the preparation of doxorubicin hydrochloride and timosaponin AIII co-loaded liposomes. The method of gel microcolumn centrifugation is accurate, reproducible, simple, and suitable for determination of the encapsulation efficiency of co-loaded liposomes.

收稿日期: 2018-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81403175); 上海卫生局项目 (2017YQ072, 201740152); 上海博士点基金资助项目 (B201703)

作者简介: 马宁辉 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向药剂学。Tel: 15221368225 E-mail: mnh2029@163.com

*通信作者 丁越, 博士, 上海中医药大学, 高级实验师, 硕士生导师, 研究方向为中药制药技术及体内过程研究。

Tel: (021)51322325 E-mail: dingyue1640@shutcm.edu.cn

Key words: doxorubicin hydrochloride; timosaponin AIII; liposome; dialysis method; gel microcolumn centrifugation; ultra-high speed centrifugation; encapsulation efficiency

盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, DOX), 又名盐酸多柔比星, 是一种抗肿瘤抗生素, 可抑制 RNA 和 DNA 的合成, 对 RNA 的抑制作用最强, 主要用于治疗急性白血病、恶性淋巴瘤、乳腺癌、骨肉瘤等, 对膀胱癌、甲状腺癌、肝癌、胰腺癌、子宫内膜癌等也有一定的治疗效果^[1]。知母皂苷 AIII (timosaponin AIII, TAIH), 又称西陵皂苷 A, 作为知母的主要有效成分, 有着较强的药理活性, 具有抗血小板聚集^[2-3]、抗老年痴呆^[4]、抗肿瘤^[5]和降糖^[6]等作用。尤其在抗肿瘤方面, TAIH 表现出较强的药理活性, 对结肠癌^[7]、宫颈癌^[8]、乳腺癌^[9]等均有抑制作用。在前期研究中发现 DOX 和 TAIH 联用对 HepG2 细胞具有良好的协同抑制作用, 联合给药可以降低 DOX 的剂量, 从而减轻其心脏毒性。DOX 作为水溶性药物, TAIH 作为脂溶性药物, 体内联合给药有一定难度, 需要借用纳米技术如脂质体、胶束等, 实现同时包载两种及以上的药物, 以达到协同治疗肝癌的效果。脂质体由磷脂双分子层组成, 具有低毒、生物相容性好的特点, 亲水的内核可以包载 DOX, 疏水的磷脂双分子层内可以包载 TAIH, 作为 2 种药物的共载递送体系, 可以提高难溶药物的生物利用度, 协同发挥两者的抗肿瘤作用。

本实验采用温敏性脂质体材料如二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC), 通过薄膜分散-水化超声法制备得到 DOX 和 TAIH 共载脂质体, 并对其形态、粒径及其分布、包封率进行评价。包封率的测定常用方法有葡聚糖凝胶柱色谱法^[10]、超滤离心法^[11-12]、超高速离心法和透析法等^[13]。本实验通过透析法、微柱离心法和超高速离心法将脂质体和游离药物分离, 测定并对比不同方法中 DOX 和 TAIH 共载脂质体的包封率, 为其他共载脂质体包封率的测定提供参考和依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1100 高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; Agilent 1290 液相色谱系统, 包括 G4220A 型二元输液泵, G4226A 型自动进样器, G1316C 型柱温箱, 美国 Agilent 公司; Alltech3300 蒸发光散射检测器, 美国 Grace 公司; 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; Optima XE-90 超高速离心机, 美国贝克

曼库尔特有限公司; SCIENTZ-IID 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技有限公司; XS105 电子天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Spectra/Por 透析膜, 截留相对分子质量 8 000~10 000, 美国 Spectrum 化学试剂公司。

1.2 试剂

Sephadex™ G-50 葡聚糖凝胶, 中粒度, 瑞典 Pharmacia 公司; TAIH 对照品, 批号 20150426, 质量分数 98%, 上海源叶生物科技有限公司; DOX, 批号 H23D7J27418, 质量分数 98%, 上海源叶生物科技有限公司; DPPC, 批号 B51046, 上海艾韦特医药科技有限公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(DSPE-PEG2000), 批号 B51152, 上海艾韦特医药科技有限公司; 氯化钠注射液, 批号 16050302, 华裕(无锡)制药有限公司; 甲醇, 色谱纯; 氯仿, 分析纯。

2 方法与结果

2.1 DOX 和 TAIH 共载脂质体的制备与表征

分别精密称取一定量的 DPPC、DSPE-PEG2000 和 TAIH, 置于量瓶中, 分别加入适量氯仿和甲醇定容, 使之分别成为 100 mg/mL 的 DPPC 氯仿溶液、DSPE-PEG2000 氯仿溶液和 2 mg/mL 的 TAIH 甲醇溶液。按 DPPC-DSPE-PEG2000-TAIH 物质的量比为 20:4:4 的比例分别取适量以上溶液, 置于蛋形瓶中, 60 °C 水浴减压旋转蒸发除去氯仿及甲醇, 使辅料和 TAIH 在蛋形瓶底部形成一层均匀的薄膜, 置于干燥器中抽真空过夜。次日取出, 加入一定量的生理盐水 60 °C 水化, 根据 DOX-TAIH 物质的量比为 1:1 的比例加入 DOX 的生理盐水溶液(1 mg/mL), 水浴超声, 即得。相同方法制备不含 DOX 和 TAIH 的空白脂质体。

取共载脂质体适量, 用蒸馏水稀释 50 倍, 滴在铜网上, 用 2.0% 磷钨酸溶液染色, 在透射电镜下观察粒径大小和形态。室温条件下, 取 DOX 和 TAIH 共载脂质体适量, 用蒸馏水稀释 50 倍后, 用马尔文纳米精度和电位分析仪测定其粒径大小及表面电位, 计算平均粒径和分散系数(PDI)。

2.2 DOX 和 TAIH 共载脂质体的处方筛选

按“2.1”项下操作, 分别按 DPPC-DSPE-PEG 2000-TAIH 物质的量比分别为 5:1:4、10:2:4、

20 : 4 : 4、40 : 8 : 4 的比例制备得到 DOX 和 TAIH 共载脂质体,其中,考虑到 DOX 与 TAIH 比例为 1 : 1 时,两药对 HepG2 细胞的协同抑制指数 (CI) 最小 0.43 ± 0.02 , 因此选用该药物比例来考察不同磷脂用量对 DOX 与 TAIH 包封率和载药量的影响。参

考“2.1”项下测定脂质体粒径和电位,微柱离心法测定 DOX 和 TAIH 包封率,根据粒径、电位、载药量和包封率得到最优处方比。

结果见表 1,随着磷脂用量的增加,粒径逐渐增大,由 36.6 nm 升高至 79.7 nm,电位随着磷脂用

表 1 DOX 和 TAIH 共载脂质体的处方优化

Table 1 Optimization of formulation of DOX and TAIH co-loaded liposomes

处方比	粒径/nm	电位/mV	载药量/%		包封率/%	
			DOX	TAIH	DOX	TAIH
5 : 1 : 4	36.6 ± 0.4	-7.2 ± 0.6	2.2 ± 0.2	7.7 ± 0.5	30.0 ± 2.0	20.6 ± 1.5
10 : 2 : 4	68.7 ± 1.7	-15.6 ± 0.7	1.9 ± 0.2	15.2 ± 0.7	54.8 ± 5.4	88.7 ± 4.8
20 : 4 : 4	55.4 ± 0.6	-17.4 ± 0.6	1.4 ± 0.1	8.2 ± 0.4	75.4 ± 4.0	87.5 ± 4.5
40 : 8 : 4	79.7 ± 1.1	-22.8 ± 0.6	0.9 ± 0.1	4.1 ± 0.1	88.7 ± 7.8	83.0 ± 2.3

量的增加,由 -7.2 mV 降低至 -22.8 mV。随着投药量的增加,DOX 载药量逐渐提升,TAIH 载药量也基本呈现上升趋势,在处方比为 5 : 1 : 4、10 : 2 : 4、20 : 4 : 4、40 : 8 : 4 的条件下,DOX 载药量范围为 0.9%~2.2%,包封率由 30.0% 升高至 88.7%,TAIH 载药量范围为 4.1%~15.2%,包封率由 20.6% 升高至 87.5%,处方 5 : 1 : 4、10 : 2 : 4 条件下 DOX 包封率在 60% 以下,包封率偏低,而 20 : 4 : 4、40 : 8 : 4 的条件下 2 种药物的包封率均在 75% 以上,考虑到 40 : 8 : 4 的处方比例下磷脂用量较大从而使载药量相对偏低,因此综合考虑 2 种药物的载药量和包封率后,确定处方 DPPC-DSPE-PEG2000-TAIH 比例为 20 : 4 : 4。透射电镜下可以观察到按优选处方制备得到的脂质体呈圆球形,见图 1。马尔文粒径仪测得脂质体的粒径均一,见图 2,大小适中,为 (55.4 ± 0.4) nm, PDI 为 0.20 ± 0.02 , Zeta 电位为 (-17.4 ± 0.6) mV (图 3)。

2.3 分析方法的建立

2.3.1 溶液的配制 精密称取 DOX 12.45 mg 于 25

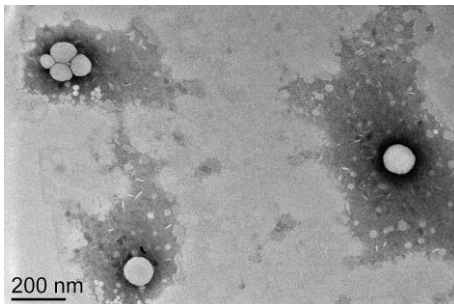


图 1 透射电镜下脂质体的形态

Fig. 1 Transmission electron microscopy image of co-loaded liposomes

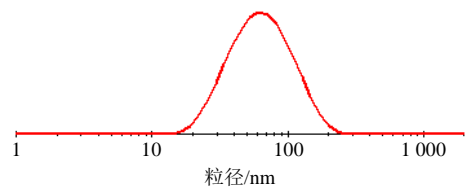


图 2 脂质体粒径分布

Fig. 2 Size distribution of co-loaded liposomes

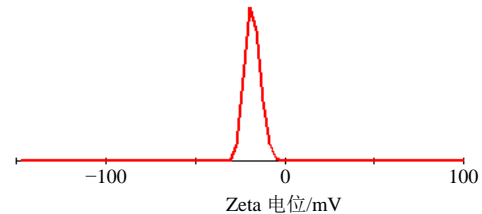


图 3 脂质体 Zeta 电位

Fig. 3 Zeta potential of co-loaded liposomes

mL 量瓶中, 甲醇定容, 配成 0.498 mg/mL 的对照品溶液。

精密称取 TAIH 10.11 mg 于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 配成 1.011 mg/mL 的对照品溶液。

取空白脂质体 20 μ L, 加入 20 倍甲醇, 涡旋混匀使其破乳, 18 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 20 μ L 进样。

2.3.2 液相色谱条件 DOX 的 HPLC 色谱条件: 色谱柱为 AlltimaTM C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-乙酸铵+0.5%冰醋酸 (55 : 45); 体积流量 1 mL/min, 进样量为 20 μ L; 紫外检测波长 254 nm, 柱温 25 $^{\circ}$ C。

TAIH 的 HPLC-ELSD 色谱条件: 色谱柱为 AlltimaTM C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水 (85 : 15); 体积流量 1 mL/min; 进样量为 20 μ L; 蒸发光散射检测器温度为 60 $^{\circ}$ C, 雾化

气体积流量为 1.5 L/min。

2.3.3 专属性试验 取“2.3.1”项下各溶液 20 μL 进样, 对照品、空白脂质体、DOX 和 TAIII 共载脂质体色谱图见图 4、5。由此可知脂质体的辅料对 DOX 和 TAIII 的测定无影响, 杂质与药物色谱峰分离良好。

2.3.4 线性关系考察 配制质量浓度为 498.0、249.0、124.5、49.8、24.9 $\mu\text{g/mL}$ 的 DOX 对照品溶液和质量浓度为 1 011.0、808.8、404.4、101.1、50.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 TAIII 对照品溶液, 分别注入液相色谱仪, 进样量为 20 μL 。以 DOX 的峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 线性回

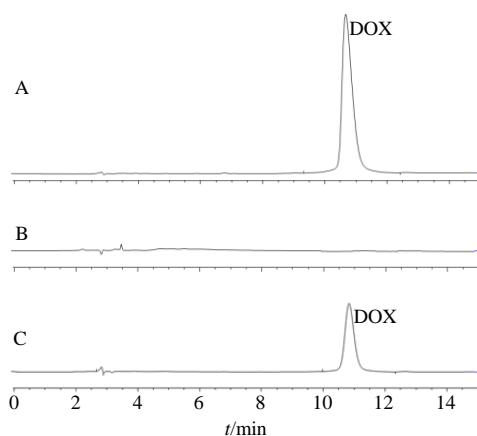


图 4 DOX 对照品 (A)、空白脂质体 (B)、共载脂质体 (C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of DOX reference substance (A), blank liposome (B), and co-loaded liposomes (C)

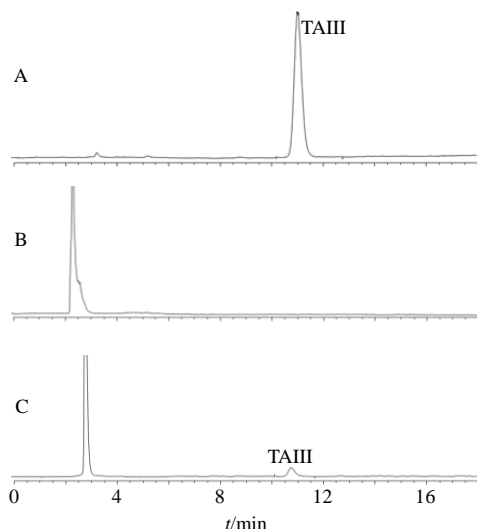


图 5 TAIII 对照品 (A)、空白脂质体 (B)、共载脂质体 (C) 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of TAIII reference substance (A), blank liposome (B), and co-loaded liposomes (C)

归方程为 $Y=25.187 X+0.602 3$, $r=0.999 9$, 表明 DOX 在 24.9~498.0 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度与峰面积呈良好的线性关系; 以 TAIII 峰面积的常用对数为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度的常用对数为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 线性回归方程为 $Y=1.268 X+0.725 8$, $r=0.999 6$, 表明 TAIII 在 50.55~1 011.00 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的常用对数与峰面积的常用对数呈良好的线性关系。

2.3.5 精密度试验 取质量浓度分别为 498.0、124.5、24.5 $\mu\text{g/mL}$ DOX 对照品溶液和质量浓度分别为 808.8、202.2、50.55 $\mu\text{g/mL}$ 的 TAIII 对照品溶液按“2.3.1”项下条件, 分别吸取对照品溶液 20 μL , 进样 6 次, 测定峰面积; 连续测定 6 d; 分别计算日内精密度和日间精密度。结果 DOX 日内精密度 RSD 分别为 1.10%、0.70%、0.20%, 日间精密度 RSD 分别为 0.46%、3.59%、4.97%; TAIII 日内精密度 RSD 分别为 0.51%、1.50%、3.63%, 日间精密度分别为 0.60%、1.07%、4.88%; 结果表明该测定方法的精密度符合分析要求。

2.3.6 稳定性试验 取“2.1”项下制备的 DOX 和 TAIII 共载脂质体适量, 加入甲醇超声破乳, 离心取上清, 按“2.3.2”项下条件, 分别在第 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h 进样, 测定 DOX 和 TAIII 的峰面积。共载脂质体中 DOX 和 TAIII 的 RSD 值分别为 1.1% 和 0.9%, 表明 DOX 和 TAIII 共载脂质体在 24 h 稳定性良好。

2.3.7 加样回收率试验 精密量取空白脂质体溶液 0.2 mL 于离心管中, 分别加入已测定的对照品溶液, 加入甲醇破乳并稀释至刻度, 配制成质量浓度为 49.8、124.5、249.0 $\mu\text{g/mL}$ DOX 和 50.5、126.1、404.4 $\mu\text{g/mL}$ TAIII 的低、中、高 3 种质量浓度的样品溶液, 按“2.3.1”项下色谱条件进样, 计算加样回收率。结果 DOX 的回收率分别为 97.93%、98.76%、100.34%, RSD 分别为 2.89%、1.11%、0.32%; TAIII 的回收率分别为 98.26%、98.20%、99.19%, RSD 分别为 4.31%、2.43%、1.39%; 平均加样回收率分别为 99.01% 和 98.55%, 可知, 回收率的测定方法符合测定要求, 脂质材料对药物含量测定没有影响。

2.4 TAIII 和 DOX 共载脂质体包封率测定方法的建立

2.4.1 透析法 取 DOX 和 TAIII 共载脂质体 0.6 mL 分别置于 6 个透析袋中, 两端用夹子卡紧, 分别置

500 mL 生理盐水中，室温下磁力搅拌 8 h，使游离药物透析出来。透析后取袋内脂质体 20 μ L，加 10 倍甲醇，涡旋混匀使其破乳，15 000 r/min 离心 5 min，取上清液 20 μ L 进样，HPLC 检测 DOX 和 TAIH 作为包封的药物量。另取透析前的脂质体 20 μ L，同法测定 DOX 和 TAIH 的含量作总药量。通过公式：包封率 = 脂质体中包封的 DOX (TAIH) 的量 / DOX (TAIH) 投药量，计算 DOX 和 TAIH 的包封率。结果 DOX 和 TAIH 的包封率分别为 (36.95 \pm 2.32)%、(62.64 \pm 5.50)%，RSD 分别为 6.28%、8.78%。

2.4.2 微柱离心法

(1) 微型凝胶柱的制备：将 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶室温下浸泡在蒸馏水中 24 h，使其充分溶胀，分别装填于 6 个 2 mL 去芯注射器内，然后将注射器放入 15 mL 离心管中，在 4 000 r/min 离心 10 min，反复添加凝胶至离心后凝胶体积均为 2 mL 左右，凝胶与注射器内壁分离，备用。

(2) 微型凝胶柱对空白脂质体的吸附：取空白脂质体 0.2 mL，逐滴加于微型凝胶柱的顶端，4 000 r/min 离心 10 min，收集洗脱液，同样的离心条件下用 0.3 mL 双蒸水洗脱 4 次，合并 5 次洗脱液用蒸馏水定容至 10 mL，另精密吸取 0.2 mL 空白脂质体用双蒸水定容至 10 mL，分别于 500 nm 处^[14-15]测定上柱前后空白脂质体的回收率。结果微型凝胶柱对空白脂质体的回收率为 (100.96 \pm 0.97)%，RSD 为 1.0%。表明 Sephadex G-50 对空白脂质体基本无吸附。

(3) 微型凝胶柱对 DOX 和 TAIH 的吸附：配制质量浓度分别为 1 mg/mL DOX 和 1 mg/mL TAIH (1% 聚山梨酯-80 溶液) 混合水溶液，取 0.2 mL 混合水溶液逐滴加于微型凝胶柱的顶端，4 000 r/min 离心 10 min，收集洗脱液，同样离心条件下用 0.3 mL 双蒸水洗脱 7 次，0.5 mL 甲醇洗脱 4 次，收集洗脱液，取每次洗脱液适量，分别按“2.3.2”项下色谱条件检测药物量，并绘制洗脱曲线，结果见图 6。由图 6 可以看出，第 4 次水洗液中已检测不出 DOX 和 TAIH，最后 4 次采用甲醇洗脱，由于甲醇对凝胶柱造成不可恢复的损坏，第 1、2 次甲醇洗脱液中含有少量的游离药物，第 3 次洗脱液中就已检测不到游离药物，微型凝胶柱对 DOX 和 TAIH 的吸附率分别为 (95.90 \pm 0.46)% 和 (96.73 \pm 0.37)%，说明 Sephadex G-50 微型凝胶柱对 DOX 和 TAIH 具有一定吸附能力。

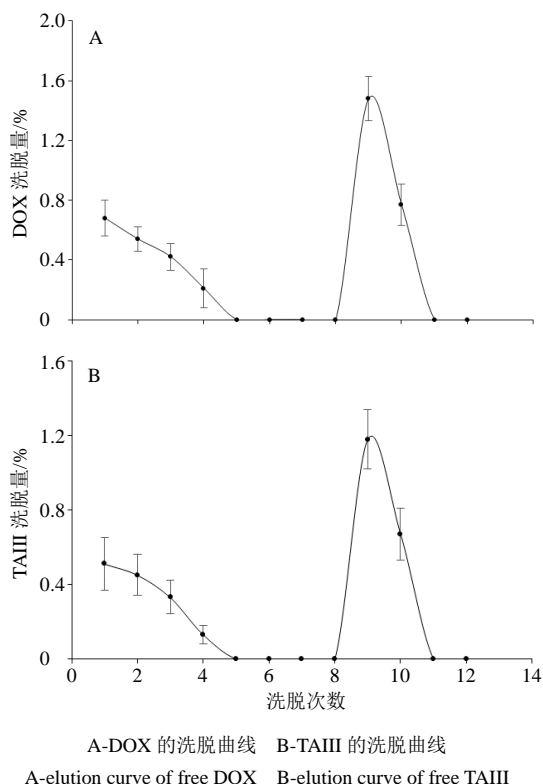


图 6 微型凝胶柱对混合水溶液的洗脱曲线

Fig. 6 Elution curve of mixture on mini column of Sephadex G-50

(4) 微型凝胶柱对空白脂质体及 DOX 和 TAIH 混合水溶液物理混合物的分离：将 DOX 和 TAIH 混合水溶液和空白脂质体溶液对半混匀后，取 0.2 mL 混合水溶液逐滴加于微型凝胶柱的顶端，4 000 r/min 离心 10 min，收集洗脱液，同样的离心条件下用 0.3 mL 双蒸水洗脱 4 次，收集洗脱液，取每次洗脱液适量，分别按“2.3.2”项下色谱条件检测药物量，计算吸附率，结果微型凝胶柱对 DOX 和 TAIH 游离药物的吸附率分别为 (97.90 \pm 1.27)%、(98.20 \pm 1.12)%，RSD 分别为 1.30%、1.14%。说明微型凝胶柱对游离 DOX 和 TAIH 的吸附不会受到空白脂质体的影响。

(5) 脂质体包封率的测定：取制备好的 DOX 和 TAIH 共载脂质体 0.2 mL，逐滴加于微型凝胶柱的顶端，4 000 r/min 离心 10 min，收集洗脱液，同样的离心条件下用 0.3 mL 双蒸水洗脱 3 次，收集洗脱液。第 1 次洗脱液加入 6 倍量甲醇，水洗液加入 2 倍量甲醇，超声涡旋使其破乳，15 000 r/min 离心 5 min，取上清液进样，测定 DOX 和 TAIH 的含量，计算 DOX 和 TAIH 的包封率。结果 DOX 和 TAIH 的包封率分别为 (85.12 \pm 1.27)%、(76.51 \pm 0.46)%，

RSD 分别为 1.49%、0.60%。

2.4.3 超高速离心法 取 6 mL 共载脂质体, 分别置 6 个超高速离心机专用的离心管中, 封口后, 用超高速离心机在 55 000 r/min 条件下离心 60 min, 经过超高速离心后, 载药脂质体沉在离心管底部, 未被磷脂包裹的游离药物存在于上清液中, 通过测定上清液中药物的质量浓度, 从而计算脂质体的包封率。结果超高速离心法测共载脂质体中 DOX 和 TAIII 的包封率分别为 $(77.70 \pm 2.45)\%$ 、 $(86.85 \pm 2.99)\%$, RSD 分别为 3.15%、3.45%。

本实验分别采用透析法、微柱离心法和超高速离心法对制备的 DOX 和 TAIII 共载脂质体进行包封率的测定。通过对比发现, 微柱离心法测得的 DOX 包封率 $(85.12 \pm 1.27)\%$ 高于透析法 $[(36.95 \pm 2.32)\%]$ 和超高速离心法 $[(77.70 \pm 2.45)\%]$, 分析原因可能为透析时间偏长造成脂质体中药物释放, 导致测得的 DOX 包封率偏低; 超高速离心法由于其长时间和高转速可能导致脂质体破坏, 使药物泄露, 测得结果偏低。3 种方法测得的 TAIII 包封率中, 超高速离心法 $(86.85 \pm 2.99)\%$ 高于微柱离心法 $[(76.51 \pm 0.46)\%]$ 和透析法 $[(62.64 \pm 5.50)\%]$, 原因可能为 TAIII 是疏水性药物, 溶解度低, 经超高速离心以后, 在生理盐水中容易析出, 而导致所测结果偏高; 此外, 长时间透析, 也会导致 TAIII 的释放, 所测结果偏低; 微柱离心法实验结果表明, Sephadex G-50 凝胶对空白脂质体基本无吸附, 而对游离的 DOX 和 TAIII 有强吸附力且空白脂质体不会影响微型凝胶柱对游离药物的吸附, 以上说明微柱离心法更适合共载脂质体包封率的测定, 影响因素少, 所测结果较准确且方便制备。

3 讨论

在前期研究中, DOX 和 TAIII 联合用药后在 HepG2 细胞上表现出良好的协同药效作用。本实验考察了 DOX 与 TAIII 比例为 1:1、1:2、1:4、2:1 种比例, 依据 Chou-Talalay 方法计算 CI 值, 结果显示 4 种比例的 CI 值分别为 0.43 ± 0.02 、 0.62 ± 0.08 、 0.72 ± 0.03 、 1.00 ± 0.14 (CI=1, 表示有加和作用, CI<1 表示有协同作用, CI>1 表示拮抗作用), DOX 和 TAIII 比例为 1:1 时 CI 值最小, 因此在制备两者双载脂质体时, 选择了 1:1 的最优协同作用配比。但 DOX 作为水溶性药物, TAIII 作为脂溶性药物, 难以实现体内同时给药, 所以考虑将其制备成新剂型如脂质体, 以达到同时给药的目的。

脂质体的制备方法有很多种, 如薄膜分散法、注入法、逆向蒸发法和冷冻干燥法等。薄膜分散法是通常用的最简单的手摇法, 是最原始但又是迄今为止最基本和应用最广泛的脂质体的制备方法; 注入法中有机溶剂多用乙醚, 此法制备的脂质体多为单室脂质体, 并且多适用于包裹水溶性药物, 比如青藤碱脂质体; 逆向蒸发法一般制备得到的是大单层脂质体, 适合水溶性药物以及大分子生物活性物质, 如抗生素、胰岛素等; 冷冻干燥法更适合过热不稳定药物, 如阿糖胞苷、蓖麻毒素脂质体等的制备^[16-18]。此实验所制备的共载脂质体, 涉及到脂溶性药物和水溶性药物的共同包载, 且要有较好的包封率和粒径, 还考虑到实验操作的简洁方便, 最终选用薄膜分散法来制备, 可以将脂溶性 TAIII 和磷脂一起在器壁上形成薄膜, 在后续水化过程中再加入水溶性 DOX 来制备双载脂质体。

基于 DOX 和 TAIII 对 HepG2 细胞的协同抗肝癌作用, 本实验制备得到水溶性药物 DOX 和脂溶性药物 TAIII 共载的脂质体, 脂质体在电镜下呈圆球形, 粒径小, 分布均一, 可用于两药联用的体内给药, 发挥协同抗肝癌的效果。为了评价共载脂质体对两种药物的包封率, 本实验建立了 HPLC 测定 DOX 和 TAIII 共载脂质体包封率的方法, 在建立的色谱条件下峰形良好, 检测药物与空白辅料分离完全, 出峰时间适中, 方法准确, 重现性好, 且具有足够的灵敏度, 结果准确可靠。

在微柱离心法实验过程中, 同大多数研究一样^[19-20], 预试验采用 1 mL 的注射器, 离心条件为 3 500 r/min、5 min, 但无法将脂质体和游离药物完全分离。双蒸水洗涤凝胶柱第 7 次所得滤液仍可测到 DOX 和 TAIII, 最后加入甲醇, 破坏凝胶柱, 所得洗脱液超声涡旋使其破乳, 通过 HPLC 测定, 所得结果显示最后甲醇洗脱液中的 DOX 和 TAIII 含量远远大于总的双蒸水洗脱液, 说明凝胶柱中仍存在大量脂质体; 增加离心速度至 4 000、5 000 r/min, 由于 1 mL 注射器太细, 填充的凝胶在较高转速下不能形成均匀的凝胶柱, 容易使凝胶柱断裂。经过反复尝试最终选用 2 mL 的注射器, 由于比 1 mL 注射器粗, 在较高转速下离心并不会发生断裂, 且所得的凝胶柱与管壁分离, 并且注射器孔径较大, 上样的样品不容易漏到凝胶柱和管壁之间, 在 4 000 r/min、10 min 的离心条件下, 上样 0.2 mL, 可以较完全地回收脂质体, 将其与游离药物尽可能分离开,

达到较好的分离效果。脂质体过完凝胶柱以后,用 0.3 mL 双蒸水洗脱 7 次,洗脱液经 HPLC 测定含量后,双蒸水洗脱凝胶柱第 4 次所得滤液中已测不到 DOX 和 TAIII,因此最终采用双蒸水洗脱 3 次来收集残留的脂质体溶液。

本研究测定共载脂质体的包封率的方法中,透析法所得的脂质体包封率与微柱离心法和超高速离心法相比较低,DOX 的包封率只有 (36.95±2.32)%,而 TAIII 的包封率只有 (62.64±5.50)%,推测其原因为透析时间较长导致药物泄露,但前期的预实验中,TAIII 水溶液的透析平衡时间为 8 h,透析时间过短则不容易将游离的 TAIII 分开,因此,透析法不适用于该共载脂质体包封率的测定。微柱离心法和超高速离心法测得 DOX 和 TAIII 实验结果分别为 (85.12±1.27)%、(76.51±0.46)% 和 (77.70±2.45)%、(86.85±2.99)%,经统计学分析,2 种方法的结果存在显著性差异,超高速离心法测得的 DOX 包封率低于微柱离心法,推测其原因可能是长时间离心和高转速引起脂质体的泄露和破坏,DOX 作为水溶性药物从脂质体中泄露以后溶解在生理盐水中,经过超高速离心后存在于上清液中而导致所测结果偏低,而 TAIII 作为难溶性药物,从脂质体中泄露出来后难溶于生理盐水,从而析出,经过超高速离心以后易沉淀在下层,上清液中存在的游离 TAIII 偏少,从而导致所测结果偏高。同实验操作和实验条件要求来看,由于超高速离心机价格昂贵,耗费较高,微柱离心法更适合普通实验室中共载脂质体包封率的测定。本研究结果可为其他水溶性和难溶性药物的共载纳米制剂的制备及包封率的测定提供参考和依据。

参考文献

- [1] 李飞阳,崔纯莹,王玉记,等.阿霉素脂质体的制备及抗肿瘤活性研究[J].首都医科大学学报,2015,36(2):157-160.
- [2] Kaname N, Zhang J, Meng Z, et al. Effect of six steroidal saponins isolated from anemarrhenae rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood [J]. *Clin Chim Acta*, 1999, 289(1/2): 79-88.
- [3] 王宁.知母皂苷 AIII 抑制血小板聚集的分子机制研究[D].大理:大理学院,2009.
- [4] Lee B, Jung K, Kim D H. Timosaponin AIII, a saponin isolated from *Anemarrhena asphodeloides*, ameliorates learning and memory deficits in mice [J]. *Pharmacol Biochem Be*, 2009, 93(2): 121-127.
- [5] King F W, Fong S, Griffin C, et al. Timosaponin AIII is preferentially cytotoxic to tumor cells through inhibition of mTOR and induction of ER stress [J]. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7283.
- [6] Miura T, Ichiki H, Iwamoto N, et al. Antidiabetic activity of the Rhizoma of *Anemarrhena asphodeloides* and active components, mangiferin and its glucoside [J]. *Bio Pharm Bull*, 2001, 24(9): 1009-1011.
- [7] Miura T, Ichiki H, Iwamoto N, et al. Timosaponin A-III induces autophagy preceding mitochondria-mediated apoptosis in HeLa cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10229-10237.
- [8] 尤杰,孙兆林,季宇彬,等.知母皂苷 AIII 药理活性及机制研究进展[J].中国医药导报,2012,9(3):11-13.
- [9] Kang Y J, Chung H J, Nam J W, et al. Cytotoxic and antineoplastic activity of timosaponin A-III for human colon cancer cells [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(4): 701-706.
- [10] 高晓黎,季兴梅.葡聚糖凝胶柱色谱法测定脂质体包封率的条件筛选[J].中国药学杂志,2003,38(7):515-517.
- [11] 闫丹,江敏瑜,王云红,等.积雪草总苷脂质体的制备及体外透皮研究[J].中草药,2018,49(9):2041-2048.
- [12] 郑杭生,佐拉·沙肯迪克,王湘林,等.离心沉淀-离心超滤法测定盐酸青藤碱脂质体的包封率[J].中草药,2011,42(8):1523-1527.
- [13] 邵红霞,奉建芳,龙晓英.脂质体包封率的测定方法[J].中南药学,2009,7(3):212-215.
- [14] 高晓非,邓英杰,曹金娜,等.微柱离心-HPLC 法测定六甲蜜胺脂质体包封率[J].药物分析杂志,2009,29(2):247-249.
- [15] 于燕燕,赵继会,冯年平,等.微柱离心-HPLC 法测定鬼臼毒素醇质体的包封率研究[J].中草药,2010,41(10):1634-1637.
- [16] 赵海霞,郭兴奎,孔德亮,等.脂质体制备技术[J].山东中医杂志,2000,19(7):435-437.
- [17] 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.
- [18] 张祺照.脂质体制备方法研究概况[J].亚太传统医药,2013,9(12):71-72.
- [19] 王汀,李文秀,邓英杰.微柱离心-药脂比测定脂质体药物包封率[J].沈阳药科大学学报,2008,25(1):10-14.
- [20] 刘利萍,金阳,李毅.微柱凝胶离心分离-HPLC 法测定克霉唑脂质体的包封率[J].药物分析杂志,2007,27(11):1812-1815.