

了浸润过程和溶质扩散过程,使人参基块内部毛细孔内快速充满溶剂,提高了有效成分的传质速度。在短时间(小于2 min)内人参基块内部的溶液浓度与外面周围介质浓度即可达到平衡。这样细胞就处于高渗透压的介质(提取溶剂乙醇)中,在泄压过程中,介质压力急速降低,细胞内外渗透压差迅速增大,从而导致细胞破碎;同时在高压作用下,细胞骨架、细胞膜等结构以及化学键发生变化,这样细胞内有效成分与提取溶剂充分接触,因此缩短了提取时间、提高了提取收率。

3.4 超高压不会影响生物小分子的结构,但能够影响蛋白质、核酸、脂质、淀粉等生物大分子的立体结构,使蛋白质变性、淀粉糊化、酶失活、细菌等微生物灭活^[7],因此超高压技术有待于进一步的深入研究。

References:

- [1] Zhang C H, Zhang C X Y. Study on the optimum extraction process of ginsensides with soale method [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2003, 25(1): 73-74.
- [2] Zhou J, Wang C Q, Yuan Y, *et al.* Study on the extraction method of ginseng sopoing Re [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 2003, 23(4): 667-670.
- [3] Zhang J, Chen Q C, Gong X J, *et al.* Effect of different method on extracting rations of ginsenosides [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2003, 25(1): 71-73.
- [4] Song Q H, Bai Y, Zhou J H, *et al.* Study on process of extracting ginsenosides from pfaffia [J]. *Chem Eng Guangzhou* (广州化工), 2000, 28(4): 94-96.
- [5] Zhang S Q. Process of extracting small molecular ingredients from biological materials under super high pressure [P]. WO 03/05a362A1, 2003-07-24.
- [6] Balny C, Masson P, Heremans K. High pressure eiects on biological macromolecules; from structural changes to alteration of cellular processes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1595: 3-10.
- [7] Boonchai B B, Chan B P, Douglas S C. Pressure eiects on intra-and intermolecular interactions within proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1595: 235-249.

猪苓多糖长循环脂质体的制备

王凯平, 张 玉, 张 俊

(华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究猪苓多糖长循环脂质体的制备方法,并对其质量进行控制。方法 用氯仿注入合并硫酸铵梯度法制备猪苓多糖长循环脂质体,并采用紫外-Sephadex 法测定脂质体中猪苓多糖的含量和包封率。结果 猪苓多糖长循环脂质体平均粒径为100 nm,药物包封率为55.3%。结论 用氯仿注入合并硫酸铵梯度法可制得包封率高、粒径小的猪苓多糖长循环脂质体。紫外-Sephadex 法测定该脂质体的包封率准确性高、重现性好、简便易行。

关键词:猪苓多糖;长循环脂质体;包封率;紫外-Sephadex 法

中图分类号:R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)03-0368-03

Preparation of *Polyporus umbellatus* polysaccharides long circulating liposomes

WANG Kai-ping, ZHANG Yu, ZHANG Jun

(School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: **Objective** To prepare the *Polyporus umbellatus* polysaccharides (PUPS) long cirrculating liposomes (LCLs) and to study the quality control of PUPS LCLs. **Methods** The PUPS LCLs were prepared by chloroform infusion combined with the ammonium sulphate gradient method. The content and encapsulation efficiency of PUPS in LCLs were determined by UV-Sephadex method. **Results** Mean diameter of the PUPS LCLs was 100 nm, with the encapsulation efficiency of 55.3%. **Conclusion** The LCLs with high encapsulation efficiency and small particle size could be prepared by chloroform infusion combined with the ammonium sulphate gradient method. UV-Sephadex method is suitable for the quality control of PUPS LCLs and the results are reliable.

Key words: *Polyporus umbellatus* polysaccharides (PUPS); long circulating liposomes (LCLs); encapsulation efficiency; UV-Sephadex method

猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fries 系多孔菌科多孔菌属猪苓的菌核。从猪苓中提取的猪苓

多糖具有抑制肿瘤生长,增强荷瘤动物及肿瘤病人机体免疫功能的作用^[1]。脂质体是目前降低药物毒

性常见的制剂学手段之一,是较理想的药物载体。但以传统的卵磷脂、胆固醇制备的常规脂质体在体内多被网状内皮系统吞噬,在血液循环中驻留时间较短,且主要靶向于肝、脾脏。近年来,采用PEG脂质衍生物修饰脂质体的研究受到广泛关注,并取得很大进展。主要是这类脂质体延长了体内循环时间,故称为长循环脂质体。由于经PEG修饰后的脂质体表面亲水性增加,降低了其与吞噬细胞的亲和性,因而能逃避网状内皮系统的识别而减少其对脂质体的捕获,故又称为隐形脂质体^[2,3]。为了延长猪苓多糖在血液中的滞留时间,增强靶向性,提高治疗肿瘤的疗效,本实验以PEG作为修饰脂质体膜材,制备了猪苓多糖长循环脂质体,并对其质量控制进行了研究。

1 仪器与材料

真空旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),722紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂),激光散射粒度测定仪(Submicron Particle Size Model 370, USA)。大豆卵磷脂(上海伯奥生物科技有限公司),胆固醇(上海化学试剂公司),PEG2000(上海浦东高南化工厂),葡聚糖凝胶(Sephadex G-50, Pharmacia,进口分装)。猪苓多糖(连云港东风制药厂药物研究所)。

2 方法和结果

2.1 猪苓多糖的制备^[4~6]:猪苓(切片)200 g,8倍水量煎煮1.5 h,煎煮4次,合并煎煮液,冷却,加10%氢氧化钙溶液调pH 12~13(出现大量沉淀),放置过夜。上清液抽滤,得棕黄色滤液。滴加3 mol/L硫酸至pH 5~6,抽滤。滤液浓缩至150 mL,趁热抽滤,除去灰白色沉淀。浓缩液置冰箱过夜,抽滤。加入无水乙醇约200 mL,搅拌后静置,弃上清液,抽滤,得淡黄色沉淀。低温干燥,得棕黄色猪苓多糖粉末。

2.2 猪苓多糖的测定

2.2.1 苯酚溶液的制备:苯酚100 g、铝片0.1 g、NaHCO₃ 0.05 g,常压蒸馏,收集约180℃馏份。称取10 g,加水约190 mL溶解,棕色瓶盛装,置冰箱备用。

2.2.2 对照品溶液的制备:精密称取干燥至恒重的葡萄糖10 mg,置100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,即得。

2.2.3 标准曲线的绘制:精密量取葡萄糖对照品溶液0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL,分别置试管中,加水至2 mL,再加苯酚溶液1.0 mL,摇匀。迅速滴加浓硫酸5.0 mL,放置5 min后沸水浴中加热15 min,取出后置冷水中冷却。以不含对照品溶

液的一管做空白,按分光光度法于490 nm处测吸光度(A)值。以葡萄糖质量浓度C(μg/mL)对A进行线性回归,得回归方程 $C = 23.677 A - 0.0932$, $r = 0.9989$ 。表明葡萄糖在4.01~13.38 μg/mL与A存在良好线性关系。

2.3 提取物中猪苓多糖的测定:精密称取样品0.01 g,置100 mL量瓶中加水溶解稀释至刻度。精密吸取1.2 mL,按标准曲线的绘制项下操作,测得A值。将A带入标准曲线方程求质量浓度,计算猪苓多糖的质量分数。3批样品中猪苓多糖的平均质量分数为12.6%。

2.4 空白脂质体的制备:采用薄膜超声法^[7,8]。大豆卵磷脂、胆固醇和PEG 2000按摩尔比7:2:0.4精密称定质量后溶于2~3 mL氯仿中,旋转蒸干除去有机溶剂。另取0.12 mol/L硫酸铵溶液3 mL水化。水浴式超声30 min得脂质体混悬液。超速离心(5 000 r/min)15 min,上清液即为空白脂质体。

2.5 载药脂质体的制备:将空白脂质体装于透析袋中,置于100 mL生理盐水中,室温透析2次,每次1 h。取透析后的脂质体1.5 mL,加入0.3%猪苓多糖水溶液1.5 mL,于40℃水浴中放置30 min,并旋涡振摇,即得猪苓多糖长循环脂质体。

2.6 载药脂质体中猪苓多糖的测定:取载药脂质体1 mL,置100 mL量瓶中,加蒸馏水至刻度。另取空白脂质体同法作为空白。各取1.2 mL按苯酚-硫酸法在490 nm处测定A值,由标准曲线方程计算载药脂质体中猪苓多糖的含量。3批载药脂质体中猪苓多糖的平均质量分数为0.78 mg/mL。

2.7 包封率的测定^[9]:吸取1.0 mL载药脂质体加到葡聚糖G-50柱上,以1 mL/min体积流量用生理盐水洗脱。收集脂质体洗脱液(乳白色,约6 mL)和后续液(约30 mL)。分别置100 mL量瓶中,加生理盐水至刻度,另取空白脂质体过柱洗脱做空白。分别取1.2 mL按苯酚-硫酸法在490 nm处测定A值,计算猪苓多糖含量,并按下式计算包封率,结果见表1。

表1 长循环脂质体包封率的测定结果

Table 1 Results of encapsulation efficiency of LCL

批号	脂质体中多糖吸光度	游离多糖吸光度	包封率/%
1	0.030	0.026	53.9
2	0.029	0.028	51.3
3	0.031	0.021	61.4
4	0.023	0.020	54.5

$$\text{包封率} = (1 - C_f / C_{\text{总}}) \times 100\%$$

C_f 为过柱后游离猪苓多糖含量; $C_{\text{总}}$ 为脂质体中猪苓多糖包封量与 C_f 之和

2.8 粒径的测定:用激光散射粒度测定仪测定猪苓多糖长循环脂质体的平均粒径为 (100 ± 40) nm。

2.9 稳定性试验:4批猪苓多糖长循环脂质体在 (6 ± 2) °C存放6个月,于0、1、3、6个月末考察外观、含量和包封率。结果外观没有发生明显改变,0、1、3、6个月的猪苓多糖质量分数分别为0.78、0.77、0.75、0.73 mg/mL,包封率分别为55.3%、56.8%、54.6%、55.1%。

3 讨论

根据文献报道^[10],猪苓多糖含量测定方法一般为分光光度法,本法建立的紫外-Sephadex 测定脂质体中猪苓多糖的含量条件简单,结果可靠。

本实验在对 Sephadex G-50 柱分离猪苓多糖长循环脂质体最佳柱色谱分离条件进行探讨中发现,乳白色脂质体完全流出后,开始的2 mL 流出液无吸光度,说明脂质体与游离多糖完全分离。在过 Sephadex 柱时,洗脱速度及上样量均对分离效果产生影响。上样量大,脂质体有拖尾现象,选取1.0 mL 可避免拖尾。洗脱速度太快,凝胶微孔内外猪苓多糖来不及平衡,提前出峰,造成分离不好,故控制流速不大于1 mL/min。

Sephadex G-50 紫外法测定猪苓多糖长循环脂质体包封率准确性高、重现性好。药物脂质体的包封率测定方法很多,有超滤膜法、超速离心法、分子筛法等。本实验根据猪苓多糖长循环脂质体直径大小及猪苓多糖的吸收特征图谱,设计了紫外-Sephadex

法测定猪苓多糖长循环脂质体包封率及含量。另外,在测定脂质体中猪苓多糖含量时,用空白脂质体作空白可以消除脂质体膜材成分对测定的干扰。

References:

- [1] Xu H W, Li B, Tian J X, *et al.* Study on cytotoxicity of PUPS and IL-2 activated PBMC on tumor cells [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1998, 14(2): 109-111.
- [2] Tardi P G, Boman N L, Cullis P R. Liposomal doxorubicin [J]. *J Drug Target*, 1996, 4(3): 129-131.
- [3] Zhang J M, Yang H, Hou X P. Study on liposomes with prolonged circulation times [J]. *Chin Biochem J* (生物化学杂志), 1995, 11(5): 615-618.
- [4] Ren T C, Zhao X Y, Kang Y L. Study on compound polysaccharides injection [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1991, 22(6): 258-259.
- [5] Shu D L, Shi H B, Pei F C, *et al.* Evaluation of the extraction technique of PUPS with orthogonal design [J]. *Primary Chin Mater Med J* (基层中药杂志), 2002, 16(1): 27-29.
- [6] Zhang J D, Yi D D, Luo G Q. Extraction of *Angelica sinensis* polysaccharides and preparation of granule [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 1998, 18(5): 220-221.
- [7] Duan Y S, Yu B T, Zhang Z R. Preparation and pharmacokinetics of long circulating mitoxantrone liposomes [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37(6): 465-468.
- [8] Anderson P M, Katsanis E, Leonard A S, *et al.* Increased local antitumor effects of interleukin-2 liposomes in mice with MCA-106 sarcoma pulmonary metastases [J]. *Cancer Res*, 1990, 50(6): 1853-1856.
- [9] Chang G M, Duan F L, Yang S Y, *et al.* Studies on preparation and characteristics of liposomal adriamycin [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 1999, 19(6): 328-331.
- [10] Hayakawa E, Nakakura M, Kato Y, *et al.* Encapsulation of doxorubicin into liposome by a freeze-thawing method using buffer solution [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(3): 773-776.

正交优选法筛选荆芥炭炮制的最佳工艺

张 丽,包贝华,孙 磊,丁安伟

(南京中医药大学药学院,江苏 南京 210029)

摘 要:目的 筛选荆芥炭炮制的最佳工艺。方法 采用分光光度法,测定不同工艺炮制的荆芥炭中总黄酮的含量。结果 荆芥炭炮制的最佳条件是210 °C、加热10 min。结论 重复试验表明,所选的最佳炮制工艺较为合理。

关键词:荆芥炭;炮制;总黄酮

中图分类号:R283.1; R286.02

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)03-0370-03

Optimum processing technique of *Herba Schizonepetae Carbonisatus* by orthogonal design

ZHANG Li, BAO Bei-hua, SUN Lei, Ding An-wei

(College of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Key words: *Herba Schizonepetae Carbonisatus* (HSC); processing; total flavonoids

收稿日期:2004-07-16

基金项目:国家“十五”攻关项目(2001BA701A11)

作者简介:张 丽(1971—),女,南京中医药大学药学院药物分析教研室副主任,现攻读南京中医药大学中药炮制学博士。

Tel: (025) 51998192