

• 药剂与工艺 •

水飞蓟宾前体脂质体的制备及其质量评价

王小宁, 贾慧婷, 李伟泽, 闫梦茹, 罗国平

西安医学院药学院, 陕西 西安 710021

摘要: 目的 制备水飞蓟宾(silybin, SLB)前体脂质体并对其进行质量评价。方法 采用冷冻干燥法制备SLB前体脂质体,以包封率和载药量为评价指标,采用单因素考察和正交试验法,优化SLB前体脂质体处方及制备工艺,筛选最优冻干保护剂并考察SLB前体脂质体的形态、粒径分布、包封率及稳定性。结果 SLB前体脂质体的最优处方及制备工艺为药脂比1:12,磷脂胆固醇比4:1,水合介质pH值为7.4,制备温度为45℃;最优冻干保护剂为甘露醇;所形成的前体脂质体外观饱满、致密,复水水合后粒径为 (251.40 ± 2.14) nm, Zeta电位值为 (-30.80 ± 0.89) mV,包封率为 $(88.92 \pm 5.86)\%$,贮存期间(30 d)稳定性较好。结论 制备的SLB前体脂质体工艺简单、包封率高、稳定性好,值得进一步研究。

关键词: 水飞蓟宾;前体脂质体;薄膜分散法;包封率;载药量;单因素考察;正交试验;冷冻干燥;冻干保护剂;质量评价;稳定性

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)07-1314-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.07.009

Preparation and quality evaluation of silybin proliposomes

WANG Xiao-ning, JIA Hui-ting, LI Wei-ze, YAN Meng-ru, LUO Guo-ping

College of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China

Abstract: Objective To prepare silybin (SLB) proliposomes and evaluate its quality. **Methods** SLB proliposomes were prepared by freeze-drying method, and the formulation and process were optimized by single factor investigation and orthogonal design with the encapsulation efficiency and drug loading as indexes. The optimal cryoprotectant was selected and the morphology, particle size, encapsulation efficiency, and stability of SLB proliposomes were investigated. **Results** The optimized preparation process was as follows: The ratio of drug to total lipid was 1:12, the ratio of phospholipid to cholesterol was 4:1, the pH of hydration medium was 7.4 and the temperature was 45℃. Mannitol was the optimal cryoprotectant to prepare SLB proliposomes, and the formation of SLB proliposomes looked plumpy and compact. The size of preliposome was around (251.40 ± 2.14) nm, the Zeta potential was around (-30.80 ± 0.89) mV, encapsulation efficiency was $(88.92 \pm 5.86)\%$, and it had good stability during storage. **Conclusion** The preparation process of SLB proliposomes is simple, and it has high encapsulation efficiency and good stability, therefore, it is deserved to be further studied.

Key words: silybin; proliposomes; film dispersion method; encapsulation efficiency; drug loading dosage; single factor investigation; orthogonal design; freeze-drying method; cryoprotectant; quality evaluation; stability

水飞蓟素系菊科植物水飞蓟 *Silybum marianum* Gaertn 果实中提取得到的黄酮木脂类化合物,其主要成分为水飞蓟宾(silybin, SLB),具有抗肝纤维化、抗脂质过氧化、抗炎、免疫调节、抗肿瘤和调血脂等^[1-2]作用,已被广泛用于治疗各种肝功能紊

乱疾病,如肝硬化、肝炎和由酒精或毒素造成的脂肪肝等^[3-6]。SLB难溶于水,口服吸收差,生物利用度低^[7]。已有研究表明,将SLB制成脂质体可以提高药物的生物利用度^[7-8],但脂质体混悬液在贮存期间易发生聚集、融合及药物渗漏,尤其水溶性药物

收稿日期: 2016-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81303231);陕西省科技厅项目(2015JM8449);陕西省优势学科资助项目(1007);西安医学院校级科研青年基金项目(2015QN05);西安医学院校级大学生创新基金项目(2015DXS1-11)

作者简介: 王小宁(1987—),女,讲师,主要从事新药研发。E-mail: wangxn_0508@126.com

的渗漏更显著;同时,天然磷脂易氧化、水解,难以满足药物制剂稳定性的要求^[9-10]。前体脂质体(proliposomes)系将脂质体膜材和药物的混合溶液,在减压搅拌下逐步分布到一种可溶性固体载体表面形成可自由流动的粉体状制剂^[11-13]。由于尚未形成脂质双分子层结构,因此称之为前体脂质体,使用前加水或缓冲液水化即形成脂质体混悬液。前体脂质体可在一定程度上克服传统脂质体聚集、融合及药物渗漏等稳定性问题^[12-14]。本实验在普通脂质体的基础上,采用冷冻干燥法制备 SLB 前体脂质体,优化其工艺处方,筛选最优冻干保护剂,并对制备的 SLB 前体脂质体进行质量评价,为 SLB 的制剂研究提供科学依据。

1 仪器与材料

1260 型高效液相色谱仪,Agilent Technologies 公司;RE-2000A 旋转蒸发仪,巩义市予华仪器有限公司;SB-5200DT 超声清洗器,宁波新芝生物科技股份有限公司;SIGMA1-14 离心机,赛多利斯科学仪器有限公司;ZEN3600 激光粒度仪,Malvern 公司;IX73 倒置荧光显微镜,Olympus 公司;FreeZone[®] 2.5L 冷冻干燥机,Labconco 公司。

SLB,批号 MUST-16031710,质量分数≥98%,成都曼斯特生物科技有限公司;卵磷脂,天津市博迪化工有限公司;胆固醇,北京奥博星生物技术有限责任公司;硫酸鱼精蛋白,武汉宏信康精细化工有限公司;葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露醇,药用级,天津市盛奥化学试剂有限公司;氯化钠、磷酸氢二钾、盐酸、氯仿、乙醚、无水乙醇、甲醇,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 SLB 的定量测定

精密称取 SLB 2.5 mg 于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)5 min 使其完全溶解,得到质量浓度 100 μg/L 的储备液。分别移取上述储备液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL 于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,得质量浓度为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 μg/L 的对照品溶液。再分别精密吸取 20 μL 注入高效液相色谱仪。色谱条件:色谱柱为 Agilent HC-C₁₈(2) (150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水-冰醋酸(48:52:1);检测波长 287 nm;体积流量 1.0 mL/min;柱温 35 ℃,记录色谱图,以进样质量浓度为横坐标(X),SLB 的峰面积为纵坐标(Y)进

行线性回归,得回归方程为 $Y=10\ 285.11 X+1\ 024.6$, $r=0.999\ 6$,表明 SLB 在 2.0~12.0 μg/L 的进样质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

2.2 载药量和包封率的测定

采用鱼精蛋白凝聚法测定包封率^[15]。取 0.1 mL 脂质体溶液或前体脂质体水化液,加 0.2 mL 10 mg/mL 鱼精蛋白溶液,搅匀,加生理盐水 2 mL,3 000 r/min 离心 30 min,取上清液 0.8 mL 于 1 mL 生理盐水中,用甲醇稀释于 10 mL 量瓶中定容,按“2.1”项方法测定 SLB,由“2.1”项下的回归方程计算得 $C_{\text{游离}}$ 。取 1 mL 脂质体于 10 mL 量瓶,用甲醇稀释至刻度线,按“2.1”项方法测定 SLB,由回归方程得 $C_{\text{总}}$ 。根据以下公式计算包封率和载药量。

$$\text{包封率}=(C_{\text{总}}-C_{\text{游离}})/C_{\text{总}}$$

$$\text{载药量}=\text{脂质体中药物量}/(\text{脂质体中药物量}+\text{载体质量})$$

2.3 SLB 纳米脂质体的制备方法及其比较

分别采用薄膜分散法、逆向蒸发法、乙醚注入法制备 SLB 纳米脂质体。

2.3.1 薄膜分散法 称取 SLB 0.02 g、卵磷脂 0.1 g、胆固醇 0.05 g,于 100 mL 茄形瓶中,加入 10 mL 氯仿与 5 mL 无水乙醇的混合溶剂,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)使其充分溶解。于 35 ℃水浴减压蒸馏除去有机溶剂,形成均匀透明的薄膜,加入 10 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)作为水合介质进行洗膜,于 40 ℃恒温水浴水化 2 h,水浴超声 30 min,得到乳状半透明脂质体溶液,密封置于 4 ℃下冷藏保存。

2.3.2 逆向蒸发法 同上,将药物和脂质材料加入 10 mL 氯仿与 5 mL 无水乙醇的混合溶剂,超声(功率 250 W,频率 40 kHz)溶解后,加 10 mL 生理盐水再超声 5 min,用旋转蒸发仪旋蒸得乳白色悬浮液密封置于 4 ℃下冷藏保存。

2.3.3 乙醚注入法 取卵磷脂和胆固醇于 100 mL 小烧杯中,加入 20 mL 乙醚,搅拌使溶解,再加入 SLB 0.02 g,匀速注入 PBS(pH 6.5)溶液中继续搅拌 2 h,直到乙醚挥尽,密封置于 4 ℃下冷藏保存。

2.3.4 3 种制备方法结果比较 按“2.2”项下方法测定 3 种方法制备的脂质体的载药量和包封率,采用马尔文激光粒度仪测定粒径及多分散系数(PDI),结果如表 1 所示。从表 1 可看出,逆向蒸发法和乙醚注入法制备的脂质体对 SLB 的包封率较低,可能是因为这 2 种方法制备的脂质体大多为单层脂质体,内水相体积较大,对水溶性药物包封率高,而

表 1 SLB 纳米脂质体 3 种制备方法的比较

Table 1 Comparison of three preparation methods of SLB liposomes

制备方法	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
薄膜分散法	269.3±2.1	0.17	83.47±3.14	11.02±2.89
逆向蒸发法	463.5±5.6	0.45	49.66±3.65	10.89±0.96
乙醚注入法	336.7±3.8	0.39	52.11±2.37	10.45±1.27

薄膜分散法多形成多层脂质体,包封在脂膜内的水相容积仅占总容积的很小部分,对水溶性差的 SLB 包封率更高^[16]。比较 3 种方法制备的脂质体的粒径,平均粒径大小顺序为逆向蒸发法>乙醚注入法>薄膜分散法。小粒径的脂质体更容易实现跨膜转运从而增加药物口服吸收^[17],因此综合粒径、包封率、载药量结果,薄膜分散法包封率和载药量高、粒径较小且分布均匀,故选择薄膜分散法作为 SLB 纳米脂质体的制备方法。

2.4 SLB 前体脂质体的制备

采用冷冻干燥法制备前体脂质体。以甘露醇为冻干保护剂,采用“2.3.1”项下的薄膜分散法,制备得到 SLB 纳米脂质体悬浮液,加入冻干保护剂浓溶液,使得混合后冻干剂质量分数为 10% (由加入保护剂的质量除以混合液的体积计算得来),在 -20℃ 下预冻 12 h。冷冻干燥过程:先降低冷阱温度,放入预冻好的样品,抽真空,待水印消失后,温度升至 20℃,继续干燥 4 h,取出,得到的冻干样品密封、避光,常温保存于干燥器中,根据实验结果绘制的冻干曲线见图 1。

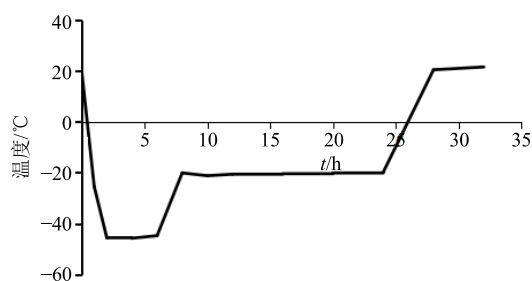


图 1 SLB 前体脂质体冷冻干燥曲线 (以甘露醇为冻干保护剂)
Fig. 1 Freezing-drying curve of SLB proliposomes (mannitol as freeze-dried protective agent)

2.5 影响前体脂质体制备的因素考察

选定冻干保护剂为 10%甘露醇,通过单因素实验考察药脂比(药物与脂质质量比)、磷脂胆固醇比、水合介质 pH 值、制备温度对 SLB 前体脂质体包封率的影响,然后采用正交试验设计优化处方,以得

到 SLB 前体脂质体的最佳制备条件。

2.5.1 药脂比对包封率和载药量的影响 固定其他因素,使处方中药脂比分别为 1:8、1:10、1:12、1:14、1:16,按“2.2”项下的方法测定包封率和载药量,结果显示载药量随着药脂比的降低而降低,当药脂比为 1:12 时,脂质体包封率最高,为 (79.81±3.90)%,随后包封率随着脂质材料用量增加降低,但降低幅度比载药量小。综合包封率和载药量结果,选定药脂比为 1:12 进行后续单因素实验,结果见表 2。

表 2 药脂比的考察

Table 2 Investigation of ratio of drug to total lipid

药脂比	包封率/%	载药量/%
1:8	70.79±6.20	10.23±0.87
1:10	76.68±4.60	9.76±0.79
1:12	79.81±3.90	8.69±0.93
1:14	78.80±2.80	7.23±0.74
1:16	77.20±3.70	6.34±0.65

2.5.2 磷脂胆固醇比对包封率和载药量的影响 固定其他因素,使处方中磷脂与胆固醇的质量比分别为 2:1、3:1、4:1、5:1、6:1,制备 SLB 前体脂质体,测定包封率和载药量,结果表明,磷脂胆固醇质量比为 4:1 时,制备的前体脂质体包封率最高,为 (80.11±3.20)%,而载药量在整个范围内变化不大,因此选定磷脂胆固醇质量比为 4:1 进行后续单因素实验,结果见表 3。

2.5.3 水合介质 pH 值对包封率和载药量的影响 固定其他因素,考察磷酸盐缓冲液 pH 值分别为 2.5、4.0、5.5、6.8、7.4 时的包封率和载药量,结果显示当 pH 值为 6.8 时,前体脂质体包封率和载药量最高,分别为 (81.68±2.66)% 和 (10.69±0.59)%,因此选定水合介质 pH 值为 6.8 进行后续单因素实验,结果见表 4。

2.5.4 制备温度对包封率和载药量的影响 考察制

表 3 磷脂胆固醇比的考察

Table 3 Investigation of ratio of phospholipid to cholesterol

磷脂胆固醇质量比	包封率/%	载药量/%
2:1	76.20±3.42	10.17±0.43
3:1	78.85±4.59	10.24±0.82
4:1	80.11±3.20	10.09±0.49
5:1	75.60±4.43	10.26±0.63
6:1	74.31±5.10	10.12±0.37

表 4 水合介质 pH 值的考察

Table 4 Investigation of pH of hydration medium

水合介质 pH 值	包封率/%	载药量/%
2.5	69.43±5.58	9.96±0.44
4.0	75.16±4.01	10.25±0.62
5.5	78.51±4.90	10.33±0.71
6.8	81.68±2.66	10.69±0.59
7.4	80.43±3.83	10.18±0.60

备温度分别为 35、40、45、50、55 ℃时, 前体脂质体的包封率和载药量, 结果表明 (表 5) 当制备温度为 45 ℃时, 制备的前体脂质体包封率最高, 为 (82.36±5.86) %, 载药量在 9.86%~10.15%波动, 变化不显著。

2.6 正交试验

以药脂比 (A)、磷脂胆固醇比 (B)、水合介质 pH 值 (C)、制备温度 (D) 为正交试验的考察因素, 以包封率和载药量之和 (S) 为指标, 进行 4 因素 3

表 5 制备温度的考察

Table 5 Investigation of preparation temperature

制备温度/℃	包封率/%	载药量/%
35	68.10±3.22	10.11±0.24
40	73.28±4.85	9.86±0.32
45	82.36±5.86	10.02±0.64
50	80.08±3.64	9.90±0.53
55	79.60±4.70	10.15±0.39

水平正交试验, 因素水平和正交试验结果见表 6, 方差分析结果见表 7。

实验结果的极差 (R) 以及方差分析如表 6、7 所示, 各因素对 SLB 前体脂质体包封率和载药量的影响程度依次为 B>A>D>C, 且因素 B 对包封率和载药量有显著性影响 ($P<0.05$)。综合以上分析, SLB 前体脂质体最佳制备工艺为 A₂B₂C₃D₂, 即药脂比为 1:12, 磷脂胆固醇比为 4:1, 水合介质 pH 值为 7.4, 制备温度为 45 ℃。

表 6 正交试验设计及结果

Table 6 Orthogonal test and data processing

编号	A	B	C	D/℃	包封率/%	载药量/%	S/%
1	1:10 (1)	3:1 (1)	5.5 (1)	40 (1)	67.61	8.95	76.66
2	1:10 (1)	4:1 (2)	6.8 (2)	45 (2)	85.24	9.08	94.42
3	1:10 (1)	5:1 (3)	7.4 (3)	50 (3)	74.93	9.13	84.16
4	1:12 (2)	3:1 (1)	7.4 (3)	45 (2)	66.32	9.07	75.29
5	1:12 (2)	4:1 (2)	6.8 (2)	50 (3)	86.10	8.92	94.92
6	1:12 (2)	5:1 (3)	5.5 (1)	40 (1)	76.31	9.00	85.21
7	1:14 (3)	3:1 (1)	6.8 (2)	50 (3)	69.42	7.31	76.73
8	1:14 (3)	4:1 (2)	7.4 (3)	40 (1)	81.24	7.25	88.49
9	1:14 (3)	5:1 (3)	5.5 (1)	45 (2)	70.50	7.30	77.80
K ₁	255.24	228.68	250.36	249.38			
K ₂	255.42	277.83	247.51	256.36			
K ₃	243.02	247.17	255.81	247.94			
R	12.40	49.15	8.30	8.42			

表 7 方差分析结果

Table 7 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	33.680	2	2.841	
B	410.849	2	34.650	$P<0.05$
C (误差)	11.857	2	1.000	
D	13.521	2	1.140	

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

2.7 验证试验

按上述最优处方制备 3 批 SLB 前体脂质体, 测定其包封率为 88.47%、88.89%、89.42%, RSD 为 0.54%, 载药量为 9.18%、9.20%、9.24%, RSD 为 0.33%, 可知该处方和制备条件稳定可行, 包封率和载药量高。

2.8 冻干保护剂的筛选

经查阅文献, 选择常用的几种冻干保护剂乳糖、

甘露醇、葡萄糖、蔗糖^[18]，分别按“2.4”项下的制备方法制备前体脂质体，根据所得冻干产品的外观、复水水合后的状态，筛选出适宜的冻干保护剂，结果见表 8。较好的前体脂质体在外观上应饱满、致密，有足够的强度以避免发生结构塌陷。

由表 8 可见，冻干保护剂的种类对前体脂质体

的质量有较大影响，葡萄糖、蔗糖的冻干保护效果一般，在冻干结束的时候样品表面结构松散，而且在常温下保存时会发生严重的干缩、塌陷现象，复水重建较难。使用乳糖作为冻干保护剂的样品颜色均匀，表面饱满，孔隙致密，复水水合效果好，甘露醇作为冻干保护剂的脂质体冻干效果最佳。

表 8 各类保护剂对 SLB 前体脂质体性质的影响

Table 8 Effects of cryoprotectants on characteristics of SLB proliposomes

保护剂	外观形态	复水水合	1 周内稳定性
无	较差，干缩现象严重	困难	干缩现象严重
蔗糖	好，颜色均匀，松散，粗糙有皱	较难	第 6 天出现干缩，颜色变黄
乳糖	好，颜色均匀，致密，粗糙有皱	容易	无变化
葡萄糖	一般，颜色不均匀，松散	较难	第 2 天发生干缩现象，有孔洞
甘露醇	好，颜色均匀，致密，平整饱满	容易	无变化

2.9 SLB 前体脂质体的质量评价

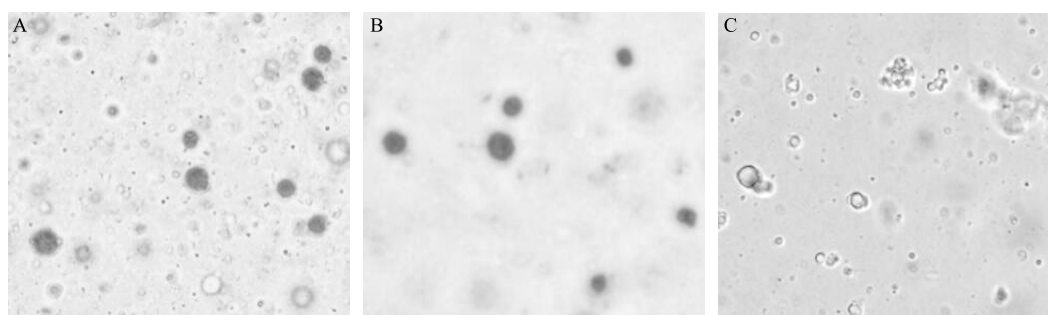
2.9.1 形态的观察 分别取一定体积的脂质体、甘露醇作保护剂的前体脂质体、未添加保护剂的脂质体冷冻干燥产品，用蒸馏水稀释到合适浓度，取适量置载玻片上，于倒置显微镜下观察形态，结果如图 2 所示。

可以看出，不添加任何冻干保护剂的脂质体复水较难，且溶液混浊，肉眼可见大量的沉淀物，镜下观察有脂质团块。以甘露醇为保护剂的脂质体冻干粉复水过程容易，形成的脂质体悬浮液带有乳光，且镜下观察形态与复水前相似，均显示外观圆整，无聚集。

2.9.2 粒径分布和 Zeta 电位的测定 分别取一定体积的脂质体、甘露醇作保护剂的前体脂质体、未添加保护剂的脂质体冷冻干燥产品，用马尔文激光粒度仪测定其粒径和电位，结果如图 3 所示。

由图 3 可以看出，在无冻干保护剂的情况下，脂质体易发生聚集、融合，脂质体粒径增大，这主要是由于冻干消除了脂质体膜之间的水化层屏障，使膜之间相互聚集的机会增加。添加甘露醇作为冻干保护剂后，复水前后脂质体的平均粒径接近，分别为 (195.50 ± 1.23) nm 和 (251.40 ± 2.14) nm，这可能是由于甘露醇易和卵磷脂基团相互作用，代替水分子成为膜之间的水化层屏障，有效地阻止脂质体膜之间的相互聚集和融合^[19]。复水水合后的脂质体 Zeta 电位值为 (-30.80 ± 0.89) mV，表明水合后的 SLB 前体脂质体溶液稳定。

2.9.3 复水前后包封率的测定 分别取一定体积的前体脂质体、甘露醇作保护剂的复水后前体脂质体、未添加保护剂的复水后前体脂质体，按“2.2”项下的包封率测定方法，测定 SLB 前体脂质体复水前后的包封率变化，结果见图 4。由图 4 可以看出，添



A-冻干前脂质体 B-冻干之后复水（10%甘露醇作保护剂） C-冻干后复水（无保护剂）

A-liposomes before freeze-drying B-proliposomes prepared with 10% mannitol as cryoprotectant C-proliposomes prepared without cryoprotectant

图 2 SLB 脂质体的形态

Fig. 2 Morphology of SLB liposomes

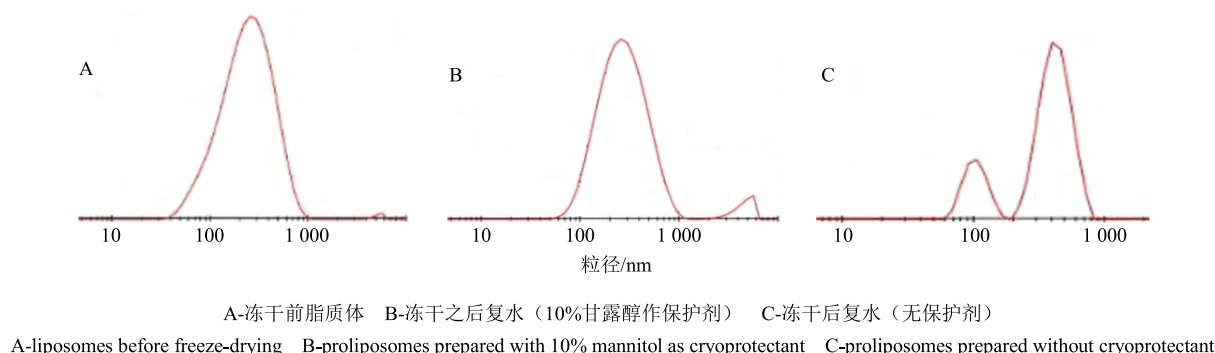


图 3 SLB 脂质体的粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of SLB proliposomes

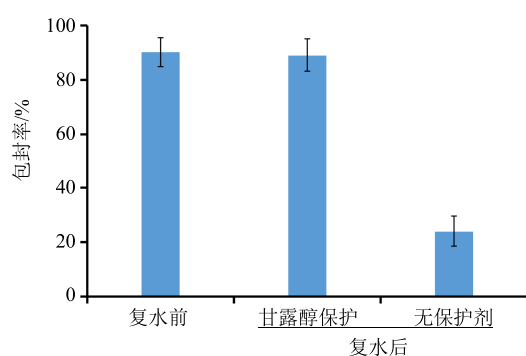


图 4 冻干保护剂对 SLB 前体脂质体复水后包封率的影响 ($n = 3$)

Fig. 4 Effects of cryoprotectants on encapsulation efficiency of SLB proliposomes after rehydration ($n = 3$)

加冻干保护剂后, SLB 前体脂质体复水前后包封率变化不大, 复水后为 $(88.92 \pm 5.86)\%$, 而未添加保护剂的脂质体, 复水后包封率仅为 $(24.17 \pm 5.66)\%$, 这表明不添加保护剂的脂质体冻干后可能以胶态存在, 脂质体膜从原来紧密排列状态变得紊乱, 通透性增加, 容易引起药物的渗漏, 而甘露醇可以与卵磷脂极性基团相互作用, 以氢键结合代替失去的结构水, 能有效阻止脂质体膜之间的靠近, 并降低冻干态的相转变温度降低渗漏的发生^[11]。

2.9.4 前体脂质体稳定性考察 取验证试验制备的 SLB 前体脂质体 3 批, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存, 定时取样, 观察外观, 复水后测定其粒径和包封率, 结果如表 9 所示, 可以看出所制备的前体脂质体性质较为稳定, 粒径在 30 d 内变化不显著, 且药物不易渗漏, 放置 30 d 后, 包封率仍为 $(82.20 \pm 4.60)\%$, 包封率保留率达 93.45%。

3 讨论

脂质体的不稳定主要由于膜材易氧化和水解造

表 9 前体脂质体稳定性考察结果 ($n = 3$)

Table 9 Results of stability test ($n = 3$)

贮存时间/d	外观形态	粒径/nm	包封率/%
0	颜色均匀, 致密, 平整饱满	214.3 ± 2.21	87.96 ± 3.67
5	无变化	216.4 ± 1.98	87.80 ± 2.86
10	无变化	213.2 ± 2.65	86.25 ± 4.55
15	无变化	220.5 ± 3.11	85.64 ± 3.77
20	颜色均匀, 略有干缩	230.7 ± 4.63	84.12 ± 3.09
30	颜色均匀, 略有干缩	238.6 ± 3.57	82.20 ± 4.60

成, 其中氧化可以采用抗氧化剂、金属螯合剂等抑制, 而水解对脂质体膜的影响很难避免。目前, 一些措施如选择合成磷脂或饱和磷脂可以大大减小膜材被氧化水解的机会, 从而提高脂质体稳定性, 但这类磷脂材料通常因价格昂贵而使其应用受限^[10,20]。前体脂质体以干燥粉末形式存在, 可以有效避免磷脂水解, 从而使脂质体长期保存成为可能。

冷冻干燥法是常用的前体脂质体制备方法^[21], 然而冷冻和干燥过程都会引起脂质体结构和功能上的破坏, 主要是由于冻干消除了膜之间的水化层屏障, 其次是冰晶的生长使脂质体的浓度升高, 从而增加了膜之间相互附着聚集的机会, 从而使其在水化后, 暴露出的脂质膜相互融合, 重新形成脂质体结构, 导致粒子的明显增大和包封药物的渗漏^[22]。

已有研究表明, 对于脂质体在冷冻、干燥及重建过程中的破坏, 糖类可以相应地进行保护, 其不仅起到冻干制剂的骨架作用, 还能促进前体脂质体在水中的再分散, 其保护机制仍在研究和探讨中^[18,23]。“水替代”假说认为, 生物体中的大分子活性物质被 1 层水化膜包围着, 该水化膜是维持生物分子结构和功能的物质基础, 干燥脱水时水化膜被破坏会导致生物分子结构发生不可逆变化, 生物活性丧失,

而糖的羟基可与生物分子的极性基团形成氢键,代替干燥过程中极性基团周围失去的水分子,保护氢键的连接位置不直接暴露在周围环境中,在失水位置与磷脂极性基团结合代替失去的结构水,阻止膜之间靠近,抑制膜融合^[24]。经考察,糖类对冷冻干燥过程均可起到一定保护作用,而甘露醇效果最佳,这也能是由于甘露醇具有多孔结构,容易形成结晶,由于结晶本身的支撑能力,容易得到饱满的外观,不会塌陷,使得冻干周期大大缩短^[25]。

本实验考察了以甘露醇作保护剂制备的前体脂质体复水水合后的粒径、形态以及包封率,结果显示前体脂质体外观饱满、致密,呈现可流动的粉末状制剂,复水过程容易,形成的脂质体粒度分布均匀,形态圆整,包封率高,并且稳定性好。制备的SLB前体脂质体有效增加了脂质体的稳定性,制备方法简单,便于贮存和运输,其体内生物利用度及药效学情况值得进一步考察。

参考文献

- [1] 王红军,姜媛媛,路平,等.水飞蓟宾的抗肿瘤、抗氧化和免疫调节分子药理学机制研究进展[J].药学报,2010,45(4):413-421.
- [2] 武艳强,王慧娟,冯社军,等.水飞蓟宾对H₂O₂诱导大鼠H9C2心肌细胞氧化应激损伤的保护作用[J].现代药物与临床,2015,30(5):503-508.
- [3] 郭斯敏,谢青.水飞蓟素在慢性肝炎治疗中的新认识及研究进展[J].肝脏,2013,18(6):423-426.
- [4] 张逸强,宋红杰,王振东.水飞蓟宾联合复方二氯醋酸二异丙胺治疗非酒精性脂肪肝的临床研究[J].现代药物与临床,2016,31(12):1933-1936.
- [5] 杨婷婷,王伟,李国全,等.水飞蓟宾对小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(10):102-106.
- [6] 蒋继周.水飞蓟宾葡甲胺联合多烯磷脂酰胆碱治疗脂肪肝的临床研究[J].现代药物与临床,2015,30(2):176-179.
- [7] 于莲,杜妍,田丽华,等.叶酸修饰水飞蓟宾固体脂质纳米粒的制备及其对A549细胞抑制作用研究[J].中草药,2013,44(2):158-164.
- [8] 郝吉福,房信胜,王建筑,等.应用Box-Behnken实验设计优化水飞蓟素固体脂质纳米粒处方研究[J].中草药,2011,42(11):2221-2225.
- [9] 王选东.水飞蓟宾脂质体的制备及物理化学性质研究[D].苏州:苏州大学,2010.
- [10] 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.
- [11] 王立华,毛微曦,黄慧婷,等.大黄酚前体脂质体的制备及其质量评价[J].中草药,2014,45(14):2014-2017.
- [12] 郑彬.银杏叶提取物前体脂质体的构建、评价及其肠吸收机理的研究[D].长春:吉林大学,2016.
- [13] 杨平.不同载体和前体脂质体对盐酸小檗碱体外释放和大鼠体内吸收的影响[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [14] 仲跻云,陈梁,杨肖斌.口服前体脂质体的研究进展[J].药学与临床研究,2012,20(1):56-59.
- [15] 范云鹏,王德云,胡元亮,等.正交试验优选黄芪多糖脂质体的制备工艺[J].中草药,2011,42(3):470-473.
- [16] 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.
- [17] Sun W T, Zou W W, Huang G H, *et al.* Pharmacokinetics and targeting property of TFu-loaded liposomes with different sizes after intravenous and oral administration [J]. *J Drug Target*, 2008, 16(5): 357-365.
- [18] 唐文雅,宋艳志,邓意辉.脂质体冻干保护剂的种类及其作用机制研究进展[J].沈阳药科大学学报,2012,29(7):560-569.
- [19] 夏书芹,范明辉,许时婴,等.红景天苷前体脂质体的制备与性质研究[J].食品科学,2009,30(16):35-40.
- [20] 时念秋.前列腺素长循环前体脂质体的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2006.
- [21] 张献领,鲍士宝,刘春,等.茶多酚前体脂质体的制备及稳定性研究[J].贵州师范大学学报:自然科学版,2014,32(6):71-75.
- [22] 王岩,丛振娜,刘清飞,等.青藤碱脂质体的处方优化及制备工艺研究[J].中国中药杂志,2009,34(3):275-278.
- [23] Koster K L, Lei Y P, Anderson M, *et al.* Effects of vitrified and nonvitrified sugars on phosphatidylcholine fluid-to-gel phase transitions [J]. *Biophys J*, 2000, 78(4): 1932-1946.
- [24] 张玉华,凌沛学,籍保平,等.糖类在生物活性物质冷冻干燥中的保护作用及其作用机制[J].中国生化药物杂志,2006,27(4):247-249.
- [25] 邓礼荷,韦敏燕,汤晨懿,等.冻干工艺及保护剂对羟基喜树碱脂质体质量的影响[J].中国医药工业杂志,2012,43(1):30-34.