

斑蝥素半乳糖化脂质体制备工艺研究

邹蔓姝, 钟思雨, 周莉莉, 乔勇, 杨晶, 夏新华*

湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 优选斑蝥素半乳糖化脂质体(Lac-CTD-lips)的最佳处方配比和制备工艺,并建立其含量测定的方法。方法 采用薄膜分散法制备Lac-CTD-lips,采用GC-MS法建立斑蝥素含量测定的方法,以斑蝥素的包封率为评价指标,通过单因素考察结合正交试验,优化Lac-CTD-lips的制备工艺,并对其进行表征、包封率、粒径、Zeta电位考察。结果 Lac-CTD-lips最佳处方为斑蝥素-氢化大豆磷脂-胆固醇(1:20:5)、10%半乳糖苷;最佳工艺为50℃成膜,30 mL pH 6.0的PBS溶液洗膜,40℃下水合1.5 h。所得Lac-CTD-lips外观呈淡蓝色乳光,粒子形态呈球形,表面较圆整,无粘连。平均粒径为 (123.9 ± 4.8) nm ($n=3$),粒径分布呈单峰,Zeta电位为 (-0.36 ± 0.81) mV ($n=3$),包封率可达75%以上。结论 GC-MS适用于斑蝥素的定量测定,正交试验优选的制备工艺稳定可靠,所得的Lac-CTD-lips包封率较高、粒径小,外观形态好。

关键词:斑蝥素;半乳糖化脂质体;制备工艺;薄膜分散法;GC-MS;包封率;正交试验

中图分类号:R283.6 **文献标志码:**A **文章编号:**0253-2670(2018)12-2809-08

DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2018.12.012

Preparation process of galactosylated liposome of modified cantharidin

ZOU Man-shu, ZHONG Si-yu, ZHOU Li-li, QIAO Yong, YANG Jing, XIA Xin-hua

College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To optimize the formulation ratio and preparation process of galactosylated cantharidin liposome (Lac-CTD-lips) and establish its methodology for content determination. **Methods** The method of determination of GC-MS cantharidin content was established by film dispersion method. The entrapment efficiency of cantharidin was evaluated as an index. The preparation process of Lac-CTD-lips was optimized by single factor and orthogonal experiments. Its surface characteristics, encapsulation efficiency, particle size, and Zeta potential were also investigated. **Results** The best prescription was as follow: cantharidin: hydrogenated soya lecithin:cholesterol at 1:20:5, 10% galactoside, film-forming at 50℃, film cleaning with 30 mL of PBS solution of pH 6.0, and hydration at 40℃ for 1.5 h. The resulting liposomes exhibited a pale blue opalescent appearance, a spherical particle morphology, and a more rounded surface with no adhesion. The average particle size was (123.9 ± 4.8) nm ($n=3$), the particle size distribution was single-peak, the zeta potential was (-0.36 ± 0.81) mV ($n=3$), and the encapsulation efficiency was over 75%. **Conclusion** GC-MS is suitable for the determination and analysis of cantharidin content. The optimal preparation technology from orthogonal experiment is stable and reliable. The obtained liposomes have higher encapsulation efficiency, small particle size, and good appearance.

Key words: cantharidin; galactosylated liposomes; preparation process; film dispersion method; GC-MS; encapsulation rate; orthogonal test

肝脏肿瘤是全球最常见的恶性肿瘤之一^[1],目前针对肿瘤治疗多采用化学药,但其毒副作用大,且肿瘤细胞易产生耐药性,限制了其临床应用^[2]。而中药因多靶点、多通路与高效低毒优势已逐渐进入抗肿瘤药物的市场^[3-9]。

斑蝥素(cantharidin, CTD)是斑蝥的主要有效成分,现代药理学研究表明,斑蝥素对原发性肝癌具有确切的治疗效果^[10-13]。但斑蝥素水溶性差、口服生物利用度较低、具有强毒性,限制了其在临床肿瘤治疗方面的应用^[14-17]。脂质体被认为是最成熟

收稿日期:2018-05-20

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81573621)

作者简介:邹蔓姝(1994—),女,硕士研究生,从事中药新制剂及制剂质量标准的研究。Tel:13755147874 E-mail:453812042@qq.com

*通信作者 夏新华(1962—),博士,教授,博士生导师,主要从事中药新制剂、新剂型、新技术及制剂质量标准的研究。

Tel:(0731)88458305 E-mail:xiaxinhua001@163.com

与最具前景的纳米靶向给药载体,具有良好的生物药剂学性质,在抗肿瘤药物的研发中显示出巨大的前景^[18-20]。肝实质细胞内存在去唾液酸糖蛋白受体(asialoglycoprotein receptor, ASGPR)亦称半乳糖受体,可高效识别半乳糖残基^[21-22]。普通斑蝥素脂质体(CTD-lips)易被机体免疫系统识别吞噬,因此肝靶向效果较差。斑蝥素脂质体半乳糖化(Lac-CTD-lips)后可主动靶向肝脏,既提高了药物在病灶部位的局部浓度,又减少了药物对其他非靶组织的毒副作用。课题组前期合成了肝靶向分子硬酯醇乙酰化半乳糖苷,本实验研究 Lac-CTD-lips 的处方配比和制备工艺,以及初步探索其理化性质,考察 Lac-CTD-lips 制备的可行性。为斑蝥素治疗肝病的研究奠定基础,为中药肝靶向制剂的开发与应用提供实验依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

电子分析天平,北京赛多利斯天平有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华有限公司;减压旋转蒸发仪,Buchi 公司;KQ5200BE 型数控超声清洗器,昆山市超声仪器有限公司;GCMS-QP2010 Ultra,上海普迪生物技术有限公司;MicroPette Plus 单道移液器,大龙兴创仪器有限公司;探头超声仪,宁波新芝生物科技股份有限公司;DF-101S 磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限公司;Zetasize ZS 型激光纳米粒度测定仪,英国 Malvern 公司;Tecnai G² Spirit Twin 透射电子显微镜(TEM),Thermo Fisher Scientific 公司;Moticam pro 282B 数码显微成像系统,麦克奥迪实业集团有限公司。

1.2 材料

斑蝥素对照品,中国食品药品检定研究院,批号 110783-201105,质量分数 98.6%;斑蝥素原料药,西安通泽生物科技有限公司,批号 TZ180408,质量分数 99.4%;氢化大豆磷脂 Lipoid S100,注射用,德国 Lipoid 公司;胆固醇,天津东方试剂厂;甲醇,色谱纯,斯百全(Spectrum)化学有限公司;葡聚糖凝胶 G-50,北京鼎国生物技术有限责任公司;Triton X-100,国药集团化学试剂有限公司;冰醋酸,湖南汇虹试剂有限公司;十八烷,国药集团化学试剂有限公司,质量分数 99%;硬酯醇乙酰化半乳糖苷,质量分数 90%,实验室自制;磷酸氢二钠,广东光华科技股份有限公司;磷酸二氢钠,广东汕头市西陇化工厂;三氯甲烷,湖南汇虹试剂有限公司;

蒸馏水,华润怡宝饮料中国有限公司。

2 方法与结果

2.1 GC-MS 含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 DB-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);气化温度 270 °C;程序升温:起始温度 60 °C,保留 1 min,后以 15 °C/min 升至 260 °C,保留 10 min;载气为 N₂,柱体积流量 1 mL/min,分流比 10:1;进样量 1 μL;理论塔板数以斑蝥素峰计>5 000,分析时间 25 min。

2.1.2 质谱条件 EI 源电子轰击能量 70 eV;离子源温度 230 °C;质谱检测口温度 270 °C;倍增电压 1.40 kV;溶剂切割时间 3 min。

2.1.3 对照品与内标溶液的配制 精密称取斑蝥素对照品 10 mg,加甲醇溶解于 100 mL 量瓶中,摇匀,定容得质量浓度为 100 μg/mL 的对照品溶液。精密称取 150 mg 十八烷于 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容作为母液,再精密移取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释定容至刻度,得质量浓度为 150 μg/mL 的十八烷甲醇内标溶液。精密量取斑蝥素对照品溶液 0.7 mL,对应的内标溶液 0.6 mL,甲醇定容 10 mL,得斑蝥素、十八烷混合的对照品溶液。

2.1.4 供试品溶液的配制

(1) 含药靶向脂质体供试品溶液:按课题组前期预实验的处方比例,精密称取斑蝥素-氢化大豆磷脂-胆固醇 1:10:2.5,10%靶向分子于 500 mL 茄形瓶中,加入三氯甲烷超声溶解,40 °C 下真空旋转成膜,减压干燥 12 h,50 °C 下加入等温的 pH 6.0 的 PBS 溶液 30 mL,孵化 30 min,搅拌水合 1 h,探头超声 10 min,依次通过 0.45、0.22 μm 微孔滤膜整粒后即得 Lac-CTD-lips 溶液。

(2) 空白脂质体供试品溶液:除不加入斑蝥素药物外其余操作同含药靶向脂质体的制备。

2.1.5 斑蝥素和十八烷特征离子的确定 按“2.1.1”“2.1.2”项色谱和质谱条件,取斑蝥素十八烷混合的对照品溶液进行测定,结果见图 1。采用 GC-MSscan 模式扫描确立了斑蝥素和内标物十八烷的特征离子,斑蝥素的特征离子为 m/z 70、96、128,十八烷的特征离子为 m/z 43、57、71。采用 sim 模式测量脂质体中斑蝥素的含量。

2.1.6 专属性试验 按上述 GC-MS 条件,测定甲醇、空白脂质体、十八烷对照品、斑蝥素十八烷混合对照品溶液,结果(图 2)表明溶剂和阴性供试品对结果没干扰,表明专属性好。

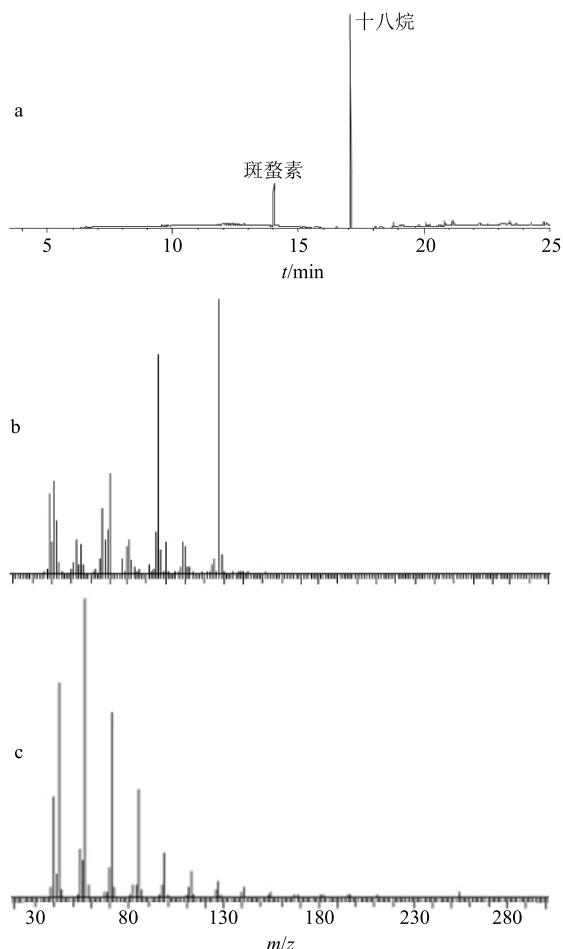


图 1 混合对照品溶液色谱图 (a)、斑蝥素特征离子 (b) 和十八烷特征离子 (c)

Fig. 1 Mixed reference solution (a), cantharidin characteristic ion (b), and octadecane characteristic ion (c)

2.1.7 标准曲线的建立 用移液枪分别精密吸取斑蝥素对照品溶液各 0.02、0.1、0.3、0.7、1.0、7.0 mL 于离心管中，各加十八烷甲醇内标溶液 0.6 mL，后用移液枪补足剩余的甲醇溶液使每份总体积为 10 mL。按上述 GC-MS 条件进行检测，以测得的斑蝥素峰面积与内标十八烷平均峰面积的比值为纵坐标 (Y)，斑蝥素质量浓度为横坐标 (X)，绘制标准曲线，回归方程为 $Y=48.738X-0.0234$ ， $r=0.9999$ 。说明斑蝥素在 0.22~77.98 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积比成良好线性关系。

2.1.8 精密度试验 用移液枪精密吸取斑蝥素对照品溶液 0.7 mL，内标溶液 0.6 mL，定容至 10 mL 作为混合内标对照品溶液，按上述 GC-MS 条件重复进样 6 次，测定斑蝥素与十八烷峰面积比值的 RSD 值为 1.5%，表明仪器的精密性和进样操作的一致性符合要求。

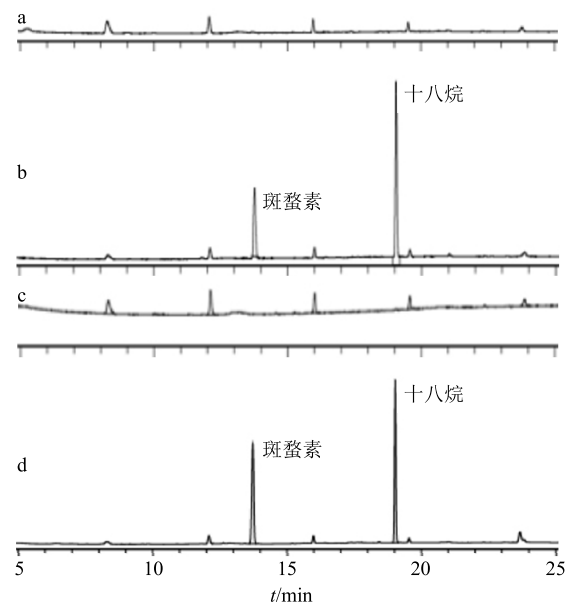


图 2 甲醇溶液 (a)、混合对照品甲醇溶液 (b)、空白脂质体溶液 (c) 和 Lac-CTD-lips 溶液 (d) 的色谱图

Fig. 2 HPLC of methanol solution (a), mixed reference methanol solution (b), blank liposome solution (c), and Lac-CTD-lips solution (d)

2.1.9 重复性试验 精密量取制备的 Lac-CTD-lips 溶液 6 份，每份 1.0 mL，加 10 倍量甲醇 (2.5 mL) 破乳，加 0.6 mL 内标甲醇溶液，定容至 10 mL，按上述 GC-MS 条件进行测定，结果斑蝥素与十八烷峰面积比值的 RSD 值为 2.5%，表明重复性良好。

2.1.10 稳定性试验 精密量取制备好的斑蝥素供试品溶液，分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h 进样，按上述 GC-MS 条件进行测定，计算斑蝥素峰面积与内标十八烷峰面积之比，得到斑蝥素供试品溶液的 RSD 值为 2.3%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.11 加样回收率试验 分别精密量取 0.25 mL 空白脂质体 9 份，分别置 9 个 10 mL 量瓶中，依次分别加入斑蝥素甲醇对照品溶液 0.1、1.0、5.0 mL；内标十八烷溶液各 0.6 mL，用甲醇破乳并定容至 10 mL，即得。按“2.1.1”项色谱条件进行测定，高、中、低 3 个质量浓度下平均回收率分别为 102.32%、101.74%、96.54%，RSD 分别为 2.6%、2.3%、2.3%。

2.2 脂质体包封率的测定方法

2.2.1 洗脱方法的建立 本实验结合了斑蝥素的性质和脂质体的制备方法，选用葡聚糖凝胶柱法。具体洗脱方法为称取 Sephadex G-50 约 4 g，用蒸馏水溶胀过夜，漂洗去杂质，装入玻璃色谱柱 (30

cm×1.8 cm) 中, 装柱 20 cm, 排除气泡, 用洗脱液不断冲洗平衡柱子, 得到 Sephadex G-50 色谱柱。精密吸取 Lac-CTD-lips 溶液适量至分离柱顶部, 用洗脱液以一定流速进行洗脱, 每 2 mL 洗脱液为 1 管, 收集洗脱液, 分别吸取 0.25 mL 洗脱液用色谱甲醇破膜, 超声使其澄清后, 加入 0.3 mL 内标溶液, 甲醇定容至 5 mL, 滤过后用 GC-MS 进样分析, 测定每管样品中斑蝥素的含量。收集脂质体部分, 进行浓缩、破乳, 可进行斑蝥素含量测定, 从而求得 Lac-CTD-lips 的包封率。

2.2.2 破乳剂的考察 取 11 份脂质体样品, 每份为 0.25 mL, 分别加入 5、10、20、40 倍甲醇, 5、10、20、40 无水乙醇, 以及 5、10、20 倍 20% 曲拉通溶液, 超声使其澄清, 用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过后, 用 GC-MS 法测定。从经济效益、操作简便性及总药量的结果等方面考虑, 3 种溶液, 甲醇破乳效果最好, 且 5 倍量的甲醇即可成功破乳。

2.2.3 不同洗脱溶剂的考察 精密吸取 3 份 Lac-CTD-lips 溶液, 各 0.5 mL 上柱, 分别用蒸馏水、0.9% NaCl、pH 6.0 的 PBS 溶液以 0.5 mL/min 体积流量进行洗脱, 其他操作同“2.2.1”项下方法, 洗脱液以蒸馏水洗脱为佳, 生理盐水洗脱的溶液经检测得到的色谱峰形不佳, 积分误差较大, pH 6.0 的 PBS 洗脱液不能很好地分离脂质体和游离药物, 故选择蒸馏水作为洗脱溶剂。其具体洗脱结果见图 3, 因脂质体微粒先被洗脱下来, 游离药物后出来, 峰 a 为脂质体的峰, 脂质体在 32~56 mL 被洗脱出来, 峰 b 是洗脱下来的游离药物的峰, 游离药物在 72~78 mL 被洗脱出来。洗脱峰有明显的分界, 说明脂质体与游离药物分离良好。

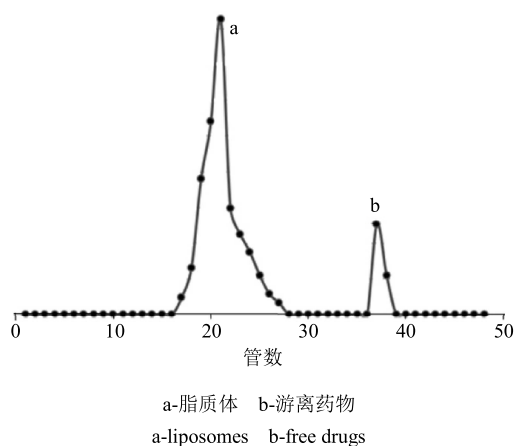


图 3 Lac-CTD-lips Sephadex G-50 PBS 洗脱曲线

Fig. 3 Sephadex G-50 PBS elution curve of Lac-CTD-lips

2.2.4 不同洗脱体积流量考察 精密吸取 3 份 Lac-CTD-lips 溶液, 各 0.5 mL, 按“2.2.1”项下的方法, 分别用蒸馏水以 0.5、1.0、2.0 mL/min 的体积流量进行洗脱。结果显示, 3 种洗脱速度均可使脂质体与游离药物达到较大程度的分离, 但包封率有一定的差异, 分别为 40.1%、49.6%、89.1%, 因此选择 2.0 mL/min 的体积流量进行洗脱为佳。

2.2.5 不同上样量的考察 精密吸取 Lac-CTD-lips 溶液, 分别上柱 0.25、0.5、1.0 mL, 用蒸馏水以 2.0 mL/min 的体积流量进行洗脱, 其他操作同“2.2.1”项下方法。结果显示, 上样量为 0.25、0.5 mL 时, 脂质体与游离药物分离良好, 包封率分别为 78.9% 和 89.1%。上样量为 1.0 mL 时, 可能由于上样量过大, 导致葡聚糖凝胶柱过载, 洗脱曲线稍有拖尾现象且斑蝥素峰形不佳, 误差偏大, 包封率仅为 62.9%。所以从减小实验误差、取样及测定方便等方面考虑, 选择上样量为 0.5 mL。

2.3 Lac-CTD-lips 制备工艺考察

2.3.1 脂质体制备方法的选择

(1) 薄膜分散法: 精密称取磷脂、胆固醇、斑蝥素、10% 的半乳糖苷导向分子, 按课题组前期预实验中的比例溶于三氯甲烷中, 50 °C 减压蒸发除去有机溶剂, 形成均匀脂质膜, 加入 30 mL pH 6.0 磷酸盐缓冲液, 50 °C 水合, 先孵化 30 min 后磁力搅拌水合 1.5 h, 探头超声 12 min, 过 0.45、0.22 μm 微孔滤膜, 即得半透明、淡蓝色乳光脂质体, 包封率为 86.8%。

(2) 乙醇注入法: 精密称取磷脂、胆固醇、斑蝥素、10% 的半乳糖苷导向分子, 按课题组前期预实验中的比例溶于无水乙醇中, 溶解时水浴加热至澄清透明 (油相), 所得溶液用细孔径注射器缓慢匀速地注入到恒温 50 °C pH 6.0 的 30 mL 磷酸盐缓冲液 (水相) 中, 注入过程中用磁力搅拌器搅拌, 先通氮气除去乙醇, 再继续搅拌 30 min。50 °C 孵育 20 min, 探头超声 12 min, 过 0.45、0.22 μm 微孔滤膜, 即得半透明、淡蓝色乳光脂质体, 包封率为 31.3%。

由于乙醇注入法包封率较低, 因此选择薄膜分散法制备 Lac-CTD-lips。

2.3.2 不同药量对包封率的影响 改变斑蝥素的加入量, 分别取斑蝥素的量为 2、4、6、8、10 mg, 处方中其他成分按课题组前期预实验比例 (氢化大豆磷脂-胆固醇 4:1, 10% 靶向分子), 考察不同药

量对药物包封率的影响,结果包封率分别为 $(49.7 \pm 1.9)\%$ 、 $(71.1 \pm 2.2)\%$ 、 $(88.5 \pm 2.7)\%$ 、 $(65.6 \pm 1.9)\%$ 、 $(75.4 \pm 1.0)\%$ ($n=3$)。不同药物量对药物包封率的影响较大,随着药量的增加,包封率升高;但是当药量达到 6 mg 时,脂质体的包封率反而随着药量的增加而有所下降,可能是因为脂质体膜包封斑蝥素的量有限,超过其饱和度之后,即使斑蝥素的药量增加,脂质体包封药物的量也不会继续增加,所以其包封率下降。因此,选择药量为 6 mg。

2.3.3 不同药脂比对包封率的影响 固定处方中的药量为 6 mg,改变药物与磷脂的质量比,考察药物与磷脂的比例分别为 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40 时药物包封率的大小,结果包封率分别为 $(69.2 \pm 1.5)\%$ 、 $(89.0 \pm 0.9)\%$ 、 $(82.1 \pm 3.1)\%$ 、 $(60.6 \pm 4.6)\%$ 、 $(77.3 \pm 2.4)\%$ ($n=3$)。由以上结果可知包封率随着药脂比的增大而增大,但是当药脂比达到 1:10 时,包封率不再升高,反而下降。因此,选择药脂比为 1:10。

2.3.4 不同胆脂比对包封率的影响 固定处方中的药量为 6 mg,药脂比为 1:10,改变胆固醇的量,使胆固醇与氢化大豆磷脂的质量比分别为 1:8、1:4、1:2、1:1,考察胆固醇与磷脂比对药物包封率的影响,结果包封率分别为 $(42.2 \pm 2.8)\%$ 、 $(87.6 \pm 2.4)\%$ 、 $(30.4 \pm 1.1)\%$ 、 $(51.4 \pm 0.7)\%$ ($n=3$)。结果随着胆脂比的增大,包封率也有相应的提高,但是当胆固醇与氢化大豆磷脂的比例达到 1:4 时,包封率不再升高,反而有下降的趋势。这是因为仅有磷脂时脂质体形成的膜很不稳定,胆固醇能增加脂质双分子膜中脂质分子的排列紧密程度,提高双分子膜刚性,从而起到稳定脂质体和减少渗漏的作用。但是当胆固醇加入过多时,可能增加脂质双分子膜的不对称性,脂质体易被破坏,使药物渗漏。这就解释了随着胆脂比的增加,其包封率反而减小的原因。因此,选择胆固醇与磷脂的比例为 1:4。

2.3.5 不同成膜温度对包封率的影响 温度对脂质体的制备影响很大,因为当温度升高到相变温度以上的时候脂质体双分子层中的疏水链会从有序变成无序排列,从而引起脂质体膜的物理性质的变化。所以脂质体制备的时候要使温度保持在相变温度以上。分别以 20、40、50、60 °C 的旋转蒸发温度来制备脂质体。其余操作按照比例称取适量氢化大

豆磷脂、胆固醇、斑蝥素以及半乳糖苷导向分子溶于三氯甲烷中,采用薄膜分散法制备 Lac-CTD-lips。考察不同的蒸发温度对包封率的影响,结果包封率分别为 $(67.0 \pm 2.4)\%$ 、 $(85.6 \pm 1.0)\%$ 、 $(88.6 \pm 1.2)\%$ 、 $(87.2 \pm 1.8)\%$ ($n=3$)。蒸发温度为 20 °C 时,形成薄膜时间很长,不易除去溶剂,且成膜性不好。蒸发温度为 50 °C 时,成膜性较好,包封率较高。

2.3.6 不同水合时间对包封率的影响 固定处方中的药量为 6 mg,药脂比为 1:10,胆脂比为 1:4,旋转成膜的温度为 50 °C,设计水合时间分别为 1.5、2.0、2.5 h,考察不同水合时间对药物包封率的影响,结果包封率分别为 $(89.1 \pm 0.8)\%$ 、 $(35.4 \pm 0.6)\%$ 、 $(36.8 \pm 4.0)\%$ ($n=3$)。由以上结果可见,Lac-CTD-lips 的包封率随着水合时间的延长而降低,但是变化并不是很明显,考虑到制备脂质体的时间和包封率两方面,本实验选择 1.5 h 为最佳的水合时间。

2.3.7 水合介质用量不同对包封率的影响 分别以 20、30、50、60 mL 的水合介质用量,按照课题组预实验比例称取其余组分溶于三氯甲烷中,采用薄膜分散法制备脂质体,考察不同的水合介质用量对包封率的影响,结果包封率分别为 $(61.5 \pm 1.8)\%$ 、 $(88.3 \pm 2.6)\%$ 、 $(25.2 \pm 2.5)\%$ 、0 (未检测到) ($n=3$)。由以上结果可见,在水合介质的量为 30 mL 时包封率最大,超过此量后,包封率开始下降,其中当水合量为 60 mL 由于浓度太小,检测不到斑蝥素。

2.3.8 不同磷脂种类对包封率的影响 分别采用氢化大豆磷脂 (HSPC)、大豆卵磷脂 (SPC)、蛋黄卵磷脂 (EPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPPC) 4 种不同的磷脂,其余成分按照课题组前期预实验的比例称取,采用薄膜分散法制备 Lac-CTD-lips,考察不同的磷脂种类对包封率的影响,结果包封率分别为 $(87.6 \pm 0.4)\%$ 、 $(81.8 \pm 0.6)\%$ 、 $(90.8 \pm 2.7)\%$ 、 $(82.9 \pm 4.3)\%$ ($n=3$)。结果表明 HSPC 和 EPC 的效果最好。

2.4 正交试验优化 Lac-CTD-lips 的制备

虽然单因素考察确定了一些用薄膜分散法制备 Lac-CTD-lips 的条件,但是其对脂质体包封率影响比较大的因素仍然无法确定,因此在单因素考察的基础上,固定斑蝥素的用量为 6 mg,以脂质体的包封率为指标,选择药脂比 (A)、胆脂比 (B) 和不同的磷脂种类 (C) 3 个主要的因素作为变量,每个因素分别选择 3 个水平,进行正交试验。用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验方案,所选因素水平及试验结果见表

1、2。根据方差分析结果, A、B、C 3 个因素, P 值均大于 0.05。对实验结果的影响没有统计学意义, 但正交实验中包封率最高的组合是 $A_2B_2C_3$ 。即斑蝥素-氢化大豆磷脂 (1:20), 胆固醇-氢化大豆磷脂 (1:4)。直观分析结果, 由极差 R 可以发现对脂质体包封率的影响为 $C>A>B$, 得出最优处方为 $A_3B_3C_3$, 因为直观分析和正交分析优选的条件不一致, 且在正交表中无最佳直观分析优选条件的试验, 故按照上述优选的 2 个条件分别制备 3 批脂质体样品, 来选出最佳条件并验证处方的稳定性, 结果见表 3。

表 1 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	D	包封率/%
1	1:30 (1)	1:3 (1)	SPC (1)	(1)	83.45
2	1:30 (1)	1:4 (2)	EPC (2)	(2)	68.52
3	1:30 (1)	1:1 (3)	HSPC (3)	(3)	74.18
4	1:20 (2)	1:3 (1)	EPC (2)	(3)	35.87
5	1:20 (2)	1:4 (2)	HSPC (3)	(1)	97.38
6	1:20 (2)	1:1 (3)	SPC (1)	(2)	92.96
7	1:10 (3)	1:3 (1)	HSPC (3)	(2)	94.57
8	1:10 (3)	1:4 (2)	SPC (1)	(3)	86.12
9	1:10 (3)	1:1 (3)	EPC (2)	(1)	94.70
K_1	226.15	213.89	262.53	275.53	
K_2	226.21	252.02	199.09	256.05	
K_3	275.39	261.84	266.13	196.17	
R	49.24	47.95	67.04	79.36	

表 2 方差分析

Table 2 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	538.139 3	2	0.471 9	无
B	427.725 8	2	0.375 1	无
C	947.995 0	2	0.831 3	无
误差 (D)	1 140.343 8	2		

$$F_{0.05}(2, 2)=19.0 \quad F_{0.01}(2, 2)=99.0$$

表 3 正交设计 $A_2B_2C_3$ 和 $A_3B_3C_3$ 验证试验结果Table 3 Verification test results of $A_2B_2C_3$ and $A_3B_3C_3$

编号	$A_2B_2C_3$			$A_3B_3C_3$		
	包封率/%	均值/%	RSD/%	包封率/%	均值/%	RSD/%
1	74.26			71.04		
2	80.98	77.94	3.4	73.12	70.77	3.5
3	76.35			68.15		

验证结果表明, 按照 $A_2B_2C_3$ 条件制备的脂质体平均包封率为 77.94%, RSD 为 3.4%; 按照 $A_3B_3C_3$ 条件制备的脂质体平均包封率为 70.77%, RSD 为 3.5%。确定选择 Lac-CTD-lips 的最佳制备工艺为 $A_2B_2C_3$, 精密称取斑蝥素-氢化大豆磷脂-胆固醇 (1:20:5)、10%的半乳糖苷于 250 mL 的茄形瓶中, 放入三氯甲烷溶液 30 mL 超声充分溶解, 在 50 °C 下真空旋转蒸发除去有机溶剂, 形成透明均匀的薄膜, 在室温下真空干燥过夜除去残留的有机溶剂。加入 30 mL pH 6.0 的 PBS 溶液洗膜, 于 40 °C 磁力搅拌器下搅拌水合 1.5 h, 水浴超声 10 min, 依次过 0.45、0.22 μm 的微孔滤膜即得, 将其密封置于冰箱保存备用。

2.5 Lac-CTD-lips 理化性质的初步研究

2.5.1 脂质体形态的观察 本实验制备得到的 Lac-CTD-lips 外观澄清透明, 呈淡蓝色乳光, 见图 4。用滴管滴 1 滴脂质体溶液于载玻片上, 另外滴适量水合氯醛在酒精灯上透化后, 滴 2 滴甘油, 盖上盖玻片, 用滤纸吸干多余液体, 放在 Motican 显微镜下观察, 所制备的脂质体主要是外表均匀的小单室脂质体, 见图 5。

用移液枪移取 50 μL 脂质体混合溶液滴于铜网上, 静置 3 min 左右, 用滤纸吸去多余液体, 再用

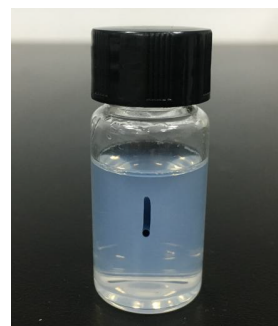


图 4 Lac-CTD-lips 的外观

Fig. 4 Lac-CTD-lips appearance

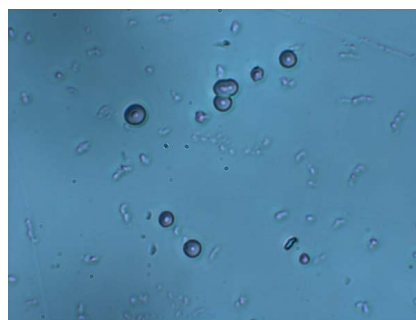


图 5 Lac-CTD-lips 显微图

Fig. 5 Micrograph of Lac-CTD-lips

2%磷钨酸染色或不染色, 染过色的样品待 3 min, 再用滤纸吸去多余试液, 静置 30 min, 待其自然干燥后, 置于透射电镜下观察, 并记录照片。根据照片显示, 普通脂质体呈类球形, 表面圆整, 无粘连。半乳糖修饰脂质体的形态圆整性不如普通脂质体, 且外围的灰暗部分区域较大, 推测可能导向分子的加入增加了脂质体外围磷脂膜的面积, 见图 6、7。

2.5.2 脂质体的粒径和电位的测定 取制备好的脂质体混悬液适量, 稀释若干倍后用纳米粒度测量仪进行测定, 结果见图 8、9。Lac-CTD-lips 的平均粒

径为 $(123.9 \pm 4.8) \text{ nm}$ ($n=3$), 电位为 $(-0.36 \pm 0.81) \text{ mV}$ ($n=3$)。

3 讨论

一般来说, 粒径范围为 10~150 nm 的脂质体, 可以借助肿瘤血管的 EPR 效应, 在肿瘤组织集聚, 粒径 100~200 nm 的脂质体有利于肝靶向性的实现^[23-24]。本研究最终优选出的 Lac-CTD-lips 外观呈淡蓝色乳光, 平均粒径为 $(123.9 \pm 4.8) \text{ nm}$ ($n=3$), Zeta 电位为 $(-0.36 \pm 0.81) \text{ mV}$ ($n=3$), 粒径分布较窄, 形态结构圆整, 因此符合肝肿瘤靶向粒径的要求。

实验中发现课题组制备的脂质体电位很不稳定, 所以电位测定偏差较大, 实验中发现脂质体的性质也不稳定, 存放时间一长, 就絮凝沉淀, 因此课题组今后的实验是考察该脂质体的冻干工艺。

脂质体的制备方法有很多种, 如乙醇注入法、薄膜分散法、逆相蒸发法、高压均质分散法等, 本实验考察了最为经典的乙醇注入法和薄膜分散法, 发现薄膜分散法的包封率较高, 且方法简单易操作, 也可应用于工业化大生产。

采用葡聚糖凝胶柱分离脂质体和游离药物, 由于上样量小, 洗脱组分中斑蝥素含量低, HPLC 检测不到, 且斑蝥素为单萜属于挥发性成分, 因此建立了 GC-MS 方法测定 Lac-CTD-lips 的含量。

制备脂质体的影响因素也很多, 以包封率为指标, 通过考察药物的加入量、药脂比、胆脂比、成膜温度、水合时间、水合介质用量、磷脂种类, 发现药物加入量为 6 mg、药脂比为 1:10、胆脂比为 1:4 时, 脂质体的外观呈淡蓝色乳光, 且性质较稳定, 24 h 内不出现絮凝或沉淀。选择 50 °C 成膜、加入 30 mL PBS 溶液、水合 1.5 h 时, 制备的脂质体外观较好且包封率较高。在单因素实验筛选的基础上对影响较大的药脂比、胆脂比和磷脂种类 3 个主要的因素采用正交试验进行优化试验, 研究得出了最佳工艺参数, 斑蝥素-氢化大豆磷脂-胆固醇脂 (1:20:5)、加 10% 的半乳糖苷溶于 30 mL 三氯甲烷, 50 °C 成膜, 30 mL pH 6.0 的 PBS 溶液洗膜, 40 °C 下水合 1.5 h, 探头超声 10 min, 过 0.45、0.22 μm 的微孔滤膜即得。

参考文献

- [1] 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国肝癌发病状况与趋势分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2015, 37(9): 691-696.
- [2] 钟润娟, 单钰齐, 朱结桃, 等. 抗肿瘤药物不良反应调

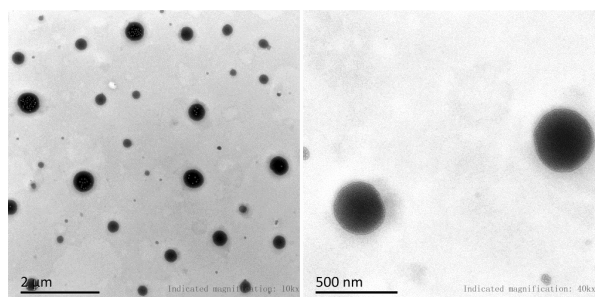


图 6 普通脂质体 TEM 图 (未染色)

Fig. 6 TEM photos of CTD-lips (unstained)

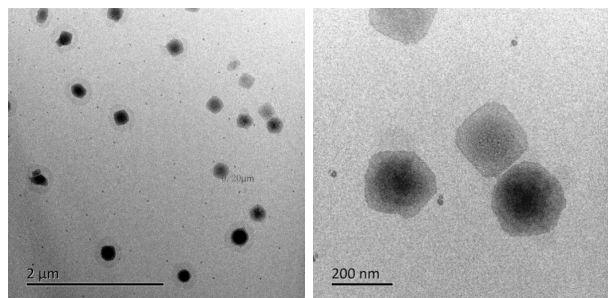


图 7 Lac-CTD-lips TEM 图 (未染色)

Fig. 7 TEM photos of Lac-CTD-lips (unstained)

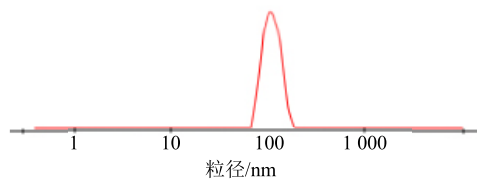


图 8 Lac-CTD-lips 粒径分布图

Fig. 8 Particle size distribution of Lac-CTD-lips

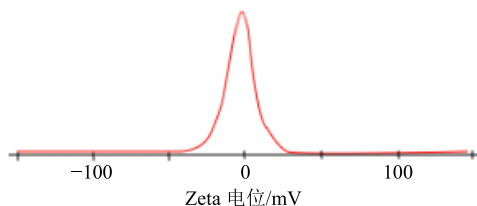


图 9 Lac-CTD-lips 电荷分布图

Fig. 9 Zeta potential of Lac-CTD-lips

- 查与分析 [J]. 北方药学, 2015, 12(10): 144-145.
- [3] 谢 峻, 谈 锋. 植物来源抗肿瘤药物研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(2): 285-289.
- [4] 傅凌鸥, 吴春暖, 孙 丽, 等. 2013—2015 年天津市肿瘤医院中药配方颗粒的使用情况分析 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(12): 2057-2063.
- [5] 许峰巍, 孟静岩. 中药多糖体外抗胃肠肿瘤作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(11): 1659-1663.
- [6] 方 栋, 张 蕾, 孙 娟, 等. “药辅合一” 茶多酚-蜂毒肽纳米复合物的制备及抗肿瘤研究 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3300-3307.
- [7] 陶婵娜, 张四喜, 曲晓宇, 等. 2011—2014 年吉林大学第一医院抗肿瘤中药注射剂的使用情况分析 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(10): 1285-1288.
- [8] 刘海晔. 中药逆转肿瘤多药耐药性的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1096-1102.
- [9] 李春雨, 王 琪, 申 坤, 等. 中药单体成分抗肿瘤侵袭转移的作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(8): 1168-1172.
- [10] 魏方超, 杜 娟, 未宁宁, 等. 斑蝥素及其衍生物的研究现状与应用 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(8): 1586-1589.
- [11] 孙伟红, 闫 逍, 杨少坤, 等. 基于可激活细胞穿透肽修饰的纳米载体系统的研究概况 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(23): 2015-2018.
- [12] 周 杰, 吴敬波. 斑蝥素及其衍生物抗肿瘤研究近况 [J]. 西南军医, 2014, 16(3): 271-274.
- [13] Liechty W B, Peppas N A. Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 80(2): 241-246.
- [14] Lila A S, Matsumoto H, Doi Y, *et al.* Tumor-type-dependent vascular permeability constitutes a potential impediment to the therapeutic efficacy of liposomal oxaliplatin [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 81(3): 524-531.
- [15] Juang V, Lee H P, Lin M Y, *et al.* Cationic PEGylated liposomes incorporating an antimicrobial peptide tilapia hepcidin 2-3: An adjuvant of epirubicin to overcome multidrug resistance in cervical cancer cells [J]. *Int J Nanomed*, 2016, 11(4): 6047-6064.
- [16] 曹咏梅. 用于基因转染的阳离子脂质体研究进展 [J]. 化学试剂, 2015, 37(6): 515-518.
- [17] 王 平, 王晓晶, 潘小霞, 等. 斑蝥素衍生物的合成、抗肝癌活性及构效关系研究 [J]. 化学通报, 2018, 81(4): 355-360.
- [18] 李秀英, 李学涛, 李钦青. 靶向性蒿甲醚脂质体的构建及体外靶向性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 814-818.
- [19] 张晓燕, 高永良. 抗肿瘤药物脂质体的研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2009, 28(5): 333-336.
- [20] 周 奕, 叶建林. 乳糖化-去甲斑蝥素磷脂复合物pH敏感型脂质体肝靶向抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2803-2808.
- [21] 黄渊余, 梁子才. 去唾液酸糖蛋白受体及其在药物肝靶向递送中的应用 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42(6): 501-510.
- [22] 陈 静, 程 怡, 郑品劲, 等. 去唾液酸糖蛋白受体配体胆固醇-半乳糖苷的酶促合成优化研究 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 502-506.
- [23] 田 伟, 李银贵, 修 宪, 等. 抗肿瘤长循环热敏脂质体的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(17): 2061-2065.
- [24] 焦 姣, 蒋宫平, 邓意辉. 脂质体药物传递系统的 50 年发展历程概述 [J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(9): 738-754.