

氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体的制备工艺研究

李秀英¹, 李学涛², 王颖莉^{1*}

1. 山西中医药大学, 山西 晋中 030024

2. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600

摘要: **目的** 优选氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体的最佳处方配比和制备工艺, 并进行理化性质评价。**方法** 以包封率为指标, 优选氨基蝶呤修饰蒿甲醚脂质体的制备方法, 并通过正交试验优化其处方及工艺; 采用激光粒度仪、透射电镜评价脂质体的粒径、Zeta 电位及外观形态; 利用透析法研究脂质体的体外释放。**结果** 制备的氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体的最优处方为卵磷脂-胆固醇-TPGS 物质的量比 95 : 0.5 : 3, 5%氨基蝶呤修饰率, 蒿甲醚与脂材的比例为 1 : 20, 30 °C 下旋转成膜, 水化后, 探头超声 8 min。所得的氨基蝶呤修饰蒿甲醚脂质体的粒径为 (99.97 ± 1.67) nm; 多分散度为 0.185 ± 0.021 ; Zeta 电位为 (-0.023 ± 0.080) mV。透射电镜结果显示蒿甲醚脂质体形态圆整; 包封率为 $(90.06 \pm 1.15)\%$; 在模拟血液中, 蒿甲醚脂质体的 48 h 累积释放率为 $(57.07 \pm 6.09)\%$ 。**结论** 正交试验优选的氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体形态圆整、粒径小且均一、药物包封率较高、具有很好的缓释效果。

关键词: 氨基蝶呤修饰蒿甲醚脂质体; 包封率; 正交试验; 粒径; 体外释放

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)07-1569-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.07.012

Preparation and characterization of APGA modified artemether liposomes

LI Xiu-ying¹, LI Xue-tao², WANG Ying-li¹

1. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030024, China

2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: **Objective** To optimize the formulation ratio and preparation process of the APGA modified artemether liposomes, and evaluate its physical and chemical properties. **Methods** The encapsulation efficiency of artemether was evaluated as index, and the preparation method of APGA modified artemether liposomes was optimized. The preparation process of APGA modified artemether liposomes was optimized by orthogonal experiments. Laser particle analyzer and transmission electron microscopy were used to evaluate the particle size, Zeta potential, and appearance of liposomes, and dialysis method was used to study the release of liposomes *in vitro*. **Results** The best prescription was as follow: EPC-Chol-TPGS at 95 : 0.5 : 3, 5% APGA-PEG-DSPE, the artemether-lipid ratio at 1 : 20, film-forming temperature 30 °C, probe ultrasound time 8 min. The resulting liposomes exhibited a pale blue opalescent appearance. The average particle size, polydispersity index, and zeta potential of artemether liposomes was (99.97 ± 1.67) nm, 0.185 ± 0.021 , and (-0.023 ± 0.080) mV, respectively. Transmission electron micrograph image showed that artemether liposomes were spherical vesicles with uniform sizes. The encapsulation efficiency of artemether in liposomes was $(90.06 \pm 1.15)\%$. *In vitro* cumulative release rate of artemether from the liposomes in the simulated body fluids was $(57.07 \pm 6.09)\%$ after 48 h. **Conclusion** The optimized APGA modified artemether liposomes was successfully developed. It had the following characters: round shape, uniform particle size, high drug encapsulation efficiency and good sustained-release effect.

Key words: APGA modified artemether liposomes; encapsulation efficiency; orthogonal test; particle size; *in vitro* release

收稿日期: 2019-01-07

基金项目: 山西省“1331工程”工程(技术)研究中心中药微乳与生物新制剂研发; 国家自然科学基金面上项目(81874347); 山西省应用基础研究项目(201801D221434); 山西省中医药管理局科研项目(2016ZYCY23); 山西中医药大学博士科研启动基金项目(2015BK03)

作者简介: 李秀英(1984—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为肿瘤靶向药物递药系统的研究。

Tel: (0351)3179903 E-mail: lixiuying85@163.com

*通信作者 王颖莉(1967—), 女, 博士, 教授, 研究方向为中药化学药效物质基础组分与代谢组分分离技术、中药生物物理化学特性研究。
Tel: (0351)3179903 E-mail: wyltyut@163.com

蒿甲醚是一种青蒿素衍生物,可用于严重的多药耐药疟疾的治疗,并具有一定的抗肿瘤活性^[1-4]。同时蒿甲醚存在水溶性差、吸收缓慢、生物利用度低、直接注射容易引起刺激、疼痛等问题^[5-6]。脂质体是一种安全、无毒、具有靶向给药功能的新型药物制剂^[7-9]。将药物包载于纳米脂质体中既可解决水溶性问题,同时利用小粒径具有实体瘤的高通透性和滞留效应(EPR),增加肿瘤部位药物的蓄积和降低毒性^[10-11]。脂质体药物的缓释效应^[12-13]可以克服蒿甲醚代谢快及利用率低的缺点。前期研究结果表明^[14],将蒿甲醚包载于氨基蝶呤修饰的靶向纳米脂质体内,利用叶酸受体介导的主导靶向效应,提高了蒿甲醚的抗肿瘤活性。然而因其包封率较低,影响体内药效实验的进行。在前期研究基础上,本研究通过正交试验,优化其处方及制备工艺,并对脂质体的性质进行初步表征,以期后续体内抗肿瘤活性研究提供制剂基础。

1 仪器与材料

1.1 材料

蛋黄卵磷脂(EPC),上海如吉生物科技发展有限公司,批号 160116;胆固醇(Chol,批号 108D102)、葡聚糖凝胶 G-50(Sephadex G-50,批号 727A0610)、胎牛血清(批号 20161026),北京索莱宝科技有限公司;聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯(TPGS),上海谱振生物科技有限公司;氨基蝶呤-聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺共聚物(APGA-PEG-DSPE,自制);蒿甲醚对照品(批号 J1529015,质量分数>98%)、蒿甲醚(批号 G1430027,质量分数 98%),上海阿拉丁生化科技有限公司;乙腈,色谱纯,默克试剂公司;透析袋,截留相对分子质量为 12 000~14 000,北京宝赛公司;氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾,分析纯,国药集团化学试剂北京有限公司。

1.2 仪器

十万分之一精密电子天平,北京赛多利斯有限公司;JY92-IIN 超声波细胞粉碎机、SB-5200 超声机,宁波新芝生物科技有限公司;St-2000 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;Zetasizer Nano-90 激光粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;ZXY-48 型恒温摇床,常州润华电器有限公司;Waters e2695 型高效液相色谱仪,2998 PDA 检测器,美国沃特斯公司;Tecnai G2 20ST 型透射电子显微镜(TEM),美国 FEI 公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC 定量测定方法

2.1.1 色谱条件^[15] 色谱柱为 Agela Innoval C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(62:38);体积流量 0.8 mL/min;检测波长 216 nm;柱温 25 ℃;进样量为 20 μL。

2.1.2 氨基蝶呤修饰蒿甲醚脂质体供试品溶液的制备 按照课题组前期实验的处方比例^[14],精密称取物质的量比为 88:3.5:3:3 的 EPC、Chol、TPGS、APGA-PEG-DSPE 和蒿甲醚(脂材-蒿甲醚 20:1)适量,于 100 mL 茄型瓶中,加入三氯甲烷溶解,40 ℃水浴条件下旋转干燥成膜,加入 4 mL 磷酸盐缓冲溶液(137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 8 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, PBS, pH 7.4)溶液水化,先在水浴中超声 1 min,至形成乳白色均匀的粗脂质体后探头超声 10 min(超声工作时间为 10 s,间歇时间为 10 s),保护温度为 20 ℃,功率为 200 W,然后将超声波粉碎后的脂质体囊泡挤压通过孔径为 400、200 nm 的聚碳酸酯膜各 3 次,制得带有蓝色乳光的半透明氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体。精密吸取脂质体样品 0.1 mL,加 0.9 mL 乙腈超声破膜,过 0.45 μm 微孔滤膜,滤过,取续滤液,即得含药脂质体供试品溶液。

2.1.3 空白脂质体供试品溶液 除不加药物外,其他操作条件同氨基蝶呤修饰蒿甲醚脂质体供试品溶液的制备。

2.1.4 对照品溶液的制备 精密称取蒿甲醚对照品适量,加流动相溶解并稀释成质量浓度为 1.96、3.92、7.84、15.69、31.38、62.75、125.50、251.00、502.00 μg/mL 系列对照品溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜,滤过,取续滤液,即得。

2.1.5 系统适应性考察 精密吸取对照品溶液、空白脂质体供试品溶液及氨基蝶呤修饰蒿甲醚脂质体供试品溶液 20 μL,按照“2.1.1”项下色谱条件进样分析,色谱图见图 1。结果表明空白脂质体对蒿甲醚测定无干扰。

2.1.6 线性关系考察 精密吸取“2.1.4”项下系列质量浓度蒿甲醚对照品溶液 20 μL,按照“2.1.1”项下色谱条件,测得峰面积(*A*)值,以 *A* 值对蒿甲醚质量浓度进行线性回归,得回归方程为 $A = 1011.1 C + 556.24$, $r = 0.9999$,结果表明蒿甲醚在 1.96~502.00 μg/mL 线性关系良好。

2.1.7 精密度试验 精密吸取“2.1.4”项下对照品

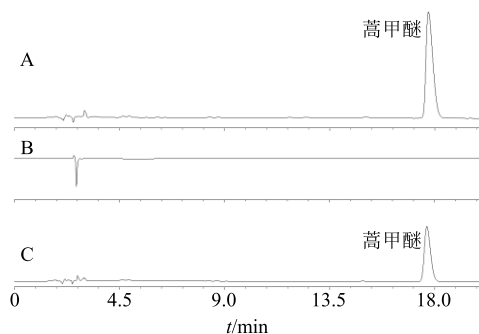


图 1 蒿甲醚对照品 (A)、空白脂质体溶液 (B) 和氨基蝶呤修饰蒿甲醚脂质体供试品溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of artemether reference substance (A), blank liposome (B), and APGA modified artemether liposomes (C)

溶液 (125.5 $\mu\text{g/mL}$) 20 μL , 按照“2.1.1”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 结果蒿甲醚峰面积的 RSD 为 0.45%。

2.1.8 稳定性试验 取“2.1.2”项下氨基蝶呤修饰蒿甲醚脂质体, 以 4 倍量乙腈破坏, 涡旋混匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 分别于 0、1、2、4、6、8 h 按照“2.1.1”项下色谱条件测定, 结果蒿甲醚峰面积的 RSD 为 0.58%。

2.1.9 重复性试验 取“2.1.2”项下氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体 6 份, 以 4 倍量乙腈破坏, 涡旋混匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 按照“2.1.1”项下色谱条件测定。结果蒿甲醚的质量浓度分别为 85.72、85.03、86.49、86.34、85.47、86.00 $\mu\text{g/mL}$, 平均质量浓度为 85.84 $\mu\text{g/mL}$, RSD 为 0.64%

2.1.10 加样回收率试验 取“2.1.3”项下空白脂质体 6 份, 每份 100 μL , 每份分别加入蒿甲醚对照品溶液 (502.0 $\mu\text{g/mL}$) 100 μL , 涡旋混匀, 以 4 倍量乙腈破坏, 涡旋混匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 按照“2.1.1”项下色谱条件进行定量测定, 结果加样回收率分别为 98.35%、100.62%、98.90%、101.34%、99.31%、99.11%, 平均回收率为 99.60%, RSD 为 1.14%。

2.2 脂质体包封率的测定方法

选用葡聚糖凝胶柱法进行脂质体与游离药物的分离^[16]。具体方法为称取约 5 g 的葡聚糖凝胶 G-50, 用蒸馏水溶胀过夜, 装入玻璃色谱柱 (30 cm $\times$ 1.5 cm) 中, 装柱 20 cm, 排出气泡, 待其充分静置以后, 用 pH 7.4 PBS 平衡色谱柱, 精密移取含药脂质体 1 mL 加入色谱柱中, 以 pH 7.4 PBS 作为洗脱剂、0.5 mL/min 的体积流量洗脱和分离游离药物与脂质体, 每毫升洗脱液为 1 管。洗脱曲线见图 2。

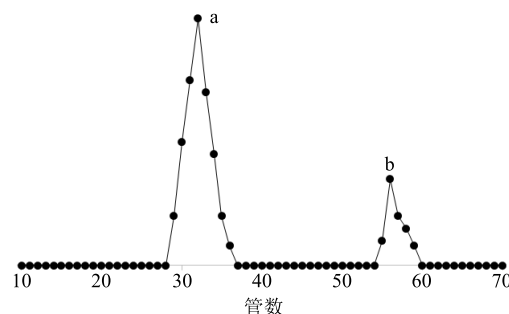


图 2 氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体 (a) 和游离蒿甲醚 (b) 洗脱曲线

Fig. 2 Sepadex G50 PBS elution curve of APGA modified artemether liposomes (a) and free artemether (b)

分别吸取 0.1 mL 洗脱液, 使用 0.9 mL 乙腈破膜, 使用涡旋机涡旋 30 s 混匀, 然后使用超高速离心机 12 000 r/min 离心 10 min 使药物与脂质体分离。取分离后的上清液使用 HPLC 法测定每管蒿甲醚的质量浓度, 收集脂质体部分, 同样进行破膜操作, 进行含量测定, 从而依据公式包封率 = $W_e/(W_e + W_o)$ (W_e 表示包裹在脂质体内药物的含量, W_o 表示未包封的游离药物量), 可以得出包封率。

2.3 氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体制备工艺筛选

2.3.1 脂质体制备方法筛选

(1) 薄膜分散法^[17]: 以物质的量比 88:3.5:3:3 精密称取 EPC、Chol、TPGS、APGA-PEG-DSPE 适量, 以 1:20 的药脂比加入蒿甲醚, 共同溶于氯仿溶液中, 并置于磨口茄型瓶中, 使用旋转蒸发器于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴, 50 r/min 条件下减压蒸去氯仿溶液, 使脂材在烧瓶壁上形成均匀类脂薄膜。加入 4 mL pH 7.4 的 PBS 溶液水化, 水浴中超声 1 min, 探头超声 10 min (超声工作时间为 10 s, 间歇时间为 10 s), 保护温度为 20 $^{\circ}\text{C}$, 功率为 200 W, 然后挤压通过孔径为 400、200 nm 的聚碳酸酯膜各 3 次, 制得带有蓝色乳光的半透明氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体, 包封率为 (73.39 $\pm$ 0.94)%。

(2) 乙醇注入法^[18]: 精密称取蒿甲醚、EPC、Chol、TPGS、APGA-PEG-DSPE (比例同薄膜分散法), 共同溶于无水乙醇中, 在搅拌的条件下将所得澄清溶液采用胰岛素注射针缓慢匀速注入到恒温的 PBS 中, 采用旋转蒸发的方式除去乙醇后, 所得混悬液探头超声 10 min (功率 200 W, 超声 10 s, 停止 10 s, 循环超声), 同法挤压通过聚碳酸酯膜, 制得淡蓝色乳光的脂质体, 包封率为 (50.34 $\pm$ 0.61)%。

根据上述实验结果, 由于乙醇注入法制备的脂

质体包封率较低,因而选择薄膜分散法制备氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体。

2.3.2 蒿甲醚脂质体处方及工艺筛选

(1) 正交试验筛选处方及工艺:以脂质体的主要组成成分 EPC-Chol-TPGS 不同物质的量比(A)、靶向分子 APGA-PEG-DSPE 修饰率(B)、旋转成膜温度(C)、药脂比(D)、探头超声时间(E)为因素,以包封率为指标,设计 5 因素 3 水平正交试验

方案,各因素水平见表 1,正交试验结果及方差分析见表 1、2。根据方差分析结果显示,A、B、C、D、E 5 个因素中,A 和 D 对包封率具有显著性影响,且影响顺序为 $A>D$;B、C、E 3 个因素对包封率影响相对较小,没有统计学意义,影响顺序为 $E>B>C$ 。正交试验中包封率最高的组合为 $A_3B_3C_1D_3E_2$,即 EPC-Chol-TPGS 物质的量比为 95:0.5:3,靶向分子 APGA-PEG-DSPE 修饰率为 5%,

表 1 $L_{18}(3^5)$ 正交试验设计与结果

Table 1 $L_{18}(3^5)$ orthogonal experimental design and results

试验号	A	B/%	C/℃	D	E/min	包封率/%
1	88:3.5:3 (1)	1 (1)	30 (1)	1:15 (1)	5 (1)	61.63
2	88:3.5:3 (1)	3 (2)	40 (2)	1:18 (2)	8 (2)	62.54
3	88:3.5:3 (1)	5 (3)	50 (3)	1:20 (3)	10 (3)	73.39
4	90:1.5:3 (2)	1 (1)	30 (1)	1:18 (2)	8 (2)	77.48
5	90:1.5:3 (2)	3 (2)	40 (2)	1:20 (3)	10 (3)	82.16
6	90:1.5:3 (2)	5 (3)	50 (3)	1:15 (1)	5 (1)	71.25
7	91:0.5:3 (3)	1 (1)	40 (2)	1:15 (1)	10 (3)	74.15
8	91:0.5:3 (3)	3 (2)	50 (3)	1:18 (2)	5 (1)	79.27
9	91:0.5:3 (3)	5 (3)	30 (1)	1:20 (3)	8 (2)	89.96
10	88:3.5:3 (1)	1 (1)	50 (3)	1:20 (3)	8 (2)	79.62
11	88:3.5:3 (1)	3 (2)	30 (1)	1:15 (1)	10 (3)	69.13
12	88:3.5:3 (1)	5 (3)	40 (2)	1:18 (2)	5 (1)	71.82
13	90:1.5:3 (2)	1 (1)	40 (2)	1:20 (3)	5 (1)	83.15
14	90:1.5:3 (2)	3 (2)	50 (3)	1:15 (1)	8 (2)	71.79
15	90:1.5:3 (2)	5 (3)	30 (1)	1:18 (2)	10 (3)	72.52
16	91:0.5:3 (3)	1 (1)	50 (3)	1:18 (2)	10 (3)	79.36
17	91:0.5:3 (3)	3 (2)	30 (1)	1:20 (3)	5 (1)	88.54
18	91:0.5:3 (3)	5 (3)	40 (2)	1:15 (1)	8 (2)	81.33
K_1	418.13	455.39	459.26	429.28	455.66	
K_2	458.35	453.43	455.15	442.99	462.72	
K_3	492.61	460.27	454.68	496.82	450.71	
R	74.48	6.84	4.58	67.54	12.01	

表 2 正交试验方差分析

Table 2 Variance analysis of orthogonal test

变异来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	463.26	2	218.93	$P<0.01$
B	4.14	2	1.96	
C	2.12	2	1.00	
D	424.85	2	200.78	$P<0.01$
E	12.14	2	5.74	

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

旋转成膜温度 30℃,药脂比为 1:20,探头超声时间 8 min。直观分析结果,由极差 R 可以发现对脂质体包封率影响为 $A>D>E>B>C$,得出最优处方为 $A_3B_3C_1D_3E_2$,与正交分析优选出的条件一致,为正交表中的试验 9。

(2) 脂质体的验证:按照上述筛选的最优处方及工艺制备 3 批脂质体样品,验证处方的稳定性。经计算 3 批蒿甲醚的包封率分别为 91.23%、90.03%、88.93%,平均包封率为 $(90.06\pm 1.15)\%$,

RSD 为 1.28%。

2.4 氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体理化性质初步研究

2.4.1 粒度及 Zeta 电位 使用马尔文 Zetasizer Nano-90 激光粒度仪测定脂质体的粒径。仪器的激光束波长设定为 633 nm, 入射光与散射光束的夹角为 90°, 测定温度设定为 25 °C。取适量载药脂质体适当稀释后进行测定, 测得氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体的粒径分别为 98.23、101.56、100.12 nm, 平均粒径为 (99.97 ± 1.67) nm, RSD 为 1.67%; 多分散度 (PDI) 分别为 0.205、0.187、0.163, 平均 PDI 为 0.185 ± 0.021 ; Zeta 电位为 -0.113、0.039、0.005 mV, 平均 Zeta 电位 (-0.023 ± 0.080) mV。

2.4.2 形态学 采用 TEM 进一步研究蒿甲醚脂质体的形态。使用去离子水作为分散介质稀释脂质体, 用 0.2 μm 微孔滤膜滤过后, 将铺有碳膜的铜网漂放在脂质体溶液上, 1 min 后取出, 用滤纸吸干后, 将俘获有脂质体粒子的铜网漂放在 1% 醋酸双氧铀水溶液上, 1 min 后取出, 用滤纸吸干。室温放置过夜后, 使用 TEM 在 120 kV 下进行观察。由图 3 可知, 脂质体形态圆整。

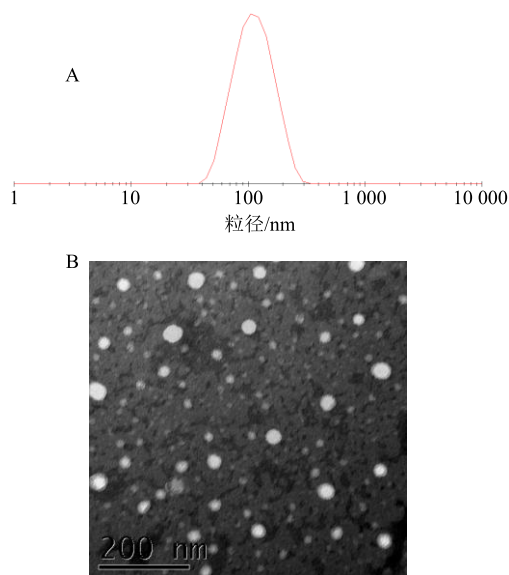


图 3 氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体的粒径分布 (A) 及形态学观察 (B)

Fig. 3 Size distribution (A) and TEM images (B) of APGA modified artemether liposomes (scale bar, 200 nm)

2.4.3 体外释放 按照文献报道方法进行释放度研究^[19]。将氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体放在含血清蛋白的释放介质 (含 10% 胎牛血清的 PBS 缓冲液) 中进行体外释放实验。取 1 mL 脂质体, 加入 1 mL

释放介质混匀后放入透析袋内, 两端扎紧后将透析袋置于 20.0 mL 释放介质中, 在 37 °C、100 r/min 的条件下在摇床上振荡。分别于 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48 h, 取出 0.2 mL 释放介质, 并每次取样后立即补入同等体积的新鲜释放介质, 经乙腈破膜、离心后, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 测定蒿甲醚的含量, 按照公式计算氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体的体外累积释放率, 结果见图 4。

累积释放率 = 第 i 时间点释放液中药物的量 / 与透析体积相同的透析前脂质体溶液中药物的量

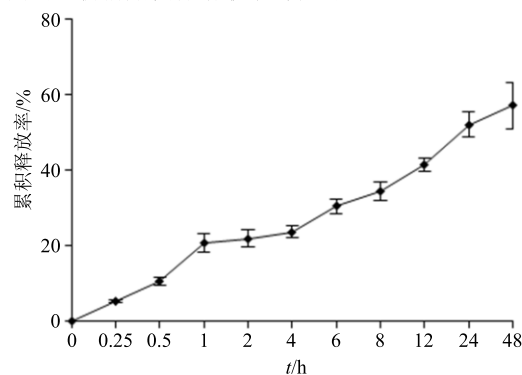


图 4 氨基蝶呤修饰的蒿甲醚脂质体在模拟血浆中的累积释放率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 *In vitro* release rates of artemether from liposomes in simulated body fluids ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

结果表明, 蒿甲醚从脂质体中的释放率, 在最初的 2 h 内, 累积释放率为 (21.95 ± 2.29) %, 24 h 累积释放率为 (51.97 ± 3.25) %, 48 h 累积释放率为 (57.07 ± 6.09) %。

3 讨论

PDI 表示粒子大小的均匀程度, PDI 越小则粒子越均匀, 脂质体越稳定。本研究制备的蒿甲醚脂质体 PDI 较小且形态圆整, 因而脂质体稳定性相对较好。本研究制备的脂质体粒径 99.97 nm, 为利用 EPR 效应被动靶向至肿瘤部位提供基础, 同时具有氨基蝶呤靶分子的修饰, 为经叶酸受体介导的主动靶向提供制剂保障。所选用的脂质载体材料 TPGS 具有长循环作用和对 ABC 转运蛋白的显著抑制作用^[20-21], 也为后续提高蒿甲醚抗肿瘤药效研究奠定了较好的基础。

蒿甲醚分子结构中无共轭结构, 紫外吸收不明显, 故对蒿甲醚的含量测定常采用酸分解后紫外分光光度法, 但由于受加热时间和温度的影响, 专属性较差。本实验利用蒿甲醚具有末端吸收的特性,

直接采用 HPLC-UV 在 216 nm 下测定脂质体中蒿甲醚含量,方法准确,简便,专属性好。

在葡聚糖凝胶柱分离脂质体与游离药物的过程中,可利用脂质体的乳光收集带蓝色乳光的脂质体条带,然而由于受到肉眼观察、光线等误差影响,可能导致脂质体收集不充分,因此本实验以洗脱曲线来避免此部分误差。

制备脂质体的影响因素有很多,通常对包封率影响较大的有磷脂与胆固醇的比例、药脂比、旋转成膜温度、超声功率、超声时间等^[22],本实验在前期实验的基础上对上述因素中的磷脂-胆固醇比例、药脂比、成膜温度、超声时间及靶向材料修饰率进行考察,而在设定的区间内,5 因素中只有 2 个因素对包封率影响显著。胆固醇可以调节脂质体膜的流动性,含量越少,膜流动性越大,容易渗漏^[23],因而在正交试验中设定磷脂胆固醇的上限比例为 9.5 : 0.5;而通常脂材与药物的比例越大,药物的包封率越高^[24],但综合载药量因素,正交试验中设定药脂比上限为 1 : 20。在脂质体的制备过程中,用探头超声破碎大单室脂质体,脂质体以及内含药物可能会因受热而导致变性,因而在探头超声过程中采用冰水浴,超声时间界定 10 min 以内。选用正交试验筛选出的最优处方与工艺制备的脂质体,具有较高的包封率和载药量,较均匀的粒度分布,说明使用该处方采用薄膜分散法制备蒿甲醚脂质体简单易行。

以含 10%胎牛血清的 PBS 缓冲液作为释放介质是为了模拟生物体内的血液环境,更加客观地模拟载药脂质体经静脉注射后在血液循环过程中的释放。脂质体中蒿甲醚的 2 h 累积释放率结果表明脂质体的突释效应较小,48 h 累积释放率结果表明其在血液中较稳定,且能够在体内长时间持续释放药物,可以克服蒿甲醚代谢快及利用率低的缺点。因此本研究制备的蒿甲醚脂质体有较好的包封率、体内外稳定性和较长的体内循环时间,为蒿甲醚脂质体体内抗肿瘤活性提供了较好的制剂基础。

参考文献

- [1] Efferth T, Oesch F. Oxidative stress response of tumor cells: Microarray-based comparison between artemisinins and anthracyclines [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(1): 3-10.
- [2] Singh N P, Panwar V K. Case report of a pituitary macroadenoma treated with artemether [J]. *Integr Cancer Ther*, 2006, 5(4): 391-394.
- [3] Nakase I, Lai H, Singh N, *et al*. Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation [J]. *Int J Pharm*, 2008, 345(1/2): 28-33.
- [4] 严苏纯,尹云泽,艾乐,等.胃肠安丸合并蒿甲醚注射液治疗刚果(布)胃肠型疟疾临床观察[J]. *中草药*, 2016, 47(8): 1366-1368.
- [5] 张亚红,王丽娟,甘淋玲.蒿甲醚及其制剂的临床应用研究进展[J]. *重庆医学*, 2014, 43(29): 3967-3970.
- [6] 王晓蕾,孙艺丹,王锐利,等.蒿甲醚在不同介质中的平衡溶解度及表观油水分配系数的测定[J]. *药物评价研究*, 2013, 36(2): 114-118.
- [7] 杨光.靶向熊果酸脂质体的制备及其体外靶向性研究[J]. *中草药*, 2018, 49(17): 4045-4050.
- [8] 罗玉琴,杨伟俊,阿吉艾克拜尔·艾萨.毛茛菪总倍半萜磁性纳米脂质体在小鼠体内组织分布和靶向效果[J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(1): 5-10.
- [9] 邹蔓姝,钟思雨,周莉莉,等.斑蝥素半乳糖化脂质体制备工艺研究[J]. *中草药*, 2018, 49(12): 2809-2816.
- [10] 李秀英,曾凡,赵曜,等.脂质体药物递送系统的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(16): 1904-1917.
- [11] 秦越,王理想,郭梦斐,等.雷公藤红素/丹参酮 II_A 磺酸钠共传递脂质体的制备、表征及协同抗乳腺癌研究[J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5271-5279.
- [12] 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.
- [13] Sun M G, Shi J F, Li X Y, *et al*. Targeting epirubicin plus quinacrine liposomes modified with DSPE-PEG₂₀₀₀-C(RGDfK) conjugate for eliminating invasive breast cancer [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2015, 11(8): 1339-1353.
- [14] 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.
- [15] 中国药典[S]. 二部. 2015.
- [16] Li X Y, Zhao Y, Sun M G, *et al*. Multifunctional liposomes loaded with paclitaxel and artemether for treatment of invasive brain glioma [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(21): 5591-5604.
- [17] Xiao Y, Cheng L, Xie H J, *et al*. Vinorelbine cationic liposomes modified with wheat germ agglutinin for inhibiting tumor metastasis in treatment of brain glioma [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(Sup3): S524-S537.
- [18] 赵凯燕,张丹参,苏晓梅,等.蛇床子素长循环脂质体

- 的制备与表征 [J]. 应用化工, 2018, 47(4): 754-757.
- [19] Ma X, Zhou J, Zhang C X, *et al.* Modulation of drug-resistant membrane and apoptosis proteins of breast cancer stem cells by targeting berberine liposomes [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(18): 4452-4465.
- [20] Zhang Z, Tan S, Feng S S. Vitamin E TPGS as a molecular biomaterial for drug delivery [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(19): 4889-4906.
- [21] Zhou J, Zhao W Y, Ma X, *et al.* The anticancer efficacy of paclitaxel liposomes modified with mitochondrial targeting conjugate in resistant lung cancer [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(14): 3626-3638.
- [22] Xiang B, Cao D Y. Preparation of drug liposomes by thin-film hydration and homogenization [A] // Lu W L, Qi X R. *Liposome-Based Drug Delivery Systems* [M]. Berlin: Springer, 2018.
- [23] Zhang L. Preparation and characterization of drug liposomes by nigericin ionophore [A] // Lu W L, Qi X R. *Liposome-Based Drug Delivery Systems* [M]. Berlin: Springer, 2018.
- [24] Li X Y. Preparation of multifunctional paclitaxel liposomes for treatment of brain glioma [A] // Lu W L, Qi X R. *Liposome-Based Drug Delivery Systems* [M]. Berlin: Springer, 2018.