

TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体的制备及质量评价

宋婷婷¹, 蔡荣珊¹, 王宏¹, 刘月¹, 伍振峰², 杨明², 徐应淑^{1*}, 熊永爱^{1*}

1. 遵义医科大学药学院, 贵州 遵义 563000

2. 江西中医药大学 中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 制备聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (*D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS) 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体, 并对其进行质量评价。方法 采用薄膜分散法制备 TPGS 包衣脂质体, 在单因素实验基础上, 通过 Box-Behnken 响应面分析法对处方进行优化, 采用超滤离心法测定药物包封率, 透射电镜 (TEM) 观察脂质体微观形态, 激光粒度仪测定脂质体的粒径、多分散性和 Zeta 电位, 并对其稳定性和体外释放情况进行考察。结果 所制备的 TPGS 包衣脂质体微观形态呈球形或类球形双层结构、外观带淡蓝色乳光, 粒径为 (95.79 ± 0.81) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.048 ± 0.007 , Zeta 电位为 (-38.60 ± 0.97) mV, 包封率为 79.89%, 载药量为 10.48%。体外释放研究表明, 与游离地榆皂苷 I 溶液相比, TPGS 包衣脂质体具有明显的缓释效果。结论 通过优化后的处方和制备工艺, 制备了外观均一稳定、包封率较高的 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体, 可用于进一步的研究。

关键词: 地榆皂苷 I; 脂质体; 聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (TPGS); 处方优化; 质量评价

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3522-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.007

Preparation and quality evaluation of TPGS-modified ziyuglycoside I long-circulating liposomes

SONG Ting-ting¹, CAI Rong-shan¹, WANG Hong¹, LIU Yue¹, WU Zhen-feng², YANG Ming², XU Ying-shu², XIONG Yong-ai¹

1. College of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

2. Key Laboratory of Chinese Medicine Preparations of Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To prepare *D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) modified ziyuglycoside I long-circulating liposomes and evaluate the quality. **Methods** TPGS coated liposomes were prepared by the film dispersion method. On the basis of the single factor experiment, the prescription was optimized by Box-Behnken response surface analysis. The drug entrapment efficiency (EE) was determined by ultrafiltration centrifugation, and the microscopic morphology of liposomes were observed under the transmission electron microscope (TEM). The particle size, polydispersity, and Zeta potential were determined by laser particle size analyzer, and investigating the stability and *in vitro* release of liposomes. **Results** The microscopic morphology of TPGS coated liposomes were spherical or quasi-spherical bilayer structure with light blue opalescence in appearance, the particle size was (95.79 ± 0.81) nm, polydispersity index was 0.048 ± 0.007 , Zeta potential value was (-38.60 ± 0.97) mV, the entrapment efficiency was 79.89%, and the drug load was 10.48%. The *in vitro* release studies showed that TPGS coated liposomes had an obvious slow-release effect compared with the free ziyuglycoside I solution. **Conclusion** TPGS-modified ziyuglycoside I long-circulating liposomes with uniform stability and high encapsulation efficiency were prepared through optimized prescription and formulation process, which can be used for further research.

Key words: ziyuglycoside I; liposomes; *D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS); formulation optimization; quality evaluation

收稿日期: 2021-02-04

基金项目: 贵州省科技厅基础研究计划 (黔科合基础 [2018] 1426); 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室开放基金 (TCM-202007)

作者简介: 宋婷婷 (1994—), 女, 在读硕士生, 从事药剂学研究。E-mail: 1578317768@qq.com

*通信作者: 熊永爱, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为天然产物免疫调控作用机制。E-mail: yongaixiong@szu.edu.cn

徐应淑, 教授, 硕士生导师, 研究方向为新药研发。E-mail: 527822816@qq.com

放化疗仍然是目前治疗癌症的主要手段,但其引起的骨髓抑制常导致患者造血功能下降、免疫力降低,阻碍放化疗的顺利进行^[1]。地榆皂苷 I 是地榆预防和治疗骨髓抑制的关键成分^[2-4],然而其溶解性差、体内半衰期短,限制了其药效的发挥^[5]。聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯 (*D*- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS) 具有增加疏水性药物溶解度和包封率、延长体内半衰期等功能^[6]。TPGS 修饰的脂质体还能避免被网状内皮系统吞噬,延长脂质体循环时间^[7]。本研究旨在制备 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体,优化操作工艺条件,并对其形貌、粒径、药物释放特性等进行表征,以评价其稳定性和适用性。

1 仪器与材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司; ME204E 电子天平,梅特勒-托利多仪器上海有限公司; 90Plus PALS 激光粒度仪,美国布鲁克海文仪器公司; TL-650Y 超声波细胞破碎仪,江苏天翎仪器有限公司; RE-52AA 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂; JEM-1200EX 透射电镜,日本电子株式会社; TG18 微量高速离心机,长沙维尔康湘鹰离心机有限公司; SHZ-82A 数显恒温振荡器,金坛市朗博仪器制造有限公司; 超滤离心管,美国 Millipore 公司,截留相对分子质量为 10 000; 透析袋,截留相对分子质量为 8000~14 000,北京索莱宝科技有限公司。

地榆皂苷 I, 实验室自制, 质量分数 91.76%; 地榆皂苷 I 对照品, 批号 MUST-17022502, 质量分数 99.47%, 成都曼思特生物科技有限公司; 大豆磷脂 S100, 德国 Lipoid 公司; 聚乙二醇 1000 维生素 E 琥珀酸酯、*DL*- α -生育酚, 上海阿拉丁试剂有限公司; 胆固醇, 上海阿达玛斯试剂有限公司; 甲醇、乙腈, HPLC 级; 纯化水; 氯仿、聚山梨酯 80 等均均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 地榆皂苷 I 分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 采用 HPLC 法测定地榆皂苷 I 含量, Unitary C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (35:65); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 203 nm; 进样量 10 μ L, 采用外标法进行含量测定。

2.1.2 专属性考察 精密称定地榆皂苷 I 对照品 12.5 mg 置于 25 mL 量瓶中, 加入适量甲醇超声溶

解并稀释至刻度, 配制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品储备液。精密量取适量地榆皂苷 I 对照品储备液, 加甲醇稀释至质量浓度为 0.25 mg/mL, 即得地榆皂苷 I 对照品溶液。取 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体混悬液 0.5 mL, 加适量甲醇破乳, 超声得到澄清透明溶液, 表明已经破乳完全, 经 0.22 μ m 滤膜滤过, 即得供试品溶液。取空白脂质体, 同法制备阴性对照溶液。以阴性对照溶液作为空白对照, 分别对对照品溶液及供试品溶液按照“2.1.1”项色谱条件进样分析, 记录色谱图 (图 1)。结果表明, 溶剂和辅料对地榆皂苷 I 测定无干扰, 对照品溶液与供试品溶液的峰形良好, 出峰时间一致, 表明该测定方法专属性良好。

2.1.3 线性关系考察 分别精密量取适量地榆皂苷 I 对照品储备液, 加甲醇稀释成质量浓度为 5.0、10.0、25.0、50.0、75.0、100.0、250.0 μ g/mL 的溶液。按“2.1.1”项色谱条件进样。以峰面积 (*Y*)

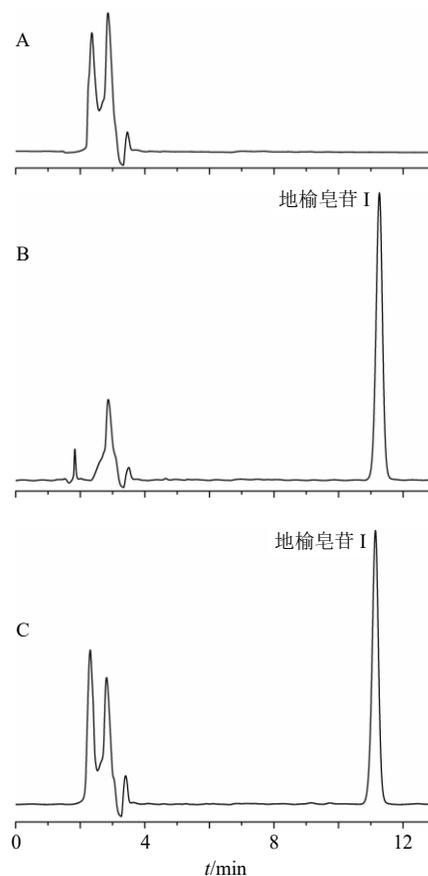


图 1 阴性对照 (A)、地榆皂苷 I 对照品 (B) 和地榆皂苷 I 长循环脂质体供试品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC spectrum of negative samples (A), ziyuglycoside I reference substances (B) and ziyuglycoside I long-circulating liposomes sample (C)

对地榆皂苷 I 质量浓度 (X) 进行线性回归, 标准曲线为 $Y=1.329 2 X+2.622 8$, $r=0.999 8$ 。结果表明, 地榆皂苷 I 在质量浓度 5.0~250.0 $\mu\text{g/mL}$ 呈良好的线性关系。

2.1.4 精密度考察 精密量取适量的地榆皂苷 I 对照品储备液, 加适量甲醇配制低、中、高 (5、50、250 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度的对照品溶液。按“2.1.1”项色谱条件, 每日各进样 5 次, 连续测定 5 d, 考察日内、日间精密度。结果测得低、中、高 3 个质量浓度对照品溶液的日内精密度分别为 0.83%、1.17%、0.92%, 日间精密度分别为 1.47%、1.13%、0.98%。

2.1.5 加样回收率考察 于 0.5 mL 空白脂质体混悬液中分别精密加入适量地榆皂苷 I 对照品溶液, 然后加甲醇破乳, 配制质量浓度为 5、50、250 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液, 各供试品溶液平行制备 3 份, 进样分析, 计算回收率。结果低、中、高 3 个质量浓度的平均回收率分别为 101.14%、98.72%、99.82%, RSD 分别为 1.34%、1.25%、0.58%。

2.2 地榆皂苷 I 的提取及含量测定

采用 3 步碱沉法^[8]提取地榆皂苷 I, 将纯化得到的地榆皂苷 I 按“2.1.1”项下 HPLC 色谱条件进样分析, 测定其含量。结果提取得到的地榆皂苷 I 质量分数为 91.76%。

2.3 地榆皂苷 I 脂质体的制备

采用薄膜分散法^[9]制备包载地榆皂苷 I 的普通脂质体和 TPGS 包衣脂质体。将处方量的地榆皂苷 I、大豆磷脂、胆固醇和维生素 E (含或不含 TPGS) 溶解在氯仿-甲醇 (2:1) 混合溶剂中, 置于干燥茄形瓶中, 超声溶解以获得澄清溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中减压旋蒸以完全除去有机溶剂, 在瓶壁上形成均匀透明的脂质薄膜, 然后加入 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 5 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 常压水合 2 h, 充分振摇至水合完全, 经探头超声处理, 以 35% 功率 (总功率为 650 W) 超声 2 min (超声 3 s, 间隔 3 s, 温度过高时可用冰浴降温), 最终得到带淡蓝色乳光的脂质体, 储存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

2.4 超滤离心法测定包封率

2.4.1 超滤膜吸附回收率的测定 配制质量浓度分别为 166.7、81.7、37.7 $\mu\text{g/mL}$ 的地榆皂苷 I 溶液, 从 3 种不同质量浓度溶液中各取 400 μL 至超滤离心管中, 7 000 $\times g$ 离心 20 min, 收集滤液, 不更换超滤单元, 再分别同法超滤 3 次。将超滤前后的药液

按“2.1.1”项色谱条件进样分析, 计算超滤膜吸附回收率。由结果 (表 1) 可知, 在各个质量浓度下第 2 份滤液的回收率符合要求, 因此, 可选择饱和 2 次后的超滤膜分离脂质体与游离药物。

表 1 超滤膜吸附回收率的测定

Table 1 Determination of adsorption recovery of ultrafiltration membrane

超滤前药物质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率/%			
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次
166.7	83.9	96.2	96.8	97.7
81.7	65.0	100.8	101.3	100.8
37.7	40.8	97.2	99.8	101.5

2.4.2 包封率和载药量的测定 取过 0.22 μm 滤膜的脂质体混悬液 200 μL 至超滤离心管中, 7 000 $\times g$ 离心 20 min, 将超滤液加甲醇稀释至 1 mL, 按“2.1.1”项色谱条件进样分析, 计算游离药物含量 (m_2)。同时取未经超滤的地榆皂苷 I 脂质体混悬液, 按“2.1.2”项下操作破乳, 测定药物含量, 计为总药量 (m_1)。脂质体中包载药物和投入脂质的总量为 m_3 , 按公式计算药物包封率和载药量。

$$\text{包封率}=(m_1-m_2)/m_1$$

$$\text{载药量}=(m_1-m_2)/m_3$$

2.5 地榆皂苷 I 长循环脂质体处方优化

2.5.1 单因素实验 影响地榆皂苷 I 长循环脂质体制备过程的因素很多, 本研究通过单因素实验初步考察了大豆磷脂与胆固醇质量比、TPGS 物质的量百分比、药物与大豆磷脂质量比和超声条件 (超声功率与时间) 对地榆皂苷 I 长循环脂质体粒径和包封率的影响。

(1) 大豆磷脂与胆固醇质量比对地榆皂苷 I 长循环脂质体粒径和包封率的影响: 固定处方中大豆磷脂 S100 为 30 mg, TPGS 物质的量百分比为 6%, 药物与大豆磷脂质量比为 1:4, 30% 超声功率, 超声 2 min。精密称取处方量的成膜材料, 按“2.3”项下地榆皂苷 I 脂质体的制备方法制备脂质体, 考察大豆磷脂与胆固醇质量比 (6:1、4:1、3:1、2:1) 对脂质体粒径和包封率的影响。结果 (表 2) 表明, 当大豆磷脂与胆固醇质量比为 4:1 时, 包封率较高, 粒径最小。胆固醇的加入可以提高脂质体的稳定性, 减少泡囊内包封药物的泄露, 但过量的加入会使膜的形成变得困难。最终选择大豆磷脂与胆固醇质量比为 4:1 进行后续的单因素实验。

表2 大豆磷脂与胆固醇质量比对地榆皂苷 I 长循环脂质体粒径和包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of mass ratio of soybean phospholipid to cholesterol on particle size and encapsulation efficiency of ziyuglycoside I long-circulating liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

大豆磷脂与胆固醇质量比	包封率/%	粒径/nm
15 : 1	73.19 ± 0.48	92.78 ± 0.59
6 : 1	69.89 ± 1.09	94.71 ± 0.65
4 : 1	76.25 ± 0.49	93.40 ± 0.11
3 : 1	69.48 ± 1.05	100.21 ± 1.01
2 : 1	68.21 ± 0.84	106.31 ± 0.88

(2) TPGS 物质的量百分比对地榆皂苷 I 长循环脂质体粒径和包封率的影响: 固定处方中其他辅料的用量和制备条件, 精密称取处方量的成膜材料, 按“2.3”项下地榆皂苷 I 脂质体的制备方法制备脂质体, 考察 TPGS 物质的量百分比 (3%、6%、10%) 对脂质体粒径和包封率的影响。结果 (表 3) 表明, 当 TPGS 物质的量百分比为 10% 时, 包封率较高, 粒径较小。可能是因为 TPGS 修饰脂质体后, 会在脂质体表面形成一层水化层, 减小脂质体表面张力, 阻止了脂质体的聚集和融合, 使粒子更稳定, 从而提高药物包封率, 减小脂质体的粒径^[10]。因此, 选择 TPGS 物质的量百分比为 10% 进行单因素实验。

表3 TPGS 物质的量百分比对地榆皂苷 I 长循环脂质体粒径和包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of molar percentage of TPGS on particle size and encapsulation efficiency of ziyuglycoside I long-circulating liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

TPGS 物质的量百分比/%	包封率/%	粒径/nm
3	70.35 ± 1.18	103.20 ± 1.10
6	69.47 ± 1.35	100.60 ± 0.58
10	76.25 ± 1.44	93.40 ± 0.11

(3) 药物与大豆磷脂质量比对地榆皂苷 I 长循环脂质体粒径和包封率的影响: 固定处方中其他辅料的用量和制备条件, 精密称取处方量的成膜材料, 按“2.3”项下地榆皂苷 I 脂质体的制备方法制备脂质体, 考察药物与大豆磷脂质量比 (1 : 20、1 : 6、1 : 4、1 : 3、1 : 2) 对脂质体粒径和包封率的影响。由表 4 可知, 药物与大豆磷脂质量比对脂质体的粒径和包封率的影响较大。当药物与大豆磷脂质量比从 1 : 20 变为 1 : 2 时, 包封率降低, 可通过包封地榆皂苷 I 的脂质体囊泡体积有限来解释。药物与大

表4 药物与大豆磷脂质量比对地榆皂苷 I 长循环脂质体粒径和包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of mass ratio of drug to soybean phospholipid on particle size and encapsulation efficiency of ziyuglycoside I long-circulating liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物与大豆磷脂质量比	包封率/%	粒径/nm
1 : 20	90.88 ± 1.41	100.53 ± 0.38
1 : 6	76.80 ± 1.45	91.67 ± 0.48
1 : 4	76.25 ± 0.64	93.40 ± 0.11
1 : 3	61.67 ± 1.08	107.92 ± 0.24
1 : 2	56.30 ± 1.88	126.69 ± 0.64

豆磷脂质量比的增加导致平均粒径的增加, 可能是因为药物浓度越大, 超声分散的机械力越大。当药物与大豆磷脂质量比为 1 : 20 时, 包封率较高, 但载药量较低, 考虑到后续药动学以及药效学实验, 选择 1 : 6 ~ 1 : 2 进一步筛选, 选择药物与大豆磷脂质量比为 1 : 4 进行单因素实验。

(4) 超声条件对地榆皂苷 I 长循环脂质体粒径和包封率的影响: 固定处方中其他辅料的用量和制备条件, 精密称取处方量的成膜材料, 按“2.3”项下地榆皂苷 I 脂质体的制备方法制备脂质体, 考察超声条件 (30% 功率、2 min, 35% 功率、2 min, 30% 功率、3 min, 35% 功率、3 min) 对脂质体粒径和包封率的影响。由结果 (表 5) 可知, 当 30% 超声功率 (总功率为 650 W), 超声时间从 2 min 增加到 3 min 时, 平均粒径减小, 包封率变化不大。当 35% 超声功率、超声时间为 2 min 时, 脂质体的包封率较高, 粒径较小。最终结果表明, 超声条件对脂质体的粒径和包封率影响不大, 选择超声条件为超声功率 35%, 超声 2 min 制备脂质体。

2.5.2 Box-Behnken 响应面分析 在单因素实验的基础上, 确定了显著变量及其优选水平, 因素水平

表5 超声条件对地榆皂苷 I 长循环脂质体粒径和包封率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effects of ultrasonic conditions on particle size and encapsulation efficiency of ziyuglycoside I long-circulating liposomes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

超声功率和时间 (总功率为 650 W)	包封率/%	粒径/nm
30%, 2 min	71.85 ± 0.87	98.32 ± 0.50
30%, 3 min	73.10 ± 1.27	94.76 ± 1.18
35%, 2 min	76.25 ± 1.84	93.40 ± 0.11
35%, 3 min	71.62 ± 1.13	94.88 ± 0.21

见表 6。通过 Box-Behnken 响应面分析法对大豆磷脂与胆固醇质量比 (X_1)、药物与大豆磷脂质量比 (X_2)、TPGS 物质的量百分比 (X_3) 3 个自变量进行处方优化, 以地榆皂苷 I 长循环脂质体包封率 (Y) 为响应值进行考察。实验设计和结果见表 6。

结果通过 Design expert 10.04 软件进行数据拟合分析。回归方程为 $Y=77.23-1.03 X_1-11.78 X_2+4.58 X_3-3.61 X_1X_2+3.39 X_1X_3+1.12 X_2X_3-7.37 X_1^2-11.16 X_2^2-3.93 X_3^2$, $R^2=0.983 0$ 。 P 值表示因

变量和自变量之间线性关系的显著性, 回归方程的方差分析结果见表 7。由显著性结果可知, X_3 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_3^2 对包封率影响显著, X_2 、 X_2^2 对包封率的影响非常显著。自变量及其相互作用对包封率的影响见图 2 所示的响应面曲线。模型的概率 $P<0.000 1$, 表明模型极显著, 方程的响应值与自变量间线性关系显著, 且方程的失拟项 F 值为 2.86 ($P>0.05$) 不显著, 说明该回归方程在整个回归区域的拟合情况良好, 回归模型具有良好的预测性。

表 6 Box-Behnken 实验设计和结果

Table 6 Box-Behnken experiment design and results

实验号	X_1	X_2	$X_3/\%$	$Y/\%$	实验号	X_1	X_2	$X_3/\%$	$Y/\%$
1	4 : 1 (0)	1 : 4 (0)	6.5 (0)	78.41	10	2 : 1 (-1)	1 : 6 (-1)	6.5 (0)	69.76
2	6 : 1 (+1)	1 : 2 (+1)	6.5 (0)	40.42	11	2 : 1 (-1)	1 : 4 (0)	10.0 (+1)	67.32
3	6 : 1 (+1)	1 : 6 (-1)	6.5 (0)	71.66	12	2 : 1 (-1)	1 : 4 (0)	3.0 (-1)	63.33
4	4 : 1 (0)	1 : 4 (0)	6.5 (0)	77.13	13	4 : 1 (0)	1 : 4 (0)	6.5 (0)	75.63
5	4 : 1 (0)	1 : 4 (0)	6.5 (0)	75.43	14	4 : 1 (0)	1 : 4 (0)	6.5 (0)	79.55
6	4 : 1 (0)	1 : 6 (-1)	3.0 (-1)	71.04	15	6 : 1 (+1)	1 : 4 (0)	3.0 (-1)	57.75
7	4 : 1 (0)	1 : 6 (-1)	10.0 (+1)	76.33	16	2 : 1 (-1)	1 : 2 (+1)	6.5 (0)	52.96
8	4 : 1 (0)	1 : 2 (+1)	10.0 (+1)	55.47	17	4 : 1 (0)	1 : 2 (+1)	3.0 (-1)	45.69
9	6 : 1 (+1)	1 : 4 (0)	10.0 (+1)	75.31					

表 7 包封率回归方程的方差分析

Table 7 Variance analysis of entrapment efficiency regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2 285.89	9	253.99	44.96	<0.000 1	X_1^2	228.55	1	228.55	40.46	0.000 4
X_1	8.47	1	8.47	1.50	0.260 4	X_2^2	524.64	1	524.64	92.88	<0.000 1
X_2	1 110.38	1	1 110.38	196.58	<0.000 1	X_3^2	65.20	1	65.20	11.54	0.011 5
X_3	167.63	1	167.63	29.68	0.001 0	残差	39.54	7	5.65		
X_1X_2	52.13	1	52.13	9.23	0.018 9	失拟项	26.96	3	8.99	2.86	0.168 4
X_1X_3	46.04	1	46.04	8.15	0.024 5	纯误差	12.58	4	3.15		
X_2X_3	5.04	1	5.04	0.89	0.376 3	总离差	2 325.43	16			

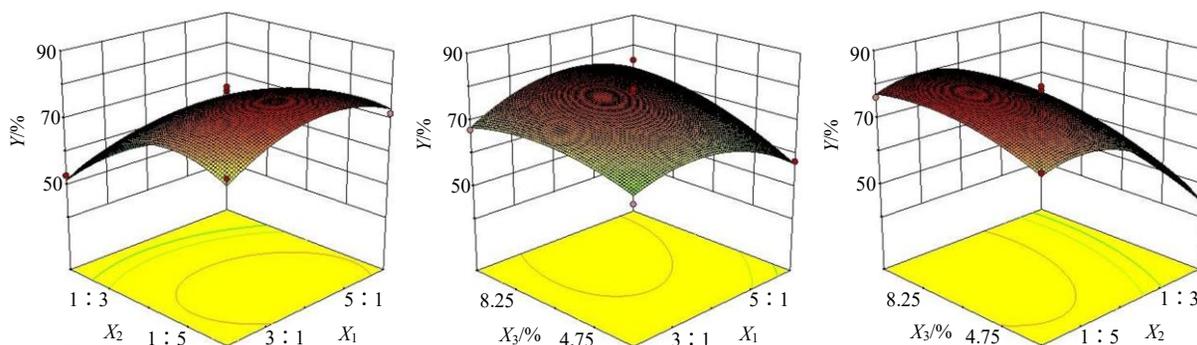


图 2 以包封率为指标的三维响应面曲线图

Fig. 2 Three-dimensional response surface curve with encapsulation efficiency as an indicator

根据分析结果得出地榆皂苷 I 长循环脂质体的最佳处方条件为大豆磷脂与胆固醇的质量比为 4.6 : 1; 药物与大豆磷脂质量比为 1 : 5; TPGS 物质的量百分比为 7.8%。根据最优条件进行处方验证, 测得平均包封率为 79.89% ($n=3$), 接近理论包封率 80.59% ($n=3$), 平均载药量为 10.48% ($n=3$)。

2.6 表征

2.6.1 微观形态 取少量 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体混悬液, 用蒸馏水稀释至一定浓度, 并将 1 滴脂质体样品滴至铜网表面, 真空干燥, 用 1% 磷钨酸溶液负染 30 s, 最后用透射电镜观察脂质体的微观形态。结果显示, TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体呈球形或类球形双层结构, 粒子间无聚集现象, 分布较均匀 (图 3)。

2.6.2 粒径及 Zeta 电位测定 取脂质体样品, 用去离子水稀释 10 倍至计数率约为 500 kcps, 采用激光粒度仪测定脂质体粒径、多分散性和 Zeta 电位。Zeta 电位是衡量电荷量的重要指标, 通常较高的 Zeta 电位 (绝对值大于 30 mV), 表示系统更稳定^[11]。结果测得 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体的粒径为 (95.79 ± 0.81) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.048 ± 0.007 , 说明脂质体的粒径分布比较均匀, 可能是 TPGS 所含有的 PEG 链在脂质体表面形成了亲水性保护层, 使脂质体更稳定, 均一性提高^[12] (图 4)。Zeta 电位为 (-38.60 ± 0.97) mV, 说明 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体表面荷负电, 带电

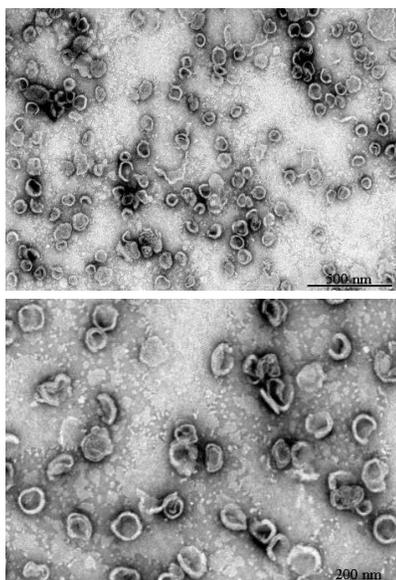


图 3 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体透射电镜图
Fig. 3 Micromorphology of TPGS modified ziyuglycoside I long-circulating liposomes

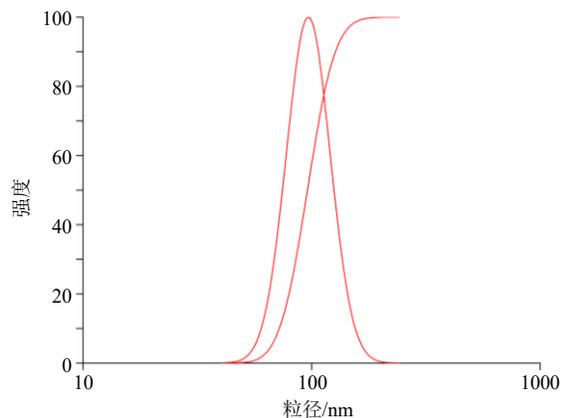


图 4 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体粒径分布
Fig. 4 Particle size distribution of TPGS modified ziyuglycoside I long-circulating liposomes

脂质体可以减少聚集和融合, 增加稳定性 (图 5)。脂质体的理化参数见表 8。

2.6.3 稳定性考察 将测定包封率后的脂质体储存在 4 °C 冰箱中, 分别于储存的第 10、20、30 天取出, 观察外观, 并测定脂质体的包封率、粒径和 Zeta 电位, 考察样品的稳定性。结果表明, TPGS 修饰的地榆皂苷 I 脂质体在 4 °C 环境中放置 30 d, 脂质体外观性状无明显变化, 溶液仍呈均一、稳定状态。平均粒径、PDI、Zeta 电位和药物包封率结果见表 9, 变化幅度较小, 表明该脂质体样品在低温 (4 °C)

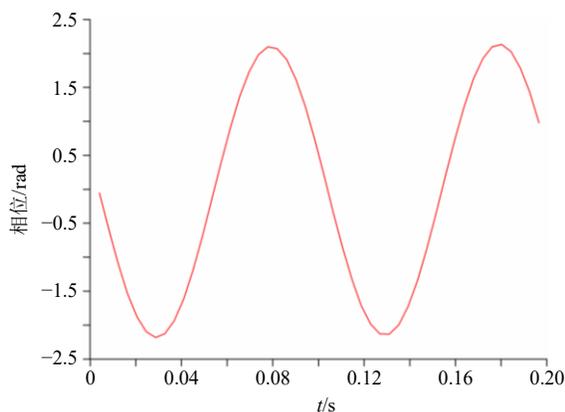


图 5 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体电位
Fig. 5 Potential of TPGS modified ziyuglycoside I long-circulating liposomes

表 8 脂质体理化参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Physical and chemical parameters of liposomes ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
空白脂质体	93.87 ± 0.32	0.201 ± 0.012	-37.57 ± 0.50
TPGS 修饰脂质体	95.79 ± 0.81	0.048 ± 0.007	-38.60 ± 0.97
普通脂质体	128.84 ± 0.98	0.181 ± 0.010	-26.54 ± 0.38

表9 脂质体稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 9 Results of liposome stability ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV	包封率/%
0	95.35±0.38	0.168±0.011	-38.17±0.63	77.85±0.77
10	95.92±0.39	0.191±0.007	-36.84±0.61	76.30±0.08
20	97.65±0.56	0.192±0.006	-37.42±0.17	74.49±0.47
30	98.08±0.94	0.196±0.003	-36.30±0.90	73.98±0.85

条件下放置 30 d 稳定性良好。

2.6.4 体外释放度 采用透析袋扩散法^[13]考察地榆皂苷 I 脂质体的体外释放情况。精密移取质量浓度为 1.5 mg/mL 的地榆皂苷 I 脂质体、TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体、地榆皂苷 I 甲醇溶液各 1 mL, 分别装入经预处理的透析袋中。将透析袋密封并浸入 30 mL 含 0.5 mg/mL 聚山梨酯 80 的 PBS 溶液中 (pH 7.4), 温度为 (37.0±0.5) °C, 以 100 r/min 恒温振荡。分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 取出 1 mL 释放介质, 过 0.22 μm 滤膜于进样小瓶中, 同时补充等温等体积的释放介质。样品中药物质量浓度按上述 HPLC 法测定, 并按公式计算不同时间点的药物累积释放率 (Q), 绘制累积释放曲线。

$$Q = (C_n V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / m$$

V_0 为释放介质总体积 (mL), C_i 和 C_n 为第 i 、 n 时间点取样时测得的药物质量浓度 (mg/mL), V 为取样体积 (mL), m 表示样品中地榆皂苷 I 的总质量

图 6 显示了游离地榆皂苷 I 溶液、地榆皂苷 I 脂质体和 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体在

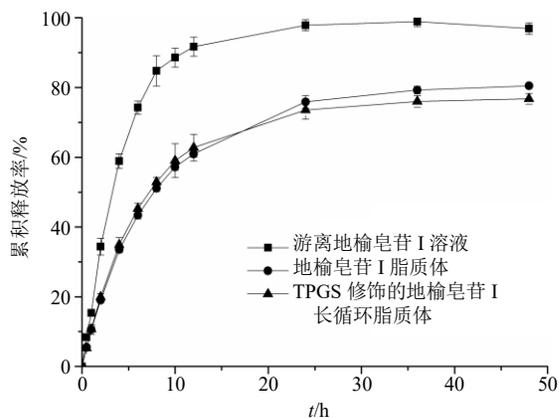


图 6 游离地榆皂苷 I 溶液、地榆皂苷 I 脂质体和 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体的体外释放曲线

Fig. 6 *In vitro* release curve of free ziyuglycoside I, ziyuglycoside I liposomes and TPGS modified ziyuglycoside I long-circulating liposomes

含 0.5% 聚山梨酯 80 的 PBS 溶液中的累积释放率。相比于游离地榆皂苷 I 溶液, 2 种地榆皂苷 I 脂质体均表现出一定的缓释特性。24 h 后, 地榆皂苷 I 脂质体和 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 脂质体的累积释放率分别为 73.53%、75.89%, 达到最大累积释放量, 之后释放趋于平缓。而游离地榆皂苷 I 溶液在 12 h 后的累积释放率达到 90% 以上。两种脂质体显示出控制释放超过 1 d, 没有检测到药物的突释现象, 这表明药物不位于脂质体表面, 而是位于其核心。据报道, TPGS 影响纳米粒子药物释放系统的释放行为, 药物的持续释放可归因于脂质体载体材料的延迟扩散。

3 讨论

本实验采用薄膜分散法制备 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体, 操作简便, 易获得形貌和粒径较好的样品。在薄膜分散法中, 磷脂的水化是很关键的步骤, 在分散过程中, 干燥的磷脂膜之间发生了有规律的重排。加入水相后, 有序的磷脂层从壁上脱离从而卷曲形成脂质体^[14], 其中水化温度和水化时间的控制对样品能否成功制备至关重要, 水化温度必须高于磷脂的相转变温度。经过预实验, 最终确定的水化温度为 37 °C, 水化时间为 2 h, 结果表明该条件下磷脂水化很充分, 所制备的样品粒度均匀, 久置无沉淀产生。最终制得的 TPGS 修饰的地榆皂苷 I 长循环脂质体稳定性良好, 具有较高的包封率和载药量, 同时也展现出良好的缓释效果。

地榆皂苷 I 可溶于甲醇、甲醇-氯仿混合溶剂、DMSO 等有机溶剂, 而不溶于氯仿。而薄膜分散法通常选择氯仿或氯仿-甲醇混合溶剂溶解膜材, 因此本实验选择甲醇-氯仿混合溶剂, 成膜性较好。实验中发现, 有机溶剂的残留会影响磷脂的聚集状态, 如体系中残留大量的氯仿, 获得的产品中有可能存在乳滴, 从而使得制备的脂质体不稳定, 出现分层现象, 因此须严格控制有机溶剂的残留量。磷脂双分子层构成脂质体的基本骨架, 不饱和磷脂在脂质体制备和储存过程中易被氧化, 体内循环中会导致药物快速泄露。查阅相关文献, 得知可在制备过程中添加脂溶性抗氧化剂维生素 E, 实验结果也表明, 所制备的脂质体稳定性较好。

实验中测得地榆皂苷 I 在水中的溶解度为 0.25 mg/mL, 极微溶解, 所以游离地榆皂苷 I 在脂质体制剂的外水介质中以 2 种形式存在: 即地榆皂苷 I 的游离未溶解形式和游离溶解形式, 且游离溶解形

式的地榆皂苷 I 不能忽略。包封率是脂质体处方筛选及质量评价的重要指标,文献报道^[15]测定包封率的方法有凝胶过滤法、超速离心法、透析法等,但这几种方法仪器要求条件高、繁琐,本实验使用超滤离心法测定包封率,方便、快速,且重现性好,更适于生产中进行质量控制。在包封率的测定中,通过 0.22 μm 微孔滤膜滤过,将游离的未溶解形式的地榆皂苷 I 从脂质体混悬液中除去。将滤液(由脂质体包封的地榆皂苷 I 和游离的溶解形式地榆皂苷 I 组成)置于超滤离心管中,离心进行分离。在离心的过程中,时间过长会产热,而温度升高会影响脂质体稳定性,因此,最终选择的离心时间为 20 min。结果得到的超滤液均为澄清状态,说明分离完全,超滤离心法可用于地榆皂苷 I 脂质体包封率的测定。在体外释放实验中,为解决地榆皂苷 I 在 PBS 介质中溶解度低的问题,通过在释放介质中加入 0.5%聚山梨酯 80 满足了漏槽条件。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang L, Li H, Shen X, et al. Elucidation of the molecular mechanism of *Sanguisorba officinalis* L. against leukopenia based on network pharmacology [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110934.
- [2] 梁金秋, 王海荣, 熊金河. 地榆升白片治疗白细胞减少症 240 例疗效观察 [J]. *华西医学*, 2008, 23(4): 858.
- [3] 张学文, 韦玮, 程悦, 等. 地榆药材中总皂苷及地榆皂苷-I 的含量测定 [J]. *中药新药与临床药理*, 2013, 24(2): 186-191.
- [4] 熊永爱, 邹娅, 张德华, 等. 地榆皂苷 I 基于自噬升高白细胞作用研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3350-3356.
- [5] 邹娅, 徐应淑, 张德华, 等. 地榆皂苷自乳化药物传递系统的制备及质量评价 [J]. *中草药*, 2018, 49(6): 1317-1323.
- [6] 庞鑫, 翟光喜. 维生素 E 聚乙二醇 1000 琥珀酸酯在药物制剂中的应用 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2014, 33(4): 247-251.
- [7] 万胜利, 何丹, 钟萌, 等. 聚乙二醇维生素 E 琥珀酸酯修饰的姜黄素脂质体的药代动力学及在体肠吸收 [J]. *中成药*, 2015, 37(7): 1452-1456.
- [8] 代良敏, 熊永爱, 杨桂燕, 等. 地榆皂苷类成分对环磷酸胺致小鼠骨髓抑制的保护作用研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2016, 28(6): 852-859.
- [9] Vijayakumar M R, Vajanthri K Y, Balavigneswaran C K, et al. Pharmacokinetics, biodistribution, *in vitro* cytotoxicity and biocompatibility of vitamin E TPGS coated *trans* resveratrol liposomes [J]. *Colloid Surface B*, 2016, 145: 479-491.
- [10] 胡诚, 梁琨, 安靓, 等. TPGS 修饰青蒿琥酯脂质体的制备及其体外抗肿瘤活性 [J]. *中成药*, 2017, 39(3): 492-498.
- [11] Lu Q, Li D C, Jiang J G. Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties [J]. *J Agr Food Chem*, 2011, 59(24): 13004-13011.
- [12] Wang T, Yin X, Lu Y, et al. Formulation, antileukemia mechanism, pharmacokinetics, and biodistribution of a novel liposomal emodin [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7: 2325-2337.
- [13] 苏玉娇, 周双, 孙文璐, 等. 青蒿琥酯脂质体的制备及抗肿瘤作用研究 [J]. *中国药理学杂志: 网络版*, 2019, 17(5): 169-177.
- [14] 邓英杰. 脂质体技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 35.
- [15] 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.

[责任编辑 郑礼胜]