

薄膜超声法制备共载人参皂苷 Rg₃ 和五味子乙素脂质体及其质量评价

石珂¹, 周泓妍¹, 张涵¹, 王海东¹, 金昊艺¹, 孟令鲲^{1*}, 李光哲^{1*}, 严铭铭^{1,2}

1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117

2. 吉林省中药保健食品科技创新中心, 吉林 长春 130117

摘要: **目的** 制备共载人参皂苷 Rg₃ 和五味子乙素脂质体 (co-loaded ginsenoside Rg₃ and schisandrin B liposomes, RS-LPs), 并对其进行质量评价。**方法** 采用薄膜超声法制备共载脂质体 RS-LPs, 以包封率为指标, 通过单因素考察和正交试验设计优化共载脂质体处方工艺; 并对其表面特征、粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位、体外释放度及稳定性进行考察。**结果** 优选 RS-LPs 的制备处方工艺为胆固醇-磷脂质量比 1:5、成膜温度 45 °C、水化剂体积 10 mL、超声时间 15 min。制得的 RS-LPs 的平均包封率为 (93.31±2.45) %, 平均粒径为 (121.4±2.6) nm, PDI 为 0.261±0.024, ζ 电位为 (-46.8±1.1) mV。体外释放研究表明, RS-LPs 在 4 h 释放了 60%, 达到释放平衡; RS-LPs 在 12 h 时的累积释放率为 80%, 24 h 内持续缓慢释放。稳定性实验结果表明, RS-LPs 在 30 d 内粒径、PDI、 ζ 电位无明显变化。并通过初步体外细胞实验对所制备的脂质体的抗肿瘤活性进行测定, 表明所制备的脂质体对 HepG2 细胞拥有明显的抑制作用。**结论** 优选的 RS-LPs 制备处方工艺重现性好、包封率高、粒径小, 具有明显的缓释效果和良好的抗肿瘤活性, 且质量稳定, 为人参-五味子药对分子配伍药的应用提供了参考。

关键词: 人参皂苷 Rg₃; 五味子乙素; 共载脂质体; 薄膜超声法; 分子配伍

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)21-7725-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.007

Preparation and quality evaluation of co-loaded ginsenoside Rg₃ and schisandrin B liposomes by thin-film ultrasonic method

SHI Ke¹, ZHOU Hongyan¹, ZHANG Han¹, WANG Haidong¹, JIN Haoyi¹, MENG Lingkun¹, LI Guangzhe¹, YAN Mingming^{1,2}

1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

2. Jinlin Provincial Science and Technology Innovation Center of Health Food of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective To prepare co-loaded ginsenoside Rg₃ and schisandrin B liposomes (RS-LPs) and evaluate their quality. **Methods** The co-loaded liposomes were prepared by thin film ultrasonic method. The formulation and process of co-loaded liposomes were optimized by single factor investigation and orthogonal experimental design with encapsulation efficiency as the index. The surface characteristics, particle size, polydispersity index (PDI), ζ potential, *in vitro* release and stability were investigated. **Results** The optimal preparation process of RS-LPs was as follows: the ratio of cholesterol to phospholipid was 1:5, the film forming temperature was 45 °C, the volume of hydration agent was 10 mL, and the ultrasonic time was 15 min. The average encapsulation efficiency of the prepared RS-LPs was (93.31±2.45)%, The average particle size was (121.4±2.6) nm, the PDI was 0.261±0.024, and the ζ potential was (-46.8±1.1) mV. *In vitro* release studies showed that RS-LPs released 60% at 4 h, reaching a release balance. The cumulative release rate of RS-LPs was 80% at 12 h, and sustained slow release within 24 h. The results of stability experiments showed that there was no significant change in particle size, PDI and ζ potential of RS-LPs within 30 d. The anti-tumor activity of the prepared liposomes was determined by preliminary *in vitro* cell experiments, indicating that the prepared liposomes had a significant

收稿日期: 2025-06-05

项目基金: 国家自然科学基金资助项目 (22301020); 吉林省现代农业产业技术体系项目 (JLARS-2025-040210); 吉林省科技发展计划项目 (YDZJ202401657ZYT)

作者简介: 石珂 (2001—), 女, 硕士, 研究方向为中药有效成分发现、生物转化及健康产品研发与开发。E-mail: 2879237097@qq.com

*通信作者: 孟令鲲 (1990—), 男, 博士, 讲师, 研究方向为中药化学、配位化学。E-mail: lingkunmeng90@163.com

李光哲 (1972—), 男, 博士, 教授, 研究方向为药物化学、中药化学及保健食品开发研究。E-mail: ligz@nenu.edu.cn

inhibitory effect on HepG2 cells. **Conclusion** The optimized RS-LPs preparation prescription process has good reproducibility, high encapsulation efficiency, small particle size, obvious sustained release effect and good anti-tumor activity, and the quality is stable, which provides a reference for the application of Renshen (*Ginseng Radix et Rhizoma*)-Wuweizi (*Schisandrae Chinensis Fructus*) drug pair molecular compatibility.

Key words: ginsenoside Rg₃; schisandrin B; co-loaded liposomes; thin film ultrasonic method; molecular compatibility

人参-五味子为临床常用药对,源于孙思邈《千金药方》中的生脉散^[1],人参为甘性药材,五味子为酸性药材,人参-五味子药对为典型的“酸甘化阴”配伍形式。二药相使为用,一补一收,使气虚得补,气散得敛,健脾理气。

现代研究发现,这种传统药对彼此中的小分子成分,也可相互配伍,并在分子层面表现为活性成分的协同作用,体现了“分子配伍理论”的现代科学内涵^[2]。“分子配伍药”是指根据分子水平的相互作用机制,合理组合不同药物分子,使它们在体内或体外产生协同、增强或互补的治疗效果,从而提高疗效、减少不良反应或克服耐药性的一种新型药物组合策略。近年来针对分子配伍的研究逐渐成为研究热点。李均等^[3]针对丹酚酸 B、C 分子药对配伍对大鼠肾间质纤维化的保护作用及机制进行了研究,发现其分子药对配伍可显著改善肾功能;王淑玲等^[4]阐述了分子配伍理论科学内涵及其在现代中药研发中的应用,其对复杂性、系统性疾病疗效明显,不良反应小;顾铜等^[5]对丹酚酸 A、C 分子药对配伍干预肾纤维化组织凋亡进行了研究,表明其分子药对配伍可一定程度保护大鼠肾小管功能,减轻肾间质纤维化程度。

但分子配伍后常常出现溶解度低、生物利用度低等问题。脂质体凭借其高度选择性被开发为新型药物递送载体,可以有效解决分子配伍药物的相关问题。脂质体(liposome)是一种人工制备的纳米或微米级囊泡载体,由磷脂双分子层构成,内部包裹水相核心。其结构和功能模仿天然细胞膜,是生物医学领域重要的药物递送系统。当前研究主要聚焦于脂质体提升生物利用度的分子机制及关键技术路径^[6-8]。

近年来,基于“分子配伍理论”的指导,选出合适的中药小分子进行配伍,并将其装载于脂质体的递送载体中已成为研究热点,研究发现,通过分子配伍理论的系统应用,可有效解决药对中协同小分子成分配伍时产生的技术瓶颈,例如溶解性差、体内代谢不稳定及生物利用度低等关键问题^[9-12]。

人参-五味子药对人参含有多重有效成分,其

中人参皂苷 Rg₃ (ginsenoside Rg₃, Rg₃) 为人参中的主要有效成分之一^[13],具有抗肿瘤、抗炎及免疫调节作用^[14-16],尤其在抑制肿瘤血管生成和转移中表现突出^[17];五味子乙素(schisandrin B, SB)是从五味子中提取的木脂素类成分^[18],以抗氧化、保肝及协同抗肿瘤效应著称^[19-21]。但由于 Rg₃ 的相对分子质量大、溶解度低以及细胞通透性差等问题,使其很难透过血脑屏障,从而限制了 Rg₃ 在治疗疾病中的应用,且 Rg₃ 与 SB 均为脂溶性成分,水溶性差,使其口服生物利用度低。因此,开发一种高效递送系统以改善 2 药溶解性和生物利用率,成为亟待解决的关键问题。因此,本研究以“分子配伍理论”为指导,构建搭载 Rg₃-SB 分子配伍药物的共载脂质体,并优化其制备工艺,对其粒径、包封率、体外释放及稳定性等特性进行质量评价,为解决中药小分子溶解度差、生物利用率低等问题提供新思路,为构建搭载中草药的共载脂质体提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,安捷伦科技有限公司;AB265-S 型万分之一分析天平,梅特勒托利多科技(中国)有限公司;SB-5200DT 型超声波清洗机、SCIENTZ-IIID 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;SHZ-D (III) 型循环水式多用真空泵、RE-2000B 型旋转蒸发仪,郑州华辰仪器有限公司;Zetasizer Nano ZEN 型马尔文激光粒度分析仪,英国马尔文公司;日立 S-3400N 透射电镜,日本 Hitachi 公司。

1.2 试药和试剂

对照品 Rg₃ (批号 B21759,质量分数 98.0%)、SB (批号 B21327,质量分数 98.0%) 及胆固醇 (批号 S23165,质量分数 99.0%)、大豆卵磷脂 (批号 S31726,质量分数 98.0%)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS),上海源叶生物科技有限公司;三氯甲烷,天津新通精细化工有限公司;纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司;甲醇、乙腈,分析纯,美国 Thermo Fisher Scientific;HepG2 细胞购于中国科学院细胞库,上海中国科学院。

2 方法与结果

2.1 Rg₃-SB 联用比例的筛选

基于《中国药典》2025 年版所载文献资料^[22], 筛选同时包含人参和五味子 2 味中药的复方制剂。通过系统检索, 收集相关方剂的组成、剂量等详细信息。在数据筛选过程中, 剔除剂量信息缺失、适应症不明确等不符合要求的方剂, 最终选取含有人参与五味子配伍应用的方剂进行分析。结果如表 1 所示, 结果表明在人参-五味子药对配伍比例中, 1:1 出现的频数最高, 占 34.78%。因此, 后续选择该比例制备共载脂质体。

表 1 《中国药典》2025 年版中人参-五味子药对配比频数统计

Table 1 Frequency statistics of Ginseng Radix et Rhizoma-Schisandrae Chinensis Fructus pairs in Chinese Pharmacopoeia 2025 edition

配伍比例	频数占比/%	配伍比例	频数占比/%
1:1	34.78	1:2	4.35
3:1	4.35	1:50	4.35
3:2	8.70	3:5	4.35
4:1	4.35	3:31	8.70
4:3	4.35	其他	21.72

2.2 共载 Rg₃ 和 SB 脂质体 (co-loaded Rg₃ and SB liposomes, RS-LPs) 制备方法考察

2.2.1 薄膜超声法 将大豆卵磷脂、胆固醇、Rg₃ 和 SB 按一定质量比溶解于氯仿和甲醇混合溶液中, 利用旋转蒸发器制得薄膜。用 PBS 溶液对薄膜进行水化, 然后使用探头超声波破碎仪对水化后的脂质体混悬液破碎。随后, 将样品挤出通过孔径为 0.45、0.22 μm 的聚碳酸酯膜, 以完成 RS-LPs 的制备。

2.2.2 乙醇注入法 取适量 Rg₃、SB、大豆卵磷脂溶于乙醇中 (油相), 用注射液将油相液体缓慢滴入水溶液中, 水溶液需要恒定的温度且滴入过程中不断搅拌水溶液以挥发除尽乙醇, 超声均匀, 即得脂质体。

2.2.3 包封率考察 取一定量的脂质体混悬液置于离心管中, 放入高速离心机中, 10 000 r/min, 离心半径是 15.7 cm 离心 10 min。离心后, 脂质体沉淀在离心管底部, 而游离药物存在于上清液中。将离心后的上清液小心转移至装有微孔滤膜的滤过装置中, 进行滤过。游离药物可通过滤膜, 而可能残留的少量脂质体或其他杂质被截留。收集滤液, 用于测定游离药物的含量。取沉淀部分, 加入适量的

溶剂进行, 使脂质体中的药物释放出来。然后将溶液转移至量瓶中, 用溶剂定容至一定体积, 摇匀。按照如下公式对其包封率进行测定。

$$\text{包封率} = 1 - \frac{\text{游离药物含量}}{\text{脂质体混悬液中药物总量}}$$

2.2.4 粒径考察 采用马尔文激光粒度分析仪对 RS-LPs 的粒径进行考察。将 RS-LPs 溶液放入石英比色皿中, 采用动态光散射法考察脂质体的粒径, 每个样品测定 3 次。

2.2.5 2 种制备方法比较 按如上方法检测 2 种方法制备的脂质体的包封率与粒径大小, 结果如表 2 所示, 结果表明, 与乙醇注入法相比, 薄膜超声法制备得到的脂质体包封率最高, 为 (87.98±3.97)%, 且粒径最小, 为 (129.10±6.56) nm; 且乙醇注入法中的乙醇难以挥发。因此, 后续选择薄膜超声法进一步优化其制备工艺。

表 2 薄膜超声法与乙醇注入法制备的脂质体的包封率及粒径 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Encapsulation rate and particle size of prepared liposomes by thin film ultrasonic method and ethanol injection method ($\bar{x} \pm s, n=3$)

制备方法	包封率/%	粒径/nm
薄膜超声法	87.98±3.97	129.10±6.56
乙醇注入法	68.17±3.53	141.50±7.16

2.3 HPLC 法测定 RS-LPs 包封率和载药量

2.3.1 对照品溶液的配制 精密称取 Rg₃、SB 对照品适量, 分别加入甲醇溶解定容, 得 2 种对照品各 0.1 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的配制 精密量取 RS-LPs 1 mL 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 超声处理 30 min 破乳, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得 RS-LPs 供试品溶液; 取不加 Rg₃ 和 SB 的空白脂质体按上述操作得阴性供试品溶液。

2.3.3 色谱条件

(1) Rg₃ 检测: 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水 (55:45); 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 203 nm; 进样量为 10 μL; 柱温为 25 °C。

(2) SB 检测: 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (72:28); 体积流量为 1 mL/min; 检测波长为 254 nm; 进样量为 10 μL; 柱温为 25 °C。

2.3.4 专属性实验 按照“2.3.3”项下色谱条件分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液与阴性对照溶

液各 10 μL ，进入高效液相色谱仪，记录 HPLC 图谱。结果如图 1、2 所示，在对照品和样品色谱图相应位置上，有相同保留时间的色谱峰，且溶剂峰与目标峰分离良好，空白无干扰，方法专属性良好。

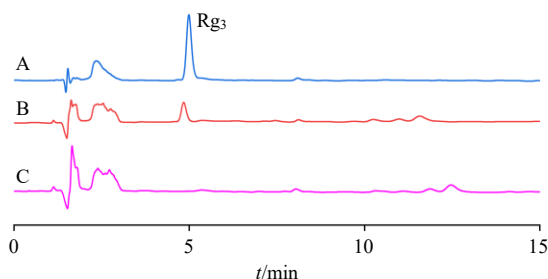


图 1 Rg_3 对照品 (A)、RS-LPs 破乳液 (B) 和空白脂质体破乳液 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC profiles of Rg_3 standard (A), RS-LPs broken emulsion (B) and blank liposome broken emulsion (C)

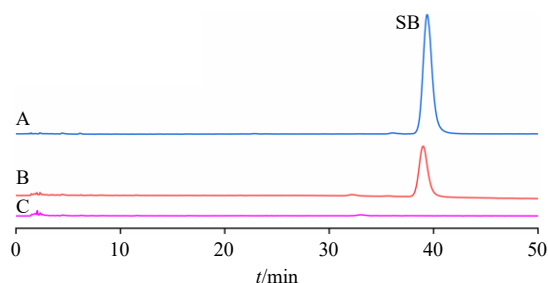


图 2 SB 对照品 (A)、RS-LPs 破乳液 (B) 和空白脂质体破乳液 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC profiles of SB standard (A), RS-LPs broken emulsion (B) and blank liposome broken emulsion (C)

2.3.5 线性关系考察 精密量取储备液适量，用甲醇稀释成 25、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液，按照“2.3.3”项下色谱条件进样 10 μL ，进行分析，得回归方程分别为 Rg_3 $Y=4.3817X+2.5917$ ， $R^2=1.0000$ ；SB $Y=15.1360X-0.3208$ ， $R^2=1.0000$ ；结果表明， Rg_3 和 SB 均在 25~400 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.3.6 精密度考察 精密吸取对照品溶液，按照“2.3.3”项下色谱条件进样测定 6 次， Rg_3 检测 RSD 为 1.284%，SB 检测 RSD 为 0.470%，表明该仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性考察 精密量取供试品溶液适量，分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12 h，按照“2.3.3”项下色谱条件进样测定， Rg_3 检测 RSD 为 0.439%，SB 检测 RSD 为 0.243%，结果表明，供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.8 重复性考察 精密吸样品溶液，按照“2.3.3”项下色谱条件进样 6 次， Rg_3 检测 RSD 为 0.798%，

SB 检测 RSD 为 0.344%，结果表明该实验方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率考察 制备同一批的空白脂质体混悬液，分别精密加入适量的低、中、高（10、40、60 $\mu\text{g/mL}$ ）已知质量浓度的 Rg_3 和 SB 对照品溶液，吸取 10 μL 进 HPLC 检测药物质量浓度，计算其 RSD 值及加样回收率。得出 Rg_3 的平均加样回收率为 $(102.99 \pm 3.63)\%$ ，RSD 为 $(0.68 \pm 0.34)\%$ ，且 SB 的平均加样回收率为 $(101.13 \pm 0.05)\%$ ，RSD 为 $(0.73 \pm 0.28)\%$ ，符合方法学考察要求，且说明该实验准确度较高。

2.3.10 包封率与载药量的测定 Rg_3 在水中的溶解度很小，SB 在水中几乎不溶，因此，认为游离药物可以在制备过程中通过微孔滤膜滤去除。精密量取 100 μL RS-LPs，加入甲醇定容至 1 mL 进行破乳，静置后，用 0.22 μm 有机系微孔滤膜滤过，取续滤液，按照“2.3.3”项下色谱条件测定 Rg_3 与 SB 药物含量。按下列公式分别计算包封率和载药量。

包封率 = $1 - \text{游离药物含量} / \text{脂质体混悬液中药物总量}$

载药量 = $\text{药物实际质量} / \text{制剂总质量}$

2.4 RS-LPs 制备工艺优化

2.4.1 单因素实验

(1) 胆固醇-磷脂质量比考察：固定成膜温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 、水化剂体积为 15 mL、超声时间为 15 min，使胆固醇-磷脂质量比为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6，按照“2.2.1”项下方法制备 RS-LPs，按照“2.4”项下方法测定 Rg_3 和 SB 的包封率与载药量。结果如表 3 所示，包封率与载药量随磷脂比例增加呈先升后降趋势。这可能是因为当磷脂比例较低时，因载药空间不足而导致包封率下降；而胆固醇比例过高则会占据磷脂的载药空间，同时可能因结构稳定性不足而引发药物泄漏，导致载药量下降。当胆固醇与磷脂质量比为 1:5 时， Rg_3 和 SB 的包封率分

表 3 不同胆固醇-磷脂质量比的考察

Table 3 Examination of different cholesterol-phospholipid ratios

胆固醇-磷脂质量比	包封率/%		载药量/%	
	Rg_3	SB	Rg_3	SB
1:2	59.364 3	51.166 1	2.994 6	2.385 0
1:3	64.833 5	58.635 3	3.388 3	2.578 7
1:4	71.201 3	67.003 1	3.675 6	3.066 0
1:5	80.075 1	75.876 9	3.985 9	3.576 3
1:6	66.980 3	73.178 5	3.532 9	3.323 3

别达到 80.075 1%和 75.876 9%，其载药量分别为 3.985 9%和 3.576 3%，均为最高值。故选择胆固醇与磷脂用量比为 1 : 4~1 : 6 进行进一步正交试验继续优化。

(2) 水化剂体积考察：固定胆固醇-磷脂质量比为 1 : 5，成膜温度为 35 ℃，超声时间为 15 min，使水化剂体积为 5、10、15、20、25 mL，按照“2.2.1”项下方法制备 RS-LPs，按照“2.4”项下方法测定 Rg₃ 和 SB 的包封率和载药量。结果如表 4 所示，包封率与载药量随水化剂体积增加呈先升后降趋势。这可能是因为脂质体形成过程中，水化剂的加入可以使薄膜水化更加完全，并且帮助药物分子被包封在脂质体内部，但过量水化剂 (>15 mL) 会导致脂质体在形成过程中吸水过多，粒径增大、膜完整性受损，进而降低包封效率。当水化剂体积为 15 mL 时 Rg₃ 与 SB 包封率分别为 80.075 1%和 75.876 9%，载药量为 3.985 9%和 3.576 3%，故选择水化剂体积 10~20 mL 进行正交试验继续优化。

表 4 不同水化剂体积的考察

Table 4 Examination of different hydrated agent volumes

水化剂 体积/mL	包封率/%		载药量/%	
	Rg ₃	SB	Rg ₃	SB
5	60.274 7	54.076 5	2.747 6	2.957 2
10	77.227 4	69.029 2	3.731 0	3.521 4
15	80.075 1	75.876 9	3.985 9	3.576 3
20	75.763 3	69.565 1	3.888 3	3.478 7
25	72.117 0	63.918 8	3.763 0	2.953 4

(3) 成膜温度考察：固定胆固醇-磷脂质量比为 1 : 5、水化剂体积为 15 mL、超声时间为 15 min，使成膜温度为 30、35、40、45、50 ℃，按照“2.2.1”项下方法制备 RS-LPs，按照“2.4”项下方法测定 Rg₃ 和 SB 的包封率与载药量。结果如表 5 所示，随温度升高，包封率与载药量先显著上升后下降。这可能是因为，适度升温可增强脂质体膜流动性、降

表 5 不同成膜温度的考察

Table 5 Examination of different film forming temperatures

成膜温 度/℃	包封率/%		载药量/%	
	Rg ₃	SB	Rg ₃	SB
30	62.012 6	66.210 8	3.054 0	3.263 6
35	80.075 1	75.876 9	3.985 9	3.576 3
40	94.121 5	85.923 3	4.530 0	4.320 4
45	82.211 2	74.013 0	4.102 4	3.692 8
50	69.086 9	64.888 7	3.683 0	3.073 4

低体系黏度，脂质体更易形成并包载 Rg₃ 和 SB；但温度过高时，会导致脂质体膜的结构变得不稳定，甚至破裂，导致包封率和载药量降低。当成膜温度为 40 ℃时，Rg₃ 与 SB 包封率分别达 94.121 5%和 85.923 3%，载药量分别为 4.530 0%和 4.320 4%，故选择成膜温度为 35~45 ℃进行进一步正交试验继续优化。

(4) 超声时间：固定胆固醇-磷脂质量比为 1 : 5，成膜温度为 40 ℃，使水化剂体积为 15 mL，使超声时间为 5、10、15、20、25 min，按照“2.2.1”项下方法制备 RS-LPs，按照“2.4”项下方法测定包封率与载药量。结果如表 6 所示，包封率与载药量随超声时间延长呈先升后降趋势。当超声时间为 15 min 时包封率和载药量相对较高，故选择超声时间为 10~20 min 进行进一步正交试验继续优化。

表 6 不同超声时间的考察

Table 6 Examination of different ultrasound time

超声时 间/min	包封率/%		载药量/%	
	Rg ₃	SB	Rg ₃	SB
5	73.265 8	82.836 6	3.927 5	3.876 3
10	89.382 8	84.638 2	4.464 7	4.075 2
15	94.121 5	85.923 3	4.530 0	4.320 4
20	78.537 8	69.562 2	3.764 3	3.265 3
25	75.536 3	66.688 6	3.833 2	3.199 7

2.4.2 正交试验 根据单因素实验结果，设计 4 因素 3 水平正交试验表 (表 7)，4 因素分别胆固醇-磷脂质量比 (A)、成膜温度 (B)、水化剂体积 (C)、超声时间 (D)。测定 Rg₃ 和 SB 的平均包封率与平均载药量，并以其算术平均值作为综合评分；以该评分作为评价指标，以空白脂质体作为对照，得到脂质体最佳制备条件。

通过正交试验分析，极差 (R) 值的大小直观反映了各工艺参数对包封率影响的显著程度。方差分析结果 (表 8) 表明，成膜温度对脂质体包埋工艺的包封率的影响最为显著，而水化剂体积的影响相对最小。均值 (K) 反应了各因素在不同水平下对包封率的优化趋势。由正交试验结果可得，极差 R_B > R_D > R_A > R_C，因此参照极差大小确认出各个影响因素的主次顺序为 B > D > A > C，进一步确认出 RS-LPs 的最优工艺组合为 A₁B₃C₁D₂，即胆固醇-磷脂质量比为 1 : 5、成膜温度为 45 ℃、水化剂体积为 10 mL、超声时间为 15 min。

2.4.3 处方工艺验证 由正交试验表明，RS-LPs 的

表 7 正交试验因素水平、试验设计与结果

Table 7 Orthogonal experimental factor levels, design and results

序号	A	B/℃	C/mL	D/min	平均包封率/%	平均载药量/%	综合评分
1	1 : 4 (1)	35 (1)	10 (1)	10 (1)	78.345 3	4.118 7	41.232
2	1 : 4 (1)	40 (2)	15 (2)	15 (2)	76.521 8	3.726 5	40.124
3	1 : 4 (1)	45 (3)	20 (3)	20 (3)	85.279 5	4.735 8	45.008
4	1 : 5 (2)	35 (1)	15 (2)	20 (3)	77.976 5	3.781 1	40.879
5	1 : 5 (2)	40 (2)	20 (3)	10 (1)	65.085 5	2.653 4	33.869
6	1 : 5 (2)	45 (3)	10 (1)	15 (2)	91.490 6	5.245 3	48.368
7	1 : 6 (3)	35 (1)	20 (3)	15 (2)	79.940 8	3.705 7	41.823
8	1 : 6 (3)	40 (2)	10 (1)	20 (3)	67.571 3	2.862 8	35.217
9	1 : 6 (3)	45 (3)	15 (2)	10 (1)	69.942 4	2.774 4	36.358
K ₁	126.364	123.934	124.817	111.459			
K ₂	123.116	109.210	117.361	130.315			
K ₃	113.966	129.734	120.700	121.104			
R	12.966	20.524	7.456	18.856			

表 8 方差分析

Table 8 Analysis of variance

误差来源	平方和	自由度	F值	显著性
A	30.345 1	2	3.263 3	无
B	74.630 1	2	8.025 6	无
C	9.298 9	2	1.000 0	
D	59.268 6	2	6.373 7	无

最佳处方工艺参数为胆固醇-磷脂质量比 1 : 5、成膜温度 45 ℃、水化剂体积 10 mL、超声时间 15 min。在此条件下进行 3 份平行验证实验, 结果 (表 9) 3 次制得的 RS-LPs 的平均包封率为(93.31±2.45)%,

表 9 制备工艺验证

Table 9 Preparation process validation

试验号	平均包封率/%	粒径/nm	PDI	ζ电位/mV
1	95.43	118.9	0.239	-45.8
2	93.87	121.4	0.258	-46.6
3	90.63	124.0	0.286	-48.0
平均值	93.31±2.45	121.4±2.6	0.261±0.024	-46.8±1.1

ζ 电位为 (-46.8±1.1) mV, 平均粒径为 (121.4±2.6) nm, 多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.261±0.024, 说明该工艺稳定可行。

2.5 RS-LPs 的质量评价

2.5.1 RS-LPs 水分散体外观形态 加去离子水制备 Rg₃-SB 混合对照品溶液 (RS) (2 种对照品各 0.1 mg/mL) 与 RS-LPs 样品, 于透明玻璃容器中进行观察。结果表明, RS-LPs 体系呈现典型胶体分散特征, 在自然光下呈乳白色混悬液并伴有淡蓝色乳光, 与对照品溶液的澄清透明状态形成鲜明对比。进一步

采用激光笔横向照射样品, 可观察到显著丁达尔效应, 此现象证实脂质体颗粒在分散介质中形成稳定胶体体系。结果 (图 3) 显示, 薄膜超声法制备的 RS-LPs 分散均匀, 未出现絮凝或分层现象, 符合优质脂质体的物理稳定性要求。

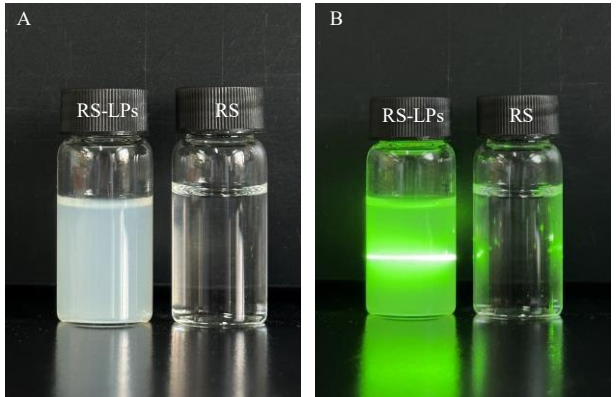


图 3 RS-LPs 和 RS 溶液的外观和丁达尔效应

Fig. 3 Appearances and Tyndall effects of RS-LPs and RS solution

2.5.2 RS-LPs 的微观形态表征 将待测样品经梯度稀释后, 取 5 μL 分散液, 均匀滴附于铜网载体表面, 经自然干燥后采用 2 mg/mL 磷钨酸溶液负染色处理, 再次干燥后置于日立 S-3400N 透射电镜进行图像采集。成像结果 (图 4) 显示, RS-LPs 在水相介质中保持完整球形结构, 粒径分布区间为 100~150 nm, 颗粒边界清晰可辨, 表面未发现明显凹陷或聚集现象。

2.5.3 粒径、PDI 及 ζ 电位的表征 将待测样品注入石英比色皿, 通过马尔文激光粒度分析仪连续 3

次测定粒径分布及 PDI。结果（图 5）表明，制剂平均流体力学直径为 (121.30 ± 2.50) nm ($n=3$)，符合纳米载药系统对粒径的优化标准 (<200 nm)。并且本研究制备的共载脂质体 (RS-LPs) 体系 PDI 值稳定在 0.276 ± 0.015 ，显著低于 0.3 的临界阈值，证实粒子尺寸呈现单峰窄分布特征。

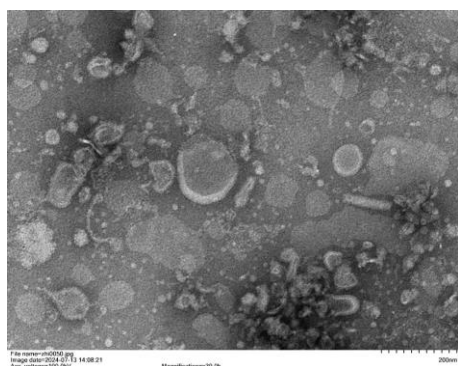


图 4 RS-LPs 的 TEM

Fig. 4 TEM of RS-LPs

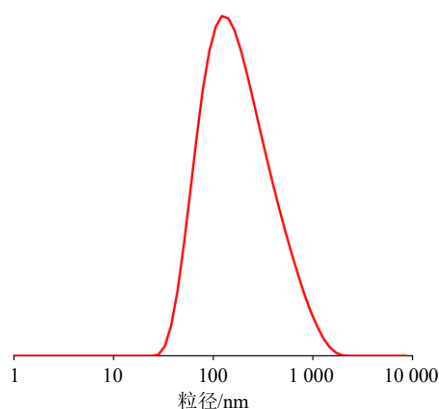


图 5 RS-LPs 的粒径

Fig. 5 Particle size of RS-LPs

2.5.4 稳定性的评价 将脂质体溶液置于 4 ℃ 环境中保存一段时间，期间观察其是否出现沉淀现象；同时，利用动态光散射技术，对该溶液的 ζ 电位、粒径及 PDI 的变动情况进行测定。RS-LPs 在 4 ℃ 条件下保存一段时间的稳定性测试结果如表 10 所示。结果表明，在整个观察期间，脂质体溶液始终保持清澈，未观察到显著沉淀；同时，其粒径、 ζ 电

表 10 RS-LPs 溶液在 30 d 内的稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Stability results of RS-LPs solutions over 30 d

($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
0	138.20 ± 5.81	-45.7 ± 1.9	0.289 ± 0.018
10	132.10 ± 5.32	-48.6 ± 1.6	0.252 ± 0.017
30	133.60 ± 6.01	-47.8 ± 1.8	0.259 ± 0.021

位及 PDI 值与保存首日相比，均未发生明显变化，这证明了 RS-LPs 溶液在 30 d 内的稳定性良好。

2.5.5 体外释放率测定 将待测样品置于透析袋内以排除气泡，随后浸泡于 500 mL pH 值为 6.5 的 PBS 透析介质中。在 37 ℃ 的循环水浴中，以每分钟 50 转的速度旋转透析袋。在 0.5、1.0、4.0、8.0、15.0、24.0、48.0 h，各取 1 mL 样品，并同时补充等体积且温度相同的透析介质，以测定脂质体中的药物含量，并计算累积释放率。结果（图 6）表明，采用透析膜法时，RS-LPs 和 RS 均在 1~10 h 内的体外释放速度相对较快。RS 在 48 h 的累积释放率接近 100%。RS-LPs 在 4 h 释放了 60%，达到释放平衡；RS-LPs 在 12 h 时的累积释放率为 80%，24 h 内持续缓慢释放。

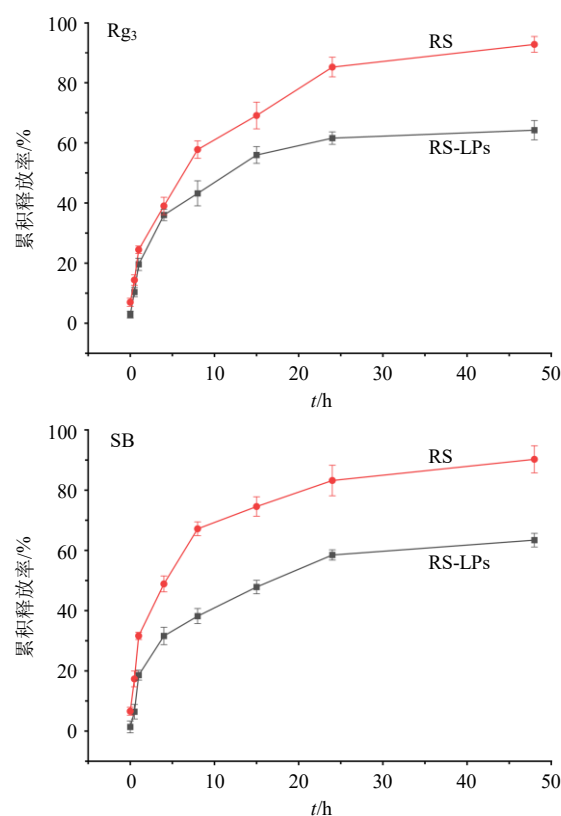


图 6 Rg₃ 和 SB 在 RS 和 RS-LPs 中的体外累积释放率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 *In vitro* cumulative release rates of Rg₃ and SB in RS and RS-LPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5.6 RS-LPs 对 HepG2 细胞的抑制作用 将 HepG2 细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 μ g/mL 链霉素的 MEM 培养基中 37 ℃、5% CO₂ 下培养，通过倒置显微镜观察。当细胞贴壁至 80% 时，更换新的培养液并用 PBS 冲洗 2 次。加入 1 mL 胰蛋白酶进行 2 min 的消化处理后传代培养，定期更

换培养基，以获得处于对数生长期的细胞供后续实验使用。实验分为正常对照组：完全培养基；实验组：加入不同质量浓度的 RS-LPs 和 RS 干预 24 h。结果如表 11 所示，与 RS 相比，当 RS 被包裹在脂质体中时，提高了对 HepG2 细胞的抑制率。

2.5.7 Calcein-AM/PI 双色荧光凋亡染色考察 RS-LPs 的抗癌活性 选取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 24 孔板内，每孔体积为 0.5 mL，接种密度为 1.0×10^5 个/mL，置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养

24 h，加入 RS-LPs 和 RS（RS 质量浓度均为 100 μg/mL）干预 24 h，用 PBS 洗涤细胞 2~3 次，然后每孔加入 500 μL 稀释后的 Calcein-AM 溶液，于 37 ℃培养箱中避光孵育 20 min，用 PBS 洗涤细胞 3 次，再加入 200 μL 稀释后的 PI 溶液于 37 ℃避光反应 5 min，PBS 洗涤细胞 2~3 次，置于荧光显微镜下观察。结果如图 7 和表 12 所示，与 2 种混合对照品溶液相比，将其制作成脂质体的 RS-LPs，具有更明显的癌细胞抑制能力，表现为细胞的数量减

表 11 RS-LPs 和 RS 对 HepG2 细胞抑制率的测定 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 11 Determination of inhibition rate of RS-LPs and RS on HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

给药质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	细胞抑制率/%		给药质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	细胞抑制率/%		给药质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	细胞抑制率/%	
	RS	RS-LPs		RS	RS-LPs		RS	RS-LPs
5	6.37±0.36	13.56±0.72	40	37.74±1.90	68.43±3.49	100	68.10±3.49	81.77±4.22
10	11.11±0.60	31.36±1.63	60	47.51±2.42	71.52±3.63	5	6.37±0.36	13.56±0.72
20	16.28±0.87	48.05±2.45	80	59.75±3.13	75.42±3.81			

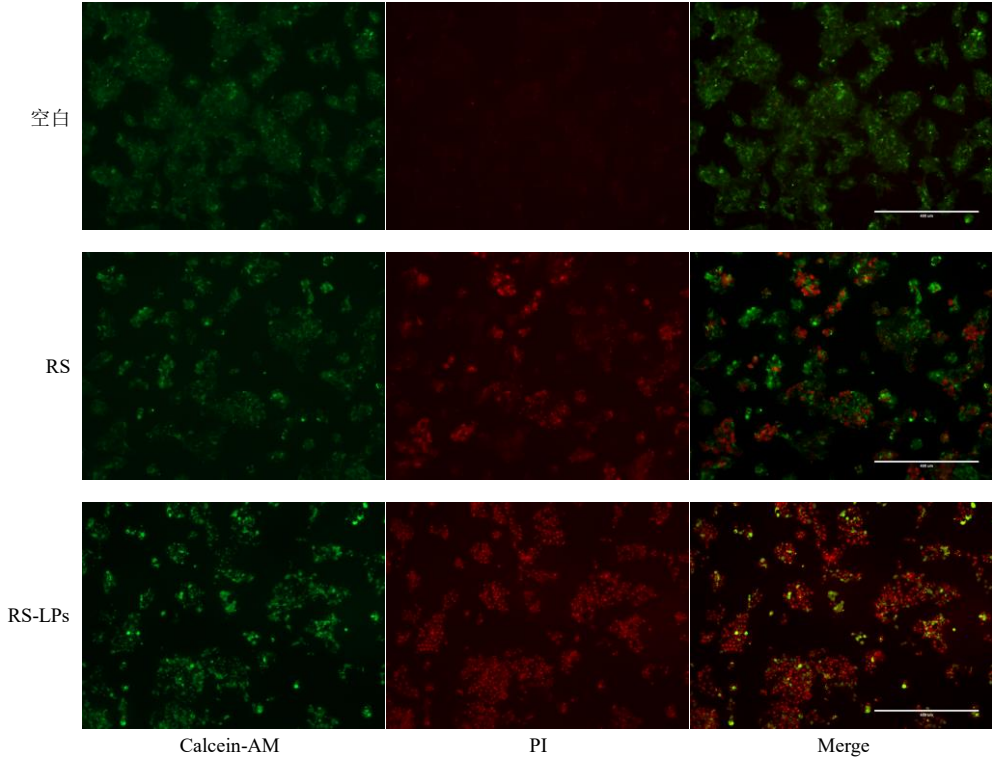


图 7 RS-LPs 和 RS 对 HepG2 细胞的双色荧光凋亡染色

Fig. 7 Double color fluorescence staining of HepG2 cells with RS-LPs and RS for apoptosis

表 12 RS-LPs 和 RS 对 HepG2 细胞的双色荧光凋亡染色
Table 12 Double color fluorescence staining of HepG2 cells with RS-LPs and RS for apoptosis

组别	剂量/(μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%
对照	—	100.00
RS	100	63.55±5.64
RS-LPs	100	19.55±3.44

少，且红色的死细胞明显增多，表明 RS-LPs 具有抗癌活性。

2.5.8 流式细胞术细胞凋亡检测 选取对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板内，每孔体积 2 mL，接种密度为 1.0×10^5 个/mL，置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h，加入 RS-LPs 和 RS 干预 24 h，应用凋亡试剂盒，采用流式细胞仪技术按照试剂盒说

明书规则对 2 种组别的 HepG2 细胞凋亡进行分析检测。图 8 说明了 RS 和 RS-LPs 对 HepG2 细胞凋亡

的影响,通过给予 RS-LPs 后细胞存活率为 63.14%,明显低于 RS 组 (71.34%)。

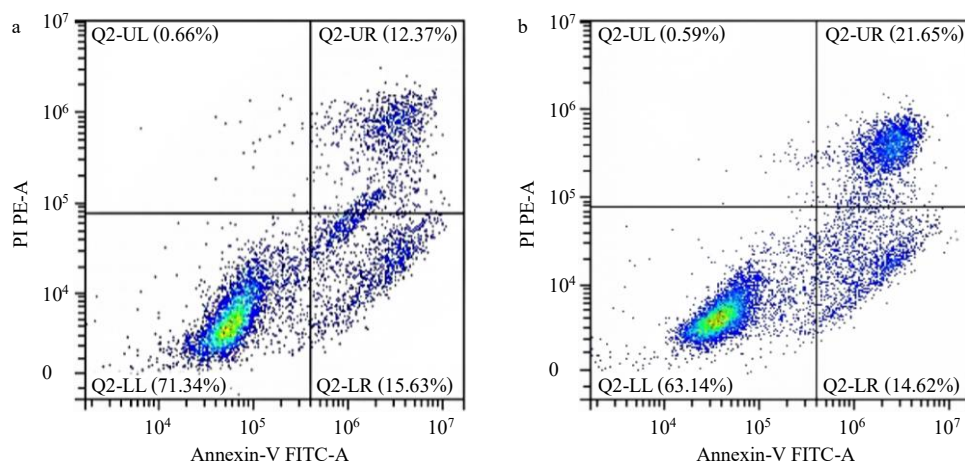


图 8 RS (a) 和 RS-LPs (b) 对 HepG2 细胞的双色荧光凋亡染色

Fig. 8 Double color fluorescent apoptosis staining of HepG2 cells with RS (a) and RS-LPs (b) for apoptosis

3 讨论

本研究以经典药对人参-五味子为研究对象,基于《中国药典》收录的成方制剂数据对相关方剂进行筛选分析。结果显示,人参-五味子配伍频次最高的质量比为 1:1 (占比 34.78%),据此设计 Rg₃-SB 分子配伍药物。针对分子配伍药物溶解性差、生物利用度低等问题制备了 Rg₃-SB 共载脂质体。

脂质体的制备方法主要有薄膜分散法及在此基础上设计出的薄膜超声法、乙醇注入法、挤压法、逆向蒸发法、化学梯度法、钙融合法等^[23]。在制备脂质体时,选择哪一种制备方法是非常重要的。由于 Rg₃ 为水溶性较差的药物,宜选用薄膜分散法和薄膜超声法,而有研究中也选择乙醇注入法;SB 具有亲脂性,穿透性好但在水中的溶解度有限,因此制备方法与 Rg₃ 相同。

结合药物的性质,比较薄膜超声法和乙醇注入法制备 RS-LPs。结果发现,薄膜超声法制备得到的脂质体包封率最高,为 (87.98±3.97)%,且粒径最小 (129.10±6.56) nm,可能是因为薄膜超声法通过超声波的机械振动提供高能量,这能够有效地破碎脂质膜的聚集体,使其形成均匀的纳米粒子。此外,超声波的作用能够促进脂质体的均匀分散,减少大颗粒的形成,从而得到更小的粒径。并且在薄膜超声法中,首先将脂质等材料溶解在有机溶剂里,然后通过减压旋转蒸发的方式除去溶剂,在容器壁上形成均匀的脂质薄膜。这种成膜方式能够使脂质分子有序排列,形成相对稳定且均匀

的膜。而乙醇注入法是将含有脂质的乙醇溶液快速注入到水相介质中,在这个过程中,由于乙醇与水的快速混合,脂质的分散和聚集过程相对较为迅速和随机,因此,本实验采用薄膜超声法对共载脂质体进行制备。

包封率是制备脂质体的重要影响因素之一,是指所包封的药物或活性成分在脂质体中的占比,其直接影响药物在体内的生物利用度。包封率越高,药物在体内有效浓度的维持时间越长,从而增强药物的治疗效果。通常对包封率影响较大的有磷脂与胆固醇的比例、药脂比、成膜温度、超声功率、超声时间、水化剂体积等^[24],因此本实验对上述因素中的胆固醇-磷脂比例、成膜温度、水化剂体积及超声时间进行考察。脂质体包封率随着胆脂比的增加呈现先增加后降低的趋势,可能是由于随着胆固醇比例的增加,膜的流动性适度增加,有助于药物更好地融入和封装在脂质体中,从而提高包封率,但当胆固醇含量过高时,会干扰药物与膜的结合,降低其包封能力^[25]。此外,包封率随着成膜温度、水化剂体积增加也均呈先增加后降低的趋势,可能是因为高温会降低水分子的活性,减弱水合作用的效果。而随着水化剂的增加会导致包封物质在体系中的浓度降低,稀释效应使得成分之间的相互作用减小,从而影响包封效率。同时,包封率随着超声时间的增长呈现先增加后见效的趋势,因为超声能够提高脂质体混悬液的分散性,使体系中较大的脂质体囊泡分裂成较小的、均一的囊泡,缓解乳液出现

絮凝现象,起到乳化稳定作用,从而增加脂质体包封率和载药量。但随着超声时间的延长,可能会引起磷脂的水解和氧化,造成膜结构的不稳定,易使脂质体中的 Rg_3 和 SB 发生泄漏,进而使包封率降低。而随着脂质体在超声处理过程中,气泡会经历快速的形成和破裂。随着时间的延长,气泡的数量和大小会发生变化,过长的超声时间可能导致气泡的破裂频率增加,从而降低包封率,因此确定了制备的脂质体的最佳提取工艺。

本研究通过所制备的共载脂质体的表现特征进行了多维度观察说明了制备的共载脂质体物理稳定性,同时还可以观察到制备的 RS-LPs 在溶液中呈乳白色,且分散均匀,并产生淡蓝色乳光,未出现絮凝或分层现象,此外丁达尔现象的产生,说明所制备的共载脂质体符合优质脂质体的物理稳定性要求。为了观察所制备的共载脂质体的微观形态,本研究采用透射电镜对优化后的 RS-LPs 进行系统表征,表明所制备的共载脂质体呈现良好的单分散性,符合纳米载药系统对粒子均一性的质量要求。通过粒径特征进行分析本研究也证实其制备的共载脂质体的粒子尺寸呈现单峰窄分布特征,且在 30 d 内的稳定性良好,说明所制备的共载脂质体的可能性与实用性。

此外,通过体外释放试验表明药物在短时间内几乎完全释放,且 2 种药物在脂质体中的释放速率受到了明显的调控,显示出逐渐释放的特性,这意味着药物在释放介质中维持了更高的稳定性。表明了制备的共载脂质体能够更有效地实现药物递送,满足高效药物传输的需求。通过体外细胞抗肿瘤检测初步表明,其具有优良的抗肿瘤作用,能够明显抑制 HepG2 细胞的增殖,在 Calcein-AM/PI 双色荧光凋亡染色中 Calcein-AM 仅对活细胞进行染色,使细胞质发出绿色荧光,而作为核染色剂的 PI 则不会染色完整质膜的活细胞,仅对死细胞的细胞核进行染色,发现了发现与未配制成脂质体的 RS 相比,通过共载脂质体处理后的 Rg_3 和 SB 红色的死细胞明显增多,说明 RS-LPs 有着更优良的对 HepG2 细胞的抑制作用。

通过细胞凋亡的检测进一步验证了脂质体通过控制细胞凋亡来进行抗肿瘤。凋亡跟据 Annexin V/PI 双染细胞的结合能力和情况划分了 4 个象限,左下限表示未被 AnnexinV-FITC 或 PI 染色的正常细胞。左上限表示被 AnnexinV-FITC 和 PI 染色的

机械损伤细胞。右下限代表经膜联蛋白 V-FITC 染色的早期凋亡细胞。右上限代表被 AnnexinV-FITC 和 PI 染色的早期凋亡细胞,以及晚期凋亡细胞。可以看出 RS-LPs 对肿瘤细胞的抑制能力更强,抗肿瘤效果更好,表明脂质体包裹可以增强 RS 的抗肿瘤效果,说明所制备的共载脂质体的优势,并为其在抗肿瘤中的应用提供参考。

本研究基于分子配伍理论,以人参-五味子药为研究对象,选出 Rg_3 -SB 分子配伍药物,并搭载共载脂质体载体制备 RS-LPs,优化其制备工艺,对其进行系统表征,并通过体外抗癌活性,证实了其在双药共载与缓释递送中的显著优势,为推动两药在临床中的协同应用提供了新思路,也为中药活性成分的现代化递送提供了可借鉴的技术路径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 史佳琳,张涵,王海东,等. 酶辅助提取人参-五味子复合蛋白酶解物的理化性质和抗氧化活性 [J]. 现代食品科技, 2025, 41(5): 136-146.
- [2] 王淑玲,谢恬,孙敏,等. 分子配伍的理论与实践 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 222-224.
- [3] 李均,付旭,姚兰,等. 丹酚酸 B、C 分子药对配伍对 UUO 大鼠肾间质纤维化的保护作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(20): 113-117.
- [4] 王淑玲,谢恬,李钺璐,等. 分子配伍理论科学内涵及在现代中药研发中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 338-341.
- [5] 顾铜,李均,付旭,等. 丹酚酸 A、C 分子药对配伍干预肾纤维化组织凋亡相关蛋白 caspase-3、GRP78 的实验研究 [J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(10): 79-84.
- [6] 曾健,周学东,刘英. 黄芩素脂质体通过 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路诱导铁死亡抑制 NSCLC 进展的机制研究 [J/OL]. 解剖科学进展, (2025-02-19) [2025-10-04]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1347.Q.20250219.1658.046>.
- [7] 赵玮璇,卢雪,赵瑞林,等. 顺铂脂质体在肿瘤治疗中的研究进展 [J]. 中国药房, 2025, 36(3): 356-361.
- [8] 王正雨,陈青山,谭新华. 甘草次酸修饰的紫草素脂质体联合光热对肝癌细胞的抗肿瘤疗效研究 [J]. 天津中医药, 2025, 42(2): 216-222.
- [9] 刘花. 治疗三阴性乳腺癌的负载双氢青蒿素/紫杉醇的人参皂苷 Rg_3 脂质体的制备、表征及机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
- [10] 贺艳. 奥希替尼-黄芪甲苷共载脂质体的制备及其体内外药效学研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2022.
- [11] 刘天舒. 巨噬细胞膜仿生共载人参皂苷 Rg_3 和三七总皂苷脂质体鼻脑转运靶向治疗缺血性脑卒中 [D]. 长

- 春: 吉林大学, 2024.
- [12] 张璐, 何思雨, 刘昕泽, 等. RPV 修饰的紫杉醇与五味子乙素脂质体处方工艺优化及体外抗肿瘤活性初步评价 [J]. 中国药房, 2021, 32(10): 1173-1180
- [13] 周微红, 洪建勋, 傅斌, 等. 人参皂苷 Rg₃ 通过 miR-1298-5p 靶向 TLR4 对胃癌前病变大鼠的保护机制 [J]. 中国老年学杂志, 2025, 45(3): 656-661.
- [14] 鲍灵芝, 沈蕾, 冯天意, 等. 人参皂苷 Rg₃ 联合布格替尼对非小细胞肺癌细胞增殖和迁移的影响 [J]. 中南药学, 2025, 23(5): 1303-1309.
- [15] 谢蕊秀, 余远迪, 杨柳, 等. 人参皂苷的结构修饰及其活性研究进展 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(15): 458-469.
- [16] Zhou Y, Wang Z, Ren S, *et al.* Mechanism of action of protopanaxadiol ginsenosides on hepatocellular carcinoma and network pharmacological analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 548-557.
- [17] 赵娅菽, 邓丽聪, 曹玥, 等. 人参皂苷 Rg₃ 与 5-氟尿嘧啶联用对结肠癌小鼠肿瘤的血管生成与肿瘤生长抑制效果的实验研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2024, 55(1): 111-117.
- [18] 李智, 李汶泽, 倪秀一, 等. 五味子提取物及其有效成分对心血管疾病的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(8): 1827-1832.
- [19] 王磐妍, 孙凤霄, 张敬, 等. 五味子乙素通过抑制 Nrf2/GPX4 通路介导的铁死亡减轻脓毒症小鼠心肌损伤 [J/OL]. 海南医学院学报, (2025-02-27) [2025-10-04]. <https://doi.org/10.13210/j.cnki.jhmu.20250227.002>.
- [20] 孙惠萍, 王剑, 张小芳. 五味子乙素对 CCl₄ 诱导的肝损伤大鼠 NF-κB/COX-2 的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2021, 31(6): 515-519.
- [21] 宋安平. 五味子乙素通过激活 NK 细胞介导的抗肿瘤免疫诱导 HepG2 细胞焦亡 [D]. 芜湖: 皖南医学院, 2023.
- [22] 中国药典 [S]. 一部. 2025.
- [23] 郭文娣, 彭玉帅, 许卉, 等. 脂质体制剂制备工艺及质量控制研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43(1): 61-69.
- [24] 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: 1-11.
- [25] 张雅筠, 程玉钊, 李伟泽, 等. 红花黄色素纳米柔性脂质体的制备研究 [J]. 中草药, 2024, 55(20): 6909-6917.

[责任编辑 郑礼胜]