

# 长春碱亲水基修饰阳离子脂质体制备及理化性质测定

牛凤菊<sup>1</sup>, 周祉延<sup>2</sup>, 李学涛<sup>3\*</sup>

(1. 济南市第五人民医院, 济南 250022; 2. 吉林大学口腔医学院, 长春 130021;  
3. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

**[摘要]** 目的: 制备长春碱亲水基修饰阳离子脂质体并考察其理化性质。方法: 采用 pH 梯度法制备长春碱亲水基修饰阳离子脂质体, 透射电镜下观察脂质体外观形态, 激光散射测定脂质体粒径分布和 Zeta 表面电位, 利用氧化指数测定氧化程度, 葡聚糖凝胶法测定脂质体的包封率和渗漏率。结果: 长春碱亲水基修饰阳离子脂质体平均粒径  $(102.4 \pm 3.8)$  nm, 多分散指数  $0.18 \pm 0.01$ , 呈双分子层结构, Zeta 电位  $(27.4 \pm 0.58)$  mV, 氧化指数  $< 0.2$ , 包封率 86.42%。冰箱 ( $< 4$  °C) 保存 9 个月脂质体的渗漏率  $< 8.0\%$ , 而室温保存时渗漏率较大, 9 月渗漏率达 34.8%。结论: 制备的长春碱亲水基修饰阳离子脂质体粒径均匀, 外观良好, 包封率高。脂质体的渗漏率与保存温度密切相关。

**[关键词]** 长春碱; 亲水基修饰; 阳离子脂质体; 理化性质

**[中图分类号]** R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0017-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200017

## Preparations and Physicochemical Properties Determination of Vinblastine Hydrophilic Group-modified Cationic Liposomes

NIU Feng-ju<sup>1</sup>, ZHOU Zhi-yan<sup>2</sup>, LI Xue-tao<sup>3\*</sup>

(1. The Fifth People's Hospital of Ji'nan, Ji'nan 250022, China;

2. School of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China;

3. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare vinblastine hydrophilic group-modified cationic liposomes and investigate their physicochemical properties. **Method:** Vinblastine hydrophilic group-modified cationic liposomes were prepared by pH gradient method. Morphology of liposomes was detected by transmission electron microscopy, particle size distribution and Zeta potential was investigated by laser scattering, degree of oxidation was measured by oxidation index method, sephadex G-50 was applied to separate free drug and liposomes in order to determine entrapment efficiency and leakage efficiency of liposomes. **Result:** Particle size of liposomes was  $(102.4 \pm 3.8)$  nm with a narrow polydispersity index of  $0.18 \pm 0.01$ , bilayer of these liposomes was observed obviously with a Zeta potential of  $(27.4 \pm 0.58)$  mV. Oxidation index of liposomes was less than 0.2, entrapment efficiency of vinorelbine was 86.42%. Leakage rate was less than 8.0% prevented in refrigerator ( $< 4$  °C) after nine months, while this index was 34.8% at room temperature. **Conclusion:** Vinblastine hydrophilic group-modified cationic liposomes have uniform particle size and fine-looking with high entrapment efficiency. Leakage rate of liposomes is close to storage temperature.

**[Key words]** vinblastine; modified by hydrophilic group; cationic liposomes; physicochemical properties

**[收稿日期]** 20140314(022)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102822)

**[第一作者]** 牛凤菊, 硕士, 副主任医师, 从事中医药临床研究, Tel:18753157889, E-mail: zcnzfj@163.com

**[通讯作者]** \*李学涛, 博士, 副教授, 从事新型给药系统, Tel:0411-87586010, E-mail: lixuetao1979@yahoo.cn

长春碱(vinblastine, VLB)是从夹竹桃科植物长春花 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don 中提取的一种双吲哚型生物碱。VLB 主要抑制微管蛋白的聚合,妨碍纺锤体微管的形成,使核分裂停止于中期,主要用于治疗实体瘤。与其他化疗药物一样,VLB 对肿瘤组织缺乏选择性,使其临床应用受到严重限制<sup>[1]</sup>。脂质体通过亲水基修饰后可延长药物在体内的保留时间,以便更好地发挥载体的高通透性和滞留效应,达到靶向肿瘤组织、降低毒性及提高疗效的作用<sup>[2]</sup>。阳离子脂质体通过自身的正电性与肿瘤组织中新生血管的负电性相结合,可达到靶向肿瘤新生血管的目的,实现主动靶向<sup>[3]</sup>。本实验在确定了 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体处方工艺基础上,对其理化性质进行系统考察,为 VLB 的临床应用提供新思路。

### 1 材料

Zetasizer 3000HS 型光散射粒径测定仪(英国 Malvern 公司),Tecnai G2 20ST 型透射电镜(美国 FEI 公司),1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),JY92-2D 型超声波细胞捣碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),LF-1 型脂质体挤出仪(美国 Avanti Polar Lipids Inc 公司),PHS-25 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂),AY220 型电子分析天平(日本岛津公司),DF2101S 型磁力搅拌器(河南巩义市予华仪器厂),MD34 透析袋(上海百赛生物,截留相对分子质量 14 000)。

长春碱(VLB,武汉金诺化工有限公司),VLB 对照品(贵州迪大有限公司,批号 GZDD-0329),VLB 亲水基修饰阳离子脂质体(辽宁中医药大学自制,批号 120511,120512,120513), $3\beta$ -[N-(N',N'-二甲胺乙基)胺基甲酰胺基]-胆固醇(DC-Chol,美国 Avanti Polar Lipids Inc 公司),sephadex G-50(上海华蓝化学科技有限公司),二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇(PEG2000-DSPE)均购自日本精化株式会社,甲醇、乙腈为色谱纯,水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体的制备**<sup>[4]</sup> 精密称取 DC-Chol 0.025 2 g, DPPC 0.037 g, DSPE-PEG2000 0.001 g,加入三氯甲烷 20 mL 使溶解,旋转蒸发除去三氯甲烷,得磷脂膜;加入 pH 3.0 柠檬酸缓冲液 30 mL,水化磷脂膜,于 60 °C 水浴搅拌 30 min,超声处理 30 min,得空白脂质体;空白脂质体依次通过脂质体挤出仪,加入 0.2 mol·L<sup>-1</sup> VLB

溶液 5.0 mL,用 1 mol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液调 pH 6.5,置 55 °C 水浴中振摇 10 min,冷却,即得。

**2.2 形态学观察** 取 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体 1 mL,加水稀释至 10 mL,取稀释液适量至小烧杯中,静置 10 min,加 3% 磷钨酸负染,吸取负染液滴至铜网上,滤纸吸去多余染色液,静置 30 min,使微粒在铜网沉积,利用透射电镜观察粒径大小和形态,见图 1。结果显示脂质体外观呈圆球形或椭圆形的球形粒子,大小均匀,粒径约 100 nm,可见明显的双分子层结构。

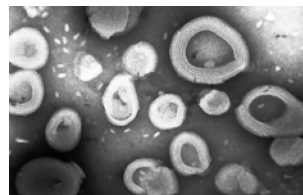


图 1 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体 TEM(×20 万)

**2.3 粒径及 Zeta 电位的测定** 取 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体 0.5 mL,加水稀释至 10 mL,稀释液加入样品池中进行测定,以微粒个数为基准,测定粒径和 Zeta 电位,绘制粒径分布图及电位图,见图 2,3。计算平均粒径(102.4 ± 3.8) nm,多分散指数(polydispersity index, PDI)0.18 ± 0.01,呈单峰正态分布,制备的脂质体带正电荷,Zeta 电位(27.4 ± 0.58) mV。

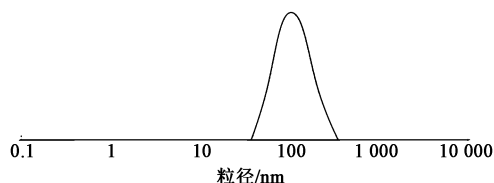


图 2 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体粒径分布

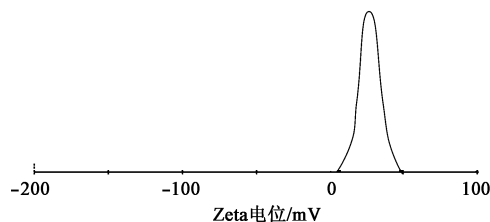


图 3 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体 Zeta 电位分布

**2.4 pH 测定** 取 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体 3 批,测得平均 pH 6.28 ± 0.52 (n = 3),而磷脂在 pH 6.5 时较稳定,说明脂质体的 pH 有利于制剂的稳定性。

**2.5 DPPC 氧化指数的测定** 精密量取 VLB 亲水

基修饰阳离子脂质体 1.0 mL,加无水乙醇稀释至 10.0 mL,以无水乙醇为空白,分别于 233,215 nm 处测定吸光度(A),计算氧化指数<sup>[5]</sup>。

$$\text{氧化指数} = A_{233 \text{ nm}} / A_{215 \text{ nm}} \times 100\%$$

式中  $A_{233 \text{ nm}}$  和  $A_{215 \text{ nm}}$  分别代表稀释液在 233 nm 和 215 nm 的 A。脂质体在制备及贮存过程中磷脂极易被氧化,磷脂被氧化后一方面可使脂质体的稳定性遭到破坏,另外磷脂的氧化产物可能存在一定毒性作用,故控制脂质体的氧化指数十分必要。结果 3 批脂质体的氧化指数分别为 0.17,0.15,0.17,表明脂质体中磷脂未被破坏。

## 2.6 脂质体包封率的测定

**2.6.1 色谱条件** 迪马  $C_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相二乙胺溶液(取二乙胺 14 mL,加水 986 mL,混匀,磷酸调 pH 7.5)-乙腈与甲醇的混合液(32:68),柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,检测波长 281 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 10  $\mu\text{L}$ 。理论塔板数按 VLB 计不低于 3 000。

**2.6.2 线性关系考察** 精密称取 VLB 对照品 15.01 mg,加甲醇 50 mL 溶解并稀释至刻度,得储备液。精密量取适量储备液,分别加甲醇稀释成 0.02,0.05,0.10,0.15,0.20,0.30 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,按 2.6.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 5481.4X + 80.571$  ( $r = 0.9996$ ),线性范围 0.02 ~ 0.30 g·L<sup>-1</sup>。

**2.6.3 洗脱曲线绘制** 称取 sephadex G-50 2.0 g,置 pH 7.6 磷酸盐缓冲液中浸泡过夜,湿法装柱。精密吸取 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体 0.5 mL,加至凝胶柱(1.0 cm × 12 cm)上部,以水为洗脱液,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,收集洗脱液,每份 2 mL,共收集 22 份,分别从 22 份样品中吸取 1 mL,加入 1 mL 水,超声使其澄清,以水为空白,于 281 nm 处测定  $A$ <sup>[6-7]</sup>,绘制洗脱曲线,见图 4,表明第 1~8 管为含药脂质体,第 9~17 管为游离药物。

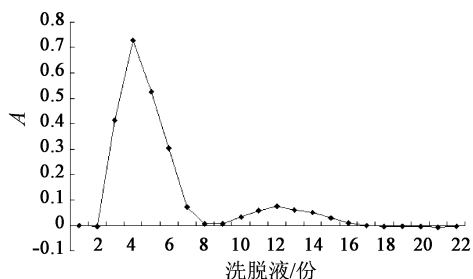


图4 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体洗脱曲线

**2.6.4 上柱回收率的测定** 精密吸取 0.02,0.15,

0.30 g·L<sup>-1</sup> 的 VLB 对照品溶液各 0.5 mL,按 2.6.3 项下方法分离,合并第 9~17 管洗脱液,混匀,按 2.6.1 项下色谱条件测定 VLB 含量,计算柱回收率 102.5%,RSD 1.41% ( $n = 3$ )。取上述溶液,分别加入亲水基修饰阳离子空白脂质体,混匀,精密吸取混合液 0.5 mL,上柱,洗脱,收集游离 VLB,计算平均加样回收率 100.4%,RSD 1.75% ( $n = 3$ )。

**2.6.5 样品测定** 精密吸取 3 批 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体各 3 份,每份 0.5 mL,按 2.6.3 项下方法操作,收集游离药物部分,水浴蒸干,残渣加甲醇溶解,滤过,滤液加甲醇定容至 5 mL,经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取滤液按 2.6.1 项下色谱条件测定,计算平均包封率 86.42%,RSD 1.02%。

**2.7 渗漏率考察** 取 VLB 亲水基修饰阳离子脂质体,氮气流保护下熔封于安瓿中。脂质体分别在 4  $^{\circ}\text{C}$  和室温(25  $^{\circ}\text{C}$ ) 条件下放置一定时间,于 0,1,3,6,9 月取样检查渗漏率,按 2.6 项下方法测定脂质体在不同时间渗漏出来的游离药物含量,按  $(W_1 - W_2) / W_1 \times 100\%$  计算渗漏率, $W_1$  和  $W_2$  分别为制备时和贮存一定时间后的包封率。结果 4  $^{\circ}\text{C}$  时渗漏率分别为 0,3.2%,4.3%,5.8%,7.9%,室温时依次为 0,7.8%,13.4%,21.5%,34.8%。说明脂质体的渗漏率与保存温度密切相关。

## 3 讨论

Zeta 电位是表征粒子表面电荷情况的一个重要指标,直接影响脂质体混悬液的稳定性。荷电脂质体能减少相互间的聚集和融合,增加稳定性。由粒径分布图可知,脂质体的粒径分布为单峰,分布较窄,说明粒径分布较好。VLB 亲水基修饰阳离子脂质体在 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存 9 个月时渗漏率 < 8%,而室温放置时渗漏率则较大,这是由于脂质体的膜材成分磷脂中不饱和基团易发生氧化所致,随着温度的升高,氧化反应速率加快,故室温条件下保存脂质体的渗漏率较大<sup>[8]</sup>。

分离脂质体中游离的药物的方法有凝胶过滤法、超速离心法、鱼精蛋白沉淀法、透析法等,预试验发现鱼精蛋白沉淀法、超速离心法、透析法均无法较好地达到分离游离药物的目的。而葡聚糖凝胶法的原理为脂质体通过凝胶柱时,溶质分子(被分离的物质)在一个流动液体中通过多孔粒子固定床时,小分子药物可完全渗透进入柱子填料内部孔穴中而被滞留,较大的脂质体渗入细孔的比例较少,从而比小分子药物更易从柱上洗脱下来,实现脂质体先从柱中流出,而游离药物后流出,达到分离效果。本文

# cremophor RH40 及 labrafil M 1944 CS 的鼻黏膜毒性考察

孟亚飞<sup>1</sup>, 张伟玲<sup>1</sup>, 李彤彤<sup>2</sup>, 王亚静<sup>1\*</sup>, 郑银<sup>1</sup>, 张曦<sup>2</sup>

(1. 天津中医药大学现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心, 天津 300193;  
2. 天津市中央药业有限公司, 天津 300400)

**[摘要]** 目的:考察乙醇-油酸聚乙二醇甘油酯(labrafil M 1944 CS)和聚氧乙烯氢化蓖麻油40(cremophor RH40)的鼻黏膜毒性,探讨其在鼻腔给药系统中应用的可行性。方法:以山梨糖醇酐油酸酯(span-80)和聚山梨酯-80(tween-80)为参比,采用在体蟾蜍上腭模型,光学显微镜下观察纤毛持续运动时间,考察 cremophor RH40 和 labrafil M 1944 CS 的纤毛毒性作用;运用家兔红细胞溶血试验,考察 cremophor RH40 和 labrafil M 1944 CS 对细胞膜完整性的影响。结果:体积分数为1%时,4种表面活性剂对纤毛运动的影响顺序为 cremophor RH40 < labrafil M 1944 CS < tween-80 < span-80; cremophor RH40 的细胞膜毒性最小, tween-80 和 span-80 次之,而 labrafil M 1944 CS 的影响最大; cremophor RH40 对细胞膜完整性无影响用量为 tween-80 和 span-80 的15倍。结论:在一定体积分数下 cremophor RH40 的鼻黏膜毒性作用较小,可应用于鼻腔给药制剂的研制。

**[关键词]** 鼻腔给药系统; 鼻黏膜毒性; 乙醇-油酸聚乙二醇甘油酯; 聚氧乙烯氢化蓖麻油40

**[中图分类号]** R283.6; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0020-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014200020

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140829.1412.008.html>

**[网络出版时间]** 2014-08-29 14:12

## Evaluation of Nasal Mucosa Toxicity of Cremophor RH40 and Labrafil M 1944 CS

MENG Ya-fei<sup>1</sup>, ZHANG Wei-ling<sup>1</sup>, LI Tong-tong<sup>2</sup>, WANG Ya-jing<sup>1\*</sup>, ZHENG Yin<sup>1</sup>, ZHANG Xi<sup>2</sup>

(1. Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

**[收稿日期]** 20140222(006)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09304007);天津市科技特派员项目(201306)

**[第一作者]** 孟亚飞,在读硕士,从事药物制剂设计及新药开发研究, Tel:13821319069, E-mail:myf916@sina.com

**[通讯作者]** \*王亚静,副研究员,从事药物制剂设计及新药开发研究, Tel:022-59596169, E-mail:yajing022@163.com

采用凝胶过滤法测定脂质体的包封率,该法操作简单、快捷、药物分离效果较好。

### [参考文献]

[1] 高正航,李卫东. 长春花生物碱类药物研究概述[J]. 贵州农业科学, 2005, 33(6):94.  
[2] Meyer O, Kirpotin D, Hong K, et al. Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides[J]. Int J Pharm, 1998, 273(25):15621.  
[3] Sorgi F L, Leaf H. Large scale production of DC-CHol cationic liposomes by microfluidization[J]. Int J Pharm, 1996, 144(2):131.  
[4] 谭静净,程岚,李学涛. 中心组合设计-效应面法优化长

春碱亲水基修饰阳离子脂质体的处方[J]. 中草药, 2012, 43(9):1742.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005;附录 181.  
[6] 李海刚,王东凯. 注射用克拉霉素脂质体的制备及其包封率的测定[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(10):635.  
[7] 鲁会侠,冯锁民. 紫杉醇脂质体药物包封率的测定[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(10):778.  
[8] 闫颖,齐荣荣. 以叶酸受体为靶向的阳离子脂质体的制备与性质考察[J]. 药学学报, 2008, 43(11):1134.

[责任编辑 刘德文]