

姜黄素复方脂质体的制备及质量评价

朱佳, 轩亚茹, 张春春, 王亚华, 闫荷露, 李霞, 应雪*

(石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆石河子 832000)

[摘要] **目的:**制备姜黄素-奎纳克林脂质体,优化其处方工艺并评价其质量,为姜黄素的药物开发提供参考。**方法:**采用薄膜分散-硫酸铵梯度法制备姜黄素-奎纳克林脂质体,HPLC测定姜黄素和奎纳克林的含量,流动相分别为甲醇-水(含0.3%冰乙酸)(70:30)和乙腈-水(含0.6%冰乙酸和1.5%三乙胺)(50:50),流速分别为1.0,1.5 mL·min⁻¹,检测波长依次为423,269 nm。以包封率为评价指标,通过单因素试验优选姜黄素-奎纳克林脂质体的处方工艺,考察脂质体的粒径和Zeta电位。**结果:**最优处方为磷脂-胆固醇摩尔比(2:1),姜黄素-膜材(1:40),奎纳克林-膜材(1:48),硫酸铵浓度250 mmol·L⁻¹。脂质体中姜黄素和奎纳克林平均包封率分别为(95.33±0.85)%和(94.13±0.49)%,粒径(117.73±0.15) nm,Zeta电位(-8.56±0.22) mV,多分散系数0.12±0.01。**结论:**姜黄素-奎纳克林脂质体的粒径均一、包封率高、稳定性良好,具有一定缓释作用。

[关键词] 姜黄素; 奎纳克林; 脂质体; 包封率

[中图分类号] R283.6;R284.1;R942 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0019-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190019

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150824.1005.018.html>

[网络出版时间] 2015-08-24 10:05

Preparation and Quality Evaluation of Curcumin-quinacrine Liposomes ZHU Jia, XUAN Ya-ru, ZHANG Chun-chun, WANG Ya-hua, YAN He-lu, LI Xia, YING Xue* (Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resources, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare curcumin-quinacrine liposomes, then optimize its formulation technology and evaluate its quality in order to provide references for development of curcumin. **Method:** Curcumin-quinacrine liposomes were prepared by film dispersion-ammonium sulfate gradient method. The content of curcumin and quinacrine were determined by HPLC, mobile phase was methanol-water (containing 0.3% acetic acid) (70:30) and acetonitrile-water (containing 0.6% acetic acid and 1.5% triethylamine) (50:50), flow velocity was 1.0, 1.5 mL·min⁻¹, detection wavelength was 423, 269 nm, respectively. Formulation process of curcumin-quinacrine liposomes was optimized by single factor tests with encapsulation efficiency as index. Characterization of curcumin-quinacrine liposomes were investigated, including particle size and Zeta potential. **Result:** Parameters of optimal prescription were mole ratio of phospholipid-cholesterol (2:1), curcumin-membrane material (1:40), quinacrine-membrane material (1:48) and ammonium sulfate concentration of 250 mmol·L⁻¹. Encapsulation efficiencies were (95.33±0.85)% and (94.13±0.49)% for curcumin and quinacrine, respectively. Particle size was (117.73±0.15) nm, Zeta potential was (-8.56±0.22) mV, polydispersity index (PDI) was 0.12±0.01. **Conclusion:** Curcumin-quinacrine liposomes has advantages of uniform particle size, high encapsulation efficiency, good stability and enough slow-release effect.

[Key words] curcumin; quinacrine; liposomes; encapsulation efficiency

[收稿日期] 20150318(030)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160396,81460540);石河子大学杰出青年科技人才培养计划项目(2012ZRKXJQ07);新疆生产建设兵团社会发展科技攻关与成果转化计划项目(2015AD007)

[第一作者] 朱佳,在读硕士,从事药物新剂型研究,Tel:18935757219,E-mail:865321294@qq.com

[通讯作者] *应雪,博士,副教授,从事药物新剂型研究,Tel:13579455890,E-mail:yingxue2011@qq.com

为了更有效地治疗癌症,多种药物共同治疗已在动物研究和临床研究中应用^[1-2]。在脂质体中同时载入亲脂性和亲水性的药物,2 种药物协同治疗肿瘤是抗肿瘤治疗的新趋势^[3-4]。脂质体是一种无毒的药物载体,具有生物相容性和可降解性的特点,可避免药物过早失活,改善药物的溶解性^[5-6]。与游离药物相比,脂质体作为一种能提高抗肿瘤药物治疗指数的药物传递系统,可更好地向肿瘤组织运输和积累药物^[7-8]。

姜黄素是从姜黄根茎中分离的生物活性化合物,作为一种抗氧化剂、抗菌剂、抗炎剂和抗癌化合物,其已被广泛应用于临床。研究证明姜黄素对多种人类肿瘤细胞株有抑制作用。但由于姜黄素为脂溶性药物,生物利用度低,使得其用于癌症治疗存在很大局限性。脂质体作为纳米运输载体,可克服姜黄素的这个问题,可增加其稳定性和生物利用度^[9-10]。奎纳克林又称作米帕林,曾经作为抗疟疾常用药物,后逐渐被新型抗疟药物取代。近年研究发现奎纳克林具有抗肿瘤作用,有可能用于肾脏、肺脏、乳腺等肿瘤的治疗。美国科学院院士 George R. Stark 报道奎纳克林可诱导肾癌细胞系 RCC45 凋亡^[11]。研究报道线粒体靶向柔红霉素-奎纳克林脂质体可用于治疗和预防乳腺癌 MCF-7 肿瘤干细胞的复发,直接杀死肿瘤干细胞,诱导肿瘤细胞凋亡^[12]。Reyes 等^[13]在培养神经胶质瘤细胞和大鼠恶性胶质瘤的实验中发现,奎纳克林可增强卡莫司汀的抗肿瘤作用,并维持恶性胶质瘤细胞对化疗药物的长期敏感性。本实验拟将姜黄素和奎纳克林共同包载在脂质体中,探索脂质体作为载体以提高姜黄素稳定性和生物利用度的可行性,同时研究奎纳克林诱导肿瘤细胞凋亡并增强姜黄素抗肿瘤活性的可能性。

1 材料

BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司),1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),JY92 型细胞超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司),UV-2401PC 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),ZEN3690 型激光粒度仪(英国马尔文公司)。蛋黄卵磷脂(德国 Lipoid 公司,纯度 >98%),胆固醇(北京双旋微生物培养基制品厂),姜黄素(西安融升生物科技有限公司,纯度 >98%),葡聚糖凝胶 G50(北京拜尔迪生物科技有限公司),奎纳克林盐酸盐(上海源叶生物科技有限公司,纯度 >98%),甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 姜黄素-奎纳克林脂质体的制备 称取适量胆固醇、磷脂及姜黄素置于茄形瓶中,加甲醇溶解,旋转蒸发成膜后用硫酸铵超声水化,分别过 0.4, 0.2 nm 聚碳脂膜各 3 次,经磷酸盐缓冲液(PBS)透析,60 ℃ 预热加入奎纳克林盐酸盐粉末,混合并轻摇 20 min,即得。

2.2 姜黄素和奎纳克林的含量测定

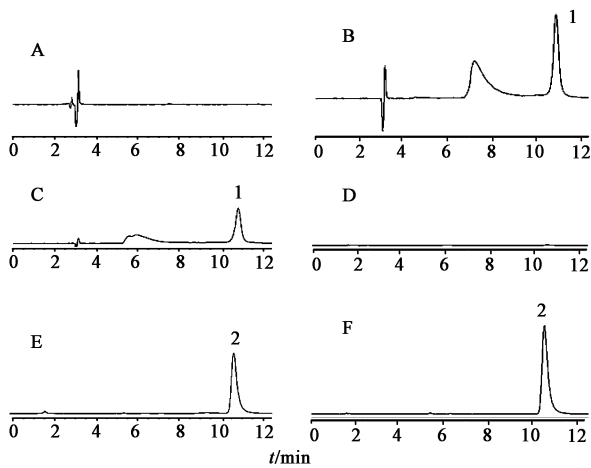
2.2.1 对照品贮备液配制 精密称取姜黄素 5.0 mg,加相应流动相配成 50.0 mg·L⁻¹ 贮备液。精密称取奎纳克林 10 mg,加相应流动相配制 100.0 mg·L⁻¹ 贮备液。

2.2.2 供试品溶液的制备 量取姜黄素-奎纳克林脂质体 0.5 mL,置于 10 mL 量瓶中,破乳后分别用流动相稀释至刻度,即得。

2.2.3 色谱条件 姜黄素色谱条件为 GL sciences Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(含 0.3% 冰乙酸)(70:30),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 423 nm,柱温为室温,进样量 20 μL。奎纳克林色谱条件为 GL sciences Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(含 0.6% 冰乙酸和 1.5% 三乙胺)(50:50),流速 1.5 mL·min⁻¹,检测波长 269 nm,柱温为室温,进样量 20 μL。在上述色谱条件下,分别取空白脂质体破乳溶液、姜黄素对照品溶液、奎纳克林对照品溶液、姜黄素-奎纳克林脂质体破乳溶液进样分析,见图 1。结果显示空白脂质体对药物测定无干扰,姜黄素和奎纳克林色谱峰的保留时间分别约为 10.9, 10.4 min。

2.2.4 标准曲线绘制 精密量取姜黄素储备液 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度。精密量取奎纳克林贮备液 0.5, 2.0, 3.5, 5.0, 6.5, 8.0, 9.5 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度。按 2.2.3 项下条件测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得姜黄素、奎纳克林回归方程分别为 $Y = 125.73X - 53.701$ ($r = 0.9999$), $Y = 98.86X - 16.452$ ($r = 0.9997$),线性范围依次为 0.499 ~ 44.91, 5.05 ~ 95.95 mg·L⁻¹。

2.2.5 精密度试验 精密量取姜黄素贮备液 0.5, 5.0, 9.0 mL 至 10 mL 量瓶,加流动相稀释至刻度。精密量取奎纳克林储备液 2.0, 5.0, 8.0 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度。1 d 内分别进样 3 次,计算日内精密度;分别进样 1 次,共



A, D. 空白脂质体; B, E. 对照品; C, F. 供试品; 1. 姜黄素; 2. 奎纳克林
图 1 姜黄素-奎纳克林脂质体 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of curcumin-quinacrine liposomes

3 d, 计算日间精密度。结果峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 分别配置 6 份脂质体样品的供试品溶液, 按 2.2.3 项下条件测定, 计算姜黄素、奎纳克林峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明该方法重复性良好。

2.2.7 回收率试验 取空白脂质体 0.1 mL, 加入 9 倍量甲醇破乳, 分别加入姜黄素贮备液 0.5, 5.0, 9.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度; 取空白脂质体 0.1 mL, 加入 9 倍量乙腈破乳, 分别加入奎纳克林储备液 2.0, 5.0, 8.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 按 2.2.3 项下条件测定, 记录峰面积, 计算姜黄素和奎纳克林的平均回收率分别为 $(99.57 \pm 4.46)\%$, $(99.97 \pm 2.62)\%$, RSD 分别为 4.5%, 2.6%。

2.3 包封率测定方法的建立

2.3.1 姜黄素洗脱曲线的绘制^[14] 采用葡聚糖凝胶 G50 柱色谱法分离姜黄素脂质体和未包封的姜黄素, 运用紫外分光光度法测定姜黄素含量。上样量 1.0 mL, 洗脱液 PBS 缓冲液, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 共收集 21 管 (每管 1 mL), 改用含 30% 乙醇的 PBS 缓冲液洗脱, 收集 21 管。取空白脂质体 1 mL 上柱, 同法操作, 收集洗脱的组分, 破乳后作为空白对照, 于 423 nm 处测定各管溶液的吸光度 A, 绘制洗脱曲线, 见图 2。结果显示 2~8 mL 的组分为姜黄素脂质体, 30~42 mL 的组分为游离姜黄素, 姜黄素脂质体和未包封的游离姜黄素可完全分离。

2.3.2 包封率的计算 取适量过柱前脂质体, 加甲醇消解并测定姜黄素含量; 另取过柱后的脂质体溶

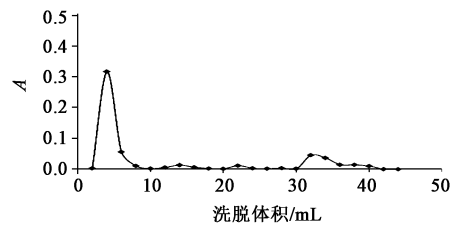


图 2 姜黄素-奎纳克林脂质体的洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of curcumin-quinacrine liposomes

液用甲醇消解, 测定姜黄素-奎纳克林脂质体中包封的姜黄素含量。采用透析法去除未包封的奎纳克林, 取适量透析前姜黄素-奎纳克林脂质体加乙腈消解, 测定奎纳克林含量; 另取透析后的脂质体溶液用乙腈消解, 测定姜黄素-奎纳克林脂质体中包封的奎纳克林含量。按 $W_{\text{包}}/W_{\text{总}}$ 计算包封率, $W_{\text{包}}$ 和 $W_{\text{总}}$ 分别表示脂质体包封的剂量和总投剂量。

2.4 制备工艺考察 采用薄膜分散-硫酸铵梯度法制备姜黄素-奎纳克林脂质体, 以姜黄素和奎纳克林包封率为指标, 采用单因素试验优选制备工艺。

2.4.1 胆固醇与磷脂的摩尔比 固定姜黄素的质量, 考察磷脂-胆固醇摩尔比分别为 2:3, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 时对姜黄素包封率的影响, 并观察脂质体的稳定性, 结果包封率分别为 $(32.59 \pm 0.07)\%$, $(33.40 \pm 0.60)\%$, $(48.97 \pm 0.73)\%$, $(38.96 \pm 0.37)\%$, $(58.76 \pm 0.43)\%$ 。说明随着磷脂用量的增加, 脂质体包封率增高。磷脂-胆固醇 (4:1) 时脂质体的包封率最高, 但会出现絮凝现象, 故选择磷脂-胆固醇 (2:1)。

2.4.2 姜黄素药脂比 固定磷脂-胆固醇 (2:1), 考察姜黄素与膜材质量比为 1:10, 1:25, 1:40, 1:55, 1:70 对姜黄素包封率的影响, 并观察脂质体稳定性, 结果包封率分别为 $(42.57 \pm 0.67)\%$, $(92.98 \pm 1.27)\%$, $(97.40 \pm 0.34)\%$, $(92.25 \pm 0.99)\%$, $(83.86 \pm 1.01)\%$ 。表明姜黄素-膜材 (1:40) 时包封率最大, 在包封率相差不大的情况下, 姜黄素-膜材 (1:25) 载药量更大, 但由于姜黄素-膜材 (1:25) 时, 脂质体放置 1 周后会出现黄色沉淀, 故选择姜黄素-膜材 (1:40)。

2.4.3 奎纳克林药脂比 固定磷脂-胆固醇 (2:1) 和姜黄素-膜材 (1:40), 考察奎纳克林与膜材质量比分别为 1:30, 1:36, 1:42, 1:48, 1:54 对包封率的影响, 并观察脂质体稳定性, 计算包封率分别为 $(61.00 \pm 0.77)\%$, $(84.98 \pm 1.07)\%$, $(82.96 \pm 0.09)\%$, $(96.85 \pm 0.48)\%$, $(88.71 \pm 0.74)\%$ 。由结果可知, 当药脂比为 1:48 时脂质体包封率最高,

所以选择奎纳克林药脂比为 1:48。

2.4.4 硫酸铵浓度 硫酸铵梯度法类似于 pH 梯度法,通过游离氨扩散到脂质体外,间接形成 pH 梯度,使奎纳克林包于内水相中。确定其他条件,考察硫酸铵浓度分别为 100,200,250,300,350 mmol·L⁻¹ 时对奎纳克林包封率的影响,结果包封率分别为 (62.03 ± 0.33)%, (82.64 ± 0.41)%, (93.87 ± 1.24)%, (87.09 ± 0.75)%, (82.87 ± 0.55)%, 故选择硫酸铵浓度 250 mmol·L⁻¹。

2.5 验证试验 最优处方确定为磷脂-胆固醇 (2:1),姜黄素-膜材 (1:40),奎纳克林-膜材 (1:48),硫酸铵浓度 250 mmol·L⁻¹,按该处方制备 3 批姜黄素-奎纳克林脂质体,测定脂质体中姜黄素和奎纳克林平均包封率分别为 (95.33 ± 0.85)% 和 (94.13 ± 0.49)%,且 RSD 均 < 1.0%,表明该处方工艺稳定可靠。

2.6 脂质体体外释放率的测定 精密量取姜黄素-奎纳克林脂质体混悬液 2 mL,装入透析袋中,透析袋两端系紧,悬置在盛有释放介质(释放介质为含有 0.2% 十二烷基硫酸钠的 PBS 缓冲液,以增加姜黄素的溶解度)的锥形瓶中,(37 ± 0.5) °C 恒温振荡 48 h,在设定的时间点取样并立即补入等体积等温度的释放介质,样品过 0.45 μm 微孔滤膜,按 2.2.3 项下条件测定,计算姜黄素及奎纳克林的释放率,绘制释放曲线,见图 3。结果表明姜黄素-奎纳克林脂质体具有缓释作用。

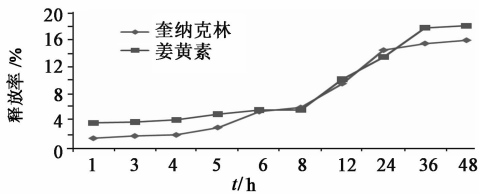


图 3 姜黄素-奎纳克林脂质体中姜黄素和奎纳克林的释放曲线
Fig.3 Release curves of curcumin and quinacrine from curcumin-quinacrine liposomes

2.7 粒径电位的测定 脂质体的平均粒径和多分散系数采用激光粒度仪测定。姜黄素-奎纳克林脂质体在进行粒径分析前用葡聚糖凝胶分离游离药物,取脂质体溶液 0.5 mL,加水稀释至 10 mL,测得粒径 (117.73 ± 0.15) nm; Zeta 电位 (-8.56 ± 0.22) mV,多分散系数 0.12 ± 0.01。粒径分布图见图 4,结果显示脂质体粒径分布较均匀。

3 讨论

预试验选择 PBS 缓冲液作为洗脱液,结果显示姜黄素载药脂质体较易洗脱出来,而游离姜黄素由

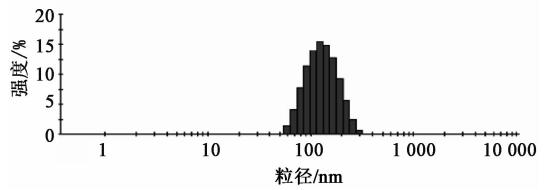


图 4 姜黄素-奎纳克林脂质体的粒径分布
Fig.4 Particle size distribution of curcumin-quinacrine liposomes

于吸附于凝胶柱而难以洗脱。若要使游离姜黄素洗脱下来,需采用对姜黄素较好溶解性的溶剂作为洗脱液。姜黄素易溶于乙醇,理论上可采用乙醇溶剂,故分别考察了体积分数 10%,20%,30%,40% 的乙醇溶液,结果发现凝胶柱严重萎缩,柱效较差。通过反复实验发现,采用含 30% 乙醇的 PBS 缓冲液进行洗脱时,能将游离姜黄素洗脱下来,且对凝胶柱性能影响不大。

由于姜黄素为脂溶性药物,为了包封脂溶性药物,考察了脂质体的制备方法和特点,选择薄膜分散法制备具有较高包封率的脂质体。在考察胆固醇与磷脂的摩尔比对包封率影响时,磷脂-胆固醇摩尔比为 4:1 时,姜黄素脂质体包封率最高,但会出现絮凝现象,故选择了磷脂-胆固醇摩尔比 2:1。可能是因为胆固醇具有稳定脂质双分子膜的作用,可增加膜的有序排列,减少流动性,对于被脂质体包封在内部的脂溶性药物——姜黄素而言,可防止药物泄露,包裹更多的药物,提高包封率。随着磷脂浓度的增加,形成的脂质体增多,包封在脂质体内部的脂相就增大,能包裹更多药物;但若磷脂浓度过大,相同投药量下的载药量下降,而且形成的脂质体容易聚集融合,使药物泄露,会对脂质体的稳定性有一定影响。

本文选用硫酸铵梯度法制备姜黄素-奎纳克林脂质体,该法需用透析法除去脂质体外部的硫酸铵,操作简便,并能提高奎纳克林的包封率。硫酸铵梯度法是一种主动载药法,其原理是硫酸铵水溶液中存在 (NH₄)₂SO₄,SO₄²⁻,NH₄⁺,H⁺ 和 NH₃ 分子,通常维持动态平衡,但在脂质体中各离子对磷脂双分子层的渗透系数不同,随着水中氨分子离开脂质体,质子被保留在脂质体的内水相中,使内水相 pH 变得越低,从而形成 pH 梯度,使奎纳克林包于内水相中。

[参考文献]

[1] Chiu G N, Wong M Y, Ling L U, et al. Lipid-based nanoparticulate systems for the delivery of anti-cancer drug cocktails: Implications on pharmacokinetics and

- drug toxicities [J]. *Curr Drug Metab*, 2009, 10 (8) : 861-874.
- [2] Ali S, Ahmad A, Banerjee S, et al. Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9) :3606-3617.
- [3] Sánchez M, Aranda F J, Teruel J A, et al. New pH-sensitive liposomes containing phosphatidylethanolamine and a bacterial dirhamnolipid [J]. *Chem Phys Lipids*, 2011, 164(1) :16-23.
- [4] Cosco D, Paolino D, Cilurzo F, et al. Gemcitabine and tamoxifen-loaded liposomes as multidrug carriers for the treatment of breast cancer diseases [J]. *Int J Pharm*, 2012, 422(1/2) :229-237.
- [5] Federico C, Morittu V M, Britti D, et al. Gemcitabine-loaded liposomes: rationale, potentialities and future perspectives [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7 (1) : 5423-5436.
- [6] Slingerland M, Guchelaar H, Gelderblom H. Liposomal drug formulations in cancer therapy: 15 years along the road [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(3/4) :160-166.
- [7] Immordino M L, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential [J]. *Int J Nanomedicine*, 2006, 1(3) :297-315.
- [8] Wang X, Yang L Y, Chen Z, et al. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging [J]. *Ca-Cancer J Clin*, 2008, 58(2) :97-110.
- [9] Allen T M, Cullis P R. Drug delivery systems: Entering the mainstream [J]. *Science*, 2004, 303 (5665) : 1818-1822.
- [10] Pizzo P, Scapin C, Vitadello M, et al. Grp94 acts as a mediator of curcumin-induced antioxidant defence in myogenic cells [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14 (4) : 970-981.
- [11] Wang K, Zhang T, Liu L, et al. Novel micelle formulation of curcumin for enhancing antitumor activity and inhibiting colorectal cancer stem cells [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7(17) :4487-4497.
- [12] Gurova K V, Hill J E, Burdelya L G, et al. Small molecules that reactivate p53 in renal cell carcinoma reveal a NF-kappaB-dependent mechanism of p53 suppression in tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(48) :17448-17453.
- [13] Reyes S, Herrera L A, Ostrosky P, et al. Quinacrine enhances carmustine therapy of experimental rat glioma [J]. *Neurosurgery*, 2001, 49(4) :969-973.
- [14] 时军, 黄嗣航, 王小燕, 等. Z-综合评分法优化丹皮酚阳离子脂质体凝胶剂制备工艺 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(3) :32-35.

[责任编辑 刘德文]