

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00202

海参皂苷 nobilisideA 注射用脂质体冻干制剂的制备及其性质考察

郭丹¹, 熊阳², 许玮仪³, 吴忠斌¹, 崔黎丽¹, 陈建明^{1*}

1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433
2. 浙江中医药大学药学院药剂学教研室, 杭州 310053
3. 北京中医药大学中药学院中药分析教研室, 北京 100029

[摘要] **目的:**制备海参皂苷 nobilisideA 冻干脂质体并对其性质进行考察。**方法:**采用薄膜分散法制备了 nobilisideA 脂质体并将其冻干制成 nobilisideA 冻干粉,测定冻干脂质体的药物含量和包封率、粒径、 ζ 电位等指标,考察其与葡萄糖配伍的稳定性和溶血性,了解 nobilisideA 冻干脂质体的性质。**结果:**通过工艺优化,制备了以蔗糖为冻干保护剂的 nobilisideA 冻干脂质体,具有较好的成型性和复溶能力。测得冻干前后 nobilisideA 脂质体的百分含量分别为 108.3% 和 108.6%,包封率分别为 98.4% 和 97.8%,粒径分别为 89.9 nm 和 115.8 nm, ζ 电位分别为 -19.9 mV 和 -15.9 mV。脂质体在葡萄糖输液中 8 h 内含量、包封率、粒径以及溶血率均无明显变化。**结论:**所制得 nobilisideA 冻干脂质体粒径分布范围窄,包封率高,性质稳定,是一种很有应用前景的 nobilisideA 脂质体制剂。

[关键词] 脂质体;nobilisideA;冷冻干燥法;包封率;稳定性

[中图分类号] R 943.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)02-0202-06

Preparation and characterization of *Holothuria nobilis* saponins nobilisideA freeze-dried liposome

GUO Dan¹, XIONG Yang², XU Wei-yi³, WU Zhong-bin¹, CUI Li-li¹, CHEN Jian-ming^{1*}

1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053
3. Department of Analysis and Quality Evaluation of Chinese Herbal Medicines, School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare and characterize nobilisideA freeze-dried liposome. **Methods:** The nobilisideA liposomes were prepared using a film dispersion method followed by a freeze-dried technique. The freeze-dried liposomes were characterized with regard to the drug content, entrapment efficiency, the particle size, ζ potential, and its stability and hemolytic rate in glucose transfusion. **Results:** Through optimized technique, the prepared nobilisideA freeze-dried liposome, with sucrose as protective agent, had satisfactory structure and redissolubility. The contents of nobilisideA liposome before and after freeze-drying were 108.3% and 108.6%, the entrapment efficiency were 98.4% and 97.8%, the particle sizes were 89.9 nm and 115.8nm, and the ζ potentials were -19.9mV and -15.9mV, respectively. The liposome content, entrapment efficiency, particle size and hemolytic rate were stable within 8 h during glucose transfusion. **Conclusion:** NobilisideA freeze-dried liposomes have a narrow size distribution range, a high entrapment efficiency and a stable character, making it a promising candidate for nobilisidesA liposome.

[KEY WORDS] liposomes; nobilisideA; freeze-drying; entrapment efficiency; stability

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(2): 202-207]

海参皂苷 nobilisideA(结构式见图 1)是从黑乳海参中提取出来的三萜皂苷类成分,作为海参体内主要的有毒物质和化学防御物质,其具有较强的抗

肿瘤活性,是很有前景的抗肿瘤药物,目前已经对该化合物申请了专利^[1]。经体内外抗肿瘤活性实验、体内小鼠移植瘤药效实验以及体内外新生血管生成

[收稿日期] 2008-06-20 **[接受日期]** 2008-12-08

[基金项目] 国家高科技研究发展计划(“863”计划,2006AA090304). Supported by the National High-tech R&D Program(“863 Program”, 2006AA090304).

[作者简介] 郭丹,硕士生, E-mail: luckygirl840126@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81874593, E-mail: yjcm@163.com

抑制实验,初步显示该化合物具有肿瘤杀伤兼血管生成抑制作用的双重作用,是一种新型的抗肿瘤新药。但是,nobilisideA 静脉注射具有强烈的溶血作用,对心脏、肾脏具有很强的刺激作用,普通的静脉注射制剂无法直接应用于临床。近年来对抗肿瘤药物的脂质体制剂的研究较多^[2-3]。同时脂质体是一种新型的载体,通过包载药物可降低药物毒性、降低溶血作用(如两性霉素 B^[4]),并且作为具有生物降解性和生物相容性载药系统,脂质体已得到广泛研究和应用,是已经上市的可用于静脉注射的纳米给药载体^[5]。鉴于脂质体作为给药系统的诸多优点,本研究制备了 nobilisideA 脂质体,旨在降低其毒副作用,提高其肿瘤靶向性和临床疗效。但是液体脂质体在贮存过程中,易出现聚结、分层等不稳定现象。本研究以薄膜超声法将 nobilisideA 制成了脂质体,再通过冷冻干燥将其制备成冻干制剂,以期在降低毒性的同时,更好地发挥其生物活性的作用,保持其在贮存中的稳定性。

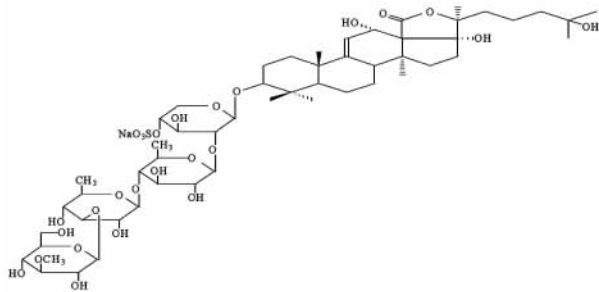


图1 NobilisideA 的结构式
Fig 1 Structure of nobilisideA

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),Agilent 化学工作站(G1311A 泵,G1314A 紫外检测器,美国安捷伦公司);Alltech ELSD 2000ES 型蒸发光散射检测器(美国奥泰科技有限公司);Agilent SB-C₁₈ 色谱柱;UV2100 型紫外可见分光光度计(日本,SHIMADZU);XWK-3A 空气泵(天津分析仪器厂);Hitech-Kflow 超纯水机,MRTTLER TOLEDO G135 电子天平(德国梅特勒公司);JEOL-2010 型透射电子显微镜(日本电子公司);TGL-16C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);CENTRIFUGE MODEL 0406-1 低速台式离心机(上海医疗器械集团有限公司手术器械厂);JY92-II N 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);R-205 型旋转蒸发仪

(瑞典 BUCHI 公司);NANO-S 型 Zetasizer 纳米粒径分析仪(英国马尔文仪器公司);Advantage 型冷冻干燥机(美国 Virtis);注射用大豆磷脂(S80,上海太伟有限公司,注射级);nobilisideA 对照品(由第二军医大学药学院海洋药物研究室提供,纯度 ≥ 98%);胆固醇(国药集团化学试剂有限公司,注射级);药用蔗糖(云南省勐永药业有限公司,注射级);甘露醇(国药集团上海化学试剂公司,注射级);海藻糖(广西南宁杰沃利生物制品有限公司,注射级);葡萄糖(国药集团上海化学试剂公司,注射级);乳糖(上海定康医药化工有限公司,注射级);果糖(上海定康医药化工有限公司,注射级);麦芽糖(上海定康医药化工有限公司,注射级);山梨醇(国药集团上海化学试剂公司,注射级);5%葡萄糖注射液(上海百特医疗用品有限公司);0.9%氯化钠注射液(浙江天瑞药业有限公司);Sephadex G-50(瑞典 Pharmacia 公司进口分装,40~150 μm);水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

1.2 NobilisideA 冻干脂质体以及空白冻干脂质体的制备

采用薄膜超声法制备。取适量的磷脂与胆固醇(W/W 为 2:1),置茄形瓶中,加入无水乙醇和氯仿(V/V 为 7:3)的混合液,振荡使完全溶解,即得类脂溶液。将茄形瓶置旋转蒸发器上,于 50℃ 减压蒸发溶剂使类脂溶液形成一层均匀薄膜。向薄膜中加入 nobilisideA 不同介质溶液 10 ml,轻摇,将类脂膜洗脱并水合成含药脂质体混悬液,再将含药脂质体水浴超声 45 min,直至近透明,200 W 探头超声 1 min(工作 6 s,间隙 6 s,共 10 次),过 0.22 μm 的微孔滤膜除去超声过程中可能脱落下来的金属屑,于冰箱 4℃ 保存备用。将所得的 nobilisideA 脂质体加入支撑剂预冻 5 h 后冷冻干燥,即得 nobilisideA 冻干脂质体。上述的水化介质中不加入 nobilisideA,同法操作即可制得空白冻干脂质体。

1.3 NobilisideA 冻干脂质体含量及包封率的测定

采用微柱离心法^[6]测定所制得 nobilisideA 冻干脂质体的包封率。

1.3.1 含量以及包封率测定的 ELSD-HPLC 色谱条件

色谱柱:Agilent SB-C₁₈ 反相色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.5%醋酸(A:B),二元梯度洗脱:28%B~20%B(0~5 min),20%B~2%B(5~12 min),2%B~0%B(12~25 min);平衡时间 5 min;流速 1 ml·min⁻¹;柱温:室温;检测器为蒸发光散射检测器;漂移管温度:80℃;空气流量:2.0 L·min⁻¹;撞击器:关;进样量:20 μl。

1.3.2 方法专属性考察

取 nobilisideA 对照品溶

液、空白冻干脂质体破乳液和 nobilsideA 冻干脂质体水合后破乳液各 20 μl 进样分析。

1.3.3 线性关系考察 精密称取 nobilsideA 对照品 15.00 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 加 50% 甲醇定容至刻度, 制得 1.500 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的对照品贮备液。精密量取对照品贮备液 20、40、80、160、240、320 μl 置于 5 ml 容量瓶中, 加 50% 甲醇定容, 摇匀后得 6、12、24、48、72、96 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 一系列浓度溶液。精密吸取 6 个不同浓度的对照品溶液各 20 μl 分别注入色谱仪, 记录色谱图和积分峰面积, 以浓度的自然对数为横坐标, 峰面积的自然对数为纵坐标, 进行线性回归, 计算回归方程。

1.3.4 精密度实验 日内精密度: 精密吸取高(96 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)、中(48 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)、低(6 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)浓度对照品溶液各 20 μl , 重复进样 6 次, 根据标准曲线计算 nobilsideA 的浓度, 计算 RSD 值。日间精密度: 精密吸取高(96 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)、中(48 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)、低(6 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)浓度对照品溶液各 20 μl , 于 3 d 内每天测定, 根据每天的标准曲线计算 nobilsideA 浓度和 RSD 值。

1.3.5 NobilsideA 冻干脂质体回收率的考察 取蒸馏水重建后的空白冻干脂质体 200 μl 于量瓶中, 分别加入不同量的对照品储备液, 各加入甲醇和异丙醇的混合液破乳并稀释至刻度, 摇匀, 17 000 $\times g$ 离心 5 min, 取上清液作为供试品溶液, 按上述色谱条件测定峰面积, 代入回归方程换算成浓度, 计算加样回收率(回收率 = 测定浓度 / 配制浓度 $\times 100\%$)。

1.3.6 NobilsideA 冻干脂质体含量测定 分别精密吸取 3 批冻干前以及用蒸馏水重建后的 nobilsideA 冻干脂质体 200 μl 于 2 ml 量瓶中, 加入甲醇和异丙醇的混合液破乳并稀释至刻度, 17 000 $\times g$ 离心 5 min, 取上清液作为供试品溶液, 测定含量, 按外标法计算出样品溶液中 nobilsideA 的含量。

1.3.7 NobilsideA 冻干脂质体包封率的测定 分别精密吸取 3 批冻干前以及用蒸馏水重建后的 nobilsideA 冻干脂质体混悬液 0.1 ml, 缓缓加于微柱顶部, 28 $\times g$ 离心 3 min。由柱顶部反复加入相同体积的蒸馏水, 每次 448 $\times g$, 收集洗脱液, 重复以上操作, 合并前 0.5 ml 洗脱液, 用异丙醇稀释至 2 ml, 摇匀。按包封率以及含量测定的色谱条件进样, 测定峰面积, 代入标准曲线计算 nobilsideA 的含量; 另分别精密吸取冻干前以及重建后 nobilsideA 冻干脂质体混悬液 0.1 ml, 用异丙醇破乳定容至 2 ml, 摇匀, 同法测定, 计算包封率。

1.4 NobilsideA 冻干脂质体溶血和凝聚的检查

按照药典规定, 有无溶血及凝聚的结果判断如下: 以阴性对照管无溶血和凝聚现象发生, 阳性对照管有溶血发生时, 若供试品管中的溶液在 3 h 内不产生溶血和凝聚, 认为供试品符合注射规定^[7]。

1.5 NobilsideA 脂质体以及空白脂质体冻干前后的粒径、 ζ 电位以及电镜形态的考察

1.5.1 粒径的考察 分别取冻干前后的空白脂质体和 nobilsideA 脂质体, 以蒸馏水为分散介质稀释适当倍数, 采用 Zetasizer 粒径测定仪测定粒径, 测定温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 黏度为 0.887 2 $\text{MPa} \cdot \text{s}$, 此仪器所测定的粒径范围为 0.6~6 000 nm。

1.5.2 ζ 电位的考察 分别取冻干前后的空白脂质体和 nobilsideA 脂质体, 稀释适当倍数, 用 ζ 电位测定仪测定其 ζ 电位。

1.5.3 电镜下形态学考察 分别取冻干前后 nobilsideA 脂质体混悬液适量, 滴加在铜网上, 用滤纸吸干多余的液体后, 室温干燥水分, 置于透射电镜下观察脂质体形态。

1.6 NobilsideA 脂质体与葡萄糖注射液的配伍稳定性考察 取 nobilsideA 冻干脂质体 10 支, 加葡萄糖注射液 50 ml 复溶, 于室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置, 分别于 0、2、4、8 h 取样, 测定其含量、粒径分布及包封率以及溶血率变化。

2 结果

2.1 制备工艺的筛选

2.1.1 不同水化介质对 nobilsideA 冻干脂质体的影响 不同的水化介质对脂质体粒径、包封率及溶血率的影响结果见表 1。结果表明: 5% 葡萄糖注射液会增大复溶后冻干脂质体的粒径, 但对包封率和溶血率没有影响; 而 pH 6.8 的磷酸缓冲盐及注射用水对复溶后冻干脂质体的粒径、溶血率以及包封率方面均无统计学差异, 为了简便本实验中选取注射用水作为水化介质。

表 1 水化介质对脂质体处方的影响

Tab 1 Effect of hydration medium on formula of liposome

Hydration medium	EE/%	HR/%	PS d/nm
Injectable water	95.7	0.44	85.1
Phosphate buffer solution	94.9	0.50	89.0
5% glucose injection	94.5	0.43	95.1

EE: Entrapment efficiency; HR: Hemolysis rate; PS: Particle size

2.1.2 冻干保护剂的选择 本实验分别将甘露醇、山梨醇、蔗糖、海藻糖、乳糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖作

为冻干保护剂进行考察,将冻干保护剂与脂质(磷脂与胆固醇的质量之和)质量比例固定为 2.5 : 1。实验结果表明,甘露醇作为保护剂其成型性较好,冻干产品外观饱满,但再分散性差,发生粒子的聚合导致粒径增大;山梨醇作为保护剂成型性较差,冻干产品色泽不佳,水化后有很多肉眼可见的颗粒;蔗糖和海藻糖作为保护剂两者对脂质体的保护作用均较好,再分散性很好,且脂质体复溶后粒径较小,但冻干品略有萎缩的现象。乳糖和麦芽糖作为保护剂的冻干效果不好,虽然再分散性较好,但是起泡现象严重;葡萄糖、果糖作为保护剂同样起泡现象严重。经过筛选,确定以蔗糖为脂质体的冻干保护剂,进一步确定其用量,其中蔗糖与脂质质量比例在 5 : 1 时比 2.5 : 1 的比例外观较好,而 7.5 : 1 时的外观与 5 : 1 时没有明显的改善,因此确定蔗糖和脂质质量比为 5 : 1。

2.1.3 冻干工艺的筛选 预冻温度对冻干产品的质量有很大影响,适宜的预冻温度可以保证样品冻实,否则会引起干燥过程中药液喷瓶,冻干后样品萎缩或塌陷。为保证样品完全冻实,并考虑到机器的冷冻温度范围,在预冻过程中选择层板温度为 -55°C ,预冻时间为 5 h。蔗糖作为冻干保护剂的缺点是表面略有萎缩,这可能是由于预冻后升温的温度高于其玻璃化转变温度,因此考虑降低第 1 次升温的起点温度,但由于如果温度低,真空度也低,水分得不到及时蒸发,冻干效率会比较低,所以采取温度逐渐升高,真空度适当降低的方式结合。通过筛选,最后确定了整个冻干过程真空度和温度设置,结果见表 2。

2.2 NobilsideA 冻干脂质体含量及包封率的测定

2.2.1 专属性考察 在该色谱条件下,辅料和试剂对药物测定无干扰,nobilsideA 的保留时间约为 7.4 min。

2.2.2 线性关系考察 以峰面积 A 的对数和浓度 C 的对数进行线性回归,得回归方程为 $\ln C = \ln A \times 0.7281 - 0.8246$,相关系数 $r = 0.9993$ 。表明 nobilsideA 在 $0.120 \sim 1.92 \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。

2.2.3 精密度实验 日内精密度及日间精密度 RSD 值均小于 3%,符合测定要求。

2.2.4 回收率 平均回收率为 99.12%,RSD($n=9$)为 1.56%。

2.2.5 NobilsideA 冻干脂质体含量以及包封率的测定 冻干前含量为 $(108.3 \pm 0.90)\%$,包封率为 $(98.4 \pm 1.1)\%$;冻干后含量以及包封率均未发生明显的变化 [$(108.6 \pm 1.08)\%$ 和 $(97.8 \pm 0.99)\%$],说明在冻干的过程中无损失或药物稳定的现象发生。

表 2 NobilsideA 脂质体的冻干条件

Tab 2 Freeze-drying condition of nobilsideA liposome

Step	T $\theta/^{\circ}\text{C}$	Time t/min	R/H*	Vacuum (mtorr)
Thermal treatment	-55	300	H	
Drying cycle steps	-40	60	R	200
	-35	120	R	150
	-30	360	R	100
	-25	120	H	100
	-15	60	H	100
	-10	60	H	100
	-5	60	R	100
	0	120	R	100
	5	60	R	100
	10	60	R	100
Secondary drying step	15	60	R	100
	20	180	R	100
	25	60	R	100
	25	120	R	100

* H: Hold. Hold will adjust shelf temperature as rapidly as possible to the new setpoint and hold that temperature; R: Ramp. Ramp will ramp the shelf temperature from its previous value to the new value. 1 mtorr = 0.133 Pa

2.3 NobilsideA 冻干脂质体溶血和凝聚的检查

NobilsideA 脂质体冻干粉水化液 0.3 ml 管,在 3 h 内未产生溶血作用,因此认为符合规定。结果见表 3。

2.4 NobilsideA 脂质体以及空白脂质体冻干前后的粒径 冻干前空白脂质体的平均粒径为 $(81.9 \pm 0.39) \text{ nm}$ ($n=3$),PDI (particle distribution index) 为 0.090 ± 0.02 ;冻干前 nobilsideA 脂质体的平均粒径为 $(89.9 \pm 0.33) \text{ nm}$ ($n=3$),PDI 为 0.131 ± 0.01 ;冻干后空白脂质体的平均粒径为 $(107.6 \pm 0.56) \text{ nm}$ ($n=3$),PDI 为 0.140 ± 0.01 ;冻干后 nobilsideA 脂质体的平均粒径为 $(115.8 \pm 0.53) \text{ nm}$ ($n=3$),PDI 为 0.171 ± 0.01 。结果表明冻干后粒径略有增大,但不明显,仍然符合要求。

2.5 ζ 电位的考察 冻干前后空白脂质体 ζ 电位分别为 -16.6 mV 和 -14.5 mV ($n=3$);冻干前后 nobilsideA 脂质体 ζ 电位分别为 -19.9 mV ($n=3$) 和 -15.9 mV ($n=3$)。结果表明冻干前后 ζ 电位值略有下降。

2.6 电镜形态的考察 NobilsideA 脂质体在冻干后粒径略有增大,但是脂质体仍然与冻干前一样较为圆整,可以明显地看到脂质双分子层膜。冻干后脂质体未发生破裂现象。结果见图 2。

2.7 NobilsideA 脂质体与葡萄糖注射液的配伍稳定性考察 NobilsideA 脂质体与葡萄糖配伍稳定性

实验中药物含量,粒径变化及包封率、溶血率情况结果见表4。视0h的药物含量为100%。NobilisideA

冻干脂质体8h内药物的含量、包封率、粒径、溶血性均无明显改变,可以满足临床使用要求。

表3 NobilisideA冻干脂质体的溶血和凝聚检查
Tab 3 Hemolytic test design of nobilisideA freeze-dried liposome

Tube number	2% RBC suspension V/ml	Normal saline V/ml	Distilled water V/ml	NobilisideA liposome suspension V/ml	Result of hemolytic activity
1	2.5	2.2	0	0.3	-
2	2.5	2.2	0	0.3	-
3	2.5	2.5	0	0	-
4	2.5	0	2.5	0	+
5	0	4.7	0	0.3	-

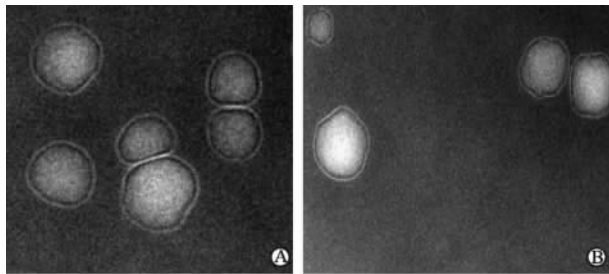


图2 NobilisideA脂质体冻干前(A)、后(B)的电镜照片
Fig 2 Transmission electron micrographs of nobilisideA liposomes before (A) and after freeze-drying(B)

表4 NobilisideA脂质体与葡萄糖注射液的配伍稳定性
Tab 4 Stability of nobilisideA liposome when combined with glucose injection

Time t/h	Content/%	Encapsulation efficiency/%	Mean particle size d/nm	Hemolytic rate/%
0	100.0	93.8	131.3	0.39
2	103.0	98.8	130.0	0.52
4	99.0	94.8	129.9	0.26
8	101.1	95.9	129.2	0.66

3 讨论

脂质体的制备涉及到3个最为关键的步骤就是磷脂的水化、粒度的控制以及药物的装载^[8]。由于制备脂质体时加入了胆固醇,为了得到磷脂、胆固醇两者均匀分散的产物,需要特殊的处理。通常将膜材溶于有机溶剂中减压蒸发后得到一层干燥的膜,加入水化介质水化膜层即可。而水化介质对溶血率、包封率均无明显影响,考虑到脂质体以后在冻干的过程中还需加入冻干保护剂,而且缓冲盐或葡萄糖还有可能影响到冻干效果,因此在本实验中选择以水为水化介质。

文献^[9]中测得当浓度为15%时葡萄糖、蔗糖、甘露醇、海藻糖的玻璃化转变温度分别为-38.5、

-32.4、-30.4、-29.2℃,即在相同浓度时这几种冻干保护剂的玻璃化转变温度逐渐升高,按照玻璃态假说,这可以解释本研究葡萄糖的保护效果较差而蔗糖、海藻糖保护效果较好的实验结果。但无法解释甘露醇虽然玻璃化转变温度较蔗糖高但保护效果很差的原因。甘露醇作为脂质体保护剂具有反玻璃化现象^[10],反玻璃化转变现象是指用DSC测量的玻璃化转变曲线中,在玻璃化转变后有一个明显的放热峰。若出现反玻璃化峰,则表明此种保护剂对脂质体的冻干保护效果差。以甘露醇作保护剂的nobilisideA脂质体冻干前后粒径变化较大,这可能与含有甘露醇的脂质体溶液在复温过程中产生的反玻璃化有关。

本实验根据冻干机的温度设定范围,将预冻层板设为-55℃,在选用蔗糖为保护剂时,能够较为迅速的降到其玻璃化转变温度以下,使脂质体混悬液最大程度实现玻璃化,减少了冰晶对脂质体膜的破坏,同时冰晶迅速增长。在预试时曾比较-70℃预冻与-55℃预冻对粒径和再分散性的影响,发现两者无区别,而-70℃预冻比较麻烦,需要先在超低温冰箱中冷冻,然后再放入冻干机中,此时还需将层板温度预先降到-55℃,且不利于操作。因此选择了-55℃预冻。

本实验中冻干后样品萎缩或塌陷与预冻温度以及升温过程有着密切的关系,而在整个的升温过程中第一次升温的起点温度以及真空度的设定至关重要。冻干制品在整个冻干过程中,温度必须低于制品的玻璃化温度,以防止制品出现塌陷、表面萎缩、结块、变硬、变色等不良症状。因此在选择5%蔗糖作为冻干保护剂后我们先后分别选择了-40℃、-35℃、-30℃作为冻干的初始温度,从外观以及复溶后粒径的差别中我们最后选择-40℃作为主干燥阶段的初始温度。但由于如果温度低,真空度也低,

水分得不到及时蒸发,冻干效率会比较低,所以在升温的初始阶段考察不同的真空度后得到的结果最终选择较高真空度。升华干燥阶段如果升温过快或由于板层温度差异太大,导致产品还有较大水分时超过产品共熔或部分共熔点,就会引起制品的萎缩,因此在整个升温的过程中采取以 5℃ 升温为一个阶段的逐渐升温过程且真空度降低的方式。

本实验采用微柱离心法测定 nobilisideA 冻干脂质体的包封率,测定结果表明包封率在冻干前后没有明显的变化,且该方法测定的药物以及空白脂质体的回收率均能达到要求。在预实验中,曾考察了葡聚糖柱层析法测定药物的包封率,此方法对药物以及空白脂质体的包封率均能达到要求,但是此方法较微柱离心法耗时长,同时对脂质体有稀释作用的缺点,因此最终选用微柱离心法测定。

NobilisideA 脂质体与空白脂质体相比,冻干前后的 ζ 电位绝对值都有所升高。这与其他文献^[10]报道不很一致,如盐酸米托蒽醌传递体与磷脂之间有相互作用,盐酸米托蒽醌的炔氨基侧链与卵磷脂磷酸基团之间产生静电吸引,使含药传递体的 ζ 电位绝对值比空白传递体减少。这可能是由于 nobilisideA 与胆固醇作用更强烈,使原来磷脂与胆固醇之间的静电吸引力减弱的原因。

由于药物具有很强的溶血性,nobilisideA 直接与葡萄糖配伍时不能直接用于临床,而将 nobilisideA 制备成冻干脂质体后与葡萄糖溶液的配伍实验结果表明 8 h 内脂质体溶液的含量、包封率、粒径

均无明显的变化,且大大的降低了原药的溶血性。

[参考文献]

- [1] 易杨华,丁健,李玲,章雄文,巫军,陈奕,等.黑乳海参中抗肿瘤化合物 nobilisideA 及其单乙酰化衍生物:中国,200510029586.5[P].2006-03-01.
- [2] Zhang J A, Anyarambatla G, Ma L, Ugwu S, Xuan T, Sardone T, et al. Development and characterization of a novel Cremophor EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 59:177-187.
- [3] 何文,吴燕,代文兵,陈健.羟基喜树碱包衣纳米脂质体的制备及在小鼠体内组织分布的研究[J].中国药理学杂志,2006,41:196-200.
- [4] Portney N G, Ozkan M. Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 384:620-630.
- [5] 崔福德.药剂学[M]//邓英杰,邓意辉.脂质体及类脂质体.北京:中国医药科技出版社,2002:491-498.
- [6] 熊阳,郭丹,郑肖利,孙鹏,徐莲英,陈建明.海参皂苷 nobilisideA 脂质体及其溶血行为的初步研究[J].药学学报,2008,43:214-20.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].一部.北京:化学工业出版社,2005;附录 XVIII B.
- [8] 邓英杰.脂质体技术[M]//李春雷.脂质体制备方法.北京:人民卫生出版社,2007:30-36.
- [9] 刘占杰,华泽钊,陶乐仁,刘宝林.不同保护剂浓度和不同降温速率对脂质体玻璃化转变温度的影响[J].低温工程,2000(6):1-5.
- [10] 陈彤,侯世祥,石碧琼,郑王禹,孙毅毅,田云飞.盐酸米托蒽醌传递体的包结机理研究[J].生物医学工程学报,2005,22:555-559.

[本文编辑] 贾泽军

• 书 讯 •

《人工关节置换手术学》已出版

本书由徐林编著,ISBN 978-7-81060-698-1,16开,价格(估):80元。

全书共14章,涵盖人体主要关节的置换及其多方面的发展史,对每一关节均系统介绍其解剖、生物力学、诊断及治疗方法与步骤、并发症的处理、康复训练及效果评估、翻修手术和该关节的特殊病变的置换。此外,还专门阐述人工椎间盘的置换、导航技术、步态分析及互联网在关节外科的应用。本书适合关节外科医生、骨科医生参考应用。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>