

脂质体稳定, 重复性良好。

包封率是评价脂质体制剂质量好坏的最重要指标, 也是其能否发挥较普通制剂高效、低毒特点的关键。测定包封率时通常将游离药物与脂质体进行分离, 分别测定游离药物量和制剂中总药物量, 计算包封率。常见的分离方法有透析法、超速离心法、葡聚糖凝胶法、超滤膜过滤法等^[8]。透析法不适用于除去大分子药物, 透析过程缓慢, 而且使用的透析液的渗透压应与脂质体混悬液的渗透压相同, 否则会引起脂质体的体积发生变化, 导致药物泄漏^[9]。由于该脂质体粒径较小, 采用较长时间的超速离心也不能完全分离脂质体和游离药物, 而且长时间的超速离心, 难以避免脂质双分子层严重破坏。本实验采用葡聚糖凝胶法测定包封率, 可以使复方脂质体和游离药物达到有效分离, 柱回收率达 95% 以上。本法方便快捷、容易操作、重复性好, 更适用于生产过程中的质量控制。

5-Fu 和 Amp 单一成分的含量测定方法有多种。本实验采用紫外分光光度法直接对二者进行测定, 方法简便、快速, 而且准确, 可适用于常规分析和质量控制。

粒径大小及其分布是影响脂质体在体内靶向性、物理稳定性及临床安全性的重要指标, 因此, 粒径大小成为该脂质体质量控制的关键之一^[11]。本实验采用了激光粒度仪对 Amp-5-Fu 脂质体的粒径及分布进行了测定, 结果表明, 粒径 < 145 nm, 大小均匀, 呈正态分布。

体外释药实验表明, Amp-5-Fu 脂质体的前期释药较快, 后期释药缓慢。未包封的游离药物先迅速释放出来, 而包封于脂质体中的药物释放缓

慢, 起到了长效缓释作用。

本实验成功将两种抗肿瘤药物 5-Fu 和 Amp 同时包封于脂质体给药系统制备成复方脂质体, 所采用的制备工艺简单可行, 重复性好, 包封率较高。体外释药实验表明, 复方脂质体具有一定的缓释作用, 延长药物的释放时间。

REFERENCES

- [1] LEUCUTA S E. Nanotechnology for delivery of drugs and biomedical applications [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2010, 5(4): 257-280.
- [2] AJAZUDDIN S S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(7): 680-689.
- [3] LIU D Y, LUO M, XIE B F, et al. Antitumor effects of ampelopsin [J]. *Chin J Cancer(癌症)*, 2001, 20(12): 1372-1375.
- [4] YE J T, ZHENG Y L, LIU D Y. Reversal effect and its mechanism of ampelopsin on multidrug resistance in K562/ADR cells [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2009, 34(6): 761-765.
- [5] HE Z F, LIU D Y, ZENG S, et al. Study on preparation of ampelopsin liposomes [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2008, 33(1): 27-30.
- [6] SAMAD A, SULTANA Y, AQIL M. Liposomal drug delivery systems: an update review [J]. *Curr Drug Deliv*, 2007, 4(4): 297-305.
- [7] GAO J K, FAN K, HOU Z J, et al. Preparation and evaluation of liposome-encapsulated recombinant human ciliary neurotrophic factor [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2011, 28(2): 146-149.
- [8] DENG Y J. *Liposomes Techniques(脂质体技术)* [M]. Beijing: People's Medical Press, 2007: 70.
- [9] CHEN Z H, LIU B Y, WEI Y C. Progress of research on methods for determination of liposomal encapsulation efficiency [J]. *Pharm J Chin PLA(解放军药学报)*, 2011, 27(1): 79-82.
- [10] QU J J, FENG S H, LI K Y. Preparation and quality evaluation of artemisinin liposomes [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2011, 28(3): 251-256.

收稿日期: 2012-03-23

硫酸长春新碱固体脂质纳米粒的制备及其性质考察

夏爱晓¹, 宋倩倩², 孙渊¹, 周鹏¹, 杜有功¹, 李范珠^{2*} (1. 浙江省台州医院药剂科, 浙江 临海 317000; 2. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要: 目的 以单硬脂酸甘油酯为载体材料, 采用复乳溶剂挥发法制备硫酸长春新碱固体脂质纳米粒(VCR-SLN), 并考察其理化性质。方法 采用复乳溶剂挥发法制备 VCR-SLN, 以正交设计优化处方及制备工艺, 并考察其形态、粒径、Zeta 电位、包封率、载药量和体外释放。结果 VCR-SLN 为类球形实体粒子, 平均粒径为(144.83±2.71)nm, Zeta 电位为

作者简介: 夏爱晓, 女, 硕士, 药师 Tel: (0576)85199450 E-mail: aixiao13579@163.com *通信作者: 李范珠, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0571)86633030 E-mail: Lifanzhu@zjctm.net

(-24.77±0.513)mV, 包封率为(40.54±0.45)%, 载药量为(1.14±0.074)%。药物体外释放曲线符合 Weibull 方程。结论 复乳溶剂挥发法适用于制备硫酸长春新碱固体脂质纳米粒。

关键词: 制备工艺; 硫酸长春新碱; 固体脂质纳米粒

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)01-0163-07

Preparation and Characterization of Vincristine Sulfate-loaded Solid Lipid Nanoparticles

XIA Aixiao¹, SONG Qianqian², SUN Yuan¹, ZHOU Peng¹, DU Yougong¹, LI Fanzhu^{2*} (1.Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Department of Pharmacy, Linhai 317000, China; 2.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare vincristine sulfate-solid lipid nanoparticles(VCR-SLN) with single stearic acid glyceride as its lipid matrix and investigate its characterization. **METHODS** Multiple emulsion-solvent diffusion technique was adopted to prepare VCR-SLN and the orthogonal design was applied to optimize its formula and technology. Its morphology, particle size, ζ potential, drug entrapment efficiency, drug loading capacity and *in vitro* release of the VCR-SLN were investigated. **RESULTS** VCR-SLN were spherelike and smooth, the mean particles size was (144.83±2.71)nm, ζ potential was (-24.77±0.513)mV, entrapment efficiency was (40.54±0.45)%, drug loading capacity was (1.14±0.074)%. The release profile of vincristine sulfate *in vitro* fitted Weibull equation. **CONCLUSION** VCR-SLN can be prepared very well by multiple emulsion-solvent diffusion technique.

KEY WORDS: preparation; vincristine sulfate; solid lipid nanoparticles

长春新碱(VCR)是一种双吲哚型生物碱,为夹竹桃科植物长春花中提取的有效成分,疗效比长春碱强约 10 倍,可用于治疗急性淋巴细胞性白血病,疗效较好,对其他急性白血病、何杰金氏病、淋巴肉瘤、网状细胞肉瘤和乳腺癌也有疗效^[1-3]。长春新碱虽然抗肿瘤作用良好,但神经毒性大,对光不稳定,给临床使用带来诸多不便利。固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)采用生理兼容耐受性好的类脂材料为载体,为非脂质体的双分子层结构。Müller 称其为“后脂质体给药系统”,它以多种固态的天然或合成的类脂材料,如磷脂、三酰甘油、脂肪酸、脂肪醇等形成的固体颗粒,能将药物包封于类脂核中或吸附在颗粒表面。这种微粒具有类细胞结构,进入人体内主要被网状内皮系统吞噬而启动机体的自身免疫功能,并改变被包封药物的体内分布,使药物主要在骨髓、脾、肺和肝等组织器官中积蓄,从而提高药物的治疗指数^[4-6]。SLN 能控制药物释放,避免药物降解或泄漏,并具有缓控释、靶向、低毒等优点^[7],主要用于静脉给药,达到控释或靶向作用;也可用于口服给药,以控制药物在胃肠道内的释放,亦可经透皮和眼部给药。靶向制剂可降低长春新碱神经毒性等不良反应,并提高其体外稳定性和疗效,目前其新制剂长春新碱脂质体正

在临床试验研究,而 SLN 具备了脂质体的一些优点外,还有一定的控释和靶向性,物理化学性质更加稳定,并可多途径给药。

SLN 的制备方法一般有以下几种:①薄膜接触法:装置简单,粒径可控,载药量大,适合于工业生产,但 SLN 质量分数较低,制备影响因素较多;②熔融-超声法:避免有机溶剂污染,操作简便,但粒径较大,不适于热敏性药物;③高剪切乳化超声法:操作简便,但粒度分布不均;④高压乳匀法:操作简便,粒径小且分布窄,避免有机溶剂污染,适合工业生产,但不适于热敏性药物;⑤微乳法:制备简单,粒径较小,分散过程不需要额外的能量,但稀释中是分散液中 SLN 含量较低,且需要大量的乳化剂和助乳化剂;⑥乳化蒸发-低温固化法:操作简便,但有机溶剂难于除尽,使药物具有潜在毒性,易于析出晶体^[8];⑦乳化-溶剂挥发法:避免高温加热,粒径较小,比较适合用于亲水性药物,如蛋白、多肽类 SLN 的制备。近些年来出现的新方法如超临界流体法,此法可避免大量使用有机溶剂及由此而造成的环境污染和除去产品中残留有机溶剂的繁琐步骤,并可用于热敏感、结构不稳定及易失活变性的蛋白质、多肽类药物^[9-10],可解决大部分方法对水溶性药物包封效率低、药物突释等缺点,但是该方

法需要特殊的超临界装置。本实验以单硬脂酸甘油酯(GMS)、卵磷脂为载体材料,采用复乳溶剂挥发法制备硫酸长春新碱 SLN,在单因素考察的基础上,以正交设计优化处方及制备工艺,并考察其形态、粒径、Zeta 电位、包封率、载药量和体外释放性能。

1 仪器与材料

Labconco 冷冻干燥机(美国 Labconco 公司); TGL-16B 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); Marvern Measurement 粒度测定仪(英国马尔文仪器有限公司); Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); UV-1700 紫外分光光度计(日本岛津公司); HJ-6B 多头磁力加热搅拌机(金坛市金伟实验仪器厂); CP225D 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司); Mill-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司); RE52CS 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); JEM-1200EX 透射电子显微镜(日本 Jeol 公司)。

硫酸长春新碱(海南长春花药业有限公司,纯度>98%,批号 20100902);泊洛沙姆 188(德国 BASF 公司,批号 WPAF538B);单硬脂酸甘油酯(法国嘉法狮公司,批号 127339);硬脂酸(德国 Cognis 公司,批号 CG43060020);大豆卵磷脂(上海国药集团化学试剂有限公司,批号 W20100601);胆酸钠(Sigma 公司,批号 104K0060);聚乙烯醇(Sigma 公司, Mw=13 000~23 000 Da,批号 10918AE);三乙胺、甲醇(美国 Honeywell Burdick&Jackson 公司);磷酸(色谱纯,美国 TEDIA 公司);透析袋(截留分子量为 7 000 Da,上海绿鸟科技发展有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 硫酸长春新碱含量测定

2.1.1 色谱条件 采用 HPLC 法,色谱柱:Hypersil ODS2 C₁₈ 柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-三乙胺(140:60:1)(磷酸调 pH=7.0);流速:1.0 mL·min⁻¹;柱温:35 °C;检测波长:297 nm,进样量为 20 μL。出峰时间为 6.080 min。

2.1.2 标准曲线绘制 精密称取硫酸长春新碱 1.0 mg 置于 10 mL 量瓶中,用蒸馏水溶解并定容至刻度作为对照储备液。精密量取一定量对照储备液用甲醇定容至刻度,制得浓度为 1, 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 μg·mL⁻¹ 系列标准溶液。按“2.1.1”项下色谱条件进行分析,记录峰面积,以硫酸长

春新碱浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,得到回归方程: $A=21.394\ 3C-5.985\ 1$, $r=0.999\ 8(n=8)$ 。

2.1.3 包封率和载药量测定 采用聚结离心法结合 HPLC 法测定包封率(entrapment efficiency, EE)与载药量(drug loading, DL)。精密量取硫酸长春新碱固体脂质纳米粒胶体溶液 1.00 mL,采用 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸调节 pH 到 1.2 絮凝纳米粒,再将其加入具塞离心管中,超速离心(室温, 15 000 r·min⁻¹, 40 min)后取上清液 20 μL,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液按“2.1.1”项下色谱条件测定,计算上清液中硫酸长春新碱含量,记作 W₁;另精密量取硫酸长春新碱固体脂质纳米粒胶体溶液 1.00 mL,加入乙醇适量超声,定容至 10.00 mL,同法求得纳米粒中总的硫酸长春新碱含量,记作 W₀;将 1.00 mL 硫酸长春新碱固体脂质纳米粒胶体溶液冻干后称重,记作 W_t。按以下公式分别计算 SLN 的包封率和载药量: $EE/\%=(W_0-W_1)/W_0\times 100\%$; $DL/\%=(W_0-W_1)/W_t\times 100\%$ 。

2.2 正交实验设计

根据单因素考察结果,选择 GMS 用量(A)、GMS 与大豆卵磷脂质量比(B)、泊洛沙姆 188 浓度(C)、复乳超声时间(D)为试验因素,各因素选取 3 个水平,见表 1。按正交设计表 L₉(3⁴)安排实验,以粒径、包封率为考察指标。初乳超声条件为涡旋 30 s+探头超声 20 s(200 W, 超声 1 s, 间歇 1 s),搅拌速度为 1 000 r·min⁻¹;复乳超声乳化,功率为 300 W。

表 1 正交试验因素水平表

Tab 1 Factors and levels in the orthogonal design

水平	因素			
	A 单硬脂酸甘油酯/mg	B 单硬脂酸甘油酯:大豆卵磷脂	C 泊洛沙姆 188/%	D 复乳超声时间/s
1	40	3:1	1.0	30
2	45	4.5:1	1.5	60
3	50	5:1	2.0	90

2.2.1 正交实验结果 应用加权分析法对正交实验结果进行综合分析,粒径(y₁)和包封率(y₂)分别按 55%和 45%的系数积分,综合评分(y)=55(1-y₁/179.1)+45×y₂/42.6。结果见表 2 和表 3。

表 2 正交试验方案和结果

Tab 2 Design and result of orthogonal design

实验号	因素				粒径/ nm	包封率/ %	y
	A	B	C	D			
1	1	1	1	1	145.1	32.8	45.09
2	1	2	2	2	179.1	28.9	30.53
3	1	3	3	3	132.1	28.7	44.75
4	2	1	2	3	149.0	39.6	51.07
5	2	2	3	1	149.2	36.6	47.84
6	2	3	1	2	130.0	42.6	54.83
7	3	1	3	2	118.9	34.3	54.96
8	3	2	1	3	94.18	37.3	65.48
9	3	3	2	1	158.3	40.0	49.27
K ₁	40.173	50.372	55.133	47.401			
K ₂	51.248	47.949	43.626	46.774			
K ₃	56.572	49.618	49.184	53.767			
R	16.442	2.426	11.507	6.993			

表 3 方差分析表

Tab 3 Variance analysis of the orthogonal design

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	422.643	2	45.726	*P<0.05
C	198.692	2	21.496	*P<0.05
D	89.812	2	9.717	
B(误差)	5.92	2		

注: $F_{0.05(2,2)}=19$ Note: $F_{0.05(2,2)}=19$

由表 2 中极差分析 R 值可知,在以加权结果做为考察指标的 4 个影响因素中,最显著影响因素为单硬脂酸甘油酯用量,泊洛沙姆 188 浓度,其次为单硬脂酸甘油酯与大豆卵磷脂质量比,影

表 4 验证实验结果

Tab 4 The result of verification test

实验号	粒径/nm	多分散系数	Zeta 电位/mV	包封率/%	载药量/%
1	141.3	0.257	-24.33	40.21	1.23
2	147.9	0.278	-24.44	41.45	1.05
3	145.3	0.293	-25.47	39.98	1.16
平均值	144.83±2.71	0.276±0.014	-24.77±0.513	40.54±0.45	1.14±0.074

2.3 VCR-SLN 形态观察

室温下,取适量所制得的 VCR-SLN 胶体溶液滴加于铜网上,静置 10 min 后用滤纸片吸干,再滴加 2.0%磷酸钨溶液于铜网上负染 3 min,自然挥干,用透射电子显微镜观察并摄制照片。从透射电镜照片可见,纳米粒呈圆形或类圆形,表面圆滑,大小及分布较均匀,粒子之间未见粘连和聚集现象,见图 1。

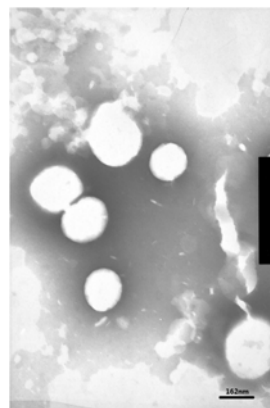
2.4 平均粒径和 Zeta 电位

取适量 VCR-SLN 胶体溶液,用粒度测定仪测定纳米粒的平均粒径及粒径分布。得 VCR-SLN 平均粒径为 (145.4 ± 3.6) nm, PDI 为 0.285 ± 0.016 , Zeta 电位为 (-28.41 ± 0.07) mV, 见图 2, 3。

响因素排序为: $A > C > D > B$ 。经计算得各因素水平之和的平均值 K_1 、 K_2 、 K_3 , 综合各因素 K 值与直观比较, 得出理论上最佳制备工艺条件为 $A_3B_1C_1D_3$, 即单硬脂酸甘油酯用量为 50 mg, 单硬脂酸甘油酯与大豆卵磷脂质量比为 3:1, 泊洛沙姆 188 浓度为 1.0%, 复乳超声时间为 90 s(功率 300 W, 工作 1 s, 间歇 1 s)。

2.2.2 优化的制备工艺 精密称取单硬脂酸甘油酯 50 mg 和 16 mg 大豆卵磷脂, 超声溶于 1 mL 乙酸乙酯为有机相; 取硫酸长春新碱 4.5 mg 混悬于 200 μ L 蒸馏水中构成内水相, 混合后涡旋 30 s, 再探头超声处理 20 s(功率 200 W, 工作 1 s, 间歇 1 s), 得 W/O 初乳; 随后用注射器将初乳加入到 3 mL 含 1%泊洛沙姆 188 的水溶液中, 探头超声处理 90 s(功率 300 W, 工作 1 s, 间歇 1 s)得 W/O/W 复乳, 将复乳分散于 1%泊洛沙姆 188 的 10 mL 水溶液中, 旋转蒸发除去有机溶剂, 得带有蓝色乳光的 VCR-SLN 胶体溶液。

2.2.3 最佳工艺验证 为进一步考察最佳工艺的可靠性及稳定性, 按照正交试验结果得出的最优工艺, 制备 3 批 VCR-SLN。工艺验证实验结果见表 4。由表中结果可知, SLN 的平均粒径、PDI、Zeta 电位、包封率和载药量均相对稳定, 表明制备工艺稳定性较好。

图 1 VCR-SLN 透射电镜照片(600 000 $\times$)Fig 1 TEM of VCR-SLN(600 000 $\times$)

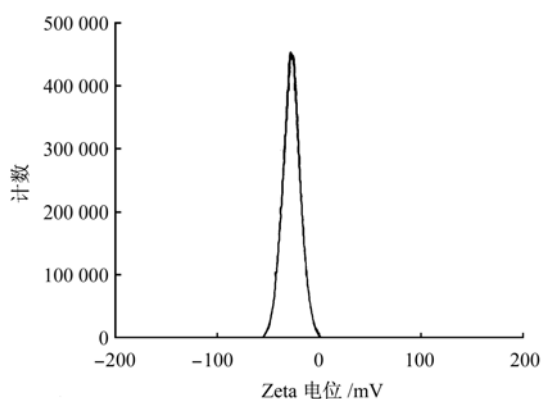


图2 VCR-SLN 的 Zeta 电位

Fig 2 Zeta potential of VCR-SLN

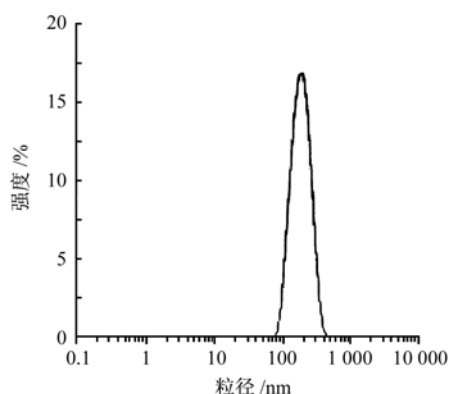


图3 VCR-SLN 的粒径分布

Fig 3 Particle size of VCR-SLN

2.5 VCR-SLN 体外释放度测定

2.5.1 透析袋对药物的吸附 精密称取 1 mg 硫酸长春新碱的 50 mL 的蒸馏水溶解完全后, 取出 10 mL 放入盛有 50 mL 磷酸盐缓冲液(pH 7.4 和 pH 6.8)的溶出杯中, 37 °C, 100 r·min⁻¹ 搅拌。待搅拌均匀后, 取出 1 mL, 测定未放透析袋前释放介质中硫酸长春新碱的浓度; 将已处理过的透析袋浸入释放介质中, 同法, 测定释放介质中硫酸长春新碱的浓度, 比较硫酸长春新碱的浓度前后是否有变化。结果表明, 加入透析袋前后, 硫酸长春新碱的浓度未有显著性变化, 说明透析袋对硫酸长春新碱没有吸附作用。

2.5.2 标准曲线绘制 精密称取硫酸长春新碱 1.0 mg, 于 50 mL 量瓶中, 加 pH 7.4 磷酸盐缓冲液定容, 得到 20 μg·mL⁻¹ 的储备液。精密量取储备液 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 4, 5 mL 于 10 mL 量瓶中, 用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液定容至刻度, 得 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 8.0, 10.0 μg·mL⁻¹ 的系列标准溶液。过 0.22 μm 微孔滤膜, 进样 20 μL。以浓度

(C) 对峰面积 (A) 进行线性回归, 得方程 $A=17.58C-0.8460$ ($r=0.9998$), 在 0.5~10.0 μg·mL⁻¹ 内线性良好。同法制备 VCR 在 pH6.8 磷酸盐缓冲液中的标准曲线 $A=20.30C-1.2428$ ($r=0.9998$), 在 0.5~10.0 μg·mL⁻¹ 内线性良好。

2.5.3 体外释放度的测定结果^[11] 采用透析袋法对 VCR-SLN 的体外释药特征进行研究。精密量取同批制备的 VCR-SLN 胶体溶液 2 mL, 置于处理过的透析袋内, 将袋口扎紧。将含药透析袋分别置于 50 mL pH 7.4 和 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中, 于 (37±0.5)°C 恒温水浴振荡 (75 r·min⁻¹), 于 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 h 取样 1 mL, 立即补加等量同温释放介质, 样品过 0.22 μm 微孔滤膜, 测定不同时间点硫酸长春新碱的含量, 按以下公式计算累积释放量 (M_n) 和累计释放百分率 (Q_n): $M_n=C_nV_0+\sum C_iV_i$; $Q_n(\%)=M_n/C_0\times 100\%$ 。其中, M_n 为各时间点的累积释放量; Q_n 为各时间点的累积释放百分率; C_n 为第 n 个时间点的实测药物浓度; V_0 为释放介质体积; V_i 为取样体积; C_i 为第 i 个取样时间点的实测药物浓度; C_0 为总药物浓度。VCR-SLN 体外释放曲线见图 4。

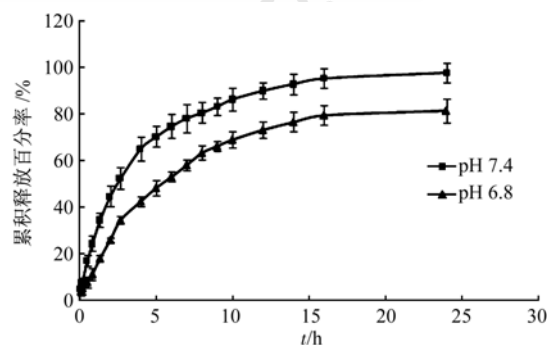


图4 VCR-SLN 体外释放曲线(n=3)

Fig 4 Drug release profiles of VCR-SLN in vitro(n=3)

VCR-SLN 在 pH 7.4 和 pH 6.8 的 PBS 缓冲液中的释药曲线见图 4。由释药曲线可知, 所得 VCR-SLN 在 pH 7.4 的释放介质中释药较 pH 6.8 介质中快。VCR-SLN 在两种介质中开始时释放均较快, 存在一定的突释现象, 4 h 时药物的累积释放百分率分别为 65.20%(pH 7.4)和 41.25%(pH 6.8), 随后释药曲线渐趋平稳, 于 24 h 时累积释放百分率分别为 97.80%(pH 7.4)和 81.60%(pH 6.8), 具有明显的缓释作用。结果表明, VCR-SLN 在 pH 7.4 和 pH 6.8 的 PBS 缓冲液中的释药行为均符合

Weibull 方程, 分别为 $\ln\ln(1/1-Q)=0.754\ln t-1.669$, $r^2=0.982$ 0(pH 7.4)及 $\ln\ln(1/1-Q)=0.775\ln t-1.080$, $r^2=0.999$ 0(pH 6.8)。

3 讨论

SLN 制备方法很多, 有乳化溶剂挥发法、高温乳化-低温固化法、复乳法等。本实验采用以上 3 种方法制备 VCR-SLN, 根据硫酸长春新碱水溶性好的性质, 最终确定 W/O/W 复乳-溶剂挥发法, 该方法适合水溶性强的小分子药物, 将药物包封于复乳的内水相中, 包封率可以达到 40%~60%。前 2 种方法主要用于包载脂溶性药物。复乳法主要采用二步法原理: 即 W/O/W 型复乳中内水相微水珠被亲油性乳化剂 I 膜(本实验采用大豆卵磷脂)包裹, 而含有微水珠的油滴又被亲水性乳化剂 II 膜(本实验采用泊洛沙姆 188)包裹, 内外水相被油膜隔开, 并避免药物向外相扩散。本实验所述的复乳法是将单硬脂酸甘油酯溶于有机溶剂中, 将药物水溶液(内部水相 W_1)分散在其中形成水溶性药物的 W_1/O 型乳液, 再在搅拌的条件下分散到含有稳定剂的水溶液(外部水相 W_2)中形成 $W_1/O/W_2$ 型乳液, 溶剂挥发, 过滤, 干燥, 即得载药固体脂质纳米粒。同时, 此萃取-挥发-萃取过程反复进行, 使载体材料析出形成囊膜, 将药物包裹其中, 直到纳米粒完全固化为止。固化速度越快, 所制得的纳米粒粒径越小。

测定包封率常用的分离方法主要有超速离心法, 透析法, 超滤离心法和凝胶色谱法等。尝试多种测定方法, 最终确定聚结离心法^[12], 通过调节分散体系电荷, 如用阳性聚集剂(氯化铝、硫酸镁等)和将 pH 值调至酸性, 可使分散体系得到更多正电荷, 整个体系电荷趋于中性, 引起粒子的自身凝聚。本实验在分散液中加入盐酸至体系 pH 1.2, 以中和 SLN 表面电荷, 破坏其体系稳定性, 使 SLN 沉降而与游离药物分离, 然后经过超速离心(离心条件为 $15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 40 min), 如果通过测定上清液中药物含量以计算游离药物总量, 并确保药物在水相中有足够的溶解度, 否则游离药物本身也可能聚结成粒子而使测定结果偏高。硫酸长春新碱在水中易溶, 即 1 g 能在 1~10 mL 水中溶解, 本实验所制备的 SLN 中硫酸长春新碱的浓度约为 $3.07\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 远低于其饱和溶解度, 即使全部硫酸长春新碱未被 SLN 包封, 将溶解于水性上清液中而不会以药物粒子的形式存在, 因此通

过测定上清液中的药物含量能准确计算出游离药物的含量。

VCR-SLN 的释药特点为开始快速释药, 后期缓慢释药。开始快速释药的原因主要是吸附在纳米粒表面或通过比较弱的键与纳米粒连接的药物在较短的时间内脱落造成, 而不是纳米粒中包载的药物, 在体外释放试验前期这部分吸附形式的药物以扩散方式快速进入释放介质中; 另一方面, 在释放初期, 纳米粒中药物浓度较高, 而释放介质中的药物浓度较低, 这种高渗透压的存在可以导致部分纳米粒破裂而将包载药物快速释放入介质中。在制备过程中, 部分乳化剂被同时包裹于脂质骨架表层中, 亦可导致药物“突释现象”的产生。在药物释放过程中, 由于亲水性乳化剂的溶解速度远远大于脂质骨架的溶解或溶蚀速度, 因此可能在纳米粒表层致孔, 导致包封在表层药物的释放速率大于包封在固体脂质核内药物。后期缓慢释药的原因, 主要是因为随着吸附形式的药物快速释放完毕和释放介质中药物浓度提高而导致的内外相之间渗透压差减小, SLN 中的包埋硫酸长春新碱开始以较恒定的速度缓慢释放, 这是实现纳米粒缓释作用的关键机制。

新型给药系统能降低 VCR 不良反应, 提高生物利用度, 目前 VCR 脂质体虽已经进入了临床研究, 但其临床耐受性及药物累积毒性仍然需要密切关注。如何更好使 VCR 达到靶向治疗, 进一步降低其不良反应, 延长其作用时间, 将是 VCR 新型给药系统不断追求的。

REFERENCES

- [1] HUSSEIN M. Pegylated liposomal doxorubicin, vincristine, and educed-dose dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma [J]. Clin Lymphoma, 2003, 4(Suppl 1): 18-22.
- [2] SIKORSKA A, SLOMKOWSKI M, MARLANKA K. The use of vinca alkaloids in adult patients with refractory chronic idiopathic thrombocytopenia [J]. Clin Lab Haematol, 2004, 26(6): 407-411.
- [3] CHAUVENET A R, SHASHI V, SELSKY C, et al. Vincristine-induced neuropathy as the initial presentation of charcot-marie-tooth disease in acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study [J]. J Pediatr Hematol Oncol, 2003, 25(4): 316-320.
- [4] MULLER R H, MADER K, GOHLA S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery review of the state of the art [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2000, 50(1): 161-177.
- [5] UNER M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipidnanoparticles(SLN) and nanostructured lipid carriers(NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems [J]. Pharmazie, 2006, 61(5): 375-386.

- [6] WISSING S A, KAYSER O, MULLER R H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(9): 1257-1272.
- [7] SAWANT K K, DODIYA S S. Recent advances and patents on solid lipid nanoparticles [J]. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2008, 2(2): 120-135.
- [8] QIU K F, HUANG S H, CAI B L, et al. Optimization of triamcinolone acetate-loaded solid lipid nanoparticles formula by central composite design and response surface methodology [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2012, 29(10): 920-924.
- [9] CHENG Y, PING Q N. Supercritical fluid precipitation technology and its application in pharmaceuticals [J]. *Prog Pharm Sci*(药学进展), 2004, 28(2): 63-67.
- [10] YE B B, YUAN H, DU Y Z, et al. Supercritical assisted atomization for preparation of solid lipid nanoparticles [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2011, 28(3): 247-251.
- [11] CHEN T, HOU S X, WANG Y Y, et al. Release profile of compound liposomes entrapped with vincristine sulfate and mitoxantrone hydrochloric acid *in vitro* and their distribution in mice [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2006, 41(12): 1170-1175.
- [12] WANG Y Z, ZHENG J X, HU H Q, et al. Determination of the entrapment efficiency of β -elemene solid lipid nanoparticles by method of coagulation-filtration [J]. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2007, 24(5): 271-275.

收稿日期: 2011-12-14

HPLC 测定维药恰玛古儿药材中槲皮素的含量

海力茜·陶尔大洪, 马桂芝, 王菁, 古娜娜·对山别克(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830054)

摘要: 目的 建立维药恰玛古儿药材中槲皮素的含量测定方法, 为其制定质量标准提供依据。方法 采用 HPLC 对恰玛古儿药材中槲皮素进行含量测定。采用 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), 流动相: 甲醇-0.1%磷酸水溶液(50:50), 检测波长: 360 nm, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 30 $^{\circ}$ C。结果 槲皮素进样量在 2.525 6~15.153 6 μ g·mL⁻¹ 时, 与峰面积值呈良好线性关系($r=0.999\ 7$)。平均加样回收率为 101.4%, RSD 为 1.1% ($n=6$)。结论 所建立的方法简便、快捷, 重复性好, 可用于该药材的质量评价。

关键词: 恰玛古儿; 槲皮素; 高效液相色谱法

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0169-03

Content Determination of Quercetin in *Brassica Rapa* L. by HPLC

TAOERDAHONG Hailiqian, MA Guizhi, WANG Jing, DUISHANBIEKE Gunana(College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the content determination method of quercetin in *Brassica rapa* L., and so as to provide reference for its quality control. **METHODS** The content of quercetin in *Brassica rapa* L. was determined by HPLC. The chromatographic conditions were as follows: Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μ m), mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid(50:50), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, column temperature at 30 $^{\circ}$ C, detection wavelength 360 nm. **RESULTS** Quercetin showed a good linear relationship in the range of 2.525 6~15.153 6 μ g·mL⁻¹, the average recovery was 101.4% and RSD was 1.1%. **CONCLUSION** The established method is simple and rapid with good reproducibility, and can be used for the quality control of *Brassica rapa* L.

KEY WORDS: *Brassica rapa* L.; quercetin; HPLC

恰玛古儿植物学名为芜菁(*Brassica rapa* L.), 种子植物门双子叶植物纲十字花科(*Cruciferae*)芸苔属, 芸苔种, 芜菁亚种二年生草本植物, 夏秋两季采收。来源为十字花科植物芜菁的干燥块根。药食同源, 历史悠久。恰玛古儿具有很高的药用价值, 始载于《名医别录》, 味苦温, 无毒, 助消

化, 祛风, 镇咳, 驱腹胸寒气, 解热毒, 消肿, 强身^[1]。《维吾尔药志》记: 性温, 开胸顺气, 健胃消食, 解毒; 用于胸闷腹胀痛, 食欲不振, 疮疖肿毒等^[2]。恰玛古儿药材的主要成分之一黄酮类化合物具有抗炎、抗肝脏毒性、抗菌、抗病毒、防治高血压及动脉粥样硬化、提高免疫力的作用^[3-4]。

基金项目: 新疆维吾尔自治区少数民族科技骨干特培专项基金(200723105)

作者简介: 海力茜·陶尔大洪, 女, 教授

Tel: 13999879870

E-mail: hailiqian2471@sina.com