

新型抗肝损伤化合物 XXH-32 脂质体的制备及其药剂学性质研究

孙晶晶^{1,2}, 席建军², 潘旭旺², 邵益丹², 方红英², 潘金明², 张建康², 庄让笑^{2*}, 游剑^{1*} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 杭州市西溪医院, 杭州 310023)

摘要: 目的 制备新型抗肝损伤化合物 XXH-32 脂质体, 并对其药剂学性质进行研究。方法 采用薄膜分散法制备脂质体, 正交试验设计考察影响制备工艺的因素, 用扫描电镜观察脂质体表面形态, 对制备的 XXH-32 脂质体的粒径、载药量、包封率等性质及体外释放特性进行了研究。结果 XXH-32 脂质体的最佳制备工艺稳定, 脂质体形态圆整, 粒径分布适宜。优化工艺制得的脂质体平均粒径为(175.2±2.55)nm, 多分散系数为 0.262±0.01, 载药量为(2.60±0.12)%, 包封率为(95.05±1.06)%, 体外释放符合一级动力学方程, $\ln(100-Q)=-0.06t+4.79$ ($R^2=0.979\ 4$)。结论 本实验获得了较理想的新型抗肝损伤化合物 XXH-32 脂质体, 其体外释药特性符合缓释制剂特征。

关键词: 新型化合物; XXH-32 脂质体; 体外释放; 缓释

中图分类号: R944.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)04-0411-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.04.006

引用本文: 孙晶晶, 席建军, 潘旭旺, 等. 新型抗肝损伤化合物 XXH-32 脂质体的制备及其药剂学性质研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4): 411-416.

Preparation and Characteristics Study of Novel Anti-liver Injury Compound XXH-32 Liposome

SUN Jingjing^{1,2}, XI Jianjun², PAN Xuwang², SHAO Yidan², FANG Hongying², PAN Jinming², ZHANG Jiankang², ZHUANG Rangxiao^{2*}, YOU Jian^{1*} (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare a novel anti-liver injury compound XXH-32 liposome and study its pharmaceutical properties. **METHODS** The liposome was prepared by thin-film dispersion method. The optimized preparation process was investigated by a series of experiments under orthogonal design. The surface morphology of the liposome was observed by scanning electron microscopy. The particle size and drug loading of the liposome was measured, and XXH-32 release behavior from the liposome was studied. **RESULTS** Under the optimal preparation process, the liposome was presented round in shape with average diameter of (175.2±2.55)nm, polymer dispersity index was 0.262±0.01. The content of XXH-32 in the liposome was (2.60±0.12)%, and the entrapment efficiency was (95.05±1.06)%. The release of XXH-32 from the liposome presented a first-order kinetic behavior. The equation as follow $\ln(100-Q)=-0.06t+4.79$, $R^2=0.979\ 4$. **CONCLUSION** XXH-32 liposome was prepared successfully with high drug entrapment efficiency. XXH-32 in the liposome showed a significantly slower release behavior.

KEYWORDS: novel compound; XXH-32 liposome; drug release *in vitro*; sustained-release

肝损伤是临床上的常见疾病, 各种物理和化学因素均可导致急、慢性肝损伤, 严重或持续的肝损伤最终可导致急性肝功能衰竭, 危及生命。近年来, 关于肝损伤机制及其防治药物的研究已经成为国内外生物学、医学及药学研究的热点之一^[1-3]。本课题组前期合成新型化合物 XXH-32, 并经药效研究发现, 其具有明显的抗急性肝损伤作用^[4], 但难溶于水, 口服吸收差, 生物利用度低, 影响药效的发挥。脂质体具有类似生物膜的磷脂双分子层结构, 所用膜材毒性小, 具有较好的安

全性^[5-6], 可将难溶性药物包裹于磷脂双分子层中间, 以增加其溶解度, 同时可被网状淋巴系统捕获而蓄积, 被动靶向至器官组织, 具有良好的靶向性^[7], 适用于难溶性药物的肿瘤靶向治疗^[8-9]。脂质体的直径一般在 50~1 000 nm, 可用于药物制备、转基因等方面^[10]。针对 XXH-32 水溶性差、生物利用度低的问题, 本实验采用薄膜分散法将其制成 XXH-32 脂质体, 通过正交设计法优化脂质体制备条件, 并对工艺的重复性、脂质体的药剂学性质及其体外释放特性进行探讨, 为今后

基金项目: 杭州市科技发展规划项目(20142013A60)

作者简介: 孙晶晶, 女, 主管药师 Tel: (0571)86481960 E-mail: lanyue129@126.com *通信作者: 游剑, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)88208443 E-mail: youjiandoc@zju.edu.cn 庄让笑, 男, 主任药师 Tel: (0571)86481960 E-mail: zhuangrangxiao@sina.com

XXH-32 的开发利用提供实验依据。

1 材料

新型抗肝损伤化合物(XXH-32, 批号: 170208; 纯度: 99.93%; 杭州市西溪医院制剂室自制); 卵磷脂(批号: E1606069; 含量>90%, 阿拉丁); 胆固醇(批号: 20161009; 多点化学); 十二烷基硫酸钠(批号: 1208212; 西陇化工股份有限公司); 透析袋(批号: MD-25-14000; 上海绿鸟科技有限公司); 其他试剂均为分析纯。

Agilent-1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); JY92-2D 型超声波细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); JEM-1200EX 型透射电子显微镜(日本电子株式会社); SHA-B 恒温振荡器(上海金鹏分析仪器有限公司); SHZ-D(III)循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); RE-2000B 旋转蒸发器(上海耀裕仪器设备有限公司); KA-1000 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); BT25S 分析天平(赛多利斯); Nano-ZS90 激光粒度仪(马尔文仪器有限公司); RC806D 溶出试验仪(天津市天大天发仪器有限公司); WD-A 稳定性检测仪(天津药典标准仪器厂)。

2 方法

2.1 脂质体的制备

采用薄膜分散法制备 XXH-32 脂质体。精密称取适量卵磷脂、胆固醇和 XXH-32, 置于 100 mL 茄形瓶中, 加三氯甲烷溶解, 微微振荡使其充分溶解形成浅黄色澄明溶液, 于 40 °C 的恒温水浴上真空旋转蒸发, 除去有机溶剂, 瓶壁上形成均匀透明的薄膜, 真空干燥 1 h, 加入一定量 pH=6.60 的磷酸盐缓冲液, 水浴常压旋转 30 min, 探头超声, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 得 XXH-32 脂质体。

2.2 正交试验优化处方

在单因素考察的基础上进行正交设计, 考虑到各因素之间的交互影响, 为进一步优化处方并考察处方因素对脂质体包封率的影响, 选择正交设计的 3 个因素分别为药与卵磷脂的质量比(A)、胆固醇与卵磷脂的质量比(B)、有机相与水相的体积比(C), 每个因素各取 3 个水平, 按正交设计表 $L_9(3^3)$ 安排试验, 结果见表 1。考虑到包封率是脂质体质量控制最重要的评价指标, 本实验以脂质体的包封率(S_1)、粒径(S_2)和电位的绝对值(S_3)3 个指标的加权求和值 $S(S=S_1 \times 0.8 - S_2 \times 0.1 + S_3 \times 0.1)$ 进

行综合评价, 优选出最佳工艺条件。以最佳工艺制备 3 批样品, 并考察制备工艺的重复性, 从而对该工艺进行验证。

表 1 正交试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	A	B	C
1	1 : 40	1 : 4	1 : 1.5
2	1 : 50	1 : 5	1 : 2
3	1 : 60	1 : 6	1 : 2.5

2.3 脂质体形态、粒径分布和 zeta 电位的测定

2.3.1 透射电镜观察 采用磷钨酸负染法, 用透射电子显微镜观察脂质体形态。取优化工艺条件下制备的 XXH-32 脂质体溶液, 稀释至一定倍数后, 取适量滴在专用铜网上, 用 2%磷钨酸负染色晾干后, 于透射电子显微镜下观察粒子的形态。

2.3.2 粒径分布和 zeta 电位 用超纯水稀释薄膜分散-探头超声法制备的脂质体溶液后, 使用激光粒度分析仪中检测粒径、多分散系数和 zeta 电位。

2.4 XXH-32 脂质体中 XXH-32 含量的测定

2.4.1 溶液配制 XXH-32 溶液: 精密称取 XXH-32 适量, 用甲醇配制成 $2.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 XXH-32 储备液, 精密量取 1 mL 储备液置于 10 mL 的量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

XXH-32 脂质体破乳溶液: 取“2.1”项下制备的 XXH-32 脂质体 2 mL, 加适量甲醇破乳并定容至 10 mL, 摇匀, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 即得。

空白脂质体破乳溶液: 取 2 mL 空白脂质体, 加适量甲醇破乳并定容至 10 mL, 摇匀, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 即得。

将空白脂质体破乳溶液于 200~400 nm 间进行紫外吸收光谱扫描, 确定空白脂质体在该波长范围内有无吸收峰。

2.4.2 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 水-甲醇(40 : 60); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 254 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 50 μL。

2.4.3 标准曲线的绘制 精密称取 XXH-32 对照品 21.5 mg 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀作为储备液。分别取上述储备液进一步用甲醇稀释得到系列浓度 XXH-32 溶液(分别为 0.027, 0.054, 0.108, 0.215, 0.430, 0.860 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 进

样,按“2.4.2”项下色谱条件测定峰面积,以浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线。

2.4.4 专属性试验 取“2.4.1”项下 XXH-32 储备液作为对照品溶液、XXH-32 脂质体破乳溶液、空白脂质体破乳溶液,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤,分别进样 $50\ \mu\text{L}$,记录液相色谱图,验证方法的专属性。

2.4.5 精密度试验 吸取 XXH-32 储备液($0.027, 0.108, 0.430\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),HPLC 测定 XXH-32 含量,分别进样 $50\ \mu\text{L}$,1 d 内连续测定 5 次,求得日内精密度。同法每天配制 XXH-32 储备液,连续测定 5 d,计算日间精密度。

2.4.6 回收率试验 甲醇中加入 XXH-32 制成已知低、中、高浓度($0.027, 0.108, 0.430\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 XXH-32 溶液,用 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液 $50\ \mu\text{L}$ 分别进样,测定药物量,平均测定 3 次,按回收率=测定浓度/真实浓度 $\times 100\%$,计算平均回收率和 RSD。

2.4.7 脂质体包封率和载药量的测定 精密吸取 $1\ \text{mL}$ 的 XXH-32 脂质体,加适量甲醇水浴超声充分破乳后,用甲醇定容至 $10\ \text{mL}$ 量瓶中,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤,取 $50\ \mu\text{L}$ 进样分析,计算总药量($W_{\text{总}}$)。另取 XXH-32 脂质体 $2\ \text{mL}$ 置离心管内, $2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $6\ \text{min}$,取上层续滤液 $1\ \text{mL}$,按上述方法甲醇破乳定容至刻度后进样,计算封于脂质体的药量($W_{\text{包}}$)。脂质体中药物和载体脂质的投入总量为 $W_{\text{脂质+包}}$ 。包封率(encapsulation efficiency, EE)按公式计算: $EE(\%)=W_{\text{包}}/W_{\text{总}}\times 100\%$,载药量($\%)=W_{\text{包}}/W_{\text{脂质+包}}\times 100\%$ 。

2.5 体外释放

2.5.1 标准曲线的绘制 精密称取 XXH-32 $4.30\ \text{mg}$ 于 $25\ \text{mL}$ 量瓶中,用加入 0.5% 十二烷基硫酸钠的 $\text{pH}=6.80$ 磷酸缓冲盐溶液于 $40\ ^\circ\text{C}$ 水浴溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液;分别取上述储备液进一步用加入 0.5% 十二烷基硫酸钠的 $\text{pH}=6.80$ 磷酸缓冲盐溶液稀释得到系列浓度 XXH-32 溶液(分别为 $0.001\ 4, 0.002\ 7, 0.005\ 4, 0.010\ 8, 0.021\ 5, 0.043\ 0, 0.086\ 0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),摇匀。按“2.4.2”项下色谱条件进样测定 XXH-32 峰面积,以浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标进行线性回归,绘制标准曲线。

2.5.2 释放度实验方法 精密移取优选工艺制备

的 $5\ \text{mL}$ XXH-32 脂质体溶液 4 份,分别放入经预处理的透析袋中,用线扎紧两侧袋口,用溶出仪按照中国药典 2015 年版的小杯法进行测定^{[11]121,368-369}。透析液为含 0.5% 十二烷基硫酸钠的 $\text{pH}=6.80$ 的磷酸盐缓冲液 $200\ \text{mL}$,溶出仪在 $(37\pm 0.5)^\circ\text{C}$, $100\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下运行,分别在预设时间点($0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 24, 30, 48, 72\ \text{h}$)从释放介质中取样 $4\ \text{mL}$,同时补充相同体积释放介质,取样后过 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜,按“2.4.2”项下色谱条件进样测定释放介质中 XXH-32 峰面积,计算样品各时间点的累积释放百分率(Q),绘制体外累积释药曲线,以 Q 对时间(t)作图,并进行方程拟合。另取用 $\text{pH}=6.60$ 磷酸缓冲液配制浓度为 $0.15\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 XXH-32 混悬液,按上述方法同法处理和测定。

2.5.3 XXH-32 脂质体稳定性考察 参照中国药典 2015 年版四部制剂稳定性考察指导原则^{[11]354-356}进行稳定性研究,将 XXH-32 脂质体充氮灌封于带塞西林瓶中,分别置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 避光和 $25\ ^\circ\text{C}$ 避光条件下随机放 3 瓶,以外观、粒径和包封率为评价指标,于 $5, 10\ \text{d}$ 分别定时取样观察测定,与 $0\ \text{d}$ 进行比较,考察样品稳定性。

3 结果

3.1 XXH-32 脂质体的制备工艺筛选

对正交试验综合评分结果进行极差和方差分析(表 2~3),各因素对 XXH-32 脂质体质量的影响顺序依次为胆固醇与卵磷脂质量比(B)、药脂质量比(A)和有机相与水相的体积比(C),最佳处方和制备工艺为 $A_1B_3C_2$,即药脂质量比为 $1:40$,胆固醇与卵磷脂的质量比为 $1:6$,有机相与水相比为 $1:2$,A、B 和 C 3 个影响因素对脂质体包封率影响没有显著性差异。按照优化处方制备 3 批 XXH-32 脂质体,包封率为 $(95.05\pm 1.06)\%$ 均优于正交试验的各次试验,载药量为 $(2.60\pm 0.12)\%$,粒径为 $(175.2\pm 2.55)\text{nm}$,多分散系数为 0.262 ± 0.01 ,zeta 电位 $- (39.3\pm 1.75)\text{mV}$,说明优化的制备工艺稳定,重复性良好。

根据直观分析结果,极差大小分析得知 B 因素对综合评价指标影响最大。方差分析结果表明,胆固醇与卵磷脂质量比对综合评价指标影响差异有显著性($P<0.05$)。

表 2 正交试验设计与结果

Tab. 2 Orthogonal design and result

试验 编号	A	B	C	空白	包封率/%	粒径/nm	电位绝对值/ mV	综合评分
1	1	1	1	1	93.12	214.8	21.3	55.15
2	1	2	2	2	91.82	227.9	23.5	53.02
3	1	3	3	3	92.05	192.6	34.9	57.87
4	2	1	2	3	82.01	178.2	38.6	51.65
5	2	2	3	1	81.11	232.9	22.8	43.88
6	2	3	1	2	92.53	236.5	20.1	52.38
7	3	1	3	2	93.25	221.3	33.3	55.80
8	3	2	1	3	81.64	222.4	26.4	45.71
9	3	3	2	1	94.98	178.5	35.8	61.71
K ₁	55.34	54.20	51.08	53.58	—	—	—	—
K ₂	49.30	47.54	55.46	53.73	—	—	—	—
K ₃	54.41	57.32	52.52	51.74	—	—	—	—
R	6.04	9.78	4.38	1.99	—	—	—	—

表 3 方差分析结果

Tab. 3 Analysis of variance

方差来源	离均差 平方和	自由度	方差	F	P
A	63.449	2	31.725	8.624	>0.05
B	149.848	2	74.924	20.368	<0.05
C	29.912	2	14.956	4.066	>0.05
误差	7.357	2	3.678	—	—

注: $F_{0.05(2,2)}=19.00$ 。

Note: $F_{0.05(2,2)}=19.00$ 。

3.2 形态、粒径分布和 zeta 电位

XXH-32 脂质体的外观为略带蓝色乳光的乳白色混悬液,加水稀释后透射电镜观察呈圆球形。激光粒度分析仪检测 XXH-32 脂质体的平均粒径为 175.2 nm,多分散系数为 0.262,峰的跨度较小,说明粒径分布集中、均匀、分散性良好,平均 zeta 电位为-39.3 mV,表明制备的脂质体稳定性较好,结果见图 1。

3.3 标准曲线的绘制

不同浓度 XXH-32 储备液按“2.4.2”项下色谱条件进样分析,并进行线性回归,得回归方程 $A=4\,379.520\,4C+22.465\,1$, $R^2=0.999\,9$ 。XXH-32 检测浓度在 $0.027\sim 0.86\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与峰面积线性关系良好。

3.4 专属性试验

量取 XXH-32 溶液、空白脂质体破乳液和 XXH-32 脂质体破乳液,按“2.4.2”项下色谱条件进样分析,胆固醇、卵磷脂、甲醇对 XXH-32 不产生干扰,结果见图 2。

3.5 仪器精密度试验

根据“2.4.5”项下方法测定日内精密度和日

间精密度,结果见表 4。日内 RSD 为 $0.18\%\sim 0.25\%(n=5)$,日间 RSD 为 $1.16\%\sim 1.66\%(n=5)$,结果表明仪器精密度较好,测定方法准确可靠。

3.6 回收率试验

根据“2.4.6”项下方法测定回收率,结果见表 5。HPLC 测定 XXH-32 含量的平均回收率为 100.03%, $RSD\leq 0.56\%$,回收率较高,符合含量测定方法要求。

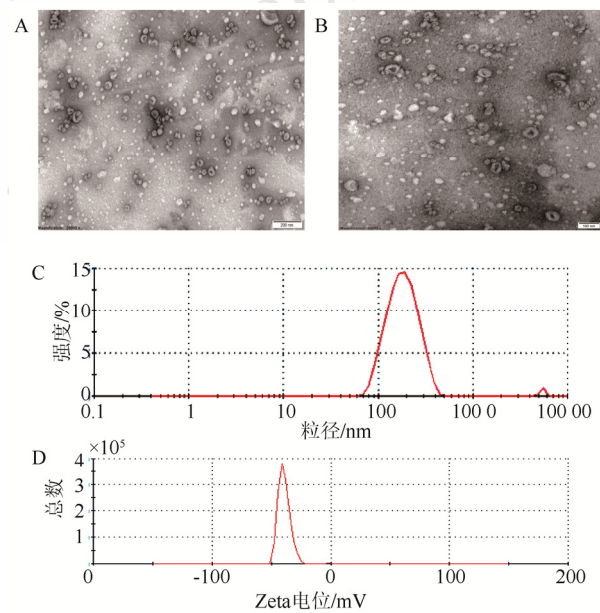


图 1 XXH-32 脂质体形态、粒径分布和 zeta 电位

A-透射电镜照片(20 000 $\times$); B-透射电镜照片(30 000 $\times$); C-粒径分布图; D-zeta 电位。

Fig. 1 Morphology, particle size distribution and zeta potential of XXH-32 liposome

A-TEM photo(20 000 $\times$); B-TEM photo(30 000 $\times$); C-particle size distribution; D-zeta potential.

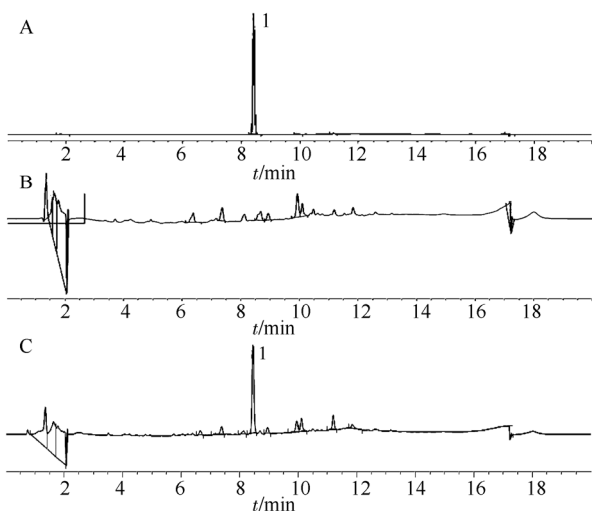


图2 高效液相色谱图

A-XXH-32 溶液; B-空白脂质体; C-XXH-32 脂质体; 1-XXH-32。

Fig. 2 HPLC chromatograms

A-XXH-32 solution; B-blank liposome; C-XXH-32 liposome; 1-XXH-32.

表4 精密度试验结果(n=5)

Tab. 4 Precision of the method for determination(n=5)

浓度/mg·mL ⁻¹	日内精密度/%	日间精密度/%
0.027	0.25	1.66
0.108	0.18	1.31
0.430	0.24	1.16

表5 回收率试验结果(n=3)

Tab. 5 Results of the recovery(n=3)

浓度/mg·mL ⁻¹	测定值/mg·mL ⁻¹	回收率/%	RSD/%
0.027	0.027±0.000 15	99.06±0.005 5	0.56
0.108	0.109±0.000 44	100.76±0.004 1	0.40
0.430	0.431±0.001 22	100.28±0.002 9	0.28

3.7 体外释放结果分析

XXH-32 溶液体外释放标准曲线绘制得回归方程 $A=4\ 333.656\ 0C+7.220\ 6$, $R^2=0.999\ 8$ 。XXH-32 检测浓度在 $0.001\ 4\sim0.086\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系。

由图 3 XXH-32 脂质体和 XXH-32 溶液在 $37\ ^\circ\text{C}$ 的累积释放曲线可见, XXH-32 溶液释放较快, 16 h 基本释放完全, 而 XXH-32 脂质体在 72 h 内缓慢释药, 与 XXH-32 溶液相比体外释放具有明显的缓释效应。将 XXH-32 脂质体与 XXH-32 溶液的释药行为按经典释药模型拟合, 拟合优度和数学释放模型结果见表 6; XXH-32 脂质体溶液释药规律符合一级动力学方程: $\ln(100-Q)=-0.06t+4.79$, $R^2=0.979\ 4$ 。

3.8 稳定性试验

参照制剂稳定性考察指导原则, 对 XXH-32

脂质体 $4\ ^\circ\text{C}$ 及 $25\ ^\circ\text{C}$ 条件下贮存稳定性进行考察, 结果见表 7。XXH-32 脂质体在 $4\ ^\circ\text{C}$ 贮存时包封率和粒径变化不是很显著, $25\ ^\circ\text{C}$ 时包封率变化较大, 随保存时间延长, 粒径变化也随之增加。

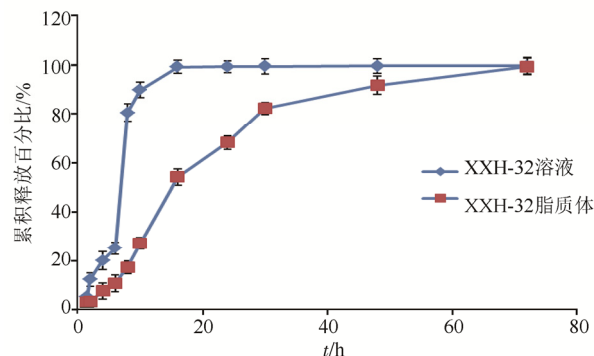


图3 XXH-32 溶液和 XXH-32 脂质体体外释放曲线(n=3)

Fig. 3 The release profile of XXH-32 solution and XXH-32 loaded liposomes(n=3)

表6 XXH-32 溶液与 XXH-32 脂质体不同释放模型

Tab. 6 Different releasing models of XXH-32 solution and XXH-32 loaded liposomes

样 品	模 型	回归方程	R^2
XXH-32 溶液	零级动力学方程	$Q=7.30t+2.17$	0.814 4
	一级动力学方程	$\ln(100-Q)=-0.29t+5.08$	0.911 0
	Higuchi 方程	$Q=29.89t^{1/2}-22.96$	0.841 4
	Weibull 方程	$\lg[-\ln(1-Q)]=0.50\lg t+0.13$	0.904 7
	Ritger-Peppas 方程	$\ln Q=1.28\ln t+1.32$	0.924 1
XXH-32 脂质体	零级动力学方程	$Q=1.54t-11.08$	0.813 5
	一级动力学方程	$\ln(100-Q)=-0.06t+4.79$	0.979 4
	Higuchi 方程	$Q=14.61t^{1/2}-13.39$	0.938 5
	Weibull 方程	$\lg[-\ln(1-Q)]=0.44\lg t-0.04$	0.833 8
	Ritger-Peppas 方程	$\ln Q=1.03\ln t+0.78$	0.873 8

表7 稳定性试验结果(n=3)

Tab. 7 Stability test results(n=3)

影响因素	时间/d	外观	粒径/nm	包封率/%
$4\ ^\circ\text{C}$ 避光	0	+	175.2 ± 0.74	94.86 ± 0.67
	5	+	179.6 ± 1.22	93.27 ± 0.41
	10	+	177.8 ± 1.07	92.05 ± 0.54
$25\ ^\circ\text{C}$ 避光	0	+	175.2 ± 0.73	94.86 ± 0.67
	5	±	182.3 ± 1.16	91.32 ± 1.05
	10	±	187.1 ± 1.31	89.11 ± 0.97

注: 脂质体外观无变化为(+); 有少量沉淀, 振摇可恢复原样记为(±)。
Note: there was no change in the appearance of the liposome (+); a small amount of precipitate was observed, and the shaking was restored to the original condition (±).

4 讨论

XXH-32 脂质体拟用于静脉注射给药, 脂质体粒径最好 $<200\ \text{nm}$, 且脂质体粒径在 $100\sim200\ \text{nm}$ 之间有利于被动靶向于肝、脾等器官, 同时考虑

到释药特性,故将粒径范围确定在 50~200 nm。脂质体的粒径分布也是评价脂质体稳定性的重要参数,影响脂质体在生物体内的行为。zeta 电位的绝对值大小是影响脂质体制剂稳定性的另一个重要因素,它是体系中颗粒之间互相吸引或排斥的衡量标准,当脂质体 zeta 电位绝对值>30 mV 时,静电稳定性较好^[12]。本实验通过正交设计法优化制备工艺,最佳工艺制备的 XXH-32 脂质体平均粒径 172.5 nm,平均 zeta 电位-39.3 mV,粒径呈正态分布,且分布范围窄,脂质体系统比较稳定。

脂质体包封率的测定方法主要有离心法、透析法和凝胶过滤法。通过前期预实验可知 XXH-32 在水和磷酸盐缓冲溶液中的溶解度非常低,其在 pH=6.60 磷酸盐缓冲溶液中的溶解度为 1.19 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,其未包裹于脂质体的游离药物多以微晶状态存在,粒径在微米级,而 XXH-32 脂质体的粒径呈纳米级,通过实验对比其他检测方法后,最终选择通过低速离心法可以沉淀未包裹入脂质体的游离 XXH-32。

为了改善 XXH-32 水溶性差的特点,进行体外释放试验时,在中国药典脂质体体外释放试验相关规定允许范围内^[11],并向释放介质中加入一定比例的十二烷基硫酸钠加以改善。前期预实验考察含有不同比例十二烷基硫酸钠的 pH=6.80 的磷酸盐缓冲液作为释放介质对 XXH-32 及其脂质体释放试验的影响,最终选择含有 0.5%十二烷基硫酸钠 pH=6.80 的 PBS 溶液。XXH-32 脂质体的体内吸收分布及其体外相关性还有待于进一步研究。

REFERENCES

- [1] WU H T, ZHANG G, HUANG L S, et al. Hepatoprotective

effect of polyphenol-enriched fraction from folium microcos on oxidative stress and apoptosis in acetaminophen-induced liver injury in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017(363): 1565-1579.

- [2] ZHANG Z W, WU S S, HUANG L N, et al. Cost-effectiveness analysis of magnesium isoglycyrrhizinate used in the treatment of antineoplastic drugs-induced acute liver injury [J]. *Pharm Today(今日药)*, 2017, 27(10): 701-705.
- [3] KHAN S R, ALJUHANI N, MORGAN A G, et al. Cytoprotective effect of isoniazid against H_2O_2 derived injury in HL-60 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2016(244): 37-48.
- [4] JU L P, XI J J, ZHAO Y M, et al. Synthesis and Anti-liver injury activities evaluation of novel acetylcysteine derivatives with disulphide and thioester bonds [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药)*, 2018, 35(3): 340-344.
- [5] DA S C L, BRANCH D R, DUONG T T, et al. The immune-stimulation capacity of liposome-treated red blood cells [J]. *J Liposome Res*, 2018, 28(3): 173-181.
- [6] WANG Z, JAY C M, EVANS C, et al. Preclinical biodistribution and safety evaluation of a pbi-shRNA STMN1 lipoplex after subcutaneous delivery [J]. *Toxicol Sci*, 2017, 155(2): 400-408.
- [7] WANG X, HUANG H, ZHANG L, et al. PCM and TAT co-modified liposome with improved myocardium delivery: *in vitro* and *in vivo* evaluations [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 339-345.
- [8] LI S, ZHOU G Y. Antitumor activity of lipusu on ovarian cancer transplantation tumor in F344 rats [J]. *Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志)*, 2015, 35(19): 1746-1749.
- [9] ZHANG N, CHEN H, LIU A Y, et al. Gold conjugate-based liposomes with hybrid cluster bomb structure for liver cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2016(74): 280-291.
- [10] MAGARKAR A, ROG T, BUNKER A. A computational study suggests that replacing PEG with PMOZ may increase exposure of hydrophobic targeting moiety [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017(103): 128-135.
- [11] 中国药典. 四部[S]. 2015: 121, 354-356, 368-369.
- [12] ZHAO Y N, ZHANG S B, CUI S H, et al. The development of cholesterol embedded cationic liposomes for gene transfer [J]. *Chin J Cell Biol(中国细胞生物学学报)*, 2014, 36(9): 1257-1261.

收稿日期: 2018-04-25

(本文责编: 曹粤锋)