

# 青蒿素脂质体的制备及质量评价

瞿建江<sup>1</sup>, 冯淑华<sup>2\*</sup>, 李可意<sup>2</sup>(1.扬州大学医学院, 江苏 扬州 225001; 2.北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

**摘要:** 目的 通过对青蒿素脂质体的处方和制备工艺研究, 研制高包封率和稳定的脂质体。方法 采用乙醇注入法制备脂质体, 以正交实验优化处方。测定了脂质体中药物的包封率; 并初步考察了脂质体的稳定性。结果 优化处方与工艺所得脂质体形态均匀, 包封率>85%, 载药量达 27.22%, 粒径约为 90 nm, Zeta 电位约为-68.4 mV, 具有良好的稳定性。结论 乙醇注入法制备脂质体工艺简便, 包封率高, 制备的脂质体稳定性好。

**关键词:** 青蒿素; 脂质体; 包封率; 质量评价

中图分类号: R283.5; R943.3

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)03-0251-06

---

作者简介: 瞿建江, 男, 硕士 Tel: (0571)85893117 E-mail: shuilianz@163.com  
E-mail: 601551253@qq.com

\*通信作者: 冯淑华, 女, 硕士, 教授 Tel: (010)52072268

# Preparation and Quality Evaluation of Artemisinin Liposomes

QU Jianjiang<sup>1</sup>, FENG Shuhua<sup>2\*</sup>, LI Keyi<sup>2</sup>(1. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China; 2. Beijing Union University College of Biochemical Engineering, Beijing 100023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To get a stable artemisinin liposome with high trapping efficiency by selecting formulation and preparation of artemisinin liposome. **METHODS** The artemisinin liposomes were prepared by film-ultrasound method. The formulation was optimized by orthogonal design. The trapping efficiency and the stability were determined. **RESULTS** The trapping efficiency of the artemisinin liposome reached 85%, the drug amounted to 27.22%, the particle size of the liposome was 90 nm and the Zeta potential was -68.4 mV. The liposome had good stability. **CONCLUSION** The method can be used to prepare a stable artemisinin liposome with high trapping efficiency.

**KEY WORDS:** artemisinin; liposomes; trapping efficiency; quality evaluation

青蒿素(artemisinin)是从植物青蒿中提取分离的具有过氧化基团的倍半萜内脂类化合物,是抗疟的有效成分。近年来研究发现,青蒿素还有抗血吸虫、免疫调节、抗心律失常、抗病毒、抗肿瘤等作用。在抗肿瘤方面青蒿素类药物不仅可以选择性抑制和(或)杀灭多种肿瘤细胞,而且具有很好的耐受性,不良反应也很少<sup>[1]</sup>。尤其重要的是,它对多药耐药的肿瘤细胞具有活性<sup>[2-3]</sup>。但是青蒿素分子的过氧键在体内易被破坏,影响药物的作用时间。脂质体作为一种靶向药物载体,具有类似细胞的结构,在体内可以改变被包封药物的体内分布,并具有靶向、长效、可降低药物毒性及增加药物稳定性等多方面的优点。现利用大豆卵磷脂制备青蒿素脂质体,以提高药物的稳定性、缓释效果和药物的治疗指数。

## 1 仪器与药品

### 1.1 仪器

RE-52A 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); KQ-250B 型超声波清洁器(昆山市超声仪器有限公司); TGL-16C 离心机(美国贝克曼); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); Mastersizer2000 激光粒度测定仪(英国 Malvern 公司); XB858 PH 酸度计(深圳柯迪达电子有限公司)。

### 1.2 药品

青蒿素对照品(中国药品生物制品检定所,批号: 200603, 纯度: 99%), 大豆卵磷脂(北京华清美恒天然产物技术开发有限公司, 批号: 20080427); 胆固醇(北京奥博星生物技术责任有限公司, 批号: 20081006); 青蒿素(浙江义乌高登精细化工有限公司, 批号: 051037); 其他试剂均为

分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 处方的优化选择

**2.1.1 处方设计** 通过文献[4]及单因素考察实验,分析确定了影响青蒿素脂质体包封率的4个主要因素,即脂质与药物的质量比(A)、大豆磷脂与胆固醇的质量比(B)、无水乙醇用量(C)、磷酸盐缓冲液的用量(D)。采用正交设计实验来筛选处方,各因素取3水平,见表1;以包封率和载药量为指标,选用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表安排实验,见表2,制备1~9号脂质体。

由方差分析可知:包封率的影响因素大小均为 A>C>D>B,载药量的影响因素大小均为 A>D>C>B,见表3。A对包封率和载药量有显著性影响,B无显著性影响,其最优工艺条件为:A<sub>2</sub>(脂质与药物的质量比12:1),B<sub>2</sub>(大豆磷脂与胆固醇的质量比4:1),C<sub>1</sub>(无水乙醇8 mL),D<sub>1</sub>(磷酸盐缓冲液10 mL)。即卵磷脂600 mg,胆固醇200 mg,无水乙醇用量8 mL,磷酸盐缓冲液的用量10 mL。

**2.1.2 验证实验** 按优选工艺制备3批青蒿素脂质体,包封率及载药量测定结果见表4,平均包封率为89.27%,RSD为0.89%,平均载药量为27.22%,RSD为1.32%,表明优选处方和工艺得到的青蒿素脂质体稳定可行。光学显微镜下观察,所得3批脂质体形态圆整,粒径小而均匀。

### 2.2 脂质体的制备工艺

用乙醇注入法制备,按正交实验得到的最佳处方组成,称取适量大豆卵磷脂、胆固醇、青蒿素,加入无水乙醇使之溶解,混匀。然后将此混合溶液用注射器缓慢注入加热至45℃的磷酸盐缓

表 1 因素水平表

Tab 1 Levels of factors

水平	因素			
	A	B	C/mL	D/mL
1	10 : 1	2 : 1	8	10
2	12 : 1	4 : 1	10	20
3	15 : 1	5 : 1	15	30

表 2 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验及结果

Tab 2 Results of orthogonal experiment

指标	实验号	因素				包封率/%	载药量/%
		A	B	C	D		
	1	1	1	1	1	80.49	31.87
	2	1	2	2	2	75.07	17.26
	3	1	3	3	3	65.82	10.14
	4	2	1	2	3	84.84	33.62
	5	2	2	3	1	85.14	35.18
	6	2	3	1	2	84.98	33.87
	7	3	1	3	2	60.24	9.65
	8	3	2	1	3	67.48	11.29
	9	3	3	2	1	70.28	14.10
包封率	K1	73.79	75.19	77.65	78.64	Σy=674.34	
	K2	84.99	75.90	76.73	73.43	$\bar{y}=74.92$	
	K3	66.00	73.69	70.40	72.71	Σy <sup>2</sup> =51236.35	
	R	18.99	2.20	7.25	5.92		
载药量	K1	19.757	25.047	25.677	27.050		
	K2	34.223	21.243	21.660	20.260		
	K3	11.680	19.370	18.323	18.350		
	R	22.543	5.677	7.354	8.700		

表 3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

指标	方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F	P
包封率	A	546.520	2	273.260	10.011	0.05
	B	7.594	2	3.797	0.032	0.05
	C	93.478	2	46.739	0.455	0.05
	D	62.709	2	31.355	0.291	0.05
	误差	710.301	8			
载药量	A	782.719	2	391.359	9.138	0.01
	B	50.199	2	25.100	0.152	0.01
	C	81.338	2	40.669	0.255	0.01
	D	125.442	2	62.721	0.412	0.01
	误差	1 039.699	8			

注: F<sub>0.05(2, 2)</sub>=19.00; F<sub>0.01(2, 2)</sub>=99.00

Note: F<sub>0.05(2, 2)</sub>=19.00; F<sub>0.01(2, 2)</sub>=99.00

表 4 验证实验结果(n=3)

Tab 4 Experimental verification results(n=3)

批号	包封率	平均值/%	RSD/%	载药量	平均值/%	RSD/%
1	88.62			26.81		
2	89.04	89.27	0.89	27.47	27.22	1.32
3	90.16			27.39		

冲液 20 mL,用电子恒速搅拌器以 300 r·min<sup>-1</sup> 的转速搅拌至无水乙醇除尽为止, 常温水合 3 h, 即得青蒿素脂质体。置-4 °C 冰箱中保存备用。同法制得空白脂质体。

### 2.3 脂质体的质量评价

**2.3.1 形态学研究** 取少量青蒿素脂质体用蒸馏水稀释, 滴至载玻片上, 用磷钨酸负染, 再滴至专用铜网上, 自然挥干, 使粒子在铜网上沉积, 在扫描电镜下观察, 脂质体为粒径较均匀的球状或近球状小囊泡。见图 1。

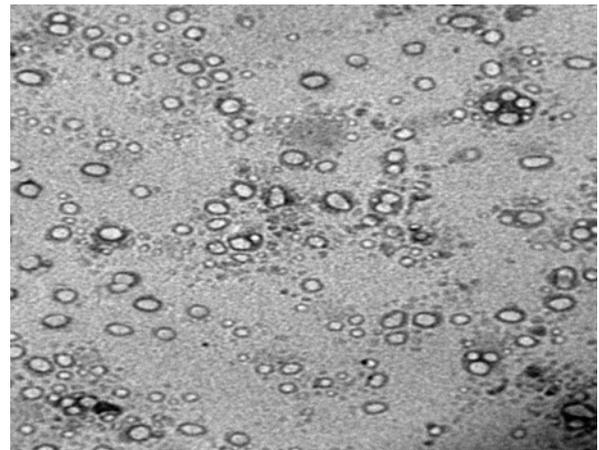


图 1 扫描电镜下青蒿素脂质体(×250 000)

Fig 1 The picture of artemisinin liposomes scanning electron microscope(×250 000)

**2.3.2 pH 值的测定** 取适量青蒿素脂质体混悬液置烧杯中, 用数字酸度计测定其 pH 值, 测得青蒿素脂质体的 pH 值为 5.79±0.01。

**2.3.3 性状** 肉眼观察脂质体颜色为淡黄色, 无杂质, 在 40×10 倍的显微镜下观察可见到分布均匀、大小较一致的外观如球形、椭圆形的脂质体, 以单室脂质体为主。

**2.3.4 粒径与粒度分布** 青蒿素脂质体用 Mastersizer 2000 激光粒度测定仪进行粒度分布测定, 可见集中分布在 45~100 nm 内。

**2.3.5 Zeta 电位的测定** 青蒿素脂质体用 Mastersizer 2000 激光粒度测定仪进行 Zeta 电位的测定, 其平均值为-68.4 mV。

### 2.3.6 包封率与载药量的测定

**2.3.6.1 测定波长的确定与标准曲线的制备** 精密称取青蒿素对照品 40 mg, 加入 100 mL 的无水乙醇溶解, 定容, 即得浓度为 400 μg·mL<sup>-1</sup> 的青蒿素对照品溶液。分别精密吸取青蒿素对照品溶液

0.25 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入混合溶剂(95%乙醇:0.2% NaOH 水溶液=1:4)至刻度, 并以混合溶剂为空白, 在 200~400 nm 波长内进行扫描。同时, 精密吸取空白脂质体各 0.5 mL 于 20 mL 量瓶中, 加入混合溶剂至刻度, 并以混合溶剂为空白, 在 200~400 nm 波长内进行扫描。结果表明, 青蒿素在 292 nm 波长处有最大吸收峰, 与文献[5]报道一致, 而空白脂质体在此波长处无吸收, 故对测定无干扰。

精密吸取青蒿素对照品溶液 0.25, 0.375, 0.5, 0.7, 1.0, 1.2 mL, 各置于 10 mL 量瓶中, 用混合溶剂稀释至刻度, 摇匀, 得澄清无色的溶液, 以混合溶剂为空白于 292 nm 处测定吸收度, 以吸收度  $A$  为纵坐标, 青蒿素对照品溶液浓度  $C(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$  为横坐标进行回归, 得回归方程为  $A=0.4604C-0.0781$ ,  $r=0.9997$ , 在  $10\sim60\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  内与吸收度呈良好的线性关系。

**2.3.6.2 精密度试验** 取高( $0.7\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、中( $1.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、低( $1.3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )浓度的标准对照液, 在上述测定条件下测定吸收度, 1 d 内测定 5 次, 计算得日内精密度, RSD 分别为 0.59%, 0.23%, 0.24%; 每日测定 1 次, 连续测定 5 d, 计算日间精密度, RSD 分别为 0.38%, 0.28%, 0.29%。

**2.3.6.3 方法回收率试验** 取低、中、高 3 种浓度的标准对照液各 3 份, 依法测定, 结果见表 5。

表 5 方法回收率试验( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Tab 5 The column recoveries of irinotecanin blank sample( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	测定值/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
0.7	0.697±0.002 1	99.57	0.33
1.0	1.012±0.004 3	101.20	0.40
1.3	1.298±0.003 3	99.85	0.24

**2.3.6.4 青蒿素脂质体包封率与载药量的测定** 采用微型柱离心法测定包封率。取一 6 mL 注射针筒, 添上滤纸做衬片, 装入用去离子水溶胀的葡聚糖 G-50 凝胶, 再将针筒置一离心管中低速离心 3 min,  $2000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 除去多余的水, 此时凝胶柱变干并与针筒内壁分离。精确定量加入脂质体样品 0.5 mL, 注意勿滴入柱床边缘,  $2000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 3 min, 使脂质体进入离心管中。在凝胶柱上加少量去离子水依上法离心, 收集洗脱液。反复洗脱 2 次, 合并得洗脱液(1)。然后在凝胶柱加入乙醇, 置一新的离心管中, 离心使凝胶

柱变干, 收集洗脱液。反复用乙醇洗 2~3 次, 合并得洗脱液(2)。将洗脱液(1)加入无水乙醇破膜后, 精密量取 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用“2.2”项下混合溶液定容, 测得其浓度  $C_{\text{包}}$ , 精密量取洗脱液(2) 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 用“2.2”项下混合溶液定容, 测得其浓度  $C_{\text{游}}$ , 按下列公式计算包封率和载药量。包封率/%= $C_{\text{包}}/(C_{\text{包}}+C_{\text{游}})\times 100\%$ ; 载药量/%=[药物量/(药物量+脂质总量)] $\times 100\%$ 。经测定包封率为  $(86.10\pm 1.8)\%(n=3)$ , 载药量为  $(27.22\pm 2.6)\%(n=3)$ 。

**2.3.6.5 凝胶色谱柱的回收率测定** 配制高、中、低 3 种浓度的青蒿素标准液, 分别取 0.5 mL 上柱, 按“2.3.6.4”项下条件进行洗脱, 收集游离药物组分后, 稀释, 定容, 进行测定, 计算青蒿素的柱回收率, 平均回收率为 100.65%, 可以认为葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 对青蒿素的吸附作用很小, 药物可以被完全洗脱下来。

## 2.4 青蒿素脂质体初步稳定性试验

**2.4.1 温度** 精密称取一定量样品, 密封于棕色玻璃瓶中, 置 20, 40, 60 °C 恒温干燥器中放置 10 d, 分别于第 0, 5, 10 天取出, 观察外观, 并按“2.3.6”项下方法测定载药量和包封率, 结果见表 6, 结果表明在室温条件下青蒿素脂质体基本稳定。

**2.4.2 光照实验** 精密称取一定量样品, 密封于无色玻璃瓶中, 于照度为 4 000 lx 的条件下光照 10 d, 第 0, 5, 10 天取出, 测定各项指标, 结果见表 6。结果表明青蒿素脂质体对光敏感, 应避光保存。

表 6 青蒿素脂质体稳定性试验结果( $n=3$ )

Tab 6 Factors influenced on stability of artemisinin liposomes ( $n=3$ )

条件	时间/d	外观	包封率/%	载药量/%
20 °C	0	淡黄色	88.51	27.01
	5	无变化	87.88	26.92
	10	无变化	87.02	26.90
40 °C	0	淡黄色	88.51	27.01
	5	无变化	87.48	26.91
	10	无变化	86.84	26.83
60 °C	0	淡黄色	88.51	27.01
	5	颜色变深	82.08	24.32
	10	颜色更深	77.56	21.54
4 000 lx	0	淡黄色	88.51	27.01
	5	颜色变深	85.52	25.86
	10	颜色更深	76.36	21.37

## 2.5 体外释放度实验

分别取等量的青蒿素溶液、青蒿素脂质体于经水煮沸 2 h、并用水清洗的透析袋中，扎紧两端，放入 250 mL 烧杯中，各 6 个，烧杯中分别加入 pH=1.2(人工肠液)，6.8(人工胃液)的磷酸盐缓冲液 200 mL，温度维持在(37±0.5)℃，转速为 50 r·min<sup>-1</sup>，定时取样 5 mL，并及时补充相应量同温度的溶出介质，以无水乙醇溶解，并以其作空白对照，用紫外分光光度法测定释放液中游离青蒿素的浓度，计算不同时间点药物的累计百分释放量，绘制累积释放曲线，结果见图 2 和图 3。

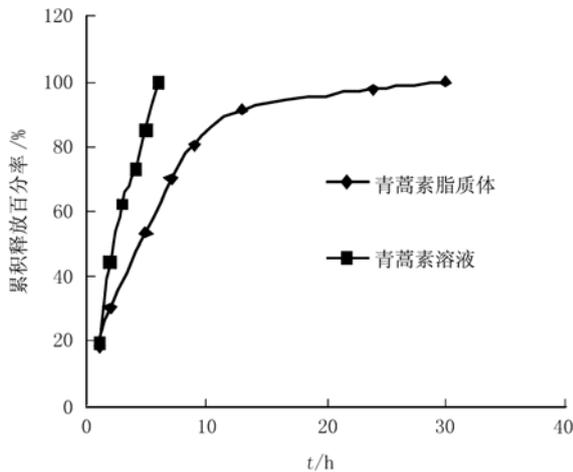


图 2 青蒿素及脂质体在人工肠液中的释放  
Fig 2 Release rate of artemisinin and artemisinin liposomes in simulated intestinal fluid

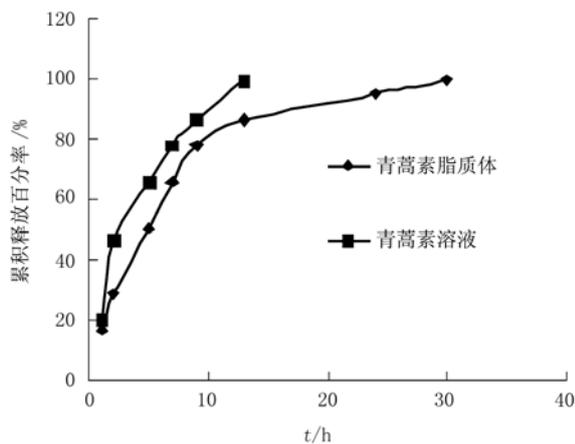


图 3 青蒿素及脂质体在人工胃液中的释放  
Fig 3 Release rate of artemisinin and artemisinin liposomes in simulated gastric fluid

图 2 和图 3 结果显示，青蒿素脂质体与青蒿素溶液比较，在人工胃液和人工肠液中，青蒿素脂质体释放较缓慢，说明脂质体具有缓释作用。

分别以零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi 方程、Weibull 方程对药物溶液和循环脂质体体外释药数据进行处理，得到回归方程见表 7 和表 8。

表 7 体外释放拟合方程(人工胃液)

Tab 7 Fitted equation release rate *in vitro* (simulated gastric fluid)

	模型	回归方程	r
青蒿素溶液	零级方程	$Q=0.132 0t+0.450 3$	0.784 9
	一级方程	$\ln(1-Q)=-0.287 5t-0.124 7$	0.949 3
	Higuchi 方程	$Q=0.153 8t^{1/2}+0.176 9$	0.882 0
	Weibull 方程	$\ln[-\ln(1-Q)]=-1.3012\ln t+2.078 5$	0.997 0
青蒿素脂质体	零级方程	$Q=0.101 5t+0.002 5$	0.996 6
	一级方程	$\ln(1-Q)=-0.022 7t+0.179 5$	0.898 0
	Higuchi 方程	$Q=0.0857t^{1/2}-0.1368$	0.939 6
	Weibull 方程	$\ln[-\ln(1-Q)]=1.157 2\ln t-4.346 1$	0.992 4

表 8 体外释放拟合方程(人工肠液)

Tab 8 Fitted equation release rat *in vitro* (simulated intestinal fluid)

	模型	回归方程	r
青蒿素溶液	零级方程	$Q=0.032 0t+0.390 4$	0.846 2
	一级方程	$\ln(1-Q)=-0.263 8t-0.119 2$	0.989 6
	Higuchi 方程	$Q=0.193 8t^{1/2}+0.189 6$	0.937 0
	Weibull 方程	$\ln[-\ln(1-Q)]=-1.120 0\ln t+1.846 3$	0.996 7
青蒿素脂质体	零级方程	$Q=0.088 0t+0.095 2$	0.995 6
	一级方程	$\ln(1-Q)=-0.020 7t+0.159 3$	0.952 0
	Higuchi 方程	$Q=0.086 1t^{1/2}-0.163 8$	0.991 4
	Weibull 方程	$\ln[-\ln(1-Q)]=1.064 2\ln t-5.036 1$	0.992 4

## 3 讨论

通过预实验对逆相蒸发法和乙醇注入法进行比较，发现实验条件下采用逆相蒸发法制备的青蒿素脂质体比用乙醇注入法制备的脂质体包封率低。为获得较高包封率的青蒿素脂质体，选择乙醇注入法。

本试验所用的膜材为大豆磷脂和胆固醇，一定比例的胆固醇可减小膜的流动性，增加脂质体的稳定性，从而提高包封率。本试验表明在大豆磷脂与胆固醇质量比为 4:1 时包封率较高。

本试验中药物与脂质的质量比是影响脂质体包封率的一个主要因素。在预实验中发现，药物浓度过高或过低都会影响其包封率，随着药物浓度的升高，包封率先增大后减小，提示青蒿素脂质体的包封率可能具有饱和性<sup>[5]</sup>，一般情况下，药

脂比越高，包封率和载药量也越高。

Zeta 电位的测量结果可以用于预测脂质体分散体系的物理稳定性。一般来说，Zeta 电位(绝对值)越高，脂质体之间的静电排斥力就越大，体系越不容易发生聚集，稳定性就越好。本实验制得脂质体平均电位为-68.4 mV，说明体系较为稳定。

体外释放实验中，青蒿素溶液、脂质体混悬液的药物释放有较大差异，药物溶液组 T50 及 Td 分别为 2.91，4.80 h，脂质体组 T50 及 Td 分别为 59.03，76.17 h，T50 及 Td 分别扩大了 20.29 倍和 15.88 倍。体外释药表明，青蒿素脂质体的前期释药较快，而后期释药缓慢。这是因为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，从而达到了本实验的设计目的，脂质体到达靶部位后可释放出较多药物，迅速达到有效治疗浓度，然后缓慢释放出剩余药物，维持有效剂量(维持量)。

体外释药研究显示，脂质体具有一定的缓释作用，但进入体内后，由于体内酶的存在，可能会在一定程度上促进药物的释放，因此其体内情况有待于进一步研究。

## REFERENCES

- [1] FAN R, XIE H, YANG J, et al. Comparison on the growth inhibiting effects of three Artemisinin derivatives on leukemia cell K562 [J]. Acta Acad Med CPAPF(武警医学院学报), 2006, 15(3): 199-201.
- [2] BEEKMAN A C, WOERDENBAG H J, VAN UDEN W, et al. Stability of artemisinin in aqueous environments: impact on cytotoxic action to Ehrlich ascites tumour cells [J]. J Pharm Pharmacol, 1997, 49(12): 1254-1257.
- [3] SINGH N P, LAI H C. Synergistic cytotoxicity of artemisinin and sodium butyrate on human cancer cells [J]. Anticancer Res, 2005, 25(6B): 4325-4331.
- [4] GULATI M, GROVER M, SINGH M, et al. Study of azathioprine encapsulation into liposomes [J]. J Microencapsule, 1998, 15(4): 485-488.
- [5] SHEN X K, YAN K D, LUO Z Y, et al. Determination of artemisinin element content by the ultraviolet spectrophotometric [J]. J Pharm Anal(药物分析杂志), 1983(3): 24-26.