·实验研究·

白头翁皂苷 B4 长循环脂质体的处方优化与评价

刘　骏[1,2],罗　莹[1],张　婧[1],李　翔[2]
(江西中医药大学 1 现代中药制剂教育部重点实验室,2 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,南昌 330006)

[摘要]　**目的**:采用星点设计-效应面法优化白头翁皂苷 B4 长循环脂质体(long-circulation pulchinenoside B4-loaded liposomes,PB4-L)的处方并进行评价。**方法**:采用乙醇注入法制备脂质体,采用超滤离心法测定制剂包封率。采用 4 因素 3 水平星点设计-效应面法优化 PB4-L 的最佳处方;采用激光粒径仪和透射电镜对制剂的粒径、Zeta 电位和形态特征进行表征,并对脂质体的稳定性进行评价。**结果**:星点设计-效应面法得到 PB4-L 最优处方如下:磷脂含量为 2.4%,磷脂与胆固醇质量比为 3∶1,脂药比为 2∶1,DSPE-PEG2000 含量为 2.4%,在最佳制备工艺下,PB4-L 的包封率为 76.9%,平均粒径为(408.7 ± 1.1) nm,聚合物分散性指数(PDI)为(0.16 ± 0.08),Zeta 电位为(−45.2 ± 0.2) mV,透射电镜照片显示脂质体外观圆整,分散性较好;制剂在 10% 胎牛血清(FBS)培养基中稳定性良好。**结论**:采用星点设计-效应面法优化的 PB4-L 制备工艺可行,所得脂质体包封率高、粒径分布均匀,具有良好的体外血清稳定性。

[关键词]　脂质体;白头翁皂苷 B4;星点设计-效应面法;稳定性
[中图分类号]　R943.42;R979.1　[文献标志码]　A　[文章编号]　1003 − 3734(2021)16 − 1524 − 06

Formula optimization and evaluation of pulchinenoside B4-loaded long-circulation liposomes

LIU Jun[1,2], LUO Ying[1], ZHANG Jing[1], LI Xiang[2]
(*Jiangxi University of Chinese Medicine* 1 *Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Medicines, Ministry of Education*, 2 *National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine*, *Nanchang* 330006, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To optimize the formula of long-circulation liposomes loaded with pulchinenoside B4 (PB4-L) by central composite design-response surface method and characterize the liposomes. **Methods**: PB4-L were prepared by ethanol injection and the encapsulation efficiency was determined by ultrafiltration centrifugation. The formula of PB4-L was optimized by the four-factor, three-level central composite design-response surface method. The particle size, zeta potential and morphology of PB4-L were characterized by laser particle zeta-sizer and transmission electron microscope. The stability of the liposomes was evaluated. **Results**: The optimal formula of PB4-L was as follows: the phospholipid content was 2.4%, the weight ratio of phospholipids to cholesterol was 3∶1, the weight ratio of lipids to drug was 2∶1, and the DSPE-PEG2000 content was 2.4%. The encapsulation

[基金项目]　国家自然科学基金资助项目(81760639,81603054);江西省自然科学基金资助项目(20171BAB215066,20202ACBL216015,20202BABL206157);江西省教育厅科研资助项目(GJJ190666,GJJ190663);江西省青年井冈学者;江西省新世纪百千万人才;江西中医药大学“1050”青年人才

[作者简介]　刘骏,男,硕士研究生,主要从事药物新剂型研究。联系电话:(0791)87119661,E-mail:2466714731@qq.com。
[通讯作者]　张婧,女,博士,教授,主要从事药物新剂型研究。联系电话:(0791)87119027,E-mail:evens_zhang@163.com。李翔,男,博士,教授,主要从事药物新剂型研究。联系电话:(0791)87119661,E-mail:sterlinghawk@126.com。

efficiency of PB4-L was 76.9%, with a mean particle size of (408.7 ± 1.1) nm, polymer dispersity index (PDI) of 0.16, and zeta potential of (−45.2 ± 0.2) mV. The morphology study of PB4-L showed that the liposomes were round-shaped with good dispersity. PB4-L was stable in 10% FBS-containing medium. **Conclusion**: The formula of PB4-L was optimized by central composite design-response surface method. The liposomes were characterized by a high encapsulation efficiency, a uniform particle size distribution and a good serum stability *in vitro*.

[**Key words**] liposomes; pulchinenoside B4; central composite design-response surface method; stability

白头翁始载于《神农本草经》,为毛茛科植物白头翁[*Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel]的干燥根,味苦、性寒,具有解毒、清热止痢、凉血等功效[1-2],研究表明白头翁总皂苷对于小鼠肝癌、Lewis 肺癌模型具有较强的抗肿瘤生长作用,其作用机制可能与干预丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、PI3K/AKT/mTOR 信号通路等相关[3-5]。白头翁皂苷 B4(pulchinenoside B4,PB4)作为白头翁皂苷中主要有效五环三萜单体成分之一,结构如图 1 所示,同样具有抑制肿瘤细胞生长及免疫调节作用[6-7],然而 PB4 具有双亲性,入血后容易发生自组装或与红细胞膜脂发生相互作用,引发溶血反应,体内稳定性差[8],限制了其在抗肿瘤作用方面的应用。

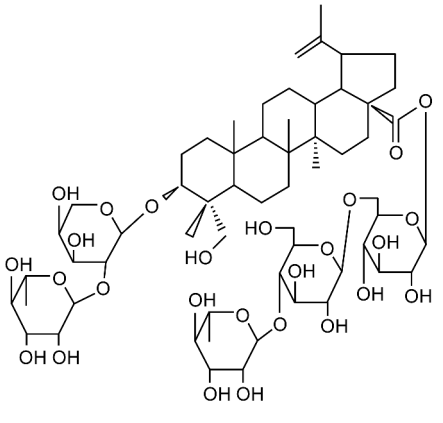


图 1 白头翁皂苷 B4 化学结构式

脂质体具有类似生物膜的磷脂双分子层结构,生物相容性较好,具有提高药物稳定性、改善药物亲和性和靶向性等特点[9]。聚乙二醇(polyethylene glycol,PEG)修饰长循环脂质体,可在囊泡表面水化形成屏障[10],减少血液中蛋白吸附,还可帮助纳米粒逃避网状内皮吞噬系统的捕获,显著延长纳米囊泡体内循环时间[11]。因此,本研究采用星点设计-效应面法制备 PB4 长循环脂质体(long circulating PB4-loaded liposomes,PB4-L)并对其理化性质及稳定性进行评价,以实现:① 提高药物囊泡的血浆稳定性,降低皂苷类成分与血浆红细胞接触概率,减少溶血作用。② 提高药物体内循环时间,利用肿瘤的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect,EPR)提高药物在肿瘤部位的分布,为后期 PB4 的抗肿瘤临床作用开发提供技术支持。

材　料

1　仪器

BSA224S 赛多利斯电子天平(广州市深华生物技术有限公司);岛津 LC－20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司);MS205DU 梅特勒-托利多电子天平(广州市璟骐仪器有限公司);Zetasizer Nano ZSZEN3690 激光粒径测定仪(英国 Malvern 公司);涡旋振荡器(无锡沃信仪器制造有限公司);ZNCL－GS 智能磁力搅拌器(郑州科华仪器设备有限公司);HC－3018R 高速冷冻离心机(江苏同君仪器科技有限公司);Talos F200X 场发射透射电子显微镜(美国 FEI 公司)。

2　试药和试剂

PB4 及其对照品(江西本草天工科技股份有限公司,纯度≥98%);高纯氢化大豆磷脂酰胆碱(hydrogenated soybean phosphotidylcholine,HSPC,德国 Lipoid 公司);胆固醇(cholesterol,CHOL,上海艾伟特医药科技有限公司);二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 {1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy(polyethylene glycol)-2000,DSPE-PEG2000,德国 Lipoid 公司};甲醇、乙腈(国药集团化学试剂有限公司);其他制剂为分析纯。

方法与结果

1　PB4-L 的制备

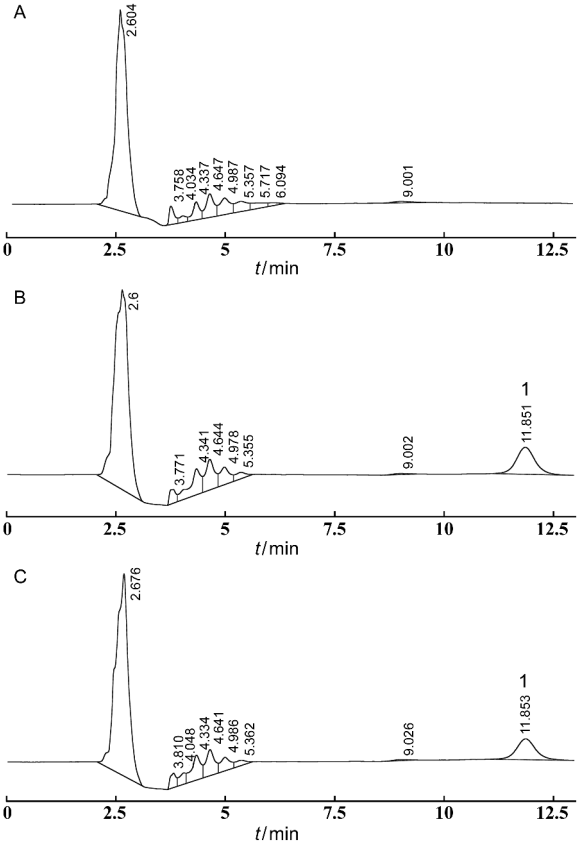
分别精密称取处方量的 PB4,HSPC,CHOL 和 DSPE-PEG2000,加入适量无水乙醇溶解,将脂质溶液注入 5% 葡萄糖水溶液中,保持 60 ℃水浴,搅拌

60 min 后,高压氮气压过 0.45 μm 滤膜,整粒,即得 PB4 长循环脂质体。同法制得空白脂质体。

2 包封率含量测定方法的建立

2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-水(32∶68,v/v)[12],检测波长为 201 nm,流速为 1.0 mL·min^{-1},进样量为 10 μL,柱温为 25 ℃。

2.2 专属性考察 取 PB4-L、空白脂质体以及 PB4 对照品溶液,用甲醇稀释定容至适宜浓度,过 0.22 μm 滤膜,分别按照"**2.1**"项下色谱条件进样分析,所得相应色谱图见图 2。结果分析表明,空白脂质体及溶剂对 PB4 的测定无干扰。



A:空白脂质体;B:PB4 对照品溶液;C:PB4-L;1:PB4

图 2 PB4-L 的 HPLC 色谱图

2.3 标准曲线的建立 精密量取 1 mg·mL^{-1} PB4 对照品储备液适量,加甲醇稀释成浓度分别为 5,10,25,50,100,200,300,400 和 500 μg·mL^{-1}的对照品溶液,按照"**2.1**"项下的色谱条件进样测定,以 PB4 浓度(X,μg·mL^{-1})为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,得到标准曲线方程:Y = 2 631.2X + 21 832,相关系数 r = 0.999 8。结果表明,PB4 在 5 ~ 500 μg·mL^{-1}浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验 配制质量浓度分别为 25,100 和 300 μg·mL^{-1}的低、中、高 3 个浓度的 PB4 对照品溶液,按照"**2.1**"项下色谱条件测定,记录其峰面积,计算相对标准偏差(RSD)值。日内精密度和日间精密度试验 RSD 分别为 0.22% 和 0.29%,表明该检测方法精密度符合方法学要求。

2.5 加样回收率试验 精密量取 500 μL 空白脂质体,分别加入质量浓度分别为 25,100 和 300 μg·mL^{-1}的低、中、高 3 个浓度的 PB4 对照品溶液,混匀后,加入甲醇定容至 10 mL,摇匀,即得,每个浓度分别制备 3 份,按照"**2.1**"项下色谱条件进行进样分析。低、中、高浓度平均加样回收率分别为 100.81%,97.98% 和 99.24%,RSD 值分别为 0.46%,0.51% 和 0.66%,表明该检测方法加样回收率符合方法学要求。

2.6 包封率测定 通过超滤离心法测定 PB4-L 的包封率(entrapment efficiency,EE/%)[13]。将 400 μL 脂质体加入 Ultra-4 超滤离心管(截留分子量 = 10 kDa)中,10 000 r·min^{-1}离心 15 min。将离心所得滤液按照"**2.1**"项下色谱条件进行进样分析,计算得脂质体中游离白头翁 B4 含量(C_m)。同时精密吸取等体积 PB4-L,甲醇破乳并按照"**2.1**"项下色谱条件测定,计算得脂质体中总 PB4 的含量(C_0)。

$$EE/\% = (1 - C_m/C_0) \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

3 处方优化

3.1 实验设计 通过前期单因素考察,选择对脂质体包封率影响较为显著的 4 个因素,分别以磷脂百分比(X_1,%)、磷脂与胆固醇质量比(X_2,w/w)、脂药质量比(X_3,w/w)、DSPE-PEG2000 百分比(X_4,%)为考察对象。运用星点设计-效应面法优化处方,建立多元二次回归方程数学模型[14]。实验因素水平见表 1。以脂质体包封率为响应值 Y(%),实验安排及结果见表 2。

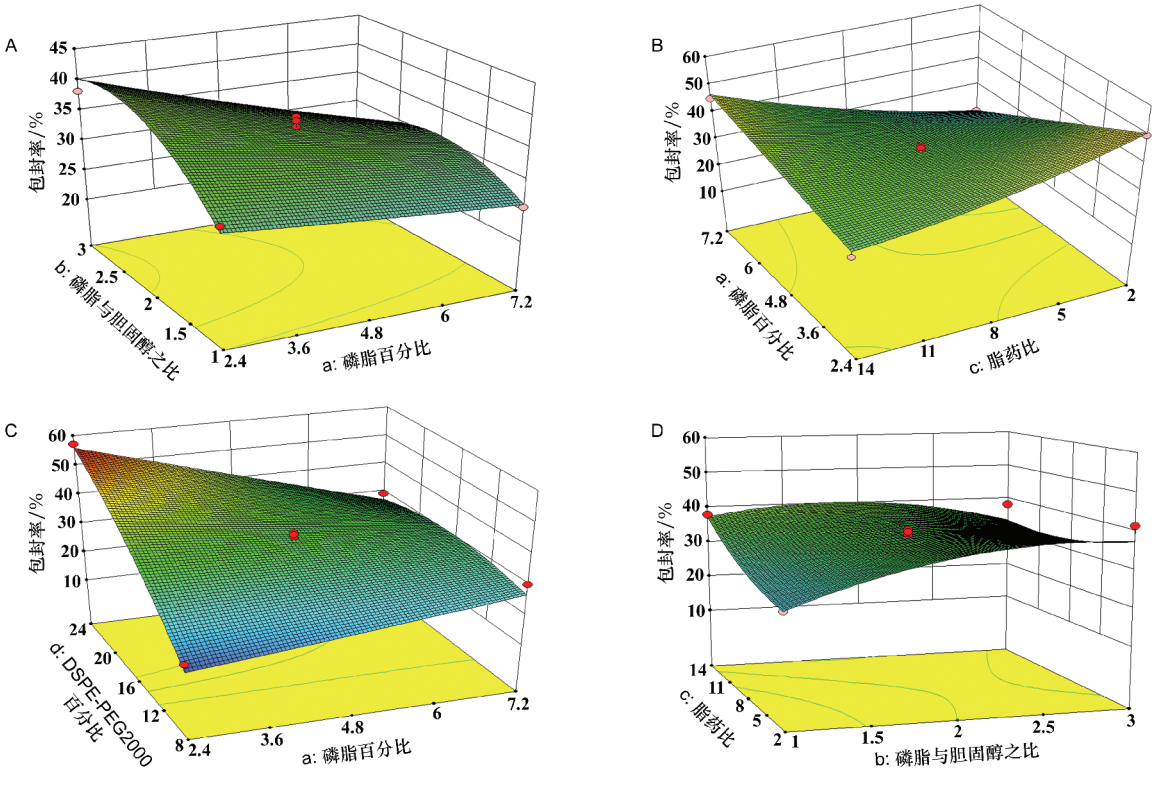
表 1 星点设计因素水平表

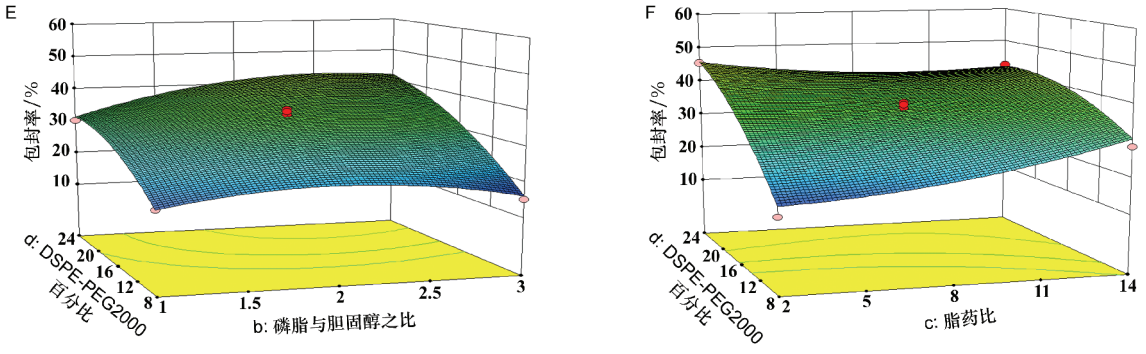
编码	水平		
	低(-1)	中(0)	高(+1)
X_1	2.4	4.8	7.2
X_2	1	2	3
X_3	2	8	9
X_4	0.8	1.6	2.4

表 2 星点设计-效应面法设计与结果

编号	X_1	X_2	X_3	X_4	包封率(Y)/%	编号	X_1	X_2	X_3	X_4	包封率(Y)/%
1	2.4	1	8	1.6	31.01	16	4.8	3	14	1.6	38.17
2	7.2	1	8	1.6	25.68	17	2.4	2	2	1.6	49.98
3	2.4	3	8	1.6	38.21	18	7.2	2	2	1.6	19.85
4	7.2	3	8	1.6	22.55	19	2.4	2	14	1.6	31.99
5	4.8	2	2	0.8	14.22	20	7.2	2	14	1.6	45.22
6	4.8	2	14	0.8	28.41	21	4.8	1	8	0.8	16.90
7	4.8	2	2	2.4	45.45	22	4.8	3	8	0.8	15.11
8	4.8	2	14	2.4	42.45	23	4.8	1	8	2.4	30.15
9	2.4	2	8	0.8	18.75	24	4.8	3	8	2.4	39.85
10	7.2	2	8	0.8	30.25	25	4.8	2	8	1.6	37.00
11	2.4	2	8	2.4	57.12	26	4.8	2	8	1.6	35.36
12	7.2	2	8	2.4	29.35	27	4.8	2	8	1.6	35.10
13	4.8	1	2	1.6	23.54	28	4.8	2	8	1.6	32.38
14	4.8	3	2	1.6	41.35	29	4.8	2	8	1.6	36.32
15	4.8	1	14	1.6	37.92						

3.2 模型拟合 采用 Design-Expert 8.0.6 数据处理软件对表 2 中数据进行二次多元回归分析，得到 $Y=35.23-4.51X_1+2.50X_2+2.48X_3+10.06X_4-2.58X_1X_2+10.84X_1X_3-9.82X_1X_4-4.39X_2X_3+2.87X_2X_4-4.30X_3X_4+0.15X_1^2-4.79X_2^2+2.47X_3^2-3.84X_4^2$ 多项式拟合方程；总指标 EE/% 对 4 个自变因素的三维效应面图见图 3。由方差分析结果表明 X_1，X_4，X_1X_3，X_1X_4 及 X_2^2 对响应值 Y 的影响极显著（$P<0.001$）；X_2，X_3，X_2X_3，X_3X_4，X_3^2，X_4^2 的影响显著（$P<0.05$），其他因素对响应值 Y 的影响不显著（$P>0.05$），方程模型的 F 值为 25.15（$P<0.0001$）。该二元回归模型是显著的，真实值与拟合值之间仅有 0.01% 的概率是由于噪声导致的 F 值偏大，模型的确定系数 $R^2=0.9618$，表明方程的各自变量与响应值 Y 之间的线性关系较显著；方程的失拟项 F 值为 3.41（$P>0.05$），表明方程的失拟项不显著，二元回归方程在整个回归区域之内的拟合情况良好，该模型的拟合具有实际意义。





A:磷脂百分比和磷脂与胆固醇之比对包封率影响的效应面图;B:脂药比和磷脂百分比对包封率影响的效应面图;C:磷脂百分比和 DSPE-PEG2000 百分比对包封率影响的效应面图;D:磷脂与胆固醇之比和脂药比对包封率影响的效应面图;E:磷脂与胆固醇之比和 DSPE-PEG2000 百分比对包封率影响的效应面图;F:脂药比和 DSPE-PEG2000 百分比对包封率影响的效应面图

图 3 各因素对包封率影响的效应图

3.3 最优处方的确定 依据星点设计-效应面设计结果,得到最优处方条件:磷脂含量为 2.4%,磷脂与胆固醇质量比为 3∶1,脂药比为 2∶1,DSPE-PEG2000 含量为 2.4%。根据最优处方制备 3 批脂质体,测定其包封率、粒径和 Zeta 电位,结果见表 3,从表中数据分析,表明此模型预测性良好。

表 3 验证及重现性试验结果

序号	粒径/nm	Zeta/mV	包封率/%	平均值/%	RSD/%	预测值/%
1	408.8	-45.2	76.88	76.90	0.99	78.60
2	409.7	-45.4	77.67			
3	407.5	-45.0	76.15			

4 PB4-L 表征

4.1 粒径分布与 Zeta 电位 吸取 PB4-L 溶液适量,用蒸馏水稀释至适当倍数,通过激光粒径分析仪测定脂质体的粒径分布、Zeta 电位及聚合物分散性指数(PDI),结果显示 PB4-L 平均粒径为(408.67 ± 1.11) nm、PDI 为(0.163 ± 0.08)、Zeta 电位为 -(45.20 ± 0.20) mV,见图 4。

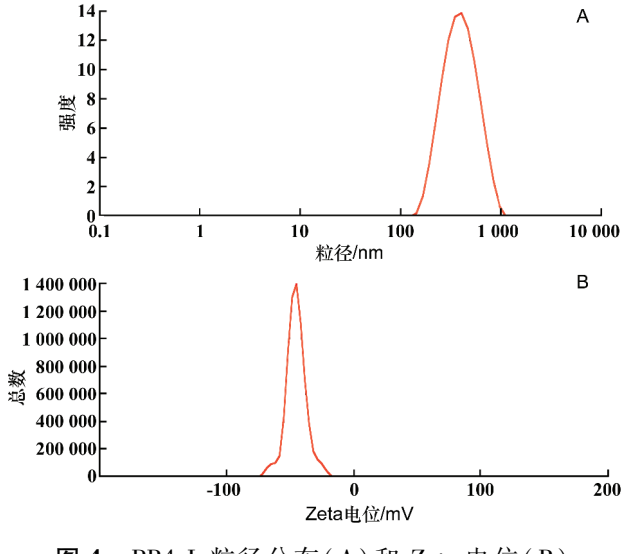


图 4 PB4-L 粒径分布(A)和 Zeta 电位(B)

4.2 形态 透射电镜样品的制备:将 PB4-L 稀释至适当倍数后,取 10 μL 样品滴于含碳膜的铜网上,静置数分钟后,浸泡于 2% 磷钨酸负染溶液中染色 3 min。待铜网自然风干后置于场发射透射电镜下观察脂质体形态特征。结果显示 PB4-L 大小均匀,呈规则、圆整的类球形,见图 5。

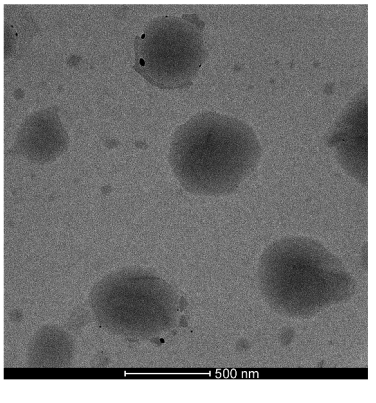


图 5 PB4-L 的外观形态

4.3 稳定性考察 本研究中选择含 10% 胎牛血清的杜尔伯科改良伊格尔培养基(DMEM)高糖培养基来模拟体内环境[15],考察 PB4-L 的体内稳定性。将适量的样品与培养基混合均匀,置于 37 ℃孵育,分

别于 0,2,4,8,12 和 24 h 后,测定脂质体混合物的粒径、Zeta 电位及渗漏率,$Q_{渗}/\% = (W_{总} - W_{始})/W_0 \times 100\%$。公式中 $Q_{渗}$ 为渗漏率,$W_{总}$ 为一定时间后测得的游离药量,$W_{始}$ 为初始测得的游离药量,W_0 为初始包封的药量。结果分析表明,脂质体在培养基中具有较好的稳定性,结果见表 4。

表 4 PB4-L 在完全培养基中的稳定性考察 $\bar{x} \pm s, n = 3$

评价指标	t/h					
	0	2	4	8	12	24
粒径/nm	403.3 ± 2.9	405.4 ± 3.6	407.5 ± 2.0	408.8 ± 4.2	408.7 ± 4.6	413.2 ± 1.2
PDI	0.119 ± 0.016	0.128 ± 0.022	0.133 ± 0.026	0.155 ± 0.024	0.163 ± 0.028	0.170 ± 0.031
Zeta/mV	-45.2 ± 0.2	-45.6 ± 0.3	-44.9 ± 0.2	-44.7 ± 0.4	-45.0 ± 0.3	42.9 ± 0.4
$Q_{渗}$/%	0	1.5 ± 0.7	4.5 ± 0.9	7.4 ± 0.8	13.2 ± 0.8	18.2 ± 1.2

讨　论

星点设计-效应面法通过建立简单的一次或二次多项式数学模型,用以拟合整个区域内自变量与响应值之间的相互作用,现已广泛应用于药物制剂的处方筛选、药物活性成分提取、制剂的制备过程等优化[16]。本研究选取对脂质体包封率影响较大的磷脂质量分数、脂药比、磷脂与胆固醇质量比、DSPE-PEG2000 质量分数作为考察变量,以包封率作为响应值进行星点设计-响应面试验设计,最终筛选出 PB4-L 的最佳处方组成。从实验数据分析可知,包封率在一定区域范围内先增加后减少,表明磷脂浓度超过一定浓度会导致脂质析出,进而降低脂质体的稳定性,影响包封率。若磷脂与胆固醇质量比过小,过量的胆固醇无法被脂质双分子膜容纳,可能改变脂质膜的性质而降低包封率。若磷脂与胆固醇质量比过大,胆固醇过少导致膜的流动性改变而降低其包封率[17]。提高脂药质量比时,因为脂质体的负载能力有限,包封率略微下降[18]。DSPE-PEG2000 可在脂质体表面形成一层水化膜,增加脂质体的稳定性,从而提高其包封率[19]。

经星点设计-效应面法优化得到的 PB4-L 形态呈类球型结构,平均粒径为(408.67 ± 1.11) nm,聚合物分散性系数为(0.163 ± 0.08),粒度分布均匀,Zeta 电位为 -(45.20 ± 0.20) mV;制剂在 10% FBS 的完全培养基中较稳定;为后续荷瘤小鼠体内药效学研究及药动学研究打下基础。同时,PB4 作为水溶性皂苷类药物的典型代表,本文以脂质体对其进行装载,以星点设计-效应面法进行处方优化,对同类化合物的纳米递药系统研究具有借鉴价值。

[参 考 文 献]

[1] 国家药典委员会.《中华人民共和国药典》[S]. 2015 年版. 一部. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 104.

[2] 魏永辉,陈子豪,曹丽颖,等. 白头翁汤加减对溃疡性结肠炎的疗效及部分机制研究[J]. 世界中医药,2020,15(24): 3831 - 3835.

[3] 连姗, 江蔚新, 薛睿. 白头翁皂苷成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(2): 35 - 38.

[4] 胡伟琼, 魏韶锋, 张红阳, 等. 白头翁抗肿瘤机制研究进展[J]. 中药材, 2018, 41(5): 1241 - 1246.

[5] 黄小波. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路探讨白头翁皂苷对结直肠癌细胞 HCT116 的作用机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.

[6] 薛淑一. 白头翁皂苷 B4 通过 Notch 通路对肝癌的抑制作用及其机制研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2019.

[7] LI YH, ZOU M, HAN Q, DENG LR, *et al*. Therapeutic potential of triterpenoid saponin anemoside B4 from Pulsatilla chinensis [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105079.

[8] CHEN Z, DUAN H, TONG X, *et al*. Cytotoxicity, hemolytic toxicity, and mechanism of action of pulsatilla saponin D and its synthetic derivatives[J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(3): 465 - 474.

[9] FUSE T, TAGAMI T, TANE M, *et al*. Effective light-triggered contents release from helper lipid-incorporated liposomes co-encapsulating gemcitabine and a water-soluble photosensitizer[J]. *Int J Pharm*, 2018, 540(1 - 2): 50 - 56.

[10] ZHANG J, CHEN YC, LI X, *et al*. The influence of different long-circulating materials on the pharmacokinetics of liposomal vincristine sulfate[J]. *Int J Nanomedicine*,2016,11:4187 - 4197.

[11] ZHANG J, ZHANG P, ZOU Q, *et al*. Co-delivery of gemcitabine and paclitaxel in cRGD-modified long circulating nanoparticles with asymmetric lipid layers for breast cancer treatment[J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2906.

[12] 崔俊凤, 于志华, 刘晓鹏. HPLC 法同时测定白蒲黄片中 5 种成分的含量[J]. 中国药房, 2017, 28(21): 3007 - 3010.

[13] WANG Y, LIU XQ, LIU GP, *et al*. Novel galactosylated biodegradable nanoparticles for hepatocyte-delivery of oridonin[J]. *Int J Pharm*, 2016, 502(1 - 2): 47 - 60.

[14] 冯玲玲, 李楠, 谭裕君. Box-Behnken 优化黄芩苷脂质体的制备工艺及体外释放模型拟合的研究[J]. 中药材, 2017,40(12): 2902 - 2907.

[15] ZHANG J, SHEN LM, LI X, *et al*. Nanoformulated codelivery of quercetin and alantolactone promotes an antitumor response through synergistic immunogenic cell death for microsatellite-stable colorectal cancer[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(11): 12511 - 12524.

[16] 谭栀恩, 曾佩琴, 陀海燕, 等. 星点设计-效应面法优化复方二甲双胍缓释片的制备工艺[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(12): 1490 - 1499.

[17] 张晓宏, 赵秀峰, 张九龙, 等. Box-Behnken 效应面法优化制备氯诺昔康柔性脂质体[J]. 沈阳药科大学学报, 2016,33(4): 264 - 270.

[18] 任婧, 张丹参, 侯文书, 等. 姜黄素长循环脂质体的制备及表征[J]. 河北科技大学学报, 2018,39(6): 532 - 539.

[19] 董荧荧, 余陈欢, 俞冰, 等. 土贝母皂苷甲长循环脂质体的制备及体外性质考察[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(7): 832 - 836.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 01 - 28