

小柱离心联合 HPLC 测定适配体修饰的斑蝥素脂质体靶向纳米体系的包封率及药剂学性质研究

韦爱秋, 梅潇旭, 蒋倩婷, 叶美欣, 刘慧, 张晓青* (湖南中医药大学药学院, 长沙 410208)

摘要:目的 建立小柱离心联合高效液相色谱法(HPLC)测定适配体修饰的斑蝥素(CTD)脂质体靶向纳米载药体系(Apt-CTD-NLP)的包封率,并进行药剂学性质研究。方法 采用薄膜分散法制备 CTD-Lip,其表面通过化学自组装技术用适配体进行修饰,构建 Apt-CTD-NLP 并进行理化性质表征。以空白脂质体柱回收率与游离 CTD 洗脱率为指标,单因素考察优化小柱分离条件,用 HPLC 定量测定 Apt-CTD-NLP 的包封率。结果 Apt-CTD-NLP 呈规则圆球形,平均粒径、多分散系数(PDI)、Zeta 电位分别为 (101.0 ± 1.058) nm、 (0.208 ± 0.012) 、 (-1.9 ± 0.397) mV,且具有缓释作用。葡聚糖凝胶小柱分离游离 CTD 的最佳条件:400 μ L 上样量,静置吸附 25 min,1 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,去离子水洗脱 3 次(500 μ L,1 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min)。3 批 Apt-CTD-NLP 平均包封率为 $(94.56 \pm 0.80)\%$ 。结论 对于亲脂性小分子药物脂质体,小柱离心联合 HPLC 可快速有效地分离脂质体与游离药物,测定 Apt-CTD-NLP 的包封率。

关键词:斑蝥素;脂质体;适配体;小柱离心法;包封率

doi:10.11669/cpj.2024.05.008 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)05-0433-06

Determination of Encapsulation Efficiency of Aptamer-Modified Cantharidin Liposomes Targeting Nano-system by Small Column Centrifugation Combined with HPLC Method and Pharmaceutical Characteristics

WEI Aiqiu, MEI Xiaoxu, JIANG Qianting, YE Meixin, LIU Hui, ZHANG Xiaoqing* (School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To establish a small column centrifugation combined with HPLC method for the determination of encapsulation efficiency for aptamer-modified cantharidin (CTD) liposomes targeting nano-system carrier system (Apt-CTD-NLP), and investigate the pharmaceutical characteristics. **METHODS** The surface of CTD-Lip was modified by chemical self-assembly technology by aptamer to construct Apt-CTD-NLP, and its pharmaceutical properties were characterized. CTD-Lip was made by the thin film dispersion method. Using the recovery rate of blank liposomes column and the elution rate of free CTD as indexes, the optimum centrifugation conditions of small column were investigated by single factor, and the encapsulation rate of Apt-CTD-NLP was quantitatively determined by HPLC. **RESULTS** Apt-CTD-NLP was regularly round and spherical, and the mean particle size, PDI and Zeta potential were (101.0 ± 1.058) nm, (0.208 ± 0.012) and (-1.9 ± 0.397) mV, and had a sustained release effect. The optimal conditions for separation of free CTD by dextran gel column were as follows: 400 μ L loading volume, standing adsorption for 25 min, centrifugation for 5 min at 1 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$, and elution with deionized water for 3 times (500 μ L, 1 000 $r \cdot \text{min}^{-1} \times 5$ min). The average encapsulation rate of three batches of Apt-CTD-NLP was $(94.56 \pm 0.80)\%$. **CONCLUSION** For lipophilic small molecule drug liposomes, column centrifugation combined with HPLC can quickly and effectively separate liposomes from free drugs, and determine the encapsulation rate of Apt-CTD-NLP.

KEY WORDS: cantharidin; liposome; aptamer; small column centrifugation method; encapsulation efficiency

《神农本草经》记载斑蝥可攻毒蚀疮,逐瘀散结,研究表明其有效成分斑蝥素(cantharidin,CTD)具有多靶点、多途径、多机制抗恶性肿瘤作用^[1-3],但其毒副作用大、靶向性低、水溶性差,临床应用严重受限^[4-6]。脂质体生物相容性好、易于修饰,是 FDA 批准用于临床的第一个纳米载药系统^[7-9]。适配体

(aptamer, Apt)是能高特异识别靶标,且免疫原性低的单链寡聚核苷酸,成为最佳靶向分子之一^[10-11]。因此,本研究采用 HepG2 肝癌细胞的适配体通过化学自组装技术修饰到脂质体表面,构建适配体修饰的斑蝥素脂质体靶向纳米载药体系(Apt-CTD-NLP),精准识别肝癌细胞,增强抗肝癌效果,降低 CTD 的毒副

基金项目:湖南省自然科学基金项目资助(2023JJ50286);湖南省教育厅科学研究项目资助(21A0255);湖南省研究生科研创新项目资助(CX20220789);湖南中医药大学 2022 年大学生创新创业训练计划项目(212);湖南中医药大学重点学科中药学科(校行发规字[2023]2 号)

作者简介:韦爱秋,女,硕士研究生 研究方向:中药药剂学 * **通讯作者:**张晓青,女,博士,副教授 研究方向:中药抗肿瘤纳米靶向药物制剂研究 Tel: (0731)88458237

作用。包封率是评价脂质体处方工艺和包封状况的重要指标^[12],是降低 CTD 毒副作用的重要因素。

脂质体包封率常用测定方法包括透析法、超滤离心法、超速离心法等^[13-15]。采用透析法测定时,由于包封药物泄漏导致结果偏低,且游离的 CTD 被透析介质稀释几十倍,必须经过浓缩才能用高效液相色谱法(HPLC)检测。超滤离心法则由于“浓差极化”使得药物易附着在超滤膜上导致测定结果不准,且成本高^[16]。超速离心法则由于脂溶性药物沉降于油水界面和离心管底部,导致测量结果偏高^[17]。小柱离心联合 HPLC 基于葡聚糖凝胶色谱的“分子筛”原理,在外加离心力作用下实现游离药物的快速分离,葡聚糖凝胶用量少、成本低,洗脱液用量少不会过度稀释样品,可以直接用 HPLC 进行定量测定^[12,17]。

在 Apt-CTD-NLP 靶向纳米载药体系包封率的测定过程中,建立了葡聚糖凝胶小柱联合 HPLC 定量测定包封率的方法。以空白脂质体柱回收率与游离 CTD 洗脱率为指标单因素考察优化小柱分离条件,建立了 Apt-CTD-NLP 包封率的测定方法。用去离子水洗脱 3 次就可以完全分离游离药物和脂质体。该法能高效分离体系中游离 CTD、简便易行、测定结果可靠,为后续进一步深入研究 Apt-CTD-NLP 的体内外抗肝肿瘤作用提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);XB 220A 分析天平(广州广电计量检测股份有限公司);Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司);WondaSil C18 Superb 柱(岛津实验器材有限公司);TDZ4-WS 台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);JEM-2100F 透射电子显微镜(日本 JEOL);SCIENTZ-IIID 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

CTD(批号:20080601,纯度大于 98%,武汉欣欣佳丽生物科技有限公司);CTD 对照品(批号:110783-202206,纯度大于 96.4%,中国食品药品检定研究院);Apt[批号:1926742116,生工生物工程(上海)股份有限公司];葡聚糖凝胶 SephadexG-50(批号:17004201,瑞典 Pharmacia 公司);大豆卵磷脂(批号:579010-1150055-13)、硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000(DSPE-PEG2000,批号:588200-2190092-01)、DSPE-PEG2000-马来酰亚胺(DSPE-

PEG2000-Mal,批号:115CCG1663)(德国 Lipoid 公司);磷酸盐缓冲液(PBS,批号:23045283,广州赛国生物科技有限责任公司);二氯甲烷(批号:20220516,分析纯,太仓沪试剂有限公司);胆固醇(批号:20181116,上海国药集团化学试剂有限公司);甲醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 Apt-CTD-NLP 的制备及表征

2.1.1 Apt-CTD-NLP 的制备 精密称取 2 mg CTD、60 mg 大豆卵磷脂、5 mg 胆固醇、12 mg DSPE-PEG2000 及 945 μL DSPE-PEG2000-Mal ($0.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 置于 250 mL 茄型瓶,加入 10 mL 二氯甲烷,超声溶解(功率:200 W,频率:400 kHz,5 min),55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴,减压旋蒸除去二氯甲烷,形成均匀透明的脂质薄膜,加入 10 mL PBS (pH 7.4),35 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴,搅拌水化 1 h,探头超声 10 min(总功率 100 W,超声 2 s,间隔 2 s),经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得带有淡蓝色乳光的斑蝥素脂质体靶向纳米载药体系(CTD-NLP),同法制得 NLP。按 $n_{(\text{DSPE-PEG2000-Mal})} - n_{\text{适配体}} = 10:1$ 的比例将 CTD-NLP 与适配体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、 N_2 保护下孵育 24 h,制成带有淡蓝色乳光的 Apt-CTD-NLP(图 1),同法制得适配体-空白脂质体(Apt-NLP),4 $^{\circ}\text{C}$ 储藏待用。



图 1 适配体修饰的斑蝥素脂质体靶向纳米载药体系(Apt-CTD-NLP)的外观

Fig. 1 Appearance of Apt-CTD-NLP

2.1.2 Apt-CTD-NLP 的粒径电位形态表征 取 1 mL Apt-CTD-NLP 用 PBS 定容于 10 mL 量瓶中,准确移取 10 μL 滴入铜网中,静置 24 h 干燥,用透射电子显微镜观察其形态。用激光粒度仪测定 Apt-CTD-NLP 的粒径、Zeta 电位及多分散系数(PDI)。结果见图 2、图 3,Apt-CTD-NLP 为规则的圆球形,分散均匀,粒径分布在 $(101.0 \pm 1.058) \text{ nm}$,平均 PDI

为 (0.208 ± 0.012) , 平均 Zeta 电位为 (-1.9 ± 0.397) mV。结果表明, Apt-CTD-NLP 粒径大小利于在肿瘤部位的聚集, PDI 数值小于 0.3 符合药典标准^[18], 表明 Apt-CTD-NLP 分布均匀, 分散性好。

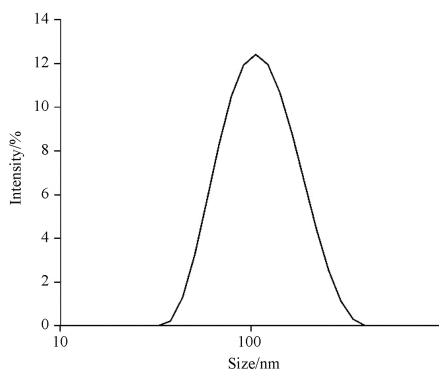


图2 Apt-CTD-NLP 粒径分布

Fig. 2 Size distribution of Apt-CTD-NLP

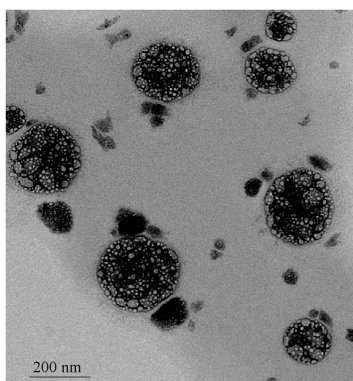


图3 Apt-CTD-NLP 透射电镜图

Fig. 3 TEM image of Apt-CTD-NLP

2.1.3 体外释放 采用透析法评价 Apt-CTD-NLP、CTD-NLP 的体外释放。将 2 mL 脂质体加入透析袋中, 加入 300 mL 体积分数 0.25% Tween 80 的 PBS (pH 7.4) 缓冲液, 于 37 °C、360 r · min⁻¹ 恒温振荡 48 h, 并于 0.5、1、2、7、12、24、48 h 准确量取 1 mL 透析介质(同时补充等量的释放介质)测定 CTD 质量浓度, 计算释放率, 结果见图 4。CTD-NLP、Apt-CTD-NLP 在 30 min 内释放率均未超过 40%, 在 1~2 h 之间 Apt-CTD-NLP、CTD-NLP 装载的 CTD 均迅速释放, 2 h 后缓慢释放, 12 h 累积释放率均超过 80%, 48 h 的累积释放率分别为 87.95%、90.63%, 结果表明制备得到的 Apt-CTD-NLP、CTD-NLP 具有缓释作用, 适配体的修饰并未影响 CTD 的释放。

2.2 CTD 含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 WondaSil C18 Superb 色谱柱

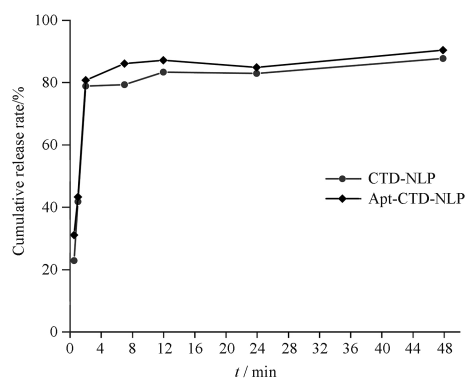


图4 斑蝥素脂质体靶向纳米载药体系(CTD-NLP)、Apt-CTD-NLP 的体外释放曲线

Fig. 4 *In vitro* release profile of CTD-NLP and Apt-CTD-NLP

(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。流动相: 水-甲醇(23:77); 流速 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 233 nm; 进样量: 20 μL。

2.2.2 溶液的制备 CTD 对照品和供试品的制备: 分别精密称取 CTD 对照品、供试品 20 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 以色谱甲醇溶解定容, 分别制成 2.00 mg · mL⁻¹ 的 CTD 对照品和供试品, 4 °C 储存备用。

脂质体供试品的制备: 准确量取 1 mL 空白脂质体置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 超声破乳 30 min (功率为 200 W, 频率为 400 kHz), 静置 24 h, 即得空白脂质体破乳液, 同法制得 Apt-CTD-NLP 破乳液。

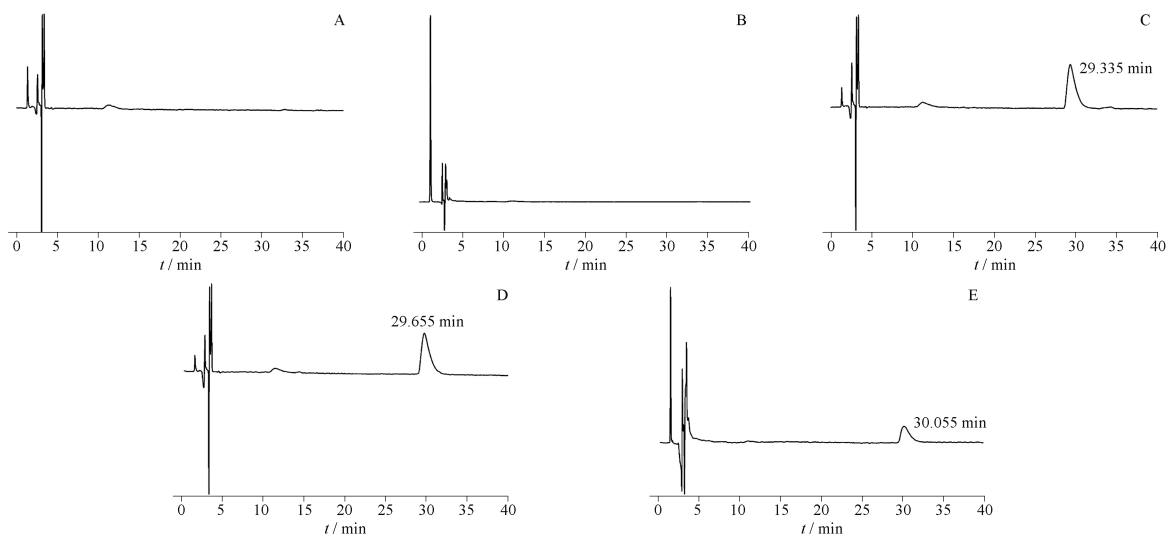
2.2.3 专属性考察 分别取 2.00 mg · mL⁻¹ CTD 对照品溶液、2.00 mg · mL⁻¹ CTD 供试品溶液、空白脂质体破乳液和 Apt-CTD-NLP 破乳液, 按“2.2.1”项色谱条件检测, 记录色谱图, 见图 5。结果表明, 在“2.2.1”项色谱条件下, 辅料对 CTD 的含量测定无干扰, 此条件可用于 CTD 的定量检测。

2.2.4 线性关系考察 分别准确量取 2.00 mg · mL⁻¹ CTD 对照品溶液 0.125、0.5、1.25、2.5、3.75 mL 置于 5 mL 的量瓶, 色谱甲醇定容配成 0.05、0.20、0.50、1.00、1.50 mg · mL⁻¹ 的标准溶液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 进样 HPLC 检测, 采用外标法对 CTD 对照品的质量浓度进行测定, 记录峰面积。以对照品质量浓度为横坐标 (x , mg · mL⁻¹), 峰面积为纵坐标 (y) 得到线性回归方程 $y = 905.69x + 1.986$, $r = 0.999$ ($n = 6$), 表明 CTD 质量浓度与峰面积在 0.05~2.00 mg · mL⁻¹ 有良好的线性关系。

2.2.5 进样精密度试验 分别准确量取 2.00 mg · mL⁻¹ CTD 对照品溶液 0.125、2.5 mL 置于 5 mL 的量

瓶,用色谱甲醇定容配成 0.05 、 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,取低、中、高质量浓度 (0.05 、 1.00 、 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进样 HPLC 检测,重复进样 5 次,记录峰面积,见表 1。

结果表明,进样量为 $20 \mu\text{L}$,低、中、高浓度的峰面积 RSD 值 ($n=5$) 分别为 1.48% 、 0.13% 、 0.10% ,表明进样精密度良好。



A - 甲醇; B - 空白脂质体; C - 斑蝥素 (CTD) 对照品; D - CTD 供试品; E - Apt-CTD-NLP。
A - methanol; B - blank liposomes; C - CTD reference substance; D - CTD sample solution; E - Apt-CTD-NLP.

图 5 斑蝥素 (CTD) 含量测定中专属性考察高效液相色谱 (HPLC) 图

Fig. 5 HPLC chromatograms in specificity investigation for the determination of CTD content

表 1 CTD 含量测定方法的精密度考察

Tab. 1 Study on the precision of CTD content determination method

$\rho/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	Mean	RSD/%
0.05	70.9	69.3	70.9	69.2	71.5	70.4	1.48
1.00	919.0	918.5	920.8	918.3	917.8	918.9	0.13
2.00	1 834.3	1 836.5	1 838.8	1 834.8	1 836.5	1 836.2	0.10

2.2.6 重复性试验 按照“2.1.1”项条件制备 Apt-CTD-NLP,准确量取 1 mL Apt-CTD-NLP 置于 10 mL 的量瓶,用甲醇定容破乳,HPLC 重复进样检测 5 次,CTD 的峰面积分别为 531.4 、 530.8 、 528.2 、 530.5 、 533.2 ,平均峰面积为 530.82 ,RSD 为 1.61% ,表明重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 分别准确量取 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ CTD 对照品溶液 0.125 、 2.5 mL 置于 5 mL 的量瓶,用色谱甲醇定容配成 0.05 、 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 测试液。取 1 mL 低、中、高质量浓度 (0.05 、 1.00 、 $2.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别与等量的空白脂质体混匀,按照“2.2.1”项条件进样 HPLC 检测,记录峰面积,见表 2。结果表明,在“2.2.1”项色谱条件下,3 份低、中、高浓度的回收率均在 $90\% \sim 110\%$ 之间,表明此方法的回收率合格。

表 2 CTD 含量测定方法的加样回收率考察. $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Recovery test of CTD solution content determination method. $n=3, \bar{x} \pm s$

$\rho/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Recovery/%	Mean/%	RSD/%
0.05	97.7	98.8 ± 0.801	0.99
	99.4		
	99.4		
1	100.3	100.3 ± 0.047	0.058
	100.3		
	100.2		
2	100.1	100.0 ± 0.082	0.10
	100.0		
	99.9		

2.3 小柱离心法的方法学研究

2.3.1 葡聚糖凝胶小柱的制备 称取 3 g Sephadex G-50 葡聚糖凝胶浸于 60 mL 去离子水 24 h ,充分溶胀后填充至 2.5 mL 注射器 (底部放适量脱脂棉),静置至底端不再滴水,将其放到 10 mL 小管一起置于离心管中, $1 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 斜角离心 1 min 使凝胶脱水形成表层平整、高度约为 2 cm 的小柱。

2.3.2 空白脂质体紫外全波长扫描 准确量取 $100 \mu\text{L}$ 空白脂质体,用 PBS ($\text{pH} 7.4$) 定容于 5 mL 量瓶中,以 PBS 为空白对照, $200 \sim 450 \text{ nm}$ 进行紫外扫描,测得空白脂质体的最大吸收波长为 254 nm 。

故选择 254 nm 作为定量测定空白脂质体的吸收波长。

2.3.3 葡聚糖凝胶小柱对空白脂质体的吸附 准确量取 100、150、200 μL 空白脂质体分别均匀加入 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶小柱,静置吸附 25 min, $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,去离子水洗脱 2 次(每次 500 μL , $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 5 min),收集洗脱液。以去离子水作为空白对照,于 254 nm 测定空白脂质体 (A_0) 及各次洗脱液 (A_x) 的吸光度,按公式 1 计算柱回收率。累积柱回收率分别为 $(98.37 \pm 0.26)\%$ 、 $(100.22 \pm 0)\%$ 、 $(100.96 \pm 0)\%$,结果表明,去离子水洗脱 2 次可将空白脂质体完全洗脱,累积小柱回收率可达到 98% 以上(公式 1)。因此,可以用去离子水做洗脱剂。

$$\text{柱回收率}(\%) = \frac{A_x}{A_0} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

2.3.4 静置吸附时间的考察 准确量取 3 份 150 μL 空白脂质体均匀加至葡聚糖凝胶小柱顶部,分别吸附 10、15、25 min, $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,用去离子水洗脱 2 次(每次 500 μL , $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 5 min),收集洗脱液。于 254 nm 测定洗脱液吸光度,按公式 1 计算柱回收率。静置吸附 10、15、25 min 的柱回收率分别为 $(42.26 \pm 0)\%$ 、 $(94.46 \pm 0.19)\%$ 、 $(102.87 \pm 0)\%$,结果表明静置吸附 25 min 时,空白脂质体已完全洗脱,因此选择静置吸附时间为 25 min。

2.3.5 离心速度对空白脂质体柱回收率的影响 准确量取 3 份 150 μL 空白脂质体均匀加至葡聚糖凝胶小柱顶部,静置吸附 25 min,分别用 700、1 000、1 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,再用去离子水洗脱 2 次(每次 500 μL , $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 5 min),收集洗脱液,在 254 nm 处测定吸光度。按照公式 1 计算柱回收率。离心速度为 700、1 000、1 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的柱回收率分别为 $(95.60 \pm 0)\%$ 、 $(102.10 \pm 0.19)\%$ 、 $(103.44 \pm 0.19)\%$,离心速度为 1 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时会造成柱子断裂,因此离心速度选用 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.3.6 离心时间对空白脂质体柱回收率的影响 准确量取 3 份 150 μL 空白脂质体均匀加至葡聚糖凝胶小柱顶部,静置吸附 25 min, $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 分别离心 1、3、5 min,去离子水洗脱 2 次(每次 500 μL , $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 5 min),收集离心液,在 254 nm 处测定吸光度,按照公式 1 计算柱回收率。柱回收率分别为 $(71.70 \pm 0)\%$ 、 $(98.90 \pm 0.38)\%$ 、 $(102.80 \pm 0.38)\%$ 。结果表明,离心时间越长,柱

回收率越高。离心 5 min 时空白脂质体完全过柱,故离心时间定为 5 min。

2.3.7 上样量的考察 准确量取 100、200、400 μL 空白脂质体分别均匀加至葡聚糖凝胶小柱顶部,静置吸附 25 min, $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,去离子水洗脱 2 次(每次 500 μL , $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 5 min),收集洗脱液,在 254 nm 处测定吸光度。按照公式 1 计算。柱回收率分别为 $(102.99 \pm 0)\%$ 、 $(99.04 \pm 0.19)\%$ 、 $(100.96 \pm 0)\%$,实验结果显示,上样量对柱回收率的影响相对较小,但研究发现上样量过大会导致游离药物与包封药物无法分离,故采用 400 μL 脂质体。

2.3.8 SephadexG-50 小柱对 Apt-NLP 与 CTD 物理混合物的吸附 准确量取 1 mL Apt-NLP 和 2.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ CTD 溶液涡旋混匀制成物理混合物。准确量取 400 μL 物理混合物均匀加至葡聚糖凝胶小柱顶部,按照最佳分离条件,静置 25 min,去离子水洗脱 15 次(每次 500 μL , $1\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 5 min),收集各次洗脱液,置于 2 mL 量瓶中用甲醇定容。以甲醇为空白对照组,于 254 nm 处测定 Apt-NLP 的吸光度并计算其含量。按照“2.2.1”项色谱条件进样 HPLC 测定 CTD 含量。以洗脱次数为横坐标,分别以 Apt-NLP、CTD 的含量为纵坐标,绘制物理混合物的洗脱曲线,见图 6。结果表明,既定的洗脱条件洗脱 15 次均未检测到 CTD,洗脱 3 次就可以将物理混合物中的 CTD 和 Apt-NLP 完全分离。

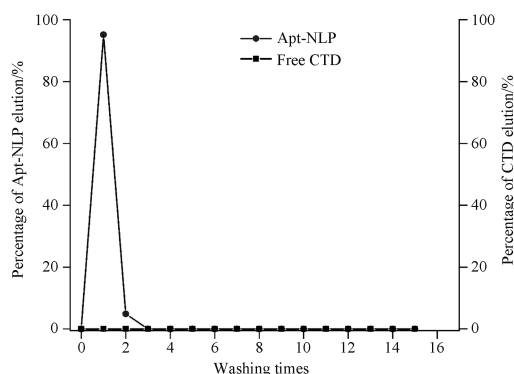


图 6 Apt-NLP 和 CTD 物理混合物洗脱曲线

Fig. 6 Elution curve of Apt-NLP and CTD physical mixture

2.3.9 Apt-CTD-NLP 包封率的测定 按照“2.1.1”项条件制备 3 批 Apt-CTD-NLP,准确量取 2 mL Apt-CTD-NLP 于 10 mL 量瓶,按照“2.2.2”项下条件破裂,进样 HPLC 测定并计算出 CTD 的总质量浓度 ρ_0 。

取同等体积的 Apt-CTD-NLP,按照按最佳分离条件分离 Apt-CTD-NLP 和游离的 CTD,收集洗脱液于 10 mL 量瓶,按照“2.2.2”条件破乳,采用 HPLC 测定并计算出包封的 CTD 质量浓度 ρ_1 。按公式 2 计算 3 批 Apt-CTD-NLP 的包封率分别为 94.29%、95.65%、93.75%,平均包封率为 $(94.56 \pm 0.80)\%$,RSD 值为 1.04%。

$$\text{包封率}(\%) = \frac{\rho_1}{\rho_0} \times 100\% \quad \text{公式(2)}$$

3 讨论

包封率是评价脂质体纳米载药体系质量的重要指标,包封率的大小会直接影响用药剂量和药物疗效^[19]。本研究用小柱离心联合 HPLC 测定 Apt-CTD-NLP 的包封率是 $(94.56 \pm 0.98)\%$,有望在后续 Apt-CTD-NLP 抗肝肿瘤作用的研究中,提高 CTD 抗肝肿瘤效果,降低 CTD 对其他正常细胞的毒副作用。

在探索 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶小柱分离游离 CTD 条件时,本研究对空白脂质体进行 200~450 nm 紫外波长扫描,确定其最大吸收波长为 254 nm。通过小柱离心前后空白脂质体的吸光度比值(柱回收率)作为评价指标,单因素考察优化小柱分离条件,建立了 Apt-CTD-NLP 包封率的测定方法。研究中发现有机溶剂易损坏葡聚糖凝胶的立体网状结构发生皱缩塌陷,导致药物无法分离,因此,本研究用去离子水做洗脱剂,且溶解 CTD 时尽量降低供试品中甲醇的用量,以确保最佳分离效果。离心转速、离心时间、吸附时间、上样量都会影响分离效果,因此在探索时需要对这些因素进行考察。本研究用小柱离心联合 HPLC 法测定包封率的佳分离条件是 400 μL 上样量,静置吸附 25 min,1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,只需洗脱 3 次就可以完全分离游离药物。与传统葡聚糖凝胶柱色谱法相比,小柱离心联合 HPLC 测定法不仅成本低,而且更简便快速,能有效地测定 CTD 包封率。

综上所述,本研究建立了葡聚糖凝胶小柱离心联合 HPLC 定量检测 Apt-CTD-NLP 包封率的方法,并进行了系统的方法学研究。结果表明,该法简便快速,为后续进一步深入研究 Apt-CTD-NLP 的体内抗肝肿瘤作用奠定实验基础。

REFERENCES

[1] HU S, CHANG J, RUAN H, *et al.* Cantharidin inhibits osteosarcoma proliferation and metastasis by directly targeting miR-214-3p/DKK3 axis to inactivate β -catenin nuclear translocation and LEF1 translation[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(10): 2504. DOI: 10.7150/ijbs.51638.

[2] ZHU S, LONG R, SONG T, *et al.* UPLC-Q-TOF/MS based metabolomics approach to study the hepatotoxicity of cantharidin

on mice[J]. *Chem Res Toxicol*, 2019, 32(11): 2204-2213.

[3] ZHU M, SHI X, GONG Z, *et al.* Cantharidin treatment inhibits hepatocellular carcinoma development by regulating the JAK2/STAT3 and PI3K/Akt pathways in an EphB4-dependent manner[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104868. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104868.

[4] LI S, WU X, FAN G, *et al.* Exploring cantharidin and its analogues as anti-cancer agents: a review[J]. *Curr Med Chem*, 2023, 30(18): 2006-2019.

[5] ZHU K, ZHOU L, ZOU M, *et al.* 18-GA-Suc modified liposome loading cantharidin for augmenting hepatic specificity: preparation, characterization, antitumor effects, and liver-targeting efficiency[J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109(6): 2038-2047.

[6] SUN S, SHANG E, JU A, *et al.* Tumor-targeted hyaluronic acid-mPEG modified nanostructured lipid carriers for cantharidin delivery: An *in vivo* and *in vitro* study[J]. *Fitoterapia*, 2021, 155: 105033. DOI: 10.1016/j.fitote.2021.105033.

[7] BULKBAKE U, DOPPALAPUDI S, KOMMINENI N, *et al.* Liposomal formulations in clinical use: an updated review[J]. *Pharmaceutics*, 2017, 9(2): 12. DOI: 10.3390/pharmaceutics9020012.

[8] ALMEIDA B, NAG O K, ROGERS K E, *et al.* Recent progress in bioconjugation strategies for liposome-mediated drug delivery[J]. *Molecules*, 2020, 5(23): 5672. DOI: 10.3390/molecules25235672.

[9] Nunes S S, Miranda S E M, de Oliveira Silva J, *et al.* pH-responsive and folate-coated liposomes encapsulating irinotecan as an alternative to improve efficacy of colorectal cancer treatment[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 144: 112317. DOI: 101016/j.biopha.2021.112317.

[10] WU L, WANG Y, XU X, *et al.* Aptamer-based detection of circulating targets for precision medicine[J]. *Chem Rev*, 2021, 121(19): 12035-12105.

[11] FU Z, XIANG J. Aptamer-functionalized nanoparticles in targeted delivery and cancer therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): 9123. DOI: 10.3390/ijms21239123.

[12] LIU L Y, ZHANG R, ZHANG S Q, *et al.* Determination of Encapsulation Efficiency of Insulin Nanoparticles by Mini-column Centrifugation-HPLC Method[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2022, 57(3): 214-219.

[13] JOSE J, KANNIYAPPAN H, MUTHUVIJAYAN V. A novel, rapid and cost-effective method for separating drug-loaded liposomes prepared from egg yolk phospholipids[J]. *Proc Biochem*, 2022, 115: 80-91.

[14] AHMED K S, HUSSEIN S A, ALI A H, *et al.* Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications[J]. *J Drug Target*, 2019, 27(7): 742-761.

[15] GUIMARAES D, CAVACO-PAULO A, NOGUEIRA E. Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications[J]. *Int J Pharm*, 2021, 6(1): 120571. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2021.120571.

[16] ZHANG Y, HANG T J, SONG M. Progress in research on the determination of entrapment efficiency of liposomes[J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2021, 52(2): 245-252.

[17] WANG H L, XU X Q, WANG R B, *et al.* Determination of Encapsulation Efficiency of Novel Solid Lipid Nanoparticles Containing Oleic Acid-CAT3 Conjugates by Mini-Column Centrifugation Method[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2020, 55(12): 1021-1026.

[18] ZHANG X R. Study on the anti-hepatocarcinoma activity of Eriamin and its transferrin targeted liposomes[D]. Changchun: Jilin University, 2021.

[19] GUO W D, PENG Y S, XU H, *et al.* Research progress of preparation technology and quality control of liposome formulation[J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2023, 43(1): 61-69.

(收稿日期:2023-05-04)