

· 实验研究 ·

复乳化-溶剂挥发法制备树舌多糖长循环热敏脂质体的方法研究及质量表征

袁佳妮 秦伟栋 韩俐莹 杨晓 丁雷 周晓东 刘丽文 罗文

摘要 目的 建立树舌多糖长循环热敏脂质体的优选制备方法。方法 通过对比薄膜分散法、乳化法溶剂挥发法、复乳化-溶剂挥发法三种方法制备树舌多糖长循环热敏脂质体的粒径、Zeta 电位、包封率和载药量,对包封率和载药量最佳者的稳定性、形态和热敏特性进行表征。结果 三种制备方法中,以复乳化-溶剂挥发法制备的树舌多糖长循环热敏脂质体包封率和载药量最高(82.4%和7.2%),其在28 d内稳定性良好,37℃时基本不释放,42℃时300 min内累计释药量≥90%。结论 复乳化-溶剂挥发法制备树舌多糖长循环热敏脂质体的处方和工艺制备的脂质体粒径均一,具有良好的热敏特性,可为进一步递药系统研究提供依据。

关键词 树舌多糖;长循环热敏脂质体;复乳化-溶剂挥发法;包封率;载药量
[中图分类号]R445.1 [文献标识码]A

Study on preparation and quality characterization of long-circulating thermosensitive liposomes of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by double emulsion solvent evaporation method

YUAN Jia'ni, QIN Weidong, HAN Liying, YANG Xiao, DING Lei, ZHOU Xiaodong, LIU Liwen, LUO Wen
Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China

ABSTRACT Objective To establish an optimal preparation method for polysaccharide long-circulating thermosensitive liposomes from *Ganoderma lucidum* polysaccharides. **Methods** The particle size, Zeta potential, entrapment efficiency and drug loading of *Ganoderma lucidum* polysaccharides long-circulating thermosensitive liposomes were characterized, which was prepared by comparing film dispersion method, emulsification solvent evaporation method and double emulsification solvent evaporation method. The stability, morphology and thermal sensitivity of polysaccharide long-circulating thermosensitive liposomes with the best encapsulation efficiency and drug loading were characterized. **Results** Among the three preparation methods, the highest entrapment efficiency and drug loading capacity of thermosensitive long-circulating thermosensitive liposomes were prepared by double emulsification solvent evaporation method (82.4% and 7.2%). The liposomes had good stability in 28 d, and basically did not release at 37℃. The cumulative drug release reached more than 90% at 42℃. **Conclusion** The formulation and process of preparation of polysaccharide long-circulating thermosensitive liposomes from *Ganoderma lucidum* polysaccharides by double emulsification solvent evaporation method are established. The prepared liposomes has homogeneous particle size and good thermosensitive properties, which could provide a basis for further drug delivery system research.

KEY WORDS *Ganoderma lucidum* polysaccharides; Long-circulating thermosensitive liposomes; Double emulsion solvent evaporation method; Entrapment efficiency; Drug loading

树舌多糖是从树舌的干燥子实体中提取的有效成分,被证实具有良好的抗肿瘤活性和增强机体免疫功能等作用^[1]。研究^[2-3]表明树舌多糖能通过抑制调

节T细胞活性,激发体内自身免疫反应,刺激IFN- γ 和IL-2分泌,或抑制TGF- β 1、IL-10和VEGF生成,从而阻止肿瘤生长。但是目前仍存在口服用药利用度低

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81671691)

作者单位:710032 西安市,中国人民解放军空军军医大学第一附属医院超声科

通讯作者:罗文, Email:lwdd1234@163.com

的问题。脂质体作为一种新型的药物载体,将药物包封于类似生物膜结构的双分子层中,可以提高药物的利用率,延长药物半衰期,控制药物在体内的释放^[4],可显著降低抗癌药物的毒副作用,并提高疗效。长循环热敏脂质体采用不同磷脂材料组成,具有不同相变温度,并在脂质膜中加入表面活性剂或类脂进行修饰,通过温度控释药物,增加循环稳定性和在体内的循环时间^[5]。本实验拟采用薄膜分散法、乳化溶剂挥发法和复乳化-溶剂挥发法制备树舌多糖长循环热敏脂质体,通过对比其粒径、包封率和载药量确定优选的制备方法,并对其制备的脂质体热敏特性进行初步探索。

材料与方法

一、仪器与材料

1. 仪器: AL104 电子天秤(瑞士 Mettler Toledo 公司), 紫外-可见分光光度计(澳大利亚 HALO 公司), RH Basic 2 恒温磁力搅拌器(德国 IKA 公司), 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器有限公司), Delsa Nano C 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪(美国贝克曼库尔特仪器有限公司), HH-42 快速恒温数显水箱(常州国华电器有限公司), 移液枪(德国 Eppendorf 公司), JD-900D 超声波细胞破碎仪(宁波江南仪器厂), 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司), 铜网(北京中镜科仪)。

2. 材料: 树舌多糖($\geq 97.0\%$, 杨凌慈缘生物科技有限公司, 生产批号: CY170908, 植物来源多孔菌科真菌平盖灵芝), D-葡萄糖标准品(中国食品药品鉴定研究院), 单棕榈磷脂酰胆碱(MPPC, 美国 Avanti polar lipids 公司), 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-氨基(DSPE-mPEG 2000-NH₂, 美国 Nanocs 公司), 二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC, Corden Pharma Switzerland LLC), 聚醚砜水相滤膜(0.45 μm 、0.22 μm), 氯仿(西安科昊生物工程有限公司)。

二、树舌多糖脂质体制备方法

1. 薄膜分散法: 称取 DPPC 32 mg, MPPC 5 mg, DSEP-mPEG2000-NH₂ 3 mg, DSPE-mPEG2000 3 mg, 溶于 100 ml 茄形瓶中, 加入 10 ml 氯仿溶解后, 在 40℃ 旋转蒸发器中减压蒸馏除去有机溶剂, 在烧瓶内壁形成均一半透明薄膜, 30℃ 真空干燥过夜, 加入 10 ml 树舌多糖水溶液, 探头超声乳化后, 得到半透明脂质体溶液, 过滤后, 密封置于 4℃ 冰箱保存。

2. 乳化溶剂挥发法: 称取 DPPC 32 mg, MPPC 5 mg, DSEP-mPEG2000-NH₂ 3 mg, DSPE-mPEG2000 3 mg, 溶

于 100 ml 茄形瓶中, 加入 10 ml 氯仿充分溶解; 称取 4 mg 树舌多糖溶于 10 ml 蒸馏水中, 加入到 10 ml 氯仿磷脂溶液中, 探头超声乳化 5 min, 形成 W/O 型白色乳液, 室温挥发有机溶剂, 得到淡黄色脂质体, 过滤后, 密封置于 4℃ 冰箱保存。

3. 复乳化-溶剂挥发法: 称取 DPPC 32 mg, MPPC 5 mg, DSEP-mPEG2000-NH₂ 3 mg, DSPE-mPEG2000 3 mg, 溶于 100 ml 茄形瓶中, 加入 4 ml 氯仿充分溶解; 称取 4 mg 树舌多糖溶于 2 ml 蒸馏水中, 加入到 4 ml 氯仿磷脂溶液中, 探头超声乳化 3 min, 形成乳白色的初乳, 将初乳加入到 10 ml 蒸馏水中, 探头超声乳化 5 min, 形成 W/O/W 型复乳, 除去有机溶剂, 得到淡黄色有乳光的脂质体混悬液, 密封置于 4℃ 冰箱保存。

三、三种方法制备的树舌多糖长循环热敏脂质体形态学及粒径检测

取不同方法制备的树舌多糖脂质体 0.5 ml, 加入 1.0 ml 蒸馏水稀释后, 加入样品池采用激光粒度及 Zeta 电位分析仪测定粒径和 Zeta 电位。使用移液枪吸取 1 滴脂质体混悬液于具有碳支持膜的铜网上, 使混悬液呈半球状附在铜网上, 静置 5 s 后, 用滤纸吸取多余样品, 待混悬液自然干透后, 于透射电镜下观察脂质体的形态; 将样品滴在硅板, 喷金后于扫描电镜显微镜下观察脂质体形态。

四、树舌多糖长循环热敏脂质体包封率和载药量测定

1. 标准曲线的制备: 精密称取 D-葡萄糖标准品于 10 ml 容量瓶中加入蒸馏水稀释, 摇匀定容, 使其浓度为 1 mg/ml 的对照品溶液。精密吸取 1 mg/ml 葡萄糖溶液, 分别置于 5 ml 的容量瓶中, 加水稀释, 摇匀定容, 配成浓度分别为 0.03、0.06、0.09、0.12、0.15 mg/ml 的葡萄糖溶液, 分别吸取 1 ml, 精密加入 1 ml 5% 苯酚溶液和 3 ml 浓硫酸, 在涡旋仪上摇匀, 置于沸水中加热 15 min 后, 在冷水浴中冷却至室温, 取出, 在紫外-可见分光光度计 490 nm 波长处测定吸光度。以吸光度(A)为纵坐标, 葡萄糖浓度(c)为横坐标, 绘制标准曲线。同时对该方法精密性、重复性、稳定性进行检测。①精密性实验: 精密吸取同一浓度的树舌多糖溶液 1.0 ml 6 份, 测定其吸光度; ②重复性实验: 精密称取同一批样品, 测定其吸光度; ③稳定性实验: 取同一浓度的葡萄糖溶液, 分别在 0、20、40、60、80、120 min 测定吸光度。

2. 包封率和载药量测定: 取上述三种方法制备好的树舌多糖长循环热敏脂质体混悬液 10 ml, 放入低温高速离心机中(12 000 r/min)离心 30 min, 吸取上清液,

取 1 ml,用蒸馏水稀释 5 倍后,取 1 ml 溶液,加入 1 ml 5% 苯酚溶液和 3 ml 浓硫酸,在涡旋仪上摇匀,置于沸水中加热 15 min 后,在冷水浴中冷却至室温,取出。于 490 nm 波长处测定吸光度,带入标准曲线,计算上清液中树舌多糖量。包封率(%)=(加入的药物总量-上清液中药物总量)/加入药物总量×100%。

五、树舌多糖长循环热敏脂质体稳定性观察

将包封率和载药量最佳制备的脂质体放置于 4℃ 冰箱中,分别检测 1、7、21、28 d 时脂质体的粒径。

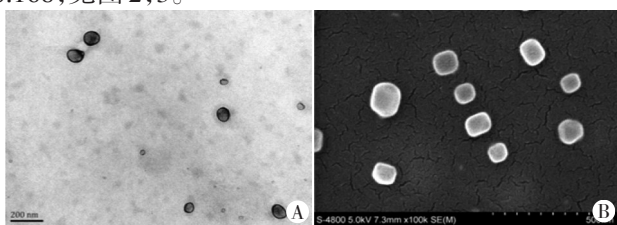
六、树舌多糖长循环热敏脂质体体外释药

取包封率和载药量最佳制备的树舌多糖长循环热敏脂质体混悬液 2 份,各 2 ml,置于透析袋中,分别测定 37℃ 和 42℃ 的体外释放速度,加入 10 倍体积的 PBS 缓冲液中透析。在 0、10、20、30、40、80、120、150、180、210、270、340 min 时各取样 2 ml,再补充同等体积的透析液,由苯酚-硫酸法于紫外-可见分光光度计下测定体外水相中的药物浓度,平均测量 3 次。

结 果

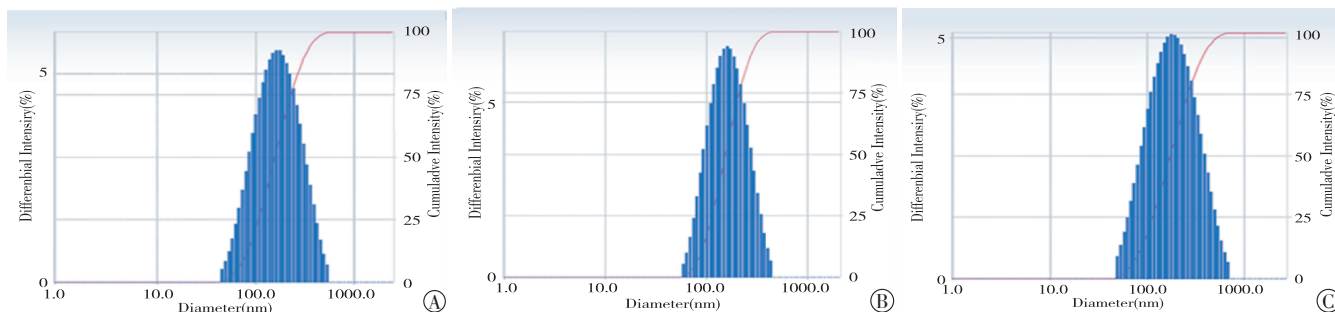
一、不同方法制备的脂质体形态学及粒径检测

薄膜分散法、乳化溶剂挥发法和复乳化-溶剂挥发法制备的树舌多糖长循环热敏脂质体溶液外观均为半透明淡黄色液体,稀释后有淡黄色乳光。在电镜下观察到的脂质体外观圆整,多呈圆形或椭圆形的小囊泡(图 1)。测得粒径分别为 144.1 nm、154.8 nm 和 163.2 nm,多分散性指数值分别为 0.230、0.225 和 0.168,见图 2、3。



A:透射电子显微镜下观;B:扫描电子显微镜下观

图 1 脂质体形态观察



A:薄膜分散法;B:乳化溶剂挥发法;C:复乳化-溶剂挥发法

图 3 不同方法制备的脂质体粒径分布图

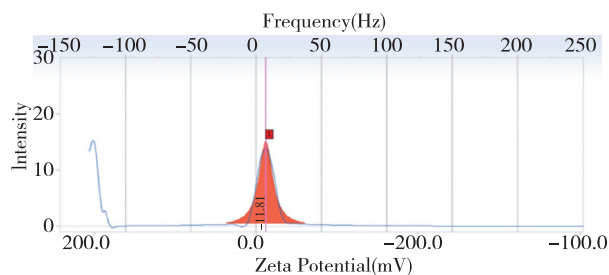


图 2 脂质体电位图

二、不同方法制备的脂质体包封率和载药量比较

1. 标准曲线方法的检测:以吸光度 A 为纵坐标,葡萄糖浓度 c 为横坐标,所得回归方程: $A=6.814c-0.0508$, $r=0.9973$,表明葡萄糖标准品在 0.03~0.15 线性关系良好。精密密度实验结果:测得 6 次吸光度分别为 0.1797、0.1886、0.1718、0.1868、0.1838、0.1789,平均吸光度 0.1816, RSD 值为 0.6%,仪器精密密度良好;重复性实验结果:RSD 值为 1.1%,方法重复性良好;稳定性实验测定吸光度结果分别为 0.1501、0.1503、0.1573、0.1634、0.1782、0.1778, RSD 值为 1.2%,其在 2 h 内稳定性良好。

2. 包封率和载药量:薄膜分散法、乳化溶剂挥发法和复乳化-溶剂挥发法制备的脂质体的包封率分别为 45.7%、80.8% 和 82.4%,载药量分别为 3.9%、6.8% 和 7.2%,其中复乳化-溶剂挥发法制备的脂质体包封率和载药量均最高。

三、复乳化-溶剂挥发法制备的脂质体稳定性实验观察结果

复乳化-溶剂挥发法制备的脂质体在 28 d 内稳定性均良好,见图 4。

四、复乳化-溶剂挥发法制备的脂质体体外释药结果

以时间为横坐标,药物释放百分比为纵坐标,脂质体体外释药情况见图 5,在 42℃ 时,300 min 内累计释药量达到 90% 以上;在 37℃ 条件下,基本不释药。

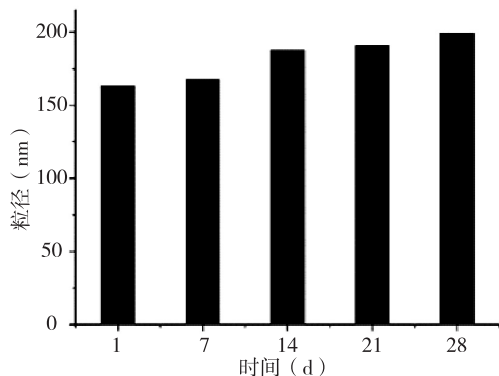


图4 复乳化-溶剂挥发法制备的脂质体体外稳定性柱状图

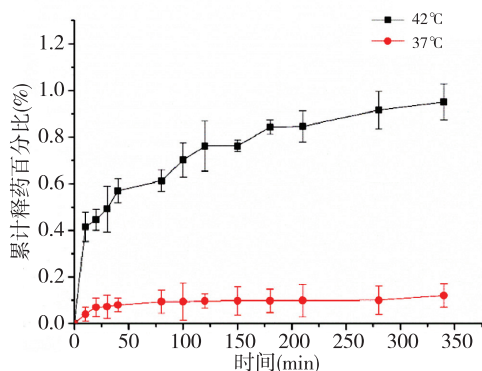


图5 复乳化-溶剂挥发法制备的脂质体在不同温度下的体外释药曲线图

讨论

脂质体的制备方法很多,根据不同性质的药物可选择不同的制备方法,目前常用有薄膜分散法、复乳化溶剂挥发法、乳化溶剂挥发法、逆向蒸发法、乙醇注入法等。本实验中用的磷脂易溶于氯仿、无水乙醇,微溶于无水乙醚、二氯甲烷,难溶于水,所包封的药物易溶于水,微溶或不溶于有机溶剂。通过分析,本实验选用薄膜分散法、乳化溶剂挥发法、复乳化-溶剂挥发法制备脂质体,发现三种方法均可以得到稳定的脂质体,且形态大小相似;进一步通过对载药量和包封率的测定发现,薄膜分散法所制备的脂质体粒径虽最小,但是包封率和载药量仅45.7%、3.9%,可能是因为在超声分散时,导致脂质体中的药物发生渗漏;复乳化-溶剂挥发法有利于制备水溶性强的药物,可以得到较高包封率的脂质体,并且在42℃下稳定性良好。复乳化-溶剂挥发法采用少量的水相溶剂与多量的有机溶剂进行第一次初乳化,形成W/O型反胶团,再加入大量水相溶剂,进行第二次乳化,形成W/O/W型复乳,进行溶剂挥发得到脂质体的过程。此过程中乳化充分,搅拌速度,水化时间是形成均一粒径脂质体的关键,通过对制备条件的优化,最终

选用复乳化-溶剂挥发法制备脂质体,得到包封率(82.4%)和载药量(7.2%)最佳的脂质体。包封率是评价脂质体的重要指标,文献^[6]报道脂质体包封率测定的方法有凝胶柱层析法、超滤法、透析法、荧光淬灭反应法、电子自旋共振光谱法,以上方法均有局限性,本实验采用高速低温离心法分离树舌多糖脂质体,以紫外-可见分光光度计为检测手段,用苯酚硫酸显色法建立标准曲线,测定脂质体的包封率,此方法简单、快速。

本实验以磷脂 DPPC、MPPC、DSPE-PEGm2000、DSPE-mPEG2000-NH₂质量比为33:5:3:3制备树舌多糖长循环热敏脂质体,其中 DPPC 的相变温度为42℃,具有良好的热敏特性,在温度高于相变温度时,脂质体膜的流动性和通透性增加,在加热条件下可使药物在加热部位局部迅速释放,保持细胞内较高的药物浓度^[7]。超声引导下的热消融技术,在对肿瘤进行治疗时,会因为局部温度不能升到60℃以上,形成40℃~60℃的亚高温温场,导致肿瘤残余;而本实验所制备的热敏脂质体,在37℃时基本不释药,在42℃时释药良好;树舌多糖具有很好的抗肿瘤活性,可对超声引导下热消融后所产生的亚高温温场中的残余肿瘤组织起作用。因此对于提高热消融的效率具有重要意义。同时,由于加入长循环材料、PEG长链,可以增加脂质体膜的亲水性,减少血浆蛋白与膜的相互作用,使脂质体在到达靶位置之前,更容易从血管间隙进入,并保持自身的完整性,延长在体内循环时间,提高了被动靶向性^[8]。

综上所述,本实验采用复乳化-溶剂挥发法制备出的树舌多糖长循环热敏脂质体包封率较高,载药量较大,脂质体粒径均一,形态稳定;同时,该载药体在体外具有良好的热敏特性,可进一步进行体内评价,也为后续靶向药物递送研究建立基础。

参考文献

- [1] Chien RC, Yen MT, Tseng YH, et al. Chemical characteristics and anti-proliferation activities of Ganoderma tsugae polysaccharides [J]. Carbohydr Polym, 2015, 128(1): 90-98.
- [2] Li A, Shuai X, Jia Z, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide extract inhibits hepatocellular carcinoma growth by downregulating regulatory T cells accumulation and function by inducing microRNA-125b [J]. J Transl Med, 2015, 13(1): 100.
- [3] Pattni BS, Chupin VV, Torchilin VP. New developments in liposomal drug delivery [J]. Chem Rev, 2015, 115(19): 10938-10966.
- [4] 李端, 罗文, 张云飞, 等. 新型载水飞蓟素热敏脂质体-微泡 SonoVue 复合体制备及质量分析 [J]. 中国超声医学杂志, 2015, 31(3): 250-253.
- [5] Kneidl B, Peller M, Winter G, et al. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review [J]. Int J Nanomedicine, 2014, 9(1): 4387-4398.