

· 工艺研究 ·

麦角甾醇联合阿法替尼双载药脂质体的制备及质量评价

张梦迪¹, 黄挺², 米完完³, 黄绳武¹(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402; 2. 杭州市红十字会医院, 浙江 杭州 310003; 3. 杭州市余杭区第五人民医院, 浙江 杭州 311100)

摘要: **目的** 研究麦角甾醇(ERG)联合阿法替尼(Afa)双载药脂质体的最佳制备工艺, 并对其质量评价。**方法** 以薄膜分散法制备 ERG 脂质体(ERG-LIP), 用硫酸铵梯度法将 Afa 柠檬酸溶液载入脂质体内水相, 制备 ERG 联合 Afa 双载药脂质体(ERG/Afa-LIP), 以 Sephadex-G50 微柱离心法测定 ERG/Afa-LIP 的包封率。以单因素试验结果为基础, 用 Box-Behnken 试验考察各因素对脂质体包封率的影响, 确定 ERG/Afa-LIP 的最佳制备工艺。对该工艺下的 ERG/Afa-LIP 进行形貌表征, 测定其粒径与 Zeta 电位、pH 值、过氧化值、包封率与载药量、体外释放度。**结果** 确定 ERG/Afa-LIP 最佳制备工艺为孵育温度 54.2 °C, 孵育时间 59.06 min, Afa 浓度 0.238 mg·mL⁻¹, 硫酸铵浓度 194.63 mmol·L⁻¹。外观形态较完整, 平均粒径为(103.03±0.61)nm, 聚合物分散性指数(PDI)为(0.261±0.003), Zeta 电位为(2.48±0.45) mV, pH 均值为(3.78±0.02), 显酸性, 平均包封率为(96.92±0.58)%, 载药量为(2.92±0.23)%, 在释放介质为 pH6.5 的含 40% 甲醇的磷酸盐缓冲液下, ERG/Afa-LIP 的体外释放度符合《中国药典》要求。**结论** 制备出具有靶向作用的 ERG 与 Afa 双载药脂质体, 其质量稳定, 符合 2015 年版《中国药典》的要求。

关键词: 药用真菌; 麦角甾醇; 阿法替尼; 硫酸铵梯度法; 双载药脂质体; 响应面实验

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)05-0701-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.015

Preparation and Quality Evaluation of Ergosterol and Afatinib Double-loaded Liposomes

ZHANG Mengdi¹, HUANG Ting², MI Wanwan³, HUANG Shengwu¹ (1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402 Zhejiang, China; 2. Hangzhou Red Cross Hospital, Hangzhou 310003 Zhejiang, China; 3. Hangzhou Yuhang District Fifth Peoples Hospital, Hangzhou 311100 Zhejiang, China)

Abstract: Objective To study the best preparation process of ergosterol (ERG) combined with afatinib (Afa) double-loaded liposomes, and to evaluate its quality. **Methods** The ergosterol liposomes (ERG-LIP) were prepared by thin-film dispersion method, and the afatinib citric acid solution was loaded into the liposome aqueous phase by the ammonium sulfate gradient method to prepare ergosterol combined with afatinib double-loaded drug liposome (ERG/Afa-LIP). Sephadex-G50 microcolumn centrifugation method was used to determine the encapsulation efficiency of ERG/Afa-LIP. Based on the single-factor test results, the effects of various factors on the liposome encapsulation rate were investigated according to the principle of Box-Behnken test design, and the best preparation process of ERG/Afa-LIP was determined. The morphological characterization of ERG/Afa-LIP was performed, and its particle size and Zeta potential, pH value, peroxide value, encapsulation rate and drug loading, *in vitro* release rate were determined. **Results** The best preparation process for ERG/Afa-LIP was determined to be as follows: an incubation temperature of 54.2 °C, and on incubation time of 59.06 min, Afa concentration at 0.238 mg·mL⁻¹, and

收稿日期: 2020-12-22

作者简介: 张梦迪, 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤靶向及肿瘤机理。Email: 17826866713@163.com。通信作者: 黄绳武, 男, 教授, 研究方向: 药物新剂型研究, Email: hsw55@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473361)。

ammonium sulfate concentration at 194.63 mM. The appearance is relatively round, and the average particle size is (103.03 ± 0.61) nm, the PDI is (0.261 ± 0.003) , the Zeta potential is (2.48 ± 0.45) mV; it is acidic with an average pH of (3.78 ± 0.02) , and the average encapsulation rate is (96.92 ± 0.58) %; the drug loading is (2.92 ± 0.23) %. The ERG/Afa-LIP meets the requirements of the Chinese Pharmacopoeia in the release medium of pH 6.5 phosphate buffer containing 40% methanol. **Conclusion** ERG and Afa dual drug-loaded liposomes with targeting effect was prepared, and the quality was stable, meeting the requirements of the 2015 edition of Chinese Pharmacopoeia.

Keywords: Medicinal fungi; ergosterol; afatinib; ammonium sulfate gradient method; dual drug-loaded liposomes; response surface experiment

近年来,药用真菌在治疗非小细胞肺癌的临床前研究中效果良好^[1-2]。本课题组前期选用台湾特有的真菌牛樟芝开展体外抗肿瘤作用研究,以肺癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌细胞为对象,开展肿瘤细胞增殖抑制试验并获得药物对于各个肿瘤细胞的 IC₅₀ 值,其中牛樟芝醇提物作用于肺癌 A549 细胞时,细胞增殖抑制作用最强,而且,牛樟芝中的麦角甾醇(ERG)对肺癌有很强的抑制作用^[3]。

阿法替尼(Afatinib, Afa)是第二代不可逆的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)酪氨酸激酶抑制剂,是德国勃林格殷格翰公司研发的 EGFR 和 HER2 (human epidermal growth factor receptor-2, HER2) 双重多靶点药物^[5-8],是针对 tyrosine kinase inhibitor (TKI) 继发性耐药开发研制的,它携带一个反应性的丙烯酰胺基,是 ATP 竞争苯胺基衍生物,能够阻止 EGFR、HER2 和 HER4 (human epidermal growth factor receptor-4, HER4) 激酶,形成共价键和不可逆价键^[9-13]。然而其使用约 9~13 个月后也会产生耐药,失去抗肿瘤作用,严重影响了治疗效果^[14-15]。前期研究^[4]表明,ERG 联合 Afa 对肺癌 A549、PC-9 细胞的抑制率比两药单用组均有不同程度的提高,表明 ERG 与 Afa 联用明显增强了 Afa 对 A549 与 PC-9 细胞的敏感性。目前市售 Afa 为片剂,口服给药生物利用度较低,且不良反应较多^[16-21]。为提高患者的生命质量,减小耐药现象的发生,开发一种具有靶向性、生物利用度高、不良反应少的 Afa 新型制剂势在必行。本研究优化了 ERG 联合 Afa 双载药脂质体的制备工艺,对其外观形态、粒径、Zeta 电位(Zeta potential)、pH 值、过氧化值、包封率、载药量及体外释放度进行了表征。

1 材料

1.1 仪器 XS105DU 分析天平(瑞士梅特勒-托利多

公司); DK-450B 电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司); Scientz-II D 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); UV759S 紫外-可见分光光度计(上海精科仪器公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); DDS-11A 型精密数显电导率仪、PHS-3C 型精密数显酸度计(杭州雷磁分析仪器厂); HOMOEX-25 高压膜挤出器(上海赫默仕机电科技有限公司); Zetasizer Nano ZS90 激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司); H-7650 透射扫描电子显微镜(日本 HITACHI 公司); 十二通道半自动多肽合成仪(上海强耀生物科技有限公司)

1.2 试剂 Afa 原料药(爱必信生物科技有限公司,批号: abs47020632); ERG 原料药($\geq 95\%$, 美国 Sigma 公司,批号: BCBN4049V); 卵磷脂(大豆卵磷脂, $> 98\%$, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号: G1813018); 高纯胆固醇(注射级,上海艾伟特医药科技有限公司,批号: B01221); 硫酸铵、柠檬酸、三氯甲烷、石油醚(上海凌峰化学试剂有限公司,批号分别为 20120313、20110725、20171017、20150911); 无水乙醇(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号: 20160414); 甲醇(色谱级,美国天地有限公司,批号: MS1922-801); 氢氧化钠(永华化学科技有限公司,批号: 20170104); 聚碳酸酯径迹蚀刻膜(型号: 0.8、0.4、0.22、0.1 μm , 英国 Whatman 公司)

2 方法与结果

2.1 ERG/Afa-LIP 的制备方法 首先制备 ERG-LIP。卵磷脂(SPC)与胆固醇(Chole)摩尔浓度比 5 : 1, ERG 载药 10 %、超声 20 min。精密称取 SPC 98 mg、Chole 10 mg、ERG 12 mg, 加入 10 mL 氯仿充分溶解, 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发成薄膜后, 加入 10 mL 一定浓度的硫酸铵溶液置于水平摇床上水化 30 min, 转速

140 r·min⁻¹。水化完毕, 超声 20 min(每超声 2 s, 停 1 s)。依次用 0.8、0.4、0.2、0.1 μm 的聚碳酸酯膜高压挤出, 即得 ERG-LIP。

将制备好的 ERG-LIP 转移到截留分子量为 8 000~14 000 的透析袋中, 两端用透析夹夹紧, 投入 100 倍量超纯水中。透析 2.5 h 后更换透析液, 继续透析 2.5 h。透析结束后, 在 ERG-LIP 中加入等体积的一定浓度的 Afa 柠檬酸溶液, 在 50 ℃ 水浴下孵育 55 min, 即得 ERG/Afa-LIP。

2.2 ERG/Afa-LIP 中 Afa 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent C₁₈ 柱 (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 保护柱: 通用型保护柱; 流动相: 甲醇-30 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液 (75:25), 为体积比; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 253 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取 Afa 对照品 29.61 mg, 甲醇定容至 50 mL 容量瓶中, 得到浓度为 592.2 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。

2.2.3 空白脂质体的制备 称取一定比例的 SPC、Chole、ERG, 用氯仿溶解后旋转蒸发成薄膜, 水化后经探头超声和高压挤出, 透析后制成空白脂质体。

2.2.4 供试品溶液的制备 分别量取空白脂质体和 ERG/Afa-LIP 脂质体溶液各 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇 2 mL 破膜, 甲醇溶液定容至刻度, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 分别作为阴性样品和供试品储备液。

2.2.5 Afa 标准曲线的绘制 取对照品储备液 0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.00、1.60、2.00、2.50 mL 于 10 mL 容量瓶中, 甲醇溶液定容至刻度, 0.45 μm 滤膜过滤, 进样 20 μL。以标准品浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。Afa 的线性回归方程为: $Y=71.961X-56.929$, $R^2=0.9998$, 表明 Afa 在 2.96~148.05 μg·mL⁻¹ 的范围内, 峰面积与浓度的线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密移取上述对照品储备液 2.0、1.0、0.1 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 甲醇溶液定容, 作为高、中、低浓度; 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 在 1 d 内每个浓度重复进样 5 针, 每次进样量为 20 μL, 得到日内 RSD。连续测定 3 d, 得到日间 RSD。Afa 高、中、低浓度对照品峰面积的相对标准偏差(RSD)在 0.13% 与 1.86% 之间, 均小于 3%, 表明仪器的精密度良好。

2.2.7 重复性试验 取 ERG/Afa-LIP, 按“2.1”项下脂质体的制备方法制备, 平行 6 份, 所得供试品按

“2.2.1”项下色谱条件测定 Afa 的含量。结果显示 Afa 浓度的 RSD 为 2.63%, 小于 3%, 表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验 取 ERG/Afa-LIP, 按“2.1”项下供试品制备方法制备, 加入 10 mL 容量瓶中, 甲醇溶液定容至刻度线; 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 分别于 0、1、2、4、6、8、12、24 h 进样 20 μL。测定供试品溶液中 Afa 含量。结果显示 Afa 浓度的 RSD 为 2.18%, 小于 3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 回收率试验 按“2.1”项下脂质体的制备, 按照样品含 Afa 量的 50%、100% 和 150%, 分别精密加入“2.1”项下 Afa 对照品储备液 0.096、0.194、0.290 mL, 置于 10 mL 容量瓶中; 加入甲醇 2 mL 破膜, 甲醇溶液定容; 0.45 μm 微孔滤膜过滤。在本研究色谱条件下, 进样 20 μL, 测定 Afa 的含量, 计算加样回收率。结果表明, Afa 的加样回收率均在 95%~105% 之间, 平均加样回收率为 97.97%, 且各浓度的 RSD 均小于 3%, 表明该方法准确性良好。

2.2.10 Afa 包封率的测定 精密量取 ERG/Afa-LIP (0.1 mL) 3 份, 慢慢上样于微柱内部, 在离心半径 6 cm、500 r·min⁻¹ 条件下离心 2 min, 使 ERG-LIP 进入微柱内部, 往微柱内继续加入 0.2 mL 的超纯水, 以离心半径 6 cm、1 500 r·min⁻¹ 离心 2 min, 收集洗脱液于 10 mL 容量瓶内; 超纯水洗脱 3 次, 用甲醇超声破乳, 甲醇定容至刻度, 按 Afa 色谱条件测定包封于 ERG-LIP 中的 Afa 药物浓度(C_i)。再量取 ERG/Afa 脂质体溶液 0.1 mL 于 10 mL 的量瓶中, 甲醇破乳, 甲醇定容至刻度, 按 Afa 色谱条件测定总药物 Afa 的浓度(C_0), 计算包封率(EE)。EE= $C_i/C_0 \times 100\%$ 。

2.2.11 Afa 载药量的测定 测定一定体积脂质体混悬液的含量, 并计算脂质体中包裹的药物量($m_{包}$), 冻干后称其质量为 m 。载药量 = $m_{包}/m \times 100\%$ 。

2.2.12 体外释放度的测定 考察在不同 pH 条件下 Afa 药物的体外释放情况。分别精密吸取 ERG/Afa-LIP 4 mL 及 Afa 的柠檬酸溶液 4 mL 于透析袋(截留分子量 8 000~14 000)中。两端用透析夹夹紧, 放入 100 mL pH 分别为 7.4 和 6.5 的含有 40% 甲醇的磷酸盐缓冲液中, 置恒温水浴振荡器(振摇速率 100 r·min⁻¹, 温度 37 ℃)中, 于 0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、10、12、24 h 吸取透析液 1 mL, 并补充 1 mL 新鲜透析介质。以 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后, 通过 HPLC 进样, 进样 20 μL 测定其峰面积, 代入线性回归方程计算各取样点下的 Afa 的释药浓度。按照如下公式进行计算:

累积释放百分率(Q)= $(C_1 \times V_0 + \sum_{n=1}^{t-1} C_n V) / M_0 \times 100\%$ 。

其中, C_1 为各取样点中 Afa 释放的浓度, V_0 为释放介质体积, V 为取样体积, M_0 为 Afa 总药量。

2.3 单因素试验

2.3.1 硫酸铵浓度对 Afa 包封率的影响 考察不同浓度的硫酸铵溶液对包封率的影响, 采用“2.1”项下脂质体的制备方法制备 ERG-LIP 后, 分别加入 100、150、200、250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 进行水化。ERG-LIP 制备结束后, 透析袋透析 2 次, 每次 2.5 h, 然后加入等体积 Afa 溶液在 50 $^\circ\text{C}$ 水浴中进行孵育, 结果见图 2。随着 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度的增加, ERG/Afa-LIP 的包封率增大。当 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 250 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 包封率达到最大, 为 57.3%。

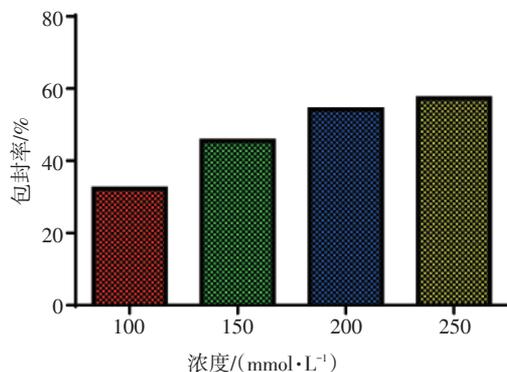


图 2 不同浓度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对 ERG/Afa-LIP 包封率的影响
Figure 2 Effect of different ammonium sulfate concentrations on encapsulation efficiency of ERG/Afa-LIP

2.3.2 孵育时间对 Afa 包封率的影响 考察 Afa 柠檬酸溶液与 ERG-LIP 在 20、30、40、50、60 min 孵育时间下的包封率, 结果见图 3。随着孵育时间的增加, ERG/Afa-LIP 的包封率增大。当孵育时间为 50 min 时, 包封率达到最大, 为 65.30%, 随着孵育时间的继续增加, 包封率下降。

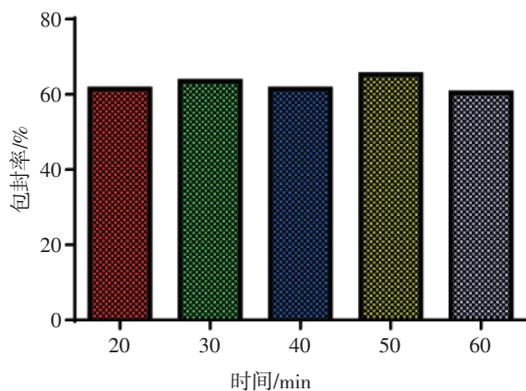


图 3 孵育时间对 Afa 包封率的影响
Figure 3 Effects of different incubation time on encapsulation efficiency of Afa

2.3.3 孵育温度对 Afa 包封率的影响 考察 Afa 柠檬酸溶液与 ERG-LIP 在 30、40、50、60、70 $^\circ\text{C}$ 孵育温度下的包封率, 结果见图 4。30~60 $^\circ\text{C}$ 之间, 随着温度升高, 包封率增大, 当孵育温度为 60 $^\circ\text{C}$ 时, 包封率达到最大, 为 66.28%。随着孵育温度的继续增高, 包封率下降。

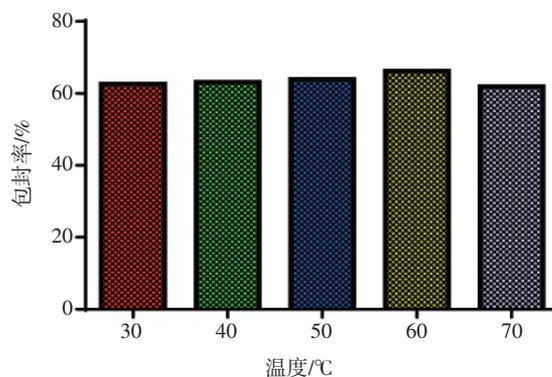


图 4 孵育温度对 Afa 包封率的影响
Figure 4 Effects of different incubation temperatures on encapsulation efficiency of Afa

2.3.4 Afa 柠檬酸溶液浓度的考察 在 ERG-LIP 中加入等体积的不同浓度的 Afa 柠檬酸溶液进行孵育, 设二者的浓度比为 1.2:1、1.5:1、2:1、3:1、6:1, 考察 ERG/Afa 不同浓度下 ERG/Afa-LIP 的包封率, 结果见图 5。当 ERG/Afa 的浓度比为 3:1 时, Afa 的包封率达到最大, 为 93.17%。

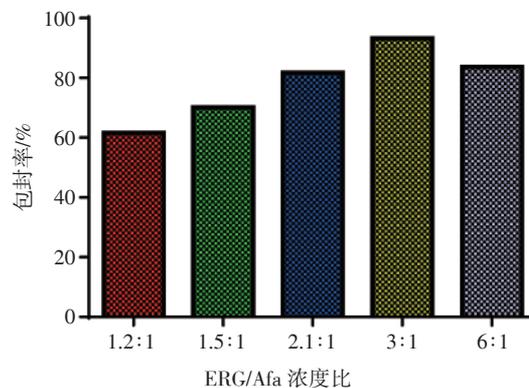


图 5 不同 ERG/Afa 浓度比对 Afa 包封率的影响
Figure 5 Effect of different ERG/Afa concentration ratio on encapsulation efficiency of Afa

2.4 响应面实验设计 以单因素试验结果为基础, 依据 Box-Behnken 试验设计的原理, 选取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度、孵育温度、孵育时间、ERG/Afa 浓度比作为自变量, 以 ERG/Afa-LIP 中 Afa 的包封率为响应值, 并以 -1、0、1 分别代表变量的因素编码, 基于 Box-Behnken 响应曲面设计方法, 用 Design-Expert 10.0.7 软件设计 4 因素 3 水平试验。结果见表 1。

表 1 响应面试验设计及结果

Table 1 Design and results of response surface test

编号	硫酸铵浓度(A)/ (mmol·L ⁻¹)	孵育温度 (B)/℃	孵育时间 (C)/min	ERG/Afa 浓度比(D)	包封率/%
1	200	70	45	2	78.12
2	250	70	45	4	87.89
3	250	50	45	4	89.42
4	150	60	45	2	70.99
5	200	50	30	4	92.62
6	200	50	45	6	95.68
7	200	60	45	4	97.52
8	200	60	60	2	83.50
9	200	60	30	6	72.12
10	200	60	60	6	94.49
11	200	60	45	4	96.76
12	250	60	45	6	93.52
13	200	60	45	4	95.27
14	200	50	45	2	78.75
15	150	60	60	4	90.92
16	150	50	45	4	87.51
17	150	70	45	4	88.00
18	200	70	45	6	97.02
19	200	50	60	4	92.02
20	200	70	30	4	92.68
21	250	60	60	4	88.24
22	200	60	45	4	91.51
23	250	60	45	2	73.78
24	150	60	45	6	94.82
25	200	70	60	4	90.39
26	200	60	30	2	82.89
27	200	60	45	4	90.84
28	250	60	30	4	95.66
29	150	60	30	4	85.55

2.4.1 模型的建立与方差分析 运用 Design-Expert V 10.0.7 软件对表 1 数据进行二次多元回归拟合, 计算回归系数, 得自变量与因变量间的回归方程: $Y = 94.38 + 0.89A - 0.16B + 1.50C + 6.64D - 0.50AB - 3.20AC - 1.02AD - 0.42BC + 0.49BD + 5.44CD - 3.76A^2 - 0.78B^2 - 1.91C^2 - 7.59D^2$ 。

由表 2 中分析结果可知, 回归方程模型 $P = 0.0474 < 0.05$, 表明模型具有显著性。失拟项 $P = 0.0796 > 0.05$, 说明失拟项不显著, 表明回归模型是合适的, 可以用来分析和预测 ERG/Afa-LIP 的最佳制备工艺。在影响 Afa 包封率的 4 个因素中, 影响 Afa 包封率程度顺序为 $D > C > A > B$, 其中 D(ERG/Afa 浓度比)因素对 Afa 包封率的影响非常显著($P < 0.01$)。

2.4.2 响应面优化分析 通过 Design-Expert V 10.0.7 软件对此模型进行响应面分析。结果见图 6。响应面为响应值对两两交互因素所构成的三维空间曲线图, 效应面曲线越陡峭, 说明各自变量对响应值的

表 2 回归模型方差分析

Table 2 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1 148.83	14	82.06	2.5	0.047 4
A	9.58	1	9.58	0.29	0.596 1
B	0.30	1	0.30	0.0092	0.924 8
C	27.12	1	27.12	0.83	0.376 8
D	528.28	1	528.28	16.23	0.001 2
AB	1.02	1	1.02	0.031	0.862 0
AC	40.90	1	40.90	1.26	0.281 2
AD	4.18	1	4.18	0.13	0.725 4
BC	0.71	1	0.71	0.022	0.884 4
BD	0.97	1	0.97	0.030	0.865 4
CD	118.37	1	118.37	3.64	0.077 3
A ²	91.70	1	91.70	2.82	0.115 5
B ²	4.00	1	4.00	0.12	0.731 3
C ²	23.73	1	23.73	0.73	0.407 7
D ²	373.43	1	373.43	11.47	0.004 4
残差	455.77	14	32.56		
失拟项	418.69	10	41.87	4.52	0.079 6
纯误差	37.08	4	9.27		
总误差	1 604.60	28			

影响越明显。取回归模型最大值点, 对应的实测值为孵育温度 54.2 ℃, 孵育时间 59.06 min, Afa 浓度 0.238 mg·mL⁻¹, 硫酸铵浓度 194.63 mmol·L⁻¹。

2.4.3 验证试验 为验证模型方程的可靠性, 首先制备 ERG-LIP, SPC 与 Chole 摩尔比 5:1, ERG 载药 10%、探头超声 20 min。精密称取 SPC 98 mg, Chole 10 mg, ERG 12 mg, 加入 10 mL 氯仿充分溶解, 40 ℃ 旋转蒸发成薄膜后, 加入 10 mL 的 194.63 mmol·L⁻¹硫酸铵溶液置于水平摇床上水化 30 min, 转速 140 r·min⁻¹。水化完毕, 探头超声 20 min。依次用 0.8、0.4、0.2、0.1 μm 的聚碳酸酯膜高压挤出, 即得 ERG-LIP。

将制备好的 ERG-LIP 转移到截留分子量为 8 000~14 000 的透析袋中, 两端用透析夹夹紧, 投入 100 倍量超纯水中, 透析 2.5 h 后更换透析液, 继续透析 2.5 h。透析结束后, 在 ERG-LIP 中加入等体积的浓度为 0.238 mg·mL⁻¹ 的 Afa 柠檬酸溶液, 在 54.2 ℃ 水浴下孵育 59.06 min, 即得 ERG/Afa-LIP。

按优选的制备工艺进行验证试验。结果见表 3。3 批 ERG/Afa-LIP 包封率的平均值为 96.92%, RSD 为 0.58%, 与模型的预测值 98.16% 相比, 偏差 1.24%, 表明建立的数学模型预测性良好, 优化的制备工艺重复性良好。

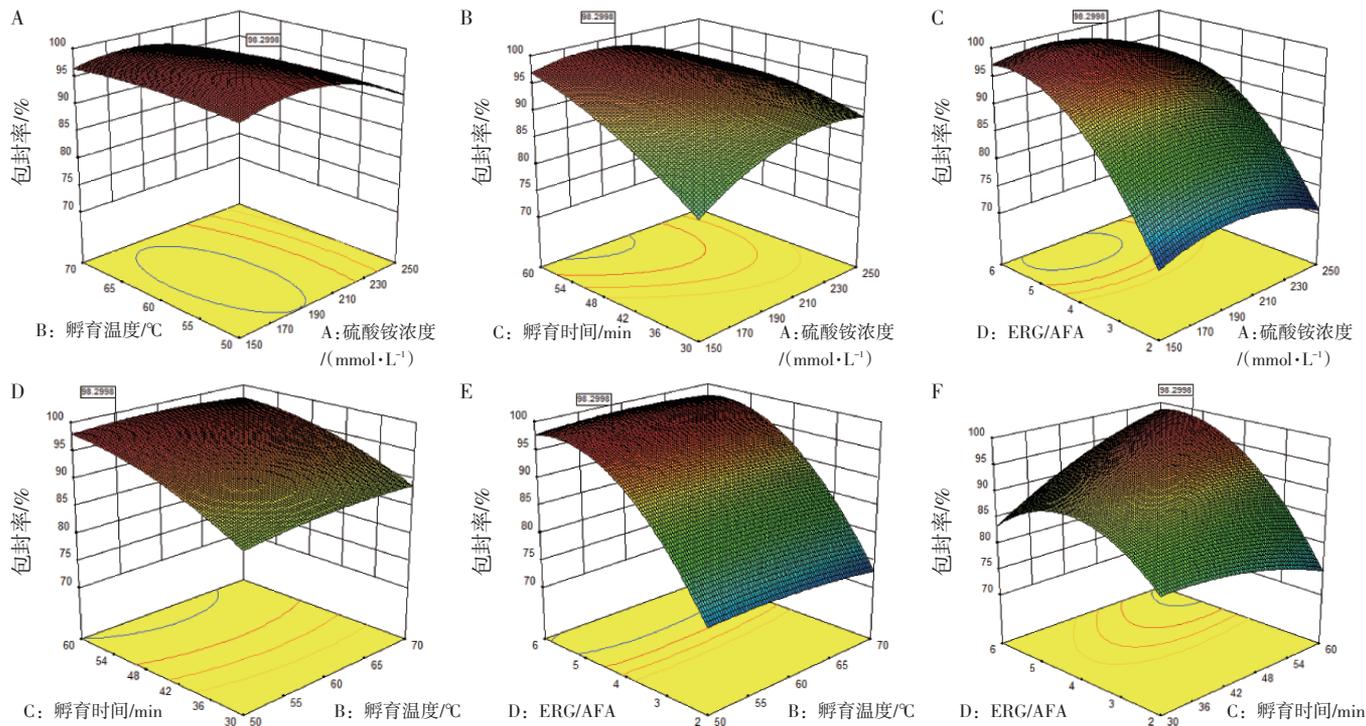


图 6 两两交互因素对 Afa 封装率影响的响应面图

Figure 6 Response surface diagram of the effect of two-to-two interaction factors on Afa encapsulation efficiency

表 3 ERG/Afa-LIP 验证试验

Table 3 Validation test of ERG/Afa-LIP

批次	封装率/%	平均封装率/%	RSD/%
20190709	97.57	96.92	0.58
20190709	96.62		
20190709	96.56		

2.5 ERG/Afa-LIP 的显微形态 采用负染法制备样品。在室温条件下，取 ERG/Afa-LIP 样品，滴至电镜专用铜网上，用滤纸吸干多余样品，静置 1 min。后用 1% 磷钨酸负染，静置 30 s 后用滤纸吸取铜网多余染液，挥干后电镜观察并照相。透射电镜结果表明，各脂质体形态较圆整，粒径分布均匀，见图 7。

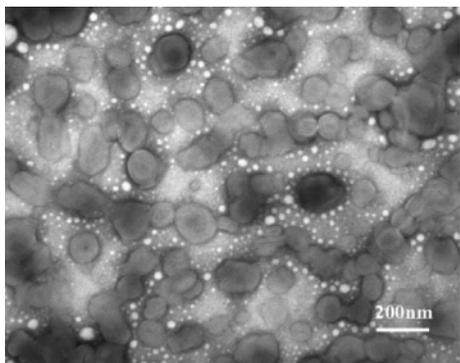


图 7 脂质体显微形态

Figure 7 Liposome micromorphology

2.6 ERG/Afa-LIP 的粒径分布与 Zeta 电位 取 ERG/Afa-LIP 样品，采用激光粒度仪测定平均粒径及其分布，结果见图 8。结果表明 ERG/Afa-LIP 的平均粒径为 $(103.03 \pm 0.61) \text{ nm}$ ，聚合物分散性指数(PDI)为 (0.261 ± 0.003) ，小于 0.3。脂质体粒径分布较集中。采用 Zeta 电位仪测定其电位，结果见图 9。结果显示 ERG/Afa-LIP 的 Zeta 电位为 $(2.48 \pm 0.45) \text{ mV}$ ，ERG/Afa-LIP 带正电。

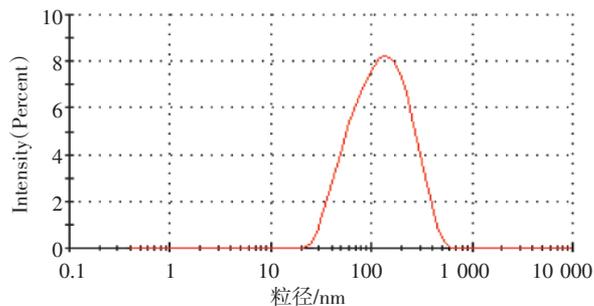


图 8 脂质体粒径分布

Figure 8 Distribution of liposome size

2.7 ERG/Afa-LIP 的 pH 值 取 3 批 ERG/Afa-LIP 样品，稀释后在常温下用 pH 计测定其 pH 值。3 批样品的 pH 均值为 (3.78 ± 0.02) ，说明 ERG/Afa-LIP 显酸性。

2.8 ERG/Afa-LIP 的封装率与载药量 测定 3 批

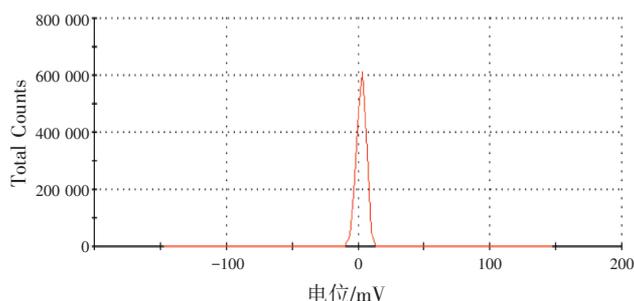


图 9 脂质体 Zeta 电位

Figure 9 Liposome Zeta potential

ERG/Afa-LIP 样品，其中 Afa 的平均包封率为 $(96.92 \pm 0.58)\%$ ，载药量为 $(2.92 \pm 0.23)\%$ 。ERG 的平均包封率为 $(93.90 \pm 1.84)\%$ ，载药量为 $(7.46 \pm 0.55)\%$ 。

2.9 体外释放度 见图 10~11。在含 40% 甲醇的磷酸盐缓冲液中，当 pH 为 6.5 时，24 h 内 Afa 原料药累积释放百分率为 97.98%，几乎完全释放；ERG/Afa-LIP 的累积释放百分率为 95.66%。当 pH 为 7.4 时，24 h 内 Afa 原料药累积释放百分率为 82.68%。ERG/Afa-LIP 的累积释放百分率为 87.17%。当 pH 为 6.5 时，在含 40% 甲醇的磷酸盐缓冲液中，0.5 h 内 ERG/Afa-LIP 的累积释放百分率为 22.03%，6 h 内 ERG/Afa-LIP 的累积释放百分率为 87.32%，直至 24 h，ERG/Afa-LIP 的累积释放百分率为 95.66%。2015 年版《中国药典》中关于脂质体突释效应的要求：开始 0.5 h 的释放量应 $\leq 40\%$ ，且 24 h 的累积释放百分率超过 80%。在释放介质为 pH6.5 的含 40% 甲醇的磷酸盐缓冲液下，ERG/Afa-LIP 符合该要求。说明 ERG/Afa-LIP 在弱酸性环境下更易释放，肿瘤部位显酸性，为 ERG/Afa-LIP 中药物的释放提供了一定的条件。

3 讨论

本实验通过薄膜分散法制备麦角甾醇脂质体 (ERG-LIP)，通过硫酸铵梯度法包载阿法替尼 (Afa)，制备 ERG/Afa-LIP。测定制剂的包封率、载药量以及药物含量，建立了 ERG 和 Afa 的含量测定方法。Afa 为弱碱性药物，将 Afa 的柠檬酸溶液与硫酸铵溶液按其在脂质体内水相中的浓度进行混合，能在一定程度上降低 Afa 在水中的溶解度，使其具有较高的包封率。

预试验采用电导率仪监测 ERG-LIP 脂质体透析液中硫酸铵浓度，确定最终透析方案如下：截留分子量为 8 000~14 000 的透析袋，1:100 透析介质，每 2.5 h 更换 1 次透析介质，透析 2 次。

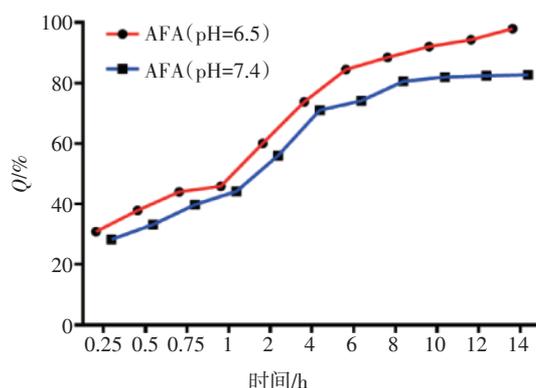


图 10 Afa 在不同 pH 释放介质下的累积释放度(Q)

Figure 10 Accumulative release of Afa in different pH release media

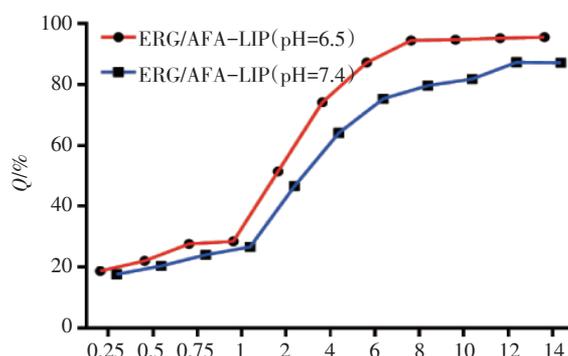


图 11 ERG/Afa-LIP 在不同 pH 释放介质下的累积释放度(Q)

Figure 11 Accumulative release of ERG/ Afa-LIP in different pH release media

脂质体包封率测定比较了超滤法和微柱离心法。结果表明，超滤法的原料药回收率为 70%，说明超滤管的膜材对 Afa 有吸附作用，导致游离的 Afa 吸附在超滤管上，使测定的包封率偏小。凝胶微柱离心法是将葡聚糖凝胶柱与离心分离方法结合测定包封率的方法之一^[22-23]，它利用分子筛原理，在洗脱过程中，脂质体由于粒径较大的特点首先被洗脱出来，从而达到脂质体与游离药物分离的目的。本实验采用 Sephadex-G50 微柱离心法测定 ERG/Afa-LIP 中 Afa 的包封率，结果平均包封率为 $(96.92 \pm 0.58)\%$ 。

本实验以 Afa 的包封率作为考察的指标，对硫酸铵浓度、孵育时间、孵育温度、Afa 浓度进行单因素考察。以单因素试验结果为基础，依据 Box-Behnken 试验设计的原理，选取硫酸铵浓度、孵育温度、孵育时间、ERG/Afa 浓度比为自变量，以 Afa 包封率为响应值进行了响应面实验，确定硫酸铵梯度法包载 Afa 的最佳处方工艺为：孵育温度为 54.2 °C，孵育时间为 59.06 min，Afa 浓度为 $0.238 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，硫酸铵浓度为 $194.63 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

质量评价表明, ERG/Afa-LIP 的粒径在 100 nm 左右, 有利于在肿瘤部位的渗透与滞留。其 pH 值显酸性, 故使用过程当中应该避免其与碱性药物联合使用。ERG 与 Afa 都具有较高的包封率, 体外释放度也符合 2015 年版《中国药典》的要求。

参考文献:

- [1] 汤莹, 韩森, 沈亚峰. 破壁灵芝孢子粉对人肺腺癌细胞超微结构影响及抑制作用[J]. 解剖学杂志, 2015, 38(1): 18-21.
- [2] 单丽珠, 宋腾, 王华庆. 牛樟芝联合化疗对恶性肿瘤患者免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2015, 21(6): 552-555.
- [3] 吴梅佳, 黄挺, 米完完, 等. 麦角甾醇与顺铂联合用药协同抑制人肺癌 A549 细胞增殖[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(6): 433-440.
- [4] 米完完, 黄挺, 张梦迪, 等. 麦角甾醇与吉非替尼联合用药协同抑制非小细胞肺癌 A549 和 PC-9 细胞增殖[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(3): 196-206.
- [5] ASHIQ M, KRISHNA K R, SUBRAMANIAN J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer harboring uncommon EGFR mutations: focus on afatinib [J]. Semin Oncol, 2019, 46: 271-283.
- [6] SHU D G, XU Y F, CHEN W Y. Knockdown of lncRNA BLACAT1 reverses the resistance of afatinib to non-small cell lung cancer via modulating STAT3 signalling[J]. J Drug Target, 2020, 28: 300-306.
- [7] HUANG F L, LIANG X J, MIN X L, et al. Simultaneous inhibition of EGFR and HER2 via afatinib augments the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. J Cancer, 2019, 10: 2063-2073.
- [8] DEBASIS D, XIE L Z, WANG J B, et al. Discovery of new quinazoline derivatives as irreversible dual EGFR/HER2 inhibitors and their anticancer activities- part I [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2019, 29: 591-596.
- [9] LIU X N, CAO Y Q, LI Y X, et al. Advanced lung adenocarcinoma with coexistent HER2 mutation and amplification and response to afatinib: a case report[J]. Ann Palliat Med, 2020, 2(2): 214-214.
- [10] LIN X F, LIAO J P, YANG Z J, et al. Inhibition of cisplatin-resistant head and neck squamous cell carcinoma by combination of afatinib with PD0325901, a MEK inhibitor[J]. Am J Cancer Res, 2019, 9: 1282-1292.
- [11] INES DE P, FILIP L, JOLIEN VAN DEN B, et al. Simultaneous targeting of EGFR, HER2, and HER4 by afatinib overcomes intrinsic and acquired cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines[J]. Mol Oncol, 2018, 12: 830-854.
- [12] SHUZO T, WANG Y, BRENDAN V, et al. In vitro molecular correlates of responses to dacomitinib and afatinib in bladder cancer [J]. Bladder Cancer, 2018, 4: 77-90.
- [13] HOON Y S, AHR Y J, REE K S, et al. Afatinib-induced acute fatal pneumonitis in metastatic lung adenocarcinoma[J]. Korean J Fam Med, 2016, 37: 351-355.
- [14] FANG W F, GAN J D, HUANG Y H, et al. Acquired EGFR L718V mutation and loss of T790M-mediated resistance to osimertinib in a patient with NSCLC who responded to afatinib[J]. J Thorac Oncol, 2019, 14: e274-e275.
- [15] YU HELENA A, RIELY GREGORY J, LOVLY CHRISTINE M. Therapeutic strategies utilized in the setting of acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20: 5898-907.
- [16] WANG J L, SU G X, YIN X Q, et al. Non-small cell lung cancer-targeted, redox-sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of a second-generation irreversible epidermal growth factor inhibitor-afatinib: *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109493.
- [17] CRYER A M, CHAN C, EFTYCHIDOU A, et al. Tyrosine kinase inhibitor gold nanoconjugates for the treatment of non-small cell lung cancer[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11: 16336-16346.
- [18] 欧阳宜强. 阿法替尼衍生物的设计、合成及抗肿瘤活性研究[D]. 南昌: 江西科技师范大学, 2018.
- [19] HAYASHI H, IIHARA H, HIROSE C, et al. Effects of pharmacokinetics-related genetic polymorphisms on the side effect profile of afatinib in patients with non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2019, 134: 1-6.
- [20] NUVOLA G, DALL'OLIO F G, MELOTTI B, et al. Cardiac toxicity from afatinib in EGFR-mutated NSCLC: a rare but possible side effect[J]. J Thorac Oncol, 2019, 14: e145-e146.
- [21] FUGGETTA M P, MIGLIORINO M R, RICCIARDI S, et al. Prophylactic dermatologic treatment of afatinib-induced skin toxicities in patients with metastatic lung cancer: a pilot study[J]. Scientifica(Cairo), 2019, 2019: 9136249.
- [22] 陈丹萍, 张涵, 索绪斌. 葡聚糖凝胶微柱离心-HPLC法测定紫杉醇-PEG 功能化多壁碳纳米管的包封率[J]. 广东药科大学学报, 2018, 34(5): 537-540.
- [23] 赵天文, 汤晗霄, 盛云杰, 等. 微柱离心结合 HPLC 法测定鳖甲肽脂质体的包封率[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1376-1379.

(编辑: 梁进权)