

· 制剂与质量 ·

正交试验法优选齐墩果酸固体脂质纳米粒的制备工艺

王靖雯, 张三奇, 文爱东, 汤海峰, 方坤泉, 刘 丹

(第四军医大学西京医院 药剂科, 陕西 西安 710032)

摘要:目的 制备齐墩果酸固体脂质纳米粒。方法 采用薄膜-超声分散法制备齐墩果酸固体脂质纳米粒,以包封率为指标,采用正交试验优选最佳制备工艺。结果 最佳制备工艺为:超声时间为40 min,齐墩果酸与大豆磷脂的比例为1:8,60 g/L甘露醇的用量为15 mL。所得齐墩果酸固体脂质纳米粒圆形或椭圆形,平均粒径范围为(75±20.3) nm,包封率大于97.81%。结论 薄膜-超声分散法制备齐墩果酸固体脂质纳米粒的工艺可行,包封率高。

关键词:齐墩果酸;固体脂质纳米粒;薄膜-超声分散法;正交试验

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)05-0683-03

Optimizing for preparation technique of oleanolic acid solid lipid nanoparticles by orthogonal test

WANG Jing-wen, ZHANG San-qi, WEN Ai-dong, TANG Hai-feng, FANG Kun-quan, LIU Dan

(Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract; Objective To prepare oleanolic acid solid lipid nanoparticles. **Methods** Film-ultrasonic wave dispersion technique was used to prepare oleanolic acid solid lipid nanoparticles. The optimal preparation technique was selected by orthogonal test, and the envelopment ratio of solid lipid nanoparticles was determined to evaluate the preparation technique. **Results** The optimal conditions were: ultrasonic wave time 40 min, oleanolic acid-phospholipids (1:8), 60 g/L mannitol 15 mL. The appearance of the prepared solid lipid nanoparticles was regular round or ellipse and the diameter distribution was (75±20.3) nm. The envelopment ratio was over 97.81%. **Conclusion** The selected preparation technique of oleanolic acid solid lipid nanoparticles is rational and practicable, with higher envelopment ratio.

Key words: oleanolic acid; solid lipid nanoparticles; film-ultrasonic wave dispersion technique; or thogonal test

齐墩果酸(oleanolic acid)是从青叶胆 *Swertia mileensis* T. N. Ho et W. L. shih 中提取分离的一种五环三萜类化合物,临床上主要用于慢性肝炎的治疗以及多方面保肝作用^[1]。固体脂质纳米(solid lipid nanoparticles)系指以固态的天然或合成类脂如大豆磷脂、三酰甘油等为载体材料,将药物包裹或内嵌于类脂核中,制成粒径约为50~1 000 nm的固体胶粒给药系统^[2]。本实验以大豆磷脂为载体,以包封率为评价指标,采用正交试验法优选各因素条件,确定了薄膜-超声分散法制备齐墩果酸固体脂质纳米粒的制备工艺。

1 材料

LC—10VP 高效液相色谱仪(日本岛津公司),Sephedex-G50 凝胶(Sigma 公司),RE—52 旋转蒸

发仪(上海亚荣生化仪器厂),KQ—250 型超声波发生器(江苏昆山淀山湖检测仪器厂),BP—190S 电子天平(德国赛多利斯),齐墩果酸(质量分数为98.7%,陕西慧科公司,批号 050322),大豆磷脂(上海太伟药业有限公司,批号 050716),其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 因素水平的确定:经预试验确定影响包封率、形态、均匀度、粒径分布的3个主要因素,即齐墩果酸与大豆磷脂比例(A),60 g/L甘露醇用量(B)和超声时间(C),各因素取3水平,因素水平见表1。

2.2 齐墩果酸固体脂质纳米粒的制备:由于齐墩果酸为脂溶性药物,本实验采用薄膜-超声分散法制备。精密称取处方量的齐墩果酸于100 mL圆底烧瓶中,

收稿日期:2006-08-12

作者简介:王靖雯(1979—),女,陕西人,硕士研究生,研究方向为药物的靶向研究。

Tel: (029)84775475-8015 E-mail: wjlbw@fmmu.edu.cn

表 1 因素水平
Table 1 Factors and levels

水 平	因 素		
	A	B/mL	C/min
1	1:7	12	20
2	1:8	15	30
3	1:9	18	40

加 15 mL 氯仿溶解。旋转蒸发除去氯仿,在烧瓶壁上形成一层薄膜,加 6%甘露醇水溶液 15 mL,水浴超声,0.45 μm 微孔滤膜滤过,分装于安瓶中^[3]。

2.3 齐墩果酸的 HPLC 法测定:色谱条件:色谱柱:Kromasil C₁₈柱(150 mm×416 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(90:10);体积流量:1 mL/min;进样体积:20 μL;检测波长:210 nm;温度:25 ℃。线性关系:峰面积与质量浓度的回归方程为 $A=262\,673C-12\,207$, $r=0.999\,6$,表明齐墩果酸在 4.34~130.34 mg/mL 线性关系良好。

齐墩果酸固体脂质纳米粒的色谱图显示在齐墩果酸出峰位置未见其他杂质峰,说明此法对测定药物的特异性好(图 1)。

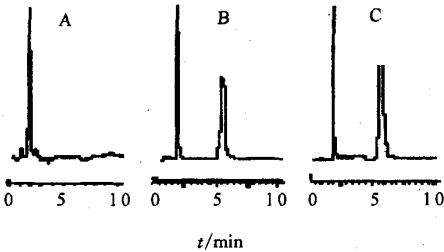


图 1 空白(A)、齐墩果酸对照品(B)和齐墩果酸固体脂质纳米粒(C)的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank control (A), oleanolic acid reference substance (B), and oleanolic acid solid lipid nanoparticles (C)

2.4 包封率和载药量的测定:采用凝胶柱色谱法测定包封率。凝胶柱为 Sephadex-G50,洗脱液为蒸馏水,体积流量为 0.5 mL/min,色谱温度为室温。分别移取齐墩果酸固体脂质纳米粒 0.5 mL 上柱,每 3.0 mL 收集 1 次,共收集(25±3)管。采用 HPLC 法测定齐墩果酸固体脂质纳米粒中齐墩果酸的质量浓度和游离齐墩果酸的质量浓度。

包封率=(总的齐墩果酸的量-游离的齐墩果酸的量)/总的齐墩果酸的量×100%

载药量^[4]=(齐墩果酸的投药量-溶液中齐墩果酸的量)/磷脂用量×100%

2.5 结果:以包封率和载药量为衡量指标,采用 L₉(3⁴)正交试验进行优化工艺参数,结果见表 2。

以包封率为衡量指标进行直观分析,由极差确

表 2 L₉(3⁴)正交试验结果
Table 2 Result of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A	B	C	包封率/%	载药量/%
1	1:7	12	40	86.65	6.27
2	1:7	15	30	85.75	9.17
3	1:7	18	20	71.61	5.75
4	1:8	15	40	98.84	8.46
5	1:8	18	30	92.28	8.32
6	1:8	12	20	82.43	8.05
7	1:9	18	40	85.79	6.77
8	1:9	12	30	84.69	7.23
9	1:9	15	20	74.56	7.67
K ₁	81.34	84.59	76.20		
K ₂	91.18	86.38	87.57		
K ₃	81.68	83.73	90.42		
R	9.84	2.65	14.22		

定主次因素顺序:C>A>B,其中 C 因素 K₃>K₂>K₁,A 因素 K₂>K₃>K₁,B 因素 K₂>K₁>K₃,因此确定 C₃A₂B₂ 为较优处方。影响包封率的主要因素为超声时间,其次为齐墩果酸与大豆磷脂的比例和 60 g/L 甘露醇的用量。

将试验测定的包封率数据代入 SPSS 软件,进行方差分析检验,由统计结果(表 3)可知,C 因素和 A 因素对齐墩果酸包封率影响均有显著性($P<0.05$),即超声时间为 40 min,齐墩果酸与大豆磷脂的比例为 1:8,60 g/L 甘露醇的用量为 15 mL,因此,确定较优处方为 C₃B₂A₂。

表 3 方差分析
Table 3 Analysis of variance

方差来源	SS	Df	MS	F	P 值
A	187.284	2	93.642	387.256	0.003
B	15.031	2	7.515	31.079	0.031
C	339.857	2	169.928	702.737	0.001
Error	484	2	0.242		

2.6 最佳工艺验证:按最优处方进行了 3 次验证试验,制备 3 批固体脂质纳米粒,结果齐墩果酸的包封率分别为 98.75%、97.81%、98.32%,重现性较好。

2.7 齐墩果酸固体脂质纳米粒的形态观察:取齐墩果酸固体脂质纳米粒少许滴至专用铜网上,用 2%磷钨酸负染,自然干燥,使粒子在铜网上浓缩沉积,用电子显微镜观察并拍照,见图 2。可见齐墩果酸固体脂质纳米粒为白色乳光胶体溶液,电镜下可见许多圆形或椭圆形颗粒,纳米粒的粒径为(75±20.3) nm。

3 讨论

固体脂质纳米粒的制备工艺主要包括薄膜-超声分散法、高压乳匀法、乳化-溶剂挥发法、微乳法、溶剂分散法等,其中薄膜-超声分散法适于包封脂溶性药物,制备工艺简单,所需成本低,适于实验室制备。大豆磷脂是一种天然非离子表面活性剂,生物相容性较好,无细胞毒性,乳化性能好^[5]。

载体材料与药物的相容性可显著影响纳米粒的

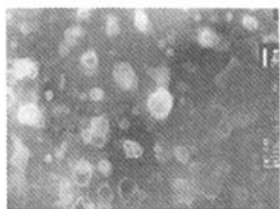


图2 齐墩果酸固体脂质纳米粒透射电镜照片

Fig. 2 TEM Micrograph of oleanolic acid solid lipid nanoparticles

包封率, 药物浓度也是影响包封率的一个因素。在预试验中发现, 药物浓度过高, 会影响包封率, 提示包封率具有饱和性^[6]。

通过预试验, 确定影响固体脂质纳米粒包封率、形态、均匀度、粒径分布的3个主要因素, 即齐墩果酸与大豆磷脂的比例、60 g/L 甘露醇用量和超声时间, 设计了3因素3水平的正交试验, 结果表明超声时间越长, 包封药物量越多; 大豆磷脂用量不能过多, 说明齐墩果酸固体脂质纳米粒包封有饱和性; 60 g/L 甘露醇用量不能过多, 否则包封率降低。

本实验选用生理盐水、60 g/L 甘露醇作为分散

介质, 实验证明, 用60 g/L 甘露醇水溶液作分散介质室温放置3个月无明显变化, 而用生理盐水则很快混浊、分层, 表明药物大量泄漏, 磷脂凝聚。原因可能是电解质的加入改变了各种粒子间电荷的相互作用, 促进了磷脂晶型的转变。

References:

- [1] Liu H J, Sun H N, Inhibition effects of oleanolic acid from *Chaenomeles lagenaria* on hepatitis B virus *in vitro* [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2002, 1(5): 272-274.
- [2] Pattarino F M, Ignoni T. Stability of drug-carrier emulsions containing 'phosphatidyl choline mixtures' [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2002, 53(4): 203.
- [3] Xue K C, Gu Y, Zhang S Q, et al. Preparation of lamivudine palmitate solid lipid nanoparticles [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2003, 24(10): 890-892.
- [4] Gao X L, Ji X M, Determining the trap efficiency of liposome using sephadex column chromatography [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2003, 38(7): 515-517.
- [5] Chen J, Tu Q R. Research and development on solid lipid nanoparticles [J]. *Foreign Med Sci; Sect Pharm* (国外医学: 药学分册) 2002, 29(4): 241-245.
- [6] Muller R H, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50: 161.

化学发光法测定白果白蛋白的体外抗氧化活性

邓乾春¹, 陈春艳², 田斌强¹, 谢笔钧^{1*}

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉, 430070; 2. 湖南科技学院 化学与生物工程系, 湖南 永州, 425006)

摘要:目的 研究白果白蛋白的体外抗氧化活性、对DNA损伤的保护作用及其作用机制。方法 以莲房原花青素和小牛血清蛋白为对照, 分别采用邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系测定了白果白蛋白对超氧阴离子的清除作用, 硫酸铜-邻菲罗啉-抗坏血酸-双氧水、硫酸亚铁-鲁米诺-双氧水和硫酸亚铁-鲁米诺3个体系测定了白果白蛋白对羟自由基的清除作用, 双氧水-鲁米诺体系测定了白果白蛋白对体外双氧水的清除作用, 采用硫酸铜-邻菲罗啉-抗坏血酸-双氧水-脱氧核糖核酸体系测定了白果白蛋白对体外DNA损伤的保护作用。结果 白果白蛋白具有较好的体外清除活性氧和保护DNA损伤的活性, 但在硫酸亚铁-鲁米诺-双氧水和双氧水-鲁米诺化学发光体系中表现出“促氧化”作用。结论 采用化学发光体系衡量白果白蛋白的抗氧化活性具有选择性。

关键词: 白果白蛋白; 化学发光法; 体外抗氧化活性

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)05-0685-06

Investigation of *in vitro* antioxidant activity of ginkgo albumin by chemiluminescence method

DENG Qian-chun¹, CHEN Chun-yan², TIAN Bin-qiang¹, XIE Bi-jun¹

(1. College of Food Science and Technology, Huzhong Agriculture University, Wuhan 430070, China; 2. Department of Chemistry and Bioengineering, Hunan Institute of Science and Technology, Yongzhou 425006, China)

Abstract: Objective To investigate the scavenging abilities of ginkgo albumin to reactive oxygen *in vitro*, as well as the protection and mechanism of ginkgo albumin on damaged DNA. **Methods** Lotus

收稿日期: 2006-09-21

基金项目: 湖北省“十五”攻关资助项目(2001AA204B02)

作者简介: 邓乾春(1979—), 男, 湖北黄石人, 博士生在读, 从事天然产物化学和食品蛋白质化学研究。

Tel: (027)87283201 E-mail: spring332288@yahoo.com.cn

* 通讯作者 谢笔钧