

大黄酚脂质体的制备及其质量评价

王永利¹, 王立华¹, 李维爽², 张江伟¹, 张丹参^{3*}

1. 河北北方学院 应用化学研究所, 河北 张家口 075000

2. 天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457

3. 河北北方学院基础医学院, 河北 张家口 075000

摘要: **目的** 研究大黄酚脂质体的最佳制备工艺和处方, 并对其进行质量考察。**方法** 采用薄膜-超声分散法制备大黄酚脂质体, 以包封率为评价指标, 采用单因素和正交试验法优化大黄酚脂质体的制备处方和工艺条件, 并观察其粒径、形态及稳定性。**结果** 大黄酚脂质体优化后的制备处方和工艺条件为: 胆固醇与大豆卵磷脂质量比为 1:3, 药脂比为 1:10, pH 值为 8.2, 成膜温度为 45 ℃。按该处方工艺制备的大黄酚脂质体包封率在 87% 以上。**结论** 优选处方和制备工艺稳定可行, 制备的大黄酚脂质体包封率和稳定性高, 粒径均匀。

关键词: 大黄酚; 脂质体; 薄膜-超声分散法; 制备; 正交试验

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** B **文章编号:** 0253-2670(2011)06-1119-03

Preparation and quality evaluation of chrysophanol liposomes

WANG Yong-li¹, WANG Li-hua¹, LI Wei-shuang², ZHANG Jiang-wei¹, ZHANG Dan-shen³

1. Institute of Applied Chemistry of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

2. School of Materials Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

3. Basic Medical College of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Key words: chrysophanol; liposome; film-ultrasonic dispersion method; preparation; orthogonal test

脂质体(liposome)是一种药物新剂型, 因为它具有提高生物利用度、降低或减少药物不良反应、增加水溶性等特点引起了众多研究者的关注^[1-4]。大黄酚(chrysophanol)是大黄产生药理作用的主要有效成分之一, 具有较好的抗菌、止血、抗衰老、利尿、抗癌及促进肠管动物神经兴奋和肌肉麻痹等作用^[5-6]。但是由于它难溶于水, 易被氧化等特点, 使其应用受到限制。为了提高其应用价值及药效, 笔者对大黄酚脂质体的制备处方和工艺进行了详细研究, 并对其进行质量评价。

1 仪器与材料

U—3900 型紫外-双波长分光光度计(日本日立公司), 752N 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), 800 型离心沉淀器(上海手术器械厂), TG 328A 型光学读数分析天平(湘仪天平仪器厂), CX—250 超声波清洗器(北京医疗设备工厂)。

大黄酚(质量分数≥98%, 中国药品生物制品

检定所), 卵磷脂(批号 20100509, 北京华清美恒天然产物技术开发有限公司), 胆固醇(批号 76C10150)、PEG 2000、维生素 E、三羟甲基氨基甲烷(Tris)均为北京鼎国生物技术有限责任公司产品; 甲醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 大黄酚的测定

2.1.1 检测波长的选择 分别取适量大黄酚和空白脂质体置 10 mL 量瓶中, 甲醇定容后待用。以甲醇为参比, 在 200~700 nm 波长进行扫描, 结果显示, 在 428 nm 波长处, 脂质体膜材对游离大黄酚的测定干扰很小, 因此选定 428 nm 为检测波长。

2.1.2 线性关系考察 精密称取 7.5 mg 大黄酚对照品, 甲醇溶解并定容于 100 mL 量瓶中, 精密量取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mL 置 25 mL 量瓶中配制成 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 μg/mL 对照品溶液。分别在 428 nm

收稿日期: 2010-10-21

作者简介: 王永利, 讲师, 硕士, 从事应用化学方面的研究。Tel: 18931316766 E-mail: fangyuanguiju@163.com

*通讯作者 张丹参 Tel: (0313)4029556 E-mail: dszhang_cn@yahoo.com

处测定吸光度值。以吸光度为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得到回归方程 $Y=0.0427X+0.0212$ ($R^2=0.9999$)。

2.1.3 精密度试验 取 12 $\mu\text{g/mL}$ 大黄酚对照品溶液, 连续测定 5 次, 计算得吸光度的 RSD 为 0.06%。

2.1.4 稳定性试验 取正交试验 5 号样品制备的供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12 h 测定, 计算得吸光度的 RSD 为 0.10%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.5 回收率试验 分别量取 0.5 mL 空白脂质体 3 份, 置 5 mL 量瓶中, 再分别精密移取 1.0、1.5、2.0 mL 18 $\mu\text{g/mL}$ 大黄酚对照品溶液加入量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别在波长 428 nm 处测定吸光度值, 计算得大黄酚的平均回收率为 100.6%, RSD 为 0.35%。

2.2 大黄酚脂质体包封率的测定^[7]

将制得的大黄酚脂质体全部转移至 10 mL 量瓶中, 用 pH 值为 8.2 的 Tris 缓冲溶液定容, 混合均匀。精密量取 2.0 mL 置离心管中, 在 1 000 r/min、每次 20 s 的条件下离心 6 次, 弃去上层清液。精密移取 5.0 mL 甲醇溶解沉淀, 以甲醇做参比测定吸光度, 计算游离大黄酚的量, 采用公式包封率 = $1 - W_{\text{游离}}/W_{\text{总}}$ ($W_{\text{游离}}$ 为游离大黄酚的质量, $W_{\text{总}}$ 为总大黄酚的质量) 计算大黄酚脂质体包封率。

2.3 薄膜-超声法制备大黄酚脂质体^[8-10]

2.3.1 空白脂质体的制备 分别精密称取处方量的胆固醇、卵磷脂、维生素 E、PEG 2000 并在适量乙醇中温热溶解, 水浴条件下减压蒸出有机溶剂, 使脂质均匀成膜。再抽真空 30 min 除尽有机溶剂。加入一定量 Tris 缓冲溶液充分水合, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下震荡水化 2 h 使膜脱落, 冰水浴中超声至形成脂质体水性悬浊液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存, 备用。

2.3.2 载药脂质体的制备 分别精密称取处方量的胆固醇、卵磷脂、维生素 E、PEG 2000、大黄酚, 按照“2.3.1”项工艺制备大黄酚脂质体。

2.4 单因素考察

2.4.1 膜材比对包封率的影响 固定大黄酚加入量 3 mg、水相 pH 值 7.9、成膜温度 45 $^{\circ}\text{C}$, 选取胆固醇与卵磷脂的质量比分别为 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5 制备脂质体, 测定包封率分别为 50.41%、58.80%、71.49%、66.17%、63.39%。表明胆固醇与卵磷脂的最佳质量比为 1:3。

2.4.2 大黄酚加入量对包封率的影响 固定胆固醇

与卵磷脂的质量比 1:3、水相 pH 值 7.9、成膜温度 45 $^{\circ}\text{C}$, 选取大黄酚加入量分别为 1、2、3、4、5 mg 制备脂质体, 测定包封率分别为 60.41%、64.37%、70.15%、68.32%、66.48%。表明大黄酚加入量为 3 mg, 即药脂比为 1:10 时, 脂质体的包封率最高。

2.4.3 水相 pH 值对包封率的影响 pH 值会影响大豆卵磷脂的水解以及脂质体被氧化的速度^[7]。固定胆固醇与卵磷脂的质量比 1:3、大黄酚加入量 3 mg、成膜温度 45 $^{\circ}\text{C}$, 选取 Tris 缓冲溶液 pH 值分别为 7.3、7.6、7.9、8.2、8.5 制备脂质体, 测定包封率分别为 59.55%、62.53%、65.23%、71.88%、66.58%。表明 pH 值为 8.2 时, 可以制得包封率高、稳定性好的脂质体。

2.4.4 成膜温度对包封率的影响 固定胆固醇与卵磷脂的质量比 1:3、大黄酚加入量 3 mg、水相 pH 值 7.9, 选取成膜温度分别为 35、40、45、50、55 $^{\circ}\text{C}$ 制备脂质体, 测得包封率分别为 62.96%、67.14%、70.03%、66.78%、64.52%。表明成膜温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 时, 所制得的脂质体的包封率最高, 且稳定性很好。

2.5 正交设计优化脂质体处方

2.5.1 因素与水平的选择 在单因素考察试验基础上, 以包封率为指标, 对方剂中胆固醇与卵磷脂的质量比 (A)、大黄酚加入量 (B)、水合介质的 pH 值 (C)、成膜温度 (D) 4 个因素进行优选, 以期得到稳定性好、包封率较高的脂质体处方。

2.5.2 正交试验设计及结果 选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 制备脂质体, 测定包封率。试验设计及结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 正交试验设计与结果

Table 1 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B/mg	C	D/ $^{\circ}\text{C}$	包封率/%
1	1:2 (1)	2 (1)	7.6 (1)	35 (1)	57.60
2	1:2 (1)	3 (2)	7.9 (2)	45 (2)	63.55
3	1:2 (1)	4 (3)	8.2 (3)	55 (3)	59.65
4	1:3 (2)	2 (1)	7.9 (2)	55 (3)	73.83
5	1:3 (2)	3 (2)	8.2 (3)	35 (1)	79.14
6	1:3 (2)	4 (3)	7.6 (1)	45 (2)	84.50
7	1:4 (3)	2 (1)	8.2 (3)	45 (2)	78.40
8	1:4 (3)	3 (2)	7.6 (1)	55 (3)	67.14
9	1:4 (3)	4 (3)	7.9 (2)	35 (1)	62.76
K_1	180.80	209.83	209.24	199.50	
K_2	237.47	209.83	200.14	226.45	
K_3	208.30	206.91	217.19	200.62	
R	18.89	2.93	5.69	8.98	

表2 方差分析
Table 2 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	535.40	2	282.96	$P < 0.01$
B	1.89	2	1	
C	48.52	2	25.65	$P < 0.05$
D	154.97	2	81.91	$P < 0.05$

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

从直观分析和方差分析可知胆固醇与卵磷脂的质量比是影响大黄酚脂质体包封率的第一因素,成膜温度次之,水合介质的 pH 值较小,大黄酚加入量最小,且无显著差异。最佳处方为 $A_2B_2C_3D_2$,即胆固醇与卵磷脂的质量比为 1:3,药脂比为 1:10, pH 值为 8.2,成膜温度为 45 °C。

2.6 验证试验

按上述最佳处方采用薄膜-超声分散法制备 3 批大黄酚脂质体,测定包封率分别为 89.2%、88.7%、87.6%。表明 3 批大黄酚脂质体的包封率无显著性差异,制备工艺重现性良好。

2.7 脂质体的形态观察和粒径测定

经透射电镜观察可见大黄酚脂质体是粒径很小的圆形小球,粒径较为均匀,相互之间没有聚集现象(图1)。

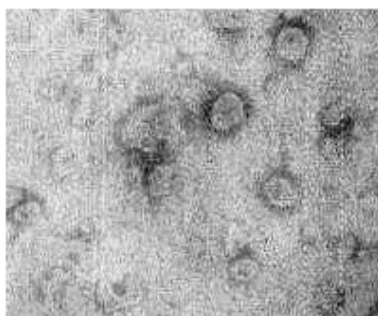


图1 脂质体透射电镜照片

Fig. 1 Transmission electronic microphotograph of chrysophanol liposomes

取验证试验制备的大黄酚脂质体适量置激光散射仪中测定其粒径大小和粒径分布。脂质体的粒径分布在 420~750 nm,粒径均小于 2 μm。

2.8 脂质体稳定性考察

取验证试验制备的大黄酚脂质体,4 °C 低温保存,每隔 1 天测定其渗透率。脂质体溶液 15 d 渗透

率仅为 2.8%,所制备的脂质体较为稳定。

3 讨论

本实验在单因素试验的基础上,采用正交试验设计对大黄酚脂质体的制备处方进行了优化研究,得到了最佳处方和工艺条件。

薄膜-超声法简单实用,适用于脂溶性药物脂质体的制备^[11]。实验结果显示,胆固醇与卵磷脂的质量比对脂质体的包封率有很大影响,这主要是由于胆固醇对脂质体起着膜流动性调节剂的作用。胆固醇比例偏低,膜的流动性小,药物易泄漏。胆固醇的比例偏高会使脂质体膜的均匀性变差,水合能力降低。成膜温度也是很重要的影响因素,温度低时制备的脂质体易泄漏,同时除去乙醇时间较长。温度高时,磷脂和药物易被氧化。

根据大黄酚难溶于水、在水性环境中易聚沉的特点,包封率检测方法选用操作方便,对仪器要求低的低速离心法。

参考文献

- [1] 韩文霞,李伟泽,汪兴军,等. 盐酸青藤碱纳米柔性脂质体的制备及其性质研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 671-675.
- [2] 邓英杰. 脂质体技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [3] 范云鹏,王德云,胡元亮,等. 正交试验优选黄芪多糖脂质体的制备工艺 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 470-473.
- [4] 许海玉,张铁军,赵平,等. 中药缓控释制剂的研究现状及研发思路 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 30-35.
- [5] 吴立军. 天然药物化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [6] 黄红娜,张丹参,郑晓霞,等. 大黄酚聚氧基丙烯酸丁酯纳米囊的制备工艺及质量研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 547-550.
- [7] 李琅琅,王文喜,牛泱平. 低速离心法测定荧光红 GG 脂质体包封率 [J]. 浙江工业大学学报, 2009, 37(5): 536-537.
- [8] 何志峰,刘德育,曾飒,等. 蛇葡萄素脂质体的制备研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(1): 27-30.
- [9] 郑芳,李鹏,李志浩,等. 川芎挥发油脂质体制备工艺研究 [J]. 中医药导报, 2009, 15(12): 69-71.
- [10] 平其能,胡一桥,周建平,等. 现代药剂学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001.
- [11] 琚辉,郝存江,尹飞,等. 姜黄素固体脂质纳米粒的制备及表征 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 420-426.