

复乳法制备龙胆苦苷脂质体

蒲宝焯, 赵 骏*, 邱 超, 张 雪

天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 目的 以大豆卵磷脂和胆固醇等为载体制备龙胆苦苷脂质体。方法 采用复乳法考察乳化剂的用量、药脂比、磷脂与胆固醇质量比等因素对脂质体制备过程的影响; 以外观形态和包封率为考察指标, 优化龙胆苦苷脂质体的最佳制备工艺。结果 复乳法制备的龙胆苦苷脂质体最佳工艺为: 大豆卵磷脂与胆固醇质量比为 6:1, 药脂比为 1:8, 助乳剂量为 30:1, 包封率可达 82%。结论 复乳法制备龙胆苦苷多囊脂质体均匀、稳定, 粒径分布 (414.8 ± 50.0) nm, Zeta 电位为 (-29.2 ± 5.0) mV。

关键词: 龙胆苦苷; 龙胆苦苷脂质体; 复乳法; 制备工艺; 包封率

中图分类号: R944.9

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2011)06-0428-04

龙胆苦苷为龙胆属植物龙胆、秦艽、当药、獐芽菜中的苦味成分^[1]。含有龙胆苦苷的中药剂型主要有颗粒剂、片剂、胶囊剂、丸剂以及针剂, 其中以口服制剂为主。经研究表明, 口服龙胆苦苷单体后其生物利用度较低, 体内吸收效果较差。

脂质体具有肝、脾网状内皮系统的被动靶向性、缓释、降低药物毒性以及提高药物稳定性的作用特点。由于龙胆苦苷易溶于水, 且临床主要用于保肝、利胆、抗炎等, 可将龙胆苦苷包封于脂质体内, 提高药物的生物利用度。目前国内对于龙胆苦苷脂质体的研究尚未报道, 对水溶性龙胆苦苷脂质体制备方法的探索, 在突破一直以来限制水溶性药物脂质体包封率不高、稳定性差等瓶颈问题上有所发现。本实验拟考察复乳法制备龙胆苦苷脂质体的可行性, 进行单因素筛选实验, 考察溶剂、乳化剂的用量、药脂比、磷脂与胆固醇质量比等因素对复乳法制备龙胆苦苷脂质体的影响。再通过正交试验设计, 优化出最佳的制备工艺, 为研发龙胆苦苷脂质体靶向制剂提供实验依据。

1 实验材料

1.1 试剂

大豆卵磷脂(北京美亚斯磷脂技术有限公司), 胆固醇(批号 071118, 上海蓝季科技发展有限公司), 龙胆苦苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110770-200712), 无水乙醚、司盘 60、正辛醇、葡萄糖(分析纯), 甲醇(色谱纯), 龙胆苦苷原料(自制, 质量分数 76%)。

1.2 仪器

KQ—300DV 型数控超声波清洗器, RE—52A

旋转蒸发器, LDZ5—2 型离心机, Waters515 型高效液相色谱仪, 2487 紫外检测器。

2 方法与结果

2.1 龙胆苦苷溶液的制备

精密称取龙胆苦苷原料粉末 122 mg, 以 50 g/L 葡萄糖溶液溶解并用棕色量瓶定容至 100 mL 作为水相, 阴暗处放置。

2.2 龙胆苦苷脂质体的制备

将大豆卵磷脂、胆固醇按 4:1, 以 15 mL 乙醚为油相溶解脂材。取水相 5 mL (龙胆苦苷溶液质量浓度为 937.2 $\mu\text{g/mL}$) 注入油相中, 超声使形成稳定的乳剂, 以室温 (20 $^{\circ}\text{C}$), 慢速旋转蒸发除去有机溶剂。然后将其注入乳化剂司盘 60 的 4.0% 葡萄糖溶液, 旋涡振荡使其形成复乳, 于设计温度下慢速搅拌 5 min 使乳剂均匀分散, 制得乳白色半透明混悬型多囊脂质体制剂。成品置干燥阴凉处保存。

2.3 脂质体包封率和载药量的测定

精密吸取样品液 1 mL, 定容至 5 mL, 离心 3 min 后, 取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜。采用 HPLC 法测定游离药物浓度, 进样 20 μL , 测定峰面积, 计算游离药物浓度, 计算脂质体包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{混}} \times 100\%$$

$W_{\text{总}}$ 为投入总药物量, $W_{\text{游}}$ 为未包入脂质体的游离药物量, $W_{\text{混}}$ 为脂质体的总量。

2.4 龙胆苦苷脂质体的单因素筛选

2.4.1 溶剂的选择 选择两种溶剂分别为水和葡萄糖溶液, 处方和其他因素不变, 制备龙胆苦苷脂质体, 测定包封率, 结果见表 1。实验结果表明, 以

收稿日期: 2011-06-18

*通讯作者 赵 骏 E-mail: zhaojun_@sina.com

水或葡萄糖溶液为溶剂, 所得脂质体无论包封率还是性状均无明显差别, 选择糖溶液作为溶剂是因为糖溶液有一定的黏稠度, 有利于脂质体成膜, 使乳剂稳定。

表1 溶剂的选择 ($n=4$)
Table 1 Selection of solvent ($n=4$)

溶 剂	性 状			包封率/%
	色泽	形状	稳定性	
水	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	70.74±0.34
葡萄糖溶液	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	71.28±1.38

2.4.2 乳化剂量的选择 脂质与司盘 60 按 40:1、30:1、20:1、10:1、5:1 混合, 处方和其他因素不变, 制备龙胆苦苷多囊脂质体, 测定包封率, 结果见表 2。乳化剂的用量在该相中一般是 1%~10%, 量太少会影响稳定性, 增大乳化剂的用量可增大黏度, 但会增加毒性。在实验过程中, 乳化剂用量对复乳的稳定性有显著性影响, 所以选择 40:1、30:1、20:1、10:1 进行正试实验。

表2 司盘 60 的量的选择 ($n=4$)
Table 2 Dose selection of Span 60 ($n=4$)

脂质: 司盘 60	性 状			包封率/%
	色泽	形状	稳定性	
40:1	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	69.06±0.66
30:1	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	70.74±0.34
20:1	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	71.00±0.39
10:1	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	64.32±0.47
5:1	乳白色	混悬液	不稳定, 易聚集	56.32±0.37

2.4.3 磷脂与胆固醇质量比的选择 磷脂与胆固醇质量比分别为 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 处方和其他因素不变, 制备龙胆苦苷脂质体, 测定包封率, 结果见表 3。可以看到, 增大磷脂量, 包封率有所提高, 但变化不大, 因此将其比例扩大为 2:1, 4:1, 6:1, 8:1 进行正交试验。

2.4.4 药脂比 (质量比) 的选择 考察 6 种药脂比 (质量比) 分别为 1:3.5、1:6、1:8、1:12、1:16、1:20, 处方和其他因素不变, 制备龙胆苦苷脂质体, 测定包封率, 结果见表 4。可以看到, 随药脂比逐渐增大, 包封率也逐渐增大。以药脂比为 1:6、1:8、1:12、1:16 进行正交试验。

2.5 正交实验法筛选处方

2.5.1 因素水平的设置 以复乳法为制备方法, 正交设计三因素四水平, 考察大豆磷脂与胆固醇质量

表3 磷脂与胆固醇质量比的选择 ($n=4$)
Table 3 Selection of quantity ratio of phospholipids and cholesterol ($n=4$)

磷脂: 胆固醇	性 状			包封率/%
	色泽	形状	稳定性	
1:1	乳白色	混悬液	不稳定, 易聚集	50.42±0.18
2:1	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	63.44±0.00
3:1	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	69.82±0.45
4:1	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	70.74±0.34
5:1	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	69.67±0.10
6:1	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	68.80±0.10

表4 药脂比 (质量比) 的选择 ($n=4$)
Table 4 Selection of quantity ratio of medicine and phospholipid

药脂比	性 状			包封率/%
	色泽	形状	稳定性	
1:3.5	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	49.68±0.05
1:6	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	68.15±0.18
1:8	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	69.82±0.03
1:12	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	70.74±0.34
1:16	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	71.80±0.36
1:20	乳白色	混悬液	稳定, 不易聚集	71.67±0.11

比 (A)、助乳剂量 (B)、药物与磷脂质量比 (C) 对包封率和载药量的影响, 选择复乳法的最佳制备条件。因素水平见表 5, 正交试验设计及结果见表 6, 方差分析结果见表 7、8。

从方差分析结果可以看出, 三因素中, 对包封率的影响大小依次是 $C>A>B$, 其中, A 和 C 因素对包封率有显著性影响 ($P<0.01$), B 因素对载药量有显著性影响 ($P<0.01$), 从脂质体的形成、外观、包封率及载药量等综合考虑, 选择最佳制备工艺为 $A_3B_2C_2$, 即大豆卵磷脂与胆固醇质量比为 6:1, 药脂比为 1:8, 助乳剂量为 30:1。

2.5.2 最佳工艺验证 按照正交试验的最佳处方, 用复乳法制备龙胆苦苷脂质体, HPLC 测定包封率, 4 次实验的包封率结果表明制备工艺条件稳定可靠。结果见表 9。

表5 因素水平
Table 5 Factors and levels

水平	因素		
	A	B	C
1	2:1	40:1	1:6
2	4:1	30:1	1:8
3	6:1	20:1	1:12
4	8:1	10:1	1:16

表6 正交试验设计及结果

Table 6 Design and results of orthogonal test

试验号	A	B	C	空白	包封率/%	载药量/%
1	1	1	1	1	75.22	7.4
2	1	2	2	2	78.07	6.5
3	1	3	3	3	69.48	3.9
4	1	4	4	4	67.80	2.8
5	2	1	2	3	70.62	7.1
6	2	2	1	4	74.93	6.2
7	2	3	4	1	70.06	4.8
8	2	4	3	2	72.67	3.6
9	3	1	3	4	75.13	7.6
10	3	2	4	3	71.05	6.9
11	3	3	1	2	78.14	5.6
12	3	4	2	1	82.91	4.6
13	4	1	4	2	69.28	7.0
14	4	2	3	1	72.06	6.7
15	4	3	2	4	76.95	5.5
16	4	4	1	3	73.73	4.1
包封率						
K_1	290.57	290.25	302.02	300.25		
K_2	288.28	296.11	308.54	298.16		
K_3	307.23	294.62	289.33	284.88		
K_4	292.02	297.11	278.18	294.81		
k_1	72.64	72.56	75.50	75.06		
k_2	72.07	74.03	77.13	74.54		
k_3	76.81	73.65	72.33	71.22		
k_4	73.00	74.28	69.54	73.70		
R	4.74	1.72	7.59	3.84		
载药量						
K_1	20.6	29.1	23.3	23.5		
K_2	21.7	26.3	23.7	22.7		
K_3	24.7	19.8	21.8	22.0		
K_4	23.3	15.1	21.5	22.1		
k_1	5.15	7.28	5.82	5.88		
k_2	5.42	6.58	5.92	5.68		
k_3	6.18	4.95	5.45	5.50		
k_4	5.82	3.78	5.38	5.52		
R	1.03	3.50	0.54	0.38		

表7 包封率的方差分析

Table 7 Variance analysis of encapsulation efficiency

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	111.28	3	37.093	8.506	* $P < 0.01$
B	13.77	3	4.590	1.053	
C	273.40	3	91.133	20.897	* $P < 0.01$
误差	109.03	25	4.361		

 $F_{0.05}(3, 25) = 4.675$

表8 载药量的方差分析

Table 8 Variance analysis of drug loading

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	2.427	3	0.809	5.491	
B	30.007	3	10.002	67.889	* $P < 0.01$
C	0.887	3	0.296	2.007	
误差	0.357	3	0.119		

 $F_{0.05}(3, 25) = 9.280$ 表9 最佳工艺验证结果 ($n = 4$)

Table 9 Validation of optimized process

实验号	包封率/%	载药量/%
1	82.68	7.4
2	83.14	7.6
3	81.76	7.2
4	84.06	7.8
均值	82.91	7.5

2.6 脂质体的质量评价

2.6.1 稳定性试验 将制备好的样品贮存于室温下, 在两个月后取样测定其包封率并计算渗漏率: 渗漏率 = (定期测得游离药物量 - 制备当时测得游离药物量) / 制备当时测得包封量。结果见表 10。

表10 两个月后脂质体的渗漏率

Table 10 Permeability of liposomes after two months

样 品	制备时包封率/%	两个月后包封率/%	渗漏率/%
1	82.72	81.48	1.50
2	83.21	81.87	1.61
3	83.96	82.79	1.39
均值	83.30	82.05	1.50

从两个月后的渗漏率, 可说明复乳法制备的龙胆苦苷脂质体稳定性较好, 可以在室温下储存。

2.6.2 龙胆苦苷脂质体粒径分布和 Zeta 电位 用最佳方法制得的龙胆苦苷脂质体加水稀释到适当浓度后用激光粒径分布仪测定其平均粒径为 (414.8 ± 50.0) nm, Zeta 电位为 (-29.2 ± 5.0) mV。见图 1、2。

3 讨论

本实验粒径及电位的测定, 是在脂质体放置两个月后进行的, 虽然脂质体的包封率变化不大, 但在放置过程可能会有脂质体的多囊减少现象, 致使测得的粒径相对较小。

渗漏率、稳定性问题一直是困扰脂质体生产的难点, 同样的脂质体保存方法不同, 药物泄漏的程度差距甚远。目前常见的保存方法有冷冻保存 (加

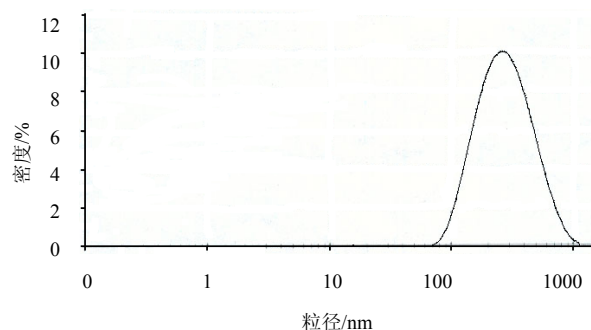


图1 龙胆苦苷脂质体粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of gentiopicroside liposome

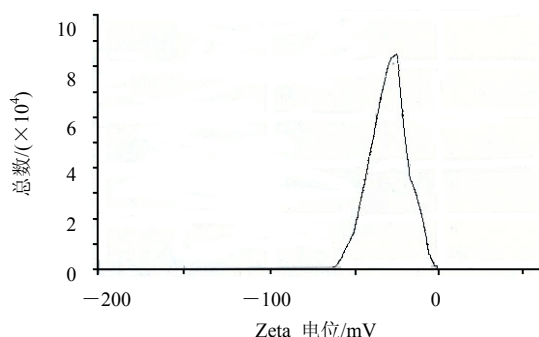


图2 龙胆苦苷脂质体 Zeta 电位

Fig. 2 Zate potential of gentiopicroside liposome

抗冻剂)、4℃冰箱保存、充氮安瓿保存等。好的脂质体制备方法不仅要提高包封率还要提高稳定性,在本实验中,将制得的脂质体置于20℃室温避光贮存两个月后,渗漏率平均为1.50%。

药脂比对包封率有较大的影响,一般情况下,随药脂比逐渐增大,包封率应逐渐增大,但载药量会有所下降。在本实验中,药脂比为1:3.5时药物的包封不够充分,当提高脂质的相对用量时包封率有一定量的上升,优化脂质体制备工艺确定药脂比为1:8,包封率达到82%。

参考文献

- [1] 杨慧玲,司庆文,侯勤正,等. HPLC 法测定不同海拔长柄秦艽中龙胆苦苷、马钱酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1720-1722.
- [2] 汪自然,徐皂勇,叶燕青. 复乳法制备聚乳酸及其共聚物微球参数的研究进展 [J]. 国际生物医学工程杂志, 2006, 29(4): 238-242.
- [3] Mantripragada S. A lipid based depot (DepoFoam technology) for sustained release drug delivery [J]. *Prog Lipid Res*, 2002, 41(5): 392.
- [4] 旷英姿,马全红,郝小祯,等. 茶多酚脂质体的制备研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(1): 28-31.
- [5] 吴 诚,吴 燕,于月梅,等. 多柔比星长效注射微球的体外释放研究 [J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(3): 246-249.
- [6] Memoli A, Palermi L G, Travagli V, *et al*. Egg and soya phospholipids-sonication and dialysis: A study on liposome characterization [J]. *Int J Pharm*, 1995, 117(2): 159-163.
- [7] 赵荣生,严宝霞,候新朴. 两性霉素B脂质体的研制及其质量评价 [J]. 中国药理学杂志. 2000, 35(9): 593-595.