

## β-榄香烯脂质体的制备工艺研究

黄汉昌<sup>1</sup>, 朱宏吉<sup>1\*</sup>, 张明贤<sup>2</sup>, 李庆武<sup>1</sup>, 林强<sup>2</sup>, 兰天路<sup>1</sup>

(1. 天津大学化工学院 制药工程系, 天津 300072; 2. 北京联合大学制药工程研究所, 北京 100023)

**摘要:**目的 确定 β-榄香烯脂质体较佳的配方组成和制备方法。方法 比较薄膜水化(TFH)、逆相蒸发(REV)和 REV 结合高压挤压法制备 β-榄香烯脂质体方法, 优选出较优的制备方法; 光子相关衍射法测量 β-榄香烯脂质体的粒径; 气相色谱法测定包封率。结果 薄膜水化法制备的 β-榄香烯脂质体的包封率大于逆相蒸发法脂质体的包封率, 但该方法不易于批量生产。逆相蒸发法脂质体经高压挤压后在一定挤压程度内, 粒径减小、包封率和载药量增加, 所制得的 β-榄香烯脂质体稳定性良好, 6 个月未发现凝聚分层现象。结论 逆相蒸发结合高压挤压方法制备的 β-榄香烯脂质体粒径小而分布较均匀, 且有较高的载药量和包封率。

**关键词:** β-榄香烯; 脂质体; 高压挤压法; 气相色谱

**中图分类号:** R284.2; R286.02

**文献标识码:** B

**文章编号:** 0253-2670(2006)12-1799-04

### Preparative processing technique of β-elemene liposomes

HUANG Han-chang<sup>1</sup>, ZHU Hong-ji<sup>1</sup>, ZHANG Ming-xian<sup>2</sup>, LI Qing-wu<sup>1</sup>, LIN Qiang<sup>2</sup>, LAN Tian-lu<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Institute of Pharmaceutical Engineering, Beijing United University, Beijing 100023, China)

**Abstract: Objective** To optimize the composition and processing method of β-elemene liposomes.

**Methods** The β-elemene liposomes were prepared by the thin film hydration (TFH), the reverse-phase evaporation (REV), and REV plus high pressure extrusion which were compared to select the optimum preparative way. The envelopment rate of β-elemene was analyzed by GC. The particle diameter of β-elemene liposomes was measured by dynamic light scattering. **Results** Although the envelopment rate of β-elemene liposomes prepared by TFH method was better than that prepared by REV method, it was difficult to be used to scale up. The envelopment rate and the load of β-elemene liposomes were increased while diameter of vesicles was decreased when prepared with REV plus high pressure extrusion. The obtained liposome had a good storage stability and not been found flocculated in six months. **Conclusion** The diameter β-elemene liposomes prepared by REV plus high pressure extrusion are smaller and uniform. The loading and envelopment rate of β-elemene is higher than that by traditional method.

**Key words:** β-elemene; liposomes; high pressure extrusion method; GC

脂质体是磷脂类分子的自组装体, 是一种由一个或多个脂质双层中间包覆水相结构的微囊。脂质体在很多领域得到了应用, 作为一种药物载体也已经实现了商业化<sup>[1]</sup>。β-榄香烯(β-elemene)是从温莪术等植物中提取的具有抗肿瘤活性的天然药物。在香茅精油中也含有较高的量, 在提取轻组分后的香茅油重组分中, β-榄香烯可以高达 80%<sup>[2]</sup>。作为治疗恶性肿瘤如肝癌, 癌性胸、腹水的抗癌药物, 以 β-榄香烯为主要成分, 同时还含有 γ-榄香烯、δ-榄香烯及其他萜类化合物的榄香烯乳剂已经被开发为国家二类新药。乳剂是传统的药物赋型形式, 具有制备容

易、给药方便的优点。但也有不利的一面, 在热力学上是不稳定的体系, 随着时间的延长, 乳剂会破乳分层; 乳液粒径较大且分布不均, 易造成病灶吸收缓慢。本实验将 β-榄香烯制备成脂质体制剂, 研究制备粒径小而包封率高的 β-榄香烯脂质体的制备工艺, 考察实验条件及配方组成对 β-榄香烯脂质体包封率、载药量和稳定性的影响。

#### 1 材料与仪器

β-榄香烯(实验室自行提纯, 质量分数为 97%); 卵磷脂 PC(实验室自制, TLC 纯); 胆固醇、正十六烷、石油醚、三氯甲烷等均为分析纯(北京化学试剂

公司)。

EYELA N-1000 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);日本岛津 GC-14C 气相色谱仪;高压均质机(Niro-Soavi, 意大利);激光粒度仪(Holiba LB-550, 日本);80-2(2B)型离心机(上海浦东物理光学仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 不同离子强度的磷酸盐缓冲溶液(PBS)配制:分别称取  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.291 0 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.232 4 g,  $\text{NaCl}$  8.014 5 g,  $\text{KCl}$  0.193 7 g 溶于 1 000 mL 的超纯水中,即得标准 PBS(1/1PBS)。将标准 PBS 用超纯水稀释至 10 倍,得 1/10 PBS。将标准 PBS 用超纯水稀释至 20 倍,得 1/20 PBS。

2.2  $\beta$ -榄香烯的测定:参照文献报道<sup>[3,4]</sup>的测定  $\beta$ -榄香烯的方法稍有改进。以正十六烷为内标物,气相色谱法测定  $\beta$ -榄香烯的量。

2.2.1 气相色谱条件:毛细柱 Se-54(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ );柱温:160  $^\circ\text{C}$ ,保持 7 min,程序升温 20  $^\circ\text{C}/\text{min}$  到 280  $^\circ\text{C}$ ;进样温度与检测温度:300  $^\circ\text{C}$ 。载气: $\text{N}_2$ ,毛细柱内流量 1.5 mL/min,检测器:FID(氢离子火焰检测器),进样 2.0  $\mu\text{L}$ ,20:1 分流。

2.2.2 校正因子( $f$ )测定:精确称取 28 mg  $\beta$ -榄香烯对照品及 30 mg 正十六烷于 25 mL 量瓶中,用甲醇定容到刻度。按  $f = (C_{\beta\text{-榄香烯}} \cdot A_{\text{正十六烷}}) / C_{\text{正十六烷}} \cdot A_{\beta\text{-榄香烯}}$  计算。结果见表 1。表明  $\beta$ -榄香烯对正十六烷的平均校正因子为 1.157, RSD 为 0.882( $n=4$ )。

表 1  $\beta$ -榄香烯校正因子测定( $n=4$ )

Table 1 Calibration factor of  $\beta$ -elemene ( $n=4$ )

$C_{\beta\text{-榄香烯}} / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$C_{\text{正十六烷}} / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$A_{\beta\text{-榄香烯}}$	$A_{\text{正十六烷}}$	$f$
1.112 05	1.213 9	169 593.656	211 206.406	1.141
1.112 05	1.213 9	188 201.594	240 099.203	1.169
1.112 05	1.213 9	203 080.219	258 388.797	1.166
1.112 05	1.213 9	188 020.497	236 564.802	1.159

2.3  $\beta$ -榄香烯脂质体包封率的测定:参考《中国药典》2005 年版附录 XIX E 微囊、微球与脂质体制剂指导原则。

载药量 = 脂质体中所含药物的质量 / 脂质体的总质量  $\times$  100%

包封率 = (系统中的总药量 - 液体介质中未包封的药量) / 系统中的总药量  $\times$  100%

以石油醚萃取未包封的  $\beta$ -榄香烯<sup>[5]</sup>。将 10 mL  $\beta$ -榄香烯脂质体置于分液漏斗中,加入 5 mL 石油醚并振荡萃取未包封的  $\beta$ -榄香烯,待分层后取出石油醚层。重复萃取 5 次,合并石油醚层。于石油醚液中

加入定量的正十六烷为内标物。测定  $\beta$ -榄香烯与正十六烷的峰面积,内标法测定未包封  $\beta$ -榄香烯(游离  $\beta$ -榄香烯质量 =  $A_{\beta\text{-榄香烯}} \times m_{\text{正十六烷}} \times f / A_{\text{正十六烷}}$ ),从而间接测得  $\beta$ -榄香烯的包封率。

2.4 薄膜水化法制备  $\beta$ -榄香烯脂质体<sup>[6]</sup>:固定卵磷脂用量 400 mg,按 3 因素 3 水平的正交设计(表 2)(卵磷脂与胆固醇的物质的量比为 6:1~2:1;卵磷脂与  $\beta$ -榄香烯的物质的量比为 1:1~3:1),精确称取卵磷脂、胆固醇、 $\beta$ -榄香烯于 500 mL 旋转烧瓶中,加入适量的维生素 E,再加入三氯甲烷使以上物质溶解。于旋转蒸发器上,42  $^\circ\text{C}$  下减压旋转蒸发 50 min,烧瓶内壁形成一层薄膜。向烧瓶内壁通入  $\text{N}_2$  1 min,以除去残留三氯甲烷和防止脂质氧化。向旋转烧瓶中加入适量的 PBS,超声振荡水化形成脂质体。测定包封率。以包封率为考察目标,采用直观分析方法分析胆固醇、 $\beta$ -榄香烯及缓冲液对包封率的影响,包封率高表明该组配方组成有利于  $\beta$ -榄香烯脂质体的形成。实验结果见表 3。

表 2 因素与水平

Table 2 Factors and levels

水平	因素		
	胆固醇/mg	$\beta$ -榄香烯/mg	缓冲液
1	51	108	1/1 PBS
2	40.8	54	1/10 PBS
3	34	36	1/20 PBS

表 3 薄膜水化法制备的  $\beta$ -榄香烯脂质体包封率测定

Table 3 Envelopment rate of  $\beta$ -elemene liposomes prepared by TFH

试验号	胆固醇/mg	$\beta$ -榄香烯/mg	缓冲液	包封率/%
1	51	108	1/1 PBS	41.75
2	51	54	1/10 PBS	97.17
3	51	36	1/20 PBS	99.01
4	40.8	108	1/10 PBS	94.07
5	40.8	54	1/20 PBS	99.20
6	40.8	36	1/1 PBS	98.20
7	34	108	1/20 PBS	97.75
8	34	54	1/1 PBS	93.34
9	34	36	1/10 PBS	98.74
K1	79.31	77.86	77.76	
K2	97.16	96.57	96.66	
K3	96.61	98.65	98.65	
R	17.85	20.79	20.89	

由 R 值可见,缓冲液的离子强度与  $\beta$ -榄香烯的用量对薄膜水化法脂质体的包封率有较大影响,胆固醇的用量影响较小。较佳的脂质比为卵磷脂与胆固醇质量比 10:1,载药量小,有利于得到较高包封率的脂质,当卵磷脂与  $\beta$ -榄香烯质量比达到 4:1 时

基本上不能形成  $\beta$ -榄香烯脂质体。

2.5 逆相蒸发法制备  $\beta$ -榄香烯脂质体<sup>[7]</sup>: 固定卵磷脂用量 400 mg, 按 3 因素 3 水平的正交设计表(同表 2), 精确称取卵磷脂、胆固醇、 $\beta$ -榄香烯于 500 mL 旋转烧瓶中, 加入适量的维生素 E。加入三氯甲烷使以上物质溶解后, 加入所需 PBS 的 1/3, 室温下超声 5 min 以形成 W/O 乳液。于旋转蒸发器上, 42 °C 下减压旋转蒸发, 待烧瓶内壁形成胶状物。向旋转烧瓶中加入剩余的 PBS, 继续减压旋转蒸发结合超声下形成脂质体。测定其包封率。实验结果见表 4。

表 4 逆相蒸发法制备的  $\beta$ -榄香烯脂质体包封率测定

Table 4 Envelopment rate of  $\beta$ -elemene liposomes prepared by REV

试验号	胆固醇/mg	$\beta$ -榄香烯/mg	缓冲液	包封率/%
1	51	108	1/1 PBS	47.68
2	51	54	1/10 PBS	90.21
3	51	36	1/20 PBS	92.72
4	40.8	108	1/10 PBS	84.70
5	40.8	54	1/20 PBS	92.67
6	40.8	36	1/1 PBS	91.02
7	34	108	1/20 PBS	57.98
8	34	54	1/1 PBS	82.58
9	34	36	1/10 PBS	92.16
K1	76.87	63.45	73.76	
K2	89.46	88.49	89.02	
K3	77.57	91.97	81.12	
R	12.59	28.51	15.26	

由 R 值可见,  $\beta$ -榄香烯的用量对逆相蒸发法脂质体的包封率有较大影响, 缓冲液的离子强度次之, 胆固醇的用量影响较小。较佳的脂质比为卵磷脂与胆固醇质量比 10 : 1, 载药量小, 有利于得到较高包封率的脂质, 当卵磷脂与  $\beta$ -榄香烯质量比达到 4 : 1 时基本上不能形成脂质体。

2.6 高压挤压法制备  $\beta$ -榄香烯脂质体<sup>[8]</sup>: 虽然薄膜水化法脂质体的包封率要高于逆相蒸发法, 但考虑到薄膜水化法较难于实现大的成膜面积等工业化放大生产, 而采用逆相蒸发法结合高压挤压法制备脂质体。高压挤压法中  $\beta$ -榄香烯脂质体组成为大豆卵磷脂、胆固醇与  $\beta$ -榄香烯质量比为 400 : 40.8 : 54, 脂质体在 120 MPa 的压力下经过不同挤压次数后, 得到小粒径的脂质体。利用激光粒度仪, 在 90° 入射角下, 测定卵磷脂浓度为 5 mmol/L 的逆相蒸发  $\beta$ -榄香烯脂质体挤压前后的动态光衍射粒径<sup>[9]</sup>。经过不同挤压次数后脂质体的粒径及包封率变化见表 5。可以看出, 在一定的高压挤压范围内,  $\beta$ -榄香烯脂质体的粒径随挤压次数的增加而变小,  $\beta$ -榄香烯的包封率增大; 但超过一定的范围后, 则得到相反的结果, 究其原因可能是脂质体遭到破坏。

表 5 高压挤压对  $\beta$ -榄香烯脂质体的影响

Table 5 Effect of extrusion under 120 MPa on  $\beta$ -elemene liposomes

高压挤压次数	平均粒径/nm	包封率/%
0	173.1	96.51
1	144.2	98.44
3	112.4	99.18
5	120.0	98.62

改变  $\beta$ -榄香烯的载药量(卵磷脂为 400 mg,  $\beta$ -榄香烯分别为 36、54、68、108 mg), 卵磷脂与  $\beta$ -榄香烯质量比 4 : 1 ~ 10 : 1, 胆固醇均为 40.8 mg 制备逆相蒸发  $\beta$ -榄香烯脂质体, 经 120 MPa 高压挤压后脂质体包封率分别为 99.20%、99.18%、99.11% 和 90.56%。可见, 卵磷脂与  $\beta$ -榄香烯质量比达到 4 : 1 后, 脂质体依然有较高的包封率, 高压挤压后  $\beta$ -榄香烯脂质体的载药量可以得到明显提高。

2.7 稳定性考察: 将以上 3 种方法制备的  $\beta$ -榄香烯脂质体置于离心机中, 在 3 000 r/min 的离心作用力下, 考察脂质体在离心时间内有无分层变化。结果见表 6。将相同配方组成而不同制备条件下所制备的脂质体放置于 4 °C 下, 考察一定时间内有没有絮凝分层现象发生。结果见表 7。可见, 逆相蒸发结合高压挤压法制备的脂质体有很好的稳定性能。

表 6 不同方法制备的脂质体的离心稳定性

Table 6 Centrifugal stability of  $\beta$ -elemene liposomes prepared by various processings

时间/min	逆相蒸发法	薄膜蒸发法	逆相结合挤压法
10	不分层	不分层	不分层
20	不分层	不分层	不分层
30	不分层	不分层	不分层
40	稍分层	不分层	不分层
50	有沉淀, 分层	稍分层	不分层

表 7 不同方法制备的脂质体的储存稳定性

Table 7 Storage stability of  $\beta$ -elemene liposomes prepared by various processings

时间/月	逆相蒸发法	薄膜蒸发法	逆相结合挤压法
1	良好	良好	良好
2	良好	良好	良好
3	絮凝分层	良好	良好
6	絮凝分层	絮凝分层	良好

### 3 讨论与结论

3.1 高压挤压对  $\beta$ -榄香烯脂质体的影响: 从制备工艺控制条件来看, 薄膜水化法需要较大的成膜面积, 占用较大的实验空间, 薄膜水化法耗费的时间也较长, 因而难于实现批量生产; 而逆相法对实验的压力及温度要求较薄膜法严格, 不易控制, 但总体而言, 逆相蒸发法是较易于实现批量生产的制备脂质体的方法, 故采用逆相蒸发法结合其他方法制备  $\beta$ -榄香烯脂质体。

对于以上两种方法,当 $\beta$ -榄香烯的量过高时,脂质双分子层的分子排列遭到破坏,不利于脂质体的形成,产生絮状物,从而降低 $\beta$ -榄香烯的包封率。

脂质体在高压作用下通过狭小的通道后,产生强大的剪切、冲击及空化撞击作用,脂质膜分子重新规整排列,形成预期的粒径极为均一的脂质体。对于本实验的 $\beta$ -榄香烯脂质体,由逆相蒸发法制备的包封率较低且粒径分布较宽的 $\beta$ -榄香烯脂质体,在 120 MPa 的压力下经过 3 次的高压挤压作用后,其粒径明显降低而包封率显著增加;同时脂质体的载药量也得到相应的提高。但若继续挤压,则起到相反的效果,可能施加的能量过高,破坏了脂质双分子层。

3.2 胆固醇对 $\beta$ -榄香烯脂质体形成的影响:在形成脂质体时,胆固醇分子中的羟基与磷脂分子中的羰基以氢键形成复合物。胆固醇对磷脂的相变具有双向调节作用,在相变温度以上时,它能抑制磷脂分子中脂肪酰链的旋转异构化运动,降低膜的流动性;在相变温度以下时,膜脂处于晶态排列,它又可诱发脂肪酰链的歪扭构象的产生,从而阻止晶态的出现。胆固醇的用量对 $\beta$ -榄香烯的包封率有影响,当卵磷脂与胆固醇质量比 10:1 时得到较高包封率的 $\beta$ -榄香烯脂质体。胆固醇的量过高时,会使膜结构过于僵硬,不利于药物的包封,而且在外观上不易形成均一相;胆固醇的量过低时,卵磷脂与 $\beta$ -榄香烯可能易于形成胶束结构而不利于形成脂质体,从而也降低 $\beta$ -榄香烯的包封率。

3.3 缓冲溶液离子强度对 $\beta$ -榄香烯包封率的影响:脂质体中极性的偶极子卵磷脂 PC 的磷酸酯酰基团居膜面外层,胆碱基团朝内,这种取向使中性的卵磷脂 PC 脂质体膜表面诱导了负电荷<sup>[7]</sup>。离子强度对脂质体粒子的表面电势有显著的影响作用<sup>[10]</sup>,离子

强度过高会有更多的反离子进入紧密层(Ster 层),导致扩散层被压缩,从而易于引起脂质囊泡之间的聚合。离子强度过高将影响 $\beta$ -榄香烯脂质体的形成,明显降低 $\beta$ -榄香烯的包封率和引起 $\beta$ -榄香烯脂质体的存储不稳定。

可见,逆相蒸发结合压力挤压的方法是较易于实现批量生产 $\beta$ -榄香烯脂质体的方法:卵磷脂与胆固醇的质量比为 10:1,采用较低离子强度的缓冲溶液有利于 $\beta$ -榄香烯脂质体的制备。以上工艺方法也可以为其他脂溶性药物的脂质体制备及包封率的测定提供参考。

#### References:

- [1] Barenholz Y. Liposome application: problems and prospects [J]. *Curr Opin Coll Int Sci*, 2001, 15 (6):66-77.
- [2] Chen Y R, Wu X Y. Beta-elemene, method to prepare the same and uses thereof [P]. US: 402744US, 1998-10-22.
- [3] Guo T, Zhang H R. The determination of distribution of  $\beta$ -elemene in rabbit eyes by gas chromatography [J]. *Chin Ophthal Res* (眼科研究), 2000, 18(4): 333-335.
- [4] Wei F X, Deng X L, Chen X. Determination of element in essential oil from *curcuma* by GC [J]. *Hebei Univ Sci Technol* (河北科技大学学报), 2005, 26(3):119-222.
- [5] Yu Y H, Li X C, Wu T. Study on liposome preparation technique of *Bupleurum chinense* volatile oil for injection [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2004, 29(6): 251-255.
- [6] Bangham A D, Standish M M, Watkins J C. Diffusion of univalent ions across the Lamellar of Swollen phospholipids [J]. *J Molecul Biol*, 1965,13: 238-252.
- [7] Deamer D, Bangham A D. Large volume liposomes by an ether vaporization method [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 443(3):629-634.
- [8] Kremer J M H. Vesicles of variacle diameter by a modified injection method [J]. *Biochemistry*, 1997, 16 (17): 3932-3935.
- [9] Bloomfield V A, *Dynamic Light Scattering Application of Photon Correlation Spectroscopy* [M]. New York: Plenum, 1985.
- [10] Tong H, Yao S N. Effect of different type electrolyte on surface potential of liposome of PC and PC-cholesterol [J]. *Acta Physico Chim Sin* (物理化学学报), 1998, 14(9): 1043-1047.

## 膨润土纯化黄芩水提液的研究

张建伟<sup>1</sup>, 王中原<sup>1</sup>, 肖斌<sup>2</sup>

(1. 沈阳化工学院, 辽宁 沈阳 110142; 2. 辽河石油勘探局油田建设二公司, 辽宁 盘锦 124120)

絮凝澄清法处理中药水提液比醇沉法具有成本低,有效成分损失小等优点。但目前所应用的絮凝剂仍会造成有效成分的损失。膨润土是天然纳米材料,

能吸附有机物,是一种具有选择性絮凝中药水提液中杂质的絮凝剂<sup>[1]</sup>,本实验采用膨润土对黄芩水提液进行除杂净化。

收稿日期:2006-03-05

基金项目:辽宁省教育厅科学研究计划(05L331)

作者简介:张建伟(1964—),男(满),辽宁省义县人,博士,教授,硕士研究生导师,沈阳化工学院机械工程学院院长,一直从事固液分离和高效节能过程装备的科学研究工作。 Tel:(024)89383279 E-mail:zhangjianwei64@163.com