

## 盐酸青藤碱传递体的制备及质量评价

姜素芳<sup>1</sup>, 姚瑶<sup>2\*</sup>, 陶昱斐<sup>2</sup>, 丁燕飞<sup>2</sup>, 陈军<sup>2\*\*</sup>, 汪洋<sup>1\*\*</sup>

(1. 湖南师范大学医学院, 湖南长沙 410013; 2. 中南大学药学院, 湖南长沙 410013)

**摘要:**目的 制备盐酸青藤碱传递体, 并进行质量评价。方法 以盐酸青藤碱的包封率为指标, 比较了薄膜分散法、逆相蒸发法和乙醇注入法制备的盐酸青藤碱传递体。采用均匀设计筛选逆相蒸发法制备盐酸青藤碱传递体的最佳处方, 并对传递体的粒径、形态、电位和稳定性进行评价。结果 逆相蒸发法制备的传递体的包封率最高。均匀设计筛选逆相蒸发法的最佳处方为: 大豆磷脂与胆酸钠的质量比为 200/30 mg/mg, 氯仿与 PBS 的体积比为 5 mL/mL, PBS 的 pH 值为 6.5, 盐酸青藤碱的加入量为 10 mg。制得的盐酸青藤碱传递体为乳白色半透明混悬液, 平均包封率为 62.2%。在电镜下观察其外形呈较规则的球形或类球形, 光滑且不粘连, 平均粒径为 96.4 nm, Zeta 电位为 -35.93 mV, 于 4℃下放置 30 d, 未产生聚集或沉淀。结论 盐酸青藤碱传递体的制备工艺可行, 所得产品稳定, 为盐酸青藤碱的临床给药提供一种新的给药系统。

**关键词:** 盐酸青藤碱传递体; 均匀设计; 包封率; 高效液相色谱

**中图分类号:** R282.2; R286.02

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2007)03-0362-04

## Preparation and quality assessment of sinomenine hydrochloride transfersomes

JIANG Su-fang<sup>1</sup>, YAO Yao<sup>2</sup>, TAO Yu-fei<sup>2</sup>, DING Yan-fei<sup>2</sup>, CHEN Jun<sup>2</sup>, WANG Yang<sup>1</sup>

(1. Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410013, China; 2. School of Pharmaceutical Science, Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract: Objective** To prepare sinomenine hydrochloride transfersomes and evaluate their qualities.

**Methods** Three different preparation methods including film dispersion, reverse phase evaporation, and ethanol injection methods were compared according to the encapsulation efficiency of transfersomes. Uniform design was applied to optimize the formulation and pharmaceutical process of reverse phase evaporation. The particle size, the appearance, the Z-potential, and the stability were also evaluated.

**Results** The transfersomes prepared by reverse-phase evaporation method possessed the highest encapsulation efficiency. The ideal combinations of preparation and formulation were: soya lecithin/sodium cholate was 200/30 mg/mg, chloroform/PBS was 5 mL/mL, pH of PBS was 6.5, added sinomenine hydrochloride was 10 mg. The transfersomes obtained were milky white translucent suspension, with a mean encapsulation efficiency of 62.2%. The shape of their particles was spherical or similar to spherical under microscope, which was smooth and disconglutinated with an average diameter of 96.4 nm, and a Z-potential of -35.93 mV. Aggregation or deposition was not observed after exposure under the temperature of 4℃ for 30 d. **Conclusion** The preparation process of sinomenine hydrochloride transfersomes is feasible, the quality of obtained transfersomes is stable. It is expected to provide a new preparation for clinical use of sinomenine hydrochloride.

**Key words:** sinomenine hydrochloride transfersomes; uniform design; encapsulation efficiency; HPLC

盐酸青藤碱(sinomenine hydrochloride)是从青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 中提取的生物碱单体的盐酸盐, 具有抗炎、抗心律失常

常、镇痛、降压等作用, 用于类风湿性关节炎等各种风湿病以及心律失常, 临床疗效确切, 且耐受性好<sup>[1]</sup>。该药口服制剂的胃肠道不良反应较大, 生物利

收稿日期: 2006-08-19

基金项目: 湖南省教育厅资助项目 (06c498)

作者简介: 姜素芳(1972-), 女, 湖南邵阳人, 讲师, 硕士, 1994年毕业于中国药科大学药物制剂专业, 2005年于中南大学药学院获药理学硕士学位, 主要从事药剂学的教学与药物传递系统的研究。 Tel: (0731) 8912473 E-mail: sufang-jiang@sina.com

\* 通讯作者 姚瑶 Tel: (0731) 2650367

\*\* 2006届本科毕业生

用度低,注射剂半衰期短,需频繁给药<sup>[2]</sup>。青藤碱的透皮给药系统成为其合适的给药方式,目前已见有贴片<sup>[2]</sup>、凝胶剂<sup>[3]</sup>、乳膏<sup>[4]</sup>。但传统的外用剂型透皮率较低,且对皮肤产生一定的刺激性。传递体(transfersome)又称柔性纳米脂质体,系一种新型的经皮给药载体,是在普通脂质体的基础上加入表面活性剂如胆酸盐等制成的类脂聚积体。除具有普通脂质体与皮肤亲和力好、安全无毒的优点外,还具有高度的变形性,能高效地穿透比其自身小数倍的皮肤孔道而达到透皮给药的目的<sup>[6,7]</sup>。为了促进青藤碱透皮吸收,尽量减少药物的皮肤刺激性,本实验选用传递体作为盐酸青藤碱的经皮给药载体,将盐酸青藤碱制成透皮制剂,透过率高、使用方便、安全无刺激、起效快。

## 1 仪器与试剂

探针式超声仪(美国 Branson 公司);激光散射粒径分析仪(美国 Brookhaven 公司);JEM1230 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);LC-2010A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

盐酸青藤碱(湖南正清制药有限公司,质量分数为 98.7%),卵磷脂(德国 Lipoid 公司),胆酸钠(上海化学试剂厂),Sephadex G-50(瑞士),磷酸盐缓冲液(PBS,自配),其余试剂均为分析纯或色谱纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 盐酸青藤碱的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱柱与系统适用性试验:迪马公司 ODS C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.01 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-乙腈(10:85:5);柱温为 30℃;体积流量为 1 mL/min;检测波长为 264.8 nm;进样量为 20 μL。此条件下盐酸青藤碱对照品、盐酸青藤碱传递体样品及阴性对照品的色谱行为见图 1。结果表明,阴性对照无干扰,方法可行。

2.1.2 标准曲线的制备:精密称取盐酸青藤碱适量,用流动相精密配成质量浓度分别为 5.0、10、20、30、40、60、80 μg/mL 系列对照品溶液,按上述色谱条件进行测定峰面积。以峰面积为横坐标,质量浓度为纵坐标进行线性回归,得回归方程为: $C = 6.7259 \times 10^{-5} A + 0.6728$ ,  $r = 0.9998$ ,表明盐酸青藤碱在 5~80 μg/mL 与峰面积的线性关系良好。

2.2 包封率的测定:精密吸取 1 mL 盐酸青藤碱传递体上 Sephadex G50 柱(200 mm×10 mm),以 PBS 洗脱,流量控制在约 1 mL/min,收集 6~14

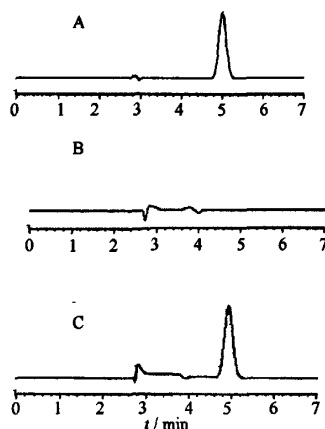


图1 盐酸青藤碱对照品(A)、盐酸青藤碱传递体(B)和阴性对照(C)的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of sinomenine hydrochloride reference substance (A), sinomenine hydrochloride transfersomes (B), and negative sample (C)

mL 洗脱液(含传递体),全部转移至 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。取 20 μL 注入 HPLC 仪,记录峰面积,代入回归方程计算药物质量浓度,并由此计算传递体中包裹的药物量,计为  $M_1$ ,另精密吸取盐酸青藤碱传递体混悬液 1 mL 置 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀后取 20 μL 同法测定,计算传递体的总药量,计为  $M_2$ 。按包封率= $M_1/M_2 \times 100\%$  计算。

2.3 盐酸青藤碱传递体的制备方法的考察:相同的处方量,以包封率为指标,分别采用薄膜分散法、逆相蒸发法和乙醇注入法制备盐酸青藤碱传递体,选择包封率较高的制备方法。

2.3.1 薄膜分散法:定量称取豆磷脂、硬脂酸置茄形瓶中,加入氯仿,振摇,使完全溶解,得类脂溶液。将茄形瓶置旋转蒸发器上,加入数颗直径约 4 mm 的玻璃珠,于 45℃ 减压蒸发溶剂使形成均匀薄膜,另将盐酸青藤碱、胆酸钠溶于磷酸盐缓冲液,加入上述茄形瓶,常压旋转洗膜,于冰水浴中探头式超声 30 s(超声 3 s,停 2 s),以 0.15 μm 的微孔滤膜滤过,即得盐酸青藤碱传递体。测得包封率为 31.4%。

2.3.2 逆相蒸发法:定量称取卵磷脂、硬脂酸于圆底烧瓶中,加氯仿溶解,另取盐酸青藤碱、胆酸钠溶于磷酸盐缓冲液,再与上述氯仿溶液混合,探头式超声处理 10 s 使形成 W/O 型乳剂,45℃ 减压旋转蒸发除氯仿,得半固体胶状物,再以适量磷酸盐缓冲液水合,于冰水浴中探头式超声 30 s(超声 3 s,停 2 s),以 0.15 μm 的微孔滤膜滤过,即得盐酸青藤碱传

递体。测得包封率为 51.2%。

2.3.3 乙醇注入法:定量称取盐酸青藤碱、豆磷脂、胆酸钠、硬脂酸,加乙醇使完全溶解,在不断搅拌下,缓慢注入 60℃磷酸盐缓冲液中,加完后继续搅拌 1 h 至乙醇挥尽。于冰水浴中探头式超声 30 s(超声 3 s,停 2 s),以 0.15 μm 的微孔滤膜滤过,即得盐酸青藤碱传递体。测得包封率为 19.7%。

2.4 均匀设计试验优化处方:根据预试验结果,采用逆相蒸发法制备传递体,筛选出制备盐酸青藤碱传递体时影响其包封率的主要 4 个因素:大豆磷脂与胆酸钠的质量比(A),氯仿与 PBS 的体积比(B),PBS 的 pH 值(C)和盐酸青藤碱的加入量(D),根据均匀设计法的原理和使用原则<sup>[3]</sup>,每个因素选 6 个水平,其他影响传递体质量的因素采用固定条件、平行操作的方法按  $U_{12}(12^4)$  均匀设计表进行拟水平试验。见表 1。

表 1  $U_{12}(12^4)$  均匀设计试验结果

Table 1 Results of  $U_{12}(12^4)$  uniform design test

| 试验号 | A/(mg : mg) | B/(mL : mL) | C   | D/mg | 包封率/% |
|-----|-------------|-------------|-----|------|-------|
| 1   | 200/25      | 3/1         | 7.5 | 30   | 47.25 |
| 2   | 200/25      | 6/1         | 6.5 | 25   | 49.56 |
| 3   | 200/30      | 3/1         | 8.5 | 15   | 56.38 |
| 4   | 200/30      | 6/1         | 7   | 10   | 59.91 |
| 5   | 200/40      | 2/1         | 6   | 35   | 50.41 |
| 6   | 200/40      | 5/1         | 8   | 25   | 47.08 |
| 7   | 200/50      | 2/1         | 6.5 | 20   | 49.92 |
| 8   | 200/50      | 5/1         | 8.5 | 10   | 51.30 |
| 9   | 200/60      | 1/1         | 7.5 | 35   | 44.01 |
| 10  | 200/60      | 4/1         | 6   | 30   | 47.00 |
| 11  | 200/70      | 1/1         | 8   | 20   | 44.13 |
| 12  | 200/70      | 4/1         | 7   | 15   | 46.82 |

将数据输入计算机,采用 dps 数据处理软件对结果进行分析,用二次多项式逐步回归,得回归方程: $Y = 25.738\ 76 + 11.123\ 52\ X_1 + 7.082\ 71\ X_2 - 0.749\ 62\ X_4 - 0.772\ 34\ X_1^2 - 0.257\ 74\ X_2^2 + 0.110\ 80\ X_3^2 + 0.017\ 99\ X_4^2 - 0.057\ 23\ X_1X_4 - 0.788\ 44\ X_2X_3 - 0.024\ 22\ X_3X_4$ ,  $R = 0.977$ , 其中  $Y$ 、 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  分别为包封率、大豆磷脂与胆酸钠的质量比、氯仿与 PBS 的体积比、PBS 的 pH 值和盐酸青藤碱的加入量。 $s = 0.029$ ,  $P < 0.01$ ,  $F$  检验通过,各因素优化值为  $X_1 = 6.94$ ,  $X_2 = 5.02$ ,  $X_3 = 6.51$ ,  $X_4 = 10.64$ 。根据优化条件结合实验具体情况,最终确定处方为大豆磷脂与胆酸钠的质量比为 200/30 mg/mg,氯仿与 PBS 的体积比为 5 mL/mL, PBS 的 pH 值为 6.5,盐酸青藤碱的加入量为 10 mg,将上述各值代入方程,得优化处方预测值  $Y = 62.7\%$ 。

2.5 传递体的粒径和形态:制得的盐酸青藤碱传递

体为乳白色半透明混悬液。采用激光散射粒径测定仪测定传递体的粒径和分布,见图 2。结果平均粒径为 96.4 nm,分布较均匀。测得 Zeta 电位为 -35.93 mV,于 4℃下放置 30 d,未产生聚积或沉淀,表明有较好的聚结稳定性。采用透射电镜观察传递体的形态,见图 3。可见所得传递体外形呈较规则的球形或类球形,光滑且不黏连。

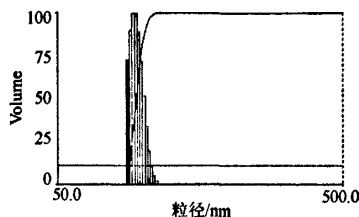


图 2 盐酸青藤碱传递体的粒径分布

Fig. 2 Size diameter distribution of sinomenine hydrochloride transfersomes

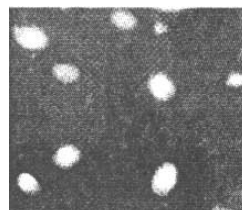


图 3 盐酸青藤碱传递体的电镜照片

Fig. 3 Transmission electron microscopic photo of sinomenine hydrochloride transfersomes

2.6 验证试验:按优选处方,制备 3 批盐酸青藤碱传递体,测定包封率,见表 2,结果与预测值接近,且重现性良好。

表 2 3 批样品包封率测定结果

Table 2 Encapsulation efficiency of three batches of samples

| 批号     | 包封率/% |
|--------|-------|
| 060313 | 61.2  |
| 060314 | 63.5  |
| 060315 | 62.0  |

### 3 讨论

制备水溶性药物脂质体,采用逆相蒸发法通常有着更高的包封率,而该方法工艺过程中能否形成稳定的 W/O 乳剂至关重要,选择适当的有机溶剂和采用恰当的油水相比,将有利于制得稳定的乳剂,从而提高脂质体的包封率。本实验发现,采用氯仿为有机溶剂,比乙醚、二氯甲烷等更容易形成乳剂且不易分层,且油水相比比例大于 3:1 时,形成的乳剂更稳定,所得脂质体的包封率亦更高。

处方中硬脂酸对传递体的聚结稳定性影响较大,未加硬脂酸的处方放置易发生聚集,粒径变大,加入硬脂酸后放置 30 d 无变化,表明有更好的稳定性。这主要是因为硬脂酸能使传递体带上更多的负电荷,电位测定显示加入硬脂酸后传递体的 Zeta 电位的绝对值提高了十几个毫伏,使得微粒与微粒间的排斥作用增强,因而更加稳定。另外,胆酸钠加入的量对传递体的包封率以及粒径影响较大,胆酸钠加入量越多,传递体粒径越小。

实验中测定传递体的包封率时,先采用葡聚糖凝胶柱色谱法分离传递体和游离药物,预试验表明,以 PBS 为洗脱介质,葡聚糖凝胶柱对盐酸青藤碱游离药物完全吸附,而传递体在 6~14 mL 时流出,且能收集完全,从而达到两者完全分离的目的。

#### References:

- [1] Liu Q, Zhou L L, Li R, *et al.* Survey of studies on sinomenine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(4): 247-249.
- [2] Zhou L L, Liu Q, Li R, *et al.* Study on releasing rate of sinomenine TDD [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1999, 21(6): 279-281.
- [3] Zhang X Z, Pan X G, Luo S D, *et al.* Studies on the Preparation and quality standards for sinomenine gel [J]. *China Pharm* (中国药房), 2003, 14(5): 275-277.
- [4] Wang H, Xie Y, Zhang X Z. Study on the preparation and quality standard for sinomenine cream [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2004, 24(4): 227-228.
- [5] Chen T, Hou S X. Latest developments of research on the prcutaneous penetration of transfersomes [J]. *Cent South Pharm* (中南药学), 2005, 3(1): 43-46.
- [6] Ceve G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradefomable drug carriers [J]. *Transfersomes Biochim Biophys Acta*, 2001, 1514 (2): 191-202.
- [7] Schatzlein A, Ceve G. Non-uniform cellular packing of the stratum comeun and permeation barrier function of intact skin; a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (transfersomes) [J]. *Br J Dermatol*, 1998, 138 (4): 583-592.
- [8] Wang P, Wang Y Z, Shen J M. Uniform design and its application in pharmacy [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1989, 6 (4): 297-299.

## 间歇式泡沫分离提取甘草中甘草酸的工艺研究

苏艳桃, 韩 丽, 马鸿雁, 王虎山, 兰 洁, 张艳艳, 杨 明

(成都中医药大学, 四川 成都 611731)

**摘 要:**目的 优选间歇式泡沫分离甘草中甘草酸的最佳工艺条件。方法 以回收率、富集比和产品质量分数为指标,单因素考察影响泡沫分离效果的各因素。结果 间歇式泡沫分离甘草皂苷的最佳工艺条件为 pH 4、进料液中甘草酸质量浓度为 0.23 mg/mL、进气速度 600 mL/min、进料体积 1 000 mL,此时泡沫相中甘草酸的回收率为 91.9%,富集比为 6.4,甘草酸质量分数 32.3%。结论 间歇式泡沫分离甘草中甘草酸是一种可行、有效的新型分离技术。

**关键词:**甘草; 甘草酸; 泡沫分离

中图分类号: R282.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)03-0365-04

### Separation of glycyrrhizic acid by intermittence foam fractionation

SU Yan-tao, HAN Li, MA Hong-yan, WANG Hu-shan, LAN Jie, ZHANG Yan-yan, YANG Ming

(Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611731, China)

**Abstract:** **Objective** To optimize the enrichment process of glycyrrhizic acid by intermittence foam fractionation. **Methods** Investigating the every factors one by one, and the recovery obtained, enrichment radio and purity were used to optimize the process. **Results** This method was proved to be with a high recovery obtained which was 91.9%, enrichment radio was 6.4, and purity was 32.3%, while pH value was 4, concentration was 0.23 mg/mL, airflow rate was 600 mL/min, and volume was 1 000 mL. **Conclusion** Intermittence foam fractionation of glycyrrhizic acid is a new, viable, and effective method.

**Key words:** *Glyrrhiza uralensis* Fisch.; glycyrrhizic acid; foam fractionation