

工艺中收率因素对包封率的影响,因此认为以此公式计算包封率更为科学可靠。

References:

- [1] Cheng Y G, Fang C S, Huang M. The research on constitutions in three kinds of *Citrus* oils produced in Shanxi[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(6): 373-374.
- [2] Arshady R. Microcapsules for food [J]. *J Microencapsul*, 1993, 10(4): 413-435.
- [3] Xue W, Yu Z F. The research on the problems about spray drying machine [J]. *Heilongjiang Med J* (黑龙江医药), 1999, 12(2): 96-97.
- [4] He W, Luo Y, Zhou J, et al. Study on preparation of vitamin E microcapsule tablets and its quality control [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2002, 22(11): 669-672.

正交试验优选猪苓多糖长循环脂质体制备工艺的研究

汪继红, 杨 瑞, 范巧娜, 王凯平, 胡明慧

(华中科技大学同济医学院药学院, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究猪苓多糖长循环脂质体的处方和制备工艺。方法 采用逆相蒸发法制备脂质体,以紫外分光光度-Sephadex 法测定脂质体中猪苓多糖的包封率和载药量,采用单因素和正交试验法优化猪苓多糖长循环脂质体的处方和制备工艺。结果 优化后的脂质体平均包封率为 98.24%,平均载药量为 27.20%。结论 脂质体制备工艺合理,紫外分光光度-Sephadex 法测定猪苓多糖长循环脂质体包封率准确性高,重现性好,简便易行。

关键词:猪苓多糖;长循环脂质体;逆相蒸发法;正交试验法;制备

中图分类号:R283.1; R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)10-1484-04

Optimizing preparation technique of *Polyporus umbellatus* polysaccharides long circulating liposomes by orthogonal test

WANG Ji-hong, YANG Rui, FAN Qiao-na, WANG Kai-ping, HU Ming-hui

(School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract; Objective To study the processing techniques for prescription and preparation of *Polyporus umbellatus* polysaccharides long circulating liposomes (PUPS LCLs). **Methods** The liposomes were prepared by the reverse evaporating method. The main influencing factors were identified by single factor analysis, then the techniques of the prescription and preparation of liposomes were optimized. The entrapment efficiency and the carrying amount were determined by UV-Sephadex method. **Results** After optimized, the average entrapment efficiency of liposomes was 98.24% and the average carrying amount was 27.20%. **Conclusion** Preparation method of PUPS LCLs is available. UV-Sephadex method is simple and suitable for quality control of PUPS LCLs with desirable reproducibility and the results are reliable.

Key words: *Polyporus umbellatus* polysaccharides (PUPS); long circulating liposomes (LCLs); reverse evaporating method; orthogonal test; preparation

猪苓是多孔菌科多孔菌属猪苓 *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. 的菌核。猪苓多糖是猪苓的主要有效成分,具有抗癌和保肝等多种药理作用^[1]。传统的脂质体易被单核吞噬细胞吞噬,在血液循环中驻留时间较短,极大地影响其作为药物载体的应用^[2]。采用聚乙二醇(PEG)修饰制成的长循环脂质体能提高脂质体的亲水性,逃避网状内皮系统对脂质体的识别,提高药物的抗肿瘤活性。本课题组前期研究制备出的猪苓多糖脂质体的包封率和载药量都

较低^[3]。故本实验以猪苓多糖为模型药物,采用正交设计筛选 PEG 4000 修饰的长循环脂质体的处方,研究其制备工艺,并进行质量评价。

1 仪器与试剂

722 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),台式离心机(上海安亭科学仪器厂),超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),葡聚糖凝胶 G-50(中国医药集团上海化学试剂公司),大豆卵磷脂(北京奥博星生物技术责任有限公司),胆

收稿日期:2007-01-08

作者简介:汪继红(1976—),女,湖北省应城市人,讲师,硕士,研究方向为药物新剂型的研制与开发。

Tel:(027)83657549 E-mail:Wj200510@126.com

固醇(北京奥博星生物技术责任有限公司),聚乙二醇4000(PEG 4000,进口分装),猪苓多糖(质量分数 $\geq 80\%$,连云港东风制药厂),所用试剂均为分析纯,实验用水为双蒸水。

2 方法和结果

2.1 标准曲线的绘制^[3]:精密称取干燥至恒重的葡萄糖对照品 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,即得对照品溶液。精密量取葡萄糖对照品溶液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL,分别置试管中,加蒸馏水适量使成 2.0 mL,再加苯酚溶液 1.0 mL,摇匀,迅速滴加浓硫酸 5.0 mL,放置 5 min 后沸水浴中加热 15 min,取出后置冷水中冷却。以不含对照品溶液的一管做空白,按分光光度法于 490 nm 处测吸光度(A)值。以 A 对葡萄糖质量浓度(C)进行线性回归,得回归方程 $A = 0.0152C + 0.0026$, $r = 0.9982$ 。表明葡萄糖在 4.80~43.2 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度存在良好的线性关系。

2.2 换算因子的测定^[4]:精密称取猪苓多糖 20 mg,置 250 mL 量瓶中加水溶解稀释至刻度,精密吸取 0.6 mL,以苯酚-硫酸法在 490 nm 处测吸光度值,将数值代入回归方程算出供试品溶液中葡萄糖的质量浓度,计算得换算因子 $f = 1.27$ 。

$$f = W/CD$$

其中 W 为多糖的质量, C 为多糖液中葡萄糖的质量分数, D 为多糖的稀释倍数。

2.3 脂质体的制备:采用逆相蒸发法^[5,6]。按比例称取大豆卵磷脂、胆固醇和 PEG4000 并用适量的三氯甲烷溶解,称取猪苓多糖用 PBS 缓冲液配成 3% 的溶液,将以上两种溶液转入圆底烧瓶内,超声混匀得 W/O 型乳剂,置旋转蒸发器上于恒温水浴中减压蒸发 15 min 除去氯仿,得稠厚的胶化物,放置 4 h 后加入适量 PBS 缓冲液,超声成均匀的乳状液,5 000 r/min 离心,得乳白色胶体溶液,即为猪苓多糖长循环脂质体。按照猪苓多糖长循环脂质体的制备方法操作,只是采用 PBS 缓冲液代替猪苓多糖溶液,同法制备空白脂质体。

2.4 脂质体包封率的测定

2.4.1 脂质体洗脱曲线的绘制:吸取 0.5 mL 载药脂质体加到 G-50 凝胶柱上,控制流量为 1 mL/min,以 PBS 缓冲液作为流动相洗脱。每管收集 2 mL,共 30 管,分别以苯酚-硫酸法在 490 nm 处测定 A,以 A 为纵坐标,管号为横坐标绘制洗脱曲线,见图 1。可见脂质体(乳白色)在 15 mL 左右开始流出,大约到 20 mL,后续液为游离药物的洗脱液,大约到 25 mL。

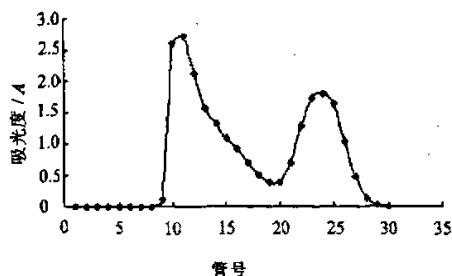


图1 猪苓多糖长循环脂质体的洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of PUPS LCLs

2.4.2 包封率测定:用紫外分光光度-Sephadex 法。吸取 0.5 mL 载药脂质体加到 G-50 凝胶柱上,控制流量为 1 mL/min,用 PBS 缓冲液洗脱。收集脂质体洗脱液 20 mL 和后续液 25 mL。分别置 100 mL 量瓶中,加 PBS 缓冲液稀释至刻度,另取空白脂质体过柱洗脱做空白。分别取 1.2 mL 溶液按苯酚-硫酸法在 490 nm 处测定 A 值,代入回归方程中计算猪苓多糖的质量浓度,计算包封率。

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

$C_{\text{总}}$ 为脂质体中猪苓多糖的包封量和 $C_{\text{游}}$ 之和, $C_{\text{游}}$ 为过柱后游离的猪苓多糖的质量浓度。

根据脂质体包裹药物的质量与脂质体中所含固体总质量之比,计算载药量。

$$\text{载药量} = W_1 / f / W_{\text{总}} \times 100\%$$

W_1 为脂质体中猪苓多糖的质量,由标准曲线换算而得; $W_{\text{总}}$ 为所有固体总质量; f 为换算因子。

2.5 影响脂质体制备工艺因素的考察

2.5.1 胆固醇与磷脂用量的比例对包封率的影响:在固定油水两相比例、PEG 4000 质量等因素条件下,选取胆固醇与磷脂物质的量为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 时制备脂质体,测得包封率分别为 91.43%、78.93%、75.53%、87.68%、63.69%。可见,当胆固醇与磷脂为 1:2 时,脂质体的包封率最高,且制备过程中产生气泡较多,超声较完全,制备的脂质体质量也较好。因此将胆固醇与磷脂的物质的量比例固定为 1:2。

2.5.2 PEG 4000 加入量对包封率的影响:固定其他因素,选取 PEG 4000 质量分别为 2、3、4、5、6 mg 时,包封率分别为 65.80%、74.82%、76.09%、78.25%、74.70%。即当 PEG 4000 的质量为 5 mg 时,脂质体的包封率最高。

2.5.3 水相与有机相比比例对包封率的影响:在固定 PEG 4000 的质量、磷脂与胆固醇的比例等因素条件下,选取 PBS 缓冲液与氯仿的体积比为 1:2、1:3、1:4 时,测得包封率为 91.43%、79.71%、

47.07%，即当水相与有机相的比例为 1:2 时，脂质体的包封率最高，比较合适。其中试验还选取了水相与有机相的比例为 1:1 和 1:5，但是比例为 1:1 时，在制备过程中将水相与有机相混合时出现固体块状物，超声也不溶解，故该比例不宜。当比例为 1:5 时，旋转蒸发后的脂质体膜很难完全超声成溶液状，测定的包封率超过了 100%，原因可能是比例不合理和操作时的误差造成，故该比例也不宜。

2.5.4 水浴温度对包封率的影响：固定其他所有因素条件，选取水浴温度分别为 30、60℃ 时，测定的包封率分别为 91.43%、90.88%，可认为温度对包封率的影响程度较小。从节能和方便实验操作的角度考虑，将水浴温度控制在 30℃。

2.5.5 猪苓多糖加入量对包封率的影响：固定其他所有因素条件，当猪苓多糖加入量为 30、40、50、60、70 mg 时，以包封率为衡量指标，测得结果分别为 87.10%、88.31%、93.40%、93.80%、95.91%。当猪苓多糖的质量继续增加时，其溶解性能受到影响。

2.6 正交设计优化脂质体处方

2.6.1 影响因素和水平的确定：在单因素考察的基础上，确定胆固醇与磷脂的比例(A)、PEG 4000 质量(B)、水相与有机相的比例(C)和猪苓多糖质量(D)为因素，每个因素取 3 个水平，因素水平见表 1。

表 1 因素与水平
Table 1 Factors and levels

水平	A/(mol·mol ⁻¹)	B/mg	C/(mL·mL ⁻¹)	D/mg
1	1:2.5	4	1:1.5	50
2	1:2.0	5	1:2.0	60
3	1:2.5	6	1:2.5	70

2.6.2 脂质体处方优化设计：以包封率和载药量为指标，按正交设计的原理选用 L₉(3⁴) 设计表进行试验，实验方案及测定结果见表 2。

表 2 正交试验方案及结果

Table 2 Design and results of orthogonal test

编号	A	B	C	D	包封率/%	载药量/%
1	1	1	1	1	90.94	20.86
2	1	2	2	2	92.24	24.91
3	1	3	3	3	95.91	25.93
4	2	1	2	3	93.70	26.52
5	2	2	3	1	95.92	21.21
6	2	3	1	2	96.12	20.58
7	3	1	3	2	95.21	24.25
8	3	2	1	3	92.97	28.82
9	3	3	2	1	94.98	19.81
包封率 K ₁	279.09	279.85	280.03	281.84		
K ₂	285.74	281.13	280.92	283.57		
K ₃	283.16	287.01	287.04	282.58		
R	6.65	7.16	7.01	1.73		
载药量 K ₁	71.70	71.63	70.26	61.88		
K ₂	68.31	74.94	71.24	69.74		
K ₃	72.88	66.32	71.39	81.27		
R	4.57	8.62	1.13	19.39		

比较 R 值的大小可以看出，当以包封率为指标

时，B>C>A>D，即对脂质体包封率影响最大的是 PEG 4000 的质量，其次是水相与有机相的比例、胆固醇与磷脂的比例，对脂质体包封率影响最小的是猪苓多糖的质量，筛选的最佳处方为 A₂B₃C₃D₂。而当考察各因素对载药量的影响时，影响程度为 D>B>C>A，可看出猪苓多糖的质量对载药量影响最大，其次是 PEG 4000 的质量、胆固醇与磷脂的比例，影响最小的是水相与有机相的比例，最佳处方为 A₃B₂C₃D₃。综合考虑包封率和载药量两个指标，胆固醇与磷脂的比例为 1:2.0 和 1:2.5 时，包封率差别不大，而载药量相差较大，故确定该比例为 1:2.5；PEG 4000 的质量为 4 mg 和 5 mg 时，包封率和载药量相差均较大，由于载药量为本实验主要考察项目，故选取 PEG 4000 的质量为 5 mg；猪苓多糖的质量对载药量的影响很大，而对包封率的影响很小，故只需考虑其对载药量的影响，从而确定猪苓多糖的质量为 70 mg。由此，通过正交设计筛选出猪苓多糖脂质体的最佳处方：A₃B₂C₃D₃，即磷脂与胆固醇的比例为 1:2.5，PEG 4000 质量为 5 mg，水相与有机相的比例为 1:2.5，确定猪苓多糖的质量为 70 mg。

2.7 验证试验：采用正交试验筛选出的最佳处方制备猪苓多糖长循环脂质体 4 批，测定其平均包封率为 98.24%，平均载药量为 27.20%。

3 讨论

脂质体在酸性和碱性环境中包装率均下降，在中性条件下脂质体的稳定性较好^[8]，故本实验选用 pH 7.0 的 PBS 缓冲液。

本实验以猪苓多糖为对照，计算出猪苓多糖与葡萄糖的换算因子，再乘以用苯酚-硫酸法测出的葡萄糖的质量浓度，这样避免了直接用葡萄糖作为对照引起的系统误差。

猪苓多糖为水溶性药物，同时又是生物大分子，因此本实验通过正交设计优化处方，采用逆相蒸发法制备出包封率高、载药量大的大单室脂质体。

猪苓多糖的测定方法一般为分光光度法^[9]。本实验建立紫外分光光度-Sephadex 法测定脂质体的包封率，结果猪苓多糖长循环脂质体包封率高、重现性好。在过 Sephadex 柱时，洗脱速度和上样量均对分离效果产生影响。上样量大时，脂质体有拖尾现象，选取 0.5 mL 可避免拖尾。洗脱速度太快时，凝胶微孔内外的猪苓多糖来不及平衡提前出峰，造成分离不好，洗脱峰变宽，故控制流量不大于 1 mL/min。另外在测定脂质体中猪苓多糖时，采用空白脂质体作空白管可以消除脂质体膜材成分对测定的干扰。

PEG在本处方中起抑晶作用^[10],同时能包裹猪苓多糖脂质体,脂质体膜表面引入聚合物分子而形成空间稳定性的脂质体。PEG-脂质体表面白蛋白浓度高达80.0%,具有高度亲水性,有效的保护脂质体不被肝脾巨噬细胞吞噬,达到长循环的目的。同时,PEG-脂质体表面可形成较厚的立体位阻层,也阻碍了MPS的作用。

References:

- [1] Wang L L, Wu H Y, Luo G F. The pharmacological action and the clinical application of *Polyporus umbellatus* [J]. *China Pharm* (中国药业), 2002, 9(10): 58-59.
- [2] Roux E, Stomp R, Giasson S, et al. Steric stabilization of liposomes by pH-responsive N-isopropylacrylamide copolymer [J]. *J Pharm Sci*, 2002, 91(8): 1795.
- [3] Wang K P, Zhang Y, Zhang J. Preparation of *Polyporus umbellatus* polysaccharides long circulating liposomes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(3): 368-370.
- [4] Zhu C P, Zhang S H. Detection of polysaccharide in *Lycium barbarum* extract [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2005, 31(2): 111-113.
- [5] Li Q, Ping Q N, Wang Q J, et al. Preparation of alprostadil liposomes and its test of irritation [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2004, 23(7): 423-426.
- [6] Cansell M, Parisel C, Jozefonvicz J, et al. Liposomes coated with chemically modified dextran interact with human endothelial cells [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 44(2): 140-148.
- [7] Gao X L, Ji X M. Determining the trap efficiency of liposome using Sephadex column chromatography [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38(7): 515-517.
- [8] Guo H Y, Mo H L. Factors affecting physical stability and envelope rate of liposomes [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2004, 13(6): 498-501.
- [9] Hayakawa E, Nakamura M, Kato Y, et al. Encapsulation of doxorubicin into liposome by a freeze-thawing method using buffer solution [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 39(3): 773-776.
- [10] Yu B T, Zhang Z R, Zeng R J, et al. Preparation of poly(ethylene glycol)-coated baicalin liposome [J]. *Med J Natl Def Forces Southwest China* (西南国防医药), 2005, 15(1): 33-37.

宝泻灵提取物的体外透皮吸收研究

王冬梅¹, 李 静¹, 徐月红², 唐 志¹, 陈 宝², 李 欢¹

• (1. 中山大学药学院天然药物与中药研究所, 广东 广州 510080; 2. 中山大学药学院

药剂学与制药工程实验室, 广东 广州 510080)

摘要:目的 研究不同透皮促进剂对宝泻灵提取物中各指标性成分体外经皮渗透的影响, 筛选出有效的透皮吸收促进剂。方法 采用改良的Franz扩散池, 以离体大鼠皮肤为透皮屏障, 通过体外透皮实验, 用高效液相色谱法测定不同渗透促进剂对提取物中各指标性成分吴茱萸次碱、丁香酚和肉桂醛的累积渗透量、透皮渗透速率等体外透皮吸收动力学参数的影响。结果 低比例氮酮、以及3%氮酮与不同比例丙二醇联合使用时的累积渗透量均有明显提高, 其中以3%氮酮+10%丙二醇作为复合促进剂时的促渗作用最强。结论 通过考察渗透促进剂对宝泻灵提取物各指标性成分的影响, 为研究其透皮给药提供了参考依据。

关键词: 宝泻灵提取物; 吴茱萸次碱; 丁香酚; 肉桂醛; 透皮吸收; 促渗剂

中图分类号: R283.3; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)10-1487-04

In vitro transdermal absorption of Baoxieling extract

WANG Dong-mei¹, LI Jing¹, XU Yue-hong², TANG Zhi¹, CHEN Bao², LI Huan¹

(1. Institute of Natural Product and Traditional Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen

University, Guangzhou 510080, China; 2. Laboratory of Pharmacy and Pharmaceutical Engineering,

School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Key words: Baoxieling extract; rutaecarpin; eugenol; cinnamaldehyde; transdermal absorption; permeation enhancers

宝泻灵作为民间验方, 在治疗小儿腹泻方面有很好的临床疗效, 由吴茱萸、丁香、肉桂等组成。该验方为外用散剂, 用醋调和后贴敷给药。传统用药方式存在着粘着力差、药粉易于散落、药膏易于干涸、用

药量大、质量稳定性差、生物利用度不足等缺点。为了使该验方更好地服务于临床, 笔者拟将其开发成一种新型的透皮制剂。本实验首先对其提取物的透皮吸收特性进行了研究, 以吴茱萸次碱、丁香酚和肉

收稿日期: 2006-12-11

基金项目: 国家中医药管理局中医药留学回国人员科技活动择优资助项目(2003LHR20)

作者简介: 王冬梅(1968—), 女, 内蒙古包头市人, 副教授, 留日博士, 1992—2000年在日本Ochanomizu University留学工作, 2000年至今在中山大学生命科学学院和药学院工作, 研究方向: 天然药物和功能食品的研究, 以及中草药质量标准化研究。

Tel/Fax: (020) 87333159 E-mail: laswdm@mail.sysu.edu.cn