

槲皮素纳米脂质体的处方工艺优化

丁燕飞, 姚 瑶*, 陶昱斐, 冯秀珍

(中南大学药学院, 湖南 长沙 410013)

摘 要:目的 制备槲皮素脂质体,并测定其包封率。方法 采用薄膜蒸发-高压均质法制备槲皮素脂质体,通过正交设计优化处方工艺,以鱼精蛋白沉淀法分离脂质体与游离药物,测定药物的量,并计算包封率。结果 优化的最佳处方工艺:胆固醇与磷脂比为 1:3;药物与载体比为 1:40;103.4 MPa 压力下均质 3 次。最佳条件下制得的脂质体平均包封率达 92.1%。结论 薄膜蒸发-高压均质法适合于制备槲皮素脂质体,鱼精蛋白沉淀法测定包封率操作简单、准确。

关键词:槲皮素;脂质体;薄膜蒸发-高压均质法;鱼精蛋白沉淀法

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)04-0522-03

Optimization of formulation and process for quercetin-loaded nanoliposomes

DING Yan-fei, YAO Yao, TAO Yu-fei, FENG Xiu-zhen

(School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To prepare quercetin liposomes and establish a method for determination of its entrapment efficiency. **Methods** The film dispersion-homogenizing method was used to prepare quercetin liposomes. The formulation was optimized on the basis of orthogonal design and its entrapment efficiency was performed by the protamine sedimentation method. **Results** The optimal conditions were found to be cholesterol-egg phospholipid = 1:3, quercetin-vehicle = 1:40, homogenization pressure 103.4 MPa for three times. The average entrapment efficiency of the optimized nano-liposomes was 92.1%. **Conclusion** The film dispersion-homogenizing method could be used to prepare quercetin liposomes. The protamine sedimentation method is convenient, accurate, and suitable for the determination of the entrapment efficiency of quercetin liposomes.

Key words: quercetin; liposomes; film dispersion-homogenizing method; protamine sedimentation method

槲皮素化学名为 3,3',4',5,7-五羟基黄酮,广泛分布于多种植物花、果实、叶中,具有抗病毒、抗炎、抗氧化、抗癌等药理作用。目前有文献报道槲皮素应用于肝癌治疗^[1]。由于槲皮素难溶于水,药物溶出、吸收受限,故生物利用度较低^[2]。如何增加药物的吸收同时达到肝靶向作用是开发该药物抗肝癌作用新剂型的关键。将具有生物相容性好的脂质体作为难溶性药物的载体,且应用于肝靶向给药为药剂领域研究热点。本实验旨在制备槲皮素纳米脂质体,对其处方工艺进行优化,为其抗肝癌的剂型研究提供参考。

1 仪器与试剂

RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);EmulsiFlex-C3 高压均质机、LiposoFast-Basic 挤出器(加拿大 Avestin 公司);LC-2010A 型高

效液相色谱仪(日本岛津);90Plus 激光粒径测定仪(美国 Brook-Heaven)。

槲皮素原料(质量分数为 89.5%,湖南九汇现代中药有限公司),槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所提供,质量分数 97.3%,批号 100081-200406),卵磷脂(上海太伟药业有限公司),胆固醇(天津市博迪化工有限公司),鱼精蛋白(Sigma)。

2 方法与结果

2.1 槲皮素脂质体的制备:采用薄膜蒸发-高压均质法^[3]。精确称取处方量磷脂、胆固醇、槲皮素及稳定剂共溶于适量无水乙醇中,所得溶液置茄形烧瓶中,37℃水浴减压旋转蒸发除去无水乙醇,在茄形烧瓶壁上形成均匀透明的薄膜后,加入 5%葡萄糖溶液适量,继续旋转 45 min,使薄膜溶胀水合完全,得淡黄色混悬液后,调整均质机压力至 103.4 MPa

收稿日期:2007-06-16

作者简介:丁燕飞(1974—),湖南常德人,讲师,硕士,主要研究方向为药物制剂与新剂型研究。E-mail: dingyanfei001@163.com

* 通讯作者 姚 瑶 Tel: (0731)2650367 E-mail: yaoyaocs@tom.com

后,均质数次,0.2 μm 微孔滤膜挤出,即得槲皮素纳米脂质体。

2.2 包封率的测定

2.2.1 色谱条件:色谱柱为大连依利特分析仪器有限公司 Hypersil ODS2(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.4%磷酸(55:45);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;体积流量:1.0 mL/min;检测波长:360 nm;进样体积:20 μL 。该色谱条件下辅料对槲皮素测定无干扰。

2.2.2 标准曲线的建立:以甲醇准确配制质量浓度为0.4 mg/mL 槲皮素对照品贮备液,置4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存。流动相稀释后得质量浓度为5.0、10、20、30、40、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 系列对照品溶液,精密吸取20 μL ,HPLC 进样记录色谱图。以峰面积对质量浓度进行线性回归,得回归方程: $A=25.37 C-8.95$, $r=0.9996$ 。表明槲皮素在5.0~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.2.3 回收率及精密度试验:精密吸取0.4 mL 空白脂质体混悬液(相当于含槲皮素2 mg的含药脂质体的体积),置于10 mL 量瓶中,分别精密量取槲皮素对照品贮备液1.0、1.5、2.0 mL,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;再分别精密量取该破乳脂质体溶液2.0 mL 置10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成质量浓度为18~50 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,分别进样20 μL ,测定峰面积,连续5次,代入回归方程计算回收率,3种质量浓度回收率分别为101.2%、100.3%、99.8%。

取质量浓度为5、10、30 $\mu\text{g/mL}$ 槲皮素对照品溶液20 μL 进样,1日测定5次,连续测定5日,测得日内和日间RSD均小于2%。

2.2.4 药物的测定:精密吸取槲皮素脂质体0.4 mL(相当于槲皮素2 mg),置于10 mL 量瓶中,加入甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取2.0 mL 置10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀即得样品溶液,进样,计算脂质体中药物的量。3批按最佳处方工艺制备槲皮素脂质体混悬液中槲皮素的相对标示量分别为99.6%、100.4%、101.2%。

2.2.5 包封率的测定:采用鱼精蛋白沉淀法^[4]。精密吸取槲皮素脂质体混悬液0.1 mL 于1.5 mL 塑料离心管中,加10 mg/mL 鱼精蛋白溶液0.1 mL,漩涡震荡使混合均匀,静置3 min,加水1 mL 混匀,室温下10 000 r/min 离心5 min,吸取上清液适量稀释后,进样,代入回归方程计算得样品中游离槲皮素的量,再计算槲皮素脂质体的包封率[包封率=(脂质体混悬液中药物的总质量-脂质体混悬液中

游离药物的质量)/脂质体混悬液中药物的总质量 $\times$ 100%]。

2.3 处方工艺的优化:参考文献报道^[5]及单因素试验考察结果,选择制备槲皮素脂质体的关键性影响因素胆固醇与磷脂比(A)、药物与载体量比(B)、均质次数(C)为考察对象,每1个因素各取3个水平,见表1。选用 $L_9(3^4)$ 正交试验表,安排试验;以所得脂质体包封率为考察指标,优化处方工艺,结果见表2。对正交试验结果进行方差分析,结果见表3。

表1 因素与水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A/(mg $\cdot$ mg $^{-1}$)	B/(mg $\cdot$ mg $^{-1}$)	C/次
1	1:1	1:80	3
2	1:2	1:60	6
3	1:3	1:40	9

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	57.0
2	1	2	2	2	49.3
3	1	3	3	3	79.0
4	2	1	2	3	52.9
5	2	2	3	1	76.2
6	2	3	1	2	90.0
7	3	1	3	2	70.0
8	3	2	1	3	83.6
9	3	3	2	1	81.3
I	185.3	179.9	230.6	214.5	
II	219.1	209.1	183.5	209.3	
III	234.9	250.3	225.2	215.5	
极差	49.6	70.4	47.1	6.2	

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

误差来源	离均差平方和	自由度	方差	F值	显著性
A	428.03	2	214.01	57.95	$P<0.05$
B	834.03	2	417.01	112.91	$P<0.01$
C	442.94	2	221.47	59.96	$P<0.05$
误差(D)	7.39	2	3.69		

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

由极差和方差分析结果可知:所设计的各因素对包封率的影响显著,其中对槲皮素脂质体包封率影响最大的因素是药物与载体量的比例,其次是胆固醇与磷脂的比例,影响最小的因素是均质次数。最佳处方工艺是 $A_3B_3C_1$,即胆固醇与磷脂比为1:3,药物与载体量比为1:40,103.4 MPa 压力条件下均质次数为3次。

2.4 最佳处方工艺的验证:按正交设计所筛选的最佳处方工艺,制备槲皮素纳米脂质体,并对其包封率

和粒径进行测定。测定最佳处方工艺制得的3个批号槲皮素脂质体的包封率分别为91.4%、92.2%、92.8%。以5%葡萄糖水稀释所制得的槲皮素脂质体样品,采用90 Plus激光散射粒径测定仪测定其粒径及分布,结果见图1。可见有效粒径为98.0 nm,多分散系数为0.141,表明所制得脂质体粒径较小且分布均匀。

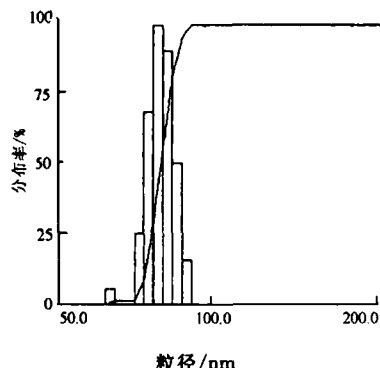


图1 槲皮素脂质体粒径及其分布
Fig. 1 Particle size and distribution of quercetin liposomes

3 讨论

3.1 槲皮素脂质体制备方法选择:由于槲皮素难溶于水,易溶于乙醇,因此选择乙醇为溶剂溶解药物。实验中曾采用乙醇注入法制备槲皮素脂质体,可能是由于乙醇在注入时向水中快速扩散,导致药物不易被脂质包裹,使药物呈结晶状态从水相析出。以薄膜蒸发-高压均质的方法,可获得粒径小且包封率高的槲皮素脂质体。为了增加槲皮素脂质体的稳定性,可进一步将其脂质体混悬液冷冻干燥或喷雾干燥,

以固态形式保存。

3.2 处方工艺研究:槲皮素脂质体包封率随着所设计的药物与载体量的比例升高而增加,但再经单因素试验时发现,进一步增加药物量时,显微镜观察脂质体中有药物结晶析出,说明载药量已达饱和;均质次数对槲皮素脂质体混悬液包封率有影响,可能是由于高压均质过程中脂质体发生了泄漏;采用最佳处方工艺制得的槲皮素脂质体包封率高,且粒径分布均匀。

3.3 包封率测定方法选择:脂质体包封率的测定方法通常采用葡聚糖凝胶柱色谱法、透析法和超速离心法。葡聚糖凝胶柱色谱法中游离槲皮素的洗脱曲线与脂质体分离较差,且色谱柱容易堵塞;选用透析法时,透析时间较长;而超速离心法要求较高离心速度才能将脂质体和游离药物分离。本实验中采用鱼精蛋白沉淀法,可降低游离药物与脂质体的离心分离速度,且避免了超速离心对脂质体的破坏;该法简便、易行,可应用于槲皮素脂质体的质量评价。

参考文献:

- [1] 许进军,何东初. 槲皮素研究进展[J]. 实用预防医学, 2006, 13(4): 1095-1097.
- [2] 王成永,王姝婧. 槲皮素纳米球的制剂学研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(14): 1087-1089.
- [3] Immordino M L, Brusa P, Arpicco S, et al. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel [J]. *J Control Release*, 2003, 91(3): 417-429.
- [4] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京:中国医药科技出版社, 1998.
- [5] 吴 骏,朱家璧. 阿昔洛韦脂质体的制备和稳定性的初步考察[J]. 药学报, 2003, 38(7): 552-554.

三黄泻心汤 HPLC 指纹图谱研究

耿慧春,辛 颖,艾凤伟,马英丽*

(黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:目的 建立三黄泻心汤的 HPLC 指纹图谱分析方法,为研究三黄泻心汤的药效物质基础和不同配伍的有效成分变化提供可行手段。方法 采用 HPLC 法建立指纹图谱,选用 Shimadzu ODS 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1%磷酸水溶液(含 0.01 mol/L 磷酸二氢钾, pH 2.8)梯度洗脱,体积流量为 1.0 mL/min,检测波长 260 nm。通过对全方与各组成药味的阳性和阴性对照组指纹图谱中各峰相对保留时间的比较分析,进行主要色谱峰的组成药味归属;利用色谱峰保留时间的对比及向全方样品中加入对照品的方法,鉴定相关色谱峰。结果 建立了三黄泻心汤的 HPLC 指纹图谱,10 批样品相似度均大于 0.92,以黄芩苷为参照峰,标示出 32 个共有峰,确认了其中 11 个活性成分峰,并说明了其药材归属。结论 该实验方法简便、准确,重复性好,具有良好的精密度和

收稿日期:2007-06-05

基金项目:黑龙江省博士创新基金项目资助项目[2007]

作者简介:耿慧春,女,博士研究生,研究方向为中药复方药效物质基础及质量标准化。

* 通讯作者 马英丽 Tel:(0451)82196178 E-mail: mylt666@sina.com