

表4 最佳工艺的验证

Table 4 Results of optimum technology

批 次	药材中总黄酮 / %	药材中阿曼 托双黄酮/ %	提取物中总 黄酮/ %	总黄酮的提 取量/ mg	提取物中阿曼 托双黄酮/ %	阿曼托双黄酮的 提取量/ mg
20061010	4.90	1.58	24.00	843.92	11.20	298.25
20061207	5.54	1.64	23.54	800.14	12.94	335.42
20070120	4.39	1.60	21.39	791.74	10.28	291.68
20070506	6.15	1.52	25.15	921.15	13.26	343.79
20070823	4.76	1.49	21.76	709.21	8.87	286.30
20071102	5.37	1.55	22.37	832.17	9.49	288.56

酮和阿曼托双黄酮的质量分数均较高。提取物中总黄酮和阿曼托双黄酮的提取量均高于其他各正交试验值,故本最佳工艺条件合理,同时也表明此工艺具有较好的稳定性。

3 讨论

在制备样品溶液时,比较水煮、超声、回流等不同提取方法,发现回流提取方法得到的总黄酮量较高,故采用回流提取的方法对样品进行处理。

本实验采用紫外分光光度法测定总黄酮与高效液相色谱法测定指标性成分阿曼托双黄酮相结合,增加了因素选择的准确性和可靠性。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 毕跃峰,郑晓珂,冯卫生,等.卷柏属植物化学成分与药理活性[J].国外医药:植物药分册,2002,17(3):97-100.
- [3] 毕跃峰,郑晓珂,冯卫生.卷柏中化学成分的分离与结构鉴定[J].药学学报,2004,39(1):41-45.
- [4] 郑晓珂,毕跃峰,冯卫生,等.卷柏中化学成分[J].药学学报,2004,39(4):266-268.
- [5] Millard D R. The island flap in cleft palates surgery [J]. Surg Gynaecol Obstet,1993,116.
- [6] 熊国强,雷荣昌.析因设计在腮裂修复动物实验中的应用[J].中国现代医学杂志,2002,12(16):18-20.
- [7] 徐智,贾素洁,谭桂山,等.垫状卷柏中双黄酮药理活性的研究[J].中国现代医学杂志,2004,14(14):88-100.

正交试验优选石杉碱甲脂质体的制备研究

张彦青^{1,2},解军波³,陈文倩^{1,2},邓晨辉^{1,2},酒向飞^{1,2},周田彦^{1,2},卢炜^{1,2,*}

(1. 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室,北京 100083; 2. 北京大学药学院药剂系,北京 100083; 3. 天津商业大学制药工程系,天津 300134)

摘要:目的 优化石杉碱甲脂质体的制备工艺和处方。方法 采用薄膜分散结合硫酸铵梯度法制备石杉碱甲脂质体,以包封率为评价指标采用正交试验优化石杉碱甲脂质体的最优处方和工艺条件。结果 石杉碱甲脂质体的最优处方工艺条件为:孵化温度为 60℃,药脂比为 1:40,孵化时间为 30 min。所得脂质体的包封率为 87.02%以上。结论 由最佳处方工艺条件制备的石杉碱甲脂质体包封率较高,包封率和体外释放稳定,重现性好。

关键词:石杉碱甲脂质体;制备;正交试验;高效液相色谱

中图分类号:R284.2;R286.06

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2009)06-0896-03

石杉碱甲是从蛇足石杉中分离得到的一种新型石松类生物碱有效单体,是我国首创的强效可逆性乙酰胆碱酯酶抑制剂,通过抑制脑内乙酰胆碱酯酶活性,提高脑内乙酰胆碱水平而发挥作用,是目前治疗老年痴呆最有效的药物之一^[1,2]。现有石杉碱甲制剂缺乏脑选择性,由于抑制外周胆碱酯酶活性导致用药者产生较大不良反应,如肌肉震颤,呼吸抑制

等。研究新型石杉碱甲制剂以提高其脑内浓度增强治疗效果并降低不良反应,对临床治疗老年痴呆将有重要意义。本实验研究制备石杉碱甲脂质体以增加石杉碱甲脑内浓度,增强治疗效果并降低外周不良反应。

1 材料和仪器

石杉碱甲(上海同田生化有限公司,质量分数为

* 收稿日期:2008-10-20

作者简介:张彦青,女,山东汶上人,讲师,北京大学药学院药剂学博士,研究方向:药物新剂型与药物动力学药效动力学研究。

Tel:13752524378 E-mail:zhyanqing@yahoo.com.cn

*通讯作者 卢炜 E-mail:luwei_pk@bjmu.edu.cn

99 %) ;曲拉通 (Amresco 0694) ;氯仿 (AR,天津市福晨化学试剂厂) ;Epikuron 200 大豆卵磷脂 (degussa,批号:1-5-3027) ;胆固醇 (cholesterol, Sigma C8667) ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (AR,天津市德恩化学试剂有限公司) ; NaH_2PO_4 (AR,天津市北方天医化学试剂厂) ; Na_2HPO_4 (AR,天津市北方天医化学试剂厂) ,葡聚糖凝胶 G50 (Pharmacia,批号 17-0042-01)

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪、DAD 紫外检测器、色谱工作站 (美国 Agilent) ;BP211D 型万分之一电子天平;AS10200A 型超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 石杉碱甲测定方法的建立

2.1.1 色谱条件:Waters ODS C_8 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm) ;流动相:甲醇-0.1 %磷酸溶液 (85 : 15) ;检测波长:312 nm ;体积流量:0.8 mL/min ;进样量:20 μL 。

2.1.2 贮备液的制备:精密称取石杉碱甲对照品 16.0 mg,置于 100 mL 量瓶中,用蒸馏水加适量氢氧化钠溶解,并稀释至刻度,于 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

2.1.3 标准曲线的制备:分别精密量取石杉碱甲对照品贮备液 0.125、0.250、0.375、0.500、0.625 mL 置于 10 mL 量瓶中,蒸馏水定容,进样,记录石杉碱甲峰面积。以质量浓度对峰面积进行线性回归,重复操作 5 次,得标准曲线方程 $C = 0.0022A - 0.0191$ ($r = 0.9999$) ,结果表明石杉碱甲在 2~10 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.1.4 精密度试验:分别于 0、2、5、8、12 h 连续测定含石杉碱甲 2、6、10 $\mu\text{g/mL}$ 脂质体的峰面积,计算 RSD 为 1.17 % ;连续 5 d 配制溶液并测定峰面积,计算 RSD 为 1.13 %。

2.1.5 回收率试验:精密量取 160 $\mu\text{g/mL}$ 石杉碱甲溶液 0.125、0.375、0.625 mL,各 5 份,分别置于 10 mL 量瓶中,用空白脂质体的曲拉通破膜溶液定容至刻度,摇匀,20 μL 进样记录峰面积,根据标准曲线方程计算石杉碱甲质量浓度,求得平均回收率为 102.42 %,RSD 为 1.47 %。

2.2 脂质体包封率的测定:精密量取脂质体混悬液 0.5 mL,加于 Sephadex G50 凝胶顶部,以 PBS 洗脱,流速为 0.5 mL/min,将石杉碱甲脂质体与未包封的石杉碱甲分离,分别收集石杉碱甲脂质体和游离石杉碱甲的洗脱液。将脂质体洗脱液及脂质体混悬液加 0.2 mL 10 %曲拉通破坏并定容于 50 mL 量瓶中,采用高效液相色谱法测定石杉碱甲峰面积,并

计算包封率 [包封率 $Q_w = (W_{\text{包}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{包}} \times 100 \%$]。

2.3 硫酸铵梯度法制备石杉碱甲脂质体的制备工艺

2.3.1 空白脂质体的制备:精密称取处方量的卵磷脂、胆固醇置 100 mL 茄形瓶中,加入 50 mL 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,于 40 $^\circ\text{C}$ 减压旋转蒸发使形成一层均匀的透明薄膜,再多蒸发 30 min 左右使溶剂完全挥发。精密吸取 50 mL 硫酸铵溶液 (180 mmol/L) 加入到茄形瓶中。涡旋震荡使脂膜完全脱落,室温下超声水化分散,将其倒入透析袋中,夹好,放入装有 500 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液的烧杯中透析。每 12 h 换一次透析液,共透析 4 次,即得有淡蓝色乳光的空白脂质体混悬液。4 $^\circ\text{C}$ 下保存,备用。

2.3.2 载药脂质体制备:利用脂质体跨膜硫酸铵梯度法进行药物遥控装载 (remote loading) ,将空白脂质体预热至孵化温度,而后将制备好的石杉碱甲溶液加入其中,并震荡。按所需温度和时间孵育,即得石杉碱甲脂质体。

2.3.3 正交设计优化石杉碱甲脂质体的制备工艺参数:预试验和单因素考察确定了药脂比 (A)、孵育温度 (B) 和孵育时间 (C) 为影响石杉碱甲脂质体包封率的主要因素,每个因素选择 3 个水平,在此基础上用 $L_9(3^4)$ 正交试验进一步筛选处方。正交试验的结果见表 1。

表 1 正交试验设计的方案与结果 ($n = 3$)

试验号	A 温度/ $^\circ\text{C}$	B 药脂比	C 时间/ min	包封率/ %
1	40	1 : 20	10	53.16
2	40	1 : 30	20	60.33
3	40	1 : 40	30	63.93
4	50	1 : 20	20	66.09
5	50	1 : 30	30	68.28
6	50	1 : 40	10	72.08
7	60	1 : 20	30	61.66
8	60	1 : 30	10	65.05
9	60	1 : 40	20	65.33
I	177.42	180.91	190.29	
II	206.45	193.66	191.75	
III	192.04	201.34	193.87	
极差	29.03	20.43	3.58	

以制备所得的石杉碱甲脂质体包封率为评价指标对包封率结果进行直观分析,考察各因素对测定指标的影响程度。数值越高说明因素的水平数越佳。由表 1 可见,各因素对石杉碱甲脂质体包封率的影响次序为孵化温度 > 药脂比 > 孵化时间,各因

素最优水平组合为 $A_2B_3C_3$, 即孵化温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 药脂比为 $1:40$, 孵化时间为 30 min 时所制得石杉碱甲脂质体的包封率最高。

2.4 最优制备工艺的验证: 按正交试验优化处方制备 3 批石杉碱甲脂质体, 并且对包封率进行测定, 包封率测定结果为 87.02% 、 89.00% 、 88.60% , 结果表明 3 批石杉碱甲脂质体的包封率无显著性差异, 制备工艺重现性良好。

3 讨论

葡聚糖凝胶柱色谱法测定脂质体包封率具有方法简便、准确的特点, 能使混合物依据分子大小不同而分离。在柱色谱过程中, 洗脱液的流速及上样量的多少均对脂质体中分离游离药物有影响, 因此宜选择能使脂质体达到最大分离程度的洗脱条件, 才能保证测得准确的包封率。若上样量大, 脂质体有拖尾现象; 洗脱速度对分离效果可产生很大影响, 洗脱速度快, 凝胶微孔内外的游离药物来不及平衡, 提

前出峰, 分离不好。本实验通过研究发现脂质体上样量为 0.5 mL , 控制流速在 0.5 mL/min 以内时, 可避免拖尾现象, 达到良好分离。

硫酸铵梯度法是脂质体制备方法中主动载药方法-pH 梯度法的一种, 主要是依靠内、外水相硫酸铵梯度产生的较高驱动力来进行载药。石杉碱甲为弱碱性生物碱类药物, 能与脂质体双分子层内的硫酸根离子结合生成溶解度小的硫酸盐, 药物与硫酸根形成难溶性盐后, 不易透过双分子层, 从而减少了药物的泄漏。采用硫酸铵梯度法制备石杉碱甲脂质体可以达到良好的包封率, 解决了被动载药法包封率低的问题。

参考文献:

- [1] 张磊, 万谦宏, 高文远. 石杉碱甲的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1422-1426.
- [2] 洪思佳, 王一涛, 李铭源. 石杉碱甲药理与临床研究进展 [J]. 中药药理与药理, 2007, 27(1): 83-86.

反相制备色谱法从朱砂根中分离朱砂根皂苷

甄 铎*

(四川农业大学, 四川 都江堰 611830)

摘要:目的 研究了 C-18 制备色谱柱从朱砂根中分离朱砂根皂苷的方法。方法 用 B $\ddot{U}$ CHI 制备色谱系统, 以甲醇-水为流动相进行梯度洗脱, 用反相高效液相色谱监控分离过程。结果 朱砂根皂苷的得率为 5.9% , 相对纯度 95.4% 。结论 该法简便, 耗时短, 效率高, 分离效果好, 可连续进样制备, 该法作为制备朱砂根皂苷对照品有较好的参考价值。

关键词: 朱砂根; 朱砂根皂苷; 反相制备色谱; 高效液相色谱。

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0898-03

朱砂根皂苷 (cyclamiretin A-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)] [β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)]- α -L-arabinopyranoside; ardicrenin^[1,2]) 是朱砂根 *Ardisia crenata* Sims 中所含三萜皂苷之一, 结构见图 1。朱砂根皂苷具有明显抑制癌细胞增殖和直接杀伤癌细胞^[3~5] 以及抗 HIV 活性^[6] 等作用。目前, 关于从朱砂根中提取、纯化三萜皂苷研究有报道^[7], 但用 C-18 制备柱纯化朱砂根皂苷未见报道。本实验采用 C-18 制备柱对朱砂根皂苷进行了分离, 采用反相高效液相色谱

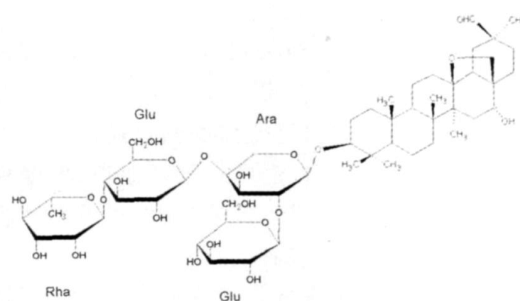


图 1 朱砂根皂苷的化学结构式

Fig 1 Chemical structures of ardicrenin

* 收稿日期: 2008-09-18

基金项目: 四川省教育厅攻关项目 (2006A016); 四川农业大学分校科技基金资助项目 (N-200802)

作者简介: 甄 铎 (1963—), 男, 副教授, 研究方向: 天然药用植物分析、提取和分离。

Tel: (028) 87122847 Fax: (028) 87133300 E-mail: zhenhua@scfc.edu