

制备的中药缓释制剂的优劣,达到了预期目的。因此,在目前条件下,采用色谱指纹图谱来考察中药缓释制剂多组分的体外释放行为,评价中药缓释制剂的质量,具有较强的科学性、代表性、可行性和适用性,值得进一步研究推广。

参考文献:

- [1] 张伟,宋洪涛,张倩. 中药口服缓释制剂的研究进展[J]. 中国药房,2009,20(6):472-474.
- [2] 张伟,宋洪涛,林方清. 雷公藤胃漂浮缓释片的制备与质量评价[J]. 中草药,2009,40(2):210-214.
- [3] 李丹,宋洪涛,初阳,等. 采用多元定时释药技术制备复方丹参缓释胶囊的研究[J]. 中草药,2009,40(4):544-548.
- [4] 李俊松,冯怡,徐德生,等. 白芍总苷缓释微丸体外释放评价方法的研究[J]. 中成药,2008,30(3):357-361.
- [5] 周雯,李红茹,李淑芬,等. 雷公藤超临界CO₂提取物的HPLC指纹图谱建立[J]. 中国中药杂志,2007,32(8):706-708.
- [6] 杨春欣,梁健,沈熊,等. 雷公藤多苷片高效液相指纹图谱的研究[A]. 中国中西医结合学会. 第五届全国雷公藤学术会议论文集汇编[C]. 福建泰宁,2008.
- [7] 李克,王曙东,陈爽. 雷公藤叶提取物高效液相色谱指纹图谱的研究[J]. 中草药,2006,37(11):1671-1673.

甘草次酸脂质体的制备及其药剂学性质的研究

郭波红^{1,2},程怡^{1*},林绿萍¹

(1. 广州中医药大学中药学院,广东广州 510006; 2. 广东药学院药剂教研室,广东广州 510006)

摘要:目的 研究甘草次酸阳离子脂质体的制备方法并考察其药剂学性质。方法 采用正交设计筛选处方,乙醇注入法制备甘草次酸脂质体;用葡聚糖凝胶 G-50 柱分离脂质体和游离药物,用 HPLC 法测定包封率;用透射电镜观察脂质体的外观形态,并用粒径分析仪测定脂质体的粒径和 zeta 电位;进一步考察脂质体的释放规律。结果 所得脂质体包封率为(91.61 ± 1.16)%;形态为粒径均匀的球形和类球形,粒径为(141 ± 10) nm, Zeta 电位为(35.9 ± 5) mV;脂质体的体外释放符合 Higuchi 方程;具有较好的稳定性。结论 优选得到的甘草次酸脂质体处方和制备工艺合理、稳定,其体外释放具有缓释特点。

关键词:甘草次酸脂质体;包封率;体外释放

中图分类号:R284.2;R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)03-0380-04

Preparation and pharmaceutical characterization of glycyrrhetic acid liposomes

GUO Bo-hong^{1,2}, CHENG Yi¹, LIN Lǜping¹

(1. Department of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2 Department of Pharmacy, Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510006, China)

Abstract : Objective To prepare and characterize glycyrrhetic acid cationic liposomes. **Methods** Liposomes were prepared by ethanol injection technique. An orthogonal test was utilized to optimize the formulation and preparation of glycyrrhetic acid liposomes. The unencapsulated glycyrrhetic acid and liposomes were separated by Sephadex gel G-50, the encapsulation efficiency was detected by HPLC. The morphological examination of glycyrrhetic acid liposomes was performed using transmission electron microscopy. The particle size and Zeta potential of the liposomes were measured. The release rate of glycyrrhetic acid from liposomes was tested. **Results** The liposomes with spherical or ellipsoidal shape and better stability featured the encapsulation efficiency of (91.61 ± 1.16)%, the mean partical size of (141 ± 10) nm, and Zeta potential of (35.9 ± 5) mV. The *in vitro* release kinetics were consistent with Higuchi equation. The stability of glycyrrhetic acid liposomes was better. **Conclusion** The selected formulation and preparation technic of glycyrrhetic acid liposomes could be rational, stable, and with a sustained feature *in vitro* release.

Key words : glycyrrhetic acid liposome; encapsulation efficiency; *in vitro* release

收稿日期:2009-08-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772790);高等学校博士学科点专项科研基金(20060572012)

作者简介:郭波红(1976—),女,湖南人,2007级在读博士研究生,讲师,主要从事药物新剂型的研究。

Tel:(020)39352117 E-mail:bohong-g@163.com

*通讯作者 程怡 E-mail:ncchengyi@21cn.com

甘草次酸为甘草的主要有效成分,主要从甘草的根部或根茎提取而得,属五环三萜皂苷类化合物。甘草次酸具有明显的抗炎、抗病毒、抗肿瘤和防癌作用,临床上常用来治疗慢性肝炎及肝癌^[1,2]。由于甘草次酸难溶于水,口服几乎不吸收,普通注射剂的生物利用度低,脂质体可以增加难溶性药物的水溶性,改变被包封药物的体内分布使其具有一定的靶向性^[3,4]。笔者对甘草次酸脂质体的制备及性质进行了研究。

1 仪器与材料

Zetasizer 激光粒度测定仪(英国 Malvern 公司);90—1 型恒温磁力搅拌器(上海沪西分析仪器厂);Dionex 高效液相色谱仪(P680 型泵,PDA—100 型检测器,ASI—100 自动进样器,美国戴安公司);Spectrum 透析袋($MW 1.2 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^4$,上海百赛生物技术有限公司);JEM—1400 高衬度透射电子显微镜(日本电子公司),Sartorius BS110S 电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

18-甘草次酸(质量分数 98%,甘肃兰特植物化学有限公司);甘草次酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 723-9203);注射用蛋黄卵磷脂(德国 lipoid 公司);胆固醇(天津市博迪化工有限公司);十八胺(Sigma 公司);Sephadex G50(瑞典 Pharmacia 公司);甲醇为色谱纯,其他药品、试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 处方设计与优化选择:以单因素考察的预试验结果为基础,在制备甘草次酸脂质体中,选择磷脂与胆固醇的质量比(A)、磷脂与药物的质量比(B)、磷脂与十八胺的质量比(C)3个主要因素为变量,每个因素又设定3个水平,进行正交试验设计,以包封率为考察指标来筛选处方。正交试验因素水平设计见表1,试验结果见表2、3。

表 1 因素和水平

Table 1 Factors and levels

水平	因素		
	A	B	C
1	3 1	10 1	30 1
2	2 1	6 1	20 1
3	1 1	2 1	10 1

可知,包封率的影响因素大小为 $A > B > C > D$,最优组合为 $A_1B_2C_2D_2$,即磷脂与胆固醇的质量比为 3 1,磷脂与药物质量比为 6 1,磷脂与十八胺质量比为 20 1。

2.2 脂质体的制备:采用乙醇注入法制备甘草次酸脂质体。定量称取磷脂、胆固醇、甘草次酸及十八胺

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

编号	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	72.5
2	1	2	2	2	86.3
3	1	3	3	3	77.2
4	2	1	2	3	55.4
5	2	2	3	1	62.8
6	2	3	1	2	60.6
7	3	1	3	2	38.7
8	3	2	1	3	49.3
9	3	3	2	1	48.1
k_1	78.667	55.533	60.800	61.133	
k_2	59.600	66.133	63.267	61.867	
k_3	45.367	61.967	59.567	60.633	
R	33.300	10.600	3.700	1.234	

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	1 675.016	2	837.51	725.43	$P < 0.01$
B	171.109	2	85.55	74.11	$P < 0.05$
C	21.296	2	10.65	9.22	
D(误差)	2.309	2	1.15	1.00	

溶于适量的无水乙醇中,所得类脂溶液缓慢匀速地注入到恒温 55 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液中,注入过程中通入 N_2 除去乙醇。注入完毕后,45 孵育 20 min,依次经 0.8、0.45、0.2 μm 微孔滤膜,即得甘草次酸脂质体。

2.3 脂质体中药物的测定

2.3.1 色谱条件:Luna C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , Phenomenex);流动相甲醇-水-冰醋酸(89 10 1)^[4],体积流量:1.0 mL/min,检测波长:250 nm,柱温:30,进样量:20 μL 。

2.3.2 专属性试验:分别取处方量配比的空白脂质体、甘草次酸对照品和甘草次酸脂质体,用适量甲醇溶解后按上述色谱条件进样测定,见图 1。结果表明,脂质体辅料对甘草次酸测定无干扰。

2.3.3 标准曲线的绘制:精密称定甘草次酸对照品 10.1 mg 于 100 mL 量瓶中,甲醇溶解定容至刻度,得甘草次酸储备液。精密吸取上述贮备液 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、40.0 mL 分别于 50 mL 量瓶中,甲醇定容,得 1.01、2.02、10.10、20.20、40.40、80.80 mg/L 的溶液。取不同质量浓度溶液分别进样,记录峰面积。以峰面积对质量浓度回归。结果甘草次酸在 1.01 ~ 80.80 mg/L 呈良好线性关系。回归方程为 $A = 0.9256C - 0.989$, $r = 0.9996$ 。

2.3.4 精密度试验:按处方配比制备空白脂质体,

加入含处方量药物溶液的容量瓶中,以无水甲醇破乳,并稀释定容,使药物质量浓度分别为 1.01、10.20、80.80 mg/L,按上述色谱条件进样测定峰面

积并计算回收率。同法制备上述溶液,于日内及日间测定峰面积并计算药物质量浓度,考察方法的精密密度,均符合要求。

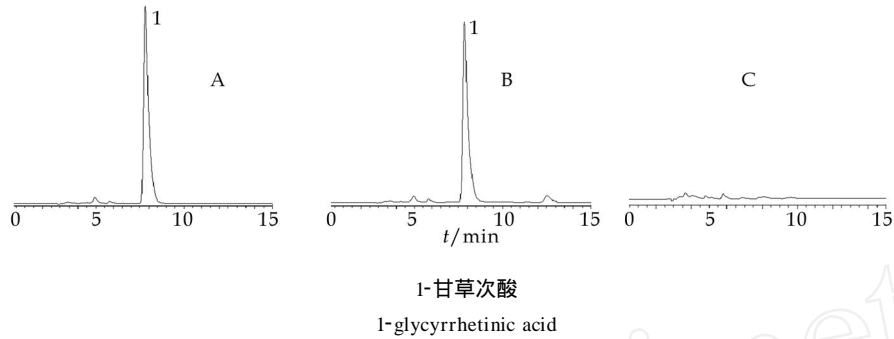


图 1 甘草次酸对照品(A)、甘草次酸脂质体(B)和空白脂质体(C)的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of glycyrrhetic acid reference substance (A), glycyrrhetic acid liposomes (B), and negative sample (C)

2.3.5 药物的测定:精密吸取脂质体样品 0.2 mL,置于 10 mL 量瓶中,甲醇定容,微孔滤膜过滤后取 20 μL 进样测定,即可计算脂质体中药物的质量浓度。测得脂质体中甘草次酸质量浓度为 (4.75 ± 0.23) mg/L (n=3)。

2.4 包封率的测定:精密量取甘草次酸脂质体 0.2 mL,加样于 Sephadex G-50 柱,以注射用水为洗脱液分离游离药物。弃去前 25 mL 洗脱液,收集游离药物部分 50 mL,蒸干,残渣用流动相溶解定容至 10 mL,微孔滤膜过滤后取 20 μL 进样测定,代入回归方程计算 W_{游离}。另取 0.2 mL 置 10 mL 量瓶中,加入适量甲醇充分振摇破乳,用流动相定容,微孔滤膜过滤后取 20 μL 进样测定,代入标准曲线计算 W_总,计算脂质体的包封率。

$$\text{包封率} = (1 - W_{\text{游离}} / W_{\text{总}}) \times 100\%$$

W_总:总药物量, W_{游离}:游离药物量

按正交试验最优处方制备 3 批脂质体,测定其包封率分别为 90.62%、91.31%、92.89%,平均包封率为 91.61%。

2.5 粒径和 Zeta 电位的测定:甘草次酸脂质体混悬液经适当稀释,用激光粒径分析仪分别测定脂质体的平均粒径和 Zeta 电位。结果脂质体平均粒径为 (141 ± 10) nm。制备的脂质体表面带正电, Zeta 电位为 (35.9 ± 5) mV。

2.6 电镜下形态观察:甘草次酸脂质体混悬液适当稀释后,用质量分数为 1% 的磷钨酸负染,于透射电镜下观察形态,见图 2。可见脂质体外观圆整,多为球形及类球形粒子,大小较均一。

2.7 体外释放度测定:精密移取甘草次酸原料药液、甘草次酸脂质体混悬液各 3.0 mL 分别装于透

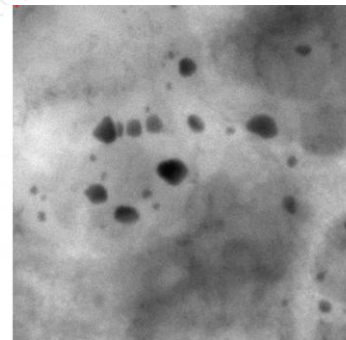


图 2 甘草次酸脂质体透射电镜照片

Fig. 2 Transmission electron microscope photo of glycyrrhetic acid liposomes

析袋内,两端扎牢,绑于溶出仪的搅拌浆上。按照《中国药典》2005 年版规定的第三法测定释放度。释放条件:pH 9.0 的硼酸盐溶液 500 mL (脱气), (37 ± 0.5) °C, 100 r/min。定时取样 3 mL,并及时补充等温的同体积空白介质。微孔滤膜过滤后进样测定峰面积。计算样品各时间点累积释放量,并对时间作图,结果见图 3。

脂质体中药物的释放有明显的缓释效果。脂质

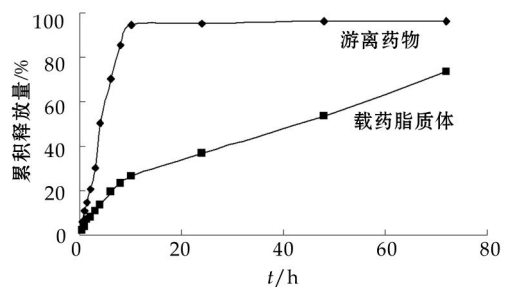


图 3 甘草次酸脂质体及游离药物累积释放结果

Fig. 3 Cumulative release of glycyrrhetic acid liposomes and free glycyrrhetic acid

体制剂在前 10 h 的累积释放量为 30 % 左右,在 72 h 内可基本保持稳定且呈现一定缓释作用,而作为对比的甘草次酸溶液在 10 h 就几乎释放完全。

以甘草次酸脂质体在 pH 9.0 硼酸盐溶液中的释放相为研究对象,分别通过零级动力学、一级动力学、Higuchi 方程和 Weibull 方程对体外释放曲线进行拟合,结果见表 4(其中 Q 为累积释放量, t 为释药时间)。从拟合结果看,脂质体中药物的释放最符合 Higuchi 方程, $r=0.9961$ 。

表 4 甘草次酸脂质体释放曲线的方程拟合 ($n=3$)

Table 4 Equations for release of glycyrrhetic acid liposomes ($n=3$)

模型	方程	r
Zero-order kinetic equation	$Q=0.9379t+9.0901$	0.9731
First-order kinetic equation	$\ln(1-Q)=-0.0167t+4.5387$	0.9906
Higuchi equation	$Q=8.7774t^{1/2}-3.7817$	0.9961
Weibull equation	$\ln[-\ln(1-Q)]=0.0003\ln t+0.0099$	0.9715

2.8 初步稳定性考察:取甘草次酸脂质体混悬液 3 批,在 (4 ± 2) 条件下放置 2 个月,于试验期间的 0、1、2 月末取样。分别考察外观、质量分数、包封率和粒径的变化。结果甘草次酸脂质体在 (4 ± 2) 条件下放置 2 个月后,外观没有发生明显的改变,甘草次酸质量浓度没有变化。0、1、2 月的包封率分别为 90.53 %、88.42 %、86.34 %; 粒径分别为 143.2、150.3、156.3 nm。可以看出低温放置 2 个月,甘草次酸脂质体的外观、甘草次酸质量浓度、包封率和粒径没有明显变化,脂质体具有较好的稳定性。

3 讨论

脂质体的包封率与被包封药物的性质密切相关。因为甘草次酸是强脂溶性药物,分布在磷脂双分子层中较多,水相中较少,所以包封率较高。文献中多见报道薄膜分散法制备甘草次酸脂质体^[6,7],因该法较难应用于工业化生产,本研究尝试用乙醇注入法制备甘草次酸脂质体,制备过程中通入 N_2 除去乙醇,在乙醇挥发的同时脂质分散进入水相形成脂质体。该法制得的脂质体粒径适宜,工艺简单可行^[8],且避免了有毒的有机溶剂,适于工业化生产。

由于磷脂本身带有少量的电荷,脂质体不载药时也会带部分负电荷,另外由于甘草次酸是一个水难溶性弱酸,在水中部分解离而带负电,这样就使含

药脂质体的 Zeta 电位会随着载药量的增加而不断降低。由于甘草次酸脂质体带有少量负电荷,所以加入的十八胺会部分吸附在脂质体表面,脂质体表面电荷随着十八胺加入量的增加而不断地升高,本实验测得甘草次酸脂质体 Zeta 电位为 35.9 mV。且随着十八胺用量的增加,包封率显著增加,从 $(56.32 \pm 2.5) \%$ 到 $(91.61 \pm 1.16) \%$ 。本实验中十八胺的用量为磷脂的 5 %,但关于甘草次酸阳离子脂质体给药后对肝组织的病理改变及肝功能的影响有待于进一步研究。

由于甘草次酸难溶于水,过量甘草次酸的存在可导致其自身在脂质体双分子层的聚积,从而破坏甘草次酸脂质体引起脂质体的积聚和渗漏。实验采用药脂比约为 1:6,在此比例下制成的脂质体经透射电镜观察未见甘草次酸结晶和脂质体积聚现象。

本实验在传统的乙醇注入法的基础上,通过加入正电荷脂质十八胺,制得了包封率较高、稳定性较好的甘草次酸阳离子脂质体。随着十八胺用量的增加,包封率显著增加,从 56.32 % 到 91.61 %。优选得到的脂质体处方和制备工艺合理、稳定,其体外释放具有缓释特点,脂质体具有较好的稳定性。本课题将建立血浆中 HPLC 测定甘草次酸的方法,动物体内药物动力学和体内组织分布实验正在进行中,以开发具有主动靶向(有关配体的合成实验正在进行中)的甘草次酸新型制剂。

参考文献:

- [1] 周荣汉. 中国资源学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1993.
- [2] 陈可冀,李春生,房定亚,等. 抗衰老中药学[M]. 北京:中国古籍出版社,1989.
- [3] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京:人民卫生出版社,1998.
- [4] 张彦青,解军波,陈文倩,等. 正交试验优选石杉碱甲酯脂质体的制备研究[J]. 中草药,2009,40(6):893-896.
- [5] 刘迎春,宋学君,王国清. RP-HPLC 法测定玄麦甘桔颗粒中甘草次酸含量[J]. 沈阳药科大学学报,2006,23(6):376-377,406.
- [6] 李娟,陆洋,王广基. Box-Behnken 效应面法优化甘草次酸长循环脂质体的处方[J]. 中国药科大学学报,2007,38(2):120-124.
- [7] Lu Y, Li J, Wang G. *In vitro* and *in vivo* evaluation of mPEG-PLA modified liposomes loaded glycyrrhetic acid[J]. *Int J Pharm*, 2008, 356(1-2): 274-281.
- [8] Pons M, Fomdada M, Estelrich J. Liposomes obtained by the ethanol injection method[J]. *Int J Pharm*, 1993, 95:51.