

• 制剂与质量 •

硫酸铵梯度法制备槐定碱脂质体的研究

胡鹏翼, 郑琴, 杨明*, 岳鹏飞, 朱根华, 王芳, 崔亚为
(江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

摘要:目的 对槐定碱脂质体的处方进行考察并优化。方法 硫酸铵梯度法制备槐定碱脂质体, 采用单因素对影响包封率的处方因素进行初步筛选, 以包封率、载药量及综合评价为指标, 采用星点设计考察药物及硫酸铵浓度对制备工艺的影响, 对结果进行多元线性和二项式拟合, 效应面法选取最佳工艺条件进行预测分析。结果 从复相关系数上看, 各指标二项式拟合方程均优于多元线性回归方程, 根据优化工艺制得的槐定碱脂质体包封率为 51.81%、载药量为 5.39%。结论 优选的槐定碱脂质体制备工艺稳定可行。

关键词: 槐定碱; 脂质体; 硫酸铵梯度法; 星点设计 效应面法

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)12-1970-04

Preparation of sophoridine liposomes by ammonium sulfate transmembrane gradient method

HU Peng-yi, ZHENG Qin, YANG Ming, YUE Peng-fei, ZHU Gen-hua, WANG Fang, CUI Ya-wei

(Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: Objective To investigate and optimize the formulation of sophoridine liposomes. **Methods** Sophoridine liposomes were prepared by ammonium sulfate transmembrane gradient method. On the basis of single factor experiments, the effects of influence factors, such as entrapment efficiency, drug loading, and comprehensive indexes, were investigated by using central composite design and response surface method. The influence factors included the concentration of drug and ammonium sulfate. The data were imitated using multi-linear equation and second-order polynomial equation. **Results** The latter was prior to the former considering from multiple correlation coefficients. Under the optimal conditions, the entrapment efficiency and drug loading of sophoridine liposomes were 51.81% and 5.39%. **Conclusion** The optimized preparation technique for sophoridine liposomes is stable and feasible.

Key words: sophoridine; liposome; ammonium sulfate transmembrane gradient method; central composite design; response surface method

槐定碱是从豆科植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 中分离出的主要生物碱之一, 属于四环的喹诺里西啉生物碱, 化学结构与苦参碱相似, 具有镇痛、兴奋中枢神经、抗肿瘤、抗心律失常、抗炎等作用^[1-3]。由于临床研究及药动学研究数据表明该药体内分布广, 消除较快, 且有一定的神经毒性作用, 限制了其在临床上的应用价值。脂质体是一种新的给药系统, 能增加药物局部浓度, 提高药物疗效, 减少药物的不良反应^[4-5]。本研究将槐定碱制备成脂

质体, 减少一日静滴时间, 增加药物在靶部位的浓度, 同时减少大循环中的药量及不良反应, 提高临床应用价值。彭海龙等^[6]采用逆向蒸发法制备槐定碱脂质体, 包封率为 50% 左右, 近年来生物碱多采用主动载药法来提高包封率^[7-9]。本研究采用硫酸梯度法制备槐定碱脂质体, 考察影响包封率的因素, 并采用星点设计 效应面法优化处方。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 Agilent1200, UV2500 紫外检

收稿日期: 2010-02-11

基金项目: “十一五”重大新药创制项目(2009ZX09310-005); 江西省自然科学基金资助项目(2008GQY0017); 江西中医学院创新人才课题(JZ0909)

作者简介: 胡鹏翼(1982—), 女, 江西九江人, 助教, 硕士, 2007年毕业于华中科技大学同济医学院, 参与“十一五”国家科技支撑项目和江西省自然科学基金制剂工艺及评价方面的研究, 从事新型给药系统方面的研究。

Tel: (0791) 7119010 E-mail: hpy820515@126.com

* 通讯作者 杨明 Tel: (0791) 7118658 E-mail: yangming16@126.com

测器(日本岛津), B-490BVCHI 型旋转蒸发器(厦门精艺兴业科技有限公司), FLV KO 弗鲁克乳化机(上海弗鲁克流体机械制造有限公司), 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司), BS124S 分析天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司), SKT5210LHC 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司), 电子 pH 测量计。

槐定碱原料药(通化方大药业股份有限公司, 质量分数> 99%); 槐定碱对照品(中国生物药品鉴定所, 批号 110784-200303); 蛋黄卵磷脂(德国 Lipoid 公司)、胆固醇(中国医药集团上海试剂公司)、纯透析袋(截留物质相对分子质量 12 000); 曲拉通 X-100(中国医药集团上海化学试剂公司); 磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(汕头市西陇化工厂有限公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 槐定碱脂质体的制备: 精密称取处方量的磷脂和胆固醇, 溶于氯仿中, 65 °C 减压蒸发, 制备磷脂膜(磷脂的质量浓度为 40 g/L), 加入硫酸铵溶液 10 mL, 旋转蒸发, 至 65 °C 水浴中水化 1 h, 16 000 r/min 乳化 5 min, 得空白脂质体。将空白脂质体依次通过 0.45、0.22 μm 的微孔滤膜各 5 次, 进行整粒。整粒后脂质体装入透析袋中, 置于 100 倍体积的 0.9% NaCl 溶液中透析 24 h, 每隔一定时间更换透析液, 共 3 次。取此空白脂质体 0.2 mL, 加入溶有槐定碱的磷酸盐缓冲液(pH 6.8) 1 mL, 水浴孵化。

2.2 包封率及载药量的 HPLC 法测定

2.2.1 色谱条件: Waters Xterra^{TR} RPC₁₈ 色谱柱(150 mm×3.9 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸缓冲液(取 0.01 mol/L 磷酸氢二钾 1 000 mL, 用 0.01 mol/L 磷酸二氢钾调节 pH 值至 8.5)-甲醇(78:22); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 205 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备: 精密称槐定碱对照品 4 mg 置 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相至刻度, 摇匀, 即得(含槐定碱 40 μg/mL)。

2.2.3 样品测定: 取槐定碱取脂质体, 加入质量浓度为 5% 曲拉通 X-100(Triton X-100) 溶解脂质体膜, 加流动相稀释, 使 Triton X-100 的最终浓度为 1%, 进行总药量的测定, 记为 W_t 。另量取槐定碱脂质体 4 °C 高速冷冻离心(18 000 r/min, 20 min), 吸取上清液, 以上述色谱条件测定游离药物的量(W_f)。另设制备时所取药物与空白脂质体的总量

为 W_s , 计算包封率与载药量。

$$\text{包封率} = (W_t - W_f) / W_t \times 100\%$$

$$\text{载药量} = (W_t - W_f) / W_s \times 100\%$$

2.3 处方筛选的单因素试验考察

2.3.1 孵化时间对包封率的影响: 固定槐定碱浓度为 1.25 mg/mL, 药脂比为 1:8, 胆脂比为 1:4, 硫酸铵浓度为 0.25 mol/L, 孵化温度为 40 °C, 考察孵化 5、15、30 min 对包封率的影响, 结果包封率分别为 22.46%、30.81%、29.45%。可见孵化时间对脂质体包封率几乎没有影响, 因此选择孵化时间为 15 min。

2.3.2 孵化温度对包封率的影响: 固定槐定碱浓度为 1.25 mg/mL, 药脂比为 1:8, 胆脂比为 1:4, 硫酸铵浓度为 0.25 mol/L, 孵化时间为 15 min, 考察孵化温度 40、50、60、70 °C 对包封率的影响, 结果包封率分别为 16.49%、23.03%、28.96%、14.42%。可见孵化温度升高包封率增加, 但升高到 70 °C, 脂质体稳定性降低药物渗漏, 因此选择 60 °C 为孵化温度。

2.3.3 药物浓度对包封率的影响: 固定胆脂比为 1:4, 硫酸铵浓度为 0.25 mol/L, 孵化时间为 15 min, 孵化温度为 60 °C, 加入不同质量浓度的槐定碱溶液使药脂比分别为 1:2、1:4、1:8、1:10、1:16、1:32、1:64。结果包封率分别为 28.05%、32.22%、38.41%、40.81%、49.92%、58.17%、59.76%。显示药物浓度对包封率的影响较大, 药脂比减小则包封率增加, 但随着药脂比的减小, 药物包封率提高并达到一个平台值, 因此确定药脂比为 1:32, 此时加入的药物质量浓度为 0.25 mg/mL。

2.3.4 硫酸铵浓度对包封率的影响: 固定胆脂比为 1:4, 孵化时间为 15 min, 孵化温度为 60 °C, 药脂比为 1:32, 选用硫酸铵浓度分别为 0.1、0.15、0.25、0.5、0.6、0.7 mol/L。结果包封率分别为 29.38%、31.69%、35.96%、58.32%、50.39%、44.53%。显示在选用较低浓度硫酸铵(0.1 mol/L)时, 包封率仅约 30%, 增加硫酸铵浓度到 0.5 mmol/L, 包封率最高, 而此后继续提高硫酸铵浓度对包封率的影响较小, 因此硫酸铵浓度选用 0.5 mol/L。

2.3.5 胆脂比对包封率的影响: 固定孵化时间为 15 min, 孵化温度为 60 °C, 药脂比为 1:32, 硫酸铵浓度为 0.5 mol/L, 考察胆脂比分别为 1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10 对包封率的影响, 结果包封率分别为 52.14%、52.37%、43.41%、44.48%、40.73%、41.66%。可以看出胆脂比对包封率的影响不大, 随着胆固醇的减少, 包封率降低, 考虑 1:2 时

可以减少胆固醇的用量, 因此选择胆脂比为 1: 2。

2 4 处方筛选优化试验^[10-11]

2 4 1 试验设计: 根据优化的处方, 在单因素考察的基础上, 选取对槐定碱脂质体制备工艺影响较显著的 药物浓度(X_1)、硫酸铵浓度(X_2) 2 个因素进行中心优化设计。考虑到包封率(Y_1)和载药量(Y_2) 在脂质体的制备方法评价中占有同样重要的地位, 分别将两者测量值最大的一组定为 0.5, 其余按比例缩放, 得到相对得分 Y_1 、 Y_2 , 以体现二者平衡的权重, 引入综合得分(Y_3), $Y_3 = Y_1 + Y_2$ 为另一评价指标^[12]。选择各因素的水平, 以 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 为评价指标(表 1、2), 分别对各因素用 SAS 统计软件进行多元线性回归和二项式拟合, 模型好坏通过相关系数进行判断。根据二项式方程, 应用统计软件分别绘制各个指标与影响较显著的两个因素的三维效应面图。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平	因 素	
	$X_1 / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$X_2 / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-2})$
- 1.414	0.20	0.20
- 1.000	0.46	0.26
0.000	1.10	0.40
1.000	1.74	0.54
1.414	2.00	0.60

2 4 2 模型拟合: 用 SAS 8.1 统计软件, 以 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 3 个评价指标分别对各因素(自变量)进行多元线性回归和二项式方程拟合。

多元线性回归方程: $Y_1 = 71.72 - 14.14X_1 - 19.05X_2$ ($R^2 = 0.9216$); $Y_2 = 2.11 + 2.92X_1 - 1.54X_2$ ($R^2 = 0.8889$); $Y_3 = 0.73 + 0.09X_1 - 0.26X_2$ ($R^2 = 0.5295$)。

二项式方程: $Y_1 = 66.30 - 13.94X_1 + 15.20X_2 - 3.87X_1^2 + 20.79X_1X_2 - 71.40X_2^2$ ($R^2 = 0.9752$); $Y_2 = -0.72 + 6.48X_1 + 5.34X_2 - 1.61X_1^2 - 0.03X_1X_2 - 8.56X_2^2$ ($R^2 = 0.9854$); $Y_3 = 0.50 +$

表 2 星点设计与结果

Table 2 Central composite design and results

试验号	X_1	X_2	$Y_1 / \%$	$Y_2 / \%$	Y_3
1	0.46	0.26	61.06	2.75	0.70
2	0.46	0.54	50.61	2.29	0.58
3	1.74	0.26	37.70	6.16	0.75
4	1.74	0.54	34.70	5.69	0.69
5	0.20	0.40	59.70	1.18	0.57
6	2.00	0.40	36.28	6.95	0.80
7	1.10	0.20	51.15	5.33	0.80
8	1.10	0.60	45.57	4.77	0.72
9	1.10	0.40	50.80	5.29	0.80
10	1.10	0.40	49.30	5.14	0.77
11	1.10	0.40	49.88	5.20	0.78
12	1.10	0.40	50.00	5.21	0.78
13	1.10	0.40	50.42	5.25	0.79

$0.36X_1 + 0.48X_2 - 0.15X_1^2 + 0.17X_1X_2 - 1.15X_2^2$ ($R^2 = 0.8932$)。

从拟合方程的复相关系数 R^2 值可见, 3 个指标采用二项式方程拟合效果较好。 X_1 、 X_2 对 Y_1 、 Y_2 及 Y_3 影响较为显著。根据方程描绘因变量和自变量的三维效应面和二维等高图, 选取较佳的制备工艺条件。

2 4 3 效应面优化和预测: 根据二项式方程, 应用 Origin 6.5 软件分别绘制 2 个自变量的三维效应面图, 从中筛选出较佳的工艺水平, 结果各因素的最佳范围见表 3 和图 1。

2 5 优化工艺验证: X_1 无论取多少都不能满足 Y_1 、 Y_2 同时达到最优值, 因此选择 Y_3 为评价指标, 得最佳条件为: $X_1 = 1.1 \text{ mg/mL}$, $X_2 = 0.4 \text{ mol/L}$ 。按此条件制备了 3 批槐定碱脂质体, 其平均 Y_1 、 Y_2 见表 4, 结果可见本实验所得的拟合方程可较好的描述指标与因素之间的关系。

表 3 各因素的预测最佳范围

Table 3 Forecasted optimal ranges of factors

参数	$X_1 / (\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	$X_2 / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
Y_1	0.2~0.3	0.2~0.3
Y_2	1.5~2.0	0.2~0.5
Y_3	0.9~1.8	0.2~0.5

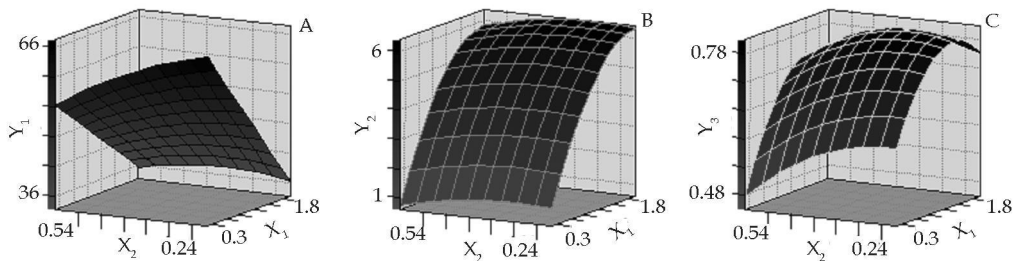


图 1 包封率(A)、载药量(B)、综合得分(C)对药物浓度和硫酸铵浓度的三维效应面图

Fig 1 Three dimensional response surface of entrapment efficiency(A), drug loading(B), and comprehensive score(C) on concentration of drug and ammonium sulfate

表 4 预测值与实测值的比较

Table 4 Comparison between forecasted and true values

批次	实测值			预测值			偏差/%		
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_1	Y_2	Y_3
1	51	24	5	34	0	80			
2	53	80	5	59	0	84	50	09	5
3	50	39	5	25	0	79	79	-3	43

3 讨论

近年来,随着生物技术的不断发展和制备工艺逐步完善,脂质体优良的生物相容性和靶向性,同时能提高药物的稳定性和治疗指数以及降低药物毒性等优点逐渐被人们发现。因此,脂质体作为药物载体的研究愈来愈受到重视。对于极性药物,其在水中溶解度越大,则在脂质体内水相中浓度越高,同时包封容积越大,包封的极性药物越多。对于非极性药物,其脂溶性越大,脂质体双分子层中包封的量就越多。油水分配系数($\lg P$)小于-0.3的水溶性药物为第一类, $\lg P$ 在-0.3~4.5的为第二类, $\lg P$ 大于4.5的脂溶性药物为第三类。只有第一类和第三类药物才能包封成具有较高包封率、稳定的脂质体。对于第二类药物,若不进行适当地修饰,就不易被包封,即使包封后也易迅速渗漏^[13]。本研究测得槐定碱的 $\lg P$ 为0.2,属于第二类药物,因此采用硫酸铵法制备槐定碱脂质体包封率也不高。本研究考虑今后通过对槐定碱进行适当的修饰使之成为第一类或第三类药物,以期得到较高的包封率。

本课题组对中药复方缓控释制剂的评价模式进行了探索^[14]。本研究采用星点设计-效应面法优化槐定碱脂质体的制备处方,评价结果的依据为脂质体的包封率和载药量,但存在不足,因为得到的结果是包封率随着卵磷脂浓度的增加呈线性增加,而载

药量却在下降,即使包封率再高也没有实际应用价值。本研究采用了1:1平均二者权重的方法,突出了脂质体药物的载药量这个指标的重要性,在保证包封率的同时兼顾载药量,由此得到的最佳制备配方为:药物质量浓度为1.1 mg/mL,硫酸铵浓度0.4 mol/L。本研究在该条件下可得到51.81%的包封率和53.9%的载药量,虽然包封率不是最高,但载药量得到了充分重视,达到包封率和载药量的最优组合。有关该脂质体的稳定性、体内血药浓度、肿瘤组织的药物浓度和临床疗效等将做进一步研究。

参考文献:

- [1] 姚婉霞,周俊俊,闫琳,等. 氧化槐定碱镇痛作用及其机制研究[J]. 中草药, 2008, 39(4): 569-571.
- [2] 余建强,蒋袁聚. 槐定碱对小鼠中枢神经系统的影响[J]. 中草药, 2006, 37(11): 1688-1691.
- [3] 夏玉叶,王大元. 槐定碱的药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(7): 391-393.
- [4] 郭波红,程怡,林绿萍. 甘草次酸脂质体的制备及其药剂学性质的研究[J]. 中草药, 2010, 41(3): 380-384.
- [5] 潘峰,胡春梅,潘黎军,等. 粉防己碱阿霉素脂质体的制备与体外释放度的研究[J]. 中草药, 2009, 40(2): 215-220.
- [6] 彭海龙,雷志强,刘燕燕,等. 槐定碱脂质体的制备及理化性质研究[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(1): 32-36.
- [7] 苗彩云,邓树海,李艳辉. 主动载药法制备两亲性药物脂质体的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(7): 433-437.
- [8] 邓意辉,王绍宁,吴琼,等. 主动载药法制备盐酸小檗碱脂质体[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(1): 40-42.
- [9] 刘文雅,刘汉清. 主动载药法制备苦参碱脂质体的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4): 908-909.
- [10] 甘良春,侯世祥,毕岳琦,等. 星点设计-效应面法优化丹参酮II_A纳米粒的制备工艺[J]. 中国药学杂志, 2007, 42(10): 758-761.
- [11] 王新春,侯世祥,李文,等. 均匀设计联用星点设计优化白藜芦醇固体脂质纳米粒制备处方[J]. 中成药, 2007, 29(8): 1139-1142.
- [12] 谭丽蓉,李国强,陈俊威,等. 均匀设计法优选盐酸小檗碱脂质体的处方[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(11): 1385-1386.
- [13] 于波涛,张志荣,刘文胜. 提高脂质体包封率的方法及其研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(11): 564-568.
- [14] 岳鹏飞,关彬,郑琴,等. 论中药复方缓控释制剂随方同步/异步释放行为评价模式的创新与商建[J]. 中草药, 2010, 41(9): 1413-1417.

均匀试验设计优化聚 β -环糊精包合丁香油的研究

陈玉苗,陈均志*,段冬海,韩春鹏

(陕西科技大学 教育部轻化工助剂化学与技术重点实验室,陕西 西安 710021)

摘要:目的 研究聚 β -环糊精(β -CDP)微球包合丁香油的最佳工艺。方法 采用饱和水溶液法制备丁香油 β -CDP微球包合物,通过均匀试验设计对制备工艺进行了优化,并对包合物进行表征。结果 最佳包合工艺条件是丁香油(mL): β -CDP微球(g)为1:1,包合温度为35℃,包合时间为1 h,乙醇可忽略。结果显示丁香油能成功地被 β -CDP微球包合。结论 丁香油聚 β -环糊精包合物包合得率更高,包合方法可行。

收稿日期: 2010-04-19

作者简介: 陈玉苗(1980—),男,硕士生,2008年毕业于四川理工学院,主要从事精细化工及环境化学方面的研究。

E-mail: chen yu miao135@163.com

* 通讯作者 陈均志 Tel: (0577) 88327698 E-mail: chen j z h@163.com