

丹酚酸 B 脂质体的制备及其体外释药的研究

马金鹏^{1,2}, 舒乐新^{1,2}, 刘志东^{1,2}

1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 300193

2. 天津中医药大学 现代中药发现与制剂技术教育部工程研究中心, 天津 300193

摘要: **目的** 研究丹酚酸 B 脂质体的制备方法及其体外释放情况。**方法** 采用逆向蒸发法制备丹酚酸 B 脂质体, 超滤离心法测其包封率, 以包封率和粒径为指标, 采用正交试验设计法优化处方, 并对其表面特征、包封率、粒径、体外释放情况进行考察。**结果** 制备的丹酚酸 B 脂质体的平均粒径为 109.8 nm, 药物的平均包封率为 71.0%, 体外 12 h 累积释放率为 43.7%。脂质体外观圆整而均匀, 分散性好。**结论** 制备的丹酚酸 B 脂质体包封率较高, 粒径小, 有良好的缓释作用, 为后期研究其长循环靶向脂质体奠定了基础。

关键词: 丹酚酸 B; 脂质体; 体外释放; 正交试验; 分散性

中图分类号: R284.2; R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)01-0065-04

Preparation of salvianolic acid B liposome and its *in vitro* release

MA Jin-peng^{1,2}, SHU Le-xin^{1,2}, LIU Zhi-dong^{1,2}

1. Research Center of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Engineering Research Center of Modern Chinese Medicine Discovery and Preparation Technique, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstracts: **Objective** To study the preparation of salvianolic acid B liposome and its *in vitro* release. **Methods** Reverse-phase evaporation technique was chosen for preparation salvianolic acid B liposome and entrapment efficiency was measured by ultrafiltration. Orthogonal design was used to optimize the formulation, by taking encapsulation efficiency and the particle size as indexes. The properties of liposomes including morphology, entrapment efficiency, mean diameter, and accumulative release were studied. **Results** Mean diameter and encapsulation efficiency of prepared salvianolic acid B liposome were 109.8 nm and 71.0%, respectively. The *in vitro* 12 h accumulative release was 43.7% of the total drug. The liposome was smooth and spherical in appearance with better dispersion. **Conclusion** The salvianolic acid B liposome prepared in this study have the smaller size and the higher encapsulation efficiency, and the *in vitro* release could be in a well sustained way, which could provide a basis on the study of long circulating heart-targeted liposome.

Key words: salvianolic acid B; liposome; *in vitro* release; orthogonal test; dispersion

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎, 归心、肝经, 微寒, 味苦、无毒, 具有祛瘀止痛、活血调经、养心除烦的功效, 主治瘀血所致的各种疼痛、癥瘕积聚、疮疡痈肿以及心悸失眠等。现代药理和临床研究表明, 丹参对心血管系统、血液系统、消化系统等均有作用^[1-2]。水溶性酚酸类是丹参的主要有效成分, 其中丹酚酸 B 量最高, 活性最强^[3-5]。但是丹参

酚酸类成分口服的胃肠吸收较差, 静脉注射给药后也会很快被代谢消除^[6-9]。临床虽有丹参多酚酸盐制剂, 但没有明确的靶向性。

脂质体属于靶向给药系统的一种新剂型。它可以将药物粉末或溶液包埋在直径为纳米级的微粒中, 这种微粒具有类细胞结构, 进入人体内主要被网状内皮系统吞噬, 从而激活机体的自身免疫功能, 并改变被包封药物的体内分布, 使药物主要在肝、

收稿日期: 2010-04-08

基金项目: 中国博士后基金资助项目 (20070420710)

作者简介: 马金鹏 (1971—), 男, 山东临清人, 副主任医师, 博士, 2005 年于山东中医药大学博士毕业, 2006 年入天津中医药大学博士后流动站, 合作导师张伯礼院士, 从事中医药治疗内分泌疾病的临床及中药现代化的实验研究工作。

Tel: 13589040128 E-mail: jinpengma@yahoo.com.cn

脾、肺和骨髓等组织器官中积蓄,从而提高药物的治疗指数,减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性^[10]。本实验采用逆向蒸发法制备了丹酚酸 B 脂质体,并考察了其体外释放,为后期体内的研究奠定基础。

1 仪器与材料

Nano ZS 型激光散射粒径分析仪(英国 Malvern 公司); JEOL 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司); JY92—II N 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司); RE—52C 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); CoMetro 高效液相色谱系统(美国 CoMetro); 超滤离心管; 透析袋(美国 Milipore 公司)。

天然大豆磷脂(LIPOID S-100, SPC)(上海东尚实业有限公司,批号 790580-4); 丹酚酸 B 原料(天津中一制药有限公司,质量分数>70%,批号 20070911); 丹酚酸 B 对照品(天津中新药业集团公司,质量分数>98%); 胆固醇、三氯甲烷、甘氨酸、氯化钠、甲酸、乙醇均为分析纯,甲醇、乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 丹酚酸 B 脂质体的制备

采用逆向蒸发法^[11]。称取处方量的大豆卵磷脂、胆固醇溶于 20 mL 氯仿,加入一定量丹酚酸 B 的生理盐水溶液 5 mL,冰浴条件下探头超声 180 次,形成均匀乳剂,转移入圆底烧瓶中,旋转蒸发除去氯仿,形成胶态后加入 pH 3.70 甘氨酸盐酸缓冲液 10 mL,继续减压蒸发 30 min,探头超声 3 min,所得溶液过 0.22 μm 滤膜,即得。

2.2 丹酚酸 B 的 HPLC 法测定^[12-13]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Comatex C₁₈-AB 柱,流动相为乙腈-0.1%甲酸水(27:73),柱温为 35 ℃,检测波长为 288 nm,体积流量为 1 mL/min,进样量为 20 μL。

2.2.2 标准曲线的制备 精密称取丹酚酸 B 对照品 2.53 mg,用水稀释成质量浓度分别为 0.506、1.265、2.53、5.06、10.12、25.3 μg/mL 溶液,于上述色谱条件下分别进样 20 μL,测定丹酚酸 B 的峰面积。以峰面积与质量浓度作线性回归,得回归方程 $A=13\,821\,C+1\,615.4$, $R^2=0.999\,6$,结果表明丹酚酸 B 在 0.506~25.3 μg/mL 线性关系良好。

2.3 丹酚酸 B 脂质体包封率的测定

取丹酚酸 B 脂质体 0.5 mL,加入乙醇破乳,稀释至 2.5 mL,摇匀,过 0.45 μm 滤膜, HPLC 法测

定丹酚酸 B 的质量浓度($C_{\text{总}}$)。采用超滤离心管(截留相对分子质量为 50 000)分离脂质体和游离药物^[14]。取丹酚酸 B 脂质体 0.5 mL,加超纯水稀释至 2.5 mL,置于超滤离心管内,4 000 r/min 离心 20 min 后取下层溶液, HPLC 法测定丹酚酸 B 的质量浓度 $C_{\text{游}}$)。计算丹酚酸 B 的包封率。

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

$C_{\text{游}}$ 为脂质体中混悬液中游离药物的质量浓度, $C_{\text{总}}$ 为脂质体中混悬液中药物的总质量浓度

2.4 丹酚酸 B 脂质体的处方优化

通过单因素考察及文献资料^[14]确定了超声时间、水浴温度、水化时间、水合溶液的体积、甘氨酸缓冲液浓度等,在此基础上选择对脂质体性质影响较大的磷脂-胆固醇质量比、有机相-水相体积比及药物-磷脂质量比 3 个因素进行处方优化,以丹酚酸 B 的包封率为指标,采用正交设计进行进一步的优化,因素水平见表 1。正交试验结果见表 2,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 (磷脂:胆固醇)	B (有机相:水相)	C (磷脂:药物)
1	10:5	3:1	10:1
2	10:4	4:1	7.5:1
3	10:3	5:1	5:1

表 2 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 2 Results of L₉(3⁴) orthogonal test

编号	A	B	C	D	包封率 /%	粒径/nm
1	1	1	1	1	42.40	132.9±1.42
2	1	2	2	2	43.39	132.8±0.84
3	1	3	3	3	43.34	148.1±1.02
4	2	1	2	3	48.25	96.3±1.39
5	2	2	3	1	46.42	124.3±1.00
6	2	3	1	2	51.30	120.9±1.67
7	3	1	3	2	52.77	106.3±0.55
8	3	2	1	3	72.92	107.1±1.07
9	3	3	2	1	53.00	145.3±1.61
K ₁	43.04	47.81	55.54	47.27		
K ₂	48.66	54.24	48.21	49.15		
K ₃	59.56	49.21	47.51	54.84		
R	16.52	6.43	8.03	7.57		

表 3 方差分析结果
Table 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	临界值	显著性
1	0.058	2	0.029	8.871	6.94	$P < 0.05$
2	0.006	2	0.003	0.864		
3	0.024	2	0.012	3.673		
4	0.007	2	0.004	1.132		

结果可知,各处方所得脂质体的平均粒径均小于 150 nm,所以以丹酚酸 B 的包封率为指标进行优化。因素 A 的差异具有显著性,各因素的影响大小为 $A > C > B$,最佳组合为 $A_3B_2C_1$,即脂质体的最佳处方为卵磷脂-胆固醇质量比为 10:3,卵磷脂-丹酚酸 B 质量比为 10:1,氯仿-药物溶液体积比为 4:1。

2.5 验证试验

对优化处方进行 3 次验证试验,各项指标的测定结果见表 4。可知该处方和工艺稳定可行。

表 4 验证试验结果
Table 4 Test of verification

编号	丹酚酸 B 包封率/%	粒径/nm
1	71.9	124.2±0.85
2	71.4	111.4±0.21
3	69.6	94.0±6.13
平均值	71.0±1.21	109.8±15.16

2.6 脂质体的形态、粒径及分布测定

取最优处方制备的丹酚酸 B 脂质体混悬液适量,用水稀释一定的倍数,滴加在覆盖铜网的碳膜上,自然干燥后置于透射电子显微镜下观察,拍照,见图 1。取丹酚酸 B 脂质体混悬液于激光粒径测定仪中,测定其粒径分布,见图 2。透射电镜显示脂质体呈球状,外观圆整规则,分散性好,粒径为 (107.10 ± 1.07) nm。

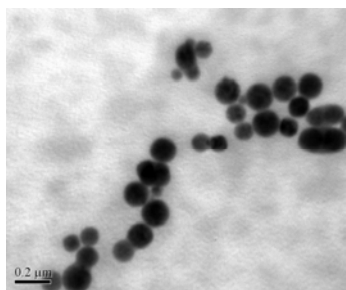


图 1 丹酚酸 B 脂质体的电镜图
Fig. 1 Electron photomicrograph of salvianolic acid B liposomes

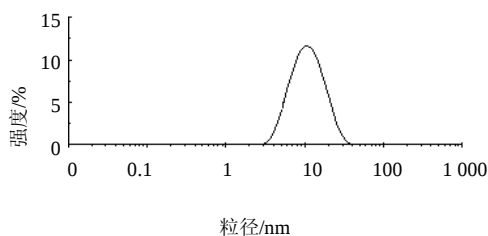


图 2 丹酚酸 B 脂质体的粒径分布
Fig. 2 Size distribution of salvianolic acid B liposomes

2.7 丹酚酸 B 脂质体的释放

以 0.9%氯化钠溶液为释放介质。精密吸取 2 mL 丹酚酸 B 水溶液(与脂质体中的药物质量浓度相当),置于处理好的透析袋内,扎紧后吊于溶出仪的小杯中,取 200 mL 释放介质于溶出仪的小杯中,于 37 °C 水浴中以 100 r/min 恒速旋转,分别于 5、10、20、30、40、60、90、120、180 min 吸取 2 mL 释放介质(同时补加等量、同温的释放介质),HPLC 法测定丹酚酸 B 的质量浓度,计算游离药物的累积释放率。另分别取 2 mL 空白脂质体与丹酚酸 B 的混合溶液、丹酚酸 B 脂质体置于透析袋内,分别于 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12 h 吸取释放介质,计算游离药物的累积释放率。见图 3。结果表明,游离药物 3 h 的释放率为 100%,空白脂质体与丹酚酸 B 的混合溶液 12 h 释放率为 96.5%,丹酚酸 B 脂质体 12 h 累积释放率为 43.7%。

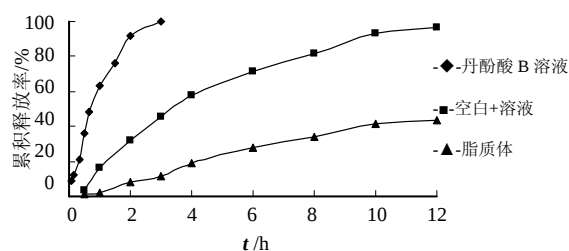


图 3 丹酚酸 B 脂质体释放曲线
Fig. 3 Accumulative release of salvianolic acid B liposomes

3 讨论

丹酚酸 B 有较好的水溶性,水溶性好的药物一般包封率较低。脂质体的制备方法较多,曾采用乙醇注入法、薄膜超声法,但制备的脂质体的包封率都较低,本实验采用逆向蒸发法制备丹酚酸 B 脂质体,酸性缓冲液水合,包封率高,粒径小。采用氯仿作为溶剂,因其密度较大,与水相超声混匀后在旋转蒸发的过程中不能很好地分散在水相中,为解决此问题,在最后进行短时超声,可将脂质较好地分散于水相中。因此脂质体的制备采用了二次超声。

测定包封率的方法有凝胶柱色谱法、超滤法,预实验表明凝胶柱色谱法分离脂质体的效果较差,且重复性不好;超滤法效果较好,重复性好。故采用超滤法测定丹酚酸 B 脂质体的包封率。

丹酚酸 B 为水溶性药物,故采用生理盐水和磷酸盐缓冲液都可以保证药物释放在漏槽状态下进行。而稳定性试验表明丹酚酸 B 在 pH 6.8 的 PBS 下不稳定,而在水中 12 h 内稳定,故采用生理盐水作为释放介质。

体外释放研究结果表明,游离药物 3 h 的释放率为 100%,3 h 透析袋内外达到平衡,表明透析袋对丹参总酚酸无吸附。空白脂质体与丹酚酸 B 的物理混合物的释放比游离药物慢,可能是由于物理混合的过程中一部分丹酚酸 B 主动载入脂质体内,或空白脂质体吸附了一部分丹酚酸 B,使丹酚酸 B 的释放减慢。丹酚酸 B 脂质体中的丹酚酸 B 在前 8 h 释放较快,随后开始缓慢释放,12 h 累积释放总药量的 43.7%,而物理混合物 12 h 释放为 96.5%,表明脂质体有延缓药物释放的作用。

参考文献

- [1] 张白嘉,刘 榴. 丹参水溶部分药理研究进展 [J]. 中草药, 1996, 37(10): 634-636.
- [2] 钱文慧,陆 茵,陈 磊,等. 血小板活化介导的肿瘤转移及丹参治疗的前景展望 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 311-314.
- [3] Sun J, Huang S H, Tan B K. Effects of purified herbal extract of *Salvia miltiorrhiza* on ischemic rat myocardium after acute myocardial infarction [J]. *Life Sci*, 2005, 76: 2849-2860.
- [4] 刘 杰,高秀梅,王 怡,等. 丹酚酸 B 对急性心肌缺血大鼠血流动力学的影响及作用分子机制研究 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 409-412.
- [5] 张 萌,张伯礼,高秀梅,等. 丹酚酸 B 和丹参酮 II_A 不同对比对肿瘤坏死因子 α 损伤大鼠心脏微血管内皮细胞的影响 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 63-65.
- [6] 张向荣,潘卫三. 丹参酚酸 A 在大鼠小肠的吸收动力学研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19 (1): 14-16.
- [7] 刘德茂,史德胜. 双丹口服液液中丹酚酸 B 和丹参素的稳定性研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(2): 102-104.
- [8] 李自强,刘志东,顾 慧,等. 药物溶出/吸收仿生系统研究丹酚酸 B 缓释片释放规律 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 367-373.
- [9] Zhang J L, Yu H L, Sheng Y X, et al. HPLC determination and pharmacokinetic studies of salvianolic acid B in rat plasma after oral administration of *Radix Salviae Miltiorrhizae* extract [J]. *Biomed Chromatogr*, 2005, 19: 51-60.
- [10] 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.
- [11] Yang T, Choi M K. Antitumor effect of Paclitaxel-loaded PEGylated immunoliposomes against human breast cancer cells [J]. *Pharm Res*, 2007, 24: 2403-2421.
- [12] 刘 睿,刘志东,高国义. 丹酚酸 B 渗透泵控释片的制备 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(2): 142-146.
- [13] 陈娇婷,王跃生,杨范莉,等. HPLC 法测定心可舒胶囊中丹酚酸 B [J]. 中草药, 2006, 37(8): 1181-1182.
- [14] 张丽红,张志荣. 丹参总酚酸长循环脂质体的研究 [D]. 成都: 四川大学, 2007.