

白藜芦醇三甲醚脂质体的制备及其质量评价

吴慧琴, 兰 天, 许玉珍, 况 丹, 姚 瑶*

中南大学药学院, 湖南 长沙 410013

摘要: 目的 制备白藜芦醇三甲醚(BTM)脂质体, 对其质量特性进行评价, 并考察脂质体对 BTM 的增溶作用。方法 采用薄膜分散法制备 BTM 脂质体, 以包封率为评价指标, 通过正交试验设计优化处方工艺, 微柱离心法测定其包封率, 观察其形态、粒径及稳定性, 并考察其对 BTM 的增溶作用。结果 优化的最佳处方工艺为 BTM 与卵磷脂质量比为 1:20, 胆固醇与卵磷脂质量比为 1:4, 水化介质为 5%甘露醇; 按该处方制备的 BTM 脂质体包封率达 $(86.4 \pm 2.2)\%$; 与游离 BTM 相比, BTM 脂质体在水中的溶解度增大了 1 012 倍。结论 采用最佳处方制备得到的 BTM 脂质体包封率较高, 形态和粒径较均匀, 并且可以较好地提高 BTM 的溶解度。

关键词: 白藜芦醇三甲醚(BTM); 薄膜分散法; 微柱离心法; 包封率; 正交试验设计

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)09-1746-05

Preparation of resveratrol trimethyl ether liposomes and their quality evaluation

WU Hui-qin, LAN Tian, XU Yu-zhen, KUANG Dan, YAO Yao

School of Pharmacy, Central South University, Changsha 410013, China

Abstract: Objective To prepare resveratrol trimethyl ether (3, 5, 4'-trimethoxy-*trans*-stilbene, BTM) liposomes, evaluate their quality, and observe the solubilization of BTM. **Methods** The film dispersion method was used to prepare BTM liposomes. Orthogonal test design was used to optimize the formula by taking encapsulation efficiency (EE) as index. The EE was determined by the microcolumn centrifugation method. The properties of liposomes including morphology, mean diameter, stability, and solubilization of BTM were studied. **Results** The best prescription was BTM-phospholipid (1:20), cholesterol-phospholipid (1:4), and 5% mannitol as hydration medium. The EE of the prepared BTM liposomes was $(86.4 \pm 2.2)\%$, and the solubility of BTM was increased by 1 012 times compared with free BTM. **Conclusion** The BTM liposomes prepared according to the optimized formula have the higher EE and the uniform morphology and diameter. Liposomes could improve the solubility of BTM.

Key words: resveratrol trimethyl ether (3, 5, 4'-trimethoxy-*trans*-stilbene, BTM); film dispersion method; microcolumn centrifugation; encapsulation efficiency (EE); orthogonal test design

白藜芦醇三甲醚(resveratrol trimethyl ether, 3, 5, 4'-trimethoxy-*trans*-stilbene, BTM^[1])是白藜芦醇的全甲基化衍生物, 具有明显的抗新血管生成、抗有丝分裂作用, 可以引起微管分解和微管蛋白解聚, 可用于抗肿瘤治疗。此外, BTM 具有抗过敏、保护胃黏膜损伤以及抗衰老作用^[1-3]。但是 BTM 难溶于水, 光照下易发生异构化并降解, 使其临床应用受到限制^[4]。脂质体可以增加难溶性药物的溶解性, 提高光不稳定性药物的光稳定性^[5-6]。本实验将 BTM 制备成脂质体, 对其处方工艺和质量特性进行评价, 并考察脂质体对 BTM 的增溶作用。

1 仪器与材料

KQ—250 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), LC20A—DAD 高效液相色谱仪(日本岛津), N—1100 旋转蒸发仪(东京理化器械公司), Digital Sonifier S—450D 超声波细胞粉碎机(美国 Branson Sonifier), Sirion 200 场发射扫描电镜(荷兰 FEI 公司), Nano—ZS90 激光散射粒径仪(英国 Malvern 公司)。BTM 对照品(质量分数 99.2%)、BTM 样品(中南大学化学化工学院提供), 卵磷脂(S100, 德国 Lipoid 公司), 胆固醇(天津博迪化工有限公司), 葡聚糖凝胶 G-50(北京瑞达恒辉科技发展有

收稿日期: 2011-12-23

作者简介: 吴慧琴(1987—), 女, 江西省上饶人, 硕士, 主要从事药物微粒递药系统研究。Tel: 13548659104 E-mail: whqling@sina.com

*通讯作者 姚 瑶 E-mail: yaoyao367@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2012-06-15 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120615.1706.002.html>

限公司), 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 BTM 脂质体的制备

采用薄膜分散法^[7-8]制备。精密称取适量卵磷脂、胆固醇、BTM 于茄形瓶中, 加入 10 mL 氯仿溶解后, 旋转蒸发除去氯仿, 使形成均匀透明的薄膜, 加入 5%甘露醇溶液 15 mL, 45 °C 水浴下水化 4 h, 使薄膜溶胀充分水合完全, 得乳白色混悬液; 探头超声 2 min, 0.45 μm 微孔滤膜挤出, 即得 BTM 脂质体。

2.2 BTM 定量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS2 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (75:25), 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 318 nm, 进样量 20 μL。

2.2.2 专属性试验 分别取空白脂质体、BTM 乙腈溶液、BTM 脂质体各 0.2 mL, 甲醇破乳并稀释至 5 mL, 按“2.2.1”项色谱条件进样测定, 见图 1。结果表明, 在此色谱条件下, 脂质体辅料对 BTM 定量测定无干扰。

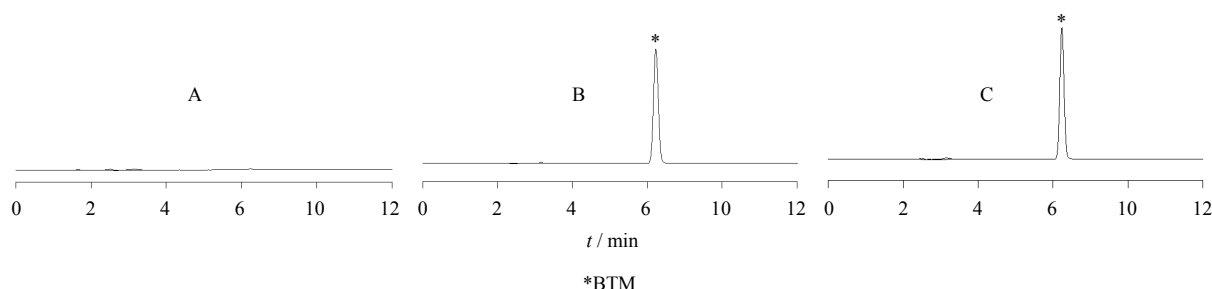


图 1 空白脂质体 (A)、BTM 对照品 (B) 和 BTM 脂质体 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank liposome (A), BTM reference substance (B), and BTM liposomes (C)

2.2.3 线性关系考察 精密称取 BTM 对照品 10.0 mg 于 50 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 得质量浓度为 200.0 μg/mL 的 BTM 对照品储备液。精密量取上述储备液适量, 乙腈稀释成质量浓度分别为 0.1、0.4、1.0、4.0、8.0、16.0、32.0 μg/mL 的系列对照品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件进样分析, 以色谱峰峰面积 (A) 对质量浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程 $A = 134\,298.1 C - 588.8$, $r = 0.999\,9$, 表明 BTM 在 0.1~32.0 μg/mL 线性关系良好。

2.2.4 精密度试验 分别配制质量浓度为 1.0、8.0、32.0 μg/mL 的 BTM 乙腈溶液各 5 份, 按“2.2.1”项色谱条件测定, 计算日内精密度和日间精密度。日内精密度 RSD 分别为 0.27%、0.43%、0.19%, 日间精密度 RSD 分别为 1.46%、0.77%、0.65%。

2.2.5 稳定性试验 取 BTM 脂质体混悬液适量, 加甲醇稀释至质量浓度分别为 1.0、8.0、16.0 μg/mL 的供试品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件, 在 0、2、4、6、8、12 h 分别测定 BTM 的峰面积, 计算其 RSD 分别为 1.38%、1.06%、0.59%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 取 BTM 脂质体混悬液适量, 加甲醇稀释至质量浓度分别为 1.0、8.0、16.0 μg/mL 的供试品溶液, 按“2.2.1”项色谱条件, 连续测定

5 次, 其质量浓度基本无变化, RSD 分别为 0.87%、0.23%、0.35%。

2.2.7 回收率试验 精密吸取 0.2 mL 空白脂质体于 5 mL 量瓶中, 分别加入 25、200、400 μL 质量浓度为 200.0 μg/mL 的 BTM 储备液, 加入甲醇破乳并稀释至刻度, 重复 3 次, 得质量浓度分别为 1.0、8.0、16.0 μg/mL 样品溶液, 分别进样测定, 计算回收率。3 种质量浓度的回收率分别为 101.3%、99.3%、99.6%, RSD 分别为 0.39%、1.53%、0.57%。

2.3 微柱离心法^[9-11]测定 BTM 脂质体的包封率

2.3.1 微型凝胶柱的制备 称取葡聚糖凝胶 G-50 1.0 g 于适量蒸馏水中, 浸泡 24 h, 沸水浴煮沸 20 min, 使葡聚糖充分溶胀并除去气泡。静置冷却后, 装填于 2.5 mL 注射器 (底部填有适量脱脂棉) 中, 于离心机中 3 000 r/min 离心 5 min, 备用。

2.3.2 洗脱曲线的考察 精密吸取 BTM 脂质体混悬液 0.2 mL, 加于微柱的顶部, 2 000 r/min 离心 3 min, 收集洗脱液; 再于柱顶部加入 0.2 mL 蒸馏水, 2 000 r/min 离心 3 min, 收集洗脱液; 重复以上操作。从第 12 管开始更换洗脱液, 用乙醇-水 (3:2) 混合溶剂代替蒸馏水作为洗脱液, 操作同上, 继续收集 10 管洗脱液。所收集的洗脱液用甲醇破乳并稀释定容至 5 mL。按“2.2.1”项色谱条件进样分析, 测

定 BTM 质量浓度,以洗脱管号为横坐标,BTM 质量浓度为纵坐标,绘制洗脱曲线,结果见图 2。可知脂质体在前 8 管基本洗脱完全,BTM 游离药物则在第 13 管以后被缓慢洗脱,可见葡聚糖 G-50 微型凝胶柱可较好地分离脂质体与 BTM 游离药物。该方法可用于 BTM 脂质体包封率的测定。

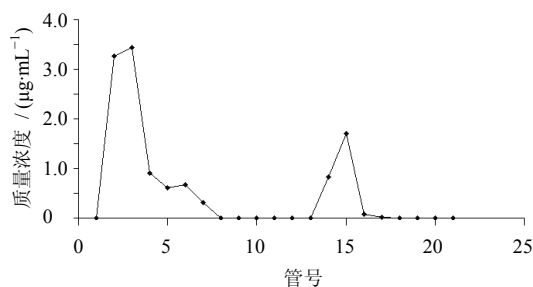


图 2 BTM 脂质体的洗脱曲线

Fig. 2 Elution curve of BTM liposomes

2.3.3 包封率的测定 精密量取 BTM 脂质体混悬液 0.2 mL 于微柱中,2 000 r/min 离心 3 min,收集洗脱液;再于柱顶部加入 0.2 mL 蒸馏水,2 000 r/min 离心 3 min,收集洗脱液;重复以上操作。合并 1~8 管洗脱液,甲醇稀释破乳后定容至 5 mL,按“2.2.1”项色谱条件进样分析,测定 BTM 质量浓度,记为 $C_{\text{脂}}$;另取 BTM 脂质体混悬液 0.2 mL,加入甲醇超声破乳,破乳后甲醇定容至 5 mL,按“2.2.1”项色谱条件进样分析,测定 BTM 质量浓度,记为 $C_{\text{总}}$,计算包封率。

$$\text{包封率} = C_{\text{脂}} / C_{\text{总}}$$

2.4 单因素考察

2.4.1 BTM 与卵磷脂质量比对包封率的影响 固定胆固醇与卵磷脂质量比为 1:3、水化介质为 5% 甘露醇、水浴温度 45 °C、水化时间 4 h,选取 BTM 与卵磷脂质量比分别为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 制备脂质体,测定包封率分别为 46.5%、70.9%、73.6%、77.4%、77.6%。结果表明,BTM 与卵磷脂质量比在 1:10 以下时包封率可达 70% 以上。

2.4.2 胆固醇与卵磷脂质量比对包封率的影响 固定 BTM 与卵磷脂质量比为 1:20、水化介质为 5% 甘露醇、水浴温度 45 °C、水化时间 4 h,选取胆固醇与卵磷脂质量比分别为 1:6、1:5、1:4、1:3、1:1 制备脂质体,测定包封率分别为 68.8%、70.4%、80.2%、75.1%、38.6%。结果表明脂质体的包封率随着胆固醇嵌入量的增加呈现先增大后减小的趋势。胆固醇对于脂质体起着膜流动性调节剂的作用,

能适当提高 BTM 包封率和脂质体稳定性。但当胆固醇用量过大时,其与脂溶性药物 BTM 竞争卵磷脂双分子层位置,导致 BTM 包封率下降。

2.4.3 水化介质的种类对包封率的影响 固定胆固醇与卵磷脂质量比为 1:3、BTM 与卵磷脂质量比为 1:20、水浴温度 45 °C、水化时间 4 h,选取水化介质分别为 5% 甘露醇、0.01 mol/L PBS、蒸馏水制备脂质体,测定包封率分别为 78.2%、69.4%、72.7%。结果表明,水化介质为 5% 甘露醇时,脂质体的包封率最佳。

2.5 正交试验设计优化处方

在参考文献资料^[12]及单因素试验考察的基础上,以包封率为指标,选择 BTM 与卵磷脂质量比(A)、胆固醇与卵磷脂质量比(B)、水化介质的种类(C)为考察因素,每个因素各取 3 个水平,进行正交设计,选用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,制备脂质体,测定包封率。试验设计与结果见表 1。

由正交试验结果分析可知,影响脂质体包封率的因素顺序为 $C > A > B$,最佳处方为 $A_3B_2C_1$,即 BTM 与卵磷脂质量比为 1:20,胆固醇与卵磷脂质量比为 1:4,水化介质为 5% 甘露醇。

2.6 最佳处方工艺的验证

按上述筛选得到的最佳处方,制备 3 批 BTM 脂质体混悬液(约相当于 BTM 0.33 mg/mL),测定包封率分别为 88.7%、84.3%、86.2%。3 次验证试验的结果基本一致,说明所优化的处方合理可行,重复性良好。

2.7 BTM 脂质体形态

取最佳处方制备的 BTM 脂质体适量,用超纯水稀释 100 倍,以扫描电镜观察脂质体形态,见图 3。可见脂质体形态圆整,多为球形及类球形粒子,大小比较均一。

2.8 粒径和 Zeta 电位的测定

取最佳处方制备的 BTM 脂质体适量,适当稀释后,用激光散射粒径仪测定脂质体的平均粒径和 Zeta 电位。结果脂质体的平均粒径为 (183.6 ± 2.1) nm,粒径分布见图 4,多分散指数(PDI)为 0.265 ± 0.006 ,Zeta 电位为 (-15.3 ± 1.2) mV,见图 5。

2.9 初步稳定性考察

取最佳处方制备的 BTM 脂质体 3 批,置 (4 ± 1) °C 冰箱中,于第 3、5、10 天取样,分别考察外观、粒径、Zeta 电位和包封率的变化。结果 BTM 脂质体在 4 °C 条件下放置 10 d 后,外观没有发生明

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D (误差)	包封率 / %
1	1 : 10 (1)	1 : 3 (1)	5%甘露醇 (1)	(1)	75.7
2	1 : 10 (1)	1 : 4 (2)	0.01 mol/L PBS (2)	(2)	63.3
3	1 : 10 (1)	1 : 5 (3)	蒸馏水 (3)	(3)	65.3
4	1 : 15 (2)	1 : 3 (1)	0.01 mol/L PBS (2)	(3)	67.1
5	1 : 15 (2)	1 : 4 (2)	蒸馏水 (3)	(1)	75.4
6	1 : 15 (2)	1 : 5 (3)	5%甘露醇 (1)	(2)	70.9
7	1 : 20 (3)	1 : 3 (1)	蒸馏水 (3)	(2)	69.5
8	1 : 20 (3)	1 : 4 (2)	5%甘露醇 (1)	(3)	81.8
9	1 : 20 (3)	1 : 5 (3)	0.01 mol/L PBS (2)	(1)	69.7
K_1	204.3	212.3	228.4	220.8	
K_2	213.4	220.5	200.1	203.7	
K_3	221.0	205.9	210.2	214.2	
R	16.7	14.6	28.3	17.1	

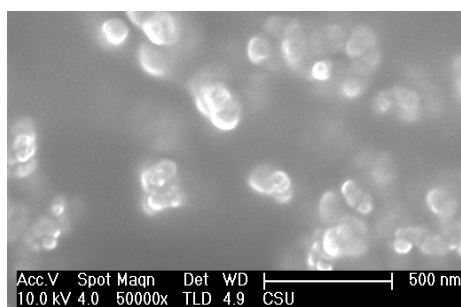


图 3 BTM 脂质体扫描电镜照片

Fig. 3 Scanning electron microscope photo of BTM liposomes

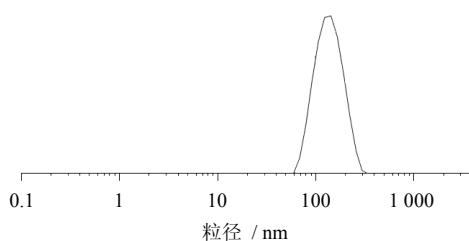


图 4 BTM 脂质体粒径分布图

Fig. 4 Particle size distribution of BTM liposomes

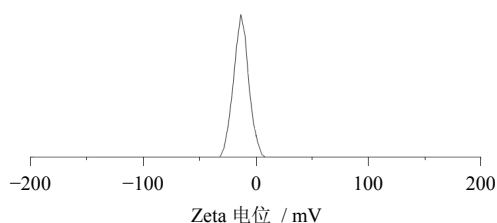


图 5 BTM 脂质体 Zeta 电位分布图

Fig. 5 Zeta potential distribution of BTM liposomes

显的变化, 3、5、10 d 的平均粒径分别为 (190.9 ± 1.8) 、 (195.9 ± 2.1) 、 (201.0 ± 2.7) nm, Zeta 电位分别为 (-15.7 ± 1.5) 、 (-16.3 ± 0.9) 、 (-17.1 ± 1.7) mV, 包封率分别为 $(84.1 \pm 0.3)\%$ 、 $(80.9 \pm 4.2)\%$ 、 $(78.3 \pm 3.6)\%$ 。可以看出, 低温 (4°C) 放置 10 d, 脂质体的外观、粒径及 Zeta 电位没有发生明显变化, 包封率略有降低。

2.10 增溶作用

取过量的 BTM 原料药置具塞试管中, 加入超纯水, 涡旋使其分散均匀, 于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的恒温振荡器中振荡 48 h, 平衡后取样, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 按“2.2.1”项色谱条件进样分析, 测得 BTM 在水中的饱和溶解度为 $0.32 \mu\text{g/mL}$ 。

取适量 BTM 脂质体于西林瓶中, 加入 10% 蔗糖溶液作为冻干保护剂, 冷冻干燥, 得到冻干脂质体。取过量冻干粉于超纯水中, 振摇复溶使分散均匀, 用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 加入甲醇破乳后, 按“2.2.1”项色谱条件进样分析, 测得 BTM 脂质体中 BTM 的饱和溶解度为 $324.2 \mu\text{g/mL}$ 。

BTM 脂质体较其原料药在水中的饱和溶解度提高了 1 012 倍, 表明脂质体对 BTM 有较好的增溶作用。

3 讨论

BTM 难溶于水, 为脂溶性药物。薄膜分散法简单易行, 适合于脂溶性药物脂质体的制备。本实验采用该法制备 BTM 脂质体, 通过正交试验筛选最佳处方。制备过程中, 成膜和水化是影响脂质体包

封率与粒径的关键步骤。成膜太厚、水化不完全,制得的脂质体粒径偏大,放置易聚集,影响脂质体的稳定性;成膜不均匀,导致药物未能很好地嵌入脂质体双分子层中,影响脂质体的包封率。

脂质体包封率的测定方法通常有凝胶柱色谱法、透析法、超速离心法、微柱离心法等^[9-11,13]。凝胶柱色谱法消耗时间长,且不易控制洗脱液的体积流量;透析法消耗时间也较长;超速离心法要求较高离心力才能将脂质体和游离药物分离。微柱离心法是一种快速、简便地分离脂质体中游离药物的方法,其优点是脂质体混悬液几乎没有被稀释,可以避免脂质体的渗漏。本实验采用微柱离心法测定BTM脂质体的包封率,脂质体与游离药物分离效果好,方法简便,重复性好。

采用最佳处方制备的3批脂质体,包封率较高,粒径分布均匀,重复性良好,并且可以显著提高BTM的溶解度。放置10 d后,外观和粒径均未发生明显变化,但包封率略有降低,推测药物可能出现渗漏。将脂质体冻干,可以显著降低磷脂的水解和氧化速率,提高脂质体的稳定性^[14],实验拟进一步考察BTM冻干脂质体贮存稳定性。

参考文献

- [1] Yuan Q, Peng J, Liu S Y, *et al.* Inhibitory effect of resveratrol derivative BTM-0512 on high glucose-induced cell senescence involves dimethylaminohydrolase/asymmetric dimethylarginine pathway [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(5/6): 630-635.
- [2] Pan M H, Gao J H, Lai C S, *et al.* Antitumor activity of 3, 5, 4'-trimethoxystilbene in COLO 205 cells and xenografts in SCID mice [J]. *Mol Carcinog*, 2008, 47(3): 184-196.
- [3] Li L, Luo X J, Liu Y Z, *et al.* The role of the DDAH-ADMA pathway in the protective effect of resveratrol analog BTM-0512 on gastric mucosal injury [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(5): 562-567.
- [4] 吕春艳, 李 芳, 张兰桐. 天然产物中二苯乙烯类化合物的研究近况与开发前景 [J]. 河北医科大学学报, 2009, 30(2): 213-216.
- [5] Ioele G, Cione E, Risoli A, *et al.* Accelerated photostability study of tretinoin and isotretinoin in liposome formulations [J]. *Int J Pharm*, 2005, 293(1/2): 251-260.
- [6] 韩文霞, 李伟泽, 汪兴军, 等. 盐酸青藤碱纳米柔性脂质体的制备及其性质研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 671-675.
- [7] Lu Y, Li J, Wang G J. *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] 琚 辉, 郝存江, 尹 飞, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒的制备及表征 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 420-426.
- [9] Di Venosa G, Hermida L, Batlle A, *et al.* Characterisation of liposomes containing aminolevulinic acid and derived esters [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2008, 92(1): 1-9.
- [10] Bhatia A, Kumar R, Katore O P. Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and *in vitro* evaluation [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 2004, 7(2): 252-259.
- [11] 于燕燕, 赵继会, 冯年平, 等. 微柱离心-HPLC法测定鬼臼毒素醇质体的包封率研究 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1634-1637.
- [12] Caddeo C, Teskač K, Sinico C, *et al.* Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells [J]. *Int J Pharm*, 2008, 363(1/2): 183-191.
- [13] 李唐棣, 郝丽梅, 梅兴国, 等. 脂质体包封率的研究进展 [J]. 国外医学: 药学分册, 2006, 33(3): 224-227.
- [14] 王 健, 李明轩. 冷冻干燥对提高脂质体稳定性的研究概况 [J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(9): 576-580.