

• 药剂与工艺 •

甘草次酸-丹参酮 II_A 复方脂质体处方优化及制备工艺研究

林珈好, 王秀丽, 王玉蓉*, 何亮颖

北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: 目的 研究甘草次酸(GA)-丹参酮 II_A(Tan II_A)复方脂质体(GT-Lip)的制备工艺。方法 以大豆卵磷脂(SPC)和胆固醇(Ch)为膜材, 薄膜分散探头超声法制备 GT-Lip。通过单因素考察确定水合温度和探头超声功率, 正交设计法优化处方工艺; 低速离心法测定脂质体中 GA 与 Tan II_A 包封率, 动态光散射粒径仪测定脂质体粒径与 Zeta 电位, 透射电镜测定脂质体形态。结果 优化处方工艺为 SPC-Ch 质量比 6:1, SPC-Tan II_A 物质的量之比 30:1, SPC-GA 物质的量之比 24:1, 水合温度为 30 ℃, 探头超声条件为 380 W 超声 5 min; 制备得到的 GT-Lip 中 Tan II_A、GA 的包封率分别为 (81.50±0.76)%、(98.63±0.90)% ($n=3$), 平均 Zeta 电位为 (-19.00±0.98) mV ($n=3$), 平均粒径为 (120.5±1.62) nm ($n=3$)。结论 优化的 GT-Lip 制备工艺稳定可行。

关键词: 甘草次酸; 丹参酮 II_A; 复方脂质体; 薄膜分散探头超声法; 低速离心法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)07-0816-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.07.008

Formula optimization and preparation technology of glycyrrhetic acid-tanshinone II_A compound liposomes

LIN Jia-hao, WANG Xiu-li, WANG Yu-rong, HE Liang-ying

College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: **Objective** To study the preparation technology of glycyrrhetic acid (GA)-tanshinone II_A (Tan II_A) compound liposomes (GT-Lip). **Methods** The compound liposomes were made of soybean phosphatidylcholine (SPC) and cholesterol (Ch) by film dispersion ultrasonic probe method. Hydration temperature and ultrasonic power were optimized by single factor tests and the optimum formulation was selected by orthogonal design. The encapsulation efficiencies (EE) of GA and Tan II_A were determined by low-speed centrifugation. The particle size and Zeta potential of liposomes were detected by dynamic light scattering particle size meter. Transmission electron microscopy was used to observe morphous. **Results** The optimal preparation conditions were as follows weight ratio of SPC-Ch 6:1, molar ratio of SPC-Tan II_A and SPC-GA was 30:1 and 24:1, hydration temperature 30 ℃, and ultrasonic power 380 W for 5 min. Using the optimal method, the EE values of GA and Tan II_A in GT-Lip were (81.50 ± 0.76)% and (98.63 ± 0.90)% ($n=3$), and the average particle size of liposomes was (120.5 ± 1.62) nm and the Zeta potential of liposomes was (-19.00 ± 0.98) mV ($n=3$). **Conclusion** The optimal preparation method of GT-Lip in this study is stable and feasible.

Key words: glycyrrhetic acid; tanshinone II_A; compound liposomes; film dispersion ultrasonic probe method; low-speed centrifugation

肝纤维化是各种原因引起的慢性肝病共同的病理特征, 是近 10 年来全球范围肝病研究的热点。研究资料表明肝纤维化病症经过治疗可以逆转^[1], 但仍有 25%~40% 的肝纤维化最终会发展为无法逆转

的肝硬化^[2]。所以, 阻断及逆转肝纤维化已成为慢性肝病治疗中的关键环节。丹参-甘草为来源于临床的肝纤维化治疗药对。丹参主要含丹参酚酸和丹参酮两类组分, 均可起到活血化瘀的作用, 尤其以丹

收稿日期: 2012-10-15

基金项目: 国家自然科学基金资助课题 (81202928); 北京市自然科学基金资助课题 (7132118); 北京中医药大学复方中药制药研究创新团队项目 (2011-CXTD-13)

作者简介: 林珈好, 女, 在读博士研究生, 主要从事中药复方新型释药系统研究。Tel: 15810881377 E-mail: missing319@163.com

***通信作者** 王玉蓉, 教授, 博士研究生导师, 主要从事中药复方新型释药系统研究。Tel: (010)84738616 E-mail: yurong.wang@163.com

网络出版时间: 2013-01-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130109.1536.016.html>

参酮 II_A (tanshinone II_A, Tan II_A) 作用明显^[3], 且量高, 并对肝纤维化具有确切的治疗作用^[4]; 甘草中所含主要药理活性物质是甘草酸和甘草次酸 (glycyrrhetic acid, GA), GA 为甘草酸体内活性代谢产物, 无毒且廉价, 药理研究表明 GA 可增强肝脏的解毒能力, 降低肝细胞的炎症反应, 减轻多种致病因子对肝细胞的损害, 使血清丙氨酸转氨酶下降, 肝糖原及核糖核酸的量恢复正常^[5-7]。同时, 临床研究证实, 丹参联合甘草酸用药后, 抗肝纤维化临床效果优于单用丹参或甘草酸^[8-10]。但 GA 和 Tan II_A 的水溶性均较差, 水中溶解度分别为 6.32^[11]、0.24 mg/L^[12], 生物利用率较低, 影响了其临床药效的发挥, 选择合适的药物传递系统以提高药效显得尤为重要。本实验以脂质体为载体, 成功制备了 GA-Tan II_A 复方脂质体 (GT-Lip), 提高了 GA 和 Tan II_A 的溶解度。

1 仪器与材料

日本岛津高效液相色谱仪 (LC-20AT 四元泵、CTO-10ASVP 柱温箱、SPD-20A 紫外检测器); RW-2000A 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); SCIENTZ-II D 型超声波细胞粉碎机 (浙江新芝); Zetasize Nano ZS 纳米粒度仪 (英国 Malvern 公司); JEM-1230 型透射电镜 (日本 JEOL); G16 型医用高速离心机 (白洋离心机厂)。对照品 GA (批号 110723-200411)、Tan II_A (批号 110766-200417) 购于中国食品药品检定研究院; GA (宝鸡国康生物科技有限公司, 批号 111215, 质量分数 > 98%); Tan II_A (宝鸡国康生物科技有限公司, 批号 120428, 质量分数 > 98%); 大豆卵磷脂 (SPC, 德国 Lipoid 公司, 质量分数 > 94%); 胆固醇 (Ch, Amresco 分装); 甲醇 (色谱纯); 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备

采用薄膜分散-探头超声法制备 GT-Lip: 称取处方量 SPC、Ch、GA 及 Tan II_A, 超声共溶于 10 mL 无水乙醇, 0.45 μm 微孔滤膜滤过后, 于 250 mL 圆底烧瓶中水浴减压旋蒸以除去无水乙醇, 形成均匀透明的薄膜, 在蒸发得到的类脂膜中加入 10 mL 纯水继续水浴常压旋转 30 min, 使薄膜溶胀水合。经水合得到的脂质体混悬液在水浴条件下, 以探头超声仪进一步均匀加工处理, 即得具有蓝色乳光的 GT-Lip。

2.2 脂质体包封率测定

采用低速离心法测定脂质体包封率。取 GT-Lip

1 mL, 4 °C 条件下 2 000 r/min 离心 5 min, 精密移取上清 0.2 mL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容并超声破乳, 测定药物量为 W_1 。另精密移取 GT-Lip 溶液 0.2 mL 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容并超声破乳, 测定药物量为 W_2 , 则包封率 = W_1 / W_2 。

色谱条件: 参考文献方法^[13]并进行改进使能同时测定 Tan II_A 和 GA, 色谱柱为 Supelco C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.5% 甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0~8 min, 45%~88% 甲醇; 8~20 min, 88% 甲醇; 20~25 min, 88%~45% 甲醇; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 253 nm。

2.3 脂质体粒度分布及 Zeta 电位测定

采用马尔文动态光散射粒径仪检测平均粒径和 Zeta 电位。激光束波长 633 nm, 入射与散射光束夹角 173°, 温度 25 °C。取 100 μL 脂质体溶液用水稀释至 10 mL, 摇匀平衡 3 min 后测定。

2.4 脂质体形态学考察

采用负染透射电镜观察。取适量样品滴于 300 目铜网表面, 5 min 后用滤纸吸去多余液体, 加入 1 滴 2% 磷酸铀溶液染色 5 min, 滤纸吸去多余液体, 自然晾干后测定。

2.5 脂质体制备工艺研究

预试验发现 SPC-Ch 质量比、SPC-GA 物质的量之比、SPC-Tan II_A 物质的量之比是影响 GT-Lip 包封率的主要因素; 另外, 制备条件中的水合温度和探头超声功率对脂质体包封率也有一定影响。故首先单因素考察, 确定最佳水合温度和探头超声功率, 然后采用正交试验设计优化处方比例, 以确定 GT-Lip 最佳制备工艺。

2.5.1 水合温度的影响 固定 SPC-Ch 质量比为 6:1, SPC-Tan II_A 物质的量之比为 15:1, SPC-GA 物质的量之比为 24:1, 570 W 探头超声 5 min, 设置水合温度分别为 30、35、40、45 °C 时, 制备 GT-Lip, 测定其包封率和粒径。结果 Tan II_A 包封率分别为 51.22%、45.26%、36.58%、31.81%, GA 包封率分别为 99.37%、98.12%、99.29%、99.31%; 平均粒径分别为 185.9、246.6、258.5、204.1 nm。发现随着水合温度的升高, Tan II_A 包封率下降较为明显, 而 GA 包封率变化不大, 且脂质体平均粒径变得较大。提示水浴温度升高时, 脂质成膜速度加快, 但 SPC 和 Ch 分子间不易形成致密结合; 考虑到 Tan II_A 对热不稳定, 天然磷脂遇高温会加速氧化, 降低脂质体的稳定性, 故最终选用 30 °C 作为水合温度。

2.5.2 探头超声功率的影响 固定 SPC-Ch 质量比为 6:1, SPC-Tan II_A 物质的量之比为 15:1, SPC-GA 物质的量之比为 24:1, 30 ℃ 水浴。另外为避免超声时间过长导致脂质体渗漏, 固定超声时间为 5 min, 改变探头超声功率分别为 285、380、475、570 W, 制备 GT-Lip 混悬液, 测定其包封率及粒径, 评价外观性状。结果 Tan II_A 包封率分别为 76.73%、76.61%、61.69%、45.26%, GA 包封率分别为 99.45%、98.89%、98.77%、98.12%, 平均粒径分别为 421.5、272.2、272.2、161.9 nm。表明超声功率增加有助于减小脂质体粒径, 但当超声功率升高至 475 W 以上后, GA、Tan II_A 包封率均有不同程度下降。当超声功率过高时, 会使脂质体过热, 降低脂质体的稳定性。故最终选择 380 W 超声 5 min 作为探头超声条件。

2.5.3 正交试验设计优选处方比例 为获得较优的 GT-Lip 制备条件, 以 SPC-Ch 质量比 (A)、SPC-Tan II_A 物质的量之比 (B)、SPC-GA 物质的量之比 (C) 为考察因素, 每因素设计 3 个水平进行正交试验, 选用正交表 L₉(3⁴) 安排试验。由于预试验中 GA 包封率均 > 95%, 故正交设计以 Tan II_A 包封率为主要指标, 考察最佳处方比例。正交试验设计及结果见表 1, 方差分析见表 2。

直观分析结果表明, 各因素对 Tan II_A 包封率的影响作用大小依次为 A > C > B, 最佳处方为 A₁B₃C₃。

表 1 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A	B	C	误差	Tan II _A 包封率 / %
1	6:1 (1)	15:1 (1)	16:1 (1)	(1)	68.05
2	6:1 (1)	20:1 (2)	19:1 (2)	(2)	72.23
3	6:1 (1)	30:1 (3)	24:1 (3)	(3)	79.11
4	8:1 (2)	15:1 (1)	19:1 (2)	(3)	56.63
5	8:1 (2)	20:1 (2)	24:1 (3)	(1)	67.78
6	8:1 (2)	30:1 (3)	16:1 (1)	(2)	57.16
7	10:1 (3)	15:1 (1)	24:1 (3)	(2)	64.23
8	10:1 (3)	20:1 (2)	16:1 (1)	(3)	59.58
9	10:1 (3)	30:1 (3)	19:1 (2)	(1)	67.60
K ₁	219.39	188.91	184.79	203.43	
K ₂	181.57	199.59	196.46	193.62	
K ₃	191.41	203.87	211.12	195.32	
R	37.82	14.96	26.33	9.81	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方法来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	256.673	2	14.009	P < 0.1
B	39.576	2	2.160	—
C	116.041	2	6.333	—
D (误差)	18.322	2		

$$F_{0.1}(2, 2) = 9.00 \quad F_{0.05}(2, 2) = 19.00$$

方差分析结果表明, 因素 A 对 Tan II_A 包封率影响较显著 (P < 0.1), 其他两个因素影响均不显著。考虑提高 Tan II_A 包封率至 80% 以上, 故依据极差分析结果确定最优水平组合为 A₁B₃C₃, 即 SPC-Ch 质量比为 6:1, SPC-Tan II_A 物质的量之比为 30:1, SPC-GA 物质的量之比为 24:1。

2.5.4 验证试验 按优选工艺, 制备 3 批 TG-Lip, 测定 TG-Lip 中 Tan II_A、GA 的包封率分别为 (81.50 ± 0.76) %、(98.63 ± 0.90) %, RSD 分别为 0.94%、0.91%; 平均 Zeta 电位为 (-19.00 ± 0.98) mV (n = 3) (图 1); 平均粒径为 (120.5 ± 1.62) nm (n = 3), 粒径分布均匀, 粒度圆整 (图 2、3)。

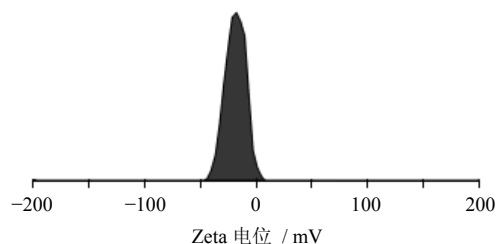


图 1 GT-Lip Zeta 电位测定结果

Fig. 1 Zeta potential of GT-Lip

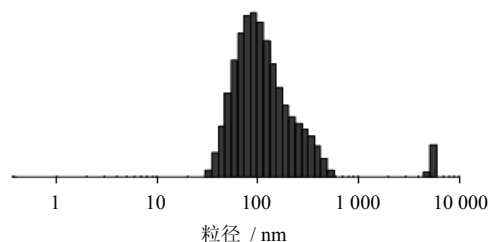


图 2 GT-Lip 粒径分布图

Fig. 2 Particle size distribution of GT-Lip

3 讨论

本课题组前期曾采用硫酸铵梯度法成功制备阿霉素-槲皮素复方脂质体, 两种药物的包封率分别为 (90.6 ± 0.61) %、(83.3 ± 0.24) % (n = 3), 主动载药法使得制备高包封率的脂质体成为可能^[14]; 本研究发现薄膜分散法包裹 Tan II_A 和 GA 两种强脂溶性

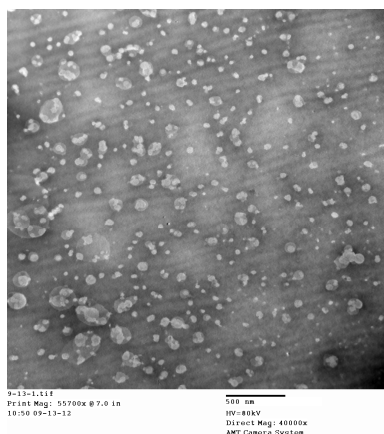


图3 GT-Lip 透射电镜照片

Fig. 3 TEM of GT-Lip

药物能获得较高包封率,同时探头超声法可有效减小脂质体粒径,故最终选用薄膜分散-探头超声法制备 GT-Lip。

由于受到载药量、包封率等因素的影响,目前脂质体所载药物多为单一成分,载体药物负荷低。近年来虽有复方脂质体的相关报道^[14-15],但均为承载两种药物、药物组成处于实验探索阶段的脂质体研究,本实验在中医配伍理论^[16]指导下,首次将临床药对丹参-甘草中所含的 Tan II_A 和 GA 两种药物构建于同一载体中,不仅使二者活血与补气的功效互惠互动,也实现了将方剂“复杂-简单-复杂”的分解与整合。

本实验发现制备过程中同时包封 Tan II_A 和 GA 较单独包封 Tan II_A 水化更完全;单独包封 Tan II_A 脂质体平均粒径为 320.15 nm, PDI=0.553,同时包封 Tan II_A 和 GA 脂质体平均粒径为 132.35 nm; PDI=0.360,粒径有所下降,且分布较均匀,提示 GA 对 Tan II_A 包封有一定的促进作用。

低速离心法分离脂质体和未包裹的药物具有操作简便、仪器要求低等优点。这种方法应用的前提是药物在缓冲液中的溶解度很小(小于投药量的 5%),则未被包封的游离药物绝大多数均以微晶状态存在,理论上在低速离心条件下应以沉淀形式析出。本实验通过前期摸索,确定了离心条件为 2 000 r/min 离心 5 min,在此条件下未包裹的药物几乎被全部沉淀,而脂质体基本无沉淀。通过加药测回收率对该低速离心方法进行考察,结果表明该方法可有效分离未包封的游离药物与脂质体。

参考文献

- [1] Farrell G C, Teoh N C. Management of chronic hepatitis B virus infection: a new era of disease control [J]. *Int Med J*, 2006, 36(2): 100-113.
- [2] 姜慧敏,田明,李萍,等.促肝细胞生长素和丹参联合穴位注射治疗肝炎肝纤维化的临床研究[J].*中西医结合肝病杂志*, 2008, 18(1): 18-20.
- [3] 蒙晓,王成蹊,蔡洪福,等.丹参酮 II_A 对腹部术后粘连大鼠成纤维细胞增殖及其相关基因表达的影响[J].*中草药*, 2012, 43(7): 1381-1384.
- [4] Takahashi K, Ouyang X, Komatsu K, *et al*. Sodium tanshinone II_A sulfonate derived from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) attenuates hypertrophy induced by angiotensin II in cultured neonatal rat cardiac cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(4): 745-749.
- [5] Lee C S, Kim Y J, Han E S. Glycyrrhizin protection against 3-morpholinosydnonime-induced mitochondrial dysfunction and cell death in lung epithelial cells [J]. *Life Sci*, 2007, 80(19): 1759-1767.
- [6] 康蕾,李学强,王凤荣. 18β-甘草次酸结构修饰及生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2012, 43(7): 1430-1442.
- [7] 黄群荣,马哲.甘草酸的药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(5): 384-387.
- [8] 侯长利.复方甘草酸苷联合丹参抗肝纤维化疗效观察 [J]. *中国药房*, 2005, 16(1): 53-54.
- [9] 李扬.复方甘草酸苷联合丹参抗肝纤维化疗效观察 [J]. *临床医药实践杂志*, 2007, 16(11): 1060-1061.
- [10] 毛欣,陆兴.美能联合丹参抗肝纤维化临床疗效观察 [J]. *实用医技杂志*, 2008, 15(31): 4403-4404.
- [11] 郭波红,程怡,林绿萍,等.甘草次酸平衡溶解度和表观油水分配系数的测定 [J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(3): 221-223.
- [12] 范广俊,范青,赵珊,等.丹参酮 II_A 理化性质的研究 [J]. *药学服务与研究*, 2008, 8(4): 295-296.
- [13] 罗世英,钟志国,林坚涛,等. HPLC 同时测定丹参水溶性 3 组分的含量 [J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(19): 1504-1506.
- [14] 陈浩,王玉蓉,孙毅坤,等.阿霉素-槲皮素复方脂质体的制备 [J]. *中医药信息*, 2011, 28(6): 14-17.
- [15] 吴燕,张福成,吴诚,等.盐酸表阿霉素-紫杉醇复方脂质体的制备 [J]. *解放军药学报*, 2010, 26(3): 216-218.
- [16] 孙洋,陈婷,徐强.从药对的角度考察复方配伍规律 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2004, 6(1): 17-21.