

· 药剂与工艺 ·

大黄酚冻干脂质体的制备工艺研究

王永利¹, 王立华¹, 张江伟², 史清文^{3*}

1. 河北北方学院应用化学研究所, 河北 张家口 075000
2. 中国石油大学(北京)提高采收率研究院, 北京 102249
3. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017

摘要: **目的** 建立大黄酚冻干脂质体的制备工艺。**方法** 采用薄膜-超声分散法制备出大黄酚脂质体悬混液, 低速离心法分离游离药物测定包封率, 考察预冻时间、干燥时间、保护剂类型、保护剂加入方式及其用量对冻干脂质体包封率的影响。**结果** 预冻时间为 24 h, 干燥时间为 24 h, 以甘露醇-蔗糖(质量比 1:1)为保护剂外加法得到的大黄酚冻干脂质体粒径均匀, 复溶性极好, 包封率达(61.30±2.2)%。**结论** 采用薄膜-超声分散法制备出大黄酚脂质体悬混液, 以甘露醇-蔗糖作保护剂, 可制得复溶性极好、包封率较高的大黄酚冻干脂质体。

关键词: 大黄酚; 冻干脂质体; 薄膜-超声分散法; 低速离心法; 包封率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)08-0960-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.008

Preparation technology of chrysophanol freeze-dried liposomes

WANG Yong-li¹, WANG Li-hua¹, ZHANG Jiang-wei², SHI Qing-wen³

1. Institute of Applied Chemistry of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China
2. Research Institute of Enhanced Oil Recovery, China University of Petroleum Beijing, Beijing 102249, China
3. School of Pharmaceutical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To establish a method for the preparation of chrysophanol freeze-dried liposomes. **Methods** The liposome suspension was prepared by film-ultrasonic dispersion method. The entrapment efficiency (EE) was determined by low-speed centrifugation and the influences of pre-freezing time, drying time, and type, dosage, and adding methods of the protective agents on EE of the freeze-dried liposome were studied. **Results** The pre-freezing time was 24 h, the drying time was 24 h, mannitol-sucrose (mass ratio 1:1) as protective agent was externally added to get uniform particle with good redissolution and the EE was (61.30 ± 2.2)%. **Conclusion** The liposome prepared by film-ultrasonic dispersion method is protected by mannitol-sucrose to get uniform particle size with the excellent redissolution and high EE.

Key words: chrysophanol; freeze-dried liposomes; film-ultrasonic dispersion method; low-speed centrifugation; entrapment efficiency

脂质体是由磷脂分子构成的双分子囊泡, 作为一种新型药物载体, 可以提高药物的靶向性、降低药物毒性和提高被包封药物的稳定性, 并且作为具有生物降解性和生物相容性载药系统, 满足了临床治疗上的许多要求, 目前脂质体制剂已得到广泛研究和应用^[1-3]。大黄酚(chrysophanol)是蓼科植物

大黄的有效成分之一, 味苦, 性寒, 具有清热解毒、泻下、抗菌、行瘀化积、消炎止血、抗肿瘤、抗衰老、调血脂等多方面功效, 极具开发价值^[4]。然而, 大黄酚作为脂溶性药物很难做成注射剂等常用制剂, 此外还有性质不稳定、易被氧化等缺点, 所以在临床应用上受到了很大的限制。将大黄酚包覆在磷脂

收稿日期: 2012-09-24

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划项目(12276104D-94); 河北北方学院自然科学基金项目(Q201112)

作者简介: 王永利(1981—), 男, 硕士, 副教授, 主要从事有机化学和药物化学研究工作。E-mail: fangyuanguiju@163.com

*通信作者 史清文(1964—), 男, 博士生导师, 教授, 博士, 主要从事天然药物活性成分研究工作。

网络出版时间: 2013-03-01 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130301.1553.005.html>

膜中做成脂质体制剂,可以很好地解决上述问题。

普通脂质体为液体制剂,易发生粒子聚集沉降、磷脂氧化分解、包封药物渗漏等问题,导致脂质体不够稳定,一般只能贮存几周。应用真空冷冻干燥技术制备冻干脂质体是目前解决液体脂质体不能长期储存、提高脂质体稳定性的最佳方法,冻干制剂特有的疏松多孔结构,可以使药物易于重新复水而恢复活性,而且冻干制剂含水量低,易长期稳定保存,可以有效避免脂质体以水溶液方式贮存的氧化、水解、聚集、分层、药物的渗漏等问题^[5]。将大黄酚做成冻干脂质体制剂可以有效、针对性地解决其临床应用缺点,推动大黄酚脂质体的应用。

本实验主要通过筛选适合大黄酚脂质体的冻干保护剂,研究大黄酚冻干脂质体的最优制备工艺,并选择大黄酚冻干脂质体复水后的粒径、Zeta 电位、包封率等指标,考察了冻干品的制剂质量。

1 仪器与材料

722S 型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);RE52—99 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);SHZ-D (III) 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司);800 型离心沉淀器(上海手术器械厂);ALC—210.4 电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);CX—250 超声波清洗器(北京医疗设备工厂);Modul YOD—230 型冷冻干燥器(美国热电公司)。

大黄酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110796-200716);大黄酚试品(质量分数为 98%,江苏省淮安市魏伟植化研究所);卵磷脂(北京华清美恒天然产物技术开发有限公司,批号 20100509);胆固醇(批号 76C10150,北京鼎国生物技术有限责任公司);聚乙二醇 2000 (PEG 2000,北京鼎国生物技术有限责任公司);维生素 E(上海蓝季科技发展有限公司);其他材料均符合药用规格,其他试剂均为色谱纯或分析纯。

2 方法与结果

2.1 大黄酚冻干脂质体的制备^[6-7]

称取卵磷脂 30.0 mg、胆固醇 10.0 mg、维生素 E 10.0 mg、PEG 2000 10.0 mg、大黄酚 3.0 mg 放入 50 mL 烧杯中,加入 10 mL 无水乙醇超声至形成均一溶液,60 °C 水浴下搅拌至完全溶解。将溶液转移至 500 mL 茄形瓶中,放入滚珠,水浴 45 °C 下旋转 15 min,缓慢减压使有机溶剂蒸出,使壁上形成均匀薄膜,待膜形成稳定后减压至 0.09 MPa 并保持

30 min,将有机溶剂蒸干后使系统缓慢恢复至大气压。加入 10 mL Tris 缓冲溶液,40 °C 水浴温度振荡水化 2 h,使膜脱落形成脂质体悬浊液,冰水浴中超声至形成水性悬浊液,加入冻干保护剂,溶解摇匀后即得脂质体混悬液。

将所得脂质体悬浊液转移到 10 mL 量瓶中,定容后用移液管准确移取 2.5 mL 溶液转移至样品瓶中,并将样品放置在-26 °C 下冰箱中进行预冻 24 h。预冻完后减压至 80 Pa,在-55 °C 条件下冷冻干燥 24 h,即得大黄酚冻干脂质体。冻干脂质体粉末加入缓冲液至冻干前的体积,充分溶解摇匀后即得重建脂质体。

2.2 冻干脂质体包封率的测定^[8]

2.2.1 检测波长的选择 分别精密量取适量空白脂质体、大黄酚于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容后待用。以甲醇为参比,在波长 200~700 nm 扫描,结果在波长 428 nm 处,膜材对游离大黄酚的测定无干扰。

2.2.2 线性关系考察 精密称取 7.5 mg 大黄酚对照品,用色谱纯甲醇溶解后转入 100 mL 量瓶中定容,配制得到 75 μg/mL 大黄酚对照品溶液,准确移取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mL 溶液于 25 mL 量瓶中,用色谱纯甲醇逐级稀释制成 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 μg/mL 对照品溶液,以色谱纯甲醇为空白对照,用 722S 型可见分光光度计在波长 428 nm 处分别测定吸光度(A)值,以质量浓度(C)对 A 值进行线性回归,得回归方程 $A=0.0427C+0.0212$, $r=0.9999$,结果表明,大黄酚在 3~30 μg/mL 与溶液 A 值线性关系良好。

2.2.3 精密度试验 取质量浓度为 12、15、18、21、24 μg/mL 大黄酚对照品溶液,分别隔一段时间测定其 A 值,测量 3 次,结果其 RSD 分别为 0.1%、0.0%、0.0%、0.06%、0.06%,结果表明仪器的精密度良好。

2.2.4 回收率试验 称取处方量的卵磷脂、胆固醇、维生素 E、PEG 2000,采用薄膜-超声法在最优工艺条件下制备空白脂质体。分别精密量取 9 份空白脂质体 0.5 mL 于 9 个 5 mL 量瓶中,再分别精密移取 1.0、1.5、2.0 mL 质量浓度为 18 μg/mL 的大黄酚对照品加入量瓶中,用色谱纯甲醇稀释至刻度,摇匀,得到 3 种质量浓度的样品溶液各 3 组,于 428 nm 波长处分别测定 A 值,各质量浓度平行测定 3 次,计算大黄酚的平均回收率为 100.6%,RSD 为 0.35%,表明膜材及辅料等对测定无干扰。

2.2.5 冻干脂质体包封率的测定 取大黄酚冻干脂质体样品,加 2.5 mL 缓冲溶液溶解,转移至离心试管中,1 000 r/min 离心 6 次,每次 20 s,加一定量甲醇溶解后,以甲醇作参比溶液,在 428 nm 处测定 A 值,带入回归方程求得大黄酚的质量浓度,进而计算出大黄酚脂质体的包封率。

包封率 = 脂质体中被包封大黄酚的量 / 脂质体溶液中
大黄酚的总量

2.3 大黄酚冻干脂质体制备工艺的建立

冻干过程一般分为以下 3 步:预冻、升华干燥、解吸干燥,冻干过程的每 1 个步骤对冷冻干燥的效果和冻干产品的质量均有重要影响,下面就几个重要因素进行了单因素考察。

2.3.1 预冻时间的考察 适宜的预冻时间可以确保抽真空之前全部样品均已冻实。本试验考察在冰箱中预冻,预冻时间分别为 12、24、36 h,比较冻干产品的外观,结果分别为微松淡黄色、疏松饱满淡黄色、疏松饱满淡黄色。结果表明,预冻时间在 24 h 以上则表面平整饱满,所以本实验采用预冻时间为 24 h。

2.3.2 干燥时间的考察 干燥分为升华干燥和解吸干燥,第 1 阶段升华干燥排出全部冰晶,约除去全部水分的 95%。第 2 阶段解吸干燥主要是除去少部分结晶水和吸附于固体物质晶格间隙中或以氢键方式结合在一些极性基团上的结合水,这部分结合水吸附能高,必须提供足够的能量(包括足够的温度和足够的真空度)才能将其解吸出来。第 2 阶段干燥除去的结晶水和结合水占全部水分的 5%,占总干燥时间的 20%。

在实际操作中,很难界定产品的 2 个干燥过程,另外由于本实验条件有限,在解吸阶段无法人为升高样品温度,因此所考察的干燥时间为两阶段的总干燥时间。本实验分别考察了干燥 16、20、24、28、32 h 时所得产品的外观和包封率,结果产品外观分别为有冰晶残留、疏松多孔、饱满、饱满、饱满,包封率分别为 43.55%、53.65%、59.96%、58.86%、60.33%。结果表明,当干燥时间大于 24 h 时,所得到的产品外观和包封率无显著变化,故选择 24 h 为总干燥时间。

2.3.3 冻干保护剂处方筛选 脂质体在冻干过程中产生冰晶,对脂质体囊泡会产生破坏作用,使其各项理化性质发生变化,因此,为了保证冻干前后脂质体的性质保持不变,需要加入冻干保护剂。对于

脂质体的冻干,至今还没有找到普遍的规律,一般用糖类物质作保护剂,主要包括蔗糖、乳糖、麦芽糖、海藻糖、葡萄糖等;另有一部分醇类,如山梨醇、甘露醇等,不同种类和不同用量的冻干保护剂对冻结过程中脂质体的保护效果不同。本试验考察了各种保护剂单独及联合使用时,对冻干产品的影响情况。

(1) 单一冻干保护剂的保护效果考察:本试验固定磷脂与保护剂质量比 1:8,冻干保护剂的添加方式为外加,对保护剂种类进行了筛选,以冻干产品的外观、复溶时间及包封率为评价指标,考察了不同保护剂对冻干产品的保护作用,结果见表 1。结果表明,甘露醇单独使用时,冻干品外观松散饱满,并且复溶速率很快,但冻干脂质体的包封率不高;山梨醇单独使用时,虽然包封率较高,但外观不能满足要求;葡萄糖、麦芽糖的包封率和复溶时间也能满足要求,但考虑到外观,效果并不理想。所以考虑采用冻干保护剂联用,以期各种保护剂实现“取长补短”,达到更好的保护效果。

表 1 单一保护剂对产品外观、复溶时间及包封率的影响

Table 1 Effect of single protective agent on product appearance, redissolution time, and EE

保护剂	外观	复溶时间 / s	包封率 / %
海藻糖	塌陷橙红	240	41.31
葡萄糖	塌陷橙黄	90	62.55
麦芽糖	塌陷橙红	60	62.89
乳糖	塌陷浅橙红	120	44.71
蔗糖	松散浅橙红	60	52.63
果糖	塌陷橙红	80	35.89
甘露醇	饱满粉黄	20	46.69
山梨醇	塌陷橙红	120	64.18

(2) 两种保护剂联用的保护效果考察:固定磷脂与保护剂($m_{\text{保护剂1}}-m_{\text{保护剂2}}$ 为 1:1)质量比 1:8,冻干保护剂的添加方式为外加,对两种保护剂联用的效果进行了筛选。以冻干制品的外观、复溶时间及包封率为评价指标,考察了各种保护剂对冻干制品的保护作用,结果见表 2。以上结果表明,甘露醇和蔗糖联用制得的冻干脂质体外观较好,复溶速率很快,包封率可达 61.30%,效果较好。

2.3.4 冻干保护剂的加入方式考察 冻干保护剂的加入方式分为内加和外加。在脂质体的制备过程中,将保护剂加至水化介质内称之为内加,外加则是将

表2 两种冻干保护剂联用对产品外观、复溶时间及包封率的影响

Table 2 Combination of two freeze-dried protective agents on product appearance, redissolution time, and EE

保护剂	外观	复溶时间 /s	包封率 /%	保护剂	外观	复溶时间 /s	包封率 /%
海藻糖-果糖	塌陷橙红	90	43.67	甘露醇-山梨醇	松散橙红	120	47.10
海藻糖-甘露醇	塌陷橙红	30	45.07	甘露醇-葡萄糖	松散橙黄	70	35.86
海藻糖-麦芽糖	塌陷橙红	40	52.57	甘露醇-蔗糖	饱满橙黄	40	61.30
海藻糖-山梨醇	塌陷橙红	120	56.63	甘露醇-乳糖	松散橙黄	60	37.42
海藻糖-葡萄糖	塌陷橙黄	150	55.22	麦芽糖-山梨醇	塌陷橙红	70	35.24
海藻糖-蔗糖	塌陷橙红	120	54.63	麦芽糖-葡萄糖	塌陷橙黄	80	57.82
海藻糖-乳糖	塌陷橙红	100	47.57	麦芽糖-蔗糖	塌陷橙红	50	52.26
果糖-甘露醇	塌陷橙红	40	48.04	麦芽糖-乳糖	塌陷橙红	140	34.77
果糖-麦芽糖	塌陷橙红	80	53.82	山梨醇-葡萄糖	塌陷橙黄	40	38.20
果糖-山梨醇	塌陷橙红	90	57.72	山梨醇-蔗糖	塌陷橙红	120	43.04
果糖-葡萄糖	塌陷橙黄	50	51.63	山梨醇-乳糖	塌陷橙红	240	37.89
果糖-蔗糖	塌陷橙红	180	34.61	葡萄糖-蔗糖	塌陷橙红	120	38.20
果糖-乳糖	塌陷橙红	90	32.58	葡萄糖-乳糖	塌陷橙红	80	35.71
甘露醇-麦芽糖	松散橙红	20	28.37	蔗糖-乳糖	塌陷橙黄	60	37.42

保护剂加至已制备好的脂质体混悬液中。本试验以冻干产品的外观、再分散性为评价指标,考察了加入方式对冻干制品的影响,结果采用内加和外加方式,产品外观均平整饱满,容易再分散。结果表明内加和外加两种方式对冻干制品的影响不大,这可能是因为无论内加还是外加,冻干保护剂都会通过膜扩散,保证内外水相都有保护剂的存在。又因为内加保护剂在脂质体水化时容易造成脂质体聚集结块,导致药物损失,所以本试验最后选择以外加的方式加入保护剂。

2.3.5 冻干保护剂用量的考察 本试验考察甘露醇-蔗糖不同用量对冻干脂质体的外观、复溶时间及包封率 3 个方面的影响。结果发现,磷脂与甘露醇-蔗糖的用量比例为 1:8 时,脂质体的外观饱满,复溶较好,当甘露醇-蔗糖用量再增加时,外观没有显著改善,磷脂与甘露醇-蔗糖的用量比例大于为 1:8 时,外观塌陷,再分散性一般,保护剂比例再小则不能完全保护脂质体内包封药物,再大则产品包封率并没有显著提高,结果见表 3。

2.4 大黄酚冻干脂质体复溶方式的考察

2.4.1 复溶介质的考察 脂质体冻干粉复溶介质可以是蒸馏水、缓冲溶液、生理盐水。本试验以单位时间内冻干脂质体溶解程度为指标,对复溶介质进行了考察,结果以缓冲溶液为复溶介质时,溶解速率最快,且复溶程度最好,以蒸馏水为复溶介质时,复溶程度最差。

表3 保护剂用量对脂质体外观、复溶时间及包封率的影响

Table 3 Effect of protective agent dosage on product appearance, redissolution time, and EE

磷脂-保护剂	外观	复溶时间 /s	包封率 /%
1:2	塌陷橙红色	有残留	47.54
1:4	塌陷橙黄色	极少残留	52.32
1:6	松散橙黄色	70	55.36
1:8	饱满橙黄色	40	60.89
1:10	饱满橙黄色	20	61.20
1:12	饱满橙黄色	20	60.11

2.4.2 复溶时间的考察 按冻干前体积 1:1 比例向大黄酚冻干脂质体中加入复溶介质缓冲溶液,加入后立即采用简单的手工振荡,振荡时间分别为 0.5、1、1.5、2、2.5、3 min,发现 3 min 之内冻干粉已完全分散,则无需再延长振荡时间。

2.4.3 复溶温度的考察 按冻干前体积 1:1 比例向冻干脂质体中加入复溶介质缓冲溶液,1 份于室温手工振荡,另 1 份于 40 °C 水浴上进行振荡,且维持此温度 3~5 min,所得脂质体乳液外观都均匀,测得两者的包封率基本一致,无明显差异。可见复溶温度对于本实验所制备的冻干脂质体性质并无影响,因此选择室温下复溶,方法简单,使用方便。

2.5 大黄酚冻干脂质体的质量评价

2.5.1 外观形状及粒径 经薄膜-超声-冷冻干燥法制备的大黄酚脂质体冻干品外观饱满,可见明显的疏松结构,呈橙黄色。取适量制备的大黄酚冻干粉

质体样品于激光散射仪中, 测定脂质体的大小及粒径分布, 由测定结果可知, 样品的平均粒径 420~750 nm, 粒径均匀, 且脂质体粒径均小于 2 μm 。

2.5.2 Zeta 电位的考察 Zeta 电位的重要意义在于其数值与分散体系的稳定性相关。Zeta 电位是对颗粒之间相互排斥或吸引力强度的度量, 分子或分散粒子越小, Zeta 电位(正或负)越高, 体系越稳定。在室温条件下, 取少量冻干前和冻干后复溶的大黄酚脂质体混悬液适量, 稀释相同的倍数, 用 ZD-2 电位测定仪测定其 Zeta 电位, 每个样品重复测定 3 次, 结果表明, 大黄酚脂质体冻干前与复溶后 Zeta 电位分别为 (-237 ± 15) mV 和 (-255 ± 18) mV, 经过冻干过程脂质体体系的稳定性没有降低。

3 小结

本实验将所制备大黄酚脂质体进行了冷冻干燥, 结合实验条件, 对主要工艺影响因素进行了考察, 确定了大黄酚冻干脂质体的最优工艺。

(1) 本实验优选的最佳制备工艺条件为预冻温度 -26 $^{\circ}\text{C}$ 、预冻时间为 24 h, 合适的冻干保护剂为甘露醇-蔗糖, 干燥时间为 24 h。

(2) 筛选了冻干保护剂的处方, 发现单一冻干保护剂难以满足脂质体体系的需要。对于大黄酚脂质体, 甘露醇和蔗糖联用的效果较好, 磷脂与甘露醇-蔗糖质量比为 1:8 是冻干保护剂的最佳用量。

(3) 本实验制得的冻干脂质体可见明显的疏松结构, 外形饱满, 呈橙黄色; 复溶后样品的平均粒径 420~750 nm, 粒径均匀, 且脂质体粒径均小于 2 μm ; 冻干复溶后大黄酚脂质体的 Zeta 电位为 -255 mV, 与冻干前 -237 mV 相比略有上升, 体系稳定性没有降低; 冻干品复溶性极好, 约 40 s 即可溶解

完全, 包封率较高为 (61.30 ± 2.2) %。

4 讨论

由于冻干体系成分复杂, 单一的冻干保护剂很难满足需要, 可以考虑各冻干保护剂的联合使用, 以实现“取长补短”。

目前, 大部分关于脂质体的研究主要是集中利用其靶向性, 本实验利用磷脂对脂溶性药物大黄酚的包覆, 促进了药物在水性介质中的分散, 同时也增加药物的稳定性, 针对性地解决了大黄酚临床使用中的一些缺点, 具体的药效学和药理学研究还需进行动物实验, 本实验为其他脂溶性药物开发提供了新的研究途径。

参考文献

- [1] 谢红兵, 何宗卫, 王梅. 脂质体及其在中药制剂中的应用研究进展 [J]. 海峡药学, 2009, 21(7): 28-32.
- [2] 蒲宝婵, 赵骏, 邱超, 等. 复乳法制备龙胆苦苷脂质体 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(6): 428-431.
- [3] 孙歆慧, 王征, 曾婧娉. pH 值敏感型脂质体表面修饰技术的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(6): 619-623.
- [4] 李淑娟, 李春更, 侯勇, 等. 大黄酚抗衰老作用研究进展 [J]. 河北北方学院学报: 医学版, 2009, 26(1): 69-71.
- [5] 胥传来, 乐国伟, 姚惠源, 等. 冷冻干燥对 PST 脂质体包封率的影响 [J]. 中国油脂, 2002, 27(4): 58-60.
- [6] 王永利, 张明媚, 李维爽, 等. 大黄酚脂质体的制备工艺研究 [J]. 中国新药杂志, 2011, 20(9): 825-827.
- [7] 王永利, 王立华, 李维爽, 等. 大黄酚脂质体的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1119-1121.
- [8] 李琅琅, 王文喜, 牛泱平. 低速离心法测定荧光红 GG 脂质体包封率 [J]. 浙江工业大学学报, 2009, 37(5): 535-537.