

正交试验优选蛇鳞草-大黄固体脂质纳米粒制备工艺

钟希文^{1*}, 王贤儿², 吴惠妃¹, 汪亚飞², 张文霞¹

(1. 中山市中医院, 广东 中山 528400; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] 目的: 制备蛇鳞草-大黄固体脂质纳米粒并考察其形态。方法: 采用 HPLC 测定三羽新月蕨苷 A 和大黄素含量, 流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)-水(C)梯度洗脱(0~35 min, 15%~75% A, 25% B, 60%~0% C), 检测波长 226 nm。利用薄膜超声法制备蛇鳞草-大黄固体脂质纳米粒, 在单因素试验基础上, 以三羽新月蕨苷 A 和大黄素包封率为综合评价指标, 采用正交试验优选处方。结果: 最佳处方为加药量 150 μ L, 硬脂酸-卵磷脂质量比 1:2, 吐温-80 质量分数 1%; 纳米粒平均粒径 (301 \pm 2.8) nm, Zeta 电位 (-19.94 \pm 3.82) mV, 三羽新月蕨苷 A 和大黄素包封率分别为 61.8% 和 81.2%。结论: 制备的蛇鳞草-大黄固体脂质纳米粒基本呈规则球形或类球形, 该工艺稳定可行。

[关键词] 蛇鳞草; 大黄; 固体脂质纳米粒; 大黄素; 薄膜超声法; 三羽新月蕨苷 A

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0015-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190015

Optimization of Preparation Technique of *Prpnephrium triphyllum*-*Rheum officinale* Solid Lipid Nanoparticles by Orthogonal Test

ZHONG Xi-wen^{1*}, WANG Xian-er², WU Hui-fei¹, WANG Ya-fei², ZHANG Wen-xia¹

(1. Hospital of Traditional Chinese Medicine of Zhongshan, Zhongshan 528400, China;
2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare *Prpnephrium triphyllum*-*Rheum officinale* solid lipid nanoparticles and investigate its morphology. **Method:** HPLC was adopted to determine contents of emodin and triphyllin A with mobile phase of acetonitrile-0.1% formic acid-water for gradient elution and detection wavelength at 226 nm. Film-ultrasonic wave dispersion technique was used to prepare *P. triphyllum*-*R. officinale* solid lipid nanoparticles, on the basis of single factor tests, orthogonal test was employed to optimize preparation technique by taking entrapment efficiencies of emodin and triphyllin A as comprehensive evaluation index. **Result:** Optimal formulation was as following: extract of *P. triphyllum*-*R. officinale* 150 μ L, stearic acid-soybean lecithin (1:1), tween-80 of 1.0%; mean particle size diameter was (301 \pm 2.8) nm, Zeta potential was (-19.94 \pm 3.82) mV, entrapment efficiencies of triphyllin A and emodin was 61.8% and 81.2%, respectively. **Conclusion:** These prepared *P. triphyllum*-*R. officinale* solid lipid nanoparticles show spherical, this preparation process is stable and feasible.

[Key words] *Pronephrium triphyllum*; *Rheum officinale*; solid lipid nanoparticles; emodin; film-ultrasonic wave dispersion technique; triphyllin A

蛇鳞草为我国岭南地区特色药材,具有清热解毒、散瘀消肿、化痰止咳等功效。前期研究表明蛇鳞草具有良好的抗炎镇痛效果^[1],治疗痈疮疔肿、湿

疹、皮肤瘙痒等疗效显著^[2]。中山市中医院内以蛇鳞草为主药的制剂均为临床使用多年的特色用药,但多为制备粗糙且具有一定缺点的散剂或膏剂,临

[收稿日期] 20140526(010)

[基金项目] 广东省中山市科技计划立项项目(20132A161)

[通讯作者] *钟希文,主任中药师,教授,从事新药开发与中药药理研究, Tel:0760-88815106, E-mail: zszxw@163.com

床使用存在诸多不便,而且缓解患者伤口疼痛的持续效果不佳,副作用多。本实验将蛇鳞草与抗炎镇痛效果明显的大黄进行组合,制备固体脂质纳米粒,通过正交试验优选制备工艺并进行形态学考察,为改善蛇鳞草制剂的临床疗效和安全性奠定基础。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),GL-20G-II 型低温超速离心机(上海安亭科技仪器厂),BS224S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),PALS 型 Zeta 电位及激光粒度分析仪(美国 Brookhaven 公司),Tecnai 型高分辨透射电镜(荷兰 FEI 公司)。

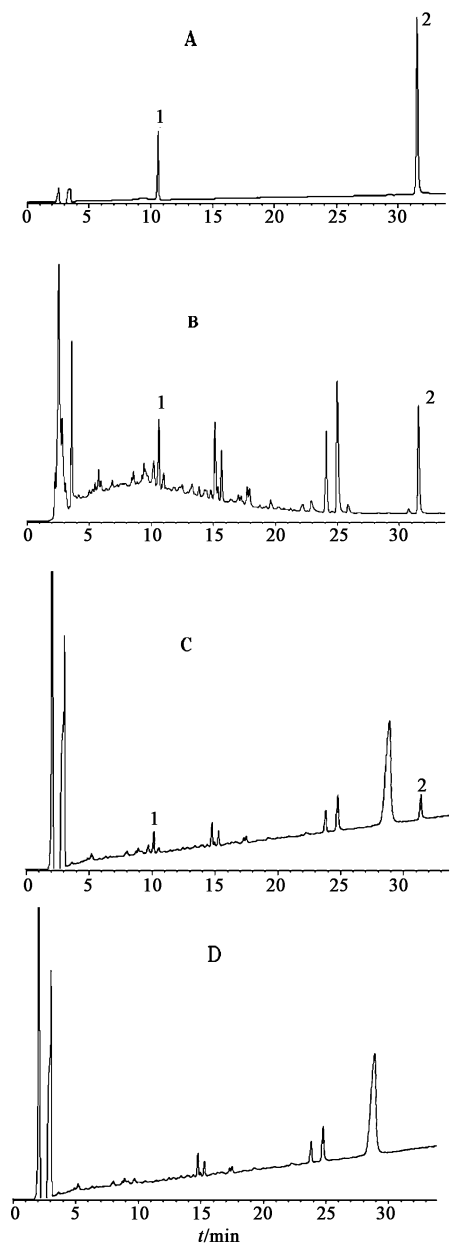
蛇鳞草采自中山市五桂山,大黄购自广东省中山市中智药业公司,经广东药学院田素英教授鉴定分别为金星蕨科植物三羽新月蕨 *Pronephrium triphyllum* (Sw.) Holtt. 的干燥全草,蓼科植物药用大黄 *Rheum officinale* Baill. 的干燥根和根茎;三羽新月蕨苷 A 对照品(triphyllin A, 自制,经波谱分析鉴定纯度 >98%),大黄素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110756-200110),蛇鳞草-大黄提取物(自制,采用 95% 醇提取,浓缩成 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的提取液),硬脂酸(天津市大茂化学试剂厂),大豆卵磷脂(武汉胜天宇生物技术有限公司),聚山梨酯-80(tween-80,广州医药站化学试剂公司),乙腈、甲醇为色谱纯,水为屈臣氏蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 蛇鳞草-大黄固体脂质纳米粒的制备 采用薄膜超声法^[3]制备。按一定比例称取硬脂酸和卵磷脂,置于圆底烧瓶中,加入适量无水乙醇,50 °C 水浴加热使其溶解,精密加入蛇鳞草-大黄提取液,超声 5 min,于 60 °C 恒温下减压回收溶剂成膜附壁,另取适量 1% tween-80 置于成膜的圆底烧瓶中,旋转将膜洗下,超声处理 50 min,过 0.80 μm 滤膜,除去大颗粒物质及无法包封的杂质,得蛇鳞草-大黄固体脂质纳米粒(solid lipid nanoparticles, SLN)混悬液。

2.2 triphyllin A 和大黄素的含量测定

2.2.1 色谱条件 Dikma Diamonsil (2) C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)-水(C)梯度洗脱(0 ~ 35 min, 15% ~ 75% A, 25% B, 60% ~ 0% C),流速 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 226 nm,进样量 20 μL。理论塔板数按 triphyllin A 峰和大黄素峰计算不低于 3 000,见图 1。



A. 混合对照品; B. 蛇鳞草-大黄混合药液; C. 供试品;
D. 空白-SLN; 1. triphyllin A; 2. 大黄素
图 1 蛇鳞草-大黄固体脂质纳米粒 HPLC

2.2.2 标准曲线绘制 精密量取 triphyllin A 和大黄素对照品 0.002 5, 0.003 8 g, 置于同一 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解,超声片刻,定容,得混合对照品贮备液。精密吸取该贮备液 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 mL, 分别置于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,得系列混合对照品溶液,按 2.2.1 项下方法测定,以峰面积积分值对质量浓度进行线性回归,得回归方程分别为 $Y = 35\ 157X - 62.049$ ($r = 0.999\ 9$), $Y = 63\ 987X + 47.640$ ($r = 0.999\ 9$), 线性范围依次为 2 ~ 80, 3.04 ~ 121.6 mg · L⁻¹。

2.2.3 供试品溶液及阴性样品溶液的制备 精密吸取蛇鳞草-大黄 SLN 混悬液 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加入适量甲醇,于 70 °C 水浴破乳 10 min,放冷至室温,加甲醇定容,过 0.45 μm 滤膜,得供试品溶液。按 2.1 项下方法制备不含药物的空白 SLN 混悬液,按供试品溶液制备方法制备,得阴性样品溶液。

2.2.4 精密度和回收率 精密吸取同一对照品溶液,按 2.2.1 项下方法连续进样 6 次,结果 triphyllin A 和大黄素峰面积的 RSD 分别为 0.61% ,0.59% ,表明仪器精密度良好。制备空白 SLN 混悬液 3 份,精密量取 1 mL,分别精密加入不同质量浓度的混合对照品贮备液(低质量浓度贮备液含 0.01 g·L⁻¹ triphyllin A 和 0.076 g·L⁻¹ 大黄素,中质量浓度贮备液含 0.04 g·L⁻¹ triphyllin A 和 0.060 8 g·L⁻¹ 大黄素,高质量浓度贮备液含 0.08 g·L⁻¹ triphyllin A 和 0.121 6 g·L⁻¹ 大黄素),按 2.2.1 项下方法测定,计算 triphyllin A 对照品低、中、高 3 个质量浓度的加样回收率分别为 100.2% ,100.9% ,99.8% ,RSD 依次为 0.55% ,0.95% ,0.88% ;大黄素对照品低、中、高 3 个质量浓度的加样回收率分别为 100.3% ,

100.2% ,99.6% ,RSD 分别为 1.11% ,1.30% ,0.96% ,表明 SLN 辅料对样品的测定无干扰且回收率好。

2.3 包封率的测定 采用低温超速离心法测定包封率。精密量取蛇鳞草-大黄 SLN 混悬液 0.5 mL 置于干燥洁净的超滤离心管,离心半径 5.8 cm,于 15 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取下层澄清液置于 5 mL 量瓶中,加甲醇定容,过 0.45 μm 微孔滤膜,按 2.2.1 项下方法测定游离药物的质量浓度(C_1);另取等量的 SLN 混悬液置于 5 mL 量瓶中,加甲醇水浴超声破乳 10 min,过 0.45 μm 微孔滤膜,同法测定药物总质量浓度(C_2),按 $(C_2 - C_1)/C_2 \times 100\%$ 分别计算 triphyllin A 和大黄素的包封率。

2.4 处方优选 在预试验基础上,选取加药量、硬脂酸和卵磷脂质量比、tween-80 质量分数为考察因素,以 triphyllin A 和大黄素的包封率为综合评价指标,因为 triphyllin A 和大黄素在复方药液中质量分数分别为 0.05% 和 0.07% ,故确定二者权重系数分别为 0.05 和 0.07,采用 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

表 1 蛇鳞草-大黄的固体脂质纳米粒处方正交试验安排及直观分析

No.	A 加药量/μL	B 硬脂酸-卵磷脂	C tween-80/%	D(空白)	包封率/%		综合评分
					triphyllin A	大黄素	
1	100	2:1	1	1	42.2	79.1	7.647
2	100	1:1	1.5	2	45.2	84.9	8.203
3	100	1:2	2	3	44.2	91.3	8.601
4	150	2:1	1.5	3	51.0	75.1	7.807
5	150	1:1	2	1	55.8	80.1	8.397
6	150	1:2	1	2	61.5	80.4	8.703
7	200	2:1	2	2	60.0	60.6	7.242
8	200	1:1	1	3	57.4	77.1	8.267
9	200	1:2	1.5	1	61.4	78.4	8.558
K_1	8.15	7.57	8.21	8.2			
K_2	8.31	8.29	8.19	8.05			
K_3	8.02	8.62	8.08	8.23			
R	0.29	1.05	0.13	0.18			

表 2 综合评分方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	0.121	0.061	2.116	>0.05
B	1.747	0.873	30.455	<0.05
C	0.031	0.016	0.542	>0.05
D(误差)	0.057	0.029		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,各因素对综合评分的影响程度为 $B > A > C$ 。方差分析显示因素 B 对 triphyllin A 和大黄素包封率的影响显著,具有统计学意义;而其他因素则无显著性影响,故选择最佳处方 $A_2B_3C_1$,即加药量 150 μL,硬脂酸-卵磷脂(1:2),tween-80 质量分数 1%。按最佳条件平行制备 3 批蛇鳞草-大黄

SLN, 结果 triphyllin A 和大黄素的平均包封率分别为 61.8% (RSD 1.06%) 和 81.2% (RSD 1.12%), 说明该条件重复性较好。

2.4 蛇鳞草-大黄 SLN 形态学考察

2.4.1 外观形状 本品为棕黄色乳状混悬液, 晃动后有乳光产生。

2.4.2 形态观察、粒径及电位的测定 取按优化处方制备的蛇鳞草-大黄 SLN 混悬液 0.1 mL, 加水稀释 600 倍, 取 1 滴, 用覆有支持膜的铜网蘸取后, 以 1.5% 磷钨酸钠负染, 室温待自然干燥, 在透射电镜下观察, 发现蛇鳞草-大黄 SLN 大小均匀, 基本呈规则球形或类球形, 见图 2。另取蛇鳞草-大黄 SLN 混悬液按一定比例稀释后, 置于激光粒径测定仪中测定粒径大小、粒径分布以及 Zeta 电位, 结果显示平均粒径 (301 ± 2.8) nm, Zeta 电位 (-19.94 ± 3.82) mV, 见图 3。

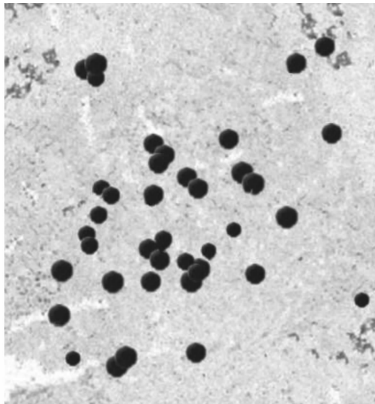


图2 蛇鳞草-大黄 SLN 混悬液 TEM ($\times 60\ 000$)

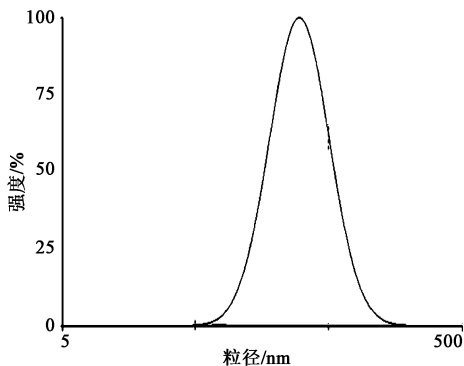


图3 蛇鳞草-大黄 SLN 混悬液粒径分布

3 讨论

前期研究已对蛇鳞草的有效物质基础进行系统研究, 发现 triphyllin A 活性和含量均较高, 为黄烷醇苷类成分, 具有一定代表意义^[4-5]; 大黄则选取抗炎药效学确切的大黄素为指标^[6]。目前以提取物或

复方作为模型药物的 SLN 研究较少, 预试验发现该方式具有一定的可行性, 并且符合院内制剂大批量生产的原则; 但在剂型制备过程中, 存在着某些成分无法包封而析出现象, 故最后采用滤膜对其进行除杂, 同时不影响 triphyllin A 和大黄素的包封率。根据 SLN 本身的结构特点推测, 极性较小的大黄素有可能包裹在纳米粒内, 而极性较大的 triphyllin A 则可能吸附在纳米粒表面, 因而前者的包封率相对较大。

根据模型药物本身的极性特点, 预试验对制备方法进行了考察, 包括薄膜超声法、水性溶剂扩散法、微乳法及高温乳化-低温固化法, 结果表明水性溶剂扩散法不适用于制备, 制得的 SLN 稳定性极差; 而微乳法及高温乳化低温固化法耗时较长, 制备相对繁琐, 且制得的 SLN 粒径较大, 达 500 ~ 600 nm; 故采用制备较为简单、可行性较好的薄膜超声法, 结果证明该法制得的 SLN 稳定性较好, 指标成分的包封率较高且粒径相对较小, 可用于经皮给药。

制备的蛇鳞草-大黄 SLN 为黄棕色带乳光的混悬液, 预试验考察了不同比例的硬脂酸和卵磷脂, 结果显示当表面活性剂卵磷脂用量较高 (1:2) 时, 制得的 SLN 性质相对稳定, 而当脂质材料比例增加 (3:1) 时, SLN 混悬液极不稳定, 静置 2 d 即开始分层以及药物析出, 故为了增加纳米粒稳定性且更适用于皮肤给药, 可能在工艺的最后将其采用冷冻干燥、喷雾干燥等方法进行保存或分散在凝胶基质中。

[参考文献]

- [1] 钟希文, 梅全喜, 林慧, 等. 蛇鳞草抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 山西中医学院学报, 2009, 10(6): 14.
- [2] 周岁锋, 缪英年, 钟希文. 蛇黄散凝胶剂治疗虫咬皮炎临床观察[J]. 中国中医急症, 2013, 22(12): 2116.
- [3] 刘红梅, 褚惠媛, 崔金霞, 等. 薄膜-超声分散法制备 β -榄香烯固体脂质纳米粒[J]. 中草药, 2008, 39(2): 193.
- [4] 钟希文, 张文霞, 曾聪彦, 等. 紫外分光光度法测定蛇鳞草根茎和叶中总黄烷醇苷的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(23): 2176.
- [5] 钟希文, 汪亚飞, 梅全喜, 等. 正交试验优选蛇鳞草中 triphyllin A 的提取工艺[J]. 中药材, 2013, 36(11): 1858.
- [6] 黄伟锋. 大黄素的药理作用研究进展[J]. 柳州医学, 2013, 26(4): 241.

[责任编辑 刘德文]