

# 龙胆苦苷纳米脂质载体的制备和性质表征

张坤驰,吕邵娃,刘卢,李欣,李永吉\*

(黑龙江中医药大学药学院,哈尔滨 150040)

**[摘要]** **目的:**制备龙胆苦苷纳米脂质载体(GEN-NLC),进行性质表征及稳定性、体外释放情况考察。**方法:**采用溶剂分散法制备 GEN-NLC,以粒径、Zeta 电位及包封率为指标,考察固/液脂质的比例、药脂比、表面活性剂种类及浓度等对 GEN-NLC 制备工艺的影响,通过透射电镜观察其形态,并进行稳定性、体外释药考察。**结果:**最佳处方为选用 0.1% 泊洛沙姆 188 为表面活性剂,药脂比 1:10,液态脂质的比例 10%。制备的 GEN-NLC 包封率( $38.19 \pm 1.61$ )%,载药量( $3.47 \pm 0.08$ )%,粒径( $129.9 \pm 3.07$ )nm,PDI( $0.264 \pm 0.01$ ),Zeta 电位( $-22.5 \pm 0.42$ )mV。GEN-NLC 为球形粒子且呈单分散分布,外观圆整,大小均一,于 4℃下放置 30 d,包封率、粒径和 Zeta 电位均无明显变化,在 4 h 时仅释放 39.65%,36 h 时累积释放量达 79.86%。**结论:**溶剂分散法制备的 GEN-NLC 具有较好的理化性质和稳定性,且具备一定的缓释长效作用。

**[关键词]** 纳米脂质载体;龙胆苦苷;包封率;粒径

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0015-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013160015

## Preparation and Characterization of Gentiopicroside Nano-lipid Carriers

ZHANG Kun-chi, LV Shao-wa, LIU Lu, LI Xin, LI Yong-ji\*

(College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare gentiopicroside nano-lipid carriers (GEN-NLC) and investigate its stability, *in vitro* release and properties. **Method:** Solvent dispersion method was used to prepare GEN-NLC. With particle size, Zeta potential and encapsulation efficiency as indexes, effects of proportion of solid-liquid lipid, drug-lipid ratio and the type and concentration of surfactant on preparation technology were investigated, morphology of prepared GEN-NLC was observed by transmission electron microscopy, its characteristics and stability was investigated. **Result:** Optimal prescription was as following: 0.1% poloxamer 188 as surfactant, drug-lipid ratio 1:10, liquid lipid ratio 10%. Encapsulation efficiency of prepared GEN-NLC was ( $38.19 \pm 1.61$ )%, drug loading was ( $3.47 \pm 0.08$ )%, particle size was ( $129.9 \pm 3.07$ ) nm, PDI was ( $0.264 \pm 0.01$ ), Zeta potential was ( $-22.5 \pm 0.42$ ) mV. GEN-NLC was spherical particles and showed monodisperse distribution, rounded appearance and uniform size. After stored at 4℃ for 30 d, indicators were not changed significantly, release of gentiopicroside 39.65% in 4 h, cumulative release amounted to 79.86% at 36 h. **Conclusion:** It showed that there were good physicochemical properties and stability of GEN-NLC prepared by solvent dispersion method, and had a certain degree of sustained-release long-lasting effect.

**[Key words]** nanostructured lipid carriers; gentiopicroside; encapsulation efficiency; particle size

龙胆苦苷(GEN)是一类对肝脏系统疾病具有明确且独特疗效的水溶性成分,能抗 CCl<sub>4</sub> 急性模型

小鼠的肝损伤<sup>[1]</sup>。CCl<sub>4</sub> 肝损伤是由于脂质过氧化引起生物膜流动性及蛋白质结构改变,影响正常功

**[收稿日期]** 20121203(001)

**[基金项目]** 哈尔滨市科技创新人才研究专项(2012RFXXS003)

**[第一作者]** 张坤驰,在读博士,从事中药纳米制剂研究,Tel:18745037191,E-mail:kunchizhang@163.com

**[通讯作者]** \*李永吉,博士,教授,从事中药新剂型与新药研究,Tel:0451-87267038,E-mail:Liyongji2009@163.com

能而致肝细胞中毒坏死。但 GEN 半衰期短,稳定性较差,在传统剂型中治疗效果不甚理想,也不利于储存及运输。

纳米结构脂质载体(NLC)是将药物以镶嵌、吸附或溶解的方式存在于脂质基质中而形成的载体系统,是在固体脂质纳米粒基础上发展起来的第二代固液混合脂质纳米粒<sup>[2-3]</sup>。NLC 可提高有效成分的生物利用度,增强疗效,增加药物的稳定性,减少不良反应。本实验采用溶剂分散法<sup>[4]</sup>制备 GEN-NLC,采用单因素试验优选其处方工艺,并进行性质表征及稳定性、体外释放情况考察。

## 1 材料

VCX750 型超声波细胞粉碎机(美国 Sonics 公司),85-2A 型恒温磁力搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司),2996 型高效液相色谱仪系统(美国 Waters 公司),色谱柱 Diamonsil C<sub>18</sub>(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),FA2004 型电子分析天平(上海良平仪器仪表有限公司),Malvern Zetasizer 3000 型粒度测定仪(英国 Malvern 公司),TECNAIG<sup>2</sup> 型透射电子显微镜(荷兰飞利浦),PHS-3C 型酸度计(金坛市荣华仪器制造有限公司)。

龙胆苦苷原料(GEN,纯度 98%,南京泽朗医药科技有限公司)龙胆苦苷对照品(成都 Must 生物技术有限公司,批号 MUST 11011401),单硬脂酸甘油酯(Aladdin 化学有限公司),油酸(上海晶纯试剂有限公司),泊洛沙姆 188(上海运宏化工制剂辅料技术有限公司),葡聚糖凝胶(Sephadex G-50,上海浩然生物技术有限公司),山梨醇酐十六酸酯(司盘 40,国药集团化学试剂有限公司),聚山梨酯 80(Tween 80,天津市天力化学试剂有限公司),聚乙烯吡咯烷酮(PVP,天津市天力化学试剂有限公司),透析袋(截留相对分子质量 8 000 ~ 14 000,美国 Sigma 公司),乙二胺四乙酸(EDTA,天津市化学试剂厂),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 龙胆苦苷含量测定

**2.1.1 色谱条件** 流动相甲醇-水(30:70),检测波长 270 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,进样量 10 μL。

**2.1.2 标准曲线的绘制** 精密称定对照品龙胆苦苷适量,配成质量浓度分别为 5, 15, 25, 60, 100, 200, 400 mg·L<sup>-1</sup>的对照品溶液,按上述色谱条件进行检测<sup>[5-6]</sup>,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 9\ 864X + 63\ 358 (R^2 = 0.999\ 3)$ ,

表明 GEN 在 5 ~ 400 mg·L<sup>-1</sup>线性关系良好。

**2.2 GEN-NLC 的制备**<sup>[7]</sup> 称取一定比例的油酸和单硬脂酸甘油酯,作为制备 NLC 的脂质材料;另取适量 GEN,与脂质材料同置于乙醇中,水浴溶解,作为有机相。将有机相于搅拌条件下注入水中,冷却至室温,超声分散于泊洛沙姆溶液中,减压除去有机溶剂,即得。

**2.3 包封率测定** 吸取制得的 GEN-NLC 溶液加至 Sephadex G-50 凝胶柱顶部,用水洗脱,分离纳米粒和游离药物,接取游离药部分,HPLC 测定 GEN 含量,计算包封率和载药量。

### 2.4 处方工艺优选

**2.4.1 不同表面活性剂的影响** 分别选用相同质量分数的泊洛沙姆 188、Tween 80、司盘 40、PVP 作为表面活性剂制备 GEN-NLC,结果( $n = 3$ )测得包封率分别为(36.88 ± 1.2)%,(14.5 ± 1.01)%,(30.26 ± 0.84)%,(22.23 ± 2.15)%;粒径分别为(180.1 ± 3.12),(81.23 ± 2.8),(326.7 ± 4.38),(224.5 ± 1.37) nm;Zeta 电位分别为(-20.8 ± 0.85),(-10.15 ± 0.63),(-5.23 ± 1.5),(-16.76 ± 1.02) mV,故选用泊洛沙姆 188。

**2.4.2 表面活性剂质量分数的影响** 因为固定表面活性剂后,Zeta 电位变化甚微,故分别考察不同质量分数(0.1%,0.5%,1%,2%)泊洛沙姆 188 对 GEN-NLC 包封率、粒径和 PDI 的影响,结果( $n = 3$ )测得包封率分别为(38.19 ± 1.61)%,(19.78 ± 1.2)%,(11.68 ± 1.73)%,(15.12 ± 1.38)%;粒径分别为(129.9 ± 3.07),(180.1 ± 3.12),(272.9 ± 3.05),(243.4 ± 1.8) nm;PDI 分别为(0.264 ± 0.01),(0.318 ± 0.03),(0.426 ± 0.02),(0.436 ± 0.01),故选择 0.1%泊洛沙姆 188。

**2.4.3 不同药脂比的影响** 按药脂质量比 1:20,1:10,1:6,1:3 称取 GEN 和混合脂质,分别制备 GEN-NLC,结果( $n = 3$ )包封率分别为(28.33 ± 1.93)%,(38.19 ± 1.61)%,(32.39 ± 1.33)%,(5.92 ± 1.16)%;粒径分别为(164.1 ± 3.25),(129.9 ± 3.07),(153.7 ± 2.36),(169.8 ± 2.5) nm;PDI 分别为(0.357 ± 0.03),(0.264 ± 0.01),(0.354 ± 0.02),(0.307 ± 0.02),故选用药脂比 1:10。

**2.4.4 油酸质量分数考察** 分别加入 0%,10%,30%,50%,80%制备 GEN-NLC,结果( $n = 3$ )包封率分别为(27.23 ± 2.11)%,(38.19 ± 1.61)%,(19.29 ± 1.33)%,(11.57 ± 0.62)%,(9.48 ±

1.09)% ;粒径分别为  $(208.0 \pm 2.65)$ ,  $(129.9 \pm 3.07)$ ,  $(95.99 \pm 0.96)$ ,  $(90.07 \pm 1.34)$ ,  $(81.52 \pm 1.72)$  nm; PDI 分别为  $(0.537 \pm 0.02)$ ,  $(0.264 \pm 0.01)$ ,  $(0.419 \pm 0.01)$ ,  $(0.449 \pm 0.02)$ ,  $(0.423 \pm 0.01)$ , 故选用油酸质量分数 10%。

**2.5 粒径、多分散性指数(PDI)和 Zeta 电位的测定**  
将制备的 GEN-NLC 样品稀释后置于粒度测定仪的石英测量池中,平行 3 次测得粒径  $(129.9 \pm 3.07)$  nm, Zeta 电位  $(-22.5 \pm 0.42)$  mV, PDI =  $(0.264 \pm 0.01)$ , 结果见图 1, 2。

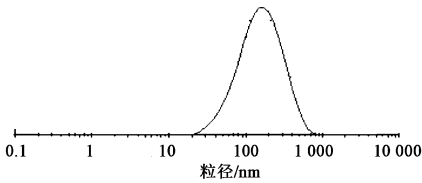


图 1 GEN-NLC 的粒径密度分布

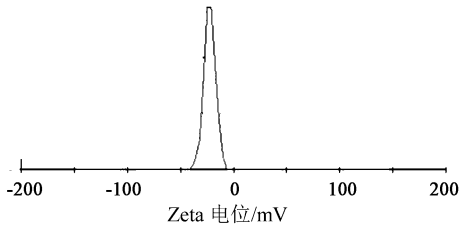


图 2 GEN-NLC 的 Zeta 电位分布

**2.6 透射电镜检测** 将 GEN-NLC 样品适度稀释,滴加至铜网上,用 2% 磷钨酸液染色 40 s,在透射电镜下观察其形态,见图 3,显示 GEN-NLC 为球形粒子且呈单分散分布,外观圆整,大小均一。

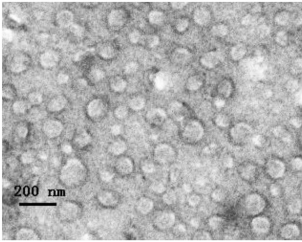


图 3 GEN-NLC 的透射电镜

**2.7 稳定性考察** 样品按 1 mL 分装,于 4 °C 密封保存于安瓿瓶中,在 0, 10, 20, 30 d 时检测粒径及包封率,每次取 3 瓶样品测量。结果粒径分别为  $(129.9 \pm 3.07)$ ,  $(132.3 \pm 2.24)$ ,  $(138.7 \pm 1.31)$ ,  $(131.0 \pm 1.26)$  nm; 包封率分别为  $(38.19 \pm 1.61)$ %,  $(36.7 \pm 2.53)$ %,  $(35.53 \pm 1.29)$ %,  $(33.84 \pm 4.55)$ %; Zeta 电位分别为  $(-22.5 \pm 0.42)$ ,  $(-24.3 \pm 0.6)$ ,  $(-20.6 \pm 0.28)$ ,  $(-21.8 \pm 0.74)$  mV, 表明放置 30 d 后样品稳定。

**2.8 体外释放试验** 精密吸取一定量的 GEN-NLC 冻干粉溶液和 GEN 对照品溶液,转入经 EDTA 处理的透析袋中,将袋口扎紧,置于盛有 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 50 mL 的烧杯中,将烧杯放入 37 °C 恒温水浴振荡器中震荡  $(100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1})$ , 分别于 0.08, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48 h 取透析液 2 mL,并及时补充等量同温的新鲜释放介质,测定释放介质中 GEN 含量,计算各时间点的累积释放率,载药纳米粒的释放曲线见图 4。

$$Q = (V_0 C_t + V) / W \times 100\%$$

式中  $C_t$  为各时间点测得释放介质中药物质量浓度,  $W$  为投入药物的总质量,  $V_0$  为释放介质的总体积,  $V$  为每次取样体积。结果可知 GEN 对照品在 4 h 时累积释放率 84.2%, 而 GEN-NLC 在 4 h 时仅释放 39.65%, 之后释药曲线渐趋平稳,释放缓慢,在 36 h 时累积释放率 79.86%, 具有一定的缓释长效作用。

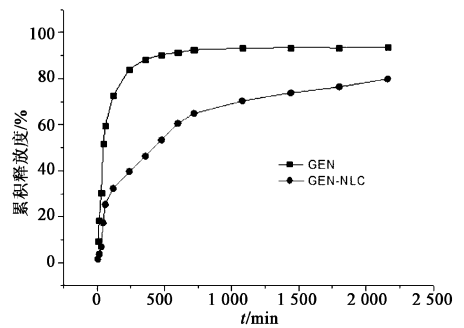


图 4 GEN-NLC 的体外释放曲线

### 3 讨论

对包封率和粒径均具有明显影响的因素是油酸质量分数,随脂质中油酸比例的增大,体系的粒径减小,包封率在油酸比例为 10% 时最高,之后降低,这可能与 NLC 形成的结构有关,鉴于 NLC 载药能力来源于不规则晶型的比例,而不规则晶型又是由于液态脂质与固态脂质的性质差异造成,故液态与固态脂质的比例对包封率的影响很大;而随油酸比例的增加,粒径减小,形成的纳米粒结构容纳药物的空间变窄,这也可能是包封率降低的一个原因。与未加入油酸的样品相比,体系的粒径变小,包封率增加,均可说明 NLC 在载药能力方面与固态脂质纳米粒(SLN)相比更具潜力。

制备的 GEN-NLC 粒径均在 100 ~ 150 nm,且分布均匀,符合肝靶向要求。Zeta 电位大小与表面活性剂的选择密切相关,不同的表面活性剂可使粒子表面带不同电性和大小的电荷,导致具有不同的表面电位<sup>[8]</sup>。陈立亚等<sup>[9]</sup>发现,在 O/W 型体系中,

# 基于主成分分析的中药制剂综合评价模式探索

张振巍<sup>1</sup>, 张娜娜<sup>2</sup>, 石磊<sup>1\*</sup>

(1. 中国人民解放军第一五五中心医院, 河南 开封 475003;  
2. 开封市中医院, 河南 开封 475000)

**[摘要]** 目的:建立清热解毒口服液生产工艺的综合评价模式,并应用于该制剂的生产监控。方法:选择清热解毒口服液为研究对象,以共有峰为多变量,采用主成分分析、因子分析等方法实现对数据的压缩、解释,通过少量主分量分析揭示制剂整体质量的变化。结果:最佳提取工艺为加 10 倍量水提取 2 次,每次 100 min。结论:降维分析法能简化分析过程,且能深刻揭示原始数据的内在规律,适用于对中药整体质量的控制。

**[关键词]** 清热解毒口服液; 主成分分析法; 因子分析; 综合评价; 质量控制

**[中图分类号]** R283.6, R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0018-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013160018

## Investigation of Comprehensive Evaluation for Traditional Chinese Medicine Preparations Based on Principal Component Analysis

ZHANG Zhen-wei<sup>1</sup>, ZHANG Na-na<sup>2</sup>, SHI Lei<sup>1\*</sup>

(1. The 155th Central Hospital of People's Liberation Army, Kaifeng 475003, China;  
2. Kaifeng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kaifeng 475000, China)

**[收稿日期]** 20121213(011)

**[基金项目]** 济南军区后勤科研计划(CJN10L067)

**[第一作者]** 张振巍,药师,从事中药新药及制剂质量标准研究,Tel:15137868191,E-mail:zhenwei\_981@163.com

**[通讯作者]** \*石磊,主任药师,从事中药制剂与医院药学研究,Tel:0378-3958759

Zeta 电位绝对值在 30 mV 已足够建立最大能量来保证体系的稳定性,而制备的样品为 -20 ~ 25 mV,较接近最稳定电位值。龙胆苦苷作为水溶性药物,在体系中更易发生药物泄漏问题,较难制成纳米制剂。

### [参考文献]

- [1] 徐关丽,陈露露,蔡江辉,等. 龙胆苦苷对脓毒症小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 激光杂志,2013,34(1):96.
- [2] Müller B H, Petersen R D, Hommess A, et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products[J]. Adv Drug Deliv Rev,2007,59(6):522.
- [3] Müller B H, Radtke M, Wissing S A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations[J]. Adv Drug Deliv Rev,2002,54(S1):131.

- [4] YUAN H, CHEN J. Studies on oral absorption of stearic acid SLN by a novel fluorometric method[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,2007,58:157.
- [5] 葛卫红,郭建友,蔡金娜,等. 高效液相色谱法测定金胆片中龙胆苦苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(11):10.
- [6] 王金鹏,王砚,任华忠,等. HPLC 测定复方茵陈糖浆中龙胆苦苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(11):71.
- [7] 黄凌斐. 脂质纳米载体的制备与细胞转运研究[D]. 杭州:浙江大学,2008.
- [8] 陈晶,顾月清. 纳米结构脂质载药系统的研究进展[J]. 药学进展,2010,34(12):535.
- [9] 陈立亚,于宝珠,赵慧芳. Zeta 电位及其在药学分散体系研究中的应用[J]. 药物分析杂志,2006,26(2):281.

[责任编辑 全燕]