

# 盐酸小檗碱脂质体的制备工艺优选 及体外释放性质考察

王兴慧<sup>1</sup>, 李俊生<sup>1</sup>, 吕佳佳<sup>1</sup>, 刘志辉<sup>2\*</sup>

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 南京中医药大学附属医院, 南京 210036)

**[摘要]** 目的: 优选盐酸小檗碱脂质体的制备工艺并考察其体外释放性质。方法: 采用 pH 梯度结合薄膜分散法制备盐酸小檗碱脂质体, 以包封率为指标, 通过正交试验考察磷脂胆固醇比、药脂比、磷脂质量浓度、外水相 pH 对外方工艺的影响。采用透析法考察脂质体的体外释放性质。结果: 最佳处方工艺为磷脂胆固醇比 3:1, 药脂比 1:15, 磷脂质量浓度 30 g·L<sup>-1</sup>, 外水相 pH 7.0。制备的盐酸小檗碱脂质体包封率 89.34%, 平均粒径 123.3 nm, Zeta 电位 -20.0 mV, 24 h 累积释放率 90.46%。结论: pH 梯度结合薄膜分散法制备的脂质体包封率较高, 粒径均匀, 具有显著体外缓释特性。

**[关键词]** 盐酸小檗碱; 脂质体; 包封率; 体外释放

**[中图分类号]** R283.6; R943; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0039-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013180039

## Preparation and *in vitro* Release Behavior of Berberine Hydrochloride Liposomes

WANG Xing-hui<sup>1</sup>, LI Jun-sheng<sup>1</sup>, LV Jia-jia<sup>1</sup>, LIU Zhi-hui<sup>2\*</sup>

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210036, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize preparation technology of berberine hydrochloride liposomes and evaluate its *in vitro* release properties. **Method:** Berberine hydrochloride liposomes was prepared by pH gradient combined thin film dispersion method, with encapsulation efficiency as index, orthogonal test was adopted to investigate effects of cholesterol-phospholipid ratio, drug-lipid ratio, the concentration of phospholipid and pH of external phase on formulation technology. *In vitro* release behavior was investigated by dynamic dialysis. **Result:** Optimum prescription was that ratio of phospholipid to cholesterol (3:1), drug-phospholipid ratio (1:15), phospholipid concentration of 30 g·L<sup>-1</sup>, pH of external phase 7.0. Encapsulation efficiency of prepared berberine hydrochloride liposomes was 89.34%, average particle size was 123.3 nm and Zeta potential was -20.0 mV, cumulative release was 90.46% in 24 h. **Conclusion:** These berberine hydrochloride liposomes prepared by pH gradient combined thin film dispersion method had high entrapment efficiency and uniform particle size with significant *in vitro* sustained-release characteristics.

**[Key words]** berberine hydrochloride; liposomes; entrapment efficiency; *in vitro* release

**[收稿日期]** 20130507(012)

**[基金项目]** 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD, 2010)

**[第一作者]** 王兴慧, 硕士, 从事药物新剂型技术研究, Tel: 15950573880, E-mail: wxh1988517@163.com

**[通讯作者]** \* 刘志辉, 主任中药师, 从事中药制剂开发及中药质量标准研究, Tel: 025-86529291, E-mail: liuzh1008@126.com

盐酸小檗碱又称黄连素, 是一种常见的异喹啉季铵生物碱, 具有抗菌、降血糖、免疫调节等药理作用<sup>[1]</sup>, 对人类肝癌细胞、胃癌细胞、食管癌细胞、宫颈癌细胞等肿瘤细胞具有一定的抑制作用<sup>[2-3]</sup>。但其体内抗肿瘤作用没有体外明显, 主要与体内难以达到有效血药浓度有关, 且静脉注射不良反应较大。脂质体作为一种新型给药系统, 能包裹药物, 控制药

物释放,具有显著降低药物毒性及提高生物利用度等优点<sup>[4-5]</sup>。本实验采用 pH 梯度结合薄膜分散法制备盐酸小檗碱脂质体并考察其体外释放特性。

## 1 材料

Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),pH-25 型 pH 计(上海雷磁仪器厂),Nano-ZS 型粒径测定仪(英国 Malvern 公司),JEM-1400 型透射电子显微镜(日本电子株式会社),葡聚糖凝胶 G-50(美国 Pharmacia 公司),盐酸小檗碱对照品(四川维克奇生物科技有限公司,批号 110620,纯度 ≥98%),氯化磷脂酰胆碱(HSPC)、胆固醇(CH)均购自德国 Lipoid 公司,乙腈、甲醇、乙醇均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 盐酸小檗碱脂质体的制备**<sup>[6-10]</sup> 精密称取处方量的磷脂和胆固醇溶于无水乙醇中,于旋转蒸发器上减压蒸发成膜。将盐酸小檗碱超声溶解于适量柠檬酸缓冲液中,加入梨形瓶中旋转,直至凝胶脱落,得到混悬脂质体溶液。探头超声并依次过 0.8, 0.45, 0.22 μm 滤膜整粒。用 1 mol·L<sup>-1</sup> 的 NaOH 调节外水相 pH,于磁力搅拌器上水浴孵化,即得。

### 2.2 盐酸小檗碱的含量测定

**2.2.1 色谱条件** Diamonsil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm), 流动相 乙腈-0.05 mol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (35:65, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 调至 pH 3.2), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 345 nm, 进样量 10 μL。

**2.2.2 线性关系考察** 称取盐酸小檗碱对照品适量,加甲醇制成 0.2 g·L<sup>-1</sup> 的对照品储备液。精密量取不同体积储备液,加甲醇配制 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6 mg·L<sup>-1</sup> 系列对照品溶液,分别进样,测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 44\ 101X - 1\ 943.1$  ( $R^2 = 1.000$ ),表明盐酸小檗碱在 0.2 ~ 25.6 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好。

**2.2.3 精密度试验** 精密量取同一对照品溶液,连续进样 6 次,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果峰面积的 RSD 0.46%,表明仪器精密度良好。

**2.2.4 重复性试验** 精密量取盐酸小檗碱脂质体 0.2 mL 置 10 mL 量瓶,用甲醇破乳并稀释至刻度,同一批样品平行制备 6 份,计算峰面积的 RSD 0.26%,表明该方法重复性较好。

**2.2.5 回收率试验** 取空白脂质体 0.2 mL,加低、中、高 3 个不同质量浓度的对照品溶液 ( $n = 3$ ),加入适量甲醇破乳,配制成 0.4, 3.2, 12.8 mg·L<sup>-1</sup> 的

样品溶液,计算平均回收率 99.85%, RSD 0.79%。

**2.3 包封率的测定** 采用葡聚糖凝胶法测定。精密量取盐酸小檗碱脂质体 0.2 mL 上样,以 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液洗脱,控制流速 1 mL·min<sup>-1</sup>。收集乳黄色脂质体部分(25 管,每管 1.5 mL),加甲醇破乳,HPLC 测定峰面积,绘制洗脱曲线,见图 1。取上柱前的脂质体 0.2 mL,用甲醇破乳,测定,计算包封率。

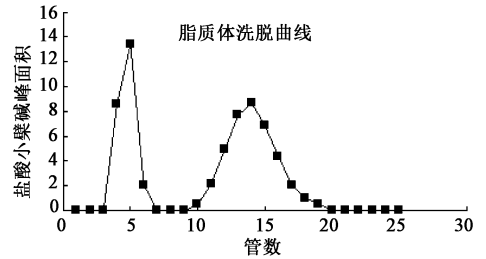


图 1 盐酸小檗碱脂质体洗脱曲线

**2.4 正交设计优化处方工艺** 在预试验基础上,以包封率为指标,选取磷脂胆固醇比、药脂比、磷脂质量浓度、外水相 pH 为考察因素,每个因素选取 3 个水平,按 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表进行试验,按 2.1 项下方法制备盐酸小檗碱脂质体,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 盐酸小檗碱脂质体的处方工艺优选正交试验因素水平

水平	A 磷脂-胆固醇	B 药脂比	C 磷脂质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	D 外水相 pH
1	2:1	1:10	30	6.6
2	3:1	1:15	25	7.0
3	4:1	1:20	20	7.4

表 2 盐酸小檗碱脂质体的处方工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	63.45
2	1	2	2	2	83.28
3	1	3	3	3	71.22
4	2	1	2	3	70.57
5	2	2	3	1	69.20
6	2	3	1	2	82.79
7	3	1	3	2	69.07
8	3	2	1	3	73.01
9	3	3	2	1	59.51
K <sub>1</sub>	217.95	203.09	219.25	192.16	
K <sub>2</sub>	222.56	225.49	213.36	235.14	
K <sub>3</sub>	201.59	213.52	209.49	214.80	
R	6.990	7.467	3.253	14.327	

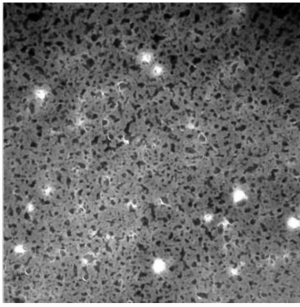
表3 包封率方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	80.960	2	5.03	>0.05
B	83.758	2	5.20	>0.05
C(误差)	16.103	2	1.00	
D	308.174	2	19.14	<0.05

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析可知,各因素对包封率的影响顺序为  $D > B > A > C$ 。以极值最小的  $C$  因素为误差项进行方差分析,结果表明因素  $D$  对包封率影响具有显著性,因素  $A, B$  均无显著性影响,确定最佳处方工艺为  $A_2B_2C_1D_2$ ,即磷脂胆固醇比 3:1,药脂比 1:15,磷脂质量浓度  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,外水相 pH 7.0。按最优处方工艺制备 3 批脂质体,测定平均包封率 89.34%,RSD 1.01%。

**2.5 形态观察** 将制备的盐酸小檗碱脂质体稀释后滴加到铜网上,滤纸吸去过多样品,用 2.0% 磷钨酸钠液染色 2 min,用滤纸吸走多余液体,自然晾干,置透射电镜下观察,见图 2。

图2 盐酸小檗碱脂质体透射电镜显微镜下形态( $\times 2000$ )

**2.6 粒径及电位的测定** 将制备的脂质体稀释至适当倍数,用激光粒度分析仪测得粒径 123.3 nm,多分散系数  $PdI = 0.057$ ,Zeta 电位  $-20.0 \text{ mV}$ ,表明制备的脂质体粒度分布均匀,体系较稳定。

**2.7 体外释放度考察** 精密吸取已知含量的盐酸小檗碱脂质体 2 mL,置于处理好的透析袋内,扎紧后置于 100 mL 锥形瓶中,以 pH 6.8 的 PBS 缓冲液为释放介质,将其放入恒温振荡箱中,于  $(37 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下进行释放试验,分别于 10, 20, 30, 40, 50 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 h 取样 1 mL,同时补充同温、同体积的新鲜介质。样品过  $0.45 \text{ } \mu\text{m}$  微孔滤膜,采用 HPLC 测定药物含量,计算不同时间点的药物累积释放量,同法考察原料药的释放情况,释放曲线见图 3。分别采用 4 种数学模型对盐酸小檗碱脂质体和原料药体外释放数据进行方程拟合,见表 4,结果表明盐酸小檗碱脂质体的体外释放曲线符合一级动力学方程,原料药符合 Weibull 方程。

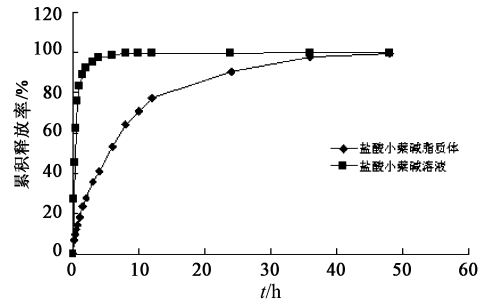
图3 盐酸小檗碱脂质体和原料药释放曲线( $n = 3$ )

表4 盐酸小檗碱脂质体和原料药体外释放拟合方程

样品	数学模型	拟合方程	$R^2$
脂质体	一级动力学	$\ln(1 - Q) = -0.1047t - 0.0974$	0.9962
	Higuchi 方程	$Q = 0.1621t^{1/2} + 0.0591$	0.9329
	Weibull 方程	$\ln[1/(1 - Q)] = 0.7175\ln t + 0.2844$	0.9889
	Hixcon-Crowell 方程	$(1 - Q)^{1/3} = -0.0176t + 0.9255$	0.9481
原料	一级动力学	$\ln(1 - Q) = -0.1311t - 0.0974$	0.6690
	Higuchi 方程	$Q = 0.0941t^{1/2} + 0.5821$	0.4040
	Weibull 方程	$\ln[1/(1 - Q)] = 1.2494\ln t + 1.9651$	0.9889
	Hixcon-Crowell 方程	$(1 - Q)^{1/3} = -0.0176t + 0.9255$	0.4349

### 3 讨论

将盐酸小檗碱溶于柠檬酸缓冲液中,在水化过程中,内水相就包封了一定量药物<sup>[11]</sup>。通过调节外水相 pH,使未被包封的药物以分子形式跨膜内转进入脂质体。相比于常规的 pH 梯度法,pH 梯度结合薄膜分散法在一定程度上提高了盐酸小檗碱的包封率,且处方工艺简单可行、重复性较好。

调节脂质体外水相 pH 使形成梯度的方法,主要有  $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{NaOH}$  溶液调节法<sup>[12-14]</sup>。前 2 种溶液 pH 较低,调节过程中,将脂质体溶液稀释倍数较多,使磷脂浓度降低,导致包封率下降,故选用  $\text{NaOH}$  溶液。体外释放结果表明,游离药物在 2 h 内累积释放率达 92.37%,脂质体在 24 h 内累积释放率 90.46%,说明盐酸小檗碱脂质体比原料药

# 不同制备工艺对肺毒清体外抗病毒作用的影响

刘涛<sup>1</sup>, 李娟<sup>2</sup>, 吴春梅<sup>1</sup>, 陆瑾<sup>3</sup>, 徐玉玲<sup>4\*</sup>

(1. 成都大学生物产业学院, 成都 610106; 2. 南京海陵中药制药工艺技术研究院有限公司, 南京 210049;  
3. 南京中医药大学中药复方分离工程重点实验室, 南京 210029;  
4. 成都大学实验技术中心, 成都 610106)

**[摘要]** 目的: 考察不同制备工艺对肺毒清处方药物体外抗病毒作用的影响。方法: 采用体外抗病毒法对比肺毒清的水提取物(A)、水醇提取物(D)、水提醇沉物(B)及水提醇沉物的正丁醇萃取物(C)的抗病毒作用。结果: 样品 D 在  $1\ 250\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  下能完全抑制甲 1 型和甲 3 型流感病毒,  $250\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  样品 A 在 60% 细胞毒性下能完全抑制甲 1 型及甲 3 型流感病毒, 其他样品对其他呼吸道病毒均无抑制作用, 且样品 D 的体外抗病毒作用较样品 A 更好。结论: 相同处方不同制备工艺对复方的药效作用具有一定影响。

**[关键词]** 肺毒清; 体外抗病毒试验; 制备工艺; 甲 1 型及甲 3 型流感病毒

**[中图分类号]** R283.6; R943; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0042-03

**[doi]** 10.11653/syfy2013180042

**[收稿日期]** 20130328(014)

**[基金项目]** 成都市科技局高校院所应用成果转化项目(12DXYB020JH-002)

**[第一作者]** 刘涛, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中成药新药开发及再评价研究, Tel: 028-61302236, E-mail: liutao0578@sina.com

**[通讯作者]** \* 徐玉玲, 高级工程师, 从事中成药质量研究及管理研究, Tel: 028-61302236, E-mail: xuyuling19750818@sina.com

释放缓慢, 具有明显的缓释作用, 且无明显突释效应。

## [参考文献]

- [1] 李芸兰, 成志锋. 小檗碱的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(21): 4173.
- [2] 廖霞, 李彩虹, 丁航. 黄连提取物盐酸小檗碱对三种肿瘤细胞株增殖的影响[J]. 东南大学学报: 医学版, 2011, 30(2): 344.
- [3] 黄勤杰, 施超, 朱健. 小檗碱对人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 河北医药, 2012, 34(13): 1953.
- [4] 洪怡, 何伟, 李丹, 等. 黄芩苷脂质体的制备及体外抗肿瘤作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 29.
- [5] 李祥, 杜俊, 向小四, 等. 脂质体在抗肿瘤药物中的应用研究进展[J]. 中南药学, 2012, 10(4): 290.
- [6] 苏春梅, 杨红, 梁翠茵, 等. 盐酸小檗碱脂质体制备工艺研究[J]. 中国药业, 2009, 18(21): 41.
- [7] 胡鹏翼, 郑琴, 刘彦君, 等. pH 梯度结合逆向蒸发法制备槐定碱纳米脂质体及体外释放度研究[J]. 中国

新药杂志, 2011, 20(14): 1275.

- [8] 许伯慧, 李晓霞, 孟璐, 等. 齐墩果酸脂质体包封率的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 86.
- [9] 齐娜, 刘广, 廖迎, 等. 熊果酸脂质体的制备及体外释放特性考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 29.
- [10] 赵志英, 谢俊, 刘文一, 等. 羟喜树碱脂质体的制备及其大鼠体内组织分布的研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(4): 450.
- [11] 孙念, 刘相男, 王玉, 等. pH 梯度法结合逆向蒸发法制备硫酸多黏菌素 E 脂质体[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(10): 784.
- [12] 叶鹏, 宋金春, 郭成希. pH 梯度法结合逆向蒸发法制备氟尿嘧啶脂质体[J]. 中国药师, 2009, 12(3): 308.
- [13] 张宏梅, 徐明, 崔佰吉, 等. pH 梯度法制备重酒石酸长春瑞滨脂质体[J]. 吉林医药学院学报, 2008, 29(6): 320.
- [14] 苗彩云, 邓树海, 李艳辉. 主动载药法制备两亲性药物脂质体的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(7): 433.

[责任编辑 全燕]