

三七总皂苷脂质体微丸的制备

李娜^{1,2}, 崔翰明^{1*}, 李小芳²

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的: 制备三七总皂苷脂质体微丸。方法: 以包封率为考察指标, 大豆磷脂-胆固醇-水相-有机相, 药物质量浓度, 脂类用量为考察因素, 通过正交设计优选三七总皂苷脂质体冻干粉的最佳处方工艺, 采用塑制法制备三七总皂苷脂质体微丸。**结果:** 三七总皂苷脂质体冻干粉的最佳处方工艺为大豆磷脂-胆固醇(6:1), 水相-有机相(1:4), 药物质量浓度 20 g·L⁻¹, 磷脂用量 150 mg。制备的脂质体微丸溶解后脂质体的平均粒径 220.5 nm, Zeta 电位 -71.21 mV, 1 h 内溶出度达 81.41%。**结论:** 制备的三七总皂苷脂质体微丸体外溶出度较高, 脂质体的粒径分布较好、质量稳定。

[关键词] 三七总皂苷; 脂质体; 冻干粉; 微丸; 包封率; 正交设计

[中图分类号] R283.6; R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0035-04

[doi] 10.11653/syfy2013180035

Preparation of *Panax notoginseng* Saponins Liposome Pellets

LI Na^{1,2}, CUI Han-ming^{1*}, LI Xiao-fang²

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China;
2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare *Panax notoginseng* saponins liposome pellets. **Method:** With entrapment efficiency as index, orthogonal design was adopted to investigate effects of proportion of soybean

[收稿日期] 20130204(005)

[基金项目] 国家重大科技专项重大新药创制项目(2009zx09103-355)

[第一作者] 李娜, 在读硕士, 从事中药新剂型及中药新技术研究, Tel: 010-88001470, E-mail: doctorlina0505@163.com

[通讯作者] * 崔翰明, 硕士, 副研究员, 从事中药药效物质、质量分析和新制剂研究, Tel: 010-88001470, E-mail: cui-yaoshi@163.com

[参考文献]

- [1] 曹春林. 中药制剂汇编[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 1116.
- [2] 郑汉臣, 蔡少青. 药用植物学与生药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 384.
- [3] 杨苏敏, 邓桂平. 冠心宁注射液的临床应用进展[J]. 现代医院, 2007, 7(11): 68.
- [4] 吕晓莉. 冠心宁注射液的临床应用初探[J]. 当代医学, 2011, 17(2): 17.
- [5] 余涛, 周波. 冠脑宁片的制备工艺、质量标准及临床应用研究[J]. 湖北中医杂志, 2009, 31(11): 73.
- [6] 国家药典委员会. 冠心宁注射液质量标准草案[S]. WS3-B-32, 2011.
- [7] 陈啸飞, 姜子洋, 张金花, 等. 冠心宁注射液生产质量

- 控制方法及特征成分含量变化研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(2): 303.
- [8] 唐登峰, 祝明, 陈勇, 等. RP-HPLC 同时测定冠心宁注射液中的丹参素、原儿茶醛、阿魏酸、迷迭香酸和丹酚酸 B 的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 144.
- [9] 雷志丹, 雷志钧, 夏新华. 川芎血清药物化学的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 96.
- [10] 刘静, 戴忠, 王钢力, 等. 丹参活性成分及相关分离分析方法研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 96.
- [11] 闫安忆, 龚行楚, 瞿海斌. 一种中药醇沉前浓缩液关键质量控制指标的辨析方法[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1558.

[责任编辑 全燕]

phospholipid and cholesterol, ratio of water phase and organic phase, the concentration of drugs and lipid dosage on formulation technology of *P notoginseng* saponins liposome lyophilized powder, then *P notoginseng* saponins liposome pellets was prepared by plastic method. **Result:** Optional formulation technology of *P notoginseng* saponins liposome lyophilized powder were as follows: proportion of soybean phospholipid and cholesterol (6:1), ratio of water phase and organic phase (1:4), the concentration of drugs $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, lipid dosage 150 mg. After dissolved of prepared liposome pellets, average particle size of liposomes was 220.5 nm, Zeta potential was -71.2 mv, dissolution was up to 81.41% within 1 h. **Conclusion:** Dissolution of prepared *P notoginseng* saponins liposome pellets was high, particle size distribution of liposomes was well and quality was stable.

[**Key words**] *Panax notoginseng* saponins; liposomes; lyophilized powder; pellets; entrapment efficiency; orthogonal design

三七具有滋补强壮、活血化瘀、消肿止痛等功效^[1-4],药理研究发现三七有强心、抗动脉粥样硬化、降低血黏度、抗血栓形成等作用^[5],临床多应用三七总皂苷(PNS)治疗中风、脑血栓、冠心病、心绞痛、动脉粥样硬化、视网膜中央静脉阻塞等^[6]。PNS水溶性较好,相对分子质量偏大,口服吸收差,小肠吸收过程中黏膜渗透性差是导致其生物利用度低的主要原因^[6]。脂质体具有促进药物吸收的特点^[7]。本实验在逆相蒸发法制备 PNS 脂质体的基础上,采用冷冻干燥技术制备 PNS 脂质体冻干粉,通过正交试验优选其处方工艺,从而制备 PNS 脂质体微丸。

1 材料

三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别为 110745-200421, 110703-200424, 110754-200421, 110704-200420),三七总皂苷提取物(昆明圣火制药厂,三七总皂苷质量分数约 75%),乙腈、甲醇为色谱纯,水为自制高纯水,其他试剂均为分析纯。

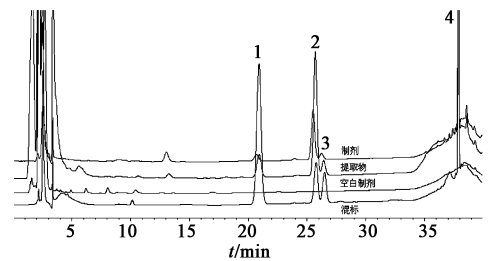
1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂), LGJ-10 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂), MDF-192 型超低温冰箱(日本 Sanyo 公司), Zetasizer Nano ZSP 型激光粒度分析仪、Zeta 电位分析仪(英国 Malvern 仪器公司), ME 215P 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司), Q-Gard 型纯水机(美国 Millipore 公司)。

2 方法与结果

2.1 三七总皂苷 HPLC 含量测定

2.1.1 色谱条件^[8-9] Kromasil C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水梯度洗脱(0 ~ 13 min, 20% A; 13 ~ 30 min, 20% ~ 25% A; 30 ~ 35 min, 25% ~ 40% A; 35 ~ 40 min, 40% ~ 20%

A), 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长 203 nm, 进样量 10 μL , 见图 1。



1. 三七皂苷 R_1 ; 2. 人参皂苷 R_{g_1} ;
3. 人参皂苷 R_e ; 4. 人参皂苷 R_{b_1}

图 1 三七总皂苷 HPLC

2.1.2 溶液的制备 分别精密称取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 和人参皂苷 R_{b_1} 对照品 4.4, 10.8, 2.12, 11.2 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得各成分的对照品储备液。精密吸取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 对照品储备液适量, 加甲醇分别稀释成系列对照品溶液。取三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 质量浓度分别为 110, 540, 42.4, 560 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的对照品溶液各 1 mL 配制成混合对照品溶液。精密称取三七总皂苷提取物约 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇超声溶解并稀释至刻度, 即得供试品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密吸取 2.1.2 项下三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 对照品储备液适量, 加甲醇分别稀释成系列对照品溶液, 按 2.1.1 项下方法进样, 测定峰面积, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程分别为 $Y = 2.5159X - 0.9402$ ($r = 0.9999$), $Y = 2.914X - 2.5983$ ($r = 1$), $Y = 2.8113X + 1.9988$ ($r = 0.9999$), $Y = 2.347X - 0.4003$ ($r = 0.9999$), 线性范围依次为 4.40 ~ 440, 4.32 ~ 1080, 4.24 ~ 212, 4.48 ~ 1120

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.1.4 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 $10\ \mu\text{L}$,连续进样 5 次,按 2.1.1 项下色谱条件进样,结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 峰面积的 RSD 分别为 0.46%, 0.24%, 0.77%, 0.68%,表明该仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取同一混合对照品溶液 $10\ \mu\text{L}$,分别在 0,1,2,5,7 d 按 2.1.1 项下色谱条件进样,结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 峰面积的 RSD 分别为 1.64%, 0.69%, 0.65%, 0.51%,表明对照品溶液在 7 d 内稳定。

2.1.6 重复性试验 精密称取三七皂苷提取物 6 份,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,测定峰面积,结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 含量的 RSD 分别为 0.43%, 3.05%, 3.67%, 2.94%,表明该方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 精密吸取已知质量浓度的供试液 1 mL,精密加入混合对照品溶液 1 mL,用甲醇定容至 5 mL,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算回收率。结果三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_{b_1} 平均加样回收率分别为 102.93%, 103.18%, 103.86%, 103.20%, RSD 分别为 1.18%, 0.47%, 0.38%, 1.53%,符合含量测定要求。

2.2 PNS 脂质体冻干粉的制备 采用逆相蒸发法制备。精密称取处方量的大豆卵磷脂和胆固醇置于 200 mL 梨形瓶中,用三氯甲烷溶解。按规定有机相-水相比比例加入含处方量 PNS 的 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液,混合,超声 10 min 得乳浊液,30 °C 恒温水浴减压蒸发除去有机溶剂,得 PNS 脂质体混悬液,加 5% 的甘露醇及蔗糖(作为冻干保护剂),于 -50 °C 预冻 24 h,置冷冻干燥机中,负压条件下冻干,即得。

2.3 脂质体包封率的测定 精密吸取水合后的 PNS 脂质体溶液 1 mL,置超速离心机中,10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min。取沉淀用甲醇溶解,超声 5 min,破乳,用甲醇定容至 10 mL,过滤,滤液按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算药物质量(W_1);精密吸取水合后的 PNS 脂质体溶液 1 mL,用甲醇溶解,超声 5 min,破乳,用甲醇定容至 10 mL,过滤,HPLC 测定,计算药物总质量($W_{\text{总}}$),按下列公式计算药物包封率。

$$\text{包封率} = W_1 / W_{\text{总}} \times 100\%$$

2.4 正交试验^[10] 在预试验基础上,选定大豆磷

脂和胆固醇质量比、水相和有机相比比例、药物质量浓度及脂类用量为考察因素,包封率为指标,设计四因素三水平的 $L_9(3^4)$ 正交试验,按 2.2 项下方法制备 PNS 脂质体冻干粉,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 三七总皂苷脂质体冻干粉处方工艺优选正交试验因素水平

水平	A 磷脂-胆固醇	B 水相-有机相	C 药物质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	D 脂类用量/ mg
1	4:1	1:3	10	150
2	6:1	1:4	20	200
3	8:1	1:5	30	250

表 2 三七总皂苷脂质体冻干粉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	52.25
2	1	2	2	2	90.30
3	1	3	3	3	75.53
4	2	1	2	3	80.04
5	2	2	3	1	92.44
6	2	3	1	2	50.38
7	3	1	3	2	58.16
8	3	2	1	3	60.41
9	3	3	2	1	96.02
K_1	72.693	63.483	54.347	80.237	
K_2	74.287	81.050	88.787	66.280	
K_3	71.530	73.977	75.377	71.993	
R	2.757	17.567	34.440	13.957	

直观分析表明各因素对 PNS 脂质体冻干粉包封率的影响顺序为 $C > B > D > A$ 。以极值最小的 A 因素为误差项进行方差分析,发现因素 B, C, D 均对包封率具有显著影响,最优水平组合为 $A_2B_2C_2D_1$,即磷脂-胆固醇(6:1),水相-有机相(1:4),药物质量浓度 $20\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,磷脂用量 150 mg。

表 3 三七总皂苷脂质体冻干粉处方工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A(误差)	11.491	2	5.746	1.000	
B	468.730	2	234.365	40.791	<0.05
C	1 808.203	2	904.102	157.358	<0.05
D	295.383	2	147.692	25.706	<0.05

注: $F_{0.05}(2,2) = 19.00$ 。

2.5 验证试验 按最佳处方工艺制备 3 份 PNS 脂质体冻干粉,按 2.3 项下方法测定包封率,计算平均包封率 85.68%,载药量 21.83%。

2.6 PNS 脂质体微丸的制备

2.6.1 脂质体微丸的制备 取制备好的 PNS 脂质体冻干粉适量,加入适量 75% 乙醇作为润湿剂,采用塑制法制备,挤出滚圆直径 1~2 mm 的微丸。

2.6.2 脂质体微丸溶出度考察 取 PNS 脂质体微丸 3 份,每份约 0.05 g,放入盛有水 200 mL 的溶出杯中,按《中国药典》2010 年版附录 XC 溶出度测定法第三法有关规定,转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度 $(37 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$ 。分别于 10, 20, 30, 60, 90, 120 min 取样 2 mL,同时补加等量溶出介质,溶出液经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,进样测定,计算 PNS 不同时间的溶出度,绘制溶出曲线,见图 2,表明微丸中药物平均溶出率在 1 h 内 $>80\%$, 预计口服后释放较完全。

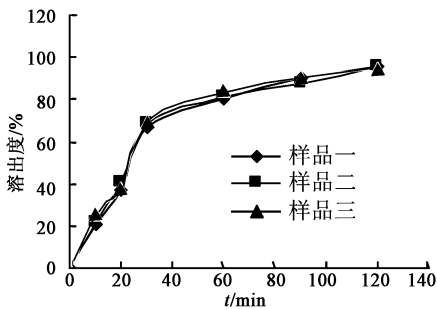


图 2 三七总皂苷脂质体微丸溶出度曲线

2.7 脂质体粒径和 Zeta 电位的测定 取三七总皂苷脂质体微丸约 0.02 g,加水 5 mL 超声分散,取样置于粒径测定仪及 Zeta 电位测定仪中测定,结果平均粒径 220.5 nm,粒径分布较好,Zeta 电位 -71.2 mV ,表明制备的脂质体较稳定。

3 讨论

曾采用石油醚和乙醚等溶解大豆磷脂,但与三七皂苷水溶液混合时均不能形成均匀的乳剂,而采用三氯甲烷作为有机相时则形成的乳剂非常均匀,且制得的脂质体包封率高达 80%,载药量 21.83%,优于石油醚和乙醚等溶剂。曾尝试利用薄膜分散法制备该脂质体,但包封率不佳,可能与所用磷脂材料

和药物性质有关,因此选择逆相蒸发法制备 PNS 脂质体。

脂质体包封率的测定方法常采用葡聚糖凝胶过滤法、透析法、高速离心法等^[11]。但应用葡聚糖凝胶过滤法时,洗脱曲线拖尾较严重,柱效较差;透析法较简便,不需要昂贵的仪器和复杂的技术,但耗时较长;高速离心法操作简单、耗时短,可有效地分离药物与脂质体,因此采用该方法。

[参考文献]

- [1] 刘华钢,梁秋云,赖茂祥,等. 广西三七中皂苷成分的含量测定及变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(5):5.
- [2] 鲍建才,刘刚,丛登立,等. 三七的化学成分研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2):246.
- [3] 胡志洁,张志耘. 三七总皂苷对心脑血管的药理作用研究[J]. 天津药学, 2006, 18(6):51.
- [4] 王爱华,郭婕. 中药三七的药理作用研究新进展[J]. 中国中医药咨讯, 2010, 31(2):39.
- [5] 沈央,方晓玲. 三七总皂苷脂质体的制备及其生理适应性的初步考察[J]. 中成药, 2004, 26(5):352.
- [6] 韩旻. 三七总皂苷(PNS)口服吸收机理及 W/O 口服微乳的研究[D]. 上海:复旦大学, 2006.
- [7] 邓英杰. 脂质体技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:8.
- [8] 崔翰明,张春光,林海,等. HPLC 法测定三七不同药用部位中有效成分含量[J]. 中药材, 2009, 32(12):1810.
- [9] 王超群,贾秀虹,陈秀,等. 中药三七“一测多评”质量控制方法的系统研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(22):3438.
- [10] 徐力昆. 黄芩苷脂质体的制备及体内药理学行为研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2003.
- [11] 邵红霞,奉建芳,龙晓英. 脂质体包封率的测定方法[J]. 中南药学, 2009, 7(3):212.

[责任编辑 全燕]