

穿心莲内酯脂质体的制备及质量控制

侯甲福^{1*}, 赵玉佳¹, 梁启超¹, 沙靖全², 李雪梅¹, 张敏³, 吴宜艳¹, 王元奕¹

(1. 牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011; 2. 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007;
3. 牡丹江师范学院, 黑龙江 牡丹江 157011)

[摘要] **目的:**制备穿心莲内酯脂质体并建立其质量控制方法。**方法:**采用薄膜分散-超声法制备穿心莲内酯脂质体,以包封率为指标,通过正交试验考察大豆卵磷脂-胆固醇、大豆卵磷脂-穿心莲内酯、维生素 E 用量、超声时间对脂质体制备工艺的影响。观察所制备脂质体的形态和粒径,利用 HPLC 测定穿心莲内酯含量。**结果:**最佳制备工艺为大豆卵磷脂-胆固醇(6:1),大豆卵磷脂-穿心莲内酯(4:1),维生素 E 用量 20 mg,超声时间 5 min。制备的穿心莲内酯脂质体平均粒径 625.8 nm,包封率 81.35%,渗透率 1.54%,穿心莲内酯线性范围 8.16~48.96 mg·L⁻¹($r=0.9998$)。**结论:**采用薄膜分散-超声法制备的穿心莲内酯脂质体粒径大小合适、包封率高、渗透率低,建立的质量控制方法可靠,为制备穿心莲内酯脂质体气雾剂奠定基础。

[关键词] 穿心莲内酯; 脂质体; 包封率; 粒径; 渗透率

[中图分类号] R283.6, R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0035-03

[doi] 10.11653/syfy2013160035

Preparation and Quality Control of Andrographolide Liposomes

HOU Jia-fu^{1*}, ZHAO Yu-jia¹, LIANG Qi-chao¹, SHA Jing-quan², LI Xue-mei¹,
ZHANG Min³, WU Yi-yan¹, WANG Yuan-yi¹

(1. Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China;
2. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China;
3. Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157011, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare andrographolide liposomes and establish its quality control method. **Method:** Andrographolide liposomes was prepared by film dispersion-ultrasound method, with encapsulation efficiency as index, orthogonal test was adopted to investigate effects of ratio of soybean lecithin-cholesterol, ratio of soybean lecithin-andrographolide, the amount of vitamin E and ultrasonic time on preparation technology of andrographolide liposomes. Particle size and morphology of these prepared liposomes was assessed. The content of andrographolide was determined by HPLC. **Result:** Optimum preparation technology was as following: ratio of soybean lecithin-cholesterin 6:1, ratio of soybean lecithin-andrographolide 4:1, the amount of vitamin E 20 mg, ultrasonic time 5 min. Morphology of prepared liposome showed sphere structure with uniform diameter. The average particle size was 625.8 nm and encapsulation efficiency was 81.35%, rate of leakage was 1.54%. The linear range of andrographolide was 8.16-48.96 mg·L⁻¹($r=0.9998$). **Conclusion:** Prepared andrographolide liposomes had high entrapment efficiency and low leakage rate, this established method for quality control was reliable, which lay foundation for preparing andrographolide liposomes aerosol.

[Key words] andrographolide; liposomes; entrapment efficiency; particle size; leakage rate

穿心莲内酯又名穿心莲乙素,属于二萜内酯化合

物,是穿心莲的主要活性成分之一,具有较强的解热镇痛、抗菌抗炎、抗病毒、止咳平喘等作用^[1-2]。但穿心莲内酯难溶于水、稳定性差、味道极苦,存在口服生物利用度较低、制备注射液澄明度差等问题^[3]。脂质体可提高药物生物利用度及溶解性,同时掩盖不良味

[收稿日期] 20130127(001)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521580)

[通讯作者] *侯甲福, 硕士, 从事药剂学研究, Tel: 0463-6984683, E-mail: 59101290@qq.com

道^[4]。本实验采用薄膜分散-超声法制备穿心莲内酯脂质体,以包封率为指标,通过正交试验优选其制备工艺,并建立该脂质体的质量控制方法。

1 材料

T-500 型电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司),ZETASIZER3000 型粒度分布与电势分析仪(英国 Malvern 公司),JEM-1200EX 型投射电镜(日本电子公司),LC-30A 型高效液相色谱仪(日本岛津)。

穿心莲内酯对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110797-200607),大豆卵磷脂(上海东尚实业有限公司),鱼精蛋白(上海静融生物科技有限公司),维生素 E(上海如吉科技发展有限公司),胆固醇(上海海曲化工有限公司),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 制备工艺优选

2.1.1 正交试验设计^[5-7] 在预试验基础上,以包封率为指标,选取大豆卵磷脂-胆固醇、大豆卵磷脂-穿心莲内酯、维生素 E 用量及超声时间为考察因素,通过正交试验优选穿心莲内酯脂质体的制备工艺,因素水平见表 1。

表 1 穿心莲内酯脂质体的制备工艺优选正交试验因素水平

水平	A 大豆卵磷脂-胆固醇比例	B 大豆卵磷脂-穿心莲内酯比例	C 维生素 E 用量/mg	D 超声时间/min
1	9:1	12:1	10	5
2	6:1	8:1	20	10
3	3:1	4:1	30	15

2.1.2 包封率测定 采用鱼精蛋白沉淀法,取制得的各脂质体混悬液,反复摇匀,取 3 份,每份 0.1 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,用甲醇定容,测定脂质体中药物质量浓度($C_{总}$)。另取 3 份,每份 0.1 mL,分别置于 10 mL 离心管中,加入 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 鱼精蛋白溶液 0.1 mL,搅匀,静置 5 min 后滴加生理盐水 3 mL,于 $1\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$

离心 20 min,小心吸取上清液 1 mL,用甲醇定容至 10 mL,测定游离药物质量浓度($C_{游}$)。取穿心莲内酯对照品溶液作对照,甲醇作空白,分别于 225 nm 处测定吸光度(A),计算穿心莲内酯含量,计算包封率。

$$\text{包封率} = (1 - C_{游}) / C_{总} \times 100\%$$

2.1.3 正交试验分析 采用薄膜分散-超声法制备脂质体。按正交设计精密称取适量大豆卵磷脂、胆固醇、穿心莲内酯及维生素 E,加二氯甲烷

30 mL 使溶解,转移至 500 mL 茄形瓶中,于 45 ℃ 减压干燥使成膜。成膜后加入磷酸盐缓冲溶液(pH 6.5,PBS)10 mL,水化 30 min,超声 10 min 使之均匀分散,依次过 0.80,0.45 μm 微孔滤膜 3 次,整粒后得脂质体混悬液,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 2 穿心莲内酯脂质体的制备工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	71.35
2	1	2	2	2	88.33
3	1	3	3	3	88.16
4	2	1	2	3	57.54
5	2	2	3	1	41.24
6	2	3	1	2	55.18
7	3	1	3	2	89.25
8	3	2	1	3	85.86
9	3	3	2	1	89.23
K_1	82.613	72.713	70.797	67.273	
K_2	51.320	71.810	78.367	77.587	
K_3	88.113	77.523	72.883	77.187	
R	36.793	5.713	7.570	10.314	

表 3 制备工艺方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	2 363.27	2	3.480	<0.05
B	56.59	2	0.083	<0.05
C	91.73	2	0.135	<0.05
D	204.80	2	0.302	<0.05
误差	2 716.39	8		

注: $F_{0.05}(2,8) = 4.460$ 。

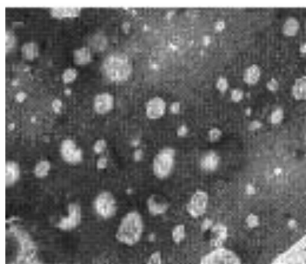
由直观分析可知,各因素对穿心莲内酯脂质体包封率的影响顺序为 $A > D > C > B$ 。最佳处方为 $A_2B_3C_2D_1$,即大豆卵磷脂与胆固醇用量比 6:1,大豆卵磷脂与穿心莲内酯用量比 4:1,维生素 E 用量 20 mg,超声时间 5 min。

2.2 脂质体的制备 按 2.1.3 项下最佳处方制备穿心莲内酯脂质体,即大豆卵磷脂 600 mg,胆固醇 100 mg,穿心莲内酯 150 mg,维生素 20 mg,超声 5 min。同法制备空白脂质体。

2.3 穿心莲内酯脂质体的质量控制^[8-10]

2.3.1 形态观察 取少量穿心莲内酯脂质体悬液,用 PBS 稀释后滴至载玻片上,用 3% 磷钨酸钠溶液(pH 7.0)负染后滴至有支持膜的铜网上,自然挥干后在透射电子显微镜下观察脂质体形态,见图 1,观察到脂质体结构完整,外观呈球形或类球形,粒径较小,分布均匀,说明工艺稳定。

2.3.2 粒径分布 取穿心莲内酯脂质体少量,用 PBS 稀释,测得平均粒径 625.8 nm,多分散性系数

图1 穿心莲内酯脂质体透射电镜($\times 10\ 000$)

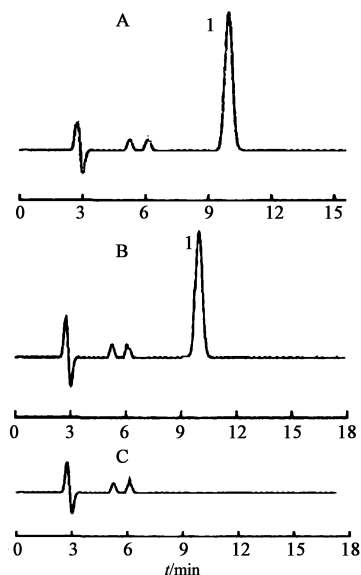
0.425 8。

2.3.3 包封率及渗透率的测定 按 2.1.2 项下方法测定穿心莲内酯脂质体包封率(Q_0)81.35%。将穿心莲内酯脂质体于 4℃ 冰箱保存 30 d,测定包封率(Q_1)79.81%,计算渗透率 1.54%。

$$\text{渗透率} = (1 - Q_1/Q_0) \times 100\%$$

2.3.4 穿心莲内酯含量测定

2.3.4.1 色谱条件 Inertsil ODS-SP 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),检测波长 225 nm,流动相乙腈-水(60:40),流速 1.0 mL \cdot min⁻¹,进样量 20 μL ,柱温室温,见图 2。



A. 对照品;B. 样品;C. 空白脂质体;1. 穿心莲内酯

图2 穿心莲内酯脂质体 HPLC

2.3.4.2 对照品贮备液的制备 精密称取穿心莲内酯对照品 10.20 mg,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇滴加至近刻度,超声 25 min 使溶解,放冷至室温,加甲醇定容,即得。

2.3.4.3 供试品及空白脂质体溶液的制备 精密量取穿心莲内酯脂质体 3 份,每份 0.2 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,超声溶解,分别精密量取该溶液 1 mL 至 50 mL 量瓶中,加甲醇定容,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。取空白

脂质体同法制备,即得空白脂质体溶液。

2.3.4.4 线性关系考察 精密量取对照品贮备液 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 mL,分别置于 25 mL 量瓶中,用甲醇定容,得系列对照品溶液,进样,记录峰面积,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 92.48X - 134.67$ ($r = 0.9998$),表明穿心莲内酯在 8.16 ~ 48.96 mg \cdot L⁻¹ 与峰面积呈良好线性关系。

2.3.4.5 样品测定 取供 3 份供试品溶液,按上述 HPLC 进行测定,计算脂质体中穿心莲内酯平均质量分数 0.45%,RSD 分别为 0.92%,0.87%,0.95% ($n = 5$)。

3 讨论

采用薄膜分散-超声法制备穿心莲内酯脂质体,该方法简单易行,得到的产品性质稳定、形态完整、粒径大小适中、包封率高、渗透率低。制备的穿心莲内酯脂质体各项指标均符合要求,为该制剂的体外释放特性考察和穿心莲内酯脂质体气雾剂的制备提供参考。

[参考文献]

- [1] 孙艳荣,王跃生,梁玲,等. 高效液相色谱法测定穿心莲内酯掩味树脂复合物的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(10):4.
- [2] 官妍,章九云,汪长中,等. 穿心莲内酯对表皮葡萄球菌生物被膜作用初探[J]. 中国中药杂志,2012,37(14):2147.
- [3] 陈浩,戴俊东,王玉蓉,等. 薄膜超声法制备槲皮素脂质体的研究[J]. 药学实践杂志,2012,30(1):32.
- [4] 温悦,孟德胜,毕小婷. 正交试验优选二氢青蒿素脂质体的制备工艺[J]. 中国药房,2010,21(43):4069.
- [5] 陈建霞,徐缓,于涛,等. 微柱离心-紫外分光光度法测定超氧化物歧化酶模拟物脂质体的包封率[J]. 中国新药杂志,2011,20(10):928.
- [6] 闫军,贾献慧,唐文照. 丹酚皮脂质体的制备及质量控制方法研究[J]. 中国药房,2010,21(35):3299.
- [7] 白兰,赵明琴,尹蓉莉,等. 龙胆苦苷脂质体含量测定及包封率考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(7):48.
- [8] 代现平,张光辉. 正交试验优选齐墩果酸脂质体制备工艺[J]. 中国生化药物杂志,2011,32(1):10.
- [9] 唐志远. 水中干燥法制备维生素 C 微囊的工艺研究[J]. 牡丹江医学院学报,2012,33(6):60.
- [10] 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.

[责任编辑 全燕]