

熊果酸脂质体的制备及体外释放特性考察

齐娜^{1*}, 刘广², 廖迎¹, 黄凤香¹, 张薇³, 徐勤¹

(1. 桂林医学院药剂药动教研室, 广西 桂林 541004;

2. 桂林天和药业股份有限公司, 广西 桂林 541100; 3. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 制备熊果酸脂质体, 优化熊果酸脂质体的处方工艺, 并研究其理化性质及体外释放特性。方法: 采用摇瓶法考察熊果酸在不同 pH 介质中的油水分配系数; 采用薄膜-超声法制备熊果酸脂质体, 以包封率为指标, 通过正交试验优选熊果酸脂质体的处方工艺。采用透射电镜观察其形态, 激光粒度测定仪测定其粒径和 zeta 电位, 动态透析法考察其体外释放的特性。结果: 熊果酸油水分配系数 $\lg P_{o/w}$ 随 pH 增大而降低, 且均 > 0.5 , 说明熊果酸具有较好的亲脂性。优选的处方工艺为载药量 6 mg, 磷脂-胆固醇 2:1, PBS 摩尔浓度 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 超声时间 3 min。制备的熊果酸脂质体透射电镜下呈球形或椭圆形, 平均粒径 $(223.7 \pm 68.4) \text{ nm}$, zeta 电位 -20.63 mv , 包封率 $(89.85 \pm 1.66)\%$, 48 h 体外累计释放率 $> 80\%$, 体外释放符合一级动力学模型。结论: 制备的熊果酸脂质体包封率高, 体外释放性能良好, 具有缓释特性。

[关键词] 熊果酸; 脂质体; 正交设计; 包封率; 体外释放

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0028-04

Preparation and *in vitro* Release Behavior Investigation of Ursolic Acid Liposome

QI Na^{1*}, LIU Guang², LIAO Ying¹, HUANG Feng-xiang¹, ZHANG Wei³, XU Qin¹

(1. Department of Pharmaceutics and Pharmacokinetics, Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. Guilin Tianhe Pharmaceutical Co. Ltd., Guilin 541100, China;

3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare ursolic acid liposome, optimize formulation of ursolic acid liposome and investigate its physicochemical properties and *in vitro* release behavior. **Method:** Oil-water partition coefficient of ursolic acid in a series of phosphate buffer solutions of different pH by shake flask method; Ursolic

[收稿日期] 20120716(013)

[通讯作者] *齐娜, 博士, 讲师, 从事药物新剂型及药物动力学研究, Tel: 13768435402, E-mail: qina1012@163.com

时还能增加片剂硬度^[5]。中药片剂干颗粒含水量一般在 3% ~ 5%, 而本制剂由于流化床制粒时加入了微粉硅胶, 使其抗湿性能得到改善。根据冠心平片压片工艺考察结果, 颗粒含水量在 7% ~ 9% 时片剂质量最好, 含水量 $> 9\%$ 则压片黏冲, 故在吸湿性研究中取含水量 9% 时对应的相对湿度^[6]作为生产中控制指标(类似于临界相对湿度), 以防止颗粒吸湿而导致压片时黏冲或薄膜衣片吸湿导致衣膜变软破裂等问题的出现, 保证成品质量的稳定。

[参考文献]

[1] 张源, 周琴妹, 王璐. 多指标综合评分法研究中药半浸

膏片的制粒工艺[J]. 中国药师, 2011, 14(2): 182.

[2] 古一雯. 微粉硅胶在制剂工艺中的应用[J]. 安徽医药, 2008, 12(10): 981.

[3] 苏碧华, 王介庆, 许激扬. 新型药用辅料微粉硅胶在药物制剂生产中的应用[J]. 中国药业, 2005, 14(5): 76.

[4] 吴逢波, 唐尧, 徐珽. 中药固体制剂成型性设计思路与方法[J]. 中国药房, 2009, 20(3): 236.

[5] 高华宏, 付建武, 曾文雪. 骨通薄膜衣片的制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 43.

[6] 赵碧清, 何群, 滕久祥, 等. 秦香止泻片半成品及成品吸湿性研究[J]. 中成药, 2010, 32(5): 770.

[责任编辑 全燕]

acid liposome were prepared by film-ultrasonic dispersion method, with entrapment efficiency as index, formulation of ursolic acid liposome was optimized by orthogonal test. Morphology was examined by transmission electron microscope, particle size and zeta potential were determined by laser particle sizer/zeta potential system, *in vitro* release behavior of ursolic acid liposome was studied by dynamic dialysis. **Result:** Oil-water partition coefficients of ursolic acid $\lg P_{o/w}$ decreased with increasing of pH, and they were >0.5 , it suggested that ursolic acid had good lipophilic. Optimized formulation was: drug loading of 6 mg, phospholipid-cholesterol 2:1, the molar concentration of PBS $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ultrasonic time 3 min. These prepared ursolic acid liposome were spherical or elliptical sphere under transmission electron, the mean particle size was $(223.7 \pm 68.4) \text{ nm}$, zeta potential was -20.63 mv , entrapment efficiency was $(89.85 \pm 1.66)\%$, *in vitro* release behavior fitted the first order kinetic model, *in vitro* cumulative release rate was $>80\%$ in 48 h. **Conclusion:** Prepared ursolic acid liposome had high entrapment efficiency and good *in vitro* release property with sustained release characteristics.

[**Key words**] ursolic acid; liposome; orthogonal design; entrapment efficiency; *in vitro* release

熊果酸又名乌索酸(乌苏酸),属五环三萜类化合物,存在于多种植物中,研究证明其具有抗肿瘤、保肝等药理作用^[1-2],抗肿瘤作用最为显著。目前大多数抗肿瘤药物均存在一定程度的肝损伤作用,特别是抗肝癌的药物。因此,寻找抗肿瘤又保护肝细胞的药物具有重要意义,而熊果酸恰好符合这一要求,有希望发展成为低毒的抗癌新药。由于熊果酸水溶性差,生物利用度低,导致其应用受到较大限制。为更好地发挥其抗肿瘤活性、增强靶组织及靶器官对其的选择性、降低给药剂量,拟将熊果酸制成可静脉注射的脂质体制剂。本试验采用 $L_9(4^3)$ 正交设计进行处方筛选,以包封率为指标,进行处方工艺优化,并考察其体外释放特性。

1 材料

DE-6P3C 型超声波细胞破碎机(宁波科生仪器厂),NicompTM PSS 型粒径测定仪(美国 PSS 公司),GL-25M 型高速冷冻离心机(长沙骏逸实验仪器有限公司),DLSB-5120 型低温冷却液循环泵(郑州长城科工贸有限公司),Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

熊果酸样品(纯度 $>99\%$,浏阳艾特天然产物研究开发公司),熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110742-200415),豆磷脂 S75($\text{PC} \geq 75\%$,日本 Tishisun international Pty 有限公司),胆固醇(CH,上海第二试剂厂),透析袋(相对分子量截留 $12\ 000 \sim 14\ 000$,Sigma 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 脂质体的制备 采用薄膜-超声法^[6]制备熊果酸脂质体,按处方量精密称取磷脂、胆固醇适量加入到三氯甲烷中,超声待完全溶解后,将适量熊果酸溶

入其中,得类脂溶液,将该类脂溶液置于圆底烧瓶中,在 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 水温条件下减压旋转蒸发有机溶剂,使磷脂等成膜材料在烧瓶上形成均匀类脂薄膜。向烧瓶中加入水合介质(PBS),然后每次在超声仪上间歇超声 3 min,形成脂质体。

2.2 熊果酸含量测定

2.2.1 色谱条件 Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}, 5 \text{ } \mu\text{m}$),流动相甲醇-1% 冰乙酸水溶液(88:12)^[3],流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 210 nm ,柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $20 \text{ } \mu\text{L}$,外标法定量分析。

2.2.2 标准曲线的绘制 将熊果酸分别配制成 $0.068\ 75, 0.138, 0.275, 0.55, 1.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的系列对照品溶液,进样,测定,记录峰面积。以峰面积对质量浓度进行线性回归,得回归方程 $Y = 8\ 203.7X - 93.975$ ($R^2 = 0.999\ 8$),表明当熊果酸进样量在 $1.375 \sim 22 \text{ } \mu\text{g}$ 呈良好线性关系。

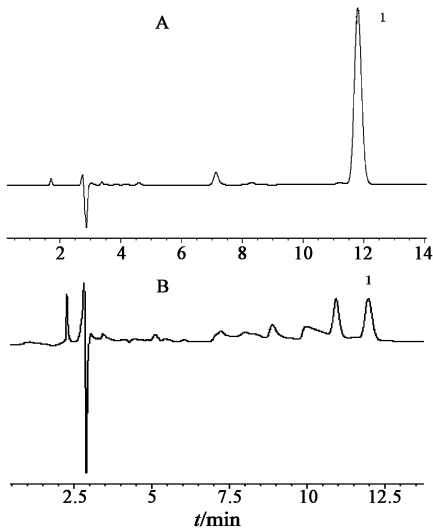
2.2.3 精密度试验 取熊果酸脂质体 0.5 mL ,加甲醇 4.5 mL 溶解,经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,连续测定 5 次,结果 RSD 0.032% ,表明仪器精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取熊果酸脂质体 0.5 mL ,加甲醇 4.5 mL 溶解,经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取同一批 5 个样品,按上述处理方法进行操作,进行测定,结果 RSD 0.025% ,表明方法重复性良好。

2.2.5 回收率试验 精密量取已知质量浓度的熊果酸脂质体样品溶液 3 份,各 0.5 mL ,分别加入样品溶液 $80\%, 100\%, 120\%$ 的熊果酸对照品,加甲醇溶解超声,经 $0.45 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,精密吸取 $20 \text{ } \mu\text{L}$,HPLC 测定。结果平均回收率 100.60% ,RSD 1.95% 。

2.2.6 样品含量测定 精密称定熊果酸对照品适

量,用甲醇溶解稀释成 $0.275 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,即为对照品溶液;精密称取熊果酸脂质体 2 mL ,置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,超声, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后,为供试品溶液,分别采用 HPLC 测定。见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 熊果酸

图 1 脂质体中熊果酸含量测定 HPLC

2.3 熊果酸油水分配系数测定 取 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 熊果酸的水饱和正辛醇溶液 5 mL 作为油相,分别加入 pH 分别为 $2.0, 3.5, 5.0, 5.8, 6.8, 7.4, 8.0$ 的正辛醇饱和磷酸盐缓冲液 (PBS) 5 mL ,摇床振摇 72 h ,取上层油相 0.25 mL ,用甲醇稀释至 1 mL , $0.22 \mu\text{m}$ 有机膜过滤,取 $20 \mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪,记录峰面积,根据 $\rho_w = (\rho - \rho_o) \times 0.5/5$ 计算水相质量浓度^[4-5]。得到油水分配系数 (P) $P = \rho_o/\rho_w$ (其中 P 为油水分配系数, ρ 为初始加入的熊果酸质量浓度, ρ_o 为油相中熊果酸质量浓度, ρ_w 为水相中熊果酸质量浓度, $\lg P_{o/w}$ 为油水分配系数的对数值)。表明在熊果酸 P 随 pH 增大而呈减小趋势,且 $\lg P_{o/w}$ 均 > 0.5 ,具有较好的亲脂性,适合制成较高包封率的脂质体。

2.4 透射电镜形态观察 将熊果酸脂质体稀释至一定质量浓度,吸取少量滴加到铜网正面,过多样品液用滤纸吸去,用 2% 磷钨酸钠溶液负染 3 min ,取出铜网,用滤纸吸取过多染液,将铜网正面朝上置于玻璃皿中,自然晾干,在透射显微镜下观察其形态,结果见图 2。表明熊果酸脂质体为小单室脂质体,外观呈球形或椭圆球形可见脂质体空心的结构。

2.5 包封率的测定 超速离心法测定包封率^[7],精密吸取熊果酸脂质体溶液 2 mL , $20\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min ,取沉淀用无水乙醇溶解定容至 10 mL ,

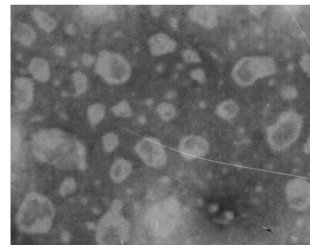


图 2 熊果酸脂质体透射显微形态 ($\times 2\,000$ 倍)

HPLC 测定得到包含在脂质体中的熊果酸含量;精密吸取制备好的熊果酸脂质体溶液 2 mL ,乙醇溶解稀释至 10 mL ,HPLC 测定熊果酸含量。

包封率 = 包封的熊果酸质量/熊果酸总质量 $\times 100\%$ 。

2.6 处方工艺优选 以包封率为指标,选取载药量、磷脂-胆固醇、缓冲液质量浓度、超声时间为考察因素,采用正交试验优选熊果酸脂质体的处方,按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 熊果酸脂质体的处方工艺正交试验因素水平

水平	A 载药量 /mg	B 磷脂- 胆固醇	C PBS 摩尔浓度 /mol·L ⁻¹	D 超声时间 /min
1	1.5	2:1	0.05	1.5
2	3.0	1:1	0.01	3.0
3	6.0	1:2	0.02	6.0

表 2 熊果酸脂质体的处方工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	87.21
2	1	2	2	2	88.81
3	1	3	3	3	74.63
4	2	1	2	3	71.42
5	2	2	3	1	70.86
6	2	3	1	2	78.08
7	3	1	3	2	93.33
8	3	2	1	3	83.79
9	3	3	2	1	91.94
K_1	83.550	83.987	83.027	83.337	
K_2	73.453	81.153	84.057	86.740	
K_3	89.687	81.550	79.607	76.613	
R	16.234	2.834	4.450	10.127	

由表 2 可知,影响熊果酸脂质体包封率的因素主次顺序 $A > D > C > B$,优选的处方组合为 $A_3B_1C_2D_2$,即载药量 6 mg ,磷脂-胆固醇 $2:1$,PBS 摩尔浓度 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,超声时间 3 min 。

2.7 验证试验 按优选的处方制备 3 批熊果酸脂

质体,采用 HPLC 测得包封率分别为 87.79%, 91.54%, 88.23%, 表明该处方工艺稳定。

2.8 粒径和 zeta 电位的测定 利用 Nicomp™ PSS 380 动态光散射粒度测定仪进行检测。测定粒径时取熊果酸脂质体用纯净水稀释于样品池内,调节光强度至约 300 kHz。平衡后测定 10 min,保存数据。测定 zeta 电位时,先调整到 zeta 电位测定模式,调节光强度至约 2 000 kHz,测定时间 1 min,保存数据。结果按优化的处方制备的熊果酸脂质体的粒径 (223.7 ± 68.4) nm, zeta 电位 -20.63 mv。

2.9 体外释放度考察 由于熊果酸在水中溶解度很小,采用 pH 7.4 PBS 作为溶出介质时,药物难以释放出来。为了更好地满足漏槽条件,选用 pH 7.4 PBS 加入 40% 乙醇作溶出介质^[8]。采用平衡透析法,将 3 mL 熊果酸脂质体置于已活化的透析袋中,将透析袋密封置于装有 50 mL 溶出介质的具塞锥形瓶中,于 37 °C 恒温水浴震荡,每隔一定时间更换一次释放介质,分别于 1, 2, 4, 8, 12, 15, 24, 36, 48 h 各取 1 mL 置 EPT 管中,并及时补充消耗的介质,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,采用 HPLC 测定熊果酸脂质体的释放度 ($n = 3$),见图 3。采用 4 种常见的释药数学模型对熊果酸脂质体的体外释放进行拟合^[9],以相关系数为指标,结果见表 3。

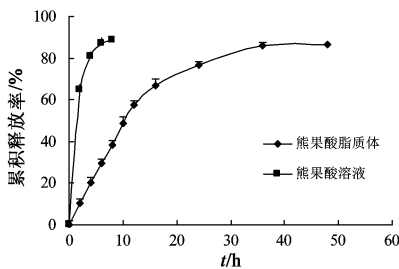


图 3 熊果酸体外释放曲线

表 3 熊果酸脂质体体外释放回归方程

模型	方程	R^2
零级	$Y = 0.0156t + 0.1249$	0.9351
一级	$\ln(1 - Y) = -0.032t + 0.0602$	0.9893
Weibull	$\ln \ln[1/(1 - Y)] = 0.74911nt - 2.6019$	0.9340
Higuchi	$Y = 0.1274t^{1/2} - 0.0735$	0.9731

由图 3 可知,熊果酸溶液在 6 h 释药已 $> 85\%$, 在 48 h 累积释放率 86.49%, 说明熊果酸脂质体具有一定缓释效果。由表 3 可知,一级方程拟合最佳,熊果酸脂质体在体外以一级释药方程持续而缓慢的

释放药物,未见明显的突释现象产生。

3 讨论

研究表明,在 pH 2 ~ 8 时,熊果酸油水分配系数 P 均较大 ($\lg P > 0.5$), 脂溶性较好, 较适合采用“被动载药”法制备^[7]。采用动态透析法测定熊果酸脂质体的体外释药情况,为了模拟体内释放情况达到最大漏槽条件,每隔一定时间更换一次释放介质。由于熊果酸水中溶解度很小,当用 pH 7.4 PBS 溶出介质时,药物释放很少;当选 pH 7.4 PBS 加入 40% 乙醇作溶出介质时^[10-11], 48 h 累积释放率达 86.49%, 并以一级速率方程 $\ln(1 - Y) = -0.032t + 0.0602$ ($R^2 = 0.9893$) 持续而缓慢地释放药物,具有缓释特点,且无明显突释效应。为熊果酸脂质体的体内的分布、药效及毒性研究提供试验依据。

[参考文献]

- [1] 夏国豪. 熊果酸抗肿瘤作用研究进展[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 2002, 29(6): 420.
- [2] 熊斌, 雷志勇, 陈虹, 等. 熊果酸药理学研究进展[J]. 国外医学: 药学分册, 2004, 6(3): 1001.
- [3] 陈宝龙, 冯坤, 郑朝华. 山楂中齐墩果酸和熊果酸的测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 73.
- [4] 徐文, 孙进, 张婷婷, 等. HPLC 法测定冬凌草甲素的平衡溶解度和表观油水分配系数[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(4): 220.
- [5] 陆伟根, 陈亭亭, 王培全, 等. 草乌甲素油-水分配系数和脂质体-水分配系数的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2008, 39(8): 591.
- [6] 程岚, 李学涛, 唐凌. 异长春花碱脂质体的制备及安全性评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 241.
- [7] 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.
- [8] 胡连栋, 唐星, 崔福德. 维甲酸固体脂质纳米粒的制备及体内评价[J]. 药学学报, 2005, 40(1): 71.
- [9] 彭海龙, 雷志强, 刘燕燕, 等. 槐定碱脂质体的制备及理化性质研究[J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(1): 32.
- [10] 穆筱梅, 梁世强. 脂质体的制备方法及其研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(7): 1784.
- [11] 张洪, 成蓓, 詹新安. 联苯双酯固体脂质纳米粒的体外释药特性评析[J]. 广东药学院学报, 2009, 25(1): 15.

[责任编辑 全燕]