

Z-综合评分法优化丹皮酚阳离子脂质体凝胶剂制备工艺

时军*, 黄嗣航, 王小燕, 廖华卫
(广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:优化丹皮酚阳离子脂质体凝胶剂的制备工艺。方法:采用薄膜分散-探头超声法结合研磨法制备丹皮酚阳离子脂质体凝胶,以包封率、粒径大小及 ξ 电位为考察指标,以中性脂材/带电脂材摩尔比、药脂比、水化时间和超声条件因素,每因素采取3个水平,利用正交试验优化制备工艺。结果:最佳制备工艺为DC-Chol 160 mg, Chol 300 mg, HSPC 500 mg, 溶于40 mg丹皮酚三氯甲烷液(15 mL)中,40℃水浴减压蒸发除去有机溶剂,形成均匀薄膜,加入pH 6.5磷酸盐缓冲液(PBS, 0.05 mol·L⁻¹)10 mL水化2 h,探头式超声3 min,再依次过0.8, 0.45 μ m的微孔滤膜,得脂质体溶液。另取卡波姆1.0 g,加入脂质体溶液中,溶胀完全后,加入甘油0.3 g,研磨均匀,即得。结论:薄膜分散-探头超声法结合研磨法制备脂质体凝胶,脂质体包封率较高、粒径分布均匀、 ξ 电位适宜,制剂黏度佳,刺激性小。

[关键词] 丹皮酚;阳离子脂质体;凝胶;Z-综合评分法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0032-04

Optimization of Preparation Technology for Paeonol Cation Liposome Gel by Z-comprehensive Score Method

SHI Jun*, HUANG Si-hang, WANG Xiao-yan, LIAO Hua-wei

(School of Chinese Materia Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate optimization of preparation technology for paeonol cation liposome gel. **Method:** Paeonol cation liposome gel was prepared by dispersion-ultrasonic combined with grinding method, with encapsulation efficiency, particle size and ξ potential as indexes, L₉ (3⁴) orthogonal design was used to optimize preparation technology, factors were chosen as amount of substance ratio of DC-Chol/Chol, lipid/drugs, hydration time and ultrasonic condition. **Result:** Optimum preparation technology was as follows: weigh of DC-Chol was 160 mg, Chol 300 mg and HSPC 500 mg, added into 40 mg paeonol solution dissolved by 15 mL chloroform, evaporated and removed organic solvent to form uniform film at 40℃, added 10 mL pH 6.5 phosphate buffer solution to hydrate for 2 h, probe ultrasound for 3min, and then filter by 0.8, 0.45 μ m microporous membrane, liposome solution was obtained. Meanwhile, took carbomer 1.0 g, added into liposome solution, swelled completely, dropped into 0.3 g glycerin, ground to form uniform gel preparations. **Conclusion:** Using film dispersion-ultrasonic and gridding method, we prepared cation liposomes gel containing paeonol with liposome having high entrapment efficiency, uniform size distribution and moderate ξ potential, gel preparation had moderate viscosity and slight irritation.

[Key words] paeonol; cation liposome; gel; Z-comprehensive score method

疤痕形成是组织创伤修复和愈合的主要方式,对皮肤组织结构和功能的恢复具有重要意义。对于愈合缓慢的皮肤创面,目前临床常应用重组人血小

板衍生生长因子(rh-PDGF-BB)治疗,以促进PDGF受体表达,促进血管和纤维生成^[1-2]。然而,基因工程药物存在价格昂贵、稳定性不佳等缺陷。中药牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮,性寒,味苦、辛,有清热凉血、活血散瘀之功效^[3]。现代医学证实牡丹皮具有抗炎、抗凝血、改善机体免疫功能等作用。牡丹皮中的活性成分-

[收稿日期] 20110909(005)

[通讯作者] *时军,博士,从事新型给药系统研究, Tel:020-39352169, E-mail: shijun8008@163.com

丹皮酚(paeonol)能抑制毛细血管通透性的提高,减少炎症组织中前裂腺素 E_2 (PGE₂) 的含量,同时还能抑制细胞内 O_2^- 自由基产生,将皮肤中沉积色素还原褪色,具有良好的改善创面愈合作用^[4-6]。

脂质体微粒给药系统是良好的皮肤给药载体,具有增强药物进入角质层脂质双分子层的能力,增加药物在皮肤的滞留量和滞留时间,减少药物的全身吸收和不良反应等优势^[7]。采用特殊材料制成阳离子脂质体,进入真皮层中与带负电的磷脂、膜蛋白、蛋白多糖产生静电吸附作用,并通过内吞作用进入细胞,释放药物产生作用^[8]。本研究利用阳离子脂质体载体包裹中药牡丹皮活性成分丹皮酚,并制备成凝胶剂,一方面增加丹皮酚的稳定性和溶解性能,另一方面促进丹皮酚的透皮作用,以期发挥改善创伤修复和愈合的作用。

1 材料

丹皮酚(南京泽朗医药科技有限公司,批号20100907,纯度 $\geq 98\%$),丹皮酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号110708-200506),氢化大豆卵磷脂(HSPC,德国Lipoid公司),胆固醇(Chol,中国医药公司北京采购供应站), 3β -[N-(N'N'-二甲基胺乙基)胺基甲酰胺基]-胆固醇(DC-Chol,美国Sigma公司),Sephadex G-50(瑞典Pharmacia公司),甲醇为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他药品、试剂均为国产分析纯。

UV-1601型紫外分光光度计(岛津),Dinonex型高效液相色谱仪(岛津,P680型泵,PDA-100型检测器,ASI-100自动进样器),JY92-II型超声细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所),Zetasizer Nano ZS型Zeta电位测定仪(英国马尔文),H-600型透射电子显微镜(日本Hitachi),Zetasizer型激光粒度测定仪(英国Malvern)。

2 方法和结果

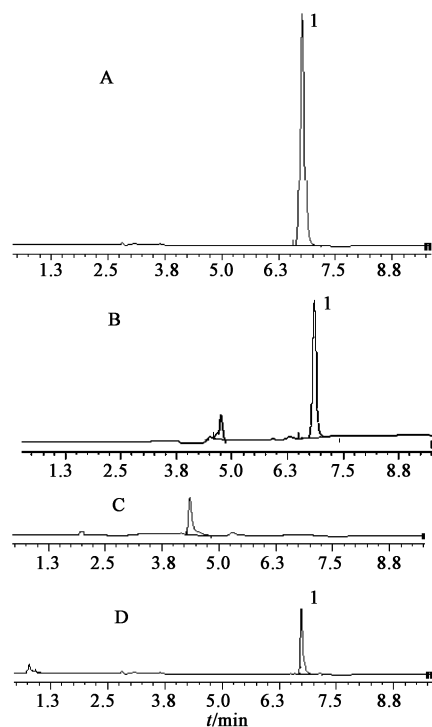
2.1 丹皮酚阳离子脂质体的制备 采用薄膜分散-探头超声法,精密称取一定量的脂材(DC-Chol、Chol、HSPC,磷脂与胆固醇摩尔比1:1),溶于40 mg丹皮酚三氯甲烷液(15 mL)中,40 °C水浴减压蒸发除去有机溶剂,形成均匀性薄膜,加入pH 6.5磷酸盐缓冲液(PBS, 0.05 mol·L⁻¹)10 mL水化,探头式超声,再依次过0.8,0.45 μm 微孔滤膜,得脂质体溶液。

2.2 形态、粒径大小和表面电荷的测定 取脂质体样品适量,缓冲液稀释,滴加磷钨酸染色液,混匀,用铜网蘸取混合液,干燥,于透射电镜下观察并摄像。

同时测定样品的粒径及Zeta表面电位。

2.3 测定方法的建立 采用RP-HPLC测定丹皮酚含量。Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(70:30),流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长274 nm,柱温25 °C,进样量20 μL 。精密称取丹皮酚对照品适量,用流动相溶解定容,制备成质量浓度为0.107 g·L⁻¹的丹皮酚贮备液。精密量取上述贮备液,用流动相稀释成质量浓度10.7,21.4,42.8,64.2,85.6 mg·L⁻¹的系列对照品溶液,按照上述色谱条件进行操作。用测得的峰面积(ρ)与其质量浓度(C)进行回归,得到回归方程 $\rho = 0.3207C - 0.3721$ ($r = 0.9998$),结果表明丹皮酚10.7~107 mg·L⁻¹线性关系良好。

精密量取丹皮酚阳离子脂质体0.1 mL,加入20% Triton X-100乙醇液0.4 mL,超声震荡1 min使之澄清,加流动相稀释至2 mL,按照上述色谱条件进行进样测定,同时取不含丹皮酚的空白脂质体溶液,按照上述方法进行消解,发现辅料和破膜剂对丹皮酚的测定无干扰,对照品、样品与空白脂质体图谱见图1。方法学考察结果表明,日内精密密度为101.3%,日间精密密度为99.36%,加样回收率98.74%。



A. 对照品;B. 样品;C. 空白脂质体;D. 药物洗脱液;1. 丹皮酚

图1 丹皮酚阳离子脂质体 HPLC

2.4 包封率测定方法 采用葡聚糖凝胶分离法测定脂质体包封率。精密量取丹皮酚阳离子脂质体

0.4 mL, 加至 Sephadex G-50 凝胶柱 (1.0 cm × 12 cm) 上方, 以蒸馏水为洗脱剂进行洗脱, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 收集游离药物组分 (约 40 mL), 滤过, RP-HPLC 直接测定。脂质体中总的药物含量采用 2.3 样品处理方法处理并测定。以未被脂质体封装的游离丹皮酚质量 (C_u) 与总的丹皮酚质量 (C_t) 之比计算脂质体的包封率, 见公式 1。

$$\text{脂质体包封率} = \left(1 - \frac{C_u}{C_t}\right) \times 100\% \quad (1)$$

以不同质量浓度的丹皮酚甲醇溶液上柱, 收集洗脱液, 测定回收药量, 考察柱回收率。经考察, 平均回收率为 97.36%。游离药物洗脱液的 HPLC 见图 1。

2.5 制备方法的优化 正交设计进行脂质体制备工艺的优化, 在单因素考察的基础上, 以 DC-Chol 与 Chol 的摩尔比、药脂比、水化时间和超声条件 (输出功率与总功率 650 W 的比例、周期及超声时间) 为因素, 采用 L₉(3⁴) 正交表, 因素水平表见表 1。

表 1 丹皮酚阳离子脂质体制备工艺正交试验因素水平

水平	A	B	C	D
	DC-Chol-Chol	脂材-药物	水化时间/h	超声条件
1	2:3	8:1	0.5	75% × 3 × 0.5 min
2	1:2	10:1	1	50% × 3 × 1 min
3	2:5	12:1	2	25% × 3 × 1.5 min

表 2 丹皮酚阳离子脂质体制备工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	平均粒径 /nm	包封率 /%	ξ 电位 /mV	归一化指标
1	1	1	1	1	237	44.71	9.76	-3.51
2	1	2	2	2	201	58.33	11.33	-1.16
3	1	3	3	3	141	54.38	12.81	-0.21
4	2	1	2	3	158	66.19	15.25	0.96
5	2	2	3	1	169	50.74	14.17	-1.03
6	2	3	1	2	255	64.28	26.26	-0.08
7	3	1	3	2	143	53.61	30.17	1.45
8	3	2	1	3	109	71.37	31.28	4.16
9	3	3	2	1	219	44.91	34.26	-0.60
K ₁	-1.62	-0.36	0.19	-1.71				
K ₂	-0.05	0.66	-0.26	0.07				
K ₃	1.67	-0.30	0.07	1.64				
R	1.10	0.34	0.15	1.12				

表 3 归一化指标方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	16.28	2	48.48	<0.05
B	1.97	2	5.86	
C(误差)	0.34	2	1.00	
D	16.86	2	50.22	<0.05

粒径大小、包封率及 ξ 电位为阳离子脂质体性状的重要特征, 因此将其作为正交试验设计的评价指标。从单因素考察结果可以看出, 各因素对粒径大小、包封率及 ξ 电位的影响规律不同, 因此有必要运用多指标综合评价试验结果^[9]。将各项结果归一化处理后, 采用多指标 Z-评分法综合评分, 计算公式 2, 3 如下。

$$Z_i = \frac{X_i - \bar{X}_i}{S_i} \quad (2)$$

$$\sum Z_i = \sum Z_{i \text{ 高优}} - \sum Z_{i \text{ 低优}} \quad (3)$$

其中, Z_i 为指标归一化后的得分值, X_i 为指标值, \bar{X}_i 为指标值平均值, S_i 为指标值的标准方差; $\sum Z_i$ 为高优指标和低优指标的差值。

本试验中, 包封率 (%)、ξ 电位 (mV) 为高优指标, 平均粒径大小 (nm) 为低优指标, 各指标归一化的结果见表 2, 方差分析见表 3。

影响试验结果各因素主次顺序为 D > A > B > C, 最佳因素水平为 A₃B₂C₃D₃, 即 DC-Chol-Chol 的摩尔比为 2:5, 药脂比为 10:1, 水化时间为 6 h, 超声条件为输出功率为总功率的 25%, 以 1.5 min 为一个周期, 超声 3 个周期。

2.6 丹皮酚脂质体制备工艺的确定 为进一步验证上述最佳工艺的稳定性

和可行性, 按照优选出的最佳制备工艺制备 3 批脂质体溶液, 进行验证试验, 得到的脂质体粒径分别为 (117 ± 24), (134 ± 32), (145 ± 37) nm; 包封率分别为 72.83%, 71.91%, 74.37%; ξ 电位分别为 31.35, 34.17, 35.09 mV。由结果可知, 确定薄膜分散-探头超声法制备工艺为精密称取 DC-Chol 160 mg, Chol 300 mg, HSPC 500 mg,

溶于 40 mg 丹皮酚三氯甲烷液 (15 mL) 中,40 ℃ 水浴减压蒸发除去有机溶剂,形成均匀性薄膜,加入 pH 6.5 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.05 mol·L⁻¹) 10 mL 水化 6 h,探头式超声 3 min,再依次过 0.8,0.45 μm 的微孔滤膜,得脂质体溶液。所得的丹皮酚阳离子脂质体溶液呈乳白色半透明状,色泽均匀,略带乳光,流动性好。透射电镜观察结果显示,脂质体微粒外观圆整,大小较均一,分散性好,粒径呈正态分布,大小均匀,见图 2,3。

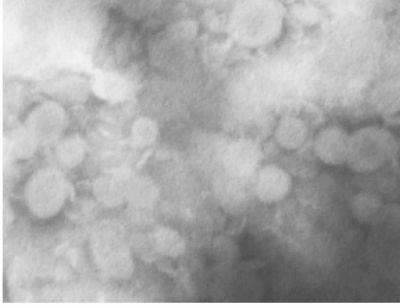


图 2 丹皮酚脂质体透射电镜照片 (a × 80 000)

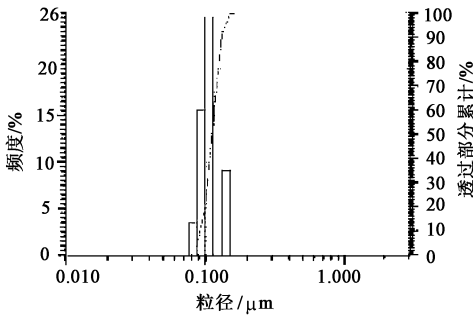


图 3 丹皮酚脂质体粒径分布

2.7 丹皮酚阳离子脂质体凝胶剂的制备 称取高分子材料卡波姆 1.0 g,加入上述最佳制备工艺制成的脂质体中,溶胀完全后,加入甘油 0.3 g,研磨均匀,即得丹皮酚阳离子脂质体凝胶剂。该制剂黏度良好,皮肤刺激性小。

3 讨论

脂质体凝胶是将含药脂质体混于凝胶基质中的一种外用半固体剂型,具有高度亲水性,药物分散性能好,除具备脂质体载体的优势外,独特的溶液-凝胶转变特性使其兼有制备简单、使用方便、与皮肤组织亲和力强等优点。由于氧气可由凝胶自由进入皮肤表面,不会引起缺氧环境造成的创伤皮肤异常愈合问题^[10]。

目前市场上有抗过敏和消炎止痒用的丹皮酚软膏,用于皮炎、皮肤瘙痒等症。本研究利用阳离子脂质体载体,设计将丹皮酚输送至真皮层,加速组织创伤修复和愈合,同时消除破损皮肤炎症,为中药治疗组织创伤提供有益的探索和尝试。为考察丹皮酚阳离子脂质体凝胶的透皮性能,将进一步进行大鼠离体皮肤经皮渗透试验。

[参考文献]

[1] Ostman A, Heldin C H. Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists[J]. *Adv Cancer Res*, 2001, 80(3):1.

[2] Daniels J T, Schultz G S, Blalock T D. Mediation of transforming growth factor β_1 -stimulated matrix contraction by fibroblasts: a role for connective tissue growth factor in contractile scarring[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(5):2043.

[3] 中国药典. 一部[S]. 2010;160.

[4] 孙言才,沈乐先,孙国平. 丹皮酚的主要药理活性研究进展[J]. *中成药*, 2004, 26(7):579.

[5] 卜今,马鹏程,陈志强,等. MAPKs 对丹皮酚下调黑色素合成的介导作用[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(7):915.

[6] 王玫,刘继勇,韩盈,等. 丹皮酚对 TNF- β_1 诱导真皮成纤维细胞 MMP-9mRNA 及细胞因子表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(4):458.

[7] Ferreira L S, Ramaldes G A, Nunan E A, et al. *In vitro* skin permeation and retention of paromomycin from liposomes for tropical treatment of the cutaneous leishmaniasis [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2004, 30(3):289.

[8] Katahira N, Murakami T, Kugai S, et al. Enhancement of topical delivery of a lipophilic drug from charged multilamellar liposomes [J]. *J Drug Target*, 1999, 6(6):405.

[9] 靳浩,吴诚,梅兴国. 多指标综合评价法优选阿霉素微球的制备工艺及体内的初步考察[J]. *中国药学杂志*, 2006, 41(22):1723.

[10] Chen C P, Yang Y C, Su T H, et al. Hypoxia and transforming growth factor-beta I act independently to increase extracellular matrix production by placental fibroblasts[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(2):1083.

[责任编辑 全燕]