

莪术油复合磷脂脂质体的制备工艺

程娜娜, 陆兔林, 陈军*, 毛春芹
(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] 目的: 采用复合磷脂脂质体技术制备莪术油脂质体并研究其最佳制备工艺及处方。方法: 采用高效液相色谱法和分光光度法分别测定复合磷脂脂质体中莪术醇和莪术油的含量。采用乙醇注入法制备莪术油复合磷脂脂质体, 并以脂质体中药物含量为考察指标, 采用正交试验优选了莪术油复合磷脂脂质体的最优处方与工艺。结果: 以优化的工艺和处方制备的莪术油复合磷脂脂质体, 包封率稳定, 药物含量高。结论: 该脂质体制备方法准确可靠, 工艺可行, 质量稳定可控。

[关键词] 莪术油; 脂质体; 制备工艺; 氢化大豆磷脂; 大豆磷脂

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0014-04

Investigation on Preparation of ZTO-containing Liposomes Composed of SPC and HSPC

CHENG Na-na, LU Tu-lin, CHEN Jun*, MAO Chun-qin

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu Province 210046, China)

[Abstract] Objective: To investigate the preparation of the novel liposome composed of hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC) and soybean phosphatidylcholine (SPC) containing zedoary turmeric oil (ZTO). **Method:** HPLC analysis and spectrophotometry analysis were used to determine the contents of curcumol and ZTO in ZTO liposomes both composed of HSPC and SPC respectively. The ZTO novel liposomes were prepared by ethanol injection method. The best prescription of ZTO liposome both composed of HSPC and SPC was determined through orthogonal design, using the drug content of liposomes as the evaluation index. **Result:** When ZTO novel liposome was prepared with the best prescription, both the entrapment efficiency stability and the drug content were high. **Conclusion:** The method was accurate and applicable. The preparation was feasible and the quality of the novel liposome was stable and controllable.

[Key words] zedoary turmeric oil; liposomes; preparation; HSPC; SPC

莪术油是从姜科植物蓬莪术 (*Curcuma phaeocaulis* Val.)、广西莪术 (*C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang) 或温郁金 (*C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling) 的干燥根茎中提取的挥发油, 含有莪术醇、

-榄香烯等多种活性成分。目前的研究表明, 莪术油具有确切的抗肿瘤、抗菌、抗病毒等作用^[1]。临床上有莪术油静脉注射液应用, 但因采用吐温-80 增溶, 具有溶血等毒副作用^[2]。

脂质体 (liposomes) 是一种结构和成分 (主要是磷脂) 都类似于生物膜的超微型球状药物载体, 具有靶向、缓释长效、降低药物毒性、提高组织相容性和药物稳定性等特点, 是静脉注射给药系统的常用载体。在前期研究^[3] 中曾尝试将亲脂性的莪术油包裹在脂质体双分子层中制备莪术油脂质体, 以解决其水溶性不佳的问题并避免使用吐温-80。但由于莪术油中有效成分较多, 而脂质体往往稳定性不佳, 容

[收稿日期] 20100802(006)

[基金项目] 南京中医药大学引进人才启动项目(200802)

[通讯作者] * 陈军, 博士, 副教授, 从事中药新剂型与药物动力学研究, Tel: 025-85811050, E-mail: chenjun75@163.com

[第一作者] 程娜娜, 硕士, 从事药质量控制及新药开发研制, Tel: 15005187130, E-mail: chengnana198512@126.com

易产生药物泄漏,故尝试采用复合磷脂脂质体技术解决这一问题。

复合磷脂脂质体^[4],即采用 2 种或 2 种以上不同相变温度的磷脂材料作为膜材,在储存和使用过程中,脂质体双分子层中同时存在胶晶相和液晶相,将双分子层分为若干个不连续的区域,与单一磷脂脂质体(双分子层中只存在一相)相比,脂质体的某些性质发生了显著改变。本文在大豆磷脂(soybean phosphatidylcholine, SPC)中添加少量氢化大豆磷脂(hydrogenated soybean phosphatidylcholine, HSPC)作为膜材制备了莪术油复合磷脂脂质体,并进行了制备工艺的研究,以期提高药物的稳定性并用于静脉注射。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪(LC-20AT,日本岛津);N2000 色谱工作站(浙大智达信息工程有限公司);DF-101SA 集热式恒温加热磁力搅拌器(南京科尔仪器设备有限公司);紫外分光光度计(752 型,上海菁华科技仪器有限公司);电子天平(BS124S,德国赛多利斯公司);超声波细胞粉碎机(JY92- 型,宁波新芝生物科技股份有限公司);恒流泵(HL-2S 型,上海沪西分析仪器厂有限公司)。

1.2 药品与试剂 莪术醇(中国药品生物制品检定所,批号 100185-200506);莪术油(注射级,江西省吉水县同仁药用油厂);大豆磷脂(SPC)(德国 lipid 公司,批号 790549-1);胆固醇(分析纯,中国慧兴生化试剂有限公司,批号 20030122);氢化大豆磷脂(HSPC)(德国 Lipoid 公司,批号 256261-1);乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司);香草醛(分析纯,上海化学试剂采购供应站分装厂);泊洛沙姆 188(美国 Sigma 公司)。

2 方法与结果

2.1 分光光度法测定复合磷脂脂质体中莪术油的含量^[3]

2.1.1 显色剂(香草醛硫酸溶液)配制 取香草醛 0.2 g,加入乙醇 1 mL 使溶解,加入放冷的硫酸溶液(1:2)100 mL,摇匀,即得,临用新制。

2.1.2 显色方法^[3] 取 1 mL 莪术油复合磷脂脂质体加入 1 mL 无水乙醇,涡旋 1 min,40 ℃ 超声提取 10 min,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取 0.5 mL 上清液于 5 mL 量瓶内,加入显色剂至刻度,摇匀,在 23 ℃ 放置 1 h,520 nm 下测定吸光度。

2.2 HPLC 测定复合磷脂脂质体中莪术醇的含量

2.2.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil C₁₈(4.6 mm ×250 mm, 5 μm);检测波长 210 nm;流动相乙腈-水(80:20);柱温 35 ℃;流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 20 μL。莪术醇标准曲线为 $Y=1\,564.6X+2.970\,3$, $r=0.999\,9$,线性范围 0.5~20 mg·L⁻¹。精密度、重复性、加样回收率、稳定性均符合要求。具体方法和数据已另文报道^[5]。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密吸取莪术油复合磷脂脂质体溶液 1 mL,加入 1 mL 破膜剂(无水乙醇:异丙醇=1:4),超声 10 min,摇匀即得。

2.3 莪术油复合磷脂脂质体的制备

2.3.1 制备方法 根据前期研究,采用乙醇注入法制备莪术油复合磷脂脂质体。精密称取磷脂(SPC 与 HSPC 的混合物)、胆固醇,加入莪术油无水乙醇溶液超声溶解,恒温磁力搅拌下注入到 PBS(pH=6.5)中,挥去乙醇后,探头超声,即得。

2.3.2 复合磷脂比例的确定 制备了复合磷脂比例(HSPC:SPC,重量比)分别为 1:9,1:3,1:1,3:1,9:1 的莪术油复合磷脂脂质体,结果发现,复合磷脂比例(HSPC:SPC)大于等于 1 后,脂质体黏性增大,迅速沉降,难以形成稳定的分散体系。复合磷脂比例 1:9 与 1:3 的复合磷脂脂质体中莪术油的包封率分别为 67.99% 和 70.70%,莪术醇的包封率分别为 29.01% 和 25.28%。鉴于 HSPC 的价格是 SPC 的 10 倍,因此在保证包封率的前提下,选择 HSPC 用量较少的磷脂比例为 1:9 的复合磷脂脂质体用于下一步研究。

2.3.3 复合磷脂脂质体制备处方与工艺的优化 采用 L₉(3⁴) 正交试验方法,对莪术油复合磷脂脂质体的处方与工艺进行优化,选用药脂重量比(A)、胆固醇与磷脂的质量比(B)、无水乙醇与 PBS(pH6.5)的体积比(C)、搅拌温度(D)为考察指标进行优化。因素水平见表 1,正交试验设计及测定结果见表 2,脂质体中莪术醇及莪术油含量的方差分析见表 3,4。

表 1 莪术油复合磷脂脂质体制备处方与工艺优化

正交设计因素水平				
水平	A 药脂重量比	B 胆固醇 磷脂	C 无水乙醇 PBS	D 搅拌温度 /
1	1:4	1:3	1:1	40
2	1:6	1:6	1:2	50
3	1:9	1:12	1:4	60

表 2 莪术油复合磷脂脂质体处方正交试验设计

No.	及含量测定结果				mg·L ⁻¹	
	A	B	C	D	莪术醇	莪术油
1	1	1	1	1	2.51	973.05
2	1	2	2	2	8.81	1 402.49
3	1	3	3	3	13.80	1 484.03
4	2	1	2	3	5.45	1 288.34
5	2	2	3	1	30.42	1 549.26
6	2	3	1	2	49.83	1 560.14
7	3	1	3	2	28.10	1 560.14
8	3	2	1	3	64.29	1 696.04
9	3	3	2	1	77.02	1 804.76
<i>K</i> _{1a}	8.373	12.02	38.877	36.65		
<i>K</i> _{2a}	28.567	34.507	30.427	28.913		
<i>K</i> _{3a}	56.47	46.883	24.107	27.847		
<i>R</i> _a	48.097	34.863	14.77	8.803		
<i>K</i> _{1b}	1 286.523	1 273.843	1 409.743	1 442.357		
<i>K</i> _{2b}	1 465.913	1 549.263	1 498.53	1 507.59		
<i>K</i> _{3b}	1 686.98	1 616.31	1 531.143	1 489.47		
<i>R</i> _b	400.457	342.467	121.4	65.233		

注: a 为脂质体中莪术醇的含量, b 为脂质体中莪术油的含量。

表 3 莪术醇含量的方差分析

因素	SS	f	F	P
A	3 499.656	2	25.270	<0.05
B	1 874.284	2	13.534	
C	329.498	2	2.379	
D(误差)	138.49	2	1.000	

注: $F_{0.05(2,2)} = 19.00$, $F_{0.01(2,2)} = 99.00$, 表 4 同。

表 4 莪术油含量的方差分析

因素	SS	f	F	P
A	241 416.785	2	35.485	<0.05
B	197 634.850	2	29.049	<0.05
C	23 684.662	2	3.481	
D(误差)	6803.388	2	1.000	

由直观分析结果可知, 4 个指标影响因素作用均为 $A > B > C > D$, 以脂质体中莪术醇及莪术油的含量分别作为指标时所得到的最优工艺有所不同(以莪术醇含量作为指标, 最优工艺为 $A_3 B_3 C_1 D_1$; 以莪术油含量作为指标, 最优工艺为 $A_3 B_3 C_3 D_2$, 但莪术油更能代表整体性, 且方差分析结果表明, 无水乙醇与 PBS 的体积比及搅拌温度影响不显著, 因此以脂质体中莪术油的含量作为指标筛选最优工艺。鉴

于 HSPC 的相变温度为 50 , 为保证其在制备时能充分溶解发挥作用, 因此将搅拌温度定为 60 。最终确定最佳工艺为 $A_3 B_3 C_3 D_3$, 即药脂重量比为 1 : 9, 胆固醇 : 磷脂(质量比) = 1 : 12, 无水乙醇 : PBS(体积比) = 1 : 4, 温度为 60 。

2.4 包封率的测定 采用葡聚糖凝胶法测定包封率。精密吸取 1 mL 莪术油复合磷脂脂质体, 以磷酸盐缓冲溶液(PBS)为洗脱液, 收集脂质体与游离药物部分, 分别测定两部分洗脱液的药物含量, 并计算包封率。包封率测定的方法学考察(上柱回收率、洗脱曲线)具体方法和数据已另文报道^[3]。

包封率 = 脂质体中药物含量 / (脂质体中药物含量 + 游离药物含量) × 100%

按照上述优选工艺, 制备 3 批莪术油复合磷脂脂质体, 并测定其包封率及含药量。结果莪术醇的平均包封率为 49.95%, 质量浓度为 85.29 mg·L⁻¹; 莪术油的平均包封率为 66.64%, 质量浓度为 1 899.17 mg·L⁻¹, 表明该优选工艺可行。

2.5 泄漏稳定性 取莪术油 SPC 脂质体及复合磷脂脂质体, 加入等体积 1% 泊洛沙姆 188 溶液后于 37 水浴中避光密封放置, 于不同时间点取样测定脂质体中药物含量, 以开始放样时脂质体中药物含量为 100% 计算各个时间点的脂质体中含药量的相对百分数。结果见图 1, 2。

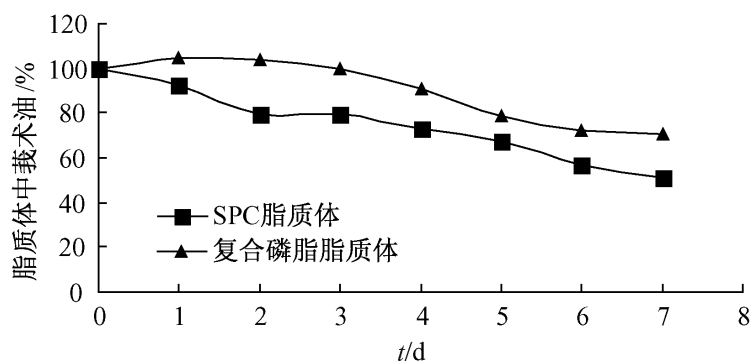


图 1 莪术油 SPC 脂质体与复合磷脂脂质体中莪术油的泄漏稳定性比较

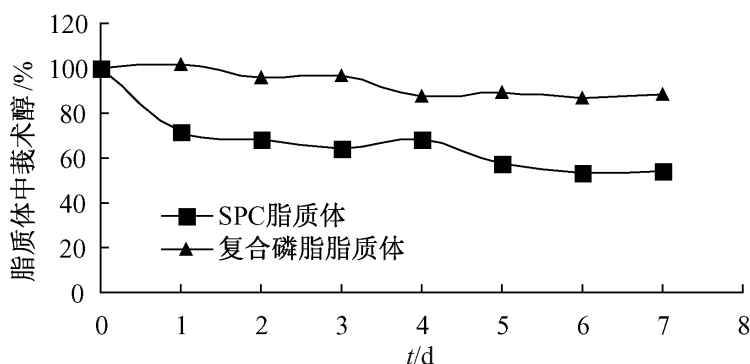


图 2 莪术油 SPC 脂质体与复合磷脂脂质体中莪术醇的泄漏稳定性比较

由图可见, 莪术油复合磷脂脂质体中莪术油及莪术醇的泄漏均明显小于普通的 SPC 脂质体。7 d

后 SPC 脂质体和复合磷脂脂质体中莪术油含量分别为 50.85% 和 70.35%; 莪术醇含量分别为 53.98% 和 88.72%。

3 讨论

莪术油收载于《中国药典》2010 年版一部, 常用于抗病毒药、抗癌药, 它的活性成分主要有莪术醇、-榄香烯等, 其中莪术醇是公认的抗癌活性成分^[6]且含量较高, 因此本文也将莪术醇作为处方优选的考察指标。

脂质体(liposomes)是一种结构和成分(主要是磷脂)都类似于生物膜的新型药物载体, 包封药物后可达到靶向和缓释的效果, 可控制药物在体内的清除速度及改变组织分布等, 因此, 我们将莪术油制成脂质体拟开发新型抗肝癌制剂, 并尝试应用复合磷脂脂质体技术进一步改善药剂学性质。采用高相变温度磷脂如 HSPC 作为膜材完全替代 SPC 已被证明能够改善脂质体的稳定性^[7], 但是, HSPC 的价格是 SPC 的 10 倍, 推广应用较为困难。本文的研究结果表明, 在 SPC 中添加少量(10%)的 HSPC 后, 即可达到较好的包封率及载药效果。前期也曾尝试制备莪术油 HSPC 脂质体, 但发现载药效果很低, 尤其是莪术醇的包封率更是接近于 0。

处方优选时如采用包封率作为考察指标, 结果与以脂质体中药物含量作为指标所得到的最优处方工艺相同。挥发油类药物由于极易挥发, 在制备脂质体过程中不可避免地会有所损失, 这一损失会直接影响到脂质体中药物的含量, 但对包封率(相对比率)可能影响有限, 因此在莪术油复合磷脂脂质体的

制备优化过程中, 以脂质体中药物含量作为指标可能更有意义。

由于中药的成分复杂, 在进行制备工艺考察成分选取时, 往往存在代表性是否充分的问题。本文同时采用莪术油总量及主要有效成分莪术醇的含量作为指标筛选最优工艺, 得到的最优处方中主要影响因素均相同, 因此所得到的最优处方工艺更具有说服力。

[参考文献]

- [1] 梁广, 黄志锋, 李校堃, 等. 莪术油的药理学及临床应用研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(12): 1541.
- [2] 梁莉, 乔华, 王婷, 等. 莪术油注射液的不良反应[J]. 中国药事, 2006, 20(12): 770.
- [3] 陈军, 朱铠, 程娜娜, 等. 磷脂组成对莪术油脂质体性质的影响[J]. 中药材, 2009, 32(5): 777.
- [4] Kan P, Wang A J, Chen W K, et al. Liposome for incorporating large amounts of hydrophobic substances [P]. US: 2004126886, 2004-07-01.
- [5] 程娜娜, 陆兔林, 陈军, 等. 莪术油脂质体的含量测定及方法应用[J]. 安徽医药, 2010, 14(4): 404.
- [6] 曾建红, 陈旭, 潘艳薇, 等. 莪术醇的研究进展[J]. 中药材, 2008, 31(1): 168.
- [7] 王黎, 侯宝光, 侯新朴, 等. 氢化与非氢化卵磷脂对阿霉素脂质体体内外稳定性的影响[J]. 药学学报, 2001, 36(6): 444.

[责任编辑 仝燕]