

· 药剂学 ·

## 正交试验优选硫酸铵梯度法制备苦参碱脂质体的工艺研究

李莎<sup>1</sup>, 仵文英<sup>2</sup>, 徐晓娜<sup>1</sup>, 李兴华<sup>2</sup>, 马小亚<sup>2</sup> (1. 西安交通大学医学院药理学系, 陕西 西安 710061; 2. 西安交通大学医学院第二附属医院药剂科, 陕西 西安 710004)

**[摘要]** 目的 以包封率为指标优选苦参碱脂质体的制备工艺。方法 以氢化大豆卵磷脂(HSPC)和胆固醇(Ch)为膜材, 采用薄膜超声-硫酸铵梯度法制备脂质体。通过正交设计优化处方工艺, 葡聚糖凝胶法分离游离药物, HPLC法测定脂质体中苦参碱的包封率。结果 最佳工艺为:HSPC:Ch=3:1, 探头超声10 min, 药脂比为1:15, 包封率均值为50.68%。结论 优化后的工艺可提高苦参碱脂质体的包封率, 此工艺条件简单, 可操作性强, 适于实验室条件下制备苦参碱脂质体。

**[关键词]** 苦参碱; 脂质体; 制备方法; 葡聚糖凝胶法; 包封率

**[中图分类号]** R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)04-0286-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.04.013

## Optimization of preparation of matrine liposome in ammonium sulfate gradient method by orthogonal experiment

LI Sha<sup>1</sup>, WU Wen-ying<sup>2</sup>, XU Xiao-na<sup>1</sup>, LI Xing-hua<sup>2</sup>, MA Xiao-ya<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xian 710061, China; 2. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xian 710004, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the preparation method of matrine liposome and screen the optimal technological conditions by the encapsulation efficiencies. **Methods** Liposome was made of hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC) and cholesterol (Ch) by film ultrasonic-ammonium sulfate gradient method. Then orthogonal design was adopted to screen the optimal conditions. Free drug was separated by Sephadex gel and the encapsulation efficiency of matrine was determined by HPLC. **Results** The optimum conditions of matrine liposomes were as follows: HSPC:Ch=3:1, the time of probe ultrasonic was 10min, and the ratio of drug to lipid was 1:15. The average entrapment efficiency was 50.68%. **Conclusions** The entrapment efficiency of liposome could be obviously improved with the optimized condition. The method discussed above was simple, feasible, and easily operated, which could be suitable for laboratory to prepare matrine liposome.

**[Key words]** matrine; liposome; preparation; Sephadex gel; entrapment efficiency

苦参碱(matrine)系指豆科植物苦参、苦豆子、广豆根中的一种喹诺里西啶类生物碱,是苦参碱类生物碱的代表<sup>[1]</sup>。近年来苦参碱的抗肿瘤作用日益受到重视,苦参碱的抗肿瘤作用是通过抑制肿瘤细胞增殖、转移,诱导其凋亡和向正常细胞分化的机制实现的。

脂质体(liposome)系指将药物包封于类脂质双分子层内而形成的微型泡囊体。作为一种药物载体,脂质体能够提高药物的生物利用度、减轻不良反应,被动靶向于肝、肾等器官<sup>[2]</sup>。本文采用薄膜超声-硫酸铵梯度法制备苦参碱脂质体,并通过正交试验优化其制备工艺。

### 1 材料与仪器

氢化大豆卵磷脂(HSPC),高纯合成磷脂(DSPG, 上海艾维特医药科技有限公司),胆固醇[中国医药(集团)上海化学试剂公司],苦参碱原料(西安中鑫生物技术有限公司,纯度>98%,批号:111019),苦参碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号:20110719),葡聚糖凝胶G-100(浙江黄岩曙光化工厂),透析袋(截留分子量:8000~14400),除HPLC所用试剂为色谱纯外,其它试剂均为分析纯。

WHCL-350型超声波药品处理机(济宁万和超声电子设备有限公司),UV-2550PC型紫外可见分光光度计(岛津(香港)有限公司),RE-52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),GR-202型电子天平(日本A&D公司),85-2恒温加热磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司),探头超声波处理器(上海生析超声仪器

**[作者简介]** 李莎(1987-),女,硕士研究生。Tel:15829210384, E-mail:lisa710021@126.com.

**[通讯作者]** 仵文英。Tel:(029)87679282, E-mail:wuy0413@tom.com.

有限公司), Waters 高效液相色谱系统。

## 2 方法与结果

**2.1 苦参碱脂质体的制备** 将 HSPC 和 Ch 按一定质量比溶解于适量氯仿中, 于氯仿中加入少量 DSPG, 37 °C 旋转蒸发仪减压蒸发除去氯仿, 在梨形瓶壁上形成均匀脂质薄膜。加入 0.3 mol/L 硫酸铵溶液于脂质薄膜中, 水浴(50 °C) 孵化 1.5 h, 37 °C 恒温磁力搅拌 30 min, 探头超声即得空白脂质体。将制得的空白脂质体装于透析袋中, 扎紧两端, 4 °C 下用生理盐水透析 3 d 除去脂质体外水相的硫酸铵。在透析后的空白脂质体中按一定药脂比加入苦参碱溶液, 混合均匀, 50 °C 水浴中孵化 2 h, 即得苦参碱脂质体。

**2.2 脂质体制备工艺优化** 根据预实验, 选择磷脂-胆固醇比例(HSPC:Ch)、探头超声时间及药脂比为三因素。包封率为指标, 采用  $L_9(3^4)$  正交表设计实验。因素水平见表 1, 方案及结果分析见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 因素水平表

因素	HSPC:Ch A	超声时间 B(min)	药脂比 C	空白 D
1	1:1	10	1:25	
2	2:1	15	1:20	
3	3:1	20	1:15	

表 2 正交设计方案及结果分析

	A	B	C	D(空白)	包封率%
1	1	1	1	1	41.88
2	1	2	2	2	36.67
3	1	3	3	3	45.56
4	2	1	2	3	38.09
5	2	2	3	1	35.68
6	2	3	1	2	34.48
7	3	1	3	2	59.69
8	3	2	1	3	52.23
9	3	3	2	1	48.90
$K_1$	124.11	139.66	128.59	126.45	
$K_2$	108.25	124.58	123.65	130.84	
$K_3$	160.81	128.93	140.93	135.88	
优水平	$A_3$	$B_1$	$C_3$		最佳组合
主次因素			A, C, B		$A_3B_1C_3$

表 3 方差分析表

因素	离差平方和 (SS)	自由度 (V)	均方 (MS)	F 值	显著性
A	484.55	2	242.28	32.81	*
B	40.16	2	20.08	2.71	
C	52.81	2	26.40	3.56	
D(误差)	14.84	2	7.42	1.00	

注:  $F_{0.05(2,2)} = 19.00, P < 0.05; F_{0.01(2,2)} = 99.00, P < 0.01$

分析结果表明, 影响苦参碱脂质体包封率的因素顺序为:  $A > C > B$ 。氢化大豆卵磷脂(HSPC)与胆固醇(Ch)质量比对脂质体的包封率影响最大, 超声时间对脂质体的包封率的影响最小。经方差分析 HSPC:Ch 对包封率有显著影响, 药脂比和超声时间对包封率影响较小, 最佳处方组成为:  $A_3B_1C_3$ , 即 HSPC:Ch 质量比为 3:1, 超声时间为 10 min, 药脂比为 1:15。

### 2.3 包封率的测定

**2.3.1 最大吸收波长的测定** 苦参碱标准溶液以蒸馏水为空白对照在 200~400 nm 范围内扫描, 显示苦参碱在 215 nm 处有最大吸收, 故选 215 nm 作为苦参碱测定波长。

**2.3.2 色谱条件** 色谱柱: Agilent  $C_{18}$  色谱柱(250 × 4.6 mm, 5  $\mu$ m); 流动相: 乙腈:0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(10:90), 流速:1.0 ml/min, 检测波长为 215 nm, 进样量为 20  $\mu$ l, 柱温为 25 °C。

**2.3.3 标准曲线测定** 精密称定苦参碱标准品 0.001 g 于 50 ml 容量瓶中, 蒸馏水溶解定容至刻度, 即得苦参碱储备液。分别精密量取上述储备液 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 ml 至 5 ml 容量瓶中, 以蒸馏水稀释定容。按“2.3.2”项下色谱条件, 以浓度 C 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标做回归曲线。回归方程:  $A = 27\ 858C + 2\ 842.2, r = 0.9997$ 。在 0.8~16.0  $\mu$ g/ml 浓度范围内, 线性关系良好。

**2.3.4 精密度测定** 取同一对照品溶液, 重复进样 6 次, 按上述色谱条件测定, 记录峰面积, 计算 RSD 值为 0.98% ( $n = 6$ ), 表明精密度良好。

**2.3.5 加样回收率的测定** 精密称取一定量的苦参碱标准品, 加入到已知含量的样品中, 依样品测定项下方法测定, 计算平均加样回收率。低、中、高(2.0、4.0、6.0  $\mu$ g) 3 个浓度加样回收率分别为(98.62 ± 0.75)%, (98.38 ± 0.58)%, (99.1 ± 0.62)% ( $n = 3$ )。

**2.3.6 脂质体与游离药物的分离** 用凝胶柱过滤法分离苦参碱脂质体与游离苦参碱。称取葡聚糖凝胶用生理盐水充分溶胀, 湿法装柱。取苦参碱脂质体, 精密移取 0.2 ml 上柱, 以生理盐水洗脱, 收集洗脱液, 每份 1 ml, 共接取 35 份。将洗脱液分别加甲醇定容至 5 ml 摇匀, 过 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜后按“2.3.2”项下色谱条件进样测定峰面积。结果见图 1。

流出曲线表明, 苦参碱脂质体通过凝胶柱后, 苦参碱脂质体和苦参碱游离药物能够被完全分离。其中 7~13 ml 为苦参碱脂质体部分, 19~30 ml 为苦参碱游离药物部分。

**2.3.7 药物含量测定** 采用凝胶法测定苦参碱脂

质体的包封率。精密量取苦参碱脂质体 0.20 ml, 葡聚糖凝胶 G-100 柱分离, 根据流出曲线, 将 19 ~ 30 ml 流分合并混匀得到游离药物部分, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜后注入 HPLC 测定峰面积, 根据峰面积计算得到游离苦参碱的量 ( $W_1$ )。另精密量取苦参碱 0.20 ml, 直接加甲醇溶解并稀释至 12 ml, 依法测定苦参碱含量 ( $W_2$ ), 按下式计算包封率  $EF\% = (1 - W_1/W_2) \times 100\%$ 。平均包封率为 50.68%。

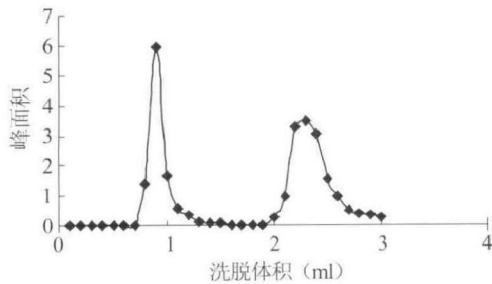


图1 苦参碱脂质体的流出曲线

**2.4 脂质体外观形态考察** 制备得到的苦参碱脂质体为均一、稳定的淡乳白色混悬液。取少量苦参碱脂质体稀释后涂片, 光学显微镜下观察, 其分布均匀, 偶有较大粒径出现; 将苦参碱脂质体涂于有支持膜的铜网上, 用磷钨酸复染, 自然凉干, 在透射电镜下观察脂质体的外观形态。如结果显示, 脂质体边缘圆整, 均为圆形或近圆形, 粒度分布均匀。图2为光镜下脂质体形态, 图3为电镜下脂质体形态。

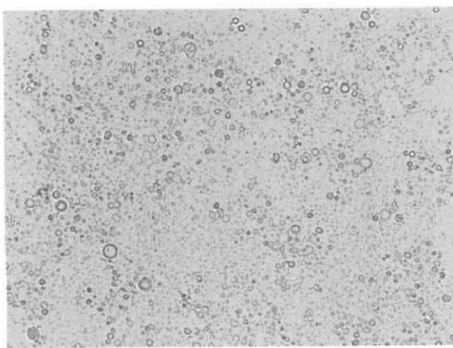


图2 苦参碱脂质体光镜图 ( $\times 400$ )

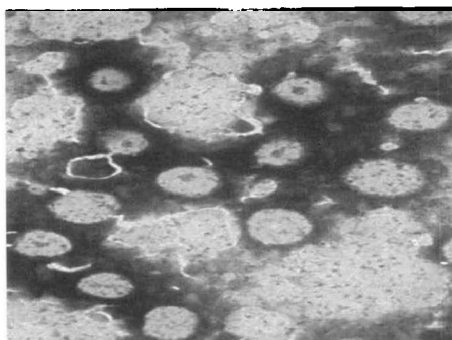


图3 苦参碱脂质体电镜图 ( $\times 30\ 000$ )

**2.5 脂质体粒径分布测定** 采用粒径测定仪测定苦参碱脂质体的粒径。将苦参碱脂质体稀释后, 超声 10 min, 在激光粒度分布仪上测定脂质体的粒径大小及粒度分布图。苦参碱脂质体平均粒径为 205.0 nm。如图4所示。

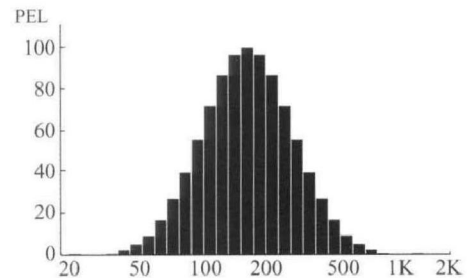


图4 苦参碱脂质体粒径分布图

**2.6 最佳工艺验证** 按优化工艺制备3批苦参碱, 测定包封率。包封率分别为: 47.67%、50.66% 和 53.70%。平均包封率为 50.68%。

### 3 讨论

**3.1 苦参碱脂质体制备方法的选择** 脂质体制备方法包括: 薄膜分散法、逆向蒸发法、二次乳化法、Kirby 法、pH 梯度法等。薄膜分散法制备的脂质体为单室脂质体, 粒径较小且均匀。但单独使用薄膜分散法制备的脂质体包封率较低, 而硫酸铵梯度法可以提高弱碱性药物脂质体的包封率。硫酸铵梯度法的原理为<sup>[4]</sup>: 脂质体内水相中的  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  含有  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NH}_4^+$  进一步分解为  $\text{NH}_3$  和  $\text{H}^+$ ,  $\text{NH}_3$  的释放和  $\text{H}^+$  的产生在脂质体内外水相之间产生了一个 pH 梯度。由于 pH 梯度的存在, 使弱碱性的药物苦参碱以分子状态进入内水相, 并在酸性条件下成盐变成离子态, 无法穿过脂质双分子层回到外水相, 从而使得脂质体不易泄漏, 更加稳定。因此薄膜分散-硫酸铵梯度法制备的苦参碱脂质体粒径小, 包封率高。

**3.2 影响苦参碱包封率重复性不佳的可能因素** ① 薄膜旋转蒸发成膜不均匀, 成膜时间差异较大, 受旋转蒸发时蒸发仪的转速、水流速度及真空泵压力大小等因素影响。② 孵化温度和时间差异可能影响脂质体包封率。③ 钻头超声时由于功率较大, 偶有脂质体溅出丢失, 使其量减少。

**3.3 脂质体包封率的测定方法**<sup>[5]</sup> 脂质体和游离药物的分离有葡聚糖凝胶柱过滤法、透析法和超速离心法。透析法存在耗时长、耗介质多、易造成药物渗漏等不足。超速离心法成本高, 时间较长, 还有可能导

致脂质体破乳,使其包封率降低。所以本工艺采取葡聚糖凝胶柱过滤法,此法简单易行,重现度较好。该方法是利用分子筛原理,粒径大的脂质体先从柱中流出,粒径小的游离药物后流出。应用这种方法能将脂质体与游离药物较好分开。

**3.4 分离效果** 黄洁等<sup>[6]</sup>采用 G-100 凝胶色谱法分离苦参碱与苦参碱隐形脂质体时上样量为 0.5 ml。笔者在预实验中,以 0.2 ml 上样量即能够达到很好的分离效果,共收集了 40 瓶洗脱液,每瓶 1 ml。在第 34 瓶洗脱液里已经检测不到苦参碱。所以在试验中,只收集了 35 瓶洗脱液。

**3.5 影响苦参碱脂质体的三个主要因素** 仵文英等<sup>[7]</sup>曾提出影响苦参碱脂质体制备的因素有药脂比,硫酸铵溶液浓度等。笔者通过 9 组试验优选了影响脂质体制备的三个主要因素,即卵磷脂和胆固醇的比值,药脂比和超声时间。正交试验得出的最佳处方组成为 HSPC:Ch,质量比为 3:1,超声时间为 10 min,药脂比为 1:15。

## 【参考文献】

- [1] 刘梅,刘雪英,程建峰.苦参碱的药理研究进展[J].中国中药杂志,2003,28(9):801.
- [2] Amarnath S, Uma SS. Liposomes in drug delivery: progress and limitation[J]. Int J Pharm, 1997(154):123.
- [3] 陈浩,戴俊东,王玉蓉,等.薄膜超声法制备槲皮素脂质体研究[J].药学实践杂志,2012,30(1):32.
- [4] 陆彬.药物新剂型与新技术[M].北京:人民卫生出版社,1998:120.
- [5] 王绍宁,邓意辉,严志,等.硫酸铵梯度法制备盐酸环丙沙星脂质体的影响因素[J].沈阳药科大学学报,2003,20(2):94.
- [6] 黄洁,仵文英,席枝侠,等.苦参碱脂质体的制备与包封率测定[J].医药导报,2008,27(1):87.
- [7] 仵文英,黄洁,刘硕,等.苦参碱隐形脂质体的制备及影响因素考察[J].中国医院药学杂志,2008,28(21):1816.

[收稿日期]2012-09-05

[修回日期]2012-11-28

(上接第 270 页)

季取样时,叶片与枝条的相似性系数最高 0.63,叶片与树皮的相似性系数为 0.48,枝条与树皮的相似性系数最低为 0.45。

## 4 讨论

本研究对不同季节三尖杉不同组织的内生真菌进行了分离鉴定,并对内生真菌的定殖率、分离率、分离频率、多样性指数、皮耶诺均匀度指数、丰度、相似性系数等指标进行统计分析。研究发现不同季节三尖杉内生真菌的组成和多样性明显不同;三尖杉不同组织部位内生真菌的组成和多样性也存在差异。但是不同季节三尖杉不同组织的内生真菌均具有较高的定殖率、分离率和丰度,说明三尖杉内生真菌具有较为丰富的生物多样性。

研究还发现季节对内生真菌的种类组成有明显的影响,70 种内生真菌分类单元中只有 1 种分布于 4 个季节;同时季节对定殖率和分离率也有明显的影响。植物组织部位对定殖率、分离率有一定的影响,定殖率、分离率最高的是枝条,最低的是树皮。但是植物组织部位对内生真菌的种类组成的影响小于季节,说明宿主植物所处环境的温度是影响内生真菌的菌群结构和生物多样性的一个重要的因素。结合内生真菌丰度和多样性指数综合分析,在春季三尖杉内生真菌具有较高的丰度和多样性。因此,

春季是获得较多种类的内生真菌的最佳取样时间。

## 【参考文献】

- [1] Petrini O, Fisher P. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*[J]. Mycological Res,1990,94(8):1077.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. Science,1993,260:214.
- [3] Contreras-Cornejo, HA, Macias-Rodriguez L, Cortes-Penagos C, et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*[J]. Plant-Physiol, 2009,149(3):1579.
- [4] Waller F, Achatz B, Baltruschat H, et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield[J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2005,102(38):13386.
- [5] 万德光.中药品质研究:理论、方法与实践[M].上海:上海科学技术出版社,2008:35.
- [6] 张艳艳,韩婷,吴令上,等.三尖杉碱类化合物的来源、药理作用及临床应用研究进展[J].现代药物与临床,2011,26(5):370.
- [7] 叶静,冉雪琴,孙端方,等.三尖杉内生真菌的遗传多样性研究[J].山地农业生物学报,2009,28(2):130.
- [8] 韩洁,赵杰宏.一株产高三尖杉酯碱内生真菌 *gyzy-6* 的分离与鉴定[J].广东农业科学 2011,5:112.

[收稿日期]2013-01-16

[修回日期]2013-04-05