

正交试验优选黄芩苷二元醇质体制备工艺

金思岑*(太极集团有限公司,重庆 401147)

中图分类号 R283;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1777-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.17

摘要 目的:优选黄芩苷二元醇质体的制备工艺。方法:以黄芩苷与卵磷脂质量比、含醇质量分数、无水乙醇与丙二醇体积比为考察因素,以包封率为评价指标,采用注入法制备黄芩苷二元醇质体,通过正交试验优选制备工艺。结果:优选的制备工艺为黄芩苷与卵磷脂质量比1:20,含醇质量分数10%,无水乙醇与丙二醇体积比6:4,在此条件下,黄芩苷二元醇质体的包封率为76.51%。结论:所选工艺合理、可行,可用于黄芩苷二元醇质体的制备。

关键词 黄芩苷;二元醇质体;制备工艺

Optimization of the Preparation Technology of Baicalin Binary Ethosomes by Orthogonal Design

JIN Si-cen(Tianjin Group Co., Ltd., Chongqing 401147, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the preparation technology of Baicalin binary ethosomes. METHODS: Baicalin binary ethosomes were prepared by ethanol injection method. The preparation technology was optimized by orthogonal design with ratio of baicalin to lecithin, mass fraction of ethanol, volume ratio of absolute ethanol to propanediol as factors using encapsulation efficiency as index. RESULTS: Optimal preparation technology was as follows: ratio of baicalin to lecithin was 1:20; mass fraction of ethanol was 10%; volume ratio of absolute ethanol to propanediol was 6:4. The encapsulation efficiency of the preparation was 76.51% under this condition. CONCLUSIONS: The optimized formulation is reasonable and feasible, and it can be used for the preparation of Baicalin binary ethosomes.

KEY WORDS Baicalin; Binary ethosomes; Preparation technology

黄芩是唇形科植物黄芩的干燥根,味苦,性寒,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎的功效^[1]。黄芩苷是黄芩的主要有效成分,属于黄酮苷类化合物,有抑菌、抗炎、降压、抗变态反应等药理作用,且在抗肿瘤、抗人类免疫缺陷病毒(HIV)以及治疗心血管疾病等方面也具有潜在的开发应用价值^[2-4]。醇质体具有变形性高、包封率高、能透过完整皮肤等特点,尤其适合外用给药或者作为透皮给药的载体^[5]。然而,由于乙醇具有挥发性,容易导致单元醇质体的质量不稳定,故采用丙二醇和无水乙醇混合(即二元醇质体)来代替单一的乙醇,其具有良好的稳定性、变形性及经皮渗透性。故本试验拟将黄芩苷制成无水乙醇和丙二醇混合的二元醇质体,以包封率为评价指标,采用正交设计优化制备工艺,为黄芩苷制剂的开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1200高效液相色谱仪(美国Agilent公司);SZ-93自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);TGL-16C台式离心机(上海安亭科学仪器厂);BP211D电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

黄芩苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110815-200614);黄芩苷原料(上海景森生物科技有限公司,批号:201108,纯度 $\geq 95\%$);卵磷脂(湖北美联生物科技有限公司,批号:201106);无水乙醇(天津恒兴化学试剂制造有限公司);丙二醇(西陇化工股份有限公司);水为双蒸水,其余试剂

均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄芩苷二元醇质体的制备

采用注入法制备黄芩苷二元醇质体。精密称取处方量的黄芩苷、卵磷脂于25 ml洁净三口烧瓶中,加入处方量的无水乙醇及丙二醇使之完全溶解。35℃以下300 r/min持续搅拌,用5号针头将处方量双蒸水缓慢匀速注入醇溶液中,注完后持续搅拌30 min,超声(功率:250 W,频率:45 kHz)10 min,0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 黄芩苷含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验^[6-7] 色谱柱:Lichrospher C₁₈柱(250 mm \times 4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水-磷酸(46:54:0.2, V/V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:25℃;进样量:20 μl 。理论板数按黄芩苷峰计算应不低于3 000。

2.2.2 供试品溶液的制备 取黄芩苷二元醇质体溶液适量,16 000 r/min离心30 min,精密量取上清液1 ml,置10 ml量瓶中,甲醇稀释,即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品13.2 mg,置50 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,分别精密移取1、2、4、6、8 ml于10 ml量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列浓度对照品溶液。

2.2.4 线性关系考察 取“2.2.3”项下各系列浓度对照品溶液适量,按上述色谱条件分别进样20 μl 测定峰面积。以黄芩苷峰面积积分值(y)对黄芩苷质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程为 $y=410.89x+0.5615$ ($r=0.9999$)。结果表明,黄芩苷质量浓度在0.026 4~0.211 2 mg/ml范围内与峰面积积分值呈良好线性关系。

* 工程师,硕士。研究方向:中药新药。电话:023-89886551。E-mail:jinsicen@163.com

2.2.5 精密密度试验 精密吸取已知含量的黄芩苷对照品溶液 20 μ l,按上述色谱条件重复进样6次,测定峰面积。结果, RSD=1.11% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

2.2.6 加样回收率试验 精密量取已知含量(黄芩苷质量浓度:0.1 mg/ml)的供试品溶液 0.5 ml,共6份,置50 ml量瓶中,精密加入对照品溶液(黄芩苷质量浓度:0.1 mg/ml)0.5 ml,加水稀释至刻度,摇匀,精密量取1 ml,置50 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,计算平均回收率。结果,黄芩苷平均加样回收率为99.37%,RSD=2.05% ($n=6$)。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.2”项下供试品溶液适量,按上述色谱条件分别在0、2、4、8、12、24 h进样20 μ l,测定峰面积。结果,RSD=1.48% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.3 包封率的测定

取“2.1”项下制得的黄芩苷二元醇质体溶液适量,于高速冷冻离心机中16 000 r/min离心30 min,精密量取上清液适量,按“2.2”项下方法测定未包封的黄芩苷含量(c),则未包封黄芩苷的质量(m_1)= $c \times V \times$ 稀释倍数(V 为黄芩苷醇质体混悬液体积),包封率= $(m_2 - m_1) / m_2$ (m_2 为制备初始加入黄芩苷的质量)。

2.4 正交试验优选制备工艺

根据文献^[9]、药物性质及预试验结果,选取对工艺有显著影响的黄芩苷与卵磷脂质量比(A)、含醇质量分数(B)、无水乙醇与丙二醇体积比(C)为考察因素,以包封率为评价指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验表进行试验。因素与水平见表1;正交试验结果见表2;方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(m/m)	B,%	C(V/V)
1	1:10	10	10:0
2	1:15	30	8:2
3	1:20	50	6:4

表2 正交试验结果

Tab 2 Results of orthogonal design

试验号	因素				包封率,%
	A	B	C	D(误差)	
1	1	1	1	1	68.37
2	1	2	2	2	69.89
3	1	3	3	3	71.54
4	2	1	2	3	73.68
5	2	2	3	1	74.16
6	2	3	1	2	65.42
7	3	1	3	2	76.74
8	3	2	1	3	70.32
9	3	3	2	1	66.93
K_1	69.93	72.93	68.04	69.82	
K_2	71.09	71.46	70.17	70.68	
K_3	71.33	67.96	74.15	71.85	
R	1.40	4.97	6.11	2.03	

由表2、表3可知,各因素对工艺的影响大小顺序为无水乙醇与丙二醇体积比>含醇质量分数>黄芩苷与卵磷脂质量比,其中,无水乙醇与丙二醇体积比对工艺有显著性影响($P < 0.1$)。浓度适当的无水乙醇能使膜的流动性增加,从而使包封率提高;但是,体积分数过高的无水乙醇可能会由于其能溶解卵磷脂,导致囊泡膜易漏,而使包封率降低。同理,浓度适当

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
A	3.340	2	1.670	0.538	
B	39.042	2	19.521	6.291	
C	57.709	2	28.855	9.299	<0.1
D(误差)	6.206	2	3.103		

注: $F_{0.1}(2,2) = 9.00$

note: $F_{0.1}(2,2) = 9.00$

的丙二醇能提高包封率,但丙二醇比例过大又会增大二元醇质体的粒径,使其稳定性降低。在本试验中,黄芩苷与卵磷脂质量比对包封率没有显著性影响,包封率并没有随着卵磷脂质量分数的增加而增加,可能是由于黄芩苷醇质体属于热力学不稳定体系,卵磷脂的比例增加到一定程度,颗粒之间发生碰撞的几率就会增大,容易出现析出与融合现象^[9]。因此,根据试验结果,综合考虑成本、稳定性等因素,将优化的处方和工艺设定 $A_3B_1C_3$,即药物与卵磷脂质量比为1:20,含醇质量分数10%,无水乙醇与丙二醇体积比6:4。在此工艺条件下,黄芩苷二元醇质体包封率较高。

2.5 工艺验证试验

按上述最佳工艺制备3批黄芩苷二元醇质体。称取药物0.2 g,卵磷脂2 g,加入6 ml无水乙醇和4 ml的丙二醇,溶解后注入双蒸水,边加边搅拌,使含醇质量分数为10%,加完后持续搅拌30 min,超声(功率:250 W,频率:45 kHz)10 min,0.45 μ m微孔滤膜滤过,并测定包封率。结果,黄芩苷二元醇质体的平均包封率为76.51%,RSD=1.8% ($n=3$),与正交试验最高值相当,表明工艺合理、可行。工艺验证试验结果见表4。

表4 工艺验证试验结果

Tab 4 Results of technology validation test

试验号	包封率,%	\bar{x} ,%	RSD,%
1	75.18		
2	76.43	76.51	1.80
3	77.93		

3 讨论

黄芩苷几乎不溶于水,且脂溶性较差,造成其口服制剂体内吸收差、生物利用度低,液体制剂浓度低、稳定性差,这不仅影响到其在体内的转运过程和作用部位的有效浓度,而且还影响制剂的制备和使用,从而限制了黄芩苷类制剂临床的应用。醇质体具有的磷脂膜结构,与生物细胞具有很大的相似性,可以很好地融合或者穿透于皮肤细胞。其中含有的高浓度乙醇在一定程度上也起到促渗的作用,可以达到更好的治疗效果,比脂质体更具优势^[8]。但由于醇质体含有较高浓度的乙醇,有较大的挥发性,使药物容易泄露,稳定性差,在一定程度上限制了其应用。而丙二醇黏度较大,不易挥发,刺激性小,可增加醇质体的稳定性,并可改善挥发性及对皮肤的刺激性。同时,丙二醇作为透皮吸收促进剂时,单独应用的效果不佳,而与其他促进剂合用,则可增加药物及促进剂的溶解度。丙二醇与乙醇合用,既可产生显著的促透协同作用,也可增加药物的溶解度^[9]。

笔者将黄芩苷制备成二元醇质体,采用正交设计优化制备工艺,以高效液相色谱法测定黄芩苷包封率,流动相为甲醇-水-磷酸(46:54:0.2, V/V/V),所得峰形良好,且方法简便、准确,重现性好。本试验确定的制备工艺简单、易于操作,制得

不同年限人参中水溶性蛋白含量的比较[△]

白雪媛*, 赵雨#, 张惠, 王思明, 李晓华(长春中医药大学, 长春 130117)

中图分类号 R284.1;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)19-1779-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.19.18

摘要 目的:比较不同年限人参中水溶性蛋白的含量,以鉴别人参质量的年限差异。方法:选取吉林省抚松县同一产地、不同年限的4批人参,应用Bradford蛋白质定量试剂盒测定水溶性蛋白含量,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法获得水溶性蛋白的电泳胶片,通过凝胶成像软件将胶片转化成含量-比移值图谱,累积叠加不同年限人参的图谱,比较分析不同条带的含量变化情况。结果:不同年限人参中水溶性蛋白的SDS-PAGE谱带条数无明显差异,主要谱带为9条,但因含量的不同而引起的谱带指纹信息差异较大。结论:人参中水溶性蛋白的含量在不同年限间存在差异,以4年生含量最低,5~7年生没有明显差异。

关键词 人参;生长年限;水溶性蛋白;含量;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法

Comparison of Water-soluble Protein Content in *Panax ginseng* from Different Years

BAI Xue-yuan, ZHAO Yu, ZHANG Hui, WANG Si-ming, LI Xiao-hua (Changchun University of TCM, Changchun 130117, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To compare the content of water-soluble protein in *Panax ginseng* of different years, and to identify the quality of *P. ginseng* with the different years. **METHODS:** 4 batches of *P. ginseng* of different year from Fusong county of Changbai mountain area were selected, and the content of water-soluble protein was determined by Bradford quantitative kit; we get the electrophoresis spectrum about water-soluble protein of *P. ginseng* with SDS-PAGE. The electrophoresis spectrum was transformed into concentration-R_f spectrum through the gel imaging software; the spectrums of water-soluble protein in *P. ginseng* from different years were superimposed, and the concentrations of different bands were compared. **RESULTS:** There was no significant difference in SDS-PAGE bands of water-soluble protein in *P. ginseng* of different years. There were 9 main absorption peak, and the number of absorption peaks are similar, but the different of fingerprint was great among different concentrations. **CONCLUSIONS:** The contents of water-soluble protein are different in *P. ginseng* of different years; the content of 4 years is the least, and the content of 5-7 years haven't the obvious differences.

KEY WORDS *Panax ginseng*; Different years; Water-soluble protein; Content; SDS-PAGE

得醇质体粒径均匀,包封率较高,可为黄芩苷二元醇质体的制备提供参考。

参考文献

- [1] 蔡薇薇,孟建伟,寇红云,等.黄芩治疗糖尿病并发症机制研究进展[J].中国药房,2008,19(12):947.
- [2] 初正云,初明,滕宇.黄芩苷体内抗流感病毒作用[J].中国中药杂志,2007,32(22):2 413.
- [3] 汤立建,赵良才,李庆林,等.黄芩黄酮类成分抗肿瘤作用及机制研究进展[J].中国中药杂志,2007,32(1):21.
- [4] 郑加嘉,曾繁涛.黄芩苷对脑组织缺血模型大鼠神经营养因子含量的影响[J].中国药房,2006,17(13):9 771.
- [5] 曾昭,王小丽.苦参碱醇质体的制备[J].中国组织工程研

究与临床康复,2008,41(12):8 107.

- [6] 聂继红,王萍,孙蕾,等.黄芩中黄芩苷提取工艺的研究[J].中国药房,2005,16(14):1 051.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:282.
- [8] Zhou Y, Wei YH, Liu HX, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of ethosomal total alkaloids of *Sophora alopecuroides* loaded by a transmembrane pH-gradient method [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2010, 11(3):1 350.
- [9] 王军,何文.酮洛芬二元醇质体凝胶的研制及其质量考察[J].中国药师,2012,15(6):780.

(收稿日期:2012-12-19 修回日期:2013-03-25)

[△] 基金项目:国家科技重大专项课题资助(No.2011ZX09401-305); 国家科技支撑计划资助课题(No.2012BAI29B05);吉林省医药产业发展专项资金项目(No.YYZX201134)

* 助理研究员,硕士。研究方向:中药有效成分研发及产品开发。电话:0431-81660061。E-mail:baixy1212@163.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:中药有效成分研发及产品开发。电话:0431-86172300。E-mail:cnzhaoyu@yahoo.com.cn

本栏目协办

江阴天江药业有限公司

地址:江苏省江阴市经济开发区秦望山路8号 电话:400 066 9211
传真:0510-86409611 网址: <http://www.tianjiang.com>