

# 辅酶Q10长循环脂质体及冻干制剂的制备与质量控制<sup>△</sup>

杨硕晔\*,王乐,刘娜,王贯宇,潘梦宇,胡元森(河南工业大学生物工程学院,郑州 450001)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3115-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.27

**摘要** 目的:制备辅酶Q10长循环脂质体,建立含量与包封率测定方法,并将其制成冻干制剂以提高稳定性。方法:以薄膜分散法制备辅酶Q10长循环脂质体。检测所制脂质体的粒径和Zeta电位;采用高效液相色谱法测定药物含量;鱼精蛋白沉淀法分离脂质体与游离药物,计算包封率。将辅酶Q10长循环脂质体制成冻干制剂,检测其冻干0、30、90 d后药物含量与包封率变化。结果:所制备的辅酶Q10长循环脂质体大小均匀,粒径约为(166.0±5.3) nm,Zeta电位约为(-22.2±1.4) mV,3批样品中辅酶Q10的平均含量(占标示量的百分含量)为98.2%(RSD=2.8%),平均包封率为93.2%(RSD=4.6%);与冻干0 d比较,冻干90 d后辅酶Q10长循环脂质体冻干制剂的含量与包封率无明显变化。结论:成功制得含量和包封率均较高的辅酶Q10长循环脂质体和能冻干保存90 d的冻干制剂。

**关键词** 辅酶Q10;长循环脂质体;冻干制剂;鱼精蛋白沉淀法;质量评价;冷冻干燥

## Preparation and Quality Control of Coenzyme Q10 Long-circulating Liposomes and Lyophilized Preparation

YANG Shuoye, WANG Le, LIU Na, WANG Guanyu, PAN Mengyu, HU Yuansen (College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Coenzyme Q10 long-circulating liposomes, establish the determination method of content and entrapment efficiency, and prepare it into lyophilized preparation to improve its stability. METHODS: Coenzyme Q10 long-circulating liposomes were prepared by film dispersion method. Particle size and Zeta potential of liposomes were determined, and HPLC assay was used to determine the content of coenzyme Q10. Free drugs and liposomes were separated using protamine aggregation method, and the encapsulation efficiency was calculated. Lyophilized preparation was prepared by coenzyme Q10 long-circulating liposomes, and the changes of content and encapsulation efficiency of drugs were determined 0, 30 and 90 days after lyophilization. RESULTS: The liposomes were homogeneous in size with mean diameter of (166.0±5.3) nm and Zeta potential of (-22.2±1.4) mV. Average content (the percentage of content accounted for labeled amount) and entrapment efficiency of 3 batches of sample were 98.2% (RSD=2.8%) and 93.2% (RSD=4.6%), respectively. Compared with 0 d after lyophilization, coenzyme Q10 long-circulating liposomes had no obvious change in the content and encapsulation efficiency 90 d after lyophilization. CONCLUSIONS: Coenzyme Q10 long-circulating liposomes with high quality and entrapment efficiency and lyophilized preparation being stored stably for 90 d have been prepared successfully.

**KEYWORDS** Coenzyme Q10; Long-circulating liposomes; Lyophilized preparation; Protamine aggregation method; Quality evaluation; Freeze-drying

辅酶Q10为脂溶性醌类化合物,是细胞呼吸链中的重要递氢体,能激活细胞代谢,同时具有较强的天然抗氧化作用,可用于缓解体力疲劳、抗氧化和增强免疫力<sup>[1]</sup>。研究证实,其抑制皮肤脂质过氧化、提高皮肤抗衰老的功能优于维生素B与维生素E,因此被广泛用作功能食品、药品及保健品,在临床上主要用于心血管疾病、坏血病、糖尿病、胃溃疡、坏死性牙周炎、病毒性肝炎与癌症的辅助治疗药<sup>[2]</sup>。

由于辅酶Q10分子质量大、水溶性差、见光易分解,导致其在常规制剂如片剂、胶囊、注射剂中的稳定性差,难以长期储存,而且其体内生物利用度也较低<sup>[3]</sup>。目前,如何使用制剂新技术有效提高辅酶Q10的稳定性及生物利用度是其研究热点,已开发的辅酶Q10新制剂包括固体分散体、环糊精包合物、纳米粒、微囊等<sup>[4-6]</sup>。使用长循环材料将辅酶Q10制成纳米脂质体,可以增强其稳定性、延长体内循环时间、提高生物利用度<sup>[7]</sup>。笔者制备了辅酶Q10长循环脂质体并将其制成冻干制剂,详细考察了其粒子形态、粒径、电位、含量、包封率等质量指标,为进一步研究其体内释放特性提供了试验依据。

△基金项目:河南省高等学校重点科研项目(No.15A350006)

\*讲师,博士。研究方向:药理学、药动学。电话:0371-67756253。E-mail: yangshuoyecu@163.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

TGL-16B型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂,离心半径:6.0 cm);JEM-200CX型透射电子显微镜(日本Jeol公司);Nano-ZS90型激光粒度分析仪(英国Malvern公司);Agilent 1260型高效液相色谱仪,包括G1322A标准真空脱气机、G1312C二元泵、G1316A标准柱温箱、G1314B可变波长检测器(安捷伦科技有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

辅酶Q10对照品(上海晶纯生化科技股份有限公司,批号:C111045,纯度:98.5%);注射用大豆磷脂(上海太伟药业有限公司,种类:95,批号:130621);磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000(DSPE-PEG2000)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、胆固醇(美国Avanti公司,批号:880128C、840455P、700000);硫酸鱼精蛋白注射液(上海第一生化药业有限公司,批号:20150609,规格:10 ml/支);维生素E(VE,广州日康食用化工有限公司);甲醇、正己烷为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 辅酶Q10长循环脂质体的制备

采用薄膜分散法制备辅酶Q10长循环脂质体<sup>[8]</sup>。称取适

量辅酶 Q10、豆磷脂 95、DPPG、胆固醇或 DSPE-PEG2000 于茄形瓶中,加氯仿并超声振荡使充分溶解。将真空度控制在 0.05 MP 进行旋转蒸发,至茄形瓶内壁形成一层薄膜,通氮气除尽剩余氯仿。精密加入去离子水 8 ml,超声使薄膜脱落成凝胶并充分分散,经细胞破碎仪破碎后过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜,制得的辅酶 Q10 长循环脂质体为淡黄色半透明状液态制剂。由于辅酶 Q10 见光易分解,上述操作均在避光条件下完成。

## 2.2 形态观察

样品用 1% 磷钨酸进行负染色,使用透射电子显微镜观察辅酶 Q10 长循环脂质体的形态结构。结果显示,脂质体样品均为类球形颗粒,表面的指纹状分子层明显。透射电镜图见图 1。

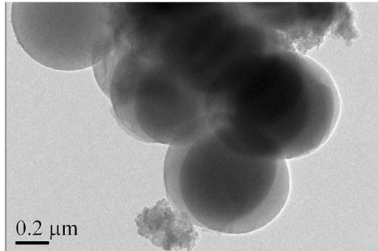


图 1 辅酶 Q10 长循环脂质体的透射电镜图

Fig 1 TEM photograph of coenzyme Q10 long-circulating liposomes

## 2.3 粒径、Zeta 电位、多分散系数的测定

取 3 批次的辅酶 Q10 长循环脂质体适量,用纯净水稀释,激光粒度分析仪测定,动态光散射软件进行数据处理,测得平均粒径、Zeta 电位、多分散系数(PDI),结果见表 1。

表 1 辅酶 Q10 长循环脂质体的粒径、Zeta 电位和 PDI 的测定结果

Tab 1 Results of particle size, Zeta potential and PDI of coenzyme Q10 long-circulating liposomes

批次	粒径, nm	Zeta 电位, mV	PDI
1	164.4	-21.0	0.291
2	171.9	-21.8	0.192
3	161.7	-23.7	0.202

## 2.4 辅酶 Q10 含量的测定

2.4.1 溶液的制备 精密称取辅酶 Q10 对照品适量,用甲醇溶解并稀释制成 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的辅酶 Q10 对照品溶液。精密量取辅酶 Q10 长循环脂质体 1 ml (相当于 1 mg 辅酶 Q10),置于 100 ml 量瓶中,加甲醇破乳溶解并定容,摇匀即得供试品溶液。制备不含辅酶 Q10 的空白脂质体,同法制成空白脂质体破乳溶液。

2.4.2 色谱条件 色谱柱:  $\text{C}_{18}$  (200 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流动相: 甲醇-正己烷 (4:1), 流速: 1.5 ml/min, 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ , 检测波长: 275 nm, 进样量: 20  $\mu\text{l}$ 。

2.4.3 专属性考察 分别取辅酶 Q10 对照品溶液、空白脂质体破乳溶液、空白脂质体破乳溶液+辅酶 Q10 对照品溶液、供试品溶液进样测定,记录色谱。结果辅酶 Q10 的保留时间约为 11.0 min, 脂质体辅料不干扰其测定。色谱图见图 2。

2.4.4 标准曲线的绘制 取辅酶 Q10 对照品适量制备成系列浓度的对照品溶液,进样测定。以质量浓度 ( $c$ ) 为横坐标,峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标进行回归分析,得回归方程为  $A = 9.385 \times 10^4 c + 30.303$  ( $r = 0.9992, n = 5$ )。结果表明,辅酶 Q10 检测质量浓度的线性范围为 5.0~150.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 检测限与定量限分别为 1.3 ng。

2.4.5 精密度试验 取适量辅酶 Q10 对照品溶液,于同日内测定 6 次,连续测定 3 d,考察日内、日间精密度。结果,日内、日间 RSD 分别为 1.20%、7.30% ( $n = 3$ )。

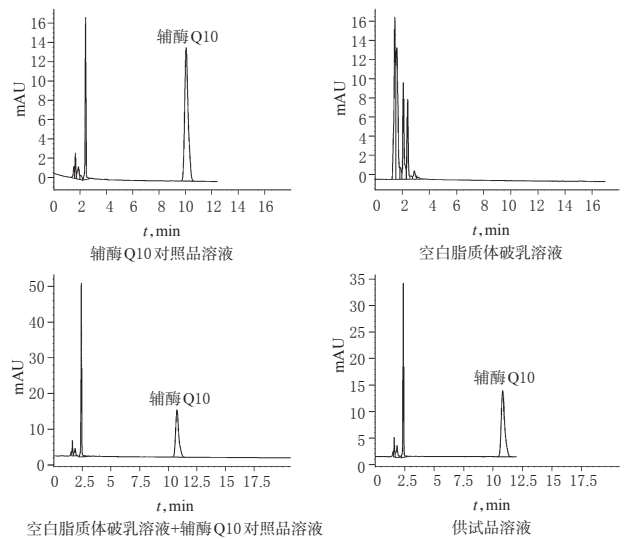


图 2 高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms

2.4.6 回收率试验 按处方比例取空白脂质体于量瓶中,分别精确加入辅酶 Q10 对照品溶液 (300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 8.0、10.0、12.0 ml,纯净水定容,摇匀,0.45  $\mu\text{m}$  滤膜滤过,取续滤液进样测定。另取辅酶 Q10 对照品溶液进样,记录峰面积,计算回收率分别为 99.5%、96.3%、99.7%, RSD 分别为 0.64%、0.90%、0.54% ( $n = 3$ )。

2.4.7 稳定性试验 取辅酶 Q10 对照品溶液 2 份,分别置于避光与光照条件 (强度为 2 000 lx) 中,于 0、2、4、6、8、10、12 h 测定辅酶 Q10 含量。结果显示,在避光环境中辅酶 Q10 的含量 12 h 内基本不变,峰面积 RSD 为 1.32%; 而在光照条件下辅酶 Q10 含量 12 h 内下降了约 25%,因此在测定过程中须注意避光操作。

2.4.8 含量测定 分别取辅酶 Q10 对照品溶液和供试品溶液进样测定,记录色谱图,按外标法以峰面积计算辅酶 Q10 含量。结果,3 批次辅酶 Q10 长循环脂质体中辅酶 Q10 的含量 (占标示量的百分含量,下同) 分别为 96.7%、102.3%、95.6%, RSD 分别为 2.36%、1.87%、4.15%。

## 2.5 辅酶 Q10 长循环脂质体包封率的测定

2.5.1 鱼精蛋白用量对脂质体分离的影响 采用鱼精蛋白沉淀法分离脂质体与游离药物,计算包封率。取硫酸鱼精蛋白注射液适量,分别稀释适当倍数得系列稀释液。取 100  $\mu\text{l}$  辅酶 Q10 长循环脂质体,加入 100  $\mu\text{l}$  稀释液,混匀放置后精确加入 4.0 ml 纯净水,以离心半径 7.6 cm、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 540 nm 波长处测定吸光度,记为  $A_1$ ; 另取 100  $\mu\text{l}$  辅酶 Q10 长循环脂质体,直接加入 4 ml 纯净水,同法操作测定吸光度,记为  $A_0$ ; 以  $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$  计算澄清度。同法测定系列稀释液分离辅酶 Q10 长循环脂质体所得上清液的澄清度。结果表明,使用较低量的鱼精蛋白 (0.5 mg) 即可有效分离辅酶 Q10 长循环脂质体与游离药物 (澄清度 > 95%)。鱼精蛋白用量对脂质体分离效果的影响见图 3。

2.5.2 鱼精蛋白用量对辅酶 Q10 包封率的影响 按“2.5.1”项下方法依次使用系列稀释液分离辅酶 Q10 长循环脂质体与游离药物,取上清液按“2.4.1”项下色谱条件进样测定,计算包封率。结果,鱼精蛋白用量在 0.1~1.0 mg 范围内,辅酶 Q10 包封率在 82%~90% 之间,表明鱼精蛋白用量对辅酶 Q10 包封率的影响不大。

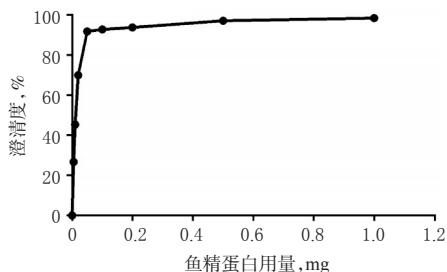


图3 鱼精蛋白用量对脂质体分离效果的影响

Fig 3 Effects of protamine dosage on the separation of liposomes

2.5.3 回收率试验 以甲醇制备低、中、高质量浓度的辅酶Q10溶液,加入适量空白脂质体并混匀作为样品溶液,测定辅酶Q10的量;再以中质量浓度的辅酶Q10对照品溶液作为对照,测定辅酶Q10的量,计算回收率。结果回收率分别为100.4%、104.5%、99.6%,RSD为4.31%、4.14%、4.59%(n=3)。

2.5.4 包封率测定 精密吸取适量脂质体,按“2.5.1”项下方法操作,取上清液进样,外标法计算游离药物的质量( $m_1$ );另取适量脂质体,加入甲醇破乳溶解,摇匀后进样测定,计算药物总量( $m_0$ ),计算包封率(%)=(1- $m_1/m_0$ )×100%。结果,3批次辅酶Q10长循环脂质体的包封率分别为94.0%、94.2%、91.4%,RSD分别为4.63%、6.74%、2.54%。

## 2.6 长循环脂质体冻干制剂的制备

2.6.1 冻干工艺 将辅酶Q10长循环脂质体从冰箱(4℃)中取出,使用涡旋混合器和超声波清洗机分散均匀后再使用细胞破碎机进行破碎,然后倒入烧杯,冷冻3h。在冷冻完成前40min,接通冷冻干燥机电源,打开制冷机,冷阱温度开始降低。按下真空计开关,预冻结束后将样品置于干燥盘中,罩上有机玻璃筒,按下快速充气阀并拔出喷嘴,以自动密封。按下真空泵开关,至真空度降到1000Pa以下,显示实际真空度,冷冻干燥开始,24h后,取出样品即可。使用前加入去离子水,振荡充分即可重新形成脂质体混悬液。

2.6.2 冻干制剂的含量与包封率测定 将辅酶Q10长循环脂质体与其冻干制剂冷藏(4℃)或冷冻(-20℃)储存,分别于0、30、90d时测定辅酶Q10含量与包封率。结果脂质体冷藏放置90d,辅酶Q10含量从97.4%下降至73.1%,包封率从92.8%下降至74.7%,两者分别下降了24.3%、18.1%;而其冻干制剂在冷冻条件下放置90d后,辅酶Q10含量与包封率无明显变化,仅分别下降了3.3%、5.2%。这提示所用冻干工艺合理有效,冻干制剂在冷冻条件下放置性质稳定,可实现脂质体的长期储存。

## 3 讨论

对于辅酶Q10的含量测定,文献报道有使用紫外分光光度法,但无法将脂质体中的辅料与药物有效分离,测定的结果将会有较大误差;而在HPLC法文献中多使用甲醇-无水乙醇混合溶剂作为流动相(二者比例为5:95、1:9或1:1)<sup>[7,9]</sup>,本文也曾尝试使用,发现这一组成的流动相优点在于两种溶剂混溶性好、辅酶Q10出峰时间早,但是峰形较差,不能将制剂处方中的辅料成分与药物完全分离。通过试验筛选以甲醇-正己烷(4:1)为流动相,虽然药物保留时间较长,但峰形好,而且能够将脂质辅料与药物完全分离,测定效果更好。

包封率是脂质体重要的质量指标,计算包封率通常需要将游离药物与脂质体分离后,分别测定游离药物量与总药物量<sup>[10]</sup>。对于辅酶Q10脂质体的包封率测定,文献中多采用有机

溶剂提取法,该法需要用聚山梨酯80或其与有机溶剂的混合溶液,充分混匀并使脂质体增溶,再将脂质体洗脱、分步分离等<sup>[7]</sup>。这类法操作较烦琐,而且由于步骤多,对测定结果引入误差的环节也相应增加。鱼精蛋白是一种由碱性氨基酸组成的高分子物质,表面富含多聚阳离子,可通过静电吸附与脂质体结合,增加其密度而使其更易与游离药物分离<sup>[11-12]</sup>。常规脂质体表面多带负电荷,因此该法适用于大多数脂质体的包封率测定。

在对脂质体破乳剂的选择中,笔者曾尝试分别使用甲醇、乙醇、氯仿、甲醇-氯仿(1:1)、乙醇-氯仿(1:1)。结果显示,在等体积条件下,氯仿不能完全破乳,其余4种溶剂均能有效破乳,甲醇的效果优于乙醇。从简化操作角度考虑,选择甲醇作为破乳剂。

稳定性差是液状脂质体的突出问题,表现为粒子聚集导致粒径变大、药物从脂质分子层中渗漏使包封率下降等。通过冷冻干燥可使脂质体的结构变得疏松多孔,其固形态易于复水后快速恢复活性<sup>[9]</sup>,且在此过程中药物的理化性质与生理活性基本保持不变。本试验将辅酶Q10长循环脂质体制成冻干制剂后使其稳定性显著提高,利于长期储存。

## 参考文献

- [1] 李伟静,于群.辅酶Q10的生理作用及临床应用[J].生物技术通讯,2007,18(5):882.
- [2] 李聚海,岳田利,袁亚宏.辅酶Q10超声波破碎法提取工艺条件研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,35(5):207.
- [3] 李喆,邓英杰,李保齐,等.辅酶Q10脂质体的制备及稳定性研究[J].中国药理学杂志,2006,4(2):37.
- [4] Hu XH, GuoYN, Wang L, et al. Coenzyme Q10 nanoparticles prepared by a supercritical fluid-based method[J]. *J Supercrit Fluids*, 2011, 57(1):66.
- [5] Bule MV, Singhal RS, Kennedy JF. Microencapsulation of ubiquinone-10 in carbohydrate matrices for improved stability[J]. *Carbohydr Polym*, 2010, 82(4):1290.
- [6] 陈银武,卢琳,陈敏,等.辅酶Q10新剂型研究进展[J].北方药学,2013,10(5):46.
- [7] 张婧,李翔,王思玲,等.辅酶Q10膜修饰脂质体的制备及其抗上皮细胞RA01/04凋亡作用研究[J].中国药房,2013,24(17):1559.
- [8] 陈浩,戴俊东,王玉蓉,等.薄膜超声法制备褪黑素脂质体研究[J].药学实践杂志,2012,30(1):32.
- [9] 邹佳,于彬,宋阳,等.粒径和质量浓度对辅酶Q10脂质体光解动力学的影响[J].沈阳药科大学学报,2010,27(1):24.
- [10] 陈召红,刘皈阳,魏亚超.脂质体包封率测定方法研究进展[J].解放军药学报,2011,27(1):79.
- [11] 杨硕晔,王杏林,杨志强.洛莫司汀-碘海醇复方脂质体的制备及包封率测定[J].中国药房,2014,25(1):48.
- [12] Torchilin VP, Weissig V.脂质体[M].邓意辉,徐晖,译.2版.北京:化学工业出版社,2007:106-112.
- [13] 刘娟,卢荣,樊君,等.响应面法优化BSA冻干脂质体的处方工艺[J].西北大学学报:自然科学版,2011,41(6):1001.

(收稿日期:2015-09-27 修回日期:2015-11-23)

(编辑:邹丽娟)