

复方莪术油脂质体的制备及质量评价[△]

陈积^{1,2*}, 赵小倩¹, 胡姗姗¹, 马彦巧³, 刘燕², 谭丹枫², 陈泽慧¹, 田应彪^{1#}(1.遵义医学院附属医院药剂科, 贵州遵义 563003; 2.遵义医学院药学院, 贵州遵义 563003; 3.遵义医学院基础医学院生理学教研室, 贵州遵义 563003)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0615-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.10

摘要 目的:制备复方莪术油脂质体(ZTOC-LPS)并对其质量进行评价。方法:以复方莪术油中莪术油(以吉马酮表征)和维A酸的包封率及载药量等为考察指标,筛选ZTOC-LPS的制备方法及其处方中大豆卵磷脂(SPC)的加入量、脂质中SPC-胆固醇(CH)质量比、莪术油-脂质质量比、维A酸-脂质质量比、水浴温度;并对最优处方制备工艺所制脂质体进行质量评价和初步稳定性考察。结果:优选的制备方法为乙醇注入法;最优处方制备工艺为每1 mL脂质体中SPC 4 mg、SPC-CH质量比3:1、莪术油-脂质质量比1:9、维A酸-脂质质量比1:70、水浴温度55 ℃。所制3批脂质体中莪术油和维A酸的平均包封率分别为(64.63±1.00)%和(90.33±0.72)%,载药量分别为(9.09±0.14)%和(1.43±0.02)%,粒径为(257.41±7.58) nm, Zeta电位为(-38.77±0.81) mV,多分散系数为0.10±0.04;离心加速试验结果显示脂质体具有良好的物理稳定性;脂质体样品在(4±2) ℃条件下放置1个月时各项考察指标均未发生明显变化。结论:建立的制备方法简单可行,所制脂质体质量符合要求,可为后续复方莪术油新剂型的研究提供参考。

关键词 莪术油;维A酸;脂质体;包封率;载药量;制备工艺;质量评价

Preparation and Quality Evaluation of Zedoary Turmeric Oil Compound Liposomes

CHEN Ji^{1, 2}, ZHAO Xiaoqian¹, HU Shanshan¹, MA Yanqiao³, LIU Yan², TAN Danfeng², CHEN Zehui¹, TIAN Yingbiao¹ (1.Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563003, China; 2.School of Pharmacy, Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563003, China; 3.Dept. of Physiology, School of Basic Medicine, Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare zedoary turmeric oil compound liposomes (ZTOC-LPS) and evaluate its quality. METHODS: The preparation method of liposome, the addition amount of soybean phosphatidylcholine (SPC), ratio of SPC to cholesterol (CH) in lipid, drug-lipid ratio of zedoary turmeric oil (ZTO), drug-lipid ratio of tretinoin in formulation, and water bath temperature were screened using encapsulation efficiency and drug-loading amount of ZTO (represented by germacrone) and tretinoin as investigation indexes. Quality evaluation and primary stability investigation were conducted for liposomes prepared by optimal preparation technology. RESULTS: The optimal preparation method was ethanol injection method; The optimal preparation technology were SPC 4 mg in 1 mL lipid, the mass ratio of SPC to CH 3:1, the ratio of ZTO to lipid 1:9, the ratio of tretinoin to lipid 1:70, water bath temperature of 55 ℃. Encapsulation efficiencies of ZTO and tretinoin were (64.63±1.00)% and (90.33±0.72)% in 3 batches of ZTOC-LPS, respectively. Drug-loading amount of ZTO and tretinoin were (9.09±0.14)% and (1.43±0.02)%, respectively. Particle size was (257.41±7.58) nm, Zeta potential was (-38.77±0.81) mV, PDI was 0.10±0.04; the results of centrifugal acceleration test showed that the liposomes had good physical stability. No obvious change was found in each investigation index of ZTOC-LPS that stored at (4±2) ℃ for 1 month. CONCLUSIONS: Established preparation technology is simple and feasible, the quality of the prepared ZTOC-LPS conforms to the requirements, and it can provide reference for the following research of ZTOC-LPS.

KEYWORDS Zedoary turmeric oil; Tretinoin; Liposomes; Encapsulation efficiency; Drug-loading amount; Preparation technology; Quality evaluation

银屑病是一种常见的慢性炎症皮肤疾病,已经影响

△基金项目:贵州省科技计划子课题(No.黔科合SY字[2015]3028-7);贵州省教育厅自然科学研究项目(No.黔教合KY字[2012]054号);贵州省中医药管理局中药、民族医药科学技术研究课题(No.QZYY-2014-034)

*硕士研究生。研究方向:临床药学。电话:0851-28608517。E-mail:1533055570@qq.com

#通信作者:主任药师,教授,硕士生导师。研究方向:临床药学。电话:0851-28608517。E-mail:tybczh@163.com

了全球2%~3%的人口^[1-2],外用药物治疗是其主要的治疗方法之一。银屑病的传统治疗主要有免疫抑制剂、类固醇激素、物理疗法等方法,有如毒副作用及不良反应较多等缺点,故不易被患者接受。中医药治疗银屑病具有疗效较好、副作用较少、复发率低等特点,在治疗上具有一定的优势^[3]。莪术油为中药莪术经水蒸气蒸馏所得挥发油,有文献^[4]报道其可外用治疗银屑病,作用机制可能为抑制角质形成细胞增殖、促进角质形成细胞正常

分化。维A酸可以调节角质形成细胞的终末分化,从而抑制其增殖^[5],为银屑病的辅助治疗药物^[6]。本课题组前期研究表明,两药合用治疗银屑病具有协同作用^[7]。但两者均具有水溶性差、稳定性差的缺点,使其应用受到限制^[8-9]。

脂质体能较好地模拟生物膜脂质双层结构,并具有生物膜的流动性和生物相容性,已较广泛地用于经皮给药系统中^[10-11]。以脂质体作为药物的载体,可增强药物的水溶性、稳定性及延长药物在皮肤的局部滞留量和滞留时间,提高生物利用度,并可延长药物作用时间,发挥长效缓释作用^[12-13]。因此,为了改善莪术油和维A酸的稳定性、溶解性等,本研究尝试将两者共同包载在脂质体中,制备成复方莪术油脂质体(ZTOC-LPS),为后续制剂的研发提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent-1260-DAD-ELSD 高效液相色谱(HPLC)仪(美国安捷伦科技公司);85-2恒温磁力搅拌器(金坛市城东新瑞仪器厂);KQ-300VDE 双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);JEM-2100 高分辨率透射电子显微镜(日本电子株式会社);FiveEasy PlusTM FE28 pH计[瑞士梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];RE-2000A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);TG16W 高速离心机、TD5M 低速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);90 Plus PALS Zeta 电位粒度分析仪(美国布鲁克海文仪器公司)。

1.2 药品与试剂

胆固醇(CH,批号:S0727A,纯度:≥95%)、维A酸原料药(批号:A0330A,纯度>98.5%)、维A酸对照品(批号:M0512AS,纯度:>98%)均来源于大连美仑生物技术有限公司;莪术油[江西雪松天然药用油有限公司,批号:20160313,含吉马酮8.1%(>7.5%),符合2015年版《中国药典》规定];吉马酮对照品(成都普菲德生物科技有限公司,批号:160222,纯度:≥98%);大豆卵磷脂(SPC,上海太伟药业有限公司,批号:20140703,纯度:>95%);甲醇、乙腈均为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 吉马酮含量测定方法的建立

以莪术油中吉马酮为考察指标^[14],采用HPLC法测定ZTOC-LPS中吉马酮的含量。

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Gemini C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-水(65:35);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;紫外检测波长:220 nm;进样量:20 μL。

2.1.2 对照品贮备液的制备 精密称取吉马酮对照品适量,用甲醇溶解制成20 μg/mL的溶液,即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 ZTOC-LPS破乳溶液:精密

吸取“2.4.2”项下ZTOC-LPS混悬液1 mL,加入1 mL甲醇破乳,超声(频率:45 kHz,功率:150 W)10 min,摇匀、离心,即得。同法制备不含主药的空白脂质体破乳溶液。

2.1.4 方法专属性考察 分别取空白脂质体破乳溶液、吉马酮对照品溶液、ZTOC-LPS破乳溶液20 μL进样分析,考察方法的专属性。结果吉马酮峰形良好,其余物质未见干扰。色谱详见图1。

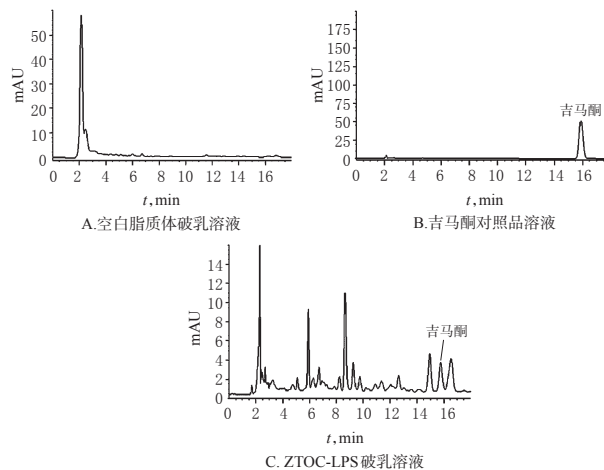


图1 吉马酮高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of germacrone

2.1.5 标准曲线的制备 精密吸取吉马酮对照品贮备液,加入甲醇制备成吉马酮终质量浓度分别为0.19、0.38、0.76、1.14、1.52、1.90、2.26 μg/mL的系列溶液,进样分析,以峰面积(y)对吉马酮的质量浓度(x)进行线性回归,得回归方程为 $y=52.762x-0.7445$ ($r=0.9998$),结果表明,吉马酮检测质量浓度线性范围为0.19~2.26 μg/mL。

2.1.6 精密度、稳定性、重复性和准确度试验 按相关方法进行考察。在精密度试验中,吉马酮含量的RSD为1.04%($n=6$);在稳定性试验中,12 h内吉马酮含量的RSD为1.24%($n=6$);在重复性试验中,吉马酮含量的RSD为1.11%($n=6$);在准确度试验中,吉马酮平均加样回收率为106.05%(RSD为1.68%, $n=6$)。

2.2 维A酸含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Gemini C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-2%冰醋酸溶液(85:15)^[15];流速:1.0 mL/min;紫外检测波长:346 nm;柱温:45℃;进样量:20 μL。

2.2.2 对照品贮备液的制备 精密称取维A酸对照品适量,用甲醇溶解制成100 μg/mL的溶液,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 同“2.1.3”项下方法。

2.2.4 方法专属性考察 分别取空白脂质体破乳溶液、维A酸对照品溶液、ZTOC-LPS破乳溶液20 μL进样分析,考察方法的专属性。结果,维A酸峰形良好,其余物质对其未见干扰。色谱详见图2。

2.2.5 标准曲线的制备 精密量取维A酸对照品贮备

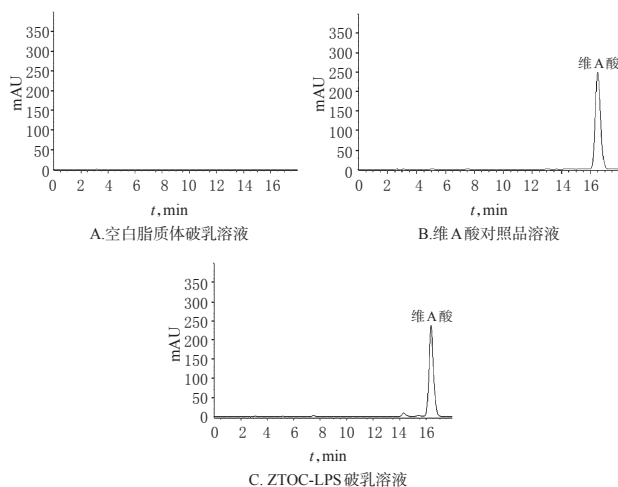


图2 维A酸高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of tretinoin

液,加入甲醇,制备成维A酸终质量浓度分别为7.65、15.30、30.60、45.90、61.20、71.50、91.80 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,以峰面积(y)对维A酸的质量浓度(x)进行线性回归,得到方程为 $y=146.07x-12.567$ ($r=0.9999$),结果表明,维A酸检测质量浓度线性范围为7.65~91.80 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.6 精密度、稳定性、重复性和准确度试验 按相关方法进行考察。在精密度试验中,维A酸含量的RSD为0.34% ($n=6$);在稳定性试验中,12 h内维A酸含量的RSD为0.49% ($n=6$);在重复性试验中,维A酸含量的RSD为0.11% ($n=6$);在准确度试验中,维A酸的平均加样回收率为100.53% (RSD为0.80%, $n=6$)。

2.3 ZTOC-LPS包封率及载药量的测定

2.3.1 游离吉马酮和维A酸的回收率测定 取9支2 mL离心管,分成3组,各加入空白脂质体0.2 mL,再分别精密加入吉马酮对照品贮备液0.2、0.6、1.0 mL(或维A酸对照品贮备液0.2、0.6、1.0 mL),用甲醇稀释至刻度,15 000 r/min离心(离心半径为6.2 cm,下同)30 min后,精密量取上清液1 mL,用甲醇制备成质量浓度为0.40、1.20、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 的吉马酮溶液或10.00、15.00、25.00 $\mu\text{g/mL}$ 的维A酸溶液,进样测定。结果,吉马酮的平均回收率分别为100.20%、100.92%、99.99% (RSD分别为0.60%、0.15%、0.09%, $n=3$),维A酸的平均回收率分别为100.67%、100.24%、100.03% (RSD分别为0.44%、0.68%、0.12%, $n=3$)。可知,采用超速离心法分离脂质体与游离药物可行。

2.3.2 包封率和载药量测定 选择超速离心法来分离以测定药物的包封率和载药量^[16]。精密吸取“2.4.2”项下ZTOC-LPS混悬液1 mL,15 000 r/min离心30 min,弃去上清液,取下层沉淀,加1 mL甲醇溶解,HPLC法测定脂质体包封吉马酮的质量浓度(c_1)和维A酸的质量浓度(c_2);另取ZTOC-LPS混悬液1 mL用甲醇定容破乳,水

浴超声(频率:45 kHz,功率:150 W)10 min,15 000 r/min离心10 min,HPLC法测定脂质体混悬液中吉马酮总质量浓度 $c_{1总}$ 、维A酸的总质量浓度 $c_{2总}$ 。计算2种主药的包封率和载药量。其中,莪术油包封率= $c_1/c_{1总} \times 100\%$,维A酸包封率= $c_2/c_{2总} \times 100\%$,莪术油载药量=[脂质体中吉马酮药物量/(脂质体中药物量+载体质量)] $\times 100\%$,维A酸载药量=[脂质体中维A酸药物量/(脂质体中药物量+载体质量)] $\times 100\%$ 。

2.4 ZTOC-LPS制备方法的筛选

2.4.1 薄膜分散法 按文献[17]的条件及方法称取适当比例的SPC、CH、莪术油和维A酸,以5 mL氯仿溶解,置于旋转蒸发器上在35 $^{\circ}\text{C}$ 减压除掉有机溶剂(转速为60 r/min),形成均匀透明的薄膜,室温真空干燥过夜除去残余溶剂,然后加10 mL磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=6.5),于40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴水化2 h,探头超声(频率:20 kHz,功率:300 W)4 min,即得ZTOC-LPS混悬液,测定ZTOC-LPS包封率和载药量,平行试验3次。

2.4.2 乙醇注入法 按文献[18]的条件及方法称取适当比例的SPC、CH、莪术油和维A酸,溶于5 mL无水乙醇中,再取适量PBS置于磁力搅拌器上搅拌(恒温水浴),吸取5 mL将其缓慢匀速注入到50 $^{\circ}\text{C}$ PBS (pH=6.5)中。注入完毕后,继续恒温搅拌1 h,使乙醇完全挥发即得ZTOC-LPS混悬液,测定ZTOC-LPS包封率和载药量,平行试验3次。同上称取相同比例的SPC和CH,在相同条件下制备空白脂质体混悬液。

2.4.3 逆相蒸发法 按文献[19]的条件及方法称取适当比例的SPC、CH、莪术油和维A酸,置于圆底烧瓶中,加入5 mL氯仿溶解,置于旋转蒸发器上旋转蒸发,水浴温度35 $^{\circ}\text{C}$,转速为60 r/min,使脂质在器壁上形成均匀薄膜。加入5 mL氯仿,溶解脂质膜后,加入10 mL PBS (pH=6.5),水浴超声30 min,即得到乳黄色均匀混悬液,将混悬液在旋转蒸发器上减压蒸发,除去氯仿,即得ZTOC-LPS混悬液,测定ZTOC-LPS包封率和载药量,平行试验3次。

2.4.4 制备方法筛选结果 以包封率和载药量为评价指标评价制备方法。结果,薄膜分散法、逆相蒸发法所制脂质体中2种药物的包封率和载药量均较低,乙醇注入法所制脂质体包封率和载药量相对较高,故以下选择简单易行的乙醇注入法制备ZTOC-LPS。筛选结果见表1。

2.5 单因素试验筛选ZTOC-LPS制备处方及工艺

2.5.1 SPC加入量 固定莪术油-维A酸质量比为10:1,脂质中SPC-CH质量比为3:1,水浴温度为50 $^{\circ}\text{C}$,其他因素不变,只改变SPC的投料量,使每1 mL脂质体中SPC加入量分别为4、5、6、7、8 mg,考察SPC加入量对ZTOC-LPS包封率和载药量的影响。结果,莪术油包封率分别为39.67%、74.58%、55.21%、42.98%、29.21%;莪

表1 不同制备方法所得 ZTOC-LPS 的包封率和载药量 (%)

Tab 1 Entrapment efficiency and drug-loading amount of ZTOC-LPS prepared by different preparation methods (%)

指标	制备方法		
	薄膜分散法	乙醇注入法	逆相蒸发法
莜术油包封率	53.01±1.47	63.55±1.92	38.73±1.37
莜术油载药量	7.45±0.21	8.94±0.27	5.45±0.19
维A酸包封率	71.01±1.55	82.13±1.19	58.69±1.61
维A酸载药量	1.12±0.02	1.30±0.02	0.93±0.03

术油载药量分别为 6.17%、9.60%、6.07%、4.12%、2.48%；维 A 酸包封率分别为 54.21%、87.69%、63.36%、47.84%、32.92%；维 A 酸载药量分别为 0.84%、1.13%、0.70%、0.46%、0.28%。表明 SPC 加入量对包封率和载药量均有影响,当 SPC 加入量为 5 mg 时 2 种主药的包封率和载药量最高。

2.5.2 脂质中 SPC-CH 质量比 固定莜术油-维 A 酸质量比为 10:1,水浴温度为 50 ℃,SPC 加入量为每 1 mL 脂质体中 5 mg,其他因素不变,只改变 SPC-CH 质量比,使其分别为 3:1、4:1、5:1、6:1、7:1,考察 SPC-CH 质量比对 ZTOC-LPS 包封率和载药量的影响。结果,莜术油包封率分别为 50.66%、36.18%、28.03%、22.75%、16.18%,载药量分别为 5.57%、4.21%、3.38%、2.81%、2.03%；维 A 酸包封率分别为 53.66%、39.38%、31.99%、25.61%、23.38%,载药量分别为 0.59%、0.46%、0.39%、0.32%、0.29%。表明当 SPC-CH 质量比为 3:1 时,2 种主药的包封率和载药量均较高,所以下一步试验中均固定 SPC-CH 质量比为 3:1。

2.5.3 莜术油-脂质质量比 固定每 1 mL 脂质体中 SPC 加入量为 5 mg,脂质中 SPC-CH 质量比为 3:1,其他因素不变,只改变莜术油-脂质(膜材,SPC+CH)的质量比,使其分别为 1:7、1:8、1:9、1:10、1:11,考察莜术油-脂质质量比对 ZTOC-LPS 包封率和载药量的影响。结果,莜术油包封率分别为 54.58%、58.73%、38.10%、32.74%、33.16%,载药量分别为 6.75%、6.45%、3.77%、2.94%、2.73%；维 A 酸包封率分别为 52.18%、55.74%、43.13%、31.59%、38.36%,载药量分别为 0.56%、0.61%、0.48%、0.35%、0.43%。表明莜术油-脂质质量比对包封率和载药量均有影响,当其为 1:8 时 2 种主药的包封率和载药量均较高。

2.5.4 维 A 酸-脂质质量比 固定每 1 mL 脂质体中 SPC 加入量为 5 mg,脂质中 SPC-CH 质量比为 3:1,莜术油-脂质质量比为 1:8,其余因素不变,只改变维 A 酸-脂质质量比,使其分别为 1:50、1:60、1:70、1:80、1:90,考察维 A 酸-脂质质量比对 ZTOC-LPS 包封率和载药量的影响。结果,莜术油包封率分别为 24.49%、41.56%、31.16%、29.09%、30.46%,载药量分别为 2.67%、4.55%、3.42%、

3.20%、3.35%；维 A 酸包封率分别为 26.36%、47.38%、35.59%、27.23%、25.98%,载药量分别为 0.46%、0.69%、0.45%、0.30%、0.25%。表明维 A 酸-脂质质量比对包封率和载药量均有影响,当其为 1:60 时 2 种主药的包封率和载药量均较高。

2.5.5 水浴温度 固定每 1 mL 脂质体中 SPC 加入量为 5 mg,脂质中 SPC-CH 质量比为 3:1,莜术油-脂质质量比为 1:8,维 A 酸-脂质质量比为 1:60,其余因素不变,只改变水浴温度,使其分别为 40、45、50、55、60 ℃,考察水浴温度对 ZTOC-LPS 包封率和载药量的影响。结果,莜术油包封率分别为 35.32%、37.25%、30.91%、54.92%、31.24%,载药量分别为 3.88%、4.09%、3.40%、6.03%、3.43%；维 A 酸包封率分别为 37.38%、41.99%、37.26%、80.99%、33.53%,载药量分别为 0.41%、0.46%、0.41%、0.89%、0.37%。表明水浴温度对包封率有影响,当其为 55 ℃ 时 2 种主药的包封率和载药量均较高。

2.6 处方设计与优化选择

2.6.1 正交试验 根据单因素试验结果,筛选出 4 个主要考察因素,包括每 1 mL 脂质体中 SPC 加入量(A)、莜术油-脂质质量比(B)、维 A 酸-脂质质量比(C)、水浴温度(D),每个因素选取 3 个不同水平,以包封率和载药量之和(S)为评价指标,设计 $L_9(3^4)$ 正交试验法优化 ZTOC-LPS 的制备工艺。因素与水平见表 2,正交试验设计与结果见表 3,方差分析结果见表 4。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素			
	A(每 1 mL 脂质体中 SPC 加入量,mg)	B(莜术油-脂质质量比)	C(维 A 酸-脂质质量比)	D(水浴温度,℃)
1	4	1:7	1:50	45
2	5	1:8	1:60	50
3	6	1:9	1:70	55

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Design and results of orthogonal test

编号	因素				指标	
	A	B	C	D	$S_{\text{莜术油}}, \%$	$S_{\text{维A酸}}, \%$
1	1	1	1	1	58.20	53.66
2	1	2	2	2	38.28	51.56
3	1	3	3	3	74.95	93.98
4	2	1	2	3	55.48	73.64
5	2	2	3	1	51.05	53.09
6	2	3	1	2	59.61	69.47
7	3	1	3	2	64.15	84.40
8	3	2	1	3	49.00	54.14
9	3	3	2	1	47.70	48.58
莜术油	\bar{K}_1	57.14	59.28	49.07	46.09	
	\bar{K}_2	55.38	46.11	41.68	47.89	
	\bar{K}_3	53.61	60.75	56.01	52.79	
	R	3.53	14.64	16.23	7.49	
维A酸	\bar{K}_1	66.40	70.57	59.09	51.78	
	\bar{K}_2	65.40	52.93	57.92	68.48	
	\bar{K}_3	62.37	70.68	77.12	73.92	
	R	4.03	17.75	19.23	22.14	

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of analysis of variance

指标	方差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
莪术油	A	18.656	2	9.328	1.000	>0.05
	B	389.969	2	193.484	20.903	<0.05
	C	395.344	2	197.672	21.191	<0.05
	D	92.630	2	46.315	4.965	>0.05
	误差	18.66	2	9.33		
维A酸	A	26.375	2	13.187	1.000	>0.05
	B	626.008	2	313.004	23.735	<0.05
	C	697.551	2	348.775	26.447	<0.05
	D	798.847	2	399.423	30.288	<0.05
	误差	26.38	2	13.19		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.0$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.0$

2.6.2 结果分析 由表3和表4结果可知,以 $S_{\text{莪术油}}$ 为评价指标,各因素对包封率和载药量的影响效果依次为 $C>B>D>A$,因素B、C对包封率和载药量有显著影响,最优处方制备工艺为 $A_1B_3C_3D_3$ 。以 $S_{\text{维A酸}}$ 为评价指标,各因素对包封率和载药量的影响效果依次为 $D>C>B>A$,其中因素B、C、D对包封率和载药量有显著影响,最优处方制备工艺为 $A_1B_3C_3D_3$ 。以2种药物的包封率和载药量为指标筛选出的处方制备工艺均为 $A_1B_3C_3D_3$,故选此为最优制备工艺,即每1 mL脂质体中SPC加入量为4 mg,SPC-CH质量比为3:1,莪术油-脂质质量比为1:9,维A酸-脂质质量比为1:70,水浴温度为55℃。

2.6.3 验证试验 以乙醇注入法按最优处方及制备工艺制备3批处方量为10 mL的ZTOC-LPS,即精密量取SPC 40.00 mg、CH 13.33 mg、莪术油 5.93 mg、维A酸 0.76 mg,其余操作同“2.4.2”项下方法(水浴温度为55℃);采用超速离心法分离脂质体及游离药物,测定其包封率和载药量。结果,莪术油包封率和载药量分别为 $(64.63 \pm 1.00)\%$ 、 $(9.09 \pm 0.14)\%$ ($n=3$),维A酸包封率和载药量分别为 $(90.33 \pm 0.72)\%$ 、 $(1.43 \pm 0.02)\%$ ($n=3$)。表明所得最优处方及制备工艺制备的ZTOC-LPS的工艺稳定、重现性好。

2.7 ZTOC-LPS的质量评价

2.7.1 形态 用滴管吸取ZTOC-LPS 1滴置于碳铜网上,静置1 min后用滤纸片吸干,再滴加1%磷钨酸溶液于铜网上负染1 min,自然挥干,透射电镜下观察脂质体形态并拍摄照片。结果,ZTOC-LPS粒径外观呈球状或类球状,结构完整,为单室脂质体。透射电镜图详见图3。

2.7.2 pH值 用pH计平行测定3批ZTOC-LPS混悬液的pH值,每批测定3次。结果,3批样品的pH平均值分别为6.71、6.65、6.62,pH值均接近于6.5,而磷脂在pH为6.5时最稳定^[20],故所制ZTOC-LPS较为稳定。

2.7.3 粒径与Zeta电位 取3批ZTOC-LPS混悬液适量,用电位粒度分析仪测定其粒径和Zeta电位。结果,平均粒径为 (257.41 ± 7.58) nm ($n=3$),多分散系数

(PDI)为 0.10 ± 0.04 ($n=3$),Zeta电位为 (-38.77 ± 0.81) mV ($n=3$)。表明ZTOC-LPS粒径分布均匀,稳定性较好。

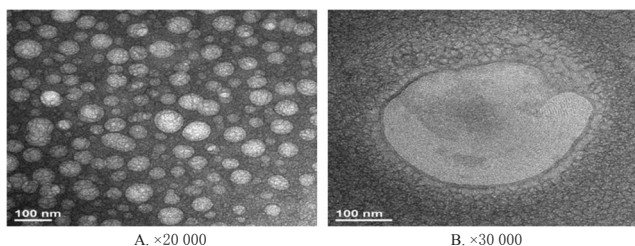


图3 ZTOC-LPS的透射电镜图

Fig 3 TEM micrograph of ZTOC-LPS

2.7.4 脂质体物理稳定性 采用离心加速试验进行考察。取2 mL ZTOC-LPS混悬液置于10 mL离心管中,3000 r/min(离心半径为16 cm,下同)离心15 min后,弃上层液体1.4 mL,将剩余液体摇匀,用微量取样器取0.4 mL置于10 mL量瓶中,用蒸馏水定容,在450 nm波长下测定浊度 A 。另精密量取未离心的脂质体样品0.4 mL,同上操作,测定浊度 A_0 。离心稳定常数(K_E)= $|A-A_0|/A_0 \times 100\%$ 。结果,3批样品的 K_E 分别为7.7、8.5、9.1,表明体系的物理稳定性较好^[21],提示所制备的ZTOC-LPS的具有良好的物理稳定性。

2.7.5 脂质体留样稳定性 将2批ZTOC-LPS分别于 (25 ± 2) ℃和 (4 ± 2) ℃条件下放置,再分别于放置0、15、30 d取样,观察其外观性状,测定粒径及包封率等稳定性参数。结果,ZTOC-LPS在 (25 ± 2) ℃下放置30 d后包封率下降较快,粒径及Zeta电位变化也较大,PDI上升也较快,且通过观察发现有少量微粒沉降聚集。而放置于 (4 ± 2) ℃下的样品的包封率、粒径、Zeta电位及PDI结果均较优,通过观察未发现微粒有沉降聚集等现象,结果见表5。

表5 脂质体留样稳定性考察结果

Tab 5 Results of stability test of liposome

指标	(25 ± 2) ℃			(4 ± 2) ℃		
	0 d	15 d	30 d	0 d	15 d	30 d
莪术油包封率,%	66.08	50.00	49.15	65.00	60.13	59.66
维A酸包封率,%	90.63	77.47	75.81	91.49	90.09	85.69
平均粒径 \pm SD,nm	202.80 \pm 10.66	306.35 \pm 2.90	400.48 \pm 46.32	257.41 \pm 7.58	263.43 \pm 30.07	283.81 \pm 19.48
Zeta电位 \pm SD,mV	-40.24 \pm 0.84	-37.76 \pm 1.00	-35.26 \pm 0.51	-38.77 \pm 0.81	-37.87 \pm 1.19	38.72 \pm 0.56
PDI \pm SD	0.11 \pm 0.03	0.79 \pm 0.37	1.13 \pm 0.77	0.10 \pm 0.04	0.20 \pm 0.01	0.40 \pm 0.20

3 讨论

前期研究表明,莪术油与维A酸可通过局部起效而协同治疗银屑病,对于局部应用药物,脂质体不仅对其有良好的促渗透作用,而且还可以降低药物的全身吸收,使药物集中于病灶部位而对病变细胞发挥治疗作用,从而提高其生物利用度,降低毒副作用^[22]。因此,本试验尝试将莪术油与维A酸两药共同包封于脂质体内制成ZTOC-LPS。

在建立ZTOC-LPS中药物含量测定方法时,笔者选

择吉马酮(牻牛儿酮)为莪术油的含量测定指标,这是因为吉马酮是2015年版《中国药典》(一部)中莪术油及莪术药材项下的主要质量控制指标成分。包封率是评价脂质体制剂质量好坏的最重要指标,也是其能否发挥较普通制剂高效、低毒特点的关键^[23]。由于超速离心法简单、快速、易行,因此本试验选择超速离心法来分离脂质体和游离药物,再通过 HPLC 法测定包封率,所得试验结果稳定、可靠。

脂质体的制备方法很多,如薄膜分散法、逆相蒸发法、乙醇注入法等,本试验选用了3种传统的制备方法分别制备 ZTOC-LPS,以包封率和载药量为评价指标进行评价。结果发现用乙醇注入法制备的脂质体的包封率和载药量较高,且该法条件温和,操作简单方便,廉价,不易使敏感药物成分发生变性,可以避免使用有毒的有机溶剂。通过单因素试验发现,影响 ZTOC-LPS 包封率和载药量的影响因素有 SPC 的加入量、脂质中 SPC-CH 质量比、莪术油及维 A 酸与脂质质量比、水浴温度。在此基础上采用了正交试验法对 ZTOC-LPS 的处方制备工艺进行优化,主要考察了4个因素不同水平对药物包封率和载药量的影响,最终筛选出了最优处方及制备工艺,再通过验证试验证明了筛选出的处方与制备工艺条件的稳定性和可重现性。

粒径大小是脂质体质量控制的关键之一,Zeta 电位是衡量电荷量的重要指标,是衡量脂质体稳定性的重要指标之一,PDI 是脂质体粒子分布均匀性的直观呈现。所以本试验对所制脂质体的粒径、Zeta 电位和 PDI 进行了测定。结果表明,粒径大小均匀,呈正态分布;表面荷负电,电位较高,表明脂质在贮存时稳定性更好,不易发生聚沉。以离心加速试验评价了脂质体的稳定性,结果表明其具有良好的物理稳定性。再考察了脂质体的留样稳定性,发现将所制样品在(4±2)℃条件下放置1个月,各项考察指标均未发生明显变化,提示其放置于4℃条件下稳定性好。

本试验成功地将莪术油与维 A 酸同时包封于脂质体中制备成了复方脂质体,所采用的处方与制备工艺简单可行、重现性好、包封率和载药量较高、稳定性较好,可为后续复方莪术油新剂型的研究提供参考。

参考文献

[1] HOU RX, LI JQ, NIU XP, et al. Stem cells in psoriasis[J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 86(3):181-186.

[2] TAKESHITA J, GREWAL S, LANGAN SM, et al. Psoriasis and comorbid diseases: epidemiology[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 76(3):377-390.

[3] 牛蔚露,崔伟锋,黄莺,等.基于数据挖掘的钟以泽教授治疗银屑病处方组方规律分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(2):181-186.

[4] 宋智琦,韩世新,刘晓明,等.莪术油霜剂外用治疗银屑病的药效学及作用机制研究[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2001, 15(5):17-19.

[5] 张培,单葵.银屑病外用药物治疗进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(17):2446-2448.

[6] 陈新谦,金有豫,汤光.新编药理学[M]. 17版.北京:人民卫生出版社,2015:773.

[7] 田应彪,陈泽慧,袁勤,等.复方莪术油乳膏治疗银屑病样动物模型作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2009, 36(3):57-59.

[8] 张志勤,王栋,邵丰德,等.复方维 A 酸乳膏化学稳定性研究及有效期预测[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(2):212-220.

[9] 王兰,常相娜.莪术油多囊脂质体处方及制备工艺研究[J]. *现代中医药*, 2012, 32(4):74-85.

[10] PIERRE MB, DOS SMCI. Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications[J]. *Arch Dermatol Res*, 2011, 303(9):607-621.

[11] KUMAR GAUR P, MISHRA S, KUMAR SHARMA K, et al. Development of nitrendipine nanoliposome for transdermal drug delivery: preparation, characterization and permeation studies[J]. *Drug Delivery Letters*, 2017, 7(1):48-53.

[12] MATLOOB AH, MOURTAS S, KLEPETSANIS P, et al. Increasing the stability of curcumin in serum with liposomes or hybrid drug-in-cyclodextrin-in-liposome systems: a comparative study[J]. *Int J Pharm*, 2014, 476(1/2):108-115.

[13] 张小灵,郭嘉俊,时军,等.双丹脂质体凝胶剂的制备工艺优化及体外透皮性能研究[J]. *中药材*, 2017, 40(2):402-407.

[14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:412.

[15] 宋立娟,徐风华,孙华燕,等. HPLC 法测定维 A 酸软膏中维 A 酸含量[J]. *解放军药理学学报*, 2015, 31(2):135-137.

[16] 任翔,刘琨,张莉.星点设计-响应面法优化积雪草苷阳离子脂质体的处方[J]. *中国药房*, 2016, 27(16):2272-2275.

[17] 范一文,鲁群,李德才,等.茶多酚脂质体的制备和物化性质研究[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(10):1187-1191.

[18] 陈博.维 A 酸脂质体的制备工艺研究[J]. *中国药房*, 2014, 25(21):1973-1975.

[19] 杜云.莪术油脂质体的制备及体外释药研究[D].扬州:扬州大学,2012.

[20] 袁松,孙会敏,丁丽霞.脂质体物理化学稳定性研究进展[J]. *中国药事*, 2011, 25(4):384-388.

[21] 程怡,林绿萍,郭波红,等.甘草次酸阳离子脂质体的制备及稳定性考察[J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(13):1002-1005.

[22] 袁雍,黄萍,杨秀丽.脂质体经皮局部给药研究进展[J]. *中国药师*, 2014, 17(7):1227-1231.

[23] 陈召红,刘皈阳,魏亚超.脂质体包封率测定方法研究进展[J]. *解放军药理学学报*, 2011, 27(1):79-82.

(收稿日期:2017-06-12 修回日期:2017-09-04)

(编辑:刘萍)