

# 苦参碱脂质体的稳定性及体外释放度研究

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

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3542-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.32

**摘要** 目的:考察苦参碱脂质体的稳定性及体外释放度。方法:用硫酸铵梯度法制备苦参碱脂质体,考察其粒径、形态和包封率;以渗漏率为指标考察苦参碱脂质体在4℃和室温放置9个月内的稳定性;同时采用桨碟法考察苦参碱脂质体的体外释放情况。结果:制备的苦参碱脂质体的平均粒径为220 nm,包封率为63.37%,4℃放置9个月的渗漏率为(10.7±0.1)%。脂质体的体外释放规律符合Higuchi方程。结论:苦参碱脂质体应在冷藏条件下贮存,其在体外具有良好的缓释作用。

**关键词** 苦参碱脂质体;稳定性;渗漏率;体外释放度

## Study on Stability and Release Rate *in vitro* of Matrine Liposome

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

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the stability and release rate *in vitro* of Matrine liposome. METHODS: The ammonium sulfate gradient method was applied to produce the liposome, and the diameter, morphology and entrapment efficiency were studied. Using leakage rate as index, the stability of Matrine liposome at 4℃ and room temperature was investigated within 9 months, and the release behavior of the drug was studied by paddle over disk method. RESULTS: The average particle size of Matrine liposome was 220 nm and entrapment efficiency was 63.37%; the leakage rate of drug was (10.7±0.1)% at 4℃ within 9 months. The release rule *in vitro* was up to the Higuchi equation. CONCLUSIONS: Matrine liposome should be kept in cold storage and has sustained-release effect.

**KEY WORDS** Matrine liposome; Stability; Leakage rate; Release rate *in vitro*

苦参碱(Matrine)分子属于四环喹啉类化合物,骨架结构为2个喹啉环的稠合体,分子中有4个六元环<sup>[1]</sup>。近年来,苦参碱的抗肿瘤、抗炎、抗过敏、抗心律失常<sup>[2]</sup>等作用已经引起人们的重视。脂质体(Liposome)作为一种药物载体,具有独特的优点,可以在某种程度上提高抗肿瘤药物的靶向性,并大幅度地降低化疗药物的毒副作用。本试验采用硫酸铵梯度法制备苦参碱脂质体,以通过增强其靶向性而提高其对肿瘤的治疗作用。笔者在本文中主要对苦参碱脂质体的包封率、稳定性和体外释放度等进行了研究,以为下一步的药效学研究提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

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);R-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);高效液相色谱(HPLC)系统(美国Waters公司);COULTER LS230粒径分析仪(美国贝克曼公司)。

### 1.2 药品与试剂

氢化大豆卵磷脂(HSPC,批号:110903,纯度:>99.98%)、高纯合成磷脂二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG,批号:110723,纯度:>99.98%)均来源于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,批号:20050304];苦参碱

原料药(西安中鑫生物技术有限公司,批号:111019,纯度:>98%);苦参碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:20110719,纯度:>99.9%);葡聚糖凝胶G-100(浙江黄岩曙光化工厂);除色谱法所用试剂均为色谱纯外,其余试剂均为分析纯。

### 1.3 其他

透析袋(美国Sigma公司,截留分子量:8 000~14 400)。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件的建立

色谱柱:Agilent C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm);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:215 nm;进样量:20 μl;柱温:25℃。在此条件下,取“2.2”项下对照品、样品(苦参碱脂质体)和空白样品(空白脂质体)溶液进样分析。结果苦参碱峰与其他杂质峰的分度度>1.5,符合色谱分离条件,见图1。

### 2.2 样品的制备

2.2.1 对照品溶液的制备。精密称定苦参碱对照品0.001 g置于25 ml量瓶中,甲醇溶解定容至刻度,即得苦参碱对照品贮备液。分别精密量取贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 ml至5 ml量瓶中,以甲醇稀释定容,摇匀即得。

2.2.2 苦参碱溶液的制备。称取苦参碱原料药0.5 g,加入少量的蒸馏水,超声溶解,待完全溶解后在50 ml的棕色量瓶中定容,摇匀即得(质量浓度为10 mg/ml)。

2.2.3 空白脂质体的制备。采用硫酸铵梯度法制备。将HSPC、DSPG和胆固醇按一定质量比(3:1:1)溶解于适量氯仿

\* 主任药师。研究方向:中药及其靶向制剂。电话:029-87679282。E-mail:wvy0413@tom.com

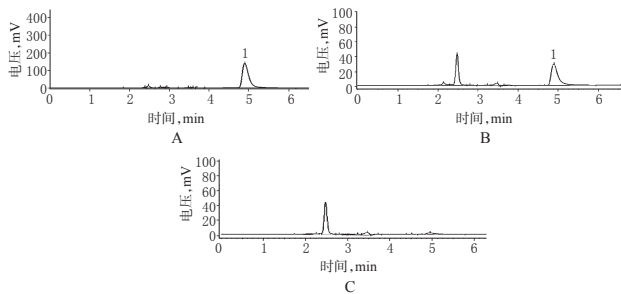


图1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 样品; C. 空白样品(空白脂质体); 1. 苦参碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. sample; C. blank sample (blank liposome);  
1. matrine

中, 超声溶解, 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/ml 硫酸铵溶液于脂质薄膜中, 水浴孵化 1.5 h, 37 °C 恒温磁力搅拌 20 min, 探头超声 10 min 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 0.9% 氯化钠注射液(生理盐水)透析除去脂质体外水相的硫酸铵, 即得空白脂质体。

2.2.4 苦参碱脂质体的制备。在空白脂质体中按一定药脂比(1:15)加入苦参碱溶液, 混合均匀, 50 °C 水浴中孵化 1.5 h, 即得苦参碱脂质体。

2.2.5 样品以及空白样品溶液的制备。将制得的苦参碱脂质体及空白脂质体以甲醇破乳, 过 0.45 μm 微孔滤膜后即得。

### 2.3 分析方法的建立

2.3.1 最大吸收波长的测定。苦参碱对照品溶液以水为空白对照在 200~400 nm 波长范围内扫描, 显示苦参碱在 215 nm 波长处有最大吸收, 故选择 215 nm 为测定波长。

2.3.2 标准曲线的制备。取“2.2.1”项下各质量浓度对照品溶液, 进样分析测定; 以质量浓度(*c*)为横坐标、峰面积(*A*)为纵坐标作回归曲线, 得回归方程:  $A = 27\ 931c + 2\ 735.2$  ( $r = 0.999\ 5$ ), 表明苦参碱检测质量浓度线性范围为 0.8~16.0 μg/ml。

2.3.3 精密度的试验。取 4.0 μg/ml 对照品溶液重复进样 6 次, 计算含量的 RSD 值为 0.62% ( $n = 6$ ), 表明精密度良好。

2.3.4 稳定性试验。取供试品溶液分别放置 0、2、4、6、12、24 h 时进样测定, 计算苦参碱含量的 RSD 值为 0.95% ( $n = 6$ ), 表明供试品在 24 h 内基本稳定。

2.3.5 重复性试验。取同一批供试品溶液 6 份, 测定并计算苦参碱含量的 RSD 值为 1.03% ( $n = 6$ ), 表明方法的重复性良好。

2.3.6 柱回收率试验。取 3 种质量浓度的苦参碱对照品溶液(4.0、8.0、16.0 μg/ml), 分别加入一定量的空白脂质体, 混合均匀后精密量取 0.2 ml 上柱, 收集游离药物, HPLC 法测定含量。求得平均柱回收率为 98.54%, RSD = 1.03% ( $n = 9$ )。

2.3.7 样品加样回收率。精密称取 3 种质量浓度的苦参碱对照品溶液(2.0、4.0、6.0 μg/ml), 加入到已知含量的样品中, 测定。计算平均加样回收率为 98.67%, RSD = 0.57% ( $n = 9$ )。

### 2.4 脂质体的包封率测定

2.4.1 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 1.5 g 葡聚糖凝胶 G-100 用生理盐水充分溶胀, 湿法装柱(20 cm × 1 cm)。取苦参碱脂质体, 精密移取 0.2 ml 上柱, 以生理盐水洗脱, 流速为 1 ml/min, 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 μm 微孔滤膜后进样测定峰面积, 绘制流出曲

线, 见图 2。

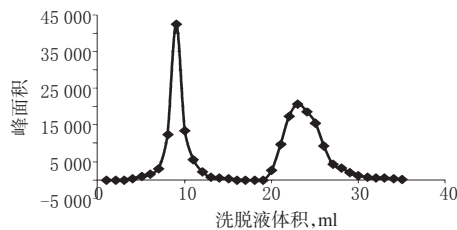


图2 苦参碱脂质体的流出曲线图

Fig 2 Elution curve of Matrine liposome

图 2 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 6~13 ml 为苦参碱脂质体部分, 19~30 ml 为苦参碱游离药物部分(根据凝胶色谱分离原理, 粒径大的脂质体先流出, 粒径小的苦参碱溶液后流出而确定)。

2.4.2 包封率测定。采用 HPLC 法测定苦参碱脂质体的包封率。精密量取苦参碱脂质体 0.2 ml, 葡聚糖凝胶 G-100 柱分离。根据流出曲线, 将 6~13 ml 洗脱液混匀得到脂质体部分共 8 ml, 加入 10 ml 甲醇破乳, 过 0.45 μm 微孔滤膜后进样测定峰面积, 根据峰面积计算得到脂质体中苦参碱的含量( $W_1$ )。另精密量取苦参碱脂质体 0.2 ml, 加入 8 ml 生理盐水, 再加入 10 ml 甲醇破乳, 依法测定苦参碱含量( $W_2$ ), 计算包封率( $W_1/W_2 \times 100\%$ )。

3 批苦参碱脂质体包封率测定结果分别为 63.66%、61.23%、65.21%, 平均值为 63.37%。

### 2.5 脂质体形态外观考察

制备得到的苦参碱脂质体为均一、稳定的淡乳白色混悬液, 光学显微镜下观察其分布均匀; 透射电镜下观察可见脂质体边缘圆整, 均为圆形或近圆形, 粒度分布均匀, 如图 3 所示。

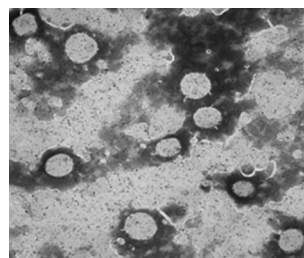


图3 苦参碱脂质体透射电镜图(×30 000)

Fig 3 TEM photograph of Matrine liposome(×30 000)

### 2.6 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平均粒径为 220 nm, 其粒径分布情况如图 4 所示。

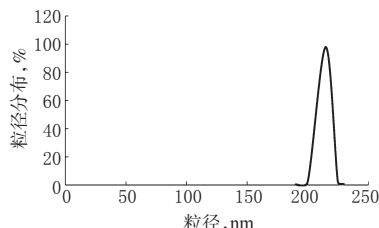


图4 苦参碱脂质体粒径分布图

Fig 4 The particle size distribution of Matrine liposome

### 2.7 脂质体稳定性考察

将制备的苦参碱脂质体分别在冰箱 4 °C 和室温保存, 于 1、3、6、9 个月观察脂质体外观形态及渗漏率变化情况。渗漏

率的测定依据“2.4”项下包封率的测定方法,按照公式:渗漏率 $= (W_1 - W_2) / W_1 \times 100\%$ 计算脂质体的渗漏率。式中 $W_1$ 为未放置前的包封量, $W_2$ 为定期测得包封量。结果4℃下脂质体渗漏率分别为 $(1.2 \pm 0.2)\%$ 、 $(2.8 \pm 0.3)\%$ 、 $(7.9 \pm 0.1)\%$ 、 $(10.7 \pm 0.1)\%$ ,室温下1、3个月时分别为 $(3.9 \pm 0.3)\%$ 、 $(9.7 \pm 0.2)\%$ ,之后由于脂质体已经发生絮凝和霉变,所以未测定。

室温条件下保存苦参碱脂质体,第3个月开始出现沉淀,分散不均匀,但轻轻摇晃后可以重新分散;但从第6个月开始脂质体已经发霉变质,有黑色絮状物。而在冷藏条件下,脂质体比较稳定,外观和渗漏率变化较小,有轻微沉淀,轻轻摇晃可以重新分散,直到第9个月时仍未出现絮状沉淀,说明脂质体应在冷藏条件下保存。

## 2.8 脂质体体外释放试验

2.8.1 脂质体外部游离药物的去除。使用透析法分离脂质体和游离药物。精密移取苦参碱脂质体10 ml装于透析袋中,两端扎紧,将其置于500 ml的生理盐水中,于室温磁力搅拌下透析12 h,每2 h更换1次透析介质。测定介质中的苦参碱含量,12 h后介质中的苦参碱含量几乎为0,说明大部分的游离药物已经透析出来。

2.8.2 体外释放度测定及方程拟合。分别精密移取苦参碱溶液(1 mg/ml)和苦参碱脂质体6 ml置于透析袋中,两端扎紧,绑于溶出仪的搅拌桨上,按照2010年版《中国药典》(二部)规定的第三法(浆碟法)测定释放度<sup>[9]</sup>。释放条件为:生理盐水300 ml,温度37℃,转速50 r/min。分别在1、2、3、4、5、6、7、8、10、15、20、24 h时取样1 ml,并及时补充等量的生理盐水,取样过0.45 μm微孔滤膜后进样测定峰面积。以样品各时间点的累积释放度(Q)对时间(t)作累积释放曲线,见图5所示;分别用零级动力学、一级动力学模型和Higuchi方程对苦参碱溶液和苦参碱脂质体的累积释放曲线结果进行方程拟合,结果见表1。

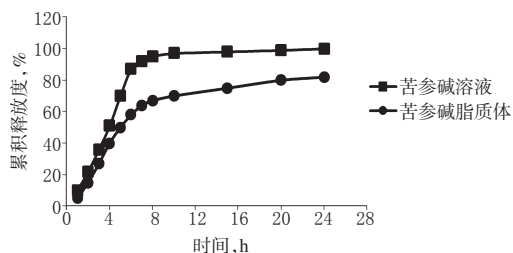


图5 苦参碱溶液及脂质体的累积释放曲线

Fig 5 Accumulative release curves of Matrine solution and liposome

表1 苦参碱溶液及脂质体释放曲线拟合结果

Tab 1 Results of release curve fitting of Matrine solution and liposome

药物类型	动力学模型/方程	拟合方程	r
苦参碱溶液	零级动力学	$Q=0.0337t+0.4181$	0.5471
	一级动力学	$\ln(1-Q)=-0.26t-0.1095$	0.8835
	Higuchi	$Q=0.2347t^{1/2}+0.0728$	0.7183
苦参碱脂质体	零级动力学	$Q=0.0291t+0.2736$	0.6865
	一级动力学	$\ln(1-Q)=0.1168t+0.7939$	0.8291
	Higuchi	$Q=1.1731t^{1/2}-0.2871$	0.9747

由图5可知,苦参碱溶液在6 h就已经释放了90%左右的药物,而脂质体24 h累积释放度为90%。结果表明,脂质体中药物的释放呈现明显的缓释效果。

由表1可知,苦参碱溶液的体外释放规律更符合一级动力学方程,而脂质体的体外释放规律更符合Higuchi方程。

## 3 讨论

### 3.1 磷脂的选择

本试验采用的磷脂是HSPC和DSPG。考虑到普通的大豆卵磷脂含有不饱和的双键,受热或者在空气中容易氧化变质,特别在高频超声的空化作用下更容易出现稳定性方面的问题<sup>[9]</sup>,而HSPC的热稳定性和抗氧化能力比普通的大豆卵磷脂高,故选择其为主要膜材制备苦参碱;而加入人工合成的磷脂DSPG后,脂质体的稳定性大大提高,制备的脂质体能够均匀分散。所以本文中脂质体磷脂材料是HSPC-DSPG(1:1)。

### 3.2 制备方法的选择

笔者在预试验中曾用薄膜分散法、乙醚注入法、逆相蒸发法和硫酸铵梯度法制备苦参碱脂质体。薄膜分散法制备的脂质体粒径大,不均匀;乙醚注入法有机溶液残留多,制备的脂质体毒性较大;逆相蒸发法制备的脂质体粒径均匀,但包封率特别低。而用硫酸铵梯度法制备苦参碱脂质体,粒径均匀,包封率高。因为脂质体内水相中的 $(NH_4)_2SO_4$ 含有 $NH_4^+$ 和 $SO_4^{2-}$ , $NH_4^+$ 进一步分解为 $NH_3$ 和 $H^+$ , $NH_3$ 的释放和 $H^+$ 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,分子状态的苦参碱进入内水相后转变为离子态,无法回到外水相。

虽然本文和文献<sup>[9]</sup>都采用硫酸铵梯度法制备苦参碱脂质体,但制备方法也有不同之处。本文是对之前的方法进行了优化。本文中,制备的脂质体在37℃恒温磁力搅拌20 min,探头超声10 min。由于磁力搅拌速度均匀而且较快、温度可控,探头超声功率较大,所以此方法制备的脂质体粒径均匀,不易沉淀。文中的电镜图和粒径分布图可以充分说明本研究制备的脂质体粒径分布更好,且苦参碱包封率也有所提高。包封率是影响脂质体质量的一个重要方面,本文中包封率为63.37%,文献<sup>[9]</sup>中为52.4%。

### 3.3 体外释放度考察

作文英等在文献<sup>[9]</sup>中考察过脂质体的体外释放度,其取样量为2 ml。在本文中,笔者同样采用《中国药典》中规定的浆碟法<sup>[9]</sup>测定了苦参碱溶液和苦参碱脂质体在生理盐水中的释放度,但每次取样仅1 ml,减少了由于取样量大导致累积释放度小的误差。由此得出的释放曲线虽有所差异,但拟合方程结果是一致的,即苦参碱溶液的体外释放规律符合一级动力学方程,而苦参碱脂质体的体外释放规律更符合Higuchi方程。

## 参考文献

- [1] 刘丽敏,刘华钢,毛俐,等.苦参碱和氧化苦参碱体外对肿瘤细胞增殖的影响[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(11):35.
- [2] 魏铭,刘小平,李惠,等.苦参碱脂质体的研究[J].武汉理工大学学报,2006,28(8):46.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录87-88.
- [4] 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.
- [5] 作文英,黄洁,刘硕,等.苦参碱隐形脂质体的包封率测定和体外释放度研究[J].中国药房,2008,19(31):2456.

(收稿日期:2012-12-21 修回日期:2013-03-13)