技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)04-0582-04

抗肝纤维化姜黄素脂质体的制备及初步稳定性考察

赵 怡,孟路华,潘黎军,王 驰
(重庆医科大学药学院药物化学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:制备姜黄素(Curcumin,Cur)脂质体并考察其包封率及稳定性。方法:采用逆相蒸发法制备 Cur 脂质体,葡聚糖凝胶柱层析法分离含药脂质体与游离药物并测定包封率;正交设计优选制备处方;离心加速实验与渗漏率的测定考察脂质体的稳定性。结果:所得优化处方为磷脂与药物的重量比 60:1,磷脂与胆固醇的重量比 4:1,pH6.5 的磷酸盐缓冲液水合递质,超声时间为 5 min。以优化处方制得的脂质体平均包封率达 95.06%。结论:选用逆相蒸发法优化 Cur 脂质体处方合理,工艺简便可行,包封率高,稳定性好。

【关键词】姜黄素脂质体;逆相蒸发法;正交设计;包封率;稳定性
【中国图书分类法分类号】R931 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-01

Preparation of curcumin liposome and preliminary study on its stability

ZHAO Yi, et al
(*Department of Pharmaceutical Chemical Pharmacy Laboratory, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare curcumin liposome and investigate its stability. *Methods*: Curcumin liposome was prepared by the reversed-phase evaporation method and purified by exclusion chromatography with Sephadex-50. The optimum formation was selected by means of orthogonal design of experiment; Centrifugal acceleration experiment and determination of leakling ration were served to proved the liposome stability. *Results*: The optimum formula was as follows: the ratio of lecithin to drug was 60:1; lecithin: cholesterol was 4:1; pH of PBS was 6.5, ultrasonic time was 5min. The average entrapment efficiency for curcumin was 95.06%. *Conclusion*: The selected formulation and preparation technique of curcumin liposome is reasonable in prescription, practicable in techniques, high in encapsulation efficiency and good in stability.

【Key words】Curcumin liposome; Reverse phase evaporation; Orthogonal design; Encapsulation efficiency; Stability

肝纤维化(Hepatic fabrosis,HF)是一个慢性肝病发展成肝硬化必经的动态病理过程[1]。研究证实,位于 Disse 间隙的间质细胞——肝星状细胞(Hepatic stellate cell,HSC)是参与 HF 发生发展的重要细胞,肝损伤后,其表型发生转变转化为成肌纤维细胞,后者的细胞增殖活性提高,可合成大量的细胞外基质(Extracellular matrix,ECM),最终导致 HF 的形成[2],故抑制 HSC 的活化成为抗肝纤维化,治疗肝硬化的关键。近年来的研究成果已证实从姜黄(Curcuma longa Linn)中提取的天然活性成分——姜黄素(Curcumin,Cur)具有抑制 HSC 的活化和增殖、诱导 HSC 凋亡,减少胶原合成的来源,促进 ECM 的降解,逆转肝纤维化的作用。然而,Cur 是一种不溶于水的酚类色素,其结构中的 -OH、$-OCH_3$ 等基团极不稳定,体外易被氧化、光解,体内吸收差,易代谢,其应用受到极大的限制[3]。脂质体作为一种药物载体,可以将一些不稳定、易氧化的药物包封在脂质体中,药物因受到脂质体双层膜的保护,在很大程度上提高了药物的稳定性,同时利用其天然的趋向网状内皮系统的特性,使其浓集于巨噬细胞丰富的肝脏,从而提高药物的治疗指数、减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性,达到肝被动靶向的作用[4]。本研究设计将 Cur 包裹于脂质体中,改善 Cur 不稳定特性,同时利用被动靶向作用提高 Cur 的治疗效果;以包封率为指标,采用正交实验筛选并优化了其处方和制备工艺,旨在探索包封率高,稳定性好的 Cur 脂质体。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV-2102PC 紫外分光光度计(日本尤尼可公司);RE-52 型真空旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);KQ2200B 型超声

作者介绍:赵 怡(1985-),女,硕士,研究方向:靶向制剂。
通讯作者:王 驰,男,副教授,E-mail: Wchi639@sohu.com。

波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；层析柱（重庆医用玻璃厂）；激光粒度测定仪（英国 Malvern 公司）；孔径为 0.8 μm、0.45 μm 的聚碳酸膜（Whatman 公司）；漩涡混合器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）。

1.2 试剂

大豆卵磷脂（美国 sigma 公司）；胆固醇（美国 sigma 公司）；Cur 原料药（上海试剂三厂，080203）；Cur 对照品（昆明市科翔生物有限公司，080517）；Sephadex-G50（美国 sigma 公司）；其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 Cur脂质体和空白脂质体的制备

精密称取卵磷脂和胆固醇适量，加入至圆底烧瓶中，加入氯仿 10 ml，再加入 Cur 无水乙醇溶液，混匀，35 ℃全真空减压旋转，蒸发除去有机溶剂，成均匀薄膜，加入 10 ml 氯仿，再加入 3 ml 磷酸缓冲溶液，振摇，超声 5 min 形成稳定的 W/O 相。35 ℃半真空旋转至凝胶状，补加适量 PBS 继续旋转洗脱胶状物，得脂质体混悬液，再依次过 0.8 μm、0.45 μm 的微孔滤膜，置于 4 ℃冰箱保存备用。采用上述方法制备空白脂质体，4 ℃冰箱保存备用。

2.2 Cur 脂质体包封率的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 Cur 标准品 10.5 mg 置于 10 ml 容量瓶中，加无水乙醇溶解并定容至刻度，混匀，即得浓度为 1.05 mg/ml 的标准贮备液。

2.2.2 波长选择 将 Cur 对照品溶液用无水乙醇稀释。分别取空白脂质体溶液和 Cur 脂质体溶液 0.5 ml，各加入 1 ml 10% 1Triton-100 水溶液破乳后，分别在 200~600 nm 与 200~500 nm 范围内进行全波长扫描。结果表明，Cur 在 430 nm 处有最大吸收，而空白脂质体在此处无吸收，即空白脂质体在 430 nm 处对药物无干扰。紫外光谱见图 1~1、1~2 和 1~3。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密吸取上述 Cur 标准品储备液 20、40、60、80、100 μl，加至 10 ml 容量瓶中，无水乙醇稀释并定容至 10 ml 刻度，混匀即得浓度为 2.1、4.2、6.3、8.4、10.5 μg/ml 的 Cur 标准液。以无水乙醇为空白，430 nm 处测定以上各溶液的吸光度。以吸光度（A）对 Cur 浓度（C）进行线型回归，回归方程为：A=0.146 6C+0.015 4（r=0.999 6）结果表明，Cur 在 2.1~10.5 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.2.4 精密度实验 分别配制 2.1、6.3、10.5 μg/ml 3 个低中高浓度的 Cur 溶液，在上述条件下测定，1 d 内测定 5 次，计算日内精密度；每日测定 1 次，连续测定 5 d，计算日间精密度。日内精密度为：1.10%，日间精密度为：1.22%。

2.2.5 洗脱曲线的绘制 采用 Sephadex G-50 型葡聚糖凝胶柱色谱法分离脂质体和游离药物。取 0.5 ml Cur 脂质体上葡聚糖凝胶柱，用 PBS 缓冲液洗脱，流速控制在 1 ml/min 左右，用刻度管每 2 ml 收集 1 份，共收集前 8 管，从第 9 管开始更换洗脱液，用 PBS 配制的 30%乙醇水溶液代替 PBS 进行洗脱，每 2 ml 收集 1 份，另收集 8 管。每份分别用 10%的 Triton X-100 水溶液破乳后用乙醇稀释至 4 ml。取空白脂质体 0.5 ml 上柱，收集洗脱液用 10%的 Triton X-100 水溶液破乳后用乙醇稀释至 4 ml 作为空白，在上述条件下进行测定，记录吸光度，绘制洗脱曲线（图 2），结果表明脂质体集中在 4~16 ml，游离药物集中在 26~30 ml。

2.2.6 包封率的测定 精密移取 Cur 脂质体 0.5 ml 上柱，以 PBS 洗脱，收集第 4~16 ml 的流份共 14 ml，混合均匀，用 10%的 Triton X-100 水溶液破乳后用乙醇稀释至 16 ml，由标准曲线计算脂质体中包封药量。按 2005 年版《中国药典》[5] 中的相关规定，脂质体包封率 = 系统中包封药量 / 系统中包封与未包封总药量 × 100%，计算包封率。

2.2.7 柱回收率 分别移取 1.05 mg/ml 标准贮备液 40、60、100 μl 上柱，按“2.2.5”项的层析条件进行层析，收集游离药物组分后，稀释，定容，于 430 nm 处测吸光度，代入标准曲线计算收集的游离药物的总量，计算 Cur 柱回收率（表 1）。配制一系列不同浓度的 Cur 标准溶液，分别与空白脂质体混合，得标准混合液，移取 0.5 ml 上柱，相同条件下进行柱层析，测定游离药物组分的含量，计算柱加样回收率（表 1）。

2.3 正交实验

2.3.1 因素和水平的确定 在单因素实验的基础上采用正交实验优化 Cur 脂质体的处方和制备工艺，以脂质体的包封率为考察指标。选择影响脂质体包封率的主要因素：磷脂与药物的重量比（A），磷脂与胆固醇的重量比（B），水合递质磷酸盐缓冲液 pH 值（C）和超声时间（D），每个因素取三水平，按 $L_9(3^4)$ 正交表安排实验，结果见表 2。

2.3.2 正交实验结果 对表 2 结果进行直观分析，由极差 R 可知对包封率的影响因素大小为 C>A>D>B。最佳处方工艺组合为 $A_1B_3C_1D_2$，即选择磷脂与药物比为 60:1，磷脂与胆固醇之比为 4:1，磷酸缓冲液 pH 值为 6.5，超声时间为 5 min。

2.3.3 结果验证 按“2.3.2”项中所得优化处方制备 3 批批

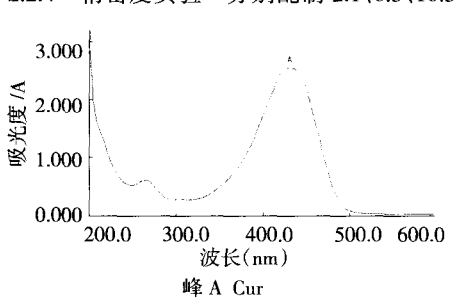


图 1-1 Cur 溶液的紫外 - 可见光扫描图

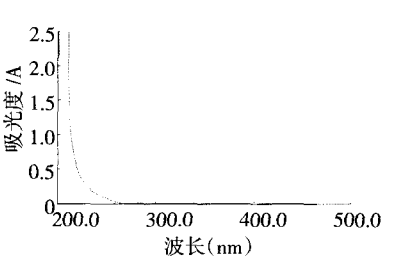


图 1-2 空白脂质体的紫外 - 可见光扫描图

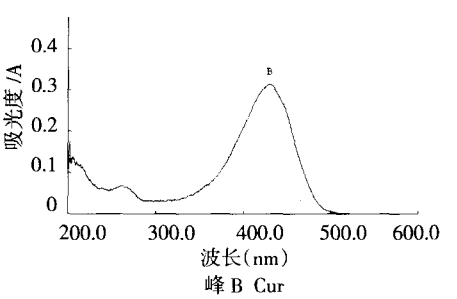


图 1-3 Cur 脂质体的紫外 - 可见光扫描图

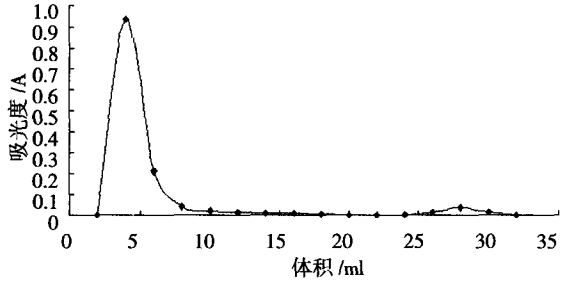


图 2 Cur 脂质体葡聚糖凝胶柱 G-50 柱洗脱曲线

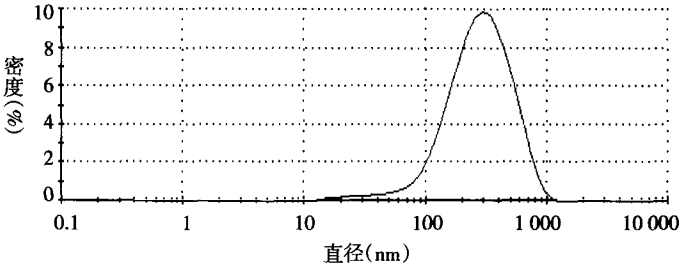


图 3 Cur 脂质体粒径分布

表 1 Cur 脂质体回收率测定结果(n=3)

回收率	加样量(μg/ml)	回收量(μg/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)
	4.20	4.14	98.57	
Cur 柱	6.30	6.29	99.84	99.44
	10.50	10.49	99.90	
	4.20	4.16	99.05	
Cur 柱加样	6.30	6.23	98.89	99.51
	10.50	10.56	100.6	

表 2 因素水平表

水平	A	B	C	D
1	60:1	2:1	6.5	3
2	30:1	3:1	7.0	5
3	20:1	4:1	7.4	7

表 3 正交试验方案及结果

序号	A	B	C	D	包封率 /%
1	1	1	1	1	94.49
2	1	2	2	2	94.13
3	1	3	3	3	85.82
4	2	1	2	3	78.08
5	2	2	3	1	57.74
6	2	3	1	2	94.16
7	3	1	3	2	78.90
8	3	2	1	3	85.85
9	3	3	2	1	73.16
K_1	91.48	83.82	91.50	75.13	
K_2	76.66	79.24	81.79	89.06	
K_3	79.30	84.38	74.15	83.25	
R	14.82	5.14	17.45	13.93	

表 4 Cur 脂质体离心加速实验结果

样品	A_0	A	K_E
20090429	0.411	0.375	0.036
20090430	0.343	0.388	0.045
20090504	0.402	0.433	0.031

表 5 比较 2 种不同贮存条件下 Cur 脂质体的渗漏率

序号	外观		渗漏率(%)	
1	4℃ ± 2℃	25℃ ± 2℃	4℃ ± 2℃	25℃ ± 2℃
2	淡黄色均匀分散,无絮状沉淀	淡黄色均匀分散,无絮状沉淀	0	0
3	淡黄色均匀分散,无絮状沉淀	淡黄色均匀分散,无絮状沉淀	0.17	6.96
4	淡黄色均匀分散,无絮状沉淀	淡黄色均匀分散,无絮状沉淀	0.48	12.38
5	淡黄色均匀分散,无絮状沉淀	试管底部有游离药物晶体析出	0.52	16.33
6	淡黄色均匀分散,无絮状沉淀	试管底部有游离药物晶体析出	0.95	17.91
7	淡黄色均匀分散,无絮状沉淀	试管底部有游离药物晶体析出	1.06	24.12

号为 20090429,20090430,20090504,包封率分别为 95.80%、94.26%、95.11%,平均包封率为 95.06%,表明该处方切实有效,重现性良好。

2.4 脂质体粒径测定

分别取少量制备的 Cur 脂质体样品,用 PBS 稀释后用激光粒度分析仪测定。结果表明,所制得 Cur 脂质体平均粒径为 242.3 nm(多分散系数 PDI 为 0.305),粒径分布均匀,符合正态分布规律(见图 3)。

2.5 初步稳定性考察

2.5.1 离心加速实验 将样品采用离心加速实验 (1 000 r/min,离心 5 min),用分光光度计测定脂质体离心前后 500 nm 处吸光度的变化,根据公式 $K_E=(|A-A_0|)\times 100\%$,求稳定性参数 K_E。A_0:脂质体离心前的吸光度值,A:脂质体离心后的吸光度值[6]。由表 4 实验数据可见,K_E 变化小,脂质体稳定性良好。结果见表 4。

2.5.2 渗漏率的测定 将 Cur 脂质体在 4℃ ± 2℃,25℃ ± 2℃条件下于 0、3、6、9、12、15 d 检测渗漏率。精密量取 Cur 脂质体混悬液 0.5 ml,按"2.2.6"项包封率测定项下处理,并按下式计算贮存过程中的渗漏率。

$P=[(W_{包}-W_{储})/W_{包}]\times 100\%$,其中,$W_{包}$、$W_{储}$分别为制备时包封量和贮存一定时间后的包封量。结果见表 5。

3 讨 论

近年来,有文献报道 Cur 脂质体包封率测定方法有离心超滤法[7]、超速离心法[8]等,这 2 种方法操作简便、快捷,但成本高。故笔者借鉴了实验室比较常规、经典的方法:葡聚糖凝胶柱层析法进行测定。在实验中发现,用 PBS 作为洗脱液进行洗脱,凝胶柱对 Cur 有较多吸附,笔者也曾利用 5%的 NaOH 水溶液进行洗脱,虽游离药物可洗脱出来,但在碱性条件下 Cur 会发生不可逆的变化。笔者根据 Cur 易溶于乙醇这一性质,分别采用 10%、20%、30%的乙醇水溶液直接进行洗脱,发现 30%的乙醇水溶液能很好的将游离药物洗脱下来,但对柱效有一定影响,故笔者设计分段式洗脱法进行洗脱。通过验证柱回收率,表明分段式葡聚糖凝胶层析法测量 Cur 脂质体的包封率是可靠的,该法分离效果较好,简便易行,价格低廉,对柱效几乎无影响,解决了 Cur 不易洗脱这一问题。

在实验过程中笔者曾将薄膜法[9]和逆相蒸发法制备的 Cur 脂质体进行比较,发现薄膜分散法制备的脂质体稳定性欠佳,故采用后者进行处方和制备工艺的筛选。在单因素考察的基础上采用正交实验优选得到的 Cur 脂质体处方合理、工艺简便可行、包封率高达 95.06%,且重现性好。初步稳定性考察证实 4℃为贮存 Cur 脂质体的最佳条件,该条件下脂质体无絮凝现象、包封率没有明显变化。

另外,关于脂质体长期稳定性考察,粒径控制,以及制备具有主动靶向性的 Cur 脂质体,实现细胞水平的靶向给药 (Targeting drug delivery system,TDDS)还需进行进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 徐 波,陆 茵,吴家明,等.姜黄素抗肝纤维化分子机制研究进展[J].中国中医药信息杂志,2008,15(3):90-93.

[2] Cheng Y,Ping J,Liu C,et al.Study on effect of extracts from salvia miltiorrhiza and curcuma longa in inhibiting phosphorylated extracellular signal regulated kinase expression in rat's hepatic stellate cell[J].Cinese journal of integrative medicine,2006,12(3):207-211.

[3] 李 彧,杨丽霞,李亚东,等.姜黄素抗纤维化作用研究进展[J].北京中医药大学学报,2008,31(6):408-411.

[4] 陆 彬.药物新剂型与新技术[M].北京:人民卫生出版社,1998.108-110.

[5] 中国药典.二部[S].2005.附录 181.

[6] 林巧平,郭仁平,许向阳,等.注射用姜黄素脂质体的制备及其质量评价[J].中国天然药物,2007,5(3):207-210.

[7] 宫 亮,杨和平,王 昆,等.姜黄素 -3 单体脂质体的研制及评价[J].华西药学杂志,2005,20(5):421-422.

[8] 张 奇,邓英杰.冻融法制备 5- 氟尿嘧啶脂质体及其稳定性考察[J].沈阳药科大学学报,2000,17(2):87-89.

[9] 许汉林,孙 芸,邵继征,等.姜黄素脂质体的制备及理化性质考察[J].中国医院药学杂志,2007,27(10):1363-1365.

(责任编辑:冉明会)