

## 丹参酮传递体的制备及其变形性

胡玉佳,张忠义,李红磊,张守尧(南方医科大学珠江医院药材科,广东 广州 510282)

**摘要:**目的 考察丹参酮传递体的制备工艺,并评价其质量。方法 用薄膜分散法制备丹参酮传递体,考察其形态、含量、包封率、粒径、多分散度及 Zate 电位;并对传递体的稳定性和变形性进行研究。结果 丹参酮传递体球形圆整,大小较均匀,含量为 $(1.0192\pm 0.075)$  mg/ml,包封率为 $(62.3\pm 0.08)\%$ ,算术平均粒径 110 nm,多分散度为 0.19,Zate 电位为 -15 mV;丹参酮传递体分散于 0.9%氯化钠注射用水中,4℃避光保存 3 个月稳定;证实了含有胆酸钠的传递体在外压作用下特定的变形性。结论 丹参酮传递体的制备工艺对其质量有较大影响,选择薄膜分散法优化工艺制备得到的丹参酮传递体包封率较高,稳定性较好。表面活性剂胆酸钠的存在促进脂质体的变形,这种作用与胆酸钠在磷脂双分子层中所占比例及外压有关。

**关键词:**丹参酮;传递体;包封率;变形性

中图分类号:R945;R943 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)03-0297-04

## Preparation of tanshinone transfersome and its deformability

HU Yu-Jia, ZHANG Zhong-Yi, LI Hong-lei, ZHANG Shou-Yao\*

Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

**Abstract: Objective** To prepare tanshinone transfersome (TTs) and evaluate its deformability. **Methods** The transfersomes were prepared by film dispersion method followed by sonication, and their physical properties, morphology, content, entrapment efficiency, particle size, polydispersity, and Zeta potential were investigated. The stability and deformability of TTs were studied. Liposomes with different molar ratios of cholate and lecithin were compared for their permeability under external pressure. **Results** The prepared TF were spherical vesicles with content of  $1.0192\pm 0.075$  mg/ml, entrapment efficiency of  $(62.3\pm 0.08)\%$ , particle size of 110 nm, polydispersity of 0.19 and Zate potential of -15.0 mV. The TTs remained stable during light-proof preservation for 3 months at 4℃, and sodium cholate contributed to the flexibility of the lecithin vesicles. **Conclusion** TTs prepared by film dispersion method has good entrapment efficiency and stability. The vesicles possess high deformability in relation to the molar ratio of sodium cholate to lecithin and the external pressure.

**Key words:** tanshinone; transfersomes; entrapment efficiency; deformability.

传递体又称柔性纳米脂质体,系一种新型的经皮给药载体<sup>[1]</sup>。通过将某些表面活性剂加入到制备脂质体的类脂材料中<sup>[2]</sup>,制备成具有高度变形性,且能高效的穿透比自身小数倍的皮肤孔道而达到透皮给药目的类脂聚集体<sup>[3]</sup>。将药物制成传递体透皮制剂,具有可制备药品种类多、透过率高、使用方便、起效快等优点<sup>[4,5]</sup>。国内外有关 TF 的研究主要集中在干扰素、胰岛素、环孢素等大分子药物,而低分子药物研究则少见,中药传递体的研究未见报道。

丹参是临床上常用的活血化瘀的要药,是唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza Bunge* 的根,常用于妇科病、冠心病、缺血性中风、动脉粥样硬化等症的治疗。临床上丹参制剂对冠心病、脑血栓、肝炎、肝硬化等有显著的疗效。丹参的活性成分主要分为脂溶性和水溶

性两类。其脂溶性成分主要是丹参酮、隐丹参酮、丹参酮 II A 等。近十多年国内外对丹参及其同属植物的脂溶性成分进行了大量的研究,仅从丹参中分离的二萜醌类化合物就有 40 多个,并且对其药理也进行了观察<sup>[6,7]</sup>。本研究以丹参酮类脂溶性成分为模板药材,对丹参酮传递体的制备进行了探讨,并初步确定了质量控制方法,证实了其在外压作用下特定的变形性,报告如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

R-200 BUCHI ROTAVAPOR<sup>®</sup> 旋转蒸发器 (BUCHI SWITZERLAND); 恒温水浴锅 (Buchi Heating Bath B-490, Buchi Switzerland); SHZ-D(III) 循环水式真空泵 (浙江黄岩求精仪器厂); 数字式超声波细胞粉碎仪 (美国 BRANSON 公司生产); 激光粒度散射仪 (MALVERN INSTRUMENTS Ltd); H-7500 型透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); 高效液相色谱仪 (Shimadzu LC-6A, 日本); 岛津 SPD-6A 型紫外检测器。

#### 1.2 试剂

收稿日期:2005-07-12

基金项目:广东省医学科研基金(A2003473)

Supported by Medical Research Foundation of Guangdong Province (A2003473)

作者简介:胡玉佳(1978-),女,现为第一军医大学在读硕士研究生, Email:yujia7879@126.com

通讯作者:张忠义,南方医科大学珠江医院药材科,副主任药师,从事药物分析及中药现代化研究,电话:020-61643555

丹参酮提取物(广州医药工业研究所提供);丹参酮ⅡA对照品(中国药品生物制品检定所);注射级卵磷脂(上海浦江磷脂有限公司);胆酸钠(Sigma公司生产);Sephadex G-50葡聚糖凝胶(上海医药工业研究院,100~300 μm);0.9%氯化钠(珠江医院药材科提供);甲醇为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 传递体的制备

根据文献方法[1]定量称取卵磷脂、胆酸钠和丹参酮提取物适量,加入20 ml氯仿-甲醇(V:V=1:1)复合溶剂,于37℃恒温水浴中,开启冷凝水管、循环水式真空泵旋转蒸发除去有机溶剂,使磷脂等成膜材料在烧瓶壁形成均匀类脂薄膜。然后往圆底烧瓶中加入0.9%氯化钠注射用水10 ml,旋转洗膜1 h得到脂质体混悬液。将其在冰水浴条件下探针式超声适当时间,经0.22 μm微孔滤膜过滤可得到柔性纳米脂质体混悬液[8]。同法制备不含胆酸钠的普通脂质体。分装于适合的安普瓶中,4℃条件下密闭避光保存。

通过预实验并参考文献[4],我们选择了四因素、三水平的L9(34)正交设计考察磷脂与胆酸钠的重量比(A)、磷脂与丹参酮提取物的重量比(B)、蒸发温度(C)、超声处理时间(D)等对传递体粒径的影响,以确定最佳制备工艺,正交实验设计各因素水平见表1。

表1 正交试验因素-水平表

Tab.1 Factors and levels of the orthogonal test

Levels	A	B	C	D
	Lecithin/sodium cholate (mg/mg)	Lecithin/tanshinone (mg/mg)	Temperature (°C)	Sonification time (min)
1	1:0	10:1	37	1
2	4:1	15:1	42	3
3	6:1	20:1	52	5

### 2.2 传递体的粒径、分布及形态学测定

用激光粒度散射仪测定传递体的粒径及分布特征[3];吸取1 ml制得的相应样品至测量杯中,所选激光光源波长为633.0 nm,于常温下测试,经样品散射后的光在90°范围内变化不同角度来检测。光信号用256通道、高速数字相关器进行处理。测试的结果分别给出体均粒径(dv)、峰数与峰面积、半峰宽、数均粒径(dn),多分散度。应用1%磷钼酸负染色制备样品,于透射电镜下观测并照相。

### 2.3 传递体中丹参酮ⅡA的测定

采用反相高效液相色谱法测定制剂中药物含量,色谱及检测条件为:色谱柱,Hypersil ODS色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相,甲醇-水(V:V=8:

2);检测波长,UV 275 nm;流速为1.0 ml/min;柱温为32℃;柱压为110 kg f/cm<sup>2</sup>;进样体积为10 μl。

### 2.4 包封率及载药量的测定

纳米脂质体的包封率通过葡聚糖凝胶柱色谱法测定[9]。柱层析条件为:Sephadex G-50柱(17 cm×3 cm);洗脱液0.9%氯化钠注射用水;流速1 ml/min,室温下层析。移取丹参酮传递体0.5 ml上柱,以柱层析条件洗脱,每3 ml收集一次。对所有收集液以上述色谱条件进样检测,根据进样量和峰面积确定的标准曲线计算浓度和含药量,分别得经柱分离出的脂质体中含药量和总药量,以下式计算脂质体分离比,即包封率EE%:脂质体分离比%=经柱分离的脂质体中含药量/总药量×100%;载药量Loading%=W<sub>b</sub>/W<sub>c</sub>×100%,其中W<sub>b</sub>为传递体混悬液中包封的药物量,W<sub>c</sub>为载体材料量。

### 2.5 变形性考察[10]

观察在外压作用下,传递体混悬液变形透过孔径为0.22 μm微孔滤膜的性能。首先记录5 ml纯水透过微孔滤膜所需时间,然后记录传递体混悬液5 ml透过同一滤膜所需的时间,以此计算相对透过速率P=V<sub>t</sub>/V<sub>water</sub>×100%。根据胆酸钠与卵磷脂不同重量比制得的空白及含药传递体的混悬液,以及不含胆酸钠的普通脂质体,在相同探针式超声条件下制备得到的混悬液,考察在一定压力下的相对透过速率。

## 3 结果

### 3.1 传递体制备方法及其影响因素

应用薄膜分散法制备传递体时,首先在圆底烧瓶壁形成均一的磷脂薄膜,水合后则形成乳白色不透明混悬液。应用探针式超声法,振幅为11%,脉冲时间为30',含有胆酸钠的柔性纳米脂质体只需1 min即可将粒径减少到100 nm。超声速度和时间的增加有利于纳米脂质体的充分分散,不容易聚集形成较大的粒子[11]。

对正交实验的直观分析结果可以看出(表2),对粒径的影响大小极差R值依次为:因素D>因素A>因素C>因素B;比较K值:D<sub>2</sub>>D<sub>1</sub>>D<sub>3</sub>、A<sub>3</sub>>A<sub>1</sub>>A<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>>C<sub>3</sub>>C<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>>B<sub>2</sub>>B<sub>3</sub>。因为粒径越小越好,所以同因素相比;选用D<sub>3</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>B<sub>3</sub>。考虑到长时间超声会引起传递体中药物的泄露,故选择D<sub>1</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>B<sub>3</sub>。

### 3.2 传递体的理化特性

3.2.1 粒径测定结果 从强度径(intensity)的分析结果中,可以得到大、小粒子对光散射强度的贡献比;从体积径(volume)的分析结果中,我们可以得到大、小粒子的体积比;从数量径的分析结果可以得到大小粒子的数量比;当三者一致时,体系最均匀、最稳定。丹参酮传递体的数均粒径为110 nm,多分散度为0.19,

表 2 正交试验结果

Tab.2 Results of orthogonal test

Levels	A	B	C	D	Diameter (nm)
	Lecithin/sodium cholate(mg/mg)	Lecithin/tanshinone (mg/mg)	Temperature (°C)	Sonification time (min)	
1	1	1	1	1	128.6
2	1	2	2	2	115.1
3	1	3	3	3	97.2
4	2	1	2	3	82.5
5	2	2	3	1	112.2
6	2	3	1	2	110.1
7	3	1	3	2	129.4
8	3	2	1	3	101.1
9	3	3	2	1	113.5
K1	113.6	113.5	113.2	118.1	
K2	101.6	109.4	103.7	118.2	
K3	114.6	106.9	112.9	93.6	
R	13.0	6.6	9.5	24.6	

Zeta电位为 -15.0 mV。数均粒径(dn)结果与透射电镜

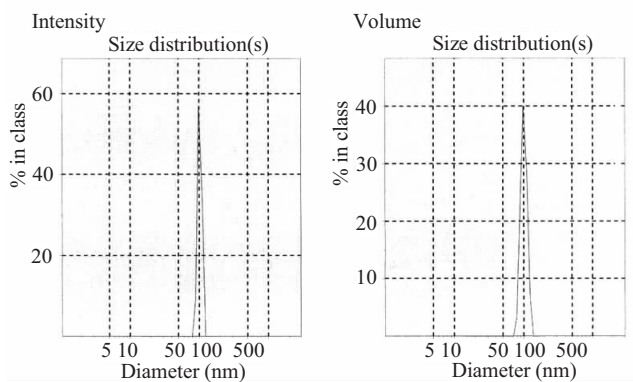


图 1 传递体的粒径

Fig.1 Particle size distribution of the prepared tanshinone transfersomes

测得的平均粒径结果相一致(图 1)。

3.2.2 透射电镜观察结果 透射电镜观察传递体(图 2),可见球形圆整、大小均匀的指纹状螺旋。其胶体混悬液在 4 °C 下保存可以稳定存在 3 个月以上没有发

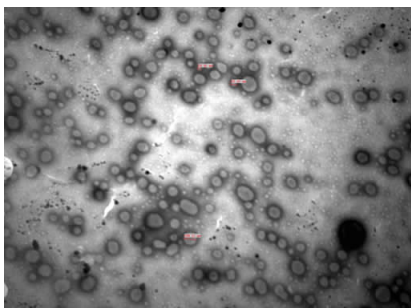


图 2 丹参酮传递体透射电镜照片

Fig.2 Transmission electron microscopic observation of the tanshinone transfersomes (Original magnification: ×50 000)

生外观变化。

### 3.3 丹参酮 II A 含量及包封率

方法专一性考察结果表明,在本色谱条件下,传递体材料及溶剂等杂质峰不干扰丹参酮的含量测定(图 3)。丹参酮峰面积  $Y$  与进样量  $X$  ( $\mu\text{g}$ ) 回归方程为  $Y = -19352.3 + 4445049X$  ( $r^2 = 1.000$ ),线性范围:  $3.82 \sim 61.12 \mu\text{g/ml}$ 。方法回收率为 97.33% ( $RSD = 1.45\%$ ,  $n = 3$ )。测得丹参酮传递体混悬液的药物含量、传递体载药量和包封率见表 3。

### 3.4 变形性研究

考察不同处方制备的传递体混悬液,在外压作用下相对透过速率。结果表明:含有胆酸钠的传递体混悬液均能透过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,且透过速率随压力增大而增大(表 4)。

## 4 讨论

丹参酮传递体的制备工艺对其质量有较大影响。丹参酮是水溶性极低的药物,在甲醇中的溶解度比较好,但经实验表明,用甲醇作有机溶媒不能形成均匀的类脂薄膜,采用甲醇-氯仿( $V:V = 1:1$ )的复合溶剂对丹参酮的溶解较完全,且形成的薄膜也比较均匀。制备传递体的方法主要有:薄膜分散法、逆相蒸发法、高压乳匀法、乳化分散法、超声波分散法等。逆相蒸发法、超声波分散法适合于包裹水溶性药物,而丹参酮的水溶性极低,所以不宜选择。压乳匀法、乳化分散法需要加热到一定温度,对丹参酮传递体的稳定性有影响。薄膜分散法适合于脂溶性及水溶性极低的药物且简便易行,适合于实验室制备。

在其他反应条件不变(温度 37 °C,反应完成后超声处理时间为 1 min)的情况下,制备传递体结果如下:随磷脂与胆酸钠的重量比(1:0~4:1)升高,粒径逐渐减小(97~138 nm),传递体混悬液为稳定体系。

实验制备得到的丹参酮传递体,由于磷脂双分子层膜流动性的存在,会发生药物的泄漏。调整磷脂与丹参酮的质量比,使分散形成的纳米级粒子更加稳定。当其他反应条件不变,随磷脂与丹参酮的质量比(10:1~20:1)递减,反应发生形成的传递体粒径逐渐减小(97~138 nm),形成的胶体混悬液更稳定。

温度对粒径的影响:温度升高(37 °C~52 °C),传递体粒径随之减小。而温度低,制备的传递体稳定性好。温度对传递体的包封率有较大影响,温度升高,磷脂双分子层的膜流动性增加,膜内包封的药物易于渗漏。所以本实验在 4 °C 下储存传递体,这样可以减少传递体渗漏率。

根据 Stokes 公式,脂质体粒径越小越稳定。但根



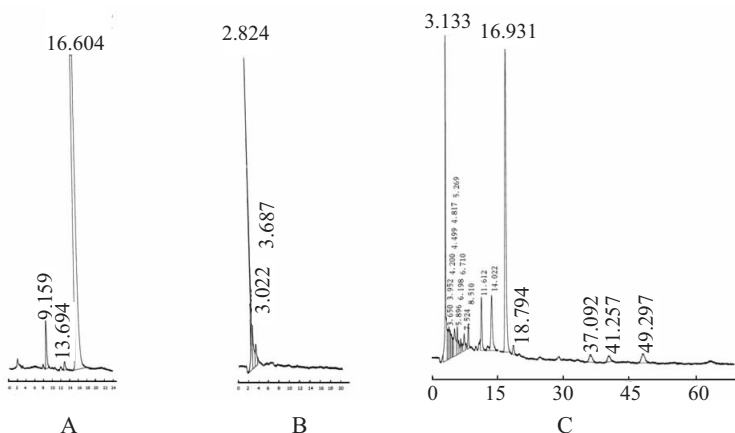


图 3 高效液相色谱图

Fig.3 High-performance liquid chromatography

A:Tanshinone; B:Blank transfersomes; C:Tanshinone transfersomes

表 3 丹参酮传递体的药物含量、载药量和包封率

Tab.3 Content, loading and entrapment efficiency of tanshinone transfersomes (n=5, Mean±SD)

No.	Content(mg/ml)	Loading(%)	Entrapment efficiency (%)
050624	0.855±0.032	3.58±0.05	53.9±0.05
050630	0.925±0.132	3.84±0.06	61.8±0.06
050706	1.019±0.075	3.68±0.02	62.3±0.08

表 4 丹参酮传递体变形性实验结果

Tab.4 Results of deformability test (n=5, Mean±SD)

Items	Relative rate (%)			
	0.1 MPa	0.2 MPa	0.3 MPa	0.4 MPa
Transfersomes	78.63±0.23	80.21±0.13	85.68±0.31	90.37±0.16
Tanshinone transfersomes	80.23±0.12	82.11±0.20	89.65±0.22	92.22±0.09
Liposomes	12.35±0.18	14.51±0.17	18.23±0.23	21.15±0.17

据脂质体双分子层膜对内含药物渗漏屏障作用大小,一般多层脂质体比单层脂质体稳定。前者从脂粒大小考虑,后者从脂质多少分析,但不能认为层数越多,粒径越小的脂质体稳定就意味着该类脂质体好,而必须在考虑到在保护包封率的前提下,制备有较高稳定性的脂质体。在包封率测定中,由于丹参酮强亲脂性且难溶于水,近似的认为未包裹的游离药物相当于药物的溶解度,不溶的丹参酮可以完全被滤膜截留。本法结果表明丹参酮传递体包封率较高,磷脂双分子层可显著增溶疏水性丹参酮。

经薄膜分散法制备得到的丹参酮传递体为橙色混悬液,随着超声时间的延长,传递体的粒径逐渐下降。动态光散射技术(DSL)是一种适合于测量纳米微粒的有效方法<sup>[12]</sup>,该方法从多分散度、强度径、体积径、数量径四个角度来分析粒子粒径的大小及分布情况。在相同压力下,随着胆酸钠用量增加,透过速率增

加。胆酸钠引起传递体变形性增加可能与其扰乱磷脂酰基链的顺序,引起顺序参数(顺序参数是反映传递体中链重新定向和异构化的参数)的显著下降等因素有关。相同组分的空白传递体与含药传递体相比,含药传递体的透过速率大,可能与药物和脂质成分的相互作用有关,具体原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Ceve G. Transfersomes, Liposomes and other lipid suspensions on the sky: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery [J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 13(3-4): 257-388.
- [2] Hofer C, Goebel R, Deering P, et al. Formulation of interleukin-2 and interferon-alpha containing ultradeformable carriers for potential transderma application [J]. Anticancer Res, 1999, 19(2c): 1505-7.
- [3] Schatzlein A, Ceve G. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeation barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (transfersomes) [J]. Br J Dermatol, 1998, 138(4): 583-92.
- [4] Ceve G, Schatzlein A, Blume G. Transdermal drug carrier: basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides [J]. J Control Release, 1995, 36(1-2): 3.
- [5] Ceve G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force [J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1104: 226.
- [6] 柳丽, 张洪泉. 丹参活性成分的现代中药药理研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2003, 22(6): 1-4.
- [7] 杨勤, 赵朝伟. 丹参的药理作用研究现状 [J]. 中国药业, 2003, 12(10): 78-9.
- [8] 尚北城, 徐贵丽, 贺建国. 传递体研究进展 [J]. 西南国防医药, 2002, 12(1): 81.
- [9] 高晓黎, 季兴梅. 葡聚糖凝胶柱色谱法测定脂质体包封率的条件筛选 [J]. 中国药学杂志, 2003, 38(7): 515.
- [10] Gao XL, Ji XM. Determining the trap efficiency of liposome using sephadex column chromatography [J]. Chin Pharm J, 2003, 38(7): 515.
- [11] 郭建新, 平其能, 黄罗生. 柔性环孢素纳米脂质体的制备及其变形性 [J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(3): 187.
- [12] Guo JX, Ping QN, Huang LS. Studies on preparation and deformability of flexible nano-liposome containing cyclosporine [J]. J Chin Pharm Univ, 1999, 30(3): 187-91.
- [11] 张磊, 平其能, 郭建新. 口服胰岛素纳米脂质体的制备及其降血糖作用 [J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(1): 25.
- [12] Zhang L, Ping QN, Guo JX. Preparation of oral insulin nano-liposomes and its hypoglycemic effect [J]. J Chin Pharm Univ, 2001, 32(1): 25-9.
- [12] Claus U, Peter S. Characterization of turbid colloidal suspensions using light scattering techniques combined with cross-correlation methods [J]. Coll Interface Sci, 1998, 207: 150-8.