

文章编号: (2008)06-0301-08

乙醇注入法制备水飞蓟宾脂质体及其质量评价

高飞¹, 王东凯¹, 张春叶¹, 崔文奇¹, 苏娟娟², 贾军²

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 沈阳沃森药物研究所, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 制备水飞蓟宾脂质体, 优化其处方和工艺, 并对其相关性能进行评价。方法 采用乙醇注入法制备水飞蓟宾脂质体; 采用 HPLC 法和超滤法测定脂质体的药物含量和包封率, 单因素考察处方及工艺对包封率的影响, 并采用正交设计法进行处方工艺优化。**结果** 确定最佳处方工艺为: 磷脂质量浓度为 $0.006 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 磷脂与胆固醇的质量比为 10 : 1, 药脂比为 1 : 60, 缓冲液 pH 值为 7.30, 类脂溶液的溶解顺序是将磷脂、胆固醇、水飞蓟宾一起溶解在乙醇中, 溶解温度设定为 35°C , 类脂溶液的溶解时间为 25 min。制得的水飞蓟宾脂质体包封率为 $(92.44\pm 0.98)\%$, 平均粒径为 $(151\pm 21) \text{ nm}$, Zeta 电位为 $(-34.6\pm 1.2) \text{ mV}$, 此制剂无溶血性。**结论** 乙醇注入法制备水飞蓟宾脂质体工艺简单可行, 所制备的水飞蓟宾脂质体包封率高、粒径较小、无溶血性。

关键词: 药剂学; 脂质体; 乙醇注入法; 水飞蓟宾; 包封率

中图分类号: R 94 **文献标志码:** A

水飞蓟宾(silybin)是目前公认的疗效确切的肝损伤修复药物^[1-2], 药理学研究表明, 水飞蓟宾能够稳定肝细胞膜, 保护肝细胞的酶系统, 清除肝细胞内的活性氧自由基, 从而提高肝脏的解毒能力, 避免肝细胞在长期接触毒物、服用肝毒性药物、吸烟、饮酒等情况下所受到的损伤^[3-4]。磷脂本身对治疗肝脏疾病也有一定作用, 将磷脂稳定肝细胞膜的作用与水飞蓟宾抗肝脏脂质过氧化活性结合起来产生协同作用, 有望增进药物疗效^[5]。从结构上看, 水飞蓟宾属二氢黄酮醇类化合物, 水飞蓟宾溶于丙酮、乙酸乙酯、甲醇、乙醇, 微溶于氯仿, 不溶于水, 因而其口服吸收差, 生物利用度较低, 从而影响了其临床疗效^[6]。本实验通过乙醇注入法将水飞蓟宾制成脂质体溶液, 以提高其生物利用度, 此法制备工艺简单, 制得的脂质体溶液可直接注射给药, 而且包封率高, 降低了药物的损失。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪(LC-10AT 泵和SPD-10A紫外检测器, Anastar工作站, 日本岛津公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂); 混合纤维微孔滤膜(上海市新亚净化器件厂); 超滤器(PALL 公司, 10 ML Stir Cell Start); 粒度分析仪(美国 Beckman Coulter 公司, LS230); Zeta 电位分析仪(美国 Beckman Coulter Delsa 公司, 440SX)。

水飞蓟宾原料药(西安天一生物技术有限公司, 含量的质量分数为99%, 批号: TYS070521); Lipoid S100(德国Lipoid公司, 批号: 790539-1); 胆固醇(天津市博迪化工有限公司, 批号: 20061031); 无水乙酸钠(天津市百世化工有限公司, 批号: 20070410); 乙酸(天津市博迪化工有限公司, 批号: 20060224)。

收稿日期: 2008-04-23

作者简介: 高飞(1981-), 女(汉族), 吉林四平人, 硕士研究生, E-mail gf00520@126.com; 王东凯(1962-), 男(汉族), 副教授, 硕士生导师, 主要从事药物新剂型研究, Tel. 024-23986310, E-mail wangdkxy@126.com。

其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 水飞蓟宾脂质体的制备

采用乙醇注入法制备水飞蓟宾脂质体。精密称取水飞蓟宾、磷脂、胆固醇以质量比为 1 : 20 : 2 溶于适量的乙醇中, 将所得类脂溶液缓慢匀速的注入到恒温 35 ℃ 的缓冲盐溶液(pH = 4.5)中, 恒温搅拌除去少量乙醇, 得到乳白色混悬液, 依次过 0.45 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2 水飞蓟宾脂质体的载药量及包封率的测定

色谱条件: 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-醋酸钠缓冲液(体积比 55 : 45, pH=4.5); 柱温为室温; 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长为 288 nm; 进样量为 20 μL。

色谱行为: 取空白脂质体破坏溶液(A)、水飞蓟宾对照品溶液(B)和水飞蓟宾脂质体破坏溶液(C)各 20 μL 进样分析, 结果见图 1。由图 1 可见, 在此色谱条件下, 辅料和试剂对药物测定无干扰, 水飞蓟宾双峰的保留时间分别约为 15.6、17.3 min。

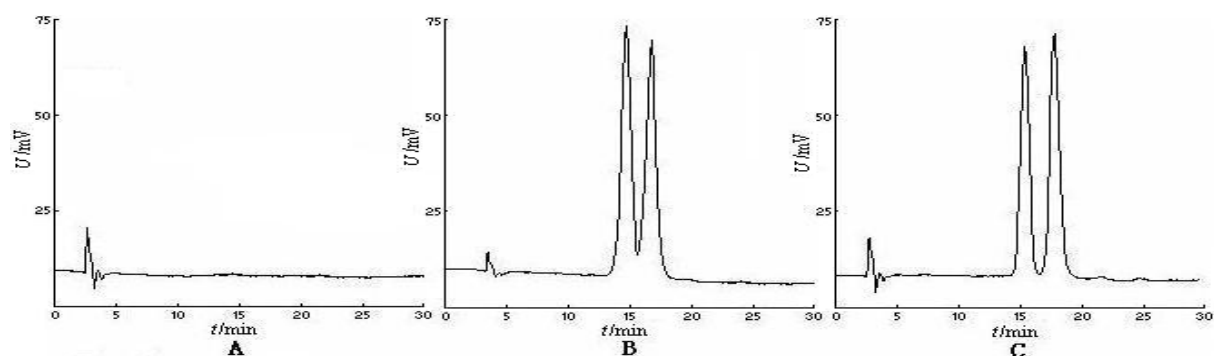


Fig.1 The chromatograms of the blank liposome(A), silybin solution(B) and silybin liposome(C)

标准曲线和方法学验证: 精密称取水飞蓟宾对照品 20 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 作为储备液。分别精密量取储备液适量置于容量瓶中, 用甲醇定容, 摇匀, 稀释得到质量浓度为 0.2、1.0、5.0、25.0、125.0 mg·L⁻¹ 的系列溶液, 分别取 20 μL 进样, 记录峰面积 A, 以峰面积对质量浓度 C(kg·L⁻¹) 进行线性回归, 得标准曲线方程: $A = 1.311 \times 10^5 C - 5.111 \times 10^4$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 水飞蓟宾在 0.2 ~ 125.0 mg·L⁻¹ 质量浓度与峰面积呈良好的线性关系。日内和日间精密度的 RSD 值分别为 0.5%、1.2%。加样回收率为 96.8% ~ 102.0%。

含量测定: 精密量取水飞蓟宾脂质体适量, 加甲醇, 振摇, 使脂质体溶解至溶液澄清, 定容。取 20 μL 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积 A, 由回归方程计算水飞蓟宾脂质体中药物含量。

包封率的测定: 取水飞蓟宾脂质体 5.0 mL 置于超滤杯中, 密封后用氮气加压, 收集续滤液。经 HPLC 法测定续滤液中的药物含量(W), 精密量取水飞蓟宾脂质体溶液 1 mL, 用一定量甲醇破坏后进样, 测定脂质体溶液中的药物含量为(W₀), 包封率的计算公式为: $EE(\%) = (W_0 - W) / W_0 \times 100\%$ 。

2.3 处方的单因素考察

根据预实验的结果, 以脂质体包封率为主要考察指标, 考察磷脂浓度、磷脂和胆固醇的质量比、

药脂比、缓冲液 pH 值对药物包封率的影响。

2.3.1 磷脂浓度

按“2.1”条的方法制备水飞蓟宾脂质体,固定其他因素不变,只改变磷脂(PC)的质量浓度,配制磷脂溶液的质量浓度分别为 2、4、6、8、10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$;按“2.2”条的方法测定脂质体的包封率,考察磷脂质量浓度对药物包封率的影响,结果见图 2。

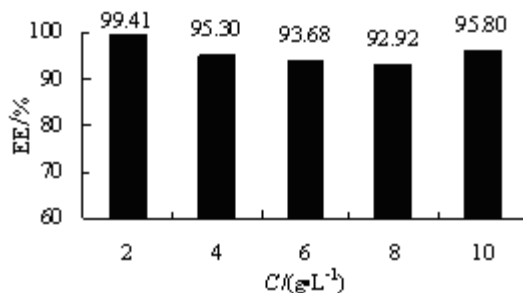


Fig. 2 Effect of PC concentration on the entrapment efficiency of silybin liposome ($n=3$)

2.3.2 磷脂和胆固醇的质量比

按“2.1”条的方法制备水飞蓟宾脂质体,固定其他因素不变,只改变磷脂与胆固醇的质量比,磷脂与胆固醇的质量比分别为 3:1、5:1、10:1、20:1 和不加胆固醇;按“2.2”条的方法测定脂质体的包封率,考察磷脂与胆固醇的质量比对药物包封率的影响,结果见图 3。

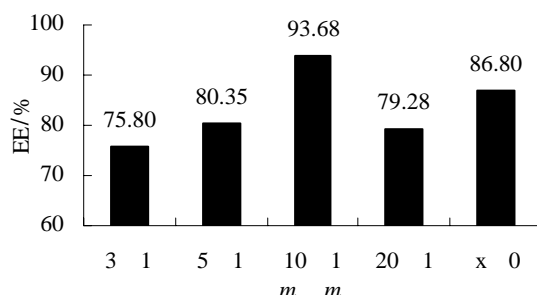


Fig. 3 Effect of PC/cholesterol weight ratio on the entrapment efficiency of silybin liposome ($n=3$)

2.3.3 药脂比

按“2.1”条的方法制备水飞蓟宾脂质体,固定其他因素不变,只改变水飞蓟宾原料药与磷脂的质量比,两者的质量之比分别为 1:60、1:30、1:20、1:15、1:12;按“2.2”条的方法测定脂质体的包封率,考察水飞蓟宾原料药与磷脂的质量比对药物包封率的影响,结果见图 4。

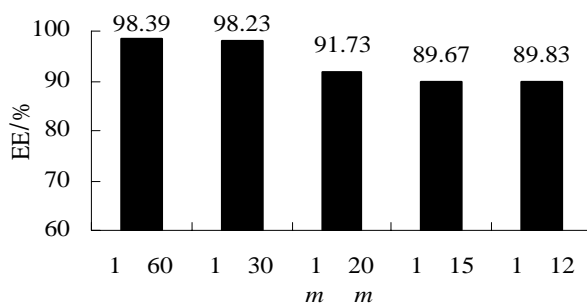


Fig.4 Effect of silybin/PC weight ratio on the entrapment efficiency of silybin liposome ($n=3$)

2.3.4 缓冲液 pH 值

按“2.1”条的方法制备水飞蓟宾脂质体，固定其他因素不变，只改变缓冲液的 pH 值，使缓冲液的 pH 值分别为 7.30、6.00、5.70、5.00、4.50；按“2.2”条的方法测定脂质体的包封率，考察缓冲液的 pH 对药物包封率的影响，结果见图 5。

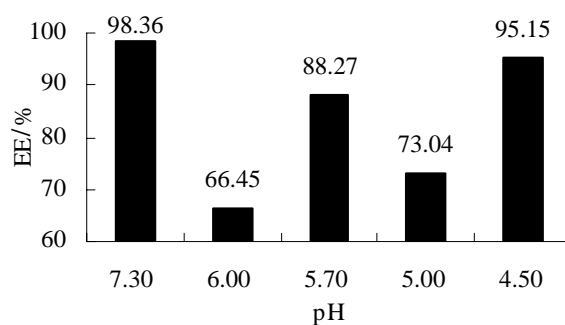


Fig.5 Effect of buffer pH on the entrapment efficiency of silybin liposome ($n=3$)

2.4 工艺的单因素考察

工艺方面的影响因素主要考察了类脂溶液的溶解顺序、溶解温度以及溶解时间。

2.4.1 溶解顺序

类脂溶液的溶解顺序分别设定为 4 种情况：磷脂、原料药、胆固醇同时溶解在无水乙醇中()，磷脂、原料药溶解在无水乙醇中后再溶解胆固醇()，磷脂、胆固醇溶解在无水乙醇中后溶解原料药()，磷脂溶解在无水乙醇中后再溶解原料药、胆固醇()，其他工艺条件固定，按“2.1”条的方法制备水飞蓟宾脂质体，按“2.2”条的方法测定脂质体的包封率，考察类脂溶液的溶解顺序对药物包封率的影响，结果见图 6。

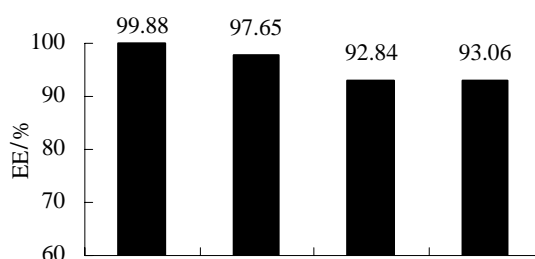


Fig.6 Effect of lipid solution dissolving order on the entrapment efficiency of silybin liposome($n=3$)

2.4.2 溶解温度

类脂溶液的溶解温度分别设定为 25、35、45、55 ，其他工艺条件固定，按“2.1”条的方法制备水飞蓟宾脂质体；按“2.2”条的方法测定脂质体的包封率，考察类脂溶液溶解温度对药物包封率的影响，结果见图 7。

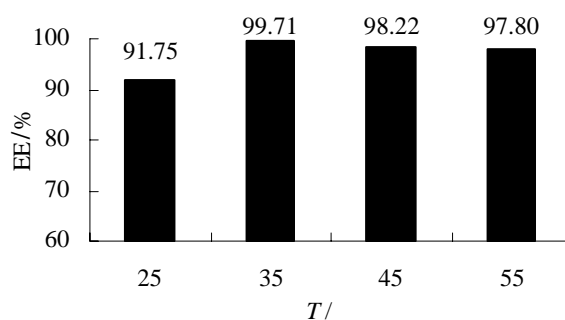


Fig. 7 Effect of lipid solution dissolving temperature on the entrapment efficiency of silybin liposome ($n=3$)

2.4.3 溶解时间

类脂溶液的溶解时间分别设定为 20、30、40、50 min，其他工艺条件固定，按“2.1”条的方法制备水飞蓟宾脂质体；按“2.2”条的方法测定脂质体的包封率，考察类脂溶液溶解时间对药物包封率的影响，结果见图 8。

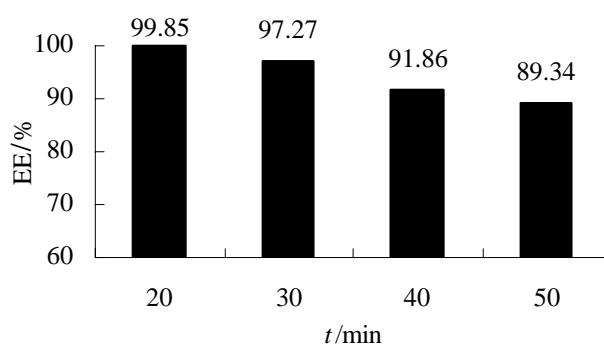


Fig. 8 Effect of lipid solution dissolving time on the entrapment efficiency of silybin liposome ($n=3$)

2.5 正交设计优化处方和工艺

在单因素考察的基础上，筛选出影响脂质体包封率的 4 个因素：磷脂浓度(A)、药脂比(B)、缓冲液 pH 值(C)、溶解时间(D)。以这 4 个因素作为主要考察因素，每个因素又选取 3 个水平(见表 1)，采用正交设计法 $L_9(3^4)$ 进行试验(见表 2)，以水飞蓟宾脂质体的包封率为评价指标，优化脂质体制备的处方和工艺。

Table 1 Orthogonal design with different factors and levels

Factor	Level 1	Level 2	Level 3
A/g	0.020 0	0.040 0	0.060 0
B/mg	1 60	1 30	1 20
C(pH)	7.30	5.70	4.50
D/min	15	25	35

Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

No.	A	B	C	D	EE/%
1	1	1	1	1	97.00
2	1	2	2	2	89.11
3	1	3	3	3	71.32
4	2	1	2	3	94.27
5	2	2	3	1	84.55
6	2	3	1	2	89.87
7	3	1	3	2	95.08
8	3	2	1	3	86.93
9	3	3	2	1	89.25
K_1	85.810	95.450	91.267	90.267	
K_2	89.563	86.863	90.877	91.353	
K_3	90.420	83.480	83.650	84.173	
R	4.610	11.970	7.617	7.180	

通过直观分析,由极差 R 可知,各因素对包封率的影响大小依次为: $B > C > D > A$ 。综合以上结果,可以确定乙醇注入法制备水飞蓟宾脂质体的最佳处方工艺组合为 $B_1C_1D_2A_3$,即磷脂的质量浓度为 $0.006 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,药脂比为 1 : 60,缓冲液 pH 值为 7.30,类脂溶液的溶解时间为 25 min。

2.6 最优处方制剂质量评价

包封率:以乙醇注入法制备 3 批水飞蓟宾脂质体,并采用超滤法-HPLC 法测定包封率,测得最佳处方中脂质体包封率的平均值为 $(92.44 \pm 0.98)\%$ 。

平均粒径及粒度分布:取水飞蓟宾脂质体溶液适量,分别置于装有蒸馏水的样品池中,分散均匀,采用 LS230 激光粒度仪测定平均粒径和粒度分布,最佳处方中水飞蓟宾脂质体的平均粒径为 $(151 \pm 21) \text{ nm}$,粒径分布范围见图 9 所示。

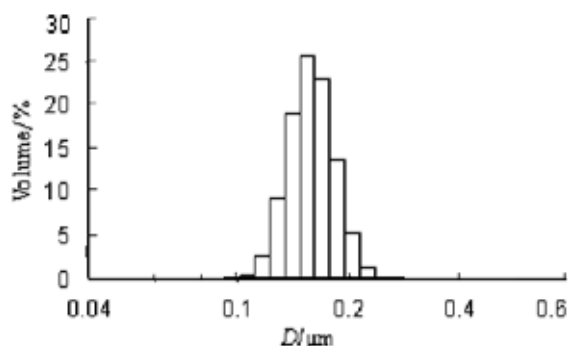


Fig. 9 Particle size distribution of silybin liposome

Zeta 电位:取水飞蓟宾脂质体溶液适量,置于样品池中,采用 Delsa 440SX Zeta 电位分析仪测定脂质体表面的 Zeta 电位,得到最佳处方工艺脂质体的 Zeta 电位平均值为 $(-34.6 \pm 1.2) \text{ mV}$ 。

溶血性考察：取家兔血约 5 mL，放入玻璃珠振摇 10 min，除去纤维蛋白原，向脱纤维蛋白原的血液中加入 10 倍量的生理盐水，摇匀，1 300 r·min⁻¹ 离心 15 min，除去上清液，沉淀用生理盐水反复洗涤 3 次，至上清液不显红色，配成体积分数为 2% 的混悬液。配制一定浓度的水飞蓟宾脂质体溶液，按要求依次加入 2.5 mL 体积分数为 2% 的红细胞混悬液以及不同体积的生理盐水/蒸馏水、水飞蓟宾脂质体溶液，置于 37 ℃ 恒温水浴中，分别于 0.5、1.0、2.0、3.0 h 观察血样变化情况。结果显示，样品在 3.0 h 内均未发生溶血和凝聚现象，表明水飞蓟宾脂质体在该浓度范围内无溶血性。

3 结论

a. 建立了水飞蓟宾脂质体中药物含量和包封率的测定方法，水飞蓟宾是以一对非对映异构体的形式存在^[7]，但是有关两者的药理作用差别未见报道^[8]，在色谱分析中水飞蓟宾表现出双峰，含量测定以水飞蓟宾 A 和水飞蓟宾 B 的峰面积之和定量，本文采取高效液相色谱法进行检测，得到了良好的峰形和分离度。

b. 分离脂质体中游离药物的方法有多种，本文作者尝试采用透析法，但该方法耗时较长，处方和工艺优化的工作量较大，因此采用超滤法分离游离药物，可减少药物渗漏，所需脂质体的体积较小，分离时间短，操作简单，重现性好。

c. 制备水飞蓟宾的方法有高压乳匀法、超声法、微乳法等^[9-10]。本文采用乙醇注入法制备水飞蓟宾脂质体，此法避免加入毒性大的有机溶剂，并且不用高压均质和超声等耗能手段，避免了药物污染和磷脂的氧化，处方中无水乙醇的加入量要控制在 5% 以内，并且在制剂成型后，加热搅拌一定时间使其挥发除去，易于实现大量生产。水飞蓟宾几乎不溶于水，生物利用度很低，当口服制剂用量很大时，将其制成脂质体，目的在于提高其生物利用度，增加疗效，同时，提高其肝靶向性，减少给药量。

d. 在单因素考察和正交设计优化处方的过程中，所制得的水飞蓟宾脂质体依次通过 0.45 μm 和 0.22 μm 孔径的混合纤维微孔滤膜，既可以去除游离在外水相中的水飞蓟宾晶体，又可以消除粒径的影响。由单因素考察结果可以确定：磷脂与胆固醇的质量比为 10 : 1，类脂溶液的溶解顺序为处方量的磷脂、胆固醇、水飞蓟宾一起溶解在无水乙醇中，溶解温度设定为 35 ℃。磷脂浓度、药脂比、缓冲液 pH 值、类脂溶液溶解时间对水飞蓟宾包封率的影响比较复杂，通过对这 4 个因素进行正交试验，确定了最佳处方工艺组合为 B₁C₁D₂A₃，即磷脂浓度为 0.006 mg·mL⁻¹，药脂比为 1 : 60，缓冲液 pH 值=7.30，类脂溶液的溶解时间为 25 min。

e. 通过水飞蓟宾脂质体的相关性质评价，可以看出通过最佳处方工艺制备的脂质体其药物包封率高、粒径小、分布均匀、表面荷负电、无溶血性。

参考文献：

- [1] FLBRA K, HAHN M, ROSEN H, et al. Milk thistle(*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease[J]. Am J Gastroenterol, 1998, 93(2): 139-143.
- [2] LUPER S. A review of plants used in the treatment of liver disease: park 1[J]. Altern Med Rev, 1998, 3(6): 410-411.

- [3] WELLINGTON K, JARVIC B. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders[J]. *Biol Drugs*, 2001, 15(7): 465-489.
- [4] KIM Y C, KIM E J, LEE E D, et al. Comparative bioavailability of silibinin in healthy male volunteers[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2003, 41(12): 593-596.
- [5] 肖衍宇, 宋斌梅, 陈志鹏, 等. 水飞蓟宾磷脂复合物的制备与大鼠生物利用度的研究[J]. *药学学报*, 2005, 40(7): 611-617.
- [6] 肖莉, 靳淑敏, 张丽霞, 等. 水飞蓟素制剂及其应用进展[J]. *中国药物与临床*, 2005, 5(3): 205-208.
- [7] 徐为人, 刘成卜, 王建武, 等. 水飞蓟宾构象理论[J]. *中草药*, 2004, 35(4): 375-378.
- [8] KREN V, KUBISCH J, SEDMERA P, et al. Glycosylation of silybin[J]. *J Chem Soc: Perkin Trans*, 197(1):2467.
- [9] MULLER R H, MADWE K, GOHLA S. Solid lipid nanoparticles(SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50(1):161-177.
- [10] MEHNERT W, MADER K. Solid lipid nanoparticles: production characterization and applications[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(23):448-454.

The preparation of silybin liposome by ethanol injection method and its quality evaluation

GAO Fei¹, WANG Dong-kai¹, ZHANG Chun-ye¹, CUI Wen-qi¹, SU Juan-juan², JIA Jun²
(1. *School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China*; 2. *Shenyang Watson Pharmaceutical Institute, Shenyang 110016, China*)

Abstract: Objective To prepare silybin liposome, optimize the formulation and preparation technology, and evaluate its properties. **Method** Silybin liposome was prepared by ethanol injection method. HPLC and ultrafiltration methods were used to determine silybin entrapment efficiency in the liposome. Factors influencing the encapsulation efficiency of silybin in the liposome was investigated, and formulation and process parameters were optimized with orthogonal design. **Result** The optimized condition was as follows: the total phospholipid concentration $0.006 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the ratio of phospholipid to cholesterol 10:1(*m:m*), the ratio of drug to total lipid 1:60 (*m:m*), pH=7.30, the lipid solution was prepared by dissolving phospholipid, cholesterol and drug together in ethanol of 35 for 25 min. Encapsulation efficiency of silybin in liposome reached $(92.44\pm 0.98)\%$ after optimization, with the mean size of (151 ± 21) nm and the Zeta potential of (-34.6 ± 1.2) mV. The prepared liposome caused no hemolysis. **Conclusion** It is feasible to prepare silybin liposome by ethanol injection method. The obtained silybin liposome has high encapsulation efficiency, low particle size without hemolysis.

Key words: pharmaceuticals; liposome; ethanol injection method; silybin; entrapment efficiency

(责任编辑 秦 昕)