

芍药总苷的理化性质及其脂质体包封率的测定方法

余 昕¹, 陈斯玮¹, 欧丽兰¹, 李东芬², 张 丹^{1*}

(1. 西南医科大学, 四川 泸州 646000; 2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137)

摘要: **目的** 研究芍药总苷的理化性质及其脂质体包封率的测定方法。**方法** HPLC法测定芍药总苷的含有量, 饱和法测定其溶解度, 摇瓶法测定其油水分配系数, 考察其磷酸盐缓冲液的稳定性和超声时间对其含有量的影响, 筛选其脂质体包封率的测定方法。**结果** 芍药总苷在 pH 值为 5.0 的磷酸盐缓冲液中溶解度最好 (50.9 mg/mL), 油水分分配系数 (logP) 在 -0.98 ~ -0.47 之间, 在 24 h 内稳定性较好, 超声 5 min 内对其含有量几乎无影响, 选择透析法测定脂质体包封率 (61.2%)。**结论** 芍药总苷可制成脂质体, 而且透析法更适合测定其包封率。

关键词: 芍药总苷; 理化性质; 脂质体; 包封率

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)06-1260-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.012

Determination of physicochemical properties of total glucosides from *Paeonia lactiflora* and methods for evaluating liposome entrapment efficiency

YU Xin¹, CHEN Si-wei¹, OU Li-lan¹, LI Dong-fen², ZHANG Dan^{1*}

(1. Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

KEY WORDS: total glucosides from *Paeonia lactiflora*; physicochemical properties; liposome; entrapment efficiency

芍药总苷存在于芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 根的水或乙醇提取物, 是含有芍药苷、羟基芍药苷、芍药花苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷等具有生理活性成分的混合物, 于 1998 年作为类风湿性关节炎缓解药物进入市场^[1]。现代药理学研究报道, 芍药总苷具有抗炎、镇痛、抗氧化、抗肿瘤、抗抑郁、抗肝纤维化、抗自身免疫疾病、抗心脑血管疾病、抗神经退行性疾病等药理作用, 临床上用于多种疾病的治疗^[2-12], 但其中最主要的生物活性成分芍药苷 (C₂₃H₂₈O₁₁, 结构见图 1) 是一种性质不稳定, 结构容易发生变化的单萜类糖苷化合物, 因此要提高该成分的临床疗效可着力于增加其化学稳定性。脂质体是一种将药物包封于类脂质双分子层而形成的微型泡囊体, 由于其结构与生物膜类似, 故可以包封水溶性和脂溶性药物, 具备提高药物稳定性的特点^[13]。

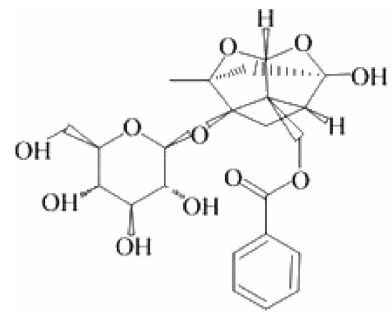


图 1 芍药苷结构

Fig. 1 Structure of paeoniflorin

为了考察芍药总苷脂质体制备的可行性, 以及保证其安全、有效、稳定, 必须首先对其理化性质进行研究, 为处方设计、制备工艺、质量控制等后续工作奠定基础。本实验采用 HPLC 法测定样品含有量, 饱和法测定溶解度, 摇瓶法测定

收稿日期: 2015-08-24

基金项目: 泸州市科技局项目 (2012-S-36); 泸州医学院大学生科研项目 (201387)

作者简介: 余 昕 (1983—), 女, 硕士, 实验师, 从事中药制剂研究。Tel: (0830) 3162291, E-mail: yuxin8303@163.com

* 通信作者: 张 丹 (1975—), 女, 博士, 副教授, 从事中药新制剂、新工艺及炮制研究。Tel: (0830) 3162291, E-mail: ppkfoot7@163.com

油水分配系数,考察样品溶液的稳定性和超声时间对样品中芍药苷含有量的影响。由于包封率是对脂质体制备工艺和质量评价的一项重要指标,加上脂质体比普通制剂拥有高效、低毒优势,并可提高药物治疗指数,降低药物不良反应,减小药物用药剂量^[14-16],故在制备一个脂质体之前,就需要选择合适的包封率测定方法,有利于脂质体对药物的包封能力进行评估。据此,本实验筛选了芍药总苷脂质体包封率的测定方法,为今后的制备研究奠定了一定基础。

1 仪器和材料

1.1 仪器 安捷伦 1200 HPLC 色谱仪,包括 DAD 检测器;BUG25-12 超声清洗器(西化仪北京科技有限公司);BP211D 十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);R-210 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司);LD4-2A 离心机(北京医用离心机厂);透析袋(8 000~14 000 kDa,美国联合碳化物公司)。

1.2 材料 芍药总苷提取物(批号 20120518,宁波立华制药有限公司,芍药苷含有量>90%);芍药苷对照品(批号 110736-20100919,中国食品药品检定研究院,纯度 $\geq 98\%$);大豆卵磷脂(药用,西安悦来医药科技有限公司);胆固醇(上海思域化工科技有限公司)。乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司);其他试剂均为分析纯;水为重蒸馏水(自制)。

2 方法

2.1 HPLC 条件^[17] Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相乙腈-0.1% 磷酸水溶液(14:86);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 230 nm;进样量 10 μL ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 芍药总苷在不同 pH 溶液中溶解度的测定 按照《中国药典》2010 年版二部附录 XV D 项下方法,配制不同 pH 值(2.0、2.5、4.0、5.0、5.8、6.8、7.8)的磷酸盐缓冲溶液。取白芍总苷提取物适量,分别加入盛有 3 mL 蒸馏水和磷酸盐缓冲溶液的离心管中,恒温振荡 30 min,静置 24 h,取上清液,0.22 μm 微孔滤膜滤过,在“2.1”项条件下测定芍药苷在各种溶剂中的含有量,从而得出芍药总苷的溶解度。

2.3 芍药总苷油水分配系数的测定 取一定量正辛醇置于具塞三角瓶中,加入等量水,37 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温搅拌 24 h 至正辛醇被水饱和,分液漏斗转移,静置 2 h,分离两相,储存备用。分别精密量取含芍药总苷的水饱和正辛醇溶液 2 mL,置于具塞离

心管中,分别加入等量蒸馏水和“2.2”项下磷酸盐缓冲液,恒温震荡 30 min,静置 24 h,小心吸取下层水相,相应介质稀释后,在“2.1”项条件下测定水相中芍药苷的含有量,计算白芍总苷的油水分配系数 $\text{Log}P$,公式为 $\text{Log}P = \text{Log} (C_o/C_s - C_o)$,其中 C_o 为芍药总苷在油相中的含有量, C_s 为芍药总苷在油相中的表观溶解度。

2.4 芍药总苷磷酸盐缓冲溶液稳定性的考察 磷酸盐缓冲溶液(pH 5.0)配制芍药总苷提取物供试液,在“2.1”项条件下测定 0、1、2、4、8、12、24 h 时其中芍药苷的含有量。

2.5 超声时间对芍药总苷中芍药苷含有量的影响

由于进一步实验要超声水合处理,故本实验考察了 1、3、5 min 3 个超声时间,并以“2.1”项条件下样品中芍药苷的含有量为指标。

2.6 芍药总苷脂质体包封率测定方法的筛选

2.6.1 脂质体包封率计算方法的建立 取芍药总苷脂质体分离后的游离药物,在“2.1”项条件下进行测定,得到游离药物的含有量,计算包封率,公式为包封率 = $(W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$ 。其中, $W_{\text{游}}$ 表示芍药总苷脂质体混悬液中游离的芍药苷含有量, $W_{\text{总}}$ 表示芍药总苷脂质体混悬液中芍药总苷含有量。

2.6.2 专属性试验 分别取空白脂质体破乳后、芍药苷对照品和含药脂质体破乳后溶液进样,在“2.1”项条件下考察处方辅料对指标成分有无干扰作用,记录各色谱图。

2.6.3 破乳剂种类及用量的考察 制备脂质体时,即使知晓配制药物溶液的浓度,因为人员操作、器材黏附等不可避免的因素,使得实际和理论药物量之间产生较大的误差,故需要对脂质体进行破乳,从而测定其中的药物含有量。本实验分别用不同有机溶剂对芍药总苷脂质体(1 mL)进行破乳,考察不同破乳剂的破乳情况及其用量。

2.6.4 包封率测定方法筛选 取 3 批脂质体,对离心法、透析法和葡聚糖凝胶柱法进行考察。

2.6.4.1 离心法 分别以 4 000、6 000、12 000 r/min 转速离心,观察记录脂质体和游离药物的分离效果。

2.6.4.2 透析法 取桶状透析袋,装入一定量芍药总苷脂质体,扎紧两端,精密量取脂质体水相溶液 50 mL 作为透析介质,透析 72 h,分别于 1、2、4、6、8、10、12、24、48、72 h 测定药物释放情况,得到芍药总苷脂质体游离药物完全释放的时

间,在“2.1”项条件下测得样品中游离药物的含有量。

2.6.4.3 葡聚糖凝胶柱法 将用0.9% NaCl溶液充分溶胀后的G-50葡聚糖凝胶装入底部带砂芯的玻璃柱中,0.9% NaCl溶液冲洗。取3批芍药总苷脂质体各1 mL,0.9% NaCl溶液稀释5倍后,0.45 μm微孔滤膜滤过,取0.5 mL续滤液上柱。配制0.9% NaCl溶液,0.45 μm水相滤膜滤过,凝胶柱洗脱。以每管3 mL的体积收集洗脱液,以0.9% NaCl溶液为空白对照,230 nm为参比波长测定吸光度,绘制洗脱体积与吸光度相关联的洗脱曲线,观察游离药物和脂质体的流出体积。

3 结果

3.1 芍药总苷在不同pH溶液中溶解度的测定 由图2可知,pH对芍药总苷的溶解度有非常大的影响。文献报道,芍药苷的稳定性在不同pH中变化较大,在3~5范围内较稳定^[18]。由此推测,可能在过酸或过碱溶液中芍药苷分子中的酯基发生水解,成为离子状态,因此溶解度较大;在3~5范围内,芍药苷呈分子状态,由于其分子结构中有多个羟基,有较好的水溶性,所以溶解度也较大。

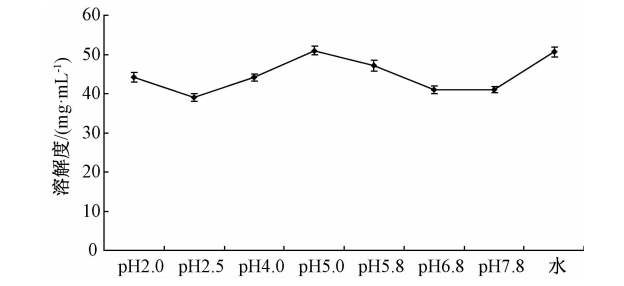


图2 不同pH值溶液中芍药总苷的溶解度
Fig.2 Solubilities of total glucosides from *Paeonia lactiflora* in solutions with different pH values

3.2 芍药总苷油水分分配系数的测定 由图3可知,芍药总苷在水中的油水分分配系数最大,其变化趋势与在不同溶剂中的溶解度一样。但由于芍药苷呈弱酸性,在水中的稳定性比在酸性溶液(pH 3~5)中差^[18],同时考虑到芍药总苷在不同pH溶液中的溶解度,故制备芍药总苷脂质体时,溶解药物的水相应选择pH 5.0的磷酸盐缓冲溶液为好。

3.3 芍药总苷磷酸盐缓冲溶液稳定性的考察 由表1可知,芍药苷在24 h内的RSD值为0.72%,表明芍药总苷在24 h稳定性较好。

3.4 超声时间对芍药总苷中芍药苷含有量的影响 由表2可知,超声时间在5 min内时,对芍药

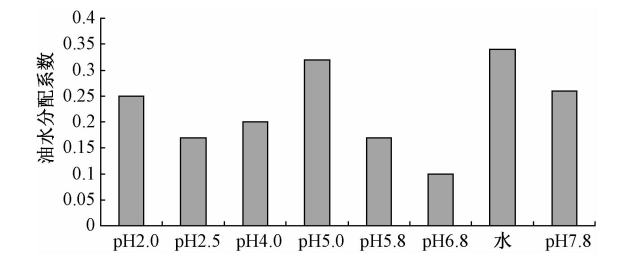


图3 芍药总苷油水分分配系数
Fig.3 Oil-water partition coefficients of total glucosides from *Paeonia lactiflora*

表1 稳定性试验结果 Tab.1 Results of stability tests			
进样时间点/h	芍药苷/mg	平均值/mg	RSD/%
0	4.670 9	4.640 7	0.72
1	4.670 6		
2	4.607 5		
4	4.628 7		
8	4.683 9		
12	4.609 8		
24	4.613 2		

表2 超声时间对芍药苷含有量的影响 Tab.2 Effect of ultrasonic time on the content of paeoniflorin			
超声时间/min	芍药苷/μg	平均值/μg	RSD/%
1	707.743 5	709.153 8	0.22
3	710.855 2		
5	708.862 7		

总苷中芍药苷的含有量几乎没有影响。

3.5 芍药总苷脂质体包封率的测定方法筛选
3.5.1 专属性试验 由图4可知,处方辅料对指标成分无干扰作用。

3.5.2 破乳剂种类及用量的考察 (表3)综合考虑不同破乳剂的用量和最终破乳效果,芍药总苷脂质体应先用磷酸盐缓冲溶液稀释,再用甲醇破乳,0.22 μm微孔滤膜过滤后,在“2.1”项条件下进行含有量测定。

表3 各破乳剂的破乳效果及用量 Tab.3 Demulsification effects and dosages of various demulsifiers			
序号	破乳剂	用量/mL	破乳效果
1	甲醇	64	澄清
2	氯仿	64	乳状液
3	无水乙醇	78	比1略澄清,但细小微粒较多
4	先用磷酸盐缓冲溶液稀释,再用甲醇破乳	25	澄清

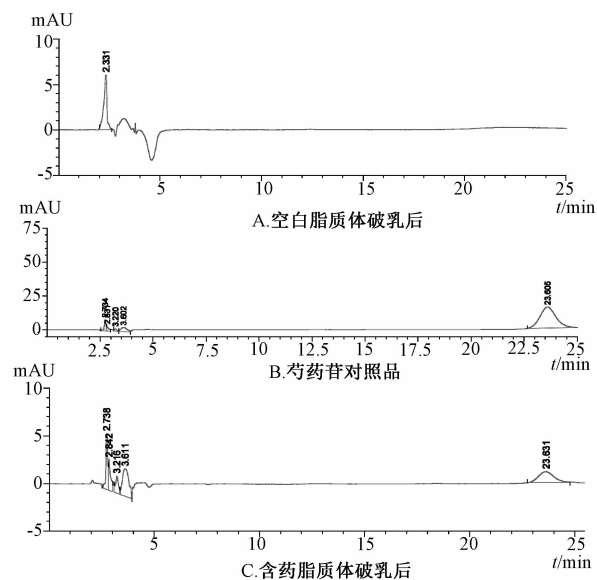


图4 HPLC 色谱图
Fig. 4 HPLC chromatograms

3.5.3 包封率测定方法筛选

3.5.3.1 离心法 由表4可知，以4 000 r/min和6 000 r/min 转速离心时，脂质体与游离药物均不能完全分离；12 000 r/min 时，两者虽然能完全分离，但是脂质体会被破坏，导致游离药物的含有量比实际值高，故舍去离心法。

表4 不同转速对脂质体分离的影响

Tab. 4 Effects of different rotational speeds on the separation of liposome	
转速/(r·min ⁻¹)	脂质体和游离药物分离效果
4 000	脂质体不能与游离药物完全分离,上层水相中依然有脂质体残留
6 000	脂质体不能与游离药物完全分离,上层水相中依然有脂质体残留
12 000	脂质体与游离药物完全分离,但脂质体被破坏

3.5.3.2 透析法 由图5可知，芍药总苷脂质体中的游离药物在12 h内释放较快，24~72 h之间较慢，48 h时达85%左右，可能是由于加入的透析介质较少，并且在透析过程中没有更换新的释放介质所致。因此，本实验增加1倍量释放介质来继续考察其释放情况，发现在24 h时释放量高于90%，因此选择透析24 h，按“2.6.1”项下公式计算芍药总苷脂质体的包封率，测得3批样品的平均包封率为61.2%，RSD为1.43%。

3.5.3.3 葡聚糖凝胶柱法 由图6可知，0~20 mL为脂质体流出的体积，40~65 mL为游离药物流出的体积，因此收集该段洗脱液，混匀，紫外分光光度计测定吸光度，计算游离芍药苷的含有量，

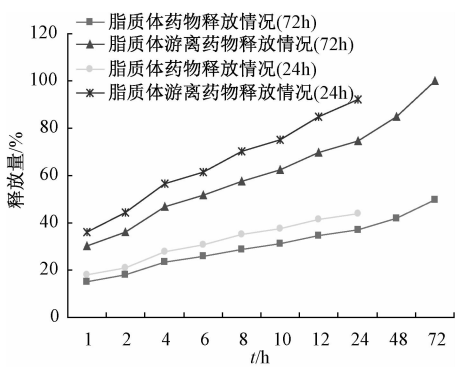


图5 透析法测定脂质体中药物的释放情况
Fig. 5 Determination of drug release in liposome by dialysis method

按“2.6.1”项下公式计算芍药总苷脂质体的包封率，测得3批样品的平均包封率为62.3%，RSD为2.24%。

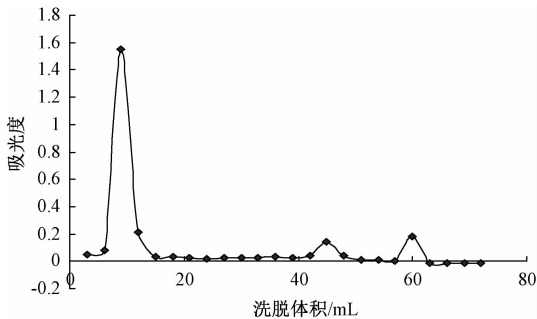


图6 葡聚糖凝胶 G-50 洗脱曲线
Fig. 6 Elution curve of Sephadex G-50

综上所述，离心法不能用于测定芍药总苷脂质体的包封率，而透析法和葡聚糖凝胶法测得的包封率接近，但前者操作简便，结果准确，重复性好，因此选择透析法作为测定方法。

4 讨论

药物进入生物体后，所产生的一切生物利用情况都与其脂溶性和水溶性（即油水分配系数）密切相关。油水分配系数反映了物质在油水两相中的分配情况，是指药物在油相和水相中达到分配平衡时，在非水相（油相）与水相中浓度的比值，故测定芍药总苷的油水分配系数对预测其在体内分配系数以及细胞膜渗透性都具有重要意义。目前，正辛醇-水是一个被广泛使用的良好模拟系统，而在制备脂质体时，最常用的水合分散介质为磷酸盐缓冲溶液。因此，本实验选择用磷酸盐缓冲溶液代替水作为水相，期望能够更好地反映脂质体制备过程中药物在油水两相的分配情况。

文献报道，药物的最佳油水分配系数为 $-1 < \log P < 2$ ^[19]，而本实验中芍药总苷的 $\log P$ 在 $-0.98 \sim -0.47$ 之间，落在范围之内，故可以将其制备成脂质体制剂。

关于芍药总苷脂质体包封率的测定方法，本实验不仅比较了离心法、透析法、葡聚糖凝胶法，还考察了微孔滤膜过滤法。葡聚糖凝胶法不仅所用凝胶柱的径高比、脂质体上样量、洗脱时体积流量等因素会对脂质体与游离药物的分离效果产生影响，而且其分离操作繁琐，耗费时间长，对样品有较大的稀释性，会造成脂质体内药物的渗漏，对于粒径小的脂质体而言，脂质体与游离药物不容易分离；微孔滤膜过滤法所用微孔滤膜会破坏脂质体，过滤时粒径小的脂质体也能穿过微孔滤膜，故测得脂质体的包封率往往小于实际包封率；结合离心法和透析法的实验结果，本实验选择了操作简单，并可以处理较大数量样品的透析法作为芍药总苷脂质体包封率的测定方法。

本实验探讨了芍药总苷的理化性质和其脂质体包封率的测定方法，为课题组后期研究^[17]中制备工艺筛选、脂质体结构类型以及处方优化等方面提供了实验基础。

参考文献：

[1] 金英善, 陈曼丽, 陶 俊. 芍药化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27 (4): 745-750.

[2] Zhou Z, Lin J, Huo R, *et al.* Total glucosides of paeony attenuated functional maturation of dendritic cells via blocking TLR4/5 signaling *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(3): 275-282.

[3] Zhang X J, Li Z, Leung W M, *et al.* The analgesic effect of paeoniflorin on neonatal maternal separation-induced visceral hyperalgesia in rats[J]. *J Pain*, 2008, 9(6): 497-505.

[4] Mao Q Q, Xian Y F, Ip S P, *et al.* Protective effects of peony glycosides against corticosterone-induced cell death in PC12 cells through antioxidant action[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(3): 1121-1125.

[5] Long J, Gao M, Kong Y, *et al.* Cardioprotective effect of total paeony glycosides against isoprenaline-induced myocardial ischemia in rats [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19 (8-9): 672-676.

[6] Fang S, Zhu W, Zhang Y, *et al.* Paeoniflorin modulates multidrug resistance of a human gastric cancer cell line via the inhibition of NF- κ B activation[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5 (2): 351-356.

[7] Mao Q Q, Huang Z, Ip S P, *et al.* Peony glycosides reverse the effects of corticosterone on behavior and brain BDNF expression in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2012, 227(1): 305-309.

[8] 胡宗涛, 高世乐, 秦 峰, 等. 芍药苷对大鼠放射性肝纤维化的保护作用 and 机制研究[J]. 解放军药学报, 2012, 28(4): 283-288.

[9] 赵 明, 梁功平, 罗双艳, 等. 白芍总苷对系统性红斑狼疮 CD4 + T 细胞 ITGAL 基因表达和启动子甲基化修饰的影响[J]. 中南大学学报: 医学版, 2012, 37(5): 463-468.

[10] 汪云开, 黄兆铨. 芍药苷对血管紧张素 II 诱导的大鼠动脉平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国中医急症, 2012, 21 (3): 399-400, 516.

[11] Lin H R. Paeoniflorin acts as a liver X receptor agonist[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(1): 35-45.

[12] Cao B Y, Yang Y P, Luo W F, *et al.* Paeoniflorin, a potent natural compound, protects PC12 cells from MPP⁺ and acidic damage via autophagic pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(1): 122-129.

[13] 张冬青, 程 怡. 脂质体的研究概况[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(2): 125-128.

[14] Zhang X M, Patel B A, de Graaf A R, *et al.* Determination of liposomal encapsulation efficiency using proton NMR spectroscopy[J]. *Chem Phys Lipids*, 2004, 127(1): 113-120.

[15] 郑 宁, 张立德. 脂质体质量控制方法的研究概况[J]. 中国新药杂志, 2004, 13 (12): 1282-1286.

[16] 杨 彤. 新型脂质体的研究进展[J]. 医药导报, 2009, 28 (3): 336-338.

[17] 张 丹, 廖 芳, 周 洁, 等. Box-Behnken Design-响应面优化法优化芍药总苷脂质体的制备工艺及体外释放研究[J]. 中草药, 2015, 46 (3): 359-364

[18] 罗 娟, 呼延玲, 刘晓玲. 溶液 pH 对芍药苷稳定性的影响[J]. 中国药业, 2011, 20 (2): 26-27.

[19] 张 蕾, 李婷婷, 陈孝健. 氧化槐果碱表观油水分配系数测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19 (3): 274-276.