

俄色叶-A 毛囊靶向脂质体制备工艺的优化

杨邦祝, 毛羽*, 沈睿娟, 李艳, 林灵敏, 杨学军, 朱刚
(西南民族大学, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 优化俄色叶-A 毛囊靶向脂质体的制备工艺。方法 薄膜-超声法制备脂质体。以包封率为指标, 单因素试验和 Box-Behnken 效应面法优化制备工艺。**结果** 最佳参数为卵磷脂与胆固醇比例 5 : 1, 卵磷脂与药物比例 10 : 1, 缓冲液用量 15 mL。包封率的预测值和实测值分别为 91.8% 和 92.3%。脂质体粒子呈球形, 粒径为 (162.1 ± 6.3) nm, Zeta 电位为 (-32.8 ± 7.3) mV。**结论** 该制备工艺简单可行, 包封率高。

关键词: 俄色叶-A; 毛囊靶向脂质体; 薄膜-超声法; 包封率; 单因素试验; Box-Behnken 效应面法

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)05-1018-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.05.011

Optimizing the preparation process of eseye-A hair follicle-targeted liposomes

YANG Bang-zhu, MAO Yu*, SHEN Rui-juan, LI Yan, LIN Ling-min, YANG Xue-jun, ZHU Gang

(Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT: AIM To optimize the preparation process of eseye-A hair follicle-targeted liposomes. **METHODS** The liposomes were prepared by film-ultrasonic method. With encapsulation efficiency as an index, the preparation process was optimized by single factor experiment and Box-Behnken response surface method. **RESULTS** The optimized parameters were 5 : 1 for ratio of lecithin to cholesterol, 10 : 1 for ratio of lecithin to drug and 15 mL for the amount of buffer solution. The predictive value and measured value were 91.8% and 92.3%, respectively. The spherical liposome particle had particle size of (162.1 ± 6.3) nm and Zeta potential of (-32.8 ± 7.3) mV. **CONCLUSION** This simple and feasible preparation process ensures a high encapsulation efficiency.

KEY WORDS: eseye-A; hair follicle-targeted liposomes; film-ultrasonic method; encapsulation efficiency; single factor experiment; Box-Behnken response surface method

藏药俄色叶为蔷薇科苹果属陇东海棠系植物变叶海棠 *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes 或花叶海棠 *Malus transitoria* (Batal.) Schneid 的干燥叶, 为高原药食两用植物, 生长在海拔 3 000 ~ 3 800 m 之间, 本课题组在 2005 年研究发现, 俄色叶总黄酮具有降血糖、降血脂等作用, 并系统进行了以俄色叶为主要原料的食品、保健食品、药品等相关研究开发工作^[1-2]。俄色叶-A 是俄色叶黄酮中二氢查

耳酮类化合物的衍生物, 具有抗氧化和抗炎作用, 外用治疗痤疮有着良好的效果。由于痤疮的主要致病菌大多存在于皮肤毛囊中, 故本实验拟将该成分制备成外用的毛囊靶向制剂, 以提高药物的生物利用度。

由于脂质体与生物膜具有相似的结构, 组成脂质体的类脂与皮肤角质层有着高度的相似性, 故能增加药物在局部组织的积累, 并延长药物的作用时

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 西南民族大学 2015 级研究生创新型科研项目 (CX2015SZ060)

作者简介: 杨邦祝 (1990—), 女, 硕士, 研究方向为民族药新药研发。Tel: 15184386958, E-mail: 707504457@qq.com

*通信作者: 毛羽 (1962—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为民族药新药研发。Tel: 15680081119, E-mail: yu-mao192000@126.com

间^[3-5]。研究表明,脂质体有一定的毛囊靶向作用^[6-8],故将药物制成脂质体后可直接靶向于毛囊,延长在毛囊的作用时间,减少全身吸收,提高生物利用度,从而降低不良反应^[9-10]。另外,俄色叶-A为淡黄色物质,直接应用于脸部或身体其他部位皮肤会影响美观,且会使衣物染色,故考虑将俄色叶-A包封于脂质体中,制成外用的脂质体制剂,在提高生物利用度的同时克服了外用的不方便性。本实验考察了俄色叶-A脂质体的制备方法,采取单因素结合响应面优化法研究其制备过程中各影响因素对脂质体包封率的影响,优化制备工艺参数,为进一步研究该成分用机理及药效提供一定的实验依据。

1 仪器与材料

MS-2000 激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司); JEM-1200EX 透射电镜(日本电子株式会社); AL104 电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); SENCO-R 系列旋转蒸发仪(上海申申科技有限公司); SHB-3 循环水多用真空泵(郑州杜甫仪器厂); DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器(上海广英仪器有限公司); KQ-250B 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); Waters2695 高效液相色谱仪,包括 Waters2996 DAD 检测器、Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司)。葡聚糖凝胶 G-50(100~200目,台州市路桥四甲生化塑料厂); PVPK17 聚乙烯吡咯烷酮(上海泰坦科技股份有限公司)。胆固醇、大豆卵磷脂、维生素 E、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、三氯甲烷、甲醇均为色谱纯(成都市科龙化工试剂厂);其他试剂均为分析纯。俄色叶-A(自制)。

2 方法及结果

2.1 俄色叶-A 包封率的测定

2.1.1 供试品溶液的制备

2.1.1.1 标准品溶液的制备 精密称取对照品 0.010 5 g, 甲醇定容至 10 mL, 移液管精密量取 2 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 得到 0.21 mg/mL 的对照品贮备液。

2.1.1.2 空白溶液的制备 薄膜-超声法制备不含俄色叶-A 的空白脂质体, 精密吸取 0.1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 超声破膜, 摇匀, 即得。

2.1.1.3 脂质体溶液的制备 精密吸取样品 0.5 mL, 加于凝胶柱内径与葡聚糖填充高度比为 1.2:5 的 Sephadex G-50 凝胶柱(100~200 μm)

顶部, 磷酸盐缓冲液(pH=7.0)洗脱, 体积流量 1 mL/min, 收集前 17 mL 洗脱液, 摇匀, 精密吸取 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 超声破膜, 摇匀, 即得分离后的脂质体溶液。另取脂质体 0.5 mL, 磷酸盐溶液稀释至 17 mL, 取 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容, 超声破膜, 摇匀, 即得未分离的脂质体溶液。

2.1.1.4 脂质体包封率测定 取“2.1.1.3”项下脂质体溶液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, HPLC 法测定峰面积, 代入标准曲线, 计算俄色叶-A 含量。然后, 计算包封率, 公式如下。

$$\text{包封率} = \frac{\text{分离后脂质体中俄色叶-A 含量}}{\text{分离前脂质体中俄色叶-A 含量}} \times 100\%$$

2.1.2 HPLC 法的建立及验证

2.1.2.1 最大吸收波长的确定 取“2.1.1”项下标准品溶液, 甲醇作为空白, 紫外分光光度计在 200~800 nm 范围内全波长扫描, 测定对照品中俄色叶-A 的吸光度, 最终确定最大吸收波长为 283 nm。

2.1.2.2 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm × 46 mm, 5 μm); 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 283 nm; 流动相甲醇-水(40:60)。

2.1.2.3 专属性考察 取“2.1.1”项下标准品溶液、空白溶液及分离前的脂质体溶液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, HPLC 法测定其吸收峰。结果, 在“2.1.2.2”项色谱条件下, 空白脂质体无吸收, 说明辅料对主药的测定无干扰, 具体见图 1。

2.1.2.4 标准曲线的绘制 取“2.1.1”项下标准品溶液, 将其分别稀释 1.25、1.75、2.5、5 和 10 倍, 得到 0.168、0.120、0.084、0.042 和 0.021 mg/mL 5 个质量浓度, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 分别进样 10 μL, HPLC 法测定峰面积, 以质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)作标准曲线, 得线性回归方程为 $Y = 3 \times 10^6 X - 189\ 358$ ($R^2 = 0.999\ 9$), 表明俄色叶-A 在 0.04~0.24 g/L 范围内线性关系良好。

2.1.2.5 精密度试验 取“2.1.1”项下标准品溶液, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 进样 10 μL, 重复进样 5 次, HPLC 法测定峰面积。结果, RSD 值为 0.22%, 表明仪器精密度良好。

2.1.2.6 稳定性试验 取“2.1.1”项下标准品溶液和未分离的脂质体溶液, 室温放置 1、2、4、6、8、12、24、48、72 h 后, 0.45 μm 微孔滤膜过

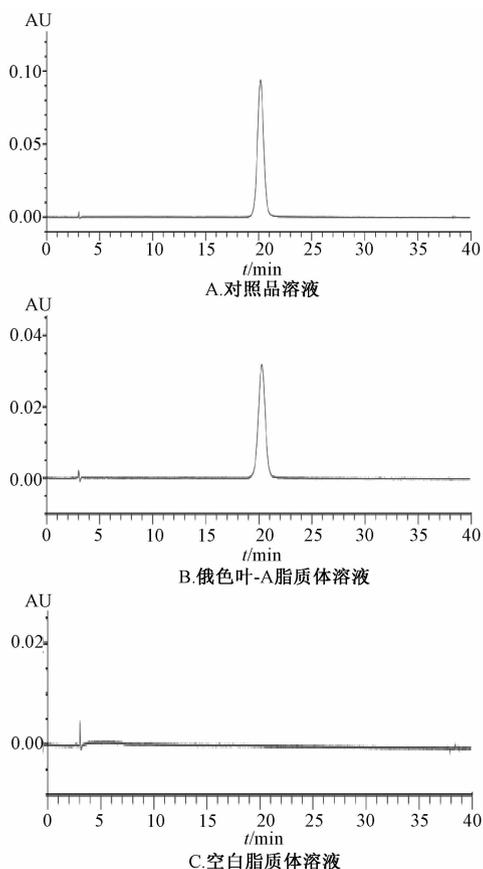


图1 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms

滤，分别进样 10 μL 进行测定，记录峰面积。结果，两者 RSD 分别为 1.42% 和 2.43%，表明溶液在 72 h 内稳定性良好。

2.1.2.7 加样回收率试验 取含有量已知的脂质体溶液 6 份，分别精密加入俄色叶-A 标准品 50 mg，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.2.2”项色谱条件下测定，结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery tests

编号	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
1	44.0	50.0	95.0	102.0	99.3	2.5
2	44.1	50.0	94.7	101.2		
3	44.3	50.0	94.9	101.2		
4	43.8	50.0	92.9	98.2		
5	44.8	50.0	93.2	96.8		
6	45.6	50.0	93.7	96.2		

2.2 俄色叶-A 脂质体的制备方法

2.2.1 薄膜分散法 精密称取胆固醇、卵磷脂和俄色叶-A 适量，以及聚乙烯吡咯烷酮 10 mg，氯

仿-甲醇 (2 : 1) 溶解，再转移至 500 mL 茄形瓶中，40 °C 下蒸干有机溶剂至瓶壁上形成一层均匀的薄膜，将适量磷酸盐缓冲液倒入茄形瓶中，室温下振摇以洗下薄膜，转入锥形瓶中，50 °C 下磁力搅拌 1 h，即得。

2.2.2 乙醚注入法 精密称取胆固醇、卵磷脂和俄色叶-A 适量，溶于乙醚中。再取聚乙烯吡咯烷酮 10 mg，溶于缓冲溶液中。水相置于 60 °C 恒温水浴锅中，乙醚溶液用注射器缓慢均匀注入缓冲溶液，搅拌挥干乙醚，超声 20 min，即得。

2.2.3 薄膜-超声法 将“2.1.1”项下脂质体置于恒温水浴中，超声一定时间，依次过 0.80、0.45 μm 微孔滤膜，即得。

2.2.4 制备方法比较 薄膜分散法制备的脂质体包封率最高，稳定性好，但粒径较大 (大于 600 nm)；乙醚注入法制备的脂质体包封率只有 61%，而且粒径不均匀，4 °C 放置 7 d 后有少量聚集沉淀，脂质体不稳定；薄膜-超声法制备的脂质体粒径小，而且均匀，包封率为 86%，4 °C 下放置 7 d 后脂质体无凝聚，稳定性较好。综合考虑包封率、粒径和稳定性，最终选择薄膜-超声法，并进行工艺优化。

2.3 单因素考察试验及结果 固定其他因素，分别考察卵磷脂与胆固醇比例、卵磷脂与主药比例、溶剂用量、缓冲液 pH、缓冲液用量、超声时间对脂质体包封率的影响。

固定因素为旋蒸温度 40 °C，转速 100 r/min，水化温度 50 °C，时间 1 h，聚乙烯吡咯烷酮 10 mg，维生素 E 1 滴。当其为非考察因素时，分别固定为卵磷脂与胆固醇比例 5 : 1，卵磷脂与主药比例 5 : 1，溶剂用量 30 mL，缓冲液 pH 7.0，缓冲液用量 10 mL，超声时间 30 min；当其为考察变量时，分别取值为卵磷脂与胆固醇比例 (1 : 1、1 : 3、1 : 5、1 : 7、1 : 9)，卵磷脂与主药比例 (1 : 1、1 : 5、1 : 10、1 : 15、1 : 20)，溶剂用量 (9、15、30、45、60 mL)，缓冲液 pH 值 (5.8、6.5、6.8、7.0、7.2、7.4)，缓冲液用量 (5、10、15、20、25、30 mL)，超声时间 (0、10、20、30、40、50 min)。各组实验均按“2.3”项下方法测定俄色叶-A 脂质体的包封率，以该变量为横坐标，包封率为纵坐标作图，结果见图 2。

由图可知，溶剂用量在 30 mL 后，脂质体包封率值只有小幅度增加，考虑结果及节约原料，将溶

剂用量定为 30 mL。缓冲液 pH 值为 7.0 时，脂质体较稳定，包封率在长时间内保持较高，而其他 pH 下脂质体易絮凝，出现沉淀，包封率在短时间内急剧下降，因此选择 pH 值 7.0 的缓冲液作为水化溶液。包封率随超声时间的增加而减少，20 min

后下降明显，考虑保持小粒径脂质体和高包封率，将超声时间定为 20 min。卵磷脂与胆固醇比例、卵磷脂与主药比例及缓冲液用量对包封率影响较大，而且规律不明显，故以三者为响应面设计优化法考察的因素。

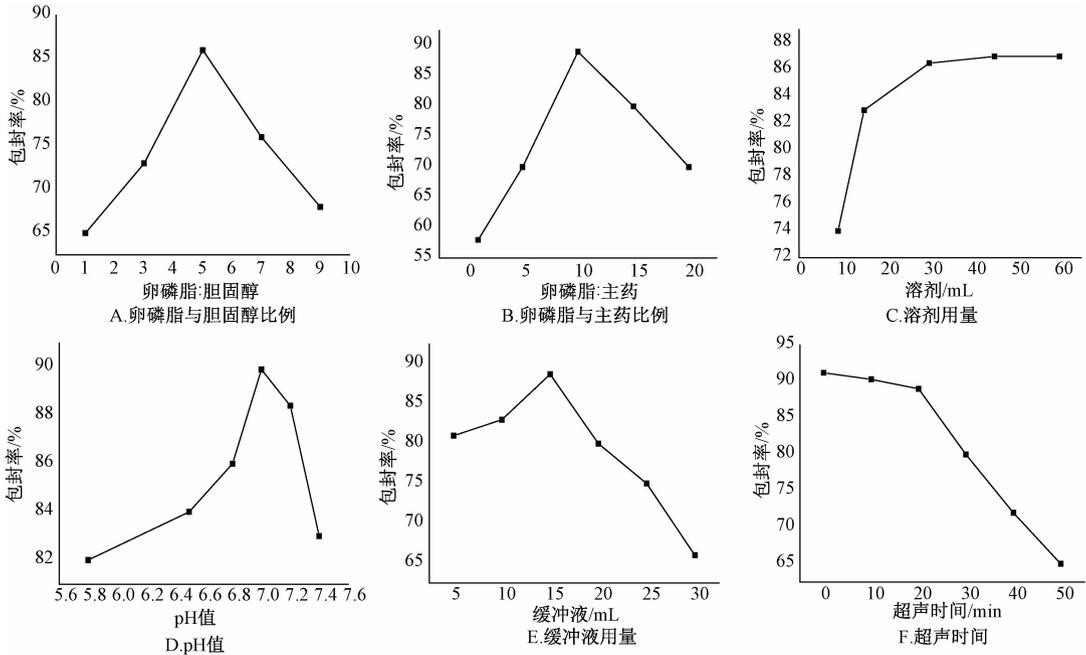


图2 各因素对包封率的影响

Fig. 2 Effects of various factors on entrapment efficiency

2.4 响应面试验设计及结果 基于单因素考察结果，选出对脂质体包封率影响较明显的因素，即卵磷脂与胆固醇比例 (A)、卵磷脂与主药比例 (B)、缓冲液用量 (C)，每个因素取 3 个水平进行工艺优选，因素水平及结果见表 2~4。

表2 因素水平

Tab. 2 Factors and levels

水平	因素		
	A 卵磷脂:胆固醇	B 卵磷脂:主药	C 缓冲液/mL
-1	4:1	5:1	10
0	5:1	10:1	15
1	6:1	15:1	20

各因素经回归拟合后，得到回归方程为包封率 = 90.62 + 2.21A + 0.86B - 1.17C + 2.08AB - 3.15AC + 4.15BC - 5.25A² - 7.10B² - 1.47C²，具有极显著性 ($P_r > F$ 小于 0.001)， R^2 0.966 5 表明模型响应值变化的 96.65% 来自所选因变量，失拟差不显著 ($P_r > F$ 大于 0.05) 表明本模型没有失拟现象，可充分反映实际情况。综上所述，该模型可用于对俄色叶-A 的包封率进行分析和

预测。

表3 试验设计和结果

Tab. 3 Design and results of tests

编号	编码值			试验值			包封率/%		
	A	B	C	A	B	C	实测值	预测值	误差
1	0	0	0	5	10	15	93.00	90.62	2.38
2	-1	0	1	4	10	20	83.10	83.66	-0.56
3	0	0	0	5	10	15	91.10	90.62	0.48
4	1	-1	0	6	5	15	78.50	77.55	0.95
5	-1	0	-1	4	10	10	80.30	79.94	0.36
6	-1	-1	1	4	5	15	78.20	77.28	0.92
7	0	0	1	5	10	15	90.00	90.62	-0.62
8	1	1	1	6	15	15	82.50	83.43	-0.93
9	0	0	1	5	10	15	90.00	90.62	-0.62
10	-1	1	1	4	15	15	73.90	74.85	-0.95
11	0	0	1	5	10	15	89.00	90.62	-1.62
12	1	0	0	6	10	10	91.00	90.44	0.56
13	0	-1	0	5	5	10	85.00	86.51	-1.51
14	0	-1	1	5	5	20	75.50	75.86	-0.36
15	0	1	-1	5	15	10	80.30	79.71	0.59
16	1	0	1	6	10	20	81.20	81.79	-0.59
17	0	1	1	5	15	20	87.40	85.89	1.51

表4 方差分析
Tab. 4 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
模型	547.20	9	60.80	22.44	0.000 2
A	39.16	1	39.16	14.45	0.006 7
B	5.95	1	5.95	2.20	0.001 9
C	11.05	1	11.05	4.08	0.043 2
AB	17.22	1	17.22	6.36	0.039 7
AC	39.69	1	39.69	14.65	0.006 5
BC	68.89	1	68.89	25.43	0.001 5
A ²	115.94	1	115.94	42.79	0.000 3
B ²	212.10	1	212.10	78.29	<0.000 1
C ²	9.13	1	9.13	3.37	0.109 0
残差	18.97	7	2.71	—	—
失拟差	9.68	3	3.23	1.39	0.367 7
纯误差	9.29	4	2.32	—	—
总差	566.16	16	—	—	—
R ²			0.966 5		
CV/%			1.96		

根据回归方程, 研究响应面图, 分析胆卵比、脂药比、缓冲液用量对俄色叶-A 脂质体影响, 结果见图3。本实验选择卵磷脂与胆固醇比例5:1、卵磷脂与主药比例10:1及缓冲液用量15 mL作为俄色叶-A 脂质体的优化工艺参数。根据上述条件制备3批样品, 分别测定其包封率, 结果预测值为91.8%, 实测值为92.3%, 两者偏差率为0.54%, 说明该模型比较可靠。

2.5 脂质体形态、粒径和 Zeta 电位 取俄色叶-A 脂质体适量, 加双蒸水稀释200倍, 滴加在覆盖碳膜的铜网上, 2% 醋酸双氧铀负染, 透射电镜下观察其粒径及形态, 激光粒径分析仪测定其平均粒径分布和 Zeta 电位。结果表明, 粒径为(162.1 ± 6.3) nm, 多分散系数为0.12, Zeta 电位为(-32.8 ± 7.3) mV。见图4。

2.6 脂质体初步稳定性考察 按优化后的最佳处方和工艺制备俄色叶-A 脂质体, 密封于西林瓶中, 4℃下保存, 分别于0、1、2、4、6月末取样, 对其外观、粒径分布、Zeta 电位值和脂质体包封率进行考察。结果, 其外观仍为均一乳白色混悬液, 无聚集沉淀, 各项考察指标值基本不变, 说明俄色叶-A 脂质体在4℃条件下于6个月内稳定。具体见表5。

3 讨论

影响脂质体包封率的因素有很多, 如药物的性质、药物与脂质体的比例、脂质体的种类和用量、制备方法等。其中, 药物的性质是影响脂质体包封率的主要因素, 极性药物在水中的溶解度越大, 在

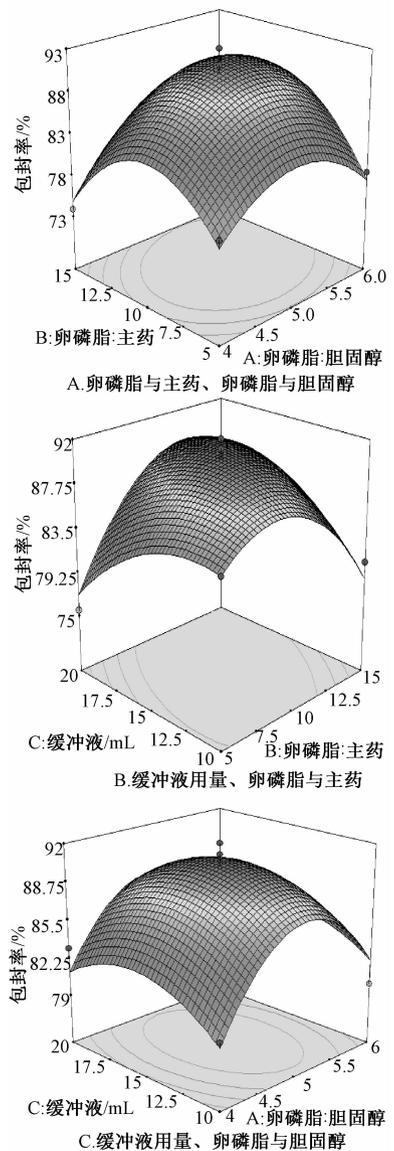


图3 包封率的三维效应面图

Fig. 3 3D response surface plots of entrapment efficiency

表5 俄色叶-A 脂质体稳定性试验结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Results of stability tests for eseye-A liposomes ($\bar{x} \pm s$)

时间/月	粒径/nm	Zeta 电位/mV	包封率/%
0	162.1 ± 6.3	-32.8 ± 7.3	92.30
1	160.0 ± 7.8	-32.5 ± 8.7	92.24
2	165.1 ± 5.6	-31.8 ± 6.9	92.29
4	163.2 ± 6.3	-31.2 ± 7.2	92.31
6	166.5 ± 9.5	-31.0 ± 6.8	92.28

脂质体水相中的质量浓度越高, 包封体积越大, 包封的极性药物越多; 非极性药物脂溶性越大, 脂质体双分子层中包封量越多, 药物电性与脂质体膜电性相反。当药物与类脂双分子的亲和力增加时, 包

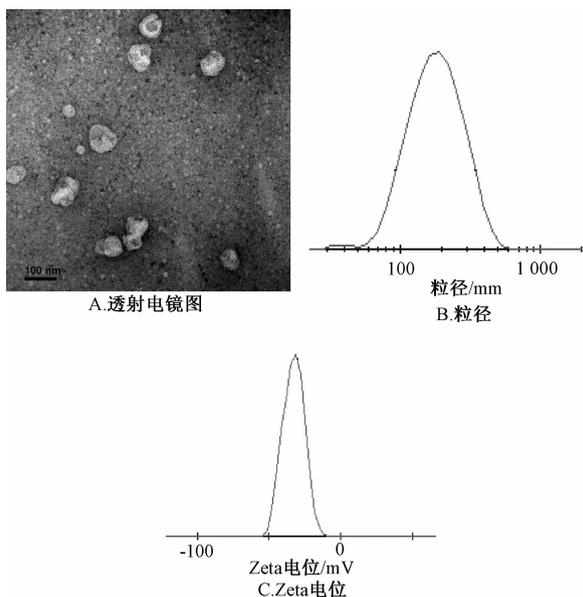


图4 透射电镜照片、粒径分布和Zeta电位

Fig. 4 Transmission electron microscope photograph, size distribution and Zeta potential

封率提高,反之则下降。另外,分子量大的药物可获得较高的包封率。俄色叶-A的油水分配系数lgP值为6.0,脂溶性很好,可包封成较高包封率的稳定脂质体^[11]。因此,选择合适的辅料及制备工艺能制得包封率较高的俄色叶-A脂质体。

响应面设计法可评价因素和指标间的非线性关系,与国内常采用的正交设计、均匀设计相比,具有精度高、预测性好、简单和直观的优点,目前已广泛用于药物处方筛选、剂型制备、生物过程以及化学合成的优化^[12]。本实验采用响应面设计法优化俄色叶-A脂质体的制备工艺,得到最佳处方为卵磷脂与胆固醇比例5:1,卵磷脂与药物比例10:1,缓冲液用量15 mL。根据该优化条件制备3批样品,分别测定其包封率,结果预测值为91.8%,实测值为92.3%,两者偏差率为0.54%,

表明该方法可用于俄色叶-A脂质体制备工艺的优化。

参考文献:

[1] 毛羽,冯豫川,吴永康,等. 苹果属花楸苹果组植物的新用途:中国, CN 101411760A[P]. 2009-04-22
[2] 毛羽,冯豫川,吴永康,等. 苹果属花楸苹果组植物的新用途:中国, CN 101411761B[P]. 2011-11-09
[3] 毛羽,冯豫川,吴永康,等. 一种保健茶及其制备方法:中国, CN 101411372B[P]. 2012-5-23.
[4] Dayan N, Touitou E. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs liposomes[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(18): 1879-1885.
[5] Ferreira L S, Ramaldes G A, Nunan E A, et al. In vitro skin permeation and retention of paromomycin from liposomes for topical treatment of the cutaneous leishmaniasis[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2004, 30(3): 289-296.
[6] Cevc G. Transdermal drug delivery of insulin with ultra-deformable carriers[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2003, 42(5): 461-474.
[7] Singh R P, Singh P, Mishra V, et al. Vesicular systems for noninvasive topical immunization: rational and prospects[J]. *Indian J Pharmacol*, 2002, 34: 301-310.
[8] Domashenko A, Gupta S, Cotsarelis G. Efficient delivery of transgenes to human hair follicle progenitor cells using topical lipoplex[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 420-423.
[9] Palac Z, Hurler J, Škalko-Basnet N, et al. Elastic liposomes-in-vehicle formulations destined for skin therapy: the synergy between type of liposomes and vehicle[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(8): 1247-1253.
[10] Shah S M, Ashtikar M, Jain A S, et al. LeciPlex, invasomes, and liposomes: A skin penetration study[J]. *Int J Pharm*, 2015, 490(1-2): 391-403.
[11] 邓英杰,史淑芬,顾学裘. 油酸多相脂质体(139)注射液包封率测定方法的研究[J]. *药学学报*, 1988, 23(7): 539-544.
[12] 隋允康,宇慧平. 响应面方法的改进及其对工程优化的应用[M]. 北京:科学出版社, 2011: 35-63.