

·工艺研究·

人参皂苷 Rg3 脂质体的处方优化及制备工艺研究

潘翠珊¹, 王风华², 翁艺芳¹, 王 岩¹(1. 广东药学院, 广东 广州 510006; 2. 中山大学肿瘤防治中心, 广东 广州 510060)

摘要: **目的** 为了提高人参皂苷 Rg3 的生物利用度和靶向性, 以卵磷脂和胆固醇为载体材料, 研究人参皂苷 Rg3 脂质体的处方和制备工艺。**方法** 采用薄膜超声分散法制备脂质体, HPLC 测定人参皂苷 Rg3 的含量。以包封率为指标, 采用单因素和正交试验法优选处方和工艺。**结果** 人参皂苷 Rg3 脂质体的最佳处方和工艺条件为: 以氯仿-乙醇(1:1)为溶剂, 卵磷脂、胆固醇、人参皂苷 Rg3 的质量比为 4:2:1, 载药温度为 50 ℃, PBS 缓冲溶液的 pH 值为 7.5。制备的脂质体平均粒径为 111.8 nm, 包封率为 87.85 %。**结论** 该工艺方法简便、稳定可行, 适用于人参皂苷 Rg3 脂质体的制备。

关键词: 人参皂苷 Rg3; 脂质体; 制备工艺; 包封率

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0113-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.028

Study on Optimization of Formulation and Preparation Process of Ginsenoside Rg3 Liposomes

PAN Cuishan¹, WANG Fenghua², WENG Yifang¹, WANG Yan¹(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Department of Medical Oncology, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To improve the bioavailability and targeting property of ginsenoside Rg3, lecithin and cholesterol were used as the carrier materials to optimize the formulation and preparation technology of ginsenoside Rg3 liposomes. **Methods** Liposomes were prepared by thin-film ultrasonic dispersion method, and the content of ginsenoside Rg3 was determined by HPLC. With the entrapment efficiency as the observation index, the formulation and process were optimized by single factor investigation and orthogonal test. **Results** The optimal formulation and process conditions were as follows: the solvent was chloroform-ethanol(1:1), the best weight ratio of lecithin to cholesterol and ginsenoside Rg3 was 4:2:1, the temperature was 50 ℃, and the pH value of PBS buffer was 7.5. The average particle diameter of the liposomes was 111.8 nm, and the entrapment efficiency was 87.85 %. **Conclusion** The optimized process is feasible, stable and applicable for the production of ginsenoside Rg3 liposomes.

Keywords: Ginsenoside Rg3; Liposomes; Preparation technology; Entrapment efficiency

人参皂苷 Rg3 是存在于中药人参中的一种四环三萜皂苷, 属于原人参二醇型。大量研究^[1-3]表明, 人参皂苷 Rg3 抗肿瘤作用显著, 对肺癌、肝癌、乳腺癌等肿瘤细胞, 均具有一定的抑制作用。因为人参皂苷 Rg3 的水溶性差而极大地降低了其生物利用度, 且口服溶出速率慢, 是其口服制剂吸收的限速因素。

研究^[4]发现参一胶囊口服后血药浓度很低, 以 3.2 mg·kg⁻¹ 剂量口服后的最大血药浓度值(C_{max})仅为(16±6) ng·mL⁻¹, 由此可见口服参一胶囊生物利用度非常低。脂质体则可提高难溶性药物的溶解度, 促进大分子药物在体内的吸收, 提高其生物利用度, 并可增强网状内皮系统丰富的肝、脾、肺等器官的靶向性, 从而降

收稿日期: 2014-06-27

作者简介: 潘翠珊, 硕士研究生, 研究方向: 从事药物新剂型与新技术研究。Email: 494840457@qq.com。通讯作者: 王岩, 博士, 教授, 研究方向: 药物新剂型与质量控制。Email: gdpuwy@126.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031800335); 广东省教育厅学科建设项目(2013KJCX0110)。

低对其他器官和组织的毒副作用。因 20 位羟基空间位置不同, 人参皂苷 Rg3 存在 20(R)型和 20(S)型 2 种对映异构体, 这 2 种异构体在理化性质和生物活性方面均有较大差异, 其中 20(R)型的抗肿瘤活性较 20(S)型高^[9], 故本研究以 20(R)- 人参皂苷 Rg3 为模型药物, 采用单因素和正交试验研制人参皂苷 Rg3 脂质体, 并从形态、粒径分布、电势等方面对其进行质量评价。

1 仪器与试药

LC-10A 高效液相色谱仪, 日本岛津公司; Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 北京迪马科技有限公司; RE-2000B 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SK3300LH 超声波清洗器, 上海科导超声波仪器有限公司; TGL-16B 台式高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; JEM100CXII 透射电镜, 日本电子公司; DelsaTM Nano C 激光粒度分析仪, 美国贝克曼库尔特有限公司。

卵磷脂, 上海蓝季科技发展有限公司, 批号: 090109; 胆固醇, 上海润捷化学试剂有限公司, 批号: 20090203; 20(R)- 人参皂苷 Rg3 原料药, 南京泽朗医药科技有限公司, 批号: ZL20140216YY, 含量 ≥ 95 %; 20(R)- 人参皂苷 Rg3 对照品, 成都曼斯特生物科技有限公司, 批号: 13080811, 含量 ≥ 98 %; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体制备工艺 采用薄膜超声分散法制备脂质体。称取处方量的卵磷脂、胆固醇和人参皂苷 Rg3, 加入氯仿-乙醇(1:1)超声溶解, 置茄形瓶中, 在旋转蒸发器上减压除去有机溶剂, 待瓶壁上形成均匀透明的薄膜, 加入磷酸盐缓冲液(PBS)超声处理至薄膜完全脱落, 将溶液转移至量瓶中, 用 PBS 定容至刻度, 摇匀, 即得人参皂苷 Rg3 脂质体混悬液。

2.2 含量测定方法的建立

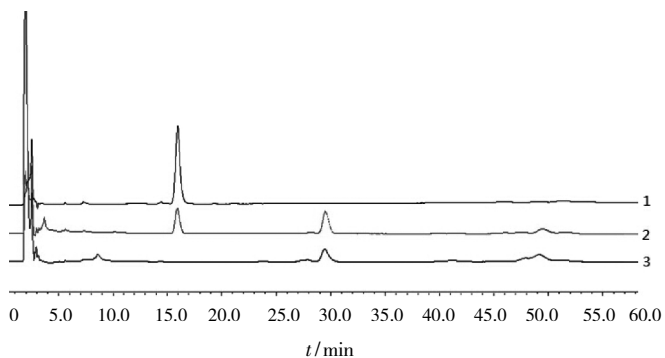
2.2.1 色谱条件及系统适应性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以乙腈-水(45:55)为流动相; 检测波长为 203 nm; 柱温为 30 ℃; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 20 μL。理论板数按人参皂苷 Rg3 峰计算应不小于 2000。

2.2.2 对照品溶液制备 精密称取干燥至恒质量的人参皂苷 Rg3 对照品 10.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 100

μg·mL⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 精密量取人参皂苷 Rg3 脂质体混悬液 1 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加乙醇稀释至刻度, 水浴超声处理 10 min 使其完全破乳, 加乙醇定容, 摇匀。以 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

2.2.4 专属性考察 精密量取空白脂质体混悬液 1 mL, 按 2.2.3 项下方法操作, 制得阴性对照溶液。在上述色谱条件下, 分别精密吸取对照品、供试品、与阴性对照溶液各 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录 HPLC 图谱, 结果表明, 人参皂苷 Rg3 与基质成分的分离情况良好, 峰形尖锐, 阴性对照无干扰, 表明本法专属性良好。见图 1。



1. 对照品; 2. 供试品; 3. 空白

图 1 人参皂苷 Rg3 的 HPLC 色谱图

Figure 1 HPLC results of ginsenoside Rg3

2.2.5 线性范围考察 精密量取人参皂苷 Rg3 对照品溶液 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 mL, 置 2 mL 量瓶中, 用甲醇稀释成 20, 40, 60, 80, 100 μg·mL⁻¹ 的系列溶液。另精密量取对照品溶液 0.2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释成 2 μg·mL⁻¹ 的溶液。按 2.2.1 项下色谱条件测定, 以峰面积对浓度进行线性回归, 得标准曲线方程 $Y=6236.4X-3287.3$, $r=0.9999$ 。人参皂苷 Rg3 在 2~100 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 精密吸取人参皂苷 Rg3 对照品溶液 20 μL, 注入高效液相色谱仪, 连续进样 6 次, 计算峰面积, 其 RSD 为 0.29 %。表明仪器精密度良好。

2.2.7 重复性试验 精密量取人参皂苷 Rg3 脂质体混悬液 1 mL, 按 2.2.3 项下步骤操作, 平行制备 6 份, 分别精密吸取 20 μL 进样测定, 结果人参皂苷 Rg3 含量的 RSD 为 0.77 %。表明该方法重现性良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于配制后 0, 2, 4, 8, 12 h 内, 精密吸取 20 μL 进样测定, 结果人参皂苷 Rg3 峰面积的 RSD 为 0.58 %, 表明供

试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.2.9 回收率试验 精密量取浓度为 100 μg·mL⁻¹ 的人参皂苷 Rg3 对照品溶液 3 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加入空白脂质体混悬液 1 mL, 用乙醇定容, 制成 60 μg·mL⁻¹ 样品, 水浴超声 10 min 使其完全破乳, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 收集续滤液, 平行制备 6 份。分别精密吸取 20 μL 进样, 测定人参皂苷 Rg3 含量。结果平均回收率为 98.04 %, 其 RSD 为 1.79 %。见表 1。

表 1 人参皂苷 Rg3 回收率试验结果

Table 1 Results of recovery test for ginsenoside Rg3				
加入量 /μg	测定量 /μg	回收率 %	平均回收率 /%	RSD/%
300	296.52	98.84	98.04	1.79
300	288.63	96.21		
300	299.19	99.73		
300	299.64	99.88		
300	293.46	97.82		
300	287.31	95.77		

2.3 包封率测定方法的建立 采用高速离心法测定人参皂苷 Rg3 脂质体的包封率^[6-7]。精密量取人参皂苷 Rg3 脂质体混悬液 1 mL, 置离心管中, 以 10000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 移取上清液, 置 5 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 以 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液按 2.2.1 项下色谱条件测定游离药量。另精密量取人参皂苷 Rg3 脂质体混悬液 1 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 超声破乳, 以 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 同法测定脂质体中的总药量, 按公式计算人参皂苷 Rg3 的包封率(EE):

$$EE(\%) = \left(1 - \frac{W_1}{W_2}\right) \times 100\%$$

式中: EE 代表药物包封率, W₂ 为脂质体中总药量, W₁ 为脂质体中未被包封的游离药量。

2.4 脂质体制备工艺的初步筛选

2.4.1 脂药比对包封率影响 固定卵磷脂与胆固醇质量比为 4 : 1, 卵磷脂浓度为 1.3 mg·mL⁻¹, 改变卵磷脂与药物的质量比, 分别为 4 : 1, 8 : 1, 10 : 1, 在 60 ℃下蒸干, 用 pH 7.5 PBS 洗脱薄膜制成脂质体, 测得包封率分别为 84.21 %, 74.23 %, 77.37 %。由本结果可知, 卵磷脂与胆固醇的质量比对脂质体包封率有较大影响。

2.4.2 载药温度对包封率的影响 固定卵磷脂与胆固醇质量比为 4 : 1, 脂药比为 10 : 1, 卵磷脂浓度为 1.3 mg·mL⁻¹, 仅改变载药时温度, 分别为 50 ℃, 60 ℃, 70 ℃, 用 pH7.5 PBS 洗脱薄膜, 测得包封率分别为 64.57 %, 77.37 %, 69.40 %。由结果可知, 载药温

度对脂质体包封率也有较大影响, 包封率先增后减。

2.4.3 卵磷脂胆固醇质量比对包封率的影响 固定脂药比为 10 : 1, 载药温度 60 ℃, 卵磷脂浓度为 1.3 mg·mL⁻¹, 仅改变卵磷脂胆固醇质量比, 分别为 4 : 1, 3 : 1, 2 : 1, 用 pH7.5 PBS 洗脱薄膜, 测得包封率分别为 77.37 %, 74.55 %, 79.84 %。由结果可知, 不同比例卵磷脂胆固醇对脂质体包封率影响不大, 其最佳比例为 2 : 1。

2.4.4 PBS 的 pH 值对包封率的影响 固定卵磷脂与胆固醇质量比为 4 : 1, 脂药比为 10 : 1, 卵磷脂浓度为 1.3 mg·mL⁻¹, 旋转蒸发的温度 60 ℃, 仅改变 PBS 溶液的 pH 值, 分别用 pH6.5、7.0、7.5 的 PBS 洗脱薄膜, 制成脂质体, 同法测得包封率分别为 59.27 %, 71.00 %, 77.37 %。由结果可知, PBS 溶液的 pH 对脂质体包封率也有影响, 在一定范围内包封率随 pH 增大而提高。

2.5 脂质体制备工艺的正交试验 单因素试验结果表明, 卵磷脂胆固醇质量比对包封率影响影响较小, 其比例可确定为 2 : 1。故本研究选择其余 3 个因素, 即脂药比, 载药温度, PBS 溶液 pH 值进行正交试验, 每个因素选取 3 个水平, 按上法制备脂质体, 以包封率作为工艺筛选指标。因素水平设置见表 2, 正交试验设计及结果见表 3, 方差分析结果见表 4。

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment			
因素	A(脂药质量比)	B(载药温度)/℃	C(pH)
1	4 : 1	50	6.5
2	8 : 1	60	7.0
3	10 : 1	70	7.5

表 3 正交试验结果表

Table 3 Results of orthogonal experiment					
因素	脂药质量比	温度	pH 值	空白	包封率 /%
实验 1	1	1	1	1	90.16
实验 2	1	2	2	2	81.42
实验 3	1	3	3	3	90.65
实验 4	2	1	2	3	80.63
实验 5	2	2	3	1	77.48
实验 6	2	3	1	2	81.50
实验 7	3	1	3	2	75.54
实验 8	3	2	1	3	59.31
实验 9	3	3	2	1	71.71
均值 1(K1)	87.410	82.110	76.990	79.783	
均值 2(K2)	79.870	72.737	77.920	79.487	
均值 3(K3)	68.853	81.287	81.223	73.863	
极差(R)	18.557	9.373	4.233	2.920	

表4 正交试验方差分析表

Table 4 Results of variance analysis of orthogonal experiment					
因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A(脂药质量比)	522.57	2	33.72	19.00	$P < 0.05$
B(温度)	161.64	2	10.43	19.00	
C(pH)	29.70	2	1.92	19.00	
误差	15.50	2			

由直观分析的结果可知,按极差R值大小排序,考察因素的影响顺序为A>B>C,即对包封率影响最大的因素是脂药比,影响最小的为PBS溶液的pH值。方差分析结果表明,A因素对实验结果影响显著,B因素和C因素对实验结果的影响差异无显著性意义。最优工艺条件确定为A₁B₁C₃,即脂药比为4:1,旋蒸温度为50℃,PBS溶液的pH值为7.5。

按优选工艺平行制备人参皂苷Rg3脂质体3批,进行工艺验证试验,结果测得包封率分别为86.88%,87.77%,88.90%,平均包封率为87.85%,表明工艺稳定可行。

2.6 粒子形态观察 将脂质体用pH 7.5 PBS稀释2倍后,取一滴于400目铜网上,静置1 min,使样品渗入铜网孔内,再用2%磷钨酸负染1 min,用滤纸吸去负染液,于透射电镜下观察。可见本法制备的脂质体电镜下呈较圆整的球状,以单室结构为主。结果见图2。

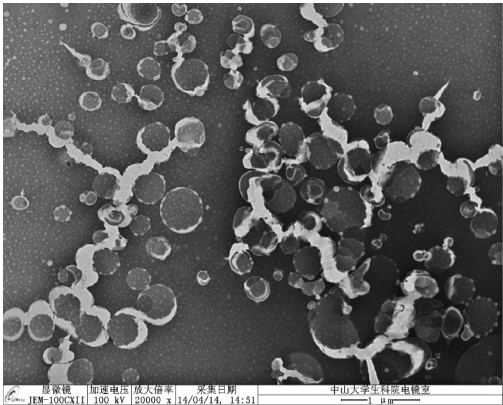


图2 人参皂苷Rg3脂质体透射电镜照片(20000×)
Figure 2 Ginsenoside Rg3 liposomes observed under transmission electron microscope(20000×)

2.7 粒径分布与电位测定 采用激光粒度分析仪对脂质体粒径和电位进行了测定,其粒径主要分布于50~300 nm范围,平均粒径为111.8 nm,粒子呈正态分布,表明分散度良好;Zeta电势为-38.67 mV,一般认为Zeta电势绝对值大于30 mV体系较稳定^[8],表明制备的脂质体具有良好的稳定性。见图3和图4。

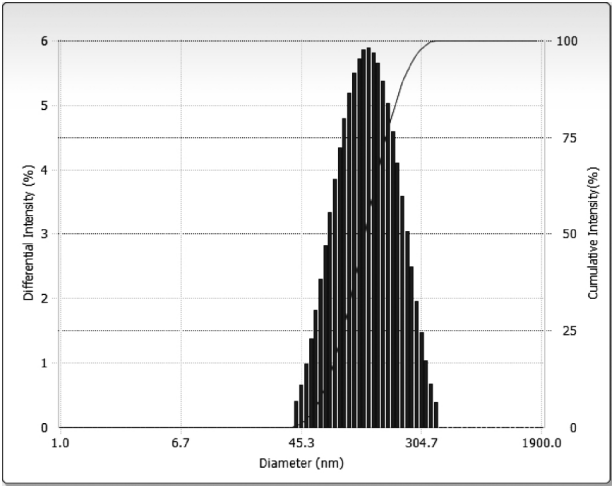


图3 人参皂苷Rg3脂质体的粒径分布图
Figure 3 Size distribution of ginsenoside Rg3 liposomes

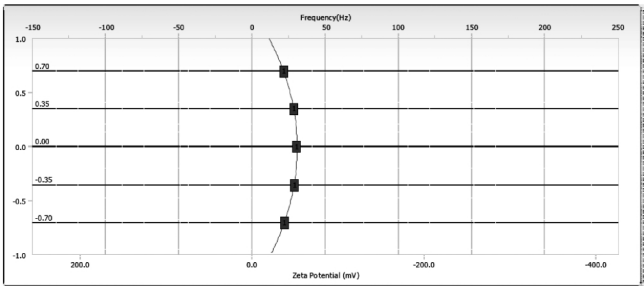


图4 人参皂苷Rg3脂质体的Zeta电势图
Figure 4 Zeta potential distribution of ginsenoside Rg3 liposomes

3 讨论

薄膜分散法对脂溶性及水不溶性药物具有较高包封率,制备的脂质体多为多层结构,但通常粒度不均匀,粒径分布较宽。而超声波分散法将多层脂质体的混悬液经超声波处理后可转变成小单层脂质体,但它只适用于水溶性药物的制备。本研究结合这两种方法,采用薄膜超声分散法制备人参皂苷Rg3脂质体,由粒径和电镜测定结果显示制得的脂质体包封率高,粒径分布均匀,形态圆整,且大多为单层脂质体。

在脂质体的制备中,曾对溶剂种类进行了选择研究。根据脂质体膜材和药物的溶解性质,分别考察了甲醇、乙醇、氯仿-甲醇(1:1)、氯仿-乙醇(1:1)对脂质体成膜效果的影响。结果在氯仿-甲醇(1:1)和氯仿-乙醇(1:1)中,磷脂均易溶,呈黄色透明溶液,而以甲醇和乙醇为溶剂时均有少量膜材不溶解。考虑到溶剂毒性、价格和废液处理问题,本研究选择氯仿-乙醇(1:1)为溶剂。

含药脂质体包封率的常用测定方法有透析法、离心法、有机溶剂萃取法和柱析法等^[9]。由于高速离心法与其他方法相比具有操作简便、脂质体与游离药物

分离时间短等优点,故本研究采用高速离心法测定包封率。

曾有学者^[10]研究过人参皂苷 Rg3 脂质体的制备工艺,其采用的是薄膜挤出法,而本研究采用的是薄膜超声分散法,与之相比具有操作简便、包封率高的优点。下一阶段,笔者将对人参皂苷 Rg3 脂质体的药物动力学特征及体内组织分布进行研究,以进一步阐释其靶向性及制剂优势。

参考文献:

- [1] LU P, SU W, MIAO ZH, et al. Effect and mechanism of ginsenoside Rg3 on postoperative life span of patients with non-small cell lung cancer[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2008, 14(1): 33-36.
- [2] 华琼, 华海青. 人参皂苷 Rg3 抗肝癌作用机制的研究进展[J]. 中医学报, 2012, 27(3): 266-268.
- [3] ZHANG Q, KANG X, YANG B, et al. Antiangiogenic effect of capecitabine combined with ginsenoside Rg3 on breast cancer in mice[J]. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals, 2008, 23(5): 647-653.
- [4] 庞焕, 汪海林, 富力, 等. 20(R)-人参皂苷 Rg3 人体药代动力学研究[J]. 药学学报, 2001, 36(3): 170-173.
- [5] 高位博. 人参化学成分及抗疲劳生物活性研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2011.
- [6] 邵红霞, 奉建芳, 龙晓英. 脂质体包封率的测定方法[J]. 中南药学, 2009, 7(3): 212-215.
- [7] 周洪伟, 周曼, 侯德岩, 等. 星点设计-效应面法优化人参皂苷脂质体的制备工艺[J]. 中医药信息, 2011, 28(4): 38-41.
- [8] 陈立亚, 于宝珠, 赵慧芳. Zeta 电位及其在药学分散体系研究中的应用[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2): 281-285.
- [9] 关延彬, 田雨冬, 贾永艳, 等. 柴胡皂苷脂质体的制备工艺及处方优化研究[J]. 中药材, 2013, 36(3): 468-471.
- [10] 于欢. 人参皂苷脂质体的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.

(编辑: 邓响潮)

正交试验优选黄芪葛根汤保护胃黏膜的水煎工艺

来慧丽¹, 林静瑜¹, 桂雪虹¹, 柯雪红², 黄可儿² (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 正交试验结合药效学实验优选黄芪葛根汤抗乙醇诱导胃黏膜损伤最佳水煎工艺。**方法** 小鼠灌胃给药 4 d 后, 无水乙醇灌胃制备小鼠急性胃黏膜损伤模型, 以胃黏膜损伤分数作为评价黄芪葛根汤保护胃黏膜的药效学指标。对黄芪葛根汤水煎液的煎煮时间、煎煮次数、加水量 3 个因素进行正交试验设计, 以葛根素的含量作为评价指标, 优选最佳水煎工艺。**结果** 黄芪葛根汤抗胃黏膜损伤的最佳提取水煎工艺为煎煮 30 min, 煎煮 3 次, 加 10 倍水。**结论:** 正交试验优选的黄芪葛根汤水煎工艺简便可行, 可充分提取汤剂中葛根素, 并起到保护胃黏膜的作用。

关键词: 黄芪葛根汤; 胃黏膜损伤; 黄芪; 葛根; 正交试验

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2015)01-0117-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.029

Optimization of Water Extraction Process of *Huangqi Gegen* Decoction in Protecting Gastric Mucosal Injury by Orthogonal Test

LAI Huili¹, LIN Jingyu¹, GUI Xuehong¹, KE Xuehong², HUANG Ke'er² (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To optimize the water extraction process of *Huangqi Gegen* decoction (HGD) in protecting

收稿日期: 2014-10-10

作者简介: 来慧丽, 女, 博士研究生, 研究方向: 调理脾胃方药的临床与实验研究。Email: 37273938@qq.com。通讯作者: 黄可儿, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治脾胃疾病的研究。Email: hke8989@163.com。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(S2013010013163)。