

# 前列腺素 E<sub>1</sub> 脂质体的制备及稳定性初步研究

刘凯,王昆,黄复生

(第三军医大学基础部病原生物学教研室科美纳米药物技术开发联合实验室,重庆 400038)

中图分类号:TQ460.7+2;R943

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2005)02-0046-02

**摘要 目的:**研制含量稳定、包封率较高的前列腺素 E<sub>1</sub> 脂质体制剂,为临床新制剂的开发提供参考。**方法:**采用逆相蒸发法制备前列腺素 E<sub>1</sub> 脂质体,固相萃取-高效液相色谱法测定主药含量及包封率,并用加速试验对制剂的稳定性作出初步考察。**结果:**前列腺素 E<sub>1</sub> 脂质体平均粒径为 127.5 nm,包封率为 92.35%,具有良好的稳定性。**结论:**前列腺素 E<sub>1</sub> 脂质体制备工艺可行,质量控制方法简单、可靠,该脂质体是一种比较理想的制剂。

**关键词:**前列腺素 E<sub>1</sub>;脂质体;逆相蒸发法;高效液相色谱法;固相萃取;包封率;稳定性

## Preparation of Prostaglandin E<sub>1</sub> Liposome and Rudimentary Study on Its Stability

Liu Kai, Wang Kun, Huang Fusheng

(TMMU - Comed Nanopharmaceuticals Joint R&D Laboratory Department of Pathogenic Biology, Third Military Medical University, Chongqing, China 400038)

**Abstract Objective:** To prepare and study the prostaglandin E<sub>1</sub> liposome with stable concentration and high entrapment efficiency in order to develop a new therapeutic preparation. **Methods:** Prostaglandin E<sub>1</sub> liposome was prepared by the reverse evaporating method and using the technique of HPLC combined with solid phase extraction to determine the concentration of prostaglandin E<sub>1</sub> in liposome and the encapsulation. The liposome stability was proved by acceleration experiment. **Results:** The particle size of the prostaglandin E<sub>1</sub> liposome was 127.5 nm. The entrapment efficiency reached 92.35%. The liposome was stable. **Conclusion:** The technics of preparing the prostaglandin E<sub>1</sub> liposome is feasible and the method of quality control is simple and reliable. The liposome is expected to be an ideal preparation of liposomes.

**Key words:** prostaglandin E<sub>1</sub> liposome; reverse evaporating method; HPLC; solid phase extraction; entrapment efficiency; stability

前列腺素 E<sub>1</sub>(PGE<sub>1</sub>)是一种高效生理活性物质,不仅能扩张血管,还有抑制血小板聚集、防止动脉粥样硬化形成及扩张血管平滑肌等作用。因 PGE<sub>1</sub> 化学性质不稳定,经肺循环一次即失活 90% 以上,加上有其他的心血管效应,故曾认为没有防治血栓性疾病的临床意义<sup>[1]</sup>。随着现代制剂技术的发展,人们已经运用多种包封方法将其活性成分保留在稳定体系中,国外已有多种制剂应用于临床<sup>[2-3]</sup>。国内目前研究较多的有环糊精包合物制备的注射液以及 PGE<sub>1</sub> 脂微球制备的脂肪乳剂。脂质体作为药物载体携带 PGE<sub>1</sub> 可改变药物的运输,加强 PGE<sub>1</sub> 作用的靶向性,延长其循环半衰期,从而提高药效,减少用量,减轻毒副反应<sup>[4-5]</sup>,目前国内尚未见相关报道。我室与重庆科美纳米生物技术有限公司合作,共同开发了 PGE<sub>1</sub> 脂质

体,现就其制备及制剂的稳定性初步研究报道如下。

### 1 仪器与材料

#### 1.1 仪器

M-110S 型高压微射流机(美国);Hitachi 55p-72 超高速离心机(日本);RE52-AA 旋转蒸发器(上海);Grant Y14 恒温水浴循环系统(英国);90 型磁力搅拌器(上海);SHZ-D 型真空泵(河南);Leybold 真空冷冻干燥机(德国);Climacell 111 人工气候箱(德国);Alltech 426 型高效液相色谱仪泵,UVIS-201 型检测器,Agilent G1315B 光电二极管阵列检测器(DAD),Alltech C<sub>18</sub> 色谱柱(100 Å, 5 μm, 4.6 mm × 250 mm),12 孔 Alltech SPE 提取板(美国);Sep-pak C<sub>18</sub> 萃取小柱(Waters);超声波清洗器(美国 Branson);

表 3 样品均一性试验结果(规格 0.25 g)

批号	t (min)							
	3	5	10	15	20	30	45	60
0102001 A	0.4766	0.4781	0.4896	0.4926	0.4967	0.5034	0.5207	0.5244
溶出率(%)	84.3	84.6	86.7	87.2	87.9	89.1	92.2	92.8
0103001 A	0.4898	0.4999	0.5004	0.5020	0.5089	0.5114	0.5153	0.5162
溶出率(%)	86.7	88.5	88.6	88.9	90.1	90.5	91.2	91.4
0104001 A	0.4914	0.4962	0.5134	0.5140	0.5327	0.5361	0.5409	0.5485
溶出率(%)	87.0	87.8	90.9	91.0	94.3	94.9	95.8	97.1
0105001 A	0.5022	0.5094	0.5106	0.5135	0.5137	0.5183	0.5256	0.5484
溶出率(%)	88.9	90.2	90.4	90.9	90.9	91.8	93.0	97.1
0105002 A	0.4873	0.4969	0.5094	0.5125	0.5153	0.5234	0.5243	0.5457
溶出率(%)	86.3	88.0	90.2	90.7	91.2	92.7	92.8	96.6
0008001 A	0.4726	0.4749	0.4841	0.4850	0.4852	0.5168	0.5203	0.5327
溶出率(%)	83.7	84.1	85.7	85.9	85.9	91.5	92.1	94.3
溶出率平均值(%)	86.2	87.2	88.8	89.1	90.1	91.8	92.9	94.8
RSD(%)	2.20	2.72	2.41	2.42	3.22	2.15	1.70	2.56

0105002,0008001)分散片,照 2.5 项下方法操作,以磷酸氢二钠溶液(用盐酸调节 pH 值至 6.0)为溶剂,转速为 100 r/min,分别于 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 min 时,在 482 nm 波长处测定吸收度,并计算其溶出百分率。结果见表 3。

表 3 表明 0.25 g 规格的阿奇霉素分散片在 3 min 时溶出率可达 85% 以上,符合《中国药典》所规定的标准。

### 3 讨论

一般阿奇霉素片在 30 min 时溶出百分率才能达到 80%,而阿奇霉素分散片在 3 min 时溶出百分率可达 85% 以上,说明分散片理想地体现了其作用特点及体外释药特性。同时上述试验也说明各批阿奇霉素分散片之间的均一性良好,制剂工艺稳定。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:化学工业出版社,2000 附录 26,75.
- [2] 周建平. 阿奇霉素分散片的研究[J]. 化工时刊,2000,11:32.
- [3] 洪利娅. 阿奇霉素片溶出度测定[J]. 中国药业,2001,10(1):22.

(收稿日期 2004-04-15,修回日期 2004-06-28)

取各批(批号分别为 0102001,0103001,0104001,0105001,

Sartorius 电子天平(德国);TECHNE Dri-Black DB20 数字加热器,氮气,Milipore Simplicity 185 纯水仪(法国);Zetasizer 3000HS 激光微粒仪(英国 Malven)。

## 1.2 材料

磷脂(Purity > 95%, 德国 Nattermann 公司);胆固醇(美国 Sigma 公司);PGE<sub>1</sub> 原料药(批号:20030122, 重庆药友制药有限公司);BHT(美国 Sigma 公司);甲醇,乙腈(色谱纯,美国);磷酸二氢钾,无水乙醇(重庆东方化学试剂厂);超纯水(本实验室自制)。

## 2 方法与结果

### 2.1 制备方法

取 PGE<sub>1</sub> 原料药、磷脂、胆固醇和 BHT 混匀,再加入适量无水乙醇溶液充分溶解,真空减压,去除有机溶剂,得均匀干膜。加入相应缓冲液,在一定温度下高速搅拌,充分水化,获得脂质体溶液。然后使制备的脂质体溶液在高压作用下进入高压微射流机(MFIC)反应腔,分为多条液流(高速流体改变切流方向,彼此相互撞击,在腔内进行减压后,产生巨大的剪切力),经过数个循环,得到一定粒径、均匀的 PGE<sub>1</sub> 脂质体,真空冷冻干燥,分装即得。

### 2.2 含量测定

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱:Alltech C<sub>18</sub> 柱(美国 Alltech 公司);流动相 0.02 mol/L 磷酸二氢钾(pH=4.9)-乙腈(62:38)流速 1.0 mL/min 紫外检测波长 204 nm 柱温 35℃ 进样体积 100 μL。灵敏度 0.005 AUFS。

#### 2.2.2 待测样品的制备

取冻干脂质体,加水 1 mL,充分混匀,超声水化 15 min,加入经处理过的 Sep-pak C<sub>18</sub> 萃取小柱(用 10 mL 甲醇活化,然后用 10 mL 水冲洗),用 10 mL 蒸馏水冲洗,流速为 0.2 mL/s;以 8 mL 甲醇洗脱,速度为 0.01 mL/s,收集甲醇液,置 35℃ 数字加热器,用氮气吹干,用流动相 1 mL 溶解,进样 100 μL。

#### 2.2.3 检测波长的确定

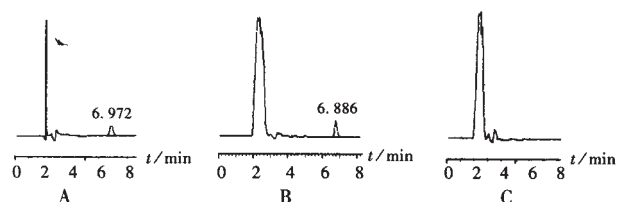
用光电二极管阵列检测器(DAD)在 0~14.3 min,190~330 nm 范围内采集全部光谱-色谱数据,绘制三维光谱-色谱图。选择背景吸收小、主药峰面积大的吸收波长,最终定为 204 nm。

#### 2.2.4 标准曲线的绘制

取 PGE<sub>1</sub> 原料药,精密称定,以甲醇配制成浓度为 100 μg/mL 的贮备液,分别精密吸取 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,置 10 mL 量瓶中,用甲醇定容,配制成浓度为 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 μg/mL 的标准溶液,以浓度(X)对峰面积(Y)作图,得标准曲线为  $Y=6101.3X$ ,  $r=0.9993$ 。表明在 5~100 μg/mL 浓度间峰面积的响应值与 PGE<sub>1</sub> 进样量有良好的线性关系。

#### 2.2.5 样品含量测定

在本色谱条件下,按 2.2.2 项下方法处理 PGE<sub>1</sub> 脂质体,进样,得色谱图(图 1),保留时间在 6.9 min 左右。按 PGE<sub>1</sub> 峰计算,理论塔板数均 ≥ 3000, PGE<sub>1</sub> 与其相邻的杂质峰的分度为 4.2,按规定方法制备 3 批样品的供试品溶液,分别进行 PGE<sub>1</sub> 含量测定,结果



A. PGE<sub>1</sub> 原料药溶液 B. PGE<sub>1</sub> 脂质体溶液 C. 空白脂质体溶液

图 1 样品高效液相色谱图

平均标示量分别为 99.87% 99.75% 99.94%, RSD 分别为 2.1%, 1.1%, 1.4% ( $n=5$ )。

### 2.3 包封率的测定及回收率考察

取 PGE<sub>1</sub> 脂质体,用 1 mL 甲醇溶液,以 HPLC 法测定药物含量得全药浓度。另取相同批号 PGE<sub>1</sub> 脂质体,用 1 mL 蒸馏水水化,于 100 000 G 4℃ 条件下离心 2 h,准确测量上清液体积,以 HPLC 法测定上清液中药物含量,计算单位体积的药物含量,即为游离药物浓度。由下述公式计算得 PGE<sub>1</sub> 脂质体的包封率为(92.35 ± 1.74)%。

$$\text{包封率} = 1 - \frac{\text{游离药物浓度}}{\text{全药浓度}}$$

精密称取 PGE<sub>1</sub> 原料药,制成 20, 30, 40 μg/mL 的高、中、低 3 种不同浓度的 PGE<sub>1</sub> 受试品溶液,分别按包封率测定方法(经低温超高速离心,固相萃取,以 HPLC 法测定)测得样品浓度,并与标准样品浓度相比,求得空白回收率,结果见表 1。

表 1 PGE<sub>1</sub> 空白回收试验结果 ( $n=5$ )

加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)
20.21	20.17 ± 0.19	99.82 ± 0.95	
30.37	29.69 ± 0.33	97.76 ± 1.09	98.50 ± 1.21
40.16	39.32 ± 0.63	97.91 ± 1.58	

另取同一批号的空白脂质体,随机分成 3 组,用 1 mL 水超声水化,分别加入上述高、中、低 3 种不同浓度的 PGE<sub>1</sub> 受试品,按包封率测定方法测定游离药物含量。离心后上清液中样品含量与加样样品含量相比,求得加样回收率,结果见表 2。

表 2 PGE<sub>1</sub> 加样回收试验结果 ( $n=5$ )

批号	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)
1	20.21	18.89 ± 0.46	93.48 ± 2.30	
2	30.37	29.31 ± 0.40	96.51 ± 1.32	95.59 ± 1.76
3	40.16	38.87 ± 0.67	96.78 ± 1.66	

### 2.4 脂质体粒径大小测定

将制备的样品用水稀释后,以激光粒度测定仪测定样品的平均粒径。结果平均粒径为 127.5 nm,多相分散系数为 0.28。

## 3 PGE<sub>1</sub> 脂质体加速试验

根据 2000 年版《中国药典(二部)》中关于微囊、微球与脂质体制剂的稳定性考察要求,采用加速试验法考察脂质体的稳定性。取 3 批不同批号的 PGE<sub>1</sub> 冻干脂质体,置人工气候箱,调节温度为(25 ± 2)℃,放置 6 个月。在试验期间第 1, 2, 3, 6 个月未取样 1 次,按照前述方法对 PGE<sub>1</sub> 脂质体药物含量、包封率进行测定,结果见表 3。

表 3 不同批号 PGE<sub>1</sub> 脂质体稳定性考察结果 ( $n=10$ )

放置时间(月)	PGE <sub>1</sub> 含量(μg/mL)				包封率(%)			
	031101	031102	031103	$\bar{X} \pm s$	031101	031102	031103	$\bar{X} \pm s$
0	29.961	29.925	29.981	29.96 ± 0.028	92.35	92.81	92.44	92.53 ± 0.244
1	26.129	26.857	26.716	26.57 ± 0.386	90.30	91.07	90.85	90.74 ± 0.397
2	24.055	24.921	24.876	24.62 ± 0.488	86.76	87.63	86.94	87.11 ± 0.459
3	18.497	18.261	18.335	18.36 ± 0.121	70.52	71.12	71.07	70.90 ± 0.333
6	16.597	16.547	15.779	16.31 ± 0.459	65.32	66.49	66.18	65.99 ± 0.606

从表 3 可见,脂质体的药物含量和包封率在第 1, 2 个月末基本没有变化,但在第 3 个月末时,药物含量和包封率明显下降。经激光微粒仪测量粒径,上述测量时间点粒径变化与含量、包封率的变化一致。

## 4 讨论

PGE<sub>1</sub> 对冠心病、心力衰竭、脑梗塞、肺动脉高压等疾病都具有良好的临床疗效,但此前上市的 PGE<sub>1</sub> 脂微球制剂因包封率不高、有效时间较短等缺点限制了临床应用。制备药物含量符合要求、包

## 葛芎通脉颗粒乙醇提取工艺的研究

王琴芳

(四川省眉山市第二人民医院,四川 眉山 612160)

中图分类号:TQ460.1 R282.71

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2005)02-0048-01

**摘要 目的:**优选葛芎通脉颗粒处方中葛根等药味的乙醇提取工艺条件。**方法:**采用正交试验法,以浸膏收得率和葛根素含量为评价指标。**结果:**最佳提取工艺条件为加10倍量、80%乙醇,提取3次,每次2h。**结论:**该工艺条件稳定,重复性好。

**关键词:**葛芎通脉颗粒;正交试验;提取;葛根素

葛芎通脉颗粒是根据临床经验方开发的中药新制剂,处方由葛根、川芎、延胡索、当归、白芷、桂枝等药材组成,具有活血化瘀、通络止痛的功效,主要用于治疗淤血阻滞所致头痛等症。方中葛根为君药,主要成分为黄酮类化合物,如大豆苷、大豆苷原、葛根素等<sup>[1]</sup>;延胡索主要含多种生物碱,如延胡索乙素、延胡索甲素、延胡索丙素等。工艺路线设计为将葛根与延胡索等4味药材合并加乙醇回流提取。笔者采用正交试验法,优化得到这4味药材的最佳提取工艺,现报道如下。

### 1 仪器与试剂

LC-2010A液相色谱仪(日本岛津);SPD-10A检测器;十分之一电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);减压干燥箱(上海一恒科技有限公司)。葛根素对照品(中国药品生物制品检定所);甲醇为色谱纯,水为重蒸馏水,其余试剂为分析纯。

葛根、川芎、延胡索等药材购于四川省中药材公司,均符合2000年版《中国药典(一部)》有关规定。其中葛根为豆科植物野葛 *Pueraria lobata*(Willd.)Ohiwi的干燥根,经测定,葛根素含量为3.4%,高于药典规定的含量限度<sup>[2]</sup>。

### 2 葛根素含量测定方法学研究<sup>[3]</sup>

#### 2.1 色谱条件

SunteK C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(25:75);检测波长:250 nm;流速:1.0 mL/min;室温;进样量10 μL。理论塔板数按葛根素峰计算不低于4 000。

#### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取葛根素对照品10.5 mg,置25 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,作为葛根素对照品贮备液,精密吸取2 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,得每1 mL含葛根素0.084 mg的对照品溶液。

#### 2.3 线性关系考察

精密吸取上述对照品贮备液0.5, 1, 2, 3, 4, 5 mL,分别置

封率较高和粒径大小合适且均匀的脂质体制剂,是其临床应用的先决条件<sup>[6]</sup>。笔者采用逆相蒸发法结合高压微射流(MFIC)技术制得的脂质体药物含量稳定,包封率高于90%,有较高的应用价值。

脂质体是由磷脂、胆固醇等为膜材包合而成,进行主药含量测定时需排除辅料的干扰。采用固相萃取技术可成功地对PGE<sub>1</sub>与磷脂、胆固醇的有效分离,分离后进行高效液相色谱测定,色谱峰峰形较好,采用加速试验法考察脂质体的稳定性,为该脂质体的处方优化、贮藏条件选择及储存时间预测提供了依据。

### 参考文献:

- [1] Katori M, Takeda K, Imai S. Effects of prostaglandins E<sub>1</sub> and Flalpha on the heart-lung preparation of the dog[J]. *Tohoku J Exp Med*, 1970, 101(1): 67-75.

10 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀。分别精密吸取该对照品溶液10 μL进样,测定峰面积。以葛根素峰面积积分值(Y)对进样量(X)进行线性回归,得回归方程:Y=483 786X-1 725, r=0.999 9。表明进样量在0.21~2.1 μg范围内,线性关系良好。

#### 2.4 精密度试验

精密吸取2.2项下对照品溶液10 μL,连续进样5次,分别测定峰面积。结果RSD=0.8%。

#### 2.5 回收率试验

精密吸取已知葛根素含量的样品溶液6份,每份1 mL,置25 mL量瓶中,分别加入不同量的葛根素对照品,用乙醇稀释至刻度,摇匀,用0.45 μm微孔滤膜滤过,依法测定葛根素含量,计算回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果

加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.95	2.024	97.2	99.3	1.3
0.98	2.072	99.1		
1.01	2.106	99.5		
1.08	2.183	100.2		
1.12	2.210	99.0		
1.18	2.291	100.8		

### 3 提取工艺研究

采用L<sub>6</sub>(3<sup>4</sup>)正交试验,以浸膏收得率与提取液中葛根素含量为评价指标,筛选葛根等药味乙醇回流提取的最佳工艺条件。

**因素与水平:**根据文献及预试验结果,将乙醇浓度(A)、溶剂用量(B)、提取时间(C)及提取次数(D)作为考察因素,因素水平见表2。

**正交试验:**按处方量称取葛根等4味药材,按表3设计的工艺条件回流提取,滤过,合并滤液,适当浓缩,定容至500 mL,供含量测定与出膏率测定用。取提取液50 mL,置已干燥至恒重的蒸发皿

- [2] 王地槐. 前列腺素E<sub>1</sub>软膏对难治性皮肤溃疡局部血流量的影响[J]. *国外医学·皮肤病学分册*, 1995, 21(5): 308.
- [3] 许铁男. 日本对前列腺素相关药物的研究开发[J]. *国外医药·合成药、生化药、制剂分册*, 1995, 16(2): 82-90.
- [4] Toyota T, Hirata Y, Ikeda Y, et al. Lipo-PGE<sub>1</sub>: a new lipid-encapsulated preparation of prostaglandin E<sub>1</sub>: Placebo and prostaglandin E<sub>1</sub> controlled multicenter trials in patients with diabetic neuropathy and leg ulcers[J]. *Prostaglandin*, 1993, 46(5): 453-456.
- [5] Davidson SM, Cabral LD, Mauro FP, et al. Association and release of PGE<sub>1</sub> from liposomes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1327(1): 97-106.
- [6] Hofland HEJ, Van Der Geest R, Bodde HE, et al. Estradiol permeation from nonionic surfactant vesicles through human stratum corneum in vitro[J]. *Pharm Res*, 1994, 11(5): 659-664.

(收稿日期 2004-07-16, 修回日期 2004-10-09)