

· 研究报告 ·

## 紫草素钠脂质体的制备及性能研究

施磊<sup>1</sup>, 叶隽<sup>1</sup>, 宋磊<sup>2</sup> (1. 上海市静安区食品药品检验所, 上海 200435; 2. 上海市交通大学医学院附属同仁医院, 上海 200050)

**[摘要]** 目的 研究紫草素钠脂质体的制备工艺并考察其性质, 旨在开发一种安全高效的紫草新型制剂。方法 利用碱溶酸提法纯化紫草提取物, 并采用乙醇注入法制备紫草素钠脂质体, 测定其形貌、粒径和 Zeta 电位。利用高效液相建立左旋紫草素含量测定方法, 并考察了脂质体包封率和体外释放性能。结果 紫草素钠脂质体平均粒径为 104.2 nm 左右, 且大小均一, 成正态分布; Zeta 电位为 -14.8 mV; 左旋紫草素在 5~50 mg/L 范围与峰面积呈良好的线性关系, 相关系数为 0.999 9; 紫草素钠脂质体的包封率为 43.67%, 药物累积释放量为 65.82%。结论 成功制备了紫草素钠脂质体, 具有较高的包封率和体外释放率。

**[关键词]** 脂质体; 紫草; 左旋紫草素; 体外释放

**[中图分类号]** R943

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2019)01-0069-05

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.016

## Preparation and properties of alkalized shikonin liposome

SHI Lei<sup>1</sup>, YE Jun<sup>1</sup>, SONG Lei<sup>2</sup> (1. Shanghai Jingan Institute for Food and Drug Control, Shanghai 200435, China; 2. Tongren Hospital Affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200050, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the preparation and properties of alkalized shikonin liposome. **Methods** Alkalized shikonin was purified from extracts of radix lithospermi with an alkali solution and acid formulation, and then the alkalized shikonin liposome was prepared by ethanol injection. The morphology, particle size and Zeta potential were determined, and the encapsulation efficiency and the *in vitro* release property were investigated. The content of *L*-shikonin was also measured by High Performance Liquid Chromatography. **Results** Alkalized shikonin liposome presented even sphere and normal distribution with particle size of 104.2 nm. The Zeta potential was -14.8 mV. *L*-shikonin was linear in the range of 5-50 mg/L with the correlation coefficient 0.999 9. The encapsulation efficiency was 43.67%. The final release rate was 65.82%. **Conclusion** Alkalized shikonin liposome was prepared successfully with good entrapment efficiency and *in vitro* release property.

**[Key words]** liposome; radix lithospermi; *L*-shikonin; *in vitro* release property

紫草有消炎<sup>[1]</sup>、抗菌<sup>[2]</sup>、抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗病毒<sup>[4]</sup>等多种药理作用, 多用于治疗褥疮、尿布疹、皮肤烧伤、湿疹等各种皮肤炎症, 临床应用前景广阔<sup>[5-6]</sup>。临床研究发现紫草中的主要活性物质紫草素(shikonin)不仅具有抗菌消炎和抗氧化等多种药理作用, 而且能够促进皮肤生长和伤口愈合<sup>[7]</sup>。由于紫草素为脂溶性活性物质, 因此目前常见的紫草制剂多为油性基质的膏剂, 活性成分易氧化变质, 且吸收性和舒适度较差。此外, 近年来研究发现紫草科植物中多含有吡咯里西啶类生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs), 这是一种肝毒性植物毒素, 长期或过量应用会损害肝脏<sup>[8-10]</sup>。因此, 欧美国家紫草相关制剂的

应用必须严格按照处方或医嘱。而我国目前市场上的大部分紫草相关制剂依旧直接以紫草提取物入药, 为临床应用带来极大的安全隐患。

针对这些不足, 近年来关于紫草素新型制剂的开发研究已有报道<sup>[11-12]</sup>, 但这些研究均是以紫草提取物为主药, 其成分复杂, 含有较多杂质, 不仅影响药效, 而且 PAs 的潜在危害依然存在。因此, 基于这一现状, 本研究拟将紫草提取物提纯, 并将其以碱性有机盐的形式制备成脂质体, 对其形貌、包封率和体外释放等性质进行考察, 为安全的新型紫草制剂的开发提供参考。

### 1 实验仪器及材料

#### 1.1 仪器

沃特世 E-2695 液相色谱仪(沃特世科技有限公司), Hitachi H7650 透射电子显微镜(HITACHI 公

**[作者简介]** 施磊, 主管药师, Email: yhh451@sohu.com

**[通讯作者]** 宋磊, 主管药师, Email: 13661829392@qq.com

司),PHS-3C型 pH计(上海雷磁科学仪器股份有限公司),JY92-IIN超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),ZS90纳米粒径电位分析仪(英国马尔文公司)。

## 1.2 材料

左旋紫草素对照品(批号,110769-200506,成都普思生物科技有限公司),紫草(上海市童涵春堂中药店),甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司),其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 紫草素的提取和提纯

取 5 g 紫草粉末浸没于 60 ml 石油醚中, 65 °C 搅拌 3 h, 冷却后过滤, 加入新的石油醚 60 ml 重复提取 2 次。合并滤液, 浓缩得紫草提取物粗品 0.71 g, 提取率为 14.2%。将该粗品溶于 60 ml 石油醚中并加入等体积饱和碳酸钠溶液, 40 °C 条件下剧烈搅拌 4 h 后, 分离上层有机液, 加饱和碳酸钠溶液萃取多次, 直到下层不显蓝色, 合并碱性水溶液, 酸化后以乙酸乙酯萃取多次, 直至上层无明显红色, 合并有机层浓缩, 得到纯化的紫草素 0.14 g 提取率为 2.8%(以紫草粉末质量计)。

以 HPLC 检测紫草素提取物和提纯后的紫草素, 检测结果见图 1: 以左旋紫草素对照品为参照, 由图 1C 可知其出峰时间约为 7.9 min, 而紫草素提取物(图 1A)和碱化提纯的紫草素(图 1B)也均在 7.9 min 左右出峰, 可见二者主要成分为左旋紫草素。但将紫草素提取物与后者相对比, 发现紫草提取物中含有更多杂峰, 这是由多种杂质引起的, 而紫草素碱化提纯后则非常纯净, 其纯度达到 99.35%, 除左旋紫草素之外, 几乎不含有其他成分。

### 2.2 脂质体的制备

#### 2.2.1 紫草素脂质体

精密称取 10 mg 胆固醇, 50 mg 卵磷脂和 5 mg 紫草素粗提物溶于 10 ml 无水乙醇中超声溶解, 并将其用注射器匀速注入已水浴恒温 50 °C 的 PBS 溶液(pH 7.4, 10 ml)中, 反应 30 min 后取出, 将溶液置于旋转蒸发器上 35 °C 温度下减压蒸发, 除去有机溶剂。剩余溶液于 50 °C 保温 1 h, 冷却后超声 10 min, 分别以 0.45、0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 得到碱化紫草素脂质体, 封装并于 4 °C 保存。用同样方法制备空白脂质体。

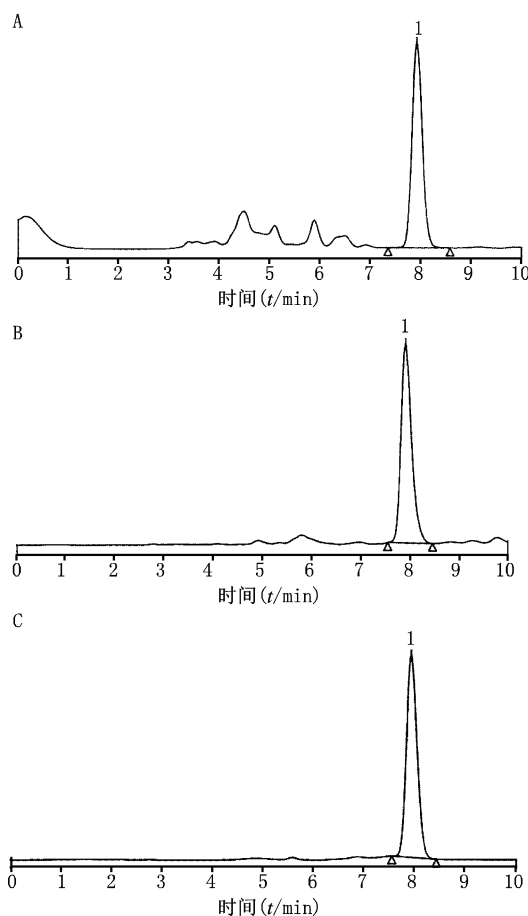


图 1 紫草提取物(A)、碱化紫草素(B)和对照品(C)的 HPLC 图

A. 紫草提取物; B. 碱化紫草素; C. 对照品; 1. 左旋紫草素

#### 2.2.2 紫草素钠脂质体

为提高药物的体外释放度, 先将紫草素溶于少量饱和碳酸钠中使之完全生成水溶性的紫草素钠盐, 并以 pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液定容至 10 ml。其他物料的加入以及制备方法与紫草素脂质体制备方法完全相同。

### 2.3 脂质体的外观形态、粒径和 Zeta 电位的测定

将脂质体加适量超纯水稀释后制样, 在透射电子显微镜下观察其外观形态, 并用纳米粒径电位分析仪测其粒径大小和 Zeta 电位, 结果如图 2 所示: 粒径分析结果显示空白脂质体的平均粒径为 98.11 nm, 聚合物分散性指数(PDI)为 0.117; 而紫草素钠脂质体的平均粒径为 104.2 nm, PDI 为 0.103。两种脂质体粒径大小均一, 有明显的双分子层结构, 均呈正态分布, 且紫草素钠脂质体 PDI 值较小, 说明紫草素钠脂质体的分散度较好。由 Zeta 电位图可以看出, 空白脂质体的 Zeta 电位为 -15.0 mV, 紫草素钠脂质体的 Zeta 电位为 -14.8 mV, 说明以上两种脂质体的稳定

性相当。将纯化的紫草素以钠盐的形式制备成紫草素钠脂质体,与空白脂质体相比粒径有所增加,且中

心不透明,这是由于紫草素碱化成盐后亲水性增强,紫草素钠脂质体被包封在内水相中引起的。

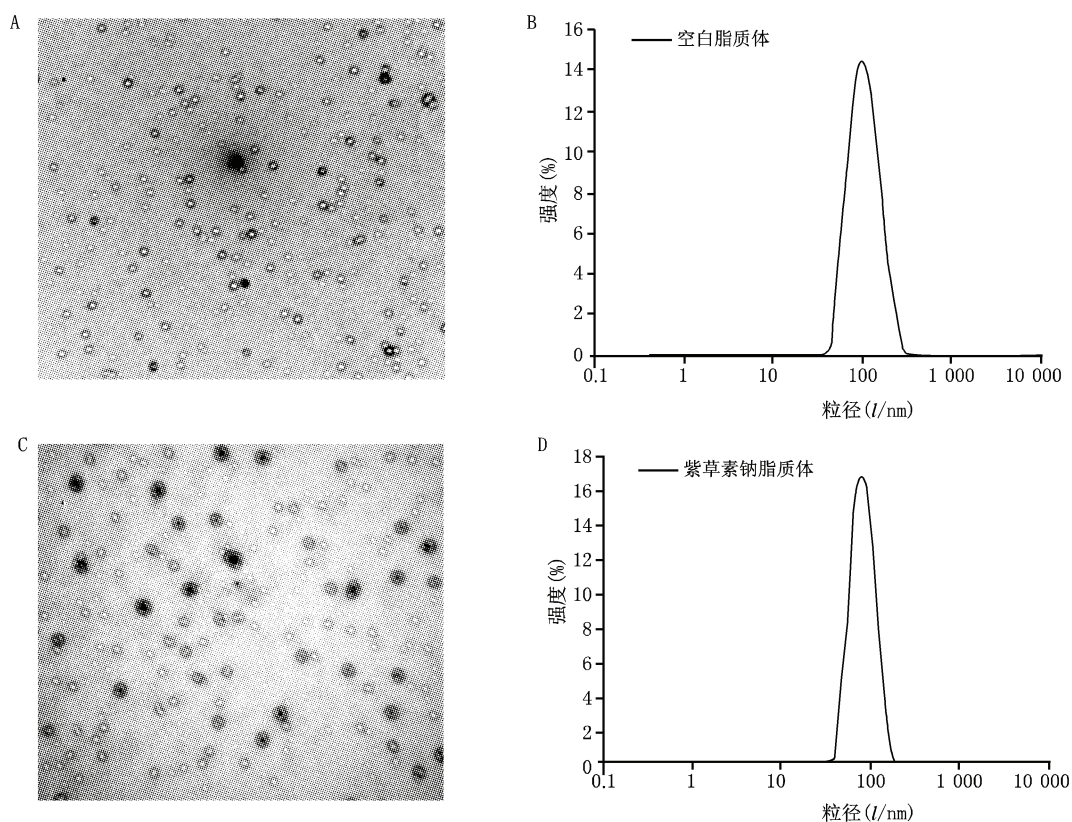


图2 空白脂质体(A、B)和紫草素钠脂质体(C、D)的透射电镜图和粒径分布图

#### 2.4 左旋紫草素含量测定<sup>[13-14]</sup>

色谱条件:色谱柱:Inertisl<sup>®</sup> ODS-3(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.025 mol/L 磷酸(85:15);流速:1.0 ml/min 检测波长:516 nm;柱温:25 °C;进样量:20 μl。

标准曲线绘制:精密量取浓度为100 μg/ml的储备液0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 ml,分别于10 ml的容量瓶中用甲醇定容,配制成5、10、20、30、40、50 μg/ml的对照品溶液,高效液相色谱检测并记录峰面积A,绘制峰面积A-对照品质量浓度C的标准曲线并进行线性回归分析,得到紫草标准曲线方程: $A=3\,429.474\,2C-319.393\,6(r=0.999\,96)$ 。结果表明紫草素在5~50 μg/ml范围内线性关系良好。

#### 2.5 包封率测定

包封率是指包封在脂质体内的药物量占投料量的百分比,是评定脂质体制剂质量的一个重要指标。将脂质体溶于pH7.4的磷酸盐缓冲溶液中并定容至10 ml,量取3 ml加适量甲醇超声破乳,再加甲醇定容至5 ml,并在12 000 r/min条件下离心10 min,取上清液,测其浓度为脂质体中紫草素总量,记为

$C_{总}(\mu\text{g/ml})$ ;另取3 ml的紫草素钠脂质体混悬液在5 500 r/min条件下离心10 min,然后取上清液,测得未包入脂质体的游离紫草素浓度 $C_{游}(\mu\text{g/ml})$ ,然后根据公式(1)计算其包封率。

$$\text{包封率} = (C_{总} - C_{游}) / C_{总} \times 100\% \quad (1)$$

实验表明,紫草提取物脂质体的包封率为20.4% (20.11%、20.42%、20.57%; RSD为1.2%),而紫草素钠脂质体的包封率为43.7% (44.02%、43.16%、43.84%; RSD为1.0%),与前者相比,紫草素碱化成盐后包封率提高1倍。其原因主要是由于包封率测试是以左旋紫草素为参照,在药物加入量相同的情况下,紫草素钠脂质体中紫草素纯度更高,因此表现出较高的包封率。

#### 2.6 体外释药特性

采用动态透析法测定脂质体的体外释放特性:将脂质体溶于pH7.4的磷酸盐缓冲溶液中并定容至10 ml,并置于透析袋中,以含有0.5%吐温-80的磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)为释放介质,(37±0.5)°C下搅拌,分别于1/3、2/3、1、2、4、6、8、10、12、24 h取样1 ml,同时补加相同温度相同体积的释放介质,测样品中紫草素浓度,并按公式(2)计算药物累计释

放量  $Q$ 。

$$Q = (C_n + V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i) / M_d \times 100\% \quad (2)$$

式中： $Q$ 为药物累计释放量，单位为%； $C_n$ 为第  $n$  次取样的紫草素浓度，单位为  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ； $V_e$ 为取样体积，单位为  $\text{ml}$ ； $M_d$ 为脂质体中包载的药物质量，单位为  $\text{mg}$ 。

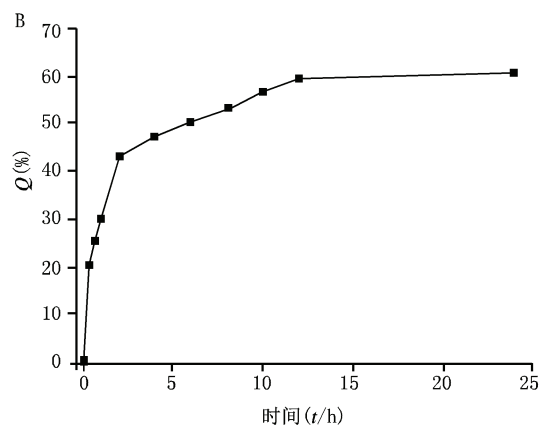
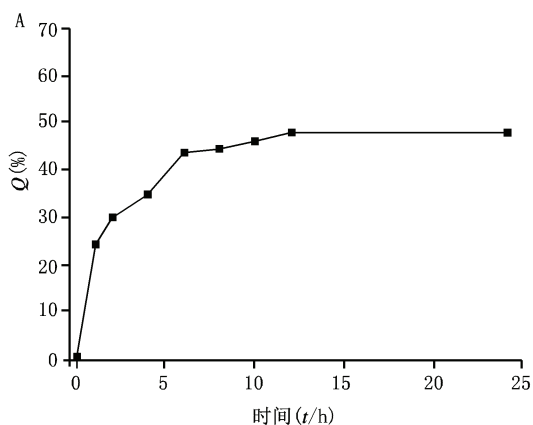


图3 紫草素脂质体(A)和紫草素钠脂质体(B)的药物累计释放曲线

### 3 讨论

本研究首先对紫草素提取物进行碱化提纯。紫草素是紫红色的蒽醌类脂溶性生物活性物质，因为

具有酚羟基而显酸性，其侧链上的酯键在碱性条件下会水解，并与碱离子形成水溶性的紫草素盐，其颜色为蓝色，加入酸后，又可形成脂溶性的紫红色紫草素，其转化过程见图4。

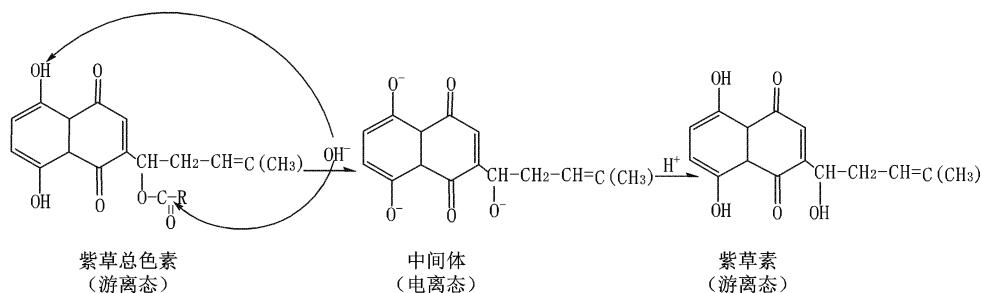


图4 紫草素碱化过程

经过碱溶酸沉法提纯后，紫草素被有效纯化，紫草提取物中大部分有害杂质均被除去(图1)，其安全性大大提高，对解决现有市场上紫草相关制剂安全问题有积极意义。此外，对紫草素钠脂质体性质研究发现，与紫草素脂质体相比，由于所含药物纯度和亲水性更高，其脂质体包封率和体外释放度均比后者有较大提高，有利于提高药效，为开发安全、高效的紫草新型制剂提供思路。

### 【参考文献】

[1] DRAGICEVIC-CURIC N, WINTER S, KRAJISNIK D, et al. Stability evaluation of temoporfin-loaded liposomal gels for

topical application[J]. J Liposome Res, 2010, 20(1): 38-48.

[2] SHEN C C, SYU W J, LI S Y, et al. Antimicrobial activities of naphthazarins from *Arnebia euchroma* [J]. J Nat Prod, 2002, 65(12): 1857-1862.

[3] 帅冬华. 紫草中化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中外医疗, 2009, 28(22): 103-104.

[4] 艾庆波, 刘玉璇, 国大亮. 中药紫草的研究进展[J]. 齐鲁药事, 2010, 29(10): 609-611.

[5] 严松柏, 谈献和, 胡玉涛. 紫草的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(2): 103-105.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 版(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1587.

[7] 徐颖, 王敏伟, 中谷一泰.  $\beta$ -羟基异戊酰基紫草素对高表达酪氨酸激酶肿瘤细胞系的生长抑制作用[J]. 沈阳药科大学学

报, 2003, 20(3): 203-206.

- [8] 汤俊.《中国药典》含吡咯里西啶生物碱的中品种与用药安全[J]. 药学学报, 2011, 46(7): 762-772.
- [9] XIONG A, LI Y, YANG L, et al. Simultaneous determination of senecionine, adonifoline and their metabolites in rat serum by UPLC-ESIMS and its application in pharmacokinetic studies[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, 50(5): 1070-1074.
- [10] 李蔚仑, 李军生, 黄国霞, 等. 乙酰紫草素的潜在毒性机理研究及毒性评价[J]. 食品工业, 2015, 36(5): 174-178.
- [11] LI H, CHEN Y, DENG Y, et al. Effects of surface charge of low molecular weight heparin-modified cationic liposomes on

drug efficacy and toxicity[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2017, 43(7): 1163-1172.

- [12] 岳永阳. 脂质体在中药制剂中的研究及应用进展[J]. 首都食品与医药, 2015, 22(12): 100-102.
- [13] 周彤. 复方紫草凝胶剂的制备与研究[D]. 天津: 天津工业大学, 2017.
- [14] 咎珂, 苏蕊, 滕爱君, 等. 新疆紫草 HPLC 特征图谱和紫草类药材 6 种萘醌类成分含量测定[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(9): 1526-1535.

[收稿日期] 2018-07-22 [修回日期] 2018-11-12

[本文编辑] 陈盛新

(上接第 18 页)

根据目前的文献报道, 鲜有将 D-gal 整体及离体模型联合应用于发病机制及药效学评价过程, 所以本研究将两者结合应用可能会在新药研发以及阐明认知功能下降机制等研究领域发挥一定的积极作用。

经过多次 Morris 水迷宫实验发现, 在前 2 天的训练过程中, 可适当延长动物在平台上的停留时间至 20 s, 以便给动物更多的时间对周围环境和空间线索进行学习记忆。与此同时, 在实验过程中需要密切监视每只受试动物的行为表现, 由于每只动物每天共进行 4 次实验, 对于明显不符合其他 3 次实验结果的数据可以考虑进行重新检测。对于在不同训练日出现波动甚至相反实验结果的实验个体可以考虑剔除或者增加训练次数。对于个别始终找不到平台的动物, 除了考虑其认知功能确实下降之外, 还应综合考虑水温、环境等外界因素对动物行为本身的干扰, 特别是水温对于受试动物的行为影响较大。由于动物行为学实验数据存在的波动性较大, 针对 D-gal 模型, 根据荟萃分析的报道<sup>[11]</sup>, 有 1% 的文献采用不同动物行为学方法联合检测, 包括 Y 迷宫、穿梭箱等, 虽然所占比例较低, 但是不失为一个优选策略。联合应用动物行为学方法可以考察不同方面的认知功能以互补长短, 使结果更具有说服力。

## 【参考文献】

- [1] MIQUEL S, CHAMP C, DAY J, et al. Poor cognitive ageing: vulnerabilities, mechanisms and the impact of nutritional interventions[J]. Ageing Res Rev, 2018, 42: 40-55.
- [2] CHAN K Y, WANG W, WU J J, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China,

1990-2010: a systematic review and analysis[J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2016-2023.

- [3] KANG E, WEN Z, SONG H, et al. Adult neurogenesis and psychiatric disorders[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(9): a019026.
- [4] ERNST A, ALKASS K, BERNARD S, et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain[J]. Cell, 2014, 156(5): 1072-1083.
- [5] ALI T, BADSHAH H, KIM T H, et al. Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF- $\kappa$ B/JNK signaling pathway in aging mouse model[J]. J Pineal Res, 2015, 58(1): 71-85.
- [6] VORHEES C V, WILLIAMS M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 848-858.
- [7] MIYAMOTO T, STEIN L, THOMAS R, et al. Phosphorylation of tau at Y18, but not tau-fyn binding, is required for tau to modulate NMDA receptor-dependent excitotoxicity in primary neuronal culture[J]. Mol Cell Neurodegen, 2017, 12(1): 41.
- [8] HUSAIN M, MEHTA M A. Cognitive enhancement by drugs in health and disease[J]. Trends Cogn Sci (Regul Ed), 2011, 15(1): 28-36.
- [9] SHWE T, PRATCHAYASAKUL W, CHATTIPAKORN N, et al. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions[J]. Exp Gerontol, 2017, 101: 13-36.
- [10] WEI H, LI L, SONG Q, et al. Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. [J]. Behav Brain Res, 2005, 157(2): 245-251.
- [11] SADIGHETEGHAD S, MAJDI A, MCCANN S K, et al. D-galactose-induced brain ageing model: a systematic review and Meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices[J]. Plos One, 2017, 12(8): e0184122.

[收稿日期] 2018-07-02 [修回日期] 2018-09-12

[本文编辑] 李睿旻