

正交试验优选黄芪多糖脂质体的制备工艺

范云鹏, 王德云*, 胡元亮, 刘家国, 高 煥, 王远垒, 郭利伟

南京农业大学 中兽医学研究室, 江苏 南京 210095

摘 要: 目的 优选黄芪多糖脂质体制备的最佳工艺。方法 采用薄膜分散-微孔滤膜挤压法制备黄芪多糖脂质体, 以包封率和载药量为指标, 以脂药比、膜材比和超声时间为因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计对制备条件进行优选, 鱼精蛋白法测定黄芪多糖脂质体的包封率, 透射电镜测定其形态和粒径。结果 薄膜分散-微孔滤膜挤压法制备黄芪多糖脂质体的最佳工艺为脂药比 10:1, 膜材比 8:1, 超声时间 20 min。结论 采用最佳工艺制备的黄芪多糖脂质体包封率和载药量较高, 形态和粒径较均匀, 重现性好。

关键词: 黄芪多糖脂质体; 薄膜分散-微孔滤膜挤压法; 正交试验; 包封率; 鱼精蛋白法

中图分类号: R283.6; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0470-04

Preparation condition optimization of astragalus polysaccharide liposome by orthogonal test

FAN Yun-peng, WANG De-yun, HU Yuan-liang, LIU Jia-guo, GAO Huan, WANG Yuan-lei, GUO Li-wei

Institute of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Objective To optimize the preparation conditions of astragalus polysaccharide (APS) liposome. **Methods** APS liposome was prepared by membrane distribution-micromembrane extruding method. $L_9(3^4)$ orthogonal test was adopted to optimize the preparation conditions which was designed with three factors of lecithin to drug ratio, lecithin to cholesterol ratio, and ultrasonic time, and two indexes of encapsulation efficiency and drug-loading rate. The encapsulation efficiency of APS liposome was assayed by Protamine method, the shape and particle size were observed by transmission electron microscope. **Results** The optimized preparation conditions were as follows: the ratio of lecithin to drug was 10:1, the ratio of lecithin to cholesterol was 8:1, and ultrasonic time was 20 min. **Conclusion** The APS liposome prepared under the optimized conditions has following advantages: high encapsulation efficiency and drug-loading rate, uniform shape and particle size, and good reproduction quality.

Key words: astragalus polysaccharide (APS) liposome; membrane distribution-micromembrane extruding; orthogonal test; encapsulation efficiency; Protamine method

黄芪多糖 (astragalus polysaccharide, APS) 是黄芪的主要有效成分, 在调节免疫、抗病毒、抗衰老等方面具有重要作用^[1-4]。目前大多数黄芪多糖制剂在使用过程中药物在到达作用部位之前, 已被降解代谢或排除, 因此需要大剂量或是连续给药。研究新型的黄芪多糖制剂或是选择一种高效的载体以提高治疗效果并降低使用剂量, 对黄芪多糖的临床应用具有重要意义。脂质体具有靶向释药、缓释、无免疫原性、降低药物不良反应等优势, 近年来作

为药物载体已被广泛研究^[5-10]。本研究采用薄膜分散-微孔滤膜挤压法制备 APS 脂质体, 采用正交试验设计筛选出制备 APS 脂质体的最佳工艺, 旨在提高黄芪多糖的功效。

1 仪器与材料

Model RE—52A 型旋转蒸发仪, 上海亚荣生物仪器公司; 754 紫外可见分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司; SB3200 超声波清洗器, 上海新芝生物技术研究所以; Model H—7650 型透射电子显微

收稿日期: 2010-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30901085); 国家科技支撑计划 (2008BADB4B06)

作者简介: 范云鹏 (1983—), 男, 山东烟台人, 在读博士研究生, 主要从事兽医中药学与中药药理学研究。

Tel: 13770610887 E-mail: 2007107121@njau.edu.cn

*通讯作者 王德云 Tel: (025)84395203 E-mail: dywang@njau.edu.cn

镜, Hitachi, High-Technologies 公司; BS110S 型电子天平, Sartorius 公司。

黄芪购自南京大华中药房, 由南京农业大学园艺学院中药学周立良副教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 的干燥根; 大豆卵磷脂 (批号 20090728), 上海太伟磷脂有限公司; 胆固醇 (批号 20090908), 天津市博迪化学有限公司; 鱼精蛋白 (批号 P4380), Sigma 公司; Triton-100 (批号 9002-93-1), 上海源叶生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 APS 的制备

取蒙古黄芪 2.0 kg, 加 8 倍量水煎煮 2 次, 合并滤液浓缩至 2.0 L, 缓慢加入 95%乙醇至乙醇体积分数达 60%, 搅匀, 静置 24 h, 取沉淀, 挥去乙醇, 加蒸馏水溶解, 重复醇沉 1 次。取沉淀冷冻干燥, 得黄芪多糖, 质量分数为 87%。

2.2 制备工艺设计

在预试验的基础上, 发现脂药比 (卵磷脂与药物质量比)、膜材比 (卵磷脂与胆固醇质量比) 和超声时间对脂质体的制备影响最大, 因此, 以脂药比 (A)、膜材比 (B) 和超声时间 (C) 为考察因素, 按 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验, 因素水平见表 1。

表 1 因素水平
Table 1 Factors and levels

水平	因 素		
	A	B	C/min
1	10 : 1	4 : 1	10
2	15 : 1	6 : 1	20
3	20 : 1	8 : 1	30

2.3 APS 脂质体的制备^[11]

将大豆卵磷脂 (1 g)、胆固醇、维生素 E (0.025 g) 溶解于乙醇-氯仿 (1 : 1) 中, 混匀后倒入梨形瓶, 在 30 r/min, 水浴条件下旋转蒸干溶剂, 使其在玻璃瓶壁上形成干膜。将 APS 溶解在 PBS 溶液中 (3 个水平下 APS 的用量分别为 100、66.7、50 mg), 再将 APS 溶液倒入梨形瓶中, 在 40 r/min, 旋转水化直至将瓶壁上的干膜完全洗脱下来为止, 并将所得粗混悬液在 25 °C 下水化 1 h, 然后水浴超声 20 min。将所得粗混悬液依次通过 0.8 μ m 微孔滤膜 1 次, 0.45 μ m 微孔滤膜 3 次, 0.22 μ m 微孔滤膜

3 次, 即得 APS 脂质体混悬液。

2.4 APS 脂质体包封率和载药量的测定^[12]

吸取 0.5 mL 脂质体于 10 mL 锥形离心管中, 添加 0.5 mL 鱼精蛋白 (10 mg/mL), 搅匀, 静置 3 min, 加入 3 mL 生理盐水, 在室温条件下离心 30 min (3 000 r/min), 上清液以生理盐水定容至 10 mL。取 1 mL 溶液, 测定其多糖量, 即游离药物量。沉淀以 10% Triton-100 3 mL 溶解, 并补充生理盐水至 10 mL。取 1 mL 溶液, 测定其多糖量, 即包封药物量。

$$\text{包封率} = 1 - C_f / C_s$$

$$\text{载药量 } W = (W_T - W_F) / W_P$$

C_f 为游离多糖量, C_s 为脂质体中包封的多糖与游离多糖之和; W_T 为脂质体溶液中多糖的总质量, W_F 为游离多糖的质量, W_P 为大豆卵磷脂和胆固醇的质量之和

2.5 APS 脂质体中多糖的苯酚-浓硫酸法测定^[13]

2.5.1 标准曲线 精密称取干燥至恒定质量的葡萄糖 10 mg 定容于 100 mL 量瓶中, 得质量浓度为 0.1 mg/mL 葡萄糖对照品溶液。在 6 支带塞试管中分别加入葡萄糖对照品溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 加蒸馏水至 2 mL, 再各加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 迅速垂直液面加入浓硫酸 5 mL, 混匀后在沸水浴中加热 15 min, 冷却后用分光光度计在 490 nm 处测定吸光度值 (以 0 mL 葡萄糖对照品溶液管吸光度值为校正值), 以葡萄糖质量浓度对吸光度值进行线性回归, 得回归方程 $Y = 59.36 X - 0.007 8$, $r^2 = 0.999 3$, 表明葡萄糖在 2.5~12.5 μ g/mL 线性关系良好。

2.5.2 样品测定 精密吸取脂质体溶液 1 mL, 加蒸馏水至 2 mL, 按上述方法测定样品吸光度值, 将吸光度值求平均数后代入回归方程, 计算, 即得。

2.6 正交试验结果分析

以包封率为指标, 各因素对包封率的影响大小依次为超声时间 > 膜材比 > 脂药比, 最佳制备工艺为 $C_2B_3A_2$ 。以载药量为指标, 各因素对载药量的影响大小依次为脂药比 > 膜材比 > 超声时间。最佳提取工艺为 $A_1B_3C_2$ 。因此, 最佳膜材比为 8 : 1, 最佳超声时间为 20 min。进一步进行 F 检验, 可知脂药比对载药量的影响较小, 因此脂药比为 10 : 1~15 : 1 均可, 但从实际生产考虑, 脂药比增大, 导致过滤困难, 因此选择脂药比为 10 : 1 (见表 2)。

2.7 APS 脂质体形态及粒径测定

吸取脂质体混悬液适量, 将其吸附于覆盖有碳

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果
Table 2 Results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	包封率/%	载药量/%
1	10:1	4:1	10	34.28	2.88
2	10:1	6:1	20	38.44	3.54
3	10:1	8:1	30	42.82	5.90
4	15:1	4:1	20	45.24	3.61
5	15:1	6:1	30	38.66	2.43
6	15:1	8:1	10	39.55	2.45
7	20:1	4:1	30	33.86	1.22
8	20:1	6:1	10	31.22	1.19
9	20:1	8:1	20	48.11	2.68
包封率					
$\bar{K}_1$	38.513	37.793	35.017		
$\bar{K}_2$	41.150	36.107	43.930		
$\bar{K}_3$	37.730	43.493	38.447		
R	3.420	7.386	8.913		
载药量					
$\bar{K}_1$	4.107	2.570	2.173		
$\bar{K}_2$	2.830	2.387	3.277		
$\bar{K}_3$	1.697	3.677	3.183		
R	2.410	1.290	1.104		

膜的铜网上, 自然晾干后置透射电镜下观察, 见图1。结果表明, APS 脂质体均匀圆整, 为球形或近球形, 脂质体可见明显的双层膜结构, 脂质体的平均粒径 $<150\text{ nm}$ 。

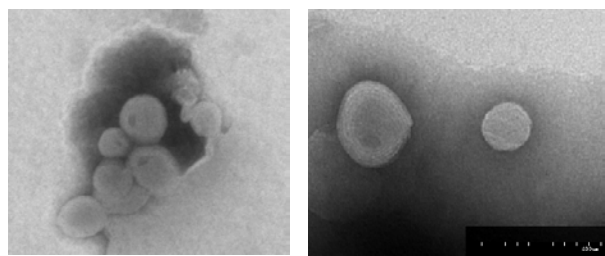


图1 APS 脂质体透射电镜图片

Fig. 1 Transmission electron micrograph of APS liposomes

2.8 验证试验

按正交试验优化工艺, 将反应原料(卵磷脂、胆固醇和 APS)数量增加1倍, 其他条件不变, 制备3批 APS 脂质体, 测定包封率和载药量, 结果分别为 47.48%、5.23%, 47.66%、5.57%, 47.37%、5.39%。

3 讨论

包封率是衡量脂质体内在质量的重要指标之一, 常用的分离方法有葡聚糖凝胶柱色谱法、透析法、超速离心法、超滤膜滤过法等^[14]。葡聚糖凝胶柱色谱法是较为常用的方法, 但是在柱色谱过程中, 洗脱液的体积流量及上样量的多少均对脂质体中分离游离药物有很大影响。若上样量大, 脂质体有拖尾现象; 若洗脱速度快, 则提前出峰, 分离效果不好^[15], 而上样量和洗脱速度较难控制, 需要反复摸索, 并且洗脱时间较长。采用葡聚糖凝胶柱色谱法分离纳米脂质体时, 由于其粒径小, 出柱晚, 与游离药物不能很好分离, 不能准确测定纳米脂质体($\leq 180\text{ nm}$)包封率^[16]。因为 APS 脂质体的平均粒径 $<150\text{ nm}$, 属于纳米脂质体, 因此本实验利用鱼精蛋白凝聚法分离 APS 脂质体, 以紫外分光光度法为分析手段, 测定 APS 脂质体药物包封率。这是因为鱼精蛋白凝聚法的适用范围比较广泛, 可以测定不同溶解性质药物脂质体的包封率, 对于不同粒径的脂质体, 通过调节鱼精蛋白用量可较准确地测定脂溶性药物脂质体的包封率, 且具有方法简单、速效的特点^[16]。

脂质体的制备方法很多, 常用的方法有薄膜法、高压均质法、逆相蒸发法和表面活性剂增溶法等^[17]。本试验采用的薄膜分散-微孔滤膜挤压法为薄膜法和高压均质法两者的简化方法, 大大降低了制备的成本, 并且通过此种方法制备的 APS 脂质体的包封率要高于李淑梅等^[18]通过逆相蒸发法和薄膜法制备的 APS 脂质体。

一般认为提高脂药比可以增大脂质体的包封率, 但本试验中发现, 随着脂药比的增大包封率并未出现显著增大。在试验中, 最终选择脂药比为 10:1, 在此条件下, 脂质体的粒径和形态均较均匀, 并且 APS 的包封率和载药量均能达到最大值。这是因为制备脂质体所需的卵磷脂质量(1 g)及 APS 质量浓度(4 mg/mL)一定, 随着脂药比的增大, 导致 APS 质量减少, PBS 溶液体积减少, 使得脂质体混悬液较为黏稠, 不容易通过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 给滤过增加了困难, 并导致粒径和形态不均匀。因此从实际生产考虑, APS 脂质体的最佳制备工艺为脂药比为 10:1, 膜材比 8:1, 超声时间 20 min。

包封脂质体最合适的药物是脂溶性好或水溶性特别好的两种类型药^[19]。由于 APS 的化学成分主要为葡聚糖和杂多糖, 而葡聚糖有水溶性的 α -

(1→4)(1→6)葡聚糖和水不溶性的 α -(1→4)葡聚糖两种^[20],这就导致了APS的溶解度一般,属于水溶性一般的药物。正是由于APS的这种性质,导致了APS脂质体中APS的包封率在50%以下。李淑梅等^[18]和Deng等^[21]研究也表明,APS脂质体的包封率在50%以下,与本试验结果相似。虽然APS脂质体中APS的包封率在50%以下,但是邓英杰等^[19]研究证明了APS脂质体比APS普通制剂和空白脂质体具有更加显著的免疫增强效果,说明脂质体能够显著提高APS的药效。因此脂质体作为APS的载体是切实可行的。

参考文献

- [1] Wang D Y, Hu Y L, Sun J L, *et al.* Comparative study on adjuvanticity of compound Chinese herbal medicinal ingredients [J]. *Vaccine*, 2005, 23(28): 3704-3708.
- [2] Yang Y F, Feng J Q, Xu H Y, *et al.* Influence of different extraction and purification methods on astragalus polysaccharides and pharmacological evaluation [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(1): 54-61.
- [3] 苏旭春, 梁傍顺, 郭晓东, 等. 黄芪多糖对化疗后气虚证患者青紫舌的改善作用 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 106-110.
- [4] 金 璋, 沈 洁. 注射用黄芪多糖对 II-III 期非小细胞肺癌放疗患者免疫功能的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 611-612.
- [5] 李春雷, 邓英杰. 国外部分公司脂质体药物研发现状 [J]. 中国药理学杂志, 2004, 2(3): 73-75.
- [6] 王学勇, 邱德文, 许建阳. 中药脂质体的研制与进展 [J]. 武警医学, 2004, 15(1): 61-62.
- [7] 杨硕晔, 王杏林, 杨志强, 等. HPLC 法测定洛莫司汀-碘海醇复方脂质体的药物含量及包封率 [J]. 药物评价研究, 2009, 32(1): 38-42.
- [8] 马金鹏, 舒乐新, 刘志东. 丹酚酸 B 脂质体的制备及其体外释药的研究 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 65-68.
- [9] 胡鹏翼, 郑 琴, 杨 明, 等. 硫酸铵梯度法制备槐定碱脂质体的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1970-1973.
- [10] 郭波红, 程 怡, 林绿萍. 甘草次酸脂质体的制备及其药剂学性质的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 380-383.
- [11] Zhang J A, Anyarambhatla G, Ma L, *et al.* Development and characterization of a novel Cremophor EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 59 (1): 177-187.
- [12] Gunter K K, Gunter T E, Jarkowski A, *et al.* A method of resuspending small vesicles separated from suspension by protamine aggregation and centrifugation [J]. *Anal Biochem*, 1982, 120(1): 113-124.
- [13] 余晓雷, 张 可, 郑旭霞. 芦荟中多糖含量测定方法的探讨 [J]. 营养学报, 2003, 25(2): 149-151.
- [14] Tuitou E, Junginger H E, Weiner N D, *et al.* Liposomes as carriers for topical and transdermal delivery [J]. *J Pharm Sci*, 1994, 83(9): 1189-1203.
- [15] 张彦青, 解军波, 陈文倩, 等. 正交试验优选石杉碱甲脂质体的制备研究 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 896-898.
- [16] 孙维彤, 黄桂华, 叶杰胜, 等. 鱼精蛋白凝聚法测定脂质体和纳米脂质体包封率 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(22): 1716-1720.
- [17] 王汝兴, 张宇丽. 脂质体的研究进展及其制备方法 [J]. 承德医学院学报, 2008, 25(2): 183-185.
- [18] 李淑梅, 杨 帆, 李 睿. 黄芪多糖脂质体的制备 [J]. 光谱实验室, 2008, 25(2): 164-166.
- [19] 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.
- [20] 李万玉, 李安荣, 徐晓玉, 等. 黄芪多糖的提取方法 [J]. 中国药业, 2009, 18(11): 87-88.
- [21] Deng Y J, Xu F, Jin Y G, *et al.* Preparation, stability and immunoenhancement of APS (astragalus polysaccharide) liposomes [J]. *J Chin Pharm Sci*, 1996, 5(2): 93-98.