

绞股蓝总皂苷脂质体的制备与表征

喻 樊^{1,2}

1. 盐城师范学院药学院, 江苏 盐城 224051

2. 盐城师范学院 江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室, 江苏 盐城 224002

摘要: **目的** 探讨用豆甾醇替代胆固醇制备绞股蓝总皂苷脂质体的可行性, 并获得最佳制备工艺与处方。**方法** 以卵磷脂和豆甾醇为膜材制备不含胆固醇的绞股蓝总皂苷脂质体; 脂质体以鱼精蛋白沉淀法进行封装率的测定; 以封装率为评定指标, 筛选该新型绞股蓝总皂苷脂质体的最佳制备方法; 采用正交设计优化该脂质体的制备工艺; 采用粒径、Zeta 电位、原子力显微镜 (AFM) 表征该新型绞股蓝总皂苷脂质体。**结果** 用豆甾醇替代胆固醇制备绞股蓝总皂苷脂质体的最佳制备方法为乙醇注入法, 通过正交设计得最佳工艺为绞股蓝总皂苷与卵磷脂的质量比为 1 : 10, 卵磷脂与豆甾醇的质量比为 4 : 1, PBS 缓冲溶液 pH 值为 7.0, 水化温度为 35 °C; 所得脂质体的封装率为 $(77.00 \pm 1.17)\%$, 粒径为 (202.6 ± 3.9) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.108 ± 0.003 , 电位为 (-28.66 ± 0.86) mV, 该脂质体在电镜下呈规则圆形。**结论** 用豆甾醇替代胆固醇制备绞股蓝总皂苷脂质体方法可行, 采用最佳工艺制备的绞股蓝总皂苷封装率高, 形态和粒径均较好, 重现性好。

关键词: 绞股蓝总皂苷; 脂质体; 豆甾醇; 制备工艺; 正交设计

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253 - 2670(2013)18 - 2526 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.18.007

Preparation and characterization of gypenosides liposomes consisted by lecithin and stigmasterol

YU Fan^{1,2}

1. College of Pharmacy, Yancheng Teachers University, Yancheng 224051, China

2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bioresources and Environmental Protection, Yancheng Teachers University, Yancheng 224002, China

Abstract: Objective To study the feasibility of preparing gypenoside liposomes (GLs) with stigmasterol instead of cholesterol, and to optimize the prescription and preparation of GLs. **Methods** GLs without cholesterol were prepared by ethanol injection method with lecithin and stigmasterol, and the encapsulation efficiency was determined by protamine precipitation method. The encapsulation efficiency was adopted to evaluate and optimize the preparation process as response in orthogonal design assay. GLs were characterized by Dynamic Light Scattering and Atomic Force Microscope (AFM) using particle size and electric potential as indexes. **Results** Ethanol injection was the best method to prepare GLs with lecithin and stigmasterol. The optimal preparation process determined by orthogonal design assay was as follows: the ratio of gypenosides to lecithin was 1 : 10, the ratio of lecithin to stigmasterol was 4 : 1, the pH value of PBS buffer solution was 7.0, and the hydration temperature was 35 °C. The entrapment efficiency was $(77.00 \pm 1.17)\%$, the particle size was (202.6 ± 3.9) nm, the PDI was 0.108 ± 0.003 , the zeta potential was (-28.66 ± 0.86) mV, and the morphology was round observed by AFM. **Conclusion** The preparation of GLs with lecithin and stigmasterol was feasible. The GLs prepared by optimum preparation process have high encapsulation efficiency, good morphology, and reproducibility. **Key words:** gypenosides; liposomes; stigmasterol; preparation technology; orthogonal design

脂质体由于具有缓释、增效、减毒、靶向等优点, 已成为中药传递系统中最受关注的热点^[1]。普通

脂质体由磷脂和胆固醇所构成, 胆固醇作为稳定剂加入到脂质体中能增加脂质体双分子膜的流动性,

收稿日期: 2013-04-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102817); 江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室项目 (JLCBE09021); 盐城师范学院自然科学基金项目 (09YCKL010); 盐城师范学院教研项目 (编号 13YCTCJY046); 盐城师范学院博士科研启动基金资助项目

作者简介: 喻 樊 (1979—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为药剂学。Tel: (0515)88258773 E-mail: pharmanyufan@163.com

减少膜渗透性,起到稳定脂质体的作用^[2-3],但其易导致心血管疾病^[4],大大限制了脂质体在治疗心血管领域的应用。因此找到一种胆固醇的替代品用于生产脂质体就显得尤为必要。豆甾醇与胆固醇结构极为相似,但其却不会引发心血管疾病,相反,它能用于降低血液中的胆固醇的量,常应用于心血管疾病的辅助治疗,美国食品药品监督管理局(FDA)也在2000年宣称豆甾醇在降低心血管疾病发生率方面是有效的。因此,很有必要对采用卵磷脂与豆甾醇制备脂质体的可行性进行探讨。

绞股蓝总皂苷(gypenosides)具有抑制肿瘤、抗肝炎、调血脂、降血压等作用^[5]。绞股蓝总皂苷口服后很容易被降解代谢^[6-9],因此需要大剂量或频繁给药,而绞股蓝总皂苷制成脂质体后,在胃肠道中受到脂质材料的保护避免被快速代谢,另外脂质体还有缓释功能,能减少绞股蓝总皂苷的给药剂量与次数。本实验探讨了用卵磷脂和豆甾醇为材料制备新型绞股蓝总皂苷脂质体(gypenoside liposomes, GLs)的可行性,优化了GLs的制备方法和工艺,并对该脂质体进行了初步的表征。

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);SHB—III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);HZQ—X280恒温振荡培养箱(太仓市华美生化仪器厂);WFJ2000可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司);BS210型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);LGJ—10冷冻干燥仪(北京博医康实验仪器有限公司);KBS—150型数控超声波细胞粉碎机(昆山市超声仪器有限公司);SCZL—A型数字智能控温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司);数显恒温水浴锅HH—2(国华电器有限公司);原子力显微镜(AFM, Veeco公司)。绞股蓝总皂苷(批号20120119,陕西昂盛生物医药科技有限公司);鱼精蛋白(批号P4672, Sigma公司);绞股蓝皂苷对照品(批号D100246, 阿拉丁试剂);香草醛(批号v100115, 上海晶纯实业有限公司);卵磷脂(蛋黄卵磷脂,批号EK10028, 日本丘比株式会社);豆甾醇(质量分数97%, 杭州大阳化工有限公司);曲拉通-X100(T109026, 上海晶纯实业有限公司);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 GLs测定方法的建立

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒定质

量的绞股蓝皂苷对照品50 mg加入蒸馏水定容于100 mL量瓶中作为储备液。取储备液适量,加水稀释成质量浓度为0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL的系列对照品溶液。

2.1.2 测定波长的确定 绞股蓝皂苷对照品和空白脂质体用5%香草醛冰醋酸溶液-高氯酸(2:8)混合液显色,在400~1100 nm处进行光谱扫描,结果显示对照品最大吸收波长为555 nm,且该处空白脂质体无干扰,故选择测定波长为555 nm。

2.1.3 线性关系考察 参照《中华人民共和国卫生部颁标准》绞股蓝总皂苷进行。取6支具塞试管,精密量取“2.1.1”项下不同质量浓度对照品溶液1 mL,分别置15 mL具塞试管中,精密加入新鲜配制的含5%香草醛冰醋酸溶液-高氯酸(2:8)的混合液2 mL,摇匀,密塞,置60℃水浴中加热15 min,取出,立即放入冰水中冷却2 min,精密加入冰醋酸10 mL,摇匀,以试剂作空白,照分光光度法项下(《中国药典》2010年版一部附录V A)试验,于(555±5) nm波长处测定吸收度(A)值。以A值为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $A=0.2932C+0.0712$, $r=0.9991$,线性范围50.3~503.0 μg/mL。

2.1.4 精密度试验 精密吸取同一份对照品溶液1.0 mL,置15 mL具塞试管中,按“2.1.3”项下自“精密加入新鲜配制的含5%香草醛冰醋酸溶液与高氯酸(2:8)的混合液2 mL”起操作,在同一条件下连续测定A值5次,以A值计算RSD为1.33%。

2.1.5 稳定性试验 精密吸取供试品溶液1 mL,置15 mL具塞试管中,分别在0、5、10、15、20 min按“2.1.3”项下自“精密加入新鲜配制的含5%香草醛冰醋酸溶液与高氯酸(2:8)的混合液2 mL”起操作,测定A值, RSD为2.10%,说明供试品在20 min内显色稳定。

2.1.6 重复性试验 精密量取同一份样品5份,每份1 mL,照“2.1.3”项下自“精密加入新鲜配制的含5%香草醛冰醋酸溶液与高氯酸(2:8)的混合液2 mL”起操作,在同一条件下分别测定A值, RSD为2.74%。

2.1.7 加样回收试验 精密称取冻干的空白脂质体样品6份,分别加入一定量的绞股蓝皂苷对照品,照“2.1.3”项下自“精密加入新鲜配制的含5%香草醛冰醋酸溶液与高氯酸(2:8)的混合液2 mL”起操作,在同一条件下分别测定A值,计算回收率。

平均回收率为 98.84%，RSD 为 2.95%。

2.1.8 GLs 包封率的测定 采用鱼精蛋白沉淀法。吸取 2 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)。取 1 mL 上清液，测定其皂苷量，即游离药物量。沉淀以 10% 曲拉通-X100 3 mL 溶解，并补充生理盐水至 5 mL。取 1 mL 溶液，测定其皂苷量，即包封药物量。

2.2 GLs 的制备方法筛选^[10]

2.2.1 乙醇注入法 称取绞股蓝总皂苷 12 mg、卵磷脂 60 mg、豆甾醇 30 mg 于 100 mL 烧杯中，加入 20 mL 乙醇使之完全溶解。取 20 mL pH 7.0 的 PBS 缓冲液，预热到 45 °C，搅拌下用针头匀速注入烧杯中，恒温搅拌 2 h 以除去乙醇，冰浴条件下探头超声 10 min (超声时间 2 s，间隔时间 2 s，功率为 100 W)，过 0.45 μm 微孔滤膜即得 GLs^[11]。按“2.1.8”项方法测定，得其包封率为 56.92%。

2.2.2 薄膜分散法 称取绞股蓝总皂苷 12 mg，加入 20 mL pH 7.0 的 PBS 缓冲液，混匀，备用。称取卵磷脂 60 mg，豆甾醇 30 mg，溶于 25 mL 乙醚，40 °C 旋转蒸发至形成均匀的薄膜。加入绞股蓝溶液，45 °C 恒温振摇 90 min，冰浴条件下探头超声 10 min (超声时间 2 s，间隔时间 2 s，功率为 100 W)，过 0.45 μm 微孔滤膜即得 GLs^[12]。按“2.1.8”项方法测定，得其包封率为 45.27%。

2.2.3 逆向蒸发法 称取卵磷脂 60 mg，豆甾醇 20 mg 溶于 25 mL 二氯甲烷，置于烧杯中。称取绞股蓝总皂苷 12 mg 溶于 5 mL pH 7.0 的 PBS 缓冲液中，置于圆底烧瓶中，将烧杯中的混合液倒入圆底烧瓶中。冰浴条件下探头超声 10 min (超声时间 2 s，间隔时间 2 s，功率为 100 W)，形成均匀乳剂，旋转蒸发除去二氯甲烷，形成胶态后加入 pH 7 的 PBS 缓冲液 20 mL，继续减压蒸发 30 min，冰浴条件下探头超声 10 min (超声时间 2 s，间隔时间 2 s，功率为 100 W)，过 0.45 μm 微孔滤膜即得 GLs。按“2.1.8”项方法测定，得其包封率为 40.51%。

由此可知，乙醇注入法制备的 GLs 体包封率最高，因此选择此法制备 GLs，并进行工艺优化。

2.3 GLs 处方及工艺优化

2.3.1 正交试验 在预试验基础上，发现药脂比 (总皂苷与卵磷脂质量比)、膜材比 (卵磷脂与豆甾醇质量比)、缓冲液 pH 值、水化温度对脂质体的制备影

响较大，因此以药脂比 (A)、膜材比 (B)、缓冲液 pH 值 (C)、水化温度 (D) 为考察因素，脂质体包封率为指标，采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对脂质体的制备工艺进行优化。试验设计与结果见表 1，方差分析见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

试验号	A	B	C	D / °C	包封率 / %
1	1 : 5 (1)	2 : 1 (1)	6 (1)	35 (1)	52.72
2	1 : 5 (1)	4 : 1 (2)	7 (2)	45 (2)	60.32
3	1 : 5 (1)	6 : 1 (3)	8 (3)	55 (3)	60.95
4	1 : 10 (2)	2 : 1 (1)	7 (2)	55 (3)	62.03
5	1 : 10 (2)	4 : 1 (2)	8 (3)	35 (1)	76.64
6	1 : 10 (2)	6 : 1 (3)	6 (1)	45 (2)	61.14
7	1 : 15 (3)	2 : 1 (1)	8 (3)	45 (2)	51.27
8	1 : 15 (3)	4 : 1 (2)	6 (1)	55 (3)	64.85
9	1 : 15 (3)	6 : 1 (3)	7 (2)	35 (1)	67.14
K_1	173.99	166.02	178.71	196.50	
K_2	199.81	201.81	189.49	172.73	
K_3	183.26	189.23	188.86	187.83	
R	25.82	35.79	10.78	23.77	

表 2 方差分析

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	114.056	2	4.674	无
B	219.765	2	9.006	无
D	96.466	2	3.953	无
C (误差)	24.403	2		

由正交分析可知，影响脂质体包封率的因素顺序为 $B > A > D > C$ ，最佳优化的处方和工艺为 $A_2B_2C_2D_1$ ，即药物与卵磷脂质量比为 1 : 10，卵磷脂与豆甾醇的比例为 4 : 1，缓冲液 pH 值为 7.0，水化温度 35 °C。

2.3.2 验证试验 根据上述筛选得到的最佳工艺，制备 3 批脂质体样品，测定其包封率，结果分别为 76.88%、78.23%、75.89%，平均包封率为 (77.00 ± 1.17) %，3 次验证试验的结果基本一致，说明所确定的优化工艺合理可行，稳定可靠，具有可操作和重现性。

2.4 脂质体粒度分布及 Zeta 电位测定

采用动态光散射粒径仪检测平均粒径和 Zeta 电位。激光束波长 633 nm，入射与散射光束夹角

173°, 温度 25 °C。取 100 μL 脂质体溶液用水稀释至 10 mL, 摇匀平衡 3 min 后测定。粒径与电位图(图 1、2)表明, GLs 的平均粒径为 (202.6 ± 3.9) nm ($n=3$), 多分散系数 (PDI) 为 0.108 ± 0.003 ($n=3$), 说明该脂质体粒径均一。平均 Zeta 电位为 (-28.66 ± 0.86) mV ($n=3$), 表明该脂质体稳定性较好。

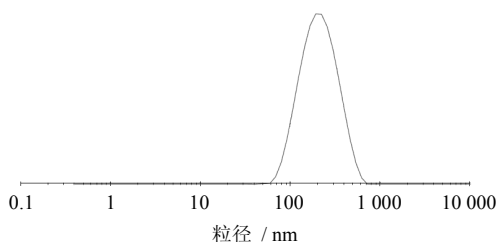


图 1 绞股蓝总皂苷脂质体的粒径图

Fig. 1 Particle size distribution of GLs

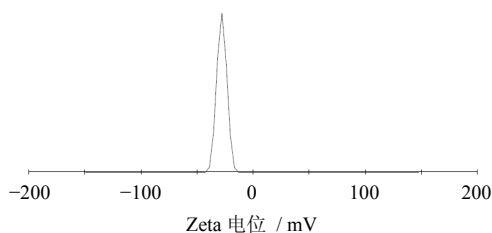


图 2 绞股蓝总皂苷脂质体的 Zeta 电位图

Fig. 2 Zeta potential of GLs

2.5 GLs 原子力显微镜 (AFM) 观察

吸取脂质体适量, 将其吸附于盖玻片上, 自然晾干后置 AFM 下观察, 结果见图 3。结果表明, 绞股蓝总皂苷脂质体均匀圆整, 为球形或近球形, 脂质体的平均粒径 < 200 nm。

3 讨论

胆固醇作为稳定剂而加入到脂质体中, 但其易引发心血管疾病, 限制了脂质体这种剂型在治疗心血管疾病中的应用。本课题探讨了用和胆固醇结构类似、具有降胆固醇功能的豆甾醇制备脂质体的可

行性。研究结果表明豆甾醇也能与卵磷脂形成脂质体, 该新型脂质体弥补了普通脂质体的不足, 拓宽了脂质体制剂在心血管疾病中的应用, 是本研究的创新之处。

常用的制备脂质体的方法有薄膜分散法、逆向蒸发法、乙醇 (乙醚) 注入法等。本研究中对这几种常用的制备方法进行了筛选, 根据筛选结果最终选择了乙醇注入法这种操作简单, 可应用于工业化大生产的方法。但该方法存在粒径不均匀的弊端, 因此本实验在制备出脂质体后增加了探头超声的步骤, 以得到均匀一致的纳米脂质体。超声后, 脂质体粒径为 (202.6 ± 3.9) nm, PDI 为 0.108 ± 0.003 , 表明超声后制备出的脂质体粒径较小且高度均一。由于小于 400 nm 的纳米粒子在血液中具有被动靶向到肝、脾或肿瘤组织的性质^[13], 而绞股蓝总皂苷也常用于肝炎、肝癌等肝部疾病的治疗, 因此该制剂可用于肝炎、脂肪肝和肝癌等疾病的治疗。

研究表明 Zeta 电位能从一定程度上反映纳米分散体系的稳定性, Zeta 电位绝对值越高 (> 15 mV), 粒子间的静电斥力越大, 体系越稳定不容易发生聚集, 因而有高的稳定性^[14-16]。本研究制备的绞股蓝总皂苷脂质体 Zeta 电位为 (-28.66 ± 0.86) mV (电位绝对值 > 15 mV), 表明该纳米制剂具有较好的稳定性。

AFM 是一种先进的电子显微镜, 能提供真正的三维表面图, 由于不破坏样品, 常用于各种磷脂生物膜、蛋白质等大分子的形貌研究。由于脂质体与磷脂生物膜相类似, 本课题应用 AFM 对卵磷脂和豆甾醇为膜材的 GLs 进行了形貌观察, 电镜下的 GLs 外形圆整、粒径均一, 充分说明用豆甾醇替代胆固醇制备 GLs 是可行的。但 AFM 图中显示的脂质体粒径比动态光散射粒径仪检测出的粒径要小, 这可能是由于 AFM 制样干燥失水后脂质体体积缩小引起的^[17]。

包封率测定方法也有多种, 如凝胶过滤法、透析法、超速离心法和鱼精蛋白沉淀法。凝胶过滤法消耗时间长, 且不易控制流速; 采用透析法时, 药物几乎透析不出来, 且耗时长。超速离心法对转速要求高, 否则易造成纳米脂质体沉淀不完全, 且要控制温度, 温度过高易使脂质体破碎而影响包封率的测定。鱼精蛋白沉淀法适于中性或负电荷脂质体的测定^[18], 本研究中脂质体 Zeta 电位约为 -30 mV, 满足条件, 故本实验采用经典的鱼精蛋白沉淀法进

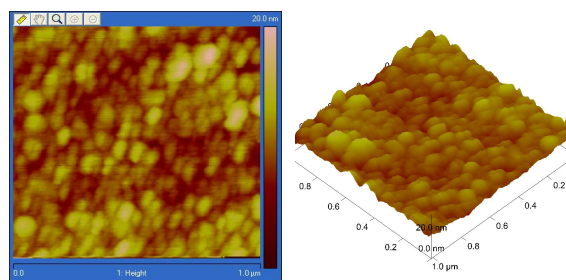


图 3 绞股蓝总皂苷脂质体的 AFM 图

Fig. 3 AFM photographs of GLs

行脂质体包封率的测定。

本课题探讨了用卵磷脂与豆甾醇制备GLs的可行性,筛选、优化了制备工艺和处方,并对该新型脂质体进行了表征。该脂质体制剂不仅不含胆固醇,反而以有降胆固醇功能的豆甾醇为膜材,解决了脂质体在心血管治疗和降胆固醇领域应用受限的问题,拓宽了脂质体的应用领域,具有很好的开发前景。关于更进层次的理论研究(如采用分子模拟技术模拟豆甾醇替代胆固醇制备脂质体)和工业化过程中的问题(如干燥、溶剂残留等)正处于进一步研究中。

参考文献

- [1] 范云鹏,王德云,胡元亮,等. 正交试验优选黄芪多糖脂质体的制备工艺 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 470-473.
- [2] Weissig V, Vladimir P. Torchilin. *Liposomes: A practical approach* [M]. New York: Oxford University Press, 2003.
- [3] Vemuri S, Rhodes C T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: A review [J]. *Pharm Acta Helv*, 1995, 70(2): 95-111.
- [4] Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) [J]. *Lancet*, 1994, 344(8934): 1383-1389.
- [5] 张晓喻,黎艳,雍彬,等. 复方绞股蓝总皂甙改善小鼠学习记忆的研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(3): 330-333.
- [6] 王娟,单进军,狄留庆,等. 五环三萜皂苷类活性成分口服吸收与代谢研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(1): 196-200.
- [7] Xie H T, Wang G J, Sun J G, *et al.* High performance liquid chromatographic-mass spectrometric determination of ginsenoside Rg₃ and its metabolites in rat plasma using solid-phase extraction for pharmacokinetic studies [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 818(2): 167-173.
- [8] Xu Q F, Fang X L, Chen D F. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb₁ and Rg₁ from *Panax notoginseng* in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 84(2/3): 187-192.
- [9] Sun J G, Wang G J, Xie H T, *et al.* Simultaneous rapid quantification of ginsenoside Rg₁ and its secondary glycoside Rh₁ and aglycone protopanaxatriol in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38(1): 126-132.
- [10] 郭海燕,莫穗林. 脂质体物理稳定性和包封率的影响因素 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(6): 498-501.
- [11] 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.
- [12] 潘峰,胡春梅,潘黎军,等. 粉防己碱阿霉素脂质体的制备与体外释放度的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 215-220.
- [13] 霍美蓉,张勇,周建平,等. *N*-辛基-*O*, *N*-羧甲基壳聚糖聚合物胶束对紫杉醇的增溶、缓释及其安全性初步评价 [J]. 药学报, 2008, 43(8): 855-861.
- [14] Dong Y C, Feng S S. Methoxy poly (ethylene glycol)-poly (lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(14): 2843-2849.
- [15] Zhang Z P, Feng S S. Nanoparticles of poly(lactide) / vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: Synthesis, formulation, characterization and *in vitro* drug release [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(2): 262-270.
- [16] Yu F, He C H, Waddad A Y, *et al.* *N*-octyl-*N*-arginine-chitosan (OACS) micelles for gambogic acid oral delivery: Preparation, characterization and its study on *in situ* intestinal perfusion [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, doi: 10.3109/03639045. 2013, 786723.
- [17] Li J, Huo M R, Wang J, *et al.* Redox-sensitive micelles self-assembled from amphiphilic hyaluronic acid-deoxycholic acid conjugates for targeted intracellular delivery of paclitaxel [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7): 2310-2320.
- [18] 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]. 中国药理学杂志, 2006, 41(22): 1716-1720.