

薄膜超声法制备槲皮素脂质体研究

陈浩,戴俊东,王玉蓉,祝年青,孙毅坤,王玥,龚卫红(北京中医药大学中药学院,北京100102)

[摘要] 目的 以粒径和包封率为指标,优选槲皮素脂质体的制备工艺。方法 以氢化大豆磷脂(HSPC)、胆固醇(CH)为膜材,采用薄膜超声法制备脂质体。通过正交设计优化处方工艺,利用马尔文动态光散射粒径测定仪测定脂质体的粒径,鱼精蛋白沉淀法分离游离药物,HPLC法测定脂质体中槲皮素(QU)的包封率。结果 最佳处方工艺为:HSPC:CH=3:1、HSPC:QU=20:1、探头超声(600 W)9 min。结论 薄膜超声法适于实验室条件下制备槲皮素脂质体。

[关键词] 槲皮素;脂质体;薄膜超声法;鱼精蛋白沉淀法

[中图分类号] R944 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)01-0032-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.01.008

Preparation of quercetin liposome by film-ultrasonic technique

CHEN Hao, DAI Jun-dong, WANG Yu-rong, ZHU Nian-qing, SUN Yi-kun, WANG Yue, GONG Wei-hong (School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective** To study the preparation method of quercetin liposome and screen the optimal technological conditions by the particle sizes and the encapsulation efficiencies of quercetin. **Method** Liposomes were made of hydrogenated soybean phosphatidylcholine(HSPC) and cholesterol(CH) by film evaporation and probe ultrasonic technique, then orthogonal design was adopted to screen the optimal conditions. The particle sizes were detected by Zetasizer Nano, while the encapsulation efficiency of quercetin (QU) were determined by HPLC after the free drug was separated by protamine sedimentation method. **Results** The optimal technological conditions of quercetin liposome were as follows: HSPC: CH=3: 1, HSPC:QU=20:1, the time of probe ultrasonic (600 w) was 9 minutes. **Conclusion** Film evaporation and probe ultrasonic technique could be suitable for laboratory to prepare quercetin liposome.

[Key words] quercetin; liposome; film evaporation and probe ultrasonic technique; protamine sedimentation method

槲皮素(Quercetin)为黄酮类化合物,目前众多研究表明其具有明显的抗肿瘤作用,并能够通过多种机制逆转耐药肿瘤的多药耐药现象。但由于其水溶性差,生物利用度低而限制了其临床应用。脂质体作为抗肿瘤药物的优良载体,具有良好的生物相容性和靶向性。故本文考虑将槲皮素包封于脂质体中,以提高其对耐药肿瘤的治疗作用。

1 材料与仪器

槲皮素(四川协力有限公司,批号:090503),槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所,纯度:97.3%,批号100081-200406),氢化大豆磷脂 SPC-3(德国 Lipoid 公司),胆固醇(Sigma),鱼精蛋白(Sigma);除 HPLC 所用试剂为色谱纯外,其它试剂均为分析纯。RE-52CS 型旋转蒸发仪(上海亚荣),SCI-

ENTZ-II D 型超声波细胞粉碎仪(浙江新芝),NANO-CS 型动态光散射粒径仪(美国马尔文),SPD-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津),DL-5-B 型离心机(上海安亭)。

2 方法与结果

2.1 脂质体的制备 选取稳定性良好的氢化大豆磷脂为膜材^[1],采用薄膜蒸发-探头超声法^[2]制备槲皮素脂质体,称取处方量的氢化大豆磷脂、胆固醇和槲皮素,加无水乙醇溶解,40℃水浴旋蒸除去乙醇,形成均匀的薄膜,然后加入 10 ml 缓冲盐溶液,75℃水化 30 min。所得淡黄色混悬液经探头超声(600 W)一定时间,即得槲皮素脂质体。

2.2 包封率测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相^[3]:甲醇:乙腈:PBS(pH 3.8)=19:29:52;流速:1 ml/min;柱温:25℃;检测波长:254 nm,进样体积:15 μl。该色谱条件下,辅料对槲皮素的检测无干扰。

2.2.2 标准曲线测定 取槲皮素对照品,加甲醇超

[基金项目] 国家自然科学基金课题(新型抗肿瘤多药耐药长循环脂质体的研究,课题编号:30801549/H2806)。

[作者简介] 陈浩(1986-),男,硕士研究生,Tel:(010)84738616,E-mail:pangail22@163.com。

[通讯作者] 戴俊东.Tel:13606806864,Tel:(010)84738616,E-mail:dajid@163.com。

声溶解,制成浓度为2、30、60、100、150、200、240、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列对照品溶液,依法测定,以峰面积A对浓度C作线性回归,得标准曲线: $A = 62\,481\,C - 80\,497$ ($r = 0.999\,9$),说明槲皮素在2~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.2.3 回收率测定 精密量取空白脂质体0.5 ml (相当于含槲皮素90 μg),分别精密加入30、150、240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的槲皮素对照品溶液0.5 ml,加甲醇溶解并稀释至5 ml,依法测定,计算回收率。结果分别为(96.1 \pm 1.0) %、(102.3 \pm 1.9) %和(103.8 \pm 1.1) %,RSD分别为1.38 %、1.76 %和1.06 % ($n = 3$)。

2.2.4 药物含量测定 采用鱼精蛋白沉淀法^[3]测定槲皮素脂质体的包封率。精密量取槲皮素脂质体0.1 ml (相当于含槲皮素18 μg),加入10 mg/ml 鱼精蛋白溶液0.3 ml,漩涡混匀;静置3 min后加入生理盐水3.6 ml,1 800 g离心30 min;取上清液2.5 ml,加甲醇溶解并稀释至5 ml,HPLC依法测定其槲皮素含量(W_1)。另精密量取槲皮素脂质体0.1 ml,直接加甲

醇溶解并稀释至5 ml,依法测定槲皮素含量(W_2),按下式计算包封率(EF %): $EF\% = (1 - \frac{W_1}{W_2}) \times 100\%$ 。

2.3 脂质体粒径分布测定 采用马尔文动态光散射1粒径仪测定脂质体的平均粒径。激光束波长633 nm,入射与散射光束夹角173°,温度25 °C。取100 μl 脂质体加水稀释至1.5 ml,混匀,平衡3 min后测定。

2.4 脂质体制备工艺优化 在预实验的基础上,选择磷脂-胆固醇比例(HSPC:CH)、磷脂-槲皮素比例(HSPC:QU)和超声时间为因素,脂质体粒径和包封率为指标,按L9(3⁴)正交表设计实验,结果见表2和表3。

表1 因素水平表

水平	A: HSPC:CH (mol: mol)	B: HSPC:QU (mol: mol)	C: t (min)	D 空白
1	2:1	10:1	3	1
2	3:1	20:1	6	2
3	4:1	30:1	9	3

表2 正交实验包封率与粒径测定结果

样品	因素				包封率(%)	平均粒径(nm)
	A	B	C	D		
1	1	1	1	1	93.0	956.6
2	1	2	2	2	95.7	594.3
3	1	3	3	3	88.5	405.3
4	2	1	2	3	85.7	463.9
5	2	2	3	1	91.0	227.9
6	2	3	1	2	89.2	715.4
7	3	1	3	2	93.2	282.4
8	3	2	1	3	86.7	770.6
9	3	3	2	1	88.0	478.4
包封率	K1	277.2	272.0	268.9	272.0	
	K2	265.9	273.4	269.4	278.1	
	K3	267.9	265.7	272.7	260.9	
	R	3.8	2.6	1.3	5.7	
平均粒径	K1	1956.2	1 702.9	2 442.6	1 662.9	
	K2	1 407.2	1 592.8	1 536.6	1 592.1	
	K3	1531.4	1 599.1	915.6	1 639.8	
	R	549.0	110.1	1 527.0	70.8	

表3 正交实验包封率与粒径测定结果方差分析

因素	A	B	C	D(误差)	
包封率	Si	24.04	11.35	2.87	50.57
	MS	12.02	5.67	1.44	25.28
	F	0.48	0.22	0.06	1.00
平均粒径	Si	110 507.04	5 096.92	786 268.00	1 738.12
	MS	55 253.52	2 548.46	393 134.00	869.06
	F	63.58 ¹⁾	2.93	452.37 ²⁾	1.00

注:¹⁾ $F_{0.05}(1,2) = 19.0$; ²⁾ $F_{0.01}(1,2) = 99.0$

槲皮素为脂溶性药物,与构成脂质体的主要成分磷脂和胆固醇极性相近,具有较好的亲和性,因此在实验中不同条件下得到的槲皮素脂质体包封率均在85 %以上,各因素均无显著性差异($P > 0.05$);粒径方面,超声时间(因素C)与磷脂-胆固醇比例(因素A)对槲皮素脂质体的粒径影响显著($P < 0.01$)。故着重考虑粒径的影响。综上选取A₂B₂C₃,即磷脂-胆固醇比例为3:1,磷脂-槲皮素比例为20:1,超声9 min为槲皮素脂质体的最佳制备工艺。

2.5 最佳工艺验证 按优选工艺制备3批槲皮素脂质体,测定粒径和包封率。结果平均粒径分别为268.0、272.7和267.5 nm, RSD为1.07% ($n=3$); 包封率分别为92.1%、91.2%和90.8%, RSD为0.71% ($n=3$)。透射电镜负染检测结果如图1所示,表明本法制备的槲皮素脂质体,粒径较小,分布均匀,工艺稳定可行。

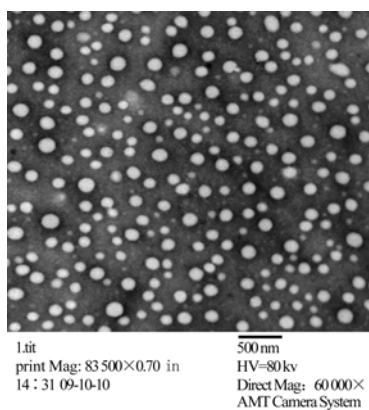


图1 槲皮素脂质体透射电镜显微照片

3 讨论

3.1 磷脂的选择 实验中曾分别以蛋黄磷脂(EPC)和氢化大豆磷脂(HSPC)为膜材制备槲皮素脂质体,进行对比研究。结果表明二者粒径相似,多分散系数和包封率无明显差异。考虑到EPC分子结构的脂肪酸链中含有不饱和双键,受热或在空气中容易氧化变质,特别是在高频超声的空化作用下更易出现稳定性方面的问题。而HSPC为氢化磷脂,其热稳定性和抗氧化能力与EPC相比显著提高,故选择其为膜材制备槲皮素脂质体。

3.2 包封率测定方法 脂质体中药物包封率测定的关键是将未包封的游离药物从脂质体混悬液中分离出来。常用的方法包括透析法、超滤法、葡聚糖凝胶柱层析法(包括微柱离心法)、高速离心法和鱼精蛋白沉淀法。对于脂溶性药物脂质体,透析法、超滤法和葡聚糖凝胶柱层析法的关键问题在于如何选择适宜的透析液或洗脱液,以保证充分溶解药物,形成适宜浓度梯度的同时又不至于破坏脂质体的磷脂双

分子层结构,这往往需要经过大量实验摸索才能实现。高速离心法对于粒径较小的脂质体往往需要极大的离心力和较长的离心时间,容易破坏脂质体的正常结构,造成药物渗漏。此外,针对脂溶性药物脂质体,高速离心法同样存在溶剂的选择问题。如果溶剂不能够将游离药物全部溶解,那么在极大的离心力条件下,未充分溶解在溶剂中的药物微晶会随脂质体一同沉降在容器底部,从而使包封率的测定产生较大误差。鱼精蛋白分子中含有较大比例的碱性氨基酸,特别是分子中含有胍基的精氨酸占比较多,正是由于这些带有正电荷的胍基的大量存在,多聚阳离子鱼精蛋白会与带负电荷或中性的脂质体产生絮凝作用,在常规离心条件下即可完成脂质体与游离药物的分离,对脂溶性药物脂质体的包封率测定,能够避免上述方法的缺点,同时还具有操作简便、快速的优点。

实验中采用鱼精蛋白沉淀法测得槲皮素脂质体的平均包封率为91.4% (92.1%、91.2%和90.8%); 用超速离心法(水为溶剂,200 000 g 4℃离心2 h)测定,平均包封率为94.7% (93.1%、95.8%、95.2%)。两者之间的差异可能与槲皮素难溶于水,在水中析出的结晶在超速离心条件下随脂质体一同沉淀有关。

在实验中发现鱼精蛋白的用量与脂质体的浓度呈正相关,与脂质体的粒径呈负相关,这与鱼精蛋白和脂质体之间的表面吸附作用有关。脂质体的浓度越高,粒径越小,表面积越大,所需鱼精蛋白的用量也越大,这一点与文献的实验结果相吻合^[3]。根据实验条件优选鱼精蛋白的用量可以准确测定带负电荷或中性脂溶性药物的包封率。

【参考文献】

- [1] 王黎,侯宝光,侯新朴,等. 氢化与非氢化卵磷脂对阿霉素脂质体体内外稳定性的影响[J]. 药学学报, 2001, 36(6): 444.
- [2] 丁燕飞,姚瑶,陶昱斐,等. 槲皮素纳米脂质体的处方工艺优化[J]. 中草药, 2008, 39(4): 522.
- [3] 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): 1717.

[收稿日期] 2011-05-27

[修回日期] 2011-06-27

欢迎订阅2012年《药学实践杂志》

本刊网址: www.jxsjzz.cn; yxsj.smmu.edu.cn