

猕猴桃根多糖脂质体包封率测定方法研究

吴瑾瑾¹,朱雨晴^{2,3},葛卫红²,李昌煜²,石森林^{2*}

(1. 杭州第四医院,杭州 310005;2. 浙江中医药大学药学院,杭州 310053;
3. 富阳市妇幼保健院药剂科,杭州 310053)

[摘要] 目的:建立猕猴桃根多糖脂质体包封率的测定方法。方法:采用阴离子交换树脂法分离脂质体和游离 APPS,采用紫外-可见分光光度法测定游离 APPS 含量,计算脂质体包封率。结果:以纤维素 DE-52 阴离子交换树脂为填料,采用 1.0 mol·L⁻¹NaCl 溶液洗脱,游离 APPS 的回收率 99.21%,空白脂质体的回收率 0.07%;线性范围 11.66 ~ 58.29 mg·L⁻¹(*r* = 0.999 4),日内和日间精密度均符合要求(RSD 均小于 2%),方法平均回收率 99.28%,RSD 0.66%;APSP 脂质体的平均包封率 70.16%。结论:此法简便、可行,可用于猕猴桃根多糖脂质体包封率的测定。

[关键词] 猕猴桃根多糖;阴离子交换树脂;紫外-可见分光光度法;脂质体;包封率

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)06-0020-04

Study on Establishing Method to Deternine APPS
Liposome Entrapment Efficiency

WU Jin-jin¹,ZHU Yu-qing^{2,3},GE Wei-hong²,LI Chang-yu²,SHI Sen-lin^{2*}

(1. Hangzhou Fouth Hospital, Hangzhou 310005;
2. Dept. of Pharmaceutical,Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053;
3. Dept. of Pharmacy,Fuyang Maternal and Child Health Care Hospital,Hangzhou 311400,China)

[Abstract] **Objective:** The method was established to determine the entrapment efficiency for the APPS liposome. **Method:** Anion exchange resin was used to separate the liposome and free APPS; UV-visible spectrophotometry was used to determine the content of APPS, and liposome encapsulation efficiency was calculated. **Result:** The method established was as follows: the anion-exchange resin was used with 1.0 mol·L⁻¹ NaCl as eluent; the free APPS recovery was 99.21%, liposome recovery was 0.07% with the linear range of 11.66 ~ 58.29 mg·L⁻¹(*r* = 0.999 4). The intra- and inter-day precisions (RSD) could meet the requirements (within 2.0%); the average recovery was 99.28%, RSD was 0.66%. The encapsulation efficiency of APPS liposome was 70.16% on average. **Conclusion:** This method is simple and feasible, and can determine the entrapment efficiency for the APPS liposome.

[Key words] actinidia planch polysaccharide; anion exchange resin; Uv-Vis spectrophotometry; liposome

[收稿日期] 20101014(004)
[基金项目] 浙江省科技厅重点项目(2008C23068);浙医江省
中药管理局项目(2007CA114)
[第一作者] 吴瑾瑾,副主任中药师,从事中药制剂新技术与医院制剂研究
[通讯作者] *石森林,博士,硕士生导师,从事制剂新技术与新剂型研究, Tel: 0571-86613524, E-mail: pjstone@163.com

猕猴桃根为猕猴桃科植物中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch 的根或根皮,也叫藤梨根,性寒,味苦,涩,具清热解毒,活血消肿,祛风利湿等功,主治肝炎、肿瘤、跌打损伤、疮疖瘰癧等^[1]。目前认为,其药效物质基础主要是猕猴桃根多糖(Actinidia Planch Polysaccharide, APPS)^[2-4],具有抗肿瘤、抗病毒、调节免疫、抗感染、抗衰老等作用,颇具研究开发价值。但是,本实验室的前期研究显示其口服给药

疗效较差,主要原因可能是其相对分子质量较大、对胃肠道黏膜的穿透性弱,还可能被消化道的胃酸、消化酶降解而失活。

脂质体^[5-6] (liposomes) 是由磷脂和胆固醇双分子层组成的泡囊,可以将水溶性和脂溶性药物包裹在脂质体的水相和膜相内,从而提高药物的稳定性,并可促进药物的肠吸收,提高生物利用度。因此,为保护 APPS 免受肠道内酶的降解,防止药物在胃肠道被破坏,增加口服吸收,提高药效作用,我们进行了 APPS 脂质体口服给药的适用性研究。

包封率是目前脂质体制剂处方筛选、工艺优化与质量评价最为重要的指标之一,也是脂质体能否发挥较普通制剂高效、低毒特点的关键。因此,研究脂质体时,包封率是一个重要的考察项目。本文参考国内外有关脂质体包封率的测定方法^[7-12],依据 APPS 的荷负电性质,采用阴离子交换树脂法,开展了 APPS 脂质体包封率的测定方法研究。

1 仪器与试剂

UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津);WH-861 型涡旋混合仪(太仓市科教器材厂);XS105 Dual Range 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);筛板色谱柱(华东医药器材化剂分公司)Avanti J-26XP 系列高速离心机(贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司)。

猕猴桃根多糖(实验室自制);D-无水葡萄糖对照品(中国药品生物制品检定所,110833-200503);浓硫酸(浙江衢州巨化试剂厂);苯酚(杭州双林化工试剂厂);纤维素 DE-52(合肥博美生物科技有限责任公司);蛋黄卵磷脂(上海艾韦特医药科技有限公司);胆固醇(上海思吉生物制品有限公司);PEG2000(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 载药脂质体与空白脂质体溶液的制备

2.1.1 APPS 脂质体的制备 按照《中国药典》规定配制 pH 7.4 的 PBS 溶液,用蒸馏水稀释 10 倍制得 1/10 (pH 7.4) PBS 溶液。精密称定卵磷脂 150.00 mg、胆固醇 37.50 mg、PEG2000 22.50 mg、APPS 7.50 mg。将处方量 APPS,PEG2000 加 10 mL 蒸馏水中溶解,制得水相溶液,备用;取卵磷脂、胆固醇用 40 mL 乙醚溶解,加入水相溶液 10 mL,在 12 000 r·min⁻¹ 搅拌 2.5 min,使成 W/O 型乳液;转入 100 mL 圆底烧瓶中,于 25 ℃,60 r·min⁻¹,真空条

件下蒸发除去乙醚,得脂质体膜;加 1/10 的 PBS 缓冲液 5.0 mL,以 5 000 r·min⁻¹ 转速搅拌水合得到 APPS 脂质体,加蒸馏水至 50 mL,得到 APPS 脂质体溶液,备用。

2.1.2 空白脂质体溶液的制备 采用逆相蒸发法制备空白脂质体,精密称定卵磷脂 150.00 mg、胆固醇 37.50 mg,溶于 40 mL 乙醚中,加入溶解 PEG2000 22.50 mg 的 10 mL 蒸馏水溶液,按照 2.2.1 项下的制备过程,制备空白脂质体溶液,备用。

2.2 分析方法的建立

2.2.1 溶液的制备 精密称取 105 ℃ 干燥至恒重的无水葡萄糖对照品约 10.00 mg,置 100 mL 量瓶中,加适量蒸馏水溶解,稀释至刻度,摇匀,即得对照品溶液。精密称定 APPS 粉末约 150 mg,置 100 mL 容量瓶中,加适量蒸馏水,在温水浴中溶解至完全,冷却后蒸馏水定容,摇匀,得供试品溶液。

2.2.2 检测波长的选择 参考文献[13],精密移取葡萄糖对照品及 APPS 供试品溶液各 2.0 mL 置试管中,加入 5% 苯酚 1 mL,再加入浓硫酸 5 mL,涡旋混匀,置室温冷却 20 min。另以蒸馏水 2 mL,加入 5% 苯酚、浓硫酸(同上操作)作为空白对照,于 400 ~ 600 nm 扫描,结果对照品与供试品溶液的最大吸收波长均为 485 nm,因此确定 485 nm 为检测波长。

2.2.3 标准曲线的建立 精密移取葡萄糖对照品溶液 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0 mL 分别至 10 mL 量瓶中,用 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液定容刻度,精密移取 2.0 mL 至具塞试管中,以硫酸-苯酚法显色,在 485 nm 处测定吸光度,建立标准曲线。结果回归方程为 $A = 0.012\ 2\ C + 0.009\ 8$, $r = 0.999\ 4$ 。

2.2.4 精密度试验 精密移取葡萄糖对照品溶液 3 份,用 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液配成高、中、低 3 种质量浓度的溶液,分别按照 2.2 项下测定吸光度值 A,根据随行标准曲线计算含量,每天测定 3 次,连续测定 3 d,考察其精密度,结果见表 1。

表 1 精密度试验结果

质量浓度 / mg·L ⁻¹	日内精密度		日间精密度	
	平均含量/ μ g	RSD/%	平均含量/ μ g	RSD/%
11.66	23.26	1.36	23.30	1.07
23.32	46.65	1.45	46.67	0.96
58.29	116.57	0.94	116.57	1.40

2.3 阴离子交换树脂柱层析法分离脂质体和游离药物

2.3.1 阴离子交换树脂柱的搭建 阴离子交换树脂的预处理:精密称取纤维素 DE-52 阴离子交换树脂(DEAE)1 g,置 5 mL 量筒中加蒸馏水约 5 mL,浸泡溶胀 12 h,除去细小颗粒,如此漂洗几次;滤过,DEAE 用 0.5 mL·L⁻¹ NaOH 溶液浸泡 1 h 以上;滤过,用蒸馏水漂洗至中性;再用 0.5 mL·L⁻¹ HCL 溶液浸泡 1 h 以上,去酸溶液,用蒸馏水洗至中性,即得。

阴离子交换树脂柱的填装:选择规格为 20 mm×150 mm 的色谱柱,缓缓加入处理好的 DEAE 适量,采用湿法装柱,排除气泡,以蒸馏水不断冲洗柱使之装紧,待柱径高比为 2:10 不再变化时,用洗脱剂 10 mL 洗脱,即得阴离子交换树脂柱,备用。

2.3.2 洗脱剂的选择 精密吸取 APPS 溶液 10.0 mL、空白脂质体溶液 10.0 mL,各 2 份;分别上阴离子交换树脂柱;分别以蒸馏水、1.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液为洗脱剂,流速为 0.75 mL·min⁻¹,洗脱液收集于刻度试管中,每管 4 mL,共 15 管。每管移取洗脱液 2.0 mL,置 20 mL 具塞试管中,加苯酚 1.0 mL,浓硫酸 5.0 mL,依法显色,用紫外分光光度计在 485 nm 处测定 A,以洗脱体积对吸光度作图,结果见图 1~2。

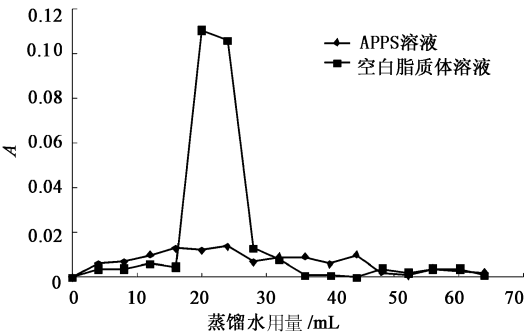


图 1 蒸馏水为洗脱剂的洗脱曲线

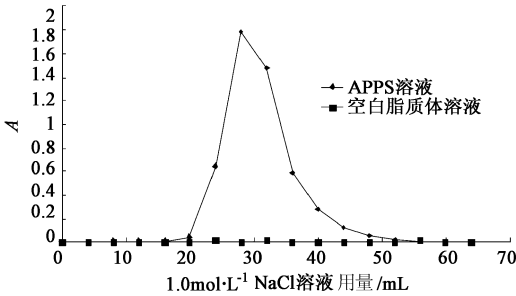


图 2 NaCl 溶液为洗脱剂的洗脱曲线

根据结果可知: APPS 溶液和空白脂质体溶液,以蒸馏水为洗脱剂,不能完全分离;而采用 1.0 mol·

L⁻¹ NaC 洗脱,可完全分离。因此,选定 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液为洗脱剂。

2.3.3 树脂柱径高比的选择 取 20 mm×150 mm 的色谱柱 2 个,依法装柱,A 柱径高比为 2:5,B 柱径高比为 2:10。分别用 10 mL 的 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗脱后,备用。于 A 柱、B 柱中,分别缓缓加入 APPS 溶液 5.0,10.0 mL;然后用 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗脱,收集洗脱液。结果,A 柱洗脱较快、且完全。故选定径高比为 2:5 的树脂柱,上样量 5.0 mL。

2.3.4 APPS 的柱回收率 配制 1.0,1.5,2.0 g·L⁻¹ 3 个质量浓度的 APPS 溶液,分别精密移取 5.0 mL 2 份,一份置 25 mL 量瓶中加 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液稀释至刻度。另一份依法上柱,采用 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗脱,收集洗脱液于 25 mL 量瓶中,并以洗脱剂稀释至刻度。精密移取上述溶液各 2.0 mL,依法测定吸光度,计算 APPS 的回收率。结果见表 3,说明 APPS 可被完全洗脱,其柱平均回收率为 99.21%。

表 3 APPS 的柱回收率试验结果

质量浓度 /g·L ⁻¹	A		柱回收率 /%
	过柱前	过柱后	
2.0	0.510	0.506	99.22
1.5	0.476	0.466	98.96
1.0	0.444	0.438	99.45

2.3.5 空白脂质体的柱回收率 精密移取 6 份空白脂质体溶液 5.0 mL,3 份分别置 25 mL 量瓶中,加 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液稀释至刻度。另 3 份分别上柱,用 1.0 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗脱,洗脱液收集于 25 mL 量瓶中,并加洗脱剂稀释至刻度。取上述溶液各 2.0 mL,依法测定吸光度,计算空白脂质体溶液的回收率。结果见表 4。

表 4 空白脂质体柱回收率试验结果

No	A		柱回收率 /%
	过柱前	过柱后	
1	0.510	0.001	0.20
2	0.476	0.000	0.00
3	0.444	0.000	0.00

由此可见,空白脂质体溶液不被洗脱,其柱回收率为 0.07%。表明 DEAE 柱可有效分离 APPS 与空白脂质体。

2.4 APPS 脂质体封装率的测定

2.4.1 脂质体包封率测定原理 根据 APPS 与载药脂质体膜表面的带电性质差异,采用 DEAE 型阴离子交换树脂柱层析法,以 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1} \text{NaCl}$ 溶液为洗脱剂,洗脱分离脂质体和未被包封的游离 APPS,采用分光光度法测定游离 APPS 的含量,计算 APPS 脂质体包封率。

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

$W_{\text{总}}$ 为 APPS 的投料量, $W_{\text{游}}$ 为未包入脂质体游离 APPS 量。

2.4.2 APPS 脂质体的包封率测定 取 APPS 脂质体 3 批,各精密移取 5.0 mL ,依法上阴离子交换树脂柱,以 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 溶液为洗脱剂,洗脱液收集于 25 mL 量瓶中,以洗脱剂稀释至刻度。精密移取洗脱液 2.0 mL ,依法测定吸光度;同时按 2.2.3 项操作,建立标准曲线,并以回归方程计算游离 APPS 的量,再按公式计算包封率。结果分别为 $(70.45 \pm 2.48)\%$, $(70.10 \pm 2.38)\%$, $(69.94 \pm 2.67)\%$ 。

3 讨论

测定脂质体包封率的关键是游离药物与载药脂质体的分离,目前常用的分离方法主要有凝胶过滤法、超速离心法和透析法等。然而,对于多糖类脂质体,上述方法均有一定局限性,分离游离药物与载药脂质体难度较大。本文参考文献[10-11],根据 APPS 带负电性的特征,采用 DEAE-52 阴离子交换树脂吸附, $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 溶液为洗脱剂,分离脂质体与游离 APPS,结果表明该法能使两者达到完全分离。洗脱原理可能为洗脱剂中的 Cl^- 交换了带负电性的游离多糖,而被包封于脂质体内的多糖则不受 Cl^- 交换的影响,在 DEAE-52 阴离子交换树脂吸附的作用下,能使脂质体与游离 APPS 分离开来。

用 DEAE-52 阴离子树脂交换法洗脱游离 APPS,本文考察了洗脱剂的种类,蒸馏水不能使脂质体与游离多糖分离;洗脱剂(NaCl 溶液)的浓度对 APPS 的柱回收率有一定影响,浓度为 0.1 , $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液,均不能完全洗脱游离

APPS,柱回收率较低;采用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液洗脱,APPS 的平均柱回收率为 99.21% ;而空白脂质体的平均柱回收率为 0.07% 。因此,本文选定 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$ 溶液作为洗脱剂。结果表明,建立的 DEAE-52 阴离子树脂交换法操作简单,重复性好,可用于 APPS 脂质体包封率的测定。

[参考文献]

- [1] 吴瑾瑾,石森林,张小寅,等. 浙产猕猴桃属植物根、茎、叶中多糖的比较[J]. 中草药,2006,37(7):1099.
- [2] 杨艳杰,何弘水. 猕猴桃根提取物抗氧化及保肝作用的研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(19):8059.
- [3] 崔莹,张雪梅,陈纪军,等. 中华猕猴桃根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2007,8:1663.
- [4] 楼丽君,吕定量,胡增仁,等. 猕猴桃根抗肿瘤作用研究[J]. 中国药理学通报,2007,23(6):808.
- [5] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2001:594.
- [6] 朱盛山. 药物新剂型[M]. 北京:化学工业出版社,2003:414.
- [7] 李红汝,李淑芬. 脂质体中药物包封率的测定方法[J]. 药物分析杂志,2007,27(11):1844.
- [8] 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]. 中国药志,2006,41(22):1716.
- [9] 徐勇华,杨亚玲,彭海龙,等. 海带多糖脂质体的制备与质量评价[J]. 医药导报,2007,26(11):60.
- [10] 王绍宁,邓意辉,毕殿洲,等. 阳离子交换树脂一阶导数分光光度法测定盐酸环丙沙星脂质体包封率[J]. 沈阳药科大学学报,2002,19(3):192.
- [11] 索绪斌,邓英杰,井水泉,等. HPLC-ELSD-大孔吸附树脂分离法测定黄芪皂苷脂质体的包封率[J]. 中国药理学杂志,2004,39(9):680.
- [12] 尹鸿萍,张明宇. 螺旋藻多糖脂质体包封率的测定[J]. 中国生化药物杂志,2006,27(4):225.
- [13] 徐光域,颜军,郭晓强,等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J]. 食品科学,2005,26(8):342.

[责任编辑 全燕]