

二甲基姜黄素脂质体的制备及性能研究

李正义, 邵丹迪, 徐德锋, 何浩明, 孙小强*

(江苏省精细石油化工重点实验室, 常州大学石油化工学院, 江苏常州 213164)

摘要:以乙醇为溶剂, 采用薄膜分散法制备二甲基姜黄素(ASC-J9)脂质体。通过单因素试验和正交试验优化得到最佳制备工艺: 磷脂与胆固醇的质量比为 10:1、磷脂与 ASC-J9 的质量比为 1 000:10、水化温度为 60℃ 以及磷脂质量浓度为 6.67 mg/mL。最佳条件下制备的 ASC-J9 脂质体的包封率为 97.99%, 平均粒径为 145.7 nm, 其粒径分布较窄且在水中分散较好。4℃ 下 ASC-J9 脂质体的稳定性较好, 且脂质体可以较好地保护装载的 ASC-J9。该制备工艺具有绿色环保、操作简便、产品性能好等特点, 所制 ASC-J9 脂质体可以有效改善 ASC-J9 的热稳定性和水溶性。

关键词:二甲基姜黄素; 脂质体; 制备工艺; 稳定性; 水溶性

中图分类号: R943

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2018)11-0132-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2018.11.028

Studies on preparation and properties of dimethyl curcumin liposome

LI Zheng-yi, SHAO Dan-di, XU De-feng, HE Hao-ming, SUN Xiao-qiang*

(Jiangsu Province Key Laboratory of Fine Petrochemical Engineering, School of Petrochemical Engineering, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: Dimethyl curcumin (ASC-J9) liposome is prepared by the thin film dispersion method using ethanol as solvent. The optimal preparation conditions are obtained via single factor and orthogonal experiments that the mass ratio of phospholipid to cholesterol is 10:1, the mass ratio of phospholipid to dimethyl curcumin is 1 000:10, the hydration temperature is set at 60℃ and the concentration of phospholipid is 6.67 mg·mL⁻¹. Under the optimal conditions, the entrapment efficiency of dimethyl curcumin liposome can reach 97.99% and its particle size is averaged at 145.7 nm, with a very narrow particle size distribution. It can be well dispersed in water and remains stable at 4℃. The liposomes can protect the entrapped dimethyl curcumin well. This preparation technology has many characteristics such as environmental friendliness, simple operation, good product performance, etc. Dimethyl curcumin liposome prepared by this technology can effectively improve the thermal stability and water solubility of dimethyl curcumin.

Key words: dimethyl curcumin; liposome; preparation technology; stability; water solubility

姜黄素是从姜黄、莪术根茎中提取的一种天然脂溶性化合物, 广泛应用于食品、染料、药物等领域^[1], 尤其是在抗癌、抗炎以及治疗阿尔兹海默症等方面具有良好的治疗效果^[2-3]。其衍生物二甲基姜黄素(ASC-J9)作为雄性激素受体抑制剂^[4], 较姜黄素具有更高的抗癌活性, 可以更好地抑制癌细胞的增殖, 在治疗前列腺癌、脊髓延髓肌萎缩症上具有较好的效果^[4-5], 但是 ASC-J9 在实际应用中存在热稳定性差、水溶性差和生物利用度低的问题。

脂质体是由磷脂与胆固醇组成的类似于细胞膜结构的药物载体, 具有生物相容性好、控制药物释放、降低药物毒性、提高药物被动靶向性及稳定性等优点^[6-8], 在不破坏药物结构的前提下, 解决了脂溶性药物在水中溶解度低的问题^[9], 大幅提高药物的生物利用度^[10]。如王浩等^[11]通过薄膜分散法制备

的紫杉醇脂质体粒径均一且稳定性好, 包封率达 90%, 在一定程度上解决了紫杉醇水溶性差的问题。李翰旻等^[12]制备的水溶性姜黄素脂质体的稳定性较好, 且对肝癌细胞具有良好的抑制作用。因此, 笔者以乙醇作为绿色溶剂, 采用薄膜分散法制备 ASC-J9 脂质体, 并对其稳定性和水溶性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

ASC-J9, 纯度>98%, 根据文献[13-14]中所述的方法制备; 大豆磷脂酰胆碱, 生物试剂(BR), 德国 Lipoid 公司生产; 胆固醇, AR, 国药集团化学试剂有限公司生产。

旋转蒸发器, 德国 Heidolph 公司生产; 磁力搅拌仪, 德国 Heidolph 公司生产; Agilent 1260 型高效

收稿日期: 2018-03-01; 修回日期: 2018-09-05

基金项目: 国家自然科学基金(21572026); 江苏省高校自然科学研究重大项目(14KJA150002); 江苏省先进催化与绿色制造协同创新中心资助项目(ACGM2016-06-05)

作者简介: 李正义(1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为精细化工, zylj@cczu.edu.cn; 孙小强(1956-), 男, 博士, 教授, 研究方向为精细化工, 通讯联系人, sunxiaoliang@yahoo.com。

液相色谱仪,美国安捷伦公司生产;Scientz-750F 超声波分散仪,宁波新芝生物科技股份有限公司生产; Thermo 超速离心机,赛默飞世尔科技有限公司生产; ZS90 型激光粒度仪及 Zeta 电位分析仪,英国 Malvern 公司生产;岛津 UV-vis3600 型紫外-可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 ASC-J9 脂质体的制备

采用薄膜分散法制备脂质体。取大豆卵磷脂 0.5 g、胆固醇 0.05 g、ASC-J9 5 mg,加入适量无水乙醇溶解后,倒入茄形瓶中旋干溶剂;再加入 75 mL 水,置于旋蒸仪上,60℃ 旋转 30 min,将瓶壁上的膜完全剥离入水中;水化完全后,置于 60℃ 水浴中继续孵化 3 h,然后冰水浴超声(525 W)分散 15 min,得到 ASC-J9 脂质体。

1.2.2 ASC-J9 分析方法的建立

液相检测方法: Agilent ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ 反相柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相体系为 V(乙腈溶液):V(水溶液)=60:40,流速为 1.0 mL/min,柱温为 40℃,进样量为 20 μL,检测波长为 420 nm。

称取一定量的 ASC-J9,用无水乙醇作溶剂,配成浓度分别为 50、40、30、20、10、5 μmol/L 的 ASC-J9 乙醇溶液,采用上述液相分析方法进行测定。以 ASC-J9 的峰面积 A 为纵坐标,浓度 C (μmol/L) 为横坐标绘制标准曲线。

1.2.3 包封率的测定

吸取 ASC-J9 脂质体 1.0 mL,加入无水乙醇破乳并定容于 10 mL 容量瓶中,按 1.2.2 中所述的液相方法进行测定,得到 ASC-J9 的总浓度(A_1);另取 ASC-J9 脂质体置于离心管中,4℃、8 000 r/min 离心 45 min,取上清液 1 mL 用无水乙醇定容于 10 mL 容量瓶中,按 1.2.2 中所述的液相方法进行测定,得到被脂质体包裹的 ASC-J9 的浓度(A_2)。脂质体包封率计算式为:

$$\text{包封率}(\%) = (A_2/A_1) \times 100\% \quad (1)$$

2 结果与讨论

2.1 ASC-J9 分析方法

2.1.1 标准曲线绘制

按照 1.2.2 所述的液相方法对一系列不同浓度的 ASC-J9 进行测定并且绘制其标准曲线,如图 1 所示。线性回归方程为: $A = 62.284 5C - 21.035 7$, $R^2 = 0.999 6$ ($n = 6$),结果表明,ASC-J9 在 5 ~

50 μmol/L 浓度范围内线性关系较好。

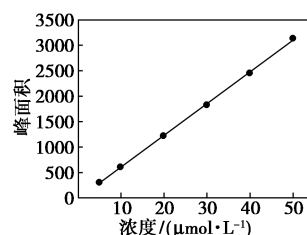


图 1 ASC-J9 乙醇溶液的标准曲线

2.1.2 ASC-J9 液相分析方法的考察

为了验证 1.2.2 中所述方法的精密度和准确度,分别进行水平重复实验和加标回收实验。分别测定 ASC-J9 的日内精密度和日间精密度,相对标准偏差分别为 0.21% 和 0.35%;分别测定不同加标水平(0.8、1.0、1.2)下的样品回收率,平均回收率为 98.35%,相对标准偏差为 0.8%。由此说明该分析方法具有较好的精密度和准确度。

2.2 ASC-J9 脂质体制备工艺的优化

2.2.1 单因素试验优化

在磷脂与 ASC-J9 质量比为 1 000:15,水化温度为 50℃,磷脂质量浓度为 10 mg/mL 的条件下,考察磷脂与胆固醇质量比(5:1、10:1、15:1、20:1)对 ASC-J9 脂质体包封率的影响,结果如图 2(a)所示。由图 2(a)可以看出,磷脂与胆固醇质量比为 10:1 时效果最佳,包封率为 95.22%。

在磷脂和胆固醇质量比为 10:1,水化温度为 50℃,磷脂质量浓度为 10 mg/mL 的条件下,考察磷脂与 ASC-J9 质量比(1 000:10、1 000:15、1 000:20、1 000:25)对 ASC-J9 脂质体包封率的影响,结果如图 2(b)所示。由图 2(b)可以看出,磷脂与 ASC-J9 质量比为 1 000:15 时效果最佳,包封率为 95.22%。

在磷脂和胆固醇质量比为 10:1,磷脂与 ASC-J9 质量比为 1 000:15,磷脂质量浓度为 10 mg/mL 的条件下,考察水化温度(35、40、50、60℃)对 ASC-J9 脂质体包封率的影响,结果如图 2(c)所示。由图 2(c)可以看出,包封率随水化温度的提高而提高,水化温度为 60℃ 时包封率已达 96.93%,考虑到能耗及药物稳定性问题,没有继续升高温度。

在磷脂和胆固醇质量比为 10:1,磷脂与 ASC-J9 质量比为 1 000:15,水化温度为 60℃ 的条件下,考察磷脂质量浓度(5、6.67、10、15 mg/mL)对 ASC-J9 脂质体包封率的影响,结果如图 2(d)所示。由图 2(d)可以看出,磷脂质量浓度为 10 mg/mL 和 15 mg/mL 时,包封率分别为 97.32% 和 97.80%,

考虑到载药量和成本问题,选用磷脂质量浓度为 10 mg/mL。

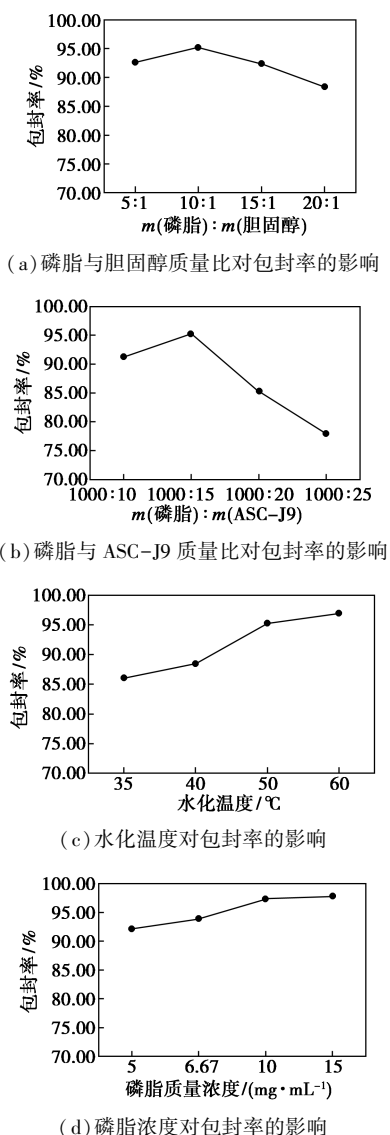


图 2 单因素试验优化结果

2.2.2 正交试验优化

根据单因素试验结果,考察磷脂与胆固醇质量比(A)、磷脂与 ASC-J9 质量比(B)、水化温度(C)以及磷脂浓度(D)这 4 个因素对 ASC-J9 脂质体包封率的影响,每个因素各取三个水平,选用 L₉(3⁴) 正交表进行正交试验优化,结果如表 1 所示。结果表明,各因素对 ASC-J9 脂质体包封率的影响程度依序为 A>B>C>D,最佳工艺条件为 A₂B₁C₃D₂,即磷脂和胆固醇的质量比为 10:1,磷脂与药物的质量比为 1 000:10,水化温度为 60℃,磷脂质量浓度为 6.67 mg/mL。在最佳工艺条件下平行制备 3 批 ASC-J9 脂质体,包封率分别为 97.66%、98.38%、97.93%,由此可见,该工艺条件下制备的 ASC-J9

脂质体具有较高的包封率且重复性好。

表 1 ASC-J9 脂质体制备正交表

	A	B	C/°C	D/(mg·mL ⁻¹)	包封率/%
1	5:1	1000:10	40	10.00	96.29
2	5:1	1000:15	50	6.67	92.71
3	5:1	1000:20	60	5.00	93.98
4	10:1	1000:10	50	5.00	97.46
5	10:1	1000:15	60	10.00	97.72
6	10:1	1000:20	40	6.67	95.31
7	15:1	1000:10	60	6.67	94.82
8	15:1	1000:15	40	5.00	85.55
9	15:1	1000:20	50	10.00	79.67
K ₁	94.33	96.19	92.38	91.23	
K ₂	96.83	91.99	89.95	94.28	
K ₃	86.68	89.65	95.50	92.33	
R	10.15	6.54	5.55	3.05	

2.3 ASC-J9 脂质体的质量评价

2.3.1 ASC-J9 脂质体在水中的分散性能

制备的 ASC-J9 脂质体可以有效解决 ASC-J9 在水中的溶解性问题,如图 3 所示。由图 3 可以看出,ASC-J9 在水中溶解性能极差,但 ASC-J9 脂质体可以在水中很好地分散。利用激光散射粒度分析仪测得水溶液中 ASC-J9 脂质体的平均粒径为 145.7 nm,分散系数为 0.361,结果如图 4 所示。由图 4 可以看出,粒径分布区间较窄,表明 ASC-J9 脂质体的粒径分布较为均匀且在水中的分散性较好。

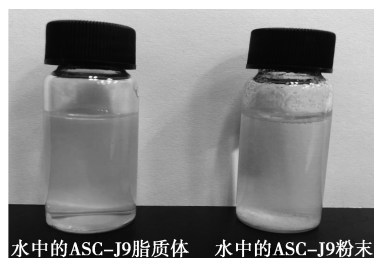


图 3 ASC-J9 脂质体与 ASC-J9 在水中的状态

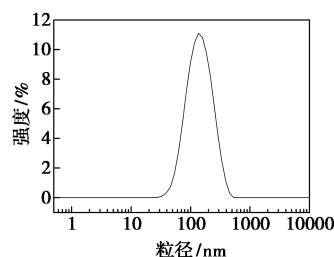


图 4 ASC-J9 脂质体粒径分布

2.3.2 ASC-J9 脂质体的稳定性

将 ASC-J9 脂质体分别置于 4℃ 和 25℃ 环境下保存,每隔一段时间观察其形态和包封率的变化情况,如图 5 所示。由图 5 可以看出,40 d 后,4℃ 下保存的 ASC-J9 的包封率为 91.22%,且未出现絮凝现象;而 25℃ 下保存的 ASC-J9 脂质体在 10 d 后便出现少量絮凝,包封率降至 91.01%,40 d 后出现了大量絮凝,包封率降至 82.95%。因此,ASC-J9 脂质体在 4℃ 环境下较为稳定,适宜冷藏保存。

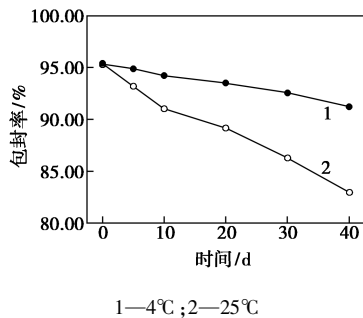
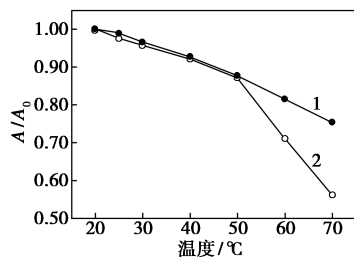


图 5 ASC-J9 脂质体包封率变化

为进一步考察脂质体对 ASC-J9 热稳定性的影响,利用紫外-可见分光光度计在 420 nm 波长下考察温度对 ASC-J9 脂质体和游离 ASC-J9 降解速率的影响,如图 6 所示。由图 6 可以看出,20~50℃ 范围内,ASC-J9 脂质体和游离 ASC-J9 的降解速率相当,但 50℃ 之后两者出现明显的分化,游离 ASC-J9 的降解速率明显加快,而 ASC-J9 脂质体的降解速率保持平缓,由此可见,脂质体可以较好地保护包载的 ASC-J9,提升其热稳定性。



1—ASC-J9 脂质体;2—游离 ASC-J9

图 6 温度对 ASC-J9 脂质体和游离 ASC-J9 的影响

注: A_0 为 20℃ 时 ASC-J9 脂质体与游离 ASC-J9 的吸光度;

A 为不同温度下 ASC-J9 脂质体与游离 ASC-J9 的吸光度。

3 结论

利用乙醇作为绿色溶剂,采用薄膜分散法制备

ASC-J9 脂质体。建立了 ASC-J9 液相分析方法,在 5~50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内线性关系较好且具有较好的精密度和准确度。通过单因素试验和正交试验得到了最佳的制备工艺,此时,制备的 ASC-J9 脂质体的包封率为 97.99%,平均粒径为 145.7 nm,粒径分布较窄且在水中分散较好,有效改善了 ASC-J9 的水溶性。4℃ 下 ASC-J9 脂质体的稳定性较好,且脂质体可以较好地保护包载的 ASC-J9,提升其热稳定性。

参考文献

- [1] Tamvakopoulos C, Dimas K, Sofianos Z D, et al. Metabolism and anticancer activity of the curcumin analogue, dimethoxy curcumin [J]. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13(4): 1269-1277.
- [2] 陈建平, 李琳, 苏健裕. 姜黄素的抗氧化及抗肿瘤活性研究 [J]. *现代食品科技*, 2014, 30(12): 11-15.
- [3] 马翊斌, 俞春江, 李峰. 姜黄素应用于阿尔茨海默病的机制研究进展 [J]. *疑难病杂志*, 2014, 13(5): 539-541.
- [4] Yamashita S, Lai K P, Chuang K L, et al. ASC-J9 suppresses castration-resistant prostate cancer growth through degradation of full-length and splice variant androgen receptors 1, 2 [J]. *Neoplasia*, 2012, 14(1): 74-83.
- [5] Yang Z, Chang Y J, Yu I C, et al. ASC-J9 ameliorates spinal and bulbar muscular atrophy phenotype via degradation of androgen receptor [J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(3): 348-353.
- [6] 郑杭生, 黄绳武, 李范珠, 等. 盐酸青藤碱脂质体的制备工艺研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(4): 408-413.
- [7] 瞿叶清, 陈军, 林爱华, 等. 马钱子总生物碱复合磷脂脂质体的抗肿瘤作用研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(3): 143-145.
- [8] 吕清, 韩旻, 李黎明, 等. 双配体修饰的阿霉素脂质体靶向于脑胶质瘤的体外研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2012, 29(11): 963-970.
- [9] 孙欣欣, 金楠. 脂质体研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2009, 38(12): 20-21.
- [10] 牛静, 邹立强, 刘伟, 等. 姜黄素脂质体的研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2014, 35(7): 352-356.
- [11] 王浩, 邓英杰. 紫杉醇冻干脂质体的制备及含量稳定性 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2008, 25(8): 609-614.
- [12] 李瀚旻, 晏雪生, 明安萍, 等. 脂质体-姜黄素水溶液剂抗肝癌效应的稳定性研究 [J]. *中草药*, 2006, 37(4): 561-565.
- [13] 李正义, 严金贝, 殷乐, 等. 二甲基姜黄素对 Fe^{3+} 的选择性识别研究 [J]. *分析测试学报*, 2016, 35(10): 1306-1310.
- [14] Li Z Y, Yan J B, Yin Y, et al. A fluorescent chemosensor for Al^{3+} based on C=O isomerization derived from curcumin [J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2016, 34(7): 657-661. ■