

聚乙二醇修饰的原花青素脂质体的制备及稳定性研究

谭旭坤, 余倩*, 柯永乐, 骆高丹, 韩胜博

(广东工业大学轻工化工学院; 广东省高等学校清洁化学技术重点实验室, 广东 广州 510006)

摘要: 采用逆向蒸发-冻融法制备原花青素脂质体, 利用聚乙二醇(PEG)溶液与原花青素脂质体混合制备出 PEG 修饰的脂质体。脂质体经聚乙二醇修饰后, 原花青素包封率和稳定性都得到提高。实验证明, 随着 PEG 溶液质量分数的增加, 脂质体的包封率先增后降, 在加入质量分数为 2% PEG 溶液时, 得到的原花青素脂质体包封率最高, 为 73.95%, 相比未修饰脂质体高 6.84%, 平均粒径为 357.0 nm。并且研究了最优条件制备的聚乙二醇修饰原花青素脂质体在常温下的稳定性和体外缓释性能, 结果表明, 聚乙二醇修饰后的脂质体性能得到提高。

关键词: 氢化卵磷脂; 原花青素; 脂质体

中图分类号: TQ314

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2016)07-0064-04

DOI: 10.16606/j.cnki.issn.0253-4320.2016.07.016

Preparation and stability property of PEG-modified proanthocyanidin liposomes

TAN Xu-kun*, YU Qian, KE Yong-le, LUO Gao-dan, HAN Sheng-bo

(School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Key Laboratory of Clean Chemistry Technology of Guangdong Regular Higher Education Institutions, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Proanthocyanidin liposome is prepared by reverse phase evaporation-freeze thaw method. The PEG-modified proanthocyanidin liposome is obtained by mixing PEG solution with the liposome suspension. The results show that with the increase of the mass ratio of PEG1500, the encapsulation efficiency is increased at first and then decreased. When the liposome suspension is mixed with 2% mass ratio of PEG solution, the highest encapsulation efficiency (73.95%) can be achieved, which is increased by 6.84% in comparison with unmodified liposome. The average particle size of such PEG-modified proanthocyanidin liposome is 357.0 nm. The stability and *in vitro* slow-release performance of PEG-modified proanthocyanidin liposome prepared under the optimal conditions are also performed. The PEG-modified proanthocyanidin liposome exhibits improved performance.

Key words: hydrogenated lecithin; proanthocyanidin; liposome

原花青素(Procyanidins, PC)是一种具有特殊分子结构的生物类黄酮, 是目前国际上公认的清除人体内自由基最有效的天然抗氧化剂。实验证明, 原花青素的抗自由基氧化能力是维生素 E 的 50 倍, 维生素 C 的 20 倍^[1-2], 除此以外, 原花青素还具有抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗高血压等功效^[3-4]。因此, 其在保健品、食品添加剂、药品、化妆品等领域得到广泛的应用^[5-7]。在国外, 原花青素脂质体微胶囊被成功开发成各类化妆品产品, 但国内此领域研究相对较少。原因是化妆品用脂质体微胶囊粒径要求不能太大, 否则脂质体中有效成分无法透过角质

层被皮肤吸收, 目前国内工业化生产技术达不到这一要求。胡博等^[8]用大豆卵磷脂、胆固醇为膜材, 优化条件制备出原花青素脂质体, 得到较高的包覆率, 但脂质体粒径分布不均, 整体偏大。郭芳等^[9]在胡博等的研究基础上进一步优化, 制备出粒径较小的脂质体, 但稳定性有待检验。

脂质体是一类能够把药物包封于类脂质双分子层内而形成的微型泡囊体, 具有良好的靶向性、缓释性、无免疫原性和易降解等优点^[10]。目前, 制备脂质体所用壁材多为大豆卵磷脂, 但由于其含有大量不饱和和脂肪链, 容易氧化变质, 使制备的脂质体稳定

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 广东省教育厅科技项目(2013CXZDA016)

作者简介: 谭旭坤(1990-), 男, 硕士生, tanmike@foxmail.com; 余倩(1964-), 博士, 教授, 研究方向为催化材料及精细化工领域, 通讯联系人, yuqgdut@126.com。

性不高。氢化卵磷脂是在一定温度和压力下利用催化剂对磷脂内不饱和脂肪酸部分或全部双键加氢反应得到的,其氧化稳定性得到一定提高。为了使制备的脂质体不易霉变并具有良好稳定性,笔者利用氢化卵磷脂、胆固醇为壁材制备脂质体,用聚乙二醇(PEG)对其进行修饰,提高原花青素脂质体的包封率和稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

葡萄籽提取物(原花青素, $w > 98\%$),山东曲阜圣嘉德生物科技有限公司生产;氢化卵磷脂,广州市颐和贸易有限公司生产;胆固醇,美国默克有限公司生产;磷酸盐缓冲溶剂(PBS),赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司生产;聚乙二醇(PEG1500, AR)、Tween80(CP)、Span80(CP),无水乙醇(AR)、无水乙醚(AR),天津大茂试剂厂生产;实验用水为去离子水。

OSB-2100 旋转蒸发仪, EYELA 生产; KQ-250VDB 超声波清洗仪, 上海霄汉实业发展有限公司生产; H1850 高速离心机, 湘仪仪器有限公司生产; UV-2700 紫外-可见分光光度计, 日本岛津有限公司生产; Zeta 电位及粒度分析仪, 美国 Brookhaven 公司生产; SU8010 高分辨场发射扫描电镜, 日本日立公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 原花青素脂质体的制备

采用逆相蒸发-冻融法制备原花青素脂质体。按质量比 3:1 准确称取氢化卵磷脂和胆固醇并加入到烧杯中, 加入 Tween80 和 Span80 各 2 滴, 加入体积比为 3:1 乙醇乙醚混合溶液 20 mL, 于 50℃ 下搅拌至氢化卵磷脂完全溶解, 在超声条件下缓慢滴入 4 mL 质量分数为 45% 原花青素磷酸盐缓冲溶剂(PBS), 超声 20 min。把溶液放在旋转蒸发仪上 50℃ 减压旋蒸至溶剂完全除去。加入 20 mL PBS 溶液, 旋转蒸发 50 min, 使产物充分水化后超声 10 min, 于 -20℃ 冷冻 12 h 得到原花青素脂质体乳浊液。用 PEG 对其进行修饰^[11], 按一定质量分数 PEG1500 的 PBS 溶液与等体积制备好的脂质体混合, 在 4℃ 下放置 60 min, 得到最终产物。

1.2.2 包封率的测定

准确移取混悬液 3 mL 至超滤离心管中(截留相对分子质量为 100 kD), 5 000 r/min 离心 20 min, 取滤液 2 mL, 定容至 5 mL, 用紫外可见分光光度计在 280 nm 处测其吸光度, 根据标准曲线回归方程算出未包覆的原花青素含量。包封率计算式为:

$$\text{包封率} = \left[\frac{\text{投料药物质量} - \text{滤液中的药物质量}}{\text{投料药物质量}} \right] \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 脂质体粒径的测定

取一定量原花青素脂质体分散在蒸馏水中, 充分

(上接第 63 页)

[23] 宋党育, 秦勇, 王文峰. 电厂燃煤中有害微量元素的燃烧迁移行为研究[J]. 中国矿业大学学报, 2003, 32(3): 316-320.

[24] 刘桂建, 彭子成, 杨萍玥, 等. 煤中微量元素在燃烧过程中的变化[J]. 燃料化学学报, 2001, 29(2): 119-123.

[25] 张军营, 郑楚光, 任德怡, 等. 循环流化床煤燃烧产物中微量元素分布特征[J]. 燃烧科学与技术, 2003, 9(1): 64-67.

[26] 郑楚光, 张军营, 赵永椿, 等. 煤燃烧汞的排放及控制[M]. 北京: 科学出版社, 2010.

[27] 钱卫. 低阶烟煤中低温热解及热解产物研究[D]. 北京: 中国矿业大学(北京), 2012.

[28] 张宇宏. 煤中硫、氟、氯、汞、砷常压热解迁移特征的研究[D]. 北京: 煤炭科学研究总院, 2004.

[29] 魏晓飞, 张国平, 李玲, 等. 黔西南高硫煤热解过程中微量元素释放规律研究[J]. 中国环境科学, 2011, 31(12): 2005-2012.

[30] 余琛. 煤中汞、氯、氟释放和形态转化规律的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009.

[31] Lee B Clarke. The fate of trace elements during coal combustion and gasification: An overview[J]. Fuel, 1993, 72(6): 731-736.

[32] Bunt J R, Waanders F B. Trace element behaviour in the Sasol-Lurgi MK IV FBDB gasifier. Part 1-The volatile elements; Hg, As, Se, Cd and Pb[J]. Fuel, 2008, 87: 2374-2387.

[33] Joseph J Helble, Wahab Mojtahedi, Jussi Lyyranen, et al. Trace element partitioning during coal gasification[J]. Fuel, 1996, 75(8): 931-939.

[34] Richaud R, Lachas H, Healey A E, et al. Trace element analysis of gasification plant samples by i. c. p. -m. s.; validation by comparison of results from two laboratories[J]. Fuel, 2000, 77: 1077-1087.

[35] 李扬, 张军营, 何北惠, 等. 煤热解气化过程中汞的形态转化和释放规律[J]. 工程热物理学报, 2008, 29(10): 1775-1779.

[36] 黄亚继, 金保升, 仲兆平, 等. 煤气化过程中痕量元素迁移规律与气化温度的关系[J]. 中国电机工程学报, 2006, 26(4): 10-15.

[37] 高聚忠. 水煤浆气化工艺过程中砷平衡试验研究[J]. 煤化工, 1999, (4): 26-28.

[38] 贺根良, 郑亚兰, 门长贵. 湿法气流床煤气化过程中 N、S、As 元素的迁移分析[J]. 煤化工, 2009, (6): 10-14. ■

摇匀后用 0.45 μm 滤膜过滤,用 Zeta 电位及粒度分析仪测定脂质体粒径大小。

1.2.4 脂质体显微形态观察

取一定量原花青素脂质体分散在蒸馏水中,取样品真空喷金,在扫描电子显微镜下进行形貌观察。

1.2.5 脂质体的稳定性测试

利用浊度/光散射测定法对制备脂质体进行粒径变化的测定。在常温下,每隔 5 d 取样品,用 PBS 配制成 1 mg/mL 的溶液,用紫外可见分光光度计在 500 nm 处测其吸光度,绘制出吸光度随时间变化的曲线。

浊度/光散射测定法^[12]是一种快速测定脂质体大小的方法,当不需要定量测定脂质体粒径大小的分布时,利用该方法能够反映出脂质体粒径及团聚变化情况。

1.2.6 脂质体体外释放研究

准确称取 5 mL 原花青素脂质体于透析袋中,透析袋两头用夹子夹住悬放于烧杯中,加入 100 mL pH = 7.2 的 PBS 溶液,避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴搅拌。分别在 0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48 h 取 2 mL 袋外液同时补充相同体积的 PBS 溶液。利用紫外可见分光光度计进行测试,计算累计释放原花青素百分率,每个样品做 3 组平行实验,计算释放率:

$$\text{累计释放率 } i\% = i_{\text{袋外液}} / i_{\text{总}} \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 包封率

包封率与 PEG1500 质量分数的关系如图 1 所示。经 PEG 表面修饰的脂质体包封率比未修饰的高,且随着 PEG 质量分数的增加,包封率先增加后减少。实验测得,当 PEG1500 质量分数为 2% 时,得到的原花青素脂质体包封率最高,为 73.95%。这是因为 PEG 分子中含有大量的乙氧基,能够在脂质体外层交错重叠,形成水化膜,根据 PEG 质量分数的大小,PEG 在脂质体外层存在 2 种空间构象“蘑菇云”或“毛刷状”,研究表明,毛刷状空间构象的 PEG 修饰脂质体的屏蔽效果更好^[13]。因此,随着 PEG1500 质量分数的增加,覆盖在脂质体外层的 PEG 能紧密排列,形成毛刷状空间构象,致使药物较难泄漏,包封率得到增加。当 PEG 质量分数增加时,脂质体外层覆盖的 PEG 数量不断增多,包封率却开始减少。笔者认为,PEG 具有很强水溶性,当覆盖在脂质体外层的 PEG 数量过多时,PEG 能够透过脂质体外壁与原花青素相溶,从而导致药物泄漏,

包封率减少。

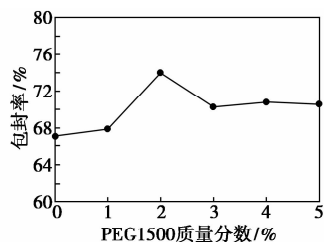


图 1 包封率与 PEG1500 质量分数的关系

2.2 粒径分布及 Zeta 电位

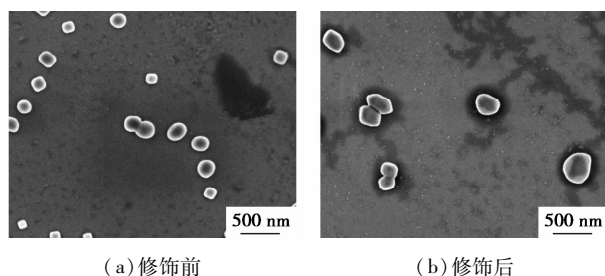
PEG 修饰原花青素脂质体前后的粒径大小及 Zeta 电位如表 1 所示。从表 1 可知,未经 PEG 修饰的脂质体平均粒径为 265.9 nm,PEG 修饰后的脂质体平均粒径为 357.0 nm。研究表明,脂质体粒径小于 600 nm 时,脂质体极易穿透皮肤进入角质层^[14]。因此所制备的脂质体能发挥有效的作用。同时测得经 PEG 修饰前后该脂质体 Zeta 电位分别为 -41.03 mV 和 -47.63 mV,说明经 PEG 修饰后脂质体稳定性更好。

表 1 PEG1500 修饰前后原花青素脂质体粒径及 Zeta 电位

脂质体	修饰前	修饰后
平均粒径/nm	265.9	357.0
Zeta 电位/mV	-41.03	-47.63

2.3 脂质体显微形态观察

PEG 修饰脂质体表面前后的扫描电镜图如图 2 所示。通过对比发现,PEG 修饰前后,脂质体形状没有明显变化,均呈圆球或椭圆球状,但经过 PEG 修饰后脂质体平均粒径较大,可初步认为脂质体外层包覆了 PEG。



(a) 修饰前

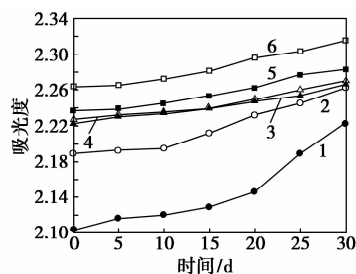
(b) 修饰后

图 2 PEG1500 修饰前后原花青素脂质体的扫描电镜图

2.4 脂质体稳定性测试

脂质体稳定性是一项重要的评测指标,能够在一定程度上判断脂质体的存放期限。以不同质量分数的 PEG1500 修饰原花青素脂质体常温下进行稳定性实验,脂质体吸光度随时间变化情况如图 3

所示。



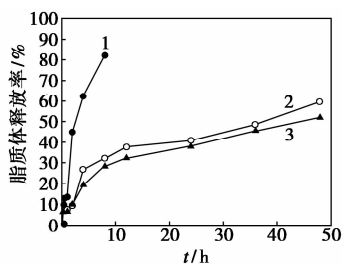
1—0% ; 2—1% ; 3—2% ; 4—3% ; 5—4% ; 6—5%

图3 稳定性与 PEG1500 质量分数的关系

由图3可知,常温下贮存的原花青素脂质体吸光度随时间增加逐渐增大。这说明在贮存过程中脂质体出现团聚,粒径变大。对比发现,经PEG修饰的原花青素脂质体吸光度变化幅度较少,说明PEG覆盖在脂质体表面后形成空间位阻,能够减缓脂质体间的团聚速度,脂质体中加入质量分数2%和3%的PEG,吸光度变化曲线相对平缓,脂质体稳定性相对较强。

2.5 脂质体体外释放测试

根据脂质体稳定性测试结果,选取PEG1500质量分数为2%的原花青素脂质体进行体外释放测试。原花青素溶液、未经PEG修饰原花青素脂质体和质量分数为2%PEG1500修饰原花青素脂质体的体外释药性随时间变化曲线如图4所示。从图4中可看出,在37℃、pH为中性环境下,原花青素脂质体释放率明显低于游离原花青素,且添加了PEG的脂质体体外释放时间最长。实验证明,经过PEG修饰后的脂质体,在48h后原花青素的释放量达到52%。由此看出,其保留时间较长,能够对皮肤进行持续有效地保湿抗紫外作用。



1—原花青素;2—0% PEG;3—2% PEG

图4 原花青素溶液、未修饰原花青素脂质体、2% PEG 修饰原花青素脂质体体外释药性

3 结论

采用逆向蒸发-冻融法制备原花青素脂质体,

并用PEG1500对其进行修饰。所得脂质体的包封率、稳定性和体外释药性均得到明显提高。当PEG1500质量分数为2%时,得到最高包封率,为73.95%,此时脂质体存放1个月内,没有出现明显团聚或分层等失衡状态,且体外缓释时间大于48h。综合可知,经PEG1500修饰后原花青素脂质体应用在化妆品中,能够达到持续保湿抗紫外等功效。

参考文献

- [1] 丛红群,成汉义,钟进义. 葡多酚对N-亚硝基化合物诱变性的抑制作用[J]. 癌变·畸变·突变,2004,16(1):30-33.
- [2] Bagchi D, Garg A, Krohn R L, et al. Oxygen free radical scavenging abilities of VC and VE and a grape seed proanthocyanidins extract in vitro[J]. Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 1997, 95(2):179-189.
- [3] Merfort Heilmann J, Weiss M. Radical scavenge activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs[J]. Planta Medica, 1996, 62(4):289-292.
- [4] Packer L, Rimbach G, Virgili F. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (pinus maritima) bark, pycnogenol[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 27(5/6):704-724.
- [5] Paola C, Maurizio C, Paola B, et al. Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes[J]. Journal of Controlled Release, 2000, 63:19-30.
- [6] Stepan K, Josef M, Jiri N. Lyophilised liposome-based formulations of α -tocopheryl succinate: Preparation and physico-chemical characterisation[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 99(5):2434-2443.
- [7] Maria L I, Paola B, Silvia A, et al. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel[J]. Journal of Controlled Release, 2003, 91:417-429.
- [8] 胡博,姚薇薇,刘宁,等. 原花青素脂质体的制备条件优化[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(9):106-111.
- [9] 郭芳,胡国胜,奚朝晖,等. 化妆品用原花青素脂质体的制备及应用性能研究[J]. 日用化学工业, 2014, 44(3):143-150.
- [10] 穆筱梅,钟振声. 大豆卵磷脂脂质体的制备[J]. 江苏农业科学, 2007, 2:184-186.
- [11] Takeuchi H, Yamamoto H, Toyoda T, et al. Physical stability of size controlled small unimaller liposome coated with a modified polyvinyl alcohol[J]. International Journal of Phamaceutics, 1998, 164:103-111.
- [12] 张灵芝. 脂质体制备及其在生物医学中的应用[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998:57-58.
- [13] 陈涛,王昭,傅经国,等. 聚乙二醇修饰脂质体研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2003, 2(5):801-805.
- [14] 穆筱梅. 脂质体在化妆品中的研究进展[J]. 日用化学工业, 2007, 37(1):46-49. ■