

牛蒡寡糖脂质体的制备和性质鉴定

郜海涛^{1,2}, 顾黎^{1,2*}, 张鹏英², 孔蕴^{1,2}, 陈靠山², 王鹏^{2,3}

(1. 山东大学生命科学学院微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250100; 2. 国家糖工程技术研究中心, 山东 济南 250100; 3. The Ohio State University, Ohio State, PA United state, 19104)

摘要:目的 采用不同的方法制备牛蒡寡糖脂质体, 并对脂质体的主要性质进行检测, 为其临床应用奠定基础。方法 分别采用旋转薄膜分散法和逆相蒸发法制备大多室脂质体(MLV), 再利用高压均质机处理得到小单室脂质体(SUV)制剂, 并对此制剂的形态学、包封率、Zeta电势、粒径分布和稳定性等参数进行实验研究。结果 均质后脂质体的平均粒径为75 nm左右, 粒度分布均匀, 电镜观察形态是呈球形的小囊泡, 高压均质后其包封率达到45.55%, 4℃下放置较稳定。结论 薄膜分散法更适用于制备牛蒡寡糖脂质体。且其性质比较稳定, 大小均匀, 可进行细胞学和动物活体实验, 为牛蒡寡糖脂质体的临床应用奠定基础。

关键词:牛蒡寡糖(BOS); 脂质体; 超滤管超滤法; 紫外可见分光光度法

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 1001-7119(2010)06-0863-06

Preparation and Characterization of *Arctium lappa* L. Oligosaccharide Liposome

GAO Haitao^{1,2}, GU Li^{1,2*}, ZHANG Pengying², KONG Yun^{1,2}, CHEN Kaoshan², WANG Peng^{2,3}

(1. State key laboratory for microbial technology, School of life science, Shandong University, Jinan 250100, China; 2. National glycoengineering research center, Jinan 250100, China; 3. The Ohio State University, Ohio State, PA United state, 19104)

Abstract: Objective Two different methods were used to prepare Burdock oligosaccharide liposome, followed by an evaluation of their major characteristics, so as to develop a foundation for clinical application. **Methods** Liposomes were prepared by the rotary-film evaporation method and the reverse evaporation method. Multilamellar large vesicles (MLV) were obtained first, which then would be converted into small unilamellar vesicles (SUV) using a high pressure homogenizer. Then, the major characteristics of liposomes, such as morphology, entrapment efficiency, zeta potential, size distribution and stability, were also analyzed. **Result** About 45.55% of initial *Arctium lappa* L. oligosaccharide was entrapped into liposomes, and the result of transmission electron micrograph showed that the treated *Arctium lappa* L. oligosaccharide liposomes were evenly distributed small spherical vesicles, with a mean diameter of 75 nm after treating with high pressure homogenizer, and the liposome remained more stable at 4℃. **Conclusion** The rotary-film evaporation method is more suitable for the preparation of Burdock oligosaccharide liposomes. The obtained liposomes could be used in cell culture and animal experiments to further study their biological effects.

Key words: *Arctium lappa* L. oligosaccharide; liposome; moline ultrafiltration; UV-VIS.

牛蒡寡糖为一种水溶性、菊糖构型的低聚果糖^[1], 可从牛蒡(*Arctium lappa* L.)根中提取, 是

一种传统的药食同源菊科植物, 具有多种药理活性^[2]。研究发现, 牛蒡寡糖不仅具有免疫抑制和生

收稿日期: 2009-08-05

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(2007BS02001)和国家973项目(2007CB914800)资助

作者简介: 郜海涛(1986-), 男, 安徽人, 学士. evilen9@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 顾黎, 博士, 副教授, E-mail: yehe.gl@sdu.edu.cn

物调节功能,同时作为一种果寡糖,还可以改善血脂,降低血压和血糖^[3,4]。但是由于消化道分解和小肠粘膜细胞对其吸收有限,使这种低聚果糖不能有效发挥生物学功能^[5]。因此探讨一种新的药物剂型来丰富其给药途径,对牛蒡寡糖的应用具有重要意义。

脂质体是近年来备受科研和临床关注^[6]的一种新的药物剂型,丰富了药物的给药方式。脂质体的口服可以避免因胃酸对药物的分解而导致的疗效降低;而且通过静脉给药,也能利用脂质体对富含免疫细胞的脏器如淋巴、肝、脾等的被动靶向性^[7],而更好地发挥免疫调节作用;除此以外,它还具有减少用药剂量、降低毒性、延缓释放等优点^[8]。本课题组将分离得到的牛蒡寡糖纯品(BOS-2)作为包封药物,分别采用两种不同的方法制备脂质体,并进行了高压均质处理,得到了满足过滤除菌及临床静脉注射需要的小粒径脂质体^[9]。通过脂质体主要性质,如粒径和包封率等的检测,选择出了一种较好的制备方案,为牛蒡寡糖脂质体的大量制备、生物活性研究、体内实验及临床应用等奠定了基础。

1 仪器与材料

大豆磷脂(PC,含量 90%),胆固醇(CH),牛蒡低聚寡糖(本实验室提取纯化),葡萄糖标准品;RE52-AA 旋转蒸发仪,SHB- 循环水式多用真空泵,CQ-250 超声波清洗器,Helios-γ 紫外-可见光分光光度计,ATS-AH100D 超高压纳米均质机,LS-230 型全自动激光粒度分析仪,JEM-2100 高分辨电子显微镜等。

2 实验方法和结果

2.1 标准曲线的制作

精密称取干燥至恒重的定量无水葡萄糖,用 pH=7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)配制成 0.2 mg/mL 的标准溶液,量取 2 mL,加入 1 mL 5%苯酚试剂,并迅速滴加浓硫酸 5 mL,充分混匀,放置 5 min,后置沸水浴中加热 15 min,取出放置 20 min。同时,用 PBS 同法操作,作为参比;所用辅料为空白对照。之后在 300~700 nm 波长之间进行扫描,以确定葡萄糖的体外测定波长。结果葡萄糖在 488

nm 处有最大吸收峰,而对应的溶剂辅料无吸收干扰,故确定 488 nm 为葡萄糖体外测定波长。

准确配制一系列浓度的标准待测液,并按照上述“苯酚-浓硫酸”法处理,以 PBS 为空白参照,在所确定的波长下测定吸光度值(A)。以浓度 C(mg/mL)对 OD 值进行线性回归,求出标准曲线为 $Y=12.4051X+0.01428$ ($R=0.99962$; $SD=0.01742$; $n=3$)。结果表明在葡萄糖浓度为 0.005 至 0.15 mg/mL(即 5~150 μg/mL)的区间内,线性关系良好。

2.2 回收率和精密度测定

配制低、中、高浓度的葡萄糖标准溶液,分别为 20、60、100 μg/mL,在 1 d 内测定 5 次和 5 d 内测定 5 次浓度值,将测得的浓度值和配制的浓度相比较,计算其回收率以及日内和日间精密度 RSD。结果表明,其回收率达到 99%,日内和日间精密度 RSD<3%,见表 1。

表 1 葡萄糖回收率和精密度试验结果(n=5)

Table 1 The results of Glucose recovery and precision test (n=5)

浓度/ (μg/mL)	回收率试验		精密度试验	
	回收率/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%	
20	99.04	1.73	2.10	
60	99.49	0.72	0.69	
100	99.17	0.77	0.73	

2.3 换算因子的测定

精密称取干燥至恒重的牛蒡寡糖,配制成 0.1 mg/mL 的溶液,按照“2.1”项方法处理,紫外分光光度法测定 OD 值,并计算其寡糖溶液中葡萄糖的浓度 C。则换算因子 $f=C'/C$ 。其中 C'为所配制牛蒡寡糖浓度值。结果计算出牛蒡寡糖溶液换算因子 f 为 1.28。

2.4 牛蒡寡糖脂质体的制备

2.4.1 处方优化筛选

为获得最佳脂质体制备方案,本实验以包封率为参考,对卵磷脂和胆固醇的比例、有机相和水相的种类及比例、旋转蒸发温度以及高压均质等条件都做了优化,从而筛选出一套最优制备方案:卵磷脂与胆固醇的质量比为 4:1;有机相为氯仿,水相为 PBS(pH=7.4),两者体积比为 1:2;旋转蒸发温度为 37 °C;均质条件为 800 bar,3 个循环。

2.4.2 薄膜分散-高压均质法

按筛选的处方精密称取一定量的大豆磷脂和胆固醇,溶于氯仿并置于梨心瓶中,37℃旋转蒸发,使脂质均匀成膜,并继续抽干以除去痕量有机溶剂。之后加入一定量的牛蒡寡糖溶液,使脂质膜完全脱落转入水相,充分溶胀、水合,得到粗制的大多室(MLV)牛蒡寡糖脂质体悬液。同时以PBS代替上述牛蒡寡糖溶液进行相同操作,得到空白脂质体。再将得到的MLV脂质体稀释10倍,高压均质机处理,得到小单室(SUV)脂质体悬液^[9]。

2.4.2 逆相蒸发-高压均质法

配置好大豆磷脂和胆固醇的氯仿溶液,置于梨心瓶中,加入牛蒡寡糖溶液,超声乳化至形成均匀稳定的W/O型乳剂。然后37℃旋转蒸发,待形成类白色胶状物,再加入一定量的PBS,旋转脱胶,得到大单室脂质体(LUV)。空白脂质体即是用PBS代替上述牛蒡寡糖溶液进行同样操作。之后,同样方法得到小单室(SUV)脂质体悬液。

2.5 脂质体形态观察

取制备好的脂质体样品适量,根据要求稀释数倍后,用3%磷钨酸负染,滴至铜网上,自然挥干后用透射电子显微镜观察并拍摄照片。结果见图1,结果表明,本实验制备的牛蒡寡糖脂质体为粒径均匀的球状或近球状小囊泡。

2.6 Zeta电势测定

取牛蒡寡糖脂质体适量,用PBS液稀释后,用微电泳仪测得其Zeta电势为-12.56 mV。这为脂质体在胶体力学上的稳定性提供了可能。

2.7 脂质体粒径与粒度分布研究

取两种方法制备的牛蒡寡糖脂质体,经220 μm滤膜过滤后,用激光粒度分析仪进行测定,并

用动态光散射处理软件处理,结果显示,两种方法制备的脂质体粒径分布如图2所示,薄膜分散法制备的脂质体平均粒径为74.2 nm,分散系数为0.582;逆相蒸发法制备的脂质体平均粒径为68.8 nm,分散系数为0.608。两种方法制备的脂质体粒径均在40 nm至300 nm的范围,达到均质的目的。

2.8 包封率测定

本实验采用超滤-紫外可见分光光度法进行包封率的测定。取5 mL制备好的脂质体,用30 kD截留分子量的超滤管进行离心,取下层液体,用‘苯酚-浓硫酸’法测定牛蒡寡糖含量 C ,并计算包封率 $E(E=(1-C/C_{总}) \times 100\%)$ 。其中 n 为实验次数, $C_{总}$ 为牛蒡寡糖总浓度。结果见表2。

由表2知,在高压均质前,薄膜分散法制备的牛蒡寡糖脂质体包封率略低,这也证实了逆向蒸发法的优越性;但在高压均质后,逆向蒸发法制备的脂质体包封率急剧降低,而薄膜分散法制备的脂质体下降不大,因此,我们选择薄膜分散-高压均质法制备牛蒡寡糖脂质体,并将对其稳定性进行实验研究。

2.9 脂质体稳定性研究

将制备好的牛蒡寡糖脂质体分成两份,分别置于室温和4℃冰箱中储存,分别于5、10、15、

表2 包封率测定结果($\bar{x} \pm SD, n=3$)

Table 2 The results of liposome encapsulation efficiencies ($\bar{x} \pm SD, n=3$)

制备方法	高压均质前 包封率/ %	高压均质后 包封率/ %
薄膜分散法	54.22±1.84	45.55±3.05
逆相蒸发法	56.44±2.51	27.42±3.04

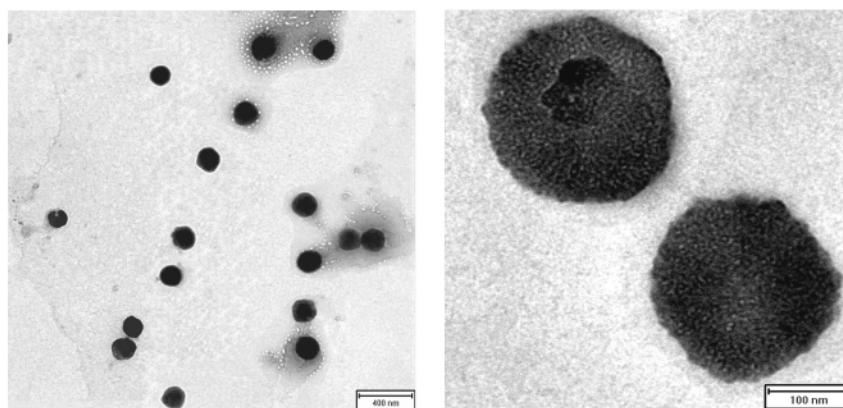


图1 牛蒡寡糖脂质体的透射电镜照片

Fig. 1 Transmission electron photomicrograms of *Arctium lappa* L. liposomes

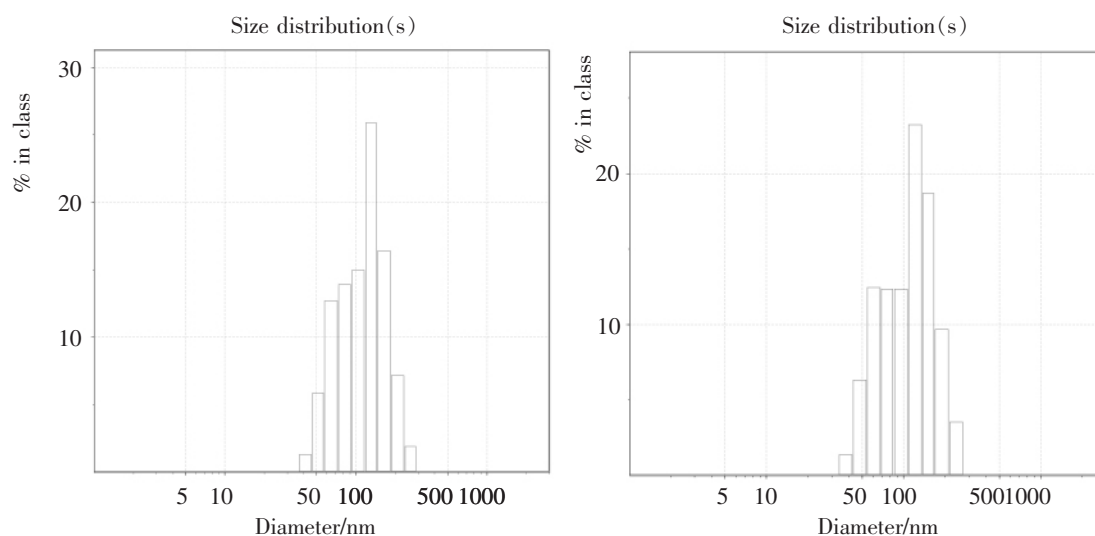


图 2 牛蒡寡糖脂质体的粒径分布

(左图为薄膜分散法制备脂质体粒径分布,右图为逆相蒸发法制备脂质体粒径分布)

Fig. 2 The size and distribution of *Arctium lappa* L. liposomes

(The left figure shows the size and distribution of liposomes prepared by Rotary-film Evaporation Method while the right one by the Reverse Evaporation Method)

30、60 d 观察其形态变化,并用超滤-紫外可见分光光度法测定其包封率 E 及渗透率 $P(P = C/C_{\text{包}} \times 100\%$, $C_{\text{包}}$ 为脂质体包封寡糖浓度)的变化,确定其稳定性。其渗透率变化结果见图 3,包封率变化结果见图 4。

脂质体的渗透率和包封率变化曲线指出,牛蒡寡糖脂质体在 4 °C 下储存稳定性较室温储存好,且其包封率下降呈现一定的 S 形曲线趋势(见图 4 附图),脂质体的包封率在 20 d 之后发生较大程度的下降,同时还伴随着脂质体悬液中大量聚沉现象的发生。而对于室温下储存的牛蒡寡糖脂质体,其包封率呈现直线下降的趋势,脂质体分散体中很早就出现脂质聚沉。

3 讨论

脂质体制备方法很多,考虑到将来大量制备的需要,本实验选用逆相蒸发法和薄膜分散法。一般而言,前种方法制备的多为大单层脂质体(LUV),而后种方法制备的多为多层脂质体(MLV)。对于水溶液药物来说,逆相蒸发法制备的脂质体包封率通常更高^[10],本实验结果与此相符。但高压均质处理后,脂质体粒径变小的同时,LUV 脂质体包封率也下降的程度也较大,可能是 LUV 脂质体在高压均质时易受破坏,而 MLV 脂质体层数多,主要由小囊泡聚集形成,受高压均

质破坏的程度相对较小。因此,薄膜分散法更适用于牛蒡寡糖脂质体的大量制备,该法均质后获得的牛蒡寡糖脂质体平均粒径为 74.2 nm、包封率较高(45.55%),能够满足过滤除菌及进一步体内实验的要求。

包封率是评价脂质体质量好坏的重要指标,一般采用的测定方法包括葡聚糖凝胶层析法,超速冷冻离心法,透析法,微柱离心法,鱼精蛋白凝聚法等。本实验根据牛蒡寡糖低分子量(约为 2134^[5])的特点,我们选择合适截留分子量的超滤管,通过离心超滤法,可将脂质体和游离的牛蒡寡糖分离开来,操作简单易行,而且无需昂贵的实验器材,方便实用。

脂质体的稳定性对脂质体的后期实验和临床运用具有重要的作用,由所测的 Zeta 电势值(-12.56 mv)可以看出制备的牛蒡寡糖脂质体稳定性较好。另外,通过考察不同保存温度下脂质体的渗透率及包封率变化,发现 4 °C 时保存的稳定性明显好于常温,其包封率呈现 S 型曲线的下降趋势,说明脂质体在一定时间段内比较稳定,之后会发生快速下降,这可能是由于磷脂的氧化水解、脂质聚集、脂质融合等达到一定程度后造成的。室温下,脂质体的包封率呈现直线下降的趋势,这可能是由于温度高(接近相变温度),磷脂本身不稳定,脂质体囊泡聚集速度快等因素的缘

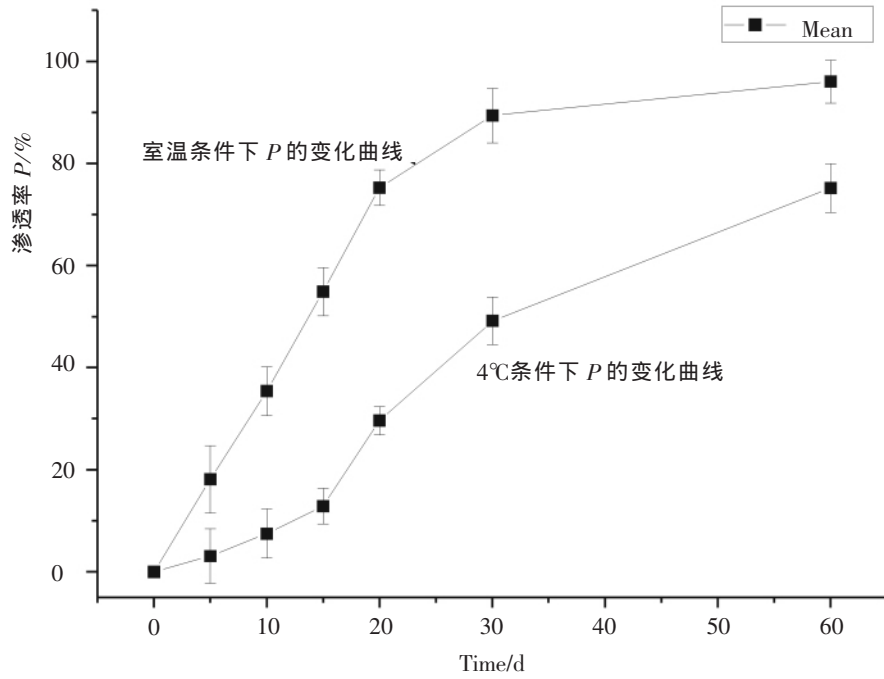


图 3 牛蒡寡糖脂质体不同条件下的渗透率变化趋势图 (n=3)

Fig. 3 The permeability trend of *Arctium lappa L.* liposomes under different conditions (n=3)

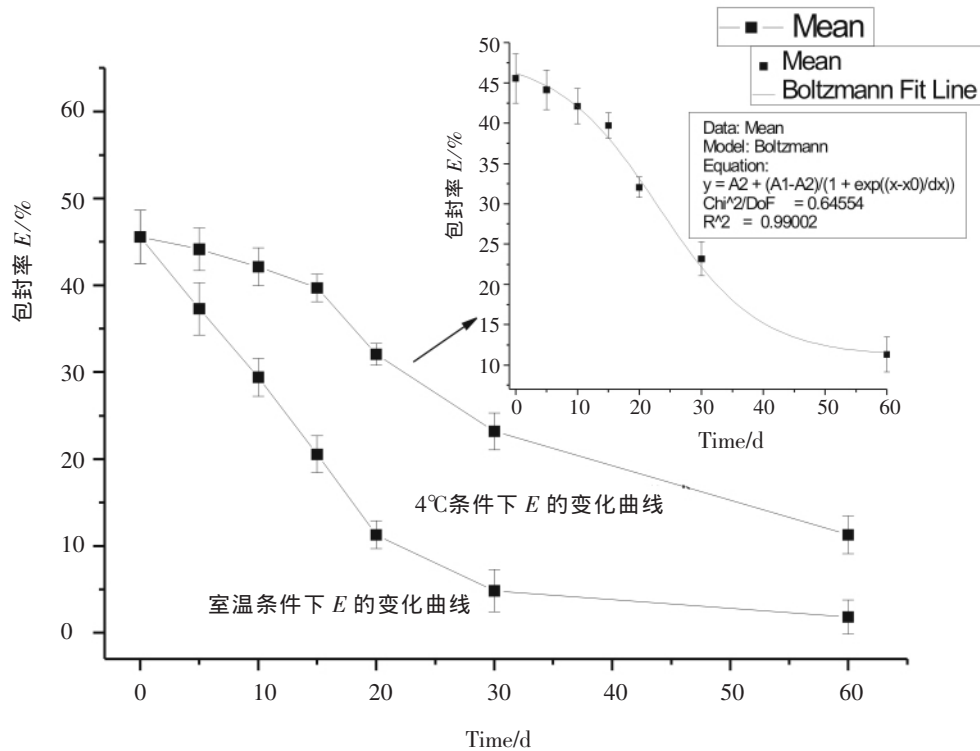


图 4 牛蒡寡糖脂质体不同条件下的包封率变化趋势图 (n=3)

其中附图为 4 °C 条件下牛蒡寡糖脂质体包封率变化趋势 S 型曲线模拟图

Fig. 4 Encapsulation efficiency trend of *Arctium lappa L.* liposomes under different conditions (n=3)

And the Attached Diagram is the S-curve simulation of Encapsulation efficiency trend on the condition of 4°C

故。因此,保存温度对于寡糖脂质体的性质影响很大,在大量制备时需要充分考虑这一点。在进一步的实验中,实验组将就该脂质体的体外、体内(口服和注射)药物释放进行分析,并对其生物学活性进行研究。

总之,本实验通过薄膜分散-高压均质法得到了粒径大小适宜,包封率较高且4℃储存稳定性较好的牛蒡寡糖脂质体。这不仅为下一步将要进行的体内外生物学活性研究奠定了基础,且为大量制备粒径较小、包封率较高及稳定性较好的寡糖类乃至可溶性药物脂质体提供了有益的参考。另外,文章中提到的“超滤管-紫外分光光度法”也为包封率测定提供了一种新的方法。

参考文献:

- [1] 郝林华,陈磊,仲娜,等.牛蒡寡糖的分离纯化及结构研究[J].高等学校化学学报,2005,26(7):1242-1247.
- [2] 于宏.牛蒡的化学成分与生物活性[J].国外医药·植物药分册,2007,22(6):244-247.
- [3] 魏东.牛蒡寡糖免疫调节作用的研究[J].食品研究与开发,2006,27(8):58-60.
- [4] 郝林华,王晓滨,陈靠山,等.功能性寡糖的研究进展与应用[J].饲料工业,2005,26(12):54-59.
- [5] 周文辉.菊糖及低果聚糖的代谢及生理特性[J].广州食品工业科技,2004,20(2):155-159.
- [6] Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential [J]. *Int J Nanomedicine*. 2006, 1(3):297-315.
- [7] Scherphof GL, Koning G, Bartsch M, *et al*. Targeting liposomes and lipoplexes to cells in the liver [J]. *Cell Mol Biol Lett*. 2002, 7(2):251-254.
- [8] 李际强,符临春.中药脂质体口服制剂的研究进展[J].中国中医药信息杂志,2001,8(6):21-23.
- [9] V.P. Torchilin, V. Weissig. *Liposomes: A Practical Approach (Second Edition)* [M]. Oxford University Press, 2003:15-18.
- [10] Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1978, 75(9):4194-4198.