

大豆磷脂脂质体的制备

穆筱梅¹, 钟振声²

(1. 仲恺农业技术学院化学与化工系, 广州 510225; 2. 华南理工大学化学学院, 广州 510640)

摘要 以 3 种不同的大豆磷脂为材料, 用反相蒸发法制备脂质体, 通过对其形态、粒径、包封率、泄漏率和稳定性的测定, 研究大豆磷脂组成对脂质体性质的影响。结果表明, 脂质体为圆球状的小囊泡, 以含有磷脂酰胆碱(PC)93.62% 的磷脂 SPC-3 为材料制备的脂质体相比较于以 PC 含量分别为 31.29% 和 58.19% 的磷脂 SPC-1 和 SPC-2 制备的脂质体, 具有最大的包封率、粒径和最小的泄漏率。稳定性研究结果表明以磷脂 SPC-1 为材料制备的脂质体稳定性好。

关键词 脂质体; 大豆磷脂; 包封率; 泄露率

中图分类号 TQ645.9⁺6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)03-0386-05

PREPARATION OF LIPOSOME MADE OF SOYBEAN LECITHIN

MU Xiao-mei¹, ZHONG Zhen-sheng²

(1. Department of Chemistry & Chemical Engineering, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225; 2. College of Chemistry, South China Univ of Tech, Guangzhou, 510641)

Abstract The liposomes made with three kinds of soybean lecithin composed of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI) and phosphatidic (PA) was prepared by using reverse phrase evaporation method. The effect of the soybean lecithin composition on the physiochemical properties by investigating diameter, zeta potential, entrapping efficiency, leakage rate and stability. The Transmission electron micrographs showed that all the liposomes were spherical-shape. The liposome made of Lecithin SPC-3 which contains 93.62% PC showed large diameter, higher entrapping efficiency and lower leakage rate than that of lecithin SPC-1 and Lecithin SPC-2 which contain 31.29% and 58.19% PC separately. The liposome made of lecithin SPC-1 was more stable than that of lecithin SPC-2 and lecithin SPC-3 due to the smallest zeta potential of Lecithin SPC-1.

Key words Liposome; Soybean lecithin; Entrapping efficienc; Leakage rate

脂质体是由磷脂分子在水中形成的具有双分子膜的球形囊泡, 它具有与细胞膜相类似的结构, 因此有很好的生物相适性。通过在脂质体膜中掺入一些靶向物质, 可以使脂质体向特定部位靶向集中, 因此近年来脂质体被广泛地用于药物载体的研究^[1]。

脂质体的主要材料有合成磷脂和天然磷脂。合成磷脂价格昂贵, 一般只能用于研究中。天然磷脂有大豆磷脂和蛋黄磷脂, 其中大豆磷脂中脂肪酸含量高并且脂肪链具有高度的不饱和性, 以大豆卵磷脂为膜材制备的脂质体具有很好的流动性和渗透

性,不仅有利穿透表面屏障,而且有利于引发细胞之间的生化反应。

磷脂根据其结构的不同,分为磷脂酰胆碱(PC,卵磷脂)、磷脂酰乙醇胺(PE,脑磷脂),脂质磷脂酸(PA)、磷脂酰肌醇(PI)等。以3种不同的大豆磷脂为膜材制备脂质体,对其形态,粒径,包封率,泄漏率和稳定性进行了测定,研究大豆磷脂成份对脂质体性质的影响,为大豆磷脂在脂质体的应用中提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

荧光光度计(DDS-307,上海雷磁仪器厂);电子显微镜(JEM-1010,日本电子光学公司);离心分离机(JI80-2B,上海安亭科学仪器厂);旋转蒸发器(ZFQ81,上海医疗器械厂);超声仪(DL-180,浙江象山石浦海天电子仪器厂);超临界萃取器(1L-SFE,广州轻工研究所);循环水式真空泵(SHZ-D,河南巩义市予华仪器厂);动态激光粒度测定仪(BI9000AT,美国Brookhaven公司);恒温培养箱(DHP030,上海市实验仪器总厂);高效液相色谱(HP1100,美国惠普公司)。

胆固醇(上海伯奥生物科技有限公司,进口分装),钙黄绿素(南化化学试剂厂),大豆磷脂(华南理工大学精细化工厂)。

1.2 方法

1.2.1 大豆磷脂制备 通过溶剂法和超临界法制备了三种磷脂,其具体成份如表1所示。

表1 大豆磷脂的组成

Table1 Average composition of soybean lecithin				
磷脂的种类 Type of lecithin	PC (%)	PE (%)	PI (%)	PA (%)
SPC-1	31.29	24.06	18.54	13.09
SPC-2	58.19	18.17	6.53	8.24
SPC-3	93.62	2.26	0.92	2.08

1.2.2 脂质体的制备^[2] 将n(大豆磷脂):n(胆固醇):n(维生素E)=1:1:0.05,加入到50 mL圆底烧瓶中,加入3 mL氯仿,缓慢搅拌使之溶解,将圆底烧瓶连在旋转蒸发器上,通氮气保护并维持瓶内真空度为700 mmHg蒸发去除氯仿,使磷脂和胆固醇在瓶壁形成一层薄膜。再加入3 mL乙醚使薄膜溶解,再加入1 mL含有钙黄绿素的磷酸盐缓冲溶

液(PBS)。将此混合溶液在水浴超声波仪器上进行超声混合4~5 min,为了防止水温的升高,同时将冰块加入到超声仪的水中。将此圆底烧瓶再次连在旋转蒸发器上,减压蒸发,同时通入氮气,瓶内保持真空度小于400 mmHg,旋转速度为200 rg·min⁻¹,去除有机溶剂至凝胶形成,继续减压(瓶内保持压力为300 mmHg~350 mmHg)15 min,形成水性悬浊液即为脂质体。瓶内的真空度逐渐增加至700 mmHg,并保持30 min,进一步去除残留的有机溶剂,最后充氮气至乙醚味消失。

1.2.3 脂质体的显微形态的测定 脂质体液少许以1%磷钨酸染色后,在涂碳的铜网上制样,用透射电子显微镜观察并拍照。

1.2.4 脂质体粒径和Zeta电势的测定 在25℃下,将脂质体混悬液用PBS缓冲溶液稀释若干倍后用粒径测定仪测定粒径及Zeta电势。

1.2.5 脂质体包封率的测定 用离心法^[3]去除游离的钙黄绿素后测定。钙黄绿素的测定用荧光光度计法,在激发波长为490 nm,发射波长为520 nm处测定。包封率依照以下式计算:

$$\text{包封率}(\%) = \frac{F_{\text{total}} - F_{\text{out}}}{F_{\text{total}}} \times 100\%$$

式中,F_{out}为游离的钙黄绿素的浓度;

F_{total}为将等量的脂质体液与10% Triton X-100混合,在60℃下加热几分钟以使脂质体的双层结构破裂,测定其中的钙黄绿素的浓度。

1.2.6 脂质体泄漏率的测定 在37℃下,将去除游离钙黄绿素的脂质体置于透析袋内(MW12000-14000),扎紧后置于50 mL PBS中,持续以50 r/min速度搅拌,每隔1 h取透析液2 mL测定,同时补充PBS 2 mL,泄漏率按下式计算

$$\text{泄漏率}(\%) = \frac{F_t - F_0}{F_{\text{total}} - F_0} \times 100\%$$

式中:F_t为任一时间的荧光度值

F₀为脂质体初始的荧光度值

1.2.7 脂质体稳定性的测定 将脂质体以5 000 rg·min⁻¹用离心加速30 min,用分光光度计测定脂质体离心前后500 nm处吸光度的变化,并根据下式计算稳定性参数K,

$$K(\%) = \frac{A_0}{A_0 - A} \times 100\%$$

式中,A₀为脂质体离心前的吸光度值

A为脂质体离心后的吸光度值

2 结果与分析

2.1 脂质体的显微形态

制备得到的脂质体为乳白色混悬液,从透射电镜照片可以看到,三种大豆磷脂制备的脂质体都是圆球状的小囊泡,大小较均匀。

图1 以 SPC-1 为原料制备的脂质体的电镜照片
Fig.1 Transmission electron micrograph of liposomes made of SPC-1

图2 以 SPC-2 为原料制备的脂质体的电镜照片
Fig.2 Transmission electron micrograph of liposomes made of SPC-2

图3 以 SPC-3 为原料制备的脂质体的电镜照片
Fig.3 Transmission electron micrograph of liposomes made of SPC-3

2.2 脂质体的粒径和 Zeta 电势

测定的结果如表2所示,以PC含量为93.62%的磷脂SPC-3制备的脂质体的粒径最大,其Zeta电势的绝对值最低,而以PC含量为31.29%的磷脂SPC-1制备的脂质体的粒径最小,Zeta电势的绝对值最大。这是由于PC和PE是电中性的,而PA和PI是负电荷磷脂。

表2 脂质体的平均粒径和 Zeta 电势
Table2 Values of mean diameter and zeta potential of soybean liposomes

磷脂的种类 Type of soybean lecithin	平均粒径 (nm) Diameter	Zeta 电势 (mv) Zeta potential
SPC-1	143	-34.3
SPC-2	156	-18.6
SPC-3	168	-15.3

2.3 大豆磷脂脂质体的包封率

由图4可以看到,脂质体的包封率随着磷脂浓度的增加而增加,在磷脂浓度小于50 mo/L时,三种脂质体的包封率随磷脂浓度的增加而增加较快,而在磷脂浓度大于50 mol/L时,包封率增加趋于缓慢。在三种脂质体中,以SPC-3为材料制备的脂质体的包封率最高,当磷脂浓度为70 mmol/L时,其包封率为48%,以SPC-1为材料制备的脂质体的包封率最低,而且用磷脂SPC-1和SPC-2制得的脂质体的包封率相差较小,当磷脂浓度为70 mmol/L时,其包封率分别为38.79%和40.28%。

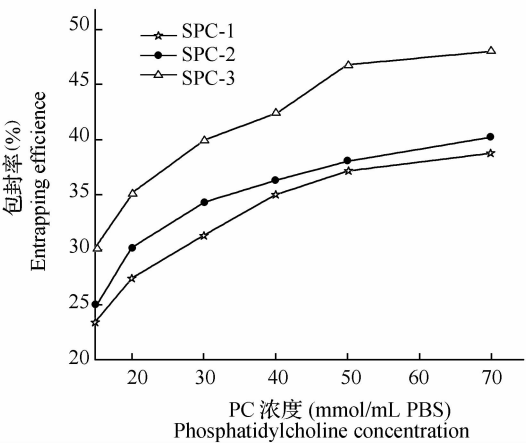


图 4 大豆磷脂浓度对脂质体包封率影响
Fig. 4 The effect of soybean lecithin concentration on liposomal entrapping efficiency

2. 4 大豆磷脂脂质体的泄露率

以大豆磷脂浓度为 50mol/L 制备脂质体,其在 37℃ 下的泄露情况如图 5 所示。三种脂质体中,以 SPC - 1 为膜材制备的脂质体的泄露最快,在 10 h

时,钙黄绿素泄露了 89. 32% ,而以 SPC - 3 为材料制备的脂质体的泄露率最小,在 10 h 时,钙黄绿素泄露了 60. 32% 。可见大豆磷脂脂质体具有一定的缓释作用,并且不同的磷脂组成的缓释效果是不同的,这种泄露的差异主要是因为不同的磷脂分子具有不同的结构,在磷脂中 PC 的极性头部基团的横截面积与两条尾部的横截面积大致相等,分子呈圆柱形,在水中自发排列具有双分子层结构呈片层(或称液晶)形式,而 PE 的亲水头部的截面积就小于疏水尾部的截面积,在水相中容易形成非双分子层膜结构,其分子形成长的圆柱状结构,头部基团朝向中心,这种结构被称作六角相(HII)(非脂质体),非饱和地 PE 与其他磷脂,如 PC 可以形成稳定的双层相,防止转换成 H II相,但是如果 PC 浓度低,形成双层后易发生相分离,在双层结构中出现六角相或反向微团,对于磷脂 SPC - 1、SPC - 2 和 SPC - 3,其 PE 含量分别为 24. 06%、18. 17% 和 2. 26% ,可见脂质体的泄露率随着磷脂中 PE 含量的增加而增加。

图 5 大豆磷脂组成对脂质体泄露率的影响

Fig. 5 The effect of soybean lecithin composition on liposomal leakage rate

从泄露曲线可以看到,脂质体的泄露率随着时间的增加而增加,三种脂质体在最初的 5 h 内泄露很快,这主要是由于吸附和嵌入脂质体纳米粒表面的包封物的释放,而当储存时间增加到 4 h 时,以 SPC - 1 和 SPC - 2 为材料制备的脂质体的泄露加快,在 10 h 后,包封物的释放趋于平缓。

2. 5 大豆磷脂脂质体的稳定性

将制备的脂质体通过离心加速实验,采用分光光度法测定脂质体离心前后的吸光度值计算得 K。在 4 ℃ 条件下,以 SPC - 1 为膜材制备的脂质体,放

置 3 个月未见分层凝聚等现象,仍为均匀混悬液, K 值从 $6. 52 \times 10^{-2}$ 增加到 $7. 81 \times 10^{-2}$,而以 SPC - 3 为膜材制备的脂质体,放置 3 个月出现分层现象, K 值从 6. 52 增加到 9. 36。同时从上表可以看到,脂质体的稳定性随温度的升高而降低。

一般而言,当 Zeta 电位大于 60 mv 时,脂质体粒子相当稳定,Zeta 电位在 30mv ~ 60 mv 时,脂质体粒子比较稳定,而当 Zeta 电位小于 30 mv 时,脂质体粒子不稳定。从表 2 的结果可知,以 SPC - 1 制备的脂质体 Zeta 电势为 -3 4. 3mv,是比较稳定的,

而其余磷脂制备的脂质体的 Zeta 绝对值都小于 30 mv,是不稳定的。

表 3 大豆磷脂脂质体稳定性
Table 3 Results of liposome stability

时间(月) Time (Month)	K × 10 ⁻²					
	4 ℃			25 ℃		
	SPC - 1	SPC - 2	SPC - 3	SPC - 1	SPC - 2	SPC - 3
0	6.52	6.52	6.52	6.52	6.52	6.52
1	6.95	7.13	7.66	8.04	9.47	9.68
2	7.38	7.90	8.84	8.96	11.60	14.26
3	7.81	8.55	9.36	12.27	12.95	17.42

3 结论

3.1 以 3 种大豆磷脂为材料制备脂质体,透射电镜照片显示其微粒为圆球状的小囊泡,大小较均匀。以 PC 含量为 93.62% 的 SPC - 3 磷脂制备的脂质体粒径最大,Zeta 电势的绝对值最低,而用 PC 含量为 31.29% 的 SPC - 1 磷脂制备的脂质体粒径最小,其 Zeta 电势的绝对值最高。

3.2 三种脂质体的包封率随着磷脂浓度的增加而增加,以 SPC - 3 为材料制备的脂质体的包封率最高,以 SPC - 1 为材料制备的脂质体的包封率最低,并且 SPC - 1 和 SPC - 2 磷脂制得的脂质体的包封

率相差较小。
3.3 泄漏率测定结果表明大豆磷脂脂质体具有一定的缓释作用,并且不同的磷脂组成的缓释效果是不同的。脂质体的泄漏率随着磷脂中 PE 含量的增加而增加,以 SPC - 1 为膜材制备的脂质体的泄漏最快,以 SPC - 3 为材料制备的脂质体的泄漏率最小,三种脂质体在最初的 5h 内泄漏很快的,并且泄漏率随着时间的增加而增加。用 SPC - 1 制备的脂质体 Zeta 电势为 - 3 4.3 mv,是三种脂质体中最稳定的

参 考 文 献

[1] 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、北京协和医科大学联合出版社,1998:1 - 53.
[2] Soka FC, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse evaporation [J]. Process of National Science . 1978, 75 (9):4194 - 4198.
[3] Takeuchi Hirofumi, Yamamoto Hiromitsu, Toyoda Toshitad, et al. Physical stability of size controlled small unilameller liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol [J]. International Journal of Pharmaceutics, 1998, 164(1 - 2):103 - 111.
[4] 刘辉,汤韧,何晓霞,等. 脂质体处方和制备方法对阿昔洛韦棕榈酸酯脂质体稳定性的影响[J]. 药学报,2002; 37(7): 563 - 566.