

聚乙二醇包覆的维生素 C 脂质体的制备及性质研究

陈婷婷, 曹光群, 杨 成

(江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要:利用聚乙二醇(PEG)包覆脂质体以提高脂质体的稳定性。先用薄膜分散-超声乳化法制备维生素 C 脂质体,然后将 PEG 溶液与维生素 C 脂质体混合制备 PEG 包覆的脂质体。电镜照片证明 PEG 在脂质体外形成了一层膜,粒径增加。脂质体经 PEG 包覆后包封率增加。稳定性试验测定不同温度下脂质体吸光度变化及脂质体中丙二醛含量变化情况,得到较佳贮存条件为 4 ℃ 避光,PEG 包覆后的脂质体吸光度与丙二醛含量增大幅度均较小。结果表明:用 PEG 可有效包覆维生素 C 脂质体并提高脂质体的稳定性。

关键词:维生素 C;脂质体;聚乙二醇

中图分类号:TQ658

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2008)03-0505-04

Preparation and Property of Peg-coated Vitamin C-containing Liposome

CHEN Ting-ting, CAO Guang-qun, YANG Cheng

(School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract:The purpose of this work was to improve the stability of liposome by coating PEG. The vitamin C-containing liposome, which had been prepared by film dispersion-ultrasonic emulsify method, was coated with PEG by simply mixing the liposomal suspension with the PEG solution. The structure determined by electron microscope confirmed the existence of polymer layer on the surface of liposome particles. By comparison with the non-coated liposome, the polymer coated one had larger particle size and better encapsulation. The changes of A_{500nm} and the malondialdehyde(MDA) content in liposome in different temperature were investigated, the optimal storage condition was light-avoiding at 4 ℃, and the polymer coated one showed less increase in A_{500nm} and MDA. Results suggest that the vitamin C-containing liposome could be effectively coated by PEG and its stability was improved.

Key words:Vitamin C; Liposome; Polyethylene glycol(PEG)

维生素 C 也叫抗坏血酸,是一种水溶性的维生素,具有良好的抗氧化功能,可以用来促进胶原蛋白合成。维生素 C 越来越多地用于化妆品,特别是用于护肤霜和洗面奶液中,用来澄清皮肤、增强皮肤的免疫体系。但是,维生素 C 本身对光和热具有不稳定性,因此在大多数情况下,将其添加到护肤产品中都需要经过改性处理,目前使用最多的是维生素 C 衍生物^[1]。作者用脂质体包封维生素 C,主要是因为脂质体是一种理想的递药技术,具有长效缓释的作用,而且它是目前在体外实验中能够将各种物质引入细胞的最有效载体。

脂质体具有靶向、长效、可降低药物毒性及增加药物稳定性等多方面的优点,但也存在一定的不足和问题,如脂质成分易氧化水解,脂质体易聚集、融

合等,限制了它的功能。在所有的改进方法中,脂质体表面修饰^[2-4]是一个较好的方法。聚乙二醇(PEG)结构简单、价廉、无毒、无免疫原性,具有良好的生物相容性,是目前高分子修饰脂质体的研究重点。现利用大豆卵磷脂制备维生素 C 脂质体,并利用 PEG 对脂质体进行表面包覆,提高维生素 C 脂质体的稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

维生素 C(分析纯),上海光铎科技有限公司;大豆卵磷脂(食品级),上海爱康精细化工有限公司;PEG1500(化学纯),无锡轻大精化科技有限公司;胆固醇(分析纯),国药集团化学试剂有限公司。

收稿日期:2008-02-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20506008)。

作者简介:陈婷婷(1984-),女,硕士研究生,研究方向为精细化学品开发。

通讯作者:曹光群,高级工程师。E-mail: gqcao@jiangnan.edu.cn。

透析袋(截流分子量 3 500),上海绿鸟科技发展有限公司;其它所用无机及有机药品与试剂如无特别说明均为分析纯,试验过程所用水为去离子水。

515 高效液相色谱, Waters; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;H-800 透射电子显微镜, Hitachi; Quanta-200 型扫描电子显微镜,荷兰 FEI 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 脂质体的制备 首先用薄膜分散-超声乳化法^[5]制备维生素 C 脂质体,将 n(大豆卵磷脂):n(胆固醇):n(维生素 E)=4:1:0.15 加入到 100 mL 茄形瓶中,加 30 mL 氯仿使其溶解,减压蒸发氯仿,脂质在瓶内壁形成一层薄膜。将维生素 C 溶于 pH=6.40 PBS 缓冲溶液,减压条件下洗膜 30 min。再在超声仪上冰水浴超声 90 s,得到均匀的乳白色微透明脂质体乳浊液。然后包覆 PEG^[6],将一定质量分数的 PEG1500 的 PBS 溶液与等体积制备好的脂质体混合,并在 4℃ 下放置 60 min 后,再加入相同体积 PBS 溶液,继续在 4℃ 下放置 60 min。

1.2.2 脂质体的显微形态观察 扫描电镜观察:将脂质体置于液氮中快速冷冻 1~2 min,真空喷金镀膜,进行扫描电镜观察。

透射电镜观察^[7]:将所得的脂质体,加水稀释到合适的浓度,取 1 滴于点滴反应瓷板的凹槽内,并将喷碳铜网放于试液上(膜面向下),1~2 min 后取出铜网,用滤纸小片从铜网边缘吸干多余液体;按上述同样方法,将该铜网放在染液滴(2% 磷钨酸溶液, pH7.0)上约 30 s,用滤纸小片从铜网边缘吸干多余染液,干燥。在透射电镜下观察脂质体形态。

1.2.3 包封率的测定 用透析法将未包封的维生

素 C 去除。取一定量的脂质体放入透析袋,浸于去离子水中,在室温、避光、搅拌条件下透析 20 h。用高效液相色谱法测定透析液中的维生素 C 含量。色谱条件:lichrospher C18 柱;流动相:乙腈:水(25:40);流速:0.65 mL·min⁻¹;检测波长:286 nm;进样量:20 μL;运行时间:10 min;检测温度:室温。在维生素 C 的浓度为 20~120 μg·mL⁻¹ 范围内,主峰面积与维生素 C 的浓度有良好的线性关系,回归方程:Y=49891X-151557, r=0.9997。

按下式计算包封率:

$$\text{包封率}(\%) = (1 - W_1/W_2) \times 100\%$$

式中:W₁为透析液中维生素 C 的质量, W₂为维生素 C 的总质量。

1.2.4 脂质体的稳定性测定 取不同时间点样品置于 4℃、20℃、37℃,避光,测定不同条件下样品稳定性的变化。

浊度法^[8]测定脂质体粒径变化:脂质体的粒径和分布与其稳定性有关,当不需要定量测定颗粒大小的分布时,浊度法是一种测定脂质体相对大小的非常实用的方法,如所有脂质体的粒径增加(储存过程中)或降低(超声或挤压)。用紫外可见光光度计测定脂质体吸光度的改变,吸光度大表明脂质体粒径相对较大。

膜材磷脂氧化程度的测定^[9]:磷脂中含不饱和类脂,氧化最初产物为共轭二烯,之后形成过氧化脂质,过氧化脂质进一步分解为丙二醛(MDA)等。丙二醛在酸性条件下可与硫代巴比妥酸(TBA)反应,生成一种红色染料(TBA-Pigment),如下式。化合物(TBA-Pigment)在波长 532 nm 处有特异吸收,吸收值的大小即反映磷脂的氧化程度。

丙二醛测定方法:取 1 mL 脂质体置于试管中,加入 TBA-TCA-HCl 溶液 5 mL 混匀,将试管置于 100℃ 水浴加热 30 min,冷却后转入 10 mL 容量瓶,用 TBA-TCA-HCl 溶液定容、混匀、过滤,以 TBA-TCA-HCl 溶液为空白,测定 532 nm 处吸光度 A_{532 nm},计算 MDA 值。

$$\text{MDA}(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = A_{532 \text{ nm}} \times 4.15$$

4.15 为每毫升含丙二醛量的换算系数^[10]。

$$\text{MDA}(\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ 磷脂}) = \frac{\text{MDA}}{\text{单位体积磷脂含量}(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})}$$

2 结果与讨论

2.1 脂质体的显微形态结构

从图 1 中可见,两种脂质体均呈圆球状,图 1b

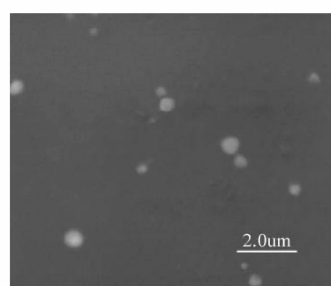
经 PEG1500 包覆的脂质体平均粒径较图 1a 大。从图 2 中可以看到 PEG 包覆前后的脂质体在形态上有所差异,经 PEG1500 包覆的脂质体在外层形成了一个 PEG 层。

2.2 包封率

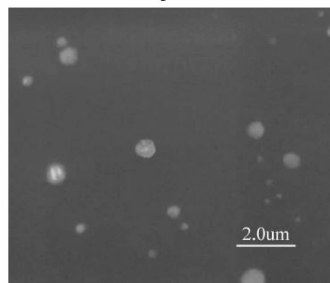
包封率与表面修饰所用 PEG1500 的质量分数的关系见图 3。PEG 包覆的脂质体的包封率明显高于未包覆的维生素 C 脂质体。随着 PEG 含量的增加脂质体的包封率增加,但当 PEG1500 的质量分数高于 3% 时,包封率又略有下降。当 PEG1500 的质量分数为 3% 时,得到最高包封率为 56.88%。

2.3 脂质体的稳定性

脂质体的稳定性是脂质体另一个重要的评价指标,它在很大程度上决定了脂质体的存放和使用期



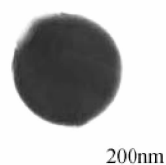
a 维生素C脂质体
a Vc liposome



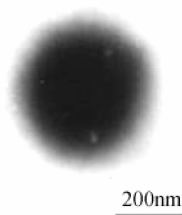
b PEG1500包覆的维生素C脂质体
b PEG1500-coated Vc liposome

图1 脂质体的扫描电镜图片

Fig. 1 Scan electron micrograph of liposome



a 维生素C脂质体
a Vc liposome



b PEG1500包覆的维生素C脂质体
b PEG1500-coated Vc liposome

图2 脂质体的透射电镜照片

Fig. 2 Transmission electron micrograph of liposome

限。以质量分数为3%的PEG1500包覆维生素C脂质体,经短期稳定性实验,考察维生素C脂质体与PEG1500包覆的维生素C脂质体的稳定性。

吸光度曲线:以水为空白测定脂质体在500 nm处的吸光度 $A_{500\text{nm}}$,反映脂质体相对大小的变化情况。不同贮存温度下脂质体吸光度随时间的变化情况见图4、5。

由图4可知,随着时间的增加,维生素C脂质

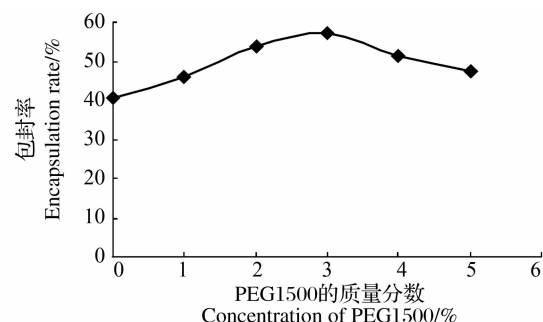


图3 包封率与 PEG1500 质量分数的关系

Fig. 3 Relationship between encapsulation rate and the concentration of PEG1500

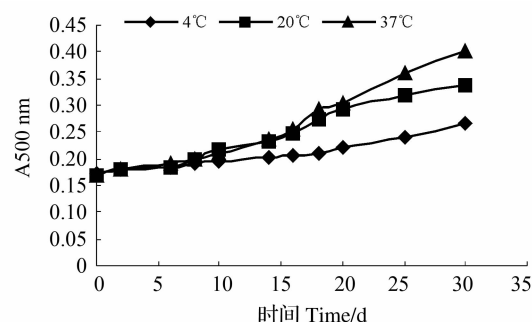


图4 不同温度下维生素C脂质体500 nm处吸光度的变化

Fig. 4 The change of $A_{500\text{nm}}$ of Vc liposome in different temperature

体吸光度逐渐增大。贮存温度较高时,吸光度增大幅度较大,表明温度升高加速了脂质体分子的热运动,促进其聚集、融合,使得粒径增大。37°C贮存30 d后观察发现体系略有浑浊,但并未呈现明显的上浮、下沉等严重失稳现象。4°C贮存30 d后体系仍为乳白色微透明。

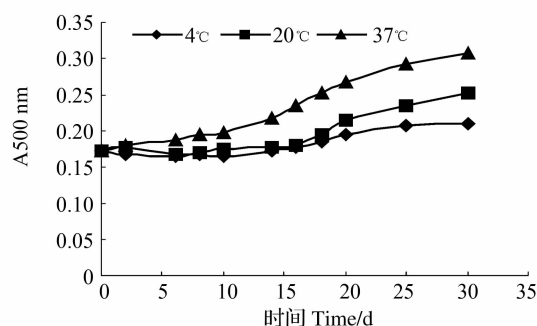


图5 不同温度下 PEG1500 包覆的维生素C脂质体500 nm处吸光度的变化

Fig. 5 The change of $A_{500\text{nm}}$ of PEG 1500-coated liposome in different temperature

图5显示经PEG1500包覆的维生素C脂质体,随着贮存时间的增加,脂质体吸光度略有上升,然后

趋于稳定。贮存温度较高时,吸光度增大幅度亦较大,但与图 4 相比可知,经 PEG1500 包覆的维生素 C 脂质体吸光度变化幅度均小于未包覆的脂质体。对于 PEG 包覆脂质体的作用机理^[11],一般认为,PEG 具有一定的柔性,可交错重叠覆盖在脂质体的表面,形成致密的构像云,从而起到稳定脂质体的作用。贮存 30 d 后,各温度下的 PEG1500 包覆的脂质体均仍呈微透明状。

MDA 值变化:通过不同贮存温度下 MDA 值的变化来评价脂质体的短期稳定性,结果见表 1。

表 1 不同温度下脂质体 MDA 值的变化
Table 1 The change of the MDA value of liposome in different temperature

贮存时间 Time	贮存温度 Temperature /°C	脂质体 MDA 值的变化/ $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ Change of the MDA value of liposome	
		维生素 C 脂质体 Vc liposome	PEG1500 包覆的脂质体 PEG1500-coated liposome
贮存初期 Initial stage		0.011	0.010
10 d 后 10 d later	4	0.015	0.011
	20	0.020	0.013
	37	0.028	0.017
20 d 后 20 d later	4	0.019	0.014
	20	0.029	0.019
	37	0.045	0.027
30 d 后 30 d later	4	0.022	0.016
	20	0.035	0.026
	37	0.054	0.035

由表 1 可知,在不同温度下,脂质体 MDA 值逐渐增大。但在低温时,MDA 值变化较小;而在温度高时,MDA 值变化较大。并且,PEG1500 包覆的脂质体 MDA 值均较未包覆的小,MDA 值增大幅度亦小,说明维生素 C 脂质体在 4℃ 贮存温度下稳定性较好,且脂质体表面经 PEG1500 包覆后,减缓了膜材磷脂的氧化,提高了稳定性。

3 结论

将维生素 C 脂质体与 PEG 溶液混合制备了聚乙二醇包覆的维生素 C 脂质体。维生素 C 脂质体经 PEG1500 包覆后,包封率得以提高,当 PEG1500 的质量分数为 3 % 时,包封率最高,为 56.88 %。聚乙二醇包覆脂质体,使得粒径增加,脂质体表面形成一层膜,减缓了脂质体粒子之间的聚集融合、膜材磷脂的氧化,提高贮存稳定性,贮存最佳条件为 4℃ 避光。

收稿日期:2008-01-02

基金项目:科技部“十一五”国家科技支撑重点资助项目(2006BAD02B01);集美大学创新团队基金资助项目。

作者简介:刘明(1980-),男,硕士,研究方向为粮食加工、食品发酵。
通讯作者:傅经国。Tel:15002380600

参考文献

- [1] Kristl J, Volk B, Gaüperlin M, et al. Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 19: 181-189.
- [2] Woodle M C, Lasic D D. Sterically stabilized liposome[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1113: 171-199.
- [3] Zanin M H A, Torriani I C L, Zollner R L, et al. Physical characterization of surface-modified liposomes by incorporation of gangliosides designed for immunotherapies[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2004, 251: 175-182.
- [4] Tirosh O, Barenholz Y, Katzhendler J, et al. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer[J]. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2005, 135: 117-129.
- [5] 刘亚文,曹光群,陈婷婷.维生素 C 脂质体的制备研究[J]. *大豆科学*, 2007, 26(2): 270-272. (Liu Y W, Cao G Q, Chen T T. Study on preparation of vitamin C liposome[J]. *Soybean Science*, 2007, 26(2): 270-272.)
- [6] 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 Pharmaceutics*, 1998, 164: 103-111.
- [7] 王岩,周莉玲.青藤碱脂质体的制备及稳定性研究[J]. *中成药*, 2005, 27(2): 757-760. (Wang Y, Zhou L L. Study on preparation and stability of sinomenine liposomes[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2005, 27(2): 757-760.)
- [8] 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. (Zhang L Z. Preparation of liposome and its application in biomedicine[M]. Beijing: Peking University Health Science Center, Peking Union Medical College Press, 1998: 57-58.)
- [9] 朱斌,许时婴,夏书芹.薄膜水化法制备辅酶 Q₁₀ 脂质体[J]. *食品与机械*, 2006, 22(6): 39-41. (Zhu B, Xu S Y, Xia S Q. Preparation of coenzyme Q₁₀ liposomes by thin-film rehydration method[J]. *Food & Machinery*, 2006, 22(6): 39-41.)
- [10] 孙京新,周光宏,徐幸莲.猪肉微粒体脂肪酸氧化产物对氧合肌红蛋白氧化的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2004, 27(1): 101-104. (Sun J X, Zhou G H, Xu X L. Effect of oxidation products of fatty acids in microsomes from pork on oxymyoglobin oxidation in vitro[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2004, 27(1): 101-104.)
- [11] 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. (Chen T, Wang Z, Fu J G, et al. Research of modifying liposome with polyethylene glycol[J]. *Digest of The World Latest Medical Information*, 2003, 2(5): 801-805.)

液态发酵大豆抗氧化活性肽条件的优化