

石榴皮总多酚脂质体制备工艺参数的统计学分析

王占一¹, 戴博², 王玉海¹, 张立华¹, 李卓瓦¹, 毕海丹¹

(1. 枣庄学院 生命科学学院, 山东 枣庄 277160; 2. 空军总医院, 北京 100142)

[摘要] **目的:**探究应用超临界 CO₂ 流体沉析技术制备石榴皮总多酚脂质体的工艺条件,为该制剂的工业化生产提供参考。**方法:**以包封率为评价指标,通过 Plackett-Burman 试验筛选主要影响因素,利用最陡爬坡试验和 Box-Behnken 试验优选石榴皮总多酚脂质体的制备工艺。**结果:**原药与膜材的质量比、反应温度和反应压力是影响总多酚脂质体包封率的显著性因素,最佳制备工艺条件为原药-膜材的质量比 1:21.15,反应温度 48.3 °C,反应压力 23.88 MPa。包封率实测值 80.295% 和预测值 81.379% 的偏差 1.33%,有效粒度 168.5 nm, Zeta 电位 -73.8 mV。**结论:**该试验模型设计达到要求,工艺具有可行性。石榴皮总多酚脂质体体外释放速度缓慢,缓释效果明显,稳定性良好。

[关键词] 石榴皮; 总多酚; 脂质体; 最陡爬坡试验; 包封率

[中图分类号] R283.6; R284.1; R195.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0033-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050033

Optimization of Preparation Process of Pomegranate Peel Polyphenols Liposomes WANG Zhan-yi¹, DAI Bo², WANG Yu-hai¹, ZHANG Li-hua¹, LI Zhuo-wa¹, BI Hai-dan¹ (1. College of Life Sciences, Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China; 2. Air Force General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100142, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation process of pomegranate peel polyphenols liposomes by using supercritical CO₂ fluid precipitation technology. **Method:** With entrapment efficiency as index, main factors were screened by Plackett-Burman test, preparation process of pomegranate peel polyphenols liposomes was optimized by steepest ascent test and Box-Behnken test. **Result:** Ratio of raw materials and membrane material, reaction temperature and pressure were significant factors, optimal preparation conditions was as following: ratio of raw materials and membrane material of 1:21.15, reaction temperature at 48.3 °C, reaction pressure of 23.88 MPa. The measured value and the predicted value of entrapment efficiency were 80.295% and 81.379%, effective size was 168.5 nm, Zeta potential was -73.8 mV. **Conclusion:** This test model meets requirements. *In vitro* release of pomegranate peel polyphenols liposomes is slow, its sustained release effect is obvious.

[Key words] pomegranate peel; total polyphenols; liposomes; steepest ascent test; entrapment efficiency

石榴皮为 2010 年版《中国药典》收载品种,其生物活性物质种类丰富,其中含量最高的成分为多酚类,即石榴皮总多酚^[1]。丛媛媛等^[2]研究发现石榴皮多酚及多糖均具有较强的还原能力和清除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基能力。严欢等^[3]发现石榴皮多酚凝胶剂在小鼠离体皮肤上渗透性良好。脂质体的膜材一般为微型泡囊体,具有类脂双分子层结构特征,而药物就包埋于双分子囊腔内,具有明显的缓释作用或靶向释放特性。瞿叶

清等^[4]采用硫酸铵梯度法及隐形脂质体技术制备了马钱子总生物碱脂质体,发现膜材对药物作用的发挥无明显抑制作用,也证明了磷脂脂质体作为药物载体的可行性。喻樊^[5]采用鱼精蛋白沉淀法制备了绞股蓝总皂苷脂质体,在电镜下观察脂质体颗粒呈不规则圆形,包封率较高。文震等^[6-7]采用超临界 CO₂ 流体快速膨胀法制备了鱼腥草挥发油脂质体和 β -桉油脂质体,发现这 2 种脂质体的包封率、溶出度及稳定性等均符合 2010 年版《中国药典》的

[收稿日期] 20140729(002)

[基金项目] 国家星火计划项目(2012GA740049);山东省自然科学基金项目(ZR2013BL018)

[第一作者] 王占一, 硕士, 讲师, 从事天然活性成分的提取与分离研究, Tel: 0632-3785886, E-mail: zhyiwang@126.com

规定,缓释效果良好。超临界 CO₂ 流体沉析技术已在微胶囊、微球等靶向制剂制备领域广泛应用^[8-9]。本实验拟将石榴皮总多酚制备成脂质体,并初步检测其理化性质,为探讨脂质体沉析结晶在超临界状态下的形成过程提供参考,为石榴皮总多酚缓释制剂的制备提供新方法与新技术。

1 材料

8453 型紫外-可见分光光度计(美国 Agilent 公司),GSH 型超临界反应釜(山东威海环宇化工机械有限公司),DT-300 型 Zeta 电位分析仪(美国康塔仪器公司),WJL-602 型激光粒度分析仪(上海仪电物理光学仪器有限公司),LGJ-10 型冷冻干燥机(宁波新芝生物技术有限公司),EVO18 型扫描电子显微镜(德国蔡司公司),ZRD-8 型溶出度测试仪(北京北研科仪仪器有限公司)。没食子酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110831-201204),石榴皮总多酚纯化物(枣庄学院生物学省级实验教学示范中心,纯度 >90%),卵磷脂(济南圣和化工有限公司),胆固醇(安徽中旭生物科技有限公司),葡聚糖凝胶 G-50(sephadex G-50,上海阳光生物科技有限公司),福林酚试剂(南京森贝伽生物科技有限公司),水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 石榴皮总多酚脂质体的制备 将石榴皮总多酚溶于无水乙醇中,制成石榴皮总多酚原药乙醇溶液;将卵磷脂与胆固醇按规定的比例充分混合,共溶于无水乙醇中制备成膜材乙醇溶液;将上述 2 种溶液混合,调整并确保乙醇体积分数达预定值,经过稀盐酸调节 pH,加热到预定初始温度,移入超临界 CO₂ 反应釜,通入 CO₂ 气体,设置规定的反应温度和反应压力,反应至规定时间后快速释放,脂质体快速溶胀沉析形成结晶,冷冻干燥,即得^[9]。

2.2 总多酚的含量测定^[10-11]

2.2.1 对照品溶液的制备 取没食子酸对照品,加适量无水乙醇溶解并定容,制成 22.5 g·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.2.2 线性关系考察 取系列对照品溶液,分别于 760 nm 处测定吸光度(A),以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 48.726C - 0.0159$ ($r = 0.9953$),线性范围 0 ~ 74.65 g·L⁻¹。

2.2.3 供试品溶液的制备 配制 10% 曲拉通 X-100 的乙醇溶液(现用现配),精确量取 2 mL,加入盛有石榴皮总多酚脂质体 100 mg 的锥形瓶中,充分摇匀,精滤后定容,即得。

2.2.4 精密度试验 精密量取对照品溶液 2 mL,重复测定 5 次,计算 A 的 RSD 0.9%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密称取供试品溶液,分别在 0,2,4,6,8,10,12 h 于 760 nm 处测定 A,计算 RSD 1.3%,表明没食子酸溶液在 12 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 精密称取样品 100 mg,共 6 份,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,于 760 nm 处测定 A,计算 RSD 1.2%,表明该方法重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取已知含量的供试品 100 mg,共 6 份,各加入一定量没食子酸对照品溶液,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,于 760 nm 处测定 A,计算平均加样回收率 99.1%,RSD 1.3%。

2.3 包封率的测定 精确量取 10% 曲拉通 X-100 的乙醇溶液 2 mL,加入盛有石榴皮总多酚脂质体 100 mg 的锥形瓶中,充分摇匀,精滤后定容,于 760 nm 处测定 A,计算总多酚含量。另取适量磷酸盐缓冲液加入盛有石榴皮总多酚脂质体 500 mg 的锥形瓶中,充分摇匀,得总多酚脂质体混悬液。将新的 sephadex G-50 材料用适量水充分膨胀,湿法上柱后用空白脂质体反复冲柱至饱和,精密称取石榴皮总多酚脂质体混悬液 1 mL 上样,洗脱液选择磷酸盐缓冲液,收集含药滤液约 50 mL,于 760 nm 处测定 A,计算总多酚含量和包封率。

2.4 制备工艺优选

2.4.1 Plackett-Burman 设计筛选主要因素 选择膜材配比(卵磷脂与胆固醇质量比)、乙醇体积分数、原药与膜材质量比、反应温度、反应压力、反应时间、初始温度及系统 pH 为石榴皮总多酚脂质体制备工艺优选的自变量,包封率为响应值,各自变量设计 2 个水平,共进行 12 次试验以确定每个自变量的响应水平^[12-13],忽略各自变量间的相互影响。试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

通过对表 2 中数据分析可知,模型影响显著,模型复相关系数(R^2)0.977 1,回归模型决定系数(R_{Adj}^2)0.915 9,说明只有 8.41% 的变异性不能应用该模型解释。8 个因素的显著性水平分析为 X_4 和 X_5 达极显著性水平, X_6 达显著性水平,其余 5 个因素的影响均不显著,主要因素影响顺序为 $X_4 > X_5 > X_6$ 。剔除 5 个对脂质体包封率影响不显著的因素,得 3 个主要影响因素为自变量的二次回归方程式 $Y = 51.83 + 5.30X_4 + 4.60X_5 + 2.64X_6$,对剔除非显

表 1 石榴皮总多酚脂质体制备工艺 Plackett-Burman 试验分析

Table 1 Plackett-Burman analysis of preparation process of pomegranate peel polyphenols liposomes

No.	X_1 膜材配比	X_2 乙醇 体积分数/%	X_3 系统 pH	X_4 原药与 膜材质量比	X_5 反应 温度/℃	X_6 反应 压力/MPa	X_7 反应 时间/min	X_8 初始 温度/℃	包封率 /%
1	4:1	15	7	1:15	60	15	20	10	52.827
2	2:1	15	7	1:30	60	30	20	20	56.488
3	2:1	30	7	1:30	60	30	40	10	54.412
4	4:1	30	7	1:30	30	15	40	10	41.039
5	2:1	15	5	1:15	30	30	40	10	54.194
6	2:1	15	5	1:30	30	15	20	10	40.312
7	4:1	30	5	1:30	30	30	20	20	42.072
8	2:1	30	7	1:15	30	15	20	20	50.771
9	4:1	15	7	1:15	30	30	40	20	55.012
10	4:1	30	5	1:15	60	30	20	10	64.700
11	4:1	15	5	1:30	60	15	40	20	44.880
12	2:1	30	5	1:15	60	15	40	20	60.312

表 2 Plackett-Burman 试验全因素方差分析

Table 2 Variance analysis of all factors for Plackett-Burman design

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	695.06	8	86.88	15.97	0.021 9
X_1	10.01	1	10.01	1.84	0.268 0
X_2	1.76	1	1.76	0.32	0.609 5
X_3	6.87	1	6.87	1.26	0.342 9
X_4	337.22	1	337.22	62.00	0.004 3
X_5	254.09	1	254.09	46.72	0.006 4
X_6	83.94	1	83.94	15.43	0.029 4
X_7	0.45	1	0.45	0.083	0.792 6
X_8	0.72	1	0.72	0.13	0.739 3
残差	16.32	3	5.44		
总离差	711.37	11			

著性影响因素后的回归方程进行方差分析,见表 3。结果发现将影响不显著的因素剔除后,模型影响极显著, $R^2 = 0.949 2$, $R_{Adj}^2 = 0.930 2$, 说明只有 6.98% 的变异性不能通过该回归模型解释;变化系数(CV) 4.10%,说明该回归模型可信度高,一般认为模型精密密度数值 > 4 就是合理的,本模型精密密度 20.454。说明应用 PB 试验数学模型对影响脂质体包封率的因素进行显著性评价是可行的^[14]。

表 3 石榴皮总多酚脂质体制备工艺主要影响因素方差分析

Table 3 Variance analysis for main factor of preparation process of pomegranate peel polyphenols liposomes

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	675.25	3	225.08	49.84	<0.000 1
X_4	337.22	1	337.22	74.68	<0.000 1
X_5	254.09	1	254.09	56.27	<0.000 1
X_6	83.94	1	83.94	18.59	0.002 6
残差	36.13	8	4.52		
总离差	711.37	11			

2.4.2 最陡爬坡试验设计接近最优区域 通过对

表 3 中数据进行偏回归系数分析,结果发现 X_4, X_5, X_6 对响应值的影响均为正效应。采用 3 个因素同时变化方式进行最优化搜索^[15-16]。原药与膜材质量比的步长均匀提高,反应温度设计步长为 6,反应压力设计步长为 3。为了方便试验,固定膜材配比为卵磷脂-胆固醇(3:1),乙醇体积分数 22.5%,系统 pH 6,反应时间 30 min,初始温度 15 ℃。试验安排及结果见表 4。故原药与膜材质量比选择 1:24 ~ 1:18,反应温度 42 ~ 54 ℃,反应压力 21 ~ 27 MPa。

表 4 石榴皮总多酚脂质体制备工艺最陡爬坡试验分析

Table 4 Steepest ascent test analysis of preparation process of pomegranate peel polyphenols liposomes

No.	X_4	X_5	X_6	包封率/%
1	1:30	30	15	46.561
2	1:27	36	18	52.308
3	1:24	42	21	61.420
4	1:21	48	24	67.809
5	1:18	54	27	63.517
6	1:15	60	30	58.102

2.4.3 Box-Behnken 设计优化制备工艺 通过建立数学模型拟合自变量与响应值间的函数关系^[17-18],应用 Design-Expert8.0.5 软件进行数据统计分析,以原药与膜材质量比、反应温度、反应压力为考察因素,包封率为响应值,试验安排与结果见表 5。

以表 5 中数据为基础进行统计分析,得多元二次回归方程 $Y = 81.35 + 0.24X_4 + 0.46X_5 - 0.42X_6 - 0.17X_4X_5 + 1.33X_4X_6 + 0.36X_5X_6 - 1.87X_4^2 - 4.22X_5^2 - 4.22X_6^2$,方差分析见表 6。结果显示该模型影响极显著,模型失拟项不显著, $R^2 = 0.991 1$,说明自变量间相关性良好; $R_{Adj}^2 = 0.979 7$,说明只有 2.03% 变异性不能应用该模型解释; CV = 0.65% ,

表 5 石榴皮总多酚脂质体制备工艺 Box-Behnken 试验分析

Table 5 Box-Behnken analysis of preparation process of pomegranate peel polyphenols liposomes

No.	X_4 原药与膜材质量比	X_5 反应温度/℃	X_6 反应压力/MPa	包封率/%
1	1:18	48	21	74.605
2	1:18	42	24	75.667
3	1:21	48	24	81.326
4	1:21	42	21	72.792
5	1:24	48	21	77.142
6	1:24	54	24	75.209
7	1:18	54	24	75.692
8	1:24	42	24	74.484
9	1:21	48	24	81.103
10	1:18	48	27	76.055
11	1:24	48	27	73.275
12	1:21	48	24	80.982
13	1:21	48	24	82.009
14	1:21	48	24	81.344
15	1:21	42	27	71.584
16	1:21	54	27	73.759
17	1:21	54	21	73.517

表 6 Box-Behnken 试验方差分析

Table 6 Variance analysis of Box-Behnken test

方差来源	SS	f	MS	F	P
模型	192.66	9	21.41	86.85	<0.000 1
X_4	0.46	1	0.46	1.85	0.216 2
X_5	1.67	1	1.67	6.76	0.035 5
X_6	1.43	1	1.43	5.80	0.046 8
X_4X_5	0.12	1	0.12	0.50	0.503 6
X_4X_6	7.07	1	7.07	28.67	0.001 1
X_5X_6	0.53	1	0.53	2.13	0.187 6
X_4^2	14.67	1	14.67	59.53	0.000 1
X_5^2	75.09	1	75.09	304.65	<0.000 1
X_6^2	74.87	1	74.87	303.74	<0.000 1
残差	1.73	7	0.25		
失拟项	1.09	3	0.36	2.31	0.217 9
误差项	0.63	4	0.16		
总离差	194.39	16			

精密度 25.425, 可充分证明该数学模型拟合度很好。 X_5 和 X_6 对预测响应值影响显著, X_4^2 , X_5^2 和 X_6^2 对预测响应值的影响均达极显著水平, 交互项中 X_4X_6 达极显著水平。

各自变量交互影响的响应面图和等高线图见图 1。结果显示 3 个响应面均为连续的平滑曲面, 开口向下, 在曲面的最高点存在着最大预测响应值^[19-20], 得最佳工艺条件为原药与膜材质量比 1:

21.15, 反应温度 48.3 ℃, 反应压力 23.88 MPa, 包封率的数学模型预测值 81.379%。根据最优工艺参数进行 3 次验证试验, 测得平均包封率 80.295%, 相对误差约为 1.33%, 说明优选的制备工艺稳定可靠。

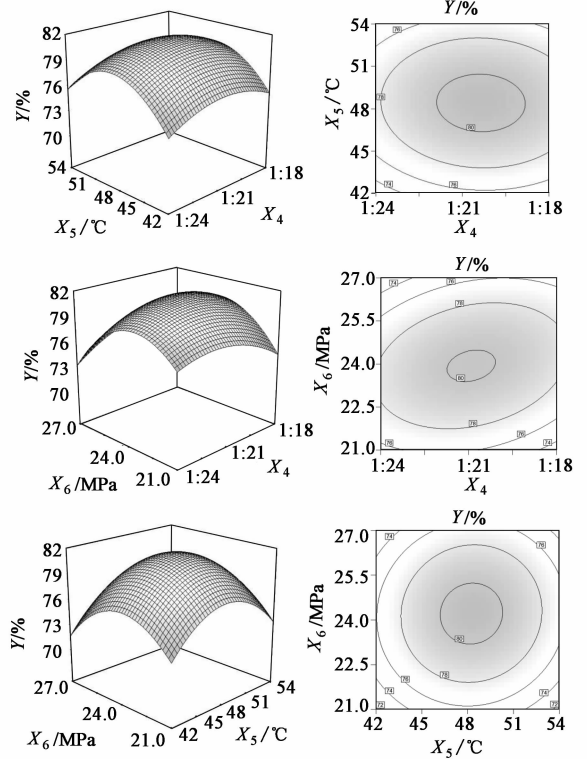


图 1 原药-膜材质量比、反应温度及压力交互作用对石榴皮总多酚脂质体制备工艺影响的响应面和等高线

Fig. 1 Response surface and contour plots of effects of interaction among ratio of raw materials-membrane material, reaction temperature and pressure on preparation process of pomegranate peel polyphenols liposomes

2.5 总多酚脂质体的质量评价

2.5.1 形态、平均粒径及 Zeta 电位测定 取适量石榴皮总多酚脂质体置于表面皿中, 喷金后仔细观察其在扫描电镜下的形态特征并拍照^[7]。结果显示石榴皮总多酚脂质体在日光下为黄白色粉末状固体, 粒度较均匀, 基本呈现球形或类球形, 颗粒彼此分离, 无凝结成团块状况, 完整度很高。应用 PBS 缓冲液将适量石榴皮总多酚脂质体稀释到合适倍数, 测得平均粒径 168.5 nm 和 Zeta 电位 -73.8 mV。

2.5.2 释放度测定 依照 2010 年版《中国药典》二部附录 X D 项下小杯法(第三法)测定, 释放介质体积 200 mL, 分别测定石榴皮总多酚脂质体在人工胃液和磷酸盐缓冲液中的释放度。结果发现 8 h 药

物释放度均 < 70% , 32 h 药物基本释放完全, 将石榴皮总多酚制成脂质体缓释效果较明显。

2.5.3 稳定性测定 取石榴皮总多酚脂质体适量, 于 4 ℃ 贮藏, 于不同时间点(0, 3, 6, 12, 24, 48 d) 取样, 测定包封率分别为 81.2% , 79.9% , 77.5% , 74.5% , 70.9% , 65.8% , 平均粒径依次为 168.5, 170.3, 172.9, 175.7, 179.6, 183.2 nm, 该工艺制备的脂质体稳定性总体上达到了 2010 年版《中国药典》的要求。

3 讨论

石榴皮总多酚在空气中长期存放会氧化变质, 本文将其制备成固体脂质体, 不仅可以防止有效成分的失活, 还可起到缓释效果。石榴皮总多酚作为水溶性药物, 制备成脂质体, 其包封率一般难获得满意的效果, 而且随着放置时间的延长, 包封率逐步降低, 这是水溶性药物制备成固体脂质体存在的共性问题。本文制备的脂质体膜材为磷脂, 附加剂为胆固醇, 二者混合使用, 可调节双分子层的流动性, 减少膜材表面的通透性, 从而改变脂质体的包封率, 提高稳定性及体内外的其他参数。制备工艺中, 要注意整个试验过程禁止明火, 膜材的乙醇溶液应保持澄清, 在水浴锅中预热时间宜 ≤ 10 min, 同时要保证所有膜材均达到水化状态, 不能存在膜质块。高压反应结束后, 溶液膨胀速率要快, 因为这个过程直接影响晶体形态及均匀性。

[参考文献]

[1] 热娜·卡斯木, 帕丽达·阿不力孜, 张笑颖. 新疆石榴皮化学成分研究[J]. 中药材, 2009, 32(3):363-365.
[2] 丛媛媛, 帕丽达·阿不力孜, 罗兰, 等. 新疆石榴皮多酚和多糖的提取及抗氧化活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(3):747-749.
[3] 严欢, 顾政一, 陈孝娟, 等. 石榴皮多酚凝胶的制备及质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8):4-6.
[4] 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.
[5] 喻樊. 绞股蓝总皂苷脂质体的制备与表征[J]. 中草药, 2013, 44(18):2526-2530.
[6] 文震, 刘波, 李琼, 等. 超临界 CO₂ 快速膨胀制备鱼腥草挥发油脂质体[J]. 过程工程学报, 2009, 9(2):350-354.

[7] 文震, 刘波, 郑宗坤, 等. β-桉油醇脂质体的超临界 CO₂ 沉析法制备与理化性质测定[J]. 高校化学工程学报, 2009, 24(1):122-126.
[8] 杜丹丹, 李建科. 响应面法优化石榴皮多酚脂质体的制备及质量评价[J]. 食品工业科技, 2012, 33(4):294-298, 303.
[9] 孙君社, 王平诺, 张中义, 等. 靶向脂质体的超临界流体技术制作与表征[J]. 中国农业大学学报, 2002, 7(4):94-99.
[10] 李文仙, 俞丹, 林玲, 等. Folin-Ciocalteu 比色法应用于蔬菜和水果总多酚含量测定的研究[J]. 营养学报, 2011, 56(3):302-307.
[11] 杜丹丹, 李建科. Folin-Ciocalteu 比色法测定石榴皮多酚含量条件的优化[J]. 西北农林科技大学学报, 2011, 76(5):190-196.
[12] Rajendran A, Palanisamy A, Thangavelu V. Evaluation of medium components by Plackett-Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling [J]. Chin J Biotech, 2008, 24(3):436-444.
[13] Zhou J Y, Yu X J, Ding C, et al. Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology[J]. J Environ Sci, 2011, 23(1):22-30.
[14] Dan Y E, Xu Z N, Cen P L. Medium optimization for enhanced production of cytosine substituted mildiomycin analogue (MIL-C) by *Streptovorticillium rimofaciens* ZJU5119[J]. 浙江大学学报: B 卷英文版, 2008, 4(1):77-84.
[15] 汪彬彬, 车振明. Plackett-Burman 和 Box-Behnken Design 实验设计法优化华根霉产糖酶发酵培养基的研究[J]. 食品科技, 2011, 36(5):41-45.
[16] 王元丰, 余弘, 谭思思, 等. 棉织物泡沫染色工艺的筛选与优化[J]. 纺织学报, 2014, 35(3):68-74.
[17] 韩建, 刘朝辉, 齐葳, 等. β-甘露聚糖酶发酵液絮凝条件的统计学筛选与响应面优化[J]. 生物加工过程, 2007, 5(2):29-35.
[18] 范凯, 杜坤, 严奉伟. 马铃薯渗透脱水工艺参数的响应面优化分析[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(12):24-27.
[19] 王雪, 王振宇. 响应面法优化超声波辅助提取黑木耳多糖的工艺研究[J]. 中国林副特产, 2009, 24(6):1-5.
[20] 贺寅, 王强, 钟葵. 响应面法优化酶法提取龙眼多糖工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(2):79-83.

[责任编辑 刘德文]