

## 山药总多糖脂质体的制备及表征

苏瑾<sup>1</sup>, 王丹<sup>1</sup>, 胡孟洋<sup>2</sup>, 马淑霞<sup>1</sup>, 张涛<sup>1</sup>, 孟德欣<sup>1</sup>, 于莲<sup>1\*</sup>

(1. 佳木斯大学药学院, 生物药剂剂重点实验室, 基础医学院, 黑龙江佳木斯 154000;  
2. 山东大学, 济南 250000)

**[摘要]** **目的:** 优选山药总多糖脂质体的处方工艺并对其进行表征, 为该有效部位的开发提供参考。**方法:** 采用逆向蒸发-微孔滤膜挤压法制备山药总多糖脂质体。以卵磷脂质量浓度、卵磷脂与胆固醇比例、药脂比为考察因素, 包封率为评价指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计优选处方。利用苯酚-硫酸法测定山药总多糖含量, 高速离心法测定山药总多糖脂质体的包封率。**结果:** 山药总多糖脂质体的最佳处方工艺为卵磷脂-胆固醇(6:1), 卵磷脂质量浓度 $12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 药脂比1:15; 包封率和载药量分别为83.29%, 3.83%, 平均粒径121.6 nm, 多分散指数平均值0.136, 平均Zeta电位-31.8 mV。**结论:** 优选的处方工艺稳定可行、重复性好。制备的山药总多糖脂质体形态圆整、粒径分布均匀、包封率较高。

**[关键词]** 山药; 总多糖; 脂质体; 逆向蒸发法; 包封率

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; R944.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0018-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160018

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160628.1403.014.html>

**[网络出版时间]** 2016-06-28 14:03

## Preparation and Characterization of Dioscoreae Rhizoma Polysaccharide Liposomes

SU Jin<sup>1</sup>, WANG Dan<sup>1</sup>, HU Meng-yang<sup>2</sup>, MA Shu-xia<sup>1</sup>, ZHANG Tao<sup>1</sup>,  
MENG De-xin<sup>1</sup>, YU Lian<sup>1\*</sup>

(1. School of Basic Medical Sciences, Key Laboratory of Biological Medicine Preparations, School of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154000, China; 2. Shandong University, Ji'nan 250000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize formulation process of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide liposomes and investigate its characterization. **Method:** The liposomes was prepared by the reverse evaporation-microporous membrane extrusion method. Taking lecithin concentration, ratio of lecithin to cholesterol and ratio of drug to lipid as factors, orthogonal test was adopted to optimize formulation process with entrapment efficiency as index. High-speed centrifugation was developed for determination of entrapment efficiency. The content of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide was measured by phenol-sulfuric acid method. **Result:** Optimum formulation of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide liposomes was as following: lecithin concentration of  $12\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , lecithin-cholesterol (6:1), drug-lipid (1:15). These average values of particle size, polydispersity index and Zeta potential were 121.6 nm, 0.136 and -31.8 mV, entrapment efficiency and drug loading were 83.29% and 3.83%, respectively. **Conclusion:** This optimized process is stable and feasible. Dioscoreae Rhizoma polysaccharide liposomes has round shape, uniform particle size distribution and high entrapment efficiency.

**[Key words]** Dioscoreae Rhizoma; total polysaccharides; liposomes; reverse evaporation method; entrapment efficiency

**[收稿日期]** 20150830(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81274101)

**[第一作者]** 苏瑾, 副教授, 博士, 从事靶向制剂及靶向系统研究, E-mail: sj0129@163.com

**[通讯作者]** \* 于莲, 教授, 硕士生导师, 从事靶向制剂及中药微生态制剂研究, E-mail: jdyulian@163.com

山药具有补中益气、消渴生津、保健养颜、滋肾益精、益肺止咳等功效,药食同源<sup>[1]</sup>,其脂肪含量低,富含多酚氧化酶、皂苷、黄酮、游离氨基酸、蛋白质、尿囊素等<sup>[2]</sup>。多糖是山药的主要活性成分,具有抗氧化、抗菌、能刺激和调节人体的免疫功能、增强白细胞的吞噬功能、促进子宫内膜上皮细胞增殖等作用<sup>[3-5]</sup>。目前国内学者关于山药多糖的研究进展主要集中在提取分离、纯化工艺、构效关系及生理活性方面,对山药总多糖的制剂工艺报道较少。

脂质体作为一种新型给药载体,具有给药明确、能提高药物稳定性及生物利用度、增加药物治疗指数、减少给药次数及剂量、提高患者的顺应性、有效降低药物的不良反应等特性<sup>[6]</sup>;此外,脂质体还具有渗透性高、体内滞留时间长等特点,已被广泛应用于新药研究与开发<sup>[7-8]</sup>。本实验采用逆向蒸发-过膜挤压法制备山药总多糖脂质体,利用正交试验筛选山药总多糖脂质体的制备工艺,为该有效部位的体内研究及开发应用提供参考。

## 1 材料

UV765 型紫外-可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),Scientz-II D 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科技股份有限公司),TGL-16M 型台式高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司),F-400 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司),Nano-ZS90 型激光散射粒度仪(英国 Malvern 公司),HT7700 型透射电镜(日本日立公司)。

山药购自亳州药材市场,由黑龙江佳木斯大学药学院于莲教授鉴定为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* 的干燥根茎。注射用大豆卵磷脂、胆固醇(上海晶纯实业有限公司,质量分数分别为 >98%, >95%),山药总多糖(陕西慈缘生物技术有限公司,批号 CY150330,质量分数 >95%),D-无水葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110833-201205,纯度 99.5%),磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4, 自制),其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 山药总多糖脂质体的含量测定

**2.1.1 检测波长的确定** 精密吸取  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖对照品溶液 2 mL,加入 5% 苯酚溶液 1 mL,摇匀,加入浓硫酸 5 mL,摇匀,沸水浴 15 min,冷水浴 10 min,取出,同法以水为空白对照,在 200 ~ 800 nm 进行紫外扫描。取空白脂质体 2 mL,按上述方法操作。结果在 490 nm 处,对照品溶液出现最大吸光度  $A$ ,而空白脂质体  $A$  无干扰,故选择检测波长

490 nm。

**2.1.2 标准曲线绘制** 精密量取葡萄糖对照品溶液 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,于 490 nm 处测定  $A$ ,以  $A$  为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程  $Y = 11.196X + 0.028$  ( $r = 0.9996$ ),线性范围  $10 \sim 70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.1.3 精密度试验、稳定性试验和加样回收率试验

吸取同一质量浓度山药总多糖溶液,于 490 nm 处重复测定 5 次,结果  $A$  的 RSD 1.2%。分别于 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 min 在 490 nm 处测定  $A$ ,计算 RSD 0.5%;精密称定葡萄糖对照品溶液,分别配置成高、中、低 3 个质量浓度,加入适量空白脂质体,于 490 nm 处测定  $A$ ,计算平均回收率 99.03%, RSD 1.2%。

**2.2 包封率测定** 采用高速离心法测定。精密量取山药总多糖脂质体混悬液 2 mL 至离心管中,置于冷冻离心机中,以  $1 \text{ 万} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min。吸取上清液 1 mL,加水定容于 10 mL 量瓶中,利用苯酚-浓硫酸法测定总多糖含量,按包封率 =  $(W_{\text{总}} - C \times V \times D) / W_{\text{总}} \times 100\%$  计算,式中  $W_{\text{总}}$  代表投药量,  $C$  代表游离药物浓度,  $V$  代表测定体积,  $D$  代表稀释倍数。

### 2.3 脂质体制备方法筛选

**2.3.1 薄膜分散水化法** 精密称卵磷脂 200 mg 和胆固醇 50 mg,溶于 15 mL 乙醚中,旋转蒸发形成薄膜,加入含有山药总多糖脂质体的 PBS 5 mL,震荡超声,加入适量 PBS 水化,得脂质体,按 2.2 项下方法测得包封率 76.36%<sup>[9]</sup>。

**2.3.2 逆向蒸发法** 精密称取卵磷脂 200 mg 和胆固醇 50 mg,加乙醚 15 mL 溶于圆底烧瓶中,加入含有山药总多糖脂质体的 PBS 5 mL,探头超声形成稳定的 W/O 型乳状液,减压旋转蒸发形成胶体溶液,加入适量 PBS 水化,形成均匀脂质体混悬液,测得包封率 79.37%<sup>[10]</sup>。

**2.3.3 乙醇注入法** 精密称取卵磷脂 200 mg 和胆固醇 50 mg,超声溶于 15 mL 乙醇中,将所得乙醇溶液缓慢加入含有山药总多糖脂质体的 PBS 中,搅拌挥发以除去乙醇,得脂质体混悬液,测得包封率 71.19%<sup>[11]</sup>。

**2.4 单因素试验考察** 上述 3 种方法以逆向蒸发法制备的山药总多糖脂质体包封率最高,并且此法制备的脂质体具有较大的水容积,适合水溶性药物的包封,故选择逆向蒸发法。虽然《中国药典》2015

年版中关于脂质体的包封率规定不得低于 80% ,但逆向蒸发法制备的脂质体包封率接近 80% ,因此选择该法进行单因素试验考察,以提高的山药总多糖脂质体的包封率。

**2.4.1 胆固醇与卵磷脂质量比** 固定卵磷脂质量浓度  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ,药脂比 1:40,水相与有机相比例 1:3,胆固醇与卵磷脂质量比分别为 1:1,1:3,1:5,1:7,1:9,所得包封率分别为 51.06% , 59.00% , 73.00% ,84.18% ,79.61% 。

**2.4.2 卵磷脂质量浓度** 固定胆固醇与卵磷脂质量比 1:7,药脂比 1:40,水相与有机相比例 1:3,考察不同卵磷脂质量浓度(2.5,5,10,15,20  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )对包封率的影响,结果包封率分别为 45.78% , 50.57% ,79.36% ,77.19% ,59.07% 。

**2.4.3 药脂比** 固定胆固醇与卵磷脂质量比 1:7,卵磷脂质量浓度  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ,水相与有机相比例 1:3,分别考察不同药脂比(1:5,1:10,1:20,1:30,1:40)对包封率的影响,计算包封率分别为 63.36% , 71.18% ,76.89% ,73.18% ,68.75% 。结果表明药脂比例过大或过少都会降低包封率,当药脂比为 1:20 时包封率最大。

**2.4.4 水相与有机相比例** 固定胆固醇与卵磷脂质量比 1:7,卵磷脂质量浓度  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ,药脂比 1:20,水相与有机相比例分别为 1:1,1:2,1:3,1:4,结果包封率分别为 73.57% , 75.17% , 82.36% ,77.11% 。

**2.5 正交试验优化处方** 在单因素试验基础上,选择卵磷脂与胆固醇质量比、卵磷脂质量浓度、药脂比(模型药物与卵磷脂质量比)为影响因素,包封率为评价指标,采用  $L_9(3^4)$  正交表设计试验,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。由直观分析可知,各因素对处方的影响顺序为  $C > A > B$ 。方差分析表明因素 A,C 具有显著性差异,因素 B 则无显著性差异,故选择处方组合  $A_1B_3C_1$ ,即卵磷脂-胆固醇(6:1),卵磷脂质量浓度  $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ,药脂比 1:15。

**2.6 制备工艺优化**

**2.6.1 旋转蒸发转速选择** 转速主要影响成膜的速度和膜成型的情况,进而影响脂质体的质量,采用逆向蒸发法制备脂质体,其他条件不变,旋转蒸发的转速分别为 100,60,40  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  ,常温减压除去乙醚,测得包封率分别为 77.13% ,73.18% ,72.60% ,转速对于脂质体包封率的影响未见显著差异,但考虑到设备稳定性,故选定 60  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  。

**2.6.2 乳化超声时间** 乳化超声时间主要影响脂

表 1 山药总多糖脂质体处方优选正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis on formulation of Dioscoreae Rhizoma polysaccharide liposomes

No.	A 卵磷脂-胆固醇	B 卵磷脂质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	C 药脂比	D (空白)	包封率/%
1	6:1	8	1:15	1	87.75
2	6:1	10	1:20	2	78.39
3	6:1	12	1:25	3	86.80
4	7:1	8	1:20	2	68.90
5	7:1	10	1:25	3	72.90
6	7:1	12	1:15	1	83.20
7	8:1	8	1:25	3	75.18
8	8:1	10	1:15	1	84.83
9	8:1	12	1:20	2	80.22

表 2 包封率方差分析

Table 2 Variance analysis of entrapment efficiency

方差来源	SS	MS	F	P
A	130.46	65.23	37.80	<0.05
B	61.71	18.27	17.88	>0.05
C	143.37	30.86	41.54	<0.05
D(误差)	3.45	1.02	1.00	

质体溶液分层的状况,稳定不分层有利于 W/O 型乳剂的形成,进而影响脂质体的质量。其他条件不变,分别考察乳化超声 2,5,8,10 min 对包封率的影响,结果包封率分别为 31.00% ,62.60% ,75.18% ,73.09% 。乳化超声时间过短会显著降低脂质体的包封率,甚至不能形成 W/O 型乳剂;超声时间延长时,分层时间也会相对延长,包封率也会因此降低,故最终选定乳化超声时间 8 min。

**2.6.3 水化时间** 水化时间主要影响脂质体混悬液分布的均匀性,进而影响脂质体的稳定性。其他条件保持不变,水化时间分别为 0.5,1,1.5,2,3 h,结果测得包封率分别为 47.19% , 67.91% , 77.77% ,83.52% ,84.17% 。说明当水化时间 < 1 h 时,脂质体溶液会出现浑浊,影响脂质体的粒度分布,且包封率降低;随着水化时间的延长,脂质体溶液均匀分布,且包封率提高,2 h 时包封率值趋于平衡,故选定水化时间 2 h。

**2.6.4 水浴温度考察** 脂质体制备过程中,水浴温度是磷脂材料溶解、成膜的因素之一,会影响膜材成膜性及脂质体稳定性,分别考察旋转蒸发温度(25,30,35,40  $^{\circ}\text{C}$ )对包封率的影响。结果包封率分别为 67.17% ,73.12% ,75.06% ,69.69% 。在逆相蒸发

法制备脂质体时,制备温度对于薄膜的质量及脂质体包封率无显著影响,且考虑乙醚自身的沸点较低,挥发除去容易,故选定 30 ℃ 条件下减压除去乙醚。

**2.7 山药总多糖脂质体的制备** 按照处方量精密称取卵磷脂与胆固醇溶解于乙醚中,加入含有山药总多糖的水相[水相-有机相(1:3)],超声,形成稳定 W/O 型乳剂。向 W/O 型乳剂中加入玻璃珠,在水浴温度 30 ℃,转速 60 r·min<sup>-1</sup> 条件下减压蒸发,除去有机溶剂,继续减压 10 min,形成脂质体混悬液,加入一定量 PBS 水化 2 h,取出,过 0.22 μm 微孔滤膜,得山药总多糖脂质体混悬液。

**2.8 验证试验** 称取 3 份山药总多糖,每份 16 mg,按优选的处方工艺制备 3 批山药总多糖脂质体混悬液,结果包封率分别为 81.37%, 85.59%, 82.91%,载药量分别为 3.95%, 3.74%, 3.80%。表明优选的处方工艺可行性和重复性较好。

**2.9 脂质体形态、粒度分布和 Zeta 电位** 取山药总多糖脂质体适量,用磷钨酸负染,在透射电镜下观察脂质体形态,可观察到脂质体呈类球形,表面圆整,无黏连。利用激光散射粒度仪检测,结果发现山药总多糖脂质体无杂峰,呈单峰正态分布,平均粒径(121.6 ± 2.7) nm,多分散指数(PDI) 0.136 ± 0.011, Zeta 电位(-31.8 ± 0.69) mV。

### 3 讨论

山药药食两用,应用历史悠久;多糖类化合物是一种生物大分子,具有较好的水溶性和多方面的生物活性,近年来关于多糖类成分的保健功能和药理作用报道很多。总多糖作为山药中主要活性成分,具有较好的开发前景。脂质体是近年来受到广泛关注的新型给药系统,其结构中主要是磷脂和胆固醇形成的囊泡,可将药物包裹在囊泡内,实现药物在生物体内缓慢释放、促进机体吸收、提高药物的生物利用度<sup>[12-13]</sup>。

脂质体的常见制备方法有薄膜分散法、逆相蒸发法、注入法、复乳法、冻干法、超临界流体法、梯度法等。其中逆相蒸发法对于制备水溶性较好的药物具有显著优势。一般认为,增加药脂比可提高脂质体的包封率,但本研究发现,随着药脂比的增加,包封率反而出现了降低,其原因有待进一步研究确认。由于逆相蒸发法主要用于水溶性药物的制备,因此水相和有机相比例的选择尤为重要,有机相和水相比例较高,脂质体溶液在搅拌后不稳定,不能形成

W/O 型溶液;而有机相和水相比例较低时,则脂质体对药物的容纳量就会降低,影响药物的装载。本研究中水相-有机相(1:3),制备过程中形成的 W/O 型溶液均匀,不分层,且包封率较高。根据优选的处方工艺,制备的多批山药总多糖脂质体混悬液的包封率及载药量基本一致。

#### [参考文献]

- [1] 李丹,吕洪艳,陆海民.不同品种怀山药中山药总多糖和淀粉积累动态比较[J].中草药,2009,40(增刊):250-253.
- [2] 袁书林.山药的化学成分和生物活性作用研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(3):176-179.
- [3] 杨宏莉,李少春,张伟伟,等.山药总多糖的药理作用[J].医学研究与教育,2010,27(3):80-82.
- [4] Ju Y, Xue Y, Huang J L, et al. Antioxidant Chinese yam polysaccharides and its pro-proliferative effect on endometrial epithelial cells[J]. Int J Bio Macromol, 2014,66(5):81-85.
- [5] Yang W F, Wang Y, Li X P, et al. Purification and structural characterization of Chinese yam polysaccharide and its activities[J]. Carbohydr Polym, 2015, 117(3): 1021-1027.
- [6] 杨悦,石森林,葛卫红.多糖类药物的剂型研究概况[J].中国药事,2008,22(6):509-513.
- [7] 张丹,廖芳,周洁,等. BOX-Behnken Design-响应面优化法优化芍药总苷脂质体的制备工艺及体外释放研究[J].中草药,2015,46(3):359-364.
- [8] 尤佳,戴东波,何雯洁,等.姜黄素长循环脂质体的制备及药动学研究[J].中国中药杂志,2014,39(7):1238-1242.
- [9] 李东芬.白芍总苷脂质体的研究[D].成都:成都中医药大学,2012.
- [10] Liu Z G, Ma X, Deng B H, et al. Development of liposomal *Ganoderma lucidum* polysaccharide: Formulation optimization and evaluation of its immunological activity[J]. Carbohydr Polym, 2015, 117(3):510-517.
- [11] 高飞,王东凯,张春叶,等.乙醇注入法制备水飞蓟宾脂质体及其质量评价[J].中国药理学杂志,2008,6(6):301-308.
- [12] 平其能.现代药剂学[M].北京:中国医药科技出版社,2001:594.
- [13] 朱盛山.药物新剂型[M].北京:化学工业出版社,2003:414.

[责任编辑 刘德文]