

# 西洋参 SOD 脂质体的制备工艺优选和性质评价

齐滨,刘莉,张楠楠,王珊,赵大庆\*  
(长春中医药大学,长春 130117)

**[摘要]** 目的:优选西洋参 SOD 脂质体的制备工艺并考察其性质。方法:采用逆相蒸发法制备西洋参 SOD 脂质体,以包封率为指标,通过正交试验考察卵磷脂-胆固醇、磷酸盐缓冲液体积及西洋参 SOD 加入量对制备工艺的影响,考察西洋参 SOD 脂质体的粒径分布、体外释放和稳定性。结果:最佳制备工艺为卵磷脂-胆固醇(4:1),磷酸盐缓冲液体积 12 mL,西洋参 SOD 加入量 10 mg,制备的西洋参 SOD 脂质体形态均匀,平均粒径 480 nm,平均包封率 71.35%。结论:制备的脂质体包封率高、稳定性良好,具有一定的缓释效果。

**[关键词]** 西洋参; SOD 脂质体; 逆向蒸发法; 包封率; 粒径分布; 体外释药

**[中图分类号]** R283.6,R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0017-03

**[doi]** 10.11653/syfy2013180017

## Preparation Technology Optimization and Properties Evaluation of SOD from Panacis Quinquefolii Radix Liposomes

QI Bin, LIU Li, ZHANG Nan-nan, WANG Shan, ZHAO Da-qing\*  
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize preparation technology of SOD from Panacis Quinquefolii Radix liposomes and investigate its properties. **Method:** Anti-phase evaporation method was used to prepare SOD from Panacis Quinquefolii Radix liposomes, with entrapment efficiency as index, effects of lecithin-cholesterol ratio, volume of phosphate buffer and amount of SOD from Panacis Quinquefolii Radix on preparation technology was investigated by orthogonal design, then studied particle size, *in vitro* release and stability of SOD from Panacis Quinquefolii Radix liposomes. **Result:** Optimum preparation technology was: lecithin-cholesterol (4:1), volume of phosphate buffer 12 mL, the amount of SOD from Panacis Quinquefolii Radix 10 mg. These prepared liposomes was uniform with average particle size of 480 nm and entrapment efficiency of 71.35%. **Conclusion:** These prepared liposomes had high entrapment efficiency and good stability with certain sustained-release effect.

**[Key words]** Panacis Quinquefolii Radix; SOD liposomes; anti-phase evaporation method; encapsulation efficiency; particle size distribution; *in vitro* release

超氧化物歧化酶(SOD)是一种金属蛋白酶类,可专一地清除生物体内超氧阴离子自由基( $O_2^-$ ),

减少  $O_2^-$  对生物体的损害<sup>[1-2]</sup>。西洋参中 SOD 的活力较高且稳定性良好<sup>[3]</sup>,但体内半衰期较短,进入体内易被降解<sup>[4]</sup>。将西洋参 SOD 包封于脂质体中,可显著提高其稳定性,脂质体具有靶向性可直接到达病灶部位,且脂质体的缓释长效作用可减少给药次数。本实验采用正交试验优选西洋参 SOD 脂质体的制备工艺,考察其粒径分布、体外释放和稳定性,为西洋参 SOD 的开发利用提供实验依据。

### 1 材料

Agilent 1100N-1946C 型高效液相色谱仪(美国

**[收稿日期]** 20130423(021)

**[基金项目]** 国家科技部“十二五科技重大专项”(2010ZX09401-305);国家自然科学基金面上项目(81274038)

**[第一作者]** 齐滨,博士,讲师,从事中药有效成分的提取分离研究, Tel:0431-86172203, E-mail:qibin88@126.com

**[通讯作者]** \*赵大庆,博士生导师,教授,从事中药蛋白质、创新药物研究, Tel: 0431-86172203, E-mail:cnzhaodaqing@126.com

Agilent 公司), TA1203N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司), pHs-25CW 型精密酸度计(上海理达仪器厂), THZ-82 型数显水浴恒温振荡器(江苏金坛市亿通电子厂), 50probe 型紫外-可见分光光度计(美国 VARIAN 公司), Nano ZS 型激光散射粒径分析仪(英国 Malvern 公司), JEM-1200EX 型透射电镜(日本电子公司)。

胆固醇(德国 Sigma 公司), 西洋参超氧化物歧化酶(西洋参 SOD, 自制, 活力  $8\ 200\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), 透析膜(D25, 相对分子质量  $8\ 000\sim 144\ 000$ , 北京鼎国生物技术有限责任公司), SOD 试剂盒、Bradford 蛋白含量试剂盒(南京建成生物工程研究所), 试剂均为国产分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 西洋参 SOD 脂质体的制备**<sup>[5]</sup> 采用逆相蒸发法。按一定比例称量磷脂与胆固醇, 溶解在三氯甲烷中; 将一定量西洋参 SOD 固体溶解在一定体积的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中, 将上述溶液混合均匀, 置于 50 mL 旋干瓶中, 水浴超声 15 min, 形成均匀乳剂, 减压蒸发去除三氯甲烷, 达到胶态后, 滴加磷酸盐缓冲液 5 mL, 旋转以使容器壁上的凝胶水化脱落, 继续减压蒸发, 制得水性混悬液, 将该液体置于透析袋中, 透析过夜, 即得。

**2.2 包封率的测定**<sup>[6]</sup> 取西洋参 SOD 脂质体 1.0 mL, 加正丙醇破乳并稀释至 3 mL, 混匀, 过  $0.22\ \mu\text{m}$  微孔滤膜, 按 SOD 试剂盒提供的方法测定西洋参 SOD 的总活性( $U_1$ )。取西洋参 SOD 脂质体 1.0 mL, 加水稀释至 3.0 mL, 放于截留相对分子质量 8 000 的超滤离心管内,  $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  于  $4\ ^\circ\text{C}$  离心 5 min, 测定游离的西洋参 SOD 的酶活( $U_2$ ), 计算活性包封率。

$$\text{活性包封率} = (1 - U_2/U_1) \times 100\%$$

**2.3 制备工艺的优化**<sup>[7]</sup> 在预试验基础上, 选择卵磷脂和胆固醇的质量比, 磷酸盐缓冲液(PBS)体积, 西洋参 SOD 加入量为考察因素, 每个因素选取 3 个水平, 按  $L_9(3^4)$  正交表进行正交试验, 以活性包封率为评价指标, 因素水平见表 1, 试验安排及结果见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 西洋参 SOD 脂质体制备工艺优选正交试验因素水平

水平	A 卵磷脂-胆固醇	B PBS 体积 /mL	C 西洋参 SOD 加入量/mg
1	3:1	6	5
2	4:1	12	10
3	5:1	18	15

表 2 西洋参 SOD 脂质体制备工艺优选正交试验安排

No.	A	B	C	D(空白)	包封率/%
1	1	1	1	1	44.25
2	1	2	2	2	50.31
3	1	3	3	3	52.21
4	2	1	2	3	61.25
5	2	2	2	1	70.29
6	2	3	1	2	61.25
7	3	1	1	2	48.25
8	3	2	1	3	51.25
9	3	3	2	1	46.32
$K_1$	146.77	153.75	156.75	160.86	
$K_2$	192.79	171.85	157.88	159.81	
$K_3$	145.82	159.78	170.75	164.71	
R	15.66	6.03	4.67	1.63	

表 3 制备工艺方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	480.55	2	240.27	108.30	<0.05
B	56.63	2	28.31	12.76	>0.05
C	40.32	2	20.16	9.09	>0.05
D(误差)	4.44	2	2.22		

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

由直观分析可知, 各因素对西洋参 SOD 脂质体包封率的影响顺序为  $A > B > C$ 。方差分析表明 A 因素对包封率的影响显著, B, C 因素则无显著性影响, 按节约成本的原则分别将  $A_2B_2C_2$  和  $A_2B_1C_1$  条件平行做 3 组比较试验, 前者包封率分别为 70.67%, 70.56%, 70.83%, 后者包封率分别为 60.25%, 60.38%, 60.16%, 故确定选择  $A_2B_2C_2$ , 即卵磷脂-胆固醇(4:1), PBS 体积 12 mL, 西洋参 SOD 加入量 10 mg, 且优选的工艺重复性良好。

**2.4 形态和粒度分布考察**<sup>[8]</sup> 取少量西洋参 SOD 脂质体制剂滴至载玻片上, 用 3% 磷钨酸进行负染, 滴至专用铜网上, 自然挥干, 使粒子在铜网上浓缩沉积, 用透射电子显微镜观察并照相, 见图 1, 得到的西洋参 SOD 脂质体为乳白色、近乎透明的胶体溶液, 呈球形或近球状的小囊泡。取西洋参 SOD 脂质体适量, 用水稀释后用激光粒度分析仪测定, 经动态光散射处理软件处理, 见图 2, 显示西洋参 SOD 脂质体粒径分布均匀, 平均粒径 480 nm。

**2.5 体外释药性能的考察**<sup>[9-12]</sup> 准确移取西洋参 SOD 脂质体 2 mL 装入透析袋中, 置于 50 mL 的 PBS 缓冲液中透析, 同时取西洋参 SOD 溶液 2 mL 作对

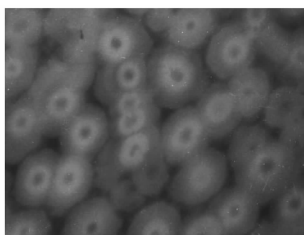
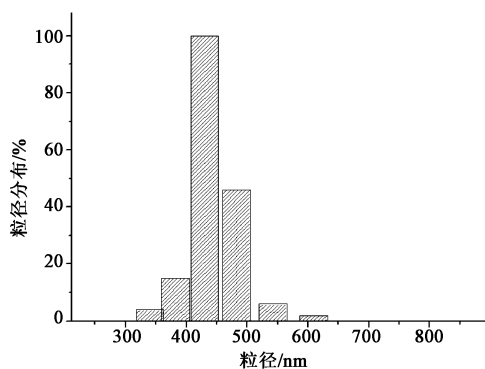
图1 西洋参 SOD 脂质体的透射电镜( $\times 1$ 万)

图2 西洋参 SOD 脂质体的粒径分布

照溶液,透析温度( $37 \pm 0.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,于恒温水浴振荡器中恒速震荡,定时取样 5 mL,同时补加等体积同温度的 PBS 缓冲液,测定西洋参 SOD 的活性,计算游离西洋参 SOD 的累积释放率,见图 3,结果表明游离药物在 3 h 的释放率达 100%,而西洋参 SOD 脂质体 12 h 累积释放率 48.5%。

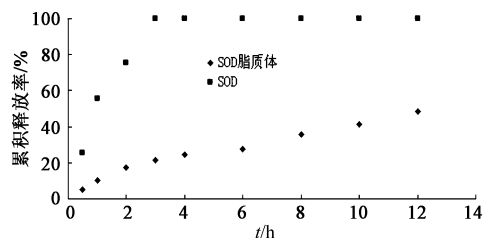


图3 西洋参 SOD 脂质体体外释放曲线

**2.6 稳定性考察**<sup>[12]</sup> 在低温(约  $4^{\circ}\text{C}$ )及  $25^{\circ}\text{C}$  条件下存放,观察外观变化,测定西洋参 SOD 脂质体的包封率和粒径变化情况。结果贮存 2 个月时,在  $4^{\circ}\text{C}$ 、 $25^{\circ}\text{C}$  贮藏条件下无明显的凝聚现象,粒径分布无明显变化,包封率分别为 68.19%、68.35%;贮存 3 个月时, $4^{\circ}\text{C}$  存放的脂质体外观无明显变化, $25^{\circ}\text{C}$  存放有少量沉淀产生,粒径分布变化甚微,包封率分别为 63.23%、57.25%;说明西洋参 SOD 脂质体在  $4^{\circ}\text{C}$  低温存放时较稳定,温度升高稳定性下降,随时间的延长包封率呈现下降趋势。

### 3 讨论

SOD 在机体内易分解,半衰期较短,一般将其

包裹起来,制成缓释剂型,以提高生物利用度。SOD 在水、稀盐、稀酸或稀碱溶液中溶解性较好,故选用 PBS 缓冲液溶解 SOD,能有效避免有机溶剂使 SOD 失活。逆相蒸发法适合于包封水溶性药物和大分子生活性物质,制备的西洋参 SOD 脂质体包封率高且相对稳定,具有一定缓释效果。

### [参考文献]

- [1] 李红艳,赵雨,杨士慧,等. 人参不同部位超氧化物歧化酶活力比较[J]. 时珍国医国药,2010,21(3):513.
- [2] 李俐,马颖哲,闫晓凯,等. 超氧化物歧化酶脂质体制备方法包封率的比较[J]. 吉林大学学报:医学版,2003,29(4):535.
- [3] 齐滨,赵大庆,刘莉,等. 不同储藏条件下人参西洋参中超氧化物歧化酶的活力比较研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(6):1538.
- [4] 赵云斌,刘敏,余忠谊. 邻苯三酚自氧化法测定血中超氧化物歧化酶的活性[J]. 中国卫生检验杂志,2001,11(4):387.
- [5] 余旭亚,赵声兰,李涛,等. 仙人掌 SOD 脂质体的制备研究[J]. 昆明理工大学学报:理工版,2002,27(1):103.
- [6] 谢建峰,曾昭武,刘星言. 高效液相色谱法测定丹酚酸 B 脂质体的含量及包封率[J]. 现代中西医结合杂志,2007,16(31):4684.
- [7] 袁海玲,胡继民,魏玉辉,等. 布洛芬乙醇脂质体的制备及体外透皮特性研究[J]. 中国新药杂志,2013,22(3):351.
- [8] 罗懿,欧阳荣,李珊,等. 多指标加权评分法优选润肤止痒脂质体凝胶提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):17.
- [9] 赵荣生,严宝霞,侯新朴. 两性霉素 B 脂质体的制备及稳定性研究[J]. 中国医药工业杂志,2001,32(4):160.
- [10] 赵菊香,程怡,吴琼,等. 苦参素空间稳定脂质体的包封率测定和体外释放度考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):4.
- [11] 周珊珊,谭睿,谢彬,等. 葛根素骨架缓释片的研制及体外释放评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):23.
- [12] 张继芬,原欢欢,林都,等. 阿魏酸载脂质体壳聚糖的微球在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(13):1751.

[责任编辑 全燕]