

染料木素脂质体的制备及其差示扫描量热考察

邬瑞光^{1*}, 刘永刚¹, 郑燕珍², 赵保胜³, 李维峰¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 清华大学化学系, 生命有机磷化学与化学生物学教育部重点实验室, 北京 100084; 3. 北京中医药大学科研实验中心, 北京 100102)

[摘要] **目的:** 分别制备含豆甾醇和胆甾醇的染料木素脂质体, 研究脂质体热致相变的热力学性质, 比较不同甾醇对脂质体热稳定性的影响。**方法:** 用薄膜分散法制备空白和含药脂质体, 差示扫描量热法(DSC)确定不同脂质体主相变的相变温度、相变焓等热力学参数。**结果:** 含药脂质体的相变温度、相变焓均低于空白脂质体。在组成相同的情况下, 豆甾醇脂质体与胆甾醇脂质体的相变温度和相变焓无明显差别。**结论:** 染料木素进入脂质体膜的疏水区与磷脂分子的疏水尾链发生疏水相互作用。豆甾醇代替胆甾醇后脂质体的热稳定性变化很小, 提示可用豆甾醇代替胆甾醇作为染料木素脂质体的膜材。

[关键词] 染料木素; 脂质体; 豆甾醇; 差示扫描量热; 主相变

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0048-03

Preparation and Differential Scanning Calorimetry Study of Genistein Liposomes

WU Rui-guang^{1*}, LIU Yong-gang¹, ZHENG Yan-zhen², ZHAO Bao-sheng³, LI Wei-feng¹

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. Key Laboratory of Bioorganic Phosphorous Chemistry and Chemical Biology (Ministry of Education), Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China;
3. Center of Scientific Experiment, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare genistein liposomes containing cholesterol or stigmasterol, investigate and compare difference of thermal stability of liposomes containing different sterols according to thermodynamic parameters. **Method:** Blank and drug-containing liposomes were prepared by film dispersion method, Thermodynamic parameters were determined by differential scanning calorimetry technique, which including transition temperature and enthalpy. **Result:** Both transition temperature and enthalpy of drug-containing liposomes were lower than those of blank liposomes. In the case of the same composition, both transition temperature and enthalpy of liposomes containing stigmasterol were no significant difference to those containing cholesterol. **Conclusion:** Genistein could incorporate into hydrophobic region of the liposomes membrane and interact with hydrophobic tails of phospholipid molecules, difference of thermal stability between liposomes containing stigmasterol and that containing cholesterol was very small, which imply that cholesterol could be replaced by stigmasterol as membranes component of genistein liposomes.

[Key words] genistein; liposomes; stigmasterol; DSC; main phase transition

染料木素是大豆异黄酮的主要成分, 具有弱雌激素活性, 临床用于治疗癌症、中老年骨质疏松症、女性更年期综合症和心血管疾病等^[1-2]。染料木素在水中几乎不溶, 直接口服生物利用度低, 限制了其临床推广应用^[3]。将其制备成脂质体可提高药物生物利用度, 增加其靶向性, 提高疗效。目前已有报

[收稿日期] 20120328(026)

[基金项目] 北京中医药大学基本科研项目(2011-JYBZZ-JS050)

[通讯作者] * 邬瑞光, 博士, 讲师, 从事物理药剂学研究, Tel: 010-84738669, E-mail: wurg@bucm.edu.cn

道通过制备染料木素胶束以提高其生物利用度^[3],但关于染料木素脂质体的研究还未见报道。

脂质体膜一般由磷脂等脂质分子通过自组装形成的以双分子层为单位的多层膜。随温度的变化,脂质体膜可能呈现层状凝胶相、波动凝胶相及液晶相等不同相态^[4]。脂质体传统组方中的甾醇一般选用胆固醇,但胆固醇可能是动脉粥样硬化的诱因之一^[5]。植物甾醇如豆甾醇与胆固醇的分子结构非常相似(图1),同时植物甾醇有助于抑制胆固醇的吸收。本课题组前期已用DSC研究丹皮酚/豆甾醇脂质体和丹皮酚/胆固醇脂质体的热力学性质的差别^[6]。本实验选择二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC,图1)和胆固醇或豆甾醇为膜材,分别制备含胆固醇和豆甾醇的染料木素脂质体,用DSC法研究脂质体的相变温度和相变焓等热力学性质,以期对染料木素脂质体中豆甾醇替代胆固醇在热力学方面研究提供理论和实验依据。

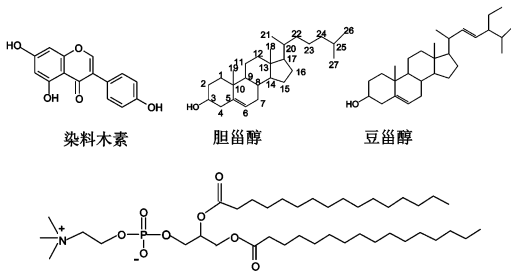


图1 染料木素、胆固醇、豆甾醇和 DPPC 的分子结构式

1 材料

821°型差示扫描量热仪(瑞士梅特勒-托利多公司),FA1104型电子天平(上海天平仪器厂),79-1型磁力加热搅拌器(金坛市瑞华仪器有限公司)。

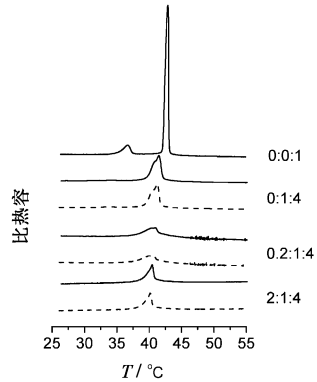
DPPC,胆固醇、豆甾醇(美国Sigma公司,纯度>99%),染料木素(中国食品药品检定研究院,纯度>98%,批号11704-200501),试验所用试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 染料木素脂质体的制备^[7] 按剂量比称取染料木素、DPPC和甾醇,溶解于三氯甲烷-甲醇(3:7)混合溶剂中,30℃旋转蒸发以除去有机溶剂,至烧瓶内壁形成一薄层脂膜,通氮气10min继续除去残留溶剂。加入过量三羟甲基氨基甲烷(Tris)-HCl(pH 7.2)缓冲液。在N₂保护下置于60℃水浴10min,旋涡混合1min,低温N₂保护下间断性超声15min,如此反复3次,至体系均匀分散。

2.3 差热扫描分析 试验气氛为N₂,以空白坩埚做参比。升温速率为0.5℃·min⁻¹,以保证样品在

升温过程中处于相平衡的状态,结果见图2。



各曲线右端标记为脂质体的组成(染料木素-甾醇-DPPC);实线代表胆固醇脂质体(0:0:1除外);虚线代表豆甾醇脂质体

图2 空白脂质体和含药脂质体的差热扫描

图2中各曲线的纵坐标已由原始曲线的功率值换算为比热值,因此各吸热峰(本实验所用DSC规定向上的峰为吸热峰)的面积数值上等于相变过程的焓变。由Origin软件得到各主相变峰(41℃附近)的相变温度 t_p (DSC曲线的峰顶温度),相变焓 ΔH 等热力学参数,结果见表1。

表1 空白和含药脂质体主相变过程的热力学参数

药物:甾醇:磷脂(摩尔比)	$t_p/^\circ\text{C}$	$\Delta H/\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$
0:0:1	42.7	53.1
0:1:4(胆固醇)	41.1	23.1
0:1:4(豆甾醇)	40.8	20.7
0:2:1:4(胆固醇)	40.3	16.1
0:2:1:4(豆甾醇)	40.1	15.1
2:1:4(胆固醇)	40.1	13.6
2:1:4(豆甾醇)	39.9	12.6

由图2可知,在脂质体中存在甾醇的情况下,脂质体前相变消失,主要因为甾醇分子可增加脂质体膜的流动性,使脂质体在室温下就处于波动凝胶相因而升温过程中不再发生前相变^[8-9]。

由表1结果可知,与不含药的甾醇-磷脂空白脂质体相比,含药脂质体的主相变温度和主相变焓均明显下降,说明染料木素已进入脂质体膜的疏水区与磷脂分子的疏水尾链发生了疏水作用,证明在脂质体中染料木素主要存在于脂相而不是水相中。同样组成的染料木素-胆固醇脂质体与染料木素-豆甾醇脂质体相比,二者主相变的相变温度和相变焓无明显差别,即胆固醇脂质体的热稳定性与豆甾醇脂质体的热稳定性无明显差别,说明染料木素脂质体处方中可用胆固醇代替豆甾醇作为膜材。推测二者热稳定性无明显差别的原因可能是豆甾醇与胆固醇

的分子结构相近,仅在 22 位碳原子处多一个双键,在 24 位碳原子处多一个乙基。

3 讨论

本试验采用薄膜分散法制备脂质体的操作过程中关键步骤之一是脂质分子的充分水化。因为只有使脂质分子充分水化,才能使脂质体均一稳定,从而保证药物不发生明显渗漏。在制备过程中应注意两点,一是必选加入超过量的缓存溶液,使缓冲溶液中水分子与磷脂分子的摩尔比大于 100:1;二是水化温度要超过磷脂分子主相变温度 20 ℃,并在高温和低温之间重复多次^[8]。本实验在制备空白和含药脂质体时均加入超过量的缓冲溶液,水化温度为 60 ℃,在室温和 60 ℃之间重复 3 次。结果表明本实验制备的脂质体为均匀的半透明乳白色液体,放置 1 周末发现絮状物。本实验在水化过程中采用 N₂ 保护,以防止磷脂分子被氧化,因而得到的脂质体有较高化学稳定性。

DSC 法研究脂质体相变机制的实验原理是^[6]:脂质体膜(双分子层)中的磷脂分子在升温过程中一般经历由层状凝胶相到波动凝胶相及由波动凝胶相到液晶相的相变过程,分别称为前相变和主相变。如果药物进入脂质体膜中的疏水区与磷脂分子的疏水尾链发生疏水相互作用(疏水力),则磷脂分子的主相变温度将发生变化。主相变温度和相变焓的大小可以反映脂质体的热稳定性,主相变温度越高,主相变焓越大,说明热稳定性越高。

[参考文献]

[1] 胡志苹,黄志华,吴亮亮,等. 染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系[J]. 中国实验方

剂学杂志, 2011, 17(13):164.

- [2] 吴秋华,王春,张志恒,等. 光谱法研究染料木素与人血清白蛋白的相互作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(4):1060.
- [3] 何礼,韩瑞伟,唐晓飞,等. 正交设计联用星点设计-效应面法优化染料木素胶束制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):12.
- [4] 邹瑞光,李维峰,侯俊玲,等. 植物固醇在脂质体中的应用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(12):1092.
- [5] Chan Y H, Chen B H, Chiu C P, et al. The influence of phytosterols on the encapsulation efficiency of cholesterol liposomes[J]. *Int J Food Sci Tech*, 2004, 39(9):985.
- [6] Wu R G, Wang Y R, Wu F G, et al. DSC study of paeonol-encapsulated liposomes, comparison of the effect of cholesterol and stigmasterol on the thermotropic phase behavior of liposomes[J]. *J Therm Anal Calorim*, 2012, DOI:10.1007/s10973-012-2331-5.
- [7] Lichtenberger L M, Wang Z M, Romero J J, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids; insight into the mechanism and reversal of NSAID-induced gastrointestinal injury[J]. *Nat Med*, 1995, 1(2):154.
- [8] Wu R G, Chen L, Yu Z W, et al. Phase diagram of stigmasterol-dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures dispersed in excess water[J]. *Biochim Biophys Acta-Biomem*, 2006, 1758(6):764.
- [9] Vist M R, Davis J H. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures:²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry [J]. *Biochemistry*, 1990, 29(2):451.

[责任编辑 仝燕]