技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)12-1709-03

正交实验优选 γ－亚麻酸脂质体制备工艺

赵跃刚,沈晓君,齐普楠,孙全乐,贡济宇
(长春中医药大学研究生学院,长春 130117)

【摘 要】目的:月见草油富含多种人体必需不饱和脂肪酸,其主要有效成分为 γ－亚麻酸,但性质不稳定易氧化,故将其制成脂质体可增加其稳定性并提高其疗效。方法:本实验采用正交试验筛选 γ－亚麻酸脂质体的制备工艺。经过实验得出最佳的制备工艺条件为磷脂与月见草油的比例为 0.2:0.1,溶于 20 ml 氯仿和 40 ml 磷酸缓冲溶液,超声处理 10 min。结果:制得的 γ－亚麻酸脂质体的包封率较高达 99%以上,且渗透率较低。结论:本方法简便易行,实验结果可为新药开发和工业化生产应用提供条件。

【关键词】脂质体;γ－亚麻酸;正交试验
【中国图书分类法分类号】R914.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-05

Orthoonal exeriment in the preparation technological of γ-linolenicacid liposome

ZHAO Yue-gang, et al
(*College of Graduate, Changchun University of Chinese Medicine*)

【Abstract】*Objective*: Evening primrose oil contains abundance of Essentia polyunsaturated fatty acids and γ-linolenic acid is the mostly important, but the property of γ-linolenic acid is unstable and easily oxidized, in this experiment the γ-linolenic acid was made into liposome so as to make it stable and more effective, orthogonal test was used to choose the Best Conditions of preparing the liposome of γ-linolenic acid. *Methods*: The best proportion of phospholipid and evening primrose oil is 0.2:0.1, dissolved in 20 ml chloroform and 40 ml phosphate buffer solution, ultrasonic treatment for 10min. *Results*: the γ-linolenic acid entrapment efficiency was more than 99% and the permeability is low. *Conclusion*: The method is simple, accurate and reliable and can be used for the new drug development and production.

【Key words】Liposome; γ-linolenic acid; Orthogonal test

月见草油(Evening primrose oil)是从柳叶菜科多年生草本植物月见草(Oenothera biennis L)的种子中提取得到的,月见草油中含有多种脂肪酸成分且多为人体必需脂肪酸,其主要有效成分为γ-亚麻酸(γ-linolenic acid,化学结构为顺-6,9,12-十八碳三烯酸),在体内可转变成花生四烯酸,为前列腺素及生物膜的构成提供前体。多年来,国内外学者对月见草油进行了大量的研究,现已证实它具有明显的抗炎、抗氧化、抗血栓、降血糖、降血脂、抗血小板聚集等药理作用,临床主要应用于糖尿病、高脂血症、动脉粥样硬化、冠心病、慢性肾功能不全等疾病的治疗,现已广泛应用于医疗、保健及食品工业等领域[1]。

脂质体(Liposome)系指将药物包封于类脂质双分子层内而形成的微型泡囊(Vesicle),也有人称脂质体为类脂小球或液晶微囊。类双分子层厚度约4 nm。药物制成脂质体后具有的主要特点有:①靶向性和淋巴定向性;②缓释性;③细胞亲合性与组织相容性;④降低药物毒性;⑤保护药物提高稳定性[2]。

γ-亚麻酸为多不饱和脂肪酸,不稳定易氧化,将其制成脂质体可增加其稳定性并提高其疗效,同时γ-亚麻酸和大豆卵磷脂均为东宝金丹中的有效成分,将二者制备成脂质体符合原处方的组方原则。γ-亚麻酸脂质体的制备在国内外尚未见有报道,本文对其制备工艺作了一点尝试。

作者介绍:赵跃刚(1973-),男,讲师,硕士,
研究方向:中药分析新方法新技术研究。
通讯作者:贡济宇,女,教授,E-mail:gjy0431@126.com。

1 脂质体的制备方法

1.1 注入法

将磷脂、胆固醇等类脂质和脂溶性药物共溶于有机溶剂中(一般多采用乙醚),然后将此药液经注射器缓缓注入加热至 50℃～60℃(并用磁力搅拌)的磷酸盐缓冲溶液(可含有水溶性药物)中,加完后,不断搅拌至乙醚除净为止,即制得脂质体,其粒径较大,不适宜静脉注射。再将脂质体混悬液通过高压乳匀机 2 次,则所得的成品,大多为单室脂质体,粒径绝大多数在 2 μm 以下。

1.2 薄膜分散法

将磷脂、胆固醇等类脂质和脂溶性药物共溶于氯仿(或其它有机溶剂)中,然后将氯仿溶液在玻璃瓶中旋转蒸发,使在烧瓶内壁上形成薄膜;将水溶性药物溶于磷酸缓冲盐液中,加入烧瓶中不断搅拌,即得脂质体。

1.3 超声分散法

将水溶性药物溶于磷酸缓冲液,加入磷脂、胆固醇与脂溶性药物共溶于有机溶剂的溶液, 搅拌蒸发除去有机溶剂,残液经超声波处理,然后分离出脂质体,再混悬于磷酸盐缓冲溶液中,制成脂质体混悬型注射剂。凡经超声波分散的脂质体混悬液,绝大部分为单室脂质体。

此外,脂质体的制备方法还有逆相蒸发法、冷冻干燥法、复乳法、熔融法、表面活性剂处理法、离心法、前体脂质体法和钙融合法等等[2],根据主要有效成分 γ－亚麻酸的性质和实验室现有条件,我们选择薄膜分散加超声分散的方法来制备 γ－亚麻酸脂质体。

2 γ-亚麻酸脂质体的制备方法

取尿素包合法富集得到的月见草油(γ-亚麻酸含量>50%)0.1 ml 和大豆精制卵磷脂 0.2 ml(0.1 g/ml),溶于 20 ml 的氯仿溶液中,置烧瓶中以 70 r/min 的转数,旋转蒸发 10 min,使磷脂和月见草油在烧瓶内壁上形成薄膜,倒入磷酸缓冲溶液 40 ml,超声处理 10 min,即得 γ-亚麻酸脂质体[3,4]。

3 脂质体制备工艺的考察

考察脂质体制备过程中如月见草油与大豆卵磷脂的比例、有机溶剂和缓冲溶液加入的体积、超声时间等因素的影响[5,6],以包封率为指标优选最佳的脂质体制备工艺条件,因素水平表见表 1,实验结果见表 2。

由正交实验结果和效应曲线(图 1)可知大豆磷脂和月见草油的比例对脂质体的包封率影响最大,缓冲溶液加入的体积和超声时间的影响次之,有机溶剂的体积影响最小。最佳制备工艺条件为 A3B1C2D2,即磷脂与月见草油的比例为 0.2:0.1 时,

表 1 γ-亚麻酸脂质体因素水平表 $L_9^{(3)}$

条件	磷脂:月见草油(v:v)	氯仿(v)	缓冲溶液(v)	超声时间
1 水平	0.1:0.1	10 ml	20 ml	5 min
2 水平	0.1:0.05	20 ml	40 ml	10 min
3 水平	0.2:0.1	30 ml	60 ml	15 min

表 2 γ-亚麻酸脂质体制备正交实验结果

因素	磷脂:月见草油(v:v)	氯仿(v)	超声时间(min)	缓冲溶液(v)	实验结果包封率(%)
实验 1	1	1	1	1	91
实验 2	1	2	2	2	98.38
实验 3	1	3	3	3	88.6
实验 4	2	1	2	3	57.65
实验 5	2	2	3	1	39.15
实验 6	2	3	1	2	56.5
实验 7	3	1	3	2	99.95
实验 8	3	2	1	3	95.59
实验 9	3	3	2	1	99.22
均值 1	92.660	82.880	81.030	76.457	
均值 2	51.100	77.707	85.083	84.957	
均值 3	98.267	81.440	75.913	80.613	
极差	47.167	5.173	9.170	8.500	

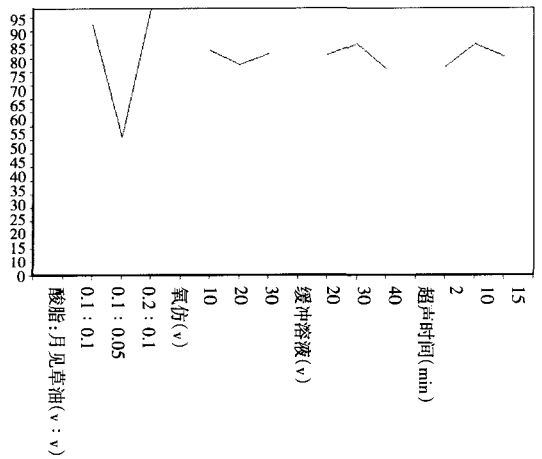


图 1　γ-亚麻酸脂质体制备的效应曲线

溶于 20 ml 氯仿，加入 40 ml 缓冲溶液，超声处理 10 min。

4　小结与讨论

利用磷脂均不溶于丙酮，卵磷脂与脑磷脂在乙醇中溶解度的差异，可以将二者初步分离，获得卵磷脂含量较高的大豆精制磷脂。采用溶剂法纯化大豆磷脂简单且操作方便，对资源丰富、价格低廉，来源于大豆油脚的大豆卵磷脂的纯化极为有利。该法既适合于实验室少量制备又适合于工业大量生产。通过薄层鉴别和扫描测定表明，以乙醇提取后再经丙酮洗涤得到的卵磷脂含量和收率均较高。根据 2005 版《药典》的要求，制备脂质体的原料磷脂需要进行氧化指数的测定，本实验制备的大豆精制卵磷脂氧化指数为 0.39 高于药典要求氧化指数小于 0.2 的要求，而市售两种大豆卵磷脂的氧化指数分别为 0.41 和 0.54 也均高于药典要求标准，分析其原因可能是由于磷脂在生产过程中温度过高所致。因此，药用磷脂在生产制备过程中应严格控制温度，可采用超临界流体萃取，真空干燥等手段进行提取和加工。

γ-亚麻酸为多不饱和脂肪酸、易氧化，为其应用带来诸多不便，脂溶性药物制备脂质体可以得到包封率较高的产品。将 γ-亚麻酸制备成脂质体在国内外尚未见有报道，本文以实验制得的大豆精制卵磷脂和尿素包合得到的月见草油为原料考察 γ-亚麻酸脂质体的制备条件和最佳工艺。由实验结果可知，制得的 γ-亚麻酸脂质体的包封率较高达 99%以上且渗透率较低，证明将 γ-亚麻酸制备成脂质体确实可行。本实验由于时间有限，对于 γ-亚麻酸脂质体的疗效和稳定性还有待于进一步加以考察。

以上实验内容的完成将为复方 γ-亚麻酸软胶囊的最终研制成功积累条件。

参　考　文　献

[1] 魏晓舒. 气相色谱内标法测定月见草油胶囊中 γ－亚麻酸的含量[J].现代应用药学，1996，13(1)：55-56.

[2] 路　萍，赖炳森，王映强，等.毛细管气相色谱内标法测定月见草种子油中 γ－亚麻酸的含量[J].中草药，1997，26(11)：658-660.

[3] 中国药典[S].化学工业出版社 2005 版.

[4] 李　鹃，周　震.两种月见草油脂肪酸成分的质谱分析[J].中成药，1996，18(2)：39-41.

[5] 顾　意，石　玉，张三奇，等.大黄素纳米脂质体的制备和质量评价[J].第四军医大学学报，2003，24(5)：479.

[6] 于波涛，张志荣，刘文胜.提高脂质体包封率的方法及其研究进展[J].中国医药工业杂志，2002，33(11)：564-568.

（责任编辑：冉明会）

欢迎投稿，欢迎订阅

《医学教育探索》

邮发代号 78-127