

苦杏仁苷脂质体制备的探究及包封率的测定

单红芳 李宏* 朱凯 张玉芬 慕娜娜

甘肃医学院

DOI:10.32629/fcmr.v8i2.20920

[摘要] 目的：以苦杏仁为原料提取苦杏仁苷,探究苦杏仁苷脂质体的制备并测定其包封率。方法：用95%乙醇直接进行脱脂回流提取,将提取出来的苦杏仁苷利用逆向蒸发法制备苦杏仁苷脂质体。结果：提取出的苦杏仁苷为白色结晶状粉末,制备的脂质体为淡黄色乳液。通过电子显微镜观察到苦杏仁苷脂质体的囊泡呈规则的球体,分布均匀。结论：此方法简便可行、成本较低、产品收率较高。通过单因素实验得到了苦杏仁苷脂质体的最优制备工艺条件即磷酸盐缓冲液 pH 值为 6.6,胆固醇和磷脂质量比为 1:3,苦杏仁苷与磷脂的质量比为 5%,此条件下脂质体的包封率为(53.470.72)%。

[关键词] 苦杏仁苷；脂质体；包封率

中图分类号：Q946.83+2 文献标识码：A

Study on preparation of Laetrile liposome and determination of encapsulation efficiency

Hongfang Shan Hong Li* Kai Zhu Yufen Zhang Nana Mu

Gansu Medical College

[Abstract] Objective:To extract laetrile from bitter apricot kernels, explore the preparation of laetrile liposome and determine its encapsulation efficiency. Methods: Laetrile liposome were prepared by reverse evaporation method after 95% ethanol directly degrease and circulation reflux extraction. Results:The extracted laetrile was white crystalline powder, and the prepared liposome was light yellow emulsion. The laetrile liposome vesicles were observed by electron microscopy as regular spheres with uniform distribution. Conclusion: This method is simple, feasible, cost-effective, and yields high product efficiency. Through single-factor experiments, the optimal preparation conditions for amarogentin liposomes were determined:a phosphate buffer pH of 6.6,a cholesterol-to-phospholipid mass ratio of 1:3,and an amarogentin-to-phospholipid mass ratio of 5%. Under these conditions, the encapsulation efficiency of the liposomes was (53.47±0.72)%.

[Key words] Laetrile; Liposome; The encapsulation rate

引言

苦杏仁苷属于氰苷类化合物,在苦杏仁中的含量大约为2.4 %^[1-2]。苦杏仁苷用于止咳定喘,血虚津枯,同时,作为一种很受欢迎的常规抗癌药物,苦杏仁苷有着抗动脉粥样硬化,免疫抑制,防癌抗癌功能^[3-5]。

脂质体的结构与人体生物膜相似,其选择性和靶向性均比较好,能有效地保护被包裹的药物,并且在临床上具有缓释、控释的特殊优势。由于脂质体往往是用于治疗药物的载体,故可以使药物靶向释放以减少对其他器官的生物毒性^[6]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器设备

表1 仪器设备

仪器	型号	厂家
鼓风干燥箱	DHG-9140A	山东博科科学仪器公司
紫外可见分光光度计	UV-5100	上海元析仪器有限公司
循环水式真空泵	SHB111	河北博汇仪器有限公司
多功能粉碎机	YB-800A	永康市速锋工贸有限公司
高速台式冷冻离心机	H-1650R	长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司
集热式磁力搅拌器	DF-101S	上海力辰邦西仪器科技有限公司
正置生物显微镜	UB203i	重庆澳浦光电技术有限公司

1.2实验试剂

表2 药品与试剂

药品与试剂	厂家
苦杏仁	西安中药饮片厂有限公司
乙醇	天津市天力化学试剂有限公司
石油醚	天津市富宇精细化工有限公司
吐温-80	天津市天力化学试剂有限公司
磷酸氢二钠	天津市天力化学试剂有限公司
胆固醇	上海山浦化工有限公司

2 实验方法

2.1以苦杏仁为原料提取苦杏仁苷

2.1.1前处理

因为苦杏仁中包含苦杏仁酶,在外界条件达到一定值时,苦杏仁苷可快速分解,故在提取之前进行灭酶处理可实现苦杏仁苷的酶失活和苷保存的效果,提高其提取率。当环境温度超过80℃时,苦杏仁酶就会失活,故可将苦杏仁平铺于烘箱中,高温灭酶2 h以上即可除去苦杏仁酶。

2.1.2脱脂处理

吴美兰等对石油醚脱脂与不脱脂对苦杏仁苷提取率和结晶的研究表明石油醚脱脂并不能明显提高苦杏仁苷提取率^[9]。故本文省去石油醚脱脂的步骤,采用95%乙醇直接脱脂提取。

2.1.3提取条件

总液料比 10 mL/g,总时间 75 min,提取 2 次,即第一次 5.5 mL/g,45 min;第二次 4.5 mL/g,30 min。采用 95%乙醇提取后,回收溶剂至料液的 1.5 倍静止 24h 直接析晶。

2.1.4纯化方法

由于苦杏仁苷在热乙醇中的溶解度大于在冷乙醇中的溶解度,故将苦杏仁苷离心后加入20倍无水沸乙醇中进行重结晶^[7]。

2.1.5工艺流程

苦杏仁先灭酶、粉碎,粉末用95%的乙醇提取,回收提取液中的溶剂并静置结晶,得苦杏仁苷粗品,再用石油醚洗涤、重结晶,最后得苦杏仁苷精品。

2.2苦杏仁苷的理化鉴别

2.2.1三硝基苯酚试纸的制作

将剪成条状的滤纸浸入饱和水溶液(三硝基苯酚)中,浸透后取出,阴干。临用时,于碳酸钠溶液中(1→10)中均匀润湿。

2.2.2理化鉴别操作

取少许苦杏仁苷于试管中加稀酸水解两小时,将制作好的三硝基苯酚试纸提前放置在试管口,管口用软木塞塞紧,40℃水浴两小时,观察试纸颜色变化。

2.3苦杏仁苷脂质体的制备

2.3.1制备工艺

氯仿溶解大豆卵磷脂和胆固醇,PBS溶解苦杏仁苷,然后将以上溶液混合并超声,经减压浓缩除去有机溶剂,再在水和作用下加入含一定量吐温80的PBS,于4℃下储存。

2.3.2苦杏仁苷脂质体包封率的测定

精密量取未离心的苦杏仁苷脂质体2 mL,加入到4 mL的甲醇中超声破乳5 min。同时移取一定量的苦杏仁苷脂质体溶液于离心管中,4000 r/min离心15 min,分别将1 mL的上清液和破乳样品加入到100 mL容量瓶内,并用甲醇定容,利用0.45 μm滤膜过滤后采用紫外分光光度法于263 nm处分别测定破乳样品和上清液的吸光度,计算苦杏仁苷的浓度^[8],苦杏仁苷脂质体的包封率计算公式如下:

$$\text{包封率} = \frac{C_{\text{总}} - C_{\text{上清}}}{C_{\text{总}}} \times 100\%$$

其中: $C_{\text{总}}$ 为破乳后脂质体中苦杏仁苷的总浓度(mg/mL), $C_{\text{上清}}$ 为上清液中测得的药物浓度(mg/mL)。

2.3.3苦杏仁苷脂质体的微观形貌

用胶头滴管吸取一滴所制得的苦杏仁苷脂质体,滴于载玻片上,盖上盖玻片,利用光学显微镜在40倍镜下观察其形态。

3 结果与分析

3.1实验结果

3.1.1苦杏仁苷的鉴别现象

苦杏仁苷水解后产生的苯甲醛使三硝基苯酚试纸由黄色变为砖红色。

3.1.2苦杏仁苷标准曲线的绘制

依次定量称取2、4、6、8、10 mg的苦杏仁苷标准品,放入10 mL容量瓶中定容,摇匀后静止。几分钟后取上述配制好的苦杏仁苷溶液测定其吸光度,最大吸收波长为263 nm^[9]。以苦杏仁苷浓度为横坐标(x),吸光度值为纵坐标(y),得到苦杏仁苷的标准曲线方程为: $y = 0.5405x + 0.1775$, $R^2 = 0.9979$ 。

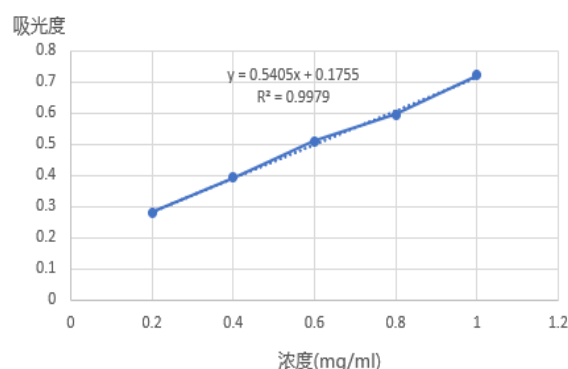


图1 苦杏仁苷标准曲线

3.1.3单因素实验

(1) PBS的pH值对脂质体包封率的影响。以其他因素为定值,分别依次制备PBS的pH值为6.2、6.6、7.0和7.4的苦杏仁苷脂

质体, 观察pH值对包封率的影响。由图5可知, pH值由6.2增加到6.6, 包封率由25.33%增加到54.18%, 当pH7.0时, 包封率持续降低。

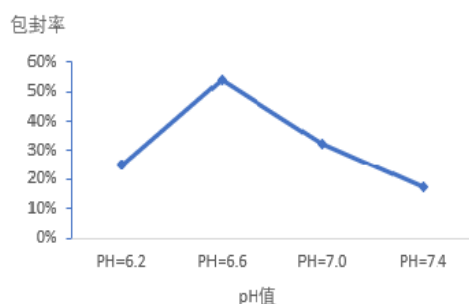


图2 pH值对脂质体包封率的影响

(2) 磷脂与胆固醇质量比对脂质体包封率的影响。以其他因素为定值, 分别依次制备脂胆比为2:1、3:1、4:1和5:1的苦杏仁苷脂质体, 观察脂胆比对包封率的影响。由图6可知, 包封率随着脂胆比的增加, 呈现先增大后减小的趋势, 当脂胆比为3:1时, 包封率达到最大值50.06%。

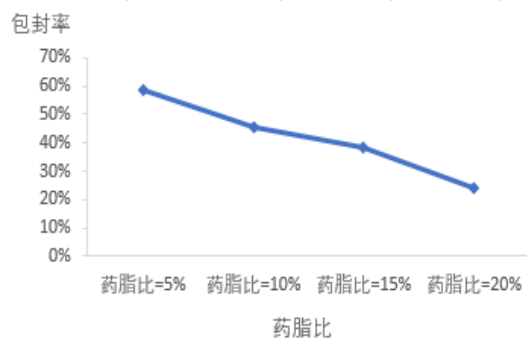


图3 脂胆比对包封率的影响

(3) 苦杏仁苷与磷脂质量比对脂质体包封率的影响。保持其他条件一致, 分别考察苦杏仁苷与磷脂质量比为5%、10%、15%和20%时, 对苦杏仁苷脂质体包封率的影响。由图8可知, 包封率随着药脂比的增大呈下滑趋势, 当药脂比为5%时, 测得的苦杏仁苷脂质体的包封率最大, 为58.55%。

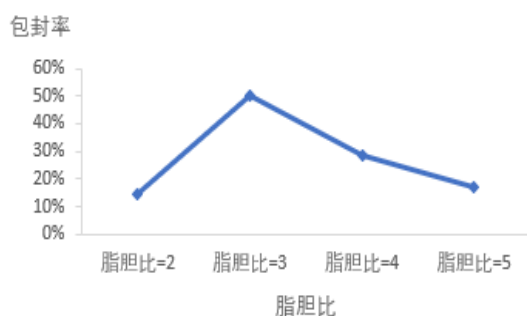


图4 药脂比对包封率的影响

3.1.4 微观形貌观察

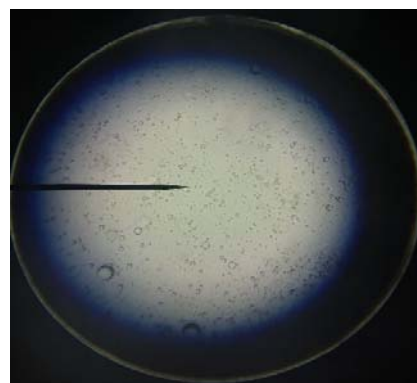
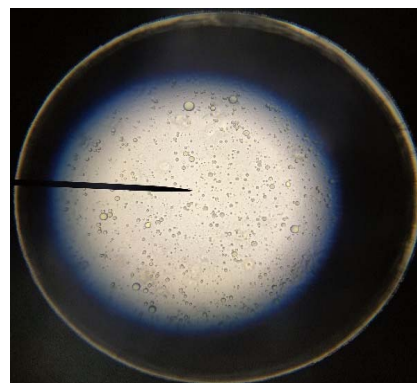


图5 苦杏仁苷脂质体的显微图

3.2 实验分析

磷酸盐缓冲液的pH为6.6时, 测定的包封率最大。这可能是因为当pH值接近中性时, 磷脂水解的速率减小, 对脂质体系统的稳定性有益。因此, 在pH值为6.6时, 脂质膜的渗漏率最低, 包封率最大, 可达54.18%。

磷脂与胆固醇质量比为3:1时, 包封率较大。这种现象可能是由于胆固醇为两性分子, 能镶入膜内, 当胆固醇在磷脂双分子层膜所占的摩尔比约为50%时, 可改变膜流动性, 提高了稳定性^[10]。

当药脂比为5%时, 其包封率最大。这表明脂质体在芯材的包埋中具有饱和性, 随着芯材的加入量增加, 其包封率呈减小趋势。

4 结论

苦杏仁生活常见, 且苦杏仁苷的含量较多, 以苦杏仁为原料, 用95%乙醇直接脱脂回流提取, 此法简便可行、成本较低、提取率较高。经过鉴别: 产品为白色结晶状粉末, 符合苦杏仁苷的性状特征, 此外进行理化鉴别, 苦杏仁苷水解产生的苯甲醛具有特殊的苦杏仁气味, 可用于鉴别, 另外苯甲醛可使三硝基苯酚试纸显砖红色。将提取得到的苦杏仁苷用逆向蒸发法制备成苦杏仁苷脂质体, 通过单因素实验, 得最优方案。最后, 苦杏仁苷脂质体在显微镜分布均匀, 且没有彩色斑块、晶体等异物。

[基金项目]

(1) 项目名称: 2025年高校教师创新基金项目(项目编号: 2

025B-267)。(2)项目名称: 甘肃医学院2024年校级教学质量提高工程建设项目(项目编号: GYJG2024S0001、GYJG2024P0009)。

[参考文献]

- [1]游洁,杏仁的研究概况[J].中国医药指南,2014,12(33):65-66.
- [2]聂鲁,丁永萍,程春萍.苦杏仁苷的研究进展[J].阴山学刊(自然科学),2012,26(04):27-30.
- [3]史佳民,范理宏.苦杏仁苷抗肿瘤机制的研究进展[J].生命的化学,2019,39(1):147-152.
- [4]常军,肖依文,吴文婷,苦杏仁苷抗肿瘤机理研究进展[J].药物生物技术,2014,21(6):115-117.
- [5]段帅,吴晓彤,李博.苦杏仁苷的结构及其降解过程的研究进展[J].食品科技,2020,45(09):233-237.
- [6]SunH Y,Cacciarelli T V,Singh N.Micafungin Versus Amphotericin B Lipid Complex for the Prevention of Invasive Fungal Infections in High-Risk Liver Transplant Recipients[J].Transplantation,2013,96(6):573-578.

[7]吴美兰.苦杏仁苷提取精制工艺研究[C].浙江工业大学,2016.

[8]刘忠洪,张梨,王丽娟,等.肺靶向多西他赛脂质体的封装率测定方法研究[J].基因组学与应用生物学,2018,37(5):2276-2281.

[9]杨志欣,王海威,张文君,等.苦参总黄酮含量测定方法的优化[J].中成药,2017,39(5):946-951.

[10]刘瑞霞,潘丽,丁冬有.苦杏仁苷脂质体的制备及特性研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2020,41(05):57-63+78.

作者简介:

单红芳(1982--),女,汉族,甘肃平凉人,本科,讲师,研究方向:药物制剂。

*通讯作者:

李宏(1983--),男,汉族,甘肃平凉人,本科,讲师,研究方向:药事管理与市场营销。