

响应面分析法优化蜂胶黄酮脂质体制备工艺

袁 菊, 张亚宁, 范云鹏, 胡元亮, 王远垒, 赵晓娟, 王德云*
(南京农业大学中兽医学研究室, 江苏 南京 210095)

摘 要: 目的: 优选蜂胶黄酮脂质体制备的最佳条件。方法: 采用乙醇注入法制备蜂胶黄酮脂质体, 在单因素试验基础上, 以脂药比、膜材比、注入速度为影响因素, 包封率为响应值, 利用Box-Behnken试验设计原理, 采用3因素3水平的响应面分析法, 对蜂胶黄酮脂质体制备工艺进行优化。结果: 蜂胶黄酮脂质体的最佳制备条件为脂药比9.6:1、膜材比8.5:1、注入速度0.8mL/min。结论: 采用最佳条件制备的蜂胶黄酮脂质体包封率较高, 验证实验测得蜂胶黄酮脂质体的包封率为91.67%, 与模型预测值相对误差为0.086%, 重现性好。

关键词: 响应面分析; 蜂胶黄酮脂质体; 包封率; 乙醇注入法; 脂药比

Optimization of Preparation Conditions for Propolis Derived Flavonoid Liposomes by Response Surface Methodology

YUAN Ju, ZHANG Ya-ning, FAN Yun-peng, HU Yuan-liang, WANG Yuan-lei, ZHAO Xiao-juan, WANG De-yun*
(Institute of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Objective: To optimize conditions for the preparation of propolis derived flavonoid (PF) liposome. Methods: PF liposomes were prepared by ethanol injection method. One-factor-at-a-time design was used to investigate the effects of five process parameters on encapsulation efficiency. Three main process parameters that influence encapsulation efficiency including lecithin/PF mass ratio, lecithin/cholesterol mass ratio and injection speed were optimized by response surface analysis based on a three-variable, three-level Box-Behnken experimental design. Results: The optimal conditions for preparing PF liposomes were determined as 9.6:1 of lecithin/PF mass ratio, 8.5:1 of lecithin/cholesterol mass ratio and 0.8 mL/min of injection speed. Conclusion: Under these conditions, the actual encapsulation efficiency of PF liposomes was 91.67%, which showed a relative error of 0.086% when compared with the predictive value.

Key words: response surface methodology; propolis derived flavonoid liposome; encapsulation efficiency; ethanol injection method; lecithin/PF mass ratio

中图分类号: S853.74

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)20-0001-06

蜂胶黄酮(propolis flavone, PF)是蜂胶中所含的主要有效成分之一, 具有抗氧化、抗病原微生物、抗炎、抗感染、抗过敏、抗肿瘤和增强免疫功能等广泛的生物学功能和药理学作用^[1-3]。黄酮自身并不稳定, 黄酮类化合物的抗氧化作用主要是通过自身的优先氧化来避免其他成分被氧化实现的^[4], 而蜂胶黄酮的不稳定性又在很大程度上影响着蜂胶提取物的贮藏、使用和其功效的发挥。为了更好地开发利用蜂胶的药理作用, 对蜂胶新剂型的研究逐渐成为热点。近年研究表明, 将药物制成脂质体可有效地提高它在体内的吸收, 显著改善其生物有效性^[5-6]。脂质体是一种新型的靶向制剂^[7], 具有无毒、无免疫原性、缓释、可降解等优点, 对脂溶性药物包封性良好^[8], 是蜂胶黄酮的一种很好的载体。本研究用响应面试验法对蜂胶黄酮

脂质体的制备条件进行优选, 以包封率为指标, 筛选出蜂胶黄酮脂质体的最佳制备工艺, 旨在提高蜂胶黄酮的功效。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

蜂胶 南京某蜂场。

大豆卵磷脂(批号1006S04) 上海太伟磷脂有限公司; 胆固醇(批号20090908) 天津市博迪化学有限公司; 鱼精蛋白(批号 P4380) 美国Sigma公司; Triton-100 生化级(批号9002-93-1) 上海源叶生物科技有限公司; 无水乙醇、乙酸乙酯、盐酸(均为分析纯) 上海试

收稿日期: 2011-07-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(30901085); “十一五”国家科技支撑计划项目(2008BADB4B06)

作者简介: 袁菊(1985—), 女, 硕士研究生, 主要从事兽医中药学与中药药理学研究。E-mail: 2010807152@njau.edu.cn

*通信作者: 王德云(1979—), 女, 副教授, 博士, 主要从事中兽医学研究。E-mail: dywang@njau.edu.cn

剂一厂。

恒温水浴振荡器 国华企业有限公司；754紫外-可见分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司；SB3200超声波清洗器 上海新芝生物技术研究所以；BS110S型电子天平 德国Sartorius公司。

1.2 蜂胶黄酮的制备

PF用酸碱沉淀法提取^[9]。称取蜂胶100g，用500mL 95%乙醇溶液浸泡，过滤，取滤液，滴加饱和氢氧化钙溶液调节pH值至8，过滤，取滤液，立即加入2mol/L盐酸调节pH值至2，在水浴上加热，挥发至无醇味，用适量乙酸乙酯萃取处理3次，每次用100mL，合并萃取液，减压回收乙酸乙酯，蒸发即得PF，用芦丁法^[10]测得净含量为26.8%。

1.3 脂质体制备工艺影响因素考察

1.3.1 膜材比对脂质体包封率的影响

在固定脂药比为10:1，注入速度为1.2mL/min，缓冲液PBS的温度45℃，水浴超声时间10min条件下，依次改变卵磷脂和胆固醇的质量比(膜材比)分别为4:1、6:1、8:1、10:1、12:1时制备脂质体，测脂质体的包封率。

1.3.2 脂药比对脂质体包封率的影响

在膜材比为8:1，其他因素同1.3.1节条件，依次改变卵磷脂的质量与蜂胶黄酮质量比(脂药比)分别为5:1、10:1、15:1、20:1、25:1时制备脂质体，测脂质体的包封率。

1.3.3 注入速度对脂质体包封率的影响

在膜材比为8:1，其他因素同1.3.1节条件，依次改变注入速度分别为0.3、0.6、1.2、2.4、4.8mL/min，测脂质体的包封率。

1.3.4 缓冲液PBS温度对脂质体包封率的影响

在注入速度0.6mL/min，其他因素同1.3.3节条件，依次改变缓冲液PBS的温度分别为30、35、40、45、50℃，测脂质体的包封率。

1.3.5 超声时间对脂质体包封率的影响

在温度40℃，其他因素同1.3.4节条件，对脂质体进行水浴超声时依次改变超声时间分别为0、10、20、30、40min时制备脂质体，测脂质体包封率。

1.4 响应面试验设计

表1 蜂胶黄酮脂质体制备工艺响应面试验设计因素及水平

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

水平	因素		
	A 脂药比	B 膜材比	C 注入速度/(mL/min)
-1	5:1	6:1	0.3
0	10:1	8:1	0.6
1	15:1	10:1	1.2

在单一因素考察的基础上，确定影响蜂胶黄酮脂质体包封率的3个主要影响因素，即脂药比、膜材比、注入速度3个因素，以此3个因素为自变量，每个因素选择3个水平，以脂质体包封率为响应值，根据Box-Behnken试验设计原理，采用响应面法优化设计，试验设计见表1。

1.5 蜂胶黄酮脂质体的制备

按一定比例称取卵磷脂(400mg)、胆固醇和蜂胶黄酮，溶于10mL的无水乙醇中使其溶解。匀速注入到40℃缓冲液PBS 20mL(0.01mol/L)中，继续恒温搅拌，除去有机溶剂直至无乙醇味为止，水浴超声20min，依次过0.80、0.45μm和0.22μm的微孔滤膜各1次，即得到蜂胶脂质体溶液，置冰箱4℃保存。

1.6 蜂胶黄酮脂质体包封率

1.6.1 芦丁标准液

精密称取干燥至质量恒定的芦丁标准品14mg加60%乙醇溶液溶解后定容至50mL，配成0.28mg/mL的溶液。

1.6.2 标准曲线的制作^[10]

精密吸取芦丁标准液0.0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25mL分别置于25mL容量瓶中，各加0.1mol/L的AlCl₃溶液1mL，再加60%乙醇溶液至刻度，摇匀，反应20min，以不加芦丁标准品液管为空白，与415nm波长处测定吸光度。以芦丁标准液浓度为横坐标(X)、吸光度为纵坐标(Y)，绘制标准曲线。回归方程为： $Y=28.034X-0.0068$ ， $R^2=0.9991$ 。

1.6.3 包封率的测定^[11]

吸取0.8mL脂质体于10mL锥形离心管中，加入0.8mL鱼精蛋白(10mg/mL)搅匀。静置3min，加入3mL生理盐水，在室温条件下离心30min(3000r/min)。上清液以生理盐水定容至10mL，取5mL此溶液，按上述芦丁标准法测定其吸光度，代入标准回归方程计算得黄酮含量，即游离药物量。沉淀以3mL 10% Triton-100溶解，并补充生理盐水至10mL。取5mL此溶液，按上述芦丁标准法测定其吸光度，代入标准回归方程计算得黄酮含量，即包埋药物量。脂质体包封率按照下列公式计算：

$$EN/\%=(1-C_f)/C_{总} \times 100$$

式中：EN为脂质体包封率； C_f 为游离黄酮含量； $C_{总}$ 为脂质体悬液中包封黄酮量与游离黄酮量之和。

1.7 验证实验

根据优化后的最佳工艺，重新制备3批PF脂质体，对包封率进行测定，观察试验结果与模型符合情况。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 膜材比的影响

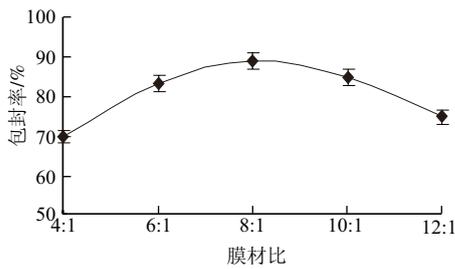


图1 膜材比对脂质体包封率的影响

Fig.1 Effect of lecithin/cholesterol mass ratio on the encapsulation efficiency of PF liposomes

由图1可以看出,膜材比对包封率的影响程度较大,脂质体包封率随着膜材比的增大而增加,当卵磷脂与胆固醇的质量比为8:1时,脂质体的包封率最高。

2.1.2 脂药比对脂质体包封率的影响

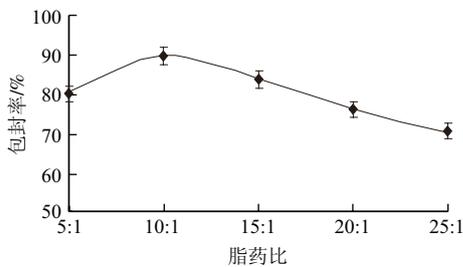


图2 脂药比对脂质体包封率的影响

Fig.2 Effect of lecithin/PF mass ratio on the encapsulation efficiency of PF liposomes

由图2可以看出,脂药比对包封率的影响程度较大,脂质体包封率随着脂药比的增大而增加,当卵磷脂与药物质量比10:1时,脂质体的包封率最高。

2.1.3 注入速度的影响

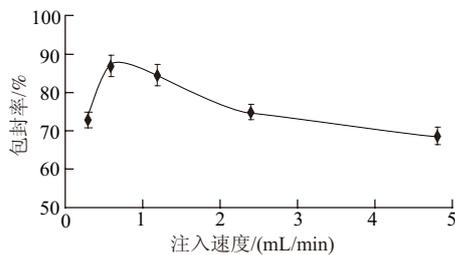


图3 注入速度对脂质体包封率的影响

Fig.3 Effect of injection speed on the encapsulation efficiency of PF liposomes

由图3可以看出,注入速度对包封率的影响程度较大,当注入速度为0.6mL/min时,脂质体的包封率最高。

2.1.4 缓冲液PBS的温度的影响

图4表明,随着温度的升高包封率略有增加,可认为缓冲液温度对包封率的影响程度较小。从节能和方便实验操作的角度考虑,将缓冲液温度控制在40℃。

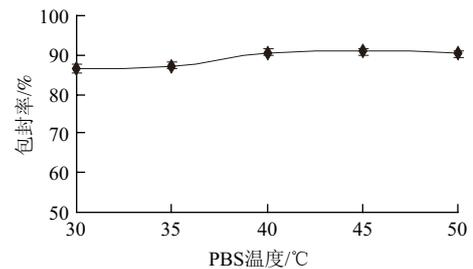


图4 缓冲液PBS温度对脂质体包封率的影响

Fig.4 Effect of PBS temperature on the encapsulation efficiency of PF liposomes

2.1.5 超声时间对脂质体包封率的影响

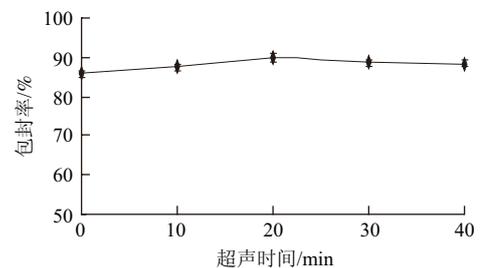


图5 超声时间对脂质体包封率的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic treatment time on the encapsulation efficiency of PF liposomes

图5表明,水浴超声时脂质体包封率略有增加,但随着超声时间的延长包封率并没有明显的提高,可认为超声时间对包封率的影响程度较小,最后选择超声时间为20min。

2.2 响应面实验

表2 Box-Behnken试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design arrangement and corresponding results

编号	A	B	C	包封率/%
1	-1	0	-1	76.00
2	-1	1	0	82.60
3	1	-1	0	76.90
4	1	0	1	72.10
5	0	1	1	82.04
6	1	1	0	80.15
7	0	-1	-1	76.40
8	1	0	-1	78.25
9	0	-1	1	77.00
10	0	0	0	92.60
11	0	0	0	90.78
12	0	1	-1	80.02
13	0	0	0	91.00
14	0	0	0	91.54
15	-1	-1	0	76.80
16	0	0	0	90.58
17	-1	0	1	79.30

17次试验结果见表2。对试验结果进行响应面分析,经

过二次回归拟合后,得到蜂胶黄酮脂质体的包封率对脂药比(A)、膜材比(B)、注入速度(C)的二次多项回归方程为:
 $Y=91.30-0.91A+2.21B-0.029C-0.64AB-2.36AC+0.36BC-7.32A^2-4.87B^2-7.57C^2$ 。

利用Design Expert 7.0软件对表2结果进行多元线性回归拟合,对模型进行方差分析,结果见表3,由表3可知,模型 $P<0.0001$,表示模型极显著,说明该模型成立,本实验方法可靠。失拟项 $P=0.2150>0.05$,不显著,表明回归方程无失拟因素存在,回归方程拟合较好。进一步说明在试验范围内可以用来解释和预测试验结果。模型中A对PF脂质体包封率影响显著,B、AC、 A^2 、 B^2 、 C^2 对PF脂质体包封率的影响极显著。同时,根据F值大小可推知,膜材比对PF脂质体包封率的影响最大,其次为脂药比和注入速度,即膜材比>脂药比>注入速度。

表3 响应面方差分析

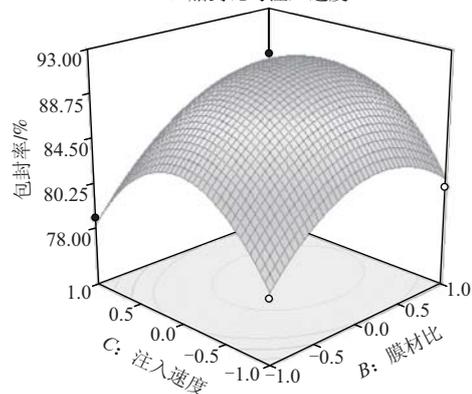
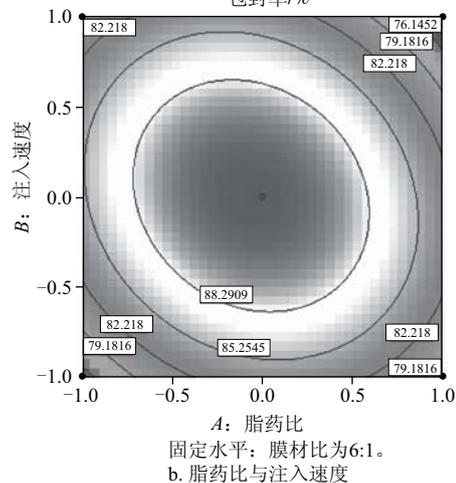
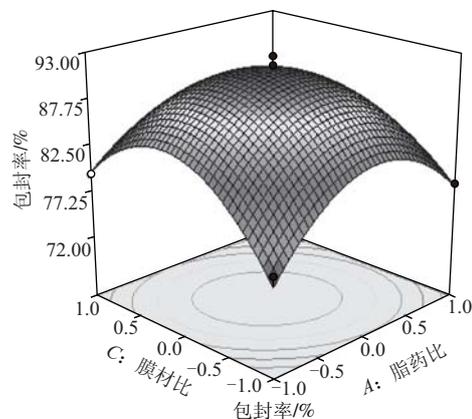
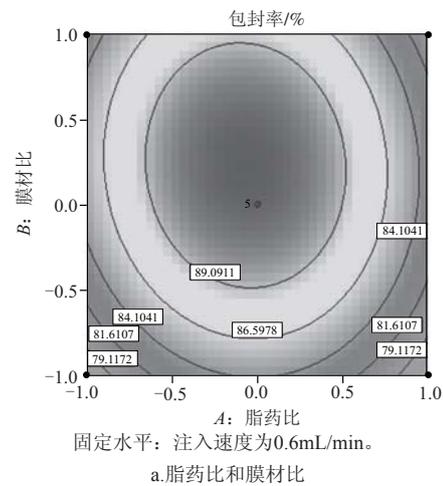
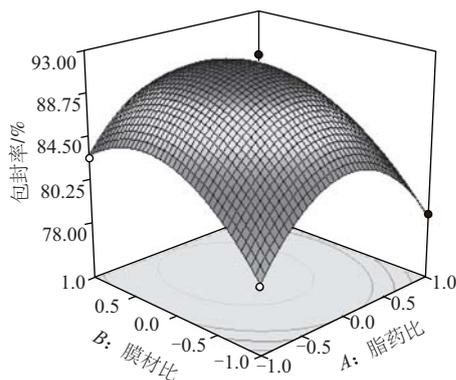
Table 3 Analysis of variance for the fitted mathematical model

方差来源	平方和	df	均方	F值	P值	显著性
模型	700.32	9	77.81	75.33	<0.0001	**
A	6.66	1	6.66	6.45	0.0387	*
B	39.21	1	39.21	37.96	0.0005	**
C	6.612×10^{-3}	1	6.612×10^{-3}	6.402×10^{-3}	0.9385	
AB	1.63	1	1.63	1.57	0.2499	
AC	22.33	1	22.33	21.61	0.0023	**
BC	0.50	1	0.50	0.49	0.5073	
A^2	225.61	1	225.61	218.42	<0.0001	**
B^2	99.76	1	99.76	96.58	<0.0001	**
C^2	241.12	1	241.12	233.44	<0.0001	**
残差	7.23	7	1.03			
失拟度	4.60	3	1.53	2.34	0.2150	
纯误差	2.63	4	0.66			
总离差	707.55	16				

$R^2=0.9898$ $R^2_{Adj}=0.9766$

注: * 影响显著, $P < 0.05$; ** 影响极显著, $P < 0.01$ 。

2.3 响应面工艺优化分析



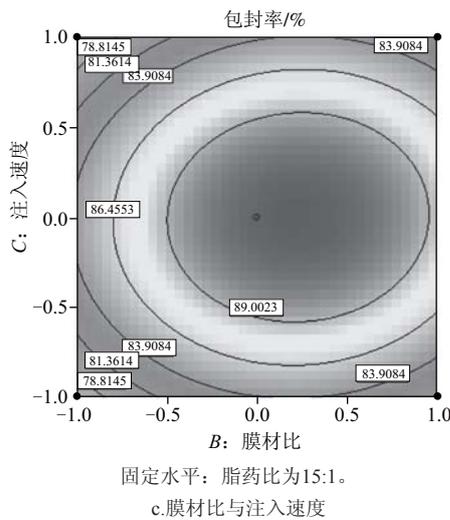


图6 两因素对蜂胶黄酮脂质体包封率影响的响应面与等高线
 Fig.6 Response surface and contour plots showing the effects of three process parameters on the encapsulation efficiency of PF liposomes

利用Design-Expert软件可以做出两两自变量为坐标的3D图和等高线图(图6), 这些图除了可以直观地反映每个变量对响应量的影响程度外, 还能很好地揭示因素之间的交互作用。

脂药比与膜材比的响应曲面和等高线(图6a), 该图反映脂药比和膜材比, 以及两者的交互作用对蜂胶黄酮脂质体包封率的影响。当注入速度在最佳值时, 随着脂药比的增大, 蜂胶黄酮脂质体包封率先增大后减小。随着膜材比的增大, 包封率也是先增大后减小。可以确定最佳水平范围即9.7:1~10.2:1, 膜材比为8:1~9:1。脂药比与注入速度的响应曲面和等高线(图6b), 该图反映脂药比和注入速度, 以及两者的交互作用对蜂胶脂质体包封率的影响。当膜材比在最佳值时, 随着脂药比的增大, 蜂胶黄酮脂质体包封率先增大后减小。随着注入速度的增大, 包封率也是先增大后减小。可以确定最佳水平范围即脂药比为9.5:1~10:1, 注入速度为0.6~0.9mL/min。膜材比与注入速度的响应曲面和等高线(图6c), 该图反映膜材比和注入速度因素, 以及两者的交互作用对蜂胶黄酮脂质体包封率的影响。当脂药比在最佳值时, 随着膜材比的增大, 蜂胶黄酮脂质体包封率先增大后减小。随着注入速度的增大, 包封率也是先增大后减小。可以确定最佳水平范围即膜材比为8.3:1~8.7:1, 注入速度为0.6~0.9mL/min。

2.4 条件的优化与验证

通过响应面交互作用分析, 优化的脂质体制备条件为脂药比9.620:1, 膜材比8.460:1, 注入速度0.757mL/min, 在此条件下制备的蜂胶黄酮脂质体的包封率为91.5917%。为了操作方便, 最佳条件变为脂药比9.6:1, 膜材比8.5:1, 注入速度0.8mL/min, 按照最佳工艺条件制备的3批蜂胶黄酮脂质体, 测得3批脂质体的包封率依次

为91.98%、91.76%和91.28%, 平均包封率为91.67%, 与理论预测值相对误差为0.086%。说明该回归方程与实际情况拟合较好, 表明用响应面法对蜂胶黄酮脂质体制备的研究是合理可行的。

3 讨论及结论

药物包封率是指包裹在脂质体囊中药量占脂质体混悬液中药物总量的比例, 是衡量脂质体制剂质量好坏的重要指标之一^[12], 也是其能否发挥较普遍制剂高效低毒作用的关键。因此选用蜂胶黄酮脂质体的包封率作为优化其制备工艺的响应值。

目前制备蜂胶黄酮脂质体的方法主要有薄膜超声法、乙醇注入法和逆向蒸发法, 钙融合法。同本研究采用的方法相比, 逆向蒸发法在制备脂质体的过程中, 减压蒸发至胶状以及第2次减压蒸发至成脂质体悬液反应终点难以确定, 所制得的脂质体质量较差; 另外, 此法适用于包裹水溶性药物, 蜂胶不属于水溶性药物, 故不选择这种方法。薄膜超声法制备脂质体时, 旋转蒸发过程中不易在瓶底形成均匀的薄膜, 会导致脂质体的粒径很不均一。钙融合法利用由酸性磷脂组成的小囊泡, 在钙存在条件下聚集、相继融合成脂质体。钙融合法^[13]的优点是脂质和所包裹的材料不直接与有害的化学物质或物理条件接触, 主要缺点是需要酸性磷脂, 这样会造成脂质体内不可避免存在微量钙^[14]。

本研究以乙醇注入法制备蜂胶黄酮脂质体, 并以响应面设计法进行优化, 最佳提取条件为脂药比9.6:1、膜材比8.5:1、注入速度0.8mL/min, 在此条件下制备的蜂胶黄酮脂质体的包封率为91.67%, 同其他方法比较, 此方法所用, 成本低, 适于工业化生产。响应面法^[15]克服了正交设计只能处理离散的水平值, 只能精确到某一个具体的水平点, 而无法找出整个区域上因素的最佳组合和响应值的最优值的缺陷。本试验根据Box-Behnken设计法及响应面分析法, 利用Design Expert 7.0软件, 对蜂胶黄酮脂质体的制备工艺进行优化, 通过对制备条件影响因素的3D图、等高线图及多元线性回归拟合, 对模型进行方差分析, 可以综合得出每个因素对脂质体包封率影响的最佳组合及响应面的最优值, 表明乙醇注入法制备蜂胶黄酮脂质体真实可信。

参考文献:

[1] 徐颖, 雷明吉, 程诚. 蜂胶与蜂胶黄酮[J]. 食品工业, 2005(3): 18-20.
 [2] HAVSTEEN B H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids[J]. Pharmacology and Therapeutics, 2002, 96(2/3): 67-202.
 [3] CASTRO S L. Propolis: biological and pharmacological activities. therapeutic uses of this bee-product[J]. An Review Biol Sci, 2001, 3(2): 49-83.

- [4] 张秀喜. 蜂胶黄酮的提取及提取物的抑菌, 抗氧化活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2009: 1-10.
- [5] CHEN Ying, PING Qineng. Nanoparticles for oral drug delivery[J]. Prog Pharmaceut Sci, 2004, 28(10): 451-455.
- [6] FLORENCE D. Evaluation of nano-and microparticle uptake by the gastrointestinal tract[J]. Advanced Drug Delivery Rev, 1998, 34(2/3): 221-233.
- [7] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 14.
- [8] 王汝兴, 张宇丽. 脂质体的研究进展及其制备方法[J]. 承德医学院学报, 2008, 25(2): 183-185.
- [9] 黄文诚. 蜂胶化学成分和生物活性[J]. 蜜蜂杂志, 1998(7): 12-14.
- [10] 王德云. 中药成分的免疫增强作用和机理及新型免疫增强剂的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [11] GUNTER K K, GUNTER T E, JARKOWSKI A, et al. A method of resuspending small vesicles separated from suspension by protamine aggregation and centrifugation[J]. Anal Biochem, 1982, 120(11): 113-124.
- [12] 李唐棣, 郝丽梅, 梅兴国. 脂质体包封率的研究进展[J]. 国外医学: 药学分册, 2006, 33(3): 224-227.
- [13] 石丽萍, 颜光涛, 张凯, 等. 酸敏脂质体的制备及其生物学活性[J]. 中国药物与临床, 2003, 3(4): 310-312.
- [14] 王林. 脂质体制备方法的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2010, 25(5): 2-5.
- [15] 王兰, 赵麟. 响应面分析法优化柿叶总黄酮提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(3): 1370-1373.

中国学术期刊网络出版总库 (CNKI数据库) 收录
万方数据库收录 中国核心期刊 (遴选) 数据库收录
中国农业机械化科学研究院主管 北京卓众出版有限公司主办

ISSN 2095-1795
CN 11-6025/S

卓众出版
Prominion Publishing

农业工程

AGRICULTURAL ENGINEERING



跟踪前沿研究 关注行业发展 报道创新成果 促进推广应用

主要栏目

综述与评析 · 装备与机械化 · 信息与电气化

生物环境与能源 · 农副产品加工与贮藏 · 食品科学与工程 · 水土工程 · 土地资源管理

设计制造及理论研究 · 教学研究 · 农学与生物技术 · 农业经济管理 · 国外研究 · 专著点评 · 企业风采

2013 年月刊 · 全年240元 欢迎投稿 欢迎订阅 欢迎刊登广告

地址: 北京德外北沙滩1号16信箱
博客: blog.sina.com.cn/d1ae

邮编: 100083

电话: 010-64882380 / 3625 / 3812 / 3384

传真: 010-64882329、64870803

微博: weibo.com/d1ae

电邮: nycg_2011@163.com nycg_2011@sina.com

www.d1ae.com