

# 抗氧化肽纳米柔性脂质体的制备及配方优化研究

牛 瑞<sup>1,2</sup> 孙 谧<sup>2</sup> 于建生<sup>1</sup> 郑 媛<sup>2</sup> 王海英<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>青岛科技大学化工学院, 266042)

(<sup>2</sup>中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 以扇贝裙边抗氧化肽为研究对象, 制备纳米柔性脂质体, 考察其主要影响因素。采用薄膜-超声分散法, 以包封率为指标, 分别考察卵磷脂与胆固醇的质量比、不同温度、不同样品浓度、不同 pH 值、不同转速、不同超声时间等对脂质体的影响, 在此基础上采用  $L_9(3^4)$  正交设计对条件进行优化。制得的纳米脂质体为单室脂质体, 平均粒径为  $255 \pm 60$  nm, 包封率为  $58.39\% \pm 0.34\%$ ,  $4^\circ\text{C}$  下粒径稳定性无明显变化。因此, 抗氧化肽脂质体包封率和稳定性较高, 重现性好。

**关键词** 抗氧化肽 脂质体 包封率

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2011)02-0089-07

## Formulation optimization of antioxidant peptide ultraflexible nano-liposome preparation

NIU Rui<sup>1,2</sup> SUN Mi<sup>2</sup> YU Jian-sheng<sup>1</sup> ZHENG Yuan<sup>2</sup> WANG Hai-ying<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, 266042)

(<sup>2</sup> Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, 266071)

**ABSTRACT** The antioxidant peptide ultraflexible nano-liposomes were prepared by using the thin-film dispersion method. The effects of some factors on the encapsulation efficiency, including the ratio of lecithin to cholesterol, temperature, concentration of the antioxidant peptide, rotation speed, pH, and ultrasonic emulsification time, were studied. The formulation was optimized by  $L_9(3^4)$  orthogonal design. The ultraflexible nano-liposomes were mostly unilamellar vesicles and their mean particle size was  $255 \pm 60$  nm. The optimum entrapment efficiency was  $58.39\% \pm 0.34\%$ . The antioxidant peptide liposome was stable at  $4^\circ\text{C}$ . Therefore, the antioxidant peptide ultraflexible nano-liposomes possess high encapsulation efficiency, good stability and reproducibility.

**KEY WORDS** Antioxidant peptide Liposome Encapsulation efficiency

脂质体是脂类分子(类脂)的自组装体, 具有由一个或多个脂质双分子层中间包覆微水相的结构。脂质体主要应用在两个方面: 一是在医药中作为免疫佐剂及药物载体; 二是在美容化妆品中作为保湿剂及营养物质载

国家高技术研究发展计划项目(2007AA09Z441)和国家自然科学基金(40706051)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: wanghy@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2010-03-12; 接受日期: 2010-06-01

作者简介: 牛 瑞(1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋活性多肽研究。E-mail: niurui168@yeah.net

体。柔性脂质体是一种新型的皮肤给药转释系统,它是在普通脂质体磷脂双分子层中加入了某些表面活性剂如胆酸钠等,使其具有充分柔性和变形性,可以大量透过皮肤角质层。脂质体在化妆品中作为有效组分的传递体系,能很快地进入皮肤深层,以脂质体包封的活性物质经皮吸收后可使更多活性物质留在表皮到真皮之间(Schreier *et al.* 1994)。近十多年来,脂质体在皮肤学和化妆品学方面的研究正蓬勃发展,含脂质体的化妆品具有传统化妆品不可比拟的优点,它在通透性、缓释性、保湿性、安全性方面的优势将使化妆品向高质量、高档次发展(喻胜飞 2006),它作为美容化妆品制剂的载体,显示出良好的应用前景(穆晓梅 2007)。

抗氧化肽在护肤品中的应用也被认为是最有开拓希望的新领域,抗氧化肽的共同特性是能够俘获各种反应所产生的高活性自由基,使之成为惰性化合物。大豆肽作为一种抗氧化肽,具有很强的吸湿性和保湿性,大豆肽可用作毛发、皮肤的保湿剂,大豆肽的这种性能比原先在化妆品领域广泛应用的胶原肽、丝肽有更好的效果(村炳智 1997)。因此,抗氧化肽应用于体外可抵抗紫外线对皮肤造成的老损,从而保护其结构功能;尤其作为特效添加剂应用于各种高档日化产品中而风靡全球,堪称发展最快、效益最好的新兴产业,受到国内外研究机构、制造厂商的重视。

因此,有效的结合抗氧化肽和脂质体的优点,将抗氧化肽制备成脂质体,充分发挥抗氧化肽脂质体的特性,为今后化妆品的研究开发提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

大豆卵磷脂(天津市博迪化工有限公司);聚乙二醇(北京益利精细化学品有限公司);胆固醇(天津市光复精细化工研究所);胆酸钠(天津市光复精细化工研究所);抗氧化肽(由中国水产科学研究院黄海水产研究所酶工程室提供);其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器设备

R-215 旋转蒸发仪(上海医械专机厂);超声波清洗机 SB-5200DT(宁波新芝生物科技股份有限公司);752N 紫外可见分光光度计(上海精科);真空泵(郑州长城科工贸有限公司);20PR-52D 高速冷冻离心机(日本日立公司);马尔文激光粒度仪 Nano-ZS90(英国马尔文仪器有限公司);JEM-1200EX 型透射电镜(日本 JEOL 公司)。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 抗氧化肽标准曲线的绘制

精密称取抗氧化肽 0.05 g,用 10 mmol/L pH 为 7.8 的 Tris-HCl 定容至 100 ml,得到 0.5 mg/ml 的抗氧化肽溶液。在 200~400 nm 范围内进行全波长扫描,230 nm 为最大吸收波长。精确配制 0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/ml 的抗氧化肽标准溶液,在 230 nm 处分别测其 OD 值,以吸光度对抗氧化肽浓度进行线性回归分析。

#### 1.3.2 抗氧化肽纳米柔性脂质体的制备

采用薄膜-超声分散法制备抗氧化肽纳米柔性脂质体。将卵磷脂、胆固醇、胆酸钠、聚乙二醇按一定质量溶于适量的无水乙醇中,溶解后,得到透明的橙黄色液体,使用旋转薄膜蒸发仪,真空去除无水乙醇,得到干燥的薄膜。精确称取一定量的抗氧化肽溶于 10 mmol/L pH 为 7.8 的 Tris-HCl 溶液中,按一定量加入到干燥的薄膜,形成乳化液,用超声波发生器超声 10 min,即得抗氧化肽纳米柔性脂质体。

#### 1.3.3 抗氧化肽纳米柔性脂质体的形态学及粒径观察

#### 1.3.4 包封率的测定

采用高速冷冻离心法(刘湘新等 1998)测定包封率。取脂质体混悬液 20 ml,其中 10 ml 在离心前加入少量的甲醇溶液破膜,用于测定抗氧化肽的总含量;另外 10 ml 经 10 000 r/min 离心 30 min 得到上清液,加入少

量甲醇溶液破膜,用于测定游离的抗氧化肽含量。以离心后的空白脂质体加少量甲醇溶液稀释作为参比,在 230 nm 处测其吸光值,根据抗氧化肽标准曲线,得抗氧化肽的总含量( $C_{总}$ )和游离含量( $C_{游}$ ),代入下式计算包封率(扶亚祥等 2009)。

$$\text{包封率} = [(C_{总} - C_{游}) / C_{总}] \times 100\%$$

### 1.3.5 单因素影响考察

以包封率为衡量指标,研究各单因素水平对脂质体制备的影响。

#### 1.3.5.1 卵磷脂与胆固醇质量比的影响

在抗氧化肽浓度、转速等其他条件不变的情况下,卵磷脂与胆固醇质量比从 3 : 1 依次增大至 8 : 1,配制成不同质量比的脂质体溶液。测定不同质量比下制备的脂质体包封率。

#### 1.3.5.2 不同温度的影响

在卵磷脂与胆固醇质量比等其他条件不变的情况下,旋转蒸发仪的水浴温度从 20 °C 依次增大至 60 °C。测定不同温度下制备的脂质体包封率。

#### 1.3.5.3 抗氧化肽浓度的影响

在其他条件不变的情况下,依次改变抗氧化肽的浓度分别为 5%、10%、15%、20%、25%,配制成不同抗氧化肽浓度的脂质体。测定不同抗氧化肽浓度下制备的脂质体包封率。

#### 1.3.5.4 不同转速的影响

在其他条件不变的情况下,依次改变旋转蒸发仪的转速分别为 50、100、150、200 r/min,考察不同转速对脂质体形成的影响。测定不同转速下制备的脂质体包封率。

#### 1.3.5.5 不同 pH 的影响

在其他条件不变的情况下,改变介质的 pH,使抗氧化肽溶于不同 pH 的介质溶液中,分别在 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 下制备脂质体。测定不同外水相 pH 制备的脂质体包封率。

#### 1.3.5.6 不同超声时间的影响

在其他条件不变的情况下,考察不同超声时间分别为 10、20、30、40、50 min 对脂质体包封率的影响。测定不同超声时间下制备的脂质体包封率。

### 1.3.6 正交设计条件优化

根据单因素实验结果,选取卵磷脂与胆固醇质量比、多肽浓度、转速、超声时间 4 个因素进行  $L_9(3^4)$  正交试验(表 1),以包封率为指标,优化脂质体制备的最佳条件(扶亚祥等 2009)。

表 1 正交设计的因素水平  
Table 1 Factors and levels of the orthogonal design

序号 Number	A	B	C	D
因素 Factor	卵磷脂与胆固醇质量比 Ratios of lecithin to cholesterol	多肽浓度 Concentration of antioxidant peptide(%)	转速 Rotation speed (r/min)	超声时间 Ultrasonic emulsification time(min)
水平 1 Level 1	3 : 1	5	50	20
水平 2 Level 2	5 : 1	15	100	30
水平 3 Level 3	7 : 1	25	200	40

## 2 结果

### 2.1 抗氧化肽浓度标准曲线

在波长为 230 nm 下,抗氧化肽浓度在 0.025~0.5 mg/ml 范围内与吸光值 OD 的线性回归方程为:  $OD = 1.7134C - 0.0233$  ( $R^2 = 0.9979$ ),其标准曲线见图 1。

### 2.2 单因素考察制备脂质体的处方和工艺结果

不同磷脂-胆固醇质量比下制备的脂质体包封率如图 2 所示。以包封率为衡量指标,卵磷脂与胆固醇质量比为 3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1 时包封率分别为 45.31%、50.65%、52.86%、47.28%、44.06%、41.62%。当卵磷脂与胆固醇质量比为 5:1 时,包封率最高。这与脂质体形成时所需磷脂和胆固醇的摩尔比有关,卵磷脂的作用是形成脂质双层,胆固醇可以改变卵磷脂在脂质双层中的排列次序及流动性,从而加固脂质体膜的稳定性(张 蓓等 2007)。

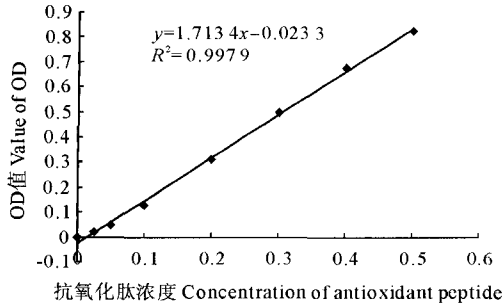


图 1 抗氧化肽标准曲线

Fig. 1 Standard curve of the antioxidant peptide

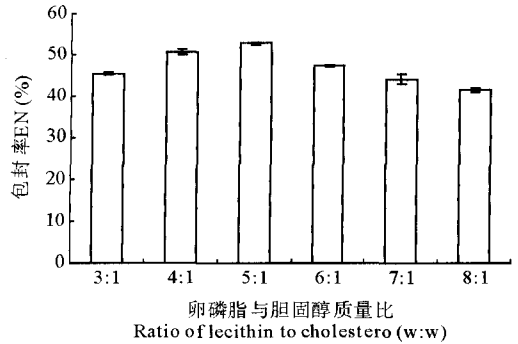


图 2 卵磷脂与胆固醇质量比对包封率的影响

Fig. 2 Influence of ratio of lecithin to cholesterol on the encapsulation efficiency

不同温度制备的脂质体包封率见图 3。以包封率为衡量指标,旋转蒸发仪温度为 20、30、40、50、60℃时包封率分别为 27.4%、35.85%、45.45%、51.71%、48.47%。当温度为 50℃时,包封率最大。

不同抗氧化肽浓度条件下制备脂质体的包封率见图 4。以包封率为衡量指标,当抗氧化肽浓度为 5%、10%、15%、20%、25%时包封率分别为 35.67%、40.68%、49.11%、46.13%、42.94%。当抗氧化肽浓度为 15%时,包封率最大。

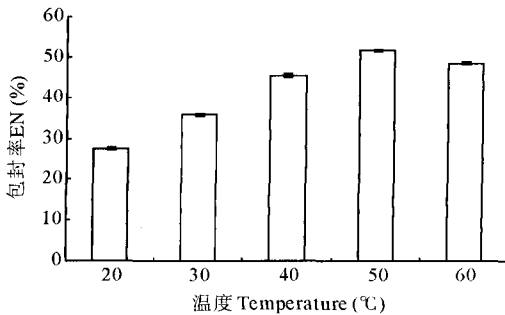


图 3 温度对包封率的影响

Fig. 3 Influence of temperature on the encapsulation efficiency

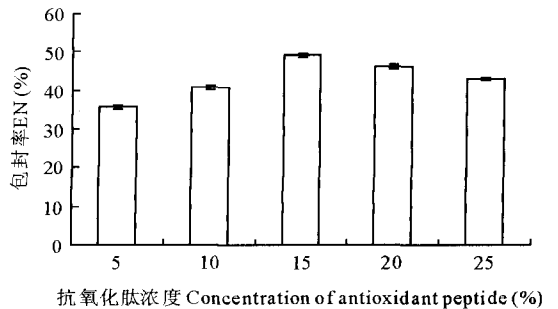


图 4 抗氧化肽浓度对包封率的影响

Fig. 4 Influence of the antioxidant peptide concentration on the encapsulation efficiency

不同转速条件下制备的脂质体包封率见图 5。当旋转蒸发仪的转速为 50 r/min 时,包封率最大。转速过快或过慢都不利于脂质原料在旋转蒸发仪茄形瓶底部均匀成膜,也不利于油水相的均匀融合(扶亚祥等 2009)。

不同 pH 条件下制备的脂质体包封率如图 6 所示。以包封率为衡量指标,介质的 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,包封率分别为 37.85%、41.06%、44.05%、46.19%、47.1%、49.13%、50.88%。当介质 pH 为 10.0 时,包封率最大。

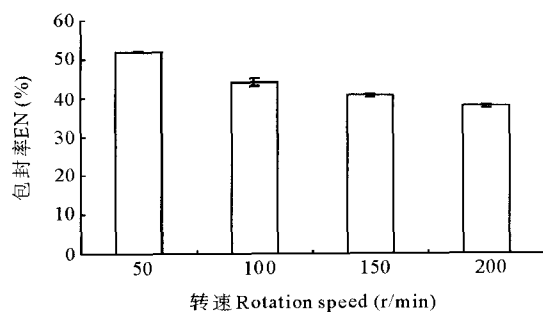


图 5 转速对包封率的影响

Fig. 5 Influence of rotation speed on the encapsulation efficiency

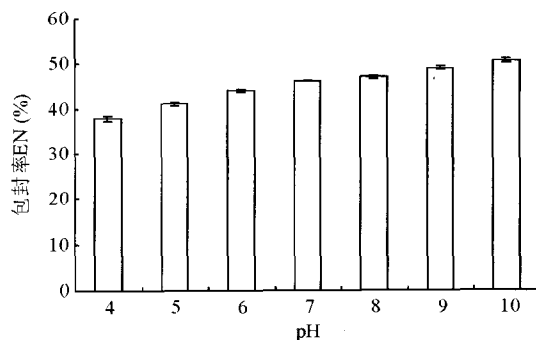


图 6 pH 对包封率的影响

Fig. 6 Influence of pH on the encapsulation efficiency

不同超声时间下制备的脂质体包封率如图 7 所示。以包封率为衡量指标,超声时间为 10、20、30、40、50 min 时包封率分别为 44.17%、47.97%、52.67%、48.22%、45.85%。当超声时间为 30 min 时,包封率最大。

### 2.3 正交试验优化结果

正交实验结果见表 2。由表 2 极差分析可知,4 个因素的极差大小排列为  $A > C > B > D$ , 即卵磷脂与胆固醇质量比影响最大,其次为转速、抗氧化肽浓度、超声时间。根据极差大小最优组合为  $A_2B_2C_2D_1$ , 即卵磷脂与胆固醇质量比为 5:1, 抗氧化肽浓度为 15%, 转速为 100 r/min, 超声时间为 20 min。

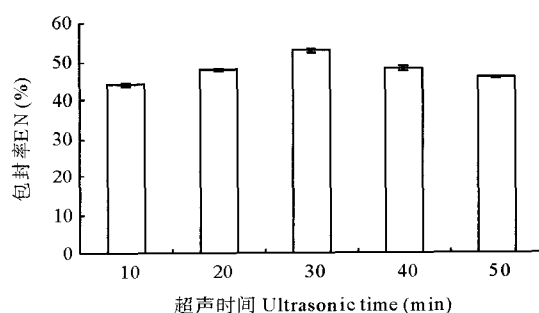


图 7 超声时间对包封率的影响

Fig. 7 Influence of ultrasonic emulsification time on the encapsulation efficiency

表 2  $L_9(3^4)$  正交实验设计与结果Table 2  $L_9(3^4)$  Orthogonal design results

试验号 No.	因素 Factor				封率 Encapsulation efficiency (%)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	43.24
2	1	2	2	2	53.12
3	1	3	3	3	39.25
4	2	1	2	3	57.98
5	2	2	3	1	57.26
6	2	3	1	2	53.49
7	3	1	3	2	37.23
8	3	2	1	3	50.08
9	3	3	2	1	48.36
T1 均值 Average of T1	45.203	46.150	48.937	49.620	-
T2 均值 Average of T2	56.243	53.487	53.153	47.947	-
T3 均值 Average of T3	45.223	47.033	44.580	49.103	-
极差 R Range	11.040	7.337	8.573	1.673	-

再对各因素做方差显著性分析,结果见表 3。由表 3 可知,因素 A、因素 B、因素 C 均显著,因素 D 不显著,分析结果与极差结果一致。

由于  $A_2B_2C_2D_1$  不在正交水平之列,做 3 组平行实验,分别测得包封率为 58.56%、57.88%、58.73%,均值为 58.39%。包封率结果符合正交优化的结果。

### 2.4 抗氧化肽纳米柔性脂质体的形态学及粒径观察结果

肉眼观察到的脂质体为乳白色,无沉淀及团聚颗粒,分散均匀。将样品稀释一定的倍数,用 JEM-1200EX 型透射电镜进行观察。放大 50 000 倍,如图 8 所示,制得的脂质体为分散较好的小单室脂质体,其内圈包裹的水溶性抗氧化肽主要集中于脂质膜附近,脂质体颗粒圆形成度较高,轮廓清晰,形态规整。

由马尔文激光粒度仪 Nano-ZS90 对所制脂质体粒径主要分布及电位进行测定,粒径分布见图 9。结果显示,优化工艺所得脂质体的粒径平均分布主要在 255±60 nm 左右,作为化妆品的活性成分符合透皮吸收的要求(穆筱梅 2007)。Zeta 电位的绝对值越大说明样品的荷电粒子稳定性越强,体系越稳定,当其绝对值达到 30 mV 以上时,体系相当稳定,粒子不易聚集。Zeta 电位结果表明,抗氧化肽脂质体带负电荷,平均 Zeta 电位为-25.9 mV,具有较强的稳定性。

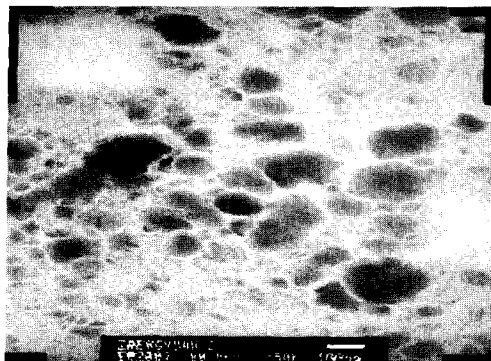


图 8 抗氧化肽脂质体的 50 000 倍电镜观察  
Fig. 8 Antioxidant peptide liposome under electron microscope (50 000×)

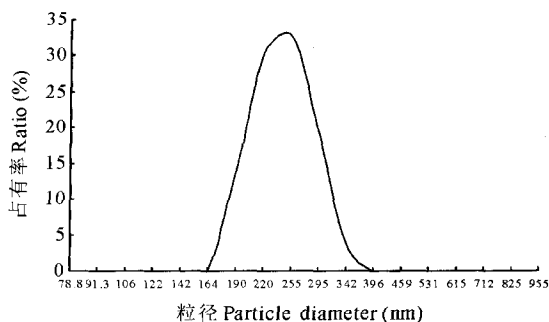


图 9 抗氧化肽脂质体粒径分布  
Fig. 9 Diameter distribution of Antioxidant peptide liposomes particles

### 2.5 稳定性测定结果

脂质体的稳定性是另一个重要的评价指标,它在一定程度上决定了脂质体存放和使用期限(旷英姿等 2006)。样品在 4 ℃放置 10、20、30、60 d,测得的粒径变化如图 10 所示。粒径随放置时间的延长变化不大,说明所制备的纳米柔性脂质体的稳定性较好。

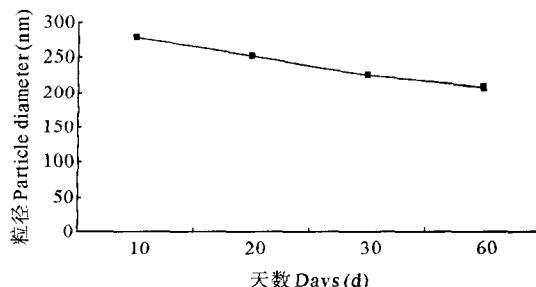


图 10 粒径与保存时间的关系  
Fig. 10 Relationship between the particle diameter and the storage time

### 3 讨论

本文选取超声波分散法制备脂质体,将水溶性药物溶于磷酸盐缓冲液中,加入卵磷脂与胆固醇及脂溶性药物共溶的有机溶剂的溶液,搅拌蒸发除去有机溶剂,残留液以超声波处理,然后分离出脂质体。采用高速离心的方法分离脂质体,此方法耗费成本低、方便、快捷,高速离心时只要把握好离心的速度和时间,使较大颗粒的脂质体完全沉淀下来和部分较小颗粒也能较好的沉淀下来(徐霞等 2005),从而达到很好的分离效果。

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

来源 Source	偏差平方和 SSD	自由度 DF	F 比 F value	显著性 Significance
A	243.322	2	55.238	*
B	96.252	2	21.851	*
C	110.263	2	25.031	*
D	4.405	2	1.000	-
误差 Error	4.41	2	-	-

评价脂质体的一个重要指标就是包封率,而包封率的好坏不仅要测定刚制备后的样品,还要控制样品的稳定性。胆固醇和二硬脂酰磷脂酰甘油能使药物不易从膜上脱落、泄漏,对提高脂质体的包封率和稳定具有重要作用(陆纪宏等 2009)。而影响包封率的因素很多,本文在单因素实验的基础上,采用正交设计的方法对影响脂质体制备的因素进行了优化,得到了制备脂质体的最佳条件,即卵磷脂与胆固醇质量比为 5:1,抗氧化肽浓度为 15%,转速为 100 r/min,超声时间为 20 min 时,包封率可达 58.39%。根据电镜及粒径观察均表明,制备得到的脂质体符合优化的结果,具有良好的稳定性。

## 参 考 文 献

- 刘湘新,肖洪波. 1998. 吡啶酮脂质体的制备及包封率测定. 湖南农业大学学报,24(3):251~253
- 张 蓓,王东凯,宋 扬,张翠霞,吕广娟. 2007. 细辛脑脂质体的制备及包封率的测定. 中国中药杂志,32(1):67~68
- 扶亚祥,何湘蓉,苏建明,李俊超,刘湘新. 2009. 奥比沙星纳米脂质体制备工艺及处方优化研究. 动物医学进展,30(4):31~35
- 旷英姿,马全红,郝小祯,周华峰,顾 宁. 2006. 茶多酚脂质体的制备研究. 中国生化药物杂志,27(1):28~31
- 村炳智. 1997. 大豆肽及其开发应用前景. 日用化学工业,(1):61~62
- 陆纪宏,李旭东,张小平,高华英. 2009. 尼莫地平脂质体的制备与理化性质研究. 医学导报,28(6):771~773
- 徐 霞,刘增再,刘 毅,孙志良. 2005. 伊维菌素脂质体的制备工艺. 湖南农业大学学报(自然科学版),31(3):300~303
- 喻胜飞. 2006. 脂质体及其在化妆品中的应用. 广东化工,33(12):55~57
- 穆筱梅. 2007. 脂质体在化妆品中的研究进展. 日用化学工业,37(1):45~49
- Schreier, H., and Bowsra, J. 1994. Liposomes and niosomes as topical drug carriers; dermal and transdermal drug delivery. J. Control Release, 30: 1~15

## 《渔业科学进展》编辑部 2011 年网上投稿启事

为充分利用网络资源,提高编辑办公和期刊出版效率,《渔业科学进展》编辑部已从 2010 年 1 月开始采用期刊网络化办公系统。该系统使投稿、审稿和编辑工作都在同一个网络平台上完成,可大大节省通讯时间,并规范编辑工作流程。同时,网络投稿将以更加友好的界面服务于广大作者,方便作者与编审之间的沟通,为您提供易查、易用、更加方便快捷的服务。

敬请作者访问黄海水产研究所网站(<http://www.ysfri.ac.cn>)右下角的“《渔业科学进展》期刊网上投稿系统”。投稿程序请参看《渔业科学进展》网络化稿件处理系统作者使用指南。

如有疑问,请致电 0532-85833580 陈严老师或 0532-85800117 王建坤老师咨询。也可发邮件到《渔业科学进展》编辑部咨询,E-mail: [chenyan@ysfri.ac.cn](mailto:chenyan@ysfri.ac.cn)。

《渔业科学进展》编辑部

2011 年 3 月 20 日