

芒果苷脂质体的制备与表征

叶民珠¹, 胡雨平², 戴伟¹, 张玉清¹, 申金玉¹, 黄浩¹

(1. 赣南医科大学药学院; 2. 赣县区人民医院心内科, 江西 赣州 341000)

摘要:目的: 筛选芒果苷脂质体的制备方法及其最佳处方。方法: 以平均粒径、聚合物分散性指数(Polydispersity index, PDI)、Zeta电位为考察指标筛选, 通过 $L_9(3^4)$ 正交实验, 确定芒果苷脂质体的最佳处方及制备方法。再对筛选出的最佳处方及制备方法制备出的芒果苷脂质体成品进行表征, 使用高效液相色谱仪测定其包封率。结果: 最佳处方: DOTAP: 胆固醇: 葵花磷脂: 芒果苷=2:6:1.5:1(摩尔比), 使用薄膜水合法对该脂质体制备效果最佳。成品的平均粒径为(182.20±2.25) nm, PDI为(0.148±0.001), Zeta电位为(45.70±0.56) mV。扫描电镜下芒果苷脂质体形态近圆。包封率为93.85%。结论: 制备的芒果苷脂质体平均粒径较小, 脂质体体系分布均匀稳定, 形态近圆, 符合脂质体的各项标准。

关键词: 芒果苷; 脂质体; 制备

中图分类号: R94 文献标志码: A 文章编号: 1001-5779(2025)09-0825-05

DOI: 10.3969/j.issn.1001-5779.2025.09.001

Preparation and characterization of mango glycoside liposome nanoparticles

YE Min-zhu¹, HU Yu-ping², DAI Wei¹, ZHANG YU-qing¹, SHEN Jin-yu¹, HUANG Hao¹

(1. School of Pharmacy, Gannan Medical University; 2. Department of Cardiology, Ganxian People's Hospital, Ganzhou, Jiangxi 341000)

Abstract: Objective: To screen the preparation method and the optimal prescription of mangiferin liposomes. **Methods:** The average particle size, polydispersity index (PDI), and Zeta potential were used as evaluation indicators. The $L_9(3^4)$ orthogonal experiment was conducted to determine the optimal prescription and preparation method of mangiferin liposomes. The prepared mangiferin liposomes with the optimal prescription and preparation method were characterized, and the entrapment efficiency was determined by high performance liquid chromatography. **Results:** The optimal prescription was DOTAP: cholesterol: sunflower phospholipid: mangiferin = 2:6:1.5:1 (molar ratio), and the film hydration method was the best for the preparation of the liposomes. The average particle size of the product was (182.20 ± 2.25) nm, the PDI was (0.148 ± 0.001), and the Zeta potential was (45.70 ± 0.56) mV. The morphology of the mangiferin liposomes was nearly spherical under scanning electron microscopy. The entrapment efficiency was 93.85%. **Conclusion:** The prepared mangiferin liposomes had a small average particle size, a uniform and stable liposome system, and a nearly spherical morphology, which met the standards of liposomes.

Key words: Mangiferin; Liposomes; Preparation

芒果苷是一种天然多酚类化合物,广泛存在于知母、芒果果实、漆树科及鸢尾科植物中^[1]。现代药理学研究表明,芒果苷具有抗炎、降血糖、抗动脉粥样硬化和心血管保护等多种药理活性^[2-5],但其水溶性不佳,导致口服生物利用度仅为1.2%^[6],这严重

限制了其在临床上的应用。

脂质体是一种具有磷脂双分子层的自组装封闭球形系统,由一种或多种两亲性磷脂组成,具有良好的包埋能力,同时也具有改善药物溶解性,延长药物半衰期,提高药物靶向性,降低药物毒副作用及提高

基金项目:国家自然科学基金国际合作项目(82111530101);江西省杰出青年基金项目(20212ACB216002);江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ2201439)

通信作者:黄浩,男,博士,教授,研究方向:药理机制分析方法、药效物质基础与生物标志物分析。E-mail: hhuang@gmu.edu.cn

难溶性药物生物利用度等优点^[7-8],目前被广泛应用于难溶性天然小分子药物载体^[9]。本研究以脂质体为载体包载难溶性芒果苷,从制备方法入手,以平均粒径、聚合物分散性指数(Polydispersity index, PDI)、Zeta电位为考察指标,通过正交实验对芒果苷脂质体处方进行筛选优化,再对芒果苷脂质体进行表征,最后通过高效液相色谱法检测包封率,以期对芒果苷脂质体的进一步开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器 ME104E型电子分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);ZS90型马尔文粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);IC-16型高效液相色谱仪(日本岛津公司);VFGA3LMu型扫描电镜[泰斯肯贸易(上海)有限公司];EXCEED型超纯水机(成都唐氏康宁科技发展有限公司);KQ-500DB型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);JB-1A型磁力搅拌器(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试剂 芒果苷对照品(批号PS000677,纯度 $\geq 98\%$,成都普思生物科技股份有限公司);芒果苷原料药(批号20210818,陕西开普勒生物科技有限公司);胆固醇(批号C12348516,上海麦克林生化科技有限公司);葵花磷脂(批号C12635185,上海麦克林生化科技有限公司);十二烷基三甲基溴化铵(DTAB)(批号C12777326,上海麦克林生化科技有限公司);2,3-二油酰基-丙基-三甲铵(氯盐)(DOTAP)(批号B2203001,苏州昊帆生物股份有限公司);无水乙醇(批号FPOB53B53F,湖北弗顿科学技术有限公司);三氯甲烷(批号2022011401,成都市科隆化学品有限公司);乙腈(批号2022041202,成都市科隆化学品有限公司)。

2 方法与结果

2.1 脂质体制备方法的选择 本实验采用薄膜水合法和乙醇注入法分别制备3个处方的空白脂质体,通过观察脂质体平均粒径、PDI、Zeta电位等指标确定最佳制备方法。混悬液澄明度以目视法进行观察,平均粒径采用ZS90型马尔文粒度仪测定,其中平均粒径越小越好,PDI越小表示粒径分布越均匀,当 $0.1 < PDI \leq 0.2$ 时表示是中等单分散体系,当 $PDI > 0.2$ 则表示样品粒径分布较宽,颗粒大小很不均一,参考价值下降^[10]。Zeta电位在 $\pm 40 \sim \pm 60$ 表示脂质体具有较好的稳定性,超过

± 60 则是具有极好的稳定性^[11]。3种处方分别为:处方一:DOTAP:胆固醇:葵花磷脂=4:4:1(摩尔比)^[12];处方二:DTAB:胆固醇:葵花磷脂=1:1:1(摩尔比)^[13];处方三:DOTAP:葵花磷脂=5:3(摩尔比)^[14]。

2.1.1 薄膜水合法 按处方一中的处方量称取膜材放置圆底烧瓶内,量取5 mL三氯甲烷使其溶解。在旋转蒸发器上挥去三氯甲烷,使在烧瓶内壁形成一层脂质体薄膜。加入10 mL超纯水溶液冲下脂质体薄膜。在超声仪中超声30 min,再通过 $0.45 \mu\text{m}$ 水系滤膜过滤,取续滤液,即得^[15]。同法制备处方二和处方三。每个处方均进行3次平行实验。

2.1.2 乙醇注入法 按处方一中的处方量称取膜材放置圆底烧瓶内,量取5 mL无水乙醇使其溶解。加入5 mL超纯水溶液,密封。在磁力搅拌器中搅拌30 min,再通过 $0.45 \mu\text{m}$ 有机系滤膜过滤,取续滤液,即得^[15]。同法制备处方二和处方三。每个处方均进行3次平行实验。

2.1.3 制备方法筛选结果 结果显示,薄膜水合法制备的脂质体平均粒径及PDI值更小,Zeta电位绝对值较大,说明粒径分布更均匀,体系更稳定,即选择薄膜水合法为本实验制备方法。见表1和表2。

表1 薄膜水合法 $\bar{x} \pm s$

处方	平均粒径/nm	PDI	Zeta电位/mV
处方一	178.13 \pm 2.85	0.185 \pm 0.009	40.17 \pm 0.40
处方二	296.53 \pm 7.56	0.176 \pm 0.009	13.10 \pm 0.50
处方三	232.13 \pm 6.79	0.218 \pm 0.019	39.07 \pm 1.55

注:PDI:聚合物分散性指数。

表2 乙醇注入法 $\bar{x} \pm s$

处方	平均粒径/nm	PDI	Zeta电位/mV
处方一	396.53 \pm 72.27	0.262 \pm 0.089	9.57 \pm 2.49
处方二	514.80 \pm 54.50	0.531 \pm 0.086	-8.27 \pm 5.07
处方三	133.30 \pm 11.59	0.310 \pm 0.050	54.33 \pm 8.14

注:PDI:聚合物分散性指数。

2.2 脂质体制备处方的选择

2.2.1 脂质体处方初筛 本实验采用薄膜水合法制备3个处方,每个处方均进行3次平行实验,通过平均粒径、PDI、Zeta电位等指标,筛选出较优的制备处方。

2.2.2 处方初筛结果 结果显示,按处方一制备的脂质体平均粒径及PDI值更小,Zeta电位绝对值较大,表示制备的脂质体体系分布更均匀稳定,

因此选择处方一为制备处方。见表3。

2.3 芒果苷脂质体制作工艺优化 按参考文献[16]对处方一包载芒果苷进行实验,以平均粒径、PDI、Zeta电位为考察指标,建立 $L_9(3^4)$ 正交实验。按参考文献[17]并结合实验需求,对平均粒径、PDI和Zeta电位进行综合加权评分。见表4。根据《试验设计与数据处理》^[18],求得的3元线性回归方程为 $y=0.34x_1+0.33x_2+0.33x_3$, y 为因变量(综合评分), x_1 、 x_2 、 x_3 为自变量(即平均粒径、PDI和Zeta电位3个指标)。

正交实验设计:正交实验以DOTAP(A)、胆固醇(B)、葵花磷脂(C)、芒果苷(D)为实验因素,按照 $L_9(3^4)$ 正交设计表确定4因素3水平。见表5。实验结果显示各因素影响程度依次为DOTAP(A)>葵花磷脂(C)>芒果苷(D)>胆固醇(B),最终确定最佳制备工艺为 $A_1B_3C_3D_2$,即DOTAP:胆固醇:葵花磷脂:芒果苷=2:6:1.5:1(摩尔比)。其中DOTAP的用量对芒果苷脂质体影响最大。见表6。

2.4 芒果苷脂质体表征

2.4.1 外观性状 在最佳处方及工艺条件下制备芒果苷脂质体,目测观察芒果苷脂质体的色泽、透明度等外观性状。芒果苷脂质体溶液目测无色透明,无絮凝物沉淀。

表3 处方初筛结果 $\bar{x}\pm s$

处方	平均粒径/nm	PDI	Zeta电位/mV
处方一	211.07±8.82	0.168±0.003	42.40±0.72
处方二	354.07±17.35	0.191±0.005	14.13±2.05
处方三	235.63±7.49	0.240±0.038	50.53±5.65

注:PDI:聚合物分散性指数。

表4 评分标准

评分/分	平均粒径/nm	PDI	Zeta电位/mV
0~50	300~500	≥0.5	0~15
50~60	250~300	0.4~0.5	15~20
60~90	100~250	0.1~0.4	20~50
90~100	0~100	0.08~0.1	≥50

注:PDI:聚合物分散性指数。

表5 正交实验因素及水平

水平	因素			
	A/ μmol	B/ μmol	C/ μmol	D/ μmol
1	2.0	2.1	0.5	0.5
2	4.0	3.9	1.0	1.0
3	6.0	6.0	1.5	1.4

注:A:DOTAP;B:胆固醇;C:葵花磷脂;D:芒果苷。

表6 正交实验结果

实验号	因素				评价指标			综合评分/分
	A/ μmol	B/ μmol	C/ μmol	D/ μmol	平均粒径评分/分	PDI评分/分	Zeta电位评分/分	
1	2.0	2.1	0.5	0.5	69.84	82.1	85.9	79.19
2	2.0	3.9	1.0	1.0	68.32	83.3	86.9	79.39
3	2.0	6.0	1.5	1.4	73.56	85.2	85.7	81.41
4	4.0	2.1	1.0	1.4	72.54	78.0	83.1	77.83
5	4.0	3.9	1.5	0.5	79.24	76.8	86.1	80.70
6	4.0	6.0	0.5	1.0	83.28	76.9	84.0	81.41
7	6.0	2.1	1.5	1.0	78.22	79.3	83.2	80.22
8	6.0	3.9	0.5	1.4	73.00	72.0	78.7	74.55
9	6.0	6.0	1.0	0.5	74.18	75.0	80.6	76.57
K1	239.99	237.24	235.15	236.46				
K2	239.94	234.64	233.79	241.02				
K3	231.34	239.39	242.33	233.79				
k1	80.00	79.08	78.38	78.82				
k2	79.98	78.21	77.93	80.34				
k3	77.11	79.80	80.78	77.93				
R	2.89	1.59	2.85	2.41				

注:A:DOTAP;B:胆固醇;C:葵花磷脂;D:芒果苷;PDI:聚合物分散性指数。

2.4.2 平均粒径、PDI及Zeta电位 使用马尔文粒度仪测定最佳处方及工艺条件下制备芒果苷脂质体的平均粒径、PDI及Zeta电位。最佳处方及工艺条件下制备芒果苷脂质体的平均粒径为 (182.20 ± 2.25) nm, PDI为 (0.148 ± 0.001) , Zeta电位为 (45.70 ± 0.56) mV。包载芒果苷后的脂质体平均粒径减小, PDI和Zeta均在合理范围内。

2.4.3 扫描电镜 取芒果苷脂质体溶液少许滴至粘帖在载物台上的导电胶上, 再滴少许1%磷钨酸溶液于其上, 使自然挥干, 用扫描电镜观察芒果苷脂质体外观形态^[19]。见图1。由扫描电镜图像可得, 最佳处方及工艺条件下制备的芒果苷脂质体外形近圆, 包载芒果苷后并未破坏脂质体结构。

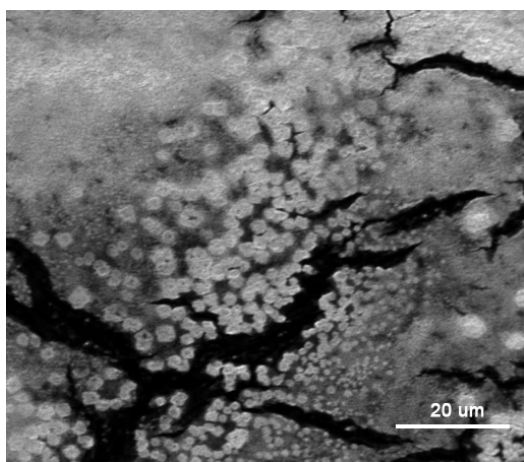


图1 芒果苷脂质体溶液扫描电镜图

2.5 芒果苷脂质体包封率检测

2.5.1 供试品溶液制备 精密量取空白脂质体溶液5 mL置于10 mL容量瓶中, 加入无水乙醇稀释至刻度线, 用封口膜密封后超声10 min(100 W)破乳, 为空白对照液。

精密量取芒果苷脂质体溶液5 mL置于10 mL容量瓶中, 加入无水乙醇稀释至刻度线, 用封口膜密封后超声10 min(100 W)破乳, 为载药溶液。

2.5.2 对照品溶液制备 精密称取芒果苷对照品20 mg, 用10 mL容量瓶加稀乙醇溶解并稀释成浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液^[20]。

2.5.3 HPLC测定条件^[1] 色谱柱: Alltima C18色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.2%冰醋酸溶液(15:85); 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL; 检测波长: 258 nm。

2.5.4 线性关系考察 精密量取芒果苷标准储备液适量置于10 mL容量瓶中, 加无水乙醇梯度稀释,

制成浓度分别为2、4、8、16、32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液, 按照HPLC条件测定各浓度样品, 记录主峰面积, 各浓度样品重复进样3针, 根据平均主峰面积(A)对溶液浓度(C)的线性回归关系绘制标准曲线^[21]。可得回归方程为 $Y=(4 \times 10^7)X-55.667$, $R^2=0.9993$ 。表明在芒果苷浓度 $0.002 \sim 0.032 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间有良好的线性关系。

2.5.5 精密度考察 将浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芒果苷标准溶液, 按照HPLC测定条件连续进样6针, 分别记录主峰面积, 并以主峰面积计算RSD%。精密度实验结果良好, 芒果苷峰面积的RSD%为2.45%, 仪器精密度良好。

2.5.6 稳定性考察 将浓度为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的芒果苷标准溶液, 按HPLC测定条件分别于0、1、6、12、24、48 h进样测定芒果苷标准溶液药物浓度, 分别记录主峰面积, 并以主峰面积计算RSD%。稳定性实验结果良好, 芒果苷峰面积的RSD%为1.73%, 供试品溶液在48 h内基本稳定。

2.5.7 包封率检测 准确移取芒果苷脂质体纳米粒1 mL置超滤离心管中, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤^[22], 测定上清液中芒果苷的质量浓度为 $0.0128 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并计算游离药物量($W_{\text{游}}$)。另取芒果苷脂质体1 mL, 用甲醇稀释至10 mL, 超声15 min破乳, $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤^[23], 测定芒果苷的质量浓度为 $0.208 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 计算药物总量($W_{\text{总}}$), 并计算包封率, 包封率 $= (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$ 。结果计算芒果苷脂质体包封率为93.85%。

3 结论

本实验采用马尔文粒度仪测定平均粒径、PDI、Zeta电位等指标来筛选出最佳制备方法为薄膜水合法, 最佳处方为处方一。再通过正交实验对方一包载芒果苷进行优化, 得出最佳处方为DOTAP:胆固醇:葵花磷脂:芒果苷=2:6:1.5:1(摩尔比)。按最佳处方制备得到的芒果苷脂质体与空白脂质体相比, 包载芒果苷的脂质体平均粒径减小, PDI及Zeta电位均无显著变化, 是因为芒果苷具有较强的亲脂性, 与脂质体中的磷脂双分子层结构发生了交互作用, 形成了较为稳定的脂质体结构。扫描电镜结果和高效液相色谱法测包封率结果均显示本实验成功制备出了平均粒径较为单一, 稳定性良好的芒果苷脂质体。后续将对芒果苷脂质体在体外释放, 细胞活性及细胞毒性等方面进行进一步研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] 刘旭,谭丹妮,向琴,等. 芒果苷对 MKR 小鼠肥胖症合并 2 型糖尿病的作用[J]. 中国药理学通报,2022,38(11):1639-1646.
- [3] 胡军峰,聂颖,徐辉甫. 芒果苷通过抑制炎症、肺泡化阻滞和肺微血管受损来减轻高氧诱导的新生小鼠肺损伤[J]. 中国病理生理杂志,2023,39(6):1014-1020.
- [4] 尚影,孔维桂,江淑琴,等. 芒果苷作用于 COX-2 和 5-LOX 双靶点改善良性前列腺增生炎症[J]. 沈阳药科大学学报,2023,40(3):309-315.
- [5] 张欣蕾,王晓,周子皓,等. 芒果苷对急性血瘀大鼠血液流变性的影响[J]. 中成药,2023,45(3):944-948.
- [6] 卢玉翠,肖颀方,赵立春,等. 酶解结合微波提取芒果皮渣中芒果苷成分及工艺优化[J]. 当代化工,2023,52(9):2036-2041.
- [7] 冯赫宣,李佩珊,刘懿萱,等. 脂质体的研究与应用进展[J]. 药学进展,2024,48(10):725-734.
- [8] 张朗朗,戴粤湘,张涵,等. 鬼臼毒素脂质体的制备及其质量评价[J]. 中南药学,2024,22(1):65-70.
- [9] 颜红,宫思璠,于亮,等. 脂质体作为药物载体的最新研究进展[J]. 药物生物技术,2023,30(3):325-330.
- [10] 张姝,刘俊彦. 单因素方差分析法比较聚乙烯醇的聚合物分散性指数[C]//中国化学会. 中国化学会第 22 届全国色谱学术报告会及仪器展览会论文集:第二卷. 上海:中国石化上海石油化工研究院,2019:302-303.
- [11] 宋璇,秦迎丹,孙晨,等. 不同 Zeta 电位纳米脂蛋白载体的物理稳定性评价[J]. 中国医院药学杂志,2023,43(12):1342-1346.
- [12] SAMADARSI R, DUTTA D. Design and characterization of mangiferin nanoparticles for oral delivery[J]. J Food Eng, 2019,247:80-94.
- [13] WANG D, WANG X, WANG L, et al. Antisense microRNA185 loaded liposome for efficient inhibition of the hepatic endogenous microRNA185 level[J]. Eur J Pharm Sci, 2021,161:105803.
- [14] YAZDANI M, NIKPOOR A R, GHOLIZADEH Z, et al. Comparison of two routes of administration of a cationic liposome formulation for a prophylactic DC vaccination in a murine melanoma model[J]. Int Immunopharmacol, 2021,98:107833.
- [15] 顾川江. NEDD4-siRNA 靶向递送系统的建立和评价[D]. 镇江:江苏大学,2020.
- [16] 李玲,彭致铖,严玉晶,等. 多指标权重分析法结合正交试验优选醋五灵脂炮制工艺[J]. 中国现代中药,2022,24(12):2455-2461.
- [17] 阙慧卿,彭华毅,钱丽萍,等. 雷公藤内酯醇纳米脂质体的处方及制备工艺研究[J]. 中草药,2016,47(13):2277-2282.
- [18] 刘振学. 实验设计与数据处理:第二版[M]. 北京:化学工业出版社,2015.
- [19] 纪刚剑,林雯,史琼枝,等. 载 siRNA 的 PLGA-b-PEG 纳米粒制备及初步体外评价[J]. 中国药业,2022,31(17):33-37.
- [20] 李秀楠,王海云,吴倩,等. 芒果苷在扁桃叶与芒果叶中含量的比较研究[J]. 产业科技创新,2023,5(6):48-50.
- [21] 陈曼曼,杨春燕,宛云云,等. HPLC 法测定知母中芒果苷的含量[J]. 山东化工,2022,51(12):115-119.
- [22] 问天娇,陈欣然,白靖,等. 装载 siRNA 的纳米阳离子脂质体在小鼠体内的药代动力学研究[J]. 癌变·畸变·突变,2022,34(6):445-448.
- [23] 张钰婕,于晨旭,张沛敏,等. 虾青素脂质体的制备及其应用研究[J]. 广东化工,2023,50(19):45-47.

(收稿:2024-12-24)(修回:2025-02-1)

(责任编辑:李萍)