

# 牛血清白蛋白脂质体包封率的测定方法研究

侯冬枝<sup>\*</sup>, 刘长科, 平其能, 梁晓辉

(中国药科大学 药学院, 江苏 南京 210009)

**摘要:** 在较温和的实验条件下, 制备粒径约 100 nm 包封模型药牛血清白蛋白 (BSA) 脂质体, 将双波长考马斯亮蓝 G-250 染料结合法用于测定 BSA 脂质体包封率时游离蛋白质含量。BSA 包封率测定运用凝胶柱色谱法, 考察不同型号的葡聚糖凝胶对游离药物和脂质体的分离性能; 对于游离 BSA 的测定, 比较了双波长紫外分光光度法、考马斯亮蓝 G-250 染料法 (Bradford 法)、双波长考马斯亮蓝 G-250 染料法 3 种测定方法。在吸收度和线性均良好的情况下, 双波长考马斯亮蓝 G-250 染料法的检测范围为  $0.25 \sim 32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 与 Bradford 法的检测范围 ( $5 \sim 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 相比, 检测灵敏度提高了 20 倍, 检测范围更宽。由此可见, 双波长考马斯亮蓝 G-250 染料法测定蛋白质含量时, 检测限较低, 线性良好, 检测线性范围更宽, 可作为测定 BSA 脂质体包封率时蛋白质含量的测定手段。

**关键词:** BSA 脂质体; 凝胶柱色谱法; 包封率; 双波长考马斯亮蓝 G-250 染料法

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2007)05-0545-05

## The entrapped efficiency of BSA liposome

HOU Dong-zhi<sup>\*</sup>, LIU Chang-ke, PING Qi-neng, LIANG Xiao-hui

(School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** BSA liposomes were prepared with approximately 100 nm mean particle size under rather gentle experiment conditions, and two-colorimetric coomassie brilliant blue protein was employed to measure the free drug in the entrapped efficiency (EE%) determination of BSA liposomes. Gel filtration was used to measure the EE%, and several Sephadex gels were examined by the separation of liposomes and free drug. To determine the free drug, three methods were compared on two-colorimetric UV spectrophotography, Bradford and two-colorimetric coomassie brilliant blue, separately. Two-colorimetric coomassie brilliant blue process increased the accuracy and improved the sensitivity of the assay about 20-fold comparing with the Bradford method. Two-colorimetric coomassie brilliant blue assay appeared to be more sensitive and showed broader dynamic range to measure the free BSA in the EE% determination of BSA liposome.

**Key words:** BSA liposome; gel filtration; entrapped efficiency; two-colorimetric coomassie brilliant blue protein assays

脂质体作为蛋白质药物载体, 具有诸多优点。逆相蒸发法是制备生物大分子药物脂质体常用的方法之一, 适用于包裹水溶性药物、大分子生物活性物质, 如各种抗生素、胰岛素免疫球蛋白、碱性磷脂酶、核酸等, 通常可得到相对较高的包封率。本实验拟采用牛血清白蛋白 (BSA) 作为蛋白质模型药物, 通

过逆相蒸发法制备 BSA 脂质体<sup>[1-3]</sup>。

载药脂质体包封率的测定, 涉及到游离药物与脂质体的分离。目前常用的分离方法主要有透析法、离心法和凝胶过滤法等。本实验采用凝胶过滤法, 通过考察和比较不同型号的葡聚糖凝胶对游离药物和脂质体的分离性能, 寻找较好的分离手段。针对游离蛋白质药物与脂质体分离后浓度很低的情况, 本文通过对不同的蛋白质检测方法进行考察<sup>[4-7]</sup>, 比较了双波长紫外分光光度法、考马斯亮蓝 G-250 染料法 (Bradford 法) 和双波长考马斯亮蓝

收稿日期: 2006-09-02.

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (2005037423)。

<sup>\*</sup> 通讯作者 Tel: 86-25-51905022,

E-mail: houdongzhi@sina.com

G-250染料法 3种测定蛋白质含量的方法,以满足BSA脂质体中游离蛋白测定的要求。

## 材料与amp;方法

**材料与仪器** 大豆磷脂,注射级,上海太伟药业有限公司;胆固醇,分析纯,中国惠兴生化试剂有限公司;Tween 80 (T-80),药用级;牛血清白蛋白(BSA,  $\geq 98\%$ ),南京生兴科技有限公司;考马斯亮蓝 G-250, Am resoo 公司; Sephadex G-75, G-100, G-150, G-200凝胶, Pharmacia公司。其他试剂均为分析纯。

Agilent紫外扫描仪 (Agilent,美国);紫外-可见分光光度计 752N,上海精密科学仪器有限公司;马尔文粒径测定仪 Zetasize 3000HSA,英国 Malvern公司。

**BSA脂质体的制备** 采用逆相蒸发法制备BSA脂质体。具体工艺是,称取处方量磷脂 300 mg、胆固醇 60 mg和 T-80少量,放入 200 mL茄形瓶中,再加入有机溶剂(乙醚-正己烷 9:1),充分溶解摇匀,在水浴超声过程中用注射器缓慢注入溶有BSA的水溶液作为内水相,继续水浴超声 5 min,形成 W/O型乳状液。在一定温度的水浴中减压蒸发除去有机溶剂,达到胶态后在减压下继续蒸发,待完全转相成水性液体后停止减压蒸发,滴加外水相,继续旋转 40 min,充分水合即得 BSA脂质体。

**BSA脂质体粒径和 zeta电位的测定** 取上述制备的 BSA脂质体溶液 1 mL,稀释 10倍,在马尔文粒径测定仪上测定粒径和 zeta电位。

**BSA脂质体包封率的测定** 取制备的 BSA脂质体(载药量为  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 50  $\mu\text{L}$ ,在柱长为 15 cm的 G-200凝胶柱上样,对脂质体和未包封的游离 BSA进行分离。用双波长考马斯亮蓝 G-250染料法测定游离 BSA的浓度,然后计算 BSA脂质体的包封率。

**双波长紫外分光光度法测定 BSA浓度** 配置不同浓度 BSA溶液,测定 280 nm和 260 nm吸收度  $A$ ,根据公式  $A = 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$  计算双波长紫外分光光度法测得的吸收度值的范围及与蛋白质浓度的线性关系,得出该法对蛋白质的检测范围。

不同型号凝胶填料对脂质体和 BSA的分离 配制  $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  BSA溶液,并取 50  $\mu\text{L}$ ;空白脂质体 50  $\mu\text{L}$ ,分别在柱长为 15 cm的 G-75, G-100, G-150, G-200凝胶柱上样,以水为洗脱液,流出液每 1 mL为 1份,再稀释到 3 mL。在紫外-可见分光光

度计上分别于 650 nm(浊度法测定脂质体的洗脱)、280 nm和 260 nm处测量溶液的吸光度,绘制洗脱曲线图。

**低浓度蛋白质含量测定方法的研究** 蛋白质脂质体的载药浓度一般每毫升仅几毫克,甚至更低,经凝胶柱分离后,蛋白质又被稀释十倍以上,因此有必要进行低浓度蛋白质含量测定方法的研究,寻找合适的蛋白质测定方法。

**考马斯亮蓝 G-250染料法 (Bradford法)** 考马斯亮蓝能与蛋白质的疏水微区相结合,并产生变色反应,最大吸收波长从 450 nm改变为 595 nm。在一定范围内,595 nm处的吸收度与蛋白质的含量成线性关系,可测定蛋白质的浓度。

配置不同浓度 BSA溶液,考察 Bradford法测得的吸收值范围及与蛋白质浓度的线性关系,得出考马斯亮蓝 G-250染料法的检测线性范围。

**双波长考马斯亮蓝 G-250染料法** 配制不同浓度 BSA溶液,测定 450 nm和 595 nm处的吸收度  $A$ ,以两波长处吸收度的比值作纵坐标,考察双波长考马斯亮蓝 G-250染料法测得的吸收值范围及与蛋白质浓度的线性关系,得出双波长考马斯亮蓝 G-250染料法的检测范围。

## 结果

### 1 BSA脂质体的制备

以逆相蒸发法制备的 BSA脂质体外观良好,有蓝色乳光,其透射电镜照片见图 1。

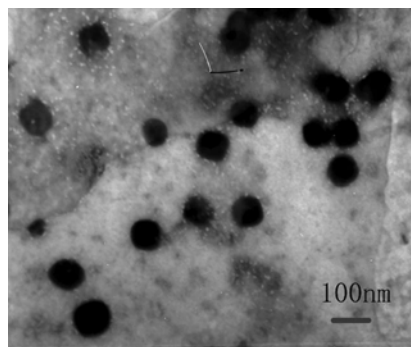


Figure 1 The TEM morphology of BSA liposome

### 2 BSA脂质体粒径和 zeta电位的测定

将 BSA脂质体稀释后在马尔文粒径测定仪上测定粒径和 zeta电位,结果如图 2和 3,由粒度测定结果可知,BSA脂质体的平均粒径为 101.2 nm,多分散系数 0.413, zeta电位为 0.8 mV。

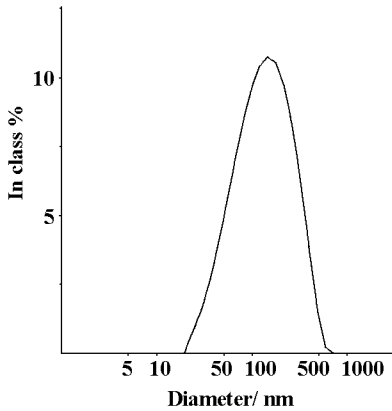


Figure 2 The particle size of BSA liposome

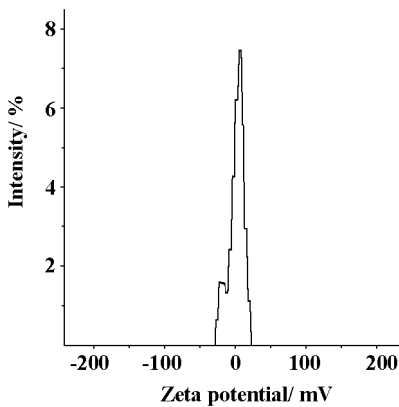


Figure 3 The zeta potential of BSA liposome

### 3 不同型号葡聚糖凝胶对脂质体和 BSA 溶液的分离情况

**3.1 双波长紫外分光光度法测定 BSA 浓度** 测量浊度时需要测定乳状液中的粒子对光反射和散射所引起光的损失,因此在测量时应尽可能降低溶液对光的吸收。在吸收度  $A$  吸收最低点,颜色对浊度的测量干扰最小,可选择该吸收度对应的波长作为测量浊度的波长。该波长一般在 600 ~ 700 nm。本文中的脂质体乳状液虽然本身没有颜色,但在紫外扫描 600 ~ 800 nm 时(图 4A)没有发现明显拐点,确定浊度测定的波长为 650 nm,空白脂质体可用浊度法在 650 nm 测量;而 BSA 在 280 nm 处有最大吸收峰(图 4B),由于蛋白质样品中可能含有核酸类物质,在 280 nm 处有干扰吸收。核酸的最大吸收峰在 260 nm 处,可通过双波长紫外分光光度法  $A = 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$  消除其对蛋白质测定的影响。

在吸收度和线性均良好的情况下,得到的吸收值-蛋白质浓度标准曲线为  $A = 0.5785C + 0.0100$  ( $r = 0.9999$ ),双波长紫外分光光度法检测范围为 0.2 ~ 2.0  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

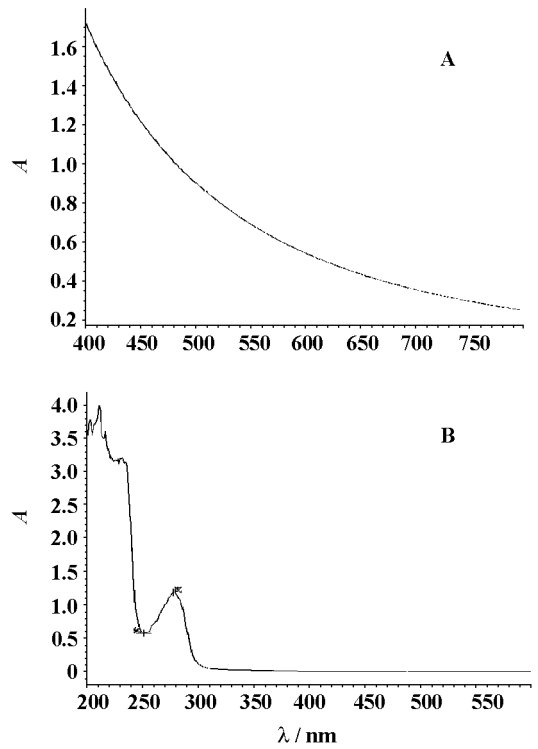


Figure 4 The UV scanning of blank liposome BSA solution

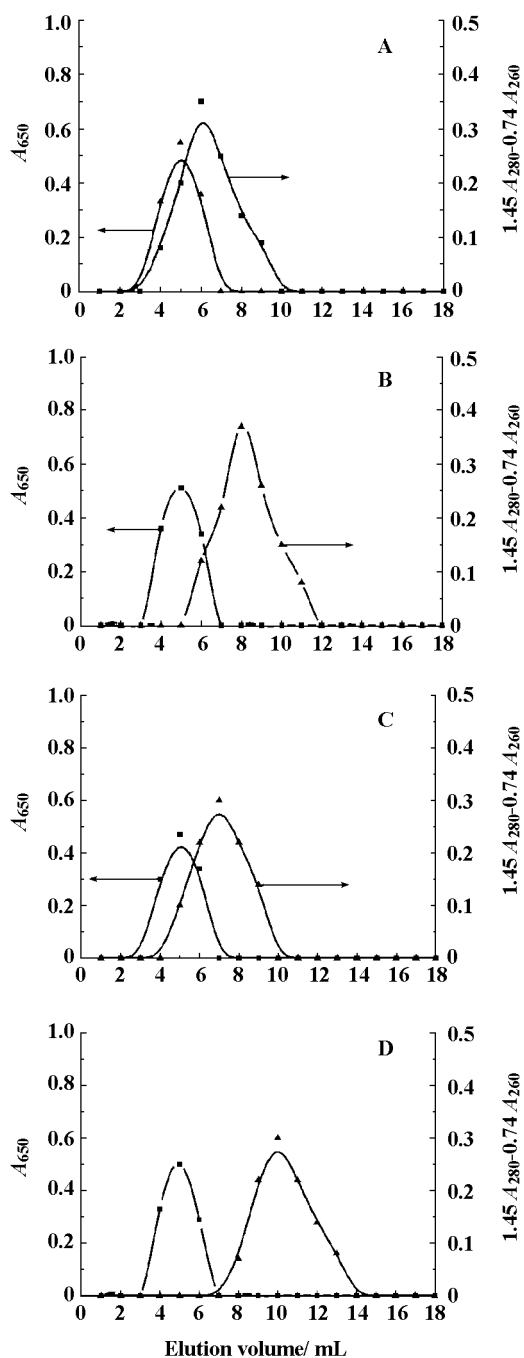
**3.2 不同型号凝胶填料对脂质体和 BSA 的分离** 选用不同型号的凝胶填料 G-75, G-100, G-150 和 G-200 装柱,固定柱长为 15 cm,分别上样空白脂质体和游离 BSA 溶液,以浊度法测定脂质体,  $A_{280}$ ,  $A_{260}$  检测 BSA,绘制的洗脱曲线如图 5 所示。

G-200 凝胶柱对空白脂质体和 BSA 的分离情况较好,基本分开,可作为测定 BSA 脂质体封装率的分离手段。

### 4 低浓度蛋白质含量测定方法的研究

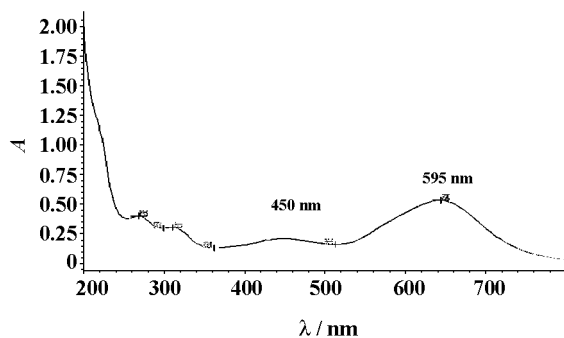
**4.1 考马斯亮蓝 G-250 染料法 (Bradford 法)** 在吸收度和线性均良好的情况下,得到的吸收值-蛋白质浓度标准曲线为  $A = 0.0055C + 0.0645$  ( $r = 0.9951$ ),检测范围为 5 ~ 80  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**4.2 双波长考马斯亮蓝 G-250 染料法** 考马斯亮蓝 G-250 蛋白质复合物具有高敏感性,受外界干扰因素影响较大。从考马斯亮蓝 G-250 溶液和考马斯亮蓝 G-250 蛋白质复合物溶液的紫外扫描图谱(图 6, 7)可以看出,游离的考马斯亮蓝 G-250 在 450 nm 和 595 nm 处均有吸收,考马斯亮蓝 G-250 蛋白质复合物仅在 595 nm 有吸收峰,用双波长法建立  $A_{595} / A_{450}$  蛋白质浓度曲线可消除游离考马斯亮蓝 G-250 的干扰,提高蛋白质的检测灵敏度。

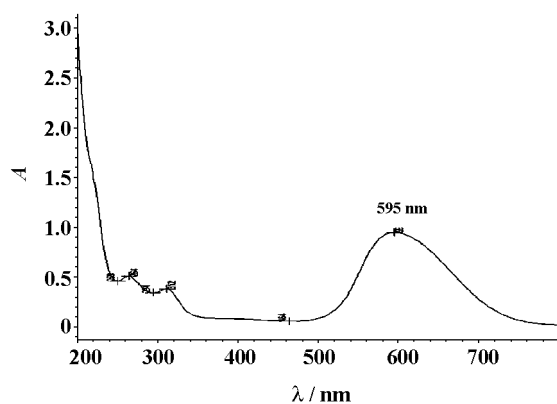


**Figure 5** The elution curve of blank liposome ( left) and free BSA ( right) through G-75 ( A), G-100 ( B), G-150 ( C), G-200 ( D) column

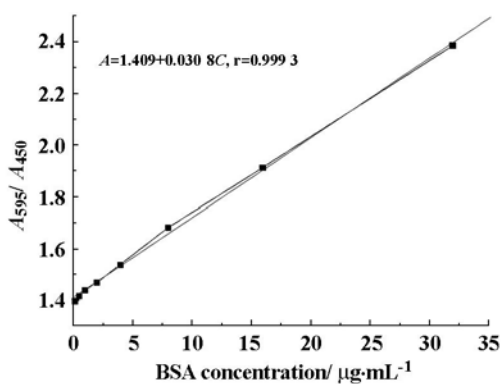
在吸收度和线性均良好的情况下, 双波长考马斯亮蓝 G-250染料法得到的标准曲线(图 8)为  $A = 0.0308C + 1.409$  ( $r = 0.9993$ ), 检测范围为  $0.25 \sim 32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。



**Figure 6** The UV scan of free coomassie brilliant blue G-250



**Figure 7** The UV scan of binding of free coomassie brilliant blue G-250 with protein



**Figure 8** The linearity of two-colorimetric assay

### 5 BSA脂质体包封率的测定

将载 BSA 的脂质体上样于 Sephadex G-200 凝胶填料装柱的 15 cm 色谱柱上, 以双波长考马法测定游离 BSA 含量, 得到所制备 BSA 脂质体(载药量为  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )的包封率为  $(32.50 \pm 2.65) \%$ 。

## 讨论

由 4 种葡聚糖凝胶填料 G-75, G-100, G-150, G-200 对空白脂质体和游离 BSA 上柱分离效果可知, G-200 凝胶柱对两者的分离情况较好,能基本分开,因此选择 G-200 凝胶柱作为测定 BSA 脂质体包封率的分离手段。

由于双波长紫外分光光度法检测范围为  $0.2 \sim 2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,只能在较高浓度范围内对蛋白质进行测定。本文所制备 BSA 脂质体的载药浓度低,经凝胶柱分离后,蛋白质又被稀释十倍以上,该法检测限过高,无法满足测定需要,因此有必要寻求有效的低浓度蛋白质含量测定方法。而考马法是最常用亦简单经济的测定蛋白质含量的方法。

文中以双波长法建立  $A_{595}/A_{450}$  蛋白质浓度曲线可消除游离考马斯亮蓝 G-250 的干扰,提高蛋白质的检测灵敏度。在吸收度和线性均良好的情况下,双波长考马斯亮蓝 G-250 染料法得到的检测范围为  $0.25 \sim 32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。与单独考马斯亮蓝 G-250 染料法 (Bradford 法) 的检测范围  $5 \sim 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  相比,检测灵敏度提高了 20 倍,检测线性范围更宽。

双波长测定法比单波长测定法灵敏度高,主要是由于双波长法不但反映了考马斯亮蓝-蛋白质结合物的吸收度,而且也反映了游离染料的吸收度。在测定过程中随着蛋白质浓度的增加,游离考马斯亮蓝染料逐渐减少,因此在蛋白质浓度发生改变时,不但染料-蛋白质结合物在 595 nm 的吸收度发生改变,而且游离考马斯亮蓝染料在 595 nm 的吸收度也发生变化,所以单采用 595 nm 波长吸收度不能确切反映染料-蛋白质浓度的变化。在 450 nm 波长时,其吸收度  $A$  在一定范围内随蛋白质浓度呈负相

关,主要是因为随着蛋白质浓度的增加,游离染料逐渐减少,所以  $A_{595}/A_{450}$  随蛋白质浓度变化的灵敏性比  $A_{595}$  更明显。实验结果表明,双波长考马斯亮蓝 G-250 染料法测定蛋白质的含量时,检测限较低,线性良好,且稳定性较好,可作为测定 BSA 脂质体包封率时微量游离蛋白质的测定手段。

## References

- [1] Li JK, Wang N, Wu XS. A novel biodegrade system based on gelatin nanoparticles and poly (lactic-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery [J]. J Pharm Sci, 1997, 86: 891 - 896.
- [2] Yokouchi Y, Tsunoda T, Imura T, et al. Effect of adsorption of bovine serum albumin on liposome membrane characteristics [J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2001, 20: 95 - 103.
- [3] Yokoyama S, Takeda T, Abe M. Preparation of ganglioside  $\text{GM}_3$  liposomes and their membrane properties [J]. Colloids Surf B: Biointerfaces, 2002, 27: 181 - 187.
- [4] Kirazov LP, Venkov LG, Kirazov EP. Comparison of the lowry and the Bradford protein assays as applied for protein estimation of membrane-containing fractions [J]. Anal Biochem, 1993, 208: 44 - 47.
- [5] Xiao YY, Song YM, Chen ZP, et al. Preparation of silybin-phospholipid complex and its bioavailability in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2005, 40: 611 - 617.
- [6] Hou DZ, Xie CS, Yang XL, et al. The investigation of microstructure of novel solid lipid nanoparticle (SLN) loaded triptolide [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2007, 42: 429 - 433.
- [7] Zhu HT, Liu JM, Yin CS. Rapid two-colorimetric assay for protein quantities [J]. Acta Acad Med Suzhou (苏州医学院学报), 2000, 20: 39 - 41.