

盐酸小檗碱脂质体的制备工艺研究

张芬, 安学勤

(南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏 南京 210097)

[摘要] 采用薄膜蒸发法制备盐酸小檗碱脂质体, 紫外分光光度——透析法测定脂质体包封率; 以盐酸小檗碱脂质体包封率为指标, 考察影响脂质体包封率的各因素. 结果表明, 制备盐酸小檗碱脂质体的最佳条件为孵化温度 60°C , 孵化时间 30 min, 胆固醇 $3.3\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 此时包封率达到最高, 且脂质体的包封率随着卵磷脂浓度的增加呈线性增加.

[关键词] 脂质体, 卵磷脂, 盐酸小檗碱, 包封率

[中图分类号] O648 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)01-0056-03

Study on Preparation of Berberine Hydrochloride Liposomes

Zhang Fen, An Xueqin

(School of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Berberine hydrochloride liposomes were prepared by thin-film evaporation method. The encapsulation efficiency of liposome was determined by UV spectrophotometric method after liposome was dialyzed. The various influences on the encapsulation efficiency were studied. The experimental results demonstrated that the liposome could get highest encapsulation efficiency when the hatched temperature was at 60°C , the hatched time was 30 min, the cholesterol concentration was $3.3\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, and the encapsulation efficiency was increased in line with the concentration of lecithin.

Key words: liposome, lecithin, berberine hydrochloride, encapsulation efficiency

0 引言

盐酸小檗碱(黄连素)是从毛茛科植物中提取的一种异喹啉类生物碱, 过去主要通过肠道给药用来治疗胃炎、细菌性痢疾以及一般肠道感染^[1]. 近十年来研究发现小檗碱对人类肝癌细胞^[2]、结肠肿瘤细胞^[3]、食管癌细胞系^[4]、恶性畸胎瘤细胞、大鼠 9L 脑肿瘤细胞^[5]等都具有一定的抑制和杀灭作用. 但盐酸小檗碱体内抑瘤作用没有体外明显, 可能因为盐酸小檗碱肠道吸收较差, 在体内很难达到对肿瘤细胞直接作用的较高的血药浓度^[1]. 盐酸小檗碱静脉给药, 可能引起药疹、过敏反应、血色素及红细胞减少、药敏性休克等副作用^[6], 1982 年以来我国已经禁止使用盐酸小檗碱静脉给药. 因此, 如何发挥盐酸小檗碱在癌症治疗上的效果, 抑制副作用是我们面临的一大问题. 脂质体是一种新的给药系统, 静脉注射脂质体后, 脂质体很快被网状内皮系统(RES)摄取, 使药物靶向于特定组织, 增加药物局部浓度, 提高药物疗效, 降低或减少药物的不良反应^[7,8]. 常温下制备脂质体主要有薄膜蒸发法、逆相蒸发法, 由于逆相蒸发法很难将有机溶剂完全去除, 因此本文采用薄膜蒸发法制备盐酸小檗碱脂质体, 测定脂质体分散颗粒的尺寸和粒

收稿日期: 2005-08-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20273032, 20573056), 江苏省高新技术资助项目(BG-2005041).

作者简介: 张芬, 女, 1981—, 硕士研究生, 主要从事物理化学的学习与研究. E-mail: z1112f@163.com

通讯联系人: 安学勤, 女, 1951—, 教授, 博士生导师, 主要从事物理化学的教学与研究. E-mail: anxueqin@njnu.edu.cn

径分布,考察影响脂质体包封率的各因素.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:紫外-可见分光光度计(U-3400 Spectrophotometer HITACHI);光散射仪(美国 BROOKHAVEN 公司,BIO200SM);原子力显微镜(AJ-III 型).

试剂:盐酸小檗碱(东北制药总厂);卵磷脂(华东师范大学化工厂);胆固醇(中国医药上海化学试剂公司,分析纯);透析袋(截留分子量 8 000—10 000);其它试剂均为分析纯.

1.2 盐酸小檗碱脂质体的制备

采用薄膜蒸发法^[9]制备盐酸小檗碱脂质体. 根据实验要求,称取不同量(50.0—300.0 mg)的卵磷脂于三角烧瓶中,用体积比为 2:1 的氯仿-甲醇溶液 3 mL 溶解,在 40℃,N₂ 气吹使溶剂挥发至样品呈玻璃态或粘稠状,抽真空至恒重. 加盐酸小檗碱溶液孵化,孵化样品充满 N₂ 气体密封放置于 60℃ 恒温水浴中孵化 30 min,取出室温冷却. 孵化后的样品采用多次透析法进行透析.

1.3 测定波长选择

紫外-可见分光光度计全波长扫描盐酸小檗碱水溶液,发现盐酸小檗碱在 190—500 nm 间有 4 个吸收峰,分别是 242、268、344、422 nm,其中 242 nm 和 344 nm 处的吸收峰较大. 为了避免卵磷脂吸收峰(最大吸收波长为 210 nm)的干扰,选择 344 nm 为盐酸小檗碱含量的测定波长.

1.4 包封率的测定

选择无盐酸小檗碱的脂质体透析溶液为参比,采用紫外-可见分光光度计在波长 344 nm 处测量透析后游离的盐酸小檗碱的含量,通过下式计算出脂质体的包封率:

$$\text{包封率} = (1 - C_{\text{游离}}/C_{\text{总}}) \times 100\%,$$

式中: $C_{\text{游离}}$ 为未包封盐酸小檗碱量; $C_{\text{总}}$ 为盐酸小檗碱总量.

2 结果与讨论

2.1 盐酸小檗碱脂质体粒径分布

光散射仪测定卵磷脂浓度为 10 mg · mL⁻¹ 的盐酸小檗碱(1 mg · mL⁻¹) 脂质体溶液,图 1 为脂质体的流体力学半径和粒径分布图,平均粒径为(122 ± 3.5) nm,脂质体粒径的单分散性较好. 图 2 为通过原子力显微镜测得的脂质体的形状及尺寸,脂质体呈球形对称分布,平均粒径为 110 nm,因为光散射测定的流体力学半径包含附着于脂质体表面的水分子,故得到的尺寸比原子力显微镜得到的尺寸稍大.

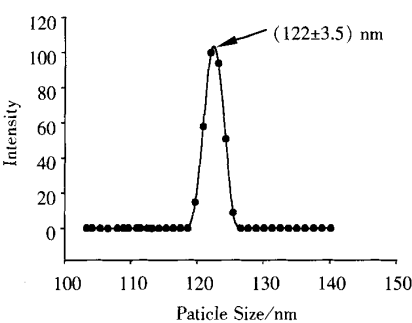


图 1 光散射仪测定的脂质体分散颗粒粒径和粒径分布

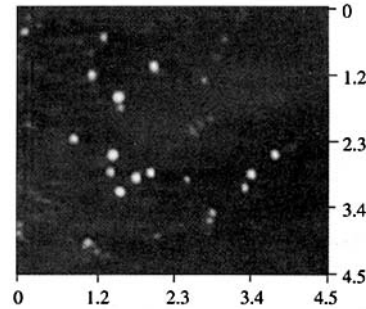


图 2 原子力显微镜测定的脂质体分散颗粒的形状和尺寸(μm)

2.2 盐酸小檗碱脂质体的孵化温度、孵化时间、卵磷脂浓度和胆固醇浓度对包封率的影响

保持盐酸小檗碱浓度为 1 mg · mL⁻¹,考察孵化温度、孵化时间、卵磷脂浓度和胆固醇浓度对脂质体包封率的影响. 研究表明:(1)盐酸小檗碱脂质体的包封率随着孵化温度呈钟型曲线,最佳孵化温度为 60℃. 卵磷脂的低临界温度为 55℃ 左右,当孵化温度低于低临界温度时,脂质体膜呈致密排列的胶晶态^[10],犹如封闭的多层球体,盐酸小檗碱很难进入脂质体中;当孵化温度高于低临界温度,脂质体膜的流

动性和通透性迅速增加^[10], 盐酸小檗碱比较容易进入脂质体内部, 单位体积包封的药物增加, 即包封率增加; (2) 盐酸小檗碱脂质体的最佳孵化时间为 30 min, 最佳孵化时间与形成的脂质体的膜材料有关. Tomohiro Imura 等^[11]采用 DPPC(二棕榈酰磷脂酰胆碱)、Ceramide 3 和 DCP 为膜材制备脂质体, 其孵化时间为 10 min; Soltan Monem A 等^[12]采用 DPPC 为膜材制备的脂质体的孵化时间为 1 h; Berg E S 等^[13]采用 POPC 为膜材制备脂质体, 其孵化时间为 3 h. 因为不同膜材形成脂质体的微观结构不同, 可形成多层泡囊或单层泡囊, 也可形成尺寸不同的泡囊, 因而, 所需要的孵化时间也不同. (3) 随着卵磷脂浓度的增加, 脂质体的包封率呈线性递增, 与 Katsuto Otake 等^[14]以 DPPC(二棕榈酰磷脂酰胆碱)为膜材制备脂质体, 其脂浓度与包封率呈线性关系的结论基本一致. (4) 胆固醇加入脂质双分子层中能有效的调节脂质双分子膜的微结构^[15]. 实验表明, 胆固醇浓度为 $3.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 胆固醇与卵磷脂具有较好的微结构, 胆固醇恰好起到稳定双层膜的作用.

3 结论

本研究结果表明薄膜蒸发法制备盐酸小檗碱脂质体可以得到粒径分布均匀的脂质体, 制备盐酸小檗碱脂质体的最佳条件为: 孵化温度为 60°C , 孵化时间为 30 min, 胆固醇为 $3.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 盐酸小檗碱包封率随着卵磷脂浓度的增加呈线性增加.

[参考文献]

- [1] 黄林清, 徐传福, 周世文, 等. 小檗碱抗肿瘤作用实验研究[J]. 中国药理学通报, 1997, 13(2): 189.
- [2] 罗彪. 黄连素抗肿瘤及放疗增敏作用的研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2004, 26(2): 278—279.
- [3] Kazunori Fukuda, Yuko Hibiya, Michihiro Mutoh, et al. Inhibition by berberine of cyclooxygenase-2 transcriptional activity in human colon cancer cells[J]. Journal of Ethnopharmacology, 1999, 66: 227—233.
- [4] Iizuka N, Miyamoto K, Norio I, et al. Inhibitory effect of coptidis rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines [J]. Cancer Lett, 2000, 148(1): 19—25.
- [5] 邓意辉, 王绍宁, 吴琼, 等. 主动载药法制备盐酸小檗碱脂质体[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(1): 40—42.
- [6] 张宪印, 安丽华, 邵智. 黄连及其制品的不良反应和治疗[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(11): 714.
- [7] 王健松, 朱家璧, 吕瑞勤, 等. 肺靶向阿奇霉素脂质体的制备及其在小鼠体内的分布[J]. 药学报, 2005, 40(3): 274—278.
- [8] 符民桂, 刘乃奎, 唐朝枢. 脂质体靶向性的研究进展[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(1): 18—21.
- [9] Peter Walde, Sosaku Ichikawa. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications[J]. Biomolecular Engineering, 2001, 18: 143—147.
- [10] 金义光, 邓英杰. 热敏脂质体[J]. 中国现代应用药学杂志, 1998, 15(6): 1—4.
- [11] Tomohiro Imura, Hideki Sakai, Hitoshi Yamauchi, et al. Preparation of liposomes containing ceramide 3 and their membrane characteristics[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001, 20: 1—8.
- [12] Soltan Monem A, Fadel M Ali, Medhat W Ismail. Prolonged effect of liposomes encapsulating pilocarpine HCl in normal and glaucomatous rabbits[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2000, 198: 29—38.
- [13] Berg E S, Skaug K. Liposome encapsulation of the internal control for whole process quality assurance of nucleic acid amplification—based assays[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55: 303—309.
- [14] Katsuto Otake, Tomohiro Imura, Hideki Sakai, et al. Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide[J]. Langmuir, 2001, 17(13): 3898—3901.
- [15] Ioanna Kyrikoua, Ioanna Dalania, Thomas Mavromoustakos, et al. The modulation of thermal properties of vinblastine by cholesterol in membrane bilayers[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2004, 1661: 1—8.

[责任编辑: 丁蓉]