

制备 HB 有效组分脂质体的工艺处方研究*

★ 刘娟^{1,2**} 胡水根¹ 卞俊¹ 汪国华³ 柯乾坤¹ (1.解放军第 411 医院药学专科中心 上海 200434; 2.江西科技师范学院药学院 南昌 330013;3.江西中医学院 南昌 330006)

摘要:目的:优化 HB 有效组分脂质体的工艺处方,提高包封率。方法:采用逆相蒸发法制备 HB 有效组分脂质体,以包封率为指标,通过正交试验对工艺处方进行了优化研究,用凯氏定氮法测定其包封率和主药含量,用紫外法测定脂质体氧化指数,用透射电镜扫描观察其外观形态和测定平均粒径。结果:最佳的处方比例为卵磷脂-胆固醇-HB 为 400:250:90,平均包封率为 $80.18\% \pm 4.08\%$,平均粒径为 $14.85 \mu\text{m}$ 。主药含量测得 HB 有效组分脂质体中含 HB 有效组分为 $6.03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。脂质体氧化程度检查测得氧化指数为 0.169。结论:优化的处方工艺合理,包封率显著提高。

关键词:HB 有效组分;脂质体;正交试验;包封率;凯氏定氮法
中图分类号:TQ 460.7 **文献标识码:**A

HB 有效组分是从海洋湖沼类贝壳软体动物园背角无齿蚌 *anodonta woodiana* (Lea) 中提取的一组具抗肿瘤活性的糖蛋白类物质。该活性糖蛋白对 7 种动物瘤株显示了较强的抗肿瘤活性^[1,2],分子量在 10 kD 以上。动物实验表明,仅腹腔注射有效,口服无效,鉴于 HB 分子量较大,注射易产生过敏反应,使得临床应用受到限制。因此将该有效组分制成脂质体口服给药,可以保护蛋白质、多肽类药物,避免其在胃肠道降解,并在一定程度上促进药物吸收,具有良好的生物相容性,不会引起副作用。经小鼠移植性肿瘤体内试验表明,该脂质体口服具有抗肿瘤活性,对 S_{180} 肉瘤、Lewis 肺癌、黑色素 B_{16} 肺转移瘤的抑瘤率分别为 48.76%、54.38%、52.66%^[3]。

本文拟对 HB 有效组分脂质体的工艺处方进行优化,按文献方法^[4]制备了 HB 有效组分脂质体,用凯氏定氮法测定其包封率和主药含量,用紫外法测定了脂质体的氧化指数。通过电镜扫描观察其形态,并用 FAM 激光粒度仪测定其粒径分布。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 SENCO 旋转蒸发器(上海申生科技有限公司),CQ50 超声波清洗器(上海超声波仪器厂),ZK401 低温高速离心机(HERMLE),离心管(HITACHI S303922A),GL-21M 离心机(上海市离心机械研究所),FA1604S 电子天平(上海天平仪器厂),透射电镜仪(TESCAN,复旦大学),FAM 激光粒度仪(上海理工大学)。

1.2 试剂 胆固醇(CH,分析纯,上海新兴化工试剂研究所,批号 030318),卵磷脂(PC,Serva 进口分装,上海伯奥生物科技有限公司,批号 031103),胆酸钠(Sodium cholate,中国医药

集团上海化学试剂公司,进口分装,批号 F20030428),硫酸标准滴定溶液(编号:0507),HB 有效组分(自制),乙醚,生理盐水均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计因素和水平的确定 采用 $\text{L}_9(3^4)$ 表,因素水平见表 1。

表 1 因素和水平表

水平	因 素		
	A 卵磷脂	B 胆固醇	C HB
1	300	100	30
2	400	150	60
3	550	250	90

2.2 HB 有效组分脂质体的制备 采用逆相蒸发法制备,取处方量的 PC 和 CH 溶于乙醚 10 mL;另取 HB 溶于 6 mL 生理盐水中,将两溶液混合于茄形瓶中,超声振荡 2 分钟(功率:50 W,每振荡 0.5 分钟,间歇 0.5 分钟);40℃ 下减压旋转蒸发除去乙醚,至成粘稠溶液后再加入 6 mL 生理盐水,超声振荡 2 分钟(每振荡 0.5 分钟,间歇 0.5 分钟);继续常压旋转蒸发 1 小时,得 HB 有效组分脂质体混悬乳浊液。

2.3 凯氏定氮法测定 HB 有效组分脂质体包封率^[5] 取 HB 有效组分脂质体混悬乳浊液 5 mL,置于离心管中,在低温高速离心机上,以 17 000 r/min 在 8℃ 下离心 1.5 小时。取上清液(包括游离药物,游离胆固醇和卵磷脂)冷冻干燥得样品粉末,作为供试品。按“2005 版药典二部附录ⅦD 氮测定法”第二法(半微量法)试验,并计算包封率。结果见表 2。

$$\text{脂质体包封率}(\%) = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$$

$W_{\text{总}}$:药物投入量, $W_{\text{游}}$:游离药物量

* 基金项目:上海市科委基金项目(No.03DZ19504)

** 通讯作者

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验号	因素			包封率 (%)
	A	B	C	
1	1	1	1	61.74
2	1	2	2	29.63
3	1	3	3	72.18
4	2	1	2	37.81
5	2	2	3	67.67
6	2	3	1	69.56
7	3	1	3	38.10
8	3	2	1	31.79
9	3	3	2	82.70
K_1	163.55	137.65	163.09	
K_2	175.04	129.09	150.14	
K_3	152.59	224.44	177.95	
R	7.48	31.78	9.27	

直观分析表明:最佳处方工艺为 $A_2B_3C_3$, 即处方比例为卵磷脂-胆固醇-HB 为 400:250:90。

按上述最佳工艺处方制备三批样品, 平均包封率为 $80.18\% \pm 4.08\%$, 重现性良好, 工艺稳定。

2.4 主药含量测定 精密量取 HB 有效组分脂质体混悬液 1.0 mL, 用水稀释至 5 mL, 混匀后, 再取 2 mL, 加入 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的胆酸钠溶液 2 mL, 氯仿 4 mL, 生理盐水 4 mL, 超声 2 分钟, 置入 20 mL 的分液漏斗中静置分层, 取上清液冷冻干燥, 并用定氮法测定。测得 HB 有效组分脂质体中含 HB 有效组分为 $5.94, 6.11, 6.04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均 $6.03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.5 脂质体氧化程度的检查 氧化指数的测定: 精密称定磷脂 40 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 成为澄清溶液, 取 $20 \mu\text{L}$ 进样。分别测定在波长 233 nm 及 215 nm 的吸光度, 由下式计算氧化指数。结果见表 3。

$$\text{氧化指数} = A_{233\text{nm}} / A_{215\text{nm}}$$

表 3 氧化指数测定结果

编号	A_{233}	A_{215}	氧化指数	X
1	0.105	0.628	0.167	0.169
2	0.106	0.628	0.169	(小于 0.2)
3	0.107	0.629	0.170	(符合药典规定)

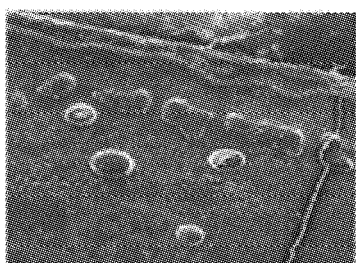


图 1 HB 有效组分脂质体扫描电镜图

2.6 HB 有效组分脂质体的形态 HB 有效组分脂质体为黄色乳状混悬液。在透射电镜下, 可以清楚的看到脂质体的囊泡状结构, 多为球形或类球形, 也有两个或三个发生粘连呈长条形, 多数为大小单室脂质体 (见图 1)。

2.7 HB 有效组分脂质体的粒径与粒度分布 取 HB 有效组分脂质体混悬液 1 mL, 用重蒸馏水稀释后滴入激光粒度仪中测定 HB 有效组分脂质体的粒径与粒度分布。(见图 2)

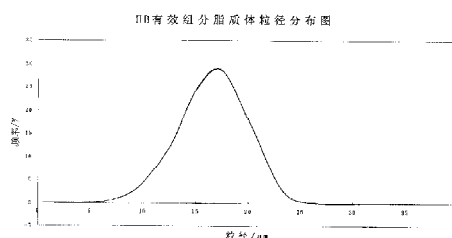


图 2 HB 有效组分脂质体粒径分布图

从 HB 有效组分脂质体的粒度分布图可知, HB 有效组分脂质体粒径主要分布在 $8.3 \sim 20.2 \mu\text{m}$ 。平均粒径为 $14.85 \mu\text{m}$ 。

3 讨论

在主药含量测定试验中, 我们曾选用 Triton X-100、乙醇、乙醚等对脂质体膜进行处理, 由于对脂质体膜破坏不完全, 导致结果偏低, 偏差较大。当同时采用胆酸钠和氯仿后, 可能是由于磷脂和胆固醇一般是在胆盐的乳化作用下进行消化的, 因此能使脂质体破坏较完全, 测定结果准确、重现性好、方法简便易行。

药理实验表明: 游离的 HB 糖蛋白口服无抗肿瘤活性, 将其制成 HB 脂质体后才显示了抗肿瘤活性, 原因可能是: 口服脂质体, 与非胃肠道应用不同, 可使细胞因子作用于 Payer's 结, 通过 Mcl 细胞的吞饮吸收, 从而使一部分药物避免了首过作用和胃肠道酶的降解, 被肿瘤细胞所摄取。此外, 脂质体作为抗癌药物载体具有增加与癌细胞的亲和力、克服耐药性、增加药物被癌细胞的摄取量、降低用药剂量、提高疗效、降低毒副作用的特点。

参考文献

- [1] 杜罗喜, 严惠芳, 胡水根, 等. HB 有效成分抗肿瘤作用的研究[J]. 中国海洋药物, 1993, 12(1): 10~12
- [2] 杜罗喜, 戴静芝, 严惠芳, 等. HB 有效成分对巨噬细胞功能的影响[J]. 中国海洋药物, 1993, 12(3): 14~16
- [3] 胡水根, 严惠芳, 王奕军, 等. 圆背角无齿蚌有效成分脂质体抗小鼠肿瘤实验研究[J]. 中国海洋药物, 2003, 94(4): 23~25
- [4] 胡水根, 朱国平, 吴萍萍, 等. 河蚌脂质体的制备方法及其应用[P]. 中国发明专利公报. CN1329885A. 2002, 01: 09
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典二部. 2000 年版[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 附录 VII D

(收稿日期: 2006-09-26)