

靶向脂质体的超临界流体技术制作和表征

孙君社¹ 王平诸² 张中义¹ 鲁 绯¹

(1. 中国农业大学食品学院; 2. 郑州工程学院)

摘 要 研究了超临界流体技术制备靶向脂质体的方法, 将 SOD 和磁性材料 Fe_3O_4 混溶后与卵磷脂充分乳化, 经超临界 CO_2 的溶胀沉析、真空冻干处理, 获得 SOD 靶向脂质体干品。当油水质量比为 7 : 1, 胆固醇与卵磷脂质量比为 1 : 3, SOD 与胆固醇质量比为 1 : 10, SOD 质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 靶向脂质体的包封率达到 96%, 包封比为 7.00%, 平均粒径为 $3.85 \mu\text{m}$, 为多层脂质体。

关键词 靶向脂质体; SOD; 超临界 CO_2 ; 包封率

中图分类号 TQ 460.6; R 944.5

Method of Producing Targeting Liposome With Supercritical Fluid Technology and Liposome Surface Morphology

Sun Junshe¹, Wang Pingzhu², Zhang Zhongyi¹, Lu Fei¹

(1. College of Food Science and Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Zhengzhou Institute of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract The method of making targeting liposome with supercritical fluid technology and liposome surface morphology were studied. The SOD was dissolved, then mixed with magnetic material Fe_3O_4 and emulsified by ultrasonic wave. The final product dry SOD was acquired by supercritical CO_2 swelling, and vacuum freezing and drying. The weight proportion of lecithin to water, cholesterol to lecithin, SOD to cholesterol and the SOD concentration were 1 : 7, 1 : 3, 1 : 10 and $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. The burying percentage reached to 96%.

Key words targeting-liposome; SOD; supercritical fluid; percentage of burying

脂质体是由磷脂双分子定向排列而成的直径几十微米至几毫米的超细粒子, 在双分子层的内外分别包封有脂溶性和水溶性药物。脂质体药物具有靶向性, 提高和延长药物疗效, 缓解毒性, 改变给药途径等特点。

近年来, 为提高靶向脂质体的靶向性和稳定性, 国内外进行了大量研究, 提出了多种形式的脂质体和制备脂质体的方法, 如薄膜分散法、注入法、超声波分散法、冷冻干燥法、冻融法、逆相蒸发法、复乳法、表面活性剂处理法、钙融合法、加压挤出法等, 脂质体的分离方法有葡聚糖或琼脂凝胶过滤法、透析法、超速离心法等。但至今脂质体仍存在着易于聚集、融合及不适于工业化规模制备等缺点^[1]。超临界 CO_2 (SFC- CO_2) 具有特殊的溶融、沉降作用, SFC- CO_2 制作法

收稿日期: 2002-03-04

江苏省科技攻关项目 (BJ97042)

孙君社, 北京清华东路 17 号 中国农业大学 (东校区) 398 信箱, 100083

具有工艺简便、易于工业化操作等特点。

本研究以超氧化物歧化酶(Super-oxide dismutase, 简称 SOD)为芯材。SOD 是生物体中主要的抗氧化酶系之一, 因其在人体内具有独特的自由基损害防御功能, 享有人体清洁剂的美称。

1 材料与方法

1.1 主要原材料和试剂

1) SOD (药物级): 鞍山美的生化厂生产, $8\ 000\ \text{u} \cdot \text{mg}^{-1}$; 2) 卵磷脂(药用级高级脂质体大豆卵磷脂): PC30, 华南理工大学精细化工厂生产; 3) 胆固醇(药用级): 北京化学试剂公司生产; 4) Fe_3O_4 : 南京大学物理系实验中心提供, 粒径 $0.5 \sim 0.6\ \mu\text{m}$ 。

1.2 主要仪器和设备

KQ 超声波机, 昆山市超声波仪器厂; ZFK-85A 型旋转蒸发仪, 上海医疗专机厂; GL-20B 冷冻离心机, 上海安婷科学仪器厂; XDS-1 型显微镜, 重庆光学仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 技术路线

SOD 溶液 磁性 SOD 溶液 W/O 型乳浊液 SCF 溶胀沉析 冷冻干燥 制品

1.3.2 磁性 SOD 脂质体的制备

1) 0.5% SOD 溶液: 将 5 g SOD 溶于 1 000 mL pH7.2 的磷酸盐缓冲液(或纯水)中, 搅拌均匀。

2) 磁性 SOD 溶液: 将 1 g Fe_3O_4 加 5 mL 蒸馏水搅拌成悬浮液, 倒入 0.5% SOD 溶液中, 搅拌成均匀溶液。

3) 磁性 SOD 与卵磷脂的混合: 取一定量的卵磷脂和胆固醇, 加正丙醇使之溶解, 再加入磁性 SOD 溶液, 经超声场乳化处理(电流 0.5 A), 使之成为稳定的 W/O 型乳浊液。

4) 磁性 SOD 脂质体的 SCF 溶胀沉析脱水: 将 W/O 型乳浊液移入 SCF 容器, 通入 $\text{SCF}-\text{CO}_2$ 使压力达 8.5 MPa, 室温下处理 30 min 后释放, 有机溶剂被 $\text{SCF}-\text{CO}_2$ 带走, 磁性 SOD 脂质体溶胀沉析而出, 油水分层而分离, 油相用蒸馏水洗 2 遍。

5) 磁性 SOD 脂质体的干燥: 将油相真空冷冻干燥, 得磁性 SOD 脂质体干品。

1.3.3 磁性 SOD 脂质体的检测

1) 表观形态的测定采用显微平板记数法。

2) 包封率 Q_w 的测定采用间接测量法。取一定量的脂质体混悬液, 用 $1\ 200\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的离心机离心 2 h, 将下层沉淀的脂质体用蒸馏水冲洗 2 遍, 收集上清液, 稀释一定倍数后, 用邻苯三酚法测 SOD 的含量。计算公式为:

$$Q_w = \frac{W_{\text{包}}}{W_{\text{总}}} \times 100\% \quad \text{或} \quad Q_w = \frac{W_{\text{总}} - W_{\text{游}}}{W_{\text{总}}} \times 100\%$$

式中: $W_{\text{总}}$ 为投料量; $W_{\text{包}}$ 为包封于脂质体的药量; $W_{\text{游}}$ 为未包入脂质体的药量。

3) 包封比 E_w 的测定方法同包封率的测定, 首先测出 $W_{\text{游}}$ 和 $W_{\text{总}}$ 。计算公式为:

$$E_w = \frac{W_{\text{总}} - W_{\text{游}}}{W_{\text{类脂}}} \times 100\%$$

式中 $W_{\text{类脂}}$ 为配方中类脂总量。

4) 体外磁响应测定^[2]。将直径 7 mm 的玻璃管水平置于磁天平下 2 块可调磁场强度的磁铁之间, 从流入端注入用 50 mL 蒸馏水混合成悬浮液的磁性 SOD 脂质体, 将磁通量密度调至 2 mT。控制流速, 收集通过磁场的流质, 真空干燥后称其质量, 测出未被定位量, 计算被磁定位的磁性 SOD 脂质体。

2 结果与讨论

表 1 和 2 示出 $L_9(3^4)$ 四因素三水平正交试验设计及其结果。从试验结果中挑选出最佳的脂质体制备配方, 从包封率、包封比等几个方面对 SOD 脂质体进行表征, 并对其体外磁响应性进行了测定。

表 1 正交试验设计表 $L_9(3^4)$

水平	因素			
	A 胆脂比	B $\rho(\text{SOD}) / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	C 油水比	D SOD 脂比
1	1 1	1.0	1 3	1 10
2	1 3	0.5	1 5	1 15
3	1 5	0.1	1 7	1 20

注: 胆固醇与卵磷脂质量比, SOD 质量浓度, 油水质量比, SOD 与卵磷脂质量比; 全文同。

表 2 试验结果

样品号	A 胆脂比	B $\rho(\text{SOD}) / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	C 油水比	D SOD 脂比	活性/ 10^4 u	包封率/ %	包封比/ %
1	1 1	1.0	1 3	1 10	1.25	90.6	4.53
2	1 3	0.5	1 3	1 15	4.00	94.0	4.70
3	1 5	0.1	1 3	1 20	5.00	63.0	2.63
4	1 1	0.5	1 5	1 15	2.00	85.0	2.83
5	1 3	1.0	1 5	1 20	6.67	95.0	3.56
6	1 5	0.1	1 5	1 10	3.33	95.0	7.92
7	1 1	0.1	1 7	1 20	2.86	95.3	2.41
8	1 3	0.5	1 7	1 10	1.00	96.3	7.25
9	1 5	1.0	1 7	1 15	5.33	96.0	5.33

2.1 包封率

由正交试验结果可知, 制备脂质体的最佳条件为: $\rho(\text{SOD}) 0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 油水比 1 7, 胆脂比 1 3, SOD 脂比 1 10。此时包封率高达 96.3%。各条件对脂质体包封率的影响由大到小顺序如下: 油水比 > $\rho(\text{SOD})$ > 胆脂比 > SOD 脂比。

各条件对脂质体包封率影响如下:

1) 油水比对包封率的影响。由图 1 可见, 随着水的增加, 脂质体的包封率增大。这是因为

水的增加,使体系分散更均匀,可以包容更多的SOD,故包封率随之增高。

2)胆脂比对包封率的影响。由图2可知,胆固醇与卵磷脂的质量比对脂质体的包封率影响较明显。随着卵磷脂的增加,脂质体的包封率先是升高然后呈降低趋势。这可能是由于SOD包埋达一定比例时,胆固醇的量相对减少,SOD包埋发生渗漏,使脂质体的稳定性减小,从而使包封率降低。

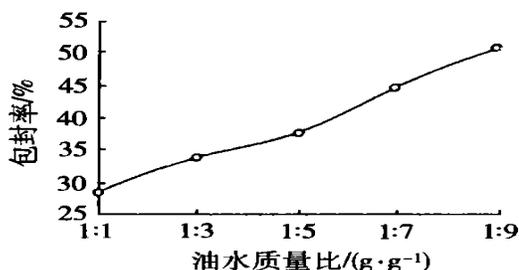


图1 油水质量比对包封率的影响

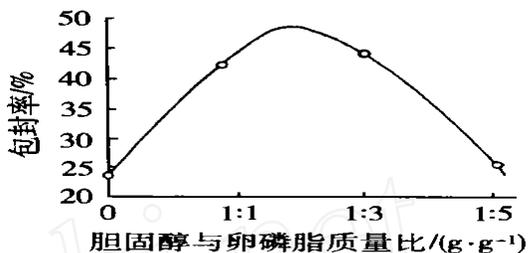


图2 胆固醇与卵磷脂质量比对包封率的影响

3)SOD与卵磷脂质量比对包封率的影响。图3表明,随着卵磷脂的增加,包封率降低。

4)SOD质量浓度对包封率的影响。由图4可以看出,在一定范围内,随着SOD质量浓度的增大,脂质体的包封率上升。这是因为SOD质量浓度增大,可以包埋的SOD量就多,在一定量的料液中其包封率就高;但当SOD质量浓度增高到一定程度,超出了油脂所能包埋的量时,其包封率就不再上升。

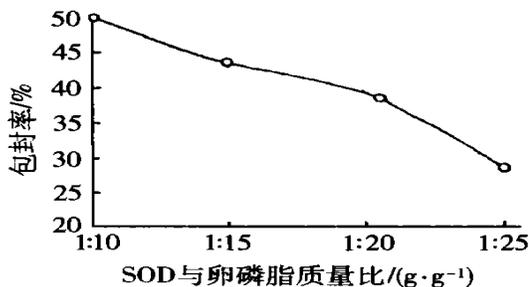


图3 SOD与卵磷脂质量比对包封率的影响

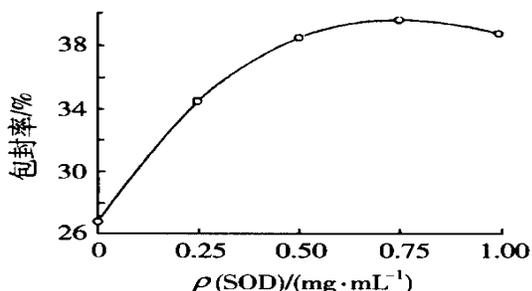


图4 SOD质量浓度对包封率的影响

2.2 包封比

试验结果表明,得到最佳包封比的条件为:油水比1:7,胆脂比1:5,SOD脂比1:10,SOD质量浓度 $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。SOD与卵磷脂质量比对包封比影响最大,其次是胆脂比,油水比,SOD质量浓度,与最高包封率的条件不完全相同。当考虑SOD脂质体的品质时,首先是SOD的包封含量,而不是包封比,再者,胆脂比为1:3还是1:5对包封比影响不是太大;因此,将制备SOD脂质体的最佳条件依然选定为高包封率的条件。

2.3 体外磁响应性

以水为介质,加入磁性脂质体1.0g,控制流速为 $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,测试脂质体的磁响应性,结果见表3。可以看出,定位率约95%,磁响应性较好。

表 3 脂质体的磁响应性

指标	样品号				平均值
	1	2	3	4	
流过量/g	0.058	0.052	0.050	0.046	0.051 5
定位率/%	94.2	94.8	95.0	95.4	94.89

3 结 论

1) 试验结果表明: 当油水质量比为 1 : 7, 胆固醇与卵磷脂质量比为 1 : 3, SOD 与卵磷脂质量比为 1 : 10, SOD 质量浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时脂质体的包封率高达 96.3%, 包封比 7.25%, 形成多层脂质体。

2) 脂质体内药物包封率是受多种因素影响的, 一般多室脂质体和大的单室脂质体的包封率较高, 小单室脂质体的包封率较低。

3) 在膜材中加入一定比例的胆固醇, 不仅能防止药物渗漏增加脂质体的稳定性, 还能提高药物的包封率。

4) 对于一定的膜材和工艺制备的脂质体, 其包封率由被包封药物本身的性质决定, 主要是由药物在脂与水两相中的溶解性决定的。

5) 利用 SCF 沉析技术消除脂质体制作过程中因表面张力引起的毛细孔塌陷、凝胶网破坏进而产生的颗粒聚集及稳定性差、靶向性差等缺点, 定位率约 95%, 磁响应性较好。

致谢: 本研究得到江苏省科技厅的大力支持, 特此感谢!

参 考 文 献

- 1 谢星辉, 徐国兴 脂质体的现状和展望 国外医学药分册, 1984(1): 5
- 2 郑文杰, 何燕岭 靶向给药系统材料与制剂 中国药学杂志, 1996(11): 664~ 666