

文章编号:1009-038X(2001)06-0594-05

生长因子(PST)脂质体的研制

孟旭, 胥传来, 乐国伟
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:通过薄膜法制备生长因子(Porcine Somatotropin, PST)脂质体, 用过滤凝胶柱法分离脂质体并测定其包封率. 在 PST 质量浓度为 0.2 mg/mL, 卵磷脂与胆固醇体积比为 5:2 时, 包封率为 26.7%. 4℃下冷藏测定发现包封率无明显变化, 故其稳定性较好. 此外, 用扫描电镜观察了 PST 脂质体的结构与形态.

关键词:生长因子; 脂质体; 包封率; 薄膜法

中图分类号: TQ 641

文献标识码: A

The Preperation of PST Liposomes

MENG Xu, XU Chuan-lai, LE Guo-wei

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The preparation of PST liposome by the thin-film method and its separation as well as its determination of encapsulation by the Gel-Filtration method were made. Under the circumstances of the PST concentration 0.2 mg/mL, the proportion of lecithin and cholesterol 5:2, the encapsulation 26.7%, the refrigeration time for 3 days. The encapsulation went up slightly. The structure and shape of the PST liposomes were also observed.

Key words: PST liposomes; encapsulation; thin-film method

近年来,随着生物技术的不断发展,脂质体制备工艺逐步完善,脂质体作用机制已被阐明^[1],加之脂质体适合于体内降解,无毒性,无免疫原性,且大量实验数据证明脂质体作为药物载体可以提高药物治疗指数,降低药物毒性和减少药物副作用,并减小药物剂量等优点^[1]. 因此,脂质体作为药物载体的研究愈来愈受到重视.

作者通过薄膜法和逆相蒸发法来制备生长因子(PST)脂质体^[9],使 PST 具有长效作用,可提高治疗指数,并用过滤凝胶法分离脂质体及测定包封率.

1 材料与方法

1.1 实验材料

卵磷脂:上海华东师大化工厂生产;胆固醇:上海生物化学试剂公司生产;十八胺:FLUKA 公司生产.

1.2 仪器

旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂制;过滤凝胶柱,自制.

收稿日期:2001-02-26; 修订日期:2001-08-29.

作者简介:孟旭(1964-),男,江苏连云港人,粮食工程博士研究生.

万方数据

1.3 实验方法

1.3.1 薄膜法 按摩尔比 7:2:1 称取卵磷脂(相对分子质量 777.9) 1.7661 g,胆固醇(相对分子质量 386.66) 0.1103 g,十八胺相对分子质量 269.52) 0.0390 g,转移至圆底烧瓶中,加 30 mL 氯仿,使其完全溶解,于 45 ℃ 旋转蒸发至干燥薄膜,量取 50 mL PBS 缓冲液($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7 的缓冲液)加入圆底烧瓶中,振荡即成空白脂质体^[2].

1.3.2 逆相蒸发法 按摩尔比 7:2:1 称取卵磷脂 0.7659 g,胆固醇 0.1100 g,十八胺 0.0394 g,转移至圆底烧瓶中.加 30 mL 氯仿,使其完全溶解.量取 PBS 40 mL 与上述溶液混溶.在 40 ℃ 下超声处理 5 min,并在相同温度下减压除去氯仿至形成胶态^[6],再加 10 mL PBS,使壁上的凝胶脱落,并继续减压蒸发除去微量氯仿.放置 30 min,混悬液不分相即可.

1.3.3 冰冻熔融法 称取卵磷脂 0.7661 g,胆固醇 0.1100 g,十八胺 0.3901 g.加入 30 mL 氯仿,使其完全溶解^[8].于 45 ℃ 下旋转蒸发至干燥薄膜.量取 50 mL PBS,加入圆底烧瓶中,振荡使薄膜脱落.超声处理 5 min^[12],置低温冰箱冷冻. 5 min 后取出融化,充分振荡^[10].

2 结果与讨论

2.1 脂质体的分离及包封率的测定

2.1.1 纯 PST 标准曲线的制定 分别配制质量浓度为 0.1,0.2,0.3,0.5 的系列 PST 标准溶液,通过凝胶柱,在 260 nm 处比色,即可得质量浓度在 0.1~0.5 mg/mL 之间的质量浓度-面积标准曲线,结果见表 1.

表 1 检测波长的选择

Tab.1 Selection of examine wave length

波长/nm	吸光度	
	0.1 mg/mL	0 mg/mL
280	0.125	0.074
220	0.137	0.084
260	0.237	0.163
265	0.206	0.138

2.1.2 吸光度-时间关系的确定 纯 PST 溶液通过凝胶柱与紫外分光光度计连接的装置时,随着 PST 出柱,有一系列吸光度值^[3],通过计时可获得一个吸收峰,结果见表 2.

表 2 吸光度-时间关系

Tab.2 Connection of absorbency-time

时间/min	吸光度			
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
0	0	0	0	
1	0.001	0.002	0.004	0.006
2	0.004	0.005	0.018	0.024
3	0.008	0.020	0.034	0.034
4	0.016	0.046	0.048	0.045
5	0.022	0.042	0.052	0.054
6	0.020	0.040	0.046	0.058
7	0.018	0.037	0.043	0.061
8	0.015	0.035	0.040	0.064
9	0.009	0.031	0.038	0.067
10	0.003	0.029	0.034	0.065
11	0	0.024	0.030	0.061
12		0.017	0.026	0.057
13		0.008	0.021	0.052
14		0.003	0.013	0.045
15		0	0.007	0.036
16			0.002	0.027
17			0	0.016
18				0.006
19				0.002
20				0

其中 A₁ 质量浓度为 0.1 mg/mL, A₂ 质量浓度为 0.2 mg/mL, A₃ 质量浓度为 0.3 mg/mL, A₄ 质量浓度为 0.5 mg/mL,得 S_{0.1} = 25, S_{0.2} = 65, S_{0.3} = 85, S_{0.5} = 150.

表 3 PST-S 标准曲线

Tab.3 Standard curve of PST-S

质量浓度/(mg/mL)	S
0.1	25
0.2	65
0.3	85
0.5	150

2.2 薄膜法制备 PST 脂质体包封率测定

在 SephadexG-50 层析柱上,把脂质体和游离的 PST 分成两个流份,层析条件为:进样量每次 100 mL,流动相为 Tris-HCl 溶液,体积流量为 1 mL/min,紫外检测波长为 260 nm^[3].

包封率 = (C_总 - C_游)/C_总. 其中 C_总为脂质体混悬液中 PST 总量, C_游为未包入的 PST 量, C_总为 0.2 mg/mL,由 S_游 = 47 查得 C_游 = 0.164 mg/mL,

包封率 = $(0.2 - 0.164) \div 0.2 = 18\%$ 。

通过薄膜法成功地制备了 PST 脂质体,形态与空白脂质体相似,并用过滤凝胶法成功地分离出游离的 PST. 通过测定包封率(18%)可知,文献[4]报道的经典方法其包封率较低,因此在下一轮实验中,作者着重研究包封率的影响因素. 由于凝胶柱

的稳定性对实验结果好坏影响甚大,故层析条件在不同的实验中应控制一致.

2.3 适宜条件的选择

包封率的测定值见表 4,不同的药物质量浓度对包封率的影响见表 5.

表 4 包封率的测定值

Tab.4 The meansuring value of encapsulation

时间/min	吸光度	时间/min	吸光度	时间/min	吸光度	时间/min	吸光度
0	0	9	0.041	18	0.010	27	0.015
1	0.002	10	0.025	19	0.011	28	0.013
2	0.003	11	0.019	20	0.010	29	0.012
3	0.007	12	0.016	21	0.012	30	0.010
4	0.166	13	0.012	22	0.013	31	0.007
5	0.606	14	0.011	23	0.014	32	0.005
6	0.320	15	0.009	24	0.015	33	0.003
7	0.137	16	0.008	25	0.016		
8	0.070	17	0.009	26	0.017		

表 5 不同的药物浓度对包封率的影响(卵磷脂与胆固醇体积比为 7:2)

Tab.5 Effect of different medication consistency to encapsulation

时间/min	吸光度			时间/min	吸光度			时间/min	吸光度		
	A ₁	A ₂	A ₃		A ₁	A ₂	A ₃		A ₁	A ₂	A ₃
0	0.001	0	0	13	0.014	0.128	0.054	26	0.003	0.026	0.059
1	0.007	0.008	0.007	14	0.011	0.020	0.044	27	0.002	0.019	0.064
2	0.198	0.430	0.302	15	0.008	0.015	0.032	28		0.017	0.060
3	0.456	0.987	0.756	16	0.006	0.011	0.024	29		0.012	0.054
4	0.956	1.245	1.278	17	0.007	0.008	0.013	30		0.008	0.051
5	0.632	0.865	0.896	18	0.010	0.013	0.010	31		0.006	0.042
6	0.278	0.532	0.632	19	0.013	0.119	0.008	32		0.004	0.025
7	0.182	0.280	0.478	20	0.016	0.025	0.008	33		0.002	0.096
8	0.114	0.198	0.312	21	0.015	0.033	0.010	34			0.010
9	0.066	0.108	0.256	22	0.013	0.042	0.016	35			0.007
10	0.041	0.076	0.186	23	0.011	0.046	0.027	36			0.004
11	0.023	0.054	0.106	24	0.008	0.040	0.036	37			0.003
12	0.017	0.140	0.068	25	0.006	0.033	0.049	38			0

其中 A₁ 质量浓度为 0.1 mg/mL,包封率为 $(0.1 - 0.0787) \div 0.1 = 21.3\%$;A₂ 质量浓度为 0.3 mg/mL,包封率为 $(0.3 - 0.252) \div 0.3 = 11\%$;A₃ 质量浓度为 0.5 mg/mL,包封率为 $(0.5 - 0.435) \div 0.5 = 13\%$ 。

通过本轮实验可知,在空白脂质体一样时,改变药物质量浓度对包封率的影响较大,随着质量浓度的增加,包封率呈下降趋势,这种现象可能与 PST 本身的特性有关. 磷脂浓度对 PST 的影响见表 6.

通过提高磷脂浓度可知,5#组的包封率最高,明了膜之间的比例对包封率影响很大.各试验组的A₅(5#)的包封率为(0.2-0.158)÷0.2=21%,表 包封率见表 7.

表 6 磷脂浓度对 PST 的影响

Tab.6 Effect of lecithin consistency to PST

组号	卵磷脂质量/g	胆固醇质量/g	十八胺质量/g	PST 质量/mg	PBS 体积/mL	氯仿体积/mL
1	0.5835	0.5801	0.1344	10.01	50	30
2	1.167	0.5798	0.1340	10.02	50	30
3	2.334	0.5802	0.1342	9.98	50	40
4	2.918	0.5896	0.1345	9.98	50	40
5	3.501	0.5901	0.1346	10.03	50	50
6	4.668	0.5902	0.1347	10.00	50	50

注 卵磷脂与胆固醇的体积比为 1:2 2:2 4:2 5:2 6:2 8:2.

表 7 各试验组的包封率

Tab.7 Encapsulation of each experiment team

时间/min	吸光度						时间/min	吸光度					
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆		A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆
0	0	0.001	0	0.001	0	0	25	0.005	0.015	0.014	0.023	0.006	0.009
1	0.017	0.033	0.004	0.036	0.019	0.026	26	0.003	0.020	0.014	0.029	0.004	0.010
2	0.294	0.656	0.018	0.434	0.286	0.251	27	0.002	0.022	0.014	0.020	0.003	0.011
3	0.852	0.951	0.292	0.867	0.816	0.921	28	0	0.025	0.015	0.016	0.001	0.012
4	0.532	0.824	0.730	1.123	1.076	1.284	29		0.026	0.015	0.013	0	0.014
5	0.302	0.367	0.355	0.923	0.967	1.310	30		0.027	0.015	0.011		0.015
6	0.183	0.215	0.123	0.526	0.556	1.194	31		0.025	0.015	0.009		0.016
7	0.086	0.145	0.051	0.278	0.254	0.752	32		0.022	0.015	0.009		0.018
8	0.063	0.105	0.028	0.158	0.148	0.390	33		0.018	0.014	0.010		0.019
9	0.048	0.079	0.020	0.101	0.110	0.221	34		0.014	0.012	0.008		0.017
10	0.036	0.060	0.015	0.068	0.080	0.144	35		0.009	0.010	0.011		0.015
11	0.028	0.047	0.012	0.042	0.063	0.102	36		0.006	0.007	0.014		0.014
12	0.022	0.038	0.011	0.034	0.049	0.077	37		0.002	0.003	0.019		0.013
13	0.014	0.030	0.010	0.029	0.040	0.058	38		0	0.011	0.023		0.012
14	0.011	0.025	0.009	0.020	0.032	0.046	39						0.011
15	0.009	0.021	0.009	0.016	0.025	0.032	40						0.009
16	0.007	0.017	0.009	0.013	0.021	0.025	41						0.007
17	0.010	0.014	0.009	0.011	0.017	0.022	42						0.006
18	0.018	0.012	0.009	0.009	0.019	0.017	43						0.005
19	0.036	0.009	0.009	0.009	0.038	0.015	44						0.004
20	0.043	0.009	0.010	0.010	0.030	0.013	45						0.003
21	0.035	0.018	0.011	0.008	0.018	0.012	46						0.002
22	0.023	0.019	0.009	0.011	0.015	0.011	47						0.001
23	0.015	0.011	0.010	0.014	0.011	0.010	48						0
24	0.008	0.012	0.012	0.019	0.008	0.008							

取上述实验的 5# 组分 4 批分别冷藏(4℃)1, 2,3,4 d,再测定其包封率,结果见表 8.

表 8 冷藏时间对包封率的影响

Tab.8 Effect of refrigerated time to encapsulation

时间/d	包封率/%
1	26.5
2	27.0
3	27.3
4	27.2

包封率随着冷藏时间略有升高,到第 3 天时达到 27.3%. 整个开幅不是很大,可知在 4℃ 下 PST 脂质体基本上保持稳定.

最近有报道用逆相蒸发法制备脂质体包封率可达 31.6%^[13],并且,用此法做成的样品脂质体形态较易观察.用逆相蒸发法比一般的薄膜法有更高的包封率.

2.4 PST 脂质体形态观察

用逆相蒸发法制备的脂质体混悬液经离心^[7],再冷冻干燥后成固体颗粒状,样品用 PhieipsSX-40 型扫描电镜观察^[5],PST 脂质体基本呈圆球形.



图 1 PST 脂质体形态
Fig.1 Configuration of PST liposome

参考文献：

[1] 平其能,胡一桥,吴建平等. 现代药剂学[M]. 北京 中国医药科技出版社,1998.

[2] 陆彬. 药物新剂型与技术[M]. 北京 人民卫生出版社,1998.

[3] 李建武,陈来同. 生物化学实验原理与方法[M]. 北京 北京大学出版社,1994.

[4] 顾学裘. 中国多相脂质体研究[M]. 北京 中国医药科技出版社,1991.

[5] 顾学裘. 阿霉素脂质体研究[M]. 北京 中国医药科技出版社,1999.

[6] 薛玉英. 阿糖腺苷脂质体的制备[J]. 药学报,1991,27(1) :74~80.

[7] 王俊平,顾学裘. 喷雾干燥法制备前体脂质体的研究[J]. 中国药理学杂志,1994,8(2) :40~45.

[8] 赵健,王小安. 冻融法制备 SOD 脂质体[J]. 中国医药工业杂志,1996,27(8) :37~42.

[9] PICKV ARCH. Possible strategies for the formulation of antioplastic chugs[J]. Biochem Biophys, 1981,212 :186~189.

[10] CHAN P H, HIGGINS J, HODGES NA, *et al.* Factors influencing cryoprotective activity and drug leakage from liposomes after freezing[J]. Ahn Nearol, 1987, 21 :540~544.

[11] FREEMAN B A, LLEYD A W, BAKER J A, *et al.* Study of modified betaine as cryoprotective additives[J]. Feed Proc, 1985, 44 :2591~2598.

[12] TURRENS J F, OKADA J, LANGER R, *et al.* Effect of cholesterol on liposome stability to ultrasonic disintegration and sodium cholate solubilization[J]. J cliu Invest, 1984, 73 :87~91.

[13] TAKASHI O, LWYD A W, OLLIFF C J, *et al.* Improvement of encapsaltion efficiency of wator-solute drags in liposomes formed by the fraze[J]. Thawing Method, 1985,33 :39~45.

(责任编辑 李春丽)