

文章编号 :1009-038X(2002)02-0191-03

猪用生长激素脂质体的化学稳定性

胥传来, 乐国伟, 姚惠源

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:通过逆相蒸发法制备猪用生长激素脂质体,重点探讨外界环境和主要原料对猪用生长激素脂质体化学稳定性的影响.经过实验研究发现,猪用生长激素脂质体在环境液 pH 为 7 左右和冷藏状态下较稳定,包封率达到 89% 左右.

关键词:脂质体;逆相蒸发法;包封率

中图分类号 S 859;S 816.73

文献标识码:A

Study on Chemical Stability of PST Liposome

XU Chuan-lai, LE Guo-wei, YAO Hui-yuan

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

Abstract: Through the experiments, it was proved that PST liposome prepared by reverse phase evaporation could be in the most stable state under neutral pH of environmental solution and refrigerated storage. Encapsulation was 89%. This is the first step of the research on applying PST liposome on clinical tests.

Key words: Liposome; reverse-phase evaporation; encapsulation

生长激素(GH)是垂体前叶合成和分泌的一种肽类激素,由 191 个氨基酸构成^[1].自 Turman 和 Andrew 于 1995 年发现并报道注射外源生长激素对猪作用以来,大量的研究已经证明,生长激素显著提高了家畜的生长速度,降低单位自增重的饲料消耗量,促进了家畜肌肉的生长和减少了脂肪组织的合成^[2];同时,基因工程的发展已经能够产生大量的重组猪生长激素,加之家畜的生长激素对人并无影响,这无疑使生长激素的应用前景更加广阔.

随着进一步的研究和试用,猪用生长激素(PST)可望广泛应用于国内的养猪生产.但由于生长激素属于生物活性肽类似物,在体内的半衰期较短,使用时很难得到较好的效果,因此,关键在于加

强生长激素给药技术.

脂质体是一种定向药物载体,属于靶向给药新剂型^[3].脂质体由具有双层膜的磷脂组成,它具有类细胞结构,进入体内主要被网状内皮系统吞噬而激活抗体的自身免疫功能,并改变包封药物的体内分布,使药物主要在肝、肺、脾和骨髓等组织器官中蓄积.从而提高了药物的治疗指数,减少药物的治疗剂量和降低药物的毒性.脂质体可以包囊脂溶性和水溶性两种类型的物质^[4],具有长效性和保护被包封物质的作用,使包封物不易被破坏^[5].实验证明,将一些不稳定、易氧化的药物包封在脂质体中,药物因受到脂质体双层膜的保护,在很大程度上提高了药物的稳定性.

收稿日期 2001-12-11; 修订日期 2001-12-21.

作者简介:胥传来(1965-),男,江苏盐城人,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生,副教授.

万方数据

逆相蒸发法是一种常用的脂质体制备方法,其所得脂质体大小均匀,包裹率高,脂质体稳定,但该方法需要超声波处理以使有机相与水相混合,并用鱼精蛋白分离脂质体并测定包封率,但脂质体在溶液状态下仍存在问题^[6],脂质体分散系的不稳定性,如药物渗漏少,粒子的聚集以及磷脂在液态下的氧化水解^[7],这影响了脂质体在临床上的应用。

本文主要报道了通过测定 PST 脂质体在不同 pH、温度等条件下的包封率,研究 PST 脂质体的化学稳定性,并通过测定酸价分析脂质体的氧化情况,为 PST 脂质体的进一步开发以及将来应用于临床提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

旋转蒸发器 上海玻璃仪器二厂 ZFA-1 型;超声波处理器 Sonics & Materials Vibra Cell;分光光度计 UV755B 型;天平 AB204-N 型;数量调节仪 XMT-152A 型;以及 pH 计、培养箱、台式离心机等。

1.2 实验方法

采用逆相蒸发法,将磷脂等膜材溶于有机溶剂如乙醚等,加入待包封药物的水溶液,进行短时超声处理,直至形成稳定的 W/O 型乳剂,然后减压蒸发除去有机溶剂,达到胶态后,滴加缓冲液,旋转帮助器壁上的凝胶脱落,然后继续蒸发,制得水性混悬液,通过超速离心法,除去未包封的药物,即得到大单层脂质体^[8]。

2 结果与讨论

2.1 PST 脂质体受不同 pH 值环境的影响

Grit 等的研究表明,卵磷脂、饱和大豆卵磷脂和磷脂酰甘油酯等的水解都受 pH 值的影响^[9]。在实验条件下,磷脂酰甘油酯的水解速度比部分饱和蛋黄卵磷脂的水解速度快。水解产物可以使脂质体混悬液的 pH 值下降,加速脂质体的进一步水解。

实验一:用盐酸、Pbs 缓冲液及氢氧化钠配出不同 pH 值的环境液,然后将所制 PST 脂质体,取样品若干,每份 5 mL,放入环境液(10 mL)中,10 h 后测定其包封率,结果见图 1。

实验二:用盐酸、Pbs 缓冲液及氢氧化钠配出不同 pH 值的环境液,然后将所制 PST 脂质体,取样品若干,每份 5 mL,放入透析袋中,透析袋的两端用密封夹夹住,然后放入不同 pH 环境液(10 mL)中,

10 h 后测定透析袋中脂质体的包封率,结果见图 2。

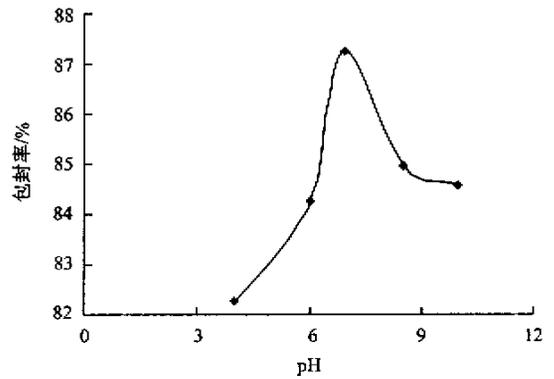


图 1 不同 pH 环境液对包封率的影响

Fig. 1 The effect of different pH on EE

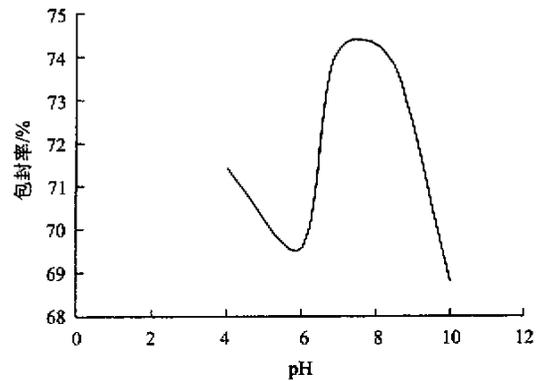


图 2 不同 pH 环境液下透析袋中脂质体包封率的变化

Fig. 2 Correlation between EE and pH of penetrating package

1) 实验证明,在中性条件下,脂质体的稳定性较好,随着环境液碱性的增加,其包封率略有下降。

2) 在酸性条件下,PST 脂质体不太稳定,随着环境液的酸性增强,其包封率下降较大。

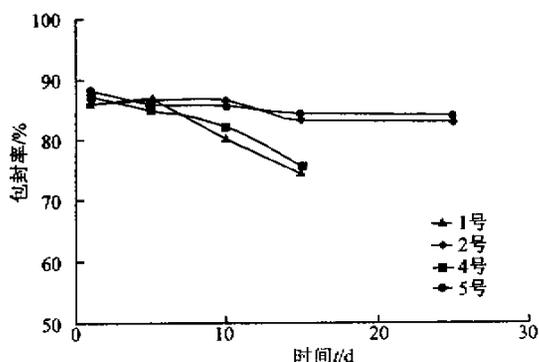
3) 在透析袋中,虽然在 pH 为 6.9 时,包封率也为最高,但随着酸度增加包封率略有下降,且随着碱度增加包封率亦有下降,这主要跟脂质体在透析袋中的透析作用有关。

因此,作者在 PST 脂质体的混悬液中加入 Pbs 缓冲液,使 pH 值定在脂质体最稳定的范围中。

2.2 不同温度下 PST 脂质体的稳定性

温度升高,加速磷脂的水解,水解速度常数与温度的关系符合 Arrhenius 方程,但直线在卵磷脂的相变温度(52 °C)处发生断裂^[10]。

制取两瓶 PST 脂质体,分别等体积分成 6 份,编号为 1~6 号。把 1 号和 4 号放在室温(20 °C)下,2 号和 5 号放入冰箱中冷藏,3 号和 6 号放入 40 °C 培养箱中,结果见图 3。



注: 3号、6号已变性, 在图中未标出。

图 3 温度对 PST 脂质体稳定性的影响

Fig. 3 The effect of temperature on the stability of PST liposome

PST 脂质体主要应用于猪的注射液,为了 PST 脂质体的临床应用和以后的市场推广,其储藏尤其重要,实验证明,新制的 PST 脂质体放入冰箱冷藏后,开始包封率略有上升,后来包封率较为稳定,保存 25 d 后包封率变化不大,证明 PST 脂质体在冷藏条件下有很好的稳定性。但在室温下 PST 脂质体不太稳定,包封率下降较快,而且容易变性。在 40 °C 培养箱中的 PST 脂质体 10 d 后取出,发现有难闻的臭味,已明显变性。

2.3 灭菌对 PST 脂质体包封率的影响

PST 脂质体易被细菌侵蚀而变质,因为脂质体使用的脂类物质多是支持细菌生产的最好培养基。因而为了延长 PST 脂质体的使用效果和时间,必须进行灭菌处理^[11]。灭菌法是指杀灭或除去所有微生物的繁殖体和芽孢的技术。因为高温高压灭菌和辐射灭菌是针对生物和药物制品最常用的两种灭菌法,因而在本节中主要探讨这两种方法对 PST 脂质体的灭菌。

1) 高温高压对脂质体的影响 热压法灭菌是用压力大于常压的饱和水蒸汽加热杀灭微生物的方法^[12]。一般具有很强的灭菌效果,灭菌可靠,能杀灭所有细菌繁殖体和芽孢,是制剂生产中常用的一种

灭菌方法。热压灭菌所需的温度(蒸汽表压)与时间的关系如下:115 °C(67 kPa),30 min;121 °C(97 kPa),20 min;126 °C(139 kPa),15 min。为了更好地储藏 PST 脂质体,作者进行了高温高压法灭菌。在 125 °C,0.07 MPa 条件下灭菌 0.5 h。再观察 PST 脂质体,其颜色变成浅黄色,并出现混浊沉淀。因而 PST 脂质体不能经受高温高压灭菌,其制备工艺还将进一步改进。

2) 辐射灭菌 以放射性同位素⁶⁰Co 辐射出的 γ 射线杀菌的方法^[13]。射线可使有机化合物的分子直接发生电离,产生破坏正常代谢的自由基,导致微生物体内的大分子化合物分解。辐射灭菌的特点是不升高灭菌产品的温度,穿透性强,适应于不耐热药物的灭菌。⁶⁰Co 辐射灭菌法是近 20 年来逐渐发展起来的新消毒灭菌工艺,已广泛用于食品、药品和医疗器械等的灭菌。将制得的 PST 脂质体入化验室进行辐射。辐射前脂质体的包封率为 80.8%,辐射后变为 76.8%,但形态没有发生明显变化。

通过高温高压灭菌和⁶⁰Co 辐射灭菌两个实验,从结果可以看出在高温高压灭菌实验中,受试 PST 脂质体的形态都发生了明显的变化,因而说明 PST 脂质体在高温高压下不太稳定,因此在 PST 脂质体的制备中将工艺作进一步改进。而在⁶⁰Co 辐射灭菌实验中,⁶⁰Co 辐射灭菌使 PST 脂质体既能保证达到无菌要求,便于 PST 脂质体的储藏,又能保持脂质体的形态和药物的化学稳定性不改变,对于 PST 脂质体是一种较好的灭菌方法。

3 结 语

通过逆相蒸发法制备 PST 脂质体,探讨了外界环境和主要原料对 PST 脂质体化学稳定性的影响。经试验论证,得出 PST 脂质体在环境液 pH 为 7 左右最稳定,PST 脂质体在冷藏状态下最稳定,包封率达到 89%左右。为 PST 脂质体的临床应用作了初步的探索。

参考文献:

- [1] 陈庄. 猪生长激素的应用研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 1999, 24(4): 1-3.
- [2] 曾礼华. 动物生长激素与畜牧生产[J]. 动物营养学报, 1999, 10(4): 4-6.
- [3] 王长虹. 脂质体的物理化学稳定性研究进展[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(2): 65-67.
- [4] HIGGINS J, HODGES N A, OLLIFF C J, et al. Factors influencing cryoprotective activity and drug leakage from liposomes after freezing[J]. J Pharm Pharmacol, 1986, 258-259.
- [5] LLEYD A W, BAKER J A, SMITH G, et al. A comparison of glycine, sarcosine, N,N-dimethylglycine, glycinebetaine and N-modified betaines as liposome cryoprotectants[J]. J Pharm Pharmacol, 1992: 504-507.

grown on glucose [J]. **J Biotechnol** , 1997 , 58 : 33.

- [90] LANGENBACH S , REHM B H A , STEINBUCHER A. Functional expression of the PHA synthase gene phaC1 from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly (3-hydroxyalkanoate) synthesis [J]. **FEMS Microbiol Lett** , 1997 , 150 : 303.
- [91] TIAN G , WU Q , SUN S Q , *et al.* Study of thermal melting behavior of microbial polyhydroxyalkanoates using two-dimensional fourier-transform infrared FT-IR correlation spectroscopy [J]. **Appl Spectrosc** , 2001 , 55 (7) : 888.
- [92] WU Q , TIAN G , WU Q , *et al.* Study of microbial poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) using two-dimensional fourier-transform infrared correlation spectroscopy [J]. **J Appl Polym Sci** , 2001 , 82 : 934.
- [93] WALLE G A M , BUISMAN G J H , WEUSTHUIS R A , *et al.* Development of environmentally friendly coatings and paints using medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder [J]. **Int J Biol Macromol** , 1999 , 25 (1-3) : 123.
- [94] WILLIAMS S F , MARTIN D P , HOROWITZ D H , *et al.* PHA applications : addressing the price performance issue I. Tissue engineering , Int [J]. **J Biol Macromol** , 1999 , 25 : 111.
- [95] ANGELO D P. Chiral chemistry is still evolving , driven by techniques and business demands [J]. **Genetic Engineering News** , 1996 , (6) : 15.
- [96] LEE S Y , LEE Y , WANG F L. Chiral Compounds from Bacterial Polyesters : Sugars to Plastics to Fine Chemicals [J]. **Biotechnol Bioeng** , 1999 , 65 : 363.
- [97] LEE Y , PARK S H , LIM I T , *et al.* Preparation of alkyl (R) - (-) -3-hydroxybutyrate by acidic alcoholysis of poly- (R) - (-) -3-hydroxybutyrate [J]. **Enzyme and Microbial Technol** , 2000 , 27 : 33.

(责任编辑 : 杨 萌 , 朱 明)

(上接第 193 页)

- [6] LLOYD A W , OLLIFF C J , RUTT K J. Study of modified betaine as cryoprotective additives [J]. **J Pharm Pharmacol** , 1994 : 704 - 707.
- [7] OKADA J , COHEN S , LANGER R. In vitro evaluation of polymerized liposomes as oral drug delivery system [J]. **Pharm Res** , 1995 , 12 (4) : 576 - 579.
- [8] 顾学裘编. 药物制剂新剂型选编 [M]. 北京 : 人民卫生出版社 , 1985. 102 - 104.
- [9] 平其能编. 现代药剂学 [M]. 北京 : 中国医药科技出版社 , 1998. 588 - 600.
- [10] GRIT M , UNDERBERG W J M , CROMMELIN D J A. Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions [J]. **J Pharm Sci** , 1993 , 82 (4) : 362 - 368.
- [11] GRIT M , DE SMIDT J H , STRUIJKE A. *et al.* Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions [J]. **Int J Pharm** , 1989 : 1 - 4.
- [12] JANDAMEN. Transfer of phosphatidylcholine between liposomes and human plasma high density lipoprotein [J]. **Biochim Biophys Acta** , 1982 : 444 - 448.
- [13] CHEN T. Possible strategies for the formulation of antineoplastic drugs [J]. **Drug Dev Ind Pharm** , 1986 , 12 (7) : 1041 - 1044.

(责任编辑 : 秦和平)