

鬼臼毒素二棕榈酰磷脂酰胆碱前体脂质体的研制及特性观察

鬼臼毒素(podophyllotoxin, PPT)亦名足叶草毒素,是1990年世界卫生组织推荐作为治疗生殖器疣的一线药物[1]。脂质体是最近几年研究较多的新型受控缓释药物载体[2][3],将PPT制成脂质体制剂,会在一定程度上改善PPT的药代动力学和药理学,对尖锐湿疣的抗复发治疗有更好的疗效[4]。相关研究显示二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)脂质体在皮肤外用药物的脂质体制剂中效果最好。但普通脂质体为液体药剂,易发生粒子聚集沉降、磷脂氧化分解、包封药物渗漏等问题,导致脂质体不够稳定。而前体脂质体(PL)是一种固体制剂,是指脂质体的组分和冻干保护剂(亦称赋形剂)的脱水形式。它加水后能重建成脂质体,解决了脂质体以水溶液贮存的氧化、水解、聚集、分层、药物的渗漏及高温灭菌等问题,即克服了脂质体以溶液形式长期储存的稳定性问题,这是脂质体走向工业化生产和商品化的关键。本研究通过对鬼臼毒素二棕榈酰磷脂酰胆碱前体脂质体(PPT-DPPC-PL)的制备及其重建后各性状的研究,证实冷冻干燥法制备PPT-DPPC-PL的可行性,为PPT-DPPC脂质体的工业化生产开辟新途径。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

胆固醇(荷兰进口分装);纯度99%的PPT标准品、L- α -DPPC(Sigma公司);二氯甲烷(汕头市光华化学品厂,分析纯);海藻糖(上海试剂二厂);TMP-1型电子天平(德国);ZFQ-85A型旋转蒸发器(上海安亭电子仪器厂);Eclipse TE300荧光倒置显微镜(日本Nikon公司);Hitachi-800型透射电镜(日本日立公司);8SE冷冻干燥器(美国Virtis公司);TSM超细颗粒粒度分析仪(上海理工大学)。

1.2 PPT-DPPC-PL的制备

用电子天平精密称取100 mg海藻糖,用pH7.4的磷酸缓冲溶液(PBS)5 ml溶解,即得2%海藻糖溶液,置恒温水浴中备用。制备PPT用浓度为0.5%的PPT-DPPC脂质体混悬液5 ml[5][6][7],与5 ml海藻糖溶液混合,振荡摇匀后超声水浴5 min使两液体混合均匀。分别取2 ml分装于安瓿中,冷冻干燥后,充氮气封口,即得疏松、洁白的PPT-DPPC-PL粉末。取1安瓿PPT-DPPC-PL,加入1 ml水充分混匀,即得重建型PPT-DPPC混悬液,PPT的浓度仍为0.5%。

1.3 重建型PPT-DPPC脂质体的性质考察

1.3.1 形态观察 分别取冷冻干燥前的PPT-DPPC脂质体(普通型PPT-DPPC脂质体)混悬液和水合后的重建型PPT-DPPC脂质体混悬液各1滴于载玻片上,覆以盖玻片,置于倒置显微镜下观察并比较其形态。另分别取普通型PPT-DPPC脂质体混悬液和重建型PPT-DPPC脂质体混悬液各1滴置于带FORMRAR膜的铜网上,以滤纸吸收边缘的液体,干燥后用2%的磷钨酸负染色,置于透射电镜下观察并比较其形态。

1.3.2 粒径分布 分别取适量普通型PPT-DPPC脂质体混悬液和重建型PPT-DPPC脂质体混悬液,经TMS超细颗粒粒度测定仪测定其粒径分布。

1.3.3 包封率测定 将10 mg PPT标准品用无水乙醇溶解后用pH 7.4的PBS液配制一系列浓度的标准溶液,测定荧光值并绘制出标准曲线。分别取普通型PPT-DPPC脂质体混悬液和重建型PPT-DPPC脂质体混悬液各0.5 ml,加入0.5 ml鱼精蛋白,再加入4 ml PBS液,以3 000 r/min离心20 min沉淀脂质体,取上清液用于测定游离药物的含量。各取少量普通型PPT-DPPC脂质体混悬液和重建型PPT-DPPC脂质体混悬液,分别加入少量异丙醇破坏脂质体膜,再加适量PBS液稀释至标准曲线范围,用于测定总的药物浓度。根据标准曲线测定游离及总的药物浓度,根据公式:包封率=(总的药物浓度-游离的药物浓度)/总的药物浓度 \times 100%,从而计算出各种脂质体的包封率[8]。

1.4 PPT-DPPC-PL的稳定性观察

采用4种不同强度的物理作用(手摇、摇床、超声、超声针)对PPT-DPPC-PL进行水合,测定其粒径,考察其对外力作用的稳定性。分别将密封于安瓿中的PPT-DPPC-PL贮存在4 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C条件下,贮存1、3、6个月后取样,经同法水合后分别考察其脂质体形态、粒径及包封率有无变化。

1.5 统计分析

用SPSS10.0统计学软件包对数据行配对t检验处理。

2 结果

2.1 PPT-DPPC-PL水合后脂质体的形态

普通型PPT-DPPC脂质体和重建型PPT-DPPC脂质体在倒置生物显微镜下观察均呈双同心球形，在透射电镜下其结构均为多层多室脂质体，两者形态结构无明显差异，说明冷冻干燥法对PPT-DPPC脂质体的形态结构无明显影响。

2.2 PPT-DPPC-PL水合后脂质体的粒径分布

经TMS超细颗粒粒度测定仪测定，普通型PPT-DPPC脂质体(处理前)的平均粒径为 $(1.47 \pm 0.31) \mu\text{m}$ ，重建型PPT-DPPC脂质体(处理后)的平均粒径为 $(1.45 \pm 0.38) \mu\text{m}$ ，二者无统计学差异($t=0.172$, $P=0.865$)。其粒径分布见图1。从图中可见，冷冻干燥处理前后PPT-DPPC脂质体粒径基本呈正态分布，且分布较均匀，粒子大小无显著性差异，说明冷冻干燥法对PPT-DPPC脂质体的粒径无明显影响。

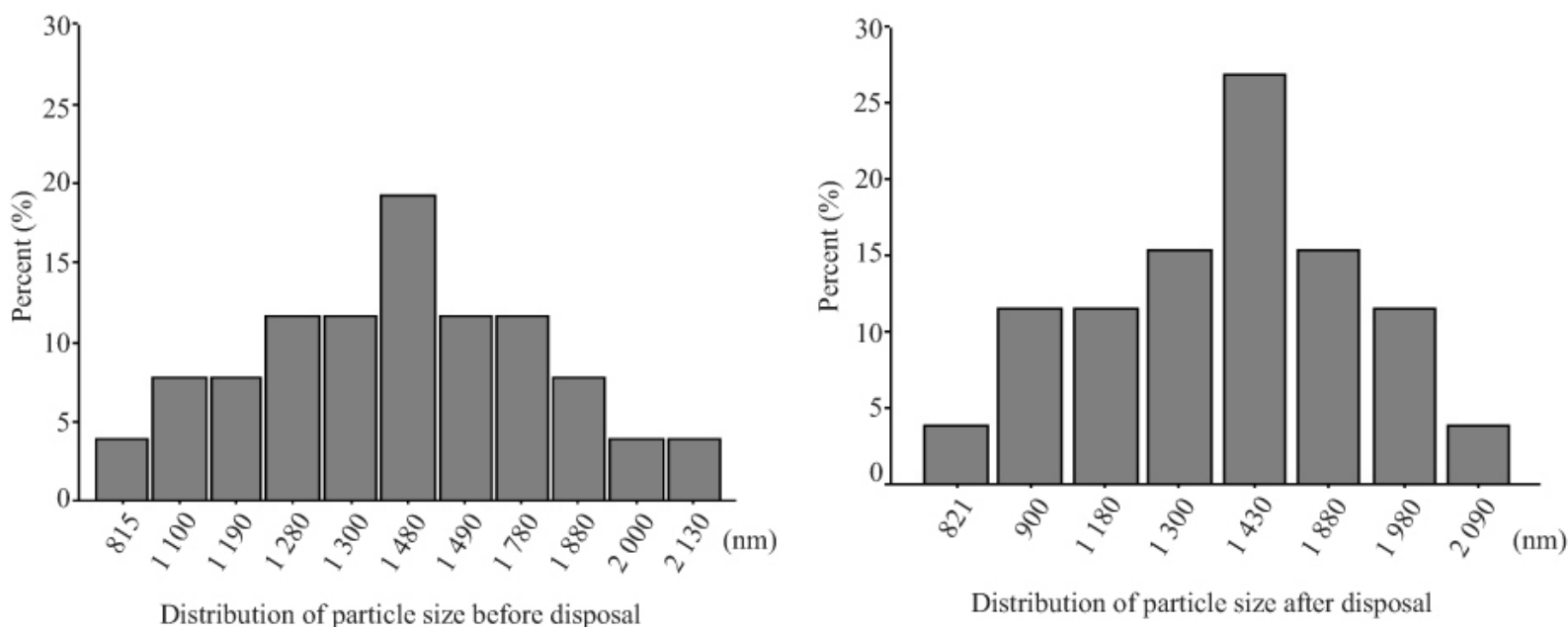


图1 冷冻干燥处理前后PPT-DPPC脂质体粒径分布
Fig.1 Diameter of PPT-DPPC liposome particles before and after freeze-drying

2.3 PPT-DPPC-PL水合后脂质体的包封率

经测定重建型PPT-DPPC脂质体的包封率为72.3%，普通型PPT-DPPC脂质体的包封率为73.1%，二者无明显差异。即冷冻干燥处理前后PPT-DPPC脂质体的包封率几乎不变，说明本法可基本保持PPT-DPPC脂质体的包封率不变。

2.4 PPT-DPPC-PL的稳定性

2.4.1 不同物理作用 采用4种不同强度的物理外力对PPT-DPPC-PL进行水合，手摇15 min后测得平均粒径为 $1.51 \mu\text{m}$ ；摇床15 min后为 $1.49 \mu\text{m}$ ；超声处理15 min后为 $1.47 \mu\text{m}$ ；超声针处理15 min后为 $1.43 \mu\text{m}$ 。4种不同强度的物理外力作用后测得的粒径大小无显著性差异，证明PPT-DPPC-PL对外力稳定性良好，可在各种常见外力作用下水合后使用。

2.4.2 不同温度及时间 将PPT-DPPC-PL分别在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下，贮存1、3、6个月 after 取样，观察结果：(1)外观上无变化，仍为疏松、洁白的粉末，在倒置生物显微镜下观察均呈双同心球形，在透射电镜下其结构均为多层多室脂质体。(2)经TMS超细颗粒粒度测定仪反复测定，在不同的温度、时间条件下其粒径分布均未发生明显变化。(3)经反复测定，在不同的温度、时间条件下PPT-DPPC-PL的包封率均未发生明显变化。证明PPT-DPPC-PL可防止脂质体被氧化分解，使脂质体的包封率长期保持稳定，能很好保护脂质体药物。其包封率见表1。

表 1 不同的温度及时间条件下 PPT-DPPC-PL 的包封率 (%)

Tab.1 Encapsulation of PPT-DPPC-PL at different temperatures and for varied time (%)

Preserve temperature (益)	Preserve time (month)		
	1	3	6
4	72.1	71.5	70.8
20	71.9	71.1	69.5
40	70.2	69.3	65.7

3 讨论

前体脂质体通常为干燥、具有良好流动性能的粉末，贮存稳定，应用前与水水合即可分散或溶解成等张的脂质体，适用于临床广泛应用。这种前体脂质体由于以固体粉末的形态存在，从而解决了普通脂质体的氧化、水解、聚集、分层、药物的渗漏及高温灭菌等稳定性问题，便于长期贮存和包装运输，为脂质体药物的工业化生产奠定了基础。

冷冻干燥法在1978年就收载为制备脂质体的专利技术[9]，国内外对此法研究较多，主要集中在如何选择合适的冻干保护剂，防止药物在冷冻干燥过程中药物的渗漏及粒子间的相互聚集[10][11]。选择一种合适的冷冻干燥支持保护剂是制备冻干前体脂质体的关键因素。目前国内外常选用甘露醇、海藻糖、山梨醇、蔗糖及葡萄糖等作为冻干保护剂。经查阅相关资料显示海藻糖、山梨醇是公认最有效的冻干保护剂。玻璃化温度是筛选冻干保护剂的重要指标，在冷冻干燥过程中，如果温度高于制剂的玻璃化温度，制剂粘度迅速降低，表面萎缩，微观结构破坏，使冻干品发生塌陷现象[12]。海藻糖的玻璃化温度为-29.2℃，较山梨醇的玻璃化温度-30.5℃高，作为冻干保护剂较好[13]。因此本实验选用海藻糖作为冻干保护剂。

本研究通过逆向蒸发法制备PPT-DPPC脂质体，然后在加入冻干保护剂海藻糖的条件下进行冷冻干燥，制成PPT-DPPC-PL，解决了脂质体溶液形态的稳定性问题。同时证明，PPT-DPPC-PL加水重建后形成的重建型脂质体和冷冻干燥前的普通PPT-DP-PC脂质体的外观、形态、粒径分布及包封率无明显差异。本研究制得的PPT-DPPC-PL呈疏松、洁白的粉末状，水分散性好，粒径分布均匀，药物包封率高，对各种外力稳定性良好，便于包装运输、高温灭菌，可在不同温度下长期保存，将具有很好的临床应用前景。

(责任编辑：杨金星)

参考文献：

[1] 朱学俊，孔繁荣，王家璧. 0.5%鬼臼毒素酊治疗尖锐湿疣1893例疗效观察[J]. 中华皮肤科杂志(Chin J Dermatol), 1996, 29(3): 218-9.

[2] 张三泉，曾抗，江彬彬，等. 大鼠外用脂质体鬼臼毒素后血液中鬼臼毒素浓度观察[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 782-3.

Zhang SQ, Zeng K, Jiang BB, et al. Changes in serum concentration of podophyllotoxin after its topical application with liposome on rat skin[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(9): 782-3.

[3] 江彬彬，曾抗，张三泉，等. 鬼臼毒素二棕榈酸磷脂酰胆碱脂质体局部外用的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(10): 875-7.

Jiang BB, Zeng K, Zhang SQ, et al. Experimental study of podophyllotoxin dipalmitoylphosphatidylcholine liposome for topical skin application[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(10): 875-7.

[4] 曾抗，李国锋，许重远，等. 鬼臼毒素脂质体软膏治疗尖锐湿疣的双盲随机对照实验[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 1998, 18(3): 246.

[5] 吴道澄，万明习，吴红，等. 智能化释药载体纳米凝胶的制备及其释药特性[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(8): 767.

Wu DC, Wan MX, Wu H, et al. Preparation and intelligence drug release characteristics of (beta)-HPAT/NVP copolymer nanogel[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2001, 22(8): 767.

[6] 施锋，吴敏，林德明. 磁性阿霉素纳米微球在磁场中磁感应的发热研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2002, 19(2): 125-6.

Shi F, Wu M, Lin DM. A study on heat effect of magnetic induction of the magnetic doxorubicin in

nanoparticles under a magnetic field[J]. Chin J Med Phys, 2002, 19(2): 125-6.

[7] 后桂荣, 曾 抗, 周再高, 等. 两种鬼臼毒素脂质体的制备及其比较分析[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(3): 216-8.

Hou GR, Zeng K, Zhou ZG, et al. Preparation and comparative analysis of two podophyllotoxin liposomes[J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 216-8.

[8] 张灵芝. 脂质体制备及其在生物学中的应用[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1988. 53-4.

[9] 朱盛山. 药物新剂型[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 435-6.

[10] Bryszewska M, Epand RM. Effects of sugar alcohols and disaccharides in inducing the hexagonal phase and altering membrane properties: implications for diabetes mellitus[J]. Biochim Biophys Acta, 1988, 943(3): 485-92.

[11] Park YS, Huang L. Cryoprotective activity of synthetic glycolipids and their interactions with trehalose[J]. Biochim Biophys Acta, 1992, 1124(3): 241-8.

[12] 刘占杰, 华泽钊, 陈建明, 等. 药品冷冻干燥过程中的玻璃化作用[J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(8): 380-3.

Liu ZJ, Hua ZZ, Chen JM, et al. Effect of vitrification on freeze-drying process of pharmaceuticals [J]. Chin J Pharm, 2000, 31(8): 380-3.

[13] 陈建明, 张仰眉, 高 申, 等. 维生素A前体脂质体的研制及其特性考察[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(2): 207-9.

Chen JM, Zhang YM, Gao S, et al. Preparation of vitamin A proliposomes by freeze-drying method[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2003, 24(2): 207-9.

参考文献:

[1] 朱学俊, 孔繁荣, 王家璧. 0.5%鬼臼毒素酞治疗尖锐湿疣1893例疗效观察[J]. 中华皮肤科杂志(Chin J Dermatol), 1996, 29(3): 218-9.

[2] 张三泉, 曾 抗, 江彬彬, 等. 大鼠外用脂质体鬼臼毒素后血液中鬼臼毒素浓度观察[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 782-3.

Zhang SQ, Zeng K, Jiang BB, et al. Changes in serum concentration of podophyllotoxin after its topical application with liposome on rat skin[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(9): 782-3.

[3] 江彬彬, 曾 抗, 张三泉, 等. 鬼臼毒素二棕榈酸磷脂酰胆碱脂质体局部外用的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(10): 875-7.

Jiang BB, Zeng K, Zhang SQ, et al. Experimental study of podophyllotoxin dipalmitoylphosphatidylcholine liposome for topical skin application[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(10): 875-7.

[4] 曾 抗, 李国锋, 许重远, 等. 鬼臼毒素脂质体软膏治疗尖锐湿疣的双盲随机对照实验[J]. 第一军医大学学报(J First Mil Med U-niv/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 1998, 18(3): 246.

[5] 吴道澄, 万明习, 吴 红, 等. 智能化释药载体纳米凝胶的制备及其释药特性[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(8): 767.

Wu DC, Wan MX, Wu H, et al. Preparation and intelligence drug release characteristics of (beta)-HPAT/NVP copolymer nanogel[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2001, 22(8): 767.

[6] 施 锋, 吴 敏, 林德明. 磁性阿霉素纳米微球在磁场中磁感应的发热研究[J]. 中国医学物理学杂志, 2002, 19(2): 125-6.

Shi F, Wu M, Lin DM. A study on heat effect of magnetic induction of the magnetic doxorubicin in nanoparticles under a magnetic field[J]. Chin J Med Phys, 2002, 19(2): 125-6.

[7] 后桂荣, 曾 抗, 周再高, 等. 两种鬼臼毒素脂质体的制备及其比较分析[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(3): 216-8.

Hou GR, Zeng K, Zhou ZG, et al. Preparation and comparative analysis of two podophyllotoxin liposomes[J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 216-8.

[8] 张灵芝. 脂质体制备及其在生物学中的应用[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1988. 53-4.

[9] 朱盛山. 药物新剂型[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 435-6.

[10] Bryszewska M, Epand RM. Effects of sugar alcohols and disaccharides in inducing the hexagonal phase and altering membrane properties: implications for diabetes mellitus[J]. Biochim Biophys Acta, 1988, 943(3): 485-92.

[11] Park YS, Huang L. Cryoprotective activity of synthetic glycolipids and their interactions with trehalose[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1124(3): 241-8.

[12] 刘占杰, 华泽钊, 陈建明, 等. 药品冷冻干燥过程中的玻璃化作用[J]. *中国医药工业杂志*, 2000, 31(8): 380-3.
Liu ZJ, Hua ZZ, Chen JM, et al. Effect of vitrification on freeze-drying process of pharmaceuticals [J]. *Chin J Pharm*, 2000, 31(8): 380-3.

[13] 陈建明, 张仰眉, 高 申, 等. 维生素A前体脂质体的研制及其特性考察[J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24(2): 207-9.

Chen JM, Zhang YM, Gao S, et al. Preparation of vitamin A proliposomes by freeze-drying method[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2003, 24(2): 207-9.

[回结果列表](#)