

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2007)05-0472-03

齐墩果酸固体脂质纳米粒的制备与质量评价

王婧雯 汤海峰 沈敏 王莉 方坤全 (第四军医大学西京医院药剂科 陕西 西安 710033)

Preparation and quality evaluation of oleanolic acid-loaded solid lipid nanoparticles

WANG Jing-Wen, TANG Hai-Feng, SHEN Min, WANG Li, FANG Kun-Quan

Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To prepare the oleanolic acid-loaded solid lipid nanoparticles (OA-SLN), determine the content of oleanolic acid in OA-SLN, and evaluate its quality. **METHODS:** OA-SLN were prepared by film-ultrasound dispersion technique. The encapsulation efficiency and appearance of solid lipid nanoparticles were studied. **RESULTS:** The appearance of prepared solid lipid nanoparticles was regular with the diameter being (62.0 ± 10.3) nm, the encapsulation efficiency was 98.29% and the loading rate was 8.17%. **CONCLUSION:** The selected preparation technique of OA-SLN is rational and practicable. It provides experimental evidence for developing a new oleanolic acid injection.

【Keywords】 oleanolic acid; solid lipid nanoparticles; quality evaluation

【摘要】目的 对齐墩果酸固体脂质纳米粒的制备工艺和含量测定方法进行研究,并对其质量进行评价。方法 采用薄膜超声分散法制备齐墩果酸固体脂质纳米粒,并对其包封率、形态等性质进行研究。结果 制得齐墩果酸固体脂质纳米粒形态均匀圆整,粒径范围为 (62.0 ± 10.3) nm,包封率为98.29%,载药量为8.17%。结论:选择薄膜超声分散法制备齐墩果酸固体脂质纳米粒方法可行,为开发齐墩果酸新型注射制剂提供了实验依据。

【关键词】 齐墩果酸 固体脂质纳米粒 质量评价

【中图分类号】 R943 **【文献标识码】** A

0 引言

齐墩果酸(oleanolic acid, OA)是一种五环三萜类化合物,国内临床上主要用于慢性肝炎的治疗以及多方面保肝作用^[1]。固体脂质纳米粒(solid lipid nanop-

articles, SLN)系指以固态的天然或合成类脂如大豆磷脂、三酰甘油等为载体材料,将药物包裹或内嵌于类脂核中,制成粒径约为10~1000 nm的固体胶粒给药系统^[2]。本实验我们以大豆磷脂为载体,采用薄膜超声分散法制备齐墩果酸固体脂质纳米粒,期望提高齐墩果酸的肝脏靶向性。

1 材料和方法

1.1 材料 LC-10AVP 高效液相色谱仪(日本岛津公司), Sephadex G-50 凝胶(Sigma 公司), RE-52 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), KQ-250 型超声波发生器(江苏昆山淀山湖检测仪器厂), BP-190S 电子天平(德国赛多利斯), 齐墩果酸(陕西慧科公司,批号 050322), 大豆磷脂(上海太伟药业有限公司,批号 040716), 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 齐墩果酸固体脂质纳米粒的制备 精密称取处方量物质于100 mL 圆底烧瓶中,加入15 mL 氯仿溶解,39℃ 旋转蒸发10 min 除去氯仿,在烧瓶壁上形成一层薄膜。加入60 mL/L 甘露醇水溶液15 mL,40℃ 水浴超声30 min, $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,分装于安瓿中^[3]。

1.2.2 外观及其粒径 取新制备的OA 固体脂质纳米粒适量,60 mL/L 的甘露醇溶液超声分散,少许滴至专用铜网,用20 mL/L 磷钨酸染色,自然干燥,使粒子在铜网上浓缩沉积,用电子显微镜观察并拍照。

1.2.3 包封率及载药量的测定

1.2.3.1 色谱条件 色谱柱 Kromasil-C18; 流动相为甲醇:水(90:10); 流速1.0 mL/min; 温度:室温; 检测波长210 nm; 进样体积20 μL 。在此色谱条件下,得OA 固体脂质纳米粒色谱图,结果显示,共存组分不干扰主药测定(图1)。

1.2.3.2 线性关系 精密称取105℃ 干燥恒质量的OA 对照品11.07 mg,用甲醇溶解后,移至10 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,精密量取此溶液(1.086 g/L)3.0 2.0 1.0 0.5 0.3 0.1 mL 分别置于6个25 mL 的容量瓶中,然后在每个容量瓶中加入1 mL 空白SLN,并用甲醇定容至刻度,摇匀,得浓度

收稿日期 2006-06-06; 接受日期 2006-09-10

作者简介:王婧雯,硕士生(导师张三奇)。Tel (029)84775475 Ext.

8015 Email wjlzbw@fmmu.edu.cn

范围为 4.34 ~ 130.32 mg/L 的系列标准溶液, 分别取此系列标准溶液 20 μ L 进样, 计算峰面积的平均值。

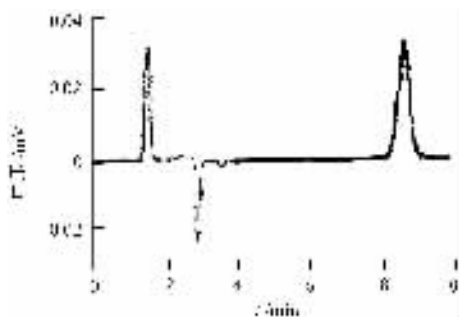


图1 OA 固体脂质纳米粒高效液相色谱图

1.2.3.3 回收率及精密度试验 按照 OA-SLN 溶液中原辅料间的比例, 精密称定, 用甲醇稀释配制高、中、低三种不同浓度的供试品 65.16, 32.58, 10.86 mg/L, 取已知浓度的 OA 对照品溶液, 用外标法依次测定含量, 每次进样 20 μ L。同时考察于室温 25 $^{\circ}$ C 避光放置 1 d 和 5 d 的日内和日间变异性。

1.2.3.4 载药量和包封率的测定 采用凝胶柱层析法。凝胶柱为 Sephadex-G50, 洗脱液为蒸馏水, 流速为 0.5 mL/min, 层析温度为室温。分别移取 OA 固体脂质纳米粒 0.5 mL 上柱, 每 3.0 mL 收集一次, 共收集 25 \pm 3 管。以柱层析条件洗脱, 应用 HPLC 测定 SLN 中药物含量以及游离药物量。包封率 = $(W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$ 。 $W_{\text{总}}$ 表示总药物含量, $W_{\text{游}}$ 表示游离药物量。载药量 = $(W_t - W_i) / W_c \times 100\%$, 其中 W_t 为 SLN 溶液中药物量, W_i 为溶液中游离药物量, W_c 为大豆磷脂量^[5]。

2 结果

2.1 纳米粒透射电镜观察 OA-SLN 为白色乳光胶体溶液, 电镜下可见许多圆形或椭圆形球粒(图 2)。统计 500 个纳米粒, 纳米粒的粒径(62.0 \pm 10.3) nm。

2.2 线性关系考察 以峰面积(A)为纵坐标, 浓度(c, mg/L)为横坐标, 进行线性回归分析, 得标准曲线方程为: $A = 262673c - 12207$ $r^2 = 0.9994$ (图 3)。

2.3 回收率及精密度测试 结果表明 3 种浓度样品中的日内 RSD \leq 1.92% ($n = 6$), 日间 RSD \leq 3.02% ($n = 6$)。得平均回收率 101.00% ~ 103.00% 之间 ($n = 6$) (表 1)。

2.4 载药量和包封率 按处方量进行了三次重复验证试验, 制备 3 批固体脂质纳米粒, 得平均包封率为

98.29%, 平均载药量为 8.17%。

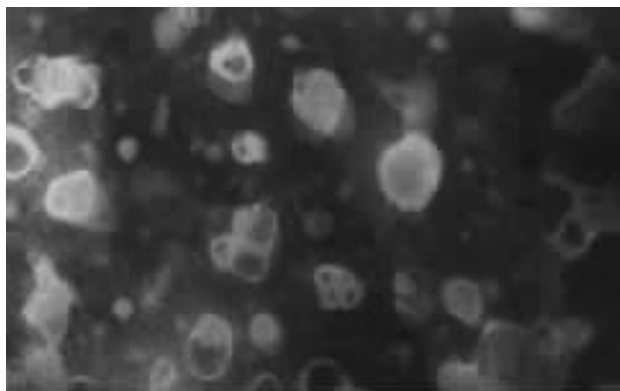


图2 齐墩果酸固体脂质纳米粒透射电镜照片 TEM $\times 10\ 000$

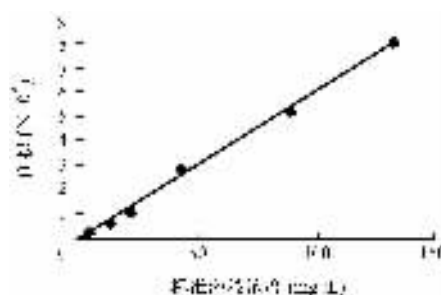


图3 系列标准溶液浓度对面积数据散点图

表1 回收率及精密度测试结果 ($n = 6$)

投入量 (mg/L)	平均回收率(%)	RSD(%)	
		日内	日间
10.86	101.13	0.85	2.75
32.58	102.29	0.88	1.69
65.16	102.95	1.92	3.02

3 讨论

取 OA 对照品溶液, 在紫外分光光度计上于波长 200 ~ 400 nm 处扫描, 结果在 207 nm 处有最大吸收, 为避免末端吸收, 选择 210 nm 作为检测波长。

我们曾考察生理盐水、60 g/L 甘露醇水溶液作分散介质的效果, 采用生理盐水作分散介质的 OA 纳米粒放置后混浊、分层, 而 60 g/L 甘露醇水溶液作分散介质在室温放置 3 wk 无混浊现象。载药的纳米粒和游离的药物必须分离后才能测定包封率。有报道采用离心法分离载药纳米粒和游离药物^[8], 但高速离心时纳米粒有可能凝聚而被破坏, 故本研究我们采用凝胶柱层析法分离, 实验结果显示分离效果良好。

OA 具有强亲脂性, 制成纳米粒是增加水中溶解度的良好方法。采用薄膜超声分散法制备纳米粒简便易行, 制备条件易控制, 制备的纳米粒的成功率高,

通过超声的办法使制备的纳米粒的粒径更均匀,适合于实验室制备和研究。大豆磷脂是细胞膜组成成分,毒性低于合成材料,体内可以降解且有良好生理相容性,价廉易得,故选其作为药物载体。

【参考文献】

- [1] 王德仁. 齐墩果酸研究新进展[J]. 天津药学, 2003, 15(3): 56-58.
- [2] Trotta M, Pattarino F, Ignoni T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidyl choline mixtures[J]. Eur J Pharm Biopharm 2002 53(4): 203-208.
- [3] 薛昌昌, 顾宜, 张三奇, 等. 十六酸拉米夫定酯固体脂质纳米

粒的制备[J]. 第四军医大学学报, 2003 24(10): 890-892.

- [4] 陈长水, 桑旭峰. 薄层扫描法测定肝喜乐胶囊中齐墩果酸的含量[J]. 安徽医药, 2005 9(5): 350.
- [5] 邓世星, 孙志勇, 周脚, 等. 紫外光谱法测定齐墩果酸含量[J]. 遵义医学院学报, 2003 26(6): 556.
- [6] 李琴韵, 张雷. 中国 HPLC 测定左归颗粒中熊果酸和齐墩果酸的含量[J]. 中药杂志, 2005 30(4): 308-309.
- [7] 向大雄, 陶昱斐, 王峰, 等. 齐墩果酸固体分散体形成和增殖机制研究[J]. 中草药, 2002 33(4): 311.
- [8] 朱瀛, 陆伟根, 邵凌燕, 等. 丝裂霉素 C 磁性纳米粒 I. 制备和质量评价[J]. 中国医药工业杂志, 2006 37(3): 168-171.

编辑 袁天峰

· 综述 · 文章编号 1000-2790(2007)05-0474-03

线粒体相关疾病蛋白质组学研究进展

涂文斌¹综述, 彭彦², 彭国光¹审校 (1 重庆医科大学附属第一医院神经内科, 2 重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016)

【摘要】作为后基因时代的一门新学科, 蛋白质组学研究技术为线粒体蛋白质组的研究提供了有力的支持, 使得从整体上研究线粒体蛋白质组在生理、病理过程中的变化成为可能。本文回顾了近年来国外学者应用蛋白质组学研究方法揭示相关疾病线粒体蛋白质存在相应的变化, 以及通过对线粒体蛋白质组的研究去发现线粒体蛋白质在疾病发生发展中的作用, 从而为寻找与疾病密切相关的疾病特异性蛋白提供线索。

【关键词】线粒体, 疾病, 蛋白质组学

【中图分类号】Q51 【文献标识码】B

0 引言

二十一世纪初, 人类基因组计划基本完成, 生命科学的研究步入了后基因时代, 其核心便是蛋白质组研究。蛋白质组被定义为: 一种细胞、组织或完整的生物体所拥有的全套的蛋白质。这是一个整体的、动态的概念, 而蛋白质组学是研究这些成分在指定时间或特定环境条件下的表达。因为蛋白质是我们理解细胞功能和疾病过程的核心, 如果在蛋白质组学方面没有共同的努力, 基因组学的成果将不会成为现实。蛋白质组学现在被认为是一个在诊断和发现伴随细胞器变化的复杂疾病的强有力的工具。迅速发展的蛋白质组学也推动了线粒体蛋白质组的研究发展。

近年来国外学者应用蛋白质组学研究方法揭示相关疾病

线粒体蛋白质存在相应的变化, 并通过对线粒体蛋白质组的研究去发现线粒体蛋白质在疾病发生发展中的作用, 从而为寻找与疾病密切相关的疾病特异性蛋白提供线索。现就近年来, 相关疾病线粒体蛋白质组的研究进展作一综述。

1 线粒体相关疾病蛋白质组学研究

线粒体是真核细胞中最复杂和最重要的细胞器之一, 哺乳动物除成熟红细胞外, 线粒体普遍存在于有氧呼吸的真核细胞的细胞质中。它是细胞内的能量供应中心, 与氧自由基生成有关。线粒体在脂肪酸代谢、嘧啶生物合成、体内钙平衡, 以及细胞信号传导中起着主要作用。同时, 线粒体也是人类“另一”个来源于母系基因组的所在地。许多细胞进程, 如凋亡、老化以及多种疾病病理学机制(包括癌、肌病、糖尿病、肥胖、老化、特别是神经退行性疾病等)都与线粒体功能障碍或突变有关^[1-2]。在人类线粒体中约有 1500 个蛋白质^[3], 其中已经有 600 多种蛋白质被鉴定出来。如果能鉴定出大部分, 甚至全部蛋白质那将是非常宝贵的资源。蛋白质组学技术为研究线粒体疾病和线粒体功能失调, 为寻找疾病诊断的标志物, 探索药物作用靶点提供了必不可少的手段, 成为临床、基础研究的热点。

1.1 神经系统疾病

1.1.1 神经退行性疾病 帕金森病是一种中老年人常见的运动障碍疾病, 以黑质多巴胺能神经元变性缺失和路易小体形成为病理特征^[4]。目前, 导致黑质多巴胺能神经元变性缺失的确切发病机制尚不完全清楚, 但是已经知道线粒体功能障碍在其中起了重要作用。采用定量蛋白质组学技术和同位素编码标记物方法, Jin 等^[5]对使用 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6 四氢吡啶(MPTP)辅以二丙苯磺酸(probenecid)处理 5 wk 的慢性帕金森病小鼠和对照小鼠, 进行了二组间黑质线粒体蛋白表达谱的差异表达比较, 辨别出超过 300 个蛋白点。比较处理组和对照组中这些蛋白点, 发现超过 100 个蛋白点在处理组中有量上的显著变化, 经鉴定其中有一个蛋白质为 DJ-1, 它的突变与家族性帕金森病有关。采用蛋白印记分析和免疫组化方法得出, 其在黑质的分布与鼠细胞内包涵体形成有关。包涵体如同帕金森患者中的路易小体。这一结果说明 DJ-

收稿日期 2006-08-31; 接受日期 2006-10-28

基金项目 国家自然科学基金(30370499)

通讯作者 彭国光. Email: penwan233@sina.com

作者简介: 涂文斌, 硕士生(导师彭国光). Tel: (023)89014049

Email: twb425@163.com