

脂质体载体材料卵磷脂的制备及质量标准研究

赵荣生 侯新朴¹ 严宝霞(北京 100083 北京大学第三医院药剂科;¹ 北京 100083 北京大学药学院)

摘要 目的:制备脂质体载体材料卵磷脂。方法:以新鲜鸡蛋为原料提取并制备了卵磷脂,并对卵磷脂的纯度、含量、氧化程度以及质量标准进行考察。结果:试验制备的卵磷脂为色谱均一的物质,含量高于 98%,其氧化程度低,各项质量指标均符合美国药典规定。结论:结果表明,试验制得的卵磷脂可作为制备脂质体的载体材料。

关键词 卵磷脂;脂质体;载体材料;质量标准

Zhao Rongsheng(Zhao RS) , Hou Xinpu(Hou XP) , Yan Baoxia(Yan BX) (Department of Pharmacy , Peking University Third Hospital , Beijing 100083)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**To prepare the liposomes carrier materials lecithin. **METHODS:**The lecithin was extracted and prepared from fresh yolks. The purity, the content, the percentage of oxidation and the quality standard were studied. **RESULTS:**The lecithin we prepared was chromatographically homogeneous phospholipid, with no indication of any other components. The content of lecithin was more than 98 %, the percentage of oxidation was very low, and the results of studies on the quality standard were fit for the USP. **CONCLUSION:**The results showed that, the lecithin we prepared could be used as the liposomes carrier materials.

KEY WORDS lecithin, liposomes, carrier materials, quality standard

脂质体(Liposomes)是将药物包封入类脂质双分子层中而形成的一种超微型球状载体。作为药物载体使用的脂质体其成膜材料主要是一些天然或合成的脂质(磷脂和固醇等),常用的天然膜材有卵磷脂(Lecithin, Egg phospholipid)、豆磷脂、胆固醇、角甾醇等,合成膜材有二肉豆蔻酰卵磷脂、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油等。虽然合成磷脂不易氧化、组成固定,更适合于制备脂质体,但其价格较贵,从生产应用考虑,还是选用价格低廉、易得的卵磷脂或豆磷脂较为合适。因购得的卵磷脂其氧化程度高、含杂质多,不适合于脂质体的制备,为此本试验以新鲜蛋黄为材料制备了卵磷脂,并对其质量进行了研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ZFQ-85A 旋转蒸发器(上海医械专机厂);2XZ-1 型旋片式真空泵(临海市精工真空设备厂);ME-3 精密加热板(北京北德科学器材有限公司);UVIKON940 紫外可见扫描仪(瑞士康强仪器公司)。

1.2 材料和试剂

新鲜鸡蛋;丙酮 95 %乙醇、甲醇(分析纯,北京化工厂);石油醚(分析纯,天津化学试剂厂);三氯甲烷(分析纯,天津天泰化学试剂厂);氧化铝(分析纯,200~300 目,上海新诚精细化工有限公司);二肉豆蔻酰卵磷脂(99.9 %, SIGMA 公司)。

2 方法与结果

2.1 卵磷脂的制备

2.1.1 粗磷脂的提取 取新鲜蛋黄 500g,加入 1000ml 丙酮,于 25℃下混合均匀, N₂ 保护下搅拌 15 min,静置 1h 后抽滤,滤饼用冷至 15℃的丙酮洗数次,至滤饼呈乳白色。将滤饼混悬于 1000ml 95 %乙醇中, N₂ 保护下搅拌 1h,静置后抽滤,收集滤液,再用 95 %乙醇提取一次,合并滤液,减压下旋转蒸发除去溶剂得淡黄色胶状物,用 200ml 石油醚溶解后,快速搅拌下倾入 5 倍体积的丙酮中,静置至上层溶液澄清,倾去丙酮,用冷的丙酮清洗沉淀,重复以上操作数次。将沉淀用 N₂ 吹干,得粗磷脂,该步得率约为 9.1 %。

2.1.2 粗磷脂的纯化 采用柱层析法分离提纯。用中性氧化铝填充层析柱,将粗磷脂用氯仿溶解成 5 %的溶液,按卵磷

脂:氧化铝(1:25, g/g)将溶液过柱,用氯仿-甲醇(9:1, v/v)的洗脱液洗脱,流速 10ml/min,用硅胶 G 薄层板对洗脱液作薄层分析,至组分为色谱均一的卵磷脂后,收集洗脱液,减压下蒸除溶剂,即得呈白色纯卵磷脂固体,充 N₂ 后密封,于 -20℃冰箱保存,该步得率约为 46 %。

2.2 自制卵磷脂的薄层色谱

将自制卵磷脂和对照品二肉豆蔻酰卵磷脂(DMPC)分别用适量氯仿溶解后,点样于同一硅胶 G 薄层板上,以氯仿-甲醇-水(65:25:4, v/v/v)为展开剂展开,取出晾干并以碘蒸汽显色。

由实验结果可见,自制卵磷脂与对照品磷脂的色谱行为一致,均为色谱均一的物质,未见有其他杂质, R_F自制、R_F对照分别为 0.354 和 0.351。

2.3 卵磷脂氧化程度的研究

卵磷脂分子中所具有的不饱和键易与氧结合生成二烯键的结构而氧化,颜色由白色变为黄色或棕色。卵磷脂氧化后,会使制得的脂质体包封率低,渗漏率增加,且有溶血毒性,故应对其氧化程度进行控制。由于卵磷脂氧化后生成的二烯结构在 233nm 处有吸收,因而其氧化程序可按式计算^[1]。

氧化率 % = [二烯 μmol/ml] / [卵磷脂 μmol/ml] × 100 %

其中[二烯] = A₂₃₃ / ε, ε = 30000。

方法:精密称取 80mg 卵磷脂至 50ml 量瓶中,用 95 %乙醇溶解至刻度,测定 233nm 处的吸收度,按上式计算氧化率。

结果表明,自制卵磷脂的氧化指数低,氧化率仅为 0.53 %。

2.4 自制卵磷脂的含量测定

采用消化定磷的方法进行测定^[2]。精密配制一定浓度的 KH₂PO₄ 标准液,分别取一定量至离心管中,各加入 0.50ml 5M 的 H₂SO₄ 溶液,混匀,在 150~160℃下加热消化 3h,冷却后加入 2 滴 30 % H₂O₂, 150~160℃下加热 1.5h,冷至室温,加入 4.60ml 0.22 % 钼酸铵溶液,0.20ml FSR 试剂后,100℃水浴加热 7min,冷却后测定 830nm 处的吸收度,以磷的浓度 C_p 对吸收度 A 进行线性回归,得标准曲线为 C_p = -2.5173 × 10⁻⁴ + 0.1798 A, r = 0.9993。

配制一定浓度的卵磷脂样品溶液,按上法进行消化,测

定其中磷的浓度,并根据标准曲线计算卵磷脂的含量。结果表明,两批自制卵磷脂的含量分别为 98.57%,98.88%。

2.5 卵磷脂质量标准的研究

参照 USP(X X III)^[3]进行检查,结果符合规定要求:水分 $\leq 1.5\%$;砷盐 $\leq 3 \times 10^{-6}$;重金属 $\leq 0.004\%$;酸值 ≤ 36 ;正己烷不溶物 $\leq 0.3\%$;丙酮不溶物 $\geq 50.5\%$ 。

3 讨论

3.1 由以上各项实验结果可见,本试验制备的卵磷脂含量高,氧化程度低,各项质量指标均符合美国药典规定,可以用作制备脂质体的成膜材料。

3.2 由于卵磷脂分子中具有不饱和键而易被氧化,所以在整个制备过程中,各步骤均应注意避免与氧发生作用,主要措施有 ①避免温度过高而加速氧化作用,应在室温或室温以下进行操作,个别步骤需要在冰浴中进行;②尽量避免直接暴露于空气中,可采取抽真空或充高纯氮气的方法;③制备的卵磷脂成品充氮气后密闭避光放置于 0℃以下贮存。

3.3 新鲜制备的纯卵磷脂其紫外扫描图谱只是在 200 ~ 210nm 处有一特征吸收 A_{λ} ,在其它波长范围没有吸收;而卵磷脂被氧化后,其分子结构中产生了共轭的双烯键,因而在 233nm 处出现又一特征吸收 A_{233} ,所以可以用 233nm 处的吸收变化来研究卵磷脂的氧化程度。亦有文献用氧化指数^[1] (oxidation index, OI) 来研究氧化程度, $OI = A_{233} / A_{\lambda}$,但这种表达方式不如氧化率更直观。

参考文献

- 1 New RRC. Liposomes: a practical approach, oxford, England, Information Press Ltd, 1990: 113.
- 2 New RRC. Liposomes: a Practical approach, Oxford, England, Information Press Ltd, 1990: 105.
- 3 US Pharmacopeia/ National formulary X X III, 1995: 2259.

收稿日期: 2000 - 01 - 25