

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2010.05.002

非离子表面活性剂囊泡对钙黄绿素包封作用的研究*

孔霞¹ 贾少辉² 葛东明³¹ 济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 山东 济宁 272011; ² 济宁医学院分子医学与化学实验室, 济宁 272067;³ 枣庄市食品药品监督管理局台儿庄分局, 枣庄 277100)

摘要 **目的** 研究非离子表面活性剂囊泡对钙黄绿素包封率的影响, 为新型药物传输系统的研究提供一定的依据。**方法** 以司盘 60 和胆固醇为主要原料, 通过薄膜分散法制备了非离子表面活性剂囊泡, 研究了该类囊泡对钙黄绿素的包封作用以及影响包封率的因素, 并利用正交实验设计优化了其最佳包封条件。**结果** 表面活性剂浓度、水化时间、水化温度、胆固醇用量、胆固醇与表面活性剂比例均对包封率有明显的影响。最佳包封条件为: 胆固醇的摩尔质量 0.2mol、水化时间 45min、水化温度 65℃、司盘 60 摩尔质量为 0.3mol。**结论** 非离子表面活性剂囊泡对钙黄绿素具有较强的包封能力, 钙黄绿素可作为研究该类囊泡作为药物载体的模型药物。

关键词 非离子表面活性剂 紫外可见分光光度法; 钙黄绿素; 囊泡; 包封率**中图分类号**: R913 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)10-308-04

The study of the encapsulation function of calcein by the nonionic surfactant noiosomes

KONG Xia, JIA Shao-hui, GE Dong-ming

(The Affiliated First People's Hospital, Jining Medical University, Jining 272011, China)

Abstract: Objective To investigate the encapsulation function of calcein by the nonionic surfactant noiosomes, and provide the guidance for the study of the new drug delivery system. **Methods** Niosomes were prepared with nonion surfactant span60 and cholesterol by Film dispersion method. The entrapment efficiency of calcein and the influence factors on the entrapment efficiency were studied, moreover the orthogonal test was used to study the optimal encapsulation conditions. **Results** The results showed that the entrapment efficiency of calcein was influenced obviously by the follows: concentration of the surfactant, the hydration time, the hydration temperature and the amount of cholesterol, and the optimal encapsulation conditions were: cholesterol 0.2mol, hydration time 45min, hydration temperature 65℃, Span 60 0.3mol. **Conclusion** The encapsulation function of the calcein by the nonionic surfactant noiosomes was strong, and the calcein could be used as model drug for this kind of noiosomes.

Key words: Calcein; Vesicles; Entrapment efficiency; Non-ionic surfactant

非离子表面活性剂囊泡具有与细胞膜相似的双分子层结构, 其中包含一个或多个水室。囊泡所具有的双层膜结构使其成为潜在的理想的体内药物载体^[1-2], 既可以携带水溶性药物, 将药物包封在微水相内, 也可以携带脂溶性药物, 将药物增溶在双层膜中^[3]。作为一种新型药物载体, 不仅能提高药物的生物利用度, 减轻药物带来的毒副作用, 还可使药物达到缓控释的目的, 并促进现存药物改变不合理剂型, 使药物的使用向着更安全、有效、可控

的方向发展, 由于在药物输送领域具有广阔的应用前景, 因此近年来引起人们的极大关注^[4-7]。

1 实验部分

1.1 仪器和药品

主要实验仪器: JY-92 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技有限公司); RE-52A 旋转蒸发器(上海嘉鹏科技有限公司); 8010 型搅拌式超滤杯(MILLIPORE. COMPANY); pH 酸度计(上海康仪仪器有限公 pH S-3C); KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); UV250 紫

* [基金项目] 2009 年济宁市科技局立项项目

外可见分光光度计(日本岛津)。

1.2 试剂

胆固醇(Cholesterol)(上海楷洋生物技术有限公司);钙黄绿素(天津市博迪化工有限公司);span60(上海山浦化工有限公司);无水乙醇(烟台三和化学试剂有限公司);三氯甲烷(莱阳经济技术开发区精细化工厂)。

2 实验步骤

2.1 标准曲线的绘制及钙黄绿素的光谱扫描

精密称取钙黄绿素 0.01043g,用蒸馏水溶解后转存至 250ml 的棕色容量瓶中,蒸馏水定容。用移液管精密量取 3.0,4.0,5.0,6.0,7.0 ml 已配制好的钙黄绿素标准溶液,分别置于 25ml 的棕色容量瓶中,用蒸馏水定容。利用紫外分光光度计对钙黄绿素溶液进行扫描,得其吸收曲线,见图 1。

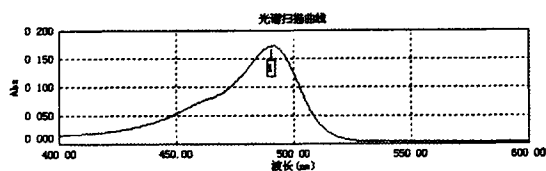


图 1 钙黄绿素溶液光谱图

由图 1 可见,钙黄绿素最大吸收波长为 473 nm,于最大吸收波长处测定各标准溶液的吸光度,以吸光度对其浓度作图,得其工作曲线回归方程: $Abs=0.03169c+0.08711, R^2=0.9984$ 。

2.2 空白囊泡的制备

称取 span60 0.17299g,胆固醇 0.11731g(摩尔比 4:3),置于 100ml 的茄形瓶中,然后加入 12 mL 氯仿,3mL 无水乙醇(4:3),在 45℃ 下减压蒸馏,待溶剂蒸干后,在玻璃壁上形成透明的薄膜。然后向形成透明薄膜的茄形瓶中加入 10ml 的蒸馏水,在 55℃ 下水浴 50min,得到乳液。最后将得到的乳液放在超声仪中,在 200w 的条件下超声 5min,得到空白囊泡。

2.3 含有钙黄绿素囊泡的制备

按照制备空白囊泡的方法得到透明薄膜后,用移液管精密量取 10 ml 的钙黄绿素标准溶液,置于茄形瓶中,在 55℃ 下水浴 50 min,得到乳液,然后在 200w 的功率下超声 5 min,得到包载钙黄绿素的囊泡体系。

2.4 包封率的测定

将得到的囊泡混悬液倒入超滤杯中进行超滤,

得滤液。取出滤液 1ml,测定滤液中钙黄绿素浓度,此浓度为 C 剩余,即未包入囊泡的游离药物,求出样品中未包入囊泡的药物的质量 D 剩余,再求出药品中投入药物总量 D 总,代入下式即可求出包封率。

2.5 影响包封率的因素

超声时间对包封率的影响:由于薄膜分散法形成的囊泡一般为大的多室囊泡,为了得到粒径较小且粒度更加均匀的囊泡,需要用超声波处理,将大的多室囊泡分散成小的单室囊泡或较小的多室囊泡。适度超声,可以使囊泡的粒径分布更加均匀。但超声时间过长,会将过多的粒径符合要求的囊泡打碎,使过多的药物泄漏,包封率降低。超声时间对囊泡包封率的影响结果见表 1。

表 1 超声时间对包封率的影响

编号	超声时间(min)	吸光度	浓度(μg/ml)	包封率(%)
1	3	0.108	0.5670	86.10
2	5	0.111	0.6630	83.75
3	7	0.113	0.7270	82.18
4	9	0.114	0.7590	81.10
5	11	0.123	1.047	74.33

由表 1 可见,超声时间对非离子表面活性剂囊泡包封钙黄绿素的能力具有较大的影响,在实验范围内,包封率随着超声时间的延长明显降低,这是由于随着超声时间的延长,部分囊泡被破坏,药物发生泄漏,导致包封率降低。因此,我们选择超声时间为 3 分钟(5s×60 次,间隙时间 6s)。间隙 6s 可以缓解超声所带来的热效应。

胆固醇浓度对包封率的影响:胆固醇(CHOL)是常用的膜添加剂,可增加膜的稳定性,降低渗透性,提高包封率。我们采用固定 span60 的浓度,称取不同质量的胆固醇来观察对钙黄绿素的包封情况。胆固醇浓度对包封率的影响结果见表 2。

表 2 胆固醇浓度对包封率的影响

编号	摩尔比	吸收度	浓度	包封率
1	4:1	0.108	0.6590	83.84
2	4:2	0.105	0.5640	86.18
3	4:3	0.094	0.2170	94.68
4	4:4	0.102	0.4070	90.02

由表 2 可见,随着表面活性剂与胆固醇比例的增加,包封能力增加,在 4:3 时达到最大峰值,继续增加,包封率反而下降。这可能是因为 CHOL 是助表面活性剂,它的加入可以增加双分子层中脂质

分子排列的紧密程度,起到稳定类脂质体的作用,有利于囊泡的形成;但过多的胆固醇分子插入双层膜中又增加了双分子层的不对称性,因此当它达到一定比例后,使药物泄漏机率增加,包封率反而下降。

司盘浓度对包封率的影响:固定胆固醇的质量,然后称取不同质量的司盘,考察不同质量的span含量对包封率的影响,结果见图2。

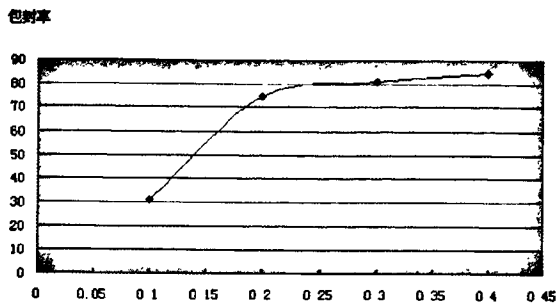


图2 Span 含量对包封率的影响

非离子表面活性剂是组成囊泡的主要成分,非离子表面活性剂之所以能形成囊泡是由其具有亲水头基和疏水尾基的两亲性结构决定的,随着表面活性剂浓度的增加形成囊泡的量增多,因此对药物包封率增加,但当表面活性剂浓度过高时,又限制了表面活性剂链的充分伸展,影响了形成的囊泡的质量和数量,故又导致其包封率下降。

水化温度对包封率的影响:在薄膜分散法制备囊泡的过程中,为了使表面活性剂具有较好的流动性,温度是一个重要的控制条件,因此本部分考察水化温度对包封率的影响,结果见图3。

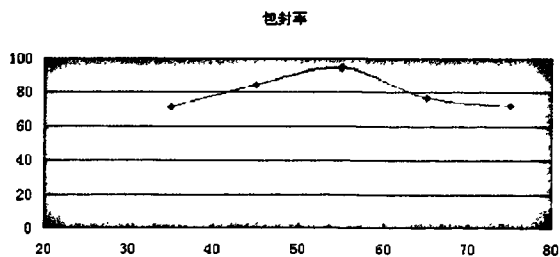


图3 水化温度对包封率的影响

由图3可见,当水化温度为55°C时包封率最高。这是由于在制备温度略高于相变温度时,膜的刚性和厚度均降低,膜的通性增加,更容易形成囊泡,但温度不宜过高,否则通透性过高,会导致药物渗漏。

水化时间对包封率的影响:水化时间也是影响囊泡包封率的重要因素,本部分考察了水化时间对包封率的影响,结果见图4。

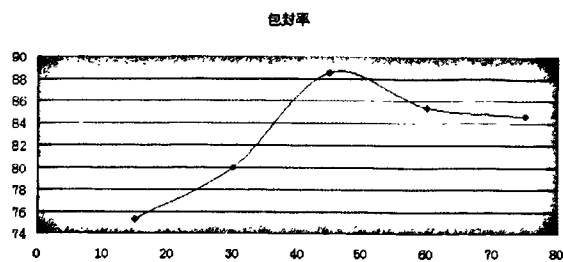


图4 水化时间对包封率的影响

由图4可见,水化时间为45min时,囊泡对钙黄绿素的包封率最高,这是由于在两亲分子定向排列并形成囊泡的过程中,足够的时间有利于囊泡的形成、药物的包封。但过长的包封时间,又会导致部分药物的泄露,因此包封率反而下降。

2.6 正交设计优化处方

根据单因素实验确定的基本条件,选用span60的摩尔质量、胆固醇的摩尔质量,水化温度,水化时间进行4因素4水平正交实验,结果见表3、4、5。

表3 正交实验因素、水平表

	A	B	C	D
1	0.1	0.1	15	35
2	0.2	0.2	30	55
3	0.3	0.3	45	65
4	0.4	0.4	75	75

因素A为胆固醇的摩尔质量,因B为an60的摩尔质量,因素C为水化时间,因素D为水化温度。

表4 正交实验结果

	A	B	C	D	包封率
实验1	0.1	0.1	15	35	29.71
实验2	0.1	0.2	30	55	31.49
实验3	0.1	0.3	45	65	45.41
实验4	0.1	0.4	75	75	56.24
实验5	0.2	0.1	30	65	57.24
实验6	0.2	0.2	15	75	59.56
实验7	0.2	0.3	75	35	57.24
实验8	0.2	0.4	45	55	40.22
实验9	0.3	0.1	45	75	51.36
实验10	0.3	0.2	75	65	40.22
实验11	0.3	0.3	15	55	58.42
实验12	0.3	0.4	30	35	38.68
实验13	0.4	0.1	75	55	25.94
实验14	0.4	0.2	45	35	54.14
实验15	0.4	0.3	30	75	34.04
实验16	0.4	0.4	15	65	54.92
均值1	40.71	41.06	50.65	44.94	
均值2	53.57	46.35	40.36	39.02	
均值3	47.17	48.78	47.78	49.45	
均值4	42.26	47.52	44.91	50.3	
极差	12.86	7.72	10.29	11.28	

表 5 方差分析结果($\alpha=0.05$)

因素	偏差平方和 (Si)	自由度	F 比	F 临界值	显著性
胆固醇	402.088	3	0.999		不显著
司盘 60	137.966	3	0.343		不显著
水化时间	231.085	3	0.574	3.290	不显著
水化温度	320.910	3	0.797		不显著
误差相	2012.23	15			

正交实验结果表明,在四种影响因素中,胆固醇浓度对包封率的影响较大,其次是水化温度、水化时间、Span 浓度。通过正交实验得其最佳工业条件为:胆固醇的摩尔质量 0.2mol、水化时间 45min、水化温度 65℃、司盘 60 摩尔质量为 0.3mol,故最优方案为 A₂C₃D₃B₃。

3 结论

利用薄膜分散法制备的非离子表面活性剂囊泡对钙黄绿素具有较强的包封能力,表面活性剂与胆固醇的用量比、表面活性剂浓度,超声时间,水化时间,水化温度等因素均对其包封率具有明显影响,正交实验结果表明其处方为:胆固醇的摩尔质量 0.2mol、水化时间 45min、水化温度 65℃、司盘 60 摩尔质量为 0.3mol 时对该黄绿素具有较强的

(上接第 307 页)脏的收缩幅度显著增强,但给予美托洛尔,再给予水提物,未见其心肌收缩增强,可见美托洛尔能拮抗广玉兰幼果水提物对心脏的兴奋作用。美托洛尔为选择性的 β_1 受体阻断剂,能使心脏的收缩幅度减弱,收缩频率减慢,心输出量减少,对心脏具有抑制作用,由此推断广玉兰幼果水提物增强心肌收缩力的作用是通过激动心肌上的 β_1 受体产生的。给予维拉帕米后再给予水提物,未见其收缩增强,可见维拉帕米能拮抗广玉兰幼果水提物对心脏的兴奋作用。维拉帕米为钙通道拮抗剂,通过阻滞 Ca^{2+} 内流使心脏的收缩幅度减弱,收缩频率减慢,心输出量减少,具有抑制心脏的作用,故推测广玉兰幼果水提物增强心肌收缩力的作用是通过促进 Ca^{2+} 内流产生的。广玉兰幼果水提物收缩离体血管和增加离体心肌的收缩力,均是引起机体血压升高的重要原因,利用麻醉狗血压

包封能力。钙黄绿素可作为研究该类囊泡作为药物载体的模型药物。

参考文献:

- [1] 赵晓宇,李慧,张保献. 新型药物载体非离子囊泡的制备和评价研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2007,34(6):439-443.
- [2] 王大林,盛坤贤. 非离子表面活性剂囊泡作为药物载体的进展[J]. 中国医药工业杂志, 1998,29(5):235-240.
- [3] 王仲妮,李干佐,张高勇. 表面活性剂缔合结构作为药物载体的研究进展—微乳液、囊泡体系[J]. 自然科学进展, 2004, 14(11):1209-1214.
- [4] 杜美菊,凌翠霞,李娜等. 类脂囊泡作为头孢噻肟钠药物载体的研究[J]. 化学研究与应用, 2006,18(6):635-637.
- [5] Vyas SP, Sing RP, Jain S, et al. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B[J]. Int J Pharm, 2005, 296(1/2): 100-86.
- [6] Manconi M, Sinico C, Valenti D, et al. Niosomes as carriers for tretinoin III. A study into the invitro cutaneous delivery of vesical-incorporated tretinoin[J]. Int. J Pharm, 2006, 311(1/2):11-19.
- [7] Behrooz N. Effect of cholesterol and temperature on the elastic properties of niosomal membranes[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2005, 300:95-101.

(收稿日期 2011-09-15)

的测定已经得到证实。而广玉兰幼果水提物对心脏灌流量无明显影响,可能是由于心肌收缩力的增强,对冠状动脉的压迫作用也相应加大,从而影响灌流量使其无明显改变。有关机制方面问题尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:1112-1113.
- [2] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:986-987.
- [3] 李时珍. 本草纲目[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2004: 1965-1965.
- [4] 谢宗万. 全国中草药汇编[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社, 2000:401-402.

(收稿日期 2011-09-11)