

$K_6 H_2 [CoW_{11} TiO_{40}]$ 纳米脂质体复合物的制备及性质研究*

杨 勇

(重庆师范大学 化学学院, 重庆 400047)

摘 要:制备了包封多酸化合物 $K_6 H_2 [CoW_{11} TiO_{40}]$ (缩写为 $CoW_{11} Ti$) 的纳米脂质体复合物,对其物理化学性质、包封率和含药量、粒度粒径、体外释药量及其体外抗肿瘤活性进行了研究。实验表明,多酸纳米脂质体复合物包封率为 45%,含药量为 23%,粒径分布在 62.2 ~ 76.7 nm 范围内,平均粒径为 69.4 nm。在 4℃ 可以稳定存在 3 个月。多酸化合物被包封于纳米脂质体后,活性明显高于原多酸化合物。

关键词:多酸化合物;纳米脂质体;生物活性

中图分类号:O611.4

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2005)03-0094-04

Characterization and Diological Activity of the Polyoxometalate $K_6 H_2 [CoW_{11} TiO_{40}]$ Incorporated Nanosized-liposome

YANG Yong

(College of Chemistry, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract:The polyoxometalate $K_6 H_2 [CoW_{11} TiO_{40}]$ (abbreviated as $CoW_{11} Ti$) incorporated nanosized-liposome has been prepared and the shape, size-distribution, encapsulate ratio of the liposome and the content of the drug in the complex have been investigated. The experimental results show that the antitumoral activity of $CoW_{11} Ti$ incorporated nanosized-liposome is higher than that of $CoW_{11} Ti$.

Key words:polyoxometalates; nanosized-liposome; biological activity

多酸化学研究发展至今已有 170 多年的历史,它是无机化学中的一个重要研究领域。由于杂多化合物具有许多特殊的性质,如体积较大,分子量较高,能传递并储存电子,晶格氧可以在固体内部迁移并且有较高的热稳定性,其在催化、医药、材料科学等领域发挥着越来越重要的作用^[1~4]。近年来,多酸化合物的生物活性及药物性质研究十分活跃,有些多酸化合物已作为抗 HIV 及抗肿瘤药物应用于临床或进入临床研究。

脂质体(liposome)是一种人工制备的、由天然磷脂和固醇类物质组成的、脂质双分子层包裹水相介质形成的、类似细胞结构的球形自封闭结构,又称类脂泡囊,属携有双层包膜的脂质小囊^[5]。早在 20 世纪 60 年代初,英国的 Bangham^[6] 等发现,磷脂分

散在水中时能形成多层微囊,且每一层均为脂质双分子层,各层之间被水隔开,这种具有生物膜双分子层结构、排列有序的微囊就是脂质体。70 年代初便开始作为一种定向药物载体应用。

本文以脂质体作为药物载体合成了包封多酸化合物 $CoW_{11} Ti$ 的纳米脂质体复合物,研究了多酸脂质体复合物的一些物理化学性质以及体外抗肿瘤活性,为合成在人体内稳定的多酸脂质体复合物提供了一条新路,为进一步研究尺寸效应对抗肿瘤活性的影响,以及开发出高效低毒、高生物利用度的抗肿瘤药物奠定了基础。

1 实验部分

1.1 多酸化合物的制备

* 收稿日期:2004-11-22 修回日期:2005-04-05

资助项目:重庆市教委科学研究项目(Kj050805)

作者简介:杨勇(1978-),女,黑龙江人,助教,硕士,主要从事多酸化学、纳米化学研究。

$K_6H_2[CoW_{11}TiO_{40}]$ 按文献合成^[7], 通过 IR、循环伏安检验。

1.2 多酸纳米脂质体的制备

采取薄膜-超声法制备多酸纳米脂质体复合物。称取适量卵磷脂、胆固醇及维生素 E 溶于氯仿和无水甲醇的混合溶剂中, 充分溶解, 在氮气保护下, 30℃ 水浴下减压旋转蒸发除去有机溶剂, 在烧杯壁上形成均匀、致密的脂质体膜, 即得空白脂质体。

向制备好的脂质体膜中加入含有 40mg Pluronic-F₆₈ [Pluronic-F₆₈ 是由聚环氧乙烷 (EPO) 和环氧丙烷 (PPO) 组成的嵌断共聚物, 同时有亲水性和亲脂性, 是一种药用表面活性剂, 属于排离子型表面活性剂] 和 40mg CoW₁₁Ti 的 20mL 水溶液, 300r/min 条件下使其混合均匀 4 ~ 6h, 然后在超声仪中超声 5min, 即得多酸化合物的脂质体混悬液。将制备好的脂质体混悬液装入截留分子量为 6 000 ~ 10 000 的透析袋中, 在 4℃、250mL 的蒸馏水中透析 24h, 其间换水 1 ~ 2 次。在透析后的脂质体混悬液中加入蔗糖做冻干剂, 用冻干机冷冻干燥 72h 后得蓝白色

粉末状固体, 密封, 于 4℃ 保存。

1.3 仪器与设备

PE-2400 元素分析仪 (Perkin-Elmer 公司); Magna FT-IR 560 傅立叶变换显微红外光谱仪 (KBr 压片); JEM-1200EX 透射电子显微镜 (加速电压 75keV, 铜网 300 目); CD-R74G 电化学分析仪; Cray 500 Scan 紫外-可见-近红外分光光度计; TGL16 台式高速冷冻离心机; 3 000HS 微粒粒度与 Zeta 点位测定仪; 1 815TC 二氧化碳培养箱; Multiskan MK3 型酶标仪; Olympus PM-20 照相倒置显微镜; 日本三洋公司 低温冰箱; HZ-8812S 恒温振荡器; LGJ0.5-II 冷冻干燥机。

2 结果与讨论

2.1 红外和紫外光谱

取适量多酸纳米脂质体的固体样品作红外光谱及紫外可见光谱, 观察红外光谱及紫外可见光谱的特征吸收峰, 以确定药物和载体之间是否有化学反应发生。红外光谱和紫外可见光谱的数据见表 1。

表 1 多酸脂质体复合物的红外光谱数据及紫外可见光谱数据

化合物	IR, ν_{as}/cm		UV, λ/nm		Vis, λ/nm	
	Co-Oa	W-Od	W-Ob-W	W-Oc-W	Od→W	Ob/c→W
CoW ₁₁ Ti	452	934 949	870	685 765	199	260 645
CoW ₁₁ Ti 纳米脂质体复合物	455	926 970	864	682 766	199	260 645

由表 1 可知当 CoW₁₁Ti 被包封于纳米脂质体后, CoW₁₁Ti 的特征峰都存在, 这表明 CoW₁₁Ti 多酸纳米脂质体形成后, 多酸化合物的基本骨架没有改变。

2.2 多酸纳米脂质体包封率及载药量的测定

2.2.1 标准曲线回归方程 实验表明, 在 $\lambda = 645nm$ 处, $C = 0 \sim 2.4mg/mL$ 范围内, CoW₁₁Ti 的浓度 (C) 与其吸光度 (A) 有良好的线性关系。标准曲线方程为:

$$A = -0.0048 + 0.2794C; R = 0.99935, N = 5$$

2.2.2 多酸纳米脂质体包封率的测定 透析后的混合液加浓 HNO₃、丙酮和三氯甲烷, 分液、水层置于 100 mL 容量瓶, 稀释至刻度, 以 40mg Pluronic-F₆₈ (表面活性剂) 的 20mL 水溶液为参比, 测 $\lambda = 645nm$ 处的吸光度, 由标准曲线方程求出未包封药物的浓度, 进而计算出包封率。由包封率计算公式:

包封率 = (被包封药物的质量 $W_{包}$ / 所加入的药物总质量 $W_{总}$) × 100%

根据实验测得的 $A = 0.241$, 带入标准曲线方程

可得 $C = 0.88mg/mL$, 根据定容体积求得包封药物质量为 88mg。所以 CoW₁₁Ti 脂质体复合物的包封率为 $(160-88)/160 \times 100\% = 45\%$ 。

2.2.3 多酸纳米脂质体含药量的测定 由多酸纳米脂质体的包封率可求得含药量。

含药量 = (被包封药物的质量 / 多酸纳米脂质体的总质量) × 100%

所以: 含药量 = $(160 - 88) / (240 + 72) \times 100\% = 23\%$

2.3 形态学研究

取多酸纳米脂质体混悬液适量加水稀释, 然后滴加在专用铜网上, 自然风干后, 在透射电镜下观察粒径大小和形态并且拍摄照片 (图 1), 可见其外观为类球形实体粒子, 类球形实体粒子中含有很多个 CoW₁₁Ti 分子, 多酸

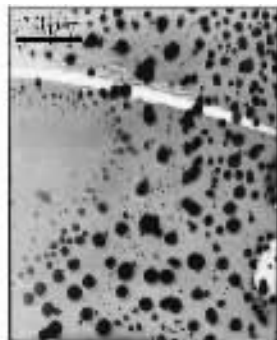
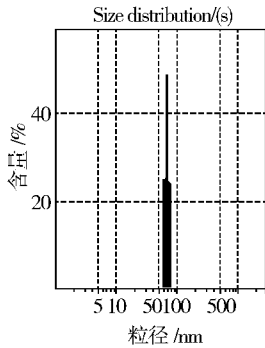


图 1 多酸纳米脂质体的透射电镜图

化合物分子位于脂质体多层微囊的水层, 粒径分布比较均匀。

2.4 粒径和粒度分布

取多酸纳米脂质体混悬液适量, 用蒸馏水稀释, 在粒度分析仪上测定其粒度及分布。经动态光散射处理软件处理, 结果如图2所示。测定结果表明, 实验制备的 $CoW_{11}Ti$ 多酸纳米脂质体 98.9% 分布在 62.8 ~ 76.7 nm 范围内, 平均粒径为 69.4 nm, 仅有 1.1% 分



布在 180 ~ 230 nm。由此可知, 多酸纳米脂质体的粒径分布范围窄, 粒径比较均匀。

2.5 多酸纳米脂质体的体外释药行为研究

2.5.1 实验方法^[8~11] 精密称取 $CoW_{11}Ti$ 纳米脂质体适量, 置于截留分子量为 6 000 ~ 10 000 的透析袋中, 紧密封口后投入具塞样品瓶内, 加入 50 mL 生理盐水 (pH = 7.0) 作为释放介质, 置 37℃, 100 次/min 恒温振荡器中, 以一定的时间间隔取样, 同时加入新鲜的释放介质保持“漏槽状态”。样品液用紫外可见分光光度法测定多酸含量, 用标准曲线回归方程计算释药量, 换算成累积释药百分率后对时间作图。

2.5.2 测定结果 $CoW_{11}Ti$ 纳米脂质体的体外释药曲线见图3。测定结果表明, $CoW_{11}Ti$ 纳米脂质体释药过程具有双向动力学模式, 最初释药快, 随着时间的延续释药逐渐变慢, 显示出一定的缓释效应。可见, 载药脂质体除了可以降低药物的毒副作用外, 还具有延长药物在体内滞留时间的作用, 从而

提高药物的生物利用度。

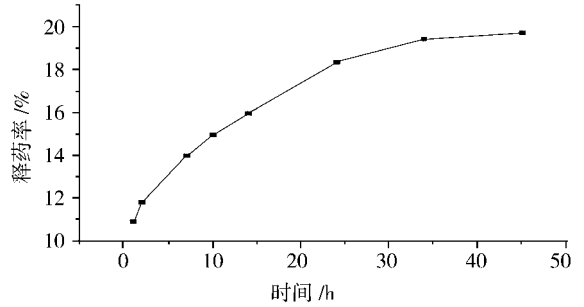


图3 多酸纳米脂质体的体外释药曲线图

2.6 多酸纳米脂质体的稳定性研究

将冷冻干燥后制得的蓝白色脂质体粉针状固体

密封, 4℃于冰箱中放置3个月后, 外观未见明显变化, 取出样品稀释, 在透射电镜上观察并摄制照片(见图4), 与3个月前的透射照片比较, 粒径基本未变。由此可知, $CoW_{11}Ti$ 多酸纳米脂质体在4℃贮存3个月后, 制剂的物理和化学稳定性良好, 其外观、含量均变化不大。

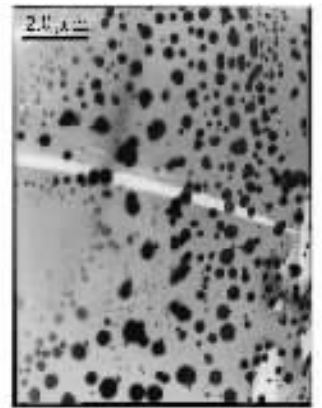


图4 多酸纳米脂质体的透射电镜图(4℃放置3个月后)

2.7 多酸纳米脂质体的体外抗肿瘤活性研究

多酸纳米脂质体的抗肿瘤活性用微量细胞培养四氮唑法^[12] (MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 测定。 $CoW_{11}Ti$ 以及 $CoW_{11}Ti$ 多酸纳米脂质体对人肝肿瘤细胞 SSMC-7721 和乳腺癌细胞 HL-60 的体外抗肿瘤活性实验结果列于表2。

表2 $CoW_{11}Ti$ 多酸纳米脂质体的体外抑瘤作用实验结果

化合物	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	多酸含量 ^a / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	SSMC-7721		HL-60	
			抑制率/%	$IC_{50}^b / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	多酸含量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$IC_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
$CoW_{11}Ti$ /脂质体	62.5	14.4	60.2	15.1	60.3	15.5
	31.3	7.2	36.6	(3.5) ^c	92.1	(3.6) ^c
	15.6	3.6	22.1		36.4	
	7.8	1.8	21.8		60.3	
$CoW_{11}Ti$	100	100	91.7	6.6	21.8	6.9
	50	50	69.4		19.6	
	10	10	28.1		90.4	
脂质体	100		1.0		76.2	
	50		1.0		29.6	

注: ^a $CoW_{11}Ti$ 在复合物中的实际含量; ^b 半数致死量; ^c 多酸化合物的实际半数致死量。

从表2可以看出, CoW_{11}Ti 多酸纳米脂质体对癌细胞具有杀灭作用, 显示出一定的体外抗肿瘤活性。 CoW_{11}Ti 被封装于多酸纳米脂质体之后, 活性高于原杂多化合物。说明脂质体这种药物载体包裹药物之后能够提高药物的体外活性。

在药物靶向制剂中, 脂质体是一种应用极为广泛的定向药物载体, 目前国内外已在广泛的治疗领域对脂质体的应用进行了深入的研究。本文制备了粒度均匀、粒径分布较窄的多酸化合物的纳米脂质体, 脂质体复合物的体外抑瘤活性实验表明, 利用定向载药系统-脂质体包裹本身具有较强生物活性的多酸化合物, 能够使之具有靶向病变部位、组织和细胞的特点, 从而起到增加药物的疗效, 减少药物的治疗剂量和降低药物毒性的作用。

参考文献:

- [1] MIZUNO N, MISONO M. Heterogeneous Catalysis [J]. Chemical Review, 1998, 98: 199-211.
- [2] KOZHEVNIKOV I V. Catalysis by Heteropoly Acids and Multicomponent Polyoxometalates in Liquid-phase Reaction [J]. Chemical Review, 1998, 98: 171-183.
- [3] RHULE J T, HILL C L, JUDD D A. Polyoxometalates in Medicine [J]. Chemical Review, 1998, 98: 327-376.
- [4] KATSOLIS D E. A Survey of Applications of Polyoxo-

metalates [J]. Chemical Review, 1996, 98: 359-385.

- [5] 周力, 吴肖群. 脂质体及其应用[J]. 现代化工, 1997, 9: 18.
- [6] BANGHAM A D, STANDISH M M, WATKINS J C. Diffusion of Univalent Ions Across the Membranes of Swollen Phospholipid [J]. J Mol Biol, 1965, 13: 228-234.
- [7] CHENG Y G, LIU J F. Synthesis and Antitumoral Activity of $\text{K}_6\text{H}_2[\text{CoW}_{11}\text{TiO}_{40}]$ [J]. Synth React Inorg Met -Org Chem, 1997, 27: 239-241.
- [8] 黄飞云, 屠锡德. 难溶性抗肿瘤药物注射剂的制剂研究[J]. 药学进展, 2002, 26(2): 71-74.
- [9] 李春茹, 王鹏, 沈振宏, 等. 尼群地平延迟释放片的体内及体外释放行为的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(7): 300-304.
- [10] 王勤, 路岩, 张娟. 以聚乳酸为载体的药物释放及动物疗效学的研究[J]. 中国生物医学工程学报, 1995, 14(1): 11-15.
- [11] 朱家蕙, 沈正荣, 王芳, 等. 含鞣丸酮的乳酸-乙醇酸共聚物微球的制备及体外药物释放[J]. 中国药学杂志, 1997, 32(10): 595-598.
- [12] 杨勇. 多酸化合物复合材料的合成及其在生物活性方面的研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2004.

(责任编辑 许文昌)