



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101849909 A

(43) 申请公布日 2010.10.06

(21) 申请号 201010124090.7

(22) 申请日 2010.03.15

(71) 申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市学府路 301 号

(72) 发明人 陈敏 李娣 谢吉民 党胜春

张建新 姜德立 黄春霞

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 汪旭东

(51) Int. Cl.

A61K 9/127(2006.01)

A61K 31/663(2006.01)

A61K 47/02(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

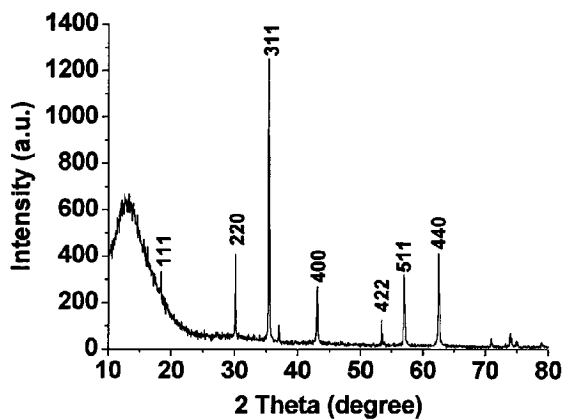
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种磁性氯屈膦酸二钠脂质体的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种磁性氯屈膦酸二钠脂质体的制备方法,属于靶向药物载体制备技术领域。主要步骤包括:(1) 纳米四氧化三铁的制备和(2) 包覆药物和纳米四氧化三铁的脂质体的制备。该方法通过热分解法制备的纳米四氧化三铁粒子尺寸均匀,形貌规则,具有良好的磁性,通过反相蒸发法制备的磁性氯屈膦酸二钠脂质体粒径小于 200nm,符合医用制剂尺寸要求,对磁性粒子及药物封装性良好,所包覆的物质不易泄漏,制备方法简单,工艺设备要求低,具有良好的医用前景。



1. 一种磁性氯屈膦酸二钠脂质体的制备方法,其特征在于其主要步骤包括:

(1) 纳米四氧化三铁的制备:

三颈烧瓶中加入摩尔比为 100 : 1 : 1 的乙酰丙酮铁、苯胺、油酸混合液,磁力搅拌下通入保护气以除去氧气,将体系升温至 80-120℃并保持 20-30min,并搅拌使反应物混合均匀,移去氮气后,继续加热至温度达到 260-270℃,保持回流状态 2-4h;将反应后得到的混合物冷却至室温,无水乙醇洗涤数次,离心,将最终得到的黑色产物分散于无水乙醇,得到四氧化三铁磁流体;

(2) 包覆药物和纳米四氧化三铁的脂质体的制备:

按质量比 5 : 1 称取卵磷脂和胆固醇,溶于氯仿中,震动使固体溶解,将溶液旋转蒸发以除去溶剂氯仿,将附有磷脂膜的烧瓶置于恒温干燥箱中 60℃烘干;

将氯屈膦酸二钠溶于 PH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,加入与氯屈膦酸二钠质量比为 1 : 1 的步骤 (1) 中已制备的四氧化三铁磁流体,将此混合物转移至已烘干的上步骤制备的带有磷脂膜的烧瓶中,将此体系震动,超声后,分别用 0.7% 的氯化钠溶液和 PH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液洗涤,离心,将最终产物置于恒温 4℃冰箱中储存。

一种磁性氯屈磷酸二钠脂质体的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包覆磁性纳米粒子和抗癌药物的脂质体的制备,属于靶向药物载体制备技术领域。

技术背景

[0002] 脂质体是磷脂分子通过疏水缔合作用在水或溶液中自发形成的一种分子有序组合体,直径 25 ~ 1000nm 不等,由于其粒子大小处于纳米级的介观范围,有许多独特的物理、化学性质,而且脂质体的制备工艺简单,在人体内无毒、无免疫原性、可降解、缓释等特点,所负载的药物种类广泛,可以减少所需药量,增强其体内稳定性和药理作用,降低药物的毒副作用,使药物具有被动靶向特征,还可以将脂质体制备成免疫形式以实现主动靶向性。

[0003] 脂质体的结构特点是具有生物相容性的磷脂双分子层膜,药物经负载后,经静脉注射、口服、皮肤、眼部、鼻腔、肺部和粘膜等多种途径给药,以延长药物半衰期,提高生物利用度。由于脂质体的体内分布依赖于给药途径,所以目前脂质体仍以注射应用为主,但近年随着制备技术的完善和应用途径的拓展,脂质体非注射给药方式逐渐成为研究的热点。

[0004] 四氧化三铁纳米微粒是一种具有反尖晶石结构的磁性材料,在其晶体中,由 O^{2-} 围成的空隙有两种类型,即八面体型和正四面体,其中 1/2 的 Fe^{3+} 占据在八面体中,而另外 1/2 的 Fe^{3+} 和全部的 Fe^{2+} 占据在正四面体中。由于其特殊的晶体结构,因此四氧化三铁可作为一种典型的半导体材料,除此外,四氧化三铁独特的磁性可调功能也被人们广泛研究。近年来,四氧化三铁被广泛应用于磁共振成像、给药系统、生物医药、生物传感器等系统中。但是,由于单独的磁性粒子生物相容性差,易团聚等原因,表面进行其他生物相容性好、副作用小的物质包覆的磁性粒子正逐渐取代单独的磁性粒子应用于生物体内,因此将其包埋与生物相容性良好的脂质体内作为磁靶向给药系统的磁性材料,具有很好的应用前景。

[0005] 磁性靶向给药系统包括药物和适当的磁性材料及必要的辅料,在体外磁场引导下,随血液流动,选择的到达并定位于病灶部位。药物从载体中释放后,在病灶组织的细胞或亚细胞水平上发挥药效,因此将正常组织的影响降至最低。磁性靶向脂质体是磁导向药物传递系统中的一种新型药物导向载体,在脂质体内部能够包裹 $10^3 \sim 10^4$ 个药物分子和纳米四氧化三铁分子,因而能够磁靶向给药。磁靶向脂质体对人体几乎不造成伤害,而且内部包裹的磁性物质可以安全的排出体外。因此磁靶向脂质体在药物载体领域受到人们的广泛关注。

[0006] 脂质体的制备方法主要有薄膜分散法、反相蒸发法、冷冻干燥法等,新型靶向脂质体有长循环脂质体、热敏 / 光敏脂质体、免疫脂质体、磁性脂质体等。石丽萍等 (中国危重病急救医学 2001, 13, 11, 659-661) 通过反相蒸发法制备了酸敏性脂质体,并研究了其在小鼠体内重要脏器中的分布研究。在 CN100998563 专利中,利用卵磷脂,胆固醇和磁性微粒通过反相蒸发法制备出磁性脂质体。Vincent Chan 等 (Langmuir 2002, 18, 3134-3141) 通过薄膜法制备了大单室热敏感型脂质体。Shuliang Li 等 (Langmuir 2004, 20, 7917-7925) 通过挤压法制备出包覆肌动蛋白脂质体,并考虑了肌动蛋白含量和脂质体尺寸对其原子力

学显微镜对脂质体结构的影响。

发明内容

[0007] 本发明目的在于提供一种磁性氯屈膦酸二钠脂质体的制备方法,脂质体通过包覆磁性粒子可以提高其药物运输的靶向性,从而提高病灶部位对药物的吸收。

[0008] 本发明实现的主要步骤包括:

[0009] (1) 纳米四氧化三铁的制备:

[0010] 三颈烧瓶中加入摩尔比为 100 : 1 : 1 的乙酰丙酮铁、苯胺、油酸混合液,磁力搅拌下通入保护器以除去氧气,将体系升温至 80-120℃并保持 20-30min 并搅拌使反应物混合均匀,移去氮气后,继续加热至温度达到 260-270℃,保持回流状态 2-4h。将反应后得到的混合物冷却至室温,无水乙醇洗涤数次,离心,将最终得到的黑色产物分散于无水乙醇,得到四氧化三铁磁流体;

[0011] (2) 包覆药物和纳米四氧化三铁的脂质体的制备:

[0012] 按质量比 5 : 1 称取卵磷脂和胆固醇,溶于氯仿中,震动使固体溶解,将溶液旋转蒸发以除去溶剂氯仿,将附有磷脂膜的烧瓶置于恒温干燥箱中 60℃烘干。

[0013] 将氯屈膦酸二钠溶于 PH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中,按照与氯屈膦酸二钠质量比为 1 : 1 的比例,加入步骤 (1) 中已制备的四氧化三铁磁流体,将此混合物转移至已烘干上步骤制备的带有磷脂膜的烧瓶中,将此体系震动,超声后,分别用 0.7% 的氯化钠溶液 (生理盐水) 和 PBS 洗涤,离心,将最终产物置于恒温 4℃冰箱中储存。

[0014] 产物的性能评价:利用透射电子显微镜 (TEM),X 射线衍射仪 (XRD) 对纳米四氧化三铁和脂质体的形貌尺寸进行分析,紫外-可见分光光度计对药物的包封率进行测量,以评估所制备脂质体作为药物载体的负载性能。

[0015] 本发明的技术优点:

[0016] 本发明采用反相蒸发的方法成功制备了磁性氯屈膦酸二钠脂质体,整个技术过程方法简单,低污染,所制备的脂质体对药物的包封性好,可以达到工业化生产的要求。

附图说明

[0017] 图 1 为所制备纳米四氧化三铁的 XRD 衍射谱图,图中衍射峰均为纳米四氧化三铁的特征衍射峰。

[0018] 图 2 为所制备纳米四氧化三铁的透射电镜照片。

[0019] 图 3 为所制备磁性氯屈膦酸二钠脂质体的透射电镜照片。

[0020] 实施例 1

[0021] 三颈烧瓶中加入 0.035g 乙酰丙酮铁,0.1mL 苯胺,0.32mL 油酸,磁力搅拌下通入氮气,将体系升温至 100℃并保持 20min,除去氮气后,继续加热至温度达到 260℃,保持回流状态 2h。

[0022] 将反应后得到的混合物冷却至室温,无水乙醇洗涤数次,离心,将最终得到的黑色产物分散于无水乙醇,使之以磁流体的形式备用。

[0023] 20mL 氯仿中溶解 0.34g 卵磷脂,0.068g 胆固醇,将此混合液旋转蒸发以除去溶剂氯仿,此时烧瓶壁上会附有一层单分子磷脂膜,将此烧瓶在 60℃的恒温干燥箱中烘干。

[0024] 20mLPBS 中加入 0.2g 氯屈膦酸二钠和 0.2g 上述已制备的纳米四氧化三铁磁流体, 将此混合物转移至已烘干的带有磷脂膜的烧瓶中, 将此体系剧烈震动后连续超声 1h 以使单分子磷脂膜自发形成磷脂双分子层, 将得到的脂质体分别用生理盐水和 PBS 洗涤, 离心, 以除去未成囊的磷脂分子。

[0025] 实施例 2

[0026] 三颈烧瓶中加入 0.11g 乙酰丙酮铁, 0.3mL 苯胺, 0.96mL 油酸, 磁力搅拌下通入氩气, 将体系升温至 120℃ 并保持 20min, 除去氮气后, 继续加热至温度达到 260℃, 保持回流状态 2h。

[0027] 将反应后得到的混合物冷却至室温, 无水乙醇洗涤数次, 离心, 将最终得到的黑色产物分散于无水乙醇, 使之以磁流体的形式备用。

[0028] 15mL 氯仿中溶解 0.14g 卵磷脂, 0.028g 胆固醇, 将此混合液旋转蒸发以除去溶剂氯仿, 此时烧瓶壁上会附有一层单分子磷脂膜, 将此烧瓶在 60℃ 的恒温干燥箱中烘干。

[0029] 15mLPBS 中加入 0.1g 氯屈膦酸二钠和 0.1g 实施例 1 中已制备的纳米四氧化三铁磁流体, 将此混合物转移至已烘干的带有磷脂膜的烧瓶中, 将此体系剧烈震动后连续超声 1h 以使单分子磷脂膜自发形成磷脂双分子层, 将得到的脂质体分别用生理盐水和 PBS 洗涤, 离心, 以除去未成囊的磷脂分子。

[0030] 实施例 4

[0031] 三颈烧瓶中加入 0.035g 乙酰丙酮铁, 0.1mL 苯胺, 0.32mL 油酸, 磁力搅拌下通入氮气, 将体系升温至 100℃ 并保持 20min, 除去氮气后, 继续加热至温度达到 260℃, 保持回流状态 2h。

[0032] 将反应后得到的混合物冷却至室温, 无水乙醇洗涤数次, 离心, 将最终得到的黑色产物分散于无水乙醇, 使之以磁流体的形式备用。

[0033] 15mL 氯仿中溶解 0.14g 卵磷脂, 0.028g 胆固醇, 将此混合液旋转蒸发以除去溶剂氯仿, 此时烧瓶壁上会附有一层单分子磷脂膜, 将此烧瓶在 60℃ 的恒温干燥箱中烘干。

[0034] 15mLPBS 中加入 0.1g 氯屈膦酸二钠和 0.1 实施例 1 中已制备的纳米四氧化三铁磁流体, 将此混合物转移至已烘干的带有磷脂膜的烧瓶中, 将此体系剧烈震动后连续超声 1h 以使单分子磷脂膜自发形成磷脂双分子层, 将得到的脂质体分别用生理盐水和 PBS 洗涤, 离心, 以除去未成囊的磷脂分子。

[0035] 实施例 5

[0036] 三颈烧瓶中加入 0.11g 乙酰丙酮铁, 0.3mL 苯胺, 0.96mL 油酸, 磁力搅拌下通入氩气, 将体系升温至 120℃ 并保持 20min, 除去氮气后, 继续加热至温度达到 260℃, 保持回流状态 2h。

[0037] 将反应后得到的混合物冷却至室温, 无水乙醇洗涤数次, 离心, 将最终得到的黑色产物分散于无水乙醇, 使之以磁流体的形式备用。

[0038] 20mL 氯仿中溶解 0.34g 卵磷脂, 0.068g 胆固醇, 将此混合液旋转蒸发以除去溶剂氯仿, 此时烧瓶壁上会附有一层单分子磷脂膜, 将此烧瓶在 60℃ 的恒温干燥箱中烘干。

[0039] 20mLPBS 中加入 0.2g 氯屈膦酸二钠和 0.2g 上述已制备的纳米四氧化三铁磁流体, 将此混合物转移至已烘干的带有磷脂膜的烧瓶中, 将此体系剧烈震动后连续超声 1h 以使单分子磷脂膜自发形成磷脂双分子层, 将得到的脂质体分别用生理盐水和 PBS 洗涤, 离心,

以除去未成囊的磷脂分子。

[0040] 产物的性能评价试验：

[0041] 将所制备的磁性氯屈膦酸二钠脂质体溶于 18mL 氯仿和 2mL 甲醇混合溶液中，除去脂质体膜以释放出所包覆的氯屈膦酸二钠，通过紫外 - 可见分光光度计检测药物浓度以计算药物的包封率。

[0042] 包封率计算方法： $\text{包封率} = (\text{脂质体中包封的药物} / \text{脂质体中药物总量}) \times 100\%$

[0043] 通过计算得到实施例 1-5 的包封率分别为 24.8%，25.3%，22.9%，26.8%，26.4%。

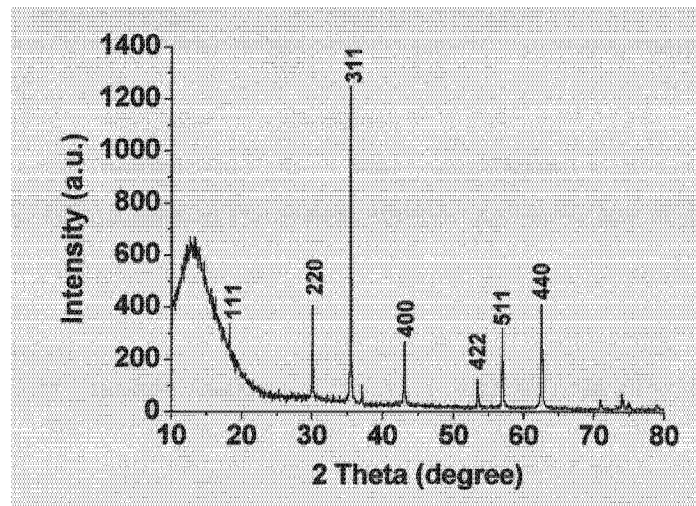


图 1

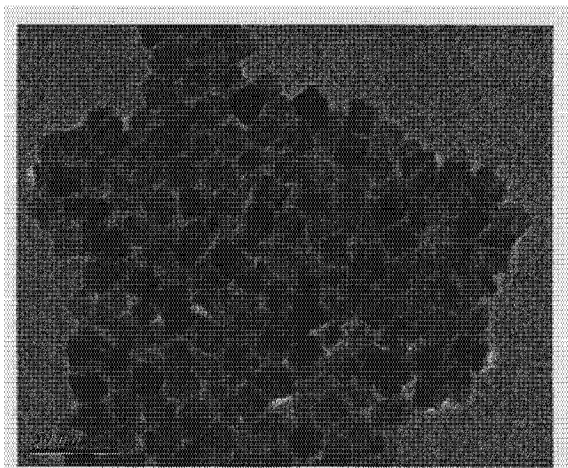


图 2

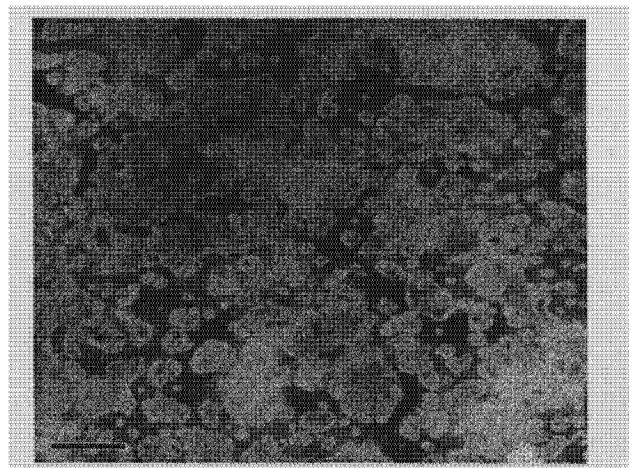


图 3