

苦参碱纳米乳的研制及其对小鼠 抗氧化作用的影响^{*}

曹发昊^{1,2}, 欧阳五庆¹, 王艳萍³, 董红宾^{1,2}

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 西北农林科技大学 国家生命科学与技术人才培养基地, 陕西 杨凌 712100;

3 河南农业大学 食品科学与技术学院, 河南 郑州 450002)

[摘要] 以肉豆蔻酸异丙酯、聚氧乙烯醚-40 氢化蓖麻油(Cremophor RH40)、苦参碱和蒸馏水为原料, 研制苦参碱纳米乳, 检测其基本性质(形态、粒径分布、苦参碱含量及稳定性), 并探讨了其对小鼠血清和肝组织中丙二醛含量和超氧化物歧化酶活性的影响。结果显示, 苦参碱纳米乳为O/W型澄清透明液体, 透射电镜下为球形液滴, 平均粒径为70 nm, 稳定性良好, 苦参碱含量为110.12 mg/mL; 苦参碱纳米乳可显著提高小鼠血清和肝组织的SOD活性($P < 0.05$), 降低MDA含量($P < 0.05$)。苦参碱纳米乳质量稳定, 能提高小鼠的抗氧化能力。

[关键词] 苦参碱; 纳米乳; 抗氧化; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 聚氧乙烯醚-40 氢化蓖麻油

[中图分类号] R944.1; R931.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2007)03-0061-04

Study of preparation of matrin nanoemulsion and its anti-oxidation on mice

CAO Fa-hao^{1,2}, OU YANG Wu-qing¹, WANG Yan-ping³, DONG Hong-bin^{1,2}

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 The National Base of Life Science and Biotechnology Education, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 College of Food Science and Technology, Henan Agriculture University, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: The matrin nanoemulsion was produced with IPM, matrin, Cremophor RH40 and distilled water, and its morphology, particle size distribution, matrin content and stability were evaluated, and its effects on MDA and SOD in blood and liver tissue of mice were studied. The results showed that the matrin nanoemulsion whose type was oil-in-water was stable and its average diameter was about 70 nm. The content of matrin in nanoemulsion was 110.12 mg/mL. Compared with control groups, the activity of SOD in matrin nanoemulsion groups significantly increased ($P < 0.05$), yet the content of MDA decreased ($P < 0.05$). The matrin nanoemulsion is a suitable preparation with better stability and antioxidation effect.

Key words: matrin; nanoemulsion; MDA; SOD; Cremophor RH40

纳米乳(nanoemulsion)是由表面活性剂、助表面活性剂、油相及水相在适当比例下形成的澄清透明液体, 液滴粒径为10~100 nm, 是一种新型理想的药物载体, 能增溶药物, 增强药效, 减少用药次数

和剂量^[1-2]。苦参碱(Matrin)是从豆科槐属植物苦豆子苦参根中分离得到的生物碱, 为白色针状结晶或粉末, 具有抗菌消炎、抗病毒、抗肝纤维化等多种生物活性, 常用的剂型有注射剂、片剂和胶囊剂, 消除

* [收稿日期] 2006-08-31

[作者简介] 曹发昊(1981-), 男, 河南新乡人, 在读硕士, 主要从事纳米药物研究。E-mail: fahao@163.com

[通讯作者] 欧阳五庆(1960-), 男, 陕西凤翔人, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米药物与纳米生物学研究。E-mail: oywq506@sina.com

半衰期较短^[3]。为了有效提高苦参碱的药效和稳定性,减少用药剂量,降低副作用,提高疗效,本试验将苦参碱制成 O/W 型纳米乳,并研究了其对小鼠抗氧化作用的影响,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

TCL-16B 台式高速离心机(湖南星科科学仪器有限公司); TU-1800 紫外分光光度计(上海禾工科学仪器有限公司); JEM-1230 透射电镜(日本); 2000HSA 型激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司); XSZ-HS7 偏光显微镜(上海光学仪器厂); BS224S 电子分析天平(北京赛多利斯系统有限公司)。

苦参碱原料药(陕西旭煌植物科技发展有限公司,批号:051223);苦参碱标准品(中国药品生物制品检定所);丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所);肉豆蔻酸异丙酯(IPM,浙江兰溪物美化公司,批号:0508001);Cremophor RH40(德国 BASF 公司);0.012 5% 溴麝香草酚蓝(pH=7.6)。其他试剂均为分析纯。

1.2 苦参碱纳米乳配方的筛选

以肉豆蔻酸异丙酯、Cremophor RH40 和蒸馏水按不同比例制备纳米乳,将过量苦参碱溶解于纳米乳中,室温下每隔 5 min 振动 1 次,30 min 后静置过滤得到饱和苦参碱纳米乳,测定其中苦参碱的含量,筛选配方。

1.3 苦参碱纳米乳的制备

苦参碱纳米乳配方:苦参碱 1.98 g, Cremophor RH40 4.80 g, IPM 1.20 g, 蒸馏水 10.00 g。称取处方量的各组分,将表面活性剂、油和苦参碱原料药混合均匀作为油相,超声处理 5 min 至苦参碱完全溶解,在 30℃ 水浴中搅拌,搅拌的同时缓慢滴加蒸馏水。在滴加蒸馏水过程中,会出现黏度较大的状态,用偏光显微镜观察是否有双折射现象,发亮的为液晶,不发亮的为凝胶,继续滴定,当体系透明时,即得苦参碱纳米乳。同法制备不含苦参碱的空白纳米乳。

1.4 苦参碱纳米乳基本性质的检测

1.4.1 纳米乳类型鉴定 取 2 份苦参碱纳米乳,向其中分别加入苏丹红和亚甲蓝,根据苏丹红和亚甲

蓝在纳米乳中扩散快慢判断纳米乳类型。若亚甲蓝快于苏丹红,则是 O/W 型纳米乳;相反,则是 W/O 型纳米乳;扩散速度相同,则为双连续型纳米乳。

1.4.2 形态观察及粒径分布 取少量苦参碱纳米乳滴于覆有支持膜的铜网上,静止 10 min 后,再滴加质量分数为 3% 的磷钨酸溶液于铜网上负染 5 min,自然挥干,透射电子显微镜拍照。将苦参碱纳米乳用蒸馏水稀释一定倍数,用激光粒度测定仪测其粒径。

1.4.3 稳定性试验 以处理后纳米乳是否澄清透明、有无药物析出和油水分层为判定依据检测其稳定性。取苦参碱纳米乳适量于离心管中,密封管口,置高速离心机中,5 000 r/min 离心 20 min,考察其外观、粒径和含量。将苦参碱纳米乳、空白纳米乳和配制的苦参碱标准品溶液装入玻璃瓶中,室温光照 30 d,定期取样,观察其外观变化。另取适量苦参碱纳米乳,密封于试管内,分别在 5, 15, 25, 35 和 40 放置 90 d,每隔 5 d 取样,观察其外观变化。

1.5 苦参碱纳米乳中苦参碱含量的测定^[4-5]

1.5.1 苦参碱标准品储备液 称取苦参碱标准品,用蒸馏水配成 1.0 mg/mL 苦参碱标准品储备液。

1.5.2 标准曲线的绘制 精密量取不同体积苦参碱标准品储备液,用蒸馏水稀释得到浓度为 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 和 0.20 mg/mL 的标准液。分别量取 0.5 mL 标准品溶液于分液漏斗,加入体积分数 0.012 5% 溴麝香草酚蓝溶液(pH=7.6) 6 mL,氯仿 6 mL,密塞振摇 3 min(注意放气),静置至下层澄清,分离出氯仿层。于 200~600 nm 波长扫描苦参碱标准液和同法处理的空白纳米乳提取液(不含苦参碱),测其最大吸收峰的波长。结果显示,苦参碱-溴麝香草酚蓝复合物在 415 nm 波长处有最大吸收峰,空白纳米乳提取物在 415 nm 波长处无吸收峰。以同法处理不加苦参碱标准品的氯仿为参比液,于 415 nm 波长测定各标准液的吸光度,以标准液的浓度为横坐标,吸光度为纵坐标绘制标准曲线,求吸光度(A)对浓度(C)的线性回归方程。

1.5.3 苦参碱纳米乳样品的处理和含量测定 将苦参碱纳米乳样品用蒸馏水适当稀释,量取 0.5 mL 稀释液至离心试管中,加 2 mg/mL 盐酸溶液适量,超声振荡 5 min,加入 0.012 5% 溴麝香草酚蓝溶液(pH=7.6) 6 mL,氯仿 6 mL,密塞振摇 3 min(注意放气),静置至下层澄清,分离出氯仿层。以同法处理

不加苦参碱标准品的氯仿为参比液, 于 415 nm 波长测样品提取物的吸光度。

1.5.4 回收率和精密度的测定 量取 8.40, 8.80 和 9.40 mL 空白纳米乳 3 份, 分别加入苦参碱标准品储备液 1.60, 1.20 和 0.60 mL, 得到含游离苦参碱高 (0.16 mg/mL)、中 (0.12 mg/mL)、低 (0.06 mg/mL) 3 个浓度梯度的纳米乳液。分别量取上述 3 个浓度的纳米乳液 0.5 mL 于具塞三角瓶, 按 1.5.3 节方法测定回收率, 重复 3 次, 取其平均值。

1.6 苦参碱纳米乳的抗氧化试验

1.6.1 动物分组与给药剂量 取健康昆明种小鼠 (20~25 g, 购自第四军医大学实验动物中心) 50 只 (雌雄各半), 随机分为 5 组。1 组为空白对照组, 灌服 10 mg/mL 生理盐水, 剂量为 5 mL/kg; 2 组为阳性对照组, 灌服 10 mg/mL 苦参碱水溶液, 剂量同空白对照组; 3~5 组为苦参碱纳米乳组, 灌服剂量分别为 100, 50 和 30 mg/kg。小鼠空腹 12 h 后灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 60 d, 于末次给药 1 d 后, 摘除眼球取血并处死, 取其肝组织。

1.6.2 血清及肝组织中 MDA 和 SOD 活性的测定^[6] 将血样用肝素抗凝, 4 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清待测。肝组织用预冷生理盐水洗净, 滤纸吸干后, 在冰浴条件下剪成碎块。称取适量肝组织碎块, 加入预冷的生理盐水, 冰浴中快速研磨成 100 g/L 组织匀浆, 4 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备测。按试剂盒说明书, 测定 MDA 含量和 SOD 活性。

1.6.3 数据处理 用 SPSS 10.0 软件对数据进行统计处理, 试验结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 并进行方差分析和 t 检验。

2 结果与分析

2.1 苦参碱纳米乳的最佳配方

纳米乳中 Cremophor RH40 和 IPM 质量比 $K_m = 9:1$ 和 $4:1$ 时, 苦参碱含量分别为 100.02 和 110.12 mg/mL。苦参碱纳米乳最佳配方为: 苦参碱 1.98 g, Cremophor RH40 4.80 g, IPM 1.20 g, 蒸馏水 10.00 g。

2.2 苦参碱纳米乳的类型

苦参碱纳米乳类型检测结果表明, 蓝色扩散快于红色, 表明所制的纳米乳为 O/W 型。

2.3 苦参碱纳米乳的稳定性

5 000 r/min 离心 20 min, 苦参碱纳米乳仍保持澄清透明状态, 无分层、絮凝、药物析出现象。室温光照 30 d, 苦参碱纳米乳保持澄清透明, 各项指标无明显变化, 而苦参碱溶液易受光照和温度影响, 被氧化变成黄色。纳米乳在 5℃ 下被冻成冰状, 但置于室温下逐渐恢复透明, 在 15, 25, 35 和 45℃ 保存 90 d 一直呈澄清透明液, 未见分层、沉淀、药物析出。

2.4 苦参碱纳米乳的形态与粒径

苦参碱纳米乳在透射电子显微镜下的形态如图 1 所示。其平均粒径为 70 nm, 其中约 85% 粒子的粒径在 55~80 nm, 10% 的粒径小于 55 nm, 5% 的粒径在 80~100 nm, 粒径分布较窄。

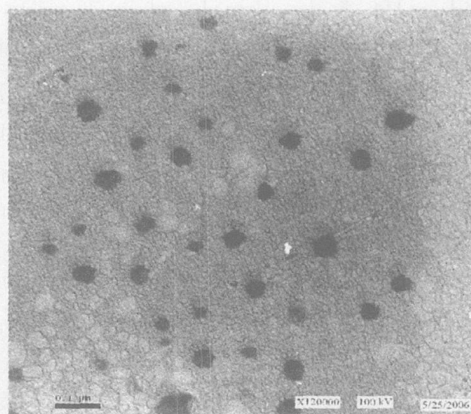


图 1 苦参碱纳米乳透射电子显微镜照片 ($\times 120\ 000$)

Fig 1 Morphology of matrin nanoemulsion under electron microscopy ($\times 120\ 000$)

2.5 苦参碱纳米乳中苦参碱的含量

分光光度法测得苦参碱浓度为 0.04~0.20 mg/mL 时, 与吸光度线性关系良好, 标准曲线的回归方程为: $A = 4.1066C - 0.0050$ ($r = 0.9973$)。苦参碱纳米乳高、中、低 3 个浓度的回收率分别为 $(99.46 \pm 2.56)\%$, $(98.82 \pm 3.12)\%$ 和 $(98.12 \pm 2.34)\%$, 平均回收率为 98.80%, RSD 为 0.67%。5 批苦参碱纳米乳样品中的苦参碱含量分别为 109.62, 110.95, 111.23, 109.78 和 109.02 mg/mL, 平均含量为 110.12 mg/mL ($n = 5$), RSD 为 0.93%。

2.6 苦参碱纳米乳的抗氧化性

由表 1 可知, 3、4 组小鼠血清和肝组织中的 MDA 含量较 2 组显著降低, SOD 活性显著升高。

($P < 0.05$), 其中 3 组作用较强。2 组与 5 组相比, MDA 含量和 SOD 活性无显著差异($P > 0.05$), 但 2 组的抗氧化的作用强于 5 组。与 1 组相比, 2~5 组

MDA 含量显著降低($P < 0.05$), SOD 活性显著升高($P < 0.05$)。

表 1 苦参碱纳米乳对小鼠血清及肝组织中 MDA 含量和 SOD 活性的影响($n = 10$)

Table 1 Effect of matrin nanoemulsion on the content of MDA and activity of SOD in blood and liver tissue of mice ($n = 10$)

组别 Group	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) Dose	MDA/($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)		SOD/($\text{nU} \cdot \text{mg}^{-1}$)	
		血清 Serum	肝 Liver	血清 Serum	肝 Liver
1 组 1st group	-	4.87 ± 0.05 c	3.00 ± 0.08 c	132.62 ± 0.14 c	9.29 ± 0.06 c
2 组 2nd group	50	4.70 ± 0.07 a	2.79 ± 0.06 a	149.67 ± 0.54 a	10.69 ± 0.08 a
3 组 3rd group	100	4.25 ± 0.06 b	2.41 ± 0.06 b	162.57 ± 0.34 b	13.58 ± 0.14 b
4 组 4th group	50	4.42 ± 0.06 b	2.50 ± 0.04 b	160.31 ± 0.54 b	13.30 ± 0.46 b
5 组 5th group	30	4.77 ± 0.07 a	2.86 ± 0.07 a	145.56 ± 0.36 a	10.14 ± 0.08 a

注: 同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Data with different small letters in the same row differ significantly at $P < 0.05$.

3 讨 论

本研究结果表明, 纳米乳能显著增加苦参碱的溶解性, $K_m = 4:1$ 的纳米乳中苦参碱的含量高于 $K_m = 9:1$ 的纳米乳, 表明苦参碱含量随着 IPM 含量的增加而增大, 其原因可能是苦参碱有亲脂基团, 能溶于肉豆蔻酸异丙酯和 Cremophor RH40 而被包裹于界面膜所形成的颗粒中。由于纳米乳含较高浓度的表面活性剂, 为了降低其毒副作用, 应尽量增加油相 IPM 的含量, 减小表面活性剂的用量或者选用生物相容性好的表面活性剂, 所以本试验选用 $K_m = 4:1$ 的纳米乳处方。苦参碱纳米乳也能很好地提高苦参碱的稳定性, 防止其被氧化, 这可能是由于纳米乳的界面膜结构和油相的保护作用所致。

自由基攻击细胞膜中的不饱和脂肪酸, 会引发脂质过氧化反应生成丙二醛。故丙二醛含量可反映组织细胞脂质过氧化的速率和强度, 间接反映细胞的损伤程度, 其含量越高, 生物膜破坏越严重。SOD 可清除自由基, 减轻和阻断脂质过氧化, 保护机体免受自由基损伤^[7-9]。本试验结果表明, 在降低 MDA 含量和升高 SOD 活性方面, 苦参碱纳米乳高剂量组(3 组)和中剂量组(4 组)明显优于其他各组($P < 0.05$); 苦参碱溶液组(1 组)和低剂量组(5 组)间无显著差异, 但前者的抗氧化作用优于后者。苦参碱纳米乳可以很好清除自由基, 显著降低 MDA 含量, 增强 SOD 活性, 在一定程度上可以抗肝纤维化^[10], 原因是苦参碱纳米乳是一种稳定的制剂, 微乳液滴小, 粒径分布均匀, 表面张力较低, 具有靶向性, 易于通过胃肠壁的水化层, 使药物能直接和胃肠上皮细胞接触, 可维持恒定的血药浓度或药理效应, 延长药物

作用时间, 增强苦参碱的吸收和抗氧化作用, 减少苦参碱用量。

本研究为苦参碱纳米乳制剂的开发奠定了基础, 对其更好地应用于临床具有重要意义。随着研究的不断深入, 纳米乳在药剂学领域将有更广阔的发展前景。

[参考文献]

- [1] 张正全, 陆 彬. 微乳给药系统研究概况[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(3): 139.
- [2] Lawrence M J. Surfactant system microemulsions and vesicles as vesicles for drug delivery[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1994, 19: 257.
- [3] 马方励, 程 怡. 苦参碱多种制剂的药效学研究进展[J]. 中草药, 2004, 26(5): 420-421.
- [4] 仵文英, 刘 硕, 张抗怀, 等. 酸性染料比色法测定苦参碱脂质体中苦参碱的含量[J]. 中国药房, 2005, 16(22): 1734-1735.
- [5] 陈星灿, 陈大为, 范晓文, 等. 心律宁片剂体外释放度研究[J]. 中草药, 1994, 25(8): 405.
- [6] 农 嵩, 易金远, 陈家军, 等. 乌圆口服液对 D-半乳糖致衰小鼠的抗衰老作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(5): 579-580.
- [7] 王 璇, 陆征丽, 常 红, 等. 维生素 C、E 对体外血管内皮细胞氧化损伤保护作用的研究[J]. 天津医科大学学报, 2005, 11(2): 187-194.
- [8] Tatiana A, Elisabetta D, Maurizio B, et al. Lack of *in vitro* protection by a common sunscreen ingredient on UVA-induced cytotoxicity in keratinocytes[J]. Toxicology, 2004, 203: 165-178.
- [9] Simon E T, Nigel P, Trevor J M. Glutathione modulates the level of free radicals produced in UVA-irradiated cells[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2000, 57: 102-112.
- [10] 胡彦武, 孙 罡. 苦参碱类成分抗肝纤维化作用机制的研究进展[J]. 食品与药品, 2006, 8(7): 14-16.