

姜黄素眼用脂质体的制备及晶状体抗氧化作用考察

倪斌¹, 李翔^{1,2}, 罗云¹, 张婧^{1*}, 廖正根¹, 刘婧³, 林艳³, 崔汉峰³

(1. 江西中医药大学现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 江西中医药大学中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;

3. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 制备 *N*-三甲基壳聚糖(TMC)包覆姜黄素眼用脂质体并考察其抑制大鼠硒性白内障晶状体氧化作用。方法: 采用乙醇注入法制备姜黄素脂质体(Cur-TCL), 通过星点设计-效应面法优化脂质体处方工艺; 采用过膜法、透射电镜、粒径电位测定仪测定 Cur-TCL 的理化性质; 建立大鼠硒性白内障模型, 考察 Cur-TCL 对白内障形成过程中晶状体氧化的抑制作用。结果: 最佳处方为姜黄素 1.41 mg, 磷脂质量分数 4%, 胆固醇-磷脂(1:5.44)。经 0.5% TMC 溶液包覆后脂质体呈球形, 粒径增大, 电位显著提高, 药物包封率基本不变。与未包覆脂质体相比, Cur-TCL 组大鼠晶状体中 SOD 活力提高 30.3%, MDA 摩尔浓度减少 52.4%, GSH 含量增加 1.29 倍。结论: Cur-TCL 可显著抑制硒性白内障导致的晶状体氧化过程, 为该制剂治疗白内障提供参考。

[关键词] 姜黄素; *N*-三甲基壳聚糖; 脂质体; 抗氧化作用; 高效液相色谱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)06-0005-05

[doi] 10.11653/syfj2014060005

Preparation of Curcumin-Loaded Ophthalmic Liposomes and Investigation of Its Lenses Antioxidant Efficacy

NI Bin¹, LI Xiang^{1,2}, LUO Yun¹, ZHANG Jing^{1*}, LIAO Zheng-gen¹, LIU Jing³, LIN Yan³, CUI Han-feng³

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM),

[收稿日期] 20131024(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202927); 江西省研究生创新专项基金项目(YC2012-S106); 江西省教育厅青年基金项目(GJJ12535, GJJ12536); 江西省卫生厅中医药科研计划(普通)课题(2012A160, 2012A157); 江西省青年科学基金项目(20132BAB215022)

[第一作者] 倪斌, 学士, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 0791-87119011, E-mail: 823570378@qq.com

[通讯作者] * 张婧, 博士, 副教授, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 0791-87119027, E-mail: evens_zhang@163.com

- [4] 梁志毅, 谢菲, 何健, 等. HPLC 法测定马兜铃蜜炙过程中马兜铃酸 A 的含量变化[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(6): 628.
- [5] 顾雪竹, 李先端, 钟银燕, 等. 蜂蜜的现代研究及应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(6): 70.
- [6] 王韵茵, 张志英, 张霭苓. 蜂蜜黏度的测定及炼蜜的最佳化[J]. 河北工学院学报, 1990, 19(3): 95.
- [7] 王林波, 刘蔚, 陈祝康. 维生素 A 棕榈酸酯凝胶动力黏度测定方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11): 1808.
- [8] 李成斌, 林瑜, 邓国宾, 等. 八种蜂蜜挥发性成分分析[J]. 精细化工, 2006, 23(11): 1082.
- [9] 庆易微, 杨林. 蜂蜜中水分的测定[J]. 青海师范大学学报: 自然科学版, 2001(2): 39.
- [10] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 食品安全国家标准——蜂蜜[S]. 北京: 中国标准出版社, GB 14963-2011, 2011.
- [11] 陈黎红. 联合国粮农组织/世界卫生组织 (FAO/WHO) 食品法典委员会 (CAC) 蜂蜜标准 (CAC 2001 年修订最新版)[J]. 蜜蜂杂志, 2005, 25(8): 39.
- [12] 曹佩玉, 郭立山. 蜂蜜炼制标准的探讨[J]. 中成药研究, 1987(11): 4.
- [13] 刘明德, 冯立彬, 武生. 蜂蜜中含水量与密度定量关系的研究[J]. 黑龙江医学, 2000(5): 10.

[责任编辑 仝燕]

Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;
2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in
Chinese Herbal Medicine, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330006, China;
3. School of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Objective: To prepare *N*-trimethyl chitosan (TMC) -coated liposomes loaded with curcumin (Cur-TCL) and investigate its *in vivo* antioxidant effect on selenite-induced cataract lenses. **Method:** Cur-TCL were prepared by ethanol injection method and formulation was optimized by central composite design-response surface methodology; Membrane filter, transmission electron microscope, dynamic light scattering and electrophoretic light scattering were employed to determined physicochemical parameters of Cur-TCL; Selenite cataract model in rats was established, inhibition of Cur-TCL on oxidation process in selenite cataract formation was investigated. **Result:** Optimal formulation was as following: phospholipids concentration 4%, cholesterol-phospholipid (1 : 5.44), curcumin 1.41 mg and the concentration of TMC solution 0.5%. Cur-TCL was spherical-shaped with increasing of mean particle sizes, significantly improving of Zeta potential and drug encapsulation efficiency basically unchanged (92.5 ± 0.35)% after coating liposomes with TMC. Compared with uncoated liposomes, SOD activity was elevated by 30.3%, molar concentration of MDA decreased by 52.4% and the content of GSH increased 1.29-fold. **Conclusion:** Cur-TCL could significantly delay lenses oxidation process of selenite cataract. This work was useful for further research on application of Cur-TCL for cataract therapy.

[Key words] curcumin; *N*-trimethyl chitosan; liposomes; antioxidant; HPLC

白内障是世界首位致盲因素,研究表明自由基及其相关的氧化应激是导致晶状体生理功能改变而导致白内障的关键步骤^[1]。姜黄素(Cur)为姜黄中有效成分,具有抑制脂质过氧化、蛋白质氧化、诱导性氧化氮合酶(iNOS)活性等作用。Cur的抗氧化能力来源于结构中不饱和脂肪族及芳香族基团,通过提供质子阻断自由基链式反应,其中酚羟基是Cur抗氧化活性的中心部位^[2-3],在抗白内障治疗过程中应用前景广泛,但Cur水溶性差,在体内吸收少、代谢过快,导致生物利用度低,极大限制了其临床应用。

角膜的特殊脂水层交替结构、角膜上皮细胞的紧密连接、角膜和结膜表面的黏液层、泪液中酶均会影响药物的角膜透过,该类多重屏障的存在会引发角膜前滞留时间短等问题^[4]。研究表明局部给药后,药物在眼表的滞留时间仅1.6 min,检测房水中药物的绝对生物利用度均 < 5%,很少能达到15% ~ 20%^[5]。

前期研究自制了 *N*-三甲基壳聚糖(TMC)并对难溶性、低渗透性药物进行包封^[6],利用TMC的高正电荷性,提高包载药物的生物利用度;因为TMC具有生物黏附性^[7],TMC的长链可与黏蛋白相互缠结,从而可延长药物角膜前滞留时间。本实验以TMC为脂质体膜修饰材料,采用有机溶剂注入法制

备姜黄素脂质体(Cur-TCL),以包封率为评价指标,通过星点设计-效应面法优选Cur-TCL的处方并考察其抗晶状体氧化损伤能力。

1 材料

JY92-IIN型超声波细胞粉碎机(宁波新艺超声设备有限公司),BS-124S型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),Nano ZS型纳米粒度仪(英国马尔文公司),HJ-4A型多头磁力搅拌器(金坛市科析仪器有限公司),UV-2550型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),3-18K型冷冻高速离心机(德国西格玛公司),1200系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)。

姜黄素(国药集团化学试剂有限公司),大豆磷脂(上海太伟药业有限公司),胆固醇(天津市大茂化学试剂厂),壳聚糖(浙江澳兴生物科技有限公司),总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、GSH测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),其他试剂均为分析纯。

SD大鼠,体重10~20 g,雌雄各半,由江西中医药大学动物实验技术中心提供,许可证号JZDW No.:2012-0730。

2 方法与结果

2.1 TMC的合成 通过壳聚糖和碘甲烷在强碱条件下甲基化合成^[4]。称取壳聚糖2 g溶于80 mL吡

咯烷酮中,于碱性条件下加入碘甲烷 11.5 mL,60 ℃ 水浴 1 h,加入碱性溶液再次反应 1 h,加入纯乙醇 500 mL 醇沉,用乙醚析 2 次,每次 20 mL,真空干燥,将产物溶于 10% NaCl 40 mL 中,经纯乙醇沉淀后于 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,产物溶于适量水中,冷冻干燥,得到的白色海绵状固体即为 TMC。

2.2 TMC 结构的确认 将纯化的 TMC 溶于重水中,通过 H-核磁共振光谱分析,季碱化水平(DQ)通过公式 $DQ = [(CH_3)_3]/[H] \times 1/9 \times 100\%$ 计算,其中 $[(CH_3)_3]$ 为氨基上三甲基氢原子在 δ 3.3 的积分, $[H]$ 为其他氢原子的积分。

2.3 姜黄素的含量测定

2.3.1 色谱条件 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.2% 乙酸(58:42),流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 ℃,检测波长 426 nm,进样量 20 μL。

2.3.2 标准曲线的绘制 精密称取 Cur 5 mg 置于 50 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,作为储备液。精密称取储备液适量,加甲醇稀释成 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mg·L⁻¹ 的系列溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标, Cur 质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 174.17X - 62.873$ ($r = 0.9999$),线性范围 1 ~ 64 mg·L⁻¹。

2.4 姜黄素未包覆脂质体的制备 采用乙醇注入法制备姜黄素未包覆脂质体(Cur-L),称取处方量 Cur、卵磷脂、胆固醇溶于乙醇(2 mL)中,于磁力搅拌下将制备的类脂溶液缓慢匀速注入 50 ℃ 水溶液 10 mL 中,在保持该温度下除去乙醇,超声均化(100 W) 3 min,得透明乳光混悬液。

2.5 包封率的测定 采用过膜法^[8]测定。精密吸取过膜前后脂质体适量,加无水乙醇破乳,各进样 20 μL,按 2.3.1 项下色谱条件测定峰面积,计算包封率。

2.6 制备工艺优选 在预试验基础上,选择姜黄素质量、磷脂质量分数、胆固醇和磷脂质量比为考察因素,以包封率为评价指标,采用星点设计-效应面法优化脂质体制备工艺,试验安排与结果见表 1。

应用 Design Expert 8.0 软件进行二次多项式逐步回归拟合,得模型 $Y = 75.26 - 20.28A + 11.89B + 2.81C + 8.7AB - 1.67AC + 7.63BC - 3.32A^2 - 0.87B^2 - 2.44C^2$,固定某一自变量为中值,其他 2 个自变量为横坐标,绘制三维因变量图,见图 1,结合工业可行性和投入产出比考虑,确定最佳处方为姜黄素 1.41 mg,磷脂质量分数 4%,胆固醇-磷脂

表 1 N-三甲基壳聚糖包覆姜黄素眼用脂质体处方工艺星点试验安排

No.	A 姜黄素 质量/mg	B 磷脂质量 分数/%	C 胆固醇-磷脂	包封率 /%
1	3.00	2.50	4.50	94.7
2	4.00	2.50	4.50	70.5
3	7.00	4.00	7.00	87.9
4	4.00	2.50	0.30	56.8
5	4.00	2.50	8.70	78.3
6	1.00	4.00	7.00	89.8
7	5.00	2.50	4.50	60.1
8	1.00	1.00	2.00	79.8
9	3.00	2.50	4.50	88.7
10	7.00	4.00	2.00	54.8
11	1.00	4.00	2.00	91.3
12	7.00	1.00	7.00	11.1
13	6.00	2.50	4.50	48.7
14	4.00	5.02	4.50	90.6
15	2.00	2.50	4.50	85.5
16	4.00	3.00	4.50	93.6
17	4.00	2.50	4.50	72.6
18	1.00	1.00	7.00	89.1
19	7.00	1.00	2.00	49.8
20	4.00	2.50	4.50	68.7

(1:5.44)。按最佳处方工艺重复 3 次试验,结果包封率(92.5 ± 0.35)%,预测值(97.8%)与实测值接近,说明优选的处方准确可靠。

2.7 Cur-TCL 的制备及评价 取 0.5% TMC 水溶液 1 mL,缓慢匀速地注入至 Cur-L 1 mL 中,室温条件下磁力搅拌 30 min,即得 Cur-TCL。将载有 Formvar 支持膜的铜网置于蜡板上,在膜上滴上 Cur-TCL 样品,自然晾干,置于透射电子显微镜下观察脂质体形态,见图 2。将 Cur-TCL 混悬液适量,稀释至适当倍数,检测脂质体的粒径分布和 Zeta 电位,结果 Cur-L 和 Cur-TCL 的包封率($\bar{x} + s, n = 3$)分别为(92.5 ± 0.35)%, (93.1 ± 0.27)%,粒径依次为(96.5 ± 1.15), (171 ± 4.9) nm, Zeta 电位分别为(-36.0 ± 2.11), (21.6 ± 0.35) mV,显示 Cur-TCL 呈球形或类球形,与 Cur-L 相比, Cur-TCL 粒径增大, Zeta 电位显著增加,说明 TMC 已被包覆在脂质体表面。

2.8 Cur-TCL 对晶状体氧化过程的抑制作用 取 11 日龄大鼠随机分组如下 4 组(空白组、模型组、

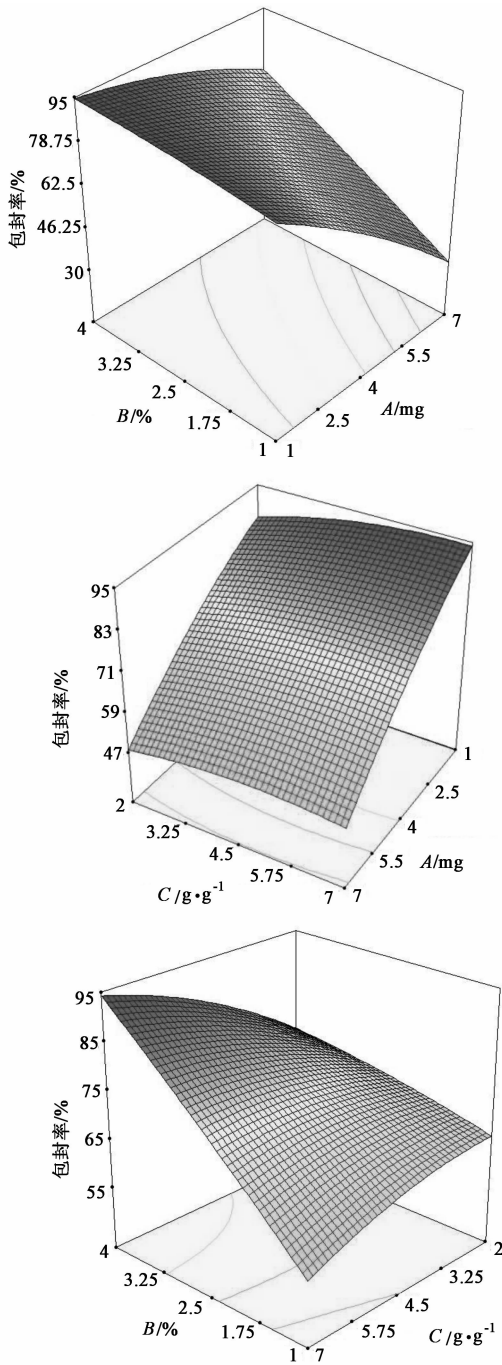


图 1 姜黄素质量、磷脂质量分数、胆固醇和磷脂质量比相互作用对封装率影响的效应面

Cur-L 组、Cur-TCL 组), 每组 6 只, 空白组和模型组给予生理盐水。给药时拨开大鼠眼帘成杯状后滴入样品 20 μL 并保持约 1 min, 每天给药 4 次, 持续给药 8 d。除空白组外, 各组动物均在首次给药后 30 min 于大鼠后颈背部皮下按 19 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ 注射亚硒酸钠生理盐水溶液以诱发大鼠白内障的形成^[4]。给药结束后, 取大鼠晶状体, 加 10 倍量生理盐水组织匀浆, 测定晶状体总超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)及谷胱甘肽(GSH)含量。

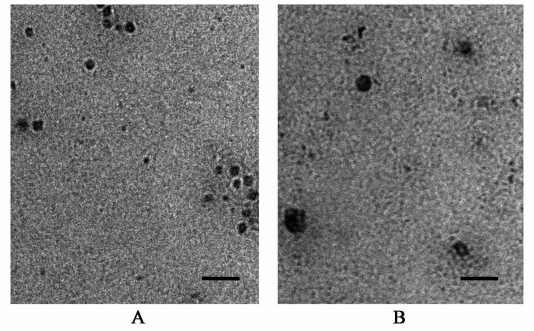


图 2 Cur-L(A)和 Cur-TCL(B)
透射电镜(Bar = 200 nm, $\times 50\ 000$ 倍)

SOD 属于酶促体系, 通过催化 2 个 O_2^- 发生歧化反应可生成 H_2O_2 和分子氧, 催化反应式为 $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ 。采用黄嘌呤氧化酶法, 按总 SOD 检测试剂盒的方法测得 SOD 活力分别为 (60.2 ± 3.5) , (26.1 ± 6.1) , (40.7 ± 3.1) , $(53.1 \pm 5.0) \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$, 表明 Cur-TCL 组的 SOD 活力显著高于模型组, 是 Cur-L 组的 1.3 倍, 对大鼠晶状体中 SOD 指标的改善优于 Cur-L 组。

MDA 可与蛋白质的氨基及磷脂某些基团相互交联, 对晶状体造成损害, 故 MDA 含量可显示机体内脂质过氧化程度, 间接反映细胞损伤程度^[9]。采用硫代巴比妥酸法, 按 MDA 检测试剂盒的方法测得 MDA 摩尔浓度分别为 (3.4 ± 0.5) , (13.8 ± 0.1) , (8.4 ± 0.9) , $(4.0 \pm 1.0) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明 Cur-TCL 组的 MDA 含量降至模型组的 30%, 同时与 Cur-L 组相比, 降低了 52.4%。

亚硒酸钠在晶状体内与 GSH 生成氧化型谷胱甘肽, 继而产生二氧化硒, 氧化巯基^[10]。GSH 缺乏或耗竭会产生中毒作用或加重中毒作用, 这可能与氧化损伤增强有关, 故 GSH 含量是衡量机体抗氧化能力的重要因素, 结果 GSH 质量分数分别为 (40.9 ± 0.9) , (15.5 ± 2.8) , (28.1 ± 1.9) , $(36.1 \pm 1.9) \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, Cur-TCL 组的 GSH 含量为 Cur-L 组的 1.29 倍, 为模型组的 2.32 倍。

3 讨论

眼用药物生物利用度的提高多采用以下 2 种方式: ①延长药物在眼部的滞留时间, 如载体制剂的制备^[11]; ②改善药物的跨角膜特性, 如加入适宜的角膜渗透促进剂^[12]。本文选取水溶性差、抗氧化作用强的姜黄素作为眼部制剂模型药物, 采用操作简单、经济成本低的乙醇注入法制备 Cur-TCL, 结果该脂质体封装率较高、粒径大小均匀, 通过 TMC 的修饰, 脂质体表面带正电。

通过考察大鼠硒性白内障过程中晶状体氧化的

抑制作用,发现与 Cur-L 组相比, Cur-TCL 组抗晶状体氧化损伤作用增强,这与脂质体膜表面修饰的 TMC 促进药物吸收的作用相关。TMC 作为脂质体的修饰材料^[13], Cur-L 可与荷正电自制 TMC 通过静电吸附作用、范德华力或聚合物链缠结的机械作用,在 Cur-L 表面吸附 TMC,形成荷正电的 Cur-TCL,使包覆脂质体能与表面带负电的角膜可产生静电吸附,延长药物滞留时间;可能打开细胞间紧密连接,促进药物的跨角膜透过,减弱角膜的生物屏障作用从而减少由眼部自我保护机制造成的大量药物流失,最终提高药物的生物利用度。

[参考文献]

- [1] Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, et al. Global data on visual impairment in the year 2002 [J]. Bull World Health Organ, 2004, 82(11) : 844.
- [2] Chen W F, Wei Q Y, Deng S L, et al. Antioxidative and cytotoxic activities of Curcumin and its synthetic analogs [C]. Shanghai: 17th IUPAC Conference on Physical Organic Chemistry, 2004.
- [3] Barclay L R C, Vinqvist M R, Mukai K, et al. On the antioxidant mechanism of curcumin; Classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity [J]. Org Lett, 2000, 2 (18) : 2841.
- [4] Zhang J, Wang S L. Topical use of Coenzyme Q₁₀-loaded liposomes coated with trimethyl chitosan; Tolerance, precorneal retention and anti-cataract effect [J]. Int J Pharm, 2009, 372(1/2) : 66.
- [5] Stella B, Arpicco S, Rocco F, et al. Nonpolymeric

- nanoassemblies for ocular administration of acyclovir; Pharmacokinetic evaluation in rabbits [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2012, 80(1) : 39.
- [6] Wang S L, Zhang J, Jiang T Y, et al. Protective effect of Coenzyme Q₁₀ against oxidative damage in human lens epithelial cells by novel ocular drug carriers [J]. Int J Pharm, 2011, 403(1/2) : 219.
- [7] Merwe S M van der, Verhoef J C, Verheijden J H M, et al. Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2004, 58(2) : 225.
- [8] 任瑾, 方正杰, 印晓星, 等. 槲皮素前体脂质体的质量考察 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(1) : 39.
- [9] 李垣君. 辅酶 Q₁₀ 对 UVB 损伤人角质形成细胞保护作用研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2005.
- [10] Varma S D, Hegde K R. Effect of α -ketoglutarate against selenite cataract formation [J]. Exp Eye Res, 2004, 79(6) : 913.
- [11] Cao F, Wang Y J, Ping Q N, et al. Zn-Al-NO₃-layered double hydroxides with intercalated diclofenac for ocular delivery [J]. Int J Pharm, 2011, 404(1/2) : 250.
- [12] Monika Y, Munish A. Preparation and evaluation of nanoparticles of gum cordia, an anionic polysaccharide for ophthalmic delivery [J]. Carbohyd Polym, 2010, 81(4) : 871.
- [13] Schipper N G, Olsson S, Hoogstraate J A, et al. Chitosan as absorption enhancers for poorly absorbable drugs 2: mechanism of absorption enhancement [J]. Pharm Res, 1997, 14(7) : 923.

[责任编辑 仝燕]

欢迎订阅 2014 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、综述、学术交流、信息等栏目,交流方剂的药理学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16 开本,192 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价 35 元,全年 840 元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655。欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfx_2010@188.com,网址:www.syfxzz.com。