

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810054580.7

[51] Int. Cl.

A61K 33/26 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/28 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 1 月 7 日

[11] 公开号 CN 101336931A

[22] 申请日 2008.2.29

[21] 申请号 200810054580.7

[71] 申请人 河北师范大学

地址 050016 河北省石家庄市裕华东路 113 号

[72] 发明人 常彦忠 葛 兰 段相林

[74] 专利代理机构 石家庄新世纪专利商标事务所
有限公司

代理人 董金国

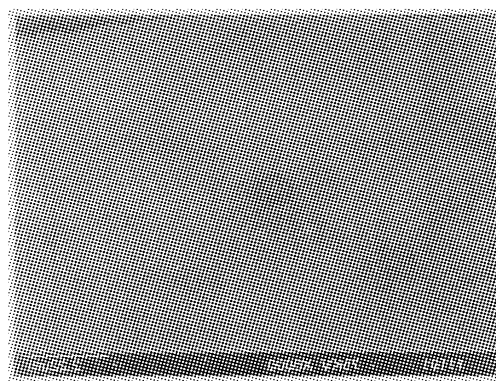
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 4 页

[54] 发明名称

补铁剂铁脂质体及其制备方法

[57] 摘要

本发明用乙醇注入法制备铁脂质体，得到一种新型补铁剂。将卵磷脂、胆固醇乙醇溶液在特定条件下采用分散到含 PBS 铁溶液中制备而成，其组成以质量份数比表示为：血红素铁和/或无机铁：胆固醇：卵磷脂 = (0.1 ~ 200) : (1 ~ 10) : (10 ~ 100)。本发明的铁脂质体无毒性和无免疫原性，作为药物载体，具有靶向性。临床使用，可减少药物用量，提高吸收效率，降低毒性，大大增加了血红素铁的溶解度和稳定性，提高了生物利用率。本发明的制备方法能够形成稳定且具有较高包封率的脂质体，采用这种方法可以有效节省脂质体制备的时间，简化制备过程，对工艺条件的要求相对较少，容易控制，操作简便。



1、一种补铁剂铁脂质体，其特征在于其组成以质量份数比表示为：

血红素铁和/或无机铁：胆固醇：卵磷脂=（0.1~200）：（1~10）：（10~100）。

2、如权利要求 1 所述的补铁剂铁脂质体的制备方法，其特征在于包括以下步骤：

（1）将质量比（1~10）：（10~100）的胆固醇和卵磷脂在 25~38℃恒温条件下用乙醇溶液完全溶解；

（2）按血红素铁和/或无机铁：胆固醇：卵磷脂以（0.1~200）：（1~10）：（10~100）的质量比称取血红素铁和/或无机铁，完全溶入 PBS 中，其中，卵磷脂:PBS 固液比为 1：15，得到 PBS 铁溶液；

（3）将步骤（1）得到的完全溶解的卵磷脂—胆固醇溶液在 45~50℃条件下缓慢滴入步骤（2）所得高速旋转的 PBS 铁溶液中，然后在 45~50℃条件下恒温搅拌或旋转蒸发 2~5 h，使乙醇充分挥发，得到均匀乳状脂质体混悬液；

（4）将所得到的脂质体混悬液用探针式超声 200~300W 在冷水浴条件下分散 10~15 min，静置 1~2 h，然后用不同孔径的滤膜反复过滤 5~35 次得到直径在 0.2~1μm 的铁脂质体，入棕色瓶，静止 1~2 h，制得补铁剂铁脂质体，充 N₂ 密闭、4℃保存。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于步骤（2）中 PBS 的 PH 值为 6.0~7.5。

补铁剂铁脂质体及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种新的补铁剂，特别是铁脂质体及其制备方法，属于生物科学技术领域。

背景技术

缺铁性贫血是目前我国和国际上最常见的疾病之一，补铁的药品和营养品种类繁多，但由于肠铁的吸收机制未被阐明，人们在未知机制的情况下，开发了多种补铁剂，具有很大的盲目性，效果不甚理想，有些还具有很大毒性，较差的口感性和对消化道的刺激性。随着近年来对肠铁吸收机制的了解让我们得知了肠铁的吸收机制和调控途径，为开发和生产新型补铁剂提供了理论依据。血红素铁是一种生物态铁，与其它的补铁剂相比有较高的生物利用率，可直接被肠道粘膜细胞吸收，消化道刺激症状轻。然而，由于它由卟啉和一分子亚铁构成卟啉化合物，结构不稳定，易氧化，且不溶于水，还带有特殊气味。更重要的是，如果与血红素铁吸收的基因突变或受到低表达调控，将会阻止和抑制血红素铁的吸收，这些特点大大限制了其在食品、保健品等工业中的应用，尤其是作为口服保健品，上述特性使其开发应用受到一定限制。其他无机的补铁剂如硫酸亚铁，柠檬酸铁等能对消化道产生刺激作用，使用不当还会引起中毒症状，对于炎症性贫血和遗传原因造成的贫血没有缓解作用。近年来，脂质体作为一种新型的生物药剂载体，已被广泛应用。脂质体是一种由脂质双分子层组成，内部为水相的闭合囊泡，大小从几十纳米到几十微米，在脂质体的水相和膜内可以包裹多种物质。有天然膜成分组成的脂质体，其脂质体膜的双层结构原则上与天然细胞膜一样，分散在水中时形成多层囊泡，而且每一层均为脂质双分子层，各层之间被水相隔开，适合于生物体内吸收和降解。脂质体无毒性 and 无免疫原性，作为药物载体，具有靶向性。临床使用，具有减少药物用量，提高吸收效率，降低毒性等优势。虽然脂质体作为药物载体具有以上优良性能，但现有文献中未发现有关铁脂

质体（或称为脂质体铁）的相关报道。

发明内容

本发明的目的是针对目前各种补铁制剂在实际应用中的局限性和脂质体作为药物载体的优点，提供一种新型补铁剂铁脂质体（或称为脂质体铁）。

本发明的目的还在于提供一种铁脂质体的制备方法。

本发明的铁脂质体的组成以质量份数比表示为：

血红素铁和/或无机铁：胆固醇：卵磷脂=（0.1~200）：（1~10）：（10~100）

本发明的铁脂质体由脂质双分子层组成，内部为血红素铁和/或无机铁 PBS 溶液水相的闭合大单室囊泡，粒径为 1.2~0.2 μ m，其中经过 0.8 μ m 的滤膜过滤后，平均粒径为 0.59 \pm 0.05 μ m，最大包封率为 36%。

本发明的铁脂质体的制备方法包括以下步骤：

（1）将质量比（1~10）：（10~100）的胆固醇和卵磷脂在 25~38℃恒温条件下用乙醇溶液完全溶解；

（2）按血红素铁和/或无机铁：胆固醇：卵磷脂以（0.1~200）：（1~10）：（10~100）的质量比称取血红素铁和/或无机铁，完全溶入 PBS 中，其中，卵磷脂:PBS 固液比为 1：15，得到 PBS 铁溶液；

（3）将步骤（1）得到的完全溶解的卵磷脂—胆固醇溶液在 45~50℃条件下缓慢滴入步骤（2）所得高速旋转的 PBS 铁溶液中，然后在 45~50℃条件下恒温搅拌或旋转蒸发 2~5 h，使乙醇充分挥发，得到均匀乳状脂质体混悬液；

（4）将所得到的脂质体混悬液用探针式超声 200~300W 在冷水浴条件下分散 10~15 min，静置 1~2 h，然后用不同孔径的滤膜反复过滤 5~35 次得到直径在 0.2~1 μ m 的铁脂质体，入棕色瓶，静止 1~2 h，制得补铁剂铁脂质体，充 N₂ 密闭、4℃保存。

步骤（2）中 PBS 的 PH 值为 6.0~7.5 更好。

将上述方法制得的铁脂质体混悬液分别用普通生物显微镜、透射电镜进行观察，普通生物显微镜观察，脂质体轮廓清晰，呈圆球状囊形颗粒（见附图 1）；透射电镜采用磷钨酸负染法进行，脂质体呈典型单室，其双分子膜规整、均一、连续，呈圆形微球体（见附图 2）。

取上述方法制备的铁脂质体混悬液，分别经过不同孔径的滤膜，粒径为

1.2~0.2 μm ，其中经过 0.8 μm 的滤膜过滤后，经相应的水合介质稀释后，用 JI-1155 型激光散射粒度测定仪测定脂质体的粒径及分布，有效粒径 $0.59\pm0.05\mu\text{m}$ （见附图 3）。

取 2ml 铁脂质体于透析袋中，透析去掉 PBS 中多余铁，取出，置 10ml 的离心管中，再加入相应体积的乙醚，混匀超声后离心。离心条件为 25℃，3500g，20 分钟，然后再用 4000g，10 分钟。弃上清，下部为铁溶液，用分光光度法测定，得出脂质体中铁的含量，进而计算出铁脂质体的包封率在 30-36%。

差示扫描量热法(differential scanning calorimetry ,DSC) 即 DSC 曲线（也称为 DSC 热分析相图）考察本发明铁脂质体制备方法过程中物质结构的变化、药物与脂质体的相互作用、表面活性剂对脂质体柔性的影响。

单一组分磷脂形成的脂质体 DSC 曲线上可发现两个特征不同的吸热峰。前一吸热峰峰形平缓且峰面积较小，来源于磷脂分子中极性端的热运动，磷脂 L β 双层结构转变为 P β 称为预相变。磷脂极性区结合其他分子特别极性物质会显著影响预相变。后出现的吸热峰称为主相变，峰面积较大，来源于磷脂分子中碳氢链的熔融，结构中含有不饱和键会降低主 T_m ，增加碳链长度会提高主 T_m ，同样，结合脂溶性物质主要影响主 T_m 。多组分磷脂形成的脂质体与单组分脂质体的热转变特征不相同。从热分析相图上可以反映出不同组分在脂质双层中的均一状态。如果两种组分的结构相差较大，则影响体系的均一性，将会扩大相变半峰宽($\Delta T_{1/2}$)，而且使峰形不对称。如果主 T_m 消失，说明脂质体形成一种介于胶晶态与液晶态之间的一种状态。当脂质体膜由两种以上成分组成时，它们各自有特定的 T_m ，在一定的环境下它们可以同时存在着不同的相(即液晶相及胶晶相) 称之为相分离。脂质体中添加不同物质，可诱导脂膜表面产生区块结构，如药物、表面活性剂等有可能影响脂质体膜的 T_m 变化。

以上结果显示，本发明铁脂质体呈均一大单室型，经过 0.8 μm 滤膜后有效粒径为 $0.59\pm0.05\mu\text{m}$ ，最大包封率为 36%。这就大大增加了血红素铁和/或无机铁的水溶性和稳定性，及给药专一性，提高了药物的生物利用率。

本发明取得的有益效果如下：

将有机铁和/或无机铁包进脂质体中，除具有无毒性、无免疫原性的特点

外，还具有很好的靶向性。能够大大的减少药物用量，提高吸收效率，降低毒性。本发明采用的乙醇注入法，能够形成稳定且具有较高包封率的脂质体，采用这种方法可以有效节省脂质体制备的时间，简化制备过程，对工艺条件的要求相对较少，容易控制，操作简便。

附图说明

图 1 是血红素铁脂质体在生物光学显微镜下放大 400 倍的照片，可见脂质体轮廓清晰，呈圆球状囊形颗粒，且在悬液中分布比较均匀。

图 2 是血红素铁脂质体在透射电镜下放大 6000 倍的照片，可见脂质体双分子膜规整、均一、连续，呈圆形微球体。

图 3 是用激光散射粒度测定仪测试血红素铁脂质体的粒径分布结果，由图中可看出经过 $0.8\mu\text{m}$ 滤膜的脂质体的平均粒径为 $0.59\mu\text{m}$ ，此外根据需要将脂质体分别经过不同孔径的滤膜，以符合不同应用的需要。

图 4 至图 6 是血红素铁脂质体各组成物质经过差示扫描量热法（DSC）检测后的相变过程。从图中可看出胆固醇，卵磷脂，血红素铁的主相变温度分别为 147.78°C 、 191°C 和 203°C 。

图 7 和图 8 分别是空白脂质体和血红素铁脂质体经过差示扫描量热法（DSC）检测后的相变过程。如图所示，在空白脂质体（只含有胆固醇、卵磷脂）的 DSC 曲线上，其主相变温度为 78.89°C ，而胆固醇、卵磷脂相变峰消失。提示，胆固醇和卵磷脂的结构发生了变化，二者的结合致使相变峰有了变化。而在血红素铁脂质体的 DSC 曲线上，其相变峰只有一个，主相变温度为 62.83°C ，两者相变温度和峰形、峰位置相近，说明加入血红素铁后，仍然能形成磷脂双分子层结构的变化。以上证据充分证明：脂质体已经形成，其中包含着血红素铁，达到了实验目的。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明。

实施例

补铁剂铁脂质体的组成：

血红素铁和/或无机铁：胆固醇：卵磷脂质量比为（ $0.1\sim 200$ ）：（ $1\sim 10$ ）：（ $10\sim 100$ ）。

制备方法:

称取重量比为(1~10):(10~100)的磷脂和胆固醇在 25~38℃恒温条件下完全溶入有机溶剂乙醇中。同时,按血红素铁和/或无机铁:胆固醇:卵磷脂质量比为(0.1~200):(1~10):(10~100)称取血红素铁和/或无机铁,完全溶入 PBS 中,其中,卵磷脂:PBS 固液比为 1:15, PBS 的 PH 值为 6.5~7.5,得到 PBS 铁溶液。将完全溶解的磷脂—胆固醇溶液在 45~50℃条件下,缓慢滴入高速旋转的 PBS 铁溶液中,后以 45~50℃条件下恒温搅拌或旋转蒸发 2~5 h 使乙醇充分挥发,得到均匀乳状脂质体混悬液。将脂质体混悬液用探针式超声 200~300W 分散 10~15 min,在冷水浴条件下控制混悬液温度在 30℃左右,静置 1~2 h,然后用不同孔径的滤膜反复过滤 5~35 次得到直径在 0.2~1 μ m 的铁脂质体,入棕色瓶,静止 1~2 h,制得补铁剂铁脂质体,充 N₂ 密闭、4℃保存。

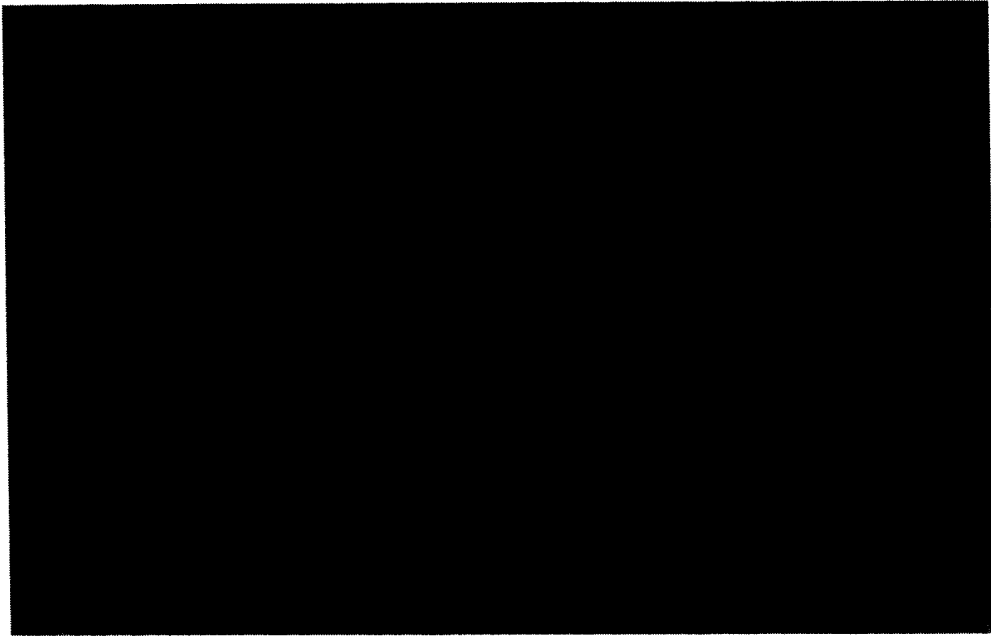


图 1

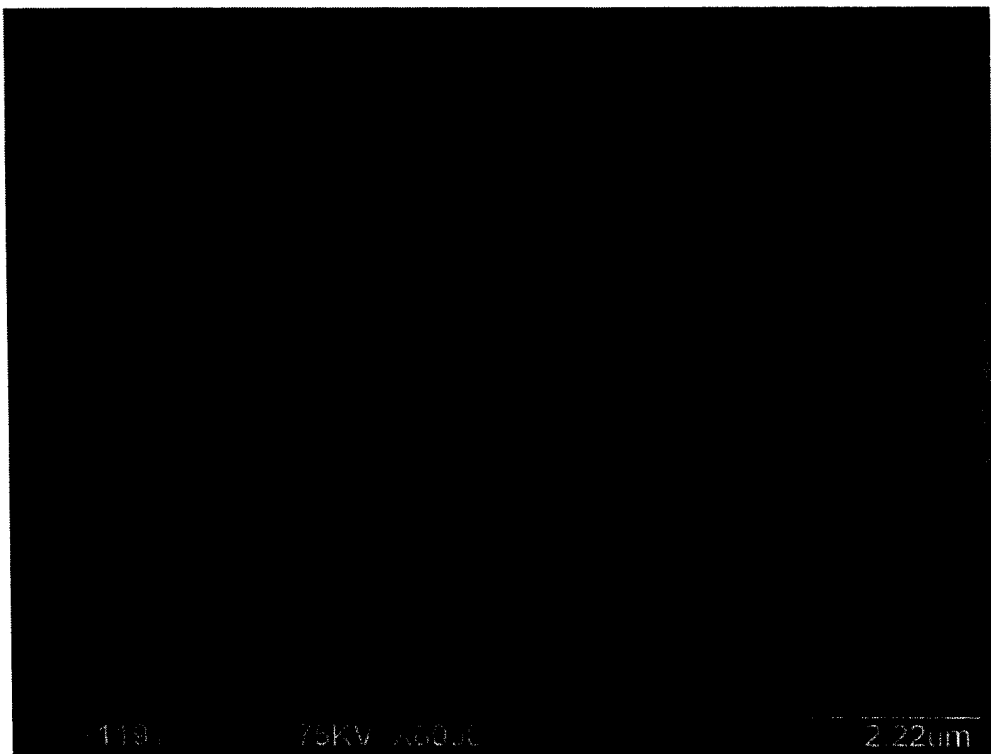


图 2

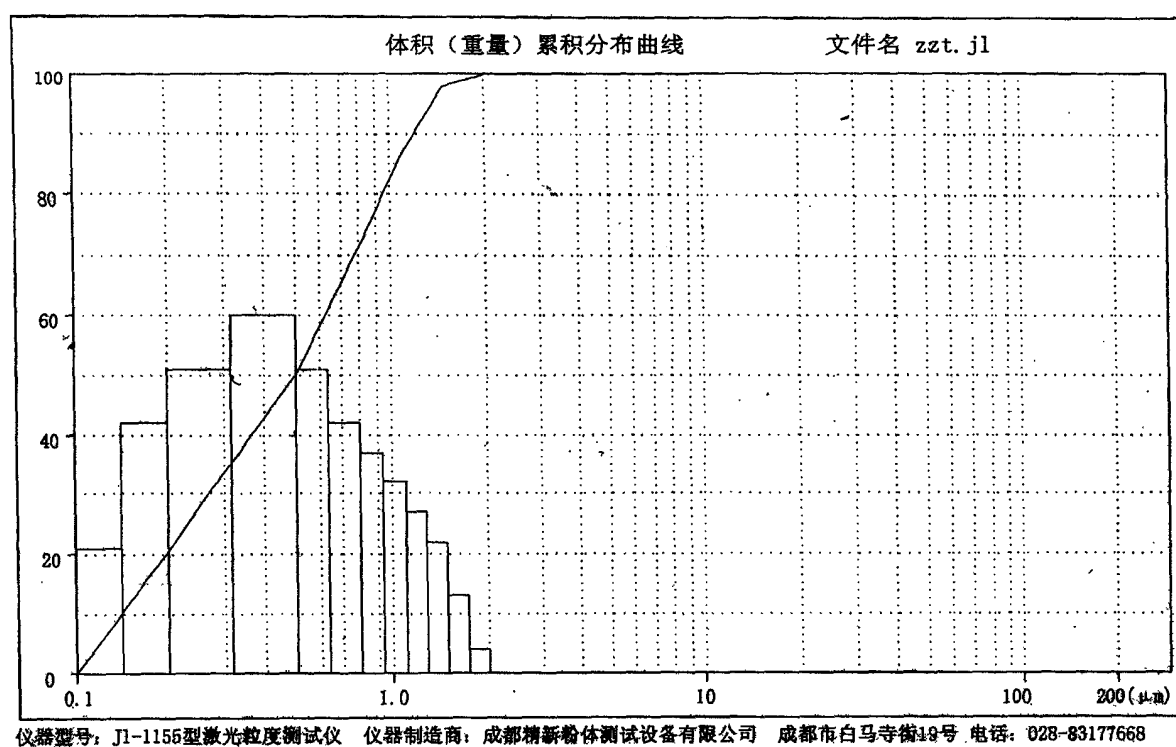


图 3

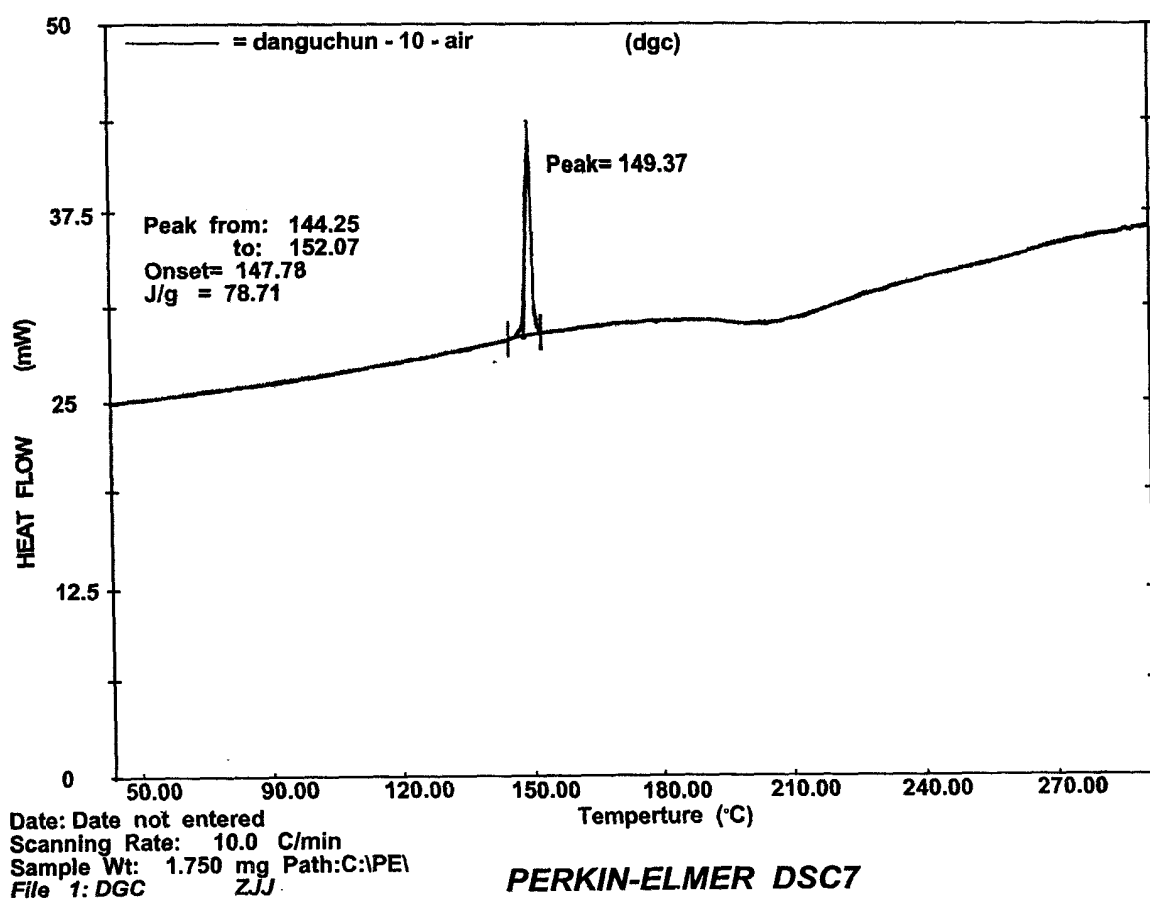


图 4

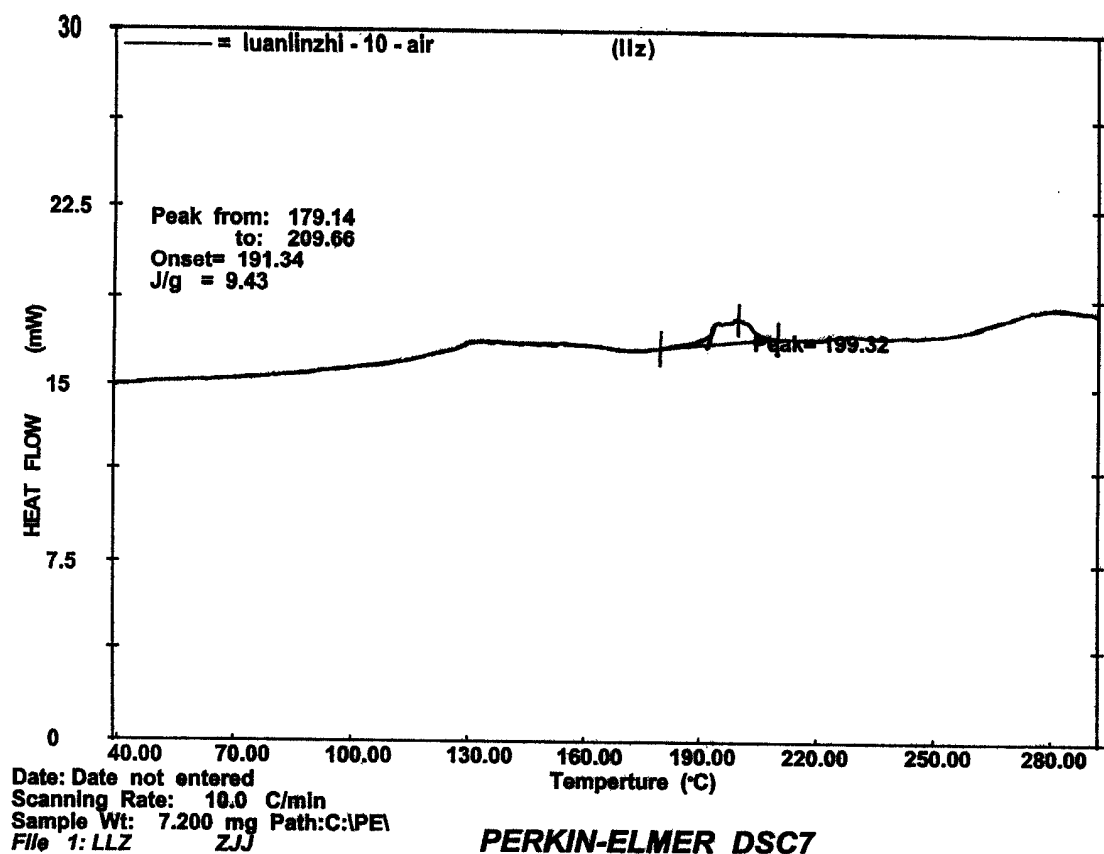


图 5

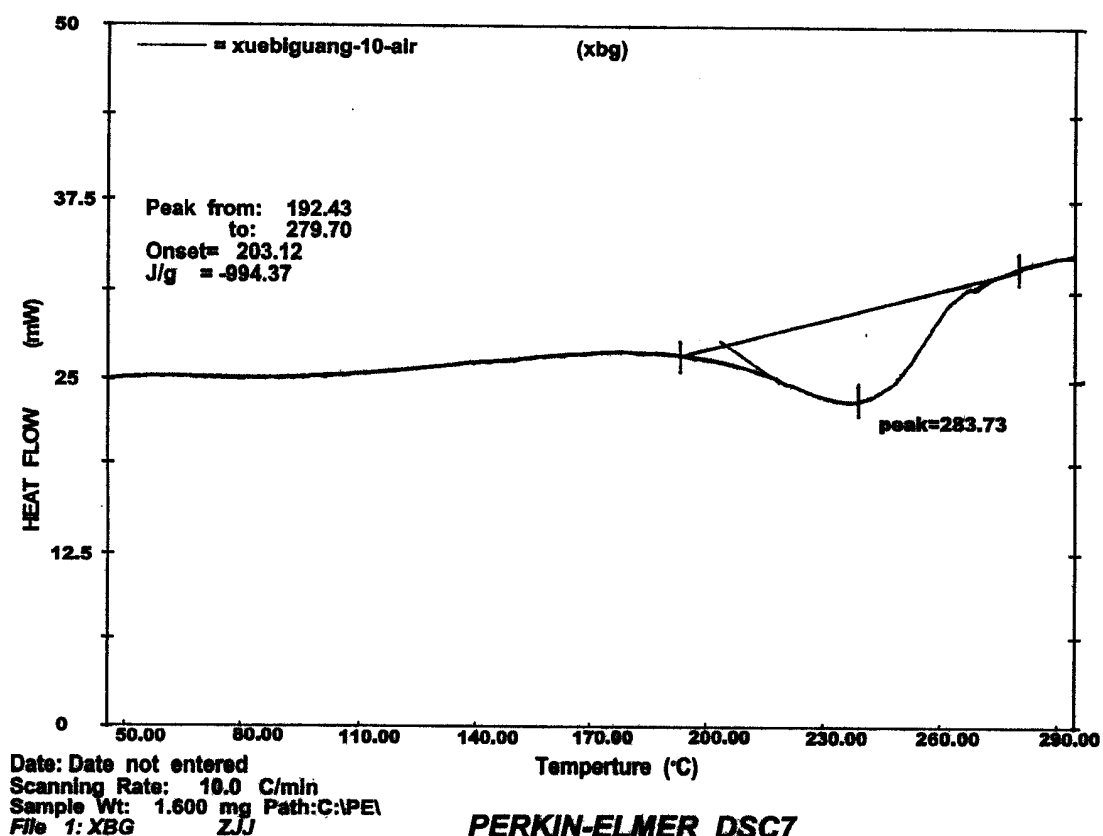


图 6

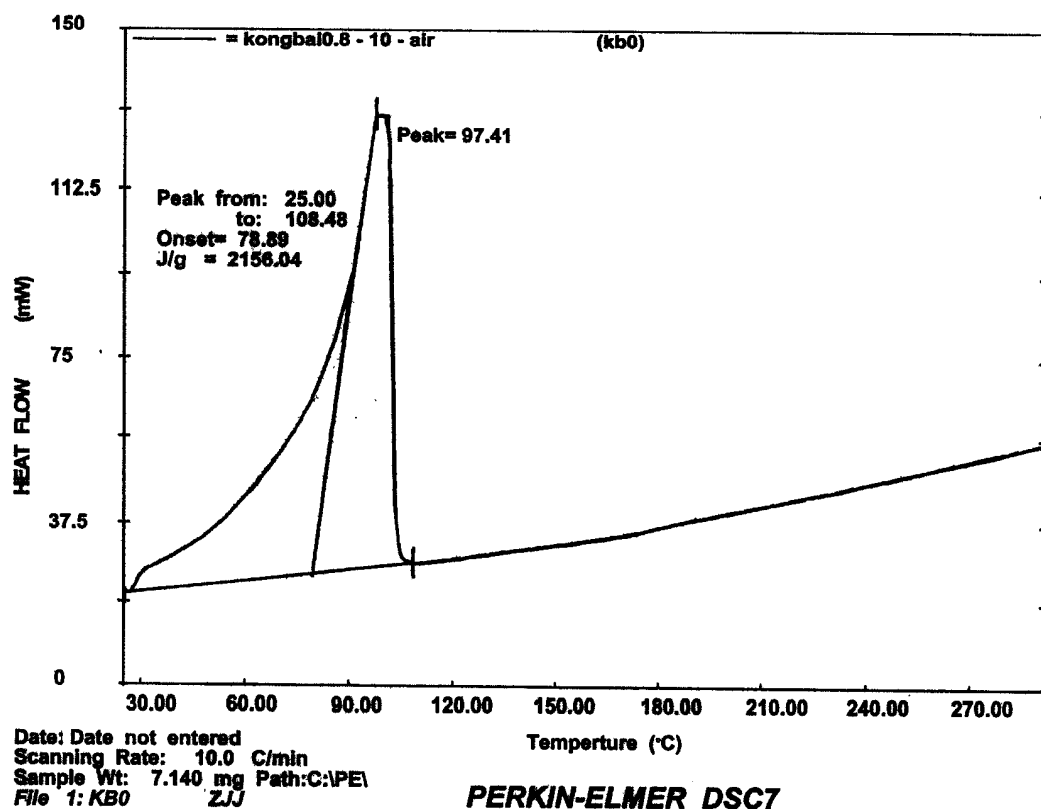


图 7

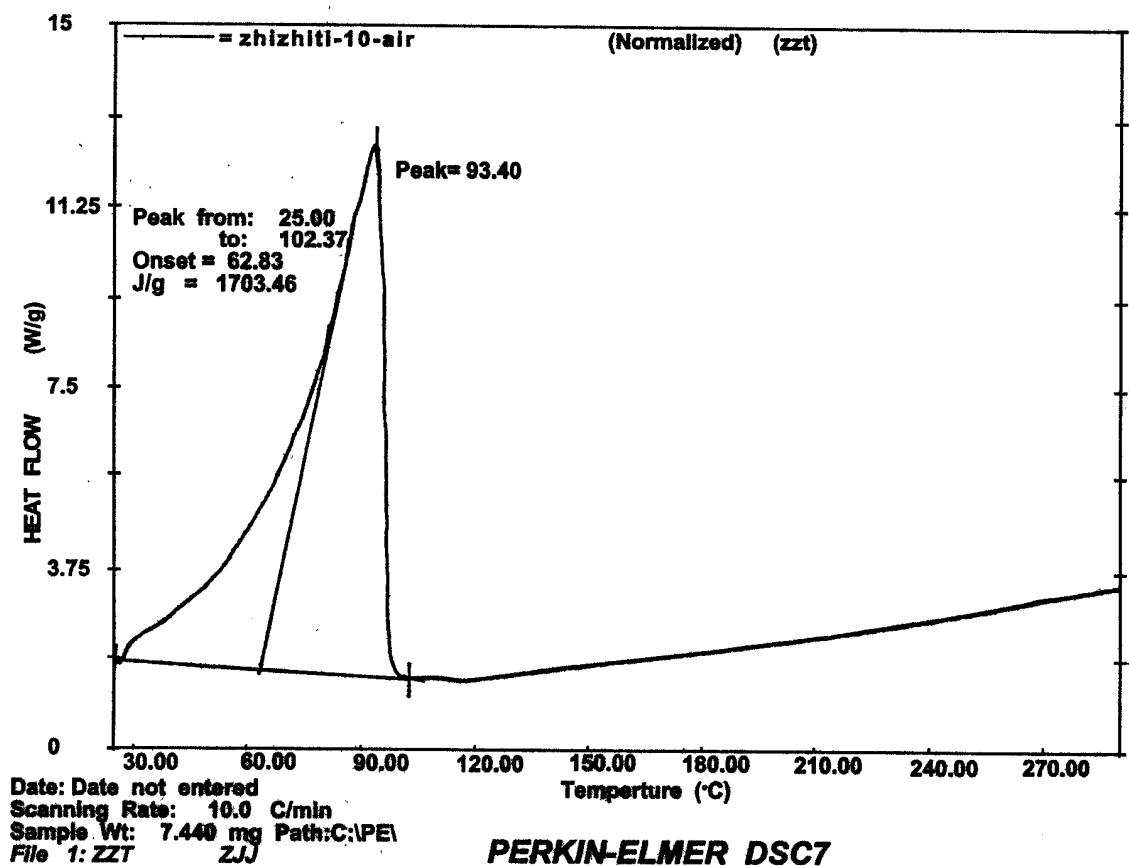


图 8