技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)04-0591-03

IL-2 靶向脂质体的处方筛选及药物含量的测定

吴镁春,朱 莉,王 驰
(重庆医科大学药学院药物化学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:筛选 IL-2 靶向脂质体的最佳处方,并对 5- 氟尿苷(5-fluorouridine,5-FUR)前药进行含量测定。方法:应用正交实验设计选择最佳处方配比;采用紫外分光光度法测定 5-FUR 前药的含量,检测波长为 267 nm。结果:筛选最佳处方:药脂比为 1:10、磷脂与胆固醇的比例为 3:1。5-FUP 前药对照品浓度在 0.002~0.02 mg/ml 的范围内与吸收度线性关系良好,回归方程为 y=16.357x+0.007,r=0.999 7(n=3),平均加样回收率为 97.09%,RSD=2.05%(n=3)。样品中 5-FUR 前药含量为 18.84~18.91 μg/ml。结论:该处方设计合理,紫外分光光度法操作简便、稳定性好、结果可靠,可作为 IL-2 靶向脂质体中 5-FUR 前药含量测定方法。

【关键词】5-FUR 前药;正交设计;紫外分光光度法;含量测定
【中国图书分类法分类号】R931 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-04-21

Selection of formulation for IL-2 targeting liposome and determination of drug contents

WU Mei-chun, et al
(*Department of Pharmacochemistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Selection of the optimal formulation for IL-2 targeting liposome and determination of content for 5-FUR. *Methods*: orthogonal test method was used to selection the optimal formulation, UV spectrophotometry was used to determine the 5-FUR prodrug content, and the detection wavelength was at 267 nm. *Results*: The optimal formulation showed Drug/EPC 1:10, EPC/Ch 3:1. The absorbency and concentration of 5-FUR prodrug had good linearity in the range of 2.0~20.0 μg/mL. The regression equation was y=16.357x+0.007, r=0.999 7(n=3), The 5-FUR prodrug content was 18.84~18.91 μg/ml. The average recovery rate was 97.09%, and RSD=2.05%(n=3). *Conclusion*: Formulation was designed reasonablely. The method is simple, stable and reliable, which can be used to determine the 5-FUR prodrug in IL-2 targeting liposome.

【Key words】5-FUR prodrug; Orthogonal design; UV spectrophotometry; Content determination

5- 氟尿苷(5-fluorouridine,5-FUR)是抗细胞增殖药物,肾移植术后常用来抑制急性排斥反应,其抗细胞增值活性远高于临床上用的氟尿嘧啶类药物[1],但因其无选择性,毒副作用大未能用于临床。5-FUR 为亲水性化合物,对 5-FUR 结构进行修饰,使其转变为脂溶性 5-FUR 前药[2,3],此前药进入细胞后必须经酯酶水解后才能发挥作用,起到一定的缓释作用。白介素 -2 受体在 HIV 感染、癌症、实质器官移植排斥反应及关节炎中都有高表达。肾移植手术后,IL-2 与其受体结合并刺激 T 细胞克隆增殖是急性排斥反应的关键和中心环节,抑制 IL-2 产生及其与受体结合的措施均可干预急性排斥反应。以 IL-2 为靶头,将 5-FUR 前药制备成 IL-2 靶向的 5-FUR 前药脂质体[4],实现主动靶向施药,既使 5-FUR 活性得以发挥,又可降低 5-FUR 系统毒性[5],从而达到提高药物治疗指数的目的。

本文报道对 IL-2 靶向 5-FUR 前药脂质体处方的筛选并建立紫外分光光度法测定 5-FUR 前药的含量,获得比较理想的效果。

1 材料与方法

1.1 试剂

5-FUR(批号:20051024,江苏省南通市海尔斯药业);5-FUR 前药(实验室自制);蛋黄卵磷脂和胆固醇(美国 Sigma,进口分装);IL-2(美国 Peprotech 公司);25% 的戊二醛(批号:1664B76,上海生工试剂公司);甲醇(批号:20080209,重庆川东化工有限公司 分析纯);其它试剂均为分析纯。

1.2 仪器

紫外可见分光光度仪(岛津 3150);BS210S 电子天平(德

作者介绍:吴镁春(1980-),女,硕士,研究方向:靶向制剂。
通讯作者:王 驰,男,副教授,E-mail:Wchi639@sohu.com。

国 Sartorius 公司）；RE-52 旋转蒸发仪（上海青浦沪西仪器厂）。

2 方法与结果

2.1 靶向脂质体的制备

2.1.1 5-FUR 前药脂质体的处方筛选[6]

①正交实验设计

经单因素实验预试，分别选取（A）EPC-Ch 比，（B）药脂比，（C）超声时间 3 个因素按表 1 中所示的因素和 3 个水平，采用 $L_9(3^3)$ 正交表进行实验组合，经过 9 个处方的试验，以包封率为指标，选择逆相蒸发法的最佳制备条件，结果见表 2。采用直观分析法分析，各因素的对包封率的影响程度为：B>C>A。最佳组合为 $A_1B_1C_1$，即药脂比为 1:10、磷脂与胆固醇的比例为 3:1、超声时间为 5 min。

②5-FUR 前药脂质体的制备

采用逆相蒸发法制备 5-FUR 前药脂质体。将卵磷脂与胆固醇按 3:1 的比例溶于一定量氯仿中，置于 250 ml 圆底烧瓶中 45℃减压旋转成膜。将 5-FUR 前药溶于氯仿，复溶脂质膜，再加入磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4）形成两相体系。在水浴中连续超声直至形成稳定的乳剂，减压旋转蒸发，形成胶态后加入一定量 PBS，继续旋转 30 min，在氮气环境下放置 2 h，使其充分水化，过 0.22 μm 的聚碳酸酯微孔滤膜 8 次，即得 5-FUR 前药脂质体混悬液。

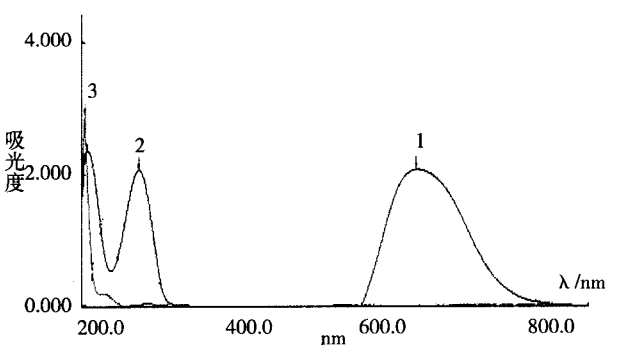
2.1.2 IL-2 靶向的 5-FUR 前药脂质体的制备[7]

取 1.0 ml 5-FUR 前药脂质体加入 25%的戊二醛后再加入 0.1 mg/ml 的 IL-2 溶液，4℃过夜。过 CM-sepherose 柱，分离游离药物和未结合上的 IL-2，收集脂质体部分，置 4℃冰箱保存，即为样品。

2.2 含量测定方法的建立

2.2.1 测定波长的选择 将 IL-2 靶向 5-FUR 前药脂质体、空白脂质体分别用甲醇破乳后，于 200~800 nm 范围内扫描，结果见图 1。由图可知，5-FUR 前药在 267 nm 处有最大吸收，且空白脂质体、IL-2 及破乳剂甲醇对药物测定无干扰。

2.2.2 标准曲线的考察 准确移取标准溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 ml 分别置于 10 ml 量瓶中，分别加甲醇稀释至刻度。摇匀，制成 2.0、4.0、6.0、8.0、1.0、1.2、1.4 μg/ml 的标准溶液。以甲醇为空白，与 267 nm 波长处测定吸光度 A。以浓度 C（μg/ml）对 A_{267} 进行线性回归，求得标准曲线为：A=16.357C+0.007，r=0.999 7（n=7），线性范围为：2.0~20.0 μg/ml。



（1.IL-2；2.5-FUR 前药；3.空白脂质体）

图 1 样品溶液及空白脂质体的紫外－可见光扫描图

2.2.3 加样回收率试验 分别量取 0.1 mg/ml 5-FUR 前药标准液 100、50、10 μl，加入等量的空白脂质体溶液及 0.1 mg/ml 的 IL-2，混匀，取 0.2 ml 上葡聚糖凝胶柱，收集纯化后的靶向含药脂质体定容到 2 ml，同时平行操作 3 份；以空白脂质体和 IL-2 溶液为空白，于 267 nm 波长处测定吸光度 A，所得结果见表 3。

2.2.4 稳定性试验 取 0.1 mg/ml 5-FUR 前药 20 μl，加入等量的空白脂质体溶液及 0.1 mg/ml 的 IL-2，将其放置 2、4、8、12、24 h 后，以空白脂质体和 IL-2 溶液为空白，在 267 nm 波长处测定吸光度 A，RSD=0.58%（n=5）。

2.2.5 精密度试验 选择低、中、高（0.5、10.0、25.0 μg/ml）3 种浓度的 5-FUR 前药溶液加入等量的空白脂质体溶液及 0.1 mg/ml 的 IL-2，以空白脂质体和 IL-2 溶液为空白于 267 nm 波长处测定吸光度 A，测定日内精密度（1 d 内测 5 次）；连续 5 d 测定日间精密度，所得结果见表 4。

2.2.6 IL-2 靶向的 5-FUR 前药脂质体中 5-FUR 前药含量的测定 取 IL-2 靶向 5-FUR 前药脂质体 3 批，按“2.1”项的方法制成样品溶液，以空白脂质体和 IL-2 溶液为空白，于 267 nm 波长处测定样品溶液吸光度 A，并以标准曲线法求得样品溶液的药物浓度，结果见表 5。

3 讨 论

本实验采用逆相蒸发法制备 5-FUR 前药脂质体，然后利用交联剂结合靶头 IL-2，成功制备了 IL-2 靶向 5-FUR 前药脂质体，为主动靶向脂质体的制备研究积累一定的实验经验。用正交设计筛选的药脂比使得一般是用于制备水溶性药物的逆相蒸发法成为制备 5-FUR 前药的最佳制备方法。

由本实验可知：正交设计筛选的处方设计合理；用紫外分光光度法测定 IL-2 靶向脂质体中 5-FUR 前药的含量具有操作简单、快速、结果准确可靠、重现性好的特点，较好的回收率和精密度，可满足本实验定量分析 5-FUR 前药的要求。

本文对 IL-2 靶向 5-FUR 前药脂质体进行了处方筛选及药物的含量测定，为下一步的细胞实验选择最佳比例打下基础。

表 1 因素水平表

水平	因素		
	A（卵磷脂:胆固醇）	B（药物:卵磷脂）	C（超声时间）
1	3:1	1:10	5
2	4:1	1:8	10
3	5:1	1:5	15

表 2 5-FUR 前药脂质体正交设计结果

编号	因素			
	A(w/w)	B(w/w)	C	Ew(%)
1	1(3:1)	1(1:10)	1(5)	94.13
2	1(3:1)	2(1:8)	2(10)	92.11
3	1(3:1)	3(1:5)	3(15)	80.76
4	2(4:1)	1(1:10)	2(10)	91.43
5	2(4:1)	2(1:8)	3(15)	86.67
6	2(4:1)	3(1:5)	1(5)	88.16
7	3(5:1)	1(1:10)	3(15)	89.12
8	3(5:1)	2(1:8)	1(5)	90.51
9	3(5:1)	3(1:5)	2(10)	87.24
K1	33.400	31.620	28.900	
K2	25.300	25.542	27.998	
K3	18.121	25.600	24.933	
R	18.874	4.933	3.967	

表 3 5-FUR 前药加样回收率试验（n=5）

5-FUR 前药加入量 (μg)	5-FUR 前药测得量(μg)	平均回收率(%)	RSD(%)
100	97.60 ± 1.87	97.40	1.91
50	49.60 ± 1.24	97.23	2.55
10	9.90 ± 1.62	96.63	1.68

表 4 5-FUR 前药精密度测定的结果（n=5）

浓度(μg/ml)	日内		日间	
	A ± SD	RSD(%)	A ± SD	RSD(%)
0.5	0.056 ± 0.002	1.73	0.057 ± 0.001	1.41
10	0.21 ± 0.021	0.17	0.21 ± 0.037	0.32
25	0.75 ± 0.042	0.03	0.75 ± 0.024	0.57

表 5 样品含量测定结果

批号	含量(μg/ml)	平均含量(μg/ml)	RSD(%)
090216	18.91		0.22
090217	18.89	18.88 ± 0.88	0.24
090218	18.84		0.27

参 考 文 献

[1] Wilkinson D S, Crumley J.The mechanism of 5-fluorouridine toxicity in Novikoff hepatoma cells[J].Cancer Res, 1976, 36(11 pt 1):4032-4038.

[2] 董 辉,钱 红.去氧氟尿苷合成工艺改进[J].中国医药工业杂志,2002,33(3):108-110.

[3] 孙洁胤,周芝芳,刘 放.苦参素油水分配系数及 pH 值对其的影响[J].浙江省医学科学院学报,2006,64(3):19-21.

[4] 郭 迪,潘 力,韩 璐,等.脂质体磷脂与抗体蛋白的偶联方法[J].华南理工大学学报(自然科学版),2005,33(3):91-94.

[5] Crosasso P, Brusa P, Dosio F, et al. antitumoral activity of liposomes and immunoliposomes containing 5-fluorouridine prodrugs[J].J Pharm Sci, 1997, 86(7):832-839.

[6] Mertins O, Sebben M, Pohlmann A R, et al.Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by everse phase evaporation: a step by step study[J].Chem Lipids, 2005, 138(1-2):29-37.

[7] 朱 莉,胡春梅,赵俊义,等.IL-2 免疫靶向脂质体的制备及稳定性考察[J].重庆医医科大学学报,2008,33(8):1000-1002.

（责任编辑：冉明会）