药 学 文章编号:0253-3626(2009)04-0459-04

粉防己碱 - 阿霉素复合脂质体的制备及质量控制评价

潘 峰,胡春梅,潘黎军,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:制备粉防己碱 - 阿霉素复合脂质体并对其工艺及质量进行研究与评价,为临床上逆转肿瘤的多药耐药提供新的思路。方法:采用 3 种不同脂质体制备方法,并以包封率为指标进行处方筛选和工艺优化。结果:确定了硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备复合脂质体的最佳处方最佳处方为:药脂比 1:20,磷脂—胆固醇比例 3:1,外水相 pH 值为 7.6,硫酸铵浓度为 250 mmol/L。以该处方制备的脂质体 DOX 的平均包封率为 90.77%,TET 的平均包封率为 80.12%。结论:该处方制备的粉防己碱 - 阿霉素复合脂质体包封率及外观良好,在低温充氮条件下较稳定,为进一步实验奠定了基础。

【关键词】粉防己碱;天然活性成分;复合脂质体;硫酸铵 pH 梯度法
【中国图书分类法分类号】R284 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-17

Preparation and quality control of tetrandrine-doxorubicin complex liposomes

PAN Feng, et al
(Department of Pharmaceutical Chemistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To prepare doxorubicin-tetrandrine complex liposomes for technology study and quality control. In order to provide a new idea to reverse the tumor multidrug resistance in clinic. *Methods*: The formulations of doxorubicin-tetrandrine complex liposomes were optimized by three different kinds of methods. And the optimum formula was selected according to the entrapment efficiency. *Results*: The complex liposomes were prepared by $(NH_4)_2SO_4$ -gradient method combined with pH gradient method according to optimum recipe. The optimum recipe of DOX- TET liposome was founded as DOX-TET /EPC of 1:10, EPC/Ch of 3:1, pH value of 7.6, incubation temperature of 50℃, $(NH_4)_2SO_4$ concentration of 250 mmol/L. Under the formulation, DOX and TET were encapsulated 90.77% and 80.12%, respectively. *Conclusion*: The doxorubicin-tetrandrine complex liposomes have high entrapment efficiency with fine looking, which provides basis for the further studies.

【Key words】Tetrandrine; Natural active ingredients; Complex liposomes; $(NH_4)_2SO_4$-pH gradient method

当今,化疗是治疗肿瘤的重要手段之一,而肿瘤多药耐药(Multidrug resistance,MDR)是临床上肿瘤化疗的最大障碍,也是化疗失败的主要原因之一[1]。20 世纪 80 年代,研究者发现 MDR 发生的机制与多种蛋白的表达和代谢有关,其中,细胞膜上的 P-糖蛋白(Permeability-glycoprotein,Pgp)的外排泵功能在 MDR 形成中起重要作用。通过药物抑制 Pgp 的外排泵功能来逆转 MDR 是近年来研究的重点。关于 Pgp 抑制剂到现在已经发展了两代,但由于其毒性较大,因此限制了在临床上的使用[2]。从天然植物中寻找低毒、高效的活性成分来逆转 MDR 是近年来的研究热点之一。

粉防己碱(Tetrandrine,TET)是千金藤属防己科植物粉防己的主要活性成分,它具有钙拮抗作用,在体内外均能逆转 Pgp 介导的 MDR,逆转作用明显优于维拉帕米以及其它中药单体[3],且毒性较低。

阿霉素为广谱的抗癌药物,但该药物的心脏毒性一直是急需解决的问题。脂质体为磷脂双分子层,将阿霉素包裹于脂质体中,与游离的药物相比,由于脂质体可以提高渗透性与停滞的效果(EPR 效应),因此明显的延长了药物的释放时间,降低了药物对心脏的毒性,增加了在实体瘤的蓄积。

针对肿瘤治疗中的多药耐药,临床上常使用多种药物联合给药的方法来逆转 MDR,达到了一定的治疗效果。有研究表明非细胞毒浓度的 TET 可以增加 DOX 对三尖杉(harringtonine)耐受 HL-60 细胞生长的抑制,使细胞内 DOX 聚集增加[4]。药剂学研究提供了一种类似联合给药的剂型:复合脂质体。本实验将粉防己碱与阿霉素同时装载于脂质体中,制成可逆转多药耐药细胞株的复合脂质体,并经过试验筛选,确定了硫酸铵梯度法合并 pH 梯度的方法制备

作者介绍:潘 峰(1983-),女,硕士,
研究方向:靶向药物制剂。
通讯作者:王 驰,男,副教授,E-mail:wangchi639@sohu.com。

复合脂质体,并对其进行一系列的质量控制评价。

1 材料和方法

1.1 材料

TET 原料药为实验室自制,质量分数为 98%,阿霉素原料药(doxorubicin,DOX,浙江海正药业股份有限公司),胆固醇(cholesterol,Ch,广州天马精细化工厂),卵磷脂(egg phosphatidyl choline,EPC,上海国药集团化学试剂有限公司),PBS 缓冲液(pH=7.4)(自制),Sepharose CL-4B(Sigma 公司),透析袋(MW 12000-14000)(Sigma 公司),$(NH_4)_2SO_4$、$CHCL_3$、Na_2HPO_4(重庆川东化工厂),混合纤维微孔滤膜(0.2 μm,0.45 μm,0.8 μm)(上海市新亚净化器件厂),其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 检测波长的确立 经紫外扫描可知,TET 在 282 nm 处有最大吸收,*DOX* 在此处也有吸收,故需用 *HPLC* 测定 TET 的含量,采用 282 nm 作为 TET 的检测波长;DOX 在 480 nm 处有最大吸收,TET 在此波长处无吸收,故在 480 nm 处测定 DOX 含量。

1.2.2 复方脂质体制备方法的筛选

1.2.2.1 薄膜法 EPC:Ch 按 4:1 比例溶于 10 ml 氯仿中,40℃旋转减压蒸发除去氯仿,在瓶内形成均匀的脂质薄膜,40℃真空干燥过夜。加入 10 ml 含 5 mg DOX、2.5 mgTET 的 PBS 缓冲液,溶解膜,放置 2 h 使其充分水化,间歇超声 10 min,过 0.2 μm 滤膜,即得。

1.2.2.2 硫酸铵梯度法 EPC:Ch 按 4:1 比例溶于 10 ml 氯仿中,40℃旋转减压蒸发除去氯仿,在瓶壁内形成均匀的脂质薄膜,40℃真空干燥过夜。加入 10 ml 125 mmol/L 硫酸铵溶液 60℃水化 30 min 后,间歇超声 5 min,置于透析袋中,于 PBS 液中透析,依次过 0.8 μm、0.45 μm、0.2 μm 微孔滤膜 2 次,形成空白脂质体。在上述空白脂质体中滴入含 5 mg DOX、2.5 mg TET 的溶液,混匀,水浴 50℃孵育 20 min,即得。

1.2.2.3 硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法 EPC:Ch 按 4:1 比例溶于 10 ml 氯仿中,40℃旋转减压蒸发除去氯仿,在瓶内形成均匀的脂质薄膜,40℃真空干燥过夜。加入 10 ml 125 mmol/L 硫酸铵溶液 60℃水化 30 min 后,间歇超声 5 min,置于透析袋中,于 PBS 液中透析,依次过 0.8 μm、0.45 μm、0.2 μm 微孔滤膜 2 次,形成空白脂质体。在上述空白脂质体中滴入含 5 mgDOX 溶液,混匀,水浴 50℃孵育 30 min。加入 Na_2HPO_4 调节外水相 pH 值为 7.2,滴入含 TET2.5 mg 的溶液,混匀,水浴 50℃孵育 30 min,即得。

1.2.3 单因素考察复方脂质体的处方和工艺 固定其它条件不变,改变单个因素,以包封率为主要考察指标,同时观察脂质体的形态、放置是否沉淀来考察其处方和工艺。

1.2.3.1 孵育时间 按 1.2.2.3 项下的方法制备复方脂质体,孵育时间分别为 5、10、15、20、25、30、35、40、45 min,孵育温度 50℃,硫酸铵浓度 125 mmol/L,外水相 pH7.2,EPC-Ch 比例为 4:1,药物—脂质比为 1:20,测量不同孵育时间制备的脂质体包封率。

1.2.3.2 孵育温度 按 1.2.2.3 项下的方法制备复方脂质体,硫酸铵浓度为 125 mmol/L,EPC:Ch 比例 4:1,药物—脂质比 1:20,孵育温度分别为 30、40、50、60、70℃,孵育 30 min,外水相 pH 为 7.2,测量不同孵育温度制备的脂质体包封率。

1.2.3.3 磷脂—胆固醇之比 按 1.2.2.3 项下的方法制备复方脂质体,药物—脂质比为 1:20,硫酸铵浓度为 125 mmol/L,水浴 50℃孵育 30 min,外水相 pH 为 7.2,EPC-Ch 比例为 2:1、4:1、8:1,测量不同磷脂—胆固醇比例下制备的脂质体包封率。

1.2.3.4 硫酸铵浓度 按 1.2.2.3 项下的方法制备复方脂质体,EPC-Ch 比例为 4:1,药物—脂质比为 1:20,水浴 50℃孵育 30 min,调节硫酸铵浓度分别 125、250、300 mmol/L 时对脂质体包封率的影响

1.2.3.5 药脂比 按 1.2.2.3 项下的方法制备复方脂质体,药物—脂质比为 1:20、1:10、1:5,EPC-Ch 比例为 4:1,硫酸铵的浓度为 125 mmol/L,水浴 50℃孵育 30 min。测量不同药脂比制备的脂质体包封率。

1.2.3.6 外水相 pH 值 pH 梯度法制备脂质体,跨膜 pH 梯度是影响包封率最主要的因素。按 1.2.2.3 项下的方法制备复合脂质体,加入 Na_2HPO_4 调节外水相 pH 值为 6.8、7.2、7.6、8.0,其它因素不变,调节不同外水相 pH 值制备的脂质体在制备空白脂质体时,测量脂质体的包封率。

1.2.4 脂质体形态及粒径的考察 取适量 DOX-TET 脂质体,用 PBS 缓冲液稀释后,滴至载玻片上,用 2% 磷钨酸复染,滴至专用铜网上,自然挥干,静置使粒子在铜网上沉积,用透射电镜观察粒径大小和形态并拍照。

1.2.5 脂质体的初步稳定性实验 将脂质体分别按 3 ml 分装在玻璃瓶中,充氮保存于 4℃和 25℃。分别于 0、3、6、9、12、15、20、30 d 检测渗漏率、粒径大小、磷脂含量变化情况。

1.2.5.1 渗漏率测定 精密量取以上脂质体 0.5 ml,按第二部分包封率测定项下处理,并按下式计算贮存过程中的渗漏率(P)。$P=[(W_{包}-W_{贮})/W_{包}]\times 100\%$,其中,$W_{包}$、$W_{贮}$分别为制备时的包封量和贮存一定时间后的包封量。

1.2.5.2 脂质体粒径大小的变化 脂质体的粒径和分布与稳定性有关,直接影响脂质体在体内的组织分布。当不需要定量测定粒径小分布时,透光率测定法是测定脂质体相对大小的非常实用的方法[4]。试验过程中以水为空白测定脂质体在 500 nm 处的透光率 T_{500nm} 及吸光值 A_{500nm}。

1.2.5.3 磷脂含量测定 采用显色法测定磷脂含量[5]。显色剂:准确称取 2.70 g 三氯化铁和 3.04 g 至 100 ml 容量瓶中,加蒸馏水使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。精密吸取 2 ml 脂质体用适量乙醇裂解后,加溶液 2.0 ml,再补加氯仿,使每个试管中氯仿的最终体积为 2.0 ml。将以上溶液分别转移至 25 ml 的分液漏斗,充分振摇 1 min,静置,取下层,以氯仿为空白,在 488 nm 处测定吸光度 A,根据标准曲线计算磷脂含量。标准曲线:C=0.415 9A-0.006 6,r=0.999 6(n=3)。

2 结 果

2.1 复方脂质体制备方法筛选结果

按包封率测定方法测定 1.2.2 的 3 种脂质体制

备方法的包封率,结果见表 1。图示,硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法的包封率最好,此法极大的提高了 TET 的包封率。因此确定了硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法作为复合脂质体的制备方法。

2.2 单因素考察复方脂质体的处方和工艺结果

不同的孵育时间制备的脂质体包封率见图 1。包封率随着孵化时间的延长而增大,当孵化时间为 30 min 时,包封率趋于平台,为了能让下面的各因素对包封率的影响的差别显示出来,故选择 30 min 作为孵育时间。

不同的孵育温度制备的脂质体的包封率见图 2。包封率随温度升高而增加,当温度升高到 50℃时达到平台,故选择 50℃作为温育温度。

不同磷脂-胆固醇比例下制备的脂质体包封率见表 2。随着 EPC-Ch 比例的增加,包封率有上升的趋势,同时 EPC-Ch 比例为 8:1 时制备所得脂质体有少许沉淀现象。

调节硫酸铵浓度制得的脂质体的包封率见表 3。硫酸铵的浓度大小对 TET 的包封率的影响较 DOX 大很多。并且随着硫酸铵浓度的增大,两种药物的包封率都逐渐增大。

不同药脂比制得的脂质体的包封率见表 4。随着药脂比的增大,包封率逐渐上升。

调节不同外水相的制备的脂质体的包封率见表 5。外水相 pH 值对脂质体包封率有重要影响,特别是对 TET 的包封率有明显影响。随着外水相 pH 值的升高 TET 包封率明显升高。

最佳处方工艺验证 通过制备方法与处方的筛选。利用硫酸铵梯度法合并 pH 梯度法,以处方:药脂比 1:20,磷脂-胆固醇比例 3:1,外水相 pH 值为7.6,硫酸铵浓度为 250 mmol/L,制备 TET-DOX 复合脂质体。

透射电镜观察到的脂质体粒径大小和形态见图 3。从图可见 DOX-TET 脂质体外观形态基本圆整,未发生粘连。

脂质体稳定性测定结果。渗漏率的测定结果见表 7。脂质体粒径大小的变化结果见图 4。脂质体在 4℃和 25℃时,透光率都随时间的增加而降低。图示可知,随着时间的增加透光率逐渐降低,说明粒径在逐渐增大。

磷脂含量测定结果见表 8。从结果可知,放置 30 d 内,25℃时,脂质体渗漏率明显增加,磷脂含量明显降低,粒径增大明显,说明温度对脂质体稳定性影响较大,在 4℃时则相对稳定,故应低温充氮保

表 1 3 种脂肺体制备方法的包封率比较

制备方法	薄膜法	硫酸铵梯度法	硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法
DOX 包封率	35.29	90.92	90.01
TET 包封率	27.31	48.61	75.60

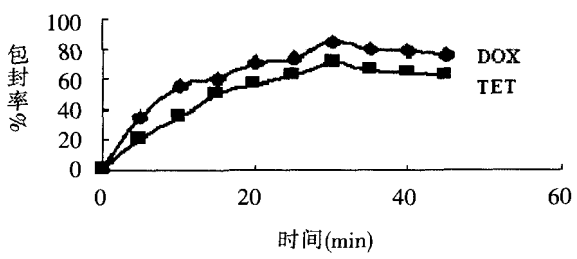


图 1 不同孵育时间的包封率

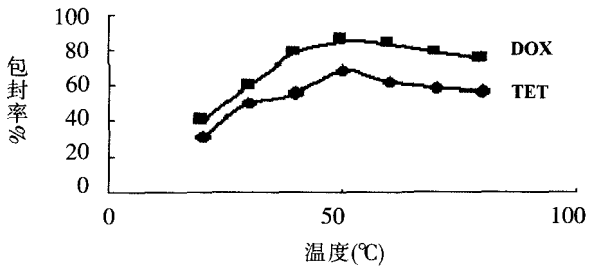


图 2 不同孵育温度的包封率

表 2 不同磷脂-胆固醇比例下的包封率

磷脂/胆固醇(w/w)	2:1	4:1	8:1
DOX 包封率	36.07	85.56	87.31
TET 包封率	28.67	67.02	69.57

表 3 不同硫酸铵浓度对包封率的影响

硫酸铵浓度(mmol/L)	125	250	300
DOX 包封率	50.95	85.61	86.68
TET 包封率	35.67	68.55	69.53

表 4 不同药脂比的包封率

药脂比	1:5	1:10	1:15	1:20
DOX 包封率	50.67	79.30	87.95	88.14
TET 包封率	40.27	66.81	77.62	79.18

表 5 不同外水相 pH 值的包封率

pH 值	6.8	7.2	7.6	8.0
DOX 包封率	80.14	87.95	89.63	85.29
TET 包封率	65.18	68.91	82.81	83.63

表 6　最佳工艺验证结果

序号	1	2	3	4	5	平均包封率
DOX 包封率	89.91	90.64	91.84	90.70	91.84	90.99±0.84
TET 包封率	78.52	79.61	80.34	83.24	79.18	80.12±1.84

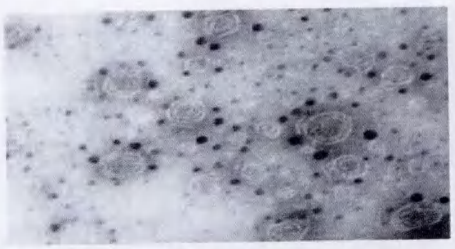


图 3 TET-DOX 脂质体透射电镜照片(×155 000)

表 7　阿霉素-粉防己碱脂质体渗漏率的变化(%)

温度(℃)	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	20 d	30 d
4	0.00	0.43	0.56	0.68	0.85	0.91	0.95	1.05
25	0.00	0.57	0.65	0.87	0.98	1.52	1.64	2.41

表 8　DOX-TET 磷脂含量的变化(mg)

温度(℃)	0 d	3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	20 d	30 d
4	1.46	1.43	1.41	1.39	1.36	1.35	1.34	1.32
25	1.46	1.43	1.38	1.28	1.24	1.19	1.15	1.05

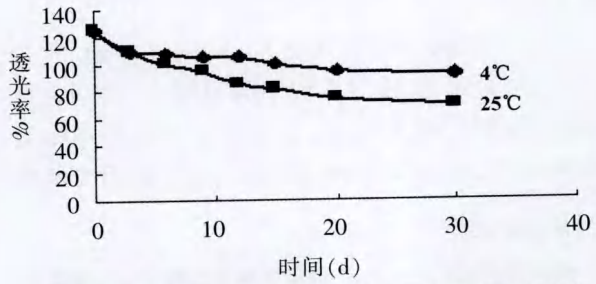


图 4　DOX-TET 脂质体在不同温度下的透光率变化

存。

3　讨　论

在制备复方脂质体中，采用硫酸铵梯度法时，DOX 取得了较高包封率；TET 属于生物碱，适合采用 pH 梯度法制备，本实验首次利用 pH 梯度法的原理将 TET 包封于脂质体中，使两种药物达到了较高的包封率。经紫外检测：DOX 的包封率平均达到 90.77%，TET 包封率平均达到 80.12%。因此确定了采用硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备 TET-DOX 复合脂质体。并且通过该法制得的脂质体在透射电镜下观察粒径均匀。

稳定性的检查是脂质体制备中质量控制的重要环节。该实验对复合脂质体稳定性进行了一系列的检查。发现用硫酸铵梯度法结合 pH 梯度法制备的 TET-DOX 复合脂质体需要在 4℃充氮气保存下，药物的渗漏率、粒径的大小变化和磷脂含量的变化最小。在后续的实验中，提高复合脂质体稳定性是重要的研究工作之一。

将能够逆转 MDR 的 TET-DOX 制成复合脂体，不仅降低了 DOX 的毒性，而且由于 EPR 效应，使其能够达到被动靶向的作用，增加药物在实体瘤上的蓄积，从而用低于常规化疗剂量的量达到相同的化疗效果。

本实验通过对 TET-DOX 复合脂质体的工艺优化及质量评价，表明了将两种药物同时包封于同一脂质体的可能，为下一步 DOX-TET 复合脂质体逆转乳腺癌耐阿霉素细胞 MCF-7/DOX 最佳比例实验打下了基础。

参　考　文　献

[1] Michael M C, Ira P, Suresh V A. P-glycoprotein and multidrug resistance [J]. Curr.Opin.Genet, 1996, 12(6): 610-617.

[2] Chen Y J. Potential role of tetrandrine in cancer therapy[J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(12): 1102-1106.

[3] 潘启超，田　晖. 多种中药单体逆转肿瘤多药耐药性[J]. 科学通报，1995，40(20)：38-40.

[4] He Q Y, Meng F H, Zhang H Q. Reduction of doxorubicin resistance by tetrandrine and dauricine in harringtonine-resistant human leukemia (HL60) cells[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1996, 17(2): 179-188.

[5] 张灵芝. 脂质体制备及其在生物医学中的应用[M]. 北京：北京医科大学，中国协和医科大学联合出版社，1998.57-58.

[6] 朱　莉，潘黎军，胡春梅，等. 5-氟尿嘧啶核苷前药脂质体中磷脂含量的测定[J]. 中国药房，2008，19(7)：547-548.

（责任编辑：冉明会）