

喜树碱多相脂质体包封率测定方法及 渗漏的研究

张清民 顾学裘 沙沂 张永恒*

(沈阳药学院)

提要 本文应用一阶导数分光光度法, 不经分离喜树碱多相脂质体中包封的喜树碱与游离的喜树碱直接测定了喜树碱多相脂质体的包封率, 结果为 $73. \pm 3.4\%$ 。同时考查了影响喜树碱多相脂质体渗漏的因素。

关键词 多相脂质体; 喜树碱; 导数分光光度法

测定脂质体中药物包封率的方法文献报道有分子筛法⁽¹⁾、超滤膜法⁽²⁾、超离心法⁽²⁾等, 但目前尚无公认的法定方法。与文献中报道的方法相比, 一阶导数分光光度法不经分离包封药物与游离药物直接测定包封率, 并且具有快速、准确、方便等特点。由于在临床应用时多用葡萄糖注射液或氯化钠注射液稀释后静脉滴注, 这样就会造成脂质体内水相与外水相中喜树碱的浓度差, 从而引起喜树碱从脂质体内向外漏出, 故本文同时考察了体外影响喜树碱多相脂质体渗漏的因素, 对临床用药具有指导意义, 同时对喜树碱多相脂质体的物理稳定性研究及包封率测定方法的准确性具有参考意义。

实 验 部 分

一. 药品和仪器

喜树碱(药用, 温州制药厂); 异丙醇、乙醚均为AR, (沈阳试剂一厂); 喜树碱多相脂质体注射液(自制), 磷酸盐缓冲液(pH为7.6)。PU 8800 可见一紫外分光光度计(英国, Philips公司)

二. 导数测定条件的选择

将喜树碱用 1 mol/L NaOH溶液溶解后配成水溶液, 空白脂质体分别用磷酸盐缓冲液及异丙醇—乙醚—水(4:2:4)稀释后在 400~300 nm 间测定一阶导数光谱, 结果见图 1。由图 1 知, 在 λ 350 nm, λ 382 nm 处测定喜树碱的导数值时, 空白脂质体的粒度及构成空白脂质体的膜材不产生干扰。故本文选用 λ 350 nm, λ 382 nm 为测定喜树碱导数值的测定波长。

三. 标准曲线及其回收率实验

(一) 标准曲线

取喜树碱标准液(1 mg/ml)20, 30, 40, 50, 60 μ l 分别置 10 ml 容量瓶中, 用磷酸盐缓冲液或异丙醇—乙醚—水(4:2:4)稀释到刻度, 在 λ 350 nm, λ 382 nm 处测定喜树碱的一阶导数值, 结果见表 1。

(二) 回收率实验

本文于 1986 年 11 月 20 日收到。

* 哈尔滨医科大学肿瘤医院药剂科。

Tab 1. The concentration of camptothecin and its first order derivative value

Concentration (mg/ml) × 1000	Derivative value (mm)	
	In phosphate buffer (h ₁)	In mixed solvent* (h ₂)
2	41	37
3	61	56
4	83	75
5	102	93
6	123	111

Least square linear regression equation

$$h_1 \text{ (mm)} = 20500 \times C, r_1 = 0.9998;$$

$$h_2 \text{ (mm)} = 0.4 + 18500 \times C, r_2 = 0.9999; C \text{ (mg/ml)}$$

* Mixed solvent = Ether-isopropanol-water (2:4:4, v/v)

取喜树碱标准液(1 mg/ml)20, 30, 40, 50, 60 μl 分别置于5个10 ml容量瓶中, 然后分别加入60 μl空白脂质体, 用磷酸盐缓冲液或异丙醇-乙醚-水(4:2:4)稀释到刻度, (前者仍是混悬液, 后者则被溶剂溶解成脂质体膜材组分的真溶液), 分别在λ 350, λ 382 nm处测定喜树碱的一阶导数值, 分别计算空白脂质体及膜材组分的回收率。结果见表2。

四. 样品测定方法

分别取40 μl喜树碱多相脂质体溶液置于2个10 ml容量瓶中, 一个用异丙醇-乙醚-水(4:2:4)混合溶剂稀释到刻度, 此时溶液变为透明, 测定λ 350, λ 382 nm处导数值为h₁, 另一个用磷酸盐缓冲液(25°C)稀释到刻度后迅速在λ 350, λ 382 nm处测定导数值h₂。将h₁, h₂分别代入各自的标准曲线方程得C₁, C₂, 则喜树碱多相脂质体的总包封率为:

$$\text{总包封率} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_1} \times 100\%$$

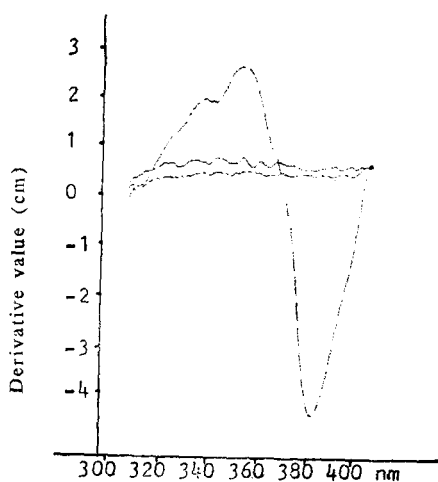


Fig 1. The first order derivative spectra of camptothecin (---); and bulk liposome in phosphate buffer (-.-.-) and in organic solvent (—).

Tab 2. Recovery of camptothecin

CPT added (mg) × 100	Bulk liposome added (μl liposome/10 ml)	CPT recovered in phosphate buffer	Recovery in phosphate buffer (%)	CPT recovered in organic solvent	Recovery in organic solvent (%)
2.00	60	1.95	97.5	1.98	99.0
3.00	60	2.93	97.7	2.95	98.3
4.00	60	3.90	97.5	3.98	98.5
5.00	60	5.02	100.4	4.95	99.0
6.00	60	6.00	100.0	6.03	100.5
Average			(98.3 ± 1.4)		(99.3 ± 0.8)

CPT: Camptothecin; Organic solvent: ether-isopropanol-water (2:4:4, v/v)

式中C₁是喜树碱多相脂质体中喜树碱的总浓度, C₂是游离喜树碱的浓度, (C₁ - C₂)为包封喜树

碱的浓度，测得结果为： $73.0 \pm 3.4\%$ ($n=5, P=95\%$)。

五. 影响喜树碱多相脂质体渗漏因素的考查

在测定包封率的过程中，喜树碱多相脂质体被稀释了250倍，从而造成了脂质体内水相与外水相的浓度差，促使喜树碱从脂质体中漏出。见图2。

(一) 介质温度对喜树碱多相脂质体渗漏的影响

将喜树碱多相脂质体用磷酸盐缓冲液(pH 7.6)稀释250倍，在25, 35, 45, 55, 65°C测定 λ 350, λ 380 nm处导数值随时间的变化，以包封率对时间作图，结果见图3。

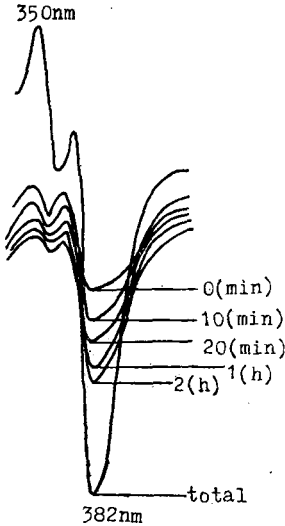


Fig 2. Leaking property of camptothecin in polyphase liposome. As time going on, more and more camptothecin leaked out from inner aqueous compartment.

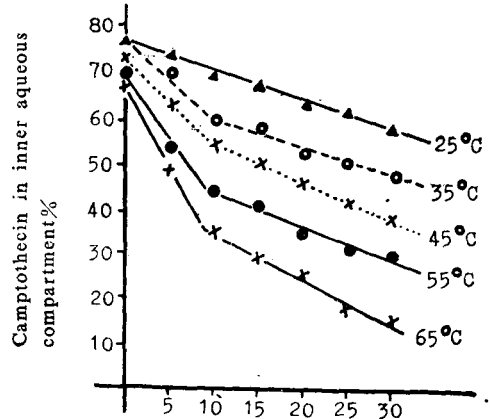


Fig 3. The influence of temperature of medium on the leaking speed.

(二) 介质酸碱性对喜树碱多相脂质体渗漏的影响

将喜树碱多相脂质体分别用不同pH的磷酸盐缓冲液稀释250倍，在25°C下测定 λ 350 nm, λ 382 nm处导数值随时间的变化，结果见图4。

(三) 介质种类对喜树碱多相脂质体渗漏的影响

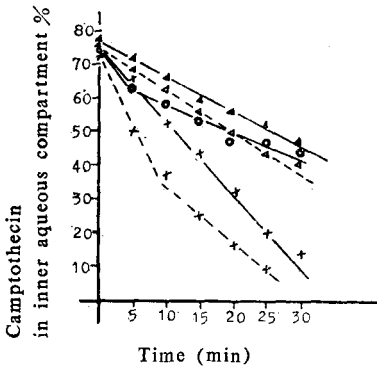


Fig 4. The influence of pH of the medium on the leaking speed.
 \blacktriangle — \blacktriangle pH7.38, \triangle — \triangle pH6.47 \circ — \circ pH=4.49; \times — \times pH9.18; \times — \times pH10.18 (Carbonate)

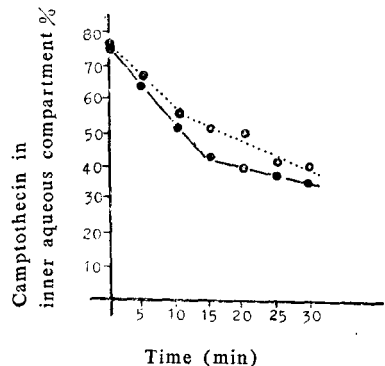


Fig 5. The influence of the sort of medium on the leaking speed. \circ — \circ In glucose (5%), \bullet — \bullet In sodium chloride (0.9%).

将喜树碱多相脂质体分别用 0.9% NaCl 及 5% 葡萄糖注射液稀释 250 倍, 在 25°C 下测定 λ 350 nm, λ 382 nm 处导数值随时间的变化。结果见图 5。

(四) 脂质体膜破坏程度对喜树碱多相脂质体渗漏的影响

先将喜树碱多相脂质体在 130°C 下加热破坏 1 h, 然后用磷酸盐缓冲液稀释 250 倍, 在 25°C 下测定 λ 350, λ 382 nm 处导数值随时间的变化, 结果见图 6。

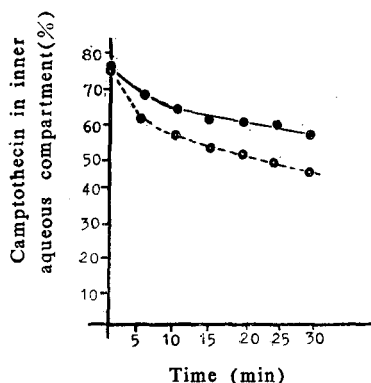


Fig 6. Influence of the extent of oxidation of the membrane components —•— 130°C, 0h; - - - - - 130°C, 1h.

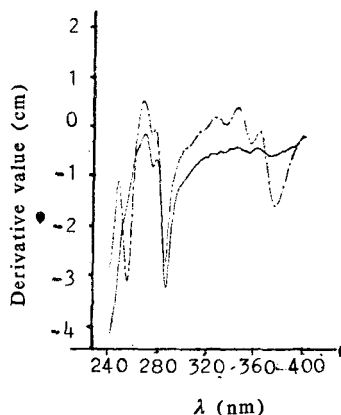


Fig 7. The first order derivative spectra of polyphase liposome in phosphate buffer (—) and in mixed solvent (- - - - -) with the same concentration.

讨 论

喜树碱的紫外吸收光谱在 220 nm, 254 nm, 290 nm, 370 nm 均有强吸收峰, 空白脂质体在 370 nm 无吸收峰, 求一阶导数后空白脂质体在 λ 350, λ 382 nm 处的导数值趋于零, 同时在 λ 370 nm 下光的能量低, 不易穿透脂质体的液晶态膜⁽³⁾, 见图 7。图 7 是将喜树碱多相脂质体分别用磷酸盐缓冲液和异丙醇—乙醚—水 (4:2:4) 混合溶剂稀释相同的倍数测得的一阶导数光谱, 由图 7 的结果知, 在波长低于 320 nm 时, 在磷酸盐介质和混合溶剂中测定的一阶导数值相等, 说明波长低于 320 nm 的光几乎 100% 穿过多相脂质体双分子膜。本法测得的包封率较高, 可能是脂质体对喜树碱有吸附作用, 这一点已在文献⁽²⁾中报道过, 吸附率占 24%。作者最近研究结果表明, 喜树碱在油酸和水中的油水分配系数为 8。这说明喜树碱在脂质体膜上的分布量很高。

从喜树碱多相脂质体的渗漏结果知, 测定时间对结果有影响, 所以要严格控制多相脂质体被磷酸盐缓冲液稀释后的测定时间, 应在稀释后 1 min 内完成测定。可在一个干燥的 1 cm 比色杯中加入 2 ml 磷酸盐缓冲液, 然后加入 8 μ l 喜树碱多相脂质体后在 30 s 内完成测定。介质的温度升高, 渗漏的速度加快, 这可能是膜的流动性随温度升高而增加, 从而引起漏出加快。介质的碱性越强, 漏出越快。膜组份氧化程度越大, 漏出越快。介质的种类及稀释倍数对喜树碱多相脂质体的渗漏也有影响, 临床应用时应尽可能降低稀释倍数。

与零阶导数光谱相比, 一阶导数光谱可以消除脂质体粒子对测定结果的影响, 因粒子具有散射作用, 求导数后, 散射的影响被消除, 此为本法的优点。与超离心法及超滤膜法相比, 本法不需分离游离药物, 并可在 30 s 内完成测定, 而前面几种方法都需分离游离药物, 在分离过程中, 会造成脂质体内外药物浓度差, 促使药物漏出, 同时至少要 30 min 才能完成, 故本法准确、快速。

参 考 文 献

1. David w, et al. Rapid separation of low molecular weight solutes from liposome without dilution. *Anal-Biochem* 1978; 90:809.
2. 罗金德, 等. 囊树碱多相脂质体(PL—CSA)的研究. 药学报 1984; 19:63.
3. 郑俊民, 等. 多相脂质体(139)液晶态物理特性的观察. 同上. 1982; 17:942.
4. 徐嘉凉, 等. 导数光谱法及其在药物分析中的应用. 药物分析杂志 1984; 4:124.

A METHOD FOR DETERMINING THE ENCAPSULATION RATIO OF CAMPTOTHECIN IN POLYPHASE LIPOSOME AND STUDIES ON ITS LEAKAGE PROPERTY

ZHANG Qing-Min, GU Xue-Qiu, SHA Yi and ZHANG Yong-Heng*

(Shenyang College of Pharmacy, Shenyang)

ABSTRACT A new method, first order derivative spectrophotometry, for determining the encapsulation ratio of camptothecin in the polyphase liposome is introduced in this article. Compared with others, this method has many advantages such as simple, correct, fast, etc. The size and shape do not interfere with the accuracy of the result. The encapsulation ratio determined with this method is $73.0 \pm 3.4\%$ ($n=5$). Using this method, we have studied the leaking property of camptothecin in the polyphase liposome. The results indicate that the leakage speed of camptothecin from the polyphase liposome is easily influenced by temperature, pH, medium, and by the extent of oxidation of the membrane components.

Key words Polyphase liposome; Camptothecin; Derivative spectrophotometry

Department of Pharmacy, Oncological Hospital, Harbin Medical University