

文章编号：(2009) 02-0044-08

二次乳化-冻融法制备5-氟尿嘧啶脂质体 及其包封率的测定

顾吉晋，邓英杰，董晓东

(沈阳药科大学 药学院，辽宁 沈阳 110016)

摘要 :目的 结合二次乳化法和冻融法制备5-氟尿嘧啶脂质体来提高5-氟尿嘧啶脂质体的包封率(encapsulation efficiency, En)。方法 采用二次乳化法制备5-氟尿嘧啶脂质体，建立超滤-HPLC法测定冻融前后5-氟尿嘧啶脂质体的包封率，并考察了二次乳化过程中温度、乳化时间对包封率的影响。结果 最终确定第一次乳化温度和时间分别为25℃、3 min，第二次乳化温度和时间分别为25℃、10 min。冻融前后的包封率分别为(23.60±0.87)%和(30.90±2.59)%。结论 二次乳化法和冻融法结合能显著提高5-氟尿嘧啶脂质体的包封率。

关键词：药剂学；5-氟尿嘧啶脂质体；二次乳化法；冻融法；超滤法；包封率

中图分类号：R94 **文献标志码**：A

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是氟化嘧啶类抗癌药物(结构见图1)，具有广谱的抗

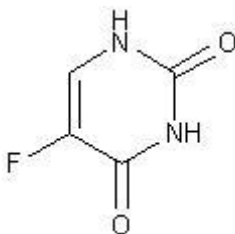


Fig.1 The structure of 5-FU

癌作用，临床上用于各种恶性肿瘤的治疗。5-FU在体内须转化为相应的核苷酸才能发挥其抑制肿瘤的作用。但5-FU在胃肠道吸收不规则，口服后20 min血药浓度达最高峰值。静脉给药后药物浓度迅速下降，半衰期仅为15~20 min，24 h后大部分已代谢，并且5-FU具有骨髓抑制和胃肠道反应等性与不良反应^[1-2]。因此，有必要选择一种合适的药物载体，减少5-FU的毒性与不良反应、提高疗效。众多研究表明，脂质体是一种理想的药物传递系统，可以解决5-FU传统制剂靶向性差，毒性与不良反应大的问题。由于5-FU的性质决定了被动载药法制备5-FU脂质体的包封率相当低，约10%左右^[3]。本文作者将二次乳化法和冻融法结合制备5-FU脂质体，来提高5-FU脂质体的包封率。

1 仪器与材料

ZFQ85A型旋转蒸发器(上海医械专机厂)，超声波清洗机(昆山市超声波仪器厂)，LC-10AT型

收稿日期：2008-07-16

作者简介：顾吉晋(1982-)，男(汉族)，山东烟台人，硕士研究生，E-mail gujjin@163.com；邓英杰(1945-)，女(汉族)，黑龙江牡丹江人，研究员，博士生导师，主要从事靶向给药新剂型，脂质体等新型给药系统的研究。Tel.024-23986311，E-mail dengyingjie45@yahoo.com.cn。

高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司), LI-PEX挤出仪(加拿大Northern Lipids公司), 超滤器(美国Milipore公司, Bedford, model 8010, MA01730), 超滤膜(截留相对分子质量50000, 上海医药工业研究院), 5-FU(纯度质量分数在99%以上, 济南制药总厂), 注射用大豆磷脂(上海太伟药业有限公司), 胆固醇(广东南方玻化进口分装), 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HPLC分析方法的建立

2.1.1 色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱(200 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相: 甲醇-水(体积比1:99), 流速: 0.8 mL \cdot min $^{-1}$, 柱温: 室温, 紫外检测波长: 265 nm, 进样量20 μ L。

2.1.2 线性关系的确定

精密称取适量5-FU对照品, 用蒸馏水溶解并定容至100 mL, 摇匀, 配成100 mg \cdot L $^{-1}$ 的储备液。吸取一定体积配制成质量浓度为1.0、2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 mg \cdot L $^{-1}$ 的系列溶液。分别进样20 μ L, 以峰面积和质量浓度进行线性回归, 得回归方程 $A=7.29 \times 10^4 \rho + 1.58 \times 10^4$ ($r^2=0.9998$), 表明在1.0~25.0 mg \cdot L $^{-1}$ 内线性关系良好。

2.1.3 精密度试验

取5-FU对照品储备液适量, 用流动相稀释至质量浓度分别为5.0、10.0、20.0 mg \cdot L $^{-1}$ 的溶液。同一天内早、午、晚各进样3次, 连续5 d, 计算日内和日间精密度。精密度用相对标准偏差表示: 日内精密度分别为1.2%、1.9%、1.7%, 日间精密度分别为1.8%、0.9%、2.1%。

2.1.4 回收率试验

取3份0.5 mL空白脂质体, 加入0.5、1.0、2.0 mL储备液, 加适量甲醇破坏脂质体, 用流动相稀释适当的倍数定容至质量浓度为5.0、10.0、20.0 mg \cdot L $^{-1}$ 。按“2.1.1”条中色谱条件进样, 计算回收率。平行操作3次。低、中、高3种质量浓度平均回收率分别为99.5%、98.7%、101.2%, RSD分别为1.53%、0.75%、0.94%。

2.2 超滤法测定5-FU脂质体的包封率

2.2.1 游离药物回收率

配制低、中、高3种质量浓度(5.0、10.0、20.0 mg \cdot L $^{-1}$)的5-FU水溶液, 分别取5.0 mL至超滤器中进行超滤, 收集续滤液。将超滤前后5-FU水溶液用流动相稀释至适当质量浓度, 按“2.1.1”条中色谱条件进样, 计算回收率, 结果见表1。

Table 1 The recoveries of 5-FU in the process of ultrafiltration without blank liposomes ($n=5$)

$\rho_{\text{added}} / (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{before ultrafiltration}} / (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{after ultrafiltration}} / (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	Recovery/%	RSD/%
5.0	5.86	5.50	93.86	1.42
10.0	9.21	9.18	99.67	0.75
20.0	21.32	20.46	95.97	2.10

2.2.2 超滤加样回收率

精密量取5-FU储备液适量,加至空白脂质体中,定容至10 mL,使5-FU质量浓度分别为5.0、10.0、20.0 mg·L⁻¹,分别取5.0 mL至超滤器中进行超滤,按“2.1.1”条中色谱条件进样,计算回收率,结果见表2。

Table 2 The recoveries of 5-FU in the process of ultrafiltration with blank liposomes (n=5)

$\rho_{\text{added}} / (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{before ultrafiltration}} / (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	$\rho_{\text{after ultrafiltration}} / (\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	Recovery/%	RSD / %
5.0	4.93	5.09	103.20	1.72
10.0	9.49	8.93	94.10	2.23
20.0	19.76	20.17	102.10	1.04

2.2.3 超滤膜对空白脂质体透过能力的考察

取空白脂质体5.0 mL至超滤器中进行超滤,收集滤液用定磷法测定滤液中磷的含量。结果表明,滤液中检测不到磷,说明超滤膜对脂质体能够完全截留。

2.2.4 包封率的测定方法

取5-FU脂质体5.0 mL至超滤器内,氮气加压,收集续滤液。精密量取一定量该滤液,流动相稀释定容至适当质量浓度,按“2.1.1”条中色谱条件进样分析,计算游离药物含量(m_{free})。精密量取5-FU脂质体0.5 mL,甲醇破坏后,用流动相稀释定容至适当质量浓度进样分析,计算脂质体中药物总含量 m_{tot} ,并按公式 $\text{En}(\%) = (m_{\text{tot}} - m_{\text{free}}) / m_{\text{tot}} \times 100$ 计算包封率En^[4]。其中 m_{free} 表示未包入脂质体中游离5-FU量, m_{tot} 表示5-FU总药物量。

2.3 5-FU在氯仿/水中油水分配系数的测定

采用经典摇瓶法测定5-FU在氯仿/水中的油水分配系数^[5]。量取2 mL 5-FU (质量浓度为5 g·L⁻¹)水溶液和用水饱和的氯仿8 mL,置于具塞试管中混合,25 °C恒温振摇2 h,取出静置30 min,分离出水相。用流动相稀释至线性范围,经0.45 μm膜过滤,取续滤液在265 nm波长处测定吸收度 A ,计算水相中5-FU的质量浓度,以初始水相中5-FU质量浓度与氯仿萃取后水相中5-FU质量浓度之差作为5-FU在氯仿中的质量浓度,计算表观油/水分配系数 $\log P = -1.66$ 。

2.4 5-FU脂质体制备工艺的研究

2.4.1 二次乳化法制备5-FU脂质体

按质量比 10 : 1 精密称取磷脂、胆固醇于茄形瓶中,用 5 mL 氯仿溶解,将 2 mL 质量浓度为 5 g·L⁻¹ 5-FU 水溶液加入有机相中,高速剪切乳化,得 W/O 型乳;然后加入 8 mL 去离子水,超声乳化成 W/O/W 型乳。旋转蒸发仪上减压除尽有机溶剂,分别过 0.8、0.45、0.22 μm 的微孔滤膜挤出,得脂质体混悬液(具体步骤如图 2 所示)。

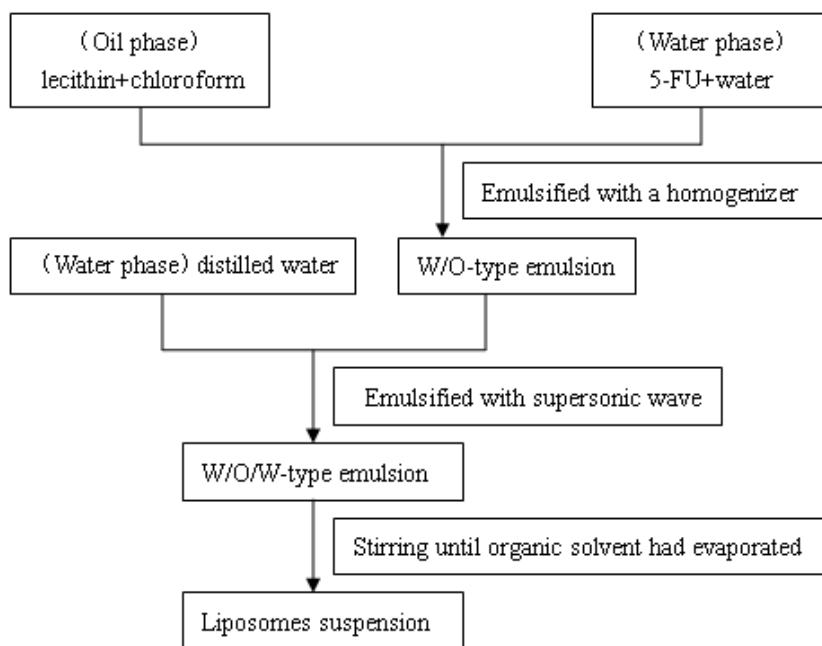


Fig.2 The process of preparaing 5-FU liposomes by double emulsification method

2.4.2 第一次乳化温度和时间对包封率的影响

固定第二步乳化条件(乳化温度为25℃, 乳化时间为10 min), 分别考察第一步乳化温度为0℃、25℃、50℃和乳化时间为3 min、5 min、10 min对脂质体包封率的影响。每组试验均平行操作3次, 结果如图3、4。

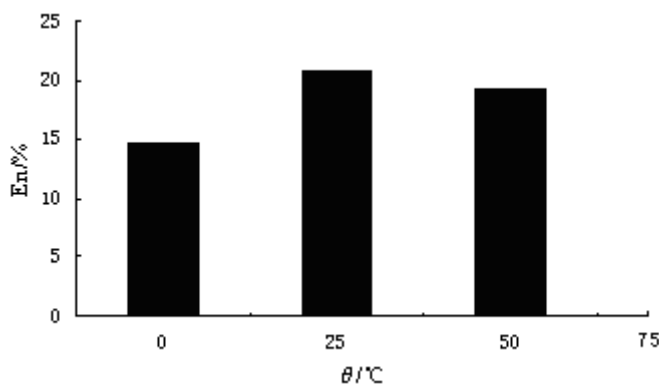


Fig.3 Effect of the first emulsion temperature on the encapsulation efficiency of 5-FU

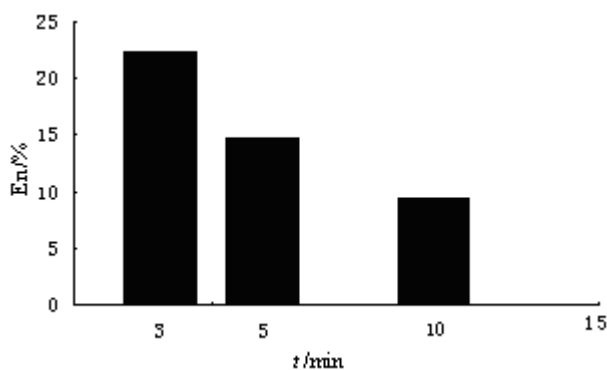


Fig.4 Effect of the first emulsification time on the encapsulation efficiency of 5-FU

结果表明随着第一次乳化温度的升高包封率先升高后降低。其中25 ℃时的包封率最大。随着第一次乳化时间的延长，脂质体的包封率下降。所以第一次乳化温度和时间分别定为25 ℃、3 min。

2.4.3 第二次乳化温度和时间对包封率的影响

固定第一步乳化条件（乳化温度为25 ℃，乳化时间为3 min），分别考察第二步乳化温度为0、25、50 ℃和乳化时间为5、10、15 min对脂质体包封率的影响。每组试验均平行操作3次，结果如图5、6。

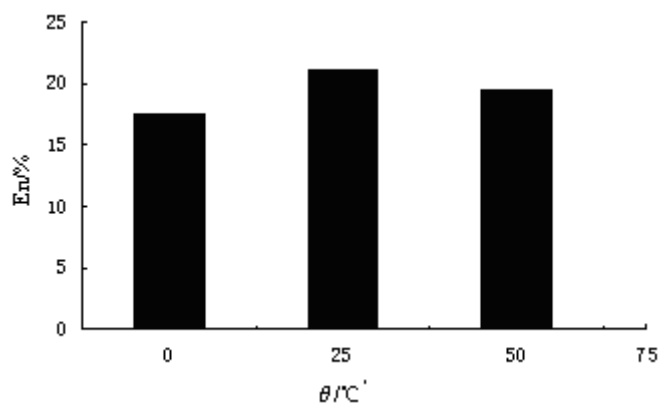


Fig.5 Effect of the second emulsion temperature on the encapsulation efficiency of 5-FU

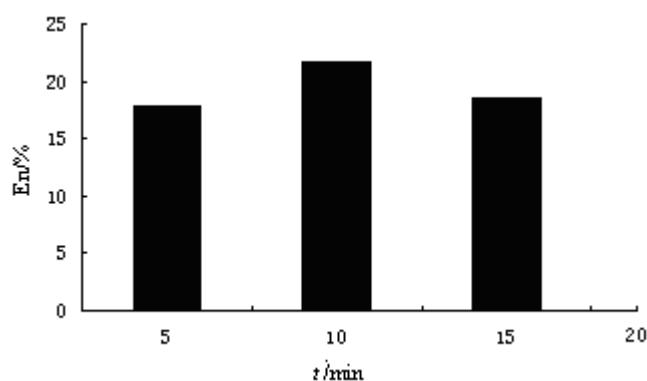


Fig.6 Effect of the second emulsification time on the encapsulation efficiency of 5-FU

结果表明，随着第二次乳化温度的升高和时间的延长，脂质体的包封率变化不大。所以将第二次乳化温度和时间分别定为25 ℃、10 min。

2.5 冻融前后包封率和粒径的变化

2.5.1 5-FU脂质体的冻融

按照处方条件将“2.4.1”制得的脂质体混悬液置于-18 ℃冰箱内贮存^[1]，冷冻过夜后室温融化，重复3次。

2.5.2 冻融前后5-FU脂质体包封率的测定

按“2.2.4”中方法测定5-FU脂质体冻融前后的包封率，其结果如表3。

Table 3 Entrapment efficiencies of liposomes before and after being frozen-thawed ($n=3$)

Samples	En /%			
	1	2	3	\bar{x}
Before frozen	28.6	27.4	26.9	23.6 ± 0.87
After frozen	34.7	31.4	29.6	30.9 ± 2.59

由表可见，二次乳化法制备的5-FU脂质体的包封率明显高于文献报道，且经过冻融脂质体包封率明显提高。

2.5.3 冻融前后5-FU脂质体粒径的测定

采用激光粒度仪对5-FU脂质体粒度分布进行测定，结果冻融后5-FU脂质体的粒径比冻融前明显增大，结果如图7、8。

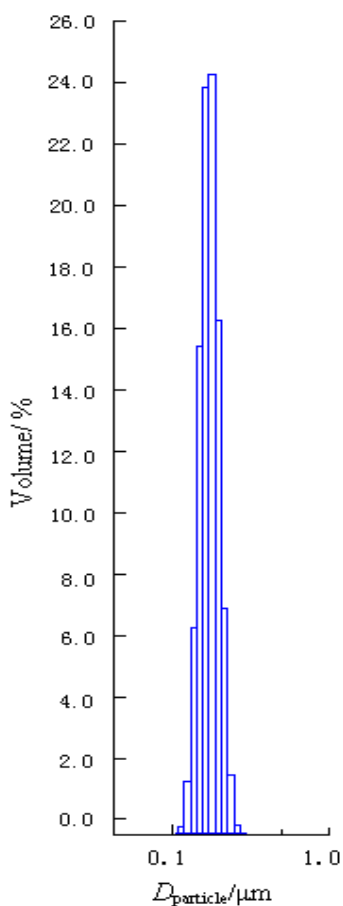


Fig.7 Particle diameter of 5-FU liposomes
before freeze-thawing

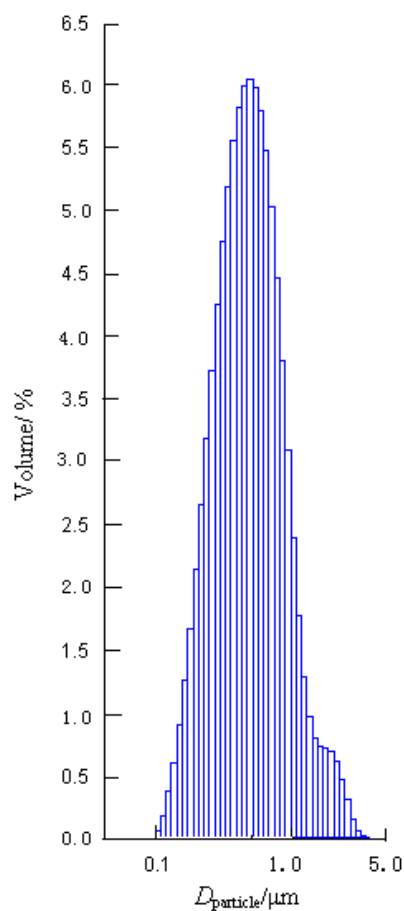


Fig.8 Particle diameter of 5-FU liposomes
after freeze-thawing

3 讨论

a. 影响脂质体包封率的因素很多，如药物特性、制备方法、脂质体膜刚性、水相体积等^[6]。5-FU 经常作为研究水溶性药物脂质体的模型药物。据报道，5-FU 的包封率在 10% 左右。本文作者从制备

工艺着手,提高 5-FU 的包封率。在二次乳化法中,5-FU 溶液首先形成 W/O 型的乳,再分散在大量水相中,形成 W/O/W 型的乳剂。理论上,通过包含磷脂的有机相,将含药内水相和外水相分离,有利于维持水溶性药物的包封率。由于 5-FU 水溶性较好,膜流动性,很容易渗漏,这是影响 5-FU 脂质体包封率不高的主要原因。因此,为了减少 5-FU 的渗漏,除了在处方中加入适量的胆固醇外,作者还加入了一定比例的氢化大豆磷脂^[7],以提高脂质体膜的刚性。预实验结果(文中没有给出具体数据)表明,氢化磷脂加入量越多,5-FU 脂质体的包封率也越高。

b. 二次乳化法制备脂质体过程中的温度和乳化时间对最终的包封率影响很大。温度过高或乳化时间过长,使制备过程中氯仿挥发较多,药物分子运动过快,不利于药物包封于脂质体的内水相。

c. 包封率与药物油水分配系数的关系:根据 Smith 等^[8]的报道,包封率与药物的油水分配系数有关。在一定的 $\log P$ 值范围内,油水分配系数越高,脂质体的包封率越高。5-FU 油水分配系数 $\log P_{\text{octanol/water}}$ 只有 -0.78,水溶性很强,易从脂质体内渗漏,故包封率较低。所以,通过二次乳化法制备脂质体,脂质体的包封率与药物在油相氯仿和水中的油水分配系数密切相关。

d. 为了提高 5-FU 脂质体的包封率,采用二次乳化法制备脂质体后,将 5-FU 脂质体经过冻融处理,有效提高了包封率。温度降低,可降低药物分子的运动速度,减少 5-FU 的渗漏,同时由于冰冻使脂质体周围外水相的药物浓度增高,且在反复冻融过程中粒径小的脂质体互相融合成粒径较大的脂质体,粒径趋于均匀化,使脂质体包封率明显提高,比冻融前约提高 7%。

参考文献:

- [1] 张奇, 邓英杰. 冻融法制备 5-氟尿嘧啶脂质体及其稳定性考察[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(2): 87-89.
- [2] 张奇, 邓英杰, 罗国安. 均匀设计法制备 5-氟尿嘧啶脂质体及其稳定性[J]. 北京大学学报(医学版), 2002, 34(1): 64-67.
- [3] ELORZA B, ELORZA M A, FRUTOS G, et al. Characterization of 5-fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freezing-thawing extrusion methods: study of drug release [J]. BBA, 1993, 1153(2): 135-142.
- [4] 雷国峰, 陈琳, 邓英杰, 等. 超滤法-HPLC法测定灯盏花素脂质体包封率[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(4): 237-243.
- [5] TOMOKO N, FUMIYOSHI I. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2005, 298(1): 198-205.
- [6] KULKARNI S B, BETAGERI G V, SINGH M. Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes[J]. Microencapsul. 1995, 12(3): 229-246.
- [7] TOMOKO N, TAKAMURA A, MOHRI K, et al. Factors affecting physicochemical properties of liposomes prepared with hydrogenated purified egg yolk lecithins by the microencapsulation vesicle method[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 27(4): 323-332.
- [8] SMITH R N, HANSCH C, AMES M M. Selection of a reference partitioning system for drug design work[J]. Journal

Pharmaceutical Science, 1975, 64(4): 599-606.

Preparation of 5-FU liposomes by double emulsification and freeze-thawing method

GU Ji-jin , DENG Ying-jie , DONG Xiao-dong

(*School of Pharmacy , Shenyang Pharmaceutical University , Shenyang 110016 , China*)

Abstract: **Objective** To prepare 5-FU liposomes by double emulsification and freeze-thawing method in order to improve the encapsulation efficiency of 5-FU in liposomes. **Methods** 5-FU liposomes were prepared by double emulsification method and the encapsulation efficiency was determined by ultrafiltration-HPLC method before and after freeze-thawing. Also, the influence of temperature, emulsifying time during the emulsification process on the encapsulation efficiency was investigated. **Results** Temperature and time had significant influence and the encapsulation efficiency of 5-FU could be improved when keeping both the first emulsion and the second emulsion temperature at 25 °C, and emulsified for 3 and 10 min, respectively. Before and after freeze-thawing, the encapsulation rates were 23.6±0.87% and 30.9±2.59%, respectively. **Conclusion** Double emulsification and freeze-thawing method can significantly increase the encapsulation efficiency 5-FU in liposomes.

Key words: pharmaceutics; 5-FU liposomes; double emulsification; freeze-thawing method; ultrafiltration; encapsulation efficiency

(责任编辑 曹霞)