

文章编号：(2009)04-0260-06

## 跨膜梯度法制备羟苯磺酸铵-盐酸阿霉素脂质体

宋 阳, 张小飞, 周欣羽, 邹 佳, 张 玲, 邓意辉

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要 目的:**以2,5-二羟基苯磺酸铵形成脂质体内外水相跨膜梯度,主动装载盐酸阿霉素。**方法:**以2,5-二羟基苯磺酸铵溶液为水化介质制备空白脂质体。通过透析法建立空白脂质体跨膜梯度。超滤法结合离子对-高效液相色谱法(IP-HPLC)测定空白脂质体外水相2,5-二羟基苯磺酸铵浓度。将已建立梯度的空白脂质体与盐酸阿霉素溶液50 孵育20 min制备盐酸阿霉素脂质体。**结果:**脂质体平均粒径约为106.4 nm,包封率为28.54%。**结论:**可以通过建立2,5-二羟基苯磺酸铵跨膜梯度来制备盐酸阿霉素脂质体。

**关键词:**药剂学; 脂质体; 盐酸阿霉素; 2,5-二羟基苯磺酸铵; 跨膜梯度载药

**中图分类号:** R944.1+5 **文献标志码:** A

盐酸阿霉素(doxorubicin hydrochloride, DOX)是蒽环类广谱抗肿瘤药,对急性白血病、淋巴瘤、乳腺癌、肺癌及其他多种实体瘤均有效,是肝癌化疗的一线药物。20世纪70年代末开始有研究者用脂质体作为蒽环类抗癌药载体,可以有效减少药物在心脏中的分布,降低其心脏方面的不良反应<sup>[1]</sup>。目前已有DOX脂质体产品上市,如Doxil<sup>®</sup>(亦称为Caelyx<sup>®</sup>)及Myocet<sup>®</sup>。由于DOX能与黄蛋白,尤其是微粒体和线粒体中的酶发生氧化还原反应形成自由基,引起肾小球结构卤化,内皮细胞肿胀,上皮细胞足突融合,肾小球基膜降解,从而导致肾脏毒性。据报道,硒可以防护DOX的肾脏不良反应<sup>[1]</sup>,也可采用维生素E、维生素C、茶多酚等抗氧化剂,但未见将具有肾功能保护作用的药物与DOX包裹于同一脂质体的研究。

2,5-二羟基苯磺酸钙(calcium dobesilate, 羟苯磺酸钙)是一种用于改善微循环的血管营养药,可以促进淋巴循环,保护微血管,同时具有良好的清除自由基、抗氧化作用,可用于慢性肾功能不全的治疗与预防<sup>[2]</sup>。一般而言,肿瘤组织中存在淋巴循环障碍、组织内压大、药物不易进入肿瘤组织等问题。将羟苯磺酸钙与DOX联合应用,有可能降低DOX肾脏方面的不良反应,同时改善肿瘤淋巴循环,降低组织内压,增加药物进入肿瘤组织的机会。作者先制备2,5-二羟基苯磺酸铵脂质体,然后建立跨膜梯度,主动装载盐酸阿霉素,首次将2,5-二羟基苯磺酸与DOX包封于同一脂质体内,为将来的药效与不良反应研究奠定基础。

### 1 仪器与试药

P230高压恒流泵(大连依利特科学仪器有限公司),DAD230二极管阵列检测器(大连依利特科学仪器有限公司),756MC型可见紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂),pHS-25型pH计(上海精科雷磁),732强酸性阳离子交换树脂(国药集团化学试剂有限公司),Anke TDL80-2B离心机(上海安亭科学仪器厂),BS124s电子分析天平(德国Sartorius公司),TN型托盘式扭力天平(上海第二天平仪器厂),透析袋(截留相对分子质量8 000~14 000),超滤膜(10 ku,上海亚东核级树脂有限公司)。

羟苯磺酸钙(巨野凌峰化工原料有限公司,批号070420),盐酸阿霉素(北京华奉联博科技有限公司,批号HF070312),磷酸二氢钾(广东汕头市西陇化工厂),四丁基溴化铵(天津远航化学试剂分公司),甲醇、乙腈(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司),磷酸(沈阳经济技术开发区试剂厂,质量分数为85%),无水乙醇(药用级,安徽安特生物化学有限公司),大豆磷脂S100(德国Lipoid公司),

收稿日期:2009-03-25

作者简介:宋阳(1984-),女(汉族),黑龙江伊春人,硕士,主要从事药剂学研究, Tel. 024- 23986316, E-mail songyang313@163.com。

胆固醇(药用级,南京新百药业有限公司),聚乙二醇单甲醚<sub>2000</sub>胆固醇琥珀酸酯(PEG-CHS,自制),氨水(沈阳化学试剂厂),盐酸(沈阳经济技术开发区试剂厂),异丙醇(天津市博迪化工有限公司),Triton X-100(北京化学试剂公司),水为重蒸水,其他试剂皆为分析纯。

## 2 2,5-二羟基苯磺酸铵的制备

量取13.5 mL 732强酸性阳离子交换树脂(氢型),湿法装柱,以蒸馏水平衡。按照732强酸性阳离子交换树脂20%工作交换容量(即 $0.3024 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,湿视体积)上样。称取0.87 g羟苯磺酸钙(2 mmol),以适量蒸馏水溶解,滴加至树脂柱顶表面中央,用40.0 mL蒸馏水(3倍床体积)以1滴/s流速洗脱,收集洗脱液。所得洗脱液经冷冻干燥得2,5-二羟基苯磺酸固体。精密称量0.1590 g 2,5-二羟基苯磺酸冻干品,以适量蒸馏水溶解(pH 1.84),氨水调节pH至6.99,用蒸馏水定容至10.0 mL,制得 $80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  2,5-二羟基苯磺酸铵溶液。

## 3 IP-HPLC测定2,5-二羟基苯磺酸铵

色谱柱:Kromasil 100-5C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm, E17853),流动相:乙腈-甲醇-质量分数为0.2%的磷酸二氢钾溶液(含质量分数为0.2%的四丁基溴化铵,磷酸调pH为 $3.10\pm 0.05$ )(体积比为10:25:65),检测波长:260 nm,柱温:30℃,进样量:20 μL,流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>。

在该色谱条件下,制剂其他辅料不干扰2,5-二羟基苯磺酸铵的测定,见图1。IP-HPLC测定2,5-二羟基苯磺酸铵的线性为20.0~500 mg·L<sup>-1</sup>;以峰面积*A*对质量浓度*ρ*(mg·L<sup>-1</sup>)进行线性回归得 $A = 1.1539\rho + 1.5910$ ,相关系数 $r=0.9998$ ;最低检测限为1.64 ng;精密度的RSD为0.23%。

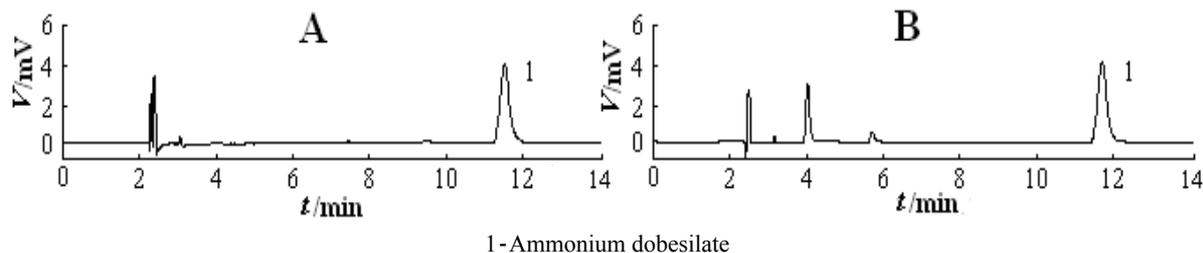


Fig.1 HPLC chromatograms of ammonium dobesilate (A) and blank liposomes (B)

## 4 空白脂质体的制备

精密称取处方量大豆磷脂S100、胆固醇、PEG-CHS(质量比为3:1:1),50 mg溶于适量无水乙醇,挥去乙醇,注入同温度pH6.99的 $80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  2,5-二羟基苯磺酸铵作为水化介质,孵育20 min,制得空白脂质体初品。所得初品通过探头超声法减小粒径,探头超声条件为200 W×2 min,400 W×6 min。采用Nicomp 380粒径测定仪测得平均粒径为106.4 nm。

## 5 透析法建立2,5-二羟基苯磺酸铵梯度的条件优化

采用透析法除去脂质体外水相的2,5-二羟基苯磺酸铵,建立跨膜梯度。取2.0 mL空白脂质体,以500 mL质量分数为5%的糖为透析介质(体积比为1:250),磁力搅拌以达平衡。分别于0.5、1.0、1.5、2.0 h取一定体积透析介质,按照“3”条的条件进样分析,[0]同时补足等体积透析介质。发现1.5 h后透析介质内2,5-二羟基苯磺酸铵浓度趋于稳定,选择透析介质平衡时间为2 h。另取每次更换的平衡透析介质按照“3”条的条件进样分析,记录HPLC色谱峰面积,结果表明在第3次更换的透析介质中已检测不到2,5-二羟基苯磺酸铵,选择透析介质更换次数为3次。将透析后的制剂转移至5.0 mL容量瓶内,用透析介质定容,混匀。

## 6 超滤法分离外水相2,5-二羟基苯磺酸铵

### 6.1 超滤膜对2,5-二羟基苯磺酸铵截留能力的考察

精密配制不同质量浓度的2,5-二羟基苯磺酸铵溶液,分别取2.0 mL至超滤装置中超滤,弃去初滤液,接续滤液部分,分别取超滤前溶液和超滤后续滤液20  $\mu\text{L}$ 进行HPLC分析,记录超滤前溶液中2,5-二羟基苯磺酸铵峰面积 $A_{\text{before}}$ 和超滤后续滤液中2,5-二羟基苯磺酸铵峰面积 $A_{\text{after}}$ ,计算回收率,结果见表1。

Table 1 The recoveries of ammonium dobesilate through ultrafiltration membrane ( $n=3$ )

| $\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ | $A_{\text{before}}/(\text{mV}\cdot\text{s})$ | $A_{\text{after}}/(\text{mV}\cdot\text{s})$ | Recovery/% |
|--------------------------------------|--|---|------------|
| 50.0                                 | 59.093                                       | 58.992                                      | 99.00      |
| 100.0                                | 116.88                                       | 116.53                                      | 99.62      |
| 500.0                                | 578.60                                       | 578.14                                      | 99.93      |

由表 1可知,2,5-二羟基苯磺酸铵可以完全透过超滤膜,不被截留。

### 6.2 超滤膜对空白脂质体截留能力的考察

采用浊度法考察了超滤膜对空白脂质体的截留能力。平行制备3份空白脂质体,分别取2.0 mL至超滤装置中超滤,弃去初滤液,取续滤液部分,于450 nm下测定脂质体的吸光度 $A$ 值,实验结果表明,没有脂质体透过超滤膜。

### 6.3 脂质体外水相2,5-二羟基苯磺酸铵浓度的测定

通过透析法建立空白脂质体跨膜梯度后,立即取2.0 mL空白脂质体溶液至超滤装置中,超滤并弃去初滤液,取20  $\mu\text{L}$ 续滤液,按照“3”条的进行HPLC分析,计算脂质体外2,5-二羟基苯磺酸铵质量浓度 $\rho_{\text{extra}}$ 为171.78  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 6.4 脂质体中2,5-二羟基苯磺酸铵浓度的测定

精密移取0.1 mL已建立跨膜梯度的空白脂质体至10.0 mL容量瓶,加入1.0 mL 体积分数为10%的Triton溶液破乳,用重蒸水定容,进行HPLC分析,计算脂质体中2,5-二羟基苯磺酸铵总质量浓度 $\rho_{\text{all}}$ 为496.99  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

## 7 主动装载DOX

将建立梯度的空白脂质体与DOX溶液混合(磷脂与DOX质量比为10:1),于50  $^{\circ}\text{C}$ , 孵育20 min。

## 8 阳离子树脂交换法测定DOX脂质体封装率

### 8.1 标准曲线绘制

以蒸馏水配制4.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX 储备液。用体积分数为90%的异丙醇溶液(含0.75  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl)稀释储备液得4.0、8.0、16、24、32  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DOX标准液,在480 nm波长下,以吸收度 $A$ 对质量浓度 $\rho$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )进行线性回归得 $A=0.0187\rho+0.0059$ , $r=0.9998$ 。

### 8.2 阳离子交换树脂对脂质体和游离DOX的分离

#### 8.2.1 阳离子交换树脂柱的制备

量取1 mL(湿视体积)常规酸碱处理后的钠型732强酸性阳离子交换树脂,装于2.5 mL注射器中,以蒸馏水平衡,2000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心4 min,弃去滤液,制成阳离子交换树脂柱。

#### 8.2.2 对空白脂质体的吸附

采用浊度法考察阳离子交换树脂柱对空白脂质体的吸附情况。取空白脂质体200  $\mu\text{L}$ 2份。一份用蒸馏水稀释定容至2.0 mL,摇匀,于450 nm处测定吸光度(记为 $A_{\text{before}}$ )。另一份加于阳离子交换树脂柱顶端表面中央,200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心4 min,收集洗脱液,用蒸馏水稀释定容至2.0 mL,摇匀,于450 nm处测定吸光度(记为 $A_{\text{after0}}$ );自顶端加入400  $\mu\text{L}$ 蒸馏水浸润阳离子交换树脂柱,

2000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心4 min, 洗脱液用蒸馏水稀释至2.0 mL, 摇匀; 继续重复用蒸馏水洗脱3次, 每次的洗脱液用蒸馏水稀释至2.0 mL, 摇匀, 于450 nm处测定吸光度(记为 $A_{\text{after } 1\ 2\ 3\ 4}$ )。回收率根据公式  $R_n = \sum A_{\text{after } n} / A_{\text{before}} \times 100\%$ 计算,  $n$ 为洗脱次数 ( $n=0\sim 4$ ), 实验结果见表2。

Table 2 The recoveries of blank liposomes by cation exchange resin ( $n=3$ )

| times of elution/ $n$ | $R_n/\%$ |
|-----------------------|----------|
| 0                     | 85.2     |
| 1                     | 93.8     |
| 2                     | 97.6     |
| 3                     | 99.0     |
| 4                     | 99.8     |

由表 2 可知, 经 4 次洗脱后空白脂质体回收率达到 99.8%。

### 8.2.3 对水溶液中 DOX 的吸附

取质量浓度为 1.0、1.2、1.5、2.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DOX 水溶液 0.2 mL 各 2 份。一份直接加入 10.0 mL 的容量瓶中, 以体积分数为 90% 的异丙醇溶液(含 0.75  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl)定容, 摇匀, 于 480 nm 处测  $A$  值 ( $A_{\text{before}}$ ); 另一份加于阳离子交换树脂柱顶端表面中央, 2000 rpm 离心 4 min, 然后自顶端加入 400  $\mu\text{L}$  蒸馏水浸润阳离子交换树脂柱, 2000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 4 min, 根据“8.2.2”条的实验结果, 重复洗脱 4 次, 收集洗脱液于 10.0 mL 容量瓶中, 以体积分数为 90% 的异丙醇溶液(含 0.75  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl)定容, 摇匀。于 480 nm 处测  $A$  值 ( $A_{\text{after}}$ )。结果见表 3。

Table 3 The adsorption values of DOX through cation exchange resin ( $n=3$ )

| $\rho/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | $A_{\text{before}}$ | $A_{\text{after}}$ |
|-------------------------------------|---------------------|--------------------|
| 1.0                                 | 0.380               | 0.000              |
| 1.2                                 | 0.452               | 0.000              |
| 1.5                                 | 0.567               | 0.000              |
| 2.0                                 | 0.748               | 0.000              |

由表 3 可知, 1 mL (湿视体积) 阳离子交换树脂可完全吸附 0.2 mL 质量浓度为 1.0~2.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DOX 溶液。

### 8.2.4 对物理混合物中 DOX 的吸附

准确移取 4.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  DOX 溶液 0.3、0.5、0.7、1.0 mL 至 2.0 mL 容量瓶内, 分别加入 1.0 mL 空白脂质体, 以质量分数为 5% 的糖溶液稀释至刻度, 混匀, 配制成 DOX 质量浓度分别为 0.6、1.0、1.4、2.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的空白脂质体-DOX 物理混合物, 按“8.2.3”条的方法洗脱, 于 480 nm 处测  $A$  值, 结果见表 4。

Table 4 The adsorption values of DOX with blank liposomes through cation exchange resin ( $n=3$ )

| $\rho/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | $A_{\text{before}}$ | $A_{\text{after}}$ |
|-------------------------------------|---------------------|--------------------|
| 0.6                                 | 0.230               | 0.003              |
| 1.0                                 | 0.380               | 0.002              |
| 1.4                                 | 0.530               | 0.002              |
| 2.0                                 | 0.749               | 0.004              |

由表4可见, DOX与空白脂质体的物理混合物中, DOX吸附率大于99%。

### 8.3 包封率的测定

精密移取0.2 mL DOX脂质体于10.0 mL容量瓶中, 加入1.6 mL蒸馏水, 以体积分数为90%的异丙醇溶液(含 $0.75 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl)破乳并定容, 摇匀, 480 nm波长下测定吸光度 $A_0$ (药物总吸收度)。另精密移取0.2 mL DOX脂质体, 置于阳离子交换树脂柱顶端表面中央,  $2000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心4 min, 再于柱顶端加入400  $\mu\text{L}$ 蒸馏水,  $2000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心4 min, 重复4次, 合并洗脱液。洗脱液转移至10.0 mL量瓶中, 用体积分数为90%的异丙醇溶液(含 $0.75 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  HCl)破乳并定容, 摇匀, 测定吸光度 $A_1$ (包封药物吸收度)。按下列公式计算包封率为28.54%。

$$\text{Entrapment Efficiency/ \%} = \frac{A_1}{A_0} \times 100$$

## 9 讨论

a. 针对2,5-二羟基苯磺酸钙、盐酸阿霉素的水溶性特点, 为改善被动载药法制得脂质体包封率低的问题, 本文作者选择以2,5-二羟基苯磺酸铵来形成脂质体跨膜梯度, 主动装载DOX, 提高包封率。

b. 透析法是建立脂质体跨膜梯度的常用方法之一。该法条件温和, 便于实现, 但存在耗时长, 梯度容易流失的缺点。本文采用IP-HPLC法监测并优化了透析法建立梯度的条件, 缩短平衡时间, 精简操作步骤, 将脂质体内外水相离子梯度的流失程度降低至最低点, 包封率从10.51%提高至28.54%。实验过程中我们发现第3次透析介质中已检测不到2,5-二羟基苯磺酸铵, 但超滤法分离得外水相2,5-二羟基苯磺酸铵浓度为 $171.78 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 说明超滤过程中, 2,5-二羟基苯磺酸铵快速跨膜渗漏。

c. DOX脂质体跨膜梯度主动载药的机理主要有“质子池”和“DOX在内水相形成复合物/沉淀”两种解释。“质子池”的形成依赖于足够跨膜梯度的建立和阴阳离子跨膜速率的巨大差异。一般认为, 保证药物有效装载入脂质体内部需要的跨膜梯度差为1000倍<sup>[5]</sup>, 由于2,5-二羟基苯磺酸铵溶解度低和跨膜速率大的问题, 导致所建立的2,5-二羟基苯磺酸铵跨膜梯度小, 这是包封率不高的原因之一, 将来可通过优化处方工艺, 提高包封率。另外, 本文尝试采用稀释的方法来建立更高的跨膜梯度, 以期获得更高的包封率, 实验结果表明将建立梯度的空白脂质体液体稀释10倍后, 包封率为33.66%, 并未明显改善, 可能原因是该处方条件下2,5-二羟基苯磺酸铵快速跨膜渗漏导致梯度流失, 具体机理有待进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] 赵玉洲, 任忠. 硒对阿霉素肾毒性防护作用的实验研究[J]. 新乡医学院学报. 1998, 15: 133-134.
- [2] 李曙平, 钟雷. 羟苯磺酸钙治疗老年男性慢性肾功能不全的疗效及用药安全性研究 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2007, 6: 425-426.
- [3] 邓意辉, 徐辉. 脂质体[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 136.
- [4] 陈涛, 王昭, 韩欢牛, 等. 离子梯度载药法制备脂质体药物的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2004: 1024-1029.

## Loading of doxorubicin hydrochloride into liposomes by ammonium dobesilate transmembrane gradient method

SONG Yang, ZHANG Xiao-fei, ZHOU Xin-yu, ZOU Jia, ZHANG Ling, and DENG Yi-hui  
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, 110016, China)

**Abstract: Objective** Ammonium dobesilate was used to form transmembrane gradient to load doxorubicin hydrochloride (DOX) into liposomes. **Methods:** The lipid mixture was hydrated by 80 mmol·L<sup>-1</sup> ammonium dobesilate to form liposomes. Ammonium dobesilate transmembrane gradient was obtained by dialysis method. The concentration of extraliposomal ammonium dobesilate was determined by ion-pair-HPLC method. The DOX solution was incubated with blank liposomes having transmembrane gradient at 50 °C for 20 minutes. **Results:** The average particle size of the liposomes was 106.4 nm. The entrapment efficiency of DOX liposomes determined by ultraviolet spectrophotometry was 28.54%. **Conclusion:** Ammonium dobesilate transmembrane gradient can be used to load DOX into liposomes. **Key words:** pharmaceuticals; liposome; doxorubicin hydrochloride; ammonium dobesilate; transmembrane gradient

(责任编辑 曹 霞)