

氨甲喋呤(MTX)脂质体的制备及其稳定性*

李 炉 杞** 翁 帼 英

(南京药物研究所)

提要 本文探讨了提高 MTX 脂质体包裹率、影响它对热稳定性的因素,并自行设计了简便、迅速、重现性好的测定 MTX 脂质体的方法。结果表明:采用二次乳化蒸发法制备 MTX 脂质体,在控制乳化温度及有机相比比例条件下,可获得 50% 左右较高的包裹率。另外提示,脂质体分散溶媒的离子强度和脂质体中胆固醇的含量是影响 MTX 脂质体对热稳定性的重要因素。以选用 50 mM 的磷酸盐缓冲液为分散溶媒和 PC/CHOL/SA 的脂质体组成,则 100°C 加热 30 分钟灭菌,所包 MTX 可滞留 90%。且灭菌前后的脂质体经电镜观察形态无明显变化。

关键词 脂质体;氨甲喋呤;脂质体稳定性

本文所用的缩写词 PC (卵磷脂); CHOL (胆固醇); PA (磷脂酸); SA (十八胺); PBS (磷酸盐缓冲液)

近年来脂质体作为药物载体的研究,进展较快,从脂质体的作用机制、代谢动力学、提高抗癌药物的选择性和疗效等方面进行了大量研究^(1~3),提示脂质体提高抗癌药物对靶的选择性有很大潜力,因此脂质体作为新型给药系统(drug delivery system)的研究引人注目。但其本身的稳定性及水溶性药物的包裹率低等问题,是未能广泛应用于医疗实践的重要原因之一。本文从药剂学方面对抗癌药物 MTX 脂质体的制备、稳定性、包裹率、灭菌等进行了探讨。

MTX 为常用有效抗癌药物之一,是一种抗代谢药物,系细胞周期特异性;但半衰期短、血浆蛋白结合率高,不能充分发挥其药效;临床除了毒付作用外亦产生抗药性。如将 MTX 制成脂质体,可提高药物对靶的选择性,降低毒付作用。国外虽对 MTX 脂质体进行了一些研究^(1~3),但均未从药剂学领域探讨。

材 料 与 仪 器

蛋黄卵磷脂(自提);胆固醇(分析纯);十八碳磷脂酸和十八胺(本所合成);注射用氨甲喋呤(上海十二制药厂 100 mg/瓶);葡聚糖凝胶 G-50 Pharmacia。

高速组织捣碎机(江苏);751-G 分光光度计(上海);UV-200 紫外分光光度计(日本)。

方 法 与 结 果

(一) MTX 脂质体的制备

1. 二次乳化蒸发法⁽⁴⁾ 称取一定比例的卵磷脂,胆固醇和十八碳磷脂酸或十八胺,共溶

本文于 1982 年 2 月 10 日收到。

* 徐宁宁、陈庆才同志参加实验工作;原料合成由本所合成室、试验车间承担。

** 系研究生。

于氯仿-异丙醚中(有机相),加 MTX 的磷酸盐缓冲液(第一水相),得到 W/O 的第一乳浊液。然后第一乳浊液与较大体积的磷酸盐缓冲液(第二水相)混合后再行乳化,得到 W/O/W 的第二乳浊液,分散相为第一乳浊液的微粒,连续相为第二水相;在减压下通氮于第二乳浊液中,与此同时,溶剂蒸发而除去,即形成脂质体混悬液。测定包裹率,结果见表 1。脂质体混悬液经减压蒸发浓缩至一定体积,再经透析除去游离 MTX,测定浓度后稀释至所需浓度。

表 1-a 温度和有机溶剂组成对 MTX 阴电荷脂质体(PC/CHOL/PA, 7:2:1)包裹率的影响

溶 剂 组 成	10 ml 氯仿 + 80 ml 异丙醚				30 ml 氯仿 + 60 ml 异丙醚	
	<15	15~23	>23	>23 T* <15	>23 T* <15	>23 T* >15
室 温 (°C)	<15	15~23	>23	>23 T* <15	>23 T* <15	>23 T* >15
包 裹 率 (%)	16.5±2.5 (n=4)	45.9±1.7 (n=3)	20.2±3.8 (n=3)	22.9±6.0 (n=4)	47.6±4.7 (n=6)	31.5±0.7 (n=2)

* 第二水相温度

表 1-b 温度和有机溶剂组成对 MTX 阳电荷脂质体(PC/CHOL/SA, 7:2:1)包裹率的作用

溶 剂 组 成	10 ml 氯仿 + 80 ml 异丙醚		20 ml 氯仿 + 70 ml 异丙醚
	15~25	>25	>25
室 温 (°C)	15~25	>25	>25
包 裹 率 (%)	52.3±7.2 (n=5)	31.2±6.3 (n=3)	56.5±1.6 (n=3)

2. 干膜法 称取一定克分子比的 PC/CHOL/SA(7:2:1)溶于氯仿,在旋转蒸发器中制成薄膜,加含 MTX 的磷酸盐缓冲液振摇,再进行高速搅拌,即得脂质体混悬液,包裹率 20%。

(二) MTX 脂质体的含量测定

1. 本法用纸层析测定脂质体中 MTX 的浓度 $C_{总}$, 而将脂质体通过 Sephadex G-50 柱过滤后分离出游离的 MTX 按上海市药品标准所载方法⁽⁵⁾(上海法)测定游离 MTX 浓度 $C_{游}$, 计算包裹率。精确吸取一定体积的脂质体混悬液,点样于层析纸(10×4.5 cm)以氯仿-甲醇(9:2 V/V)系统展开,剪下 MTX 区域带,加 0.1N 氢氧化钠溶液 5 ml,捣碎成纸浆,过滤,精确吸取 2 ml,用 0.18N 盐酸溶液 5 ml 稀释后,参照“上海市药品标准”所载的 MTX 测定方法测定,以 0.1N 盐酸溶液作空白对照,计算求得 $C_{总}$ 。再精确吸取 1.0 ml MTX 脂质体,用 Sephadex G-50 层析柱(0.7×20 cm)分离 MTX 脂质体与游离的 MTX。分别收集 MTX 脂质体滤分和游离 MTX 滤分。将游离 MTX 滤分仍按上述方法测定,可得 $C_{游}$ 。按下式求得 MTX 包裹率:

$$\text{包裹}\% = \left(1 - \frac{C_{游}}{C_{总}}\right) \times 100\%$$

曾按下述方法验证本法的重现性。

2. 测定不同包裹率的 MTX 脂质体,并将凝胶过滤所得的脂质体滤分同样用纸层析法测定,计算回收率,结果见表 2。

3. 取不同浓度的 MTX 溶液,以纸层析法测定浓度(点样时加或不加与 MTX 脂质体的

表 2 不同包裹率的MTX脂质体的测定

样 品	纸 层 析 法		上 海 法	回收率 $\left(\frac{C'+C''}{C}\right)$ (%)	包裹率 $\left(1-\frac{C''}{C}\right)$ (%)
	总MTX C (mg/ml)	包裹的MTX C' (mg/ml)	游离MTX C'' (mg/ml)		
1	1.80	0.228	1.57	99.9	12.8
2	1.54	0.394	1.18	102.2	23.4
3	1.53	0.549	0.944	97.6	38.3
4	1.53	0.233	1.28	98.9	16.3
5	1.45	0.213	1.25	100.9	13.8
6	1.41	0.386	1.05	101.8	25.5
7	2.27	1.16	1.13	100.9	50.2
8	1.44	0.521	0.970	103.5	32.6
9	1.00	0.375	0.604	97.9	39.6
10	1.33	0.708	0.608	98.9	54.3
11	1.37	0.720	0.670	101.4	51.1
12	2.60	0.594	1.95	97.8	25.0
				100.1±1.9*	

* 平均值±平均偏差

表 3 用两种方法测定MTX溶液

样 品	上 海 法 C (mg/ml)	纸 层 析 法			
		点样 0.025 ml MTX 液		点样 0.025 ml MTX 液, 0.10 ml 空白脂质体	
		C' (mg/ml)	$\frac{C'}{C}$ (%)	C'' (mg/ml)	$\frac{C''}{C}$ (%)
1	6.21	6.14	98.9	6.19	99.7
2	4.63	4.55	98.3	4.56	98.5
3	3.32	3.36	101.2	3.29	99.1
4	6.56	6.64	101.2	6.35	97.0
5	4.80	4.73	98.5	4.69	97.7
6	3.24	3.18	98.1	3.15	97.2
7	4.79	4.67	97.5	4.66	97.3
8	6.60	6.46	97.9	6.48	98.2
9	3.42	3.34	97.7	3.33	97.4
10	5.26	5.13	97.5	5.13	97.5
				98.7±1.4*	98.0±0.9*

* 平均值±平均偏差

脂质浓度相当的空白脂质体)。同上海法测定的浓度比较, 计算回收率, 结果见表 3。

(三) MTX 脂质体对加热和贮存的稳定性试验

将 MTX 脂质体充氮灌封于安瓿中以 100°C 30 分钟灭菌, 观察灭菌前后及贮存一定时间后脂质体原料 PC 的紫外光谱及氧化指数变化⁽⁶⁾, 脂质体的形态以及脂质体中 MTX 的包裹率变化。

1. 取 100°C 30 分钟灭菌前后的 MTX 脂质体、空白脂质体, 分别用无水乙醇溶解, 使 PC 的浓度为 0.53 mg/ml (空白脂质体) 和 0.27 mg/ml (MTX 脂质体), 用 UV-200 分光光度计作紫外吸收光谱, 结果见图 1。从紫外吸收光谱来看, 灭菌前后没有明显的改变。

2. 取不同的 MTX 脂质体与 20% 磷钨酸以 1:10 的体积混合, 然后把铜网浸入混合液数

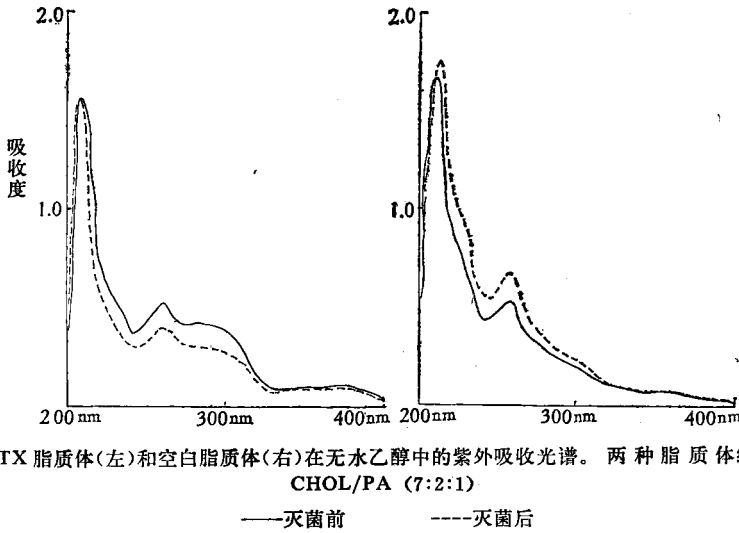


图 1 MTX 脂质体(左)和空白脂质体(右)在无乙醇中的紫外吸收光谱。两种脂质体组成均是 PC/CHOL/PA (7:2:1)

——灭菌前 ----灭菌后

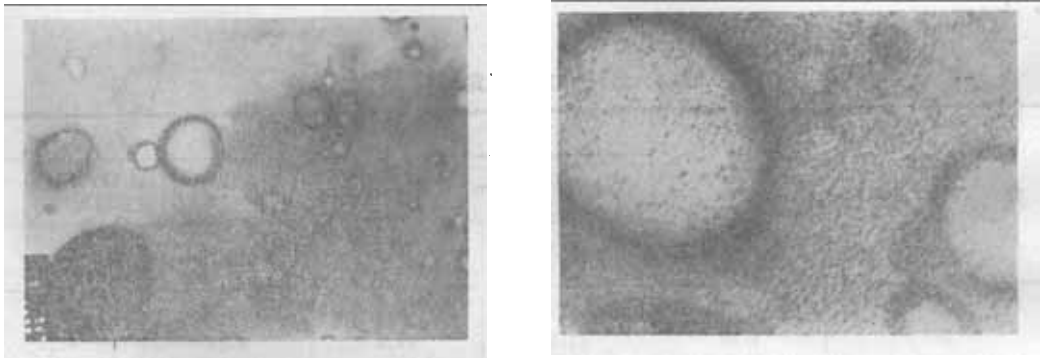
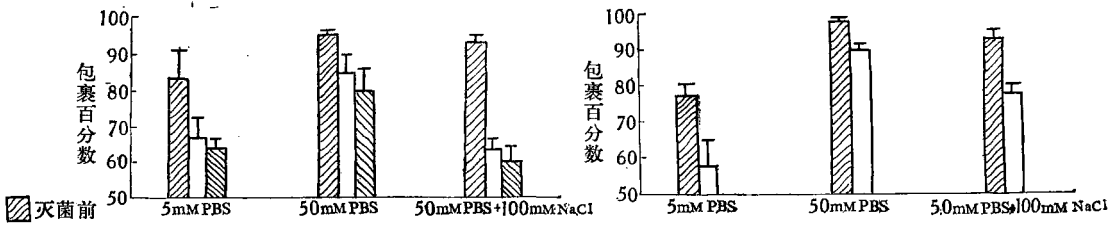


图 2 MTX 脂质体 (PC/CHOL/STEAM,7:2:1) 在灭菌前后的电子显微镜照片

左: (×83,500) 灭菌前的 MTX 脂质体负染照片
右: (×780,000) 灭菌后的 MTX 脂质体负染照片

秒钟后取出用“Philips”EM-400 电子显微镜观察(图 2)，灭菌前后的 MTX 脂质体没有明显的形态改变。

3. 取含不同离子强度 PBS (5 mM、50 mM、50 mM+100 mM NaCl) 的 MTX 脂质体过滤，测定浓度后，稀释至所需浓度，在充氮下灌封于安瓿中，在 100°C 30 分钟灭菌，测定灭菌前后及灭菌后 75 天的包裹率。结果(图 3)表明：加热引起 MTX 脂质体内封装药物的渗漏，但 3 种不同离子强度溶媒的 MTX 脂质体(阳、阴电荷)以 50 mM PBS 的渗漏最少，且在一定贮存期间能保持 MTX 脂质体的稳定。



a. MTX 阴电荷脂质体 (PC/CHOL/PA 7:2:1) b. MTX 阳电荷脂质体(PC/CHOL/SA 7:2:1)

图 3 不同离子强度的 MTX 脂质体在灭菌前后和灭菌后 75 天的包裹百分数

4. 取不同量胆固醇的 MTX 脂质体(PC/CHOL/SA: 7:0:1; 7:1:1; 7:2:1; 7:3.5:1; 7:5:1)过滤, 透析后测定浓度, 稀释至所需浓度, 在充 N_2 下灌封于安瓿中, 在 $100^\circ C$ 下灭菌 30 分钟, 测定灭菌前后的包裹率, 结果(图 4)表明: 五种比例的 MTX 脂质体以 PC/CHOL/SA=7:2:1 在加热灭菌后渗漏最少。

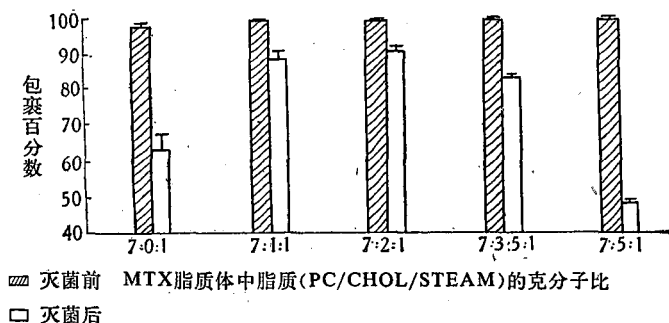


图 4 含不同胆固醇含量的 MTX 脂质体在灭菌前后的包裹百分数

5. 取 MTX 脂质体(PC/CHOL/SA=7:2:1, 50 mM PBS 为溶媒, 充 N_2 灌封后, $100^\circ C$ 30 分钟灭菌, 测定灭菌前后及间隔一定时间的包裹率。结果图 5 表明: 灭菌造成较大幅度的包裹率下降(约 10%), 但在 40 天的贮存期中基本保持稳定的状态。

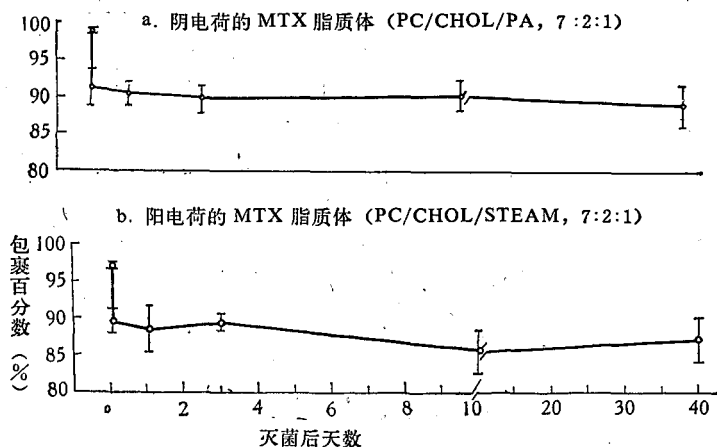


图 5 灭菌后贮存中的 MTX 脂质体 (50 mM PBS 作溶媒) 的包裹百分数变化

讨 论

(一) 从表 1 可以看出, 用二次乳化蒸发法控制适当的条件可以制得约 50% 的较高包裹率。这些条件除卵磷脂的质量⁽⁷⁾外, 有机相中溶剂的组成比例和乳化时温度都是很重要的因素。

本法与较常使用的干膜法进行了比较, 可看出二次乳化蒸发法的 MTX 包裹率明显地高于干膜法。由于二次乳化蒸发法中所要包封的药液与脂质体所分散的溶媒是始终被隔离开的。据报道, 通常的方法制备 MTX 脂质体, 其包裹率在 1~18%⁽³⁾, 低包裹率的原因主要是所要包的药液又是所成脂质体的分散液, 而所包封的药液对于总液体的比例均在 1~10% 的范围⁽⁴⁾。

(二) 本文所建立的 MTX 测定法, 是以 MTX 的较高极性(辛醇/水分配系数 0.001)为基础的。本法简便迅速可靠。12 份不同包裹率的 MTX 脂质体的连续测定结果表明, MTX 回收率达到 $100.1\% \pm 1.9\%$ 。从表 3 可以看出, 用本文所用的纸层析法测定 MTX 溶液的结果与上海法测定结果相比, 回收率达到 98.7% 和 98.0%(与空白脂质体一同点样)。说明本文所用的方法是可靠的。

(三) 关于 MTX 脂质体对加热灭菌和贮存的稳定性。从图 4 看出, 其紫外吸收和磷脂氧化程度(主要是在 233 nm 处的吸收值)在加热前后没有明显变化。从图 2 的电镜照片亦看出, MTX 脂质体在灭菌前后未发现形态改变, 其颗粒均在 10 nm~30 nm 之间的单层脂质体。但从图 3、4 可看出, 加热造成了一定量的 MTX 从脂质体内向外渗漏。关于加热促使 MTX 从脂质体内向外渗漏, 可能是在加热时, 脂质体膜变得疏松而造成, 这与脂质体的相变温度有一定关系。适当增加脂质原料中胆固醇的比例, 可以增加脂质双分子膜中脂质分子排列的紧密程度⁽⁸⁾, 可能有助于减弱加热时脂质分子烃基的弯曲结构增加, 从而减少药物的渗漏。但是应该注意到胆固醇量增加较多可能增加脂质双分子膜的区块结构, 也就是膜的不对称性增加了, 在加热的条件下, 不对称性可能更易导致膜的疏松而使药物渗漏(图 4)。

图 3 表明, 所试的三种离子强度溶媒, 以 50 mM PBS 作为溶媒的 MTX 脂质体在灭菌后 MTX 渗漏最少, 保留约 90%, 其中阴电荷的 MTX 脂质体在 75 天尚存 80% 的包裹率。提示, 选用 50 mM PBS 作为 MTX 脂质体分散介质, PC/CHOL/SA 克分子比为 7:2:1 的组成, 可以减少脂质体对热的敏感性。我们认为加热灭菌虽造成有 10% 以下的 MTX 渗漏, 但其操作比微孔滤膜过滤除菌要简便可靠, 故考虑作为脂质体制剂的灭菌方法是可行的。

参 考 文 献

1. Rahman Y E, et al: Liposomes containing ³H-actinomycin D. Differential tissue distribution by varying the mode of drug incorporation. *Eur J Cancer* 11:883,1975
2. Kinelberg H K, et al: The effect of entrapment in liposomes on the *in vivo* distribution of ³H-MTX in a primate. *Cancer Res* 36:2949,1976
3. Kosioski M J, et al: Effect of lipid vesicle(liposome) encapsulation of MTX on its chemotherapeutic efficacy in solid tumors. *Ibid* 38:2848,1978
4. Schneidner M: Verfahren zur Herstellung von Liposomen in wasseriger Losung. *Offenlegungsschrift* 2,834,307,1979
5. 上海市卫生局: 上海市药品标准, 第 105 页, 上海人民出版社, 1974
6. Klein R A: The detection of oxidation in liposome preparation. *Biochim Biophys Acta* 210:486,1970
7. 李广杞等: 卵磷脂脂质量对甲氨喋呤(MTX)脂质体包裹率的影响. *药学报* 17:218,1982
8. Gregoridis G, et al: Stability of liposomes *in vivo* and *in vitro* is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. *Biochim Biophys Res Commun* 89:1278,1979
9. Freise J, et al: Encapsulating of drugs in liposomes. A new therapeutic principle in cancer chemotherapy. *Eur J Cancer Suppl* 1:183,1977

PREPARATION OF METHOTREXATE (MTX)-LIPOSOMES AND THEIR STABILITY

LI Kuang-qi and WENG Guo-ying

(Nanjing Institute of Materia Medica)

ABSTRACT

In this paper, factors affecting the encapsulation ratio of MTX with lipo-

somes and their stability to heating were studied. A fast and reproducible method for determining MTX-liposomes is established. The results suggest that with double emulsification evaporation method, MTX-liposomes with a 50% higher encapsulation ratio can be obtained by controlling the temperature during emulsification and the ratio of the organic solvents. The ionic strength of liposome suspension and cholesterol content in liposomes are important factors affecting MTX-liposome stability to heat.

Selecting 50 mM phosphate buffer solution as the solvent of MTX-liposomes and the lipid composition of 7 PC/2 CHOL/1 SA (with molar ratios preceding), 90% of entrapped MTX was retained after sterilization at 100°C for 30 min.

Key words Liposomes; Methotrexate; Liposome stability; Liposome determination