

## · 论 著 ·

## 5 - 氟尿嘧啶脂质体的制备与评价\*

陈 琼, 孙维彤, 张杜鹃, 贾乐姣, 张 娜

**【摘要】** 目的 改进5 - 氟尿嘧啶(5 - Fu)脂质体的处方和制备工艺,提高脂质体的包封率及稳定性。方法 采用逆相蒸发法制备5 - 氟尿嘧啶脂质体,优化脂质体处方;考察脂质体的形态、粒径、粒径分布、包封率、Zeta 电位、体外释药等特性以及脂质体的稳定性,对脂质体进行质量评价。结果 所制得的脂质体外观较好,粒径均匀;空白脂质体平均粒径460.5nm,多分散性指数0.862,Zeta 电位 - 4.43mV;5 - 氟尿嘧啶脂质体平均粒径221.3nm,多分散性指数0.644,Zeta 电位 - 7.44mV;5 - 氟尿嘧啶脂质体包封率达到40.5%,体外释药起到缓慢释药的作用,且稳定性良好。结论 脂质体达到设计要求。

**【关键词】** 5 - 氟尿嘧啶;脂质体;包封率

**【中图分类号】** R943

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1680 - 077X(2006)09 - 0976 - 03

## Preparation and evaluation of 5 - Fu liposomes

CHEN Qiong, SUN Wei - tong, ZHANG Du - juan, et al .Department of Pharmaceutics , Shandong University , Jinan 250012, China

**【Abstract】** **Objective** To optimize the formulation and technology of 5 - Fu liposomes, evaluate and improve the encapsulation efficiency and stability of 5 - Fu liposomes **Methods** The liposomes were prepared by reverse - phase evaporation technique . On the base of the single factor investigation, preparation conditions of 5 - Fu liposomes were optimized . The Zeta potentials and the polydispersity were evaluated, the stabilities and the release characteristics in vitro were investigated **Results** The liposomes were spherical vesicles with uniform sizes .The mean diameter of the blank liposomes and the 5 - Fu liposomes were 460.5nm and 220.1nm, respectively . The polydispersity index were 0.862 and 0.644, respectively . The Zeta potential were - 4.43mV and - 7.44mV, respectively . The entrapment efficiency of 5 - Fu liposomes were 40.5% . The stable liposomes have sustained - release effects in vitro **Conclusion**

The liposomes are consistent with the design supposition .

**【Key words】** 5 - Fu; liposomes; encapsulation efficiency

长期以来,癌症始终严重威胁着人类的生命。据世界卫生组织统计,全世界每年死于癌症的患者约500万,因此癌症的预防与治疗任务十分艰巨。抗癌新药物及新剂型的研究开发具有重大的社会效益和经济效益。

5 - 氟尿嘧啶(5 - Fu)是一种常用的抗癌药物<sup>[1,2]</sup>,主要用于治疗各种恶性肿瘤及恶性淋巴瘤转移的患者,疗效确切。但5 - Fu的吸收不稳定<sup>[3]</sup>,一般均静脉给药。由于静脉注入后血中半衰期仅为7.5~10min,消除极快,需静脉持续给药;并且由于5 - Fu对机体正常组织和病理部位无选择性,有严重的骨髓抑制和胃肠道反应的毒副作用,这使临床应用受到影响。脂质体作为新型靶向给药载体系统<sup>[4]</sup>,可以提高选择性,优化药物体内分布,从而提高治疗指数,降低药物毒性。为此,将5 - Fu制成脂质体制剂。对制备工艺和条件进行了研究,并考察脂质体的形态、粒径、粒径分布、包封率、Zeta 电位、体外释药等特性以及脂质体的稳定性。

## 1 仪器与试药

1.1 仪器 旋转蒸发器 RE52 - 98(上海亚荣生化仪器厂);SHB - 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);CX - 250 超声波清洗器(北京医疗设备二厂);LC -

10AT VP - ODS 高效液相色谱仪(日本岛津);SPD - 10A VP 紫外检测器(日本岛津);80 - 2型离心沉淀机(国华仪器有限公司);高压匀质机(意大利 Niro - Soaro 型号 NS1001L);ZETASIZER3000 粒度分布与电势分析仪(Zetasizer3500 HS,英国 Malvern 公司);ER - 182A 型电子天平(日本);JY - 92 - 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);UNICO™ UV - 2102PCS 型紫外可见分光光度计。

1.2 试药 5 - 氟尿嘧啶(山东大学药物化学研究所);卵磷脂(上海太伟药业),胆固醇(上海化学试剂站分装厂,批号950517);无水乙醚(天津市广成试剂有限公司,批号20011222);鱼精蛋白(Sigma 公司 P4380);SephadexG - 50(Sigma 公司上海试剂厂分装);甲醇、乙腈为色谱纯;氢氧化钠、磷酸二氢钾等均为市售分析纯试剂。

## 2 方法与结果

## 2.1 脂质体的制备

2.1.1 5 - Fu 制备工艺优化 以包封率为指标,考察药脂比、卵磷脂与胆固醇的比例、制备方法(薄膜蒸发法或逆向蒸发法)、有机溶剂(氯仿或乙醚)等因素,从而确定5 - Fu 脂质体的制备工艺和处方。实验结果分析表明,最佳制备工艺条件为逆向蒸发法,采用氯仿和乙醚混合溶液为有机溶剂。

2.1.2 脂质体的制备<sup>[5]</sup> 按单因素结果摸索最佳工艺条件及处方为:逆相蒸发法制备脂质体,取卵磷脂235mg和胆固醇25mg于圆底烧瓶中,加入有机溶剂(氯仿8ml和乙醚

\* 基金项目:山东大学药学院学生创新基金资助

作者单位:250012 山东济南,山东大学药学院药剂教研室(通讯作者)

4ml)使完全溶解后,加入 5 - Fu 磷酸盐缓冲液(2.5mg/ml) 4ml,超声 10min,在旋转蒸发仪上除去有机相(控制水浴温度在 35~37℃),探针超声 30s(功率 80~100w),220nm 滤膜过滤,得 5 - Fu 脂质体。

2.1.3 空白脂质体制备 用 4ml 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)代替 5 - Fu 磷酸盐缓冲液,其他方法同“2.1.2”。

2.2 脂质体包封率的测定

2.2.1 紫外光谱扫描 将药物、空白辅料(相当于脂质体处方比例的卵磷脂和胆固醇)分别用甲醇 - 蒸馏水(5:95, V/V)混合液溶解稀释后,于 200~400nm 扫描,药物在 267nm 处有最大吸收,且空白辅料在该波长附近无吸收。

2.2.2 色谱条件 色谱柱:phenomenex C-18 柱(4.6mm × 250mm, 5μm);流动相:甲醇 - 蒸馏水(5:95, V/V);柱温:25℃;流速:1.0 ml/min;检测波长:267nm;进样量:20μl。

2.2.3 标准曲线制备及精密度试验 精密称取 5 - Fu 原料适量,用蒸馏水配制浓度分别为 20.0、50.0、80.0、140.0、170.0 和 200.0μg/ml 的一系列标准溶液,以蒸馏水为空白于 267nm 处,进样液相色谱仪测定峰面积,以峰面积对浓度作图,得线性回归方程。将高、中、低 3 个浓度的标准溶液分别于 1 天内测定 5 次,求得日内精密度;每天测定 1 次,共测定 5 天,求得日间精密度。

结果得标准曲线方程为  $A = 45292.96C - 119773.9$ ,在

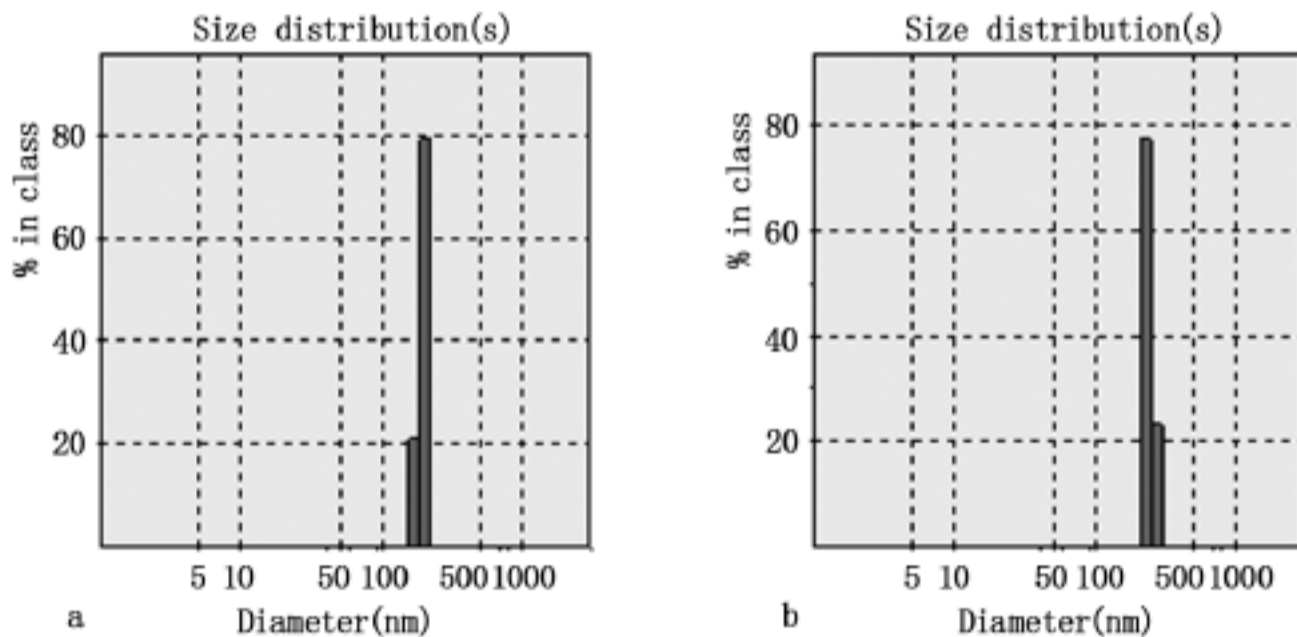
20.0~200.0μg/ml 浓度范围内线性关系良好( $r = 0.9995$ );精密度试验结果显示,3 个浓度日内 RSD < 0.98%,日间 RSD < 1.42%。

2.2.4 脂质体包封率测定<sup>[6]</sup> 精密吸取 0.1ml 5 - Fu 脂质体于 10ml 锥形离心管中,添加 0.2ml 鱼精蛋白溶液(10mg/ml),搅匀。静置 3min,加入 3ml 生理盐水,4000 r/min 离心 50min。吸取 0.5ml 上清液于 5ml 生理盐水中;同时精密吸取 0.1ml 5 - Fu 脂质体于 10ml 锥形离心管中,用甲醇破乳至 2ml。用 HPLC 测定药物浓度,按公式  $EE\% = (W_{总} - W_{游}) / W_{总} \times 100\%$  计算包封率。

\* EE: Entrapment efficiency, 计算得药物平均包封率为 40.5%。

3 脂质体的质量评价

3.1 粒度分布与电势分析 取空白脂质体及 5 - Fu 脂质体适量,分别用 PBS(pH7.4)稀释 10 倍后,ZETASIZER3000 激光粒度分布与电势分析仪测定,动态光散射软件数据处理,记录平均粒径、Zeta 电位及多分散性指数。ZETASIZER3000 激光粒度分析仪测定结果表明,实验制备的空白脂质体平均粒径 460.5nm,多分散性指数 0.862, Zeta 电位 -4.43mV(pH=7.5)。5 - Fu 脂质体平均粒径 221.3nm,多分散性指数 0.644, Zeta 电位 -7.44mV(pH=7.5)。粒度分布图见图 1。



a 5 - Fu 脂质体粒度分布图 b 空白脂质体粒度分布图

图 1 粒度分布图

3.2 初步稳定性考察 以脂质体的包封率为主要指标,考察 5 - 氟尿嘧啶脂质体的稳定性。同批样品置于 4℃ 冰箱中保存,放置 1 天、7 天、15 天和 30 天,测定脂质体的平均包封率。结果见表 1。

表 1 不同贮存条件对脂质体包封率的影响

Time(day)	0	1	7	15	30
EE (%)	41.2	41.0	40.3	38.9	38.5

初步稳定性研究结果表明,5 - 氟尿嘧啶脂质体,4℃ 保存 30 天内包封率未见显著变化,稳定性良好。

4 5 - Fu 脂质体体外释药动力学

采用动态膜透析法进行脂质体体外释药试验,以 5 - Fu 磷酸缓冲液(100μg/ml)为对照。精密吸取 5 - Fu 脂质体 1ml,装入经蒸馏水浸泡处理过的透析袋内,将袋口扎紧。

固定于转篮中,置于 150 ml pH 7.4 磷酸盐缓冲液中,按《中国药典》2005 年版二部附录“小杯法”项下测定<sup>[7]</sup>。温度控制在  $37 \pm 1$ ℃,转速为 100 r/min,定时吸取 5ml 透析液,并及时补充等量恒温的磷酸缓冲液(pH7.4)。用高效液相色谱法测定其药物释放量,同时将 0.1ml 的 5 - Fu 脂质体用甲醇破乳后测定脂质体中的 5 - Fu 含量作为总药量 W,根据下式计算累积释放量和累积释放百分率。

$$Q_n = C_n V_0 + \sum_{i=0}^{n-1} C_i V_i \quad \text{累积释放百分率}(\%) = Q_n / W \times 100\%$$

其中:  $Q_n$  为各时间点的累积释放量,  $C_n$  为各时间点的实测药物浓度,  $V_0$  为溶出介质的总体积,  $V_i$  为每次取样体积,  $C_i$  为 i 时刻各取样点的实测药物浓度, W 为脂质体中的总药量。

时间 - 累积释放曲线见图 2。

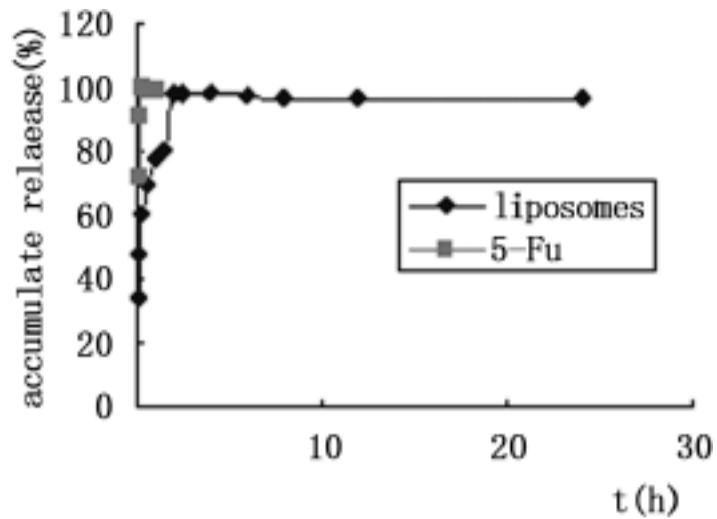


图2 5 - Fu 脂质体的体外释放曲线

表明,5 - Fu 原料药释药较快,1.0h 药物已基本全部释放,累积释药百分率为 99.46%;而 5 - Fu 脂质体 2.5h 时达最大为 98.6%,基本释放完全。

## 5 讨论

(1)工艺筛选过程中考虑到 5 - Fu 为水溶性的药物,故采用逆相蒸发的方法制备脂质体。根据文献和预实验结果,以包封率为指标,经单因素考察选择 5 - Fu 脂质体处方组成中卵磷脂与胆固醇的质量比为 9.5:1,水相与有机相的比例为 1:3 时,制备的脂质体外观形态规则,粒径分布窄,且稳定性也较好。

(2)药脂比对脂质体的外观和包封率影响也较大,比例过大药物容易析出,不能制成 5 - Fu 脂质体,且包封率不高;比例过小制得的脂质体外观不均匀,颗粒卵磷脂与胆固醇的比例对包封率的影响是:随磷脂比例增加,5 - Fu 脂质体包封率增加,当磷脂与胆固醇的比例为 9.5:1 时,包封率最高。

(3)体外释放结果表明,5 - Fu 脂质体释药缓慢,与游离药物相比,延长药物的释放时间。这是因为脂质体内相

的药物要跨越脂质双层才能进入释放介质,脂质体对内相药物的释放起到了缓释作用<sup>[8]</sup>。

(4)常规测定脂质体包封率的方法其测定机制是基于分子大小或密度差异进行的,一般较难将脂质体与药物晶体和(或)脂质体碎片分离,且对于难溶性游离药物存在回收率低的缺点,影响包封率测定。试验采用鱼精蛋白凝聚法测定脂质体的包封率。所用鱼精蛋白是 Sigma 生产的鲑精蛋白(salmine),约含 2/3 以上的精氨酸。精氨酸是一种含有胍基的碱性氨基酸,带正电,正是由于这些带有正电荷的胍基的大量存在,多聚阳离子肽 - 鱼精蛋白会与带负电或中性的磷脂产生絮凝作用,使得脂质体和游离药物得以分离,所以它是一种具有快速、用量少、针对脂质体或纳米粒电荷性质的凝聚离心法。

## 【参考文献】

- 1 Diasio RB, Harris B. Clinical pharmacology of 5 - fluorouracil. *Clinical Pharmacokinetics*, 1989, 16: 215 - 237.
- 2 Lu Z - H, Zhang R, Diasio RB. Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver. *J Biol Chem*, 1992, 267: 17102 - 17109.
- 3 Lamont EB, Schilsky RL. The oral fluoropyrimidines in cancer chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(9): 2289 - 2296.
- 4 Hofheinz, Ralf - Dieter, Gnad - Vogt, et al. Liposomal encapsulated anti - cancer drugs. *Anti Cancer Drugs*, 2005, 16(7): 691 - 707.
- 5 陆彬. 药物新剂型与新技术, 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 116 - 117.
- 6 平其能. 现代药剂学. 北京: 中国医药科技出版社, 1998, 608.
- 7 王健松, 朱家壁, 吕瑞勤, 等. 肺靶向阿奇霉素脂质体的制备及其在小鼠体内的分布. *药学学报*, 2005, 40(3): 274 - 278.
- 8 张青, 朱家壁, 邱丽梅. 盐酸左氧氟沙星脂质体的包封率和体外释放研究. *中国药科大学学报*, 2004, 35(6): 508 - 512.

(编辑:汪 洋)

(上接第 975 页)

## 3 结果

如果采取强有力的降温措施,及早积极处理各种并发症,大多数患者均能治愈。但是近年来重症中暑已不多见,只要及早识别,及时抢救,绝大多数患者均能转危为安。本组 11 例,病员经抢救苏醒后至住院治疗,平均 15 天治愈出院,未出现并发症和后遗症。故总结分析报告,以便临床参考,提高重症中暑的治愈率,降低患者的死亡率。

## 4 讨论

重症中暑病死率很高,据报道可高达 10% ~ 50%<sup>[2]</sup>,且与过高热、昏迷的程度以及维持的时间有关。体温 > 40 病死率达 41.7%, < 40 病死率 12.8%。究其原因:(1)由于在高温环境中从事体力劳动,产热过多,以致热蓄积过量而体温急剧上升达 40 以上;(2)在烈日暴晒或热辐射作用下,强烈的日光和红外线穿透头皮和颅骨引起脑细胞损害,脑组织充血水肿,此时颅内温度高达 40 以上。

本组 11 例中 85% 的病员是在白天平均气温超过 38.

9 下训练发生重症中暑。因此,做好预防中暑的宣传是关键。应积极向战士宣传防暑知识,加强个人防护,夏季居处要通风,适当饮用防暑饮料,如绿豆汤、冰水。在烈日下工作或行走,应戴作训帽,穿宽松、透气、浅色的衣服。高温期间应合理安排劳动及休息时间,延长午休时间。一方面应避免高温时期,调整受训时间,战士训练期间一旦出现恶心、头昏、头痛、语言困难或步伐不稳等中暑早期症状,应及时就医。另一方面努力提高抢救中暑的应急能力。在高温天气到来之前,及时发放防暑降温物品,充分准备好抢救器材、药品,做到抢救及时、准确,提高救治效率。高温作业原则上每天供水 4 ~ 5L,盐 10g 左右,饮食要增加维生素 C 的含量,定期体格检查。

## 【参考文献】

- 1 陈忠. 高温中暑的病理生理学研究进展. *国外医学·病理生理学与临床分册*, 1997, 17(4): 373 - 375.
- 2 Simon HB. Hyperthermia. *The New Eng J of Med*, 1993, 329(7): 483 - 487.

(编辑:齐 永)