

凝胶过滤层析法调节脂质体内外水相 pH 的探讨

刘 敏, 陆伟跃, 潘 俊, 谢 操
(复旦大学 药学院, 上海 201203)



摘 要: 通过对脂质体内外水相 pH 梯度的制备方法的探讨, 采用凝胶过滤层析技术将脂质体外水相的 pH4.0 柠檬酸缓冲液替换成 pH 7.2 磷酸盐缓冲液, 在脂质体内外水相形成 pH 梯度。在药脂比为 1:5、1:10、1:15 和 1:20(质量比) 时, 阿霉素在 pH 梯度的驱动下从脂质体外水相穿越脂质双分子膜进入内水相, 包封率分别达到 96.7%、98.7%、96.8% 和 95.1%, 其中药脂比 1:10 时包封率达到最高。药脂比 1:10 制备的阿霉素脂质体在 37 °C, 12 h 内阿霉素泄露均低于 1.0%; 48 h 内药物泄露率低于 5.0%。通过该实验, 使学生们能够观测到如何采用凝胶过滤层析技术调节 pH 梯度, 以及 pH 梯度在阿霉素脂质体主动载药过程中的重要性, 为脂质体递释系统的课堂理论教学奠定了良好的实验基础。

关键词: 凝胶过滤层析; 脂质体; pH 梯度

中图分类号: R 94

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 7167(2017)06 - 0018 - 03

Study on Adjusting pH Gradient Between the Internal and External Water Phase of Liposome Using Gel Filtration Chromatography

LIU Min, LU Weiyue, PAN Jun, XIE Cao

(School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

Abstract: pH gradient method is commonly adopted for loading drug into liposome. Depending on pH gradient, drug in the external water phase of liposome could enter into the internal phase. The citric acid buffer (pH4.0) in external water phase of liposome was changed into phosphate buffer (pH7.2) by gel filtration chromatography technology. The pH gradient had found between the internal and external water phase of liposome. Doxorubicin (DOX) could enter through the lipid membrane into the internal phase driving by pH gradient. When the ratio of drug with lipid were 1:5, 1:10, 1:15, and 1:20 (w/w), the encapsulation rates were 96.7%, 98.7%, 96.8% and 98.7%, respectively. Among the above liposome, the encapsulation rate of the liposome with 1:10 (drug: lipid) was the highest. The drug leakage rate of DOX liposome was less than 1.0% and 5.0% within 12 h or 48 h at 37 °C. Through the experiment, the students could realize how to adjust pH gradient using gel filtration chromatography technology, as well as the pH gradient was very important for loading DOX into liposome. It would be built good basis for students studying the liposome delivery system.

Key words: gel filtration chromatography technology; liposome; pH gradient

0 引 言

阿霉素是一种蒽环类抗生素, 主要用于急性白血病、恶性淋巴瘤和乳腺癌等多种肿瘤的临床治疗。但因其心脏毒性、骨髓抑制、消化道毒性、免疫抑制及致突变等毒副作用, 使其应用受到很大限制。自从 1965

收稿日期: 2016-10-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473148)

作者简介: 刘 敏(1969 -), 女, 天津人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事药物靶向递释系统研究。

Tel: 13661677680; E-mail: liumin@shmu.edu.cn

年 Bangham 发现脂质体后,1971 年 Gregoriadis 等首次报道将脂质体作为药物载体。研究发现,脂质体可作为蒽环类抗肿瘤药物的有效载体,其代表产品是阿霉素脂质体,可显著降低阿霉素的毒副作用^[1-3]。脂质体常用的载药方法可分为被动载药法和主动载药法^[4-11]。被动载药法适于亲脂性强的或亲水性强的药物,首先将药物溶于水相或有机相中,然后按适当的方法(成膜水化法、高压均质法、逆向蒸发法和乙醇注入法等)制备得到含药脂质体。主动载药法适用于两亲性药物,首先制备空白脂质体,脂质体内外水相形成 pH 梯度或离子梯度,再将药物加入脂质体外水相,在 pH 梯度或离子梯度的驱动下,两亲性药物自发地跨越脂质双分子层由脂质体的外水相渗透进入内水相。与被动载药法比较,主动载药法具有包封率高、载药量高,且稳定性好的特点。

由于吡喃糖苷上的氨基的存在,使得阿霉素在酸性条件下的溶解度远大于中性条件下的溶解度,制备内水相为酸性环境和外水相为中性环境的脂质体有利于阿霉素主动载药。其次,阿霉素是一种两亲性药物,在中性条件下阿霉素呈分子状态,具有一定的亲脂性,可在 pH 梯度驱动下穿透脂质体双分子层进入脂质体内部。再者,在酸性条件下阿霉素呈离子状态,具有一定的亲水性,导致阿霉素的脂质双分子膜渗透性减低,易于聚集在脂质体内水相。再者,阿霉素在酸性条件下具有较好的稳定性。鉴于阿霉素以上的特点,我们拟制备空白脂质体,使其外水相为 pH 7.2 磷酸盐缓冲液,内水相为 pH 4.0 柠檬酸溶液。在空白脂质体的外水相加入阿霉素,在一定温度下,阿霉素可在 pH 梯度的驱动下进入脂质体内水相,完成阿霉素脂质体的主动载药。

通常采用以下的方法在脂质体内外水相形成 pH 梯度:透析法、超滤离心法、凝胶过滤层析法和碱调节法^[12-15]。前 3 种方法视脂质体外水相的柠檬酸为小分子物质,脂质体为大分子物质,可根据两者分子大小的差异达到分离的目的。透析法,利用小分子溶质在可通过半透膜,而大分子溶质不能通过半透膜的性质,达到分离目的;超滤法是一种加压膜分离技术,即在一定的压力下,使小分子溶质和溶剂穿过一定孔径半透膜,大分子溶质不能透过,达到分离的目的。凝胶过滤层析法:又称分子排阻层析法,是利用具有网状结构的凝胶的分子筛作用,根据被分离物质的分子大小不同达到分离的目的。碱调节法,直接在脂质体的外水相加入碱溶液进行 pH 调节。比较以上 4 种方法,透析法耗时,超滤离心法的压力可能影响脂质体的稳定性,碱调节法中碱溶液的加入使得脂质体内外水相的渗透压不同,导致脂质体稳定性降低。与上述 3 种方法比较,凝胶过滤层析法具有操作简便快速,对脂质体

影响小。基于此,本文拟采用凝胶过滤层析法调节脂质体内外水相的 pH 梯度,主动载入阿霉素,考察不同阿霉素投料量的脂质体包封率,以及初步评价阿霉素脂质体的稳定性。

1 实验设计

1.1 阿霉素脂质体制备

分别精密称取氢化大豆磷脂、胆固醇和聚乙二醇 2000-磷脂酰乙醇胺(摩尔比为 1:1:0.04)溶于氯仿,减压旋转蒸发除去氯仿,得均匀脂质膜,真空干燥 24 h。加入一定体积的 0.2 mol/L pH 4.0 枸橼酸缓冲液,60 °C 水浴震荡 2 h,得脂质体混悬液。在 60 °C 恒温器上,使用微型挤出器依次将脂质体挤压过 400、200 和 100 nm 核孔膜,得空白脂质体。以 0.2 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液为洗脱剂,将空白脂质体洗脱通过 Sephadex G-50 葡聚糖凝胶柱(1 × 10 cm)交换外水相,流速 1 mL/min,收集脂质体混悬液,其脂质终浓度为 20 mmol/L。分别按照药脂比 1:5、1:10、1:15 和 1:20 (质量比)在上述脂质体混悬液加入阿霉素溶液,60 °C 水浴 20 min,期间涡旋 3 次。以 0.2 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液洗脱通过 Sephadex G-50 凝胶柱(1 × 10 cm),流速 1 mL/min,去除游离药物,收集阿霉素脂质体,激光散射粒度仪测定粒径及其分布。

1.2 包封率测定

精密称取阿霉素标准品适量,以酸性异丙醇溶液为溶剂配置成 1 ~ 50 mg/L 系列浓度的标准溶液,以酸性异丙醇为空白对照,分别测定阿霉素最大吸收波长处(480 nm)的吸光度值,绘制标准曲线。精密量取阿霉素脂质体 0.5 mL,加入酸性异丙醇溶液 2.0 mL,涡旋 1 min,测定 480 nm 处的吸光度值,根据标准曲线计算含量。按照以下公式计算包封率,

$$EE = C/C_0$$

式中: C_0 表示总投药量; C 表示脂质体中药物量。

1.3 稳定性考察

将阿霉素脂质体放置于 37 °C 恒温振荡器中,不同时间点各取 0.5 mL 阿霉素脂质体,首先采用激光散射粒度仪测定阿霉素脂质体的粒径大小及分布,再以 0.2 mol/L pH 7.2 磷酸盐缓冲液为洗脱剂通过 Sephadex G-50 凝胶柱(1 × 10 cm)去除游离药物,流速 1 mL/min,收集阿霉素脂质体,加入酸性异丙醇溶液,涡旋,测定 480 nm 处的吸光度值,根据标准曲线计算药物含量。

2 实验结果与讨论

凝胶过滤层析法调节脂质体内外水相 pH 梯度,按照药脂比 1:5、1:10、1:15 和 1:20 将阿霉素的主动载入脂质体内部,试验结果如表 1 所示。随着药脂比

的逐渐递增,阿霉素脂质体的包封率分别为 96.7%、98.7%、96.8% 和 95.1%,其中药脂比 1:10 时包封率达到最高(98.7%)。上述试验结果说明,凝胶过滤层析法调节脂质体内外水相 pH 梯度,可有效实现阿霉素的主动载入。

表 1 阿霉素脂质体的包封率

药脂比	粒径/nm	Zeta 电位/mV	包封率/%
1:5	117.1±7.4	-20.1±1.6	96.7±1.21
1:10	119.0±6.6	-21.9±0.3	97.7±2.01
1:15	123.1±7.2	-19.8±1.2	96.8±1.15
1:20	124.2±4.5	-18.9±0.9	95.1±1.39

考察了采用药脂比 1:10 制备的阿霉素脂质体在 37℃ 条件下的稳定性,结果如表 2 所示。在 37℃ 12 h 内阿霉素泄漏均低于 1.0%,48 h 内药物泄露率低于 5%,且脂质体的粒径分布均在 119~130 nm,未有明显变化。上述结果说明,采用凝胶过滤色谱法调节脂质体内外水相 pH 梯度,主动载药制得的阿霉素脂质体具有良好的稳定性。

表 2 阿霉素脂质体稳定性考察

时间/h	粒径/nm	药物泄漏率/%
0	121.0±7.4	低于检测限
4	119.0±6.6	低于检测限
8	123.1±7.2	低于检测限
12	124.2±4.5	0.8±0.1
24	129.1±8.2	2.3±0.7
48	126.4±7.0	3.5±0.5

3 结 语

凝胶过滤层析法是一种根据分子大小进行分离的层析技术,常用于多肽蛋白类物质的分离纯化。本实验利用凝胶过滤层析法将脂质体外水相的柠檬酸缓冲液替换成磷酸盐缓冲液,形成脂质体内外水相的 pH 梯度。在 pH 梯度的驱动下,两性物质阿霉素能够有

效地从脂质体外水相穿越脂质双分子膜进入内水相,实现阿霉素的主动载药。通过这个实验示教,使得学生们能够观测到凝胶过滤层析如何调节 pH 梯度,以及 pH 梯度在阿霉素脂质体主动载药过程中的重要性。凝胶过滤色谱技术不仅适用于阿霉素脂质体的制备,也将对其他纳米递药系统的分离纯化具有一定的使用价值。

参考文献(References):

- [1] 李克敏,尹如铁,谢丹. 脂质体阿霉素在妇科肿瘤中的临床应用[J]. 华西药理学杂志, 2013, 28(5): 545-47.
- [2] 沈志祥. 脂质体阿霉素治疗恶性淋巴瘤及多发性骨髓瘤的中国专家共识导读[J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(24): 1549.
- [3] 贾晋斌,韦青燕. 阿霉素脂质体的研究进展[J]. 中国肿瘤, 2011, 20(5): 372-377.
- [4] 赵波,范保辰,王学清,等. iRGD 修饰的阿霉素主动靶向脂质体的细胞毒与抗肿瘤效果评价[J]. 药学学报, 2013, 48(3): 417-422.
- [5] 刘敏,潘俊,姚明,等. 多柔比星叶酸隐形脂质体对 HeLa229 荷瘤裸鼠的抑瘤作用[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(2): 97-101.
- [6] 陆伟跃,刘敏,潘俊,等. 叶酸-脂质体制备及对 HeLa 细胞靶向作用[J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(1): 4-8.
- [7] 张磊,潘弘,刘敏,等. 阿霉素的的不同盐型对其脂质体体外药物泄漏和体内长循环的影响[J]. 药学学报, 2004, 39(12): 1018-1022.
- [8] 程冀,季宇彬,王向涛. 脂质体载药方法的研究进展[J]. 中国医药技术经济与管理, 2009, 3(9): 60-66.
- [9] 苗彩云,邓树海,李艳辉. 主动载药法制备两亲性药物脂质体的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(7): 433-437.
- [10] 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, 8(3): 1204-1209.
- [11] 张兰,李彦辉,王彩霞,等. 紫杉醇脂质体的制备及初步毒性、药效学研究[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(6): 446-449.
- [12] 宋阳,张小飞,周欣羽,等. 跨膜梯度法制备羧基磺酸铵-盐酸阿霉素脂质体[J]. 中国药剂学杂志, 2009, 7(4): 260-265.
- [13] 邓意辉,于彬,李焕秋,等. pH 梯度法制备阿霉素脂质体[J]. 沈阳药科大学学报, 1997, 14(4): 239-242.
- [14] 李飞阳,崔纯莹,王玉记,等. 阿霉素脂质体的制备及抗肿瘤活性研究[J]. 首都医科大学学报, 2015, 36(2): 157-160.
- [15] Yan Z, Wang F, Wen Z, et al. LyP-1-conjugated PEGylated liposomes: A carrier system for targeted therapy of 2 lymphatic metastatic tumor [J]. J Control Release, 2012, 157(1): 118-125.

· 名人名言 ·

知识是珍宝,但实践是得到它的钥匙。

——托马斯·富勒