

药物制剂

文章编号: 1001-8255(2003)10-0501-03

甲氧基聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺的制备及其对脂质体的稳定作用

牛国琴, 潘弘, 张静, 徐雯, 陆伟跃*

(复旦大学药学院药剂教研室, 上海 200032)

摘要: 采用两步反应法制备脂质体空间稳定膜材料甲氧基聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺(MPEG-EPE), 并用以制备空间稳定脂质体(SLs), 同时制备不含MPEG-EPE的传统脂质体(CLs), 比较两者放置过程中粒径变化、加乙醇后浊度变化、包封钙黄绿素后在冻干-再水化过程中的荧光泄漏程度及其与人血浆蛋白的吸附指标, 评价MPEG 2000-EPE对脂质体的稳定作用。结果表明, 试验前后SLs的粒径及浊度变化不大, 荧光泄漏程度和人血浆蛋白吸附量也远小于CLs, 提示其对脂质体有良好的稳定作用。

关键词: 甲氧基聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺; 制备; 脂质体; 稳定作用

中图分类号: R944.9 文献标识码: A

空间稳定脂质体(sterically stabilized liposomes, SLs)作为药物传释载体具有体内长循环、靶向肿瘤组织等优点。而甲氧基聚乙二醇-磷脂酰乙醇胺(MPEG-EPE, **1**)作为最常用的脂质体空间稳定膜材料, 由于价昂, 一定程度上制约了SLs的研究及应用。本文以甲氧基聚乙二醇(MPEG)与卵黄磷脂酰乙醇胺(EPE)为原料, 两步反应制得**1**, 并对用其制成的SLs进行体外稳定性评价。

1 仪器与材料

HSGF254 薄层色谱板(山东烟台市芝罘黄务硅胶开发试验厂); UV-2401PC型紫外可见分光光度计(日本岛津); 380型激光散射粒度分析仪(美国Nicom公司); Emulsi-Flex-C5型高压乳匀机(加拿大Avestin公司); F-3000型荧光分光光度计(日本日立); Christ Alpha 1-2型冷冻干燥机(德国); Avatar 360型傅里叶变换红外光谱仪(美国Thermo Nicolet公司)。

MPEG 2000、二琥珀酰亚胺碳酸酯(disuccinimidyl-carbonate, DSC)(Sigma公司); 氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC, 德国Lipoid公司); 卵黄磷脂酰胆碱(EPC)、EPE(自制); 胆固醇[Chol, 中国医药(集团)上海化学试剂公司]; 钙黄绿素(上海试剂三厂)。

2 实验方法

2.1 **1**的制备

MPEG 2000 0.5 g(约0.25 mmol)溶于乙腈0.7 ml, 加DSC 115 mg(0.45 mmol)、吡啶150 μ l, 25 $^{\circ}$ C反应24 h。反应液加冷无水乙醚沉淀, 沉淀物

用乙酸乙酯溶解, 再用冷无水乙醚沉淀, 过滤, 沉淀在放有P₂O₅的真空干燥器中干燥, 得中间产物甲氧基聚乙二醇-琥珀酰亚胺碳酸酯(MPEG-SC)。

取MPEG-SC 0.44 g(约0.2 mmol)溶于CHCl₃ 1.8 ml中, 加EPE 180 mg(约0.23 mmol)和三乙胺(TEA)200 μ l, 25 $^{\circ}$ C氮气氛下反应2 h, 减压蒸除溶剂, 残余物加乙腈7 ml, 4 $^{\circ}$ C放置过夜, 离心(1500 r/min)15 min, 上清液减压蒸除乙腈, 残余物在放有P₂O₅的真空干燥器中干燥, 即得**1**。

2.2 **1**的鉴别

薄层色谱法: HSGF254 高效板, 展开剂为氯仿-二氯甲烷-甲醇-正丁醇(5:4:2.25:1), 显色剂为碘蒸气和磷钼酸溶液。

红外光谱法: 溴化钾压片。

2.3 脂质体制备

以高压乳匀法^[1]分别制备传统脂质体(conventional liposomes, CLs), 组成为EPC-Chol或HSPC-Chol, 摩尔比2:1和SLs(组成为EPC-Chol-**1**或HSPC-Chol-**1**, 摩尔比2:1:0.1)。取一定量的脂质材料溶于CHCl₃, 减压旋转蒸发成膜, 加入水性缓冲液, 水化2 h(组成为EPC的水化温度为37 $^{\circ}$ C, HSPC的为65 $^{\circ}$ C), 液氮/30 $^{\circ}$ C水浴冻融5个循环, 再依次挤压通过0.45、0.2、0.1 μ m的核孔膜各7次(含HSPC的脂质体在挤压过膜时用65 $^{\circ}$ C水浴恒温乳匀机), 即制得所需脂质体。

2.4 脂质体粒径及其分布

CLs(HSPC-Chol)和SLs(HSPC-Chol-**1**)于制备后立即测定粒径及其分布, 4 $^{\circ}$ C放置46 d后再次测定。

收稿日期: 2003-01-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271550)。

作者简介: 牛国琴(1973), 女, 博士研究生, 专业方向: 靶向制剂。

Tel: 021-54237040; Fax: 021-64178790

E-mail: w.y.tu@shmu.edu.cn

2.5 乙醇对脂质体浊度影响

CLs (HSPC-Chol) 和 SLs (EPC-Chol-1, HSPC-Chol-1) 用 10 mmol/L PBS (pH7.4) 稀释后, 分别加入一定量的无水乙醇, 使乙醇含量分别达到 5%、10%、15%、20%、25% 和 30%^[2], 室温放置 30 min 后于 436 nm 处测定吸收度 A。

2.6 脂质体膜稳定性

CLs (EPC-Chol) 和 SLs (EPC-Chol-1, HSPC-Chol-1), 用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.0, 内含 70 mmol/L 钙黄绿素和 50 mmol/L 麦芽糖) 水化, 包封钙黄绿素。游离钙黄绿素经 Sephadex G50 柱 (1.5 cm × 20 cm), 用 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0, 内含 50 mmol/L 麦芽糖) 洗脱分离。钙黄绿素-脂质体样品用液氮冻结后冻干 18 h。冻干品加冻干前等体积的水, 摇匀, 按一定比例稀释后于 λ_{ex} 490 nm、λ_{em} 509 nm 处测定泄漏钙黄绿素的荧光强度, 对照用相应的含 0.1 mmol/L NaCl 的空白脂质体。以加 10% triton X-100 破坏后溶液的荧光测定值为总荧光强度, 计算钙黄绿素泄漏率^[3,4]。

2.7 血浆蛋白吸附试验

分别取 CLs (EPC-Chol) 和 SLs (EPC-Chol-1) 0.3 ml, 与等体积人血浆混匀后 37 ℃ 温育 1 h^[5], 依次加入 30% 蔗糖溶液 15% 蔗糖溶液各 1.5 ml 和 PBS (pH 7.4) 0.5 ml, 密度梯度离心 (10000 r/min) 1h, 收集悬浮于 15% 蔗糖/PBS 界面的脂质体, 重复梯度离心一次, 收集脂质体样品。脂质体吸附的蛋白量用改良的 Lowry 法测定, 以牛血清白蛋白为对照。磷脂浓度测定参照文献^[6]。

3 结果与讨论

3.1 1 的鉴别

TLC 跟踪反应结果显示, MPEG2000、MPEG-SC、EPE 和 1 的 R_f 值分别为 0.71、0.75、0.29 和 0.62。4 种物质用碘蒸气均显色, 而用磷钼酸时, 前二者不显色, 后二者显色, 说明 1 的结构中含有磷且极性介于 EPE 和 MPEG 2000 之间, 与 1 的理论分析一致。

红外谱图结果显示: MPEG-SC 在 1734 cm⁻¹ 处有 DSC 的内酰胺特征峰, 说明琥珀酰亚胺碳酰基取代了 MPEG 端羟基的氢; 而 1 在该处的吸收消失, 出现了 1715 cm⁻¹ 处的酯键特征峰, 说明 EPE 的氨基取代了 MPEG-SC 中的琥珀酰亚胺基, 故内酰胺官能团的吸收峰 (1734 cm⁻¹) 消失。

由于 DSC 活化的是 MPEG 的端羟基, 且 EPE 参与反应的基团是氨基, 故该反应可适用于不同分

子量的 MPEG 以及含有乙醇胺的 PE 类物质 (如二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺)。

3.2 脂质体的粒径及范围

所得 CLs 和 SLs 粒径分布均匀, 卡方 (χ²) 值均小于 3, 粒径分布符合 Gaussian 分布。4 ℃ 放置 46 d 后, χ² 值均大于 3, 粒径分布范围变宽, 符合多分散系的 Nicomp 分布。两种脂质体的粒径均增大, 但 SLs 粒径增大幅度远小于 CLs (见表 1), 且 CLs 溶液有少许絮状沉降物出现。因此, 含 1 的 SLs 放置稳定性明显优于 CLs。

表 1 新鲜及 4 ℃ 放置 46 d 后脂质体的粒径及分布

	新鲜制备		46 d	
	CLs	SLs	CLs	SLs
粒径/nm	141.4 ± 46.8	123.1 ± 18.0	271.7 ± 29.7	141.8 ± 18.4
χ ² 值	0.25	0.23	7.7	5.06
分布	Gaussian 分布		Nicomp 分布	

3.3 乙醇对浊度的影响

3 种脂质体在加入一定比例乙醇后, 两种 SLs 的 A 值随乙醇含量的增大而稍有降低, 而 CLs 的 A 值则随乙醇含量的增大先降低而后急剧增大 (见图 1)。这可能是由于 MPEG2000 是一种亲水性、柔顺性的高分子, 可在脂质体表面形成一层水化膜^[7], 若要破坏 SLs 的脂质体膜, 则需先薄化该水化膜, 故其表现为抗乙醇溶蚀能力较强; 而 CLs 表面无此水化膜, 随少量乙醇加入, 脂质体膜有序性增加, 其 A 值稍有降低, 当乙醇含量超过一定值 (20%) 时, 脂质体膜之间可能发生融合, 脂质体粒径增大, 浊度增大, 表现为 A 值增大。

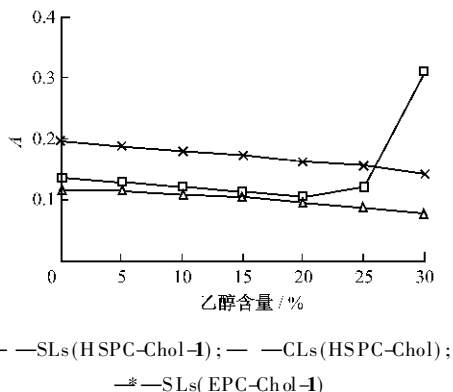


图 1 乙醇含量对 3 种脂质体浊度的影响

3.4 1 对脂质体膜稳定性的影响

3 种脂质体经冻干-再水化后钙黄绿素的泄漏实验结果为: CLs 的荧光保留率为 (36.0 ± 2.7)%、SLs (EPC-Chol-1 和 HSPC-Chol-1) 荧光保留率分别为 (64.1 ± 2.5)% 和 (61.0 ± 1.3)% (n = 4), SLs

荧光保留率显著高于 CLs ($P < 0.05$), 表明含 1 的 SLs 膜稳定性受冻干-再水化的影响小于 CLs。

3.5 1 对脂质体吸附血浆蛋白的影响

脂质体的蛋白吸附试验表明, CLs 和 SLs 每 1 μmol 磷脂的蛋白吸附量分别为 (0.4095 ± 0.2438) 和 (0.0803 ± 0.0412) mg 血浆蛋白 ($n = 8$), 两者有显著性差异 ($P < 0.05$)。这是因为 MPEG 2000 在 SLs 表面形成的水化膜是一种立体屏障^[7], 一方面掩盖了脂质体表面的疏水性结合位点, 另一方面阻碍血浆蛋白与脂质体膜的接触, 从而阻碍了血浆蛋白与脂质体的吸附, 这也是 SLs 能够在体内长时间循环的一个主要原因。

3.6 小结

本实验两步反应制得 1, 方法简单、条件温和, 且含有 1 的 SLs 具有较好的物理稳定性、膜稳定性和抗蛋白吸附能力, 符合脂质体空间稳定膜材料的要求。

参考文献:

[1] Schneider T, Sachse A, Roessling G, et al. Generation of contrast-carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method[J]. *Int J Pharm*, 1995, **117**(1): 1-12.

[2] Sivakumar PA, Rao KP. Polymerized (ethylene glycol) dimethacrylate-cholesterol methacrylate liposomes: preparation and stability studies[J]. *Reactive & Functional Polymers*, 2001, **49**(3): 179-187.

[3] Takeuchi H, Yamamoto H, Toyoda T, et al. Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified poly(vinyl alcohol)[J]. *Int J Pharm*, 1998, **164**(1-2): 103-111.

[4] Kayalar C, Duzgunes N. Membrane action of colicin E1: detection by the release of carboxyfluorescein and calcein from liposomes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, **860**(1): 51-56.

[5] Mercadal M, Domingo JC, Bermudez M, et al. N-Palmitoylphosphatidylethanolamine stabilizes liposomes in the presence of human serum: effect of lipidic composition and system characterization[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1235**(2): 281-288.

[6] Mrsny RJ, Volwerk JJ, Griffith OH. A simplified procedure for lipid phosphorus analysis shows that digestion rates vary with phospholipid structure[J]. *Chem Phys Lipids*, 1986, **39**(1-2): 185-191.

[7] 牛国琴, 陆伟跃. 聚乙二醇在脂质体中的作用[J]. 国外医药——合成药、生化药、制剂分册, 2000, **21**(3): 178-181.

Preparation of Methoxy-poly(ethylene glycol)-phosphatidylethanolamine and Its Stabilizing Effect on Liposomes

NIU Guo-Qin, PAN Hong, ZHANG Jing, XU Wen, LU Wei-Yue*

(Dept. of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai, 200032)

ABSTRACT: Methoxy-poly(ethylene glycol)-phosphatidylethanolamine (MPEG-EPE) was synthesized by a two-step process. Liposomes with or without MPEG-EPE were prepared to evaluate the effect of MPEG-EPE on liposomes stabilities, such as particle size, turbidity, leakage of entrapped contents and human plasma protein association. The results showed that the particle size and turbidity of liposomes prepared with MPEG-EPE (sterically stabilized liposomes) remained little change. The leakage of the entrapped contents and protein association were much less than the conventional liposomes. It implied that MPEG-EPE had a stabilizing effect on liposomes.

Key Words: methoxy-poly(ethylene glycol)-phosphatidylethanolamine; preparation; liposomes; stabilizing effect

B34-32 根癌农杆菌的固定化提高乙内酰脲酶和 N-乙酰化酶活性 Foster IM 等[*Biotechnol Lett*, 2003, **25**(1): 67-72]

与未固定化的酶比较, 固定在海藻酸钙颗粒上的根癌农杆菌的细胞提取物, 在和 N-乙酰甘氨酸反应时 N-乙酰甘

氨酸酰胺水解酶(1)活性提高了 7 倍, 乙内酰脲酶(2)活性比固定化前提高了 5 倍。固定化 1 和 2 在 4℃ 下保存 4 周, 酶活性保持稳定; 固定化 1 和 2 的最佳 pH 分别为 8 和 7; 1 和 2 的最佳反应温度分别为 40℃ 和 50℃。

[吴大治摘 朱春宝校]