

盐酸青藤碱脂质体的制备工艺研究

郑杭生¹, 黄绳武¹, 李范珠^{1*}, 徐莲英²

1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

2. 上海中医药大学, 上海 201203

摘要: 目的 提高盐酸青藤碱 (sinomenine hydrochloride, SIN-HCl) 脂质体的药物包封率, 并阐明处方药量与脂质体粒径等因素对包封率的影响规律。方法 以离心沉淀-离心超滤法测定 SIN-HCl 脂质体的包封率; 以包封率与成型性为主要指标筛选薄膜分散法、逆相蒸发法与乙醚注入法 3 种制备方法; 考察水化液的种类、pH 值、离子浓度以及 pH 梯度载药、磷脂-胆固醇比例、药脂比对包封率的影响; 以全面设计试验考察处方药量与粒径两因素对包封率的影响规律; 考察代表性脂质体样品在 4 °C 下的稳定性。结果 最适的制备工艺为薄膜分散法; 最佳水化液为柠檬酸缓冲液 (CBS); 随着水化液 pH 值的升高, 包封率增加; 当水化液的 pH 值相同时, 脂质体包封率随着水化液离子浓度的降低而增加; pH 梯度载药可提高脂质体的包封率, pH 梯度载药脂质体的最适水化液为 pH 值 2.5 的 CBS, 最适大豆磷脂-胆固醇比例为 6:1, SIN-HCl 与大豆磷脂的比例由 1:6 增至 6:6, 未经探针式超声处理的脂质体包封率略有下降; 建立了药物包封率与处方药量和粒径之间的定量关系, 一定粒径与处方药量的脂质体包封率大于 80%; 成品脂质体的稳定性良好。结论 pH 梯度主动载药技术可以制备高包封率的 SIN-HCl 脂质体。**关键词:** 盐酸青藤碱; 脂质体; 离心沉淀-离心超滤法; 薄膜分散法; 逆相蒸发法; 乙醚注入法; 全面设计试验; pH 梯度主动载药技术

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)04-0000-00

A Study on the Preparation of Sinomenine Hydrochloride Liposomes

ZHENG Hang-sheng¹, HUANG Sheng-wu¹, LI Fan-zhu¹, XU Lian-ying²

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou Zhejiang 310053, China

2. Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To prepare sinomenine hydrochloride (SIN-HCl) liposomes with high entrapment efficiencies and to illustrate the relation between the entrapment efficiencies and the factors formulation drug quantity and size of liposomes. **Methods** Centrifugation sedimentation combined with centrifugation ultrafiltration was employed to determine drug entrapment efficiencies of the liposomes. The following three techniques thin film hydration (TFH), reverse phase evaporation (REV) and ether injection (EI) were screened based on entrapment efficiencies and formability of liposomes. The effects of type, pH value and ion concentration of hydration liquid, pH gradient active loading drug, lecithin-cholesterol ratio and drug-lipid ratio on entrapment efficiencies of liposomes were investigated. The relation between entrapment efficiencies and the factors formulation drug quantity and liposome size was probed with a comprehensive design experiment. The stability of typical finished liposomes was evaluated at 4 °C. **Results** TFH was the optimal preparation procedure for SIN-HCl liposomes and citrate buffer solution (CBS) was the best hydration liquid for them. The liposome entrapment efficiencies increased as a result of increase in the pH value of CBS. When the pH value of CBS was fixed, the entrapment efficiencies increased as a result of decrease in the ion concentration of CBS. pH gradient active drug loading led to increased entrapment efficiencies, and to enhance this effect, the preferable hydration liquid for liposomes was CBS with pH value of 2.5. The optimal ratio of soybean lecithin to cholesterol was 6:1. Increase in ratio of SIN-HCl to soybean lecithin from 1:6 to 6:6 led to a slight decrease from 99.37% to 95.29% in entrapment efficiencies of the liposomes without probe sonification. A quantitative relation was established between the entrapment efficiencies and the factors formulation drug quantity and liposome size. The typical finished liposomes was stable at 4 °C. **Conclusion** The technique of pH gradient active loading drug is able to prepare SIN-HCl liposomes with high entrapment efficiencies.

Key words: sinomenine hydrochloride; liposomes; preparation; active loading drug

收稿日期: 2012-09-14

基金项目: 上海市教委重点学科资助 (J50302); 上海中医药大学课程建设项目 (实验教学组)

作者简介: 郑杭生, 男, 副教授, 博士, 研究方向为中药新剂型及其体内过程。Tel: (0571)86613524 18268066638 E-mail: HS-zheng@163.com

*通讯作者 李范珠 (1964-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为药物靶向给药系统, Tel: (0571)86633030 Email: lifanzhu@zjtcem.net

青藤碱 (sinomenine, SIN) 是从防己科植物青藤 *Sinomenium acutum* (Thunb.) Rehd. et Wils. 中提取的生物碱单体, 临床常以其盐酸盐 (sinomenine hydrochloride, SIN-HCl) 的形式应用。青藤碱的药理作用包括抗炎、免疫抑制、镇痛、降压、抗心律失常等, 临床常用于治疗风湿、类风湿关节炎及心率失常等^[1]。但该药临床长期服用易引起白细胞减少、血小板减少、皮疹以及胃痛等胃肠道不良反应^[2-4], 为减少其不良反应并发挥最佳的治疗作用, 制剂研究人员已开展了多项关于该药物脂质体制剂的研究^[5-9], 其给药途径包括经皮给药与口服。药物被脂质体包裹后可以实现靶向给药与缓释作用, 从而增强疗效、降低毒性, 同时还可以提高药物的稳定性。脂质体的药物包封率是脂质体能否发挥上述优势的关键, 故它是脂质体制剂质量评价中的最重要指标^[10]。《中国药典》2010 年版脂质体制剂指导原则中也明确规定其包封率不得小于 80%^[11], 而包封率低也是脂质体工业化的最大障碍之一。根据文献报道^[5-10], SIN 脂质体制剂的药物包封率均低于 70%, 张岩等^[5]采用了 pH 梯度主动载药, 但是制得的柔性纳米脂质体包封率也只有 52.7%。本课题组在前期研究中采用直接载药法, 结果制得的脂质体包封率均低于 35%^[12]。为了提高药物包封率, 本实验重新研究了 SIN 脂质体的处方工艺, 并采用 pH 梯度主动载药技术提高药物包封率, 结果药物包封率有了明显的提高, 合适粒径与处方药量下可达到《中国药典》2010 年版的要求 (不是很理解, 改成“80%以上”可以吗)。

1 仪器与材料

LC—2130 高效液相色谱仪 (上海天美科学仪器有限公司); T—25 高剪切分散仪 (德国 IKA 集团); XL2000 超声破碎仪 (美国 Misonix 公司); Nicomp 380 CLS 激光散射粒度测定仪 (美国 PSS 粒度分析仪公司); R 系列旋转蒸发器 (上海申生科技有限公司); 2—16k 冷冻高速离心机 (美国 Sigma 公司); BX51 光学显微镜 (日本 OLYMPUS); 多头磁力加热搅拌器、PHS—3C 型 pH 计 (上海精科科学仪器有限公司); 超滤单元 (Microcon YM 100, 截留相对分子质量为 1×10^5 , Millipore 公司)。

胆固醇 (CH, 分析纯, 批号 F20090719, 中国医药集团上海化学试剂公司); 维生素 E (VE, 批号 082K1382, 美国 Sigma 公司); 大豆磷脂 [sbPC, 注射级, 磷脂酰胆碱 (PC) 质量分数大于 70%, 批

号 091208, 上海太伟药业有限公司]; SIN-HCl (标示规格为 98%, 本室以外标法 HPLC 实测质量分数为 92.67%, 批号 Bsy090415, 西安博胜生物科技有限公司); SIN 对照品 (批号 0774-200206, 中国药品生物制品检定所)。柠檬酸缓冲液 (CBS): 将 0.1 mol/L 柠檬酸溶液与 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液按一定比例混合配成, 必要时稀释适当倍数; pH 4.0 醋酸缓冲液 (ABS 4.0): 将 0.1 mol/L 醋酸钠溶液与 0.1 mol/L 醋酸溶液按 16.6 : 83.4 的比例混合配成; pH 5.0 磷酸缓冲液 (PBS 5.0): 将 1/15 mol/L 磷酸二氢钾溶液与 1/15 mol/L 磷酸氢二钠溶液按 99.2 : 0.8 的比例混合配成。甲醇为色谱纯; HPLC 用水为双蒸水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 脂质体包封率的测定

按本课题组前期研究建立的离心沉淀-离心超滤法^[12]进行测定。测定过程简述如下: 取待测脂质体混悬液样品, 摇匀, 取少量进行光学显微镜观察, 确认其中不含药物结晶后精密称取适量置于精密称定质量的离心管中, 进行离心, 使大部分脂质体沉淀。取适量上清液进行离心超滤, 弃去 50 μ L 初滤液, 收集续滤液, 分别测定续滤液与离心前脂质体混悬液样品中药物浓度 (前者即为脂质体外水相中药物质量浓度)。提高离心机转速进一步离心脂质体样品足够长时间使脂质体接近完全沉淀, 除去上清液, 精密称定沉淀的脂质体与离心管的总质量, 计算得外水相质量, 计算包封率 (EE)。每个样品平行测定 3 次, 取其平均值。

$$\text{包封率} = 1 - EA \times C_{EA} / C_S^{[12]}$$

EA 为脂质体样品中外水相的质量百分比, C_S 、 C_{EA} 分别为脂质体样品与其外水相中的药物质量浓度

2.2 脂质体制备工艺的筛选

为了便于比较, 统一处方为: SIN-HCl 0.05 g、sbPC 0.30 g、CH 0.05 g、VE 0.005 g、CBS 5.0 15 mL, 考察以下 3 种工艺。

2.2.1 薄膜分散法 (TFH) 将 SIN-HCl、sbPC、CH、VE 溶于 35 mL 二氯甲烷-甲醇 (5 : 2) 混合溶剂, 转移至 500 mL 茄形瓶中, 在 45 $^{\circ}$ C、50 r/min 下减压旋转蒸去溶剂, 得到干膜, 室温下抽真空 2 h, 再以氮气吹干膜 15 min 后加入 15 mL CBS 5.0 水化干膜, 至水化完全后在冰水浴中用高剪切分散仪进行处理 (9 500 r/min), 每次剪切持续 30 s, 间隔 1 min, 重复 6 次, 即得脂质体混悬液。

2.2.2 逆向蒸发法 (REV) 将 SIN-HCl、sbPC、CH、VE 溶于 35 mL 二氯甲烷-甲醇 (5:2) 混合溶剂, 转移至 500 mL 茄形瓶中, 加入 5 mL CBS 5.0 振荡, 水浴式超声, 共 5 min, 每次持续 1 min, 两次之间间歇 1 min, 得乳状液, 在 45 °C、50 r/min 下减压旋转蒸去有机溶剂至凝胶态, 再加入 10 mL CBS 5.0, 振荡并以高剪切分散仪进行分散, 即得。

2.2.3 乙醚注入法 (EI) 将 sbPC、CH、VE 溶于 30 mL 乙醚中, 将 SIN-HCl 溶于 15 mL CBS 5.0 中, 转移至带水浴套的烧杯中, 水浴温度控制在 53 °C, 在磁力搅拌下将乙醚液匀速缓慢地注入 CBS 中, 注射完毕继续在 53 °C 下搅拌 1 h, 再以高剪切分散仪进行分散, 即得。

光学显微镜下观察各样品发现, TFH 与 REV 法制得的样品中有大量近圆形的囊泡状结构, 表明脂质体已形成, 而 EI 法制得的样品中只观察到大量形态不规则的团块, 不符合脂质体的典型形态特征, 并且样品中可以闻到乙醚味, 故残留乙醚可能导致所采用的 EI 工艺无法制得脂质体。

对 TFH 与 REV 法制得的脂质体分别进行包封率测定, 结果表明前者为 $(21.81 \pm 1.01)\%$ ($n=3$), 后者为 $(11.14 \pm 1.81)\%$ ($n=3$), 故选用 TFH 法。

2.3 脂质体水化液筛选

2.3.1 脂质体水化液种类的筛选 按处方 SIN-HCl 0.05 g、sbPC 0.30 g、CH 0.05 g、VE 0.005 g、水化液 15 mL, 采用“2.2.1”项下 TFH 工艺条件制备脂质体混悬液, 水化液分别为 CBS 3.0、ABS 4.0 和 PBS 5.0。分别测定各脂质体的包封率, 结果其包封率分别为 $(13.66 \pm 1.66)\%$ 、 $(27.65 \pm 1.43)\%$ 、 $(23.76 \pm 1.79)\%$ ($n=3$)。可以看出以 ABS 4.0 和 PBS 5.0 为水化液的脂质体包封率较高。但是在 4 °C、充氮条件下放置数天后两者均有颜色变黄的现象, 说明其稳定性欠佳, 故后两者均不宜采用, 而 CBS 3.0 水化的脂质体放置数月无变色现象, 故水化液选择 CBS。

2.3.2 脂质体水化液 pH 值的考察 按处方 SIN-HCl 0.05 g、sbPC 0.30 g、CH 0.05 g、VE 0.005 g、水化液 CBS 15 mL, 采用“2.2.1”项下 TFH 工艺条件制备脂质体混悬液, 水化液 CBS 的 pH 值分别控制在 3.0、5.0、7.0。测得成品脂质体混悬液的 pH 值分别为 3.0、5.0、7.0。分别测定各脂质体的包封率, 结果见表 1 最后一行, 可以看出, 随水化液 pH 值的升高, 包封率增加。

2.3.3 脂质体水化液离子浓度的考察 按处方 SIN-HCl 0.05 g、sbPC 0.30 g、CH 0.05 g、VE 0.005 g、CBS 3.0 水化液 15 mL, 采用“2.2.1”项下 TFH 工艺条件制备脂质体混悬液, CBS 3.0 水化液相对离子浓度分别控制在 1、1/2、1/10, 1 对应的水化液为 0.1 mol/L 柠檬酸溶液-0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液 (80.3:19.7) 混合液 (CBS 水化液的相对离子浓度均为 1), 1/2 与 1/10 离子浓度分别由 1 稀释 2、10 倍得到。分别测定 3 种不同离子浓度水化液水化的脂质体的包封率, 再分别以不同离子浓度的 CBS 5.0 与 CBS 7.0 作水化液制备脂质体并测定包封率, 结果见表 1, 可以看出, 当水化液的 pH 值相同时, 脂质体包封率随水化液离子浓度的降低而增加, 当水化液的 pH 值较低时, 增幅增大。

表 1 CBS 水化液不同 pH 值与不同相对离子浓度对包封率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of pH value and relative ion concentration of hydration liquid CBS on entrapment efficiency of SIN-HCl liposomes ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 相对离子浓度 | 包封率 / % | | |
|--------|--------------|--------------|--------------|
| | CBS 3.0 | CBS 5.0 | CBS 7.0 |
| 1/10 | 39.94 ± 1.71 | 42.56 ± 1.32 | 51.54 ± 2.05 |
| 1/2 | 34.06 ± 1.33 | 37.03 ± 2.15 | 46.28 ± 1.86 |
| 1 | 13.66 ± 1.66 | 21.81 ± 1.01 | 33.16 ± 2.79 |

2.4 pH 梯度主动载药

2.4.1 条件预试 按处方 SIN-HCl 0.15 g、sbPC 0.90 g、CH 0.15 g、VE 0.015 g、CBS 3.0 水化液 45 mL, 采用“2.2.1”项下 TFH 工艺条件制备脂质体混悬液, CBS 3.0 水化液相对离子浓度分别控制在 1、1/10 两个水平, 从各水化液相对离子浓度水平的脂质体混悬液中分别取 4 份 7.5 mL 的样品, 置于不同烧杯中, 于室温、磁力搅拌下, 以 1 mol/L NaOH 溶液分别将 4 份样品的 pH 值调至 4.0、5.0、6.0、7.0, 分别测定 pH 值调节前后各样品的包封率, 测定结果见表 2, 可以看出, pH 梯度主动载药法可明显提高脂质体药物包封率, 水化液的缓冲盐离子浓度较大时, 相同 pH 梯度下包封率提高较大。

2.4.2 水化液筛选 按处方 SIN-HCl 0.05 g、sbPC 0.30 g、CH 0.05 g、VE 0.005 g、水化液 15 mL, 采用“2.2.1”项下 TFH 工艺制备脂质体混悬液, 分别以 CBS 2.5、CBS 3.0 及 0.1 mol/L 柠檬酸溶液为水化液, 并进行 pH 梯度主动载药, 3 份样品的 pH 值

表 2 不同 pH 梯度下脂质体的药物包封率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Entrapment efficiency of SIN-HCl liposomes under different pH gradient ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 样品状态 | 包封率 / % | |
|--------------|------------|--------------|
| | 相对离子浓度为 1 | 相对离子浓度为 1/10 |
| 调节前 (pH 3.0) | 13.58±1.80 | 40.14±1.62 |
| pH 调至 4.0 | 14.66±1.94 | 40.87±2.09 |
| pH 调至 5.0 | 33.04±1.96 | 46.44±2.88 |
| pH 调至 6.0 | 52.57±1.73 | 51.96±1.57 |
| pH 调至 7.0 | 70.85±2.04 | 57.21±2.14 |

均调至 7.0, 分别测定 pH 梯度载药后样品的包封率, 结果其包封率分别为 (99.37±0.46)%、(70.85±2.04)%、(81.19±1.5)% ($n=3$)。可以看出 CBS 2.5 水化的脂质体 pH 梯度载药后包封率最大, 故 CBS 2.5 为最适水化液。

2.5 sbPC-CH 比例筛选

sbPC-CH 比例是影响脂质体成型与包封率的重要因素, 故进一步考察其对 pH 梯度主动载药的 SIN-HCl 脂质体包封率的影响。

在处方 SIN-HCl 0.05 g、sbPC 0.30 g、VE 0.005 g、CBS 2.5 15 mL 的基础上, 加入不同量 CH 使 sbPC-CH 的比例分别为 24:3、24:4、24:5、24:6, 按“2.2.1”项下 TFH 工艺制备脂质体样品。将所制得的样品分别进行 pH 梯度主动载药, pH 值均调至 7.0。测定各样品包封率, 结果其包封率分别为 (99.22±0.33)%、(99.37±0.29)%、(99.05±0.36)%、(99.13±0.41)% ($n=3$)。可以看出所有样品的包封率均在 99% 以上, 磷脂-胆固醇比例对脂质体包封率影响较小, 但制备过程中发现, sbPC-CH 比例为 24:5 和 24:6 时, 干膜水化困难, 耗时长。此外, 显微镜观察样品发现, sbPC-CH 比例为 24:4 时, 脂质体的形态与粒径均匀度明显优于比例为 24:3 时, 故确定最佳磷脂-胆固醇比例为 24:4。

2.6 药脂比对包封率影响的考察

在处方 sbPC 0.30 g、CH 0.05 g、VE 0.005 g、CBS 2.5 15 mL 的基础上, 加入不同量 SIN-HCl (0.05、0.10、0.20、0.30 g) 使药物与 sbPC 的比例分别为 1:6、2:6、4:6、6:6, 按“2.2.1”项下 TFH 工艺制备脂质体样品, 分别进行 pH 梯度主动载药, pH 值均调至 7.0。分别测定不同药脂比的脂质体的包封率, 结果其包封率分别为 (99.37±0.29)%、(99.32±0.24)%、(97.31±0.36)%、(95.29±0.58)

% ($n=3$)。可以看出在考察范围内, 随着药脂比的增加, 脂质体的包封率略有下降。

2.7 全面设计考察处方药量与粒径对包封率的影响规律

在处方 sbPC 0.30 g、CH 0.05 g、VE 0.005 g、CBS 2.5 15 mL 的基础上, 按表 3 设定不同的处方药量, 将不同处方药量的脂质体分别平均分成 4 份, 取其中 3 份, 分别在功率 5、18、22 W (均在 4 °C) 下探针式超声处理 (固定探针位置, 每次 5 s, 间隔 20 s, 共 6 次), 得不同粒径的脂质体, 以激光散射法测定粒径, 结果见表 3。将所制得的样品分别进行 pH 梯度主动载药, pH 值均调至 7.0。分别测定各脂质体样品的包封率, 结果见表 3。可以看出不同药量下, 包封率均随着脂质体粒径的减小而减小, 而药量较大时, 这种减小幅度明显增大。以 UROS 软件 (沈阳药科大学研制) 对表 3 中的数据作逐步回归分析, 以 SIN-HCl 的处方量与脂质体粒径为自变量 X_1 、 X_2 , 包封率为应变量 Y , 以完全二次逐步回归得到如下回归方程 $Y=63.6293-0.1646X_1+0.1552X_2-0.0001X_1^2-0.0001X_2^2+0.0002X_1X_2$, $r=0.9767$, $Q=445.6926$, $F=57.9158$, 查 F 检验的临界值表得 $F_{0.01}(5, 14)=4.70$, 故 $F>F_{0.01}(5, 14)$, F 检验通过, 说明回归方程是可信的。软件优化结果: 当药量为 100.1 mg、粒径为 630.1 nm 时, 包封率达到最大, 理论预测值为 102.5%, 此条件下 3 次验证试验结果表明脂质体处方的包封率分别为 99.89%、99.93%、99.94%。

2.8 成品脂质体的质量与稳定性评价

按处方 SIN-HCl 0.10 g、sbPC 0.30 g、CH 0.05 g、VE 0.005 g、CBS 2.5 15 mL, 采用“2.2.1”项下 TFH 工艺制备脂质体样品, 并进行 pH 梯度主动载药, pH 值调至 7.0。质量评价结果如下: 外观为白色均匀的混悬液, 流动性良好; 在显微镜下观察, 可以观察到大量的囊泡结构, 近似圆形, 有大多层囊泡, 大单层囊泡, 小单层囊泡及多囊型囊泡, 粒径大小差异较大, 囊泡之间有轻微的聚集, 见图 1; 药物包封率平均值为 99.72% ($n=3$); 以激光散射粒度测定仪测得脂质体的平均粒径为 (854±57) nm ($n=3$), 多分散指数为 0.267±0.046, Zeta 电位为 (-25.36±3.58) mV ($n=3$), 粒径分布图与 Zeta 电位图见图 2。

将脂质体混悬液置于 4 °C 冰箱保存, 分别于 0、7、14 d 测定脂质体的各项质量指标, 结果见表 4,

表 3 全面设计试验安排与结果 (n=3)

Table 3 The experiment arrangement and results of comprehensive design (n=3)

| 试验号 | SIN-HCl 的量 / mg | 粒径 / nm | 包封率 / % |
|-----|-----------------|---------|---------|
| 1 | 100.0 | 518.7 | 99.70 |
| 2 | 100.0 | 324.6 | 92.92 |
| 3 | 100.0 | 237.6 | 85.82 |
| 4 | 100.0 | 186.5 | 70.77 |
| 5 | 200.0 | 739.4 | 97.45 |
| 6 | 200.0 | 373.4 | 86.22 |
| 7 | 200.0 | 311.3 | 76.99 |
| 8 | 200.0 | 227.9 | 61.54 |
| 9 | 300.0 | 911.3 | 94.89 |
| 10 | 300.0 | 455.1 | 72.52 |
| 11 | 300.0 | 311.9 | 59.13 |
| 12 | 300.0 | 246.8 | 50.13 |
| 13 | 400.0 | 717.2 | 91.76 |
| 14 | 400.0 | 411.2 | 71.87 |
| 15 | 400.0 | 289.6 | 56.53 |
| 16 | 400.0 | 236.5 | 34.57 |
| 17 | 500.0 | 888.5 | 90.53 |
| 18 | 500.0 | 508.9 | 57.83 |
| 19 | 500.0 | 339.2 | 31.79 |
| 20 | 500.0 | 285.7 | 27.66 |

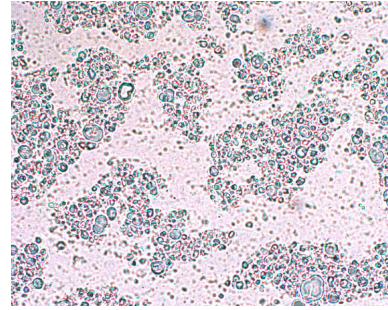


图 1 成品脂质体的显微镜照片 (×400)

Fig. 1 The microscopic picture of finished liposomes (× 400)

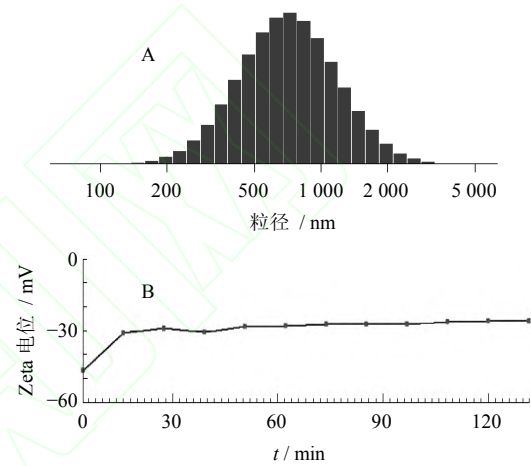


图 2 成品脂质体的粒径分布图 (A) 和 Zeta 电位图 (B)

Fig. 2 The pictures of size distribution (A) and Zeta potential (B) of a finished liposomes

表 4 成品脂质体稳定性测定结果 (n=3)

Table 4 The stability test of a finished liposome formulation (n=3)

| 时间 / d | 外观性状 | 显微观察 | 药物含量 / (mg·mL ⁻¹) | 包封率 / % | 粒径 / nm | Zeta 电位 / mV |
|--------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------|---------|--------------|
| 0 | 白色混悬液, 流动性良好 | 有大量囊泡状结构, 近似圆形, 轻微聚集, 以单层囊泡居多 | 3.31 | 99.72 | 854 | -25.36 |
| 7 | 白色混悬液, 流动性良好, 有轻微分层, 但轻摇即可再分散 | 有大量囊泡状结构, 近似圆形, 轻微聚集, 以单层囊泡居多 | 3.29 | 99.64 | 864 | -24.24 |
| 14 | 白色混悬液, 流动性良好, 有轻微分层, 但轻摇即可再分散 | 有大量囊泡状结构, 近似圆形, 轻微聚集, 以单层囊泡居多 | 3.32 | 99.56 | 871 | -24.46 |

表明样品的外观性状、显微形态、载药量、包封率、粒径与 Zeta 电位等均未发生明显变化, 说明样品稳定性良好。

3 讨论

根据成型情况与脂质体的包封率, 本实验比较了 TFH、REV、EI 3 种制备工艺, 从而确定选用 TFH 工艺。与 REV、EI 工艺相比, TFH 在无水状态下去除有机溶剂, 故可以迅速且完全去除有机溶剂,

这样一方面可以保证制剂有机溶剂残留量符合限量要求, 另一方面可以避免残留有机溶剂对脂质体双分子层膜产生的去稳定化作用, 而且这种去稳定化作用随着有机溶剂残留量的波动也可能呈现随机性, 从而影响工艺的稳定性, 故从脂质体实际应用的安全性与工艺研究结果的可靠性考虑, TFH 工艺具有较大优势。

本实验筛选了 CBS 3.0、ABS 4.0 和 PBS 5.0 3

种水化液，后两者制得的脂质体均在数天内有颜色变黄的现象，而前者制得的脂质体可以长时间稳定存放，这可能与 CBS 中柠檬酸的协同抗氧化作用有关。

本实验考察了不同浓度的 CBS 3.0、CBS 5.0、CBS 7.0 3 种水化液对脂质体包封率的影响，结果表明，当水化液的 pH 值相同时，包封率随水化液离子浓度的降低而增加，这可能是由于水相中缓冲盐与药物离子相互作用而增加药物在水相中的表观溶解度所致，同一考察项目的结果同时表明，当水化液的 pH 值较低时，因水化液离子浓度降低包封率增加的幅度增大，也说明了碱性药性与酸性缓冲盐具有更强的相互作用。

pH 梯度载药是通过调节脂质体外水相 pH 值而在内外水相形成 pH 值梯度使原本外水相中的药物进入内水相，从而提高脂质体药物包封率的方法。由表 2 可以看出相对离子浓度为 1 的 CBS3.0 水化液水化直接得到的脂质体的包封率为 13.58%，对它进行 pH 梯度载药，将外水相 pH 值分别调至 5.0 与 7.0，则脂质体的包封率分别增大至 33.04% 与 70.85%。由表 1 则可以看出相对离子浓度为 1 的 CBS 3.0 水化液、CBS 5.0 水化液、CBS 7.0 水化液分别水化直接得到的脂质体的包封率分别为 13.66%、21.81%、33.16%，可以看出水化液的 pH 值提高，药物的包封率呈增大趋势，这是由于 SIN 为一弱碱性药物，pH 值增大时，分子型药物的比例增大，故更多的药物分配到亲脂性的脂质双分子层，包封率增大，在 pH 梯度载药的过程中通过提高外水相的 pH 值同样存在上述药物向脂质双分子层的分配作用，但是对比上述相同外水相 pH 值的主动载药与直接载药脂质体的包封率数据可以看出 pH 梯度主动载药脂质体的包封率明显更大，此结果与我们在全缘千里光碱脂质体研究中发现的规律^[13]一致。由表 1、2 还可以看出，水化液的缓冲盐浓度较大时，相同 pH 梯度下包封率增幅更大。上述结果是对 pH 梯度主动载药机制的证实。

pH 梯度主动载药的脂质体的最适水化液为 CBS 2.5，在此条件下控制合适的处方药量与粒径，

脂质体的包封率大于 80%，达到《中国药典》2010 年版的要求。

脂质体制剂的处方药量与粒径可影响制剂的包封率，同时，前者对于保证药物临床用药剂量有很大的现实意义，后者又可显著影响药物经皮吸收特性，故本实验以包封率为指标，选取上述两个因素进行全面设计试验建立了药物包封率与处方药量和粒径之间的关系，从而可以为设计一定含药量下合适粒径与高包封率的脂质体制剂或一定粒径下合适含药量与高包封率的脂质体制剂提供参考。

参考文献

- [1] 刘 强, 周莉玲, 李 锐. 青藤碱的研究概况 [J]. 中草药, 1997, 28(4): 247-249.
- [2] 林小军, 蔡小燕, 叶静华. 青藤碱治疗类风湿关节炎临床观察 [J]. 湖南中医药大学学报, 2009, 29(8): 52-54.
- [3] 马兆兴, 史甫敏, 张乃峥, 等. 毛青藤总碱治疗类风湿性关节炎 172 例 [J]. 陕西中医, 1987, 8(2): 54-55.
- [4] 史甫敏, 马兆兴, 张文珍, 等. 青藤总碱治疗类风湿性关节炎 60 例 [J]. 新医学, 1986, 17(6): 292.
- [5] 张 岩, 吴 迪, 韩 飞, 等. 盐酸青藤碱柔性纳米脂质体的制备及质量考察 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(9): 690-694.
- [6] 姜素芳, 姚 瑶, 陶昱斐, 等. 盐酸青藤碱传递体的制备及质量评价 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 362-365.
- [7] 姜素芳, 姚 瑶, 丁燕飞, 等. 反相高效液相色谱法测定盐酸青藤碱纳米脂质体药物含量及包封率 [J]. 中南药学, 2005, 3(4): 213-215.
- [8] 马廷升, 李 高, 宋思才, 等. 盐酸青藤碱脂质体制备工艺的研究 [J]. 中国药师, 2007, 10(3): 209-211.
- [9] 王 岩, 周莉玲. 青藤碱脂质体的制备及稳定性研究 [J]. 中成药, 2005, 27(7): 757-760.
- [10] 郑 宁, 张立德. 脂质体质量控制方法的研究概况 [J]. 中国新药杂志, 2004, 13(12): 1282-1286.
- [11] 中国药典[S]. 二部. 2010.
- [12] 郑杭生, 佐 拉·沙肯迪克, 王湘林, 等. 离心沉淀-离心超滤法测定盐酸青藤碱脂质体的包封率 [J]. 中草药, 2011, 42(8): 1523-1527.
- [13] 郑杭生, 张亚军, 张 彤, 等. 全缘千里光碱脂质体凝胶剂制备工艺的研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(7): 510-515.