

苯丁酸氮芥脂质体的制备及处方因素考察

齐和日玛, 塔娜, 王建娜, 成日青, 郭慧卿, 马岚, 萨仁高娃* (内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

摘要: 目的 制备苯丁酸氮芥脂质体并优化其处方。方法 薄膜超声分散法制备苯丁酸氮芥脂质体, 采用微柱离心-HPLC法测定其包封率, 以包封率为考察指标, 研究膜材比、药脂比、水相介质 pH 值以及磷脂浓度等因素对脂质体包封率的影响; 通过正交试验对处方进行优化, 并进行质量评价。结果 苯丁酸氮芥脂质体优化后的制备处方为胆固醇与磷脂质量比 1:3、药脂比 1:10、水相介质 pH 值为 7.4、磷脂浓度为 0.3%。按该处方制得的苯丁酸氮芥脂质体包封率>87%, 平均粒径为 84.71 nm, PDI 为 0.167。结论 优选处方稳定可行, 制备的苯丁酸氮芥脂质体包封率高、粒径小且均匀。

关键词: 苯丁酸氮芥; 脂质体; 包封率; 单因素; 正交设计

中图分类号: R943.4 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)02-0138-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.002

引用本文: 齐和日玛, 塔娜, 王建娜, 等. 苯丁酸氮芥脂质体的制备及处方因素考察[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 138-141.

Preparation and Study on Formulation of Chlorambucil Liposome

Qiherima, Tana, WANG Jianna, CHENG Riqing, GUO Huiqing, MA Lan, Sarengaowa* (School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare chlorambucil liposome, and to optimize the formulation of chlorambucil liposome. **METHODS** Chlorambucil liposome were prepared by film-ultrasound method and the encapsulation efficiency was measured by microcolumn centrifugation-HPLC method. The single factors such as the ratio of cholesterol to phospholipid, the ratio of drug to phospholipid, the pH value of aqueous phase and the concentration of phospholipid were studied. And the orthogonal design was adopted to obtain the optimized prescription, and the quality evaluation was carried out. **RESULTS** The best prescription was as follows: the ratio of cholesterol to phospholipid was 1:3; the ratio of drug to phospholipid was 1:10; the pH value of aqueous phase was 7.4 and the concentration of phospholipid was 0.3%. The encapsulation efficiency of the chlorambucil liposome prepared according to the prescription was >87%, the average particle size was 84.71 nm, and the PDI was 0.167. **CONCLUSION** The chlorambucil liposome prepared according to the optimized formulation has higher encapsulation efficiency with small and uniform particle size.

KEYWORDS: chlorambucil; liposome; encapsulation efficiency; single factor; orthogonal design

苯丁酸氮芥为芳香氮芥衍生物, 广泛用于肿瘤的治疗, 主要包括慢性淋巴细胞白血病、恶性淋巴瘤、部分乳腺癌、多发性骨髓瘤及巨球蛋白血症等^[1]。但苯丁酸氮芥易水解、几乎不溶于水, 限制了其药效^[2-3]。脂质体以磷脂为主要膜材, 与生物膜的成分相似, 组织相容性好, 有一定缓释作用, 适合静脉使用, 可明显增加药物溶解性和稳定性^[4], 提高生物利用度, 减少给药剂量。为了探索传统抗肿瘤药物的新剂型, 本实验制备了苯丁酸氮芥脂质体给药系统, 优化了其处方工艺, 并对该制剂的质量进行了评价, 为苯丁酸氮芥新的脂质体注射剂型的研发提供参考。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(日本岛津公司, L-2130 泵、L-2400 检测器), 色谱柱为 DiamonsilTM C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); BFX5-320 型自动平衡离心机(河北省安阳县白洋离心机厂); TKH-250DB 超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); R-1001N 旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司); ZKB-1-4 型循环水多用真空泵(山东省聊城华鲁电热仪器有限公司); AL204 型电子天平[梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司]。

苯丁酸氮芥对照品(批号: MB7203; 纯度>98.78%)、苯丁酸氮芥原料药(批号: MB1052;

基金项目: 内蒙古医科大学科技百万工程项目(2015YKDKJBW01); 内蒙古医科大学“实验室开放基金”项目(2016ZN22)

作者简介: 齐和日玛, 女, 博士, 副教授 Tel: (0471)6653153
研究员 Tel: (0471)6653692 E-mail: nmgsaren@163.com

E-mail: qiherima@126.com *通信作者: 萨仁高娃, 女, 博士, 副研

纯度>98%)和胆固醇(批号: M0125A)均来源于大连美仑生物技术有限公司; 大豆磷脂(上海太伟药业有限公司, 批号: 20140701); 甲醇(色谱纯, Fisher Scientific); 其他试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 苯丁酸氮芥脂质体的制备

采用薄膜超声法制备。准确称取适量苯丁酸氮芥、磷脂、胆固醇, 溶于一定量无水乙醇中, 45 °C水浴条件下, 常压旋蒸 30 min, 缓慢减压至 0.07 MPa, 将有机溶剂蒸出, 然后减至最大压旋蒸 30 min, 使脂质体均匀成膜。加入 10 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)使膜充分水化, 40 °C水浴振荡水化 2 h, 使膜完全脱落, 冰水浴中超声 30 min, 至均一体系, 即得苯丁酸氮芥脂质体混悬液, 4 °C下保存, 备用。空白脂质体除不加苯丁酸氮芥药物外, 其他条件同上。

2.2 包封率(encapsulation efficiency, EE)测定方法的建立

2.2.1 检测波长的测定 分别取适量苯丁酸氮芥和空白脂质体置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容。在 200~700 nm 以甲醇为参比进行波谱扫描, 结果显示在 302 nm 波长处吸收最强, 故选择 302 nm 为检测波长。

2.2.2 色谱条件的建立 色谱柱为 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(72:28); 柱温 30 °C; 流速为 1 mL·min⁻¹; 紫外检测波长为 302 nm; 进样量 20 μL。色谱结果表明, 苯丁酸氮芥游离药物与空白脂质体分离良好, 辅料对苯丁酸氮芥的测定无干扰。

2.2.3 标准曲线的制作 精密称取苯丁酸氮芥对照品适量, 用甲醇溶解, 制备 0.1 mg·mL⁻¹对照品储备液。分别精密量取对照储备液 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容并按“2.2.2”项下色谱条件进样测定。以苯丁酸氮芥浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标进行回归, 得标准曲线方程 $Y=11\ 008X+5\ 636(R^2=0.999\ 7)$ 。结果表明, 苯丁酸氮芥在 2~100 μg·mL⁻¹内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.4 稳定性试验 取“2.2.3”项下对照品溶液, 在 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 分别按“2.2.2”项下色谱条件进样测定, 计算 RSD 为 1.63%, 表明对照品

溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.5 仪器精密度试验 分别取 2, 10, 100 μg·mL⁻¹的对照品溶液, 按“2.2.2”项下色谱条件分别进样 5 次测定, 计算精密度 RSD 分别为 1.11%, 0.60%, 1.26%(n=5), 表明仪器精密度良好。

2.2.6 回收率试验 取对照品储备液 0.5, 1.0, 5.0 mL 置于 3 个 10 mL 量瓶中, 分别加入 0.5 mL 空白脂质体混悬液, 用甲醇破乳并稀释至刻度, 按“2.2.2”项下色谱条件进样测定。每个浓度测定 3 次, 得平均回收率分别为 98.69%, 98.40%, 99.24%, RSD 分别为 0.52%, 1.34%, 1.71%。

2.2.7 EE 的测定 采用微柱离心-HPLC 法^[5]。经方法学考察, 微柱对游离苯丁酸氮芥的截留率为(96.89±0.68%)(n=3), 微柱对空白脂质体的回收率为(98.12±0.42%)(n=3), 微柱对空白脂质体和苯丁酸氮芥混合物中苯丁酸氮芥的截留率为(97.83±0.58%)(n=3)。具体实验操作如下: 取葡聚糖凝胶颗粒(Sephadex G-50)适量, 浸泡在蒸馏水中使其充分溶胀, 加热煮沸 1 h, 冷却后装入底部垫有 2 张滤纸片的 2.5 mL 注射器中。于离心机中, 2 000 r·min⁻¹离心 2 min, 备用。取脂质体混悬液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 超声 5 min, 按“2.2.2”项下色谱条件进样测定, 计算总的药物含量 W_0 。另取脂质体混悬液 1 mL, 加于微柱顶端, 待脂质体缓慢进入微柱, 在 2 000 r·min⁻¹离心 2 min, 收集洗脱液; 然后取 1 mL PBS 溶液, 加于微柱顶端, 继续收集洗脱液, 重复 2 次, 3 次洗脱液收集在 10 mL 量瓶中, 用甲醇破乳并稀释至刻度, 按“2.2.2”项下色谱条件进样测定, 计算被包封药物的质量浓度 W_1 , 根据公式计算 EE, $EE(\%)=W_1/W_0\times 100\%$ 。

2.3 苯丁酸氮芥脂质体处方的单因素考察

2.3.1 膜材比对 EE 的影响 磷脂和胆固醇分子相互间隔定向排列组成脂质体膜, 其中胆固醇具有双亲性, 主要与磷脂结合, 阻止磷脂凝集成晶体结构, 起调节膜结构流动性的作用^[6]。固定其他条件, 选取胆固醇与磷脂的质量比 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 制备脂质体, 测定其 EE 分别为 76.3%, 76.4%, 83.8%, 74.1%, 60.6%。实验结果表明, 随着磷脂用量的增加, 脂质体的 EE 也随之增加, 当胆固醇与磷脂质量比达到 1:3, 制得的脂质体 EE 最高。胆固醇像“缓冲剂”起着调节膜

结构“流动性”的作用，起到提高脂质体 EE 和稳定性的作用。但当胆固醇用量较大时，会与脂溶性药物竞争磷脂双分子层位置^[7]，从而导致脂质体 EE 降低。

2.3.2 药脂比对 EE 的影响 载药量相对膜材浓度较小时，膜内外浓度差较小，药物不易进入脂质体囊泡，导致 EE 较低。而药量相对膜材浓度过多时，超过膜的饱和限度，从而导致药物渗漏，EE 反而会降低^[8]。固定处方中磷脂用量，分别以药脂比为 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 制备脂质体，测定包封率分别为 75.2%, 83.6%, 68.3%, 61.8%。结果表明，当药脂比为 1:10 时，脂质体 EE 最高。

2.3.3 水相介质 pH 值对 EE 的影响 pH 值会影响磷脂的水解以及脂质体被氧化的速度。固定膜材比 1:3, 药脂比 1:10, PBS 溶液 pH 值分别为 5.8, 6.5, 7.4, 8.0 制备脂质体，测定 EE，结果分别为 64.7%, 83.6%, 81.5%, 68.8%。结果表明，当水相介质 pH 值 6.5 时，脂质体 EE 最高。

2.3.4 磷脂浓度对 EE 的影响 固定处方中膜材比为 3:1, 药脂比为 1:10, 水相介质 pH 值为 6.5, 制备磷脂浓度为 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5% 的脂质体，考察 EE 结果分别为 68.9%, 70.0%, 81.8%, 53.2%, 39.4%。结果表明，磷脂浓度为 0.3% 时，所制得的脂质体 EE 最高。

2.4 正交设计优化苯丁酸氮芥脂质体处方

在单因素考察的基础上，选择膜材比(A), 药脂比(B), 磷脂浓度(C), 水相介质 pH 值(D)4 个因素，每个因素又设 3 个水平，进行正交试验，以包封率为考察指标筛选处方。正交试验因素水平设计见表 1。选用 $L_9(3^4)$ 正交表得 9 组处方，分别制得苯丁酸氮芥脂质体，测定其 EE，试验结果见表 2，方差分析见表 3。根据表中极值(R)直观分析可知，各因素重要程度依次为 $A>D>B>C$ ，最佳处方为 $A_2D_3B_2C_1$ ，即胆固醇与磷脂质量比 1:3, 药脂比 1:10, 水相介质 PBS 的 pH 值为 7.4, 磷脂浓度 0.1%。

表 1 正交试验因素水平设计

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal design

水平	因素 A	因素 B	因素 C	因素 D
1	1:2	1:5	0.1	5.8
2	1:3	1:10	0.2	6.5
3	1:4	1:15	0.3	7.4

表 2 正交试验结果(n=3)

Tab. 2 Result of orthogonal design(n=3)

No.	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	77.1
2	1	2	2	2	81.6
3	1	3	3	3	81.8
4	2	1	2	3	85.1
5	2	2	3	1	83.7
6	2	3	1	2	82.6
7	3	1	3	2	73.2
8	3	2	1	3	79.5
9	3	3	2	1	71.4
K_1	80.17	78.47	79.73	77.40	
K_2	83.80	81.60	79.37	79.13	
K_3	74.70	78.60	79.57	82.13	
R_j	9.10	3.13	0.37	4.73	

表 3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	125.896	2	622.560	0.002
B	18.836	2	93.143	0.011
D	34.409	2	170.154	0.006
C(误差)	0.202	2		

2.5 验证试验及质量评价

按“2.4”项下最优处方，制备 3 批苯丁酸氮芥脂质体，测定 EE 分别为 88.2%, 88.4%, 87.7%，制备工艺重复性良好。外观呈均匀的乳白色混悬液。平均粒径为 84.71 nm, PDI 为 0.167, 见图 1。粒度较为均匀，相互之间无明显聚集现象，见图 2。4 °C 下放置 15 d, 无沉淀生成，EE 平均值降低 2.3%，稳定性良好。

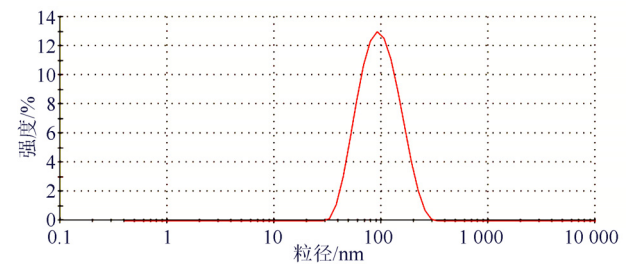


图 1 苯丁酸氮芥脂质体粒径分布图

Fig. 1 Partical size distribution of chlorambucil liposome

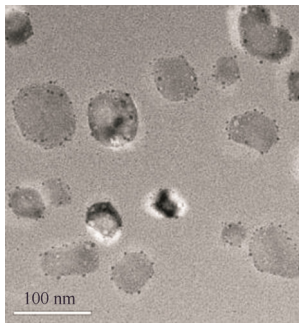


图2 苯丁酸氮芥脂质体透射电镜照片

Fig. 2 Transmission electronic microphotograph of chlorambucil liposome

3 讨论

EE 是脂质体研究的重要考察指标, 其测定方法包括透析法、凝胶柱色谱法、低速离心法、微柱离心法等^[9-10]。透析法费时, 被包封药物在长时间的膜平衡中渗漏造成结果偏低。凝胶柱色谱法消耗时间长, 不易控制洗脱液的流量。本实验尝试采用低速离心法, 用 PBS 缓冲溶液洗脱, 但其分离效果不佳。经多次试验考察, 建立了测定苯丁酸氮芥脂质体 EE 的葡聚糖凝胶微柱离心法, 可以将脂质体与游离药物分离, 方法简便, 重复性良好。

曾采用乙醇注入法制备苯丁酸氮芥脂质体, 但其粒度较大, 且稳定性差。本实验采用薄膜超声分散法制备苯丁酸氮芥脂质体, 该法制得的苯丁酸氮芥脂质体 EE 高, 稳定性好, 且粒径 < 100 nm, 符合静脉注射剂型的要求, 对苯丁酸氮芥新剂型的研发有一定的参考价值。

REFERENCES

- [1] LI Y H. Preparation and property of the nanohybrids of anticancer drugs and layered double hydroxides [D]. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2010.
- [2] SONG H L, NIE S F, YANG X G. Characterization and *in vivo* evaluation of novel lipid-chlorambucil nanospheres prepared using a mixture of emulsifiers for parenteral administration [J]. *Int J Nanomed*, 2010, 5(1): 933-942.
- [3] HUANG Y, FAN X D. Inclusion mechanism of β -cyclodextrin with chlorambucil [J]. *Chin J Appl Chem(应用化学)*, 2003, 20(1): 38-41.
- [4] WANG X Y, MIAO Z L, CHEN C. Preparation and study on formulation of sirolimus liposomes [J]. *Chin J Antibiot(中国抗生素杂志)*, 2010, 35(2): 119-122.
- [5] WANG M, DENG Y J, WANG N. Determination of the entrapment efficiency of tetracaine hydrochloride liposome by the microcolumn centrifugation-HPLC [J]. *China Pharm(中国药房)*, 2009, 20(28): 2226-2228.
- [6] 崔福德. 药剂学[M]. 第七版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 404
- [7] WU H Q, LAN T, XU Y Z, et al. Preparation of resveratrol trimethyl ether liposomes and their quality evaluation [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2012(9): 1746-1750.
- [8] WANG Y L, ZHANG M M, LI W S, et al. Preparation and quality evaluation of chrysophanol liposome [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2011, 20(9): 825-827.
- [9] ZOU G S, MEI H, PAN X, et al. Determination and entrapment efficiency of lidocaine and prilocaine in compound ethosomes by HPLC [J]. *Pharm Today(今日药学)*, 2017, 27(11): 739-741, 744.
- [10] JIN Y, ZHU S N, CHEN Y. Preparation of pazufloxacin ultra deformable liposomes and it's properties study [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志)*, 2016, 35(6): 437-440.

收稿日期: 2018-04-20

(本文责编: 曹粤锋)