

# 洛莫司汀-碘海醇复方脂质体的制备及包封率测定

杨硕晔<sup>1\*</sup>, 王杏林<sup>2</sup>, 杨志强<sup>2</sup>(1.河南工业大学生物工程学院, 郑州 475001; 2.天津药物研究院, 天津 300193)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)01-0048-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.01.17

**摘要** 目的:制备洛莫司汀-碘海醇复方脂质体,并考察其质量、测定其包封率。方法:以逆相蒸发法制备复方脂质体;以磷脂种类(A)、磷脂与胆固醇质量比(B)、脂质质量浓度(C)为因素,以两主药的包封率为评价指标,采用正交设计法优化处方;以两主药的包封率及脂质体的粒径和Zeta电位为指标进行验证试验。结果:优化处方结果显示,A为大豆磷脂80,B为2:1,C为33 mg/ml。验证试验结果显示,洛莫司汀包封率约为75.7%,碘海醇包封率约为65.7%;脂质体粒径约为236.5 nm,Zeta电位约为-42.2 mV。结论:采用该处方与工艺可成功制备包封率较高的洛莫司汀-碘海醇复方脂质体,质量符合要求。

**关键词** 洛莫司汀;碘海醇;复方脂质体;制备;正交试验;包封率

## Preparation of Lomustine-iohexol Compound Liposomes and Determination of the Entrapment Efficiency

YANG Shuo-ye<sup>1</sup>, WANG Xing-lin<sup>2</sup>, YANG Zhi-qiang<sup>2</sup>(1.College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 475001, China; 2.Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Lomustine-iohexol compound liposomes, and to evaluate the properties and determine the entrapment efficiency. METHODS: Compound liposomes were prepared by reverse evaporation method; orthogonal design was used to optimize the formulation with the types of phospholipid (A), the proportion of phospholipid to cholesterol (B) and the content of lipid (C) as factors using the entrapment efficiency of two main components as index. The entrapment efficiency of two main components, particle size and Zeta-potential of Compound liposomes were determined to validate the formulation. RESULTS: The optimal formulation was as follows: A was soybean phospholipid 80; B was 2:1; C was 33 mg/ml. The entrapment efficiency of lomustine was 75.7% and that of iohexol was 65.7%; the particle size of compound liposomes was 236.5 nm, and Zeta potentials of them were -42.2 mV. CONCLUSIONS: The formulation and preparation technology can be used to prepare Lomustine-iohexol compound liposomes with high entrapment efficiency successfully, and the quality of them is up to the standard.

**KEYWORDS** Lomustine; Iohexol; Compound liposome; Preparation; Orthogonal design; Entrapment efficiency

洛莫司汀(Lomustine)为亚硝基脲类烷化剂,具有广谱抗肿瘤作用,临床主要用于治疗脑瘤、恶性淋巴瘤、肺癌及黑色素瘤等<sup>[1]</sup>,主要剂型为胶囊剂;其不良反应较严重,例如胃肠道反应及迟发的骨髓抑制。碘海醇(Iohexol)是常用的非离子造影剂,具有水溶性大、黏度小、渗透压低等优点,主要用于脊髓、血管、泌尿系统、骨关节及淋巴管造影、电子计算机断层扫描(CT)增强等<sup>[2]</sup>。

将洛莫司汀和碘海醇一起包封于脂质体中,可通过造影明确肿瘤部位,确定脂质体到达时间,同时在肿瘤内同步定位释放化疗药物,可显著提高疗效,减少全身化疗的副作用。此外,洛莫司汀为脂溶性药物,而碘海醇的水溶性较好,包封两种药物基本不存在空间竞争问题。目前,国内外药剂学领域对于同时包封两种药物的复方型脂质体研究的报道较少,故可参考的文献有限。本试验制备了洛莫司汀-碘海醇复方脂质体,并建立了鱼精蛋白凝聚法测定该脂质体的包封率,为进一步研制复方热敏型脂质体提供了研究手段。

## 1 材料

RE52CS型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);SHB-III型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司);AS3120型超声波清洗仪(天津特纳科学仪器厂);KA-1000型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);PDJ-0.5L型真空冷冻干燥机(上

海浦东冷冻干燥设备有限公司);Nano-ZS90型激光粒度分析仪(英国Malvern公司);Laballiance高效液相色谱仪,包括Series1500泵、As3000自动进样器、Model 500检测器、HT-230A柱温箱、Anastar色谱工作站(美国Laballiance公司)。

洛莫司汀原料药(山东潍坊制药厂有限公司,批号:101181-200901,纯度:99.6%);碘海醇原料药(浙江司太立制药有限公司,批号:090621,纯度:99.4%);注射用大豆磷脂(上海太伟药业有限公司,种类为95和80,批号:111026、110712);胆固醇(上海市徐汇化学试剂供应站,批号:20091116);硫酸鱼精蛋白注射液(上海第一生化药业有限公司,含量:10 mg/ml,规格:每支10 ml);维生素E(VE,广州日康食用化工有限公司);甲醇(色谱纯,天津康科德科技有限公司);乙腈(色谱纯,美国Fisher公司);其余试剂均为分析纯,购自天津康科德科技有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 洛莫司汀-碘海醇复方脂质体的制备

2.1.1 制备工艺。采用逆相蒸发法制备复方脂质体<sup>[3]</sup>。取洛莫司汀、注射用大豆磷脂、胆固醇和抗氧化剂VE置于茄形瓶中,加乙醚溶解,25℃下减压蒸发成膜,加乙醚溶解。另取碘海醇加纯净水溶解,将两种药液置于0℃水浴中,振摇至温度平衡,超声,同时取碘海醇溶液滴入乙醚溶液中,振摇使乳化均匀,继续振摇超声2 min。在水浴温度25℃、真空度<0.05 MPa条件下旋转蒸发,形成凝胶后加纯净水分散,除去剩余乙

\* 讲师,博士。研究方向:药剂学与药动学。电话:0371-67756371。E-mail:yangshuoyehaut@163.com

醚,过0.45 μm滤膜,4℃保存备用。

2.1.2 处方考察与优化。采用正交设计法优化复方脂质体处方。在单因素考察预试验的基础上,选择对包封率影响显著的3个因素作为考察对象,即磷脂种类(A)、磷脂与胆固醇质量比(B)、脂质质量浓度(C)<sup>[4]</sup>,每个因素取3个水平,按正交设计L<sub>9</sub>(3<sup>3</sup>)表安排试验,详见表1;以洛莫司汀和碘海醇的包封率为评价指标,根据预期的试验目的,取两种药物包封率的权重均为0.5,对结果进行分析,详见表2、表3、表4。

表1 影响因素及因素水平取值

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(磷脂种类)	B(磷脂与胆固醇质量比)	C(脂质质量浓度,mg/ml)
1	注射用大豆磷脂95	9:1	90
2	注射用大豆磷脂80	5:1	67
3	卵磷脂	2:1	33

表2 正交试验设计及试验结果

Tab 2 Design and results of orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	洛莫司汀包封率,%	碘海醇包封率,%	综合评分
1	1	1	1	1	42.6	22.3	32.5
2	1	2	2	2	38.7	18.4	28.6
3	1	3	3	3	66.9	37.6	52.3
4	2	1	2	3	58.4	42.6	50.5
5	2	2	3	1	71.3	42.3	56.8
6	2	3	1	2	44.2	43.1	43.7
7	3	1	3	2	39.5	40.8	40.2
8	3	2	1	3	62.3	49.7	56.0
9	3	3	2	1	42.2	50.2	46.2

表3 正交试验结果极差分析

Tab 3 Range analysis of orthogonal experiment

项目	A	B	C	D
K <sub>1</sub>	37.80	41.07	44.07	45.17
K <sub>2</sub>	50.33	47.13	41.77	37.50
K <sub>3</sub>	47.47	47.40	49.77	52.93
R	12.533	6.33	8.00	15.43

表4 正交试验结果方差分析

Tab 4 Variance analysis of orthogonal experiment

方差来源	离差平方和	自由度	F值	F临界值	P
A	258.75	2	1.302	4.46	0.039
B	76.99	2	0.387	4.46	0.62
C	101.78	2	0.512	4.46	0.18
误差	794.80	8			

试验结果表明,各因素对洛莫司汀和碘海醇的包封率影响程度大小顺序为A>C>B,最优组合为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>,即磷脂选择注射用大豆磷脂80,磷脂与胆固醇质量比为2:1,脂质质量浓度为33 mg/ml。

## 2.2 复方脂质体冻干制剂的制备

2.2.1 冻干工艺。取复方脂质体2 ml,置于冻干瓶中,半加塞预冻,将温度降至-40℃以下,保持3 h,分别依次将搁板温度升至-20℃,升华2 h(渗气控制在15 Pa);升至-15℃,升华6 h;升至-10℃,保持13 h;最后将搁板温度升至0℃,干燥6 h,压胶塞,即得<sup>[4]</sup>。整个冻干过程中的时间-温度冻干曲线见图1,表明该工艺有效地将脂质体制成冻干制剂。使用前加入注射用水,振摇充分即可重新形成脂质体混悬液。

2.2.2 共晶点测定。采用电阻法测定复方脂质体的共晶点,测得结果为-7℃,符合冻干制剂共晶点<0℃的要求。

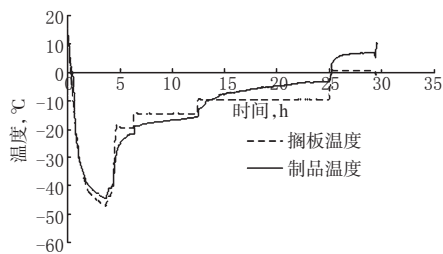


图1 时间-温度冻干曲线

Fig 1 The curve of time-temperature freeze-drying

2.2.3 解吸干燥。解吸干燥阶段最初条件是每30 min升5℃,升至25℃后保持4 h,结果在此条件下冻干后洛莫司汀的含量下降至冻干前的20%;将解吸干燥温度控制在0℃,结果冻干后洛莫司汀含量稳定。

2.2.4 冻干保护剂。复方脂质体中碘海醇的质量浓度较高(约为240 mg/ml),由于碘海醇为多元醇,在制剂中可起到保护作用而无需另加冻干保护剂,故将脂质体直接冻干即可。

## 2.3 验证试验

制备复方脂质体3批,分别取适量,用纯净水稀释,Nano-ZS90型激光粒度分析仪测定,动态光散射软件进行数据处理,记录平均粒径和Zeta电位。

3批样品的包封率与粒径、Zeta电位测定结果见表5。

表5 3批复方脂质体的包封率、粒径及Zeta电位测定结果

Tab 5 Determination results of entrapment efficiency, particle size and Zeta-potential of 3 batches of compound liposomes

批号	洛莫司汀包封率,%		碘海醇包封率,%		粒径, nm	Zeta电位, mV
	非冻干	冻干制剂	非冻干	冻干制剂		
1	78.7	75.4	68.7	62.4	237.3	-38.6
2	75.4	77.3	65.4	61.7	216.4	-44.1
3	72.9	68.5	62.9	63.1	255.7	-43.9
平均值	75.7	73.7	65.7	62.4	236.5	-42.2

由表5结果可知,脂质体冻干后包封率基本无变化,表明冻干制剂稳定,所用冻干工艺合理有效。

## 3 鱼精蛋白凝聚法测定包封率

鱼精蛋白用量-澄清度试验:取硫酸鱼精蛋白注射液(10 mg/ml)适量,将其分别稀释2、4、8、16、32、64、128、256倍,记为0(不稀释)、1、2、3、4、5、6、7、8号稀释液。取100 μl复方脂质体,加入100 μl 0号液,振摇混匀,放置约3 min,精确加入5.0 ml纯净水,离心(相对离心力350×g)15 min,取上清液于540 nm波长处测定吸光度,记为A<sub>0</sub>;另取100 μl复方脂质体直接加入5 ml纯净水,放置离心后取上清液于540 nm波长处测定吸光度<sup>[3,6]</sup>,记为A<sub>总</sub>,以(A<sub>总</sub>-A<sub>0</sub>)/A<sub>总</sub>×100%计算澄清度。同法,分别测定1~8号稀释液(鱼精蛋白用量分别为0.5、0.25、0.125、0.063、0.031、0.016、0.008、0.004 mg)分离脂质体所得上清液的澄清度,结果见图2。

由图2可知,极低量的鱼精蛋白(0.016 mg)就能达到较好的分离效果(澄清度98%以上)。

### 3.1 洛莫司汀的包封率测定

采用鱼精蛋白凝聚法分离脂质体与游离药物。精密吸取复方脂质体100 μl,加鱼精蛋白注射液100 μl,按“鱼精蛋白用量-澄清度”试验下方法操作,取上清液进样,计算游离药物的质量(W<sub>1</sub>);另精密吸取复方脂质体100 μl,加入甲醇5 ml溶解,摇匀,进样测定,计算药物总质量(W<sub>0</sub>)。按包封率=(1-W<sub>1</sub>/W<sub>0</sub>)×100%,计算洛莫司汀的包封率。

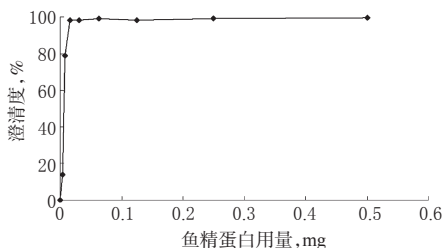


图2 鱼精蛋白用量对脂质体分离效果的影响

Fig 2 Effect of the amount of protamine on the separation of liposome

### 3.2 碘海醇的包封率测定

按“3.1”项下方法操作,取上清液 100  $\mu\text{l}$ ,置于 25 ml 量瓶中,加入流动相定容,摇匀进样,计算游离药物的质量( $W_2$ );另精密吸取复方脂质体 100  $\mu\text{l}$ ,置于 10 ml 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,精密量取 100  $\mu\text{l}$ ,置于 10 ml 量瓶中,加流动相定容,摇匀进样,计算药物总质量( $W_0$ )。按包封率 $=[1 - (W_2/W_0) \times 1.25] \times 100\%$ ,计算碘海醇的包封率。分别测定脂质体冻干制剂与非冻干制剂的药物包封率。

### 3.3 鱼精蛋白用量对洛莫司汀包封率的影响

取 100  $\mu\text{l}$  复方脂质体,加入 100  $\mu\text{l}$  鱼精蛋白注射液,按“3.1”项下方法分离脂质体与游离药物,取上清液,使用高效液相色谱法测定洛莫司汀的包封率(有关洛莫司汀与碘海醇包封率测定的液相色谱分析条件已另文发表<sup>[7]</sup>)。同法,分别测定 1、2、3、4、5、6 号稀释液(鱼精蛋白用量分别为 0.5、0.25、0.125、0.063、0.031、0.016 mg)分离脂质体所得洛莫司汀的包封率,结果见图 3。

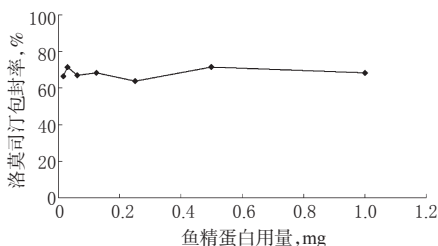


图3 鱼精蛋白用量对洛莫司汀包封率的影响

Fig 3 Effect of the amount of protamine on the entrapment efficiency of lomustine

由图 3 可知,鱼精蛋白用量在 0.016~1.0 mg 范围内,洛莫司汀包封率在 63%~72% 之间,说明鱼精蛋白用量对洛莫司汀包封率的影响不大。

### 3.4 鱼精蛋白用量对碘海醇包封率的影响

按“3.1”项下方法分离脂质体与游离药物,分别测定 1、2、3、4、5、6 号稀释液分离脂质体所得碘海醇的包封率,结果见图 4。

由图 4 可知,鱼精蛋白用量在 0.016~1.0 mg 范围内,碘海醇包封率在 56%~65% 之间,说明鱼精蛋白用量对碘海醇包封率的影响不大。

### 3.5 洛莫司汀的回收率测定

配制低(80%)、中(100%)、高(120%)质量浓度的洛莫司汀氯仿溶液,60  $^{\circ}\text{C}$   $\text{N}_2$  吹干,分别加入空白脂质体适量并混合均匀,吸取 100  $\mu\text{l}$ ,加入 100  $\mu\text{l}$  鱼精蛋白注射液,按“3.1”项下方法操作,取上清液进样测定,计算回收率分别为 97.2%、95.8%、98.1%, $\text{RSD}=1.58\%$  ( $n=3$ )。

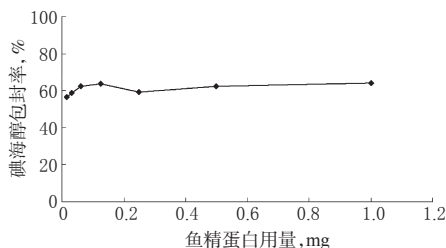


图4 鱼精蛋白用量对碘海醇包封率的影响

Fig 4 Effect of the amount of protamine on the entrapment efficiency of iodohexol

### 3.6 碘海醇的回收率测定

配制低(80%)、中(100%)、高(120%)质量浓度的碘海醇水溶液,分别加入空白脂质体适量并混合均匀,余下操作同洛莫司汀的回收率测定,计算回收率分别为 98.5%、97.4%、96.8%, $\text{RSD}=1.42\%$  ( $n=3$ )。

## 4 讨论

包封率是评价脂质体制剂质量的重要指标,通常将游离药物与脂质体进行分离,分别测定游离药物质量与制剂中总药物质量,计算包封率<sup>[8]</sup>。鱼精蛋白是一种多聚阳离子,主要由碱性氨基酸组成,与脂质体混合后可通过静电作用吸附于其表面,增加其密度使游离药物与脂质体在较低离心力下达到有效分离<sup>[9-10]</sup>。该法具有快速、用量少、可操作性强等优点,同时由于其作用原理是静电引力吸附而与脂质体中包封的药物无关,故对大多数药物组成的脂质体均适用。

对于脂质体的预处理,笔者曾尝试使用葡聚糖凝胶过滤法、透析法和超速离心法,但由于本试验研制的复方脂质体同时包封两种药物,且洛莫司汀与碘海醇溶解性差异较大,以上方法均不能将脂质体和游离药物有效分离。鱼精蛋白凝聚法通过絮凝作用增加脂质体的密度,在较低转速下就可达到有效分离。结果证明该法简单、快速、分离效果好、回收率稳定,加入的鱼精蛋白不影响药物测定,故最终选用鱼精蛋白凝聚法。

脂质体在液体状态下存在分散系统不稳定的问题,如药物渗漏、粒子聚集及长期储存分层等。冷冻干燥是提高脂质体稳定性行之有效的方法,该法可使药物保持原有的理化性质和生理活性,且有效成分损失极少;冻干制剂特有的疏松多孔结构还可使药物易于复水而恢复活性<sup>[11-13]</sup>。本试验将复方脂质体制成冻干制剂,可提高其稳定性,利于长期保存。

本试验制得的复方脂质体中两种药物的包封率与《中国药典》要求相比有一定的距离,但通过查阅国外大量文献可知,对于水溶性药物(如碘海醇),由于自身性质所限,其包封率较难提高,在 2005 年发布的碘海醇脂质体(单方)日本专利中,其平均包封率约为 50%<sup>[14]</sup>。同时,在目前国内外对脂质体的研究中,将两种理化性质完全不同的药物同时包封的先例很少,在这方面没有较好的经验可供参考,因此,对于复方脂质体药物包封率的提高仍有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Lewandowicz GM, Harding B, Harkness W, et al. Chemoresponsivity in childhood brain tumours in vitro: evidence of differential sensitivity to lomustine (CCNU) and vincristine[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(15): 1955.
- [2] 浦英彦. CT 增强扫描的护理配合[J]. *中华临床医学卫生杂志*, 2006, 4(9): 80.
- [3] Huang YZ, Gao JQ, Chen JL, et al. Cationic liposomes

# 透明质酸钠微球制备工艺的研究

李丹<sup>1\*</sup>, 初阳<sup>2</sup>(1.沈阳医学院奉天医院药学部, 沈阳 110024; 2.中国医科大学附属第一医院药学部, 沈阳 110024)

中图分类号 R944.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)01-0051-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.01.18

**摘要** 目的:制备透明质酸钠微球,为进一步制备透明质酸钠缓释制剂提供参考。方法:采用乳化-交联法制备。对方因素、工艺因素进行单因素试验,在此基础上以包封率为指标,以海藻酸钠质量分数(A)、透明质酸钠与海藻酸钠质量比(B)、交联时间(C)和分散转速(D)为因素设计正交试验优化制备工艺,再通过考察最佳工艺制备的微球的粒径和包封率进行验证试验。结果:优化工艺中A为2%、B为1:3、C为90 min、D为200 r/min。验证试验中微球的平均粒径为 $(107.8 \pm 5.51) \mu\text{m}$ 、包封率为 $(58.92 \pm 3.06)\%$ 。结论:乳化-交联法制备透明质酸钠微球工艺简单、易行。本研究可为进一步制备透明质酸钠缓释制剂奠定基础。

**关键词** 透明质酸钠;微球;制备工艺;正交试验

## Preparation Technology of Sodium Hyaluronate-loaded Microspheres

LI Dan<sup>1</sup>, CHU Yang<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Fengtian Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China; 2.Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110024, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Sodium hyaluronate-loaded microspheres, and to provide reference for sustained-release preparation. METHODS: Sodium hyaluronate-loaded microspheres were prepared by emulsion-cross linking method. The single factor test was performed for prescription factor and technology factor. The preparation technology of microspheres was optimized by orthogonal test with encapsulation efficiency (EE) as index using the concentration of sodium alginate (A), ratio of sodium hyaluronate to sodium alginate (B), crosslinking time (C) and dispersion speed (D) as factors. The investigating particle size and EE of microspheres verification test was carried out by particle size and EE of microspheres. RESULTS: The optimal technology was as follows: A of 2%, B of 1:3, C of 90 min and D of 200 r/min. The EE of the microspheres was  $(58.92 \pm 3.06)\%$  with mean diameter of  $(107.8 \pm 5.51) \mu\text{m}$ . CONCLUSIONS: The emulsion-cross linking method is simple, feasible and lays the foundation for the preparation of Sodium hyaluronate-loaded sustained-release preparation.

**KEYWORDS** Sodium hyaluronate; Microspheres; Preparation technology; Orthogonal test

- modified with non-ionic surfactants as effective non-viral carrier for gene transfer[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, 49(2):158.
- [4] 卫晓晓, 焦海胜. 卡马西平口腔速崩片的制备及质量评价[J]. *中国药房*, 2011, 22(5):425.
- [5] Kuu WY, Hardwich LM, Akers MJ, et al. Correlation of laboratory and production freeze drying cycles[J]. *Int J Pharm*, 2005, 302(1/2):56.
- [6] Yang SY, Zheng Y, Chen JY, et al. Comprehensive study of cationic liposomes composed of DC-Chol and cholesterol with different mole ratios for gene transfection[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 101:6.
- [7] 杨硕晔, 王杏林, 杨志强, 等. HPLC法测定洛莫司汀-碘海醇复方脂质体的药物含量及包封率[J]. *药物评价研究*, 2009, 32(1):38.
- [8] 陈召红, 刘舫阳, 魏亚超. 脂质体包封率测定方法研究进展[J]. *解放军药学报*, 2011, 27(1):79.
- [9] Torchilin VP, Weissig V. 脂质体[M]. 邓意辉, 徐晖, 主译. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2007:1.
- [10] 陈浩, 戴俊东, 王玉蓉, 等. 薄膜超声法制备褪皮素脂质体研究[J]. *药学实践杂志*, 2012, 30(1):32.
- [11] 刘洋, 张振中, 邵彦江, 等. 载基因纳米阳离子脂质体前体制剂的制备及性质研究[J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(1):72.
- [12] 邓礼荷, 韦敏燕, 汤晨懿, 等. 冻干工艺及保护剂对羟基喜树碱脂质体质量的影响[J]. *中国医药工业杂志*, 2012, 43(1):30.
- [13] 刘娟, 卢荣, 樊君, 等. 响应面法优化BSA冻干脂质体的处方工艺[J]. *西北大学学报:自然科学版*, 2011, 41(6):1001.
- [14] Konica Minolta Medical & Graphic, Inc. *Liposome compositions containing X-ray contrast agents, and production*: JP, 2006298838[P]. 2006-11-02.

\*副主任药师, 硕士。研究方向: 药剂学。电话: 024-85715668。E-mail: lidanjerry@126.com

(收稿日期: 2013-04-08 修回日期: 2013-06-05)