

维A酸脂质体的制备工艺研究

陈博*(重庆华邦制药有限公司,重庆 401121)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-1973-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.18

摘要 目的:提供一种制备稳定维A酸脂质体的新方法。方法:采用乙醇注入法制备维A酸脂质体,通过单因素试验和四因素三水平正交试验,以包封率为主要指标,优选药脂比、磷脂与胆固醇之比、水合介质(0.01 mol/L磷酸盐缓冲液)的pH和用量;并制备样品进行稳定性考察。结果:以药脂比为1:10(维A酸用量1.0 mg),磷脂与胆固醇之比为4:1,水合介质的pH为6.5、用量为30 ml为最佳工艺;所制维A酸脂质体的包封率约为80%,平均粒径约为150 nm。在室温条件下密封放置10 d及4℃下保存6个月,其平均粒径及包封率差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:该制剂制备工艺简单可行;制剂处方合理,包封率较高,且在短期内稳定性良好。

关键词 维A酸;脂质体;乙醇注入法

Preparation Technology of Tretinoin Liposomes

CHEN Bo(Chongqing Huapont Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 401121, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide a new method for the preparation of stable Tretinoin liposomes. METHODS: Tretinoin liposomes were prepared by using ethanol injection method. Ratio of drug to lipid, ratio of phospholipid to cholesterol, pH and amount of hydration medium (0.01 mol/L phosphate buffer) were optimized by single factor and four factors-three levels orthogonal design using encapsulation efficiency as index. The stability of preparation was investigated. RESULTS: The optimal technology was as follows: the ratio of tretinoin to lipids was 1:10 (1.0 mg tretinoin); ratio of phospholipid to cholesterol was 4:1; pH and amount of hydration medium were 6.5 and 30 ml; encapsulation efficiency was about 80% and mean particle size was about 150 nm. There was no statistical significance in mean particle size and encapsulation efficiency of preparations at room temperature for 10 days and at 4℃ for 6 months ($P>0.05$). CONCLUSIONS: The preparation technology is simple and feasible; and the preparation is reasonable in prescription and stable in a short time with good encapsulation efficiency.

KEYWORDS Tretinoin; Liposome; Ethanol injection method

维A酸(Tretinoin)是一类维生素A类化合物,是第一个用于临床治疗寻常性痤疮的维A酸类药物,也是目前应用最广和最成熟的药物^[1]。该化合物不溶于水,对光照十分敏感,极易因发生异构化而失去疗效,在常用的外用制剂中,对皮肤的强烈刺激是其主要的不良反应。为了减轻刺激感,目前常用的方法是将维A酸制成脂质体后再使用到制剂中。目前国内虽已有对维A酸进行脂质体研究的报道,但大部分是采用逆相蒸发法或醋酸钙梯度法制备脂质体,这些制备方法工艺操作较复杂,产业化难度高。本文采用乙醇注入法制备维A酸脂质体,通过单因素试验和四因素三水平正交试验筛选处方工艺,并对3批样品进行验证,为制备维A酸脂质体提供了一种新方法。

1 材料

1.1 仪器

RH D-KT/C 磁力搅拌机(德国IKA集团公司);LC-2010AHT 高效液相色谱仪(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

维A酸原料药(重庆华邦胜凯制药有限公司,批号:Tre-20111203,纯度:99.36%);磷脂[德国Lipoid公司,批号:NBVRTF09,磷脂酰胆碱含量(PC):>98.0%];胆固醇(上海生物化学试剂公司,批号:110715,含量:94.0%);甲醇为色谱纯;

*工程师,硕士。研究方向:药物制剂。电话:023-67886973。E-mail:airwarriorcb@163.com

无水乙醇、冰醋酸、异丙醇、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠均为化学纯。

2 方法与结果

2.1 维A酸脂质体的制备^[2-3]

精密称取维A酸原料药适量,加入10 ml无水乙醇超声充分溶解,备用。取适量磷酸氢二钠和磷酸二氢钠,配制成0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)作为水合介质,备用。取适量磷脂和胆固醇,加入水合介质中,置于磁力搅拌器上搅拌(水浴50℃,600 r/min)使其溶解混合均匀,在50℃高速搅拌下,用10 ml注射器吸取无水乙醇药液,缓缓匀速注入到水合介质中,随着药液加入,溶液慢慢呈现浅蓝色乳光,表明脂质体形成。注入完成后继续恒温搅拌1 h,即得维A酸脂质体混悬液。

2.2 包封率的测定

2.2.1 色谱条件^[4]与系统适用性试验。色谱柱:Kromasil C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-2%冰醋酸溶液(81:19),流速:1.0 ml/min;检测波长:350 nm;柱温:25℃;进样量:20 μl。在该色谱条件下,维A酸色谱峰的保留时间为25.3 min左右,色谱峰与其相邻峰能完全达到基线分离。

2.2.2 标准曲线的制备。取维A酸原料药,加异丙醇少量使溶解,再用甲醇稀释制备成质量浓度分别为1、5、10、20、30、50 mg/L的维A酸溶液,进样测定,记录色谱。以质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行回归分析,得回归方程为 $y=81.356x-13.7$ ($r=0.99997$)。结果表明,维A酸检测质量浓度

的线性范围为1~50 mg/L。

2.2.3 精密度试验。取“2.2.2”项下质量浓度为10 mg/L的维A酸溶液,进样测定,重复进样6次,记录色谱。结果峰面积RSD=0.75% (n=6),表明本方法精密度较好。

2.2.4 加样回收率。取“2.2.2”项下质量浓度为5、10、20 mg/L的维A酸溶液,加入空白辅料,每个浓度3份,取20 μl进样测定,记录色谱,按外标法计算含量和回收率。结果回收率在99.33%~101.42%,RSD在0.45%~1.15%。

2.2.5 稳定性试验。取“2.2.2”项下质量浓度为10 mg/L的维A酸溶液,分别于0、1、2、3、6、12 h时进样测定,记录色谱。结果峰面积的RSD=0.85% (n=6),表明维A酸溶液的稳定性较好。

2.2.6 包封率^[9]。取维A酸脂质体混悬液1 ml,加入已处理的透析袋内,将透析袋浸入透析液(水合介质)100 ml中,置于磁力搅拌器上搅拌,定时更换透析液,透析12 h,放置12 h达平衡;采用高效液相色谱法测定其维A酸含量,作为 $W_{包}$ 。另取脂质体混悬液1 ml,置于10 ml量瓶中,加异丙醇少量溶解,用甲醇稀释至刻度,同法测定其含量,作为总药量 $W_{总}$ 。根据公式计算包封率 $= (W_{包}/W_{总}) \times 100\%$ 。

2.3 维A酸脂质体制备工艺研究

2.3.1 单因素试验。影响脂质体包封率的主要因素有药物用量、药脂比、磷脂与胆固醇之比、水合介质pH和用量等^[9]。按“2.1”项下工艺制备各种配比的维A酸脂质体混悬液,并根据“2.2.6”项下方法测定包封率,采用单因素试验考察5个因素对包封率的影响,结果见图1。

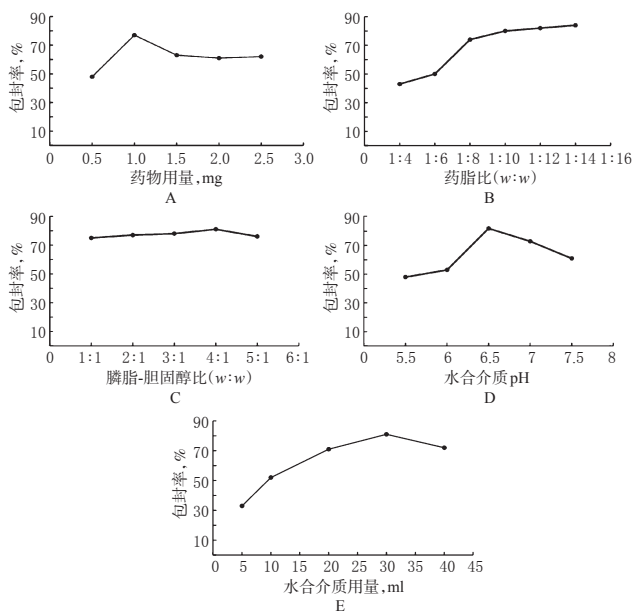


图1 单因素试验结果

A. 药物用量; B. 药脂比; C. 磷脂与胆固醇之比; D. 水合介质pH; E. 水合介质用量

Fig 1 Results of single factor test

A. amount of drugs; B. ratio of drug to lipid; C. ratio of phospholipid to cholesterol; D. pH value of hydration medium; E. amount of hydration medium

由图1可知,脂质体包封率在维A酸用量为1.0 mg时最高,超过时开始下降。说明药物用量已超过脂质膜饱和限度,

部分药物未包入脂质膜而进入了外面的胶团中,无法形成稳定的脂质体。当药物用量固定后,磷脂用量将影响包封率:当药脂比未达到1:8时,包封率均较低;但从达到1:8开始,包封率增长明显。虽然磷脂用量越大,包封率越高,但磷脂用量过大会导致脂质体稳定性降低,因此应将磷脂用量控制在一定范围内。磷脂与胆固醇之比为4:1时,包封率较高。胆固醇比例过高,双分子层结构刚性增强,形成的脂质体双分子层膜总表面积减小,破坏了双分子层组成,使包封率下降。水合介质pH对包封率影响较大,当pH为6.5时,脂质体包封率最大。维A酸在不同pH范围内的稳定性不同,可能是pH改变了脂质体膜表面的电荷性质,进而改变脂质体膜通透性,影响维A酸被包封的数量;而且磷脂在pH为6.5时稳定性较好,不易发生水解与氧化。水合介质用量为30 ml时,包封率最高;而随着PBS用量的增加,包封率先增加后减少。综上所述,本文选择了对包封率影响较大的4个因素进行筛选,即药脂比(A)、磷脂与胆固醇之比(B)、水合介质pH(C)、水合介质用量(D)。

2.3.2 正交试验^[7-9]。虽然药物用量也是影响包封率的主要因素,但是鉴于5个因素所涉及试验过多,且根据单因素试验结果可确定维A酸用量1.0 mg时包封率最高,因此本次正交试验不设计药物用量因素,默认维A酸用量均为1.0 mg。以包封率为主要指标,按 $L_9(3^4)$ 安排正交试验,正交试验的因素与水平见表1,正交试验结果与极差分析见表2,方差分析结果见表3。

表1 正交试验的因素与水平

Tab 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A(w:w)	B(w:w)	C	D, ml
1	1:10	3:1	6.0	20
2	1:12	4:1	6.5	30
3	1:14	5:1	7.0	40

表2 正交试验结果与极差分析

Tab 2 Results of orthogonal test and analysis of range

编号	因素				包封率, %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	53.97
2	1	2	2	2	81.63
3	1	3	3	3	60.13
4	2	1	2	3	63.22
5	2	2	3	1	68.16
6	2	3	1	2	63.25
7	3	1	3	2	58.77
8	3	2	1	3	67.24
9	3	3	2	1	65.33
K_1	65.243	58.653	61.487	62.487	
K_2	64.877	72.343	70.060	67.883	
K_3	63.780	62.903	62.353	63.530	
R	1.463	13.690	8.573	5.396	

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F	F临界值	P
A	3.478	2	1.000	19.000	
B	294.592	2	84.702	19.000	<0.05
C	133.646	2	38.426	19.000	<0.05
D	49.164	2	14.136	19.000	
误差	3.48	2			

由正交试验结果可知,在本研究方案所选取的因素和水平下,最佳处方工艺组合为A₁B₂C₃D₂,脂质体包封率达到81.63%,即采用药脂比为1:10、磷脂与胆固醇之比为4:1、水合介质的pH为6.5、水合介质用量为30 ml。各因素的重要指标程度依次为B>C>D>A。

2.4 验证试验

按筛选出的最佳工艺制备3批(批号:20120901、20120902、20120903)维A酸脂质体混悬液样品,取其中1批样品测定粒径分布;同时将3批样品常温密封放置10 d及4℃下保存3、6个月,检测其粒径及包封率。维A酸脂质体的粒径分布见图2,样品的稳定性试验结果见表4。

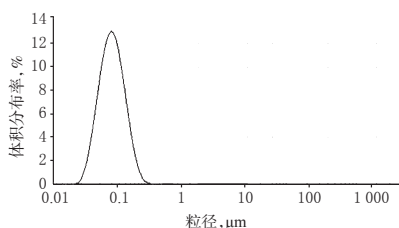


图2 维A酸脂质体的粒径分布图

Fig 2 Distribution of particle size of Tretinoin liposomes

表4 样品稳定性试验结果

Tab 4 Results of stability test of samples

项目	考察条件及时间	20120901	20120902	20120903
平均粒径, μm	0 d	147.2	159.2	142.5
	常温 10 d	148.7	160.1	148.2
	4℃ 3个月	150.6	157.3	151.2
	4℃ 6个月	159.1	166.2	157.3
包封率, %	0 d	82.56	82.14	83.19
	常温 10 d	82.10	82.35	81.32
	4℃ 3个月	81.28	80.35	80.77
	4℃ 6个月	78.07	77.24	78.32

3 讨论

试验曾尝试高速离心法^[5]和葡聚糖凝胶柱层析法测定包封率。高速离心采用转速5 000 r/min,离心1 h,但发现仅有少量维A酸脂质体被分离开来;加入枸橼酸钠改变脂质体水分散体密度,也不能有效分离游离药物和含药脂质体。采用葡聚糖凝胶柱层析法时,采用了G-50和G-100两种凝胶层析柱比较空白脂质体和维A酸洗脱曲线,也无法有效分离游离药物和含药脂质体。采用透析法测定,振荡12 h,放置12 h后即达到平衡,平均回收率为97.7%(n=3),表明透析袋对维A酸基本无阻碍作用。因此最终试验选择采用透析法测定样品的包封率。

在脂质体制备过程中,无水乙醇药液注入速度不易过快,否则易造成所制备脂质体粒径过大,形成沉淀而影响样品质

量;由于维A酸在高温、光照条件下稳定性差,因此在水化时应注意水浴温度,不易过高,且操作时应避光处理。

脂质体混悬液本身较不稳定,虽然可通过调整磷脂与胆固醇的比例,改变磷脂双分子层的流动性,以达到提高稳定性的目的,但是其长期稳定性及微生物情况仍需进一步考察。为了使制成的混悬液放置时间更长,下一步笔者计划采用冷冻干燥法^[7]对维A酸脂质体混悬液进行处理,或许将有助于其长期贮存。

本试验是根据工作中的经验来确定无水乙醇用量,并未对其用量进行筛选。需要注意的是理论上有机溶剂用量越大,所得脂质体平均粒径越小,但是体系中过多有机溶剂会增加药物在外相中的溶解度,从而造成包封好的药物被溶解掉,降低了药物包封率。为了避免过多药物损失和尽可能去除有机溶剂,笔者认为有机溶剂用量以能完全溶解药物,且能控制其平均粒径在所需范围内即可。

本试验仅仅是探讨一种制备稳定维A酸脂质体的新方法,该法工艺简便,所得脂质体包封率较高、稳定性较好、易于产业化。目前所制备的脂质体样品,还仅仅停留在脂质体混悬液阶段,属于中间产品,如何将其运用于制剂中,制成上市销售的成品,以及运用在何种剂型中均还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 潘靖,涂平,王芊.全反式维A酸霜治疗痤疮对皮脂分泌的影响[J].临床皮肤科杂志,2013,42(7):395.
- [2] 关世侠,杨民,王东凯.前列地尔脂质体制备工艺条件优化[J].中国药房,2008,19(10):759.
- [3] 成差群,魏燕华.乙醇注入法制备异长春花碱脂质体的研究[J].江西中医学院学报,2010,22(4):46.
- [4] 杨世艳,何兵,冯文宇.HPLC测定复方维A酸脂质体中蒿酮的含量和包封率[J].重庆医科大学学报,2011,36(8):956.
- [5] 尹佳,张亚兰,莫毅,等.CA4P脂质体的制备工艺研究[J].华西药学杂志,2009,24(6):594.
- [6] 欧春风,梁艳兰,沈生文.乙醇注入法制备姜黄素脂质体工艺研究[J].南方农业学报,2011,42(10):1 259.
- [7] 颜任梁.正交试验优选黄芩素长循环脂质体制备工艺研究[J].江西中医学院学报,2013,25(1):49.
- [8] 赵跃刚,沈晓君,齐晋楠,等.正交实验优选γ-亚麻酸脂质体制备工艺[J].重庆医科大学学报,2009,34(12):1 709.
- [9] 刘晓明,闫云宇,毕华,等.乙醇滴注法制备猴头菇多糖脂质体[J].中国医药科学,2013,3(4):51.

(收稿日期:2014-01-07 修回日期:2014-03-14)

《中国药房》杂志——《国际药学文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅