论著

文章编号:1000-5404(2008)09-0810-04

木犀草素脂质体制剂处方和工艺优化研究

幸海燕,王 昆,赵 凯,张敬如,黄复生 (第三军医大学基础医学部病原生物学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 优化制备注射用木犀草素脂质体的处方工艺。方法 采用薄膜分散法和冻干工艺进行木犀草素脂质体制备,并以载药量、包封率为评价指标,优化制备处方和工艺。结果 木犀草素脂质体制备的最佳工艺处方为磷脂:木犀草素10:1,磷脂:胆固醇4:1,水化介质为注射用水,温度为50 ℃。按照此处方工艺制备的木犀草素脂质体平均载药量、平均包封率、平均粒径分别为7.21%、66.8%、278.4 nm。结论 按优化处方和工艺制备的木犀草素脂质体各项指标基本符合静脉应用要求。

关键词:木犀草素;脂质体;包封率;载药量
中图法分类号:R282.71;R283.6;R284 文献标识码:A

Optimization of preparation and formulation of luteolin liposomes

XING Hai-Yan, WANG Kun, ZHAO Kai, ZHANG Jing-Ru, HUANG Fu-Sheng (Department of Pathogenic Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To optimize the preparation and formulation of intravenous luteolin liposomes. Methods Luteolin liposomes were prepared by thin-film dispersion method and lyophillization. Optimization of preparation and formulation was accomplished by evaluating the drug-loading amounts and the entrapment efficiency of luteolin liposomes. Results The ideal combination of preparation and formulation was phospholipids: luteolin = 10: 1; phospholipids: cholesterin = 4: 1. Hydrating medium was distilled water, and temperature was 50 ℃. The average drug-loading, entrapment deficiency, and the average particle size of the optimized liposome was 7.21%, 66.8% and 278.4 nm respectively. Conclusion The optimized luteolin liposomes are proved to be qualified for intravenous injection.

Key words: luteolin; liposome; entrapment efficiency; drug-loading

木犀草素(luteolin)属于天然四羟基黄酮化合物,新近研究证明对多种实体瘤、腹水癌和白血病有治疗作用[1,2]。目前临床使用的木犀草素口服剂型存在生物利用度低,血药浓度达峰时间长等不足,极大地限制了其在抗肿瘤治疗中的推广应用。木犀草素新的给药途径,特别是静脉应用已备受关注。木犀草素在水中溶解度低[3],给开发其静脉剂型带来很大的困难。本研究对制备木犀草素脂质体进行了初步配方和工艺研究,优化条件下制备的脂质体制剂显著提高了药物溶解度,基本满足静脉应用要求,旨在为进一步开发临床使用的注射用剂型提供实验基础。

作者简介:幸海燕,女,四川省达州市人,硕士研究生,主要从事纳米药物开发方面的研究。电话:(023)68752243,E-mail:haiyanxing@yahoo.com.cn
通信作者:黄复生,E-mail:fushengh@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-12-04 修回日期:2008-01-28

1 材料与方法

1.1 主要器材和试剂

M-110S型高压微流机(美国),Hitachi 55超高速离心机(日本),90型磁力搅拌器(沪西分析仪器厂,上海),RE-3000型旋转蒸发器(亚荣生化仪器厂,上海),Advantage冷冻干燥机(Virtis公司,美国),Alletch 426型高效液相色谱仪泵(Alletch公司,美国),UVIS-201型检测器(Alletch公司,美国),Zetasizer 3000HS激光粒度仪(马尔文公司,英国),Design-Ease 6.0实验设计软件(美国)。

磷脂(纯度>95%,德国Lipoid公司),胆固醇(美国Sigma公司),木犀草素原料药(纯度>99.5%,批号:20040317,西安森弗生物技术有限公司),二丁基羟基甲苯(butylated hydroxytoluene,BHT,美国Sigma公司),甲醇、乙腈(色谱纯,韩国SK公司),四氢呋喃(色谱纯,天津市光复精细化工研究所),乙酸(分析纯,上海申博化工有限公司),磷酸二氢钾、无水乙醇(分析纯,重庆东方化学试剂厂),超纯水、磷酸盐缓冲液PBS(本实验室自制)。

1.2　方法

1.2.1　影响因素、水平的确定及实验设计　　根据文献[4]和预实验结果,以木犀草素脂质体载药量、包封率为考察指标,选取磷脂与木犀草素质量比、磷脂与胆固醇质量比、水化介质种类和水化温度等 4 个影响因素,采用 Design-Ease 6.0 软件进行四因素双水平实验设计(表 1)。

表 1　四因素双水平设计因素水平表

水平	A(磷脂:木犀草素)	B(磷脂:胆固醇)	C(水化介质类型)	D(水化温度)
1	10:1	1:1	PBS	25 ℃
2	20:1	4:1	注射用水	50 ℃

1.2.2　木犀草素脂质体的制备　　取木犀草素原料药 200 mg,按照实验设计称取各组设计量磷脂和胆固醇,无水乙醇充分溶解,真空减压除有机溶剂,制得干膜。在设计温度下,加入相应水化液,充分搅拌,水化得含有木犀草素的脂质悬液。高压微流机 1.378×10^5 Pa 处理得脂质体胶体溶液,分别过 1.2 μm和 0.45 μm 微孔滤膜,除去未包被的结晶,得到木犀草素脂质体。进一步加入适量冻干保护剂甘露醇,补足体积到 100 ml,按每瓶 1 ml 分装,冷冻干燥即得成品。不加木犀草素原料药,同法制备空白冻干脂质体。取 3 个批号的木犀草素脂质体进行处方验证。

1.2.3　高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定脂质体中木犀草素的含量

1.2.3.1　色谱条件　　色谱柱:Waters C18 (3.9 mm × 200 mm, 5 μm),流动相:甲醇:四氢呋喃:1.5% 乙酸(20:30:60,体积分数),柱温:25 ℃,流速:1.0 ml/min,紫外检测波长:350 nm,进样量:20 μl,外标法定量。

1.2.3.2　标准曲线制备　　精密称取在 105 ℃干燥至恒重的木犀草素原料药 10 mg 至 10 ml 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度。精密吸取该溶液 1 ml 至 10 ml 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 100 μg/ml 的储备液。分别精密吸取储备液 0.05、0.1、0.2、0.51、1.0 ml 至 10 ml 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配制成 0.5、1、2、5、10 μg/ml 系列浓度的标准工作液,自动进样 20 μl,以木犀草素峰面积(A)对浓度(C,μg/ml)作一元线性回归。

1.2.3.3　回收率与精密度试验　　精密吸取储备液 0.16、0.2、0.24 ml 至 10 ml 量瓶中,分别加入处方量的空白脂质体溶液,加甲醇稀释至刻度,制备 1.6、2.0、2.4 μg/ml 高、中、低 3 个浓度样品,自动进样 20 μl(每个浓度进样 6 针),记录色谱峰面积,按回归方程计算回收率。同法制备上述溶液,于日内(0、2、4、8、12、24 h)及日间(1、2、3、4、5 d)进样,考察方法精密度,以相对标准偏差(RSD)表示。

1.2.3.4　木犀草素脂质体含量测定　　取制得的冻干脂质体 1 瓶,注射用水 1 ml 复溶,精密移取 1 ml 复溶液体至 10 ml 容量瓶中甲醇稀释定容,然后取稀释液 1 ml 至 100 ml 容量瓶中,甲醇定容至刻度。按 1.2.3.3 项下测定制剂中木犀草素的含量。

1.2.4　包封率的测定　　取冻干脂质体 1 瓶,按 1.2.3.4 项下测得每瓶中木犀草素的总含量($W_{总}$)。另取相同批号的冻干脂质体 1 瓶,1 ml 注射用水复溶后,加入离心管,注射用水补足体积到 7 ml,4 ℃、100 000 × g 离心 2 h,取上清液 HPLC 检测,求得未包封的游离药物总含量($W_{游}$)。按照公式计算冻干脂质体复溶后包封率。

$$包封率(\%) = (W_{总} - W_{游})/W_{总} \times 100\%$$

1.2.5　载药量的测定　　以公式计算载药量,式中 $W_{总}$为每瓶木犀草素脂质体中木犀草素的总含量,$W_{载}$为每瓶木犀草素脂质体制剂中载体的总用量。

$$载药量(\%) = W_{总}/W_{载} \times 100\%$$

1.2.6　平均粒径与分布的测定　　取木犀草素冻干脂质体 1 瓶,加 1 ml 注射用水复溶,再加入 3 ml 注射用水稀释,样品使用激光粒度分析仪测定脂质体平均粒径和多分散系数。设定入射角度为 90 ℃,样品温度为 25 ℃时进行测定,每个样品连续测定 3 次,按散射光强度计算脂质体粒径与分布。

1.3　统计学处理

采用 Design-Ease 6.0 统计软件对实验结果进行统计分析。

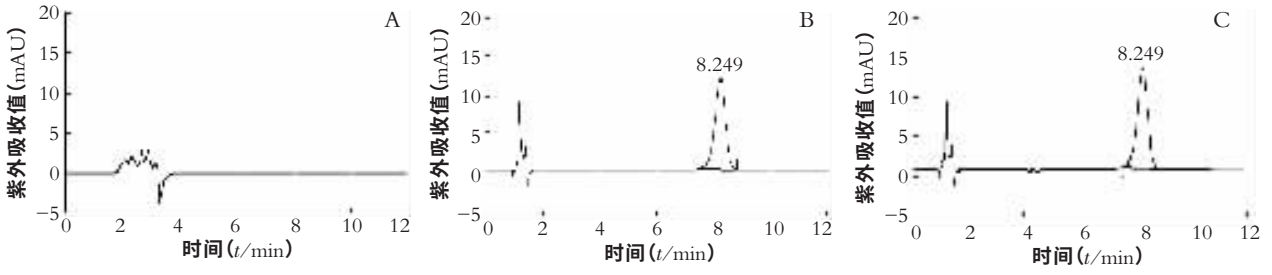
2　结果

2.1　HPLC 方法建立结果

2.1.1　标准曲线制备　　回归结果显示,木犀草素峰面积(A)与其浓度(C)在 0.5 ~ 10.0 μg/ml 范围内线性良好,回归方程为:A = −6 460.079 29 + 45 160.589 C,r = 0.999 9。

2.1.2　回收率与精密度试验　　按照 1.2.3.3 项下测得高、中、低 3 个浓度回收率分别为(99.39 ± 0.11)%、(101.12 ± 1.65)%、(99.99 ± 0.37)%,日内平均精密度 RSD 为 0.41%,日间平均精密度 RSD 为 0.67%。

2.1.3　方法专属性考察　　空白脂质体、木犀草素原料药与木犀草素脂质体典型的色谱图见图 1。在本色谱条件下,脂质体中的辅料对木犀草素的测定无干扰,木犀草素的保留时间为 8.249 min。



A 空白脂质体;B 木犀草素原料药;C 木犀草素脂质体

图 1　木犀草素 HPLC 色谱图

2.2 处方设计结果

应用 Design-Ease 6.0 软件进行四因素双水平设计(2^4),按随机排列顺序进行实验,制备脂质体制剂。分别按 1.2.4 和 1.2.5 中方法进行包封率和载药量的测定。实验结果与分析见表 2、3。

表2 处方设计实验结果

编号	磷脂:木犀草素 (mg/mg)	磷脂:胆固醇 (mg/mg)	水化介质	水化温度 (℃)	载药量 (%)	包封率 (%)
1	10:1	1:1	PBS	25	5.5	55.7
2	20:1	1:1	PBS	25	4.3	87.3
3	10:1	4:1	PBS	25	5.7	57.1
4	20:1	4:1	PBS	25	3.2	63.2
5	10:1	1:1	注射用水	25	6.4	64.5
6	20:1	1:1	注射用水	25	4.1	81.7
7	10:1	4:1	注射用水	25	4.5	45.6
8	20:1	4:1	注射用水	25	3.2	64.0
9	10:1	1:1	PBS	50	6.4	64.9
10	20:1	1:1	PBS	50	3.2	63.5
11	10:1	4:1	PBS	50	6.1	61.7
12	20:1	4:1	PBS	50	3.8	75.7
13	10:1	1:1	注射用水	50	6.7	67.3
14	20:1	1:1	注射用水	50	3.8	76.3
15	10:1	4:1	注射用水	50	6.8	68.1
16	20:1	4:1	注射用水	50	3.2	64.5

表3 处方设计方差分析结果

项目	载药量		包封率	
	P 值	系数估计	P 值	系数估计
模型	< 0.000 1		0.078 7	
截距		20.70		65.88
磷脂:木犀草素	0.000 1	−8.04	0.018 8	5.75
磷脂:胆固醇	< 0.000 1	−1.43	0.100 2	−3.75
水化介质	0.099 1	−0.24	0.906 9	0.25
水化温度	0.003 4	1.26	0.524 1	1.37

对实验结果进行统计分析,结果用多元线性模型表示。

以载药量(y_1)为评价指标时,回归方程为:$y_1 = 20.7 - 8.04\ A - 1.43\ B - 0.238\ C + 1.26\ D$。结果显示,该方程 $r^2 = 0.928\ 4$,$P < 0.000\ 1$,回归方程有意义。系数分析,各因素对回收率的影响依次为 A > B > D > C。

以包封率(y_2)为评价指标时,回归方程为:$y_2 = 65.88 + 5.75\ A - 3.75\ B + 0.25\ C + 1.37\ D$。结果显示,$r^2 = 0.505\ 4$,$P = 0.078\ 7$,说明各因素效应总的来说对包封率无显著影响。其中因素 A 的 P 值为 0.018 8($P < 0.05$),表明增加磷脂与木犀草素原料药的比值,有利于提高包封率。

针对本研究开发注射用木犀草素制剂的目的,在获得满意的脂质体包封率的同时,需要兼顾制备中使用磷脂的成本。优化评价标准拟在确保较高包封率前提下,使用尽量少的磷脂辅料,因此提高载药量是关键。最终确定的优化配方和工艺条件为:磷脂:木犀草素10:1,磷脂:胆固醇 4:1,水化介质为注射用水,温度为 50 ℃。

2.3 外观性状

冻干木犀草素脂质体外观呈黄色疏松粉末,加注射用水轻摇立即复溶成黄色半透明脂质体胶体溶液,无可见异物颗粒,24 h 放置无沉淀和分层等现象发生。

2.4 脂质体的粒径分布

测得木犀草素脂质体的平均粒径为 278.4 nm,多分散指数为 0.296。

2.5 处方验证

优化处方和工艺条件下,制备了 3 批冻干木犀草素脂质体(批号分别为 061130、061205、061206)进行验证研究,并进行了载药量、包封率、粒度等指标的测定(表 4)。验证结果证明,通过实验设计策略指导配方和工艺研究,在优化条件下制备的木犀草素脂质体包封率、载药量、粒径大小和分布指标较为满意,且具有较好的批间重现性。

表4 木犀草素脂质体指标测定结果

样品批号	包封率(%)	载药量(%)	平均粒径 (nm)	多分散系数
061130	67.5	6.45	278.3	0.29
061205	65.8	7.48	279.6	0.28
061206	67.1	7.70	277.2	0.29
平均	66.8	7.21	278.4	0.29

3 讨论

木犀草素属弱酸性四羟基黄酮化合物,在水中的溶解性非常低。现有木犀草素的口服制剂已用于临床,但存在单次服药剂量较大、生物利用度低、疗效低等缺点,很大程度地限制了其在临床上的应用。静脉用药较口服用药剂量更准确、作用更迅速、药效更可靠。但木犀草素的低水溶性增加了将其制成注射制剂的难度,传统制备难溶药物注射剂的方法,如使用增溶剂、表面活性剂以及 pH 调节剂等,可能导致毒副作用而存在安全性问题[5]。

脂质体作为一种新型药物载体,可将难溶的脂溶性药物包裹在泡囊疏水基团的夹层中,从而增加药物溶解度[6]。将脂质体作为抗癌药物载体,具有增加癌细胞对药物的摄取量、减少用药剂量、提高疗效、减少毒副作用和控制药物释放等特点[7,8]。本研究将木犀草素制成静脉注射给药的脂质体制剂,不仅能解决药物溶解度低的问题,使其达到注射制剂对药物浓度和粒径的要求,还能使药物快速、准确的发挥效用,具有很高的临床价值和市场前景。

脂质体的载药量和包封率是衡量脂质体品质优劣的两个重要指标。药典有明确规定,临床用药脂质体的包封率不得少于 80%[9]。为此本研究在处方优化时,选取木犀草素脂质体的载药量和包封率为评价指标。脂质体为磷脂形成的双分子层药物载体,对亲脂性药物有良好的包封率。脂质体的包封率和载药量与制备方法(如薄膜蒸发法,逆向蒸发法等)、磷脂与药物的质量比、磷脂与胆固醇的质量比、水化介质种类和水化温度等因素有关。本研究根据文献资料和预实验的结果,对以上因素进行考查,确定了木犀草素脂质体

的制备工艺和处方。经过这两个指标考察得到的最优处方制得的制剂，基本满足静脉给药的要求，为进一步开发静脉注射用新剂型提供了实验基础。但在实施产业化生产时，还需从安全、环保、经济的角度完善上述制备工艺。

实验计划法（design of experiments，DOE）是一种利用基本统计理论及计算机数据处理技术，快速确定核心技术因素以及优化条件的现代产品开发方法。Srijaranai[10] 和 Clarot[11] 将其用于医药领域后，DOE 在新药开发的各个阶段已受到广泛关注。运用 DOE 方法，可同时比较多种因素及其相互作用的效果，因此可以大大减少实验次数，缩短产品开发或改进周期，降低成本，提高产品可靠性。本研究在现有资料和预实验的基础上，确立木犀草素脂质体制剂处方的影响因素与水平，结合 DOE 技术进行筛选和优化，能在较短的时间内开发出最佳的实验方法，节省了开发经费。

本研究仅对木犀草素脂质体制备的工艺和处方进行了初步探索。本制备方法过程简单，条件温和，易于操作。我们选用甘露醇作为冻干保护剂，使冻干粉更加疏松，水化更加容易，水化重建后得到的木犀草素脂质体胶体溶液粒径合适且分布均匀，包封率高，因此能够得到供注射用的木犀草素脂质体制剂。

但有关此制剂的稳定性、体内作用机制、体内药物浓度和抗癌靶向性仍需进一步研究，以期为临床提供一种安全、有效的药物制剂。

参考文献：

[1] Manju V，Balasubramaniyan V，Nalini N. Rat colonic lipid peroxidation and antioxidant status：the effects of dietary luteolin on 1，2-dimethylhydrazine challenge[J]. Cell Mol Biol Lett，2005，10(3)：535－551.

[2] 肖大凯，覃燕梅，莫丽儿，等. 木犀草素对卵巢癌细胞株转移能力的影响[J]. 中国病理生理杂志，2006，22(6)：1199－1202.

[3] Lee S，Seo D H，Park H L，*et al*. Solubility enhancement of a hydrophobic flavonoid，luteolin by the complexation with cyclosophoraoses isolated from Rhizobium meliloti [J]. Antonie Van Leeuwenhoek，2003，84(3)：201－207.

[4] 吴　敏，刘　娟，张　欣. 辛夷挥发油纳米脂质体的制备工艺研究[J]. 中西医结合学报，2007，5(3)：314－317.

[5] 赵丽华，耿佃云. 水不溶性药物的新型注射制剂[J]. 中国医药情报，1999，5(5)：270－279.

[6] 吴佩颖，徐莲英，陶建生. 难溶性药物增溶方法研究进展[J]. 中成药，2005，27(9)：10－13.

[7] 麦美琦，高惠君. 静注用脂质体制剂的开发[J]. 上海医药，2000，21(7)：11－13.

[8] 陈　祥，闫丽霞. 脂质体药剂及其临床应用[J]. 天津药学，2000，12(3)：12－13.

[9] 国家药典委员会. 中国药典 2005 年版 二部[M]. 北京：化学工业出版社，2005，附录 XIX，E，181－182.

[10] Srijaranai S，Burakham R，Deming R L，*et al*. Simplex optimization of ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatographic analysis of some heavy metals[J]. Talanta，2002，56(4)：655－661.

[11] Clarot I，Regazzeti A，Auzeil N，*et al*. Analysis of neomycin sulfate and framycetin sulfate by high-performance liquid chromatography using evaporative light scattering detection[J]. J Chromatogr A，2005，1087(1－2)：236－244.

（编辑　吴培红）

（上接 806 页）

3　讨论

ACC 在过去被称为圆柱瘤（cylindroma）或腺样囊腺癌，为一种变体腺癌，男女发病无明显差异。ACC 主要发生在涎腺，少见于乳腺、皮肤、宫颈、上呼吸道、消化道及肺等其他地方，ACC 为一种低度恶性肿瘤，术后易局部复发，晚期可出现远处转移，因而远期预后不良[2]。本病临床表现无特异性，最显著的临床表现为吸气时有哮鸣音，就诊时，临床医师常常想到的是支气管哮喘，而极少想到气管肿瘤，因而患者往往会延误诊断。

由于气管 ACC 属于低度恶性肿瘤，故其影像表现多界于良恶性肿瘤之间。ACC 的一个突出 CT 征象是沿黏膜下延伸，即表现为沿管壁梭状走行的软组织肿块，气管壁增厚，肿瘤的长径一般多大于横径，肿瘤侵犯管壁多大于 180°[3]。肿瘤在形状上表现多样，可呈息肉状或结节状向腔内突入，宽基底，管壁局部浸润性增厚。亦可同时侵犯腔内外，造成腔内外软组织肿块，管腔相应狭窄和阻塞，也可以于气管黏膜上皮下方沿着管壁长轴浸润生长，致管壁不同程度的增厚与相应管腔狭窄。

CT 扫描能准确描述肿瘤本身的改变和对周围结构的侵犯情况，特别是多层螺旋 CT 应用于临床以后。CT 多平面重建、气管支气管树重建及仿真内窥镜技术的应用，弥补了横断面图像对气管、支气管树长轴显示的不足[3]。本组病例中 2 例患者采用 16 层 CT 完成扫描，与术中所见对比，轴位图像、多平面重建、气管支气管树重建及仿真内窥镜技术的联合应用对病变范围及管腔形态的显示甚至优于纤维支气管镜。

综上所述，对于发生于气道的肿瘤，同时兼有良恶性肿瘤的特征，应多考虑为 ACC 的诊断。CT 能准确的描述气道病变及周围纵隔的情况，可作为诊断气道 ACC 的首选检查方法。

关键词：气管肿瘤；腺样囊性癌；体层摄影术，X 线计算机
中图法分类号：R730.44　　文献标识码：B

参考文献：

[1] Kwak S H，Lee K S，Chung M G，*et al*. Adenoid cystic carcinoma of the airways：helical CT and histopathologic correlation[J]. AJR Am J Roentgenol，2004，183(2)：277－281.

[2] Albers E，Lawrie T，Harrell J H，*et al*. Tracheobronchial adenoid cystic carcinoma：a clinicopathologic study of 14 cases [J]. Chest，2004，125(3)：1160－1165.

[3] 李智勇，伍建林，宁殿秀，等. 螺旋 CT 在气管支气管树腺样囊性癌诊断中的临床应用价值[J]. 中华放射学杂志，2004，38(6)：662－664.

（编辑　龙　亮）