

4 讨论

由于 9-NC 内酯型和羧酸盐型活性不同,一般在体内血浆和组织样品的分析检测中需要同时测定 9-NC 内酯型浓度和羧酸盐型浓度^[2,4]。但研究表明 9-NC 在体外空白胆汁中的内酯稳定性很差,内酯型平衡比例<4%,在胆汁收集过程中内酯型浓度和比例可能会发生变化,因此,在胆汁排泄实验中只测定了 9-NC 的总浓度^[3]。

胆汁排泄的药物必须具有一定的极性基团,只有化学结构中具有羧基、磺酸基或铵离子等极性功能基团的原形药物才有可能直接从胆汁中排出。因此,9-NC 羧酸盐型更易从胆汁中直接排泄,随着内酯型比例的降低,9-NC 胆汁排泄量增加^[6]。但内酯型比例是否同时会影响 9-NC 在肝中的代谢从而改变胆汁排泄量还有待于进一步研究。本实验发现,随着 9-NC 内酯型比例的降低,胆汁排泄呈上升趋势,而相对分子质量>300 的芳香族阴离子易从胆汁排泄,具有羧基的原形药物有可能从胆汁中直接排出^[6],因此,9-NC 很可能绝大部分是以羧酸盐的形式从胆汁中排出的。本实验室此前的研究也发现,与内酯型相比,9-NC 羧酸盐型更易从肾脏经尿液排泄^[7]。

过去一般认为羧酸盐型为低效形式,进一步的研究提示,由于可以相互转化,羧酸盐型可以作为内酯型的贮库,待内酯型消除后再转换为内酯型,

并且羧酸盐型与血浆蛋白结合率远高于内酯型,更易在血液循环中存在。但研究表明,羧酸盐型更易于从胆汁排泄,因此其作为内酯型贮库的可能性有限。

REFERENCES

- [1] HERTZBERG R P, CARANFA M J, HOLDEN K G, et al. Modification of the hydroxyl lactone ring of camptothecin inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity [J]. *J Med Chem*, 1989, 32(3): 715-720.
- [2] CHEN J, PING Q N, GUO J X, et al. *In vitro* and *in vivo* stability of 9-nitrocamptothecin lactone form in rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40(10): 888-892.
- [3] CHEN J, PING Q N, LIU M L, et al. Biliary excretion of 9-nitrocamptothecin after intravenous administration of 9-nitrocamptothecin liposomes to rats [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2007, 16(17): 1365-1368.
- [4] SCOTT D O, BINDRA D S, STELLA V J. Plasma pharmacokinetics of the lactone and carboxylate forms of 20(s)-camptothecin in anesthetized rats [J]. *Pharm Res*, 1993, 10(10): 1451-1457.
- [5] CHEN J, HU R R, YANG X X, et al. Antitumor efficacy, toxicity and pharmacokinetics of 9-nitrocamptothecin: role of lactone ratio [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72(4): 925-929.
- [6] LIANG W Q. *Biopharmaceutics and pharmacokinetics (生物药剂学与药物动力学)* [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 150.
- [7] HU R R, CHEN J, YANG X X, et al. Pharmacokinetics and urinary excretion of 9-nitrocamptothecin following intravenous administration of lactone and carboxylate forms to rats [J]. *Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志)*, 2013, 33(3): 171-175.

收稿日期: 2014-07-15

硬脂醇半乳糖苷修饰吉西他滨纳米脂质体的制备及处方优化

李季, 郭伟英* (辽宁医学院药学院, 辽宁 锦州 121001)

摘要: 目的 制备硬脂醇半乳糖苷修饰的盐酸吉西他滨纳米脂质体(18-GGNL), 并采用响应面法优化其处方工艺。方法 用硫酸铵梯度法制备 18-GGNL, 以包封率为评价指标, 运用 Box-Behnken 响应面设计法对处方进行优化, 并对其包封率、形态、粒径、稳定性和体外释放度进行综合评价。结果 得到最优处方为磷脂与胆固醇的质量比为 3.10:1, 硫酸铵浓度 0.19 mol·L⁻¹, 脂物比为 20.99:1, 所得的优化脂质体平均包封率为(70.8±0.95)%, 平均粒径为(89.5±5.3)nm, 粒径分布较窄, 稳定性好且具有缓释特性。结论 以硫酸铵梯度法制备的 18-GGNL 理化性质良好。

关键词: 硬脂醇半乳糖苷; 盐酸吉西他滨; 纳米脂质体; 硫酸铵梯度法; Box-Behnken 响应面法

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)04-0449-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.016

作者简介: 李季, 女, 硕士生 Tel: 018241651513
13941627032 E-mail: wyinguo@163.com

E-mail: lij900214@163.com

*通信作者: 郭伟英, 男, 硕士, 教授 Tel:

中国现代应用药学 2015 年 4 月第 32 卷第 4 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2015 April, Vol.32 No.4

• 449 •

Preparation and Formula Optimization of Stearyl Alcohol Galactoside Modified Gemcitabine Hydrochloride Nano Liposome

LI Ji, GUO Weiying* (Department of Pharmacy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare stearyl alcohol galactosidase modified gemcitabine hydrochloride nanoliposomes (18-GGNL) and optimize the prescription process using response surface methodology. **METHODS** The 18-GGNL was prepared by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradient method, the entrapment efficiency as the evaluation index, Box-Behnken response surface design method was used to optimize the formulation. The 18-GGNL was evaluated by encapsulation efficiency, drug loading, morphology, particle size, stability, and *in vitro* release. **RESULTS** The optimized formulation was as follows: the concentration of phospholipid was 3.10 : 1, concentration of ammonium sulfate was $0.19 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, lipid ratio was 20.99 : 1. The average of liposome entrapment efficiency was $(70.8 \pm 0.95)\%$, the average particle size was $(89.5 \pm 5.3) \text{ nm}$, the particle size distribution was narrow, good stability and slow release characteristics. **CONCLUSION** The $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradient prepares 18-GGNL with good physical and chemical properties.

KEY WORDS: stearyl alcohol galactose; emcitabine hydrochlorid; nano liposome; ammonium sulfate gradient method; Box-Behnken

盐酸吉西他滨(gemcitabine hydrochloride, GEM)是细胞周期特异性抗代谢类药物,是一种具有广谱抗实体瘤活性的脱氧胞苷类似物。盐酸吉西他滨主要不良反应为骨髓抑制、嗜睡、轻度流感样症状和可逆性皮疹。自1996年被美国食品药品监督管理局批准美国上市以来,该药已在临床上被广泛应用及研究,其与铂类联合是当今治疗非小细胞肺癌(NSCLC)的一线标准方案,在美国已成为胰腺癌治疗的“金标准”,在欧洲已被批准用于进展期乳腺癌的二线治疗^[1-2]。但其具有在细胞内半衰期较短,需大剂量持续静脉给药来维持有效药用浓度等缺点。将硬脂醇半乳糖苷(18-Gal)这种导向分子用于修饰脂质体,其脂溶性部分插入脂质体双分子层,可将半乳糖残基导向脂质体双分子层表面,这种半乳糖化的脂质体具有可被肝细胞膜上ASGP-R高度特异性识别的能力^[3]。本实验拟制备18-Gal修饰的GEM纳米脂质体(18-GGNL),延长GEM在体内的滞留时间,同时具有良好的肝靶向性,使其既满足长循环的要求又拥有更高的肿瘤靶向效率。本研究以包封率和稳定性参数为考察指标对制备工艺进行筛选,以Box-Behnken响应面设计法进行模型拟合和处方优化来提高药物包封率,最终采用硫酸铵梯度法制备脂质体,并对其理化性质进行表征。

1 仪器与试剂

RE-52A型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); CE7100型高效毛细管电泳仪(Agilent公司,配有DAD2140-0585二极管阵列检测器); JEM-1010透射电镜(日本电子株式会社); Mastersizer

2000激光粒度测定仪(英国Malvern公司); LD4-2A低速离心机(北京医用离心机厂)。

GEM原料药(济南伟都化工有限公司,纯度99.72%,批号:20130311); 18-Gal(实验室自制^[3],纯度:95.97%); 大豆磷脂(上海金伴药业有限公司); 胆固醇(天津东方试剂厂); 硫酸铵(天津永晟精细化工有限公司); 异丙醇(天津永晟精细化工有限公司); 732阳离子交换树脂(天津市光复精细化工研究所); 717阴离子交换树脂(天津市光复精细化工研究所); 透析袋(北京索莱宝科技有限公司,截留分子量8 000~14 000); 氯仿等其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 18-GGNL制备方法的选择

为了便于比较,统一处方(GEM 20 mg、磷脂300 mg、胆固醇100 mg、18-Gal 15 mg)考察制备工艺。

2.1.1 薄膜分散法 精密称取处方量的大豆磷脂、胆固醇、18-Gal置于500 mL烧瓶中,20 mL氯仿完全溶解,于40℃减压旋转蒸发除去氯仿后继续蒸发30~40 min,形成一层均匀干燥的薄膜。精密称取GEM溶于pH 6.0的PBS溶液中,将预热至相同温度的PBS溶液加入烧瓶中水化30 min至形成乳白色脂质体初品。冰浴探头超声($200 \text{ W} \times 2 \text{ min}$, $400 \text{ W} \times 4 \text{ min}$,工作1 s,间隔2 s)后,依次通过0.8, 0.45, 0.22 μm 微孔滤膜3次,进行整粒,即得脂质体混悬液。

2.1.2 逆向蒸发法^[4] 精密称取处方量的大豆磷

脂、胆固醇、18-Gal 于烧杯中, 20 mL 乙醚完全溶解, 精密称取 GEM 溶于 pH 6.0 的 PBS 溶液中, 加入烧杯中, 探头超声(200 W×4 min), 形成稳定的 W/O 型乳剂, 40 °C 温度下减压旋转蒸发至可见白色凝胶物, 加入少量水相继续减压蒸发 2 h, 冰浴探头超声, 依次通过 0.8, 0.45, 0.22 μm 微孔滤膜 3 次, 进行整粒, 即得。

2.1.3 改良乙醇注入法^[5] 精密称取处方量的大豆磷脂、胆固醇、18-Gal 溶于 20 mL 无水乙醇中, 将 GEM 溶于 pH 6.0 的 PBS 溶液中, 水浴温度控制在 60 °C, 在磁力搅拌下将预热至相同温度的水相匀速缓慢地注入油相中, 注射完毕继续在 60 °C 下搅拌 30 min, 制成脂质体粗品, 冰浴探头超声, 依次通过 0.8, 0.45, 0.22 μm 微孔滤膜 3 次, 进行整粒, 即得。

2.1.4 硫酸铵梯度法 薄膜分散-超声法制备空白纳米脂质体: 精密称取处方量的大豆磷脂、胆固醇、18-Gal 置于 500 mL 烧瓶中, 氯仿完全溶解后, 40 °C 下减压旋转蒸发除去氯仿后继续蒸发 30~40 min, 待形成一层均匀干燥的薄膜, 加入预热至相同温度的(NH₄)₂SO₄ 溶液水化 30 min(磷脂浓度 50 mg·mL⁻¹), 制得乳白色脂质体初品。冰浴探头超声(200 W×2 min, 400 W×4 min, 工作 1 s, 间隔 2 s)后, 依次通过 0.8, 0.45, 0.22 μm 微孔滤膜 3 次, 进行整粒, 即得带淡蓝色乳光的空白纳米脂质体混悬液。

建立离子梯度并载药: 精密移取空白脂质体混悬液 0.2 mL 于经离心预处理的阴阳离子交换树脂柱, 停留 5 min 后, 2 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 再加等量的双蒸水, 2 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 混匀, 得具有跨膜离子梯度的空白纳米脂质体混悬液。精密移取具有跨膜离子梯度的空白纳米脂质体混悬液与 GEM 储备液(精密称取 GEM 50 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 以双蒸水溶解并定容, 得 1 mg·mL⁻¹ 的 GEM 储备液, 于 4 °C 保存备用)以处方量混合, 40 °C 条件下孵育 30 min 后冰浴 10 min, 即得 18-GGNL。

2.2 18-GGNL 制备处方的筛选

2.2.1 电泳条件 采用未涂渍标准熔融石英毛细管(40 cm×50 μm×30 cm); 电泳缓冲液: 以 45 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(pH 2.69); 运行电压: 25 kV; 柱温: 25 °C; 检测波长: 269 nm; 压力进样: 5 kPa×3 s。溶液进样前均经 0.45 μm 滤膜过

滤并超声脱气。

2.2.2 线性关系的考察 分别精密移取 GEM 储备液适量, 用水稀释成浓度分别为 4, 10, 20, 40, 100 和 250 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液, 按“2.2.1”项下电泳条件进样检测, 记录峰面积, 绘制标准曲线。以峰面积(A)为纵坐标, GEM 浓度(c)为横坐标, 得标准曲线方程为 $A=2.462\ 3c+3.421\ 82$, $r=0.999\ 9$ 。

2.2.3 包封率的测定 精密移取 3 份不同批次的 18-GGNL 0.2 mL, 置于阳离子交换树脂柱顶端表面中央, 停留 1 min 后 2 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 再加 0.4 mL 双蒸水于柱顶, 2 000 r·min⁻¹ 离心 3 min 洗脱 4 次, 合并洗脱液, 移至 10 mL 量瓶中用 10% Triton X-100 溶液 0.2 mL 破乳, 水稀释至刻度, 摇匀。按照“2.2.1”项下电泳条件测定包封于脂质体中药物浓度(记作 C₁)。另精密量取 18-GGNL 0.2 mL, 加 1.6 mL 双蒸水于 10 mL 量瓶中, 10% Triton X-100 溶液 0.2 mL 破乳, 水稀释至刻度, 摇匀。按“2.2.1”项下电泳条件测定药物总浓度(记作 C₀), 并按下式计算包封率: 包封率 = $C_1/C_0 \times 100\%$ 。

2.2.4 稳定性参数的测定^[6] 精密吸取 18-GGNL 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中, 用 PBS(pH 6.0)稀释至刻度, 以 PBS 为空白测定其在 500 nm 处的吸光度, 记作 A。取适量 18GGNL 于离心管中, 离心, 精密吸取下层液 0.2 mL 置于 10 mL 量瓶中, PBS 稀释至刻度, 测定其在 500 nm 处的吸光度, 记作 A', 根据公式 $K_e=|A'-A|/A \times 100\%$, 稳定性参数值(K_e)较小, 即离心前后吸光度变化小, 表明脂质体具有良好的分散性和稳定性。

分别使用上述 4 种方法制备 3 批 18-GGNL, 测定并计算包封率和稳定性参数, 结果见表 1。薄膜分散法和乙醇注入法的包封率较低, 逆向蒸发法制得脂质体包封率虽相对较高, 但稳定性较差, 综合考虑, 选择硫酸铵梯度法。

表 1 不同制备方法得到的 18-GGNL 的包封率(n=3)

Tab. 1 Encapsulation efficiency of 18-GGNL prepared by different methods(n=3)

制备方法	包封率/%	K _e /%
薄膜分散法	44.9±3.4	5.5±1.3
逆向蒸发法	60.1±1.7	10.6±0.6
改良乙醇注入法	47.7±2.9	6.2±1.1
硫酸铵梯度法	65.3±2.6	4.6±1.4

2.3 单因素考察与处方优化

2.3.1 磷脂与胆固醇质量比对包封率的影响 固定其他条件不变,按“2.1.4”项下处方量制备,分别考察磷脂与胆固醇比为2:1,3:1,4:1对包封率的影响,结果见表2。

表2 磷脂与胆固醇质量比对包封率的影响(n=3)

Tab. 2 Effect of mass ratio of phospholipids to cholesterol on the encapsulation efficiency(n=3)

磷脂与胆固醇比	包封率/%	RSD/%
2:1	52.5	0.64
3:1	64.1	0.48
4:1	55.9	0.52

2.3.2 18-Gal 加入量对包封率的影响 按“2.1.4”项下处方量制备且固定其他条件不变,分别加入质量为15,20,25,30 mg的18-Gal,结果见表3。

表3 18-Gal 加入量对包封率的影响(n=3)

Tab. 3 Effect of 18-Gal addition on encapsulation efficiency(n=3)

18-Gal 加入量/mg	包封率/%	RSD/%
15	36.1	0.41
20	41.4	0.54
25	39.3	0.37
30	39.5	0.63

2.3.3 脂物比对包封率的影响 按“2.1.4”项下处方量制备且固定其他条件不变,取脂物比分别为1:5,1:10,1:20,1:30制备18-GGNL,测其包封率,结果见表4。

表4 药脂比对包封率的影响(n=3)

Tab. 4 Effect of lipid ratio on lipid encapsulation efficiency(n=3)

脂物比	包封率/%	RSD/%
10:1	50.1	0.58
20:1	65.0	0.62
30:1	62.4	0.34

2.3.4 (NH₄)₂SO₄ 浓度对包封率的影响 按“2.1.4”项下处方量制备且固定其他条件不变,分别采用浓度为0.15,0.20,0.25 mol·L⁻¹(NH₄)₂SO₄溶液制备18-GGNL,结果见表5。

2.3.5 孵育温度对包封率的影响 按“2.1.4”项下处方量制备且固定其他条件不变,将18-GGNL分别于45,50,55,60,65℃孵育,结果见表6。

2.3.6 孵育时间对包封率的影响 按“2.1.4”项下处方量制备且固定其他条件不变,将18-GGNL分别恒温孵育10,20,30,40 min,结果如表7。

表5 (NH₄)₂SO₄ 浓度对包封率的影响(n=3)

Tab. 5 Effect of concentration of (NH₄)₂SO₄ on encapsulation efficiency(n=3)

浓度/mol·L ⁻¹	包封率/%	RSD/%
0.15	50.3	0.59
0.20	61.6	0.68
0.25	53.2	0.42

表6 孵育温度对包封率的影响(n=3)

Tab. 6 Effect of incubation temperature on the encapsulation efficiency(n=3)

温度/℃	包封率/%	RSD/%
40	38.1	0.34
50	41.2	0.76
60	38.3	0.58

表7 孵育时间对包封率的影响(n=3)

Tab. 7 Effect of incubation time on the encapsulation efficiency(n=3)

时间/min	包封率/%	RSD/%
10	35.2	0.62
20	38.6	0.63
30	43.1	0.49
40	42.6	0.44

2.3.7 冰浴时间对包封率的影响 按“2.1.4”项下处方量制备且固定其他条件不变,将孵育后的GEM纳米脂质体冰浴5,10,20 min,结果见表8。

表8 冰浴时间对包封率的影响(n=3)

Tab. 8 Effect of ice bath time on encapsulation efficiency(n=3)

时间/min	包封率/%	RSD/%
5	37.7	0.31
10	38.3	0.62
20	37.6	0.40

2.4 Box-Benhnken 响应面法优化处方工艺^[7-9]

2.4.1 Box-Benhnken 设计 在单因素考察的基础上,排除对包封率影响不显著的因素后选择3个因素,即磷脂与胆固醇质量比(X₁),脂药比(X₂)和(NH₄)₂SO₄浓度(X₃)作为自变量,以包封率(Y)为响应值,建立模型,利用Design Expert 7.0.0软件建立的Box-Benhnken实验设计,结果见表9。

2.4.2 二次回归模型的建立和方差分析 应用Design Expert软件对表9中数据进行二次多元回归分析,得Y=71.44+0.94X₁+1.00X₂-0.51X₃+0.21X₁X₂-0.40X₁X₃+0.075X₂X₃-4.72X₁²-5.00X₂²-2.27X₃²,对模型进行回归方差分析和显著性检验,结果见表10。

表 9 Box-Behnken 设计与试验结果

Tab. 9 Experimental results and values of responses for Box-Behnken design

试验号	X_1	X_2	X_3	$Y/\%$
1	3(0)	20(0)	0.20(0)	71.8
2	3(0)	20(0)	0.20(0)	71.3
3	4(1)	30(1)	0.20(0)	63.9
4	4(1)	10(-1)	0.20(0)	61.2
5	3(0)	10(-1)	0.15(-1)	64.0
6	3(0)	20(0)	0.20(0)	71.5
7	3(0)	20(0)	0.20(0)	71.2
8	3(0)	30(1)	0.25(1)	64.5
9	3(0)	20(0)	0.20(0)	71.4
10	2(-1)	10(-1)	0.20(0)	59.8
11	3(0)	10(-1)	0.25(1)	62.8
12	3(0)	30(1)	0.15(-1)	65.4
13	2(-1)	30(1)	0.20(0)	62.0
14	4(1)	20(0)	0.25(1)	64.6
15	2(-1)	20(0)	0.25(1)	63.3
16	4(1)	20(0)	0.15(-1)	66.4
17	2(-1)	20(0)	0.15(-1)	63.5

表 10 包封率回归模型方差分析

Tab. 10 Encapsulation efficiency regression model analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	261.18	9	261.18	283.60	<0.000 1
X_1	7.03	1	7.03	63.89	<0.000 1
X_2	8.00	1	8.00	86.96	<0.000 1
X_3	2.10	1	2.10	30.81	0.002 7
X_1X_2	0.063	1	0.063	2.98	0.461 1
X_1X_3	0.64	1	0.64	5.55	0.041 3
X_2X_3	0.023	1	0.023	2.98	0.654 1
X_1^2	93.80	1	93.80	854.69	<0.000 1
X_2^2	105.05	1	105.05	1 032.62	<0.000 1
X_3^2	21.70	1	21.70	246.64	<0.000 1
残差	0.72	7	0.10		
失拟项	0.51	3	0.17	3.19	0.145 6
纯误差	0.21	4	0.053		
总和	261.90	16			

模型的决定系数 Radj^2 值为 0.993 7, 表明方程的因变量与全体自变量间线性关系显著, 响应值的变化有 99.37% 来源于所选自变量, 即磷脂与胆固醇比, 脂质与药物比和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度。模型的变异系数(CV)为 0.49%, 说明模型的精密度良好。由表 9 可知, X_1 、 X_2 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 项差异极显著 ($P<0.000 1$), X_3 、 X_1X_3 项具有差异显著 ($P<0.05$), 其他项对 Y 的影响不显著。方程的失拟项 F 值为 3.19, $P=0.145 6$, 概率 $P>0.05$, 失拟项不显著, 说明回归方程在整个回归区域的拟合情况良好, 可用该回归模型代替实验真实点对实验结果进行分析。

2.4.3 响应面优化与预测 应用实验设计软件绘制各因素对评价指标的三维响应面图, 结果见图 1。由图 1A 可知, 固定 X_1 为 3 : 1 时, 当 X_2 为 20 : 1, X_3 为 $0.20 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为时, 包封率达到最大。 X_2 对 18-GGNL 包封率的影响大于 X_3 的影响, 其包封率随着 X_2 的增加先迅速升高后降低, 随着 X_3 的增加先升高后逐渐降低。由图 1B 可知, 固定 X_2 为 20 : 1, 当 X_1 为 3 : 1, X_3 为 $0.20 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 包封率达到最大。 X_1 对 18-GGNL 包封率的影响大于 X_3 的影响, 包封率随着 X_1 的增大先迅速升高后缓慢降低, 随着 X_3 增加先增大后缓慢减小。由图 1C 可知, 固定 X_3 为 $0.20 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 当 X_1 为 3 : 1, X_2 为 20 : 1 时, 脂质体的包封率达到最大值, 且 X_2 对 18-GGNL 包封率的影响稍大于 X_1 的影响, 18-GGNL 的包封率随着 X_1 与 X_2 的增加, 呈先增大后减小的趋势。

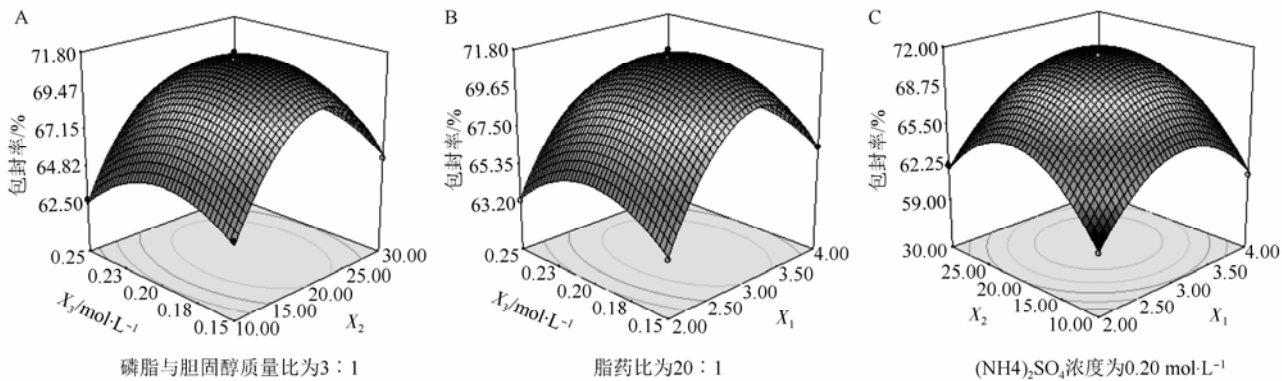


图 1 脂质体包封率的影

Fig. 1 Effects of the ratio on encapsulation efficiency

回归模型预测的最佳处方工艺为磷脂与胆固醇比例为 3.10 : 1、脂药比为 20.99 : 1、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 $0.19 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 模型预测包封率为 71.6%。

以此最佳工艺制备 3 批脂质体, 测定其平均包封率为 70.8%, 结果见表 11。模型预测值和实验观察值都比较接近, 模型具有良好的预测性。

表 11 包封率的实验值、预测值及其偏差

Tab. 11 The observed and predicted values of entrapment efficiency and their residuals

批号	试验包封率%	预测包封率%
1	71.8	71.6
2	69.9	71.6
3	70.7	71.6

2.5 评价指标

2.5.1 18-GGNL 的粒径 优化工艺条件下制备的 3 批脂质体混悬液，激光粒度仪测定其粒径，平均粒径为 $(89.5 \pm 5.3) \text{ nm}$ ，聚分散指数(Polydispersity Index, PDI)为 0.275 ± 0.012 ，分散较均匀。见图 2。

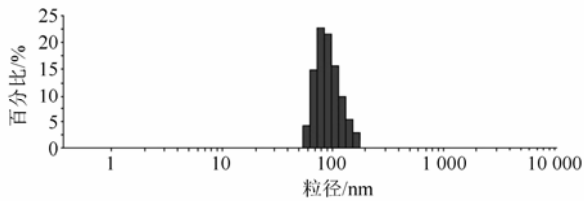


图 2 18-GGNL 脂质体粒径图

Fig. 2 18-GGNL liposome particle size chart diagram

2.5.2 稳定性考察 累积渗漏率的测定分别取上述工艺制备的 3 批脂质体混悬液，于冰箱 4℃和室温 25℃条件下，放置 60 d，分别于 7, 15, 30, 60 d 取样，按照“2.2.3”项下方法测定脂质体在不同时间渗漏出来的游离药物的量，平行测定 3 次。照下式计算渗漏率， $Q_{\text{渗}} = (W_{\text{游}} - W_{\text{始游}}) / W_{\text{包}} \times 100\%$ 。式中， $Q_{\text{渗}}$ 为渗漏率， $W_{\text{游}}$ 为定期测得的游离药量， $W_{\text{始游}}$ 为初始时的游离药量。结果见表 12。

表 12 脂质体的渗漏率($n=3$)

Tab. 12 Leakage rates of liposomes($n=3$)

贮存条件	7 d/%	15 d/%	30 d/%	60 d/%
4℃	0.9 ± 0.1	2.2 ± 0.3	4.3 ± 0.4	6.1 ± 0.7
25℃	1.5 ± 0.6	3.3 ± 0.6	6.8 ± 0.8	8.2 ± 0.9

2.5.3 体外释放度考察^[10] 采用平衡透析法，分别精密量取适量 18-GGNL 和 GEM 溶液于已活化的透析袋中，封口后放入锥形瓶中，加入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 400 mL，37℃恒温磁力搅拌，转速为 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，分别于 0.5, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24 h 取透析液 1 mL，过滤，同时补充 1 mL 新鲜磷酸盐缓冲液，滤液测定药物浓度，计算药物累积释放百分率，结果见图 3。

3 讨论

肝半乳糖受体只存在于动物肝实质细胞表面，其可特异性的与半乳糖或其某些衍生物结合，故 18-Gal 修饰的脂质体对于肝脏有特殊的亲和力。

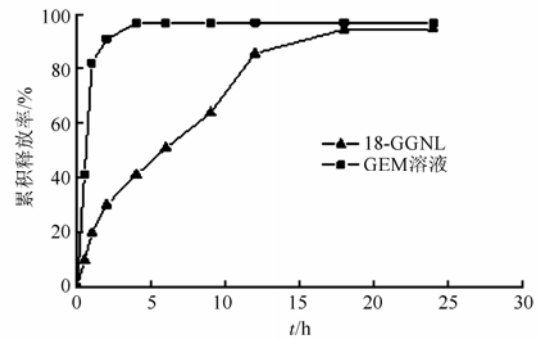


图 3 18-GGNL 和 GEM 溶液累积释放曲线

Fig. 3 18-GGNL and GEM cumulative release curve

本研究选择了硫酸铵梯度法使 18-GGNL 的包封率得到明显提高。是由于 GEM 系水溶性弱碱药物，GEM 能与脂质体的双分子层内的硫酸根离子结合而生成溶解度小的硫酸盐，药物不容易透过双分子层并在脂质体内聚集，从而提高药物的包封率^[5]。对硫酸铵梯度法制备 18-GGNL 进行单因素考察，结果可以看出，药脂比越大，包封率越高，说明内水相对药物的缓冲能力是有限的，过多的药物载入脂质体会导致内水相缓冲能力的改变，减小跨膜梯度。同时，本法对孵育温度也具有依赖性，只有达到一定温度，药物才能克服一定的活化能(E_a)壁垒，以分子态通过双分子膜进入内水相^[10]。但温度过高会引起脂质体膜不稳定，导致药物渗漏，另一方面也可能引起跨膜梯度的快速消失，因而使得包封率在孵育温度为 60℃时呈下降的趋势。

本研究考察了硫酸铵梯度法 4℃和 25℃保存 60 d 的渗漏率。25℃保存的 18-GGNL 呈半透明，略有聚集而形成细小颗粒现象，渗漏率 $<9\%$ 。在 4℃中存放的脂质体半透明，无聚集沉淀现象，渗透率明显小于前者。说明硫酸铵梯度法制得的 18-GGNL 稳定，且需低温保存。体外释放结果说明 18-GGNL 的药物释放具有缓释效果。GEM 溶液中 1 h 药物已大量释放，2 h 药物释放达到 91.4%，基本达到完全，而脂质体在 1 h 内药物仅释放 19.8%，12 h 药物释放达到 85.6%，18 h 释放完全达到 94.4%，缓释效果明显。

Box-Behnken 响应面法是近年来国外药学工作者常用的试验设计方法，适用于多因素多水平试验设计，解决了正交设计和均匀设计试验精度不够、无法精确得到最佳点、不能灵敏地考察各因素的交互作用等缺点，相比于中心复合设计法

试验次数少, 节约成本^[11]。

REFERENCES

- [1] CHEN Q Q. Quick U.S. A Fast Guild to Anticancer Drug Substances, Drug Products and Their Chemical Synthesis(美国抗癌药物化学合成速查) [M]. Beijing: Science Press, 2009, 249-250.
- [2] MIU L L, FAN Y, HUANG Z Y, et al. Phase II trial of improved regimen with gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer [J]. Chin J Lung Cancer(中国肺癌杂志), 2012, 15(1): 1-5.
- [3] SUN S F, GUO W Y, CHEN Y, et al. Study on stearyl alcohol derivatives modified liposome and mouse liver targeting drug analysis [J]. Liaoning Med Univ(辽宁医学院学报), 2010, 31(5): 393-396.
- [4] ZHOU Q M, LIU L C, ZHANG D S, et al. Preparation and characterization of gemcitabine liposome injections [J]. Pharmazie, 2012, 67(10): 844-847.
- [5] ZHANG Y J, DENG Y H, YANG Q. Preparation of sunitinib malate liposomes with transmembrane ammonium sulfate gradient [J]. Chin J New Drug(中国新药杂志), 2012, 21(5): 563-570.
- [6] LIU Y, XIAO H, JIN X, et al. Preparation and characterization of curcumin liposomes [J]. Chin J New Drug(中国新药杂志), 2013, 22(15): 1815-1824.
- [7] LIU Y, GUO W Y. Optimization of oxaliplatin liposome formulation by Box-Behnken experimental design [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(11): 1196-1202.
- [8] XIE X Y, LI Y, LI Y K, et al. Box-Behnken experimental design to optimize micromization process of celecoxib by air jet mill [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(7): 836-839.
- [9] LEI W, YU C Q, LIN H Q, et al. Optimized preparation of tacrolimus transfersomes by Box-Behnken response surface method [J]. Her Med(医药导报), 2014, 33(3): 355-360.
- [10] ANG Z Z, WANG Z Z, WU K, et al. Preparation of rivastigmine liposome and its pharmacokinetics in rats after intranasal administration [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2011, 46(7): 859-863.
- [11] CHENG Y, WU Q, YU Q Q, et al. Formula optimization of Docetaxel long-circulation liposomes by Box-Behnken design and response surface method [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43(10): 1946-1950.

收稿日期: 2014-08-25

低频超声波促进重酒石酸卡巴拉汀经皮渗透的研究

梁哲浩¹, 梁漪², 俞振伟³, 应晓英², 王华^{2*}, 梁文权²(1.浙江省中医院, 杭州 310006; 2. 浙江大学, 杭州 310058; 3.浙江大学医学院附属邵逸夫医院, 杭州 310016)

摘要: 目的 研究低频超声波对重酒石酸卡巴拉汀(rivastigmine hydrogen tartrate, RHT)经皮渗透的促进作用。方法 通过对小鼠、大鼠、小型猪和乳猪皮肤性能的考察, 选择乳猪腹部皮肤进行经皮渗透实验。采用 20 kHz 的超声波, 于单室扩散池中测定 2% 的 RHT 水溶液的经皮渗透速率, 考察超声波强度和暴露时间的影响。结果 当超声波暴露时间为 3 min 时, 超声波强度从 2 W·cm⁻² 增加到 11 W·cm⁻², 超声波对 RHT 的促渗倍数从 9.15 倍增加到 84.79 倍。超声波强度为 2 W·cm⁻² 时, 超声时间从 3 min 增加到 30 min, 促渗倍数从 9.15 倍增加到 42.85 倍。结论 低频超声波对 RHT 有很强的经皮渗透促进作用, 增加超声的功率或者延长超声的时间, 均能够明显增强超声对 RHT 的促渗作用。

关键词: 重酒石酸卡巴拉汀; 超声波; 经皮给药; 皮肤

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)04-0455-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.04.017

Study on Enhancements of Low Frequency Ultrasound to Percutaneous Permeability of Rivastigmine Hydrogen Tartrate

LIANG Zhehao¹, LIANG Yi², YU Zhenwei³, YING Xiaoying², WANG Hua^{2*}, LIANG Wenquan²(1. Zhejiang Traditional Chinese Medicine Hospital, Hongzhou 310006, China; 2. Zhejiang University, Hongzhou 310058, China; 3. Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the promoting effect of low frequency ultrasound on percutaneous penetration of rivastigmine hydrogen tartrate. **METHODS** Through investigating the skin performance of mice, rats, miniature pig and suckling pig, the suckling pig abdominal skin was used in percutaneous experiments. The percutaneous permeability of 2%

作者简介: 梁哲浩, 男, 主治医师 Tel: (0571)87068001 E-mail: wanghua@zju.edu.cn

Tel: (0571)87068001 E-mail: drugabc@163.com

*通信作者: 王华, 男, 工程师 Tel:

中国现代应用药学 2015 年 4 月第 32 卷第 4 期

Chin J Mod Appl Pharm, 2015 April, Vol.32 No.4

• 455 •