

拌析晶 2 h, 抽滤, 滤饼用二氯甲烷-乙酸乙酯(2:3)混合液洗 3 次, 将产物 40 °C 鼓风干燥 12 h, 得到 9.33 g 化合物 **6**, 收率: 93.3%, 纯度: 99.8%。

2.5 (S)-(+)-N,N-二甲基-1-苯基-3-(1-萘氧基)丙胺(7)的制备

将化合物 **6**(10 g, 14.46 mmol)、二氯甲烷 50 mL、水 50 mL 加入反应瓶, 室温搅拌溶解。加 10% 氢氧化钠溶液调 pH 至 10, 继续搅拌 1 h。静置分层, 水层用二氯甲烷萃取 2 次, 合并有机相。将有机相水洗 2 次; 饱和食盐水洗 1 次; 无水硫酸钠干燥; 抽滤; 浓缩得到 4.26 g 化合物 **7**。收率: 96.5%

2.6 盐酸达泊西汀(1)的制备

将化合物 **7**(4 g, 13.10 mmol)、乙酸乙酯 24 mL 加入反应瓶, 室温搅拌溶解。控温 0~5 °C, 滴加 3.5 mol·L⁻¹ 的氯化氢乙酸乙酯溶液 4.8 mL, 2 °C 条件下搅拌 1 h, 抽滤, 用乙酸乙酯洗涤滤饼 2 次, 将固体 40 °C 干燥 4 h 得到 4.27 g 终成品 **1** 粗品。收率: 95.4%, 纯度: 99.87%。

重结晶: 将终成品 **1** 粗品(4 g, 11.70 mmol)、异丙醇 20 mL 加入反应瓶, 加热回流至样品溶解, 缓慢降温至 -8 °C 搅拌析晶 2 h, 抽滤, 滤饼用乙酸乙酯洗 2 次。将产物 40 °C 真空干燥 12 h, 得到 3.79 g 终成品 **1**。收率: 94.8%, 纯度: 99.98%(面

积归一化法)。mp 182~184 °C, $[\alpha]_D^{25} = +129.3^\circ$ (C=1%, 甲醇); ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): 2.334~2.418[s, 6H, N(CH₃)₂], 2.691~2.775(m, 2H, CHCH₂CH₂O), 3.697~3.733(t, *J*=7.0 Hz, 1H, PhC-H), 3.978~4.035(m, 1H, OCH₂), 4.135~4.188(m, 1H, OCH₂), 6.734~6.753(d, *J*=7.6 Hz, 1H, ArH), 7.281~7.609(m, 9H, ArH), 7.885~7.908(d, *J*=9.2 Hz, 1H, ArH), 8.411~8.433(d, *J*=8.8 Hz, 1H, ArH)。MS *m/z*: 306[M+H]⁺。

REFERENCES

- [1] YIN L L, CHEN G H. Improved synthesis of dapoxetine hydrochloride [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2001, 21(1): 37-39.
- [2] DAI R, GU S L, GU F, et al. Synthesis of dapoxetine hydrochloride [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2008, 17(24): 2119-2121.
- [3] MUKUNDRAY D A, JASUBHAI P D, RAJIV K, et al. Process for preparing dapoxetine: WO, 2008035358 [P]. 2008-03-27.
- [4] ROBERTSON D W, THOMPSON D C, WONG D T (Eli Lilly and Company). 1-phenyl-3-naphthalenyloxypropamines: EP, 0288188 [P]. 1988-10-26.
- [5] KANG S, LEE H K. Highly efficient, enantioselective syntheses of (S)-(+)- and (R)-(-)-dapoxetine starting with 3-phenyl-1-propanol [J]. J Org Chem, 2010, 75(1): 237-240.
- [6] ALT C A, ROBESY R L, VANMETER E E. Intermediates to 1-phenyl-3-naphthalenyloxypropanamines: US, 5292962 [P]. 1994-03-08.

收稿日期: 2015-06-15

利福平脂质体温敏型原位凝胶的制备及其体外释药特征研究

曹佳薇, 倪坚军, 姚君, 周峰, 周中元, 徐颖颖, 蔡鑫君* (浙江省中西医结合医院药剂科, 杭州 310003)

摘要: 目的 制备利福平脂质体温敏型原位凝胶, 并对其体外性质进行研究。方法 采用薄膜分散法制备利福平脂质体, 并对利福平脂质体进行表征研究; 以泊洛沙姆 188、泊洛沙姆 407 为凝胶基质, 制备利福平脂质体温敏型原位凝胶; 以无膜溶出模型研究温敏型原位凝胶体外累积溶蚀率; 采用透析袋法分析药物体外释放情况。结果 制备的利福平脂质体平均粒径、聚分散指数、Zeta 电位、包封率和载药量分别为(149.0±5.67)nm、0.275±0.056、-(29.8±1.59)mV、(79.6±2.67)%、(18.6±0.25)%; 利福平脂质体温敏型原位凝胶的胶凝温度为(34.3±0.6)°C。体外溶蚀曲线和体外释药曲线均符合零级动力学特征。结论 利福平脂质体温敏型原位凝胶的制备工艺简单易行, 体外释放显示其有很好的缓释作用。

关键词: 利福平; 脂质体; 温敏型原位凝胶; 溶蚀

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2016)02-0183-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.012

基金项目: 杭州市卫生科技计划项目(2013A43); 杭州市科技计划引导项目(20130733Q14)

作者简介: 曹佳薇, 女, 主管药师 Tel: (0571)56109721 E-mail: caojiawei1978@163.com *通信作者: 蔡鑫君, 男, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)56109868 E-mail: zjtcxj@163.com

Preparation of Rifampicin Liposomes in Situ Gel System and Its *in Vitro* Release Mechanism

CAO Jiawei, NI Jianjun, YAO Jun, ZHOU Feng, ZHOU Zhongyuan, XU Yingying, CAI Xinjun* (Department of Pharmacy, Integrated Chinese and Western Medicine Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare temperature sensitive in situ gel of rifampicin liposomes, and study its *in vitro* properties. **METHODS** Rifampicin liposomes were prepared by film dispersion method, further, its characteristics were investigated; poloxamer 188 and poloxamer 407 were used as gel base material to prepare temperature sensitive in situ gel of rifampicin liposome. A membraneless dissolution model was used to determine gel erosion of rifampicin in situ gel system. **RESULTS** The zeta potential, dispersion index, the mean particle size, entrapment efficiency, drug loading of liposomes was (149.0±5.67)nm, 0.275±0.056, -(29.8±1.59)mV, (79.6±2.67)%, (18.6±0.25)%, respectively. Gel temperature of rifampicin liposomes in situ gel system was (34.3±0.6)°C. The *in vitro* gel erosion behavior and release behavior of the rifampicin liposomes in situ gel system exhibited the characteristics of zero order kinetics. **CONCLUSION** It is easy to prepare rifampicin liposomes in situ gel system with suitable formulation. The release of the rifampicin liposomes in situ gel system shows good sustained release effect *in vitro*.

KEY WORDS: rifampicin; liposomes; in situ gel system; erosion

肺结核病灶伴有广泛纤维增生, 周围血管分布稀少, 血运不良, 严重影响药物的渗入, 使药物浓度很难达到有效杀菌浓度, 同时结核治疗需要长期联合用药, 易产生许多不良反应^[1-2]。目前临床上常采用经纤维支气管镜介入治疗肺结核, 具有较好的治疗效果, 但也存在着结核药物在病灶滞留能力不强, 造成给药次数频繁, 引起患者顺应性差等问题, 因此亟需开发合适的新制剂, 以满足临床需求^[3]。温敏型原位凝胶能以溶液状态给药, 在用药部位根据温度变化可以发生相转变, 由液态转化形成非化学交联半固体凝胶^[4], 填充于组织间隙, 从而达到延缓药物释放的作用, 并有利于维持局部药物浓度, 适于呼吸道局部治疗。同时相关研究发现, 选择适当的凝胶介质(泊洛沙姆 407、388、188 等)、低剂量经呼吸道给药不会对肺部产生明显的毒性^[5-6]。本实验采用薄膜分散法制备利福平脂质体, 选择温敏型原位凝胶作为利福平脂质体的缓释载体, 从而构建适合气管镜介入技术, 将抗结核药物输送到结核病灶的新型给药系统, 以提高病灶药物浓度, 降低全身不良反应, 并发挥利福平脂质体-温敏型原位凝胶在病灶的缓释作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

利福平对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 130496-200702, 纯度: 98.0%); 利福平原料药(沈阳双鼎制药有限公司, 批号: 14112532, 纯度: 98.0%); 大豆卵磷脂(德国 Lipoid 公司); 胆固醇(Sigma 公司); 泊洛沙姆 188(F68, BASF 公司,

批号: WPCI514B); 泊洛沙姆 407(F127, BASF 公司批号: WPEH540B)。

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Nano-ZS90 型激光粒径分析仪(英国马尔文公司); JEM-1200EX 透射电子显微镜(日本 Jeol 公司); SCIENTZ-II D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 利福平脂质体制备

采用薄膜分散法制备利福平脂质体。分别称取利福平、大豆卵磷脂与胆固醇(质量比为 3:5:1), 溶于氯仿中, 在 45 °C 水浴中减压旋转蒸去氯仿, 使药物和磷脂等在瓶壁上形成均匀的薄膜, 真空干燥后, 将注射用水注入已形成薄膜的烧瓶内, 并在 40 °C 水浴中进行水化。将得到的脂质体溶液磁力搅拌, 进行超声均化 5 min, 过膜后即得脂质体。

1.3 利福平脂质体的表征研究

采用激光粒度仪分析脂质体的平均粒径; 以透射电子显微镜对脂质体进行观察并拍摄照片; 取少许脂质体混悬液滴于铜网上, 再滴加 2% 磷钨酸 1 滴, 静置 10 min 待溶液自然挥干后进行观察拍照。

采用高速离心法测定利福平脂质体的载药量和包封率: 取利福平脂质体混悬液适量, 加入离心管中, 离心 20 min(18 000 r·min⁻¹)。根据相关文献^[7], 采用 HPLC 测定离心后上清液中的利福平含量, 这些药物未包裹进脂质体中, 标示为 W_1 ; 另取等量利福平脂质体混悬液, 加入流动相超声破坏脂质体, 采用 HPLC 测定利福平的总量, 即为

利福平总量, 标示为 W_0 ; 根据以下公式计算利福平脂质体的载药量 (DL) 和包封率 (EE)。 $EE=(W_0-W_1)/W_0 \times 100\%$; $DL=(W_0-W_1)/W_1 \times 100\%$, 其中 W_1 指脂质材料与脂质体中利福平的总量。

1.4 利福平温敏型原位凝胶的制备

分别称取处方量的泊洛沙姆 188、泊洛沙姆 407、加固剂 HPMC, 溶于蒸馏水中, 在搅拌的条件下使其完全溶胀 24 h, 形成稳定的温敏型原位凝胶。另取利福平脂质体加入温敏型原位凝胶中, 低速充分搅拌, 使利福平脂质体能够均匀分散在凝胶体系中, 即得。

1.5 利福平含量测定

1.5.1 色谱条件的确定 根据预试验确定利福平色谱条件, 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-乙腈-0.075 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾-1.0 mol·L⁻¹ 枸橼酸 (30:30:36:4); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 254 nm。

1.5.2 专属性考察 精密量取利福平对照品适量, 用流动相溶解后定容, 得利福平对照品溶液。分别取利福平对照品溶液、空白辅料和利福平脂质体温敏型原位凝胶进行分析, 其中空白辅料采用流动相进行溶解, 凝胶样品采用流动相进行超声提取药物, 考察辅料和体外释放介质对药物测定是否有干扰。

1.5.3 标准曲线的建立 精密量取利福平对照品 27 mg, 用流动相溶解后定容, 得利福平对照品贮备液。取利福平对照品贮备液, 用流动相稀释成 5.296, 10.592, 21.184, 31.776, 42.368, 63.552 μg·mL⁻¹ 系列浓度, 摇匀后分别精密进样 20 μL 注入高效液相色谱仪, 以峰面积 Y 与进样浓度 X 进行线性回归处理。

1.5.4 仪器精密度与回收率试验 取供试品一份, 连续分析检测 6 次, 计算仪器精密度。按处方量的 80%, 100%, 120% 精密称取利福平对照品, 分别加处方比例辅料, 置量瓶中, 用流动相溶解定容。配制成高、中、低 3 个浓度, 采用微孔滤膜过滤, 取续滤液进行分析, 每个浓度平行操作 6 次, 计算加样回收率。

1.6 利福平脂质体温敏型原位凝胶的胶凝温度考察

采用倒置法测定温敏型原位凝胶的胶凝温度。取适量样品于西林瓶中, 在冰水浴开始缓慢加热, 升温速度为 1 °C·min⁻¹, 每升温 1 °C, 取出

西林瓶, 倒置是否形成凝胶, 直到西林瓶中全部形成凝胶, 记录温度, 重复 3 次取平均值。

1.7 利福平脂质体温敏型原位凝胶体外溶蚀及体外释药研究

采用无膜溶出模型研究利福平脂质体温敏型原位凝胶体外累积溶蚀率。称取利福平脂质体温敏型原位凝胶适量置于西林瓶中, 在 (37±0.5) °C 恒温水浴振荡器中使样品形成凝胶。进一步将适量 37 °C 的 PBS 溶液加入到西林瓶中。在一定频率下恒温振荡, 在设定的时间点倾出全部 PBS 溶液, 擦干西林瓶后迅速称重。再重新将西林瓶放入恒温水浴振荡器中平衡, 同时补充同温度的 PBS 溶液, 并继续振荡, 如此重复操作, 直到剩余凝胶量不足起始量的 10%, 计算相邻时间点样品的重量差异即为此期间的凝胶溶蚀量, 绘制凝胶溶蚀曲线。

采用透析袋法研究温敏型原位凝胶体外释药特性。取利福平脂质体与利福平原药各 1 份, 装入透析袋中, 加入释放介质后扎紧口袋。将透析袋置于含有 1% EDTA₂-Na, 1% Na₂SO₃ 缓冲溶液 (500 mL) 中, 使其保持漏槽状态, 在 (37±0.5) °C 恒温水浴振荡 (30 r·min⁻¹), 分别于在规定时间点取样, 补加等量同温释放介质, 透析液用微孔滤膜滤过, 取续滤液采用 HPLC 测定利福平含量, 计算累计释放百分率 (Q_n)。

1.8 统计方法

选择 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 采用独立样本 t 检验分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 利福平脂质体的表征

通过透射电镜观察到的利福平脂质体粒子大小均匀, 未见脂质体之间存在明显聚集现象, 透射电镜图见图 1。激光粒径分析仪测得脂质体的平均粒径 (149.0±5.67) nm, 聚分散系数为 0.275±0.056, Zeta 电位为 -(29.8±1.59) mV。

根据“1.3”项下方法测定利福平脂质体的 DL 和 EE 分别为 (79.6±2.67)% 和 (18.6±0.25)%。

2.2 利福平含量测定方法的确立

本试验建立利福平的 HPLC 含量测定方法专属性高、辅料与释放介质对利福平的含量测定均无干扰, 色谱图见图 1。

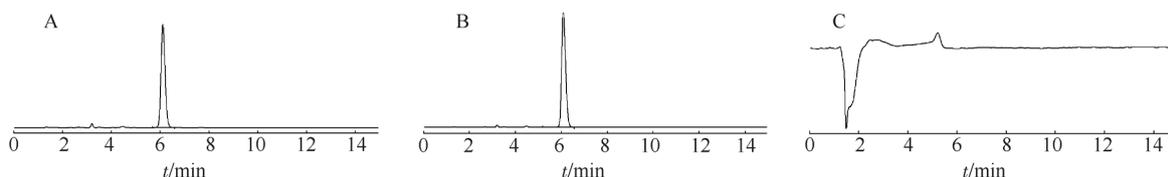


图1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-利福平温敏型原位凝胶; C-空白辅料。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-rifampicin standard solution; B-rifampicin liposomes in situ gel; C-blank in situ gel.

利福平对照品浓度在 $5.296\sim 63.552 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y=44.403X+34.025$, $r=0.9996(n=6)$ 。检测得到的仪器精密度的 RSD 值为 0.22%, 高、中、低加样回收率分别为 $(99.3\pm 0.98)\%$, $(98.9\pm 0.79)\%$, $(99.5\pm 0.103)\%$ 。

2.3 胶凝温度的考察

根据倒置法检测得到利福平脂质体温敏型原位凝胶平均值为 $(34.3\pm 0.6)^\circ\text{C}$ 。

2.4 利福平脂质体温敏型原位凝胶体外溶蚀及体外释药曲线

按“1.6”项下方法绘制利福平脂质体温敏型原位凝胶体外累积溶蚀图, 结果见图 2。通过对其累积溶蚀曲线进行拟合发现, 在 12 h 内利福平脂质体温敏型原位凝胶体外溶蚀符合零级动力学特征, 方程为 $Y=7.4979X+9.4514(r=0.9861)$ 。

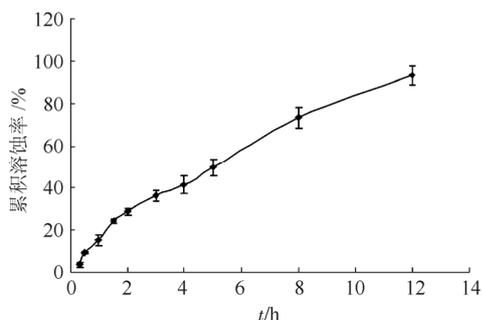


图2 利福平脂质体温敏型原位凝胶体外累积溶蚀曲线图 ($n=3$)

Fig. 2 *In vitro* erosion curve of rifampicin in situ gel system ($n=3$)

按“1.6”项下方法绘制利福平脂质体温敏型原位凝胶体外释药曲线图, 结果见图 3。通过对 3

种制剂体外释药曲线进行拟合发现, 利福平脂质体体外释药曲线符合 Weibull 方程特征, 方程为 $Q_n=0.4758X-0.9181(r=0.9700)$ 。利福平脂质体温敏型原位凝胶体外释药曲线符合零级动力学特征, 方程为 $Q_n=1.8172X+7.2859(r=0.9964)$ 。结果见表 1。

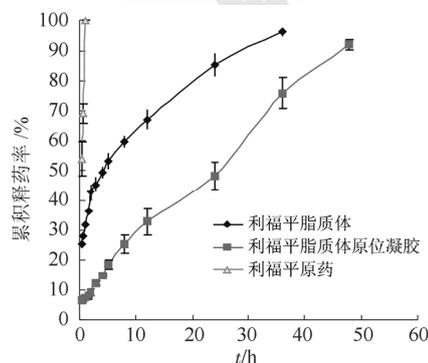


图3 利福平 3 种制剂体外释药曲线图 ($n=3$)

Fig. 3 *In vitro* release curves of rifampicin in three pharmaceutical dosage form ($n=3$)

3 讨论

利福平属于亲脂性药物, 脂溶性较高, 难以有效分散于水溶性原位凝胶中, 因此将其包裹于脂质体, 制备成脂质体混悬液后有效分散于原位凝胶中, 从而发挥缓释作用^[8]。

利福平脂质体温敏型原位凝胶利用了支气管镜介入技术, 将药物局部滞留于病灶, 从而发挥治疗作用。由于采用的气管镜介入技术使得支气管和肺部直接与外界环境相通, 经气管镜吸入的空气温度与室温基本相同, 而病灶部位的温度又接近体温 (37°C), 因此所用的凝胶应当保证其能够顺利通过纤维支气管镜, 而保证凝胶在病灶发生

表 1 利福平 2 种制剂体外释药曲线拟合方程

Tab. 1 Fitted model for *in vitro* release of rifampicin in two pharmaceutical dosage form

剂型	零级动力学方程	一级动力学方程	Weibull 方程
利福平脂质体	$Q_n=1.8963X+36.283(r=0.9447)$	$Q_n=-0.4845X+4.8007(r=0.9550)$	$Q_n=0.4758X-0.9181(r=0.9700)$
利福平脂质体原位凝胶	$Q_n=1.8172X+7.2859(r=0.9964)$	$Q_n=-0.045X+4.6377(r=0.9701)$	$Q_n=0.7083X-2.5002(r=0.9524)$

胶凝。本实验中确定的胶凝温度应当高于室温而低于体温，同时由于凝胶的相变需要时间较长，因此如果不能短时间内在病灶发生相变，凝胶所载的药物会发生突释，降低制剂的缓释作用，因此选择胶凝温度在 30~34 °C 为宜^[9]。

从本实验中可以发现，利福平脂质体体外释药曲线符合 Weibull 方程特征，利福平释放前期速度较快，可能是由于附着于脂质体表面的药物迅速扩散释放，再进一步溶蚀脂质体后释放药物，表现为溶蚀和扩散相结合的释放特征；而利福平脂质体温敏型原位凝胶的释放表现为零级动力学特征，这可能是由于利福平脂质体温敏型原位凝胶的溶蚀表现为零级动力学，药物前期的释放受到凝胶溶蚀控制，使得附着于脂质体表面的药物释放从突释改变为零级动力学特征，到释放后期由于凝胶基本溶蚀完全，释放介质不断渗入，使得利福平脂质体进一步释放其包裹的药物，使得药物释放能够继续保持零级动力学特征。同时利福平脂质体原位凝胶释放时间长于利福平脂质体和利福平原药，可以有效发挥其抗结核杆菌作用，同时减少给药次数。本实验同时对原位凝胶体外溶蚀和原位凝胶中药物释放关系进行拟合，却发现两者不存在显著的相关性，这可能是由于体外溶蚀采用了无膜溶出模型，而该模型却不适用于药物的体外释放条件。

虽然本实验对该新型制剂进行了初步评价，

但对于其生物安全性和有效性尚待进一步研究，以期为临床使用提供可靠的药物剂型。

REFERENCES

- [1] NAHID P, MENZIES D. Update in tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease 2011 [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(12): 1266-1270.
- [2] AGRAWAL Y K, BHATT H G, RAVAL H G, et al. Emerging trends in tuberculosis therapy-A review [J]. *J Sci Ind Res*, 2007, 66(3): 191-208.
- [3] CHEN L R, CHEN Z S, ZOU L R, et al. Efficacy observation of patients with endobronchial tuberculosis treated by endoscopic interventional cryotherapy and drug infusion [J]. *China J Endoscopy*(中国内镜杂志), 2013, 19(9): 986-989.
- [4] CUI J, XU J H, LIU F S, et al. Recent effect of interventional bronchoscopic treatment for tracheobronchial tuberculosis [J]. *Chin J Antituberc Assoc*(中国防痨杂志), 2013, 35(12): 1020-1024.
- [5] WANG X, XIA T, DUCH M C, et al. Pluronic F108 coating decreases the lung fibrosis potential of multiwall carbon nanotubes by reducing lysosomal injury [J]. *Nano Lett*, 2012, 12(6): 3050-3061.
- [6] TODOROFF J, UCAKAR B, INGLESE M, et al. Targeting the deep lungs, Poloxamer 407 and a CpG oligonucleotide optimize immune responses to Mycobacterium tuberculosis antigen 85A following pulmonary delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2013, 84(1): 40-48.
- [7] SINGH N K, LEE D S. In situ gelling pH- and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery [J]. *J Control Release*, 2014(193): 214-227
- [8] CAI X J, XU Y Y, LI F, et al. Application of nanotechnology in the control of lung tuberculosis [J]. *Drugs Future*, 2012, 37(9): 659-661.
- [9] CAI X J, Xu Y Y. Nanomaterials in controlled drug release [J]. *Cytotechnology*, 2011, 63(4): 319-323.

收稿日期: 2015-05-21

结晶粉体修饰用于舒必利直接压片的研究

蒋林波(广东彼迪药业有限公司, 广东 开平 529331)

摘要: 目的 改善舒必利结晶的粉体学性质, 以满足直接压片的技术要求。方法 将舒必利结晶粉碎为 100 目的粉末, 采用 2% HPMC 为修饰剂, 使原料结晶在适宜的搅拌下黏合成较大粒子, 经干燥、过筛后, 与常用直压辅料、崩解剂、润滑剂混合, 压片。结果 所得修饰物的休止角、卡氏指数、流动性等粉体学性质得到明显改善, 采用该修饰物制备的片剂具有较好的硬度和溶出度。结论 该方法可使活性药物成分(active pharmaceutical ingredient, API)达 79% 的舒必利片获得满意的压片效果, 并可望进一步拓展直接压片技术在高 API 难溶性药物上的应用。

关键词: 结晶粉体修饰; 舒必利; 流动性; 直接压片

中图分类号: R943

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2016)02-0187-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.02.013

作者简介: 蒋林波, 男, 工程师 Tel: (0750)2788666 E-mail: jlb1957@sina.com.cn