

4-邻甲苯磺酰氧基苯并噁唑酮脂质体的制备及其质量评价研究

徐 飞, 唐 莉, 李青山*

山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

摘要: 目的 制备新型抗炎镇痛化合物 4-邻甲苯磺酰氧基苯并噁唑酮 (MBB) 脂质体并对其进行质量控制方法研究。方法 采用薄膜分散法制备 MBB 脂质体, 观察脂质体的形态, 测定其粒径与电位, 采用 HPLC 法测定其含量, 并考察其包封率、渗漏率、稳定性等。结果 制备的 MBB 脂质体平均粒径为 46.3 nm, 电位为 -60.25 mV, 包封率为 94%, 且于 4 °C 下储存较稳定。结论 所制备的脂质体粒径均一, 包封率高, 稳定性好, 所建立的 HPLC 分析方法准确可靠、重复性好、操作简便、专属性强, 符合质量测定要求。

关键词: 4-邻甲苯磺酰氧基苯并噁唑酮 (MBB); 脂质体; 质量评价

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2014) 03 - 0246 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.03.012

Preparation and quality evaluation of 4-*O*-methyl-benzenesulfonyl-2 (3H)-benzoxazolone liposomes

XU Fei, TANG Li, LI Qing-shan

School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective To prepare the liposomes of 4-*O*-methyl-benzenesulfonyl-2 (3H)-benzoxazolone (MBB), an anti-inflammatory agent, and to investigate the quality control methods. **Methods** The liposomes were prepared by the film dispersion method, then the morphology and diameter were detected. The content of MBB was determined by HPLC method, and the entrapment efficiency, percolation rate, and stability of liposomes were investigated, respectively. **Results** The mean diameter of the liposomes was 46.3 nm, and the potential was -60.25 mV. The encapsulation efficiency was 94%. The liposomes were stable at 4 °C. **Conclusion** The prepared MBB liposomes show homogeneous diameter, high encapsulation efficiency, and good stability. The HPLC method is sensitive and accurate with good specificity which could be used for the quality control of MBB liposomes.

Key words: 4-*O*-methyl-benzenesulfonyl-2 (3H)-benzoxazolone; liposomes; quality evaluation

化合物 4-邻甲苯磺酰氧基苯并噁唑酮 (MBB) 是由课题组设计合成的具有较好镇痛抗炎活性, 且毒性较低的新型结构化合物^[1]。本化合物易溶于丙酮, 溶于醋酸乙酯和甲醇, 微溶于乙醚和二氯甲烷, 在正己烷和水中几乎不溶。大鼠体内药动学研究结果显示 MBB 血药浓度较低, 消除速率较快, 生物利用度较低, 药动学参数较差^[2]。因此, 选择合适的剂型, 增加溶解度, 减慢消除速率, 改善药动学参数, 以提高其生物利用度, 具有重要的意义。

脂质体作为近年来研究较为广泛的新型药物载体^[3], 其突出优点在于可以提高药物的溶解性; 增

强药物的生物利用度; 使药物具有靶向性; 增加药物的缓释作用^[4-7]。因此将 MBB 制成脂质体给药, 可以提高药物的稳定性、增强靶向性、提高生物利用度、增强缓释作用等。本实验制备了 MBB 脂质体并对其进行系统的质量评价, 为进一步的体内药效学及药动学研究提供质量均一稳定的样本。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 series 高效液相色谱仪 (美国惠普公司); Odyssil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 旋转蒸发仪 (德国 Heidolph 公司); U—3900 紫外分光光度计 (日本日立公司); 电子天平 (瑞士 Mettler

收稿日期: 2013-12-13

基金项目: 山西省科技攻关项目 (20110321076)

作者简介: 徐 飞, 男, 硕士, 研究方向为药物化学。Tel: 13834502545 E-mail: 99xu.99@163.com

*通信作者: 李青山, 男, 博士, 教授, 研究方向为基于代谢和机制研究的药物设计合成、中药及天然药物的药效物质基础研究。

Tel: (0351)4690322 E-mail: sxlqs2012@163.com

Toledo 公司); Hitachi 600 型透视电子显微镜 (日本日立公司); 粒径测定仪 (英国马尔文仪器公司); 集热式恒温磁力搅拌器 (郑州佳创仪器设备有限公司); Lipoid S 100 (德国 Lipoid 公司); 胆固醇 (天津市光复精细化工研究所); 无水乙醇 (北京化工厂); 聚山梨酯-80 (上海申宇医药化工有限公司); MBB 原料药 (山西医科大学药学院药物化学教研室合成, 其质量分数 $\geq 98.5\%$); 甲醇 (国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 采用薄膜分散法制备脂质体

称取处方量的 MBB 原料药 0.3 g、卵磷脂 2.5 g、胆固醇 0.6 g 和聚山梨酯-80 1.2 g 置于茄形瓶中, 加适量乙醇使其完全溶解, 减压蒸除乙醇, 待形成干燥的脂质薄层后加入一定量 (300 mL) 的磷酸盐缓冲液洗膜, 得到 MBB 脂质体。

2.2 表面形态^[8]

取适量生理盐水稀释后的 MBB 脂质体滴至载玻片上, 以体积浓度为 1% 磷钨酸负染后, 再滴至铜网上, 自然挥干, 使粒子在铜网上沉积, 用 TEM 透射电镜观察脂质体的形态并拍照。见图 1, 脂质体形态圆整光滑, 大小均匀, 分散性好。

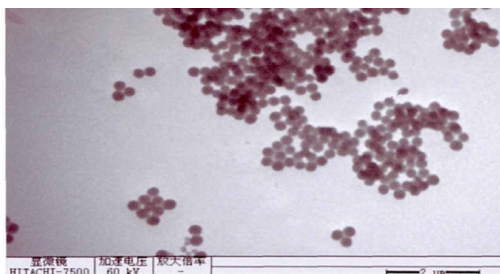


图1 MBB 脂质体的透射电镜图 ($\times 10\,000$)

Fig. 1 Transmission electron photomicrograms of MBB liposomes ($\times 10\,000$)

2.3 粒径和电位

将 MBB 脂质体用 PBS 稀释 10 倍上样, 在纳米粒度测定仪上测定粒度。将 MBB 脂质体用 PBS 稀释 10 倍上样, 在电位测定仪上测定电位。结果粒径大小均匀, 平均粒径为 46.3 nm (图 2), 粒径基本呈正态分布, 测得脂质体的电位为 -65.15 mV , 带电荷均匀 (图 3)。

2.4 MBB 脂质体含量测定方法的建立

2.4.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (55 : 45); 体积流量 0.8 mL/min; 检测波长 273 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;

进样量 10 μL 。

2.4.2 方法的专属性考察 取 MBB 对照品、空白脂质体破乳液、MBB 脂质体破乳液按“2.1.1”项下的色谱条件进样分析。色谱图见图 4, 由图可知, 辅料峰出峰时间和 MBB 的出峰时间相差很大, 因此辅料对药物测定无干扰。

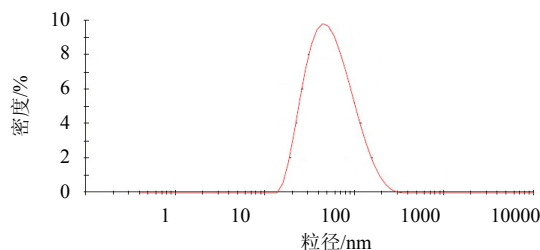


图2 MBB 脂质体粒径

Fig. 2 Diameter of MBB liposomes

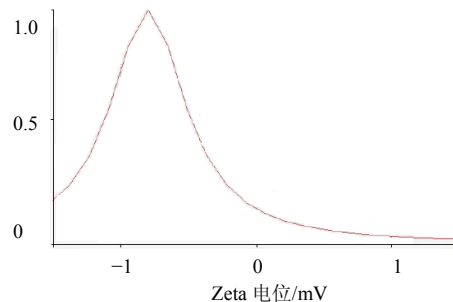


图3 MBB 脂质体 Zate 电位

Fig. 3 Zate potential of MBB liposomes

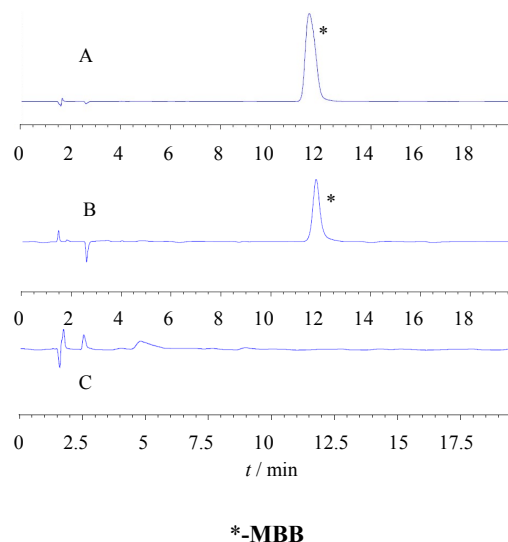


图4 MBB 原料药 (A)、MBB 脂质体 (B) 及空白脂质体色谱图 (C)

Fig. 4 HPLC of MBB (A), MBB liposomes(B) , and blank liposomes (C)

2.4.3 线性关系考察 精密称取干燥至恒重的 MBB 原料药 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解, 制得对照品储备液, 精密量取对照品储备液适量, 用甲醇定量稀释成质量浓度为 1、5、40、80、100、150、200 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 摇匀, 同法配制 3 份, 分别进样, 考察其线性关系。结果表明, 对照品在 1~150 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈良好的线性关系, 回归方程为 $A=3\,954.5C-2\,248.2$, $r=0.999\,7$ ($n=6$)。

2.4.4 检测灵敏度考察 取线性关系项下的脂质体稀释液, 用甲醇稀释成 0.1、0.2、0.25、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 4 个浓度的溶液, 以空白流动相作为对照, 依次进样, 在 273 nm 处检测, 考察信噪比 S/N 为 3 时的样品浓度, 确定本色谱系统对 MBB 的最低检测限为 1.0 ng。

2.4.5 定量限考察 取线性关系项下的脂质体对照品储备液, 用甲醇稀释成 0.25、0.5、0.8、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 4 个浓度的溶液, 以空白流动相作为对照, 依次进样, 考察信噪比 S/N 为 10 时的样品浓度, 确定本色谱系统对 MBB 的定量限为 2.5 ng。

2.4.6 精密度试验 精密称取 MBB 原料药 100.53 mg 至 10 mL 量瓶中, 少量甲醇溶解, 定容至刻度, 得到 MBB 标准液, 取 1 mL 标准液至 100 mL 量瓶中, 流动相定容至刻度, 分别在日内 (0、3、6、9、12 h) 和日间 (0、1、2、3、4 d) 的规定试验时间内进样分析。MBB 峰面积日内 $\text{RSD}=1.29\%$ ($n=5$), 日间 $\text{RSD}=1.34\%$ ($n=5$), 均小于 2.0%, 可以满足定量分析的要求。

2.4.7 回收率实验 在 3 个 10 mL 量瓶中加入空白脂质体 3 mL, 分别精密移取配制的 MBB (1.2 mg/mL) 的甲醇溶液各 0.5、1.0、1.5 mL 于上述容量瓶中, 再加入甲醇溶液破乳并定容, 摇匀得低、中、高 3 个浓度的样品溶液。分别进样测定峰面积, 重复 3 次。计算回收率分别为 100.9%、99.4%、101.4%; RSD 值分别为 0.97%、1.21%、1.16%。

2.4.8 样品的含量测定 精密量取“1.2 项下的 MBB 脂质体溶液”1 mL 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇破乳并定容, 摇匀得供试品溶液。重复进样 3 次, 代入标准曲线方程计算 MBB 的含量。3 批脂质体中 MBB 的测定结果分别为 1.08、0.89、1.17 mg/mL; RSD 值分别为 1.19%、1.16%、1.35%。

2.5 脂质体包封率的测定

精密量取 MBB 脂质体 3 mL 适量于 5 mL EP 管中, 经 5 000 r/min 离心 5 min^[10], 精密量取上清液

1 mL 至 10 mL 量瓶中, 用 3 mL 甲醇破乳, 100 W 超声 5 min, 然后用流动相定容至 10 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 取滤液 10 μL , 按“1.6.1”项下的色谱条件进样分析, 得到的峰面积代入 MBB 线性方程, 即为脂质体中包封 MBB 化合物的含量 $C_{\text{包}}$; 精密量取 MBB 脂质体 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 用 3 mL 甲醇破乳, 100 W 超声 5 min, 然后用流动相定容至 10 mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 取滤液 10 μL , 按“1.6.1”项下的色谱条件进样分析, 得到的峰面积代入 MBB 线性方程, 即为脂质体中游离的 MBB 与包封的 MBB 的总量 $C_{\text{总}}$ 。按照公式计算包封率 ($E=C_{\text{包}}/C_{\text{总}}$)。3 批 MBB 脂质体的包封率分别为 94.16%、93.78%、93.35%。

2.6 渗漏率

4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下储存脂质体, 2 周内每隔 7 d 定期取样, 测定包封率, 与储存前包封的药量比较, 按下式计算渗漏率。

$$L = (E_a - E_b) / E_a \times 100\%$$

L 表示渗漏率, E_a 表示储藏前的包封率, E_b 为储藏一定时间后测的包封率

MBB 脂质体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下储存 2 周后, 没有出现沉淀和絮凝现象, 储存一周, 渗漏率平均为 5.68%, 储存两周渗漏率为 12.44%, 可得出包封率改变不是很明显, 结果见表 1。

表 1 渗漏率的测定
Table 1 Leakage rate test of MBB liposomes

样品	$E_a/\%$	$E_b/\%$	
		7 d	14 d
1	94.37	89.51	83.22
2	94.76	89.35	82.75
3	95.82	89.91	83.54
均值	94.98 ± 0.75	89.59 ± 0.80	83.17 ± 0.41
渗漏率 (L)	—	5.68	12.44

2.7 初步稳定性实验^[11]

取 MBB 脂质体适量, 分别于 4 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 1、2、3、4、5、6 周, 观察是否有沉淀、分层。测定粒径及包封率, 考察粒径变化。

初步稳定性试验表明, MBB 包裹于脂质体后, 常温 25 $^{\circ}\text{C}$ 下保存, 其包封率降解较明显, 稳定性不高; 而在低温 4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存时, 其包封率降解较缓慢, 稳定性较高, 由此可知 MBB 脂质体在低温 4 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下保存较稳定, 结果见表 2。

表2 稳定性试验

Table 2 Stability of MBB liposomes

时间/周	4 °C			25 °C		
	粒径/nm	包封率/%	形态	粒径/nm	包封率/%	形态
0	45.78	94.57	均匀	44.39	95.04	均匀
1	48.34	89.34	均匀	54.19	83.13	均匀
2	58.31	83.73	均匀	139.67	63.14	均匀
3	74.23	71.21	均匀	159.34	46.77	少许沉淀
4	105.36	60.92	均匀	194.62	32.19	沉淀增多
5	129.75	54.52	少许沉淀	—	21.37	明显沉淀
6	—	47.89	分层	—	18.32	大量沉淀

3 讨论

药物包封率是指包裹在脂质体中的药物占脂质体混悬液中药物总量的百分比,包封率是评价脂质体制剂质量好坏的重要指标之一,是其能否发挥较普通制剂高效、提高溶解度、低毒等优点的关键,因此选择合适的测定脂质体包封率的方法尤为关键,低速离心法适用于水溶性极差的药物脂质体的分离,因不溶于水相的药物在水溶液中容易形成微颗粒,使用低速离心可以将游离药物沉积下来,而含药脂质体为纳米粒,在低速离心下不足以形成沉淀。高速离心法适用于水溶性比较好的药物,采用超高速将脂质体沉淀,而药物则溶于水相中。因此使用低速离心法前,有必要对药物在水介质中溶解程度进行考察。精密称取10 mg MBB标准品放5 mL EP离心管中,加2 mL 甲醇使其溶解,使甲醇完全挥发后加3 mL 空白脂质体,100 W超声5 min使MBB化合物在脂质体中分布均匀,然后离心。经试验得5 000 r/min,离心5 min,可使游离药物完全沉淀,而使脂质体完全沉淀需要15 000 r/min离心3 h。故采用低速离心法测定药物的包封率,测得该脂质体的包封率符合要求。

渗漏率、稳定性的问题一直是困扰脂质体生产储存的难点,相同的脂质体保存方法不相同,药物泄漏的程度相差很大。目前常见的保存方法有加抗冻剂保存、4 °C冰箱保存、充氮安瓿保存等。在本实验中,将制得的脂质体置于4 °C冰箱保存,稳定性较好,渗漏率低。

参考文献

- [1] 唐莉,班树荣,林文瀚,等.天然产物4-O-B-D-葡萄糖-苯并噻唑酮及4-取代苯并噻唑酮类衍生物的合成与其活性研究[J].中国药物化学杂志,2009,1(19): 31-35.
- [2] 马云龙. MBB 临床前药理学及药理学的初步研究[D].太原:山西医科大学,2009.
- [3] 杨瑞.紫杉醇长循环热敏脂质体的研究[D].北京:军事医学科学院,2008.
- [4] Mohammed A R, Bramwell V W, Coombes A G A. Lyophilisation sterilization of liposomal vaccines to produce stable and sterile products[J]. *Methods*, 2006, 4(10): 30-38.
- [5] 黄毅,刘松青.喜树碱类药物剂型研究[J].中国药业,2004,13(5): 69-71.
- [6] Immordino M L, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential[J]. *Int J Nanomed*, 2006, 1(42): 297-315.
- [7] Hsieh M F, Lin T Y, Gau R J. Biodegradable polymeric nanoparticles bearing stealth PEG shell and lipophilic polyester core[J]. *J Chin Inst Chem Eng*, 2005, 31(17): 23-29.
- [8] 李东芬.白芍总苷脂质体的研究[D].成都中医药大学,2012.
- [9] 徐金军,韩雪,倪京满.9-硝基喜树碱叶酸聚合物胶束肿瘤靶向给药系统的表征及体外药效评价[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,9(17): 127-131.
- [10] 闫军,贾献慧,唐文照.丹皮酚脂质体的制备及质量控制方法研究[J].中国药房,2010,28(113): 51-53.
- [11] 杨雯姝.注射用重酒石酸长春瑞滨脂质体的制剂学研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2011.