

利福平纳米脂质载体的制备及质量评价

胡建军*, 余 莉, 陈海林, 林 薇, 金海英[#](宁波大学医学院附属医院药剂科, 浙江 宁波 315020)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4879-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.33

摘要 目的:制备利福平(RFP)纳米脂质载体(RFP-NLCs),提高其水溶性,并评价其质量。方法:以液固脂质材料油酸及单硬脂酸甘油酯为脂质材料,大豆卵磷脂为乳化剂,泊洛沙姆188为非离子型表面活性剂,采用熔融-超声乳化法制备RFP-NLCs。以粒径和包封率的综合评分为指标,以脂质材料的用量、液态脂质材料比例、投药量和大豆卵磷脂-泊洛沙姆188质量比为因素,采用正交试验优化处方。测定最优处方所制脂质载体的形态、粒径、多分散指数(PDI)、Zeta电位、包封率、载药量和体外释放度。结果:最优处方中脂质材料用量为150 mg,液态脂质比例为30%,RFP用量为10 mg,大豆卵磷脂-泊洛沙姆188的质量比为1:3。所制RFP-NLCs的外观较圆整,粒径为 (124.07 ± 3.25) nm, PDI为 0.104 ± 0.010 , Zeta电位为 (-31.07 ± 2.94) mV,包封率为 $(80.90 \pm 2.59)\%$,载药量为 $(4.81 \pm 0.68)\%$ ($n=3$)。与RFP原料药比较,RFP-NLCs体外释放度明显减缓,12 h内的累积释放度为63.2%,释药行为符合Weibull方程。结论:筛选处方可成功制备RFP-NLCs;所制RFP-NLCs粒径小、包封率较高,具有体外缓释特征。

关键词 利福平;纳米脂质载体;制备;质量评价

Preparation and Quality Evaluation of Rifampicin Nano-structured Lipid Carriers

HU Jianjun, YU Li, CHEN Hailin, LIN Wei, JIN Haiying (Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Medical College, Ningbo University, Zhejiang Ningbo 315020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare rifampicin (RFP) nano-structured lipid carriers (RFP-NLCs) to improve its water-solubility, and evaluate its quality. METHODS: Using liquid-solid lipid materials oleate and glyceryl monostearate as lipid materials, soy lecithin as emulsifier, poloxamer 188 as nonionic surfactant, melting-ultrasonic emulsification was used to prepare RFP-NLCs. Using the comprehensive scores of particle size and encapsulation efficiency as indexes, the amount of lipid materials, proportion of liquid lipid materials, dosage, and mass ratio of soy lecithin-poloxamer 188 as factors, orthogonal test was adopted to optimize the formulation. The morphology, particle size, polydispersity index (PDI), Zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading and *in vitro* release degree of prepared lipid carriers with optimal formulation were evaluated. RESULTS: In the optimal formulation, the amount of lipid materials was 150 mg, proportion of liquid lipid materials was 30%, amount of RFP was 10 mg, and mass ratio of soy lecithin-poloxamer 188 was 1:3. Prepared RFP-NLCs had rounded appearance, particle size was (124.07 ± 3.25) nm, PDI was 0.104 ± 0.010 , Zeta potential was (-31.07 ± 2.94) mV, encapsulation efficiency was $(80.90 \pm 2.59)\%$, and drug loading was $(4.81 \pm 0.68)\%$ ($n=3$). Compared with RFP raw materials, *in vitro* release degree of RFP-NLCs significantly slowed down, and the cumulative release degree within 12 h was 63.2%, which was in line with Weibull equation. CONCLUSIONS: Screened formulation can successfully prepare RFP-NLCs; the prepared RFP-NLCs have small particle size and high encapsulation efficiency, and the *in vitro* drug release shows certain sustained-release characteristics.

KEYWORDS Rifampicin; Nano-structured lipid carriers; Preparation; Quality evaluation

利福平(Rifampicin, RFP)系抗结核一线用药,对结核杆菌及其他分枝杆菌均有强大的杀菌作用。但由于临床上RFP用药剂量大、作用时间长,易造成严重的胃肠道毒副作用及肝损伤,以致患者依从性较差、治疗失败率升高^[1-5]。纳米脂质载体(Nano-structured lipid carriers, NLCs)为第二代脂质纳米粒,是在固体脂质中加入化学性质不同的液态脂质,使纳米粒变成结晶缺陷型或无定形结构,以达到提高难溶性药物水溶性和载药量的目的,且具有缓释特性^[6-8]。本研究采用熔融-超声乳化法制备RFP-NLCs,采用正交试验优化处方,并评价其质量,以期开发新型RFP给药剂型提供参考。

* 药师。研究方向:医院药学、药物新剂型。电话:0574-87035223。E-mail:526416166@qq.com

[#] 通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:医院药学。电话:0574-87035223。E-mail:13736053092@163.com

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); Nano-ZS型粒径分析仪(英国Malvern公司); HT7700型透射电子显微镜(日本Hitachi公司); OptimaMAX型超速离心机(美国Beckman公司); Scientz-II DN型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

RFP原料药(沈阳双鼎制药有限公司,批号:13050301,纯度: $>98\%$); RFP对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110757-201004,纯度: $>99\%$);单硬脂酸甘油酯(法国Gattefosse公司,批号:127339);油酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:141021);注射用大豆卵磷脂(上海太伟药业有限公司,批号:

20130201); 泊洛沙姆 188 (德国 Basf 公司, 批号: WPAF538B); 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.3 其他

透析袋(美国 Viskase 公司, 截留分子量: 7 000 Da)。

2 方法与结果

2.1 RFP-NLCs 的制备

称取处方量的单硬脂酸甘油酯、油酸和 RFP, 加入少量甲醇, 置于 70 °C 恒温水浴中熔融, 作为油相; 另称取处方量的乳化剂大豆卵磷脂和泊洛沙姆 188, 分散于 20 mL 水中, 作为水相; 待水相加热至与油相相同的温度, 在磁力搅拌下将水相滴加到油相中形成初乳; 趁热将初乳超声 3 min (300 W, 3 s 间隔) 后, 冷却至室温, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得 RFP-NLCs。同法制备不含 RFP 的 NLCs, 作为空白对照。

2.2 RFP 的含量测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Platisil ODS (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.02 mol/L 磷酸二氢钾 (65:45, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 °C; 检测波长: 254 nm; 进样量: 20 μL。在该色谱条件下, 辅料不干扰 RFP 的测定。

2.2.2 线性关系 精密量取 RFP 对照品适量, 加甲醇稀释成质量浓度分别为 50.0、20.0、10.0、5.0、2.0、1.0 μg/mL 的系列对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以峰面积(A)对质量浓度(c)进行线性回归, 得 RFP 的回归方程为: $A=89.944c+49.97$ ($r=0.9999, n=6$)。结果表明, RFP 检测质量浓度在 1.0~50.0 μg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系, RFP 的定量限为 0.5 μg/mL (以信噪比≥10 计)。

2.2.3 精密度、准确度与稳定性 取低、中、高质量浓度 (2.0、10.0、40.0 μg/mL) 的 RFP 对照品溶液, 分别按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 同日内测定 5 次考察日内精密度; 每日测定 1 次, 连续测定 5 d 考察日间精密度; 以测定值/真实值×100% 计算回收率。结果, RFP-NLCs 混悬液的日内、日间精密度 RSD 均小于 2% ($n=5$); 低、中、高浓度样品的平均回收率分别为 (96.51±1.32)%、(97.03±1.43)%、(97.50±1.15)% ($n=3$)。同一批次制备的 RFP-NLCs 混悬液放置 24 h 后再进样测定, 考察稳定性。结果, 稳定性试验中含量的 RSD 为 1.25% ($n=6$)。

2.3 包封率与载药量的测定

精密量取 RFP-NLCs 混悬液, 4 °C 下 225 000×g 离心 60 min。取上清液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定游离 RFP 的含量, 记作 W_1 ; 取离心后沉淀物, 蒸馏水洗涤 3 次, 真空冷冻干燥后精密称定总质量, 记作 W 。另精密量取 RFP-NLC 混悬液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 100 W 超声 10 min, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定 RFP 总含量, 记作 W_0 。计算 RFP-NLCs 的包封率和载药量: 包封率 (%) = $(W_0 - W_1)/W_0 \times 100\%$, 载药量 (%) = $(W_0 - W_1)/W \times 100\%$ 。

2.4 正交试验优化处方

2.4.1 试验设计与结果 根据单因素预试验结果, 选择对 RFP-NLCs 制备工艺、理化性质影响较大的因素, 即脂质材料的用量 (A, mg)、液态脂质比例 (B, %)、投药量 (C, mg) 和大豆卵磷脂-泊洛沙姆 188 质量比 (D) 为考察因素。每个因素选取 3 个水平, 按正交设计 $L_9(3^4)$ 表设计试验, 以粒径 (y_1) 和包封率 (y_2) 的综合加权评分值 [y , $y=50 \times (1 - y_1/y_{1max}) + 50 \times y_2/y_{2max}$] 为考察指标, 筛选 RFP-NLCs 处方。因素与水平见表 1, 正交试验设计与结果见表 2, 方差分析结果见表 3。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(脂质材料用量),mg	B(液态脂质比例),%	C(投药量),mg	D[大豆卵磷脂-泊洛沙姆188(m/m)]
1	100	30	8	1:1
2	150	40	10	1:2
3	200	50	15	1:3

表 2 正交试验设计与结果

Tab 2 Orthogonal test design and results

序号	A	B	C	D	粒径,nm	包封率,%	综合加权评分值
1	1	1	1	1	135.4	69.92	46.87
2	1	2	2	2	122.0	63.30	47.35
3	1	3	3	3	114.5	53.77	44.32
4	2	1	2	3	120.3	80.23	57.49
5	2	2	3	1	125.3	69.40	49.77
6	2	3	1	2	153.2	88.19	51.61
7	3	1	3	2	148.9	68.14	41.60
8	3	2	1	3	158.3	80.50	45.65
9	3	3	2	1	153.1	81.39	47.78
K_1	46.180	48.650	48.043	48.140			
K_2	52.953	47.590	50.870	46.853			
K_3	45.010	47.903	45.230	49.150			
R	7.943	1.060	5.640	2.297			

表 3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

差异来源	离均差平方和	自由度	F	P
A	110.343	2	62.025	<0.05
B(误差)	1.779	2	1.000	
C	47.714	2	26.821	<0.05
D	7.950	2	4.469	

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

由表 2 和表 3 可知, 各因素对综合加权评分值的影响程度依次为 $A>C>D>B$, 其中 A 和 C 对综合加权评分值有显著影响 ($P<0.05$)。以综合加权评分值越大为标准, 筛选得到最优处方为 $A_2B_1C_2D_3$, 即脂质材料用量为 150 mg, 液态脂质比例为 30%, RFP 用量为 10 mg, 大豆卵磷脂-泊洛沙姆 188 质量比为 1:3。

2.4.2 验证试验 按“2.4.1”项下优化的处方制备 3 批 RFP-NLCs, 采用 Nano-ZS 型粒径分析仪检测其粒径、多分散指数 (PDI) 和 Zeta 电位, 按“2.3”项下方法检测其包封率和载药量。结果显示, 所制 RFP-NLCs 的平均粒径为 (124.07 ± 3.25) nm, PDI 为 0.104 ± 0.010 , Zeta 电位为 (-31.07 ± 2.94) mV, 包封率为 $(80.90 \pm 2.59)\%$, 载药量为 $(4.81 \pm 0.68)\%$ ($n=3$)。

2.5 外观形态

取按最优处方制备的RFP-NLCs适量,以2.0%磷钨酸溶液负染,使用HT7700型透射电子显微镜观察其外观形态。结果显示,RFP-NLCs外观形态圆整,大小及分布较均匀。透射电镜图见图1。

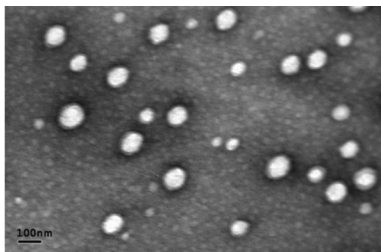


图1 RFP-NLCs的透射电镜图

Fig 1 TEM photograph of RFP-NLCs

2.6 体外释药

精密称取RFP原料药和按最优处方制备的RFP-NLCs适量(约含RFP 2 mg),分散于2 mL释放介质[含1% 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)和1% Na₂SO₃的磷酸盐缓冲液(PBS),pH为7.4]中^[9],装入处理好的透析袋中,密封后置于100 mL释放介质中,于(37 ± 0.5)℃恒温水浴下以75 r/min振荡。分别于15、30、60 min和1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h各取样2 mL,同时补充2 mL同温释放介质。按“2.2.1”项下色谱条件进样检测释放液中RFP的含量,计算累积释放度,并以累积释放度(Q)为纵坐标、时间(t)为横坐标作图,绘制释放曲线。RFP原料药和RFP-NLCs的体外释药曲线见图2。

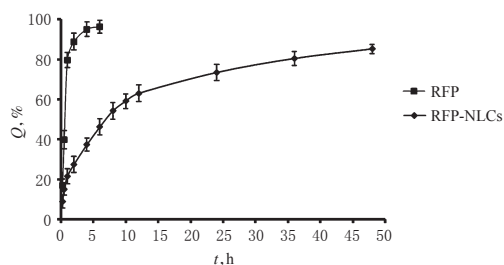


图2 RFP原料药和RFP-NLCs的体外释药曲线(n=3)

Fig 2 The *in vitro* drug release curves of RFP raw materials and RFP-NLCs(n=3)

由图2可见,RFP原料药释药迅速,4 h时的累积释放度已达到95.1%;而RFP-NLCs释药前期有少量突释,12 h时的累积释放度为63.2%,之后平稳释药,48 h时的累积释放度为85.2%。此外,分别用零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi方程和Weibull方程对RFP-NLCs的体外释药行为进行拟合,结果显示,其释药行为符合Weibull方程[$\ln(1/(1-Q)) = 0.5649 \ln t - 1.4861$, $R^2 = 0.9953$]。

3 讨论

笔者曾采用溶剂分散法、薄膜超声分散法制备RFP-NLCs,但所制RFP-NLCs的粒径明显大于熔融-超声乳化法,且较不稳定。综合考察,选用熔融-超声乳化法制备RFP-NLCs。文献[10-11]表明,液态脂质比例在

0~40%范围为宜,其包封率随液态脂质的比例升高,先增大后减少。通过正交试验,本试验最终选择30%的油酸比例。泊洛沙姆188为非离子型表面活性剂,与大豆卵磷脂合用,能插入磷脂单分子层形成稳固的混合层,可减小粒径,亦能提高稳定性。

RFP在水中几乎不溶,选择普通溶出介质难以实现漏槽条件。因此,本试验参考文献[9]中相关内容,选择含1% EDTA-2Na和1% Na₂SO₃的PBS(pH 7.4)作为释放介质。由体外释药曲线可见,RFP-NLCs具有一定的突释性,后期平缓释药,呈现明显的缓释特性。

综上所述,本研究筛选的处方可成功制备RFP-NLCs,所制RFP-NLCs粒径小、包封率较高、具有体外缓释特征。

参考文献

- [1] Riccardi G, Pasca MR. Trends in discovery of new drugs for tuberculosis therapy[J]. *J Antimicrob*, 2014, 67(9): 655-659.
- [2] Riccardi G, Pasca MR, Buroni S. Mycobacterium tuberculosis: drug resistance and future perspectives[J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(5): 597-614.
- [3] Gallardo CR, Comas DR, Figuls MRI, et al. Fixed-dose combinations of drugs versus single-drug formulations for treating pulmonary tuberculosis[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, doi: 10.1002/14651858.CD009913.pub2.
- [4] Alsultan A, Peloquin CA. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis: an update[J]. *Drugs*, 2014, 74(9): 1061.
- [5] 荆颖, 黄淑萍, 王倩, 等. 利福平药动学影响因素的研究进展[J]. *中国药房*, 2017, 28(12): 1726-1728.
- [6] Slavomira D, Souto EB, Silva AM. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers—a systematic review of *in vitro* data[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2014, 87(1): 1-18.
- [7] Belouqui A, Solinís M Á, Rodríguezgascón A, et al. Nanostructured lipid carriers: promising drug delivery systems for future clinics[J]. *Nanomed Nanotechnol*, 2015, 12(1): 143-161.
- [8] Singh H, Jindal S, Singh M, et al. Nano-formulation of rifampicin with enhanced bioavailability: development, characterization and *in-vivo* safety[J]. *Int J Pharm*, 2015, 12(1): 143-161.
- [9] 曹佳薇, 倪坚军, 姚君, 等. 利福平脂质体敏感型原位凝胶的制备及其体外释药特征研究[J]. *中国现代应用药学*, 2016, 33(2): 183-187.
- [10] 孙珊珊, 王慧云, 王飞飞, 等. 阿德福韦酯纳米脂质载体的制备及处方优化[J]. *中国药房*, 2017, 28(16): 2259-2261.
- [11] Shao Z, Shao J, Tan B, et al. Targeted lung cancer therapy: preparation and optimization of transferrin-decorated nanostructured lipid carriers as novel nanomedicine for co-delivery of anticancer drugs and DNA[J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 1223-1233.

(收稿日期:2017-06-05 修回日期:2017-08-28)

(编辑:邹丽娟)