

# 哌仑西平脂质体的研制及评价

戴淑真<sup>1</sup>, 曾骏文<sup>1</sup>, 王子亮<sup>2</sup>, 吴昌凡<sup>1</sup>

(中山大学 1. 眼科中心; 2. 附属第一医院放射介入科, 广东 广州 510060)

**摘要:**【目的】制备稳定性好、包封率高、缓释性能优的哌仑西平脂质体。【方法】采用均匀设计等方法筛选制备哌仑西平脂质体的处方和工艺, 并对其形态、粒径、包封率、加速实验结果及体外释放规律进行考察。【结果】制得的哌仑西平脂质体为单层脂质体, 平均粒径为 480 nm, 包封率为 77.24% ± 9.83%, 其稳定性好, 缓释效果优于哌仑西平磷酸缓冲液。【结论】哌仑西平脂质体达到设计要求。

**关键词:** 哌仑西平; 脂质体; 眼部给药; 质量

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)03-0217-04

## Preparation and Evaluation of Pirenzepine Liposome

DAI Shu-zhen<sup>1</sup>, ZENG Jun-wen<sup>1</sup>, WANG Zi-liang<sup>2</sup>, WU Chang-fan<sup>1</sup>

(1. Zhongshan Ophthalmic Center, 2. The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】To prepare pirenzepine liposome with good stability, high entrapment efficiency and sustained-release effect. 【Methods】The uniform design method was used to optimize the recipe and technology for preparing the pirenzepine liposome. Then the shape, particle size, entrapment efficiency, the results of accelerating experiments and releasing law in vitro of the liposome was investigated. 【Results】The liposome is mono-layer vesicle; its mean particle size is 480 nm and average entrapment efficiency of the prepared liposome is 77.24% ± 9.83%. The stability is good and the liposome has the better sustained-release effect than pirenzepine phosphoric acid buffer solution. 【Conclusions】Pirenzepine liposome is consistent with the design supposition.

**Key words:** pirenzepine; liposome; ocular drug delivery system; quality

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(3): 217 - 220, 240]

哌仑西平 (pirenzepine, PZ) 是一种选择性 M1 受体拮抗剂<sup>[1]</sup>, 临床用于治疗消化性溃疡已有 20 余年历史, 其在眼科领域的研究于近十年兴起。动物实验结果表明<sup>[2]</sup>, 哌仑西平能抑制近视的发生发展并呈一定的剂量依赖性。因哌仑西平与广谱 M 受体拮抗剂阿托品相比不良反应少, 有望成为一种新的近视防治药物<sup>[3]</sup>。但哌仑西平脂溶性差, 不易通过角膜屏障而限制了其作为滴眼剂在临床上的推广使用<sup>[4]</sup>。脂质体 (liposome) 是一种类似微型囊的球状体, 已成功地用作药物运载赋形剂。与游离

药物相比, 载药脂质体具有使用广泛、安全、有效的特性。脂质体作为眼部给药系统能避免药物浓度的波动, 提高跨角膜转运效率。因此用脂质体包封的哌仑西平有可能成为哌仑西平新的有效给药途径。

## 1 材料与方 法

### 1.1 处方筛选与制备

因产品哌仑西平脂质体 (pirenzepine liposome

收稿日期: 2003-09-02

基金项目: 美国 CMB 基金资助项目 (98-677); 广州市科技计划项目 (2002z - 0142)

作者简介: 戴淑真 (1975 - ), 女, 山东济宁人, 在读博士, 住院医师, 研究方向: 屈光不正. E-mail: susan@gzsums.edu.cn

PZL) 的制备方法及配方无详细报道, 故只能通过实验摸索。根据预试验结果并参考有关文献<sup>[5]</sup>, 采用均匀设计的方法设计图表, 见表 1, 按 U9(9<sup>4</sup>) 安排试验。 $x_1$  为制备方法, 每次试验用卵磷脂 68.6 mg, 胆固醇 19.4 mg。a 法为改良冻融法: 将卵磷脂、胆固醇、维生素 E 溶于 10 mL 三氯甲烷后真空状态下 37 °C 蒸发 3 h, 使磷脂等在瓶壁上形成均匀薄膜, 放于真空干燥器中避光过夜除去残留有机溶剂, 加入所需浓度的待包封药物溶液 5 mL, 浸泡数小时后用超声粉碎机在氮气保护下超声振荡(水浴超声, 60 s 1 次, 共 10 次, 再在探头式超声处理机上处理, 60 s 1 次, 共 10 次, 每次间隔 10 s) 得到初制脂质体混悬液。将上述混悬液反复冻融 3 次, 涡旋振荡 20 min, 得到所需脂质体混悬液; b 法为逆相蒸发法<sup>[6]</sup>; c 法为冻融法<sup>[7]</sup>。最终所得到的脂质体混悬液均通过 0.45  $\mu\text{m}$  孔径的滤膜过滤。 $x_2$  为 pH 值,  $x_3$  为抗氧化剂维生素 E 用量,  $x_4$  为所用哌仑西平的量。将均匀设计各次实验所得样品进行包封率 (EE) 测定, 以 EE(实际计算百分值) 为评价指标, 另设 a = 1, b = 2, c = 3, 在微机上经 SPSS11.0 统计软件包行多元逐步回归分析。

表 1 均匀设计表  
Table 1 Uniform design scheme

Level	Factor			
	$x_1$	$x_2$	$x_3$ (mg)	$x_4$ (mg)
1	a	5.0	0.4	8.8
2	a	5.5	0.4	14.7
3	a	5.5	0.6	44.0
4	b	6.0	0.6	176.0
5	b	6.5	0.8	7.3
6	b	7.0	1.0	11.0
7	c	7.5	1.2	22.0
8	c	8.0	1.4	88.0
9	c	8.5	1.6	6.3

a: improved freeze-thawing method; b: reversed evaporation method; c: freeze-thawing method;  $x_1$ : method for manufacture;  $x_2$ : pH level of liposome solution;  $x_3$ : quantity of vitamin E;  $x_4$ : quantity of pirenzepine

## 1.2 质量研究

1.2.1 电镜观察 将脂质体稀释 3 倍, 置于有支持膜的铜网上, 20 g/L 磷钨酸负染色数分钟, 电子显微镜下观察粒子形态并拍摄照片, 测定 800 个小体的粒径, 计算平均粒径、跨距, 绘制粒径分布曲线。

1.2.2 标准曲线的建立 分别取 20  $\mu\text{L}$  无药脂质体和哌仑西平脂质体, 稀释 100 倍, 以 PBS 为对照, 在 200 ~ 400 nm 范围内扫描, 在相同条件下对相同浓度的 PZ-PBS 溶液扫描。①标准曲线 1—哌仑西平磷酸盐缓冲液标准曲线的绘制: 精密吸取 5 g/L PZ-PBS 贮备液 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.25, 2.50 mL 于 25 mL 容量瓶中, 以 0.002 mol/L 的 PBS 定容。上述溶液在 280 nm 波长处测定吸光度 A。②标准曲线 2—哌仑西平脂质体甲醇溶液标准曲线的绘制: 取稀释的空白脂质体 5 mL 共 6 份, 分别加 0.6 mg/L PZ-PBS 贮备液 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 mL, 用甲醇溶解并定容至 25 mL, 以空白脂质体的甲醇溶液作对照, 在 280 nm 波长处测吸光度 A。③回收率和精密度试验: 取 15 份空白脂质体混悬液的稀释液各 1 mL, 分成 3 组, 每组 5 份, 每组分别加入浓度 26.88 mg/L、35.84 mg/L、44.80 mg/L PZ-PBS 溶液 5 mL, 并用甲醇定容至 10 mL, 在 280 nm 处测吸光度 A, 代入标准曲线 2 中计算回收率和精密度。

1.2.3 包封率测定 ①柱分离回收率: 取 1 mL 空白脂质体混悬液, 分别加入 1 g/L PZ-PBS 贮备液 1.278 mL、1.597 mL、1.916 mL, 并均用 PBS 稀释至 5 mL, 各取 1 mL 上 Sephadex G-50 柱。测定全部洗脱液中哌仑西平总量, 与已知的上柱哌仑西平量相比, 即得平均柱分离回收率。②柱分离曲线: 精密吸取载药脂质体 1 mL, 上 Sephadex G-50 柱, 用 pH = 6.0 的 PBS 缓冲液为洗脱液, 1 mL/min 的流速进行洗脱, 每 2 mL 收集 1 管, 直至游离哌仑西平全部流出, 测定洗脱过程收集的每管吸光度 A, 以 A 对管数作图, 绘制流出曲线。③包封率测定: 根据柱分离曲线, 直接收集 40 mL 体积以后的流出液 40 mL, 移至 50 mL 容量瓶中, 加水至刻度, 以空白流出液作空白, 在 280 nm 处测定 A, 代入标准曲线 1 中求出哌仑西平的质量即  $m_f$ , 另精密吸取哌仑西平脂质体 1 mL 至 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 测 A 值, 代入标准曲线二中, 计算出每毫升哌仑西平脂质体混悬液中所含哌仑西平总量  $m_{总}$ 。代入公式:

$$\text{包封率(EE\%)} = (1 - m_f / m_{总}) \times 100\%$$

$m_f$  为游离哌仑西平含量;  $m_{总}$  为哌仑西平脂质体中被包封药量 +  $m_f$ 。

1.2.4 稳定性实验 采用加速试验法, 由于磷脂的相变温度为 40 °C ~ 50 °C, 在 75% 恒湿条件下, 于

20 ℃, 30 ℃, 40 ℃ 进行加速试验, 观察外观、包封率及平均粒径的变化, 采用两样本均数比较的  $t$  检验对包封率及平均粒径的变化进行统计学分析。

1.2.5 体外释放实验 取 PZL、相同浓度的 PZ-PBS、和空白脂质体混悬液各 2 mL, 用 PBS 稀释 2 倍, 装入透析袋内, 两端用夹子夹紧 (袋内除气泡), 置于 400 mL 的烧杯中。释放介质为 0.002 mol/L 的 PBS (pH = 6.0) 100 mL, 置于温度为 37 ℃ 的摇床上, 摇动幅度 50 r/min, 于 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 取样 5 mL, 同时补加同体积新鲜接受液, 每个时间点哌仑西平脂质体的紫外吸光度值用相应时间点的空白脂质体的吸收值进行校正, 同一样品取 3 次试验平均值。按以下公式计算累积释药量  $C_i = f(A_i)$ ,  $Q_n = 100 C_n + 5 \sum C_i$  ( $Q_i = 100 C_i$ ,  $i = 1, 2, 3, \dots, n = i + 1$ )。 ( $C$  为药物浓度,  $Q$  为累积药物释放量,  $A$  为测得的药物吸光度值,  $i, n$  分别为取样次数)。以累积释放百分含量对时间作图得二者的释放曲线。

## 2 结果

### 2.1 处方筛选

1~9 次试验制备的脂质体的包封率分别为 66.97%, 75.38%, 41.94%, 48.03%, 80.70%, 64.48%, 30.06%, 23.98%, 33.88%。经多元逐步回归分析得回归方程:  $\hat{y} = 149.20 - 18.18 x_2 + 25.50 x_3$ ,  $r = 0.804$ ,  $n = 9$ ,  $s = 10.72$ ,  $F = 12.23$ ,  $P < 0.05$ 。根据回归分析:  $x_2$  系数为负, 宜取下限值,  $x_3$  系数为正, 表明其取值宜大。  $x_1, x_4$  与  $\hat{y}$  间相关性差, 在逐步回归分析时被去除, 表明在所取值范围内, 对结果影响不大。最后, 经综合考察, 制备 PZL 的优化条件为:  $x_1 = a$ ,  $x_2 = 6.0$ ,  $x_3 = 1.6$ ,  $x_4 = 14.7$ 。并将各取值代入方程得  $\hat{y} = 80.51$ , 与实测值 77.24 相近。

### 2.2 质量考察

2.2.1 电镜观察 电镜下可见 PZL 为单层膜结构, 圆形和椭圆形, 大小不均 (图 1)。粒径测定结果表明平均粒径为 480 nm, 跨距为 0.49, 75% 的粒子粒径在 350 nm ~ 570 nm 之间, 以各粒径范围内的粒子数占粒子总数的百分比对各粒径范围的粒子直径平均值作图得粒径分布曲线 (图 2)。

2.2.2 标准曲线的制备 对 PZ-PBS 和脂质体的扫描结果表明: 无药脂质体的扫描曲线只有一个吸

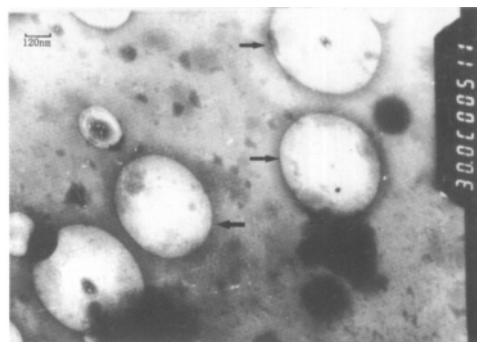


图 1 PZL 透射电镜图

Fig. 1 Transmission electronic microscopic photograph of PZL ( $\times 30\ 000$ )

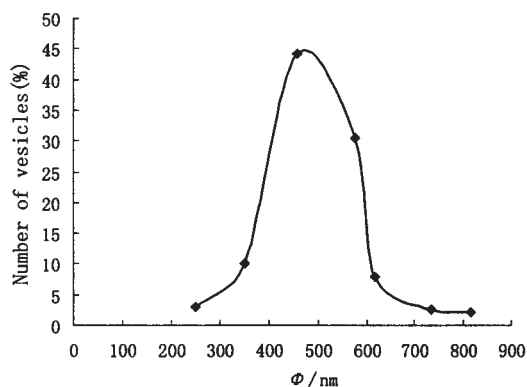


图 2 PZL 粒径分布曲线

Fig. 2 The distribution curve of vesicle diameter

收峰, 在 204 nm, 而 PZ-PBS 在 280 nm 有吸收峰, PZ 脂质体在 204 nm 也有一吸收峰, 另一吸收峰在 280 nm 处, 此峰值较 PZ-PBS 的峰值下降。由此可见, 204 nm 是脂质体的特征波长, 而哌仑西平的紫外吸收波长在 280 nm 处, 脂质体造成哌仑西平吸收峰值下降, 而其峰值无偏移。①将哌仑西平磷酸盐缓冲液及哌仑西平脂质体甲醇溶液的吸光度  $A$  对浓度  $\rho$  进行回归得回归方程分别为: 方程 1,  $\hat{A} = 0.0197\rho + 0.0141$ ,  $r = 0.9998$ ,  $\rho$  在 10 ~ 60 mg/L 范围内线性关系良好; 方程 2,  $\hat{A} = 0.0181\rho + 0.0112$ ,  $r = 0.9968$ ,  $\rho$  在 5 ~ 65 mg/L 范围内线性关系良好。②标准曲线的平均回收率和 RSD 分别为 102.15%, 99.89%, 99.59% 和 1.65%, 1.05%, 1.02%。

2.2.3 包封率测定 PZL 平均柱分离回收率为 97.15%  $\pm$  0.65%, RSD 为 3.39%。柱分离曲线见图 3。从分离曲线上得出, 流出物依次为: 20 mL 空白洗脱液  $\rightarrow$  16 mL 哌仑西平脂质体溶液  $\rightarrow$  8 mL 空白洗脱液  $\rightarrow$  32 mL 游离哌仑西平溶液  $\rightarrow$  空白洗脱液。包封率为 77.24%  $\pm$  9.38%, 药物含量为

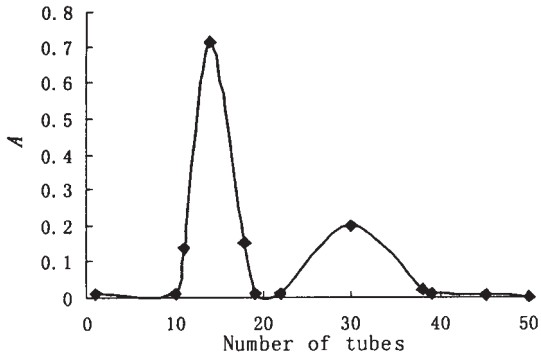


图 3 PZL 的 Sephadex G-50 柱分离曲线

Fig. 3 The Sephadex G-50 column separation curve of PZL

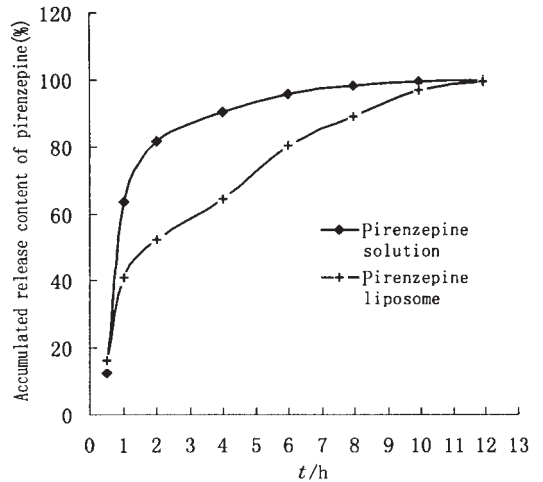


图 4 PZ 水溶液、脂质体累积释放曲线

Fig. 4 Accumulated release curve of pirenzepine solution and pirenzepine liposome

0.29% ± 0.04%。

2.2.4 稳定性实验 加速实验结果见表 2。可见且随着时间增加,产品的粒径有增大的趋势,包封率有减小的趋势,实验前后包封率及平均粒径的统计学分析结果表明 P 值均大于 0.05,差异无显著性,因此尚不能认为该方法制备的 PZL 稳定性不好。

表 2 PZL 加速实验结果

Table 2 The results of PZL accelerating tests

Products	t/°C	t/mon	EE (%)	φ/nm
PZL	20	0	76 ± 5	488 ± 25
		3	74 ± 5	510 ± 45
	30	0	75 ± 6	498 ± 57
		3	72 ± 7	518 ± 46
	40	0	74 ± 6	506 ± 56
		3	69 ± 6	530 ± 53

EE: entrapment efficiency; All t value < 1.20 within the same temperature for EE; All t value < 1.21 within the same temperature for diameter

2.2.5 体外释放实验 释放曲线如图 4, 哌仑西平水溶液在 2 h 时释药已达 81.74%, 6 h 时趋于平衡, 而哌仑西平脂质体 6 h 时释药为 80.44%, 10 h 时趋于平衡。可以认为脂质体包裹的哌仑西平具有缓慢释放效果, 达到设计要求。对哌仑西平水溶液、哌仑西平脂质体的释药数据用一级释药模型拟合得哌仑西平水溶液和哌仑西平脂质体的释药方程分别为:  $y = 1 - 0.489e^{-0.239x}$ ,  $r = 0.83611$ ,  $s = 0.131$ ,  $F = 30.61$ ,  $P < 0.01$ ;  $\hat{y} = 1 - 0.645e^{-0.245x}$ ,  $r = 0.98403$ ,  $s = 0.03723$ ,  $F = 432.42$ ,  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

均匀设计是我国学者方开泰教授提出的多因素试验法, 以均匀性为出发点, 其试验点散布均匀, 可以通过少量实验次数获得可靠结果。本研究以制备包封率高的制剂为目的, 采用均匀设计的方法筛选制备处方, 经综合考察得到了制备哌仑西平脂质体的最佳条件, 结果制得的哌仑西平脂质体包封率达 77.24%, 平均粒径为 480 nm, 跨距为 0.49, 75% 的粒子粒径在 350 ~ 570 nm 之间, 达到设计要求。

脂质易氧化是导致脂质体不稳定的重要原因, 预实验结果表明不含抗氧化剂的脂质体混悬液 4 °C 下放置 1 个月即出现氧化变黑和絮状沉淀。维生素 E 临床应用多年, 因其氧杂萘满环上 6- 位羟基可提供氢自由基, 使过氧化物失活, 从而终止脂肪酸过氧化链反应, 具有极强的抗生物膜过氧化作用<sup>[8]</sup>。实验证实制备过程中添加维生素 E 后脂质体稳定性明显提高, 4 °C 下放置 3 个月尚未观察到氧化反应的发生; 加速实验 40 °C 下放置 3 个月其包封率和粒径与放置前相比统计学上无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 进一步考察更长时间该脂质体的稳定性对于它的临床推广使用至关重要。

缓释效应是脂质体制剂的重要特征, 也是脂质体作为药物载体增强药物疗效的基础。体外释放结果表明, 哌仑西平脂质体较哌仑西平水溶液有明显的缓释效果, 6 h 时释药为 80.44%, 释放规律符合

(下转第 240 页 to page 240)

脂质体混合物孵育时间 15 min 时, 转染时间 2 h, 转染效率为 17.5%。虽然阳离子脂质体对细胞毒性小, 但在大剂量时, 不仅不经济, 而且脂质体对细胞的活性也会产生毒性反应, 转染时间过长, 脂质体对细胞的活性也会产生毒性反应。

本研究中质粒 pIRES-EYFP/VEGF<sub>121</sub> 在原代培养大鼠肝细胞的转染效率达到 17.5%, 可能与 NAIR-1 培养基中含有胎牛血清、胰高血糖素、表皮生长因子、胰岛素、甲状腺素、氢化可的松和转铁蛋白等可能提供适宜细胞因子微环境有利于分离肝细胞贴壁、存活或增殖, CLONfectin 对转染过程中对胎牛血清限制不严, 有利于通过胞饮作用或浆膜融合等, 使质粒转染效率提高。用 FCM 以荧光素蛋白质作为报告蛋白质是一种方便快捷同时检测基因转染效率和细胞平均表达水平的方法。为以大鼠原代培养肝细胞进行肝细胞移植和肝基因治疗的深入研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 王金林, 闵 军, 周晓东, 等. 加强型黄色荧光蛋白和 VEGF 双基因载体在肝细胞共转染表达 [J]. 中山医

科大学学报, 2002, 23(4):254-6.

- [2] Zhou X D, Tokiwa T, Kano J, et al. Isolation and primary culture of adult pig hepatocyte[J]. Meth Cell Sci, 1998, 19(4): 277-84.
- [3] Watanabe Y, Nomoto H, Takezawa R, et al. Highly efficient transfection into primary cultured mouse hepatocytes by use of cation-liposome: an application for immunization [J]. J Bio Chem, 1994, 116(6): 1220-6.
- [4] Keith M B, Farrell P J, Iatrou K, et al. Use of flow cytometry to rapidly optimize the transfection of animal cells[J]. Biotechniques, 2000, 28(1): 148-54.
- [5] 王金林, 周晓东, 闵 军, 等. 血管内皮生长因子基因转染对肝细胞移植的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(3): 175-7.
- [6] Tseng W, Haselton F R, Giorgio T D, et al. Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression[J]. J Biol Chem, 1997, 272(41): 25641-7.
- [7] 刘然义, 罗慧玲, 冯海林, 等. 一种用流式细胞术检测基因转移效率的新方法[J]. 癌症, 2002, 21(3): 267-71.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 220 页 from page 220)

一级释药模型。有研究表明用于眼部的药物从其基质中 5 h 内释放小于 80% 有较好的缓释效果<sup>[9]</sup>, 可以认为哌仑西平脂质体是较好的眼用缓释制剂, 但其角膜通透性和药物代谢动力学及其生物利用度有待下一步研究。

总之, 通过本法制得的哌仑西平脂质体包封率高、缓释作用可靠、稳定性好, 符合设计要求。为下一阶段进行药物吸收, 生物利用度等实验打下基础。

#### 参考文献:

- [1] 张 燕, 张旭明, 伍 卫. 哌仑西平对兔心肌梗死心率变异性、压力反射敏感性与心肌电生理特性的影响 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(5): 349-51, 383.
- [2] Tigges M, Iuvone P M, Fernandes A, et al. Effects of muscarinic cholinergic receptor antagonists on postnatal eye growth of rhesus monkey [J]. Opt Vis Sci, 1999, 76(6): 397-407.
- [3] Cottrill C L, McBrien N A, Annes R, et al. Prevention of form deprivation myopia with pirenzepine: a

study of drug delivery and distribution [J]. Ophthalmic Physiol Opt, 1999, 19(4): 327-35.

- [4] 戴怡康, 诸仁远. 哌仑西平滴眼剂在兔房水中的药代动力学研究 [J]. 眼视光学杂志, 2002, 4(4): 228-9.
- [5] 李 岩, 孙殿甲. 均匀设计筛选甲苯咪唑微丸的处方工艺 [J]. 中国现代应用药学, 2002, 19(2): 121-3.
- [6] 罗招凡, 刘剑雄, 范 侠. 丽丝胺罗丹明 B 脂质体两种制备方法的比较 [J]. 中山医科大学学报, 1999, 20(3): 封 3.
- [7] Takashi O, Hiroshi M, Kiyoshi H. Improvement of encapsulation efficiency of water-soluble drugs in liposome formed by the freeze-thawing method [J]. Chem Pharm Bull, 1985, 33(9): 3945-52.
- [8] 洪 民, 蔡 谨, 高 峰, 等. 脂质体包埋猪血红蛋白的制备及其注入小鼠体内的初步试验 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(6): 772-6.
- [9] Pekka J, Krisriina J, Arto U, et al. The use of cyclodextrins in ophthalmic formulation of diprivenin [J]. Inter J Pharm, 1997, 153(2): 225-33.

(编辑 刘清海)