

[Note]

www.chem.pku.edu.cn/whxb

超临界 CO₂ 法制备头孢唑啉钠脂质体

严 宾 安学勤* 白 晶 张英华

(南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097)

摘要 采用超临界 CO₂(scCO₂)流体代替有机溶剂一步法制备了头孢唑啉钠药物载体脂质体. 研究了该脂质体的尺寸、稳定性和药物的包封率. 结果表明, 脂质体的尺寸和稳定性依赖于制备压力, 脂质体对头孢唑啉钠的包封率与乙醇和脂浓度有关, 采用超临界 CO₂ 法制备脂质体的药物包封率比采用薄膜分散法(Bangham method)制备的包封率高.

关键词: 脂质体, 头孢唑啉钠, 超临界 CO₂, 包封率, 粒径, 稳定性

中图分类号: O648

Preparation of Cefazolin Sodium Liposomes by Supercritical Carbon Dioxide Method

YAN, Bin AN, Xue-Qin* BAI, Jing ZHANG, Ying-Hua

(College of Chemistry and Environment Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract The liposomes of cefazolin sodium were prepared using one step supercritical CO₂ (scCO₂) method. The size, stability, and trapping efficiency of liposomes were investigated. The experimental results demonstrate that the size and stability of liposomes depend on the pressure. The trapping efficiency of liposomes relates to the concentration of ethanol and lipid. The trapping efficiency by the scCO₂ method is much higher than the results from the Bangham method.

Keywords: Liposomes, Cefazolin sodium, scCO₂, Trapping efficiency, Particle size, Stability

头孢唑啉钠(CEZ) 临床应用敏感菌所致的呼吸道、皮肤软组织、骨和关节、胆道等感染, 也可用于心内膜炎、败血症、咽和耳部感染. 但是服用 CEZ 后有时会引起中枢神经系统的副反应, 表现为高颅压、呕吐、抽搐、可逆性脑病等^[1], 也可能出现周围神经损害^[2]. 因此寻找新的给药方式, 抑制或消除其副作用具有重要意义. 脂质体药物载体是一种新的给药系统, 在该系统中, 药物与载体相结合形成药物载体系统后, 药物的吸收和分布不再由药物本身决定, 而是受到载体的理化性质的影响. 脂质体药物载体可以提高药效, 抑制或消除其副作用.

脂质体(liposome)是磷脂分散在水中形成的脂

质双分子层, 其内部为水相的闭合囊泡, 可同时包封水溶性和脂溶性药物, 具有减少药物使用剂量、降低药物毒性、降低体内消除速度、改变药物在体内的分布, 使药物具有靶向等优点. 脂质体作为药物载体被广泛用于实验研究, 并向临床发展^[3]. 国内外提出了多种制备脂质体的方法, 如薄膜分散法^[4]、超声波分散法、冻融法、逆相蒸发法、有机溶剂注入法^[5-6], 但是这些方法都必须在制备过程中使用大量对人体有害的有机溶剂. 超临界二氧化碳是一种无毒、惰性、不燃、价廉易得而又对环境友好的反应介质, 二氧化碳可循环使用, 因此可减少污染, 节约资源, 绿色环保. 目前采用超临界二氧化碳代替一般有机溶剂已经

Received: July 18, 2005; Revised: September 7, 2005. *Correspondent, E-mail: anxueqin@njnu.edu.cn; Tel/Fax: 025-83598678.

国家自然科学基金(20273032, 20573056)和江苏省高新技术研究计划(BG-2005041)资助项目

©Editorial office of *Acta Physico-Chimica Sinica*

在很多领域有广泛的应用^[7-9]. 本文报道用超临界二氧化碳(scCO₂)代替有机溶剂制备脂质体, 包埋水溶性药物头孢唑啉钠.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

卵磷脂 PC、头孢唑啉钠、乙醇均为 A. R. 级试剂, CO₂ 的纯度为 99.5%. 高压釜 (江苏海安石油科研仪器厂). 柱塞计量泵(J-W 型, 杭州之江石化装备有限公司); 压力传感器 (北京昆仑天辰仪表有限公司). 控温仪(余姚市工业仪表二厂). 紫外可见分光光度计(Lambda 17 型, PERKIN-ELMER 公司). 光散射仪(BIO200SM 型, 美国 BROOKHAVEN 公司).

1.2 实验方法

1.2.1 改进的制备头孢唑啉钠脂质体 scCO₂ 法

我们改进了 Frederiksen 等人^[10]的 scCO₂ 制备脂质体的方法, 改进后的制备脂质体 scCO₂ 方法简述如下. 将一定量的卵磷脂溶解于乙醇中配得卵磷脂乙醇溶液. 移取一定量的 CEZ 溶液加入高压釜中, 然后移取定量的卵磷脂乙醇溶液到高压釜中, 密闭高压釜. 将高压釜放入恒温水浴中, 通入 CO₂ 使压力达到 20 MPa(CO₂ 超临界态), 在 333.2 K 孵化 30 min 制备脂质体和包封药物, 然后释放 CO₂, 在高压釜内获得脂质体溶液.

1.2.2 用薄膜分散法制备头孢唑啉钠脂质体

参照文献[4]用薄膜分散法(Bangham method)制备头孢唑啉钠脂质体.

1.2.3 脂质体稳定性的测定

将制备的脂质体在 277.2 K 放置一定时间后, 采用分光光度法测定脂质体在 λ₅₀₀ 处的吸光度, 根

据如下公式计算脂质体的稳定性常数(K_E):

$$K_E = (A_0 - A_1) / A_0 \quad (1)$$

A₀ 为脂质体稀释液在 λ₅₀₀ 处的吸光度; A₁ 为脂质体稀释液放置一段时间后在 λ₅₀₀ 处的吸光度. 根据 K_E 值可以判断脂质体的稳定性, K_E 值越小, 脂质体越稳定.

1.2.4 脂质体包封率的测定

将一定量的头孢唑啉钠脂质体溶液装入透析袋(分子量 8000) 内, 用 100 mL 的水溶液分三次透析, 每次 8 h, 共透析 24 h. 将透析液在 λ₂₇₂ 处测定吸光度 A, 根据药物含量的标准曲线计算出游离药物的浓度. 由包封率(Q_w)计算公式^[11], 计算 CEZ 脂质体的包封率.

$$Q_w = \frac{W_{\text{total}} - W_{\text{free}}}{W_{\text{total}}} \times 100\% \quad (2)$$

上式中 W_{total} 代表系统中的总药量, w_{free} 代表液体介质中未包封的药量.

2 结果与讨论

2.1 制备方法对脂质体粒径和粒径分布的影响

采用薄膜分散法制备脂质体, 用光散射仪测定其粒径分布, 结果如图 1 所示. 脂质体主要由粒径较大的泡囊组成, 单分散性差.

采用改进的 scCO₂ 法(压力 20 MPa, 乙醇浓度 21%) 制备脂质体, 用光散射仪测定其粒径和分布, 结果如图 2 所示, 粒径分布较窄, 其粒径比薄膜法制备的脂质体小, 而且单分散性好. 脂质体的粒径越小, 分散越均匀, 单分散性越好, 药物载体越稳定.

2.2 影响脂质体稳定性的主要因素

2.2.1 制备方法对脂质体稳定性的影响

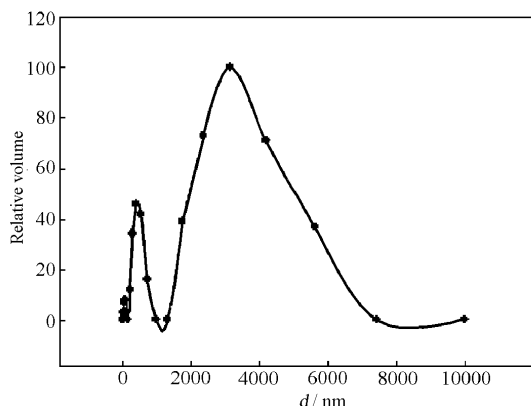


图 1 薄膜分散法制备的脂质体的粒径分布

Fig.1 Size distribution of liposomes prepared by the Bangham method

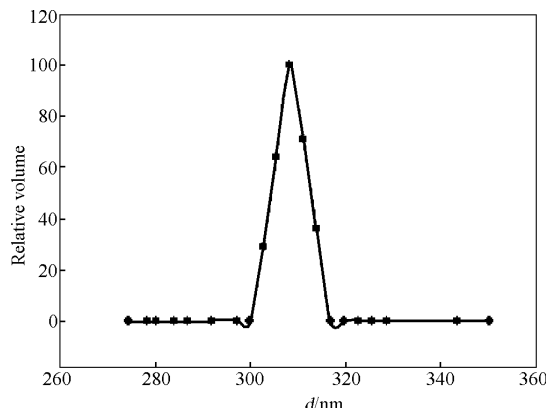


图 2 超临界 CO₂ 法制备的脂质体的粒径分布

Fig.2 Size distribution of liposomes prepared by scCO₂ method

表 1 薄膜分散法和 scCO_2 法制备的脂质体稳定性常数(K_E)
Table 1 K_E of liposomes prepared by the Bangham method and scCO_2 method

Method	K_E	
	one month	two months
Bangham method	0.252	0.423
scCO_2 method	0.045	0.052

The liposomes were stored at 277.2 K for one or two months.

将薄膜分散法和 scCO_2 法(压力 20 MPa, 乙醇浓度 21%)制备的脂质体在 277.2 K 条件下分别放置 1 个月和 2 个月, 通过(1)式分别计算出两种方法制备脂质体的稳定性常数(K_E)值, 结果列于表 1. 研究表明, 在储藏温度为 277.2 K, 薄膜分散法制备的脂质体在放置 1 个月或 2 个月后的 K_E 值是用 scCO_2 法制备的脂质体的 K_E 值的 5.6 或 8.1 倍, 说明 scCO_2 法制备的脂质体的稳定性比用薄膜分散法制备的脂质体的稳定性好.

光散射法测定脂质体的粒径尺寸和分布的结果表明: scCO_2 法制备的脂质体粒径小于用薄膜分散法制备的脂质体的粒径, scCO_2 法制备的脂质体粒径的单分散性比薄膜分散法制备的脂质体的单分散性好. 研究表明, 脂质体的粒径越小、脂质体的粒径的单分散性越好, 脂质体越稳定. 因此, 用 scCO_2 法制备的脂质体的稳定性远比薄膜分散法制备的脂质体稳定性好.

2.2.2 压力对 scCO_2 法制备的脂质体粒径及其稳定性的影响

(1) scCO_2 法制备压力对脂质体粒径的影响

在固定制备温度(333.2 K)、脂质体浓度(1%)、乙醇浓度(21%)的情况下, 考察了压力对 scCO_2 法制备的脂质体粒径的影响. 采用光散射仪分别测定了制

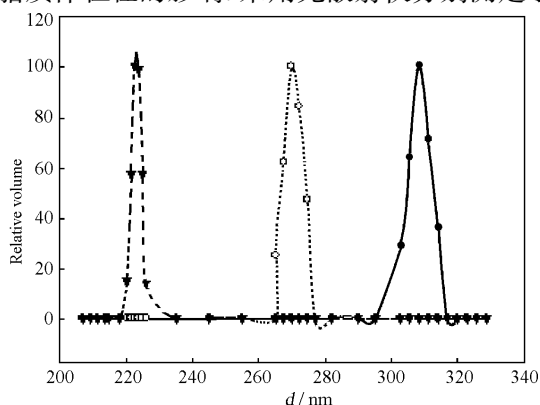


图 3 不同压力条件下的 scCO_2 法制备的脂质体的粒径分布

Fig.3 Size distribution of liposomes prepared by scCO_2 method at various pressures

●) $p=20$ MPa, ○) $p=22$ MPa, ▼) $p=25$ MPa

备压力为 20 MPa、22 MPa、25 MPa 的脂质体的粒径和粒径分布, 如图 3 所示. 实验结果表明, 随着制备脂质体压力的增大, 脂质体的粒径减小, 脂质体稳定性增加.

(2) scCO_2 法制备压力对脂质体稳定性的影响

考察了不同制备压力条件下获得的脂质体的稳定性. 在 333.2 K 的恒温水浴中, 压力分别控制为 12 MPa、16 MPa、20 MPa、24 MPa 制备脂质体溶液. 该脂质体溶液在 277.2 K 放置两个月后, 测定它们的稳定性常数 K_E , 考察脂质体的稳定性随压力的变化情况. 图 4 表示脂质体的稳定性常数随制备压力的改变规律, 压力越大, 脂质体的稳定常数 K_E 值越小, 脂质体越稳定. 这可能是因为制备压力影响脂质体的尺寸, 压力越高, 脂质体的粒径越小, 而脂质体的粒径越小, 脂质体越稳定. 研究表明, 可以通过调节压力控制脂质体的尺寸, 获得稳定的脂质体药物载体. 但是压力过大, 对仪器要求也高, 所以我们选择压力 20 MPa 为制备脂质体的条件.

2.3 影响脂质体药物包封率的主要因素

2.3.1 制备方法对脂质体包封率的影响

在不同脂浓度条件下, 分别研究了薄膜分散法和 scCO_2 法(压力 20 MPa, 乙醇浓度 21%)制备的脂质体的包封率. 研究结果示于图 5, 横坐标为脂浓度(卵磷脂的质量分数), 纵坐标为脂质体药物的包封率.

由图 5 可知在相同脂浓度条件下, 用 scCO_2 法制备的脂质体的药物包封率明显比薄膜分散法制备的脂质体的高, 这可能是由于薄膜分散法制得的脂质体膜较厚和不均匀, 包埋药物的有效空间较小, 药物包封率低. 而 scCO_2 法制备的脂质体的双分子膜排列整齐, 较薄, 包埋药物的有效空间较大, 所以包

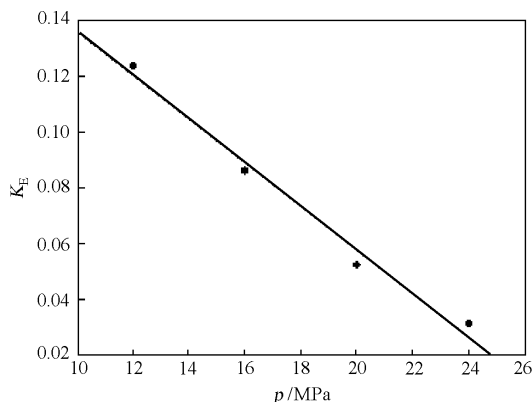


图 4 制备压力对脂质体稳定性常数(K_E)的影响

Fig.4 Effect of the preparation pressure on the K_E of liposome

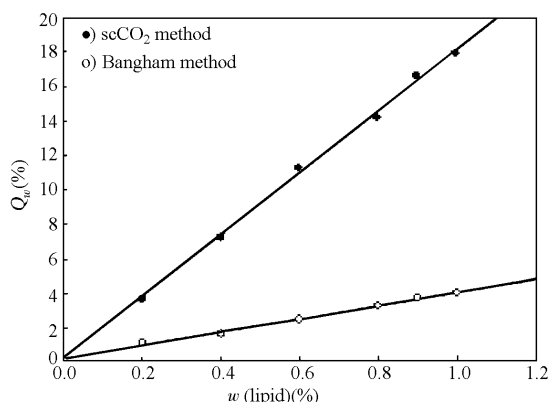


图5 脂质体的药物包封率与脂浓度的关系

Fig.5 Relationship of trapping efficiency and concentration of lipid

封率有很明显的提高. 采用改进后的 scCO₂ 法制备脂质体的药物包封率比 Otake 等^[11]使用的超临界逆相蒸发法获得的包封率高. 该方法的优点是: 1) 提高卵磷脂的利用率; 2) 在相同脂浓度条件下制备的脂质体的头孢唑啉钠药物包封率较高; 3) 实验操作简单, 仪器设备简化; 4) 不需要昂贵的高压进样器, 有利于工业化生产.

2.3.2 乙醇浓度对 scCO₂ 法制备的脂质体包封率的影响

实验表明: 乙醇的添加量对脂质体药物载体的包封率有影响. 本实验用乙醇作为卵磷脂溶剂, 考察了乙醇浓度对头孢唑啉钠药物包封率的影响. 研究表明, 在固定脂浓度(1%)、温度(333.2 K)和压力(20 MPa)的条件下, 若没有乙醇参与制备的脂质体的包封率仅为 1.6%. 药物的包封率随着乙醇浓度的改变呈钟型曲线, 如图 6 所示. 当乙醇浓度低于 21% 时, 随着乙醇浓度的增大, 药物的包封率随乙醇浓度的增加而加大. 可能因为随着乙醇量的增大, 乙醇溶解的卵磷脂也就越多, 引入体系的卵磷脂也就越多, 包封率也就越大. 当乙醇浓度高于 21% 时, 随着乙醇浓度的增加, 药物的包封率下降, 可能是由于添加的乙醇量影响了制备的脂质体的微结构. 少量的乙醇作为助剂, 能稳定脂质体的结构, 而当乙醇的量增加后, 可能破坏脂质体的稳定结构, 导致制备的脂质体包封率下降. 研究结果表明, 最佳乙醇浓度为 21%.

3 结论

改进了采用超临界 CO₂ 和少量乙醇代替有毒有机溶剂制备脂质体的方法. 研究了不同制备方法

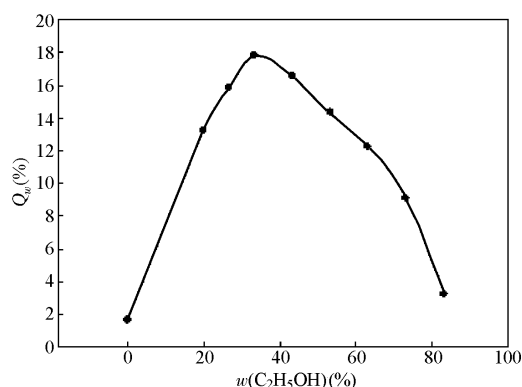


图6 乙醇浓度对脂质体包封率的影响

Fig.6 Effect of ethanol concentration on the trapping efficiency Q_w of liposomes

与脂质体的尺寸、稳定性和药物的包封率的关系. 研究结果表明, 采用 scCO₂ 法制备脂质体比采用薄膜分散法制备的脂质体具有较小的尺寸、较好的稳定性和较高的药物包封率. 脂质体的药物包封率不但与制备方法有关, 还与体系的脂浓度、乙醇浓度有关.

References

- Li, X. G.; Fang, Y. L. *Chinese Journal of Pharmacoepidemiology*, **1996**, *5*(3): 156 [李新光, 方云莉. 药物流行病学杂志(*Yaowu Liuxingbingxue Zazhi*), **1996**, *5*(3): 156]
- Wen, L. Z.; Gao, Y. F. *China Pharmaceuticals*, **2001**, *10*(4): 48 [温勵志, 高岩芳. 中国药业(*Zhongguo Yaoye*), **2001**, *10*(4): 48]
- Chupin, V.; Kroon, A. I. P. M.; Kruijff, B. *Journal of the American Chemical Society*, **2004**, *126*(42): 13816
- Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. *J. Mol. Biol.*, **1965**, *13*: 238
- Batzri, S.; Korn, E. D. *Biochim. Biophys. Acta*, **1973**, *298*: 1015
- Demer, D.; Bangham, A. D. *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *443*: 629
- Sui, R. H.; Rizkalla, A. S.; Charpentier, P. A. *Journal of Physical Chemistry B*, **2004**, *108*(32): 11886
- Liu, J. C.; Han, B. X.; Zhang, J. L.; Li, G. Z.; Zhang, X. G.; Wang, J.; Dong, B. Z. *Chem. A: Eur. J.*, **2002**, *8*(6): 1356
- Shi, L.; Zhang, X. G.; Zhang, X. F.; Yang, G. Y.; Han, B. X.; Yan, H. K. *Acta Phys.-Chim. Sin.*, **2000**, *16*(1): 31 [石磊, 张小岗, 张喜丰, 杨冠英, 韩布兴, 阎海科. 物理化学学报 (*Wuli Huaxue Xuebao*), **2000**, *16*(1): 31]
- Frederiksen, L.; Anton, K.; van Hoogevest, P.; Keller, H. R.; Leuenberger, H. J. *Pharm. Sci.*, **1997**, *86*(8): 921
- Imura, T.; Otake, K.; Hashimoto, S.; Gotoh, T.; Yuasa, M.; Yokoyama, S.; Sakai, H.; Rathman, J. F.; Abe, M. *Colloids Surf. B-Biointerfaces*, **2002**, *27*: 133