

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410041337.3

[51] Int. Cl.

*A61K 31/55 (2006.01)*

*A61K 9/127 (2006.01)*

*A61P 25/02 (2006.01)*

*A61P 25/00 (2006.01)*

*A61P 9/10 (2006.01)*

*A61P 21/04 (2006.01)*

[43] 公开日 2006 年 1 月 11 日

[11] 公开号 CN 1718190A

[51] Int. Cl. (续)

*A61P 29/00 (2006.01)*

*A61P 19/02 (2006.01)*

*A61P 19/08 (2006.01)*

[22] 申请日 2004.7.9

[21] 申请号 200410041337.3

[71] 申请人 蔡宝昌

地址 210029 江苏省南京市鼓楼区汉中路 282 号

共同申请人 刘陶世 李彦超

[72] 发明人 蔡宝昌 刘陶世 李彦超 李伟东  
邓旭坤

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

马钱子生物碱脂质体及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及中药马钱子抗肿瘤有效部位总生物碱及其单体组分的脂质体及其制备方法。马钱子生物碱脂质体的组成和重量配方是马钱子生物碱 1.67 份、磷脂 100 份和胆固醇 15 份。该脂质体的优选制备方法为硫酸铵梯度法，所制得的脂质体平均粒径小于 200nm，马钱子生物碱包封率在 90% 以上。马钱子生物碱脂质体可提高马钱子生物碱对肿瘤组织的靶向性，进而提高马钱子生物碱抗肿瘤的疗效，降低马钱子生物碱的毒性和副作用。

1. 一种马钱子生物碱脂质体, 其特征在于它是由含有下述重量配比的原料组成的药剂:

马钱子生物碱: 1 份

磷脂: 10~100 份

胆固醇: 0~50 份

2. 根据权力要求 1 所述的马钱子生物碱脂质体, 其中各原料的重量比为马钱子生物碱 1 份、磷脂 30~90 份、胆固醇 5~15 份。

3. 根据权力要求 1 所述的马钱子生物碱脂质体, 其中所述的马钱子生物碱是指从马钱子科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L 的干燥成熟种子或其炮制品中提取的生物碱。该生物碱可以是马钱子总生物碱; 也可以是组成马钱子总生物碱的任一单体生物碱, 如土的宁 (Strychnine,  $C_{21}H_{22}O_2N_2$ )、马钱子碱 (Brucine,  $C_{23}H_{26}O_4N_2$ )、番木鳖次碱 (Vomicine)、伪番木鳖碱 (Pseudostrychnine)、伪马钱子碱 (Pseudobrucine)、 $\alpha$ -可鲁勃林 ( $\alpha$ -Colubrine)、 $\beta$ -可鲁勃林 ( $\beta$ -Colubrine)、马钱子碱氮氧化物、土的宁氮氧化物等; 该生物碱也可以是上述各单体生物碱任意组合的混合物。

4. 根据权力要求 1 所述的马钱子生物碱脂质体, 其中所述的磷脂包括卵磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、心磷脂等。

5. 根据权力要求 1、2 所述的马钱子生物碱脂质体, 其特征在于将其进一步制备成任何一种药剂学上所说的剂型, 如注射剂、口服液、外用凝胶剂等。

6. 根据权力要求 1 所述的马钱子生物碱脂质体, 其特征在于用硫酸铵梯度法进行制备。

7. 一种制备马钱子生物碱脂质体的方法, 其特征在于经下述步骤制备:

(1) 按重量比称取磷脂 30~90 份和胆固醇 5~15 份, 溶解于氯仿中, 减压除去溶剂, 形成脂质薄膜。

(2) 按重量比加入 0.03~0.3mol/L 的硫酸铵水溶液 10~100 份, 水化和洗脱脂质薄膜, 形成空白脂质体混悬液。(3) 超声处理 5~20min, 减少脂质体的粒径。(4) 过 0.1~0.45  $\mu$ m 微滤膜, 控制脂质体的粒径大小。(5) 通过透析法或超滤法和凝胶柱层析法除去未被脂质体包封的硫酸铵, 形成硫酸铵梯度空白脂质体混悬液。(6) 按重量比加入马钱子生物碱 1 份于 30~80℃温孵 5~60min, 使马钱子生物碱被脂质体包封。(7) 加入占脂质体混悬液 0.9% (重量比) 的氯化钠, 过 0.2  $\mu$ m 微滤膜, 充氮气, 灌封于安瓿中。

8. 根据权力要求 7 所述的马钱子生物碱脂质体的制备方法, 其特征在于:

(1) 按重量比称取磷脂 100 份和胆固醇 15 份, 溶解于氯仿中, 减压除去溶剂, 形成脂质薄膜。(2) 加入磷脂、胆固醇和马钱子碱重量之和的 57 倍量的 0.1mol/L 的硫酸铵水溶液, 水化和洗脱脂质薄膜, 形成硫酸铵空白脂质体混悬液。(3) 超声处理 15min, 减少脂质体的粒径。(4) 过 0.2  $\mu$ m 微孔滤膜, 控制脂质体的粒径大小。(4) 通过透析法或凝胶柱层析法除去未被脂质体包封的硫酸铵, 形成硫酸铵梯度空白脂质体混悬液。(5) 按重量比加入马钱子生物碱 1.67 份于 40℃温孵 20min, 使马钱子生物碱被脂质体包封。(6) 加入占脂质体混悬液 0.9% (重量比) 的氯化钠, 过 0.2  $\mu$ m 微滤膜, 充氮气, 灌封于安瓿中。

## 马钱子生物碱脂质体及其制备方法

## 一、技术领域

本发明涉及中药脂质体及其制备方法，具体为马钱子生物碱的脂质体及其制备方法。

## 二、背景技术

马钱子为马钱子科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子，具有散血热、消肿、镇痛等功效。马钱子含总生物碱 2%~5%，主要为土的宁（Strychnine,  $C_{21}H_{22}O_2N_2$ ）、马钱子碱（Brucine,  $C_{23}H_{26}O_4N_2$ ）各占 1%~1.4%左右，此外还含有微量的番木鳖次碱（Vomicine）、伪番木鳖碱（Pseudostrychnine）、伪马钱子碱（Pseudobrucine）、 $\alpha$ -可鲁勃林（ $\alpha$ -Colubrine）、 $\beta$ -可鲁勃林（ $\beta$ -Colubrine）、番木鳖苷（Loganin,  $C_{17}H_{26}O_{10}$ ）、绿原酸、棕榈酸、脂肪油、蛋白质、多糖等。

马钱子始载于《本草纲目》，此后诸家本草对马钱子的功效和应用均有较详细的记载。近年来，马钱子用于治疗多种疑难疾病，取得了显著的疗效，所涉及病症有面神经麻痹、截瘫、脑血栓形成、偏瘫、小儿麻痹后遗症、坐骨神经痛、重症肌无力、类风湿性关节炎、骨折、痈肿疮疡、结核病、精神病、功能性不射精症、宫颈糜烂等数十种之多，而且主要集中在中枢神经系统病症方面，机理研究表明，土的宁对整个中枢系统多有兴奋作用，首先兴奋脊髓的反射功能，其次兴奋延髓的呼吸中枢及血管运动中枢，并能提高大脑皮质的感觉中枢功能，能兴奋迷走神经，使呼吸中枢兴奋性提高，呼吸加深加快。

特别引人注目的是马钱子在抑制癌痛方面，具有独特的疗效。实验证明，马钱子中止痛成分主要为马钱子碱，它对感觉神经末梢有麻痹作用，其中枢镇痛机制可能与增加脑部单胺类神经递质与脑啡肽含量有关，马钱子碱止痛作用持续时间大大超过哌替啶，具有半衰期长，无成瘾性等优点。

除抑制癌痛外，马钱子对癌细胞的杀伤作用亦很有价值。通过体外培养肿瘤细胞发现，马钱子碱及其氮氧化物以及土的宁及其氮氧化物对肿瘤细胞株 K652、HeLa、HEP-2 具有抑制其生长作用及形态损伤作用，其机制可能是抑制肿瘤细胞的蛋白质合成作用，而不是直接作用。以小鼠骨髓细胞的姐妹染色体和微核为指标的遗传毒理研究的实验表明，土的宁具有较强的抗突变作用，与马钱子类生物碱抑制肿瘤细胞的实验结果是一致的。临床上马钱子用于治疗胃癌、皮肤癌、食道癌等亦有一定疗效。

国内外对马钱子生物碱的研究较多，但侧重于土的宁及马钱子碱对神经系统及心血管系统的作用机理和毒理。马钱子用于癌症的治疗虽有大量的临床资料，但马钱子毒副作用大，有效剂量和中毒剂量接近，由于现有马钱子制剂的剂型不合理，在临床使用时造成了一些中毒病例，严重制约了马钱子在癌症治疗上的应用。为提高疗效，降低毒副作用，有必要将马钱子抗癌有效部位生物碱制成脂质体等靶向给药制剂。

自 1965 年 Bangham 等人发现脂质体，特别是 1971 年英国 Gregoriadis 等人将脂质体用作药物载体以来，脂质体作为一种新型药物载体在医药领域的研究得到了迅速的发展。脂质体是由磷脂分子构成的双分子层囊泡，脂质体作为药物载体，具有诸多优点：如脂质体既能包封脂溶性药物，又能包封水溶性药物；能有效地保护被包裹药物，提高生物利用度；使药物具有靶向作用，能降低药物的毒副作用；脂质体具有缓控释作用，适合多途径给药等。因此，脂质体由于其独特的结构特点，作为一种新型药物载体使药物制剂进入了靶向给药的新天地，并取得可喜成果，在医药界得到了日益广泛的关注。

### 三、发明内容

1. 发明目的：本发明的目的在于提供一种临床适用的马钱子生物碱脂质体，该脂质体能提高马钱子生物碱对肿瘤组织的靶向性，进而提高马钱子生物碱抗肿瘤的疗效，降低马钱子生物碱的毒性和副作用。
2. 技术方案：为达到上述目的，本发明提供了如下技术方案：

一种马钱子生物碱脂质体，其特征在于它是由含有下述重量配比范围的原料组成的药剂：

马钱子生物碱：1 份

磷脂：10~100 份

胆固醇：0~50 份

进一步优选的重量配比范围是：马钱子生物碱 1 份、磷脂 30~90 份、胆固醇 5~15 份。

再进一步优选的重量配比范围是：马钱子生物碱 1 份、磷脂 50~70 份、胆固醇 8~12 份。

所述的马钱子生物碱脂质体，其中所述的马钱子生物碱是指从马钱子科植物马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子中提取的生物碱。该生物碱可以是马钱子总生物碱；也可以是组成马钱子总生物碱的任一单体生物碱，如土的宁（Strychnine,  $C_{21}H_{22}O_2N_2$ ）、马钱子碱（Brucine,  $C_{23}H_{26}O_4N_2$ ）、番木鳖次碱（Vomicine）、伪番木鳖碱（Pseudostrychnine）、伪马钱子碱（Pseudobrucine）、 $\alpha$ -可鲁勃林（ $\alpha$ -Colubrine）、 $\beta$ -可鲁勃林（ $\beta$ -Colubrine）、马钱子碱氮氧化物、土的宁氮氧化物等；该生物碱也可以是上述各单体生物碱任意组合的混合物。

所述的马钱子生物碱脂质体，其中所述的磷脂可以是卵磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、心磷脂等中的任何一种或它们的任意混合物。

所述的马钱子生物碱脂质体，可以进一步制成任何一种药剂学上所说的剂型，如注射剂、口服液、外用凝胶剂、软膏、喷雾剂、滴鼻剂等。进一步优选的剂型是静脉注射液、口服液和外用凝胶剂。制备上述药剂还可加入其它辅料，如氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、水等。

所述的马钱子生物碱脂质体，其特征在于其制备可采用公知的方法，如被动载药法（薄膜分散法、逆向蒸发法、乙醇注入法、乙醚注入法、冷冻干燥法、前体脂质体法等）和主动载药法（pH 值梯度法和硫酸铵梯度法等）。

进一步优选的制备方法是主动载药法中的硫酸铵梯度法。

所述的制备马钱子生物碱脂质体的硫酸铵梯度法，其特征在于经下述步骤制备：

（1）按重量比称取磷脂 60~100 份和胆固醇 5~20 份，溶解于氯仿中，减压除去溶剂，形成脂质薄膜。（2）按重量比加入 0.03~0.3mol/L 的硫酸铵水溶液 10~100 倍，水化和洗脱脂质薄膜，形成硫酸铵空白脂质体混悬液。（3）超声处理 5~20min，减少脂质体的粒径。（4）过 0.1~0.45  $\mu m$  微孔滤膜，进一步控制脂质体的粒径大小。（5）通过透析法或超滤法和凝胶柱层析法除去未被脂质体包封的硫酸铵，形成硫酸铵梯度空白脂质体混悬液。（6）按重量比加入马钱子生物碱 1 份于 30~80℃温孵 5~60min，使马钱子生物碱被脂质体包封。（7）加入占脂质体混悬液 0.9%（重量比）的氯化钠，过 0.2  $\mu m$  微孔滤膜，充氮气，灌封于安瓿中。

进一步优选的制备马钱子生物碱脂质体的硫酸铵梯度法，其特征在于经下述步骤制备：

（1）按重量比称取磷脂 100 份和胆固醇 15 份，溶解于氯仿中，减压除去溶剂，形成脂质薄膜。（2）

加入磷脂、胆固醇和马钱子碱重量之和的 57 倍量的 0.1mol/L 的硫酸铵水溶液，水化和洗脱脂质薄膜，形成硫酸铵空白脂质体混悬液。(3) 超声处理 15min，减少脂质体的粒径。(4) 过 0.2 μm 微孔滤膜，控制脂质体的粒径大小。(4) 通过透析法或凝胶柱层析法除去未被脂质体包封的硫酸铵，形成硫酸铵梯度空白脂质体混悬液。(5) 按重量比加入马钱子生物碱 1.67 份于 40~70℃温孵 10~50min，使马钱子生物碱被脂质体包封。(6) 加入占脂质体混悬液 0.9% (重量比) 的氯化钠，过 0.2 μm 微滤膜，充氮气，灌封于安瓿中。

3. 有益效果：本发明的一个重要特点是脂质体对马钱子生物碱的包封率高，可达 60%以上；经过优选的制备方法对马钱子生物碱的包封率可进一步提高到 90%以上。本发明采用微滤膜控制脂质体的粒径，使 95% 以上的马钱子生物碱脂质体粒径小于 200nm。所制得的马钱子生物碱脂质体呈乳白色液体，对光透视为澄明液体。

本发明采用薄膜分散法、逆向蒸发法、乙醇注入法、冷冻干燥法、硫酸铵梯度法和 pH 值梯度法分别制备马钱子生物碱脂质体，以包封率为指标对上述 7 种制备方法进行对比和评价，实验结果见表 1。结果表明硫酸铵梯度法对马钱子生物碱的包封率最高。

表 1 7 种方法制备马钱子生物碱脂质体的包封率对比

制备方法	包封率 (%)	备注
被动载药法：薄膜分散法	30.11	乳白色混悬液
逆向蒸发法	38.25	同上
乙醇注入法	25.22	同上
山梨醇载体沉积法	37.02	淡黄白色固体脂质体颗粒
冷冻干燥法	25.94	白色疏松状固体脂质体
主动载药法：硫酸铵梯度法	58.71	乳白色混悬液
pH 值梯度法 (柠檬酸)	35.36	同上

本发明选用  $L_9(3)^4$  正交表，以马钱子生物碱包封率为指标，以卵磷脂与胆固醇之比、硫酸铵浓度、硫酸铵用量为考察因素 (各因素选三水平)，进行 9 次实验。试验安排和结果如表 2、3、4 所示。实验结果表明，因素 C 即硫酸铵溶液用量对包封率的影响具有显著性意义，而因素 A 和因素 B 对包封率的影响没有显著性意义。最优制备处方为  $A_1B_3C_1$ ，即大豆卵磷脂与胆固醇之比为 100:15，硫酸铵水溶液的浓度为 0.1mol/L，用量为 20ml (在卵磷脂用量为 300mg 的条件下)。

表 2 因素水平安排

因素	卵磷脂：胆固醇 (A)	硫酸铵水溶液浓度 (B)	硫酸铵水溶液用量 (C)
		mol/L	ml
水	100:15	0.20	20
	100:30	0.15	25
平	100:45	0.10	30

注：各实验号磷脂用量均为 300mg，马钱子生物碱加入量均为 5mg。

表 3 正交试验安排及计算分析结果

	A	B	C	D	包封率 Yi(%)	
	卵磷脂与胆固醇比	硫酸铵浓度	硫酸铵溶液用量	(空)		
1	1	1	1	1		71.19
2	1	2	2	2		61.82
3	1	3	3	3		52.46
4	2	1	2	3		57.12
5	2	2	3	1		36.48
6	2	3	1	2		73.01
7	3	1	3	2		35.85
8	3	2	1	3		76.51
9	3	3	2	1		62.69
Ij	185.47	164.16	220.71	170.36	总和	527.13
IIj	166.61	174.81	181.63	170.68	CT	30874.00
IIIj	175.05	188.16	124.79	186.09	平方和	32634.76
R	18.86	24.00	95.92	15.73	SS 总	1760.76
SSj	59.501	96.405	1550.964	53.889		

表 4 方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	59.501	2	29.751	1.10	
B	96.405	2	48.202	1.79	
C	1550.964	2	775.482	28.78	P<0.05
误差 D	53.889	2	26.945		

本发明选用  $L_9(3)^4$  正交表，以马钱子生物碱包封率为指标，以温孵温度、温孵时间和马钱子生物碱加入量为考察因素（各因素选三水平），进行 9 次实验。试验安排和结果表 5、6、7、8。结果表明，因素 A、因素 B 和因素 C 对包封率的影响均没有显著性意义。最优制备工艺条件为  $A_1B_1C_1$ ，即温孵温度为 40℃，温孵时间为 20min，马钱子碱加入量为 2mg。

表 5 因素水平安排

因素	温孵温度 (A)	温孵时间 (B)	马钱子碱加入量 (C)
	℃	min	mg
水 1	40	20	2
2	50	30	4
平 3	60	40	6

注：各实验号磷脂用量均为 150mg，胆固醇 22.5mg，0.1mol/L 硫酸铵水溶液用量为 10ml。

表 6 正交试验安排及计算分析结果

	A (温孵时间)	B (温孵温度)	C (药物加入量)	D (空)	包封率 Yi(%)	
1	1	1	1	1	94.23	
2	1	2	2	2	49.42	
3	1	3	3	3	53.61	
4	2	1	2	3	51.88	
5	2	2	3	1	56.84	
6	2	3	1	2	72.07	
7	3	1	3	2	42.48	
8	3	2	1	3	52.17	
9	3	3	2	1	53.67	
Ij	197.26	188.59	218.47	204.74	总和	526.37
IIj	180.79	158.43	154.97	163.97	CT	30785.04
IIIj	148.32	179.35	152.93	157.66	平方和	32718.79
R	48.94	30.16	65.54	47.08	SS 总	1933.75
SSj	413.409	159.183	925.767	435.393		

表 7 方差分析结果

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F 值	临界值	显著性
A	413.409	2	206.705	0.95		
B	159.183	2	79.592	0.37		
C	925.767	2	462.884	2.13		
误差 D	435.393	2	217.696			

表 8 放大验证结果

批号	硫酸铵梯度空白脂质体用量 ml	马钱子碱加入量 mg	包封率%
040420-1	20	4.1	89.49
040420-2	20	4.0	91.13
040420-3	20	4.2	87.46

四、具体实施方式

下面例举 8 个实施例，对本发明加以进一步说明。

实施例 1

马钱子总生物碱（简称总碱）脂质体及其静脉注射剂、口服液和外用凝胶剂的制备：

处方：马钱子总碱 5mg，大豆卵磷脂 300mg，胆固醇 45mg，其它药用辅料适量

制法：(1)马钱子总碱脂质体混悬液的制备：称取大豆卵磷脂和胆固醇溶解于 30ml 氯仿中，置于 2000ml 梨形瓶中，于旋转蒸发仪上以 60~100r/min 转速、水浴恒温 30℃的条件下旋转蒸去氯仿使类脂在梨形瓶内壁均匀成膜，然后置真空干燥器中干燥 4~12h。再加入 0.1mol/L 硫酸铵水溶液 20ml，于旋转蒸发仪上先慢后快以 60~150r/min 转速、40℃、真空度 500~600mbar（防止氧化）的条件下旋转水化和洗脱类脂

膜。全部洗脱后,超声处理 10min,即得包封硫酸铵的空白脂质体(不含药)。采用  $0.2\mu\text{m}$  微滤膜对空白脂质体进行挤出过滤,即得小于 200nm 的空白脂质体。然后置于葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱(玻璃柱,内直径 2.5cm,柱高 30cm,葡聚糖用量 5g,湿法装柱)上以 PBS 液(磷酸二氢钠 1.9mmol、磷酸氢二钠 8.1mmol、氯化钠 0.15mol,加蒸馏水至 1000ml)洗脱以分离未包封硫酸铵,收集乳白色脂质体洗脱液 22ml,得硫酸铵梯度空白脂质体。称取马钱子总碱 5mg 加入硫酸铵梯度空白脂质体中,于旋转蒸发仪上以 70r/min、 $40^{\circ}\text{C}$ 、真空度 500~600mbar 的条件下温孵 20min,即得马钱子总碱脂质体混悬液。

(2) 马钱子总碱脂质体静脉注射剂的制备:将上述马钱子总碱脂质体混悬液加入适量氯化钠调等渗,再过  $0.2\mu\text{m}$  微滤膜除菌,灌注于 2~10ml 安瓿中,充氮气,熔封,印字,包装, $4^{\circ}\text{C}$  保存。

(3) 马钱子总碱脂质体口服液的制备:将上述马钱子总碱脂质体混悬液加入适量蔗糖、生育酚和苯甲酸钠等辅料,再过  $0.2\mu\text{m}$  微滤膜除菌,灌装于 10~20ml 棕色口服液瓶中。

(4) 马钱子总碱脂质体外用凝胶剂的制备:取卡波姆 2g,加 50ml 蒸馏水溶胀,用 20%氢氧化钠水溶液调 pH 值至 6~7,即得无色透明的空白凝胶基质;将上述马钱子总碱脂质体混悬液适量用  $0.2\mu\text{m}$  微滤膜除菌后加入空白凝胶基质中,研和均匀,分装,即得。

(5) 包封率测定:采用紫外分光光度法和 Sephadex G-50 柱层析法(葡聚糖用量 1.5g,内直径 1.5cm,柱高 20cm)测定脂质体对马钱子总碱的包封率:①脂质体和未包封马钱子总碱的分离:取马钱子总碱脂质体和空白脂质体分别上样 0.5ml, PBS 液洗脱,流速 2ml/min,依次收集 10ml(脂质体流出部分)、2ml(基本不含脂质体和游离药物,用于判断脂质体和游离药物是否分开)、20ml(含有未包封的马钱子总碱)。②紫外吸收度测定。上述三份样品分别取两 2ml,加入破膜剂 2ml(异丙醇:无水乙醇=4:1),混匀。以空白脂质体的相应洗脱液(处理方法同样品)为背景,于最大吸收波长 255 处测定吸收度。

该方法制备的脂质体中马钱子总碱的包封率大于 90%。

## 实施例 2

士的宁脂质体的制备:

处方:士的宁 10mg、大豆卵磷脂 600mg、胆固醇 90mg、其它药用辅料适量

制法:称取大豆卵磷脂和胆固醇溶解于 60ml 氯仿中,置于 2000ml 梨形瓶中,于旋转蒸发仪上以 60r/min 转速、水浴恒温  $30^{\circ}\text{C}$  的条件下旋转蒸去氯仿使类脂在梨形瓶内壁均匀成膜,然后置真空干燥器中干燥 4~12h。再加入 0.1mol/L 硫酸铵水溶液 40ml,于旋转蒸发仪上以 60~150r/min 转速、 $40^{\circ}\text{C}$ 、真空度 500~600mbar(防止氧化)的条件下旋转水化和洗脱类脂膜。全部洗脱后,超声处理 10min,采用  $0.2\mu\text{m}$  微滤膜对空白脂质体进行挤出过滤,即得小于 200nm 的空白脂质体。然后置于葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱上以 PBS 液洗脱以分离未包封硫酸铵,收集乳白色脂质体洗脱液 40~45ml,得硫酸铵梯度空白脂质体。称取士的宁 10mg 加入硫酸铵梯度空白脂质体中,于旋转蒸发仪上以 70r/min、 $40^{\circ}\text{C}$ 、真空度 500~600mbar 的条件下温孵 20min,再过  $0.2\mu\text{m}$  微滤膜除菌,即得士的宁脂质体混悬液,充氮气并灌封于 10ml 安瓿  $4^{\circ}\text{C}$  保存。

士的宁脂质体为对光澄明的乳白色混悬液。采用 Sephadex G-50 柱层析法分离脂质体和未包封的士的宁,采用紫外分光光度法于 255nm 处测定吸收度,测得士的宁的包封率为 93.5%。



### 实施例 3

马钱子碱脂质体及其静脉注射剂、口服液和外用凝胶的制备:

处方: 马钱子碱 15mg、大豆卵磷脂 900mg、胆固醇 135mg、其它药用辅料适量

制法: (1) 马钱子碱脂质体混悬液的制备: 称取大豆卵磷脂 900mg 和胆固醇 135mg 溶解于 60ml 氯仿中, 置于 2000ml 梨形瓶中, 于旋转蒸发仪上以 60r/min 转速、水浴恒温 30℃ 的条件下旋转蒸去氯仿使类脂在梨形瓶内壁均匀成膜, 然后置真空干燥器中干燥 4~12h。再加入 0.1mol/L 硫酸铵水溶液 60ml, 于旋转蒸发仪上以 60~150r/min 转速、40℃、真空度 500~600mbar 的条件下旋转水化和洗脱类脂膜。全部洗脱后, 超声处理 10min, 采用 0.2 μm 微滤膜对空白脂质体进行挤出过滤。然后置于葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱上以 PBS 液洗脱以分离未包封硫酸铵, 收集乳白色脂质体洗脱液 60~65ml, 得硫酸铵梯度空白脂质体。称取马钱子碱 15mg 加入硫酸铵梯度空白脂质体中, 于旋转蒸发仪上以 70r/min、40℃、真空度 500~600mbar 的条件下温孵 20min, 再过 0.2 μm 微滤膜除菌, 即得马钱子碱脂质体混悬液, 充氮气并灌封于 10ml 安瓿 4℃ 保存。

马钱子碱脂质体混悬液为对光澄明的乳白色混悬液。采用 Sephadex G-50 柱层析法分离脂质体和未包封的马钱子碱, 采用紫外分光光度法于 260nm 处测定吸收度, 测得马钱子碱的包封率为 96.1%。

(2) 马钱子碱脂质体静脉注射剂的制备: 将上述马钱子碱脂质体混悬液加入适量氯化钠调等渗, 再过 0.2 μm 微滤膜除菌, 灌注于 2~10ml 安瓿中, 充氮气, 熔封, 印字, 包装, 4℃ 保存。

(3) 马钱子碱脂质体口服液的制备: 将上述马钱子碱脂质体混悬液加入适量蔗糖、生育酚和苯甲酸钠等辅料, 再过 0.2 μm 微滤膜除菌, 灌装于 10~20ml 棕色口服液瓶中。

(4) 马钱子碱脂质体外用凝胶剂的制备: 取卡波姆 1g, 加 25ml 蒸馏水溶胀, 用 20% 氢氧化钠水溶液调 pH 值至 6~7, 即得无色透明的空白凝胶基质; 将上述马钱子碱脂质体混悬液适量加入空白凝胶基质中, 研和均匀, 分装, 即得。

### 实施例 4

马钱子碱氮氧化物脂质体的制备:

处方: 马钱子碱氮氧化物 5mg、大豆卵磷脂 300mg、胆固醇 45mg、其它药用辅料适量

制法: 称取大豆卵磷脂 300mg 和胆固醇 45mg 溶解于 30ml 氯仿中, 置于 2000ml 梨形瓶中, 于旋转蒸发仪上以 60r/min 转速、水浴恒温 30℃ 的条件下旋转蒸去氯仿使类脂在梨形瓶内壁均匀成膜, 然后置真空干燥器中干燥 4~12h。再加入 0.1mol/L 硫酸铵水溶液 20ml, 于旋转蒸发仪上先慢后快以 60~150r/min 转速、40℃、真空度 500~600mbar 的条件下旋转水化和洗脱类脂膜。全部洗脱后, 超声处理 10min, 采用 0.2 μm 微滤膜对空白脂质体进行挤出过滤, 即得小于 200nm 的空白脂质体。然后置于葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱上以 PBS 液洗脱以分离未包封硫酸铵, 收集乳白色脂质体洗脱液 20~22ml, 得硫酸铵梯度空白脂质体。称取马钱子碱氮氧化物 5mg 加入硫酸铵梯度空白脂质体中, 于旋转蒸发仪上以 70r/min、40℃、真空度 500~600mbar 的条件下温孵 20min, 再过 0.2 μm 微滤膜除菌, 即得马钱子碱氮氧化物脂质体混悬液, 充氮气并灌封于 10ml 安瓿 4℃ 保存。

马钱子碱氮氧化物脂质体为对光澄明的乳白色混悬液。采用 Sephadex G-50 柱层析法分离脂质体和未包封的马钱子碱氮氧化物,采用紫外分光光度法于 262nm 处测定吸收度,测得马钱子碱氮氧化物的包封率为 36.1%。

#### 实施例 5

马钱子总碱冻干脂质体的制备:

处方:马钱子总碱 15mg、蛋卵磷脂 900mg、胆固醇 135mg、其它药用辅料适量

制法:称取蛋卵磷脂 900mg 和胆固醇 135mg 溶解于 60ml 氯仿中。另称取甘露醇 1.5g (便于水化和洗脱,减少粒径)置于 2000ml 梨形瓶中,加入类脂的氯仿液,于旋转蒸发仪上以 60r/min 转速、水浴恒温 30℃的条件下旋转蒸去氯仿使类脂在山梨醇表面和梨形瓶内壁均匀成膜,然后置真空干燥器中干燥 12h。再加入 0.1mol/L 硫酸铵水溶液 60ml,于旋转蒸发仪上以 60~150r/min 转速、40℃、真空度 500~600mbar (防止氧化)的条件下旋转水化和洗脱类脂膜。全部洗脱后,超声处理 10min,采用 0.2 μm 微滤膜对空白脂质体进行挤出过滤,然后置于透析袋中,以 10 倍量 PBS 液透析 2 次,每次 6h (带搅拌装置),以除去未包封硫酸铵,即得硫酸铵梯度空白脂质体。称取马钱子总碱 15mg 加入硫酸铵梯度空白脂质体中,于旋转蒸发仪上以 70r/min、40℃、真空度 500~600mbar 的条件下温孵 20min,加入甘露醇 1g 溶解,再过 0.2 μm 微滤膜除菌,即得马钱子总碱脂质体混悬液,分装于西林瓶中 (10ml/瓶),先预冻,然后置冷冻干燥机中冷冻干燥,即得马钱子总碱冻干脂质体。使用前每支加入注射用水 10ml 振摇溶解即可。

马钱子总碱冻干脂质体为白色疏松状粉末,冷冻前马钱子总碱的包封率为 92.7%,冻干再溶解后马钱子总碱的包封率为 31.6%。

#### 实施例 6

土的宁冻干脂质体的制备:

处方:土的宁 15mg、蛋卵磷脂 900mg、胆固醇 135mg、其它药用辅料适量

制法:称取蛋卵磷脂 900mg 和胆固醇 135mg 溶解于 90ml 乙醚中,加入 0.1mol/L 硫酸铵水溶液 60ml,振摇使乳化,于旋转蒸发仪上以 120r/min 转速、40℃、真空度 90mbar 条件下旋转除去乙醚,超声处理 10min,采用 0.2 μm 微滤膜对空白脂质体进行挤出过滤,然后置于透析袋中,以 10 倍量 PBS 液透析 2 次,每次 6h (带搅拌装置),以除去未包封硫酸铵,即得硫酸铵梯度空白脂质体。称取土的宁 15mg 加入硫酸铵梯度空白脂质体中,于旋转蒸发仪上以 70r/min、40℃、真空度 500~600mbar 的条件下温孵 20min,加入甘露醇 1g 溶解,再过 0.2 μm 微滤膜除菌,即得土的宁脂质体混悬液,分装于西林瓶中 (10ml/瓶),先预冻,然后置冷冻干燥机中冷冻干燥,即得土的宁冻干脂质体。使用前每支加入注射用水 10ml 振摇溶解即可。

土的宁冻干脂质体为白色疏松状粉末,冷冻前土的宁的包封率为 89.5%,冻干再溶解后土的宁的包封率为 33.9%

#### 实施例 7

马钱子碱脂质体的制备:

处方: 马钱子碱 5.0mg、磷脂酰胆碱 300mg、胆固醇 50mg、其它药用辅料适量

制法: 称取磷脂酰胆碱和胆固醇溶解于 60ml 乙醚中, 置于 1000ml 梨形瓶中, 加入 0.1mol/L 硫酸铵水溶液 20ml, 于旋转蒸发仪上以 120r/min 转速、40℃、真空度 90mbar 的条件下蒸去乙醚, 超声处理 10min, 采用 0.2 μm 微滤膜对空白脂质体进行挤出过滤, 即得小于 200nm 的空白脂质体。然后置于葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱上以 PBS 液洗脱以分离未包封硫酸铵, 收集乳白色脂质体洗脱液 20~22ml, 得硫酸铵梯度空白脂质体。称取马钱子碱 5mg 加入硫酸铵梯度空白脂质体中, 于旋转蒸发仪上以 70r/min、40℃、真空度 500~600mbar 的条件下温孵 20min, 再过 0.2 μm 微滤膜除菌, 即得马钱子碱脂质体混悬液, 充氮气并灌封于 10ml 安瓿 4℃保存。

上述马钱子碱脂质体的包封率为 81.5%。

#### 实施例 8

士的宁脂质体的制备:

处方: 士的宁 5.0mg、磷脂酰乙醇胺 300mg、胆固醇 45mg、其它药用辅料适量

制法: 称取磷脂酰乙醇胺和胆固醇溶解于 60ml 乙醚中, 置于 1000ml 梨形瓶中, 加入 0.1mol/L 硫酸铵水溶液 20ml, 于旋转蒸发仪上以 120r/min 转速、40℃、真空度 90mbar 的条件下蒸去乙醚, 超声处理 10min, 采用 0.2 μm 微滤膜对空白脂质体进行挤出过滤, 即得小于 200nm 的空白脂质体。然后置于葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 柱上以 PBS 液洗脱以分离未包封硫酸铵, 收集乳白色脂质体洗脱液 20~22ml, 得硫酸铵梯度空白脂质体。称取士的宁 5mg 加入硫酸铵梯度空白脂质体中, 于旋转蒸发仪上以 70r/min、40℃、真空度 500~600mbar 的条件下温孵 20min, 再过 0.2 μm 微滤膜除菌, 即得士的宁脂质体混悬液, 充氮气并灌封于 10ml 安瓿 4℃保存。

上述士的宁脂质体的包封率为 73.6%。