



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113041223 B

(45) 授权公告日 2022.08.19

(21) 申请号 201911365161.X

A61P 23/02 (2006.01)

(22) 申请日 2019.12.26

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 9014105 A1,1990.11.29

申请公布号 CN 113041223 A

CN 106668882 A,2017.05.17

CN 109276541 A,2019.01.29

(43) 申请公布日 2021.06.29

US 6162462 A,2000.12.19

(73) 专利权人 南京绿叶制药有限公司

CN 102232925 A,2011.11.09

地址 210061 江苏省南京市江北新区高新  
路28号

Camila Morais Goncalves da Silva et al..“Encapsulation of ropivacaine in a combined (donor-acceptor, ionic-gradient) liposomal system promotes extended anesthesia time”.《PLOS ONE》.2017,第12卷(第10期),

(72) 发明人 李锦 王洋 张国喜

徐盛杰等.“盐酸罗哌卡因多囊脂质体的制备及体外释放行为”.《中国药科大学学报》.2009,第40卷(第03期),

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

专利代理师 江艳丽 陈旭

审查员 张影

(51) Int.Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

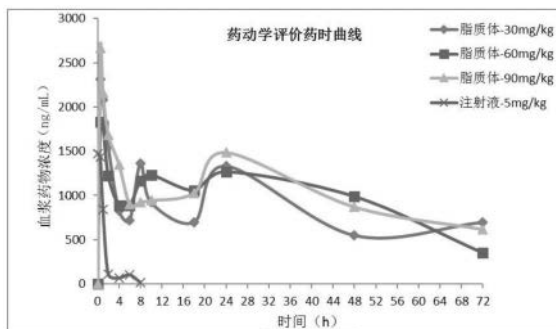
权利要求书1页 说明书11页 附图1页

## (54) 发明名称

一种局部麻醉剂脂质体制备方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种局部麻醉剂脂质体制备方法,属于物制剂工艺领域。一种局部麻醉剂脂质体制备方法,包括以下步骤:制备空白脂质体;空白脂质体超滤浓缩;待包封药物与空白脂质体共同孵育,除菌过滤即得到载药脂质体;载药脂质体与泊洛沙姆水溶液混合后分装、分装后冷冻、分装后冷冻干燥,制成液体制剂、冷冻制剂或冻干制剂。本发明能够制备出具有较低粒径且均一度较高,同时具有较高的包载率的局部麻醉剂脂质体产品,操作简单,易于实现产业化生产。



1. 一种局部麻醉剂脂质体制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

a、制备空白脂质体;

b、空白脂质体超滤浓缩;

c、待封装药物与空白脂质体共同孵育,除菌过滤即得到载药脂质体;

d、载药脂质体与泊洛沙姆水溶液混合后分装制得制剂;

所述的步骤a制备空白脂质体的制备方法是指以磷脂、胆固醇为原辅料,采用逆相蒸发法方法,并经挤压整粒制得空白脂质体;

所述的步骤c中,待封装药物为盐酸罗哌卡因;

所述的步骤d中,混合后分装冷冻,冻融循环可采用2-3℃/min梯度;冻融循环的孵化温度为5℃、时间为40-90分钟;冷冻温度为-50至-70℃,时间为40-60分钟,冻融次数为3-5次;冻融循环中升温至孵化温度的时间为20-40min,降温至冷冻温度的时间为20-40min;

所述载药脂质体与泊洛沙姆的质量比0.2%-1.0% (g/v)。

2. 根据权利要求1所述的一种局部麻醉剂脂质体制备方法,其特征在于,所述的磷脂材料是蛋黄磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、氢化磷脂、二芥酰磷脂酰胆碱、培化磷脂中的一种或多种的组合。

3. 根据权利要求1所述的一种局部麻醉剂脂质体制备方法,其特征在于,所述的步骤b,超滤为切向流超滤系统或中空纤维超滤系统。

4. 根据权利要求3所述的一种局部麻醉剂脂质体制备方法,其特征在于,所述的切向流超滤系统的膜材料为聚醚砜、改性聚醚砜或三醋酸纤维素膜的一种,截留分子量为30K~300KDa,所述的中空纤维超滤系统的膜材料为聚醚砜或改性聚醚砜膜,超滤膜组件膜孔径为0.2μm~1μm,超滤膜组件内径为0.5~1mm。

5. 根据权利要求1所述的一种局部麻醉剂脂质体制备方法,其特征在于,所述的步骤c中,药物与空白脂质体的摩尔比为1:0.5~1:2。

6. 根据权利要求1所述的一种局部麻醉剂脂质体制备方法,其特征在于,所述步骤c中,孵育温度为30~40℃,孵育时间0.5~2h。

7. 根据权利要求1所述的一种局部麻醉剂脂质体制备方法,其特征在于,所述的步骤d中冻融循环中孵化温度为5℃、时间为40分钟;冷冻温度为-50℃,时间为40分钟,冻融次数为3次。

## 一种局部麻醉剂脂质体制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物制剂工艺领域,具体涉及一种局部麻醉剂脂质体制备方法。

### 背景技术

[0002] 临床上常用阿片类药物治疗术后疼痛,但其具有呼吸抑制和成瘾性等不良反应。局麻药也是临床最重要的镇痛药物,但普通剂型局麻药物有效作用时间相对较短,于是临床上运用切口持续镇痛装置在伤口滴注酰胺类局麻药物,以维持一定的治疗浓度。但此装置具有一定的缺陷,如:贮药袋需要随身携带,给患者带来了不便;渗透导管置于体内增加了局部刺激性,并存在一定并发症及渗透导管不宜取出等问题,因此开发长效局麻药新型制剂成为如今研究的热点。

[0003] 脂质体是一种类似生物膜结构的脂质双分子层微小囊泡,具有靶向性、缓释性、提高药物稳定性、降低药物毒性等特点。目前,酰胺类局麻药脂质体一般采用复乳法(也称 DepoFoam-TM法)制备,如美国 Pacira 公司的布比卡因脂质体注射用悬浮液 Exparel<sup>®</sup>, DepoFoam法是将第一水相与脂质的有机相混合制备油包水(W/O型)初乳,形成的初乳中加入第二水相缓冲液形成水包油包水(W/O/W)型复乳,通惰性气体除去复乳中的有机溶剂,等渗液置换第二水相除去未包封的游离药物,浓缩后得到载药多囊脂质体。DepoFoam法存在一系列缺点:1、采用通惰性气体的方法除有机溶剂,操作复杂,需要特殊的生产车间与生产设备,产能提升空间有限,生产成本较高;2、采用等渗液置换的方法除去未包封的游离药物,等渗液消耗量大,不利于后续浓缩。

[0004] 脂质体混悬液的物理化学稳定性差,是脂质体应用于临床的主要困难,因为混悬液中磷脂不可避免地存在水解氧化,并且药物也容易泄露,且粒子的聚集导致粒径变大。1978年,VANLEBERGHE等首次报道采用冷冻干燥法提高脂质体的贮存稳定性,制成冻干脂质体可以显著降低磷脂和药物的水解和氧化速度,同时,冻干保护剂也保持了脂质体膜结构的完整性,克服脂质体聚集、融合以及药物渗漏等不稳定因素,显著提高贮存稳定性。然而,传统冻干方法在冷冻干燥后重建时保护脂质体完整性及确保载药脂质体的包封率仍然是目前需要解决的问题。

### 发明内容

[0005] 要解决的技术问题

[0006] 为解决上述问题,本申请提供一种局部麻醉剂脂质体制备方法,建立主动载药-冻干重建的方法,解决目前制备酰胺类局麻药脂质体制备方法复杂、工艺繁琐、脂质体产品包封率低等问题,通过本方法的实施能够制备出具有较低粒径且均一度较高,同时具有较高的包载率的局部麻醉剂脂质体产品,操作简单,易于实现产业化生产。

[0007] 一种局部麻醉剂脂质体制备方法,包括以下步骤:

[0008] a、制备空白脂质体;

[0009] b、空白脂质体超滤浓缩;

- [0010] c、待包封药物与空白脂质体共同孵育,除菌过滤即得到载药脂质体;
- [0011] d、载药脂质体与泊洛沙姆水溶液混合后分装、分装后冷冻、分装后冷冻干燥,制成液体制剂、冷冻制剂或冻干制剂。
- [0012] 进一步的技术方案,所述的步骤a制备空白脂质体的制备方法是指以磷脂为原辅料,采用薄膜分散法、乙醇注入法、逆相蒸发法等方法,并经挤压整粒制得空白脂质体。
- [0013] 进一步的技术方案,所述的磷脂材料是蛋黄磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰甘油、磷脂酰乙醇胺、氢化磷脂、培化磷脂、胆固醇中的一种或多种的组合。
- [0014] 进一步的技术方案,所述的步骤b,超滤为切向流超滤系统或中空纤维超滤系统。
- [0015] 进一步的技术方案,所述的切向流超滤系统的膜材料为聚醚砜、改性聚醚砜或三醋酸纤维素膜的一种,截留分子量为30K~300KDa,所述的中空纤维超滤系统的膜材料为聚醚砜或改性聚醚砜膜,超滤膜组件膜孔径为0.2 $\mu$ m~1 $\mu$ m,超滤膜组件内径为0.5~1mm(规格1:孔径0.2 $\mu$ m+内径0.5或1mm,规格2:孔径0.5 $\mu$ m+内径0.5或1mm,规格3:孔径1 $\mu$ m+内径0.5或1mm,优选0.2 $\mu$ m/1mm或0.5 $\mu$ m/1mm)。
- [0016] 进一步的技术方案,所述的步骤c中,药物与空白脂质体的摩尔比为1:0.5~1:2。
- [0017] 进一步的技术方案,所述步骤c中,孵育温度为30~40 $^{\circ}$ C,孵育时间0.5~2h。
- [0018] 进一步的技术方案,所述的步骤c中,待包封药物为盐酸布比卡因、盐酸左布比卡因、盐酸罗哌卡因、盐酸利多卡因、盐酸甲哌卡因中的一种。
- [0019] 进一步的技术方案,所述的步骤d中,混合需要经过2~5个冻融循环,冻融循环可采用2-3 $^{\circ}$ C/min梯度.升降温度,实现冻融循环在同一设备中操作,保证样品的稳定性。
- [0020] 进一步的技术方案,所述的步骤d中,冻融循环的孵化温度为5-10 $^{\circ}$ C、时间为20-60分钟;冷冻温度为-20至-70 $^{\circ}$ C,时间为30-60分钟,冻融次数为2-5次。
- [0021] 进一步的技术方案,所述的步骤d中冻融循环中孵化温度为5 $^{\circ}$ C、时间为40分钟;冷冻温度为-50 $^{\circ}$ C,时间为40分钟,冻融次数为3次。
- [0022] 进一步的技术方案,所述载药脂质体与泊洛沙姆的质量比0.2%-2.5% (g/v)。
- [0023] 有益效果
- [0024] 1、产业化可行性:本发明制备工艺简单易行,对生产设备要求较低,并通过除菌过滤实现产品无菌控制,简化了生产工艺,生产成本大幅降低,无菌保障水平也得到显著提升,产业化可行性大幅提升;
- [0025] 2、提高包载效率:通过反复冻融和泊洛沙姆的加入使得产品包载效率显著提升,药脂比(g/g)>100%而包封率不低于90%;
- [0026] 3、实现长效缓释:本发明制备的盐酸罗哌卡因脂质体产品,较盐酸罗哌卡因注射液体内滞留时间显著延长,表现出明显的缓释特征;
- [0027] 4、药效显著提高:本发明制备的盐酸罗哌卡因脂质体,其动物模型镇痛效果持续时间可达9h以上,显著优于盐酸罗哌卡因注射液;
- [0028] 5、局部安全性:本发明制备的盐酸罗哌卡因脂质体,在动物皮下给药后,可在14天内完全吸收,皮下无炎症和肉芽肿产生,局部安全性满足临床用药需要。

## 附图说明

- [0029] 图1为实施例12血药浓度-时间曲线。

[0030] 图2为实施例13镇痛效果图。

### 具体实施方式

[0031] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。

#### [0032] 实施例1

[0033] 一种罗哌卡因脂质体的制备方法,具体步骤如下:

[0034] a、制备空白脂质体:将20mL 0.02mol/L磷酸盐缓冲液,用注射器缓慢加入溶有DEPC(二芥酰磷脂酰胆碱) 240mg和胆固醇160mg的三氯甲烷液中(V有机相:V水相=1:1),高速搅拌乳化直至形成稳定的W/O型乳剂,所得乳剂在旋转蒸发仪(35℃)上减压除去三氯甲烷形成均匀薄膜,再加适量磷酸盐缓冲液继续旋转蒸发将磷脂膜洗下,即得到均匀的脂质体混悬液,随后用聚碳酸酯膜整粒,得空白脂质体。

[0035] b、空白脂质体超滤浓缩:将步骤a中的空白脂质体经切向流超滤系统超滤,其中膜材料为聚醚砜,截留分子量为300KDa、超滤膜组件膜孔径为0.2μm,超滤膜组件内径为1mm。

[0036] c、将4mg/mL盐酸罗哌卡因与空白脂质体混悬液按照摩尔比1:0.5于37℃共同孵育30min,除菌过滤后,即可得到盐酸罗哌卡因脂质体混悬液。d、在步骤c制备的盐酸罗哌卡因脂质体混悬液中加入0.2%的泊洛沙姆(质量比),反复冻融3次,即得。

#### [0037] 实施例2

[0038] 一种罗哌卡因脂质体的制备方法,具体步骤如下:

[0039] a、制备空白脂质体:将20mL 0.02mol/L磷酸盐缓冲液,用注射器缓慢加入溶有DEPC(二芥酰磷脂酰胆碱) 240mg和胆固醇160mg的三氯甲烷液中(V有机相:V水相=1:1),高速搅拌乳化直至形成稳定的W/O型乳剂,所得乳剂在旋转蒸发仪(35℃)上减压除去三氯甲烷形成均匀薄膜,再加适量磷酸盐缓冲液继续旋转蒸发将磷脂膜洗下,即得到均匀的脂质体混悬液,随后用聚碳酸酯膜整粒,得空白脂质体。

[0040] b、空白脂质体超滤浓缩:将步骤a中的空白脂质体经切向流超滤系统超滤,其中膜材料为聚醚砜,截留分子量100KDa、超滤膜组件膜孔径为0.5μm,超滤膜组件内径为1mm。

[0041] c、将4mg/mL盐酸罗哌卡因与空白脂质体混悬液按照摩尔比1:1于37℃共同孵育30min,除菌过滤后,即可得到盐酸罗哌卡因脂质体混悬液。

[0042] d、在步骤c制备的盐酸罗哌卡因脂质体混悬液中加入1.0%的泊洛沙姆(质量比),反复冻融3次,即得。

#### [0043] 实施例3

[0044] 一种罗哌卡因脂质体的制备方法,具体步骤如下:

[0045] a、制备空白脂质体:将20mL 0.02mol/L磷酸盐缓冲液,用注射器缓慢加入溶有DEPC(二芥酰磷脂酰胆碱) 240mg和胆固醇160mg的三氯甲烷液中(V有机相:V水相=1:1),高速搅拌乳化直至形成稳定的W/O型乳剂,所得乳剂在旋转蒸发仪(35℃)上减压除去三氯甲烷形成均匀薄膜,再加适量磷酸盐缓冲液继续旋转蒸发将磷脂膜洗下,即得到均匀的脂质体混悬液,随后用聚碳酸酯膜整粒,得空白脂质体。

[0046] b、空白脂质体超滤浓缩:将步骤a中的空白脂质体经切向流超滤系统超滤,其中膜材料为聚醚砜,截留分子量为100KDa、超滤膜组件膜孔径为0.5μm,超滤膜组件内径为

0.5mm。

[0047] c、将4mg/mL盐酸罗哌卡因与空白脂质体混悬液按照摩尔比1:2于37℃共同孵育30min,除菌过滤后,即可得到盐酸罗哌卡因脂质体混悬液。

[0048] d、在步骤c制备的盐酸罗哌卡因脂质体混悬液中加入1.0%的泊洛沙姆(质量比),反复冻融2次,即得。

[0049] 实施例4

[0050] 一种布比卡因脂质体制备方法,具体步骤如下:

[0051] a、制备空白脂质体:将20mL 0.02mol/L磷酸盐缓冲液,用注射器缓慢加入 溶有 DEPC(二芥酰磷脂酰胆碱) 240mg和胆固醇160mg的三氯甲烷液中(V有机相:V水相=1:1),高速搅拌乳化直至形成稳定的W/O型乳剂,所得乳剂在旋转蒸发仪(35℃)上减压除去三氯甲烷形成均匀薄膜,再加适量磷酸盐缓冲液继续旋转蒸发将磷脂膜洗下,即得到均匀的脂质体混悬液,随后用聚碳酸酯膜整粒,得空白脂质体。

[0052] b、空白脂质体超滤浓缩:将步骤a中的空白脂质体经切向流超滤系统超滤,其中膜材料为聚醚砜,截留分子量为300KDa、超滤膜组件膜孔径为0.2 $\mu$ m,超滤膜组件内径为1mm。

[0053] c、将4mg/mL盐酸布比卡因与空白脂质体混悬液按照摩尔比1:0.5于37℃共同孵育30min,除菌过滤后,即可得到盐酸布比卡因脂质体混悬液。

[0054] d、在步骤c制备的盐酸布比卡因脂质体混悬液中加入0.2%的泊洛沙姆(质量比),反复冻融3次,即得。

[0055] 实施例5

[0056] 一种利多卡因脂质体的制备方法,具体步骤如下:

[0057] a、制备空白脂质体:将20mL 0.02mol/L磷酸盐缓冲液,用注射器缓慢加入 溶有 DEPC(二芥酰磷脂酰胆碱) 240mg和胆固醇160mg的三氯甲烷液中(V有机相:V水相=1:1),高速搅拌乳化直至形成稳定的W/O型乳剂,所得乳剂在旋转蒸发仪(35℃)上减压除去三氯甲烷形成均匀薄膜,再加适量磷酸盐缓冲液继续旋转蒸发将磷脂膜洗下,即得到均匀的脂质体混悬液,随后用聚碳酸酯膜整粒,得空白脂质体。

[0058] b、空白脂质体超滤浓缩:将步骤a中经切向流超滤系统超滤,其中膜材料为聚醚砜,截留分子量为30KDa、超滤膜组件膜孔径为0.5 $\mu$ m,超滤膜组件内径为1mm。

[0059] c、将4mg/mL盐酸罗哌卡因与空白脂质体混悬液按照摩尔比1:2于37℃共同孵育30min,除菌过滤后,即可得到盐酸罗哌卡因脂质体混悬液。

[0060] d、在步骤c制备的盐酸罗哌卡因脂质体混悬液中加入1.0%的泊洛沙姆(质量比),反复冻融4次,即得。

[0061] 实施例6

[0062] 罗哌卡因脂质体的粒径与包封率测定

[0063] 1、粒径分布:

[0064] 取本品适量加入激光衍射粒度仪(Mastersizer 3000)测定液中进行测定。粒径方法参数如下:颗粒折射率:1.59;颗粒吸收率:0.001;分散剂:0.9%氯化钠水溶液;遮光度:8%~20%。

[0065] 2、包封率测定方法:

[0066] 精密吸取1mL盐酸罗哌卡因脂质体至5mL量瓶中,70%异丙醇溶解并定容,即得总量(T);

[0067] 吸取2mL盐酸罗哌卡因脂质体至2mL离心管中,以6000rpm转速离心30min,取上清液1mL至5mL量瓶中,70%异丙醇溶解并定容,即得游离药部分(F);

[0068] 计算公式:EE% = (1-F/T)\*100

[0069] 按照上述测定方法,上述实施例的粒径及包封率结果如下:

[0070]	实施例	粒径	包封率
	实施例 1	23.2 $\mu$ m	91.3%
	实施例 2	22.1 $\mu$ m	92.6%
[0071]	实施例 3	24.0 $\mu$ m	90.5%
	实施例 4	23.6 $\mu$ m	89.7%
	实施例 5	24.5 $\mu$ m	88.9%

[0072] 实施例7

[0073] 制备方法的筛选

[0074] 分别采用三种不同的制备方法制备盐酸罗哌卡因脂质体,并比较三种方法的制备的脂质体的包封率和粒径,以确定最佳制备工艺。

[0075] 方法1:采用薄膜分散法制备空白脂质体。称取磷脂DEPC(二芥酰磷脂酰胆碱)240mg和胆固醇160mg溶于无水乙醇30mL中,超滤20s溶解,于50℃水浴中旋蒸除去乙醇,形成脂质体膜;加入20mL pH 7.4 0.02mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)中,洗膜15min,所得空白脂质体用聚碳酸酯膜整粒。随后采用切向流超滤系统对整粒后的空白脂质体进行超滤浓缩。将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸罗哌卡因溶液于37℃共同孵育30min,制备盐酸罗哌卡因脂质体混悬液,孵育完成后加入0.2%的泊洛沙姆,反复冻融3次后测定脂质体的包封率。

[0076] 方法2:采用乙醇注入法制备空白脂质体。称取DEPC(二芥酰磷脂酰胆碱)240mg和胆固醇160mg溶于无水乙醇20mL中,超声20s溶解,加入pH7.4同体积0.02mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)中,混匀,浴式超声30s,25℃旋转蒸发除尽乙醇,用聚碳酸酯膜整粒。随后采用切向流超滤系统对整粒后的空白脂质体进行超滤浓缩。将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸罗哌卡因溶液于37℃共同孵育30min,制备盐酸罗哌卡因脂质体混悬液,孵育完成后加入0.2%的泊洛沙姆,反复冻融3次后测定脂质体的包封率。

[0077] 方法3:采用逆向蒸发法制备空白脂质体。将20mL 0.02mol/L磷酸盐缓冲液,用注射器缓慢加入溶有DEPC(二芥酰磷脂酰胆碱)240mg和胆固醇160mg的三氯甲烷液中(V有机相:V水相=1:1),高速搅拌乳化直至形成稳定的W/O型乳剂,所得乳剂在旋转蒸发仪(35℃)上减压除去三氯甲烷形成均匀薄膜,再加适量磷酸盐缓冲液继续旋转蒸发将磷脂膜洗下,即得到均匀的脂质体混悬液,随后用聚碳酸酯膜整粒。整粒后采用切向流超滤系统对空白脂质体进行超滤浓缩。将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸罗哌卡因溶液于37℃共同孵育30min,制备盐酸罗哌卡因脂质体混悬液,孵育完成后加入0.2%的泊洛沙姆,反复冻

融3次后测定脂质体的包封率。

[0078]	制备方法	包封率	平均粒径
	方法1	76.5%	18.9 $\mu$ m
	方法2	79.8%	19.3 $\mu$ m
	方法3	90.6%	22.4 $\mu$ m

[0079] 实施例8

[0080] 泊洛沙姆比例筛选

[0081] 将20mL 0.02mol/L磷酸盐缓冲液,用注射器缓慢加入溶有DEPC(二芥酰 磷脂酰胆碱) 240mg和胆固醇160mg的三氯甲烷液中(V有机相:V水相=1: 1),高速搅拌乳化直至形成稳定的W/O型乳剂,所得乳剂在旋转蒸发仪(35 $^{\circ}$ C) 上减压除去三氯甲烷形成均匀薄膜,再加适量磷酸盐缓冲液继续旋转蒸发将磷脂 膜洗下,即得到均匀的脂质体混悬液,随后用聚碳酸酯膜整粒。整粒后采用切向 流超滤系统对空白脂质体进行超滤浓缩。将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸 罗哌卡因溶液于37 $^{\circ}$ C共同孵育30min,制备盐酸罗哌卡因脂质体混悬液,孵育完 成后加入0%、0.2%、1.0%、1.8%、2.5%的泊洛沙姆,反复冻融3次后测定脂质体的包封率。

[0082]	泊洛沙姆加入量	包封率	平均粒径
	0%	73.4%	18.3 $\mu$ m
	0.2%	91.4%	22.4 $\mu$ m
	1.0%	90.3%	21.8 $\mu$ m
	1.8%	88.9%	21.5 $\mu$ m
	2.5%	87.6%	23.7 $\mu$ m

[0083] 实施例1-8中,冻融过程为冻融循环的孵化温度为5 $^{\circ}$ C、时间为40分钟;冷冻温 度为-50 $^{\circ}$ C,时间为40分钟,冻融次数为2-3次。

[0084] 实施例9

[0085] 反复冻融方法筛选

[0086] 将20mL 0.02mol/L磷酸盐缓冲液,用注射器缓慢加入溶有DEPC(二芥酰 磷脂酰胆碱) 240mg和胆固醇160mg的三氯甲烷液中(V有机相:V水相=1: 1),高速搅拌乳化直至形成稳定的W/O型乳剂,所得乳剂在旋转蒸发仪(35 $^{\circ}$ C) 上减压除去三氯甲烷形成均匀薄膜,再加适量磷酸盐缓冲液继续旋转蒸发将磷脂 膜洗下,即得到均匀的脂质体混悬液,随后用聚碳酸酯膜整粒。整粒后采用切向 流超滤系统对空白脂质体进行超滤浓缩。

[0087] 1、冻融孵化温度

[0088] 将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸罗哌卡因溶液于37 $^{\circ}$ C共同孵育30min, 制备盐酸罗哌卡因脂质体混悬液,孵育完成后加入1.0%的泊洛沙姆,冷冻温 度为-50 $^{\circ}$ C,分别于0、5、10、15 $^{\circ}$ C水浴中孵化40min,反复冻融3次,结果 见下表。

[0089]	孵化温度( $^{\circ}$ C)	包封率
	0	85.2%
	5	90.8%
	10	88.7%



15	79.6%
----	-------

[0090] 根据上述结果,冻融后孵化温度在5℃的时候达最高(90.8%),随后包封率呈下降趋势,故而孵化温度选择5℃即可。

#### [0091] 2、冻融孵化时间

[0092] 将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸罗哌卡因溶液于37℃共同孵育30min,制备盐酸罗哌卡因脂质体混悬液,孵育完成后加入1.0%的泊洛沙姆,冷冻温度为-50℃,分别于5℃水浴中孵化20、40、60、90min,反复冻融3次,结果见下表。

孵化时间 (min)	包封率
20	87.5%
40	90.8%
60	90.1%
90	90.3%

[0094] 根据上述结果,冻融后孵化时间达40min后包封率趋于平缓,故而孵化时间选择40min即可。

#### [0095] 3、冷冻温度选择

[0096] 将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸罗哌卡因溶液于37℃共同孵育30min,制备盐酸罗哌卡因脂质体混悬液,孵育完成后加入1.0%的泊洛沙姆,分别于-70℃、-50℃、-20℃、-4℃冷冻40min,于5℃水浴中孵化40min,反复冻融3次,结果见下表。

冷冻温度 (℃)	包封率
-70	90.3%
-50	91.3%
-20	89.9%
-4	88.6%

[0098] 根据上述结果,各冷冻温度下药物包封率相差不大,冷冻温度达-50℃时包封率最高,故而冷冻温度选择-50℃即可。

#### [0099] 4、冷冻时间

[0100] 将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸罗哌卡因溶液于37℃共同孵育30min,制备盐酸罗哌卡因脂质体混悬液,孵育完成后加入1.0%的泊洛沙姆,于-50℃分别冷冻20、30、40、60min,于5℃水浴中孵化40min,反复冻融3次,结果见下表。

冷冻时间 (min)	包封率
20	86.3%
30	88.9%
40	91.3%
60	90.6%

[0102] 根据上述结果,冷冻时间达40min后包封率趋于平缓,故而冷冻时间选择40min即可。

#### [0103] 5、冻融次数

[0104] 将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸罗哌卡因溶液于37℃共同孵育30min,制备盐

酸罗哌卡因脂质体混悬液, 孵育完成后加入1.0%的泊洛沙姆, 于-50℃分别冷冻40min, 于5℃水浴中孵化40min, 反复冻融5次, 每次冻融后测定其包封率, 结果见下表。

[0105]	冻融次数	包封率
	0	82.7%
	1	83.65
	2	86.4%
[0106]	3	91.3%
	4	90.9%
	5	91.6%

[0107] 根据上述结果, 冻融次数达3次后包封率趋于平缓, 故而反复冻融次数为3次即可。

[0108] 实施例10

[0109] 反复冻融梯度筛选

[0110] 将20mL 0.02mol/L磷酸盐缓冲液, 用注射器缓慢加入溶有DEPC(二芥酰 磷脂酰胆碱) 240mg和胆固醇160mg的三氯甲烷液中 (V有机相:V水相=1: 1), 高速搅拌乳化直至形成稳定的W/O型乳剂, 所得乳剂在旋转蒸发仪(35℃) 上减压除去三氯甲烷形成均匀薄膜, 再加适量磷酸盐缓冲液继续旋转蒸发将磷脂膜洗下, 即得到均匀的脂质体混悬液, 随后用聚碳酸酯膜整粒。整粒后采用切向流超滤系统对空白脂质体进行超滤浓缩。

[0111] 1、冻融升温梯度筛选

[0112] 将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸罗哌卡因溶液于37℃共同孵育30min, 制备盐酸罗哌卡因脂质体混悬液, 孵育完成后加入1.0%的泊洛沙姆, 于冻干机 中进行反复冻融操作, -50℃分别冷冻40min后, 分别用10min、20min、40min 升温至5℃, 再于5℃条件下中孵化40min, 反复冻融3次, 最后测定其包封率, 结果见下表。

[0113]	升温时间 (min)	包封率
	10	88.6%
	20	90.4%
	40	90.1%

[0114] 根据上述结果, 从-50℃升温至5℃时, 升温时间20min时包封率最佳, 故而最快升温时间20min。

[0115] 2、冻融降温梯度筛选

[0116] 将空白脂质体混悬液与4mg/mL盐酸罗哌卡因溶液于37℃共同孵育30min, 制备盐酸罗哌卡因脂质体混悬液, 孵育完成后加入1.0%的泊洛沙姆, 于冻干机 中进行反复冻融操作, -50℃分别冷冻40min后, 用20min升温至5℃, 于5℃条件下中孵化40min, 再用10、20、40min降温至-50℃, 反复冻融3次, 最后测定其包封率, 结果见下表。

[0117]	降温时间 (min)	包封率
--------	------------	-----

10	88.2%
20	91.2%
40	90.6%

[0118] 根据上述结果,从5℃降温至-50℃时,降温时间20min时包封率最佳故而 最快降温时间20min。

[0119] 实施例11

[0120] 盐酸罗哌卡因脂质体混悬注射液体外释放评价

[0121] 取实施例2制备得到泊洛沙姆含量为1%的盐酸罗哌卡因脂质体混悬注射液 和泊洛沙姆含量为0%的盐酸罗哌卡因脂质体混悬注射液各10mL,并加入190mL 的释放介质(含0.1%牛血清白蛋白的pH 7.0的PBS),使释放介质和样品体积总 和为200mL,混匀后置于小杯中,于37℃水浴中进行释放实验,搅拌桨转速为 200rpm,在0h吸取4mL样品,并及时补充4mL释放介质,分别在4h、8h、24h、48h和72h,每个样品吸取2mL样品,并及时补充相同体积释放介质。平行进行 2组实验。用离心法分别测定其释放介质中游离药物含量F和药物总量T,计算 释放率。结果见下表所示:

释放时间 h	1%泊洛沙姆添加量的释 放率/%	0%泊洛沙姆添加量的释 放率/%
0	10.33±0.51	12.25±0.54
4	14.57±0.47	15.21±0.84
8	20.89±0.96	25.64±0.71
24	57.84±1.54	63.56±1.32
48	77.24±1.69	94.27±1.25
72	96.87±1.90	99.71±1.97

[0122] 根据释放行为显示,加入1%泊洛沙姆的脂质体处方缓释行为更明显,缓释 时间达到72h,而未添加泊洛沙姆的脂质体处方缓释行为仅48h。

[0124] 实施例12

[0125] 盐酸罗哌卡因脂质体注射液6个月加速稳定性试验

[0126] 取实施例1制备得到的盐酸罗哌卡因脂质体注射液,按照《中国药典》2015 版进行6个月加速稳定性考察,结果见下表所示:

时间 (月)	百分标示含量 (%)	包封率(%)	平均粒径( $\mu\text{m}$ )	最大单杂(%)	总杂(%)
0	100.5	92.6	22.1	0.09	0.14
1	100.5	92.5	22.3	0.12	0.32
2	100.6	92.6	23.1	0.150.56	0.47
3	100.4	92.5	22.9	0.24	0.56
6	100.3	91.3	22.7	0.26	0.66

[0127] 试验结果表明,依照本发明制备的盐酸罗哌卡因脂质体注射液在6个月的加速稳定性试验中表现出良好的稳定性,各项指标无显著变化。

[0128] 实施例13

[0129] 盐酸罗哌卡因脂质体注射液药动学比较实验

[0130] 1、试验材料

[0131] (1) 试验药物

[0132] 盐酸罗哌卡因脂质体注射液:按照实验例1制备

[0133] 盐酸罗哌卡因注射液:自制

[0134] (2) 试验动物

[0135] 豚鼠,180-300g,雄12只

[0136] 2、试验方法

[0137] 将浓度为30mg/kg、60mg/kg、90mg/kg盐酸罗哌卡因脂质体与罗哌卡因注射液5mg/kg通过皮下给药(n=3),分别于给药前后0h、0.5h、1h、2h、4h、6h、8h、10h、18h、24h、48h、72h豚鼠眼眶取血0.5ml至1.5mlEP管中,肝素抗凝。4℃,10000rpm离心分离血浆。

[0138] 制定血药浓度-时间曲线,如图2所示。

[0139] 药动学参数如下表所示:

组别	AUC
注射液-5mg/kg	4507
处方2-30mg/kg	61973
处方2-60mg/kg	70491
处方2-90mg/kg	74383

[0140] 盐酸罗哌卡因脂质体注射液,从维持一定浓度释放的时间长短看,脂质体有明显的缓释效果。

[0141] 实施例14

[0142] 盐酸罗哌卡因脂质体注射液对豚鼠局部镇痛作用研究

[0143] 1、试验材料

[0146] (1) 试验药物

[0147] 盐酸罗哌卡因脂质体注射液:按照实验例1制备

[0148] 盐酸罗哌卡因注射液:自制

[0149] 生理盐水

[0150] (2) 试验动物

[0151] 豚鼠,180-300g,雄90只

[0152] 2、试验方法

[0153] 盐酸罗哌卡因脂质体、罗哌卡因注射液和生理盐水通过豚鼠腹部皮内给药 (n=3),分别于给药后0h、0.5h、1h、2h、4h、6h、8h、24h用针刺法测定用药部位皮肤的痛觉反应,针刺部位有收缩现象为阳性,无收缩现象为阴性,记录动物有反应次数(收缩次数),实验结果如图2所示。

[0154] 注射液镇痛作用仅在5h后就无明显效果,脂质体组有明显的缓释效果,药效维持在15小时左右,15小时后迅速下降,直至24小时,完全消失。

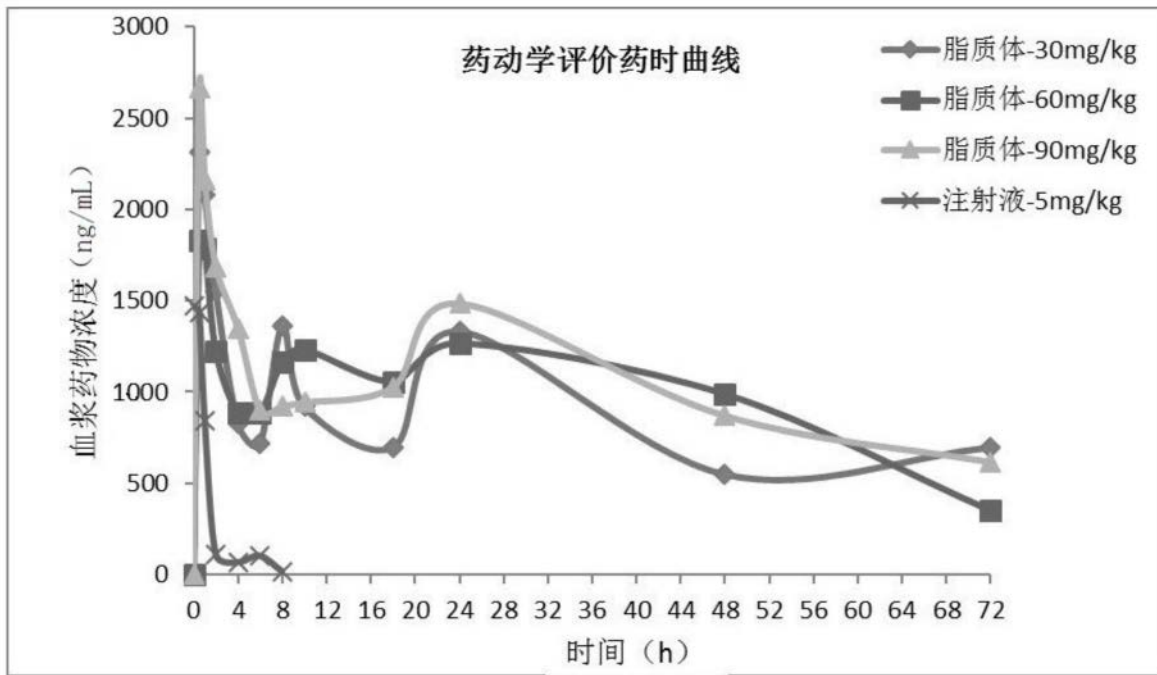


图1

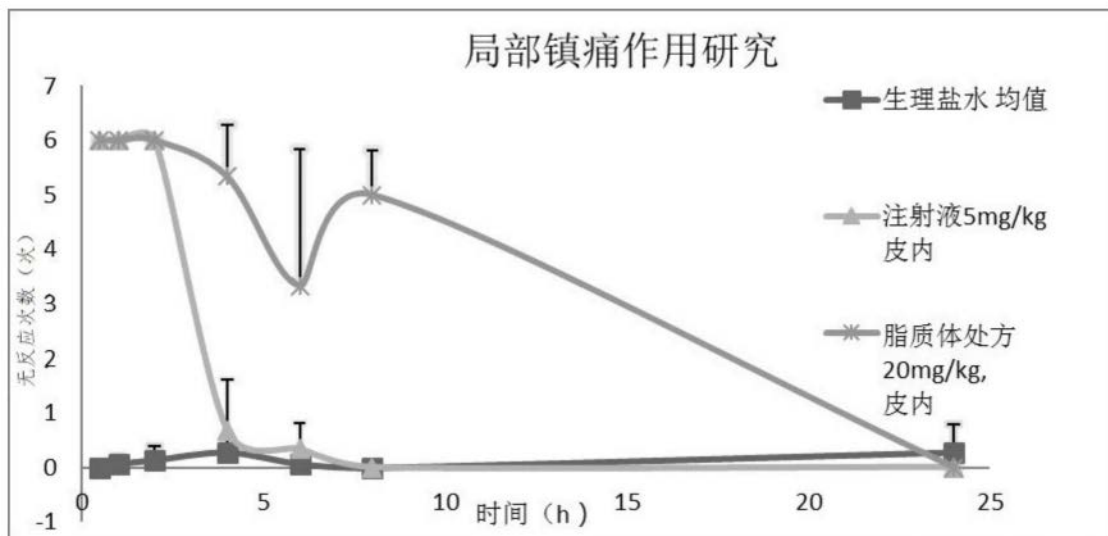


图2