

硫酸多黏菌素 B 多囊脂质体的制备及抗菌活性研究

卢宇欣, 金锐, 王娅雯, 陈雪帆* (浙江工业大学绿色制药协同创新中心, 杭州 310014)

摘要:目的 制备硫酸多黏菌素 B 多囊脂质体(polymyxin B sulfate multivesicular liposomes, PMB-MVLs), 优化其处方并对其质量、稳定性、体外释放和体外抗菌活性进行考察。方法 采用复乳法制备 PMB-MVLs, 以包封率为指标, 采用 Box-Behnken 效应面法对处方进行优化; 采用高效液相色谱法对 PMB-MVLs 中 PMB 进行定量分析; 对其理化性质、药物体外释放行为、体外抗菌活性和制剂安全性进行考察。结果 采用最优处方所制的 PMB-MVLs 外观呈无数个非同心囊泡堆积而成的球形, 大小较均匀, 包封率为 $(69.521 \pm 1.531)\%$, 平均粒径为 $(5.84 \pm 1.42) \mu\text{m}$, 平均 Zeta 电位为 $(-26.77 \pm 0.55) \text{mV}$, 其在 4°C 下储存 1 个月稳定性良好; PMB-MVLs 在体外持续释放达 72 h, 无突释效应; 体外抗菌实验结果显示, 相较于 PMB 溶液, PMB-MVLs 对 *E. coli* 和 *P. aeruginosa* 细菌具有更好的抗菌效果, 并且在抗菌活性范围内无溶血风险。结论 成功制得具有缓释作用的 PMB-MVLs, 其粒径分布均匀、包封率高, 具有增强的抗菌活性。

关键词:硫酸多黏菌素 B; 多囊脂质体; 复乳法; Box-Behnken 设计; 体外抗菌

doi:10.11669/cpj.2025.06.008 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)06-0620-10

Preparation and Antibacterial Activity of Polymyxin B Sulfate Multivesicular Liposomes

LU Yuxin, JIN Rui, WANG Yawen, CHEN Xuefan* (Green Pharmaceutical Collaborative Innovation Center, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare polymyxin B sulfate multivesicular liposomes (PMB-MVLs), optimize their formulation, and their quality, stability, release and investigate their antibacterial activity *in vitro*. **METHODS** The PMB-MVLs were prepared by the double-emulsion method. The response surface method of Box-Behnken design was used to optimize the initial prescription. High performance liquid chromatography method was established to quantitatively analyze PMB in PMB-MVLs. The physicochemical properties, the *in vitro* drug release behavior, *in vitro* antimicrobial activity and formulation safety of PMB-MVLs were investigated. **RESULTS** The appearance of PMB-MVLs prepared by optimal prescription were non-concentric spherical vesicles with uniform size. The encapsulation efficiency of PMB-MVLs were $(69.521 \pm 1.531)\%$. The average particle size was $(5.84 \pm 1.42) \mu\text{m}$, and the average Zeta potential was $(-26.77 \pm 0.55) \text{mV}$. The PMB-MVLs showed good stability when stored at 4°C for one month. The results showed that PMB-MVLs were released continuously for 72 h *in vitro*, and there was no sudden release effect. The *in vitro* antibacterial activities of PMB-MVLs on *E. coli* and *P. aeruginosa* were significantly stronger than those of the free PMB. And PMB-MVLs has no risk of hemolysis within its range of antimicrobial activity. **CONCLUSION** The slow-release PMB-MVLs are successfully prepared with uniform particle size, high encapsulation efficiency, and enhanced antibacterial activity.

KEY WORDS: polymyxin B sulfate; multivesicular liposome; double-emulsion method; Box-Behnken design; *in vitro* antibacterial activity

多黏菌素类抗生素是对由多黏芽孢杆菌菌株培养物中分离获得的一系列肽类抗生素的统称, 包括: 多黏菌素 A、B、C、D、E 等^[1], 其中多黏菌素 B 和 E 于 1959 年被批准作为抗菌药物用于临床, 临床常用其硫酸盐注射剂^[2]。硫酸多黏菌素 B (polymyxin B sulfate, PMB) 主要作用于细菌的细胞膜, 对多种革兰阴性菌具有很强的抗菌活性^[3], 但由于抗菌谱窄, 且存在肾毒性和神经毒性, 使得

PMB 的临床应用自 20 世纪 70 年代起迅速减少。也正是由于过去几十年中使用较少, 其依然保留了对多重耐药性革兰阴性菌的抗菌活性^[4], 现常被用作治疗革兰阴性菌的最后一道防线而再次被重视。目前市售的 PMB 产品主要包括药品和原料药两种形式。

多囊脂质体 (multivesicular liposomes, MVLs) 是采用储库泡沫技术 (DepofoamTM) 制备的一种新型脂

基金项目: 国家药典委员会药品标准制修订研究课题资助 (2023Y002)

作者简介: 卢宇欣, 女, 硕士研究生 研究方向: 药用辅料质量控制
药及原辅包质量 Tel: 13819183280

* 通讯作者: 陈雪帆, 男, 硕士, 高级工程师 研究方向: 化学药、中

质体,其内部由若干个囊泡腔室以非同心圆的形式构成,呈现蜂窝状结构^[5-6]。与普通脂质体相比,MVLs 稳定性好、包封体积大、渗漏率低^[7]。经注射给药后,能在注射部位形成药物储库而实现药物的缓慢释放,延长药物半衰期,从而减少注射次数,降低毒副作用,提高患者顺应性^[8]。

本研究以 PMB 为模型药物,以多囊脂质体作为载体材料,制备 PMB 多囊脂质体(polymyxin B sulfate multivesicular liposomes, PMB-MVLs)。相比于注射用硫酸多黏菌素 B, PMB-MVLs 具有多方面的优点:①提高生物利用度。PMB-MVLs 能够通过脂质体的包裹作用,提高药物在体内的稳定性和溶解度,从而增加药物的生物利用度,这意味着患者在使用相同剂量的药物时,能够获得更高的治疗效果。②减少药物毒性。脂质体作为一种载体系统,能够减少 PMB 对肾脏和其他器官的毒性作用,降低药物的副作用。③增强靶向性。PMB-MVLs 可以通过特定的脂质组成和表面修饰,实现对感染部位的靶向输送,这使得药物能够更准确地作用于感染部位,提高治疗效果并减少不必要的药物暴露。④延长药物作用时间。脂质体包裹的 PMB 能够在体内缓慢释放,从而延长药物的作用时间,这有助于减少给药频率,提高患者的便利性。此外, PMB-MVLs 除了治疗革兰阴性杆菌引起的严重感染外,还可以提高药物的靶向性和生物利用度,减少细菌对药物的耐药性,这对于当前抗生素耐药性日益严重的问题具有重要意义。

本研究采用复乳法制备 PMB-MVLs,对其处方工艺进行优化,并对该制剂进行理化性质表征、稳定性、体外释放、体外抗菌活性和安全性研究。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);UV-2250 型紫外分光光度计(日本 SHIMADZU 公司);JL-150W 型超声波细胞破碎仪(上海靳澜仪器制造有限公司);1-14K 型台式高速冷冻离心机(德国 SIGMZ 公司);MS3 型数显旋涡振荡器(德国 IKA 公司);CX31 型多功能显微镜(日本 OLYMPUS 公司);Mastersize 3000 型激光粒度仪、ZS90 型激光粒度仪及表面电位仪(英国马尔文仪器公司);DNP-9272Y 型细菌恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);BKQ-Z75I 型立式压力蒸汽灭菌锅(山东博科科学仪器有限公司);Synergy LX 型多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

1.2 药品及试剂

PMB(99%,华东医药股份有限公司);二油酰基卵磷脂(DOPC, $\geq 94\%$);三辛酸甘油酯(99%,德国 Lipoid 公司);胆固醇(CH,分析纯,上海克拉玛尔试剂有限公司);二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG, 99%,上海艾伟拓医药科技有限公司);L-赖氨酸($>97\%$,上海韶远试剂有限公司);Triton X-100(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);铜绿假单胞菌和大肠杆菌(杭州治枫科技有限公司);肉汤培养基(LB,北京奥博星生物技术有限责任公司);胰酪大豆胨液体培养基(TSB,上海博微生物科技有限公司);二氯甲烷、氯仿、无水硫酸钠和其他试剂均为分析纯;乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 PMB-MVLs 的制备

本研究采用复乳法制备 PMB-MVLs^[9-10]。具体步骤如下:将 PMB 溶解于 2 mL 质量分数为 7% 的葡萄糖溶液中,作为内水相;称取处方量的 DOPC、CH、DPPG 和三辛酸甘油酯溶于等体积的二氯甲烷/氯仿(3:1)中作为油相。将内水相缓慢注入持续搅拌的油相中,在冰水浴条件下 300 W 探头超声乳化形成稳定的油包水(W/O)型初乳。用注射器吸取 W/O 型初乳快速注入含 5% 葡萄糖和 40 mmol · L⁻¹ L-赖氨酸的外水相中,涡旋震荡形成水包油包水(W/O/W)型复乳,将复乳转移至 250 mL 锥形瓶中,置于 37 °C 水浴上,同时表面通氮气除去有机溶剂,即得 PMB-MVLs 混悬液。最后取 PMB-MVLs 混悬液,与等体积生理盐水混匀,3 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,收集沉淀部分,用生理盐水同法洗涤沉淀 3 次并稀释至适当浓度即得 PMB-MVLs 样品。

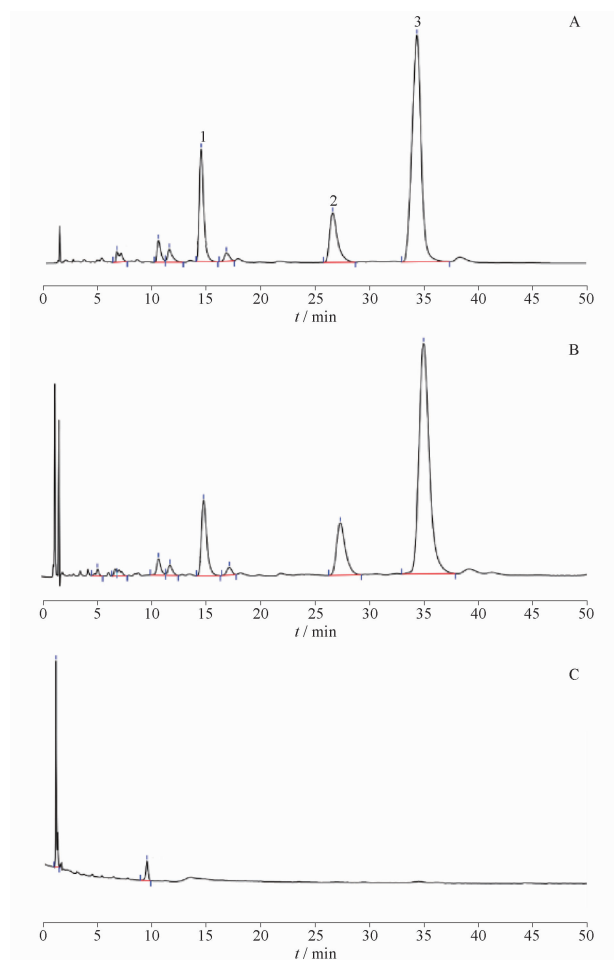
2.2 PMB 含量测定方法的建立及包封率测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相为硫酸钠溶液(取 4.46 g 无水硫酸钠溶解在 900 mL 水中,用稀磷酸调节 pH 值至 2.3 后用水稀释至 1 000 mL)-乙腈(80:20);柱温为 30 °C;检测波长为 215 nm;进样量为 20 μL;流速为 1.0 mL · min⁻¹。

2.2.2 供试品溶液制备 精密量取 1 mL PMB-MVLs 混悬液至 5 mL 量瓶中,加入体积分数 10% Triton X-100 溶液 2 mL,摇匀后超声破乳 10 min,加流动相定容至刻度,摇匀后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤即得。

2.2.3 专属性考察 以不含 PMB 的空白 MVLs 作为空白溶液,以 PMB 溶液作为对照品溶液,以 PMB-

MVLs 混悬液作为样品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图1)。由图1可见,硫酸多黏菌素 B₁、B₂、B_{1,1}峰的保留时间分别约为 34、15、27 min,本研究以主要成分 B₁为分析对象,其峰形良好,空白 MVLs 中 DOPC、CH 和三辛酸甘油酯等脂质材料对 PMB 的测定无干扰,表明该分析方法具有良好的专属性。



化合物 1 - PMB-B₂; 化合物 2 - PMB-B_{1,1}; 化合物 3 - PMB-B₁。
compound 1 - PMB-B₂; compound 2 - PMB-B_{1,1}; compound 3 - PMB-B₁。

图1 硫酸多黏菌素 B(PMB)对照溶液(A)、硫酸多黏菌素 B 多囊脂质体(PMB-MVLs)供试品溶液(B)和空白 MVLs 溶液(C)的高效液相色谱(HPLC)图

Fig. 1 HPLC chromatograms of PMB control solution (A), PMB-MVLs solution(B), and Blank-MVLs solution(C)

2.2.4 线性考察和进样精密度考察 取 0.01、0.10、0.20、0.50、1.0、1.50、2.00 mg · mL⁻¹ 系列质量浓度的 PMB 对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件分别进样检测。选择纵坐标为峰面积(A),横坐标为质量浓度(ρ)进行线性回归,得回归方程为 $A = 96.28332\rho - 0.06496$ ($r^2 = 0.99997$)。表明 PMB

在 0.01 ~ 2.00 mg · mL⁻¹ 内线性关系良好,可用于 PMB 质量浓度的计算。取 1.0 mg · mL⁻¹ 的 PMB 对照品溶液按照“2.2.1”项下色谱条件连续重复进样 6 次, PMB 峰面积相对标准偏差(RSD)值为 0.17%, 小于 2%, 表明该分析方法进样精密度良好。

2.2.5 准确度考察 精密称取 PMB 原料药 50 mg, 加流动相稀释制成质量浓度为 5.0 mg · mL⁻¹ 的 PMB 储备液。取空白 MVLs 混悬液 2 mL, 分别加入 PMB 储备液 1.0、2.0、4.0 mL 至 10 mL 量瓶中, 加入体积分数 10% Triton X-100 溶液 2 mL 破乳, 加流动相定容至刻度, 配制成质量浓度为 0.5、1.0、2.0 mg · mL⁻¹ 的溶液各 3 份, 按“2.2.1”项下色谱条件分别进样测定。结果表明, 低、中、高 3 个质量浓度的平均回收率分别为 96.64%、94.42%、96.43%, 回收率的 RSD 均值为 0.25%, 表明该方法准确度良好。

2.2.6 包封率测定 根据文献[11-12]采用低速离心法测定多囊脂质体的包封率。取 PMB-MVLs 混悬液 2 mL 置于 10 mL 量瓶内, 加入体积分数 10% Triton X-100 溶液 2 mL 破乳, 再加入生理盐水定容至刻度, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 测得 PMB-MVLs 中总药含量为 $M_{总}$ 。另取同批次同体积的 PMB-MVLs 混悬液于 3 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 后弃去上清液, 将沉淀用生理盐水洗涤 3 次, 将沉淀转移至 10 mL 量瓶内, 加入体积分数 10% Triton X-100 溶液 2 mL 破乳, 再加入生理盐水定容至刻度, 测定包封药物含量即 $M_{包}$ 。按公式 1 计算包封率(EE)。

$$EE(\%) = \frac{M_{包}}{M_{总}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

2.3 Box-Behnken 设计-效应面法优化处方

在综合分析了预实验结果和相关文献实验结果的基础上^[13-15], 确定 3 个影响 PMB-MVLs 包封率的主要因素: DOPC 与 CH 质量比(A)、DOPC 与三辛酸甘油酯质量比(B)和外水相中 L-赖氨酸的物质的量(C)作为考察对象, 采用 Box-Behnken 响应面法设计实验, 每个因素 3 个水平, 以包封率为评价指标(Y), 具体因素与水平见表 1。采用 Design-Expert 13 软件生成 17 组试验方案筛选最优处方, Box-Behnken 设计与结果见表 2。

2.3.1 模型拟合及方差分析 利用 Design-Expert 13 软件对各因素及响应值进行回归分析, 得到拟合方程为 $Y = 39.9444 - 0.31425A + 0.149B - 0.71725C + 0.6125AB + 2.016AC - 0.9445BC - 7.0467A^2 -$

5.867 2B² - 6.374 7C² ($r^2 = 0.986 7, P < 0.01$, 失拟项 $P > 0.05$)。由表 3 方差分析结果可知, 模型 $P < 0.01$, 表明达到极其显著的水平。失拟项 $P > 0.05$, 表明该方程能很好拟合和预测各因素与 Y 的关系。此外, 该模型相关系数较高 ($r^2 = 0.986 7$), 变异系数 (CV) 为 3.52%, 小于 <4%, 表明所拟合的模型具有很高的精密度和适用性, 可用此模型对 PMB-MVLs 进行预测和分析。

2.3.2 响应面优化与预测 实验数据分析采用 Design-Expert 13 软件, 为追求 Y 的最大化, 对模型进一步处理, 绘制各因素对 Y 的等高线图和 3D 效应面图 (图 2)。由图 2 效应面图可知, 包封率随着 DOPC 与 CH 质量比、DOPC 与三辛酸甘油酯质量比和 L-赖氨酸物质的量浓度的增加先增加后减小。本实验以更高的包封率为筛选目标, 通过响应面优化预测最佳处方是: DOPC: CH = 2.00:1, DOPC: 三辛酸甘油酯 = 4.03:1, L-赖氨酸物质的量浓度为 38.76 mmol · L⁻¹, 模型预测包封率为 39.97%。

表 1 Box-Behnken 响应面法的因素水平设计表

Tab. 1 The design of factors and level by Box-Behnken method

Level	A	B	C
	DOPC: CH (m:m)	DOPC: Tricaprylin (m:m)	L-Lysine/mmole · L ⁻¹
-1	1.5:1	2:1	20
0	2:1	4:1	40
1	2.5:1	6:1	60

表 2 Box-Behnken 效应面法优化 PMB-MVLs 处方的实验设计与结果

Tab. 2 Experimental design and results of optimizing the formulation of PMB-MVLs by Box-Behnken method

No.	Run	Factor 1 (A)	Factor 2 (B)	Factor 3 (C)	EE/% (Y)
6	1	2.5	4	20	25.304
4	2	2.5	6	40	27.373
15	3	2	4	40	39.682
1	4	1.5	2	40	27.913
13	5	2	4	40	39.092
7	6	1.5	4	60	23.710
17	7	2	4	40	41.146
12	8	2	6	60	25.599
10	9	2	6	20	29.224
3	10	1.5	6	40	27.866
2	11	2.5	2	40	24.970
5	12	1.5	4	20	28.875
14	13	2	4	40	38.918
9	14	2	2	20	27.917
8	15	2.5	4	60	28.203
16	16	2	4	40	40.884
11	17	2	2	60	28.070

表 3 Box-Behnken 效应面法方差分析结果

Tab. 3 Results of variance analysis by Box-Behnken method

Source	Sum of squares	df	Mean square	F	P
Model	612.82	9	68.09	57.56	<0.000 1
A	0.790 0	1	0.790 0	0.667 9	0.440 7
B	0.177 6	1	0.177 6	0.150 1	0.709 9
C	4.12	1	4.12	3.48	0.104 4
AB	1.50	1	1.50	1.27	0.297 2
AC	16.26	1	16.26	13.74	0.007 6
BC	3.57	1	3.57	3.02	0.126 0
A ²	209.08	1	209.08	176.75	<0.000 1
B ²	144.94	1	144.94	122.53	<0.000 1
C ²	171.10	1	171.10	144.65	<0.000 1
Residual	8.28	7	1.18		
Lack of fit	4.10	3	1.37	1.31	0.387 0
Pure error	4.18	4	1.04		
Cor total	621.10	16			

2.3.3 最优处方的验证 为进一步验证所建立模型预测结果与实际实验结果是否相符, 以软件预测的最优处方平行制备 3 批 PMB-MVLs 混悬液, 测定包封率为 (40.37 ± 0.48)%。实测值与预测值的相对误差相对偏差小于 2%, 说明模型拟合成功, 该制备处方条件稳定可靠。

2.4 PMB-MVLs 质量评价

2.4.1 形态 利用光学显微镜观察 PMB-MVLs 粒子形态, 图 3 中可见 PMB-MVLs 形状呈球形, 内部由许多紧密排列的非同心囊泡构成, 大小较均匀, 无磷脂碎片。

2.4.2 粒径和电位 采用激光粒度仪测定 PMB-MVLs 的粒径, 测得平均粒径为 (5.84 ± 1.42) μm, 粒度分布较均匀。Zeta 电位为 (-26.77 ± 0.55) mV, Zeta 电位的绝对值大于 25 mV, 说明 PMB-MVLs 的结构具有良好的动力学稳定性。见图 4。

2.4.3 包封率 按照最优处方和制备工艺平行制备 3 批 PMB-MVLs 混悬液, 按“2.2.7”项下方法测定包封率, 测得 PMB-MVLs 纯化后包封率为 (69.52 ± 1.53)%, RSD 为 2.20%, 表明按该处方制备的 PMB-MVLs 混悬液可获得高的包封率且重现性好。

2.4.4 稳定性 将 PMB-MVLs 混悬液分别于 4 和 25 °C 条件下放置 30 d, 分别在 0、10、20、30 d 取样, 观察其外观变化, 并测定其粒径和包封率, 具体考察结果见表 4。结果显示, 4 °C 放置 1 个月后脂质体沉淀, 轻摇后呈白色半透明均匀状混悬液, 包封率和粒径变化不大, 表明 PMB-MVLs 混悬液在 4 °C 下储

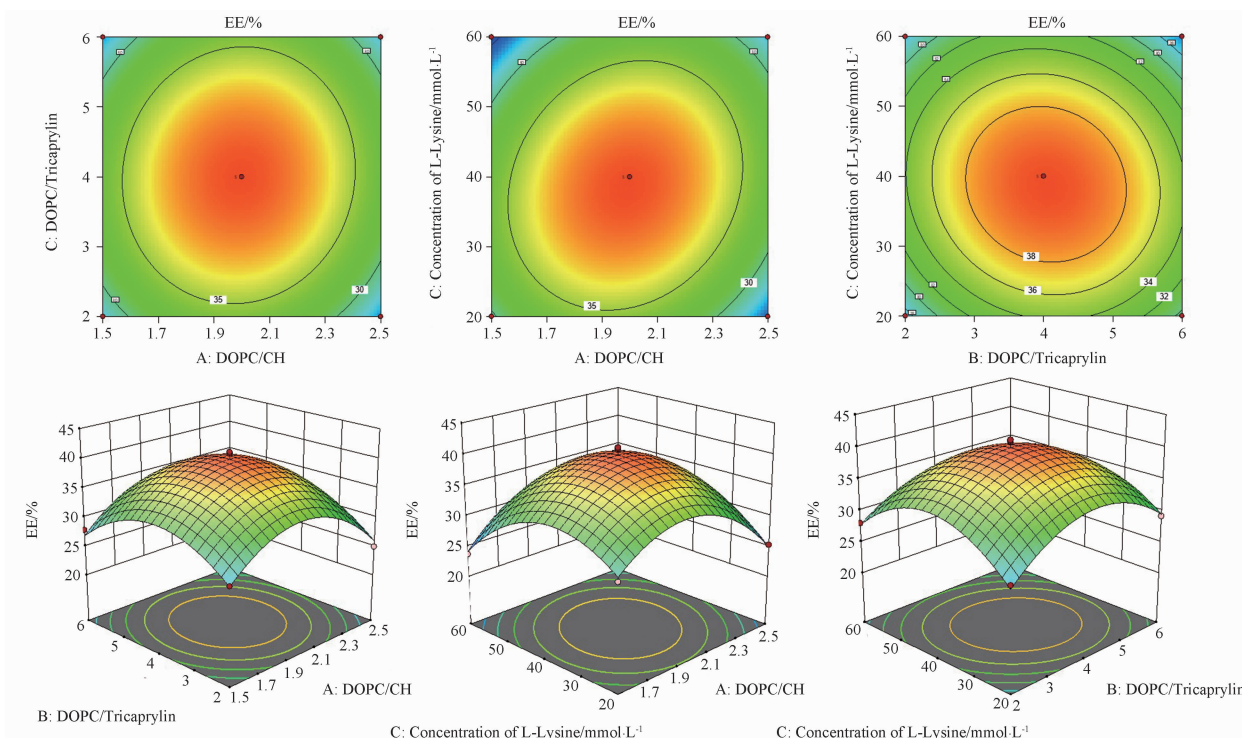


图2 各因素对PMB-MVLs混悬液包封率影响的响应面和等高线

Fig. 2 Response surface and contour of influence of various factors on PMB-MVLs suspension encapsulation efficiency

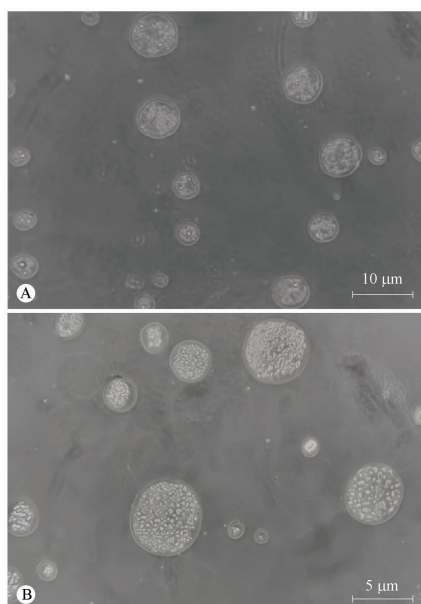
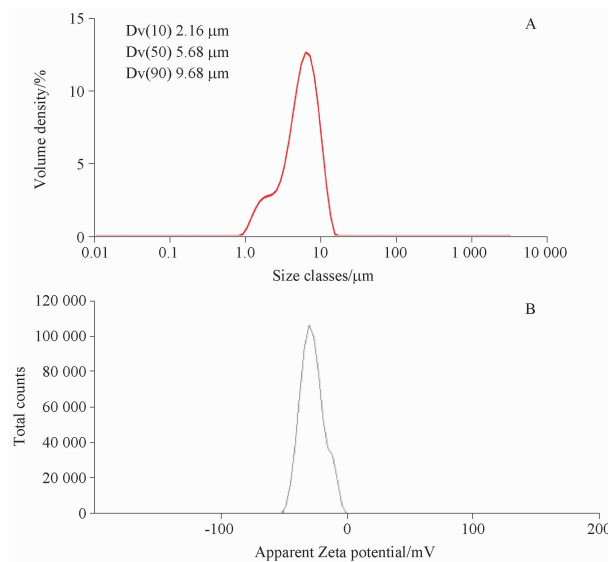


图3 PMB-MVLs放大200倍(A)和放大400倍(B)的显微镜图

Fig. 3 Micrograph of the $\times 200$ (A) and $\times 400$ (B) of the PMB-MVLs

存1个月稳定性良好。25℃放置1个月后脂质体沉淀较多,出现团状聚集,且轻摇不易消失,包封率下降约10%,粒径增大约50%,表明PMB-MVLs混悬液不宜在室温条件下储存。



Dv(10)、Dv(50)、Dv(90)分别表示累计粒度分布数达到10%、50%、90%时对应的粒径。

Dv(10), Dv(50), and Dv(90) respectively represent the particle sizes corresponding to cumulative particle size distributions of 10%, 50%, and 90%.

图4 PMB-MVLs粒径分布图(A)和表面Zeta电位图(B)

Fig. 4 Particle size distribution (A) and Zeta potential (B) of PMB-MVLs

2.4.5 体外释放 通过透析法^[16-17]研究PMB-MVLs混悬液及PMB原料药的体外释放行为。精密量取PMB-MVLs混悬液和PMB溶液

表4 PMB-MVLs 混悬液稳定性考察结果。n=3

Tab. 4 Storage stability of PMB-MVLs. n=3

t/d	4 °C		25 °C	
	EE/%	Size/μm	EE/%	Size/μm
0	68.86	5.42	68.86	5.42
10	68.25	5.58	66.24	5.60
20	66.10	6.08	65.22	7.37
30	65.11	7.43	54.49	12.30

(与PMB-MVLs混悬液药物质量浓度等量)各5 mL 添加到经预处理过的透析袋(截留相对分子质量 $M_w = 14\ 000$)内,置于盛有30 mL 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)释放介质中,于37 °C下 $100\ r \cdot \min^{-1}$ 持续搅拌,分别在0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、96 h 时取样1.0 mL,并补加等体积的新鲜释放介质(平行操作3份)。分别测定各时间点释放出PMB的含量,以零时刻包封药量为100%药量,计算累积释放度,绘制释放曲线图,并利用拟合方程对PMB-MVLs混悬液和PMB溶液在pH 7.4条件下释药行为进行模型拟合分析。

结果见图5, PMB溶液在PBS(pH 7.4)释放介质中于8 h时基本释放完全。PMB-MVLs混悬液在PBS中于2、12、24、72 h 分别释放约15%、55%、65%、82%,在72 h时基本释放完全,且无突释效应,表明其具有缓释作用。累积释药曲线方程拟合结果见表5, PMB-MVLs混悬液和PMB原料药在pH 7.4释放介质中符合一级释放动力学模型。

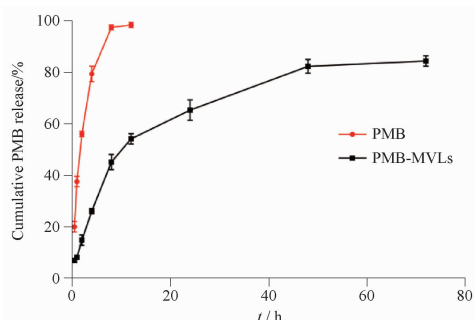


图5 PMB溶液与PMB-MVLs混悬液在pH 7.4释放介质中体外释放曲线。n=3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 5 *In vitro* release profiles of free PMB and PMB-MVLs in pH 7.4 release medium. n=3, $\bar{x} \pm s$

2.5 体外抗菌活性研究

配制LB、TSB液体培养基和固体培养基,对其进行120 °C高压蒸汽灭菌后于4 °C条件下储存。用无菌生理盐水将大肠杆菌(*E. coli*)和铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)菌液稀释至 1×10^6 和 4×10^6 CFU · mL⁻¹。其中, LB作为*E. coli*的培养基, TSB作为*P. aeruginosa*的培养基。

表5 体外释放曲线拟合模型的结果

Tab. 5 Results of fitting models for *in vitro* release profile

Fitting models	Fits the equation	
	PMB	PMB-MVLs
Zero order release	$M = 6.357\ 67t + 37.424\ 42$ ($r^2 = 0.768\ 82$)	$M = 1.069\ 04t + 22.721\ 14$ ($r^2 = 0.734\ 85$)
First order release	$Mt = 98.626\ 61(1 - e^{-0.431\ 92t})$ ($r^2 = 0.995\ 94$)	$Mt = 81.860\ 53(1 - e^{-0.090\ 9t})$ ($r^2 = 0.986\ 72$)
Higuchi	$Mt = 28.650\ 66X^{1/2} + 11.019\ 84$ ($r^2 = 0.905\ 76$)	$Mt = 10.769\ 04X^{1/2} + 5.129\ 78$ ($r^2 = 0.914\ 57$)

2.5.1 最低抑菌浓度和最低杀菌浓度的测定 采用微量稀释法^[18-19]测定最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。分别向96孔板中加入100 μL上述稀释后的菌液,再将PMB溶液和PMB-MVLs分别用已经灭菌的LB和TSB溶液倍比稀释后取100 μL分别加入各孔中。设置阴性对照孔(仅加培养基和菌液)和空白对照孔(加培养基、菌液和对应浓度的空白MVLs),将96孔板置于37 °C恒温箱中孵育24 h。在黑色背景下先观察有细菌生长孔为混浊,眼观无细菌生长孔所含药物浓度即为该药物的MIC。为了进一步确定最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC),分别吸取上述96孔板中未见细菌生长孔的培养物100 μL,移种至不含药的固体LB和TSB培养基上,37 °C倒置培养24 h,观察有无细菌生长,用活菌计数法检测平皿上的菌落,平均数小于5个菌落的最小稀释度的药物浓度即为该药的MBC。

由图6~7可知, PMB原料药组和PMB-MVLs制剂组对*E. coli*的MIC为4 μg · mL⁻¹, MBC为8 μg · mL⁻¹;对*P. aeruginosa*的MIC为8 μg · mL⁻¹, MBC为32 μg · mL⁻¹。

2.5.2 细菌生长抑制率的测定 采用微量稀释法测定各组细菌生长抑制率。本研究以加入培养基作为阴性对照组,空白MVLs作为空白对照组,给药剂量和菌液浓度同“2.5.1”项下,将96孔板于37 °C下孵育24 h后,使用酶标仪测定600 nm下的光密度值(OD_{600 nm}),按照公式2计算细菌生长抑制率。

$$\text{细菌生长抑制率}(\%) = \frac{OD_N - OD_D}{OD_N} \quad \text{公式(2)}$$

其中, OD_N为阴性对照组OD_{600 nm}光密度值, OD_D是添加药物组OD_{600 nm}光密度值。

由图8可知,在一定浓度范围内, PMB原料药组和PMB-MVLs制剂组的细菌生长抑制率随药物浓度增加而增大,表明两者抑菌作用均具有一定的浓度依赖性,且在低浓度时, PMB-MVLs制剂组表现出更好的抑菌效果。

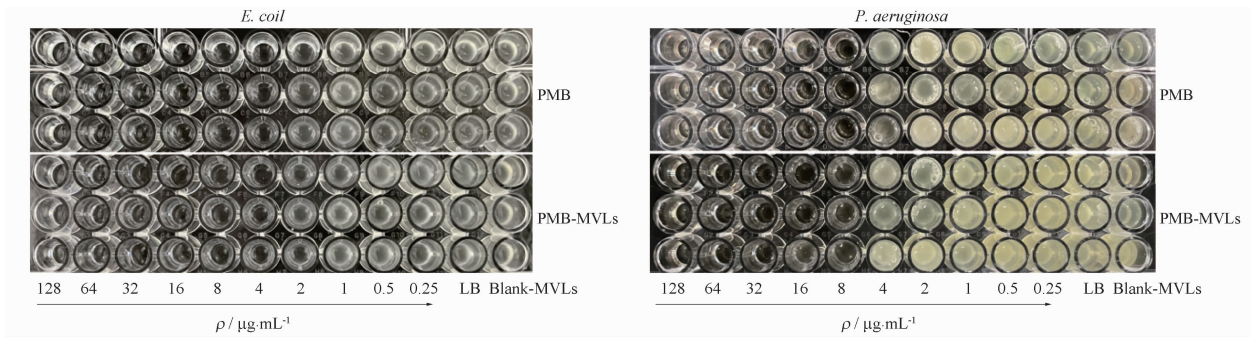
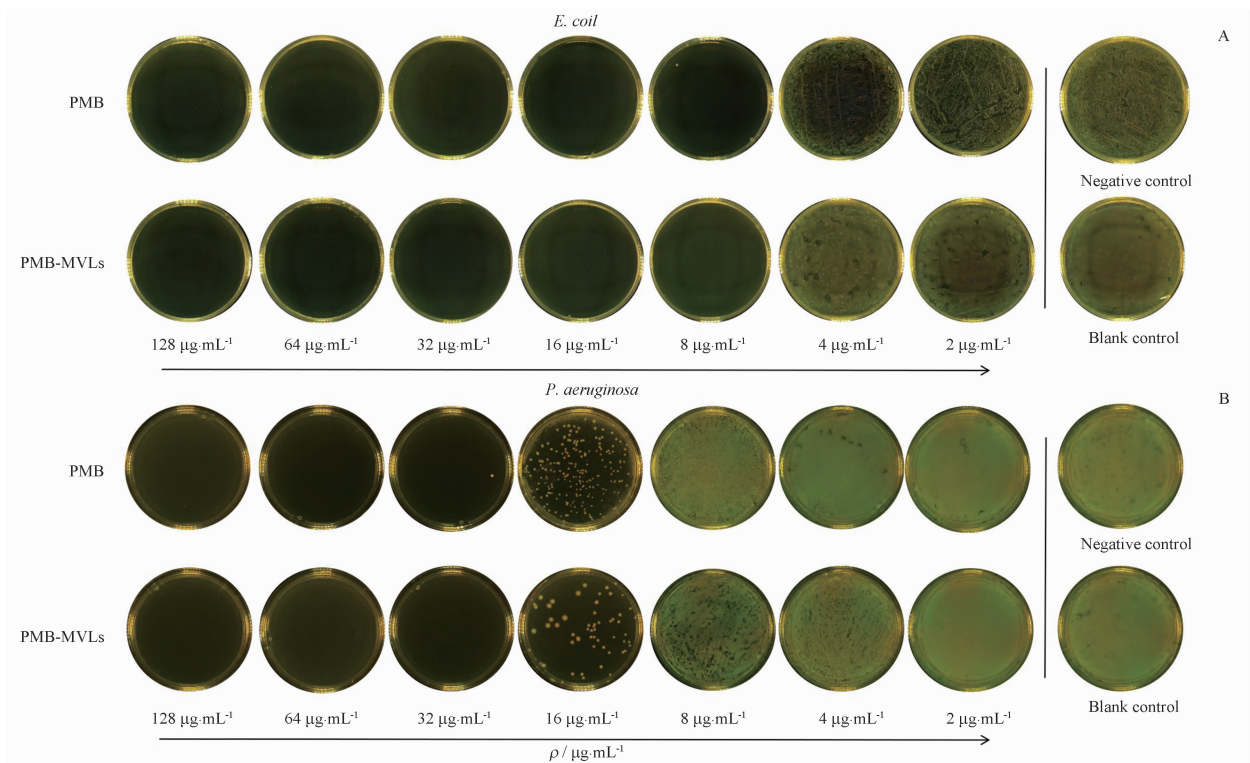


图6 不同浓度PMB和PMB-MVLs的最低抑菌浓度(MIC)考察

Fig. 6 Study on the MIC of PMB and PMB-MVLs at different concentration

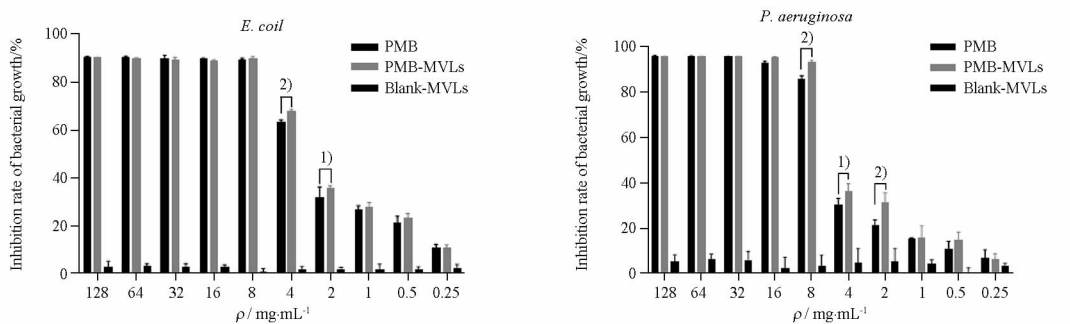


A - *E. coli*; B - *P. aeruginosa*。

A - *E. coli*; B - *P. aeruginosa*。

图7 不同浓度PMB和PMB-MVLs的最低杀菌浓度(MBC)考察

Fig. 7 Study on the MBC of PMB and PMB-MVLs at different concentrations



与空白MVLs组比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs Blank-MVLs group.

图8 PMB原料药组和PMB-MVLs制剂组24 h细菌生长抑制率的测定。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 8 Determination of the bacterial growth inhibition rate at 24 h. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5.3 细菌生长抑制率-时间曲线 为进一步研究 PMB 和 PMB-MVLs 对两种细菌生长抑制作用随时间变化情况,本研究分别设置 7 个浓度梯度,给药剂量和菌液浓度同“2.5.1”项下。分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 使用酶标仪检测各孔 OD₆₀₀ 值,计算细菌生长抑制率,以细菌生长抑制率-时间作图。

从图 9 可以看出,PMB 原料药组各浓度溶液对 *E. coli* 的抑制情况在给药 4 h 后抑制率变化不明显,而 PMB-MVLs 制剂组在 24 h 内抑制率均呈逐渐上升趋势。由图 9 可知,随着时间延长,PMB 原料药组对 *P. aeruginosa* 生长抑制率逐渐趋于平稳,于给药后 8 h 变化不大,而 PMB-MVLs 组在给药后 8 h 抑制率呈逐渐上升趋势。

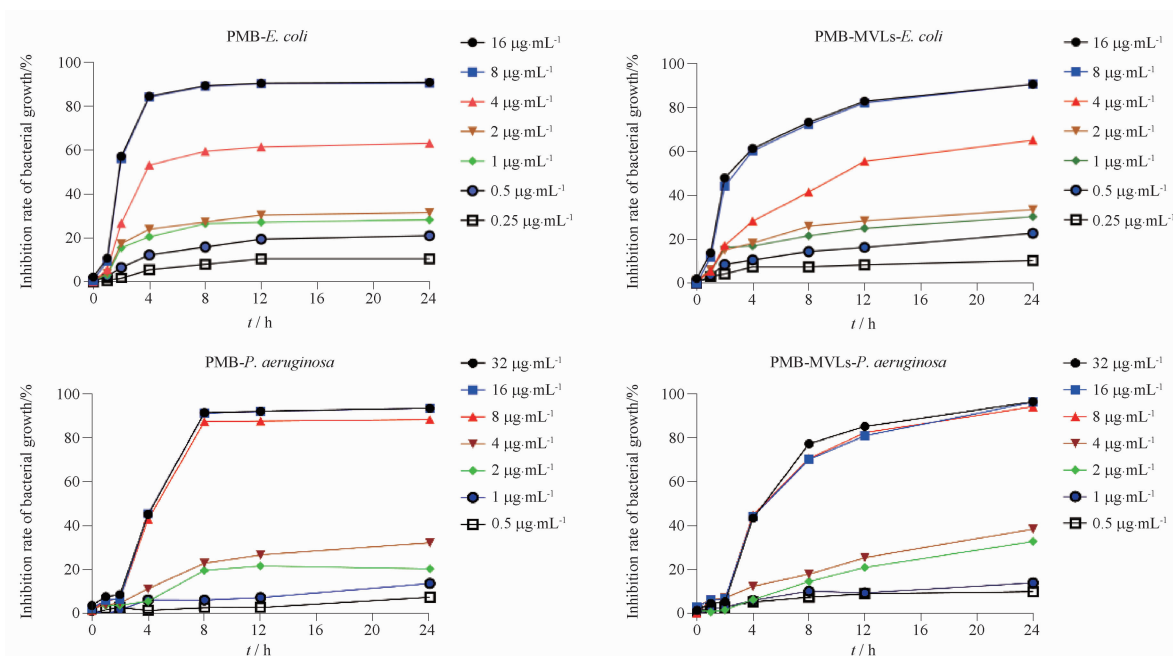


图 9 PMB 原料药组和 PMB-MVLs 制剂组细菌生长抑制率-时间的测定

Fig. 9 Determination of time-growth curve of Gram-negative bacteria

2.6 材料安全性考察

采用体外红细胞溶血实验考察多囊脂质体辅料安全性。取一定量的 PMB-MVLs 混悬液。按表 6 配比量依次加入 2% 红细胞混悬液、纯化水、生理盐水和 PMB-MVLs 于 7 支试管中,摇匀后置 37 °C 恒温水浴中连续观察 3 h,随后,将各试管中样品离心 (2 500 r · min⁻¹, 6 min) 后取上清液,采用紫外—可见分光光度计,在 541 nm 波长下测定各管样品的光密度,以添加纯化水为阳性对照组,生理盐水为阴性对照组,平行测定 3 次,根据公式 3 计算红细胞溶血率。

$$\text{红细胞溶血率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{药物组}} - \text{OD}_{\text{阴性对照组}}}{\text{OD}_{\text{阳性对照组}} - \text{OD}_{\text{阴性对照组}}} \times 100\%$$

公式(3)

其中,OD_{药物组}、OD_{阴性对照组}和 OD_{阳性对照组}分别添加各浓度 PMB-MVLs 药液组、阴性对照组和阳性对照组在 541 nm 波长下测得光密度值。

由表 6 和图 10 可知:各试管置于 37 °C 恒温孵育 3 h 后,PMB-MVLs 组和生理盐水组上层液体透明澄清,均无溶血及红细胞凝聚现象,而第 7 管阳性对照管内液体红色澄清,管底无红细胞残留,表明全部溶血。红细胞溶血率数据结果表明,当 PMB-MVLs 脂质体粒子质量浓度在 20 ~ 40 μg · mL⁻¹时,其红细胞溶血率为 0.92% ~ 0.25%,小于 2%,该结果与肉眼观察结果一致,表明 PMB-MVLs 在 3 h 内不发生溶血或凝聚,因此,PMB-MVLs 可以注射使用。

2.7 数据计算及统计分析

采用 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行统计学分析。所有数据结果均以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,经 *t*-检验或采用单因素方差分析,对所得数据进行统计学分析。其中, $P < 0.05$ 时,判定为有显著统计学差异, $P < 0.01$ 时,为有极显著性差异。

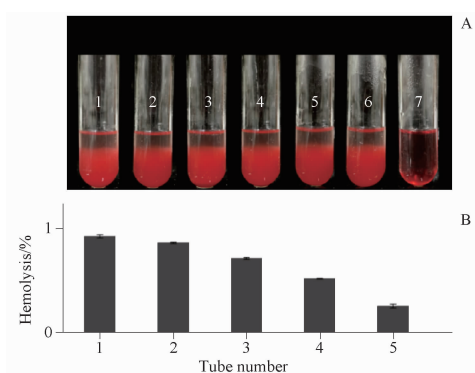
表 6 PMB-MVLs 溶血性实验结果

Tab. 6 The result of hemolytic experiment of PMB-MVLs

Item	Tube number						
	1	2	3	4	5	6	7
2% RBC suspension/mL	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Normal saline/mL	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	0
Purified water/mL	0	0	0	0	0	0	2.5
PMB-MVLs/mL	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0
0 h	-	-	-	-	-	-	++
1 h	-	-	-	-	-	-	++
3 h	-	-	-	-	-	-	++

注: --无溶血:红细胞全部下沉,上清液无色澄明; +-全部溶血:溶液呈澄明红色,管底无红细胞残留。

Note: --No hemolysis: All red blood cells sink, and the supernatant is colorless and clear; +-Complete hemolysis: The solution appears clear red with no residual red blood cells at the bottom of the tube.



编号 1~7 对应表 6 中试管编号及配比。

Numbers 1-7 correspond to the test tube numbers in Tab. 6.

图 10 不同浓度 PMB-MVLs 溶血情况观察图(A)及红细胞溶血率测定结果(B)。n=3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 10 PMB-MVLs at different concentrations(A) and hemolysis percentage determination results(B). n=3, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

抗生素耐药已成为全球面临的严重公共卫生挑战之一,多黏菌素 B 由于保留了对多重耐药性革兰阴性菌的抗菌活性,使其作为治疗革兰阴性菌的最后一道防线而再次被重视^[20-22]。本研究以模型药物 PMB 为研究对象,以 MVLs 作为载体材料,成功构建了一种 PMB-MVLs 新型给药系统。与普通脂质体相比,多囊脂质体生物相容性好^[23],稳定性高,能够在给药部位形成药物贮库,延长药物的释放时间^[24-25]。

本研究采用复乳法制备 PMB-MVLs,在参阅文献[13-15]的基础上,通过预实验和单因素筛选及 Box-Behnken 效应面法,对影响 PMB-MVLs 制备过程中重要的处方工艺因素进行优化,大大提高了 PMB-MVLs 的包封率。PMB 属于水溶性药物,普通脂质体对水溶性药物的包封率偏低^[26]。Kong 等^[27]

采用薄膜分散法和逆相蒸发法制备的硫酸多黏菌素 E 普通脂质体包封率仅为 34.12% 和 51.76%。而 MVLs 具有较大的水相包封容积,适合包封水溶性药物。本实验将 PMB 包封于 MVLs 中,将平均包封率提高至 69.52%,解决了 PMB 包封率偏低的问题,同时也为提高其他水溶性药物的包封率奠定了基础。

本实验通过体外释放实验验证, PMB-MVLs 体外持续释放达 72 h,无突释现象,具有良好的缓释效应。作为一种良好的缓释制剂,除了具有良好的缓释性能外,稳定性亦非常重要。本实验将以最佳处方和工艺制备的 PMB-MVLs 放置在 4 °C 冰箱中保存 1 个月,稳定性良好。但由于其平均粒径为 5.84 μm,粒径较大,制备和存储过程中容易发生自发聚集和沉降,在一定程度上影响了脂质体的稳定性^[28],因此,可采用真空冷冻干燥技术,将其制成 PMB-MVLs 冻干粉末,以进一步提高其稳定性。

本研究以 24 h 细菌生长抑制率为指标考察 PMB-MVLs 的体外抗菌活性,对比 PMB 原料药和 PMB-MVLs 制剂对 *E. coli* 和 *P. aeruginosa* 生长的抑制作用,结果发现低浓度时 PMB-MVLs 具有更好的抗菌效果,但并没有显著的提高;通过考察相同药物剂量下,不同时间点的 PMB 原料药和 PMB-MVLs 的细菌生长抑制率发现, PMB 原料药组的细菌生长抑制率随时间延长趋于平稳,而 PMB-MVLs 制剂组随时间延长抑制率逐渐增加, PMB-MVLs 在 24 h 达到与 PMB 原料药相同的抗菌效果。结合释放特性分析, PMB-MVLs 在 24 h 的累积释放率约为 65%,并未达到完全释放,说明 PMB-MVLs 具有更好的抗菌活性。通过红细

胞溶血性实验对 PMB-MVLs 制剂的安全性进行初步考察,结果表明在其抗菌活性范围内无溶血风险。

综上所述,本研究成功制备了具有缓释作用的 PMB-MVLs,与 PMB 原料药相比,PMB-MVLs 明显延长了药物的作用时间,增强了抗菌活性。因此,多囊脂质体作为抗生素的缓释给药体系值得进一步研究,对于减少给药次数、降低毒性、提高患者依从性具有潜在的应用前景。

REFERENCES

- [1] MOLINA J, CORDERO E, PACHÓN J. New information about the polymyxin /colistin class of antibiotics [J]. *Expert Opin Pharmacol*, 2009, 10(17): 2811-2828.
- [2] HORTON J, PANKEY G A. Polymyxin B, colistin and sodium colistimethate [J]. *Med Clin N Am*, 1982, 128(4): 874-875.
- [3] GALES A C, SEIFERT H, GUR D, *et al*. Antimicrobial susceptibility of complex and clinical isolates: Results from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2016) [J]. *Open Forum Infect Dis*, 2019, 6(1): S34-S46.
- [4] KASSAMALI Z, ROTSCHAFFER J C, JONES R N, *et al*. Polymyxins; wisdom does not always come with age [J]. *Clin Infect Dis*, 2013, 57(6): 877-883.
- [5] MYSORE P, RAMPRASAD A, ARJANG A A, *et al*. The sustained granulopoietic effect of Progenipoinetin encapsulated in multivesicular liposomes [J]. *Int J Pharm*, 2003, 261: 93-103.
- [6] GRIT M, DESMIDT J H. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersion [J]. *Int J Pharm*, 1989, 50: 1-6.
- [7] PATTNI B S, CHUPIN V V, TORCHILIN V P. New developments in liposomal drug delivery [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(19): 10938-10966.
- [8] GOMEZ A G, HOSSEINIDOUST Z. Liposomes for antibiotic encapsulation and delivery [J]. *ACS Infect Dis*, 2020, 6(5): 896-908.
- [9] HOWELL S B. Clinical applications of a novel sustained-release injectable drug delivery system; DepoFoam technology [J]. *Cancer J*, 2001, 7: 219-227.
- [10] NII T, TAKAMURA A, MOHRI K, *et al*. Factors affecting physicochemical properties of liposomes prepared with hydrogenated purified egg yolk lecithins by the microencapsulation vesicle method [J]. *Colloid Surface B*, 2003, 27(4): 323-332.
- [11] ROEHRBORN A A, HANSBROUGH J F, GUALDONI B, *et al*. Lipidbased slow-release formulation of amikacin sulfate reduces foreign body-associated infections in mice [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(8): 1752-1755.
- [12] YANG D M, XU Y Q, LI F B, *et al*. Preparation of cationic vancomycin hydrochloride multivesicular liposomes and its quality [J]. *Chin J Repar Reconstr Surg* (中国修复重建外科杂志), 2013, 27(4): 443-448.
- [13] YANG X M, WANG P, LI F Q. Preparation and quality evaluation of lidocaine hydrochloride multive sicular liposom [J]. *Pharm Care Res*(药学服务与研究), 2012, 12(1): 55-57.
- [14] ZHANG Y Y, HE L L, GU J, *et al*. Studies on preparation and in vitro release of berberine sulphate multivesicular liposomes [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2017, 28(7): 1631-1633.
- [15] JIAO Y H, SUN K X, MU H J, *et al*. Preparation of sustained release multivesicular liposome for thymopentin and preliminary study on its pharmacokinetics in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2008, 43(7): 756-760.
- [16] GE X J. Preparation and pharmacokinetics in rats of voriconazole long circulation liposomes [J]. *Chin Pharm* (中国药师), 2017, 20(5): 820-823.
- [17] TANG X H, MUNIRE K, JIAO M, *et al*. Preparation of Transferrin Modified Harmine Magnetoliposomes and Evaluation of Its Antitumor Effect [J]. *Chin Pharm J* (中国药杂志), 2018, 53(11): 900-905.
- [18] LEE K, YOON S S. Pseudomonas aeruginosa biofilm, a programmed bacterial life for fitness [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2017, 27(6): 1053-1064.
- [19] RABIN N, ZHENG Y, OPOKU-TEMENG C, *et al*. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(4): 493-512.
- [20] CHEN W, WANG W, MENG X, *et al*. Advances in Polymyxin B [J]. *Chin J Med* (中国医刊), 2022, 57(6): 608-612.
- [21] ZHANG R, SHEN Y, WALSH T R, *et al*. Use of polymyxins in Chinese hospitals [J]. *Lancet Infect Dis*, 2020, 20(10): 1125-1126.
- [22] MOHAPATRA S S, DWIBEDY S K, PADHY I. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions [J]. *J Biosci*, 2021, 46(3): 85.
- [23] DEHOOG H P M, NALLANI M, TOMCZAK N. Self-assembled architectures with multiple aqueous compartments [J]. *Soft Matter*, 2012, 8(17): 4552-4561.
- [24] ZHONG H, DENG Y, WANG X, *et al*. Multivesicular liposome formulation for the sustained delivery of breviscapine [J]. *Int J Pharm*, 2005, 301(1-2): 15-24.
- [25] ZENG H L, FU X D. Advances in the application of polycystic liposomes in drug delivery systems [J]. *J China Pharm* (中国药房), 2014, 25(37): 3526-3528.
- [26] KIM S, TURKER M S, CHI E Y, *et al*. Preparation of multivesicular liposomes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 728(3): 339-348.
- [27] KONG L W, WANG D K, WANG J, *et al*. Effect of different preparation methods on the encapsulation efficiency of polymyxin sulfate E liposomes [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2007, 24(12): 727-730.
- [28] ULRICH A S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles [J]. *Biosci Rep*, 2002, 22(2): 129-150.

(收稿日期:2024-01-19)