

羟基喜树碱脂质体冻干工艺

蒋桂秀¹, 奉建芳^{2*}, 蒋满州¹

(1. 广西壮都生物科技有限公司, 南宁 530001;

2. 上海中医药大学穆拉德中药现代化研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的: 探讨羟基喜树碱脂质体冻干工艺。方法: 以外观、粒径、再分散性和包封率为指标, 考察不同种类支架剂及其不同浓度对脂质体冻干剂的影响, 并优化冻干工艺参数。结果: 1.5% 甘露醇作为支架剂可较好阻止脂质体的聚集, 优化的冻干工艺为 -45 °C 预冻 10 h, -30 °C 保持 8 h, -10 °C 保持 6 h, 25 °C 保持 2 h。结论: 通过支架剂的筛选和优化冻干工艺参数可以获得稳定的脂质体。

[关键词] 长循环脂质体; 冷冻干燥

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0029-03

Freeze-drying of Hydrocamptothecin-loaded Liposomes

JIANG Gui-xiu¹, FENG Jian-fang^{2*}, JIANG Man-zhou¹

(1. Guangxi Zangto Biotechnology Co. Ltd. Nanning 530001, China;

2. Murad Research Center for Traditional Chinese Medicine (TCM) Modernization, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate freeze-drying technology of hydrocamptothecin-loaded liposomes (HCPT-lipo). **Method:** Effect of various types and concentrations of cryoprotectives on HCPT-lipo were investigated with appearance, particle size, disparity and encapsulation efficiency as indexes, and to optimize freeze-drying technology parameters. **Result:** 1.5% mannitol could prevent liposomes from aggregating better as cryoprotective, optimized process was as follows: precooled at -45 °C for 10 h, maintained at -30 °C for 8 h, maintained at -10 °C for 6 h, maintained at 25 °C for 2 h. **Conclusion:** Stable HCPT-lipo could be obtained by screening cryoprotectives and optimizing freeze-drying process parameters.

[Key words] long-circulating liposomes; freeze-drying

[收稿日期] 20111027(015)

[基金项目] 广西科技攻关项目(桂科攻 1099062-10)

[第一作者] 蒋桂秀, 硕士, 从事中药防治恶性肿瘤及相关动物实验模型建立的研究, Tel: 0771-3892791, E-mail: 281584804@qq.com

[通讯作者] * 奉建芳, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药新剂型与新制剂研究, Tel: 021-51322046, E-mail: fjf@shutcm.edu.cn

性, 试验筛选含乙醇体积质量分数分别 0, 10%, 20%, 30% 的生理盐水, 经 HPLC 测定, 确定含乙醇 30% 的生理盐水释放效果最好, 接收药物比较完全, 故选用为接收液。

[参考文献]

[1] 杨烨建, 柳益群, 张劲丰, 等. 黄连和五倍子对耐万古霉素肠球菌的体外抗菌活性[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(5): 819.

[2] 栗世婷. 鞣质药理活性的研究新进展[J]. 疾病监测与控制杂志, 2012, 4(7): 395.

[3] 周劲光. 五倍子的药理作用与临床研究进展[J]. 海峡药学, 2010, 22(4): 30.

[4] 毕良武, 吴在嵩, 陈筋鸿, 等. 单宁在抗爱滋病研究中的应用[J]. 林产化工通讯, 1998, 32(2): 11.

[5] 王平, 肖昌录, 袁训贤. 布洛芬缓释片的制备及其体外释放度考察[J]. 中国药房, 2011, 22(9): 829.

[责任编辑 全燕]

羟基喜树碱(hydrocamptothecin, HCPT)是从珙桐科植物喜树中提取得到的微量生物碱,抗癌谱广,且与其他常用抗肿瘤药无交叉耐药性,以喜树果实中含量最高^[1]。张力等^[3]研究表明,HCPT 的剂量限制性毒性(DLT)为骨髓抑制和腹泻。随剂量增加,上述 2 种不良反应的发生率和强度呈线性增加。其他不良反应主要包括恶心、呕吐、肝功能异常、血尿和皮疹。同时该药在体内的半衰期很短(0.0523~0.613 h),制成脂质体能更持久地延长药物在血流中的时间,保护药物不被血浆成分破坏。微粒给药系统经冻干后能保持其外观的相对稳定性,以期发挥较好的靶向作用^[3],但冻干剂制备过程受冻干保护剂、冻干工艺等因素影响较大。本文在 HCPT 脂质体(HCPT-lipo)制备的基础上,将 HCPT-lipo 制备成脂质体冻干剂,对冻干保护剂进行了筛选,并研究其冻干工艺,以期获得理想的脂质体冻干剂,保持 HCPT-lipo 的物理稳定性^[2]。

1 仪器与试药

AE240 型天平(上海精科天平),RW 20 DZM 型电动搅拌器(德国 IKA 公司),F25 型高剪切分散乳化机(德国布鲁克),Nicom 380 型纳米粒度分析仪(美国 PSS 公司),TDL-40B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),HP1100 型高效液相仪(美国 Agilent),H-600 型透射电镜(HITACHI),4K 型冷冻干燥仪(美国 VIRTIS 公司)。

羟基喜树碱(广西东兰制药厂,批号 20040811),注射用大豆磷脂(PC,上海太伟药业有限公司,批号 20060311),胆固醇(CHO,上海源聚生物科技有限公司,生化试剂 BR),无水乙醚、乙醇为分析纯,葡萄糖、乳糖、甘露醇(上海浦力膜药用辅料公司)。

2 方法与结果

2.1 HCPT-lipo 冻干剂处方与工艺研究

2.1.1 HCPT-lipo 制备工艺 分别取 PC, CHO, HCPT 375, 22.5, 20 mg, 热水浴中溶于无水乙醇中, 65 °C 减压旋转蒸发除去无水乙醇, 使溶质在瓶壁形成一层均匀的脂质薄膜, 适量乙醚使脂膜完全溶解, 加入适量 pH 6.8 磷酸盐缓冲液, 制成 O/W 乳剂(13 000 r·min⁻¹, 6 min), 于 35 °C 减压旋转蒸发至乙醚完全除去, 即得。

2.1.2 支架剂的选择 为保证冻干剂中固体物能保持原液体积, 不塌陷, 不皱缩, 再分散性良好, 并保证复溶后包封率和粒径仍保持一定水平, 需要加入适宜的支架剂。以冻干针剂的外观、粒径、再分散性

和包封率为指标, 分别考察以乳糖、甘露醇、山梨醇、葡萄糖、蔗糖为支架剂的用量比例。实验设计方案见表 1。按表中设计分别称取支架剂, 加入已制备的 HCPT-lipo 溶液 2 mL, 搅拌使完全溶解, 按常规冷冻干燥方法冷冻干燥, 得到各处方冻干品。分别取各处方冻干品, 观察外观后每瓶加 2 mL 纯水复溶, 记录再分散时间, 测定粒径和包封率, 结果见表 1。

表 1 羟基喜树碱脂质体支架剂种类及用量的初步筛选

支架剂种类 与用量	冻干剂外观	再分散 时间/s	平均粒径 /nm	包封率 /%
未加	严重萎缩	-	-	-
乳糖	1.5% 白色, 高度略塌陷	11.24	<50	68.0
	3.0% 白色, 高度略塌陷	11.22	<50	68.8
	6.0% 白色, 高度略塌陷	10.28	<50	80.4
甘露醇	1.5% 白色, 饱满	14.51	101.2	79.8
	3.0% 白色, 饱满	17.87	<50	75.5
	6.0% 白色, 饱满	28.43	<50	79.5
山梨醇	1.5% 淡黄, 底部略萎缩	10.22	122.1	64.1
	3.0% 淡黄, 底部略萎缩	9.28	<50	64.5
	6.0% 淡黄, 底部略萎缩	9.38	75.5	70.8
葡萄糖	1.5% 淡黄, 底部略萎缩	14.52	195.0	36.1
	3.0% 淡黄, 底部略萎缩	7.38	122.4	29.3
	6.0% 淡黄, 底部起泡	难以完全复溶	<50	-
蔗糖	1.5% 淡黄, 高度略塌陷	15.56	836.1	21.0
	3.0% 淡黄, 高度略塌陷	14.28	826.0	26.7
	6.0% 淡黄, 高度略塌陷	15.34	75.5	25.2

试验结果表明, 不同种类的支架剂对所得冻干品的外观、粒径和包封率的影响差别很大, 对再分散性影响不大, 最终选定甘露醇为支架剂, 用量为 1.5%。

2.1.3 冻干工艺的建立

2.1.3.1 降温曲线的建立 在冻干工艺中, 升温程序的设置是保证冻干品质量的一个重要因素, 其中第 1 步升温的温度设置应保证低于样品的最低共熔点, 以保证样品不发生溶化, 最低共熔点可通过降温曲线得出参考范围。将样品置冻干箱中, 记录板温和样品温度随时间的变化, 绘制降温曲线(图 1)。

由图 1 可知, 样品在 -9 °C 附近出现温度回升, 提示样品的最低共熔点区间为 -2 ~ -10 °C, 故第一阶段升温温度不宜超过 -10 °C。

2.1.3.2 冻干工艺的确定 在冻干工艺中, 另一重要因素为各升温阶段时间的长短, 时间过短, 样品中

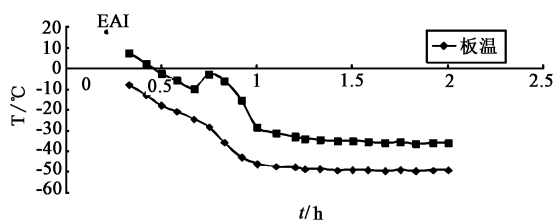


图1 羟基喜树碱脂质体冻干工艺冻干曲线

水分可能去除不完全;时间过长,可能浪费能源,本试验参考真空度数据确定各升温阶段时间,真空度基本不变表示水分已去除完全,最终确定工艺过程为 $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻10 h, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持8 h, $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持6 h, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持2 h,出箱,加塞,即得。

2.1.3.3 冻干前后的质量变化 按上述冻干工艺制备2批样品,测定冻干前后制剂的包封率分别为88.9%,79.1%;粒径分别为55.1,46.0 nm,并进行质量评价。试验结果显示,按按上法所示冻干工艺制备的HCPT-lipo冻干制剂,粒径在冻干前后基本无变化,包封率在冻干后较冻干前降低约10%,但仍在可接受范围内,说明此冻干工艺基本合理。

2.2 HCPT-lipo冻干针剂质量评价

2.2.1 外观 按确定的处方制备HCPT-lipo冻干针剂样品,2批肉眼观察为白色疏松块状物,表面细腻光洁,有一定的强度。

2.2.2 再分散性 取HCPT-lipo冻干针剂样品,加纯水2 mL,轻轻振摇,30 s内分散为均匀的淡黄色HCPT-lipo胶体溶液,表明该冻干针剂再分散性良好。

2.2.3 pH 取HCPT-lipo冻干针剂样品,加纯水分散后,测定pH为6.30。

2.2.4 干燥失重 依《中国药典》2005年版附录VIII L所示对HCPT-lipo冻干制剂测定干燥失重,取适量HCPT-lipo冻干样品置于预先于 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重的称量瓶内,精密称定,于 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥至恒重。由减失的质量和取样量计算干燥失重。平行操作2批样品,测得干燥失重分别为2.0%,1.9%。

3 讨论

本文研究了HCPT-lipo冻干针剂的制备工

艺^[4],包括支架剂的选择和冻干工艺的确定。并对冻干前后的样品粒径和包封率进行了比较,且对所得冻干针剂进行了质量检查^[5]。结果表明,所确定的冻干工艺合理且重复性佳,实现了试验设计的目的,即希望通过将所得HCPT-lipo胶体溶液进行冻干以提高稳定性的目的^[6]。

不同的支架剂种类及用量对所得冻干品的复溶时间基本无影响,可能与所得冻干品的疏松程度及表面活性剂的表面活性作用有关;不同支架剂种类对所得冻干品的粒径和包封率影响较大,可能与不同极性和构型的糖基与脂膜的作用有关。HCPT-lipo胶体溶液在冻干后较冻干前的包封率有约10%左右的降低,这与水份去除的过程中对脂膜的破坏有关,由于降低后的包封率仍在可接受的范围内,且多次重复冻干所得结果基本稳定,故选定此冻干工艺^[7]。

[参考文献]

- [1] 黄瑞松,胡秋萍,陈燕军,等.应用均匀设计法优化喜树果乙醇渗漉工艺条件[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(2):12.
- [2] 张力,李苏,廖海,等.羟基喜树碱I期药代动力学及人体耐受性临床研究[J].癌症,2001,20(12):1391.
- [3] 倪晨,赖春丽,王倩,等.氧化苦参碱微球冻干针剂器官靶向性研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(16):203.
- [4] 吴燕,何文,代文兵,等.羟基喜树碱包衣纳米脂质体的处方及制备工艺研究[J].中国药学杂志,2005,40(12):922.
- [5] 西娜,侯连兵,西传坡.羟基喜树碱半固体脂质纳米粒制备工艺研究[J].时珍国医国药,2009,20(1):127.
- [6] 付晓宁,栾立标.7-乙基-10-羟基喜树碱长循环脂质体的制备及药动学研究[J].中国新药杂志,2008(24):2132.
- [7] 李津明,张彦卓,朱宇.依托泊苷隐形脂质体的制备及其质量评价[J].中国医药工业杂志,2008,39(11):459.

[责任编辑 全燕]