

正交试验优化硫酸长春新碱脂质体的制备工艺

吴溪^{1,2}, 李文静¹, 杨志强^{2*}, 王杏林², 张雪冰^{1,2}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 制备性质稳定的硫酸长春新碱脂质体。方法 采用单因素试验考察磷脂与胆固醇比例、药脂比、脂质浓度、载药温度、载药时间、外水相 pH 值对硫酸长春新碱脂质体包封率的影响。以包封率为指标, 分别以氢化磷脂 (SPC-3) 和二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC) 为磷脂材料, 通过正交试验考察载药温度、药脂比和载药时间对制备工艺的影响, 优化出硫酸长春新碱脂质体的最佳制备工艺。结果 硫酸长春新碱脂质体的最佳制备工艺为: 将药物溶液 (按照药物含量计) 和空白脂质体溶液 (按照脂质含量计) 按照 1:20 的比例混合, 用 Na_2HPO_4 直接调节外水相 pH 值至 7.2。SPC-3 脂质体在 65 °C 条件下载药, 载药时间 30 min。DSPC 脂质体在 60 °C 条件下载药, 载药时间 10 min。结论 优选出的硫酸长春新碱脂质体的处方工艺稳定可行。

关键词: 硫酸长春新碱脂质体; 硫酸长春新碱; 制备; 正交试验

中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)06-0653-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.06.010

Optimization of preparation technology of Vincristine Sulfate Liposomes by orthogonal test

WU Xi^{1,2}, LI Wen-jing¹, YANG Zhi-qiang², WANG Xing-lin², ZHANG Xue-bing^{1,2}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To prepare stable Vincristine Sulfate Liposomes. **Methods** Single factor tests were used to investigate the effects of formulation and process factors, such as phospholipids and cholesterol ratio, drug fat ratio, fat concentration, drug loading temperature, drug loading time, and pH value of water external phase on the encapsulation efficiency of Vincristine Sulfate Liposomes. Then, the optimal preparation technology of Vincristine Sulfate Liposomes with SPC-3 and DSPC as phospholipid material was optimized by orthogonal test to investigate influence of drug loading temperature, drug fat ratio, and drug loading time to the preparation technology, taking encapsulation efficiency as index. **Results** The best formulation and process of Vincristine Sulfate Liposomes was as following: vincristine sulfate solution and blank liposome solution was mixed by the ratio of 1:20, and then Na_2HPO_4 was used to regulate the pH value of liposome external phase to 7.2. SPC-3 liposomes uptook drugs at 65 °C, and the drug loading time was 30 min. DSPC liposomes uptook drugs at 60 °C, and the drug loading time was 10 min. **Conclusion** The optimized preparation technology of Vincristine Sulfate Liposomes is stable and feasible.

Key words: Vincristine Sulfate Liposomes; vincristine sulfate; preparation; orthogonal test

长春碱类药物是以夹竹桃科植物长春花 *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don 的全草为原料, 经提取分离, 再经化学合成制得。长春新碱难溶于水, 因此在临床上以硫酸盐的形式给药, 即硫酸长

春新碱。迄今为止, 该类物质仍被认为是具有显著疗效的主要抗肿瘤药物之一^[1-2]。最新临床实践还证实, 硫酸长春新碱在治疗系统性红斑狼疮合并血小板减少性紫癜时可取得理想效果^[3]。目前, 临床给

收稿日期: 2015-02-26

基金项目: 国家重大新药创制项目 (2014ZX09507005-001)

作者简介: 吴溪 (1989—), 女, 硕士, 从事药物制剂研究。Tel: (022)23006876 E-mail: wuxi.wuxi@163.com

*通信作者 杨志强 (1978—), 男, 副研究员, 硕士, 从事药物制剂研究。Tel: (022)23006876 E-mail: yangzq@tjpr.com

药的主要剂型为硫酸长春新碱注射剂,然而累积剂量、超剂量应用、误行鞘内注射等因素都会给患者带来严重的神经毒性反应^[4],这在很大程度上限制了硫酸长春新碱应用于肿瘤的治疗。脂质体具有增强药物靶向性、提高疗效、延长半衰期、降低毒性等优点,并且脂质体的膜成分还具有生物可降解性和生物相容性等优点。因此将脂质体作为抗癌类药物载体在癌症的治疗中已经显示明显的优越性^[5]。将硫酸长春新碱制成脂质体,可延长药物循环时间,增加药物在病灶部位的浓度和作用时间,提高疗效,降低毒性^[6-7]。

目前在国外主要有3家公司进行硫酸长春新碱脂质体的研发^[8]。美国食品药品监督管理局(FDA)于2012年8月9日批准Talon Therapeutics公司和Tekmira公司联合研究的硫酸长春新碱脂质体注射剂用于费城染色体阴性成人急性淋巴细胞白血病的治疗^[9]。因此,在国内硫酸长春新碱脂质体的研发意义重大,但该项目的技术难度高,主要是如何筛选出包封足够稳定的脂质体处方,从而解决硫酸长春新碱极易从脂质体渗漏的问题。磷脂是脂质体的重要组成部分。磷脂的种类和比例不同都会对脂质体的物理和化学性质产生影响,进而影响药物疗效。研究发现,硫酸长春新碱脂质体的性质主要受到磷脂的种类、饱和度、分子链的长度、电荷等因素的影响。通常表现为:饱和磷脂相对于不饱和磷脂,饱和程度高的磷脂相对于饱和程度低的磷脂制备的硫酸长春新碱脂质体有更好的药物保留性质和体内循环时间;由结构稳定的磷脂制备的脂质体比较稳定,药物的保留性质优越^[8]。然而,目前国内文献报道的硫酸长春新碱脂质体制备多采用性质相对不稳定的磷脂材料,如氢化大豆卵磷脂^[5]、大豆卵磷脂^[10]。因此,本实验应用性质单一稳定的饱和磷脂SPC-3和DSPC分别为磷脂材料,以包封率为指标,对硫酸长春新碱脂质体制备过程中空白脂质体载药的处方工艺影响因素进行考察与优化,为后期的研发工作奠定实验基础。

1 材料

R-215型旋转蒸发仪(瑞士Buchi仪器有限公司),JEM100CXII型透射电子显微镜(日本电子公司),FE20精密pH计(瑞士Mettler-Toledo仪器公司),Zetasizer Nano ZS90电位粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司),AS 10200BT超声波清洗机(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),Liposofast LF50挤出

仪(加拿大Avestine公司),聚碳酸酯滤膜(美国Whatman公司),NS1001L高压匀质机(意大利GEA Niro Soavi公司),FJ200-S数显高速分散均质机(上海标本模型厂),透析袋(截留相对分子质量为12 000~14 000,美国生产)

硫酸长春新碱原料药(质量分数99.5%,批号20130189,广州汉方现代中药研究开发有限公司),氢化大豆磷脂酰胆碱(Lipoid SPC-3,静脉注射用,质量分数98%,德国Lipoid公司),二硬脂酰磷脂酰胆碱(Lipoid PC 18:0/18:0,即DSPC,静脉注射用,质量分数99%,德国Lipoid公司),胆固醇(质量分数99.2%,批号20130265,南京新百科药业有限公司),Triton-X 100(天津光复精细化工研究所),葡聚糖凝胶Sephadex G-50(美国Pharmacia公司)。

2 方法与结果

2.1 包封率的测定^[11]

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相甲醇-水-三乙胺(70:30:0.5,用磷酸调pH 7.0),检测波长297 nm,柱温40℃,体积流量1.2 mL/min,进样量20 μL。

2.1.2 对照品溶液的制备 取1.00 g/L硫酸长春新碱储备液0.5 mL,置250 mL量瓶内,加入10%的Triton-X 100溶液1.0 mL,去离子水定容,得2 mg/L硫酸长春新碱对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取0.15 mL硫酸长春新碱脂质体,置10 mL量瓶,加水适量,混匀后加入适量10%的Triton-X 100溶液,振摇破乳,去离子水定容,即得,用于计算总药量(m_{tot})。取0.5 mL载药脂质体,上样于阳离子交换树脂柱顶端,以水为洗脱介质。收集0~20 mL洗脱液,置25 mL量瓶,加入适量10%的Triton-X 100溶液,振摇破乳,去离子水定容,即得,用于计算脂质体部分的药物量(m_{lip})。

2.1.4 测定方法 取对照品溶液和供试品溶液进样,测定峰面积,计算供试品溶液中 m_{tot} 、脂质体部分的 m_{lip} 。根据包封率= $m_{\text{lip}}/m_{\text{tot}}$ 计算药物包封率。

2.2 粒径及粒度分布的测定

采用Zetasizer Nano粒度分析仪测量脂质体的粒径及粒度分布。其原理是使用动态光散射(DLS)技术监测样品中粒子的布朗运动,并根据已有理论对原始数据进行拟合得到粒子的粒径和分布。测得的粒径是和待测粒子扩散速度相同的球体的直径。

DLS 法测定范围宽,一定范围内,测定结果不受样品稀释倍数的影响,粒径分布不受粒子的组成和浓度的影响,结果重现性良好。PDI (polydispersity index, 多分散系数)是评价样品粒子分布宽度的参数,其数值越小表示样品粒子的粒度分布范围越窄,粒子均一性越好。

取少量待测硫酸长春新碱脂质体样品,去离子水稀释至样品有轻微浊度即可,放入样品池待测。仪器设置为以水为分散介质,25℃平衡2min,进行多次扫描后,得出结果。每个样品测定3次,计算平均值。

2.3 空白脂质体的制备

将处方量脂质溶解在适量乙醇中,于60℃加热30min,使脂质完全溶解,得醇相溶液。在持续涡旋中,将上述醇相溶液滴入于60℃保温的pH 4.0水相溶液中,形成多囊脂质体,于60℃再加热30min,充分水化。通过两张100nm聚碳酸酯膜挤出至粒径满足要求。用100倍体积的介质两次透析脂质体除掉乙醇,共透析24h,即得空白脂质体。

2.4 单因素试验考察硫酸长春新碱脂质体的处方与工艺

将空白脂质体加入到硫酸长春新碱溶液中,使用0.5mol/L Na₂HPO₄直接调节外水相pH值为7.2,在水浴条件下孵育,实现载药。以包封率为主要评价指标,进行单因素试验考察磷脂与胆固醇比例、药物与脂质比例(药脂比)、脂质浓度、载药温度、载药时间、外水相pH值对包封率的影响。

鉴于磷脂材料SPC-3、DSPC两者的理化性质十分接近,且处于经济角度的考虑,在单因素试验阶段,重点以SPC-3为考察对象。

2.4.1 磷脂与胆固醇比例对包封率的影响 胆固醇可以影响磷脂膜的相转变温度,对其起到“双相调节”的作用。在高于溶解温度时,加入胆固醇可以降低膜的流动性和通透性,在低于溶解温度时,加入胆固醇可以提高膜的流动性和通透性。因此,胆固醇能够起到使磷脂双分子层稳定的作用,这对于脂质体的包封率及稳定性有一定影响。实验中磷脂与胆固醇的比例选取为5:1、5:2、5:3、5:4,载药后测定脂质体包封率分别为89%、94%、86%、78%。结果显示,在实验考察范围内,磷脂与胆固醇比例对于硫酸长春新碱脂质体包封率有影响,选择最佳比例为5:2。

2.4.2 药脂比对包封率的影响 考察了药脂比为

1:3、1:5、1:10、1:20、1:30时脂质体的包封率,结果分别为65%、76%、89%、98%、96%。数据表明,药脂比对于包封率的影响较大,在一定范围内,药脂比减少,即磷脂含量的增大,包封率显著提高。选择最佳比例为1:20。

2.4.3 载药温度对包封率的影响 空白脂质体与药物在一定温度下一同孵育的过程,即药物的载入过程。此过程既需要有脂质体内外水相的pH值梯度差作为药物由外入内跨膜的动力,也需要有一定的温度使脂质膜的流动性和通透性提升,能量壁垒降低,确保药物顺利进入脂质体内。实验考察了孵育温度对包封率的影响,温度分别为45、50、55、60、65℃,包封率分别为60%、87%、90%、98%、97%。结果显示,包封率随着温度的升高而增加,孵育温度需保持在磷脂相变温度之上。因此,最佳载药温度可控制在60~65℃。

2.4.4 载药时间对包封率的影响 药物的载入并非瞬间完成,是一个相对持续的过程。载药时间短,药物不能充分进入脂质体内部,载药时间长则可能会影响药物和脂质膜的稳定性,进而影响包封率。实验中载药时间分别为10、20、30、40、50min,包封率分别为94%、96%、99%、91%、90%。结果显示,孵育时间不可过长,因此选择最佳载药时间为30min。

2.4.5 pH值梯度对包封率的影响 载药过程中,内水相为pH 4.0的枸橼酸缓冲液,外水相使用Na₂HPO₄调节pH值至中性或碱性。实验考察了不同外水相pH值对包封率的影响,pH值分别为6.8、7.0、7.2、7.4、7.6时,包封率分别为86%、90%、98%、97%、97%。结果显示,当外水相pH值>7.0时,脂质体包封率较高,且差异不明显。当pH值梯度差较小时,药物没有足够的驱动力进入脂质体内。外水相的pH值太高或太低时,脂质体的稳定性都不好。因此选择外水相pH值调节至7.2较合适。

2.5 正交试验考察硫酸长春新碱脂质体的处方与工艺

通过上述单因素试验考察结果,分别以SPC-3和DSPC为磷脂材料,选取对脂质体包封率影响较大的因素,即载药温度(A)、药脂比(B)和载药时间(C),每个因素取3个水平,以包封率为评价指标,进行正交试验优化处方工艺。

2.5.1 SPC-3制备硫酸长春新碱脂质体的处方工艺优化 以SPC-3为磷脂材料,按L₉(3⁴)正交试验表

安排试验,优化处方工艺。因素水平安排见表1,试验设计见表2。结果表明,各因素对于包封率的影响程度依次为 $B>A>C$,即在实验设计所选范围内,药脂比对于包封率的影响最大。载药时间次之,载药温度的影响最小。最优组合为 $A_2B_3C_3$,即载药温度 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、药脂比 $1:20$ 、载药时间 30 min 。

表1 硫酸长春新碱SPC-3脂质体处方工艺优化因素与水平
Table 1 Factors and levels of formulation process optimization of vincristine sulfate SPC-3 liposomes

水平	因素		
	A/ $^{\circ}\text{C}$	B	C/min
1	60	1:5	10
2	65	1:10	20
3	55	1:20	30

表2 硫酸长春新碱SPC-3脂质体处方工艺优化正交试验设计和结果

Table 2 Design and results of orthogonal test of formulation process optimization of vincristine sulfate SPC-3 liposomes

编号	A	B	C	空白	包封率/%
1	1	1	1	1	80.72
2	1	2	2	2	93.56
3	1	3	3	3	99.00
4	2	1	2	3	90.60
5	2	2	3	1	94.18
6	2	3	1	2	96.23
7	3	1	3	2	84.59
8	3	2	1	3	95.25
9	3	3	2	1	93.44
K_1	91.093	85.303	90.733	89.447	
K_2	93.670	94.330	92.533	91.460	
K_3	91.093	96.223	92.590	94.950	
R	2.577	10.920	1.857	5.503	

2.5.2 DSPC 制备硫酸长春新碱脂质体的处方工艺优化 以 DSPC 为磷脂材料,按 $L_9(3^4)$ 正交试验表安排试验,优化处方工艺。因素水平安排见表3,试验设计见表4。结果表明,各因素对于包封率的影响程度依次为 $B>A>C$,即在实验设计所选范围内,药脂比对于包封率的影响最大,载药温度次之,载药时间的影响最小。最优组合为 $A_1B_3C_1$,即载药温度 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、药脂比 $1:20$ 、载药时间 10 min 。

表3 硫酸长春新碱DSPC脂质体处方工艺优化因素与水平
Table 3 Factors and levels of formulation process optimization of vincristine sulfate DSPC

水平	因素		
	A/ $^{\circ}\text{C}$	B	C/min
1	60	1:5	10
2	65	1:10	20
3	55	1:20	30

表4 硫酸长春新碱DSPC脂质体处方工艺优化正交试验设计和结果

Table 4 Design and results of orthogonal test of formulation process optimization of vincristine sulfate DSPC liposomes

编号	A	B	C	空白	包封率/%
1	1	1	1	1	82.00
2	1	2	2	2	95.23
3	1	3	3	3	98.06
4	2	1	2	3	85.89
5	2	2	3	1	85.40
6	2	3	1	2	89.51
7	3	1	3	2	82.00
8	3	2	1	3	89.80
9	3	3	2	1	93.94
K_1	91.763	82.297	97.100	87.113	
K_2	86.930	90.143	91.687	88.910	
K_3	88.580	93.833	88.487	91.250	
R	4.833	10.536	4.587	4.137	

2.6 验证试验

将硫酸长春新碱溶液(按照药物含量计)和空白脂质体溶液(按照脂质含量计)以 $1:20$ 混合,再用 Na_2HPO_4 直接调节外水相pH值为7.2。SPC-3脂质体在 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下载药,载药时间 30 min 。DSPC脂质体在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下载药,载药时间 10 min 。两个处方各制备3批脂质体。结果见表5。

3 讨论

磷脂是脂质体的重要组成部分,按照其来源可分为天然磷脂和合成磷脂。天然磷脂是混合物,成分复杂,且含有多元不饱和键,容易被氧化。将天然磷脂经过结构修饰,可以得到组成相对单一的合成磷脂。合成磷脂性质更加稳定,形成的脂质体更容易控制颗粒大小,更加稳定,如经过催化氢化得到的饱和合成磷脂(如SPC-3、DSPC等)。有研究

表5 硫酸长春新碱脂质体最佳处方工艺验证实验
Table 5 Validation experiments of optimal formulation process of Vincristine Sulfate Liposomes

脂质体	批号	包封率/%	粒径/nm	PDI
SPC-3	1112	97.6	119.6	0.056
	1113	99.5	120.5	0.072
	1114	98.4	120.2	0.053
DSPC	1205	95.3	120.6	0.055
	1206	96.5	118.7	0.023
	1207	95.1	117.2	0.058

表明,使用饱和磷脂可以减慢硫酸长春新碱的释放速率。因此实验中选用 SPC-3/Chol、DSPC/Chol 作为脂质膜材,使硫酸长春新碱从脂质体中的释放减慢,有更好的保留特性。并且合成磷脂的成分明确,利于今后对硫酸长春新碱脂质体进行体内评价。

实验发现,药脂比是影响硫酸长春新碱脂质体包封率的主要因素。药脂比越小(当药物含量一定时,脂质含量越高时),药物的包封率越高。可见,脂质膜材的比例会影响到药物的包封率。但是减小药脂比,脂质体载药量也将减小,并且药脂比对于脂质体在体内外的释药特性也有影响。因此,选择合适的药脂比需要综合考虑各种因素。

通常情况下,载药温度低,脂质膜流动性差,药物不易载入;载药温度高,会影响脂质双分子层膜的稳定性。载药时间短,药物没有完全进入脂质体内;载药时间长,药物易渗漏。在本实验的考察范围内,载药温度和载药时间对于包封率的影响并不明显。可能是由于氢化磷脂稳定性较好,在考察范围内脂质体没有受到影响。或仅仅测定包封率不能全面评价脂质体的稳定性,或最佳载药时间和温

度是一个区间范围,不是一个固定数值。

参考文献

- [1] 祖元刚,罗 猛,牟璠松,等. 长春花生物碱成分及其药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(2): 325-329.
- [2] 娄 楠,王 洋,刘国雄,等. 长春新碱对人骨肉瘤细胞的效应及其作用机制研究 [J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(6): 890-892.
- [3] 杨晓珊. 用长春新碱治疗系统性红斑狼疮合并血小板减少性紫癜的疗效观察 [J]. 当代医药论丛, 2014, 12(7): 15-17.
- [4] 王 晓,曾纪权,陈黎丽. 长春新碱常规剂量化疗引起严重神经毒性反应 1 例临床报告 [J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(1): 121.
- [5] 赵 妍. 硫酸长春新碱脂质体的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [6] Gelmon K A, Tolcher A, Diab A R, *et al.* Phase I study of liposomal vincristine [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(2): 697-705.
- [7] 王奇巍,杨国红,林梦感,等. 长春新碱新型给药系统的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 154-156.
- [8] 李文静,杨志强,王杏林. 硫酸长春新碱脂质体研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(13): 1479-1484.
- [9] Silverman J A, Deitcher S R. Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(3): 555-564.
- [10] 陈 彤,侯世祥,王永炎,等. pH 梯度法制备抗癌复方硫酸长春新碱脂质体 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(8): 678-681.
- [11] 李文静,杨志强,王杏林. 两种硫酸长春新碱脂质体包封率测定方法的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14):71-75.