

不同冻干保护剂对硼替佐米冻干粉针的影响研究

刘继馨¹, 王秀丽¹, 彭琛², 徐焕焕¹, 吴浩忠¹, 马小虹¹

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102

2. 默克化工技术(上海)有限公司, 上海 201203

摘要: **目的** 研究 Emprove 低内毒素蔗糖、Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸 3 种不同类型冻干保护剂对硼替佐米冻干粉针性能的影响。**方法** 以硼替佐米冻干粉针和空白冻干粉针的外观和复溶效果为指标, 考察预冻时间、冻干保护剂用量、冻干时间、叔丁醇体积分数的影响。比较了硼替佐米冻干粉针和空白冻干粉针的含水量、pH 值和硼替佐米的质量分数。**结果** 3 种冻干保护剂均能在适宜条件下制备硼替佐米冻干粉针, 以 Emprove 低内毒素蔗糖为冻干保护剂, 预冻时间 24 h, 用量 15%, 冻干时间 15 h, 叔丁醇体积分数 40%; 以 Emprove 低内毒素甘露醇为冻干保护剂, 预冻时间 6 h, 用量 4%, 冻干时间 6 h, 叔丁醇体积分数 40%; 以 Emprove 低内毒素甘氨酸为冻干保护剂, 预冻时间 6 h, 用量 4%, 冻干时间 6 h, 叔丁醇体积分数 20%; 所得产品饱满、平整, 完全复溶。冻干后含水量 < 5%, pH 值和硼替佐米的质量分数变化不显著。**结论** Emprove 低内毒素蔗糖、Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸均适合用作硼替佐米冻干粉针剂制备的冻干保护剂, 实验为难溶性药物冻干制剂的制备提供了参考。

关键词: 硼替佐米冻干粉针; 冻干保护剂; Emprove 低内毒素蔗糖; Emprove 低内毒素甘露醇; Emprove 低内毒素甘氨酸; 冷冻干燥

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2015)07-0790-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.07.008

Effects of freeze-drying powder protective agents on Bortezomib Freeze-dried Powder

LIU Ji-xin¹, WANG Xiu-li¹, PENG Jason², XU Huan-huan¹, WU Hao-zhong¹, MA Xiao-hong¹

1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

2. Merck Chemicals (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To study the effects of three types of freeze-drying powder protective agents (Emprove low endotoxin sucrose, Emprove low endotoxin mannitol, and Emprove low endotoxin glycine) on properties of Bortezomib Freeze-dried Powder. **Methods** Appearance and re-dissolving performance of Bortezomib Freeze-dried Powder and its blank were used as indexes, and time of pre-freezing, dosage of lyoprotectants, time of freeze-drying, and tert-butyl alcohol concentration were studied. At the same time, moisture content, pH value, and change of bortezomib content were determined. **Results** All the three freeze-drying powder protective agents could be used as lyoprotectants for Bortezomib Freeze-dried Powder in suitable conditions. The optimal conditions were as following: Emprove low endotoxin sucrose was used as freeze-drying powder protective agent, time of pre-freezing was 24 h, dosage of lyoprotectants was 15%, time of freeze-drying was 15 h, and tert-butyl alcohol concentration was 40%; Emprove low endotoxin mannitol was used as freeze-drying powder protective agent, time of pre-freezing was 6 h, dosage of lyoprotectants was 4%, time of freeze-drying was 6 h, and tert-butyl alcohol concentration was 40%; Emprove low endotoxin glycine was used as freeze-drying powder protective agent, time of pre-freezing was 6 h, dosage of lyoprotectants was 4%, time of freeze-drying was 6 h, and tert-butyl alcohol concentration was 20%. The products were full, smooth, and complete re-dissolving performance. There were no significant changes of pH value, and bortezomib content, and moisture content was below 5% after freeze-drying. **Conclusion** Emprove low endotoxin sucrose, Emprove low endotoxin mannitol, and Emprove low endotoxin glycine are all suitable for the preparation of Bortezomib Freeze-dried Powder, which can provide references on freeze-drying preparation of insoluble drugs.

Key words: Bortezomib Freeze-dried Powder; freeze-drying powder protective agent; Emprove low endotoxin sucrose; Emprove low endotoxin mannitol; Emprove low endotoxin glycine; freeze-drying

收稿日期: 2015-02-26

作者简介: 刘继馨, 女, 北京中医药大学中药学院本科生。

*通信作者 王秀丽 (1978—), 女, 博士, 副研究员, 从事药物制剂研究。Tel: (010)84738657 E-mail: lnwangxiuli@163.com

利用有机溶剂或有机溶剂-水共溶剂能够溶解难溶或不溶于水的物料、增强溶液或冻干品的稳定性等特点,解决难溶性、热敏性药物的保存问题,近年来得到了发展^[1-2]。其中冻干保护剂的选择是影响冻干质量的重要因素,但是相应的冻干保护剂基础研究还不够充分,如不同冻干保护剂在有机溶剂-水共溶剂制备冻干剂时的特性如何、比较优化的冻干条件如何等均少有报道。而冻干保护剂用量过少、冻干时间过短影响冻干效果,用量过多、时间过长浪费能耗等问题在冻干制备过程中是无法避免的。本实验以硼替佐米为模型药物,考察 Emprove 低内毒素蔗糖、Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸 3 种不同类型常用冻干保护剂的相关性能,以期以硼替佐米冻干制剂的制备提供研究数据,为难溶性药物冻干制剂的制备提供参考。

1 材料

BSI10S 型万分之一电子分析天平、P8-10 型 pH 酸度计(北京赛多利斯仪器系统有限公司);DW-86L626 型超低温保存箱(青岛海尔特种电器有限公司);LGJ-12 型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)(有两台);FD-1C-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);Lyo-0.4 型真空冷冻干燥机(上海东富龙科技有限公司);HCT 型微机差热天平(北京恒久科学仪器厂);Waters 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Agilent 6890N 气相色谱仪,配有 7694E 顶空进样器,FID 检测器。

Emprove 低内毒素蔗糖(批号 K43921892)、Emprove 低内毒素甘露醇(批号 M759903247)、Emprove 低内毒素甘氨酸(批号 VP559490329)、注射级叔丁醇(批号 DC4DF64301)、硼替佐米(质量分数 99%,批号 M164514)均由默克化工技术(上海)有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 冻干粉针的制备

2.1.1 硼替佐米冻干粉针的制备 按照处方量精密称取硼替佐米 10 mg 以及 Emprove 低内毒素蔗糖、Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸 3 种冻干保护剂适量,用不同体积分数叔丁醇水溶液溶解,定容至 10 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,分装于 1 mL 西林瓶中,0.4 mL/瓶,1 mg/mL。-80℃低温预冻后放入冻干机中干燥。

2.1.2 空白冻干粉针的制备 按照处方量精密称取 Emprove 低内毒素蔗糖、Emprove 低内毒素甘露醇、

Emprove 低内毒素甘氨酸适量,用不同体积分数叔丁醇水溶液溶解,定容至 10 mL,0.45 μm 微孔滤膜滤过,分装于 1 mL 西林瓶中,0.4 mL/瓶,1 mg/mL。-80℃低温预冻后放入冻干机中干燥。

2.1.3 冻干粉针的外观和复溶效果 硼替佐米冻干粉针和空白冻干粉针预冻时间 15 h,冻干时间 15 h,叔丁醇体积分数 40%,冻干保护剂用量 15%,比较冻干效果,结果见表 1。Emprove 低内毒素甘氨酸作为保护剂制备的硼替佐米冻干粉针和空白粉针均出现塌陷、质地疏松;Emprove 低内毒素甘露醇作为保护剂制备的冻干粉针外观饱满平整;Emprove 低内毒素蔗糖作为保护剂制备的冻干粉针外观较为饱满、偶有裂隙。各冻干粉针均复溶迅速、完全。

表 1 不同种类冻干保护剂制备的冻干粉针的外观比较
Table 1 Appearance comparison on lyophilized powder prepared with various freeze-drying powder protective agents

保护剂	外观	
	硼替佐米冻干粉针	空白冻干粉针
Emprove 低内毒素蔗糖	饱满,复溶迅速、完全	饱满,复溶迅速、完全
Emprove 低内毒素甘露醇	饱满、平整,复溶迅速、完全	饱满、平整,复溶迅速、完全
Emprove 低内毒素甘氨酸	有裂隙,复溶迅速、完全	有裂隙,复溶迅速、完全

2.2 预冻时间的考察

取硼替佐米冻干粉针和空白冻干粉针,冻干时间 15 h,叔丁醇体积分数 40%,冻干保护剂用量 15%,考察不同冻干保护剂适用的最短预冻时间,结果见表 2。依据节能降耗的原则,在取得同样效果的前提下,选择预冻时间为 Emprove 低内毒素蔗糖 24 h,Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸均为 6 h。

2.3 冻干保护剂用量考察

取硼替佐米冻干粉针和空白冻干粉针,预冻时间为 Emprove 低内毒素蔗糖 24 h,Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸均为 6 h,冻干时间 15 h,叔丁醇体积分数 40%,考察不同冻干保护剂的适用的最少用量,结果见表 3。依据节能降耗原则,在取得同样效果前提下,选择 Emprove 低内毒素蔗糖 15%,Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸均为 4%。

表2 预冻时间对不同冻干保护剂制备的冻干粉针外观影响
Table 2 Effects of pre-freezing time on appearance of products prepared with various freeze-drying powder protective agents

保护剂	预冻时间/h	外观	
		硼替佐米冻干粉针	空白冻干粉针
Emprove 低内毒素甘露醇	6	饱满、平整	饱满、平整
	9	饱满、平整	饱满、平整
	12	饱满、平整	饱满、平整
Emprove 低内毒素甘氨酸	6	有裂隙	有裂隙
	9	有裂隙	有裂隙
	12	有裂隙	有裂隙
Emprove 低内毒素蔗糖	12	塌陷	塌陷
	24	饱满	饱满
	48	饱满	饱满

表3 冻干保护剂用量对不同冻干保护剂制备的冻干粉针外观的影响
Table 3 Effects of lyoprotectant dosage on appearance of products prepared with various freeze-drying powder protective agents

保护剂	用量/%	外观	
		硼替佐米冻干粉针	空白冻干粉针
Emprove 低内毒素甘露醇	4	饱满、平整	饱满、平整
	6	饱满、平整	饱满、平整
	8	饱满、平整	饱满、平整
Emprove 低内毒素甘氨酸	4	疏松	疏松
	6	疏松	疏松
	8	有裂隙	有裂隙
Emprove 低内毒素蔗糖	10	塌陷	塌陷
	15	饱满	饱满
	20	饱满	饱满

2.4 冻干时间的考察

取硼替佐米冻干粉针和空白冻干粉针, 预冻时间为 Emprove 低内毒素蔗糖 24 h, Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸均为 6 h, 冻干保护剂的用量 Emprove 低内毒素蔗糖 15%, Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸均为 4%, 考察不同冻干保护剂的适用的最短冻干时间, 结果见表 4。依据节约辅料的原则, 在取得同样效果的前提下, 选择 Emprove 低内毒素蔗糖 15 h, Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸均为 6 h。

表4 冻干时间对不同冻干保护剂制备的冻干粉针外观的影响
Table 4 Effects of freeze-drying time on appearance of products prepared with various freeze-drying powder protective agents

保护剂	冻干时间/h	外观	
		硼替佐米冻干粉针	空白冻干粉针
Emprove 低内毒素甘露醇	6	饱满、平整	饱满、平整
	9	饱满、平整	饱满、平整
	12	饱满、平整	饱满、平整
Emprove 低内毒素甘氨酸	6	疏松	疏松
	9	疏松	疏松
	12	疏松	疏松
Emprove 低内毒素蔗糖	6	放置后塌陷	放置后塌陷
	10	放置后塌陷	放置后塌陷
	15	饱满	饱满

2.5 叔丁醇体积分数的考察

取硼替佐米冻干粉针和空白冻干粉针, 预冻时间为 Emprove 低内毒素蔗糖 24 h, Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸均为 6 h, 冻干保护剂的用量 Emprove 低内毒素蔗糖 15%, Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸均为 4%, 冻干时间 Emprove 低内毒素蔗糖 15 h, Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸均为 6 h, 考察叔丁醇体积分数对冻干的影响, 结果见表 5。依据节能降耗的原则, 在取得同样效果的前提下, 选择使用 Emprove 低内毒素蔗糖、Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸时, 叔丁醇体积分数分别为 40%、40%、20%。

2.6 验证试验

依据单因素试验结果, 确定最优条件, 进行 3 次验证实验, 结果见表 6。除 Emprove 低内毒素甘氨酸略有裂隙稍显疏松外, 所得冻干粉针均外观饱满、平整; 同时所有冻干粉针剂均能迅速完全复溶。

2.7 含水量的测定

取适量样品减重法称量, 加入 30C 库仑法卡尔费休水分仪中, 输入样品编号和质量后进行测定, 结果见表 7。3 种冻干保护剂制备的硼替佐米冻干粉针和空白冻干粉针的含水量均 < 5%。

2.8 pH 值的测定

取冻干前硼替佐米和冻干保护剂溶液 2 mL, 用 pH 计测定 pH 值。取冻干粉针样品, 以冻干前相同体积的水复溶后, 取 2 mL 用 pH 计测定 pH 值。结果见表 8。3 种冻干保护剂制备的硼替佐米冻干粉针和空白冻干粉针的 pH 值均无显著变化。

表 5 叔丁醇体积分数对不同冻干保护剂制备的冻干粉针外观的影响

Table 5 Effects of tert-butyl alcohol concentration on appearance of lyophilized powder prepared with various lyoprotectants

保护剂	叔丁醇/%	外观	
		硼替佐米冻干粉针	空白冻干粉针
Emprove 低内毒素甘露醇	20	饱满、平整	饱满、平整
	30	饱满、平整	饱满、平整
	40	饱满、平整	饱满、平整
Emprove 低内毒素甘氨酸	20	疏松	疏松
	30	疏松	疏松
	40	疏松	疏松
Emprove 低内毒素蔗糖	20	塌陷	塌陷
	30	塌陷	塌陷
	40	饱满	饱满

表 6 验证试验结果 (n=3)

Table 6 Results of verified test (n=3)

保护剂	预冻时间/h	保护剂用量/%	冻干时间/h	叔丁醇体积分数/%	外观和复溶情况
Emprove 低内毒素蔗糖	24	15	15	40	饱满、平整，完全复溶
Emprove 低内毒素甘露醇	6	4	6	40	饱满、平整，完全复溶
Emprove 低内毒素甘氨酸	6	4	6	20	饱满、平整，稍显疏松，完全复溶

表 7 冻干粉针中含水量的测定

Table 7 Moisture of lyophilized powder

保护剂	含水量/%	
	硼替佐米冻干粉针	空白冻干粉针
Emprove 低内毒素蔗糖	3.37	3.12
Emprove 低内毒素甘露醇	0.73	0.40
Emprove 低内毒素甘氨酸	1.42	0.71

表 8 冻干粉针的 pH 值

Table 8 pH value of lyophilized powder

保护剂	硼替佐米冻干粉针 pH 值		空白冻干粉针 pH 值	
	冻干前	冻干后	冻干前	冻干后
Emprove 低内毒素蔗糖	6.19	7.13	6.32	7.12
Emprove 低内毒素甘露醇	5.48	6.01	6.36	6.33
Emprove 低内毒素甘氨酸	5.94	6.16	5.93	5.93

2.9 硼替佐米冻干粉针中硼替佐米的测定

2.9.1 检测波长的选择 取硼替佐米对照品溶液在 200~400 nm 进行吸光度扫描,测定硼替佐米在 40%叔丁醇中的吸收曲线。结果硼替佐米最大吸收在 269 nm,因此最终选择 269 nm 为检测波长。见图 1。

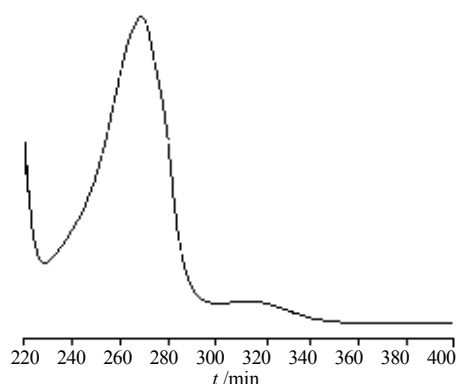


图 1 硼替佐米紫外吸收曲线

Fig. 1 UV absorption curve of bortezomib

2.9.2 色谱条件 Acquity BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液 (55:45); 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 1 μL; 样品室温度 30 ℃; 柱温 30 ℃; 检测波长 269 nm。

2.9.3 对照品溶液的制备 精密称定硼替佐米对照品 4.03 mg, 置 10 mL 量瓶中, 40%叔丁醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.9.4 供试品溶液的制备 取硼替佐米冻干粉针剂 1 瓶, 40%叔丁醇溶解并转移至 10 mL 量瓶中, 40%叔丁醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.9.5 系统适用性试验 分别取空白冻干粉针剂、硼替佐米对照品、硼替佐米冻干粉针剂供试品溶液, 进样测定, 并记录色谱图, 见图 2。结果表明硼替佐米理论板数、分离度、拖尾因子均符合要求。

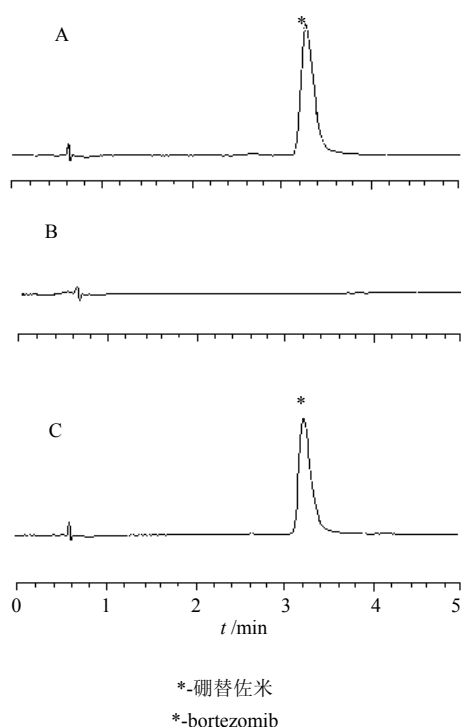


图2 硼替佐米对照品(A)、空白冻干粉针混合物(B)和硼替佐米冻干粉针混合物(C)的UPLC色谱图

Fig. 2 UPLC chromatograms of bortezomib reference substance (A), mixed blank lyophilized powder (B), and mixed Bortezomib Freeze-dried Powder (C)

2.9.6 线性关系考察 分别精密移取硼替佐米对照品溶液 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8 mL, 置 10 mL 量瓶中, 40%叔丁醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 12、24、36、48、60、72 $\mu\text{g/mL}$ 系列对照品溶液。进样测定。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y=7\,489.0\,X+3\,667.3$, $R^2=0.999\,5$, 结果表明硼替佐米在 12~72 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积线性关系良好。

2.9.7 精密度试验 取 40.3 $\mu\text{g/mL}$ 硼替佐米对照品

溶液连续进样 6 次, 测定峰面积值, 计算得其 RSD 值为 0.29%。

2.9.8 重复性试验 取以 Emprove 低内毒素甘露醇为保护剂制备的硼替佐米冻干粉针剂 6 瓶, 40%叔丁醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 进样测定硼替佐米峰面积, 计算其质量分数, 结果 RSD 值为 1.6%。

2.9.9 加样回收率试验 平行精密称定以 Emprove 低内毒素甘露醇为保护剂制备的硼替佐米冻干粉针剂 6 份, 每份 8 mg, 加入 0.403 mg/mL 硼替佐米对照品溶液 0.2 mL, 40%叔丁醇溶解并稀释至刻度, 进样测定, 计算得回收率为 99.1%, RSD 值为 1.6%。

2.9.10 样品测定 取以各冻干保护剂制备的硼替佐米冻干粉针剂样品, 制备供试品溶液。测定冻干前和冻干后中硼替佐米的质量分数, 结果见表 9。3 种冻干保护剂制备的硼替佐米冻干粉针中硼替佐米的质量分数均无显著变化。

表9 硼替佐米冻干粉针剂中硼替佐米的测定结果

Table 9 Determination of bortezomib in Bortezomib Freeze-dried Powder

样品	硼替佐米/(mg·支 ⁻¹)	
	冻干前	冻干后
Emprove 低内毒素蔗糖	0.343	0.355
Emprove 低内毒素甘露醇	0.365	0.356
Emprove 低内毒素甘氨酸	0.339	0.338

3 讨论

本实验选择了 3 种冻干保护剂进行比较研究, 均能在适宜条件下制备粉针剂, 并确定了 3 种保护剂制备冻干粉针的较佳冻干条件。3 种冻干保护剂均能在适宜条件下制备硼替佐米冻干粉针剂。

本实验研究了 Emprove 低内毒素蔗糖、Emprove 低内毒素甘露醇、Emprove 低内毒素甘氨酸 3 种不同类型常用冻干保护剂作为硼替佐米冻干保护剂的性能, 确定了一些基本参数, 为硼替佐米冻干粉针剂的制备提供了数据, 也为难溶性药物冻干制剂的制备提供参考。

参考文献

- [1] 王志宣. 冷冻干燥新技术在新剂型设计中的应用研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [2] 杜松, 左建国, 邓英杰. 采用叔丁醇-水共溶剂进行冷冻干燥 [N]. 中国医药报, 2006-09-14(A08).