

新藤黄酸包合物冻干粉针制备及工艺优化

胡海霞, 王效山, 彭代银, 李庆林

安徽中医学院药学院 现代中药安徽省重点实验室, 省部共建新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230031

摘要: 目的 优化新藤黄酸羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)包合物冻干粉针的制备工艺。方法 采用不饱和水溶液法, 以L-精氨酸与新藤黄酸成盐助溶, 制备新藤黄酸 HP- β -CD 包合物; 采用冷冻干燥法制备新藤黄酸 HP- β -CD 包合物冻干粉针; HPLC 法测定新藤黄酸的量; 以包合率为指标, 应用正交设计法优化制备工艺。结果 优化的制备工艺为 HP- β -CD 与新藤黄酸质量配料比为 10:1、20 °C 包合 5 h; 制备的包合物包合率高; 包合物冻干粉色泽均匀、粉末蓬松、溶解性好。结论 工艺优化合理、重现性好。

关键词: 新藤黄酸; HP- β -CD; 包合物; 正交设计; 工艺优化

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)01-0065-05

Preparation and process optimization of gambogenic acid inclusion complex of freeze-dried powder injection

HU Hai-xia, WANG Xiao-shan, PENG Dai-yin, LI Qing-lin

Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui Province Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, College of Pharmaceutics, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China

Abstract: Objective To optimize the preparation of gambogenic acid hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) inclusion complex of freeze-dried powder injection. **Methods** Gambogenic acid HP- β -CD inclusion complex of freeze-dried powder injection was prepared by freeze-drying method, gambogenic acid content was determined by HPLC, and the preparation was optimized by orthogonal design taking inclusion rate as index. **Results** The optimized preparation process for inclusion was that the reaction mass charge ratio (HP- β -CD-gambogenic acid) was 10:1, for 5 h at 20 °C. The inclusion rate of prepared inclusion complex was higher; The freeze-dried powder was with color uniformity, fluffy texture, and good solubility. **Conclusion** The process is reasonable and with good reproducibility.

Key words: gambogenic acid; hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD); inclusion complex; orthogonal design; process optimization

藤黄具有攻毒蚀疮、破血散结等功效, 在传统中医中用于消肿、化毒、止血等。近年来研究表明藤黄具有抗肿瘤作用, 临床上用于治疗乳腺癌、淋巴瘤、皮肤癌均取得一定疗效。我国学者研究证实新藤黄酸(gambogenic acid)是藤黄抗肿瘤的有效成分之一, 它具有较强的抗肿瘤作用, 特别是肺癌; 同时新藤黄酸对肿瘤组织的细胞具有较高的选择性, 在剂量范围内不良反应很小, 有希望成为新结构类型的抗肿瘤药物^[1-4]。新藤黄酸是一种难溶的弱酸性药物($\lg P=4.02$), 经L-精氨酸助溶后制成的静脉注射剂对给药部位有一定的刺激性, 为了降

低其用药刺激性, 本实验选用注射用羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)作为包合材料对其进行包合, 再采用真空冷冻干燥法制备包合物冻干粉针。优化工艺制备的新藤黄酸包合物包合率高、冻干粉具有较好的稳定性和溶解性, 可供溶血性和血管刺激性实验研究, 进而开发适用于临床、疗效确切的新藤黄酸制剂。

1 仪器与材料

LC-20AB 高效液相色谱仪(日本岛津), 包括SPD-M20A 紫外检测器、Hypersil ODS2 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); DSC204 热分析仪

收稿日期: 2011-06-20

基金项目: 国家重大新药创制专项(2009ZX09103-399); 安徽中医学院青年科学研究基金(2010qn005)

作者简介: 胡海霞(1977—), 女, 安徽桐城人, 硕士, 讲师, 研究方向为中药活性小分子研究。

Tel: 13966777656 (0551)2815808 E-mail: huhx6262@126.com

(德国 Netzsch 公司); Nicolet6700 傅里叶变换红外光谱仪(美国赛默-飞世尔有限公司); X'Pert Pro MPD 多功能粉末衍射仪(荷兰帕纳科公司); AE100 电子分析天平(Mettler Toledo 有限公司); FD—1 型冷冻干燥机(北京得天佑科技发展有限公司); DF—101B 型集热式恒温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司)。

注射用 HP- β -CD (西安德立生物化工有限公司); 新藤黄酸(批号 20091118, HPLC 外标法测得质量分数为 97.1%) 及其对照品(批号 20090325, HPLC 面积归一化法测得质量分数为 99.6%) 均由安徽中医学院现代中药安徽省重点实验室提供; *L*-精氨酸(Bio Basic Inc); HPLC 所用试剂均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 新藤黄酸的测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS2 C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液(9:1), 检测波长 358 nm, 柱温为室温, 进样量 20 μ L, 理论塔板数不低于 5 000。

2.1.2 对照品储备液的制备 取干燥至恒定质量的新藤黄酸对照品 10.0 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 即得。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取新藤黄酸样品 8.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容, 即得供试品溶液。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取对照品储备液 1、2、3、4、5 mL 置 10 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 进样分析, 以峰面积积分值(Y) 对新藤黄酸质量浓度(X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=9.785 9 X-45.505$ ($r=0.999 8$), 表明新藤黄酸在 20.0~100.0 mg/L 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取供试品溶液(80.0 mg/L) 重复进样 5 次, 测定新藤黄酸峰面积, 计算得其峰面积的 RSD 为 0.48%。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于 0、0.5、1、2、3、4、5 h 进样测定, 结果新藤黄酸峰面积的 RSD 为 1.33%, 表明供试品溶液在 5 h 内稳定。

2.1.7 重现性试验 平行制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 峰面积的 RSD 为 1.21%。

2.1.8 加样回收率试验 制备质量浓度分别为 65.0、75.0、85.0 mg/L 的供试品溶液各 3 份(共 9 份), 每组分别按供试品量的 120%、100%、80%精

密加入对照品溶液, 用流动相配成合适质量浓度, 进样分析, 计算得平均加样回收率为 99.82%, RSD 为 1.02%。

2.2 新藤黄酸 HP- β -CD 系统溶解度相图的绘制

将定量且过量的新藤黄酸分别加入到 6.7、13.3、20.0、26.7、33.3、40.0、46.7、53.3、60.0、66.7、80.0、93.3、106.7、120.0、133.3、146.7、173.3、200.0、226.7、253.3 mmol/L HP- β -CD 水溶液中, 于室温下磁力搅拌 7 d, 反应液用 0.45 μ m 水相微孔滤膜滤过, 得上清液, 用氯化钠饱和的醋酸乙酯萃取脱包, 有机层置 10 mL 量瓶用流动相定容后, HPLC 法测定有机层中新藤黄酸的量。绘制新藤黄酸在不同浓度 HP- β -CD 水溶液中的溶解度相图, 结果见图 1。

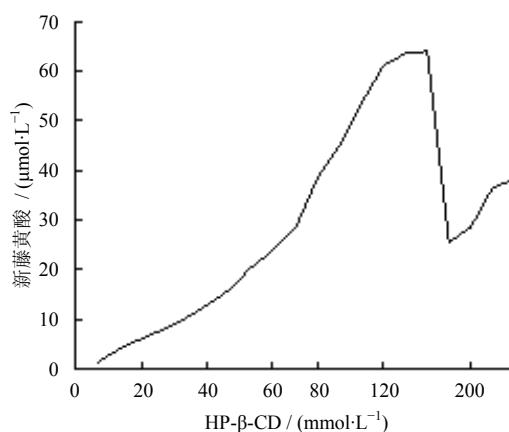


图 1 新藤黄酸 HP- β -CD 系统溶解度相图

Fig. 1 Phase diagram of gambogic acid HP- β -CD solubility

当 HP- β -CD 在 0~80 mmol/L, 新藤黄酸的溶解度呈线性关系, 线性回归得回归方程 $Y=0.486 2 X-4.344 3$ ($r=0.973 5$), 表明 HP- β -CD 和新藤黄酸能形成稳定的包合物。当 HP- β -CD 在 0~250 mmol/L, 新藤黄酸的溶解度相图整体显示出 B_s 型特征, 经历平台期后浓度的下降与微晶态包合物沉淀有关。因为 HP- β -CD 对新藤黄酸的增溶作用有限, 所以在制剂中采用 *L*-精氨酸与新藤黄酸成盐以助溶。

2.3 新藤黄酸盐的测定

2.3.1 新藤黄酸与 *L*-精氨酸成盐后最大吸收波长的确定 取新藤黄酸、*L*-精氨酸适量, 加 90% 甲醇溶解并稀释至新藤黄酸的质量浓度约为 30.0 mg/L, 在 200~500 nm 波长进行扫描, 有 3 个吸收峰, 本实验选择了干扰最小的 344 nm。

2.3.2 色谱条件 色谱柱为 Hypersil ODS2 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (90 : 10), 检测波长 344 nm, 柱温为室温。

2.3.3 对照品储备液的制备 取干燥至恒定质量的新藤黄酸对照品 10.0 mg, L-精氨酸 45.0 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解稀释至刻度, 即得。

2.3.4 供试品溶液的制备 精密称取新藤黄酸样品 4.0 mg, L-精氨酸 18.0 mg 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解定容, 即得供试品溶液。

2.3.5 线性关系考察 精密吸取对照品储备液 1、2、3、4、5 mL 置 10 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 进样分析, 以峰面积积分值 (Y) 对新藤黄酸质量浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=14.707X-25.653$ ($r=0.999\ 8$), 在 10.0~50.0 mg/L 线性关系良好。

2.3.6 精密度试验 取供试品溶液 (40.0 mg/L) 重复进样 5 次, 测定峰面积, 计算得峰面积的 RSD 为 0.83%。

2.3.7 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于 0、0.5、1、2、3、4、5 h 进样测定, 结果峰面积的 RSD 为 1.07%, 表明供试品溶液在 5 h 内稳定。

2.3.8 重现性试验 平行制备 6 份供试品溶液, 进样分析, 峰面积的 RSD 为 0.95%。

2.3.9 加样回收率试验 制备新藤黄酸质量浓度分别为 30.0、35.0、40.0 mg/L 的供试品溶液各 3 份 (共 9 份), 每组分别按供试品量的 120%、100%、80% 精密加入对照品溶液, 用流动相稀释成合适质量浓度, 进样分析, 计算得平均加样回收率为 99.36%, RSD 为 0.87%。

2.4 包合工艺研究

2.4.1 包合物制备方法 本研究选用不饱和水溶液法制备包合物, 真空冷冻干燥法^[5]制备包合物冻干粉。通过配制不同浓度的 HP-β-CD 水溶液, 在不同反应温度下, 缓慢滴入新藤黄酸-L-精氨酸盐饱和水溶液, 控制反应液中新藤黄酸质量浓度为 15 g/L, 包合不同时间, -20 ℃放置 24 h, 真空冷冻干燥得包合物冻干粉。

2.4.2 正交试验优化包合工艺参数 预试验结果表明包合工艺的主要影响因素有 HP-β-CD 与新藤黄酸质量配料比 (A)、包合温度 (B)、包合时间 (C), 按预试验结果选择各因素的水平。在整个包合及冻干工艺过程中, 客体及包合材料几乎没有损失, 得

率很高而且稳定, 所以在工艺优化中仅考察了不同工艺对包合率的影响而忽略了工艺对得率的影响。本实验采用 L₉(3⁴) 正交试验设计优选工艺参数。试验设计及结果见表 1, 方差分析见表 2。

包合率=包合物中新藤黄酸的量/新藤黄酸投药量

表 1 L₉(3⁴) 正交试验设计及结果

Table 1 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A	B / ℃	C / h	D (空白)	包合率 / %
1	10 : 1 (1)	20 (1)	5 (1)	(1)	91.5
2	10 : 1 (1)	35 (2)	7 (2)	(2)	83.6
3	10 : 1 (1)	50 (3)	9 (3)	(3)	70.0
4	45 : 3 (2)	20 (1)	9 (3)	(2)	89.0
5	45 : 3 (2)	35 (2)	5 (1)	(3)	85.0
6	45 : 3 (2)	50 (3)	7 (2)	(1)	69.9
7	60 : 3 (3)	20 (1)	7 (2)	(3)	90.3
8	60 : 3 (3)	35 (2)	9 (3)	(1)	85.8
9	60 : 3 (3)	50 (3)	5 (1)	(2)	71.4
K ₁	245.1	270.8	247.9	247.2	
K ₂	243.9	254.4	243.8	244.0	
K ₃	247.5	211.3	244.8	245.3	
R	3.6	59.5	4.1	3.2	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	自由度	偏差平方和	F 值	显著性
A	2	2.24	0.74	
B	2	629.65	206.65	$P<0.01$
C	2	1.73	0.57	
D (误差)	2	3.05		

$F_{0.05}(2, 2)=19.00$ $F_{0.01}(2, 2)=99.00$

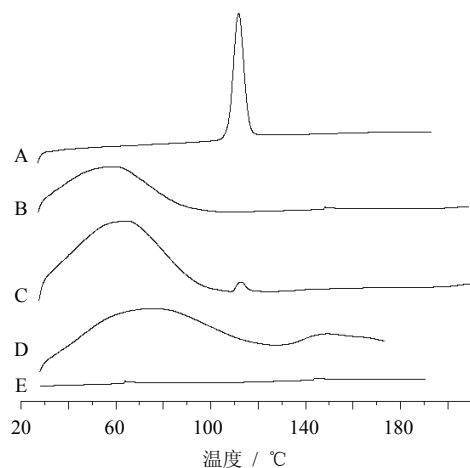
从表 1、2 中可分析出以下结论: ①成盐后的新藤黄酸能够与 HP-β-CD 形成较稳定的包合物, 且优化的工艺包合率可以达到 90%以上, 预期能有效降低新藤黄酸静脉注射给药过程中的刺激性; ②包合温度是影响包合率的最大影响因素; ③载样量是由质量配料比体现的, 当配料比达到 10 : 1 后, 继续增加 HP-β-CD 的比例对包合率影响微弱。本着在保证包合率的前提下尽量增大载样量的思路, 最终选择 10 : 1 的配料比; ④反应进行到 5 h 后包合率趋于平稳。工艺研究优化的制备工艺为包合温度 20 ℃、包合时间 5 h、HP-β-CD 与新藤黄酸质量配料比 10 : 1。

2.4.3 工艺验证试验 取 6 份新藤黄酸按“2.4.2”

项中的优化工艺进行包合, 真空冻干后, 冻干粉色泽均匀、粉末蓬松, 溶解性好; 平均包合率为 91.3%, 本制剂中新藤黄酸的溶解度能达到 15 g/L, 能满足药用要求。

2.5 包合物验证

2.5.1 差示扫描热分析 (DSC 分析) 分别取新藤黄酸、HP- β -CD、物理混合物、L-精氨酸、包合物冻干粉适量, 进行 DSC 分析, 结果见图 2。新藤黄酸在 112 $^{\circ}\text{C}$ 左右有一个吸热峰, 为新藤黄酸的熔点峰; 物理混合物保留了新藤黄酸吸收峰的特征; 而包合物的 DSC 曲线既不同于新藤黄酸也有别于物理混合物, 112 $^{\circ}\text{C}$ 左右的新藤黄酸特征吸热峰消失, 说明有新物相的生成, 即包合物。



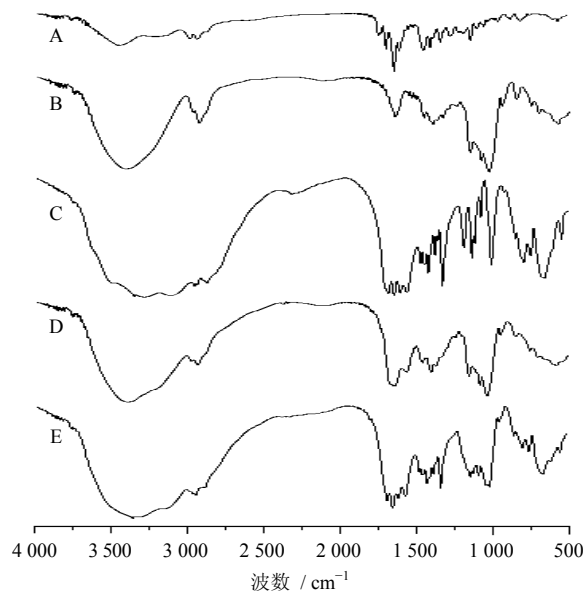
A-新藤黄酸 B-HP- β -CD C-新藤黄酸与 HP- β -CD 的物理混合物
D-新藤黄酸与 HP- β -CD 的包合物 E-L-精氨酸
A-gambogenic acid B-HP- β -CD C-physical mixture of gambogenic acid and HP- β -CD D-gambogenic acid HP- β -CD inclusion complex E-L-arginine

图 2 DSC 分析图

Fig. 2 Analysis of DSC

2.5.2 IR 分析 分别取新藤黄酸、HP- β -CD、物理混合物、L-精氨酸、包合物冻干粉 1.0 mg 置研钵中, 加入适量 KBr, 研磨均匀, 压片, 扫描, 扫描范围为 4 000~500 cm^{-1} , 红外谱图见图 3。包合物与物理混合物相比, 新藤黄酸侧链上不饱和酸的特征吸收峰 (1 680~1 690 cm^{-1}) 以及母核上的羰基特征吸收峰 1 630 cm^{-1} 消失, 说明形成了新的物相。

2.5.3 X 射线粉末衍射 (XRD) 法物相定性分析 分别取新藤黄酸、HP- β -CD、物理混合物、L-精氨酸、包合物冻干粉适量, 进行 XRD 分析, 结果见图 4。物理混合物中保留了新藤黄酸的特征衍射峰, 而包合物中新藤黄酸的特征衍射峰消失, 说明形成了新物相。

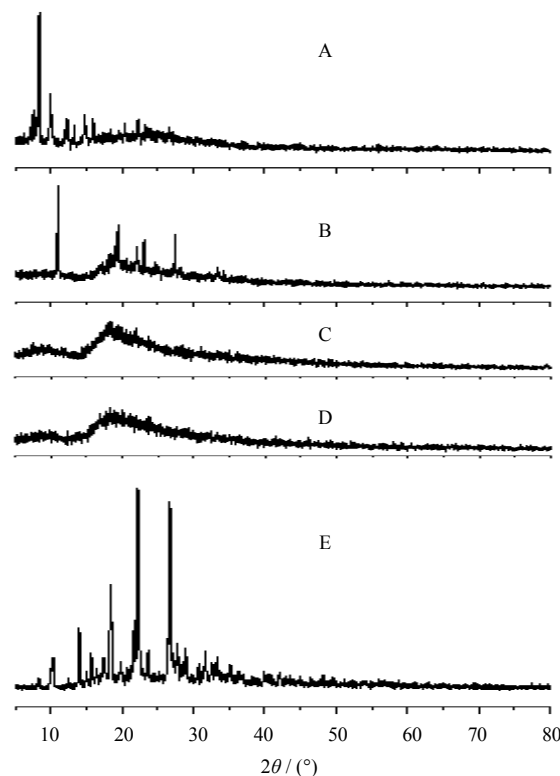


A-新藤黄酸 B-HP- β -CD C-L-精氨酸 D-新藤黄酸与 HP- β -CD 包合物 E-新藤黄酸与 HP- β -CD 物理混合物

A-gambogenic acid B-HP- β -CD C-L-arginine D-gambogenic acid HP- β -CD inclusion complex E-physical mixture of gambogenic acid and HP- β -CD

图 3 IR 分析图

Fig. 3 Analysis of IR



A-新藤黄酸 B-新藤黄酸与 HP- β -CD 的物理混合物 C-HP- β -CD
D-新藤黄酸与 HP- β -CD 的包合物 E-L-精氨酸

A-gambogenic acid B-physical mixture of gambogenic acid and HP- β -CD
C-HP- β -CD D-gambogenic acid HP- β -CD inclusion complex E-L-arginine

图 4 XRD 分析图

Fig. 4 Analysis of XRD

2.6 体外释放试验

由于本制剂预期采用静脉滴注的方式给药, 所以需要通过体外释放试验来考察该包合物的稀释稳定性。体外释放试验是将包合物冻干粉用生理盐水稀释到合适浓度, 采用 HPLC 跟踪测定溶液中未包合的新藤黄酸量的变化, 每次进样 20 μL , 连续进样 90 min, 考察包合物在 90 min 内新藤黄酸的体外释放情况。

取“2.4.3”中 6 份新藤黄酸包合物冻干粉, 分别用生理盐水溶解并迅速稀释成新藤黄酸为 30 mg/L 的溶液, 分别于稀释 0、30、60、90 min 后 HPLC 分析, 色谱条件同“2.3.2”项, 考察溶液中未包合的新藤黄酸质量浓度变化情况, 进而了解药物体外释放规律, 结果见图 5。本实验优化的工艺制备的包合物包合率高, 90 min 的体外释放率可以

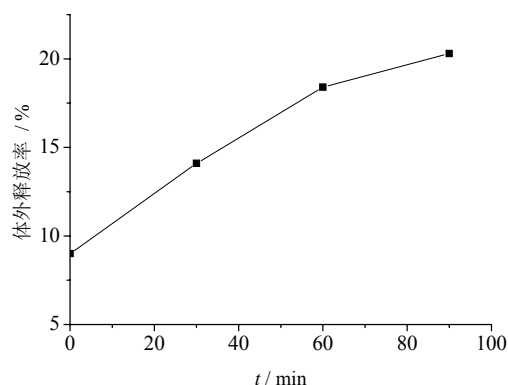


图 5 体外释放试验结果 ($n=6$)

Fig. 5 Results of release test *in vitro* ($n=6$)

控制在 25% 以内, 为减轻静脉滴注过程中的给药刺激性提供了有力的保证。

3 讨论

HP- β -CD 是一种安全的注射用辅料, 也是美国 FDA 批准的第一个可供静脉注射的 β -环糊精类衍生物, 本实验使用注射用 HP- β -CD 作为包合材料将新藤黄酸制成包合物以改善其注射刺激性^[6]。

由于包合工艺优化中需要考察主客体的质量配比, 即采用不同浓度 HP- β -CD 对客体进行包合, 所以本实验采用不饱和水溶液法使主客体在均相进行包合, 包合物形成后也仍然溶解在水相中。

参考文献

- [1] 朱国旗, 程 卉, 王训翠, 等. 新藤黄酸体外抑制肺腺癌 A549 细胞增殖的作用 [J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(1): 53-56.
- [2] Li Q L, Cheng H, Zhu G Q, *et al.* Gambogic acid inhibits proliferation of A549 cells through apoptosis-inducing and cell cycle arresting [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(3): 415-420.
- [3] 程 卉, 彭代银, 王效山, 等. 新藤黄酸体内外抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药, 2008, 39(2): 236-240.
- [4] 刘卫海, 赖小平, 周兴挺. 新藤黄酸的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 2347-2349.
- [5] 谢 鹏, 梁淑娃, 明飞平, 等. 注射用门冬酰胺酶冻干工艺研究 [J]. 今日药学, 2010, 20(11): 10-12.
- [6] 刘 妍, 程晓翔, 郭传敏, 等. 大鼠腹腔和静脉给予羟丙基- β -环糊精毒性比较实验研究 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(6): 361-364.