

## 聚(2-乙基-2-噁唑啉)修饰超氧化物歧化酶模拟物脂质体冻干制剂的制备<sup>Δ</sup>

徐 缓<sup>1\*</sup>, 尹朋朋<sup>1</sup>, 于 涛<sup>1</sup>, 张 伟<sup>1</sup>, 王凯乾<sup>2</sup>, 邓意辉<sup>3</sup>(1. 辽宁师范大学化学化工学院, 辽宁大连 116029; 2. 大连富生天然药物开发有限公司, 辽宁大连 116600; 3. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

中图分类号 R944.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)01-0057-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.01.20

**摘要** 目的: 制备聚(2-乙基-2-噁唑啉)(PEOZ)修饰超氧化物歧化酶(SOD)模拟物脂质体的冻干制剂。方法: 通过考察预冻方式、预冻时间、真空干燥时间及联合冻干保护剂的种类及比例等优化冻干工艺, 并测定所制制剂的水化复溶时间、粒径和包封率。结果: 以10%乳糖+1%甘露醇+10%海藻糖作为联合冻干保护剂, 并以外加方式加入PEOZ修饰SOD模拟物脂质体中, 快速冷冻5 h, 真空干燥30 h, 可得到外观光洁、平整的目标冻干制剂; 其水化复溶时间为(10±1) s, 粒径为(159.3±10.2) nm, 包封率为86.25% (RSD=3.26%, n=6)。结论: 该优化冻干工艺质量可控, 重复性好。

**关键词** 聚(2-乙基-2-噁唑啉); 超氧化物歧化酶模拟物; 脂质体; 冻干保护剂; 冻干制剂; 包封率

### Preparation of the Freeze-dried Preparation of PEOZ Modified SOD Mimics Liposomes

XU Huan<sup>1</sup>, YIN Peng-peng<sup>1</sup>, YU Tao<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, WANG Kai-qian<sup>2</sup>, DENG Yi-hui<sup>3</sup>(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Liaoning Normal University, Liaoning Dalian 116029, China; 2. Dalian Fusheng Natural Medicine Development Co., Ltd., Liaoning Dalian 116600, China; 3. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare freeze-dried preparation of poly(2-ethyl-2-oxazoline) (PEOZ) modified Superoxide dismutase (SOD) mimics liposomes. METHODS: The freeze-dried process of liposomes was investigated by investigating pre-freezing pattern, pre-freezing time, vacuum drying time, types and proportion of cryoprotectants. Re-dissolved time, particle size and entrapment efficiency of preparation were determined. RESULTS: The optimal technology: 10% lactose+1% mannitol+10% trehalose as cryoprotectants were added into PEOZ modified SOD mimics liposomes, with rapid freezing for 5 h and vacuum drying for 30 h. The lyophilized preparation was prepared with smooth and complete appearance. Re-dissolved time was (10±1) s, particle size was (159.3±10.2) nm and entrapment efficiency was 86.25% (RSD=3.26%, n=6). CONCLUSION: The lyophilized technology is controllable in quality and reproducible.

**KEY WORDS** Poly(2-ethyl-2-oxazoline); Superoxide dismutase mimics; Liposomes; Cryoprotectants; Freeze-dried preparation; Entrapment efficiency

在肿瘤治疗中, 脂质体由于具有生物相容性, 既可包封亲水性药物, 也可以结合亲脂性药物到脂质双分子层等优势, 引起研究者越来越多的关注。但脂质体以液体剂型存在时, 易受介质中各种因素的影响, 可能发生磷脂氧化、水解, 且随贮存时间延长产生聚集、融合、粒径变大, 甚至药物泄露等一系列问题, 限制了脂质体的临床应用及工业化生产。若将脂质体制成冻干制剂可以显著提高其贮存稳定性, 临用前简单加水复溶, 即能迅速重建形成脂质体混悬液。但脂质体在冻干过程中产生的冰晶, 会对脂质体结构产生破坏作用。为了使冻干前、后脂质体的性质保持不变, 需要在冻干过程中加入冻干保护剂<sup>[1-3]</sup>。适宜的冻干保护剂不仅起到骨架作用, 而且能促进微粒制剂再分散, 对维持粒子物理化学稳定性具有一定作用。本研究以超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)模拟物(SOD的一种低分子合成模拟物, 分子式为C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>CuN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Zn)

为模型药物, 采用聚(2-乙基-2-噁唑啉)[Poly(2-ethyl-2-oxazoline), PEOZ]与胆固醇半琥珀酸酯通过酯化反应得到PEOZ脂质修饰脂质体, 以冻干脂质体产品外观、水化复溶速度、状态及粒径变化等为指标, 筛选复合冻干保护剂的种类、比例, 确定PEOZ修饰SOD模拟物脂质体的最佳冻干工艺和处方。

### 1 材料

FA1204B 分析天平(上海精密科学仪器有限公司); DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器、RE-52 旋转蒸发器、SHZ-D 循环水式真空泵(巩义市予华仪器有限责任公司); JY92-2D 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科学仪器研究所); LGJ25 冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂); Nicomp 380 粒度测定仪(美国 Particle Sizing Systems 粒度分析仪公司); KQ-400KDE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

注射用大豆磷脂(SPC, 上海太伟药业公司, 批号: 060727, 含量: 97.4%); 胆固醇(北京美莱博医学科技公司); 海藻糖(南宁中诺生物工程有限公司); 甘露醇(北京华迈科生物技术有限责任公司); 乳糖(南京奥多福尼生物科技有限公司); SOD

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81102394)

\* 副教授, 硕士研究生导师。研究方向: 靶向药物递送系统。电话: 0411-82158329。E-mail: huan.xu1@163.com

模拟物(主成分含量: >98%)、PEOZ-胆固醇(主成分含量: >98%)均为辽宁师范大学化学化工学院自制;其他试剂均为分析纯。

## 2 方法

### 2.1 脂质体的制备

根据文献<sup>[4]</sup>方法制备PEOZ修饰SOD模拟物脂质体:磷脂、胆固醇、PEOZ-胆固醇和SOD模拟物以适当比例混合,加10 ml氯仿与甲醇混合溶剂溶解,旋转蒸发除去有机溶剂,加入10 ml磷酸缓冲溶液(pH 7.4)水浴超声振荡,经探头超声处理以0.45、0.22 μm微孔滤膜整粒。测定粒径、粒度分布,脂质体包封率测定方法同参考文献<sup>[4]</sup>。

### 2.2 脂质体的最低共熔点测定

取PEOZ修饰SOD模拟物脂质体样品适量,参照2010年版《中国药典》(二部)凝点<sup>[5]</sup>测定法操作。

### 2.3 预冻方式的选择

预冻方式可分为缓慢冷冻和快速冷冻2种<sup>[6]</sup>。本研究考察了2种预冻方式对PEOZ修饰SOD模拟物脂质体冻干产品质量的影响,主要从冻干后制剂外观、水化复溶时间和复溶后的状态3个方面进行比较。

### 2.4 预冻时间的确定

本试验将预冻时间分别设定为1、2、3、4、5、6、7、8 h,主要从冻干后制剂外观状态进行比较。

### 2.5 冻干程序

冷冻干燥分为2个阶段:第一阶段升华干燥,第二阶段解析干燥。

在脂质体冻干过程中,升华干燥阶段要求脱去全部冻结的自由水,控制温度应低于样品的低共熔温度,防止样品塌陷、表面萎缩、水化速度慢;但温度不能过低,否则会延长干燥时间。解析干燥阶段要求除去样品的结合水,可以适当提高温度,使结合水获取足够的能量从分子中解析出来,干燥所需时间一般按升华时间的0.35~0.5倍计算<sup>[7]</sup>。

### 2.6 冻干保护剂加入方式

冻干保护剂有2种加入方式——内加法和外加法。内加法是在脂质体制备过程中将保护剂加至水化介质中<sup>[8]</sup>;外加法则是将保护剂加至已制备好的脂质体混悬液中<sup>[9]</sup>。以文献报道<sup>[1,10-11]</sup>中冻干保护效果较好的海藻糖作为冻干保护剂进行加入方式的考察。

### 2.7 联合冻干保护剂的考察

联合应用乳糖( $X_1$ )、海藻糖( $X_2$ )和甘露醇( $X_3$ )3种冻干保护剂进行筛选。采用均匀设计法对联合保护剂进行考察,试验因素水平设计采用 $U_{10}^*(10^8)$ 均匀设计,见表1。

准确移取1 ml PEOZ修饰SOD模拟物脂质体,分别加入1~10号西林瓶中,按照表1加入0.6 ml各处方量的联合冻干保护剂,充分混合,进行冻干。观察冻干样品的外观、复溶时间和状态,测定复溶后的粒径。

## 3 结果

### 3.1 预冻温度

PEOZ修饰SOD模拟物的最低共熔点测定结果为,1~5号西林瓶分别为-7.7、-8.0、-7.9、-7.7、-7.6 °C,平均-7.8 °C。快速冷冻与慢速冷冻得到的产品性质基本无差别,均为表面相对平整、饱满,加水能迅速复溶,复溶后的外观与冻干前基

表1 试验因素水平(% , n=3)

Tab 1 Factors and levels(% , n=3)

序号	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	1	5	7
2	2	10	3
3	3	4	10
4	4	9	6
5	5	3	2
6	6	8	9
7	7	2	5
8	8	7	1
9	9	1	8
10	10	6	4

本一致。而有研究指出预冻温度在-50 °C左右,脂质体内容物保留率更高<sup>[12-13]</sup>。为了节约时间成本,获得更高的脂质体包封率,故选择预冻方式为快速冷冻,预冻温度为-45 °C。

### 3.2 预冻时间

试验发现预冻时间超过5 h,均能得到外观均匀细腻的产品,随着预冻时间进一步延长,药物会发生较为严重的泄漏现象,因此确定预冻时间为5 h。

### 3.3 冻干程序

经过试验考察,真空冷冻干燥总计时间为35 h,确定PEOZ修饰SOD模拟物脂质体冻干程序,见表2。

表2 PEOZ修饰SOD模拟物脂质体冻干程序

Tab 2 Freeze-dried procedure for PEOZ modified SOD mimics liposomes

温度, °C	t, h	程序
20~-45		预冻开始
-45	5	预冻
-45~-30	6	升华干燥
-30~-20	6	升华干燥
-20~-15	8	升华干燥
-15~0	2	再干燥
0~15	2	再干燥
15~30	3	再干燥
30	3	再干燥

### 3.4 冻干保护剂加入方式

经考察,外加法和内加法对脂质体的外观和复溶并无显著影响,但是会对脂质体的包封率产生影响,SOD模拟物脂质体的包封率为(91.23 ± 1.63)%,内加法脂质体的包封率下降至(71.15 ± 5.26)%,而外加法脂质体的包封率下降至(83.63 ± 4.15)%。为了同时获取高包封率和外观良好的冻干脂质体,选择外加法作为冻干保护剂的加入方式。

### 3.5 联合冻干保护剂

本文为成品冻干制剂制定了以下的评分标准:

(1)复溶前外观:表面细腻、饱满、平整记为4;表面平整、饱满、略有结晶记为3;表面饱满、有结晶、有皱缩记为2;表面塌陷、脱离瓶壁记为1。

(2)复溶后外观:取冻干产品加水复溶,溶解呈半透明带有乳光的均匀混悬液记为4;呈均匀无混浊的混悬液记为3;呈稍浑浊混悬液记为2;呈完全浑浊混悬液记为1。

(3)粒径:测定脂质体冻干前后的粒径,以平均值计算。

加入不同联合冻干保护剂时脂质体复溶前后的外观、复溶时间及粒径考察结果见表3。

表3 加入不同联合冻干保护剂时脂质体复溶前后的外观、复溶时间及粒径考察评分结果( $n=3$ )

Tab 3 Scores of appearance, re-dissolution time and particle size of freeze-dried PEOZ modified SOD mimics liposomes with different combined cryoprotectants before and after re-dissolution( $n=3$ )

序号	乳糖(%) + 甘露醇(%) + 海藻糖(%)	复溶前外观评分	复溶时间, s	复溶后外观评分	粒径, nm
1	1+5+7	1	24±3	2	288.9±22.3
2	2+10+3	1	23±2	1	389.1±44.1
3	3+4+10	3	25±6	3	255.5±20.6
4	4+9+6	4	28±4	3	276.2±25.3
5	5+3+2	1	20±5	1	329.1±36.9
6	6+8+9	3	26±3	3	189.6±26.3
7	7+2+5	4	16±2	4	182.8±29.1
8	8+7+1	2	25±3	2	253.9±40.6
9	9+1+8	4	11±1	4	169.1±20.4
10	10+6+4	4	19±2	4	216.7±31.9

由于冻干前后评价指标的侧重不同,对各项考察指标设定加权基数,脂质体粒径和复溶时间的加权基数为40,复溶前后外观的加权基数均为10,按公式(1)计算综合评价指标:

$$Y = \text{期望粒径}(150 \text{ nm}) / \text{实测粒径} \times 40 + \text{期望复溶时间}(10 \text{ s}) / \text{实测复溶时间} \times 40 + \text{复溶前外观评分} \times 10 + \text{复溶后外观评分} \times 10 \dots\dots\dots (1)$$

采用均匀设计2.20软件对结果进行回归处理,得到回归方程为 $Y = -22.7 + 872X_1 - 104X_2 + 641X_3$ ,复相关系数为0.9099,剩余标准差 $S = 17.3$ ,检验值 $F_1 = 9.62$ , $F_1 > F_{0.05}(3, 6) = 4.757$ , $P < 0.05$ ,方程有显著意义。其中 $X_2$ 对回归的贡献最小,对其进行显著性检验 $F_2 = 0.2417 \leq F_{0.05}(1, 6) = 5.987$ , $P > 0.05$ ,此方程项不显著,因此甘露醇取设定范围最小值1%。利用软件自动试验优化程序得出最优冻干保护剂组合为10%乳糖、1%甘露醇、10%海藻糖。

### 3.6 冻干工艺的确定

笔者确定最后的冻干处方和工艺为:10%乳糖+1%甘露醇+10%海藻糖以外加方式加入脂质体样品中,选择快速冷冻的预冻方式预冻5 h,真空干燥30 h。按本方法制备6份脂质体冻干样品并测定包封率,得到的冻干制剂外观光洁、平整、粉饼饱满。PEOZ修饰SOD模拟物脂质体冻干制剂复溶前后外观比较见图1。

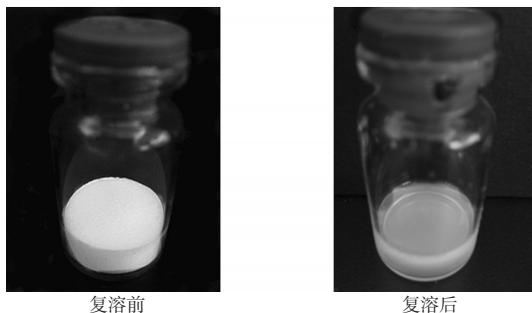


图1 PEOZ修饰SOD模拟物脂质体冻干制剂复溶前后外观比较

Fig 1 Appearance of freeze-dried PEOZ modified SOD mimics liposomes before and after re-dissolution

测得本品水化复溶时间为 $(10 \pm 1)$  s,复溶后呈现半透明带有乳光的均匀混悬液,粒径为 $(159.3 \pm 10.2)$  nm,包封率为86.25% ( $RSD = 3.26\%$ ,  $n = 6$ ),说明本方法重复性好。

## 4 讨论

在降温过程中,影响冻干样品质量的主要因素是温度下降速度不同引起的冰晶生长不同。慢速降温过程中,冰晶生长速度慢,形成的冰晶粗大,导致冻干样品外观不平整,易塌陷。快速降温过程可在瞬间形成细小的冰晶,冰晶升华后可形成致密的网状结构,一般可得到表面平整、外观饱满的冻干样品<sup>[12]</sup>。有研究以海藻糖和蔗糖为保护剂发现速冻和慢冻对冻干产品的外观性质无显著影响,且采用慢冻的脂质体复溶后水溶性药物保留率显著高于快速预冻产品<sup>[13]</sup>。因此关于预冻方式方面文献报道结果存在矛盾之处,但本研究中快速冷冻与慢速冷冻的冻干产品外观几乎没有差别。另外有研究指出预冻温度在 $-50$  °C左右,脂质体内容物保留率更高<sup>[12-13]</sup>。为了节约时间成本,获得更高的脂质体包封率,选择预冻方式为快速冷冻,预冻温度为 $-45$  °C。

本研究选择海藻糖、乳糖和甘露醇3种在文献<sup>[10-11,14-15]</sup>中应用较多且较具代表性的糖类及醇类作为复合冻干保护剂。甘露醇容易形成较小的结晶,升华后可得到具有致密网状结构、外观良好的脂质体冻干样品<sup>[16]</sup>;海藻糖和乳糖等二糖通过与磷脂形成氢键和提高脂质体的玻璃化温度起到对脂质双分子层的保护作用。据文献<sup>[1]</sup>报道,在制备脂质体冻干制剂时,无定形糖应达到一定比例,如糖与磷脂比例为2:1( $m/m$ )时即可获得最佳的保护作用。本研究中,由均匀设计得到的冻干保护剂总量与磷脂之比为2.6:1( $m/m$ ),与文献报道基本相符。

一般认为外加法会导致脂质体内外水相渗透压的差异进而导致药物的泄漏、包封率下降,但这仅针对水溶性、非双分子层相互作用化合物<sup>[1]</sup>。本研究中,内加法制备的脂质体包封率降低较为严重,可能是由于在脂质体制备过程中,含有羟基的保护剂以氢键的方式与磷脂结合,存在于磷脂双分子层之间,与脂溶性的SOD模拟物争夺位置,导致其包封率降低。

在脂质体冻干研究中,研究者对试验的各种指标往往多凭主观经验,标准不一,造成试验结论的千差万别,出现假阴性或者假阳性结果。本研究采用均匀设计法考察不同比例联合冻干保护剂配方,综合考虑冻干产品外观、复溶时间、复溶后外观以及粒径变化,可以避免假阴性或假阳性结果的出现。

## 参考文献

- [1] 托尔钦林 V.P.,魏西希 V.脂质体[M].邓意辉,徐晖,译1版.北京:化学工业出版社,2007:120.
- [2] Mohammed AR, Bramwell VW, Kirby DJ, et al. Increased potential of a cationic liposome-based delivery system: Enhancing stability and sustained immunological activity in pre-clinical development[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 76(3):404.
- [3] Wieber A, Selzer T, Kreuter J. Physico-chemical characterisation of cationic DOTAP liposomes as drug delivery system for a hydrophilic decapeptide before and after freeze-drying[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 80(2):358.
- [4] 陈建霞,徐缓,于涛,等.微柱离心-紫外分光光度法测定

# 增效磺胺嘧啶银混悬剂的制备与质量控制

高新富\*, 徐彦飞, 丁召兴, 张循格, 边瑞民(滨州医学院附属医院, 山东 滨州 256603)

中图分类号 R944.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)01-0060-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.01.21

**摘要** 目的:制备增效磺胺嘧啶银混悬剂并建立其质量控制方法。方法:以磺胺嘧啶银配伍甲氧苄啶制备增效磺胺嘧啶银混悬剂,采用高效液相色谱法测定磺胺嘧啶银和甲氧苄啶的含量,并考察制剂稳定性。结果:磺胺嘧啶银和甲氧苄啶检测质量浓度分别在20~300、8~120  $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积积分值线性关系良好( $r$ 均为0.999 9),平均回收率分别为99.76%、100.27%,RSD分别为0.38%、0.41%;3批样品中磺胺嘧啶银和甲氧苄啶的平均含量分别为49.774、20.045  $\text{mg/ml}$ ;制剂在室温、避光条件下6个月内稳定性良好。结论:增效磺胺嘧啶银混悬剂制备工艺合理,质量稳定可控。

**关键词** 增效磺胺嘧啶银混悬剂;甲氧苄啶;制备;质量控制;高效液相色谱法

## Preparation and Quality Control of Synergist Flamazine Suspension

GAO Xin-fu, XU Yan-fei, DING Zhao-xing, ZHANG Xun-ge, BIAN Rui-min(The Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Shandong Binzhou 256603, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Synergist flamazine suspension and to establish the method for its quality control. METHODS: Synergist flamazine suspension was prepared with flamazine and trimethoprim. The contents of flamazine and trimethoprim were determined by HPLC and the stability of the preparation was studied. RESULTS: The linear ranges of flamazine and trimethoprim were 20-300  $\mu\text{g/ml}$  and 8-120  $\mu\text{g/ml}$  (both  $r=0.999\ 9$ ). Average recoveries were 99.76% (RSD=0.38%) and 100.27% (RSD=0.41%). Average contents of flamazine and trimethoprim in 3 batches of sample were 49.774  $\text{mg/ml}$  and 20.045  $\text{mg/ml}$ . The stability of suspension was good in dark place at room temperature within 6 months. CONCLUSION: Preparation technology of Synergist flamazine suspension is reasonable and stable in quality.

**KEY WORDS** Synergist flamazine suspension; Trimethoprim; Preparation; Quality control; HPLC

烧伤是外科常见的一种急外伤。皮肤烧伤后,皮肤的屏障功能受到破坏,细菌容易侵蚀并在此生长繁殖,易导致感染<sup>[1]</sup>。

磺胺嘧啶银用于烧伤创面感染治疗,尤其是对铜绿假单胞菌的感染具有良好的控制作用<sup>[2-3]</sup>。虽然磺胺嘧啶银抗菌谱广,

\*\*\*\*\*

- 超氧化物歧化酶模拟物脂质体的包封率[J].中国新药杂志,2011,20(10):928.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录VID.
- [6] 徐成海,张世伟,关奎之.真空干燥[M].北京:化学工业出版社,2004:189.
- [7] 曹咏梅,易建钢,张利平.冻干曲线制定的探讨[J].畜牧与饲料科学,2008,29(3):79.
- [8] 苏树强,华泽钊,丁志华,等.冻干保护剂和复水溶液对HB-I a脂质体包封率的影响[J].中国新药杂志,2004,13(9):809.
- [9] 张丽霞,王会娟,孙莉.两性霉素B长循环脂质体冻干剂的制备工艺研究[J].药学与临床研究,2007,15(5):384.
- [10] 童桥,聂松青,林克椿.海藻糖对载药脂质体在干燥-再水化过程中的保护作用[J].生物化学杂志,1992,8(6):711.
- [11] 王健,李明轩.冷冻干燥对提高脂质体稳定性的研究概况[J].中国医药工业杂志,2005,36(9):576.
- [12] Hillgren A, Aldén M. A comparison between the protection of LDH during freeze-thawing by PEG 6000 and Brij 35 at low concentrations[J]. *Int J Pharm*, 2002, 244(1/2): 137.
- [13] van Winden EC, Zhang W, Crommelin DJ. Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration[J]. *Pharm Res*, 1997, 14(9): 1 151.
- [14] Higgins J, Hedges NA, Olliff CJ, et al. Factors influencing cryoprotective activity and drug leakage from liposomes after freezing[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1986, 38(4): 259.
- [15] Talsma H, van Steenberg MJ, Crommelin DJ. The cryopreservation of liposomes: 3. Almost complete retention of a water-soluble marker in small liposomes in a cryoprotectant containing dispersion after a freezing /thawing cycle [J]. *Int J Pharm*, 1991, 77(2/3): 119.
- [16] 刘占杰,华泽钊,陶乐仁,等.脂质体悬浮液结晶对其冻干品质影响的研究[J].青岛海洋大学学报:自然科学版,2001,31(4):612.

\* 主管药师。研究方向:药品检验、临床药学。电话:0543-3256750。E-mail: bzbyfygxf@163.com

(收稿日期:2012-02-07 修回日期:2012-04-01)