

NL-101-羟丙基倍他环糊精包合物的制备及其特性研究

徐伟良, 詹怡飞, 杨岚(杭州民生药物研究院有限公司, 杭州 311121)

摘要: 目的 考察 NL-101-羟丙基倍他环糊精包合物的制备方法。方法 采用冷冻干燥法制备 NL-101-羟丙基倍他环糊精包合物, 以 NL-101 包合率为指标, 通过正交试验优化包合条件。结果 优化的工艺条件为搅拌速度 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 搅拌温度 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 搅拌时间 30 min, NL-101: 羟丙基倍他环糊精摩尔比为 1:10, 按此条件采用冷冻干燥法制备 NL-101-羟丙基倍他环糊精包合物, 采用 X 衍射分析和红外光谱法进行确认, 表明冷冻干燥后得到了包合物。结论 NL-101 与羟丙基倍他环糊精通过冷冻干燥法可形成包合物, 按此工艺条件, NL-101-羟丙基倍他环糊精包合物的包合率 >95%, 同时包合物可提高 NL-101 的溶解度。

关键词: NL-101; 羟丙基倍他环糊精; 包合; 包合率; 冷冻干燥

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)11-1568-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.11.015

引用本文: 徐伟良, 詹怡飞, 杨岚. NL-101-羟丙基倍他环糊精包合物的制备及其特性研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(11): 1568-1571.

Study on the Preparation of NL-101-hydroxypropylbetadex Inclusion Complex and its Characteristic

XU Weiliang, ZHAN Yifei, YANG Lan(Hangzhou Minsheng Institutes for Pharma Research Co., Ltd., Hangzhou 311121, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the preparation of NL-101-hydroxypropyl betacyclodextrin inclusion complex. **METHODS** The NL-101-hydroxypropylbetadex inclusion complex was prepared by freeze drying method and was optimized with inclusion ratio as index by orthogonal experiment. **RESULTS** The optimized conditions were $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ of stirring speed, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ of stirring temperature, 30 min of stirring time, 1:10 of ratio of NL-101:hydroxypropyl betacyclodextrin confirmed by X-ray diffraction method and infrared spectroscopy. **CONCLUSION** NL-101-hydroxypropylbetadex inclusion complex can be effectively prepared with freeze drying method. And the inclusion with greater than 95% of the inclusion ratio is prepared. The solubility of NL-101 is increased when the drug was included by hydroxypropyl betacyclodextrin.

KEY WORDS: NL-101; NL-101-hydroxypropylbetadex; inclusion complex; inclusion ratio; freeze drying

NL-101^[1]是既具有 DNA 损伤又具有组蛋白去乙酰化酶抑制作用的抗恶性肿瘤候选化合物, 化学名称是 7-[5-[双(氯乙基)-氨基]-1-甲基苯并咪唑-2-基]-N-羟基-庚酰胺。

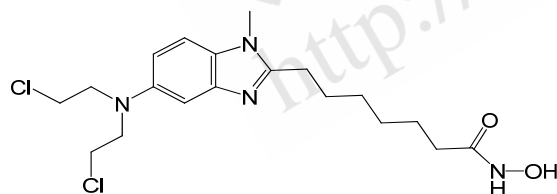


图 1 NL-101 结构式

Fig. 1 NL-101 structural formula

NL-101 为类白色至淡棕色结晶性粉末, 质轻, 不溶于水, 极微溶于乙醇, 微溶于甲醇, 易溶于乙酸。遇强酸、强碱、强氧化剂及强光容易降解, 在水溶液中不稳定。NL-101 分子中的双(氯乙基)氨基基团具有 DNA 损伤作用, 若经口给药, 局部

高浓度的 NL-101 能对快速更新的胃肠道上皮细胞产生毒性作用, 可能引起严重的胃肠道不良反应, 为了保证 NL-101 用药的安全性和有效性, 笔者制备了 NL-101 羟丙基倍他环糊精包合物^[2-6]。因此, 本研究考察了羟丙基倍他环糊精对 NL-101 的包合作用, 并且采用红外光谱(infrared spectrum, IR)和 X 衍射(x-ray diffraction, XRD)等手段对包合物的性质进行研究^[7-12], 提高 NL-101 的顺应性并改善其临床应用。

1 材料与仪器

1.1 药物

NL-101 对照品(批号: 20140121, 纯度为 98.9%)、NL-101 粉末(批号: 20140421)来自杭州民生药物研究院有限公司; 羟丙基倍他环糊精(西安德立生物化工有限公司, 批号: 20140323, 规格: 每袋 0.5 kg), 其余试剂均为分析纯。

作者简介: 徐伟良, 男, 工程师 Tel: 13738054869 E-mail: xwl@mspharm.com

1.2 仪器

S23-2 恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); NLG-1 型真空冷冻干燥机(中牧南京实业公司); S220 pH 计(梅特勒); D8 Advance XRD (Bruker); Tensor 27 FTIR(Bruker); BT125D 电子天平(Sartorius); 1260 VWD 液相色谱仪、Eclipse XDB 色谱柱(Agilent)。

2 方法

2.1 包合物的制备

将 0.5 g NL-101 溶解于冰醋酸溶液中, 16.7 g 羟丙基倍他环糊精溶于水中, 将 NL-101 溶液缓慢加入到羟丙基倍他环糊精溶液中进行混合, 100 r·min⁻¹ 搅拌 30 min, 氢氧化钠调节 pH 至 5.0 左右, 定容, 采用 0.22 μm 滤器过滤, 分装成每瓶 3 mL(5 mg·mL⁻¹), 进行冷冻干燥, 得到 NL-101 冻干包合物。

2.2 NL-101 含量测定方法

2.2.1 溶液的配制 精密称取 NL-101 工作对照品约 12.5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇适量溶解后, 甲醇稀释至刻度; 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。另取 5 瓶注射用 NL-101, 分别加甲醇 5 mL 使内容物溶解, 并转移至 100 mL 量瓶中; 用甲醇多次洗涤容器, 洗液并入量瓶内并用甲醇稀释至刻度; 精密量取适量, 用甲醇定量稀释制成每 1 mL 中约含 NL-101 0.05 mg 的溶液, 作为供试品溶液。

2.2.2 色谱条件 用十八烷基键合硅胶为填充剂(Kromasil C₁₈, 4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 0.1%磷酸水溶液-甲醇(72:28); 检测波长 231 nm, 流速为 0.9 mL·min⁻¹; 柱温为 30 ℃。取供试品溶液 5 μL 进样, 注入色谱仪, 记录色谱图。以外标法计算供试品含量。

2.3 HPLC 测定包合率

2.3.1 溶液的配制 取 NL-101 对照品 31.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液; 精密量取对照品储备溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 以四氢呋喃(经分子筛脱水)稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液; 另取 2 瓶注射用 NL-101, 倾出内容物, 混匀, 精密称取内容物粉末(约含 NL-101 12.5 mg), 转移至 100 mL 量瓶中, 加四氢呋喃(经分子筛脱水)稀释至刻度, 振摇 4 min, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3.2 色谱条件 用十八烷基键合硅胶为填充剂(Kromasil C₁₈, 4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相 0.1%磷酸水溶液-甲醇(72:28); 检测波长 231 nm, 流速为 0.9 mL·min⁻¹; 柱温为 30 ℃。取供试品溶液 5 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算。

2.4 包合工艺条件的选择

实验选择搅拌时间、搅拌温度、搅拌速度以及摩尔比进行 L₉(3⁴)正交试验, 实验因素水平表见表 1。

表 1 实验因素水平表

Tab. 1 The orthogonal experiment factor level table

水平	因素			
	A 搅拌速度/ r·min ⁻¹	B 搅拌温度/ ℃	C 搅拌时间/ min	D 摩尔比
1	10	10	10	1:1
2	50	20	30	1:5
3	100	30	60	1:10

2.5 IR 分析

NL-101-将羟丙基倍他环糊精包合物、NL-101-羟丙基倍他环糊精物理混合物、羟丙基倍他环糊精以及 NL-101 分别用 KBr 压片, 在 400~4 000 cm⁻¹ 扫描, 测定样品的吸收峰。

2.6 XRD 分析

NL-101-将羟丙基倍他环糊精包合物、NL-101-羟丙基倍他环糊精物理混合物、羟丙基倍他环糊精以及 NL-101 进行 XRD 分析, 测试条件: 40 kV, 40 mA, 3~40° 2θ。

3 结果与讨论

3.1 包合条件的选择

正交试验结果见表 2。极差分析结果显示, 各因素对包合率的影响程度依次为 D>A>B>C, 即摩尔比>搅拌速度>搅拌温度>搅拌时间。对表 2 的实验结果进行方差分析和 F 检验, 结果见表 3。从各因素对包合综合评价影响来看, 羟丙基倍他环糊精: NL-101 摩尔比值对包合率在所考察的范围内影响显著, 而其他 3 因素影响均不显著。在实验过程中同时也发现摩尔比>1:5 时包合溶液会出现析出现象, 说明羟丙基倍他环糊精对于 NL-101 的溶解度有影响, 且用量越大影响越大, 但注射级羟丙基倍他环糊精尚未进入中国药典, CFDA 的专家也建议在静脉注射剂中要谨慎使用羟丙基倍他环糊精。因此, 在进行注射用 NL-101 处方开发和优化时, 控制辅料用量, 最多不超过已上市产

品的最高用量。伊曲替康注射液(Itraconazole, 商品名: 斯皮仁诺)是 FDA 批准上市的采用羟丙基倍他环糊精辅料的药品, 且是静脉滴注, 与注射用 NL-101 拟用临床给药方法一致。每 200 mg 伊曲替康含羟丙基倍他环糊精 8 g; 刚开始 2 d 每日 2 次, 以后每日 1 次, 每次 200 mg 伊曲替康, 连续 14 d^[13]。也就是说, 开始 2 d 每天 16 g, 以后每日 8 g 羟丙基倍他环糊精, 连续 14 d 静脉滴注是安全的。根据动物安全性评价试验结果及相关文献^[14], 推测 NL-101 每日临床用量≤200 mg(以 70 kg 人体质量推算), 每天 1 次, 连续给药≤2 d。参考伊曲替康注射液的临床应用信息, 若每 1 mg NL-101 用不超过 40 mg 羟丙基倍他环糊精增溶, 即摩尔比为 1 : 10, 在临床试验和临床使用时, 该辅料对人体的安全性是有保障的, 同时为保证包含溶液的澄清度, 选择工艺条件为 A₃B₁C₂D₃, 即搅拌速度为 100 r·min⁻¹, 搅拌温度为 10 ℃, 搅拌时间为 30 min, NL-101: 羟丙基倍他环糊精摩尔比为 1 : 10。

按上述工艺条件进行 3 批放大实验, 测得包含率均>95.0%, 含量均符合要求。结果见表 4。

表 2 正交试验结果

Tab. 2 The results of orthogonal experiments

实验号	A	B	C	D	包含率/%
1	1	1	1	1	54.8
2	1	2	2	2	60.9
3	1	3	3	3	77.8
4	2	1	2	3	88.9
5	2	2	3	1	60.5
6	2	3	1	2	65.8
7	3	1	3	2	72.5
8	3	2	1	3	89.9
9	3	3	2	1	62.8
K ₁	64.500	72.067	70.167	59.367	
K ₂	71.733	70.433	70.867	66.400	
K ₃	75.067	68.800	70.267	85.533	
R	10.567 0	1.089 0	0.233 3	26.166 0	

表 3 各因素对包含率的方差分析结果

Tab. 3 Variance analysis results of various factors on inclusion ratio

因素	偏差平方和	自由度	F/F _{0.05}	显著性
A	175.087	2	0.542	不显著
B	16.007	2	0.050	不显著
C	0.860	2	0.003	不显著
D	1 100.247	2	3.406	显著
误差	1 292.20	8		

表 4 3 批中试样品包含率和含量测定结果

Tab. 4 Results of Inclusion ratio and content by three batches of samples

批号	摩尔比	包含率/%	含量/%
140807F	1 : 10	99.5	99.5
140814F	1 : 10	99.5	99.2
140821F	1 : 10	99.5	99.4

3.2 IR 分析

NL-101、空白辅料、NL-101-羟丙基倍他环糊精物理混合、研磨混合以及 NL-101-羟丙基倍他环糊精包合物的 IR 光谱见图 2。

对比 5 条曲线发现在 1 500 cm⁻¹ 位置吸收峰变化最明显, 在空白对照(2)中无, 在 API(1)中峰最高, 在物理混合 1 : 5(3)以及研磨混合 1 : 5(8)中逐渐变小, 且在研磨混合物中的强度有所降低, 在所有包合物(4~7)的图谱中该位置吸收峰基本消失, 表明 API 和 HP-β-CD 可能产生了包合反应。

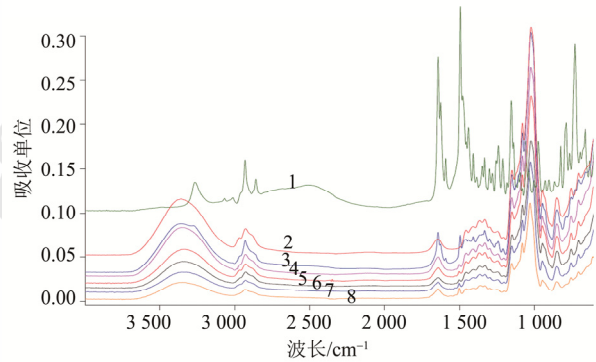


图 2 红外光谱图

1-原料红外光谱图; 2-空白红外光谱图; 3-物理混合红外光谱图; 4-包合物(140505F)红外光谱图; 5-包合物(140807F)红外光谱图; 6-包合物(140814F)红外光谱图; 7-包合物(140821F)红外光谱图; 8-研磨混合红外光谱图。

Fig. 2 Infra-red spectrogram

1-API-IR; 2-blank-IR; 3-fix by physics of 1 : 5-IR; 4-inclusion complex(140505F)-IR; 5-inclusion complex(140807F)-IR; 6-inclusion complex(140814F)-IR; 7-inclusion complex(140821F)-IR; 8-fix by grinding of 1 : 5-IR.

3.3 XRD 分析

NL-101、空白辅料、NL-101-羟丙基倍他环糊精物理及研磨混合以及 NL-101-羟丙基倍他环糊精包合物的 XRD 图谱见图 3。

从图 3 中可见 API 为晶态, 空白对照主要为无定形, 但在 27~28 °之间以及 31~32 °之间有衍射峰。在包合物(1 : 5)和包合物(1 : 10)中未见 API 的衍射峰, 但 1 : 5 的研磨混合物中显示在 21~22 °位置有 API 的特征峰, 1 : 5 物理混合物中显示在

21~22 °位置可见 API 的特征峰, 提示在物理混合物和研磨混合物中有晶态 API 存在。可知包合物中 API 与羟丙基倍他环糊精进行了包合作用。

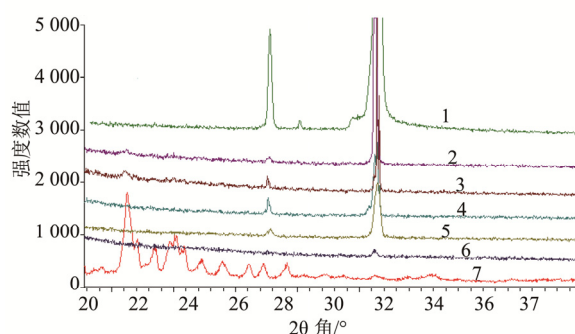


图3 X射线衍射图

1-氯化钠衍射图; 2-研磨混合 1 : 5 衍射图; 3-物理混合 1 : 5 衍射图; 4-空白衍射图; 5-包合物 1 : 5 衍射图; 6-包合物 1 : 10 衍射图; 7-原料衍射图。

Fig. 3 X-ray diffraction pattern

1-NaCl-XRD; 2-fix by grinding of 1 : 5-XRD; 3-fix by physics of 1 : 5-XRD; 4-blank-XRD; 5-inclusion complex of 1 : 5-XRD; 6-inclusion complex of 1 : 10-XRD; 7-API-XRD.

4 结论

根据实验结果, NL-101 : 羟丙基倍他环糊精摩尔比对包合影响最显著, 包合工艺条件如下: 搅拌速度为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 搅拌温度为 10°C , 搅拌时间为 30 min, NL-101 : 羟丙基倍他环糊精摩尔比为 1 : 10。IR、XRD 仪器表征表明, 冷冻干燥法制备 NL-101-羟丙基倍他环糊精包合物是成功的, 该方法可得到溶解性良好的 NL-101 包合物, 为 NL-101 临床试验提供一种较好的制剂选择。

REFERENCES

- [1] 陈瑜, 陈怡. 异羟肟酸衍生物: 中国, CN102186842B [P]. 2014-07-23.
- [2] WU J J, SONG T S, CHEN Z H, et al. The advancement of

inclusive technology of cyclodextrin [J]. J Xinjiang Norm Univ(Nat Sci Edit)(新疆师范大学学报: 自然科学版), 2005, 24(2): 51-54.

- [3] LIAO J Z, PAN Y F. Study on the preparative technique of AM- β -CD inclusion complex [J]. Int Med Health Guid News(国际医药卫生导报), 2004, 10(16): 190-191.
- [4] 何仲贵. 环糊精包合技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 83-85.
- [5] REN X L, OUYANG H Z, WANG G F, et al. Preparation and stability of stilbene glycoside β -cyclodextrin inclusion [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2011, 22(1): 195-197.
- [6] HU H X, WANG X S. Determination of neogambogic acid in inclusion complex freeze-dried powder of neogambogic acid with hydroxypropyl- β -cyclodextrin by high performance liquid chromatography [J]. J Anhui Tradit Chin Med Coll(安徽中医学院学报), 2011, 30(3): 55-57.
- [7] ZHAO X X, GAO L, LIANG Y Y, et al. Preparation and characterization of butylphthalide-sulfobutyl- β -cyclodextrin inclusion complex [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(6): 762-767.
- [8] ZENG J, REN Y, ZHANG Z H, et al. Preparation and characterization of the edaravone and cyclodextrin inclusion complex [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(9): 814-817.
- [9] WAN G W, XIE H, MAO C Q, et al. Difference in inclusion behavior of β -cyclodextrin and hydroxypropyl- β -cyclodextrin with menthol [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41(18): 3336-3341.
- [10] ZHANG L, REN Y. Study on the inclusion of insulin and β -cyclodextrin [J]. Chin Aca Med Mag Organ(中国医学生物技术应用杂志), 2003(3): 53-56.
- [11] YANG X H, REN Y. The characteristics of nimodipine/SBE7- β -CD inclusion complex [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2003, 20(5): 380-383.
- [12] SHEN W, ZHANG G H, GUO N, et al. Study on the inclusion compound of avermectin by infrared spectroscopy [J]. Spectrosc Spect Anal(光谱学与光谱分析), 2014, 34(5): 1201-1205.
- [13] 西安扬森. 伊曲康唑注射液说明书[K]. 2007.
- [14] GOHEER M A. Pharmacology/toxicology review and evaluation: Treanda [M/OL]. FDA, 2007. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2008/22249s000_pharmR.Pdf.

收稿日期: 2016-11-23

(本文责编: 李艳芳)