

注射用胆固醇基磷酰齐多夫定自组装体冻干粉的规模化制备

湛文元^{1,2}, 刘晓妍², 邱海莹², 陈晓^{1,2}, 麻培培^{1,2}, 杜丽娜^{1,2*}, 金义光^{2*} (1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要: **目的** 研究注射用胆固醇基磷酰齐多夫定(5'-cholesteryl-phosphoryl zidovudine, CPZ)自组装体冻干粉规模化制备的处方工艺和性质。**方法** 采用注入法制备 CPZ 自组装体, 将 CPZ 的乙醇溶液缓慢注入到水溶液中, 并经过旋转蒸发、高压均质处理。通过抑制 CPZ 分子解离, 增加自组装体稳定性, 优化处方工艺, 涉及不同 pH 的磷酸盐缓冲液、不同 pH 的醋酸水溶液、甘露醇, 并进一步筛选冻干保护剂用量和灭菌方法。用透射电镜观察 CPZ 自组装体, 用纳米激光粒度仪测定其粒径及 Zeta 电位。**结果** CPZ 自组装体冻干粉最优处方工艺为在水溶液中加入甘露醇(甘露醇: CPZ=2:1), 采用 0.05% 醋酸水溶液作为水相, 可连续制备 300 mL 以上, 并保持稳定。制备的自组装体经 0.45 μm 无菌滤膜过滤灭菌。CPZ 冻干粉加水重新分散后, 自组装体的粒径为 75.17 nm, PDI 值为 0.48, Zeta 电位为 -41.2 mV。透射电镜下显示 CPZ 自组装体为囊泡结构。**结论** 本研究优化了规模化制备 CPZ 自组装体冻干粉的处方工艺, 为该新型药物传递系统的成功研制打下基础。

关键词: 药物自组装体; 注入法; 艾滋病; 冻干; 灭菌

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)01-0010-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.01.003

引用本文: 湛文元, 刘晓妍, 邱海莹, 等. 注射用胆固醇基磷酰齐多夫定自组装体冻干粉的规模化制备[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 10-16.

Large-scale Preparation of 5'-Cholesteryl-phosphoryl Zidovudine Self-assemblies Freeze-dried Powders for Injection

CHEN Wenyuan^{1,2}, LIU Xiaoyan², QIU Haiying², CHEN Xiao^{1,2}, MA Peipei^{1,2}, DU Lina^{1,2*}, JIN Yiguang^{2*} (1. School of Pharmaceutical Science, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Department of Pharmaceutical Sciences, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study formulation and process method of large-scale preparation of 5'-cholesteryl-phosphoryl zidovudine(CPZ) self-assemblies freeze-dried powders for injection and their characteristics. **METHODS** CPZ self-assemblies were prepared with an injection method, where the ethanol solution of CPZ was slowly injected into aqueous solutions followed by rotary evaporation and high-pressure homogeneous process. For the sake of inhibition of CPZ dissociation and improvement of self-assemblies' stability, optimization of formulation and preparation methods involved phosphate buffered solutions with different pH, acetate solutions with different pH, and addition of mannitol. Furthermore, the content of lyoprotectants and sterilization method were explored. CPZ self-assemblies were observed with the transmission electron microscopy (TEM). Size and Zeta potential of them were measured with laser scattering size analyzer. **RESULTS** The optimal formulation and preparation method included a ratio of mannitol/CPZ (2 : 1), 0.05% acetic acid solutions as the water phase, which made the large-scale (more than 300 mL) production of CPZ self-assemblies possible. The product could keep long-term stability. The self-assemblies were sterilized by filtrating through 0.45 μm membranes. The re-suspended CPZ self-assemblies had the particle size of 75.17 nm, the PDI was 0.48, and the Zeta potential was -41.2 mV. CPZ self-assemblies were spherical vesicles according to the TEM. **CONCLUSION** CPZ self-assemblies freeze-dried powders are prepared in large scale with the optimized formulation and preparation method. This study provides a basis for successful development of the novel self-assembled drug delivery system.

KEY WORDS: self-assembled drug delivery system (SADDS); injection method; human immunodeficiency virus (HIV); lyophilization; sterilization

艾滋病(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)由艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染引起, 自 20 世纪 80 年代发现首

例患者以来在世界范围迅速传播, 严重威胁人类健康。据 WHO 统计, 截止 2015 年底, 全球共 3 670 万人感染 AIDS, 其中 2015 年新感染者 210 万,

基金项目: “重大新药创制” 国家科技重大专项(2012ZX09103101-059)

作者简介: 湛文元, 女, 硕士生 Tel: (010)66930216 E-mail: chenwenyuan91@163.com *通信作者: 杜丽娜, 女, 博士, 副研究员, 硕导 Tel: (010)66930216 E-mail: dulina@188.com 金义光, 男, 博士, 研究员, 博导 Tel: (010)66931220 E-mail: jinyg@139.com

死亡人数达到 110 万，成为人类死亡的一个重要原因。核苷类抗病毒药，如齐多夫定、去羟肌苷、扎西他滨、拉米夫定，是一类重要的抗 HIV 药物^[1]，但它们需在细胞内通过胸苷激酶转化为三磷酸酯才能发挥药效，其中单磷酸化是限速步骤，见图 1。已知 AIDS 患者的胸苷激酶活性仅为正常人的 1/3；并且长期应用核苷类药物会进一步降低胸苷激酶活性。因此核苷类药物的单磷酸化过程对其发挥药效至关重要。巨噬细胞已被证明是 HIV 的宿主，感染 HIV 后，可携带 HIV 游走到其他重要器官如脑、肝、肺，成为 HIV 贮库和感染源^[2-3]。核苷类药物一般极性较强，跨越细胞膜进入巨噬细胞内的数量有限，同时巨噬细胞内的胸苷激酶活性小，也影响了其磷酸化。

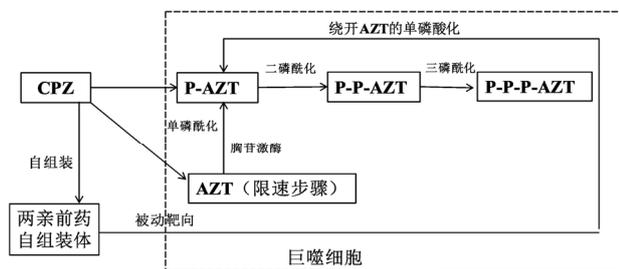


图 1 CPZ 的作用机制
Fig. 1 Mechanisms of CPZ

自组装药物传递系统 (self-assembled drug delivery system, SADDs) 是由金义光教授首次提出的一种新型药物传递系统，它是指两性亲性药物或前药在水中自组装成囊泡、脂质体、胶束等高度分散的有序聚集体^[4]。一般地，极性药物与长脂肪链共价结合形成两亲前药，在水中发生分子自组装形成纳米组装体。如果药物分别连接在脂质分子的两端，称为“双头基两亲前药”，其自组装体也属于 SADDs。SADDs 是药物与载体的有机结合，具备稳定性好、载药量大、靶向控释、容易跨越生物膜等特点，已成功应用于阿昔洛韦^[5-6]、去羟肌苷^[7-8]、异烟肼^[9]、吉西他滨^[10-11]、齐多夫定^[12-14]、氟尿嘧啶^[15]，涉及抗艾滋病^[16]、抗病毒^[17]、抗肿瘤^[11]、抗结核病^[9]等领域，为上述疾病治疗提供了新思路。

胆固醇基磷酰齐多夫定 (5'-cholesteryl-phosphoryl zidovudine, CPZ) 是基于 SADDs 理论指导、由本实验室首次合成的齐多夫定单磷酸化衍生物，结构式见图 2A。齐多夫定极性大，细胞膜渗透性差、体内半衰期短，因此给药剂量大、

给药次数频繁，且难以在巨噬细胞内分布清除残留 HIV。CPZ 的优势在于：①分子能自组装形成纳米级囊泡状结构，见图 2B，体内易被巨噬细胞吞噬；②降解成单磷酸齐多夫定，绕开了核苷类药物单磷酸化的限速步骤，与“鸡尾酒”疗法互为补充，最终根除藏匿在巨噬细胞内的 HIV。CPZ 自组装体是两亲分子在热力学规律下自发形成的，稳定性好，没有辅料参与，载药量高，不再存在所谓“包封率”，见图 3。单分子 CPZ 无法实现被动靶向，必须形成自组装体后才能被动靶向到巨噬细胞发挥药效。

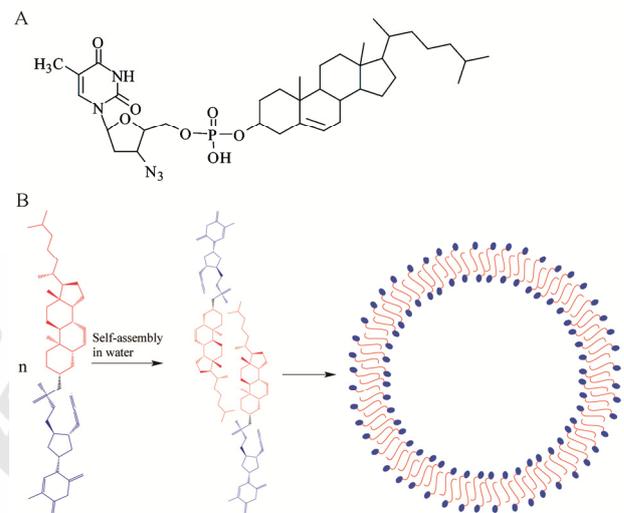


图 2 胆固醇基磷酰齐多夫定的化学结构式(A)及自组装过程(B)

Fig. 2 Structure (A) and self-assembling process(B) of CPZ

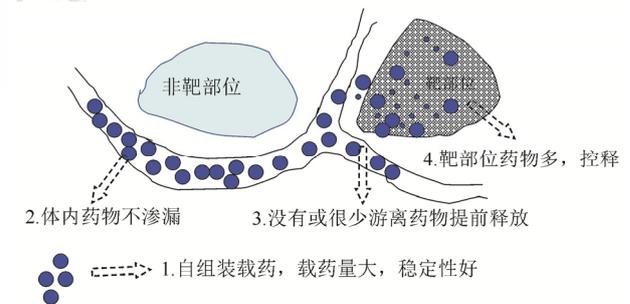


图 3 药物自组装体的特点
Fig. 3 Features of drug self-assemblies

注射用制剂包括灭菌或无菌的溶液和临用前制备成溶液或混悬液的无菌粉末等^[18]，特点是作用迅速、吸收快、剂量准确、作用可靠、避免肝脏首过效应、可局部定位给药。供注射用的制剂应符合无菌、无热原、无不溶性微粒等，并尽可能与血液等渗。本研究在前期完成 CPZ 规模化合成的基础上，重点研究注射用 CPZ 自组装体冻干

粉的规模化制备及灭菌工艺,为 AIDS 治疗提供一种新选择。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

CPZ(自制,批号:20150624,含量:99.9%);十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,分析纯,国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇、冰醋酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 (分析纯,天津市博迪化工有限公司);甘露醇(分析纯,天津市博迪化工有限公司);氨水(分析纯,西陇化工有限公司);甲醇、异丙醇(色谱纯,Fisher 公司)。

1.2 仪器

New Classic MS 十万分之一天平(瑞士 METTLER TOLEDO); Zetasizer Nano ZS 纳米激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司); LGJ-30 冷冻干燥机(华中松源科技有限公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent); HI2221 精密 pH 计(Hanna 仪器有限公司); H-7650 透射电镜(日本日立); Nano DeBEE 高压均质机(美国 DeBEE 公司); SENCO 电动搅拌器(上海申生科技有限公司); ISP01-1A 微量注射泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

1.3 CPZ 测定方法的建立

采用 HPLC 测定 CPZ 含量,色谱柱: Diamonsil[®] C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇:异丙醇=90:10, 加入 2 mmol·L⁻¹ CTAB、2%乙酸、0.5%氨水; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 检测波长: 266 nm; 保留时间: 8.7 min。

1.3.1 标准曲线的建立 精密称取 CPZ 10.04 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容, 作为贮备液, 分别移取 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 流动相定容, 摇匀, 得到浓度分别为 5.02, 10.04, 20.08, 40.16, 80.32, 100.4 μg·mL⁻¹ 的样品溶液, 进样并记录色谱图。以浓度 C (μg·mL⁻¹)对峰面积 A 进行线性回归, 得到标准曲线。

1.3.2 精密度 精密称取 CPZ 10.34 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相定容, 摇匀。分别移取 0.4, 0.5, 0.6 mL 置于 10 mL 量瓶中, 流动相定容, 摇匀, 得到浓度分别为 41.36, 51.70, 62.04 μg·mL⁻¹ 的样品溶液, 分别记为 A, B, C 样品溶液。再取制备的约 2 mg·mL⁻¹ CPZ 自组装体 2 mL 置于 10 mL 量瓶中, 制得约 400 μg·mL⁻¹ 的 CPZ 制剂样品溶液。上述溶液在 4 °C 存放, 分别于 0, 3, 6,

9 h 进样, 记录 CPZ 色谱峰面积, 计算相对标准偏差(RSD), 得到日内精密度。同上操作, 样品溶液分别于 1, 2, 3 d 进样, 记录 CPZ 色谱峰面积, 计算相对标准偏差(RSD), 得到日间精密度。

1.3.3 回收率 取 CPZ 6 mg, 准确称定, 置于 10 mL 量瓶中, 取 2 mL CPZ 自组装体于上述量瓶中, 流动相定容, 摇匀, 制得回收率待测样品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 计算回收率。

1.3.4 检测限与定量限 移取 0.1 mL CPZ 贮备液于 10 mL 量瓶中, 流动相定容, 摇匀, 得到 10.04 μg·mL⁻¹ 的 CPZ 对照品溶液。分别移取 0.2, 0.5 mL 的 CPZ 对照品溶液于 5 mL 量瓶中, 流动相定容, 摇匀, 分别得到 A, B 样品溶液。移取 0.5 mL B 样品溶液于 5 mL 量瓶中, 流动相定容, 摇匀, 得到 C 样品溶液。将 A, C 样品溶液分别进样, 记录峰面积。以 CPZ 色谱峰高与噪音(基线波动幅度)的比值为 10:1 时的浓度作为最低定量限, 比值为 3:1 时的浓度为最低检测限。

1.4 CPZ 自组装体冻干粉的制备工艺优化

1.4.1 制备设备的组装 用注入法制备 CPZ 自组装体^[19]。取 0.25 g CPZ 干燥药粉末于 50 mL 棕色量瓶中, 加适量无水乙醇溶解, 定容, 用 20 mL 注射器吸取 CPZ 乙醇溶液, 并固定于微量注射泵上。取 100 mL 水加入 250 mL 两颈烧瓶, 使用适宜长度的橡胶软管连接装有 CPZ 乙醇溶液的注射器口端和烧瓶口胶塞中固定的注射器针头, 见图 4A, 4B。在 600 r·min⁻¹ 机械搅拌条件下, 将上述 CPZ 乙醇溶液以 0.5 mL·min⁻¹ 的推注速度注入到水中。注入完毕, 得到乳白色的 CPZ 自组装体微混悬液, 见图 4C。将其转移至茄形瓶中, 在 60 °C 减压旋转蒸发除去乙醇。将除去有机溶剂的 CPZ 自组装体混悬液进行高压均质, 在 200 MPa 压力下循环 4 次均质, 得到 CPZ 自组装体, 为呈现淡蓝色乳光的混悬液, 见图 4D。重复上述制备过程, 可在 1 d 内连续制备得到 CPZ 自组装体 300 mL 以上。

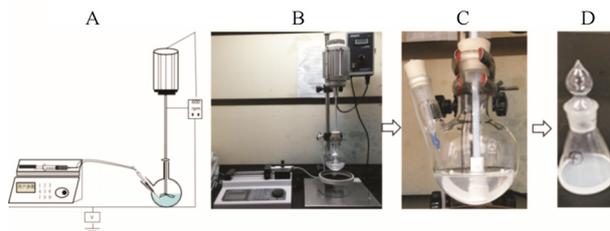


图 4 连续注入法制备 CPZ 自组装体的装置和产品
Fig. 4 Device for preparing CPZ self-assemblies with a continuous injection method and the products

1.4.2 搅拌速度的影响 考察水相搅拌速度(500, 600, 700 r·min⁻¹)对 CPZ 自组装体的影响。按油水相比例为 1:2, 油相推注速度为 0.5 mL·min⁻¹, 制备 CPZ 自组装体, 测定粒径及 Zeta 电位。

1.4.3 注射器针头规格的影响 考察 2 种不同针头 4.5#(内径 210 μm), 5#(内径 232 μm)对 CPZ 自组装体的影响。油水相比例为 1:2, 油相推注速度为 0.5 mL·min⁻¹, 按“1.4.1”项下方法制备 CPZ 自组装体, 测定粒径及 Zeta 电位。

1.5 灭菌工艺优化

分别采用过 0.45 μm 无菌滤膜和 ⁶⁰Co γ 射线照射 2 种方法灭菌^[20], 测定灭菌前后 CPZ 含量, 粒径和 Zeta 电位的变化。

1.6 CPZ 自组装体冻干粉的处方优化

1.6.1 冻干保护剂用量的筛选 为得到 CPZ 自组装体冻干粉, 在注入法中的水溶液中加入甘露醇作为冻干保护剂。CPZ 与甘露醇比例分别为 10:1, 5:1, 2:1, 1:1, 1:2(表 1), 按表 2 中冻干曲线冻干。根据 CPZ 自组装体冻干粉的形貌, 水重分散情况, 粒径, Zeta 电位等指标, 筛选甘露醇最佳比例。

表 1 注入法制备 CPZ 自组装体中甘露醇用量的优化

Tab. 1 Optimization of additive mannitol in the injection method for CPZ self-assemblies

CPZ:甘露醇比例	50 mL 乙醇溶液中的 CPZ/g	100 mL 水溶液中的甘露醇/g
10:1	0.126 9	0.014 3
5:1	0.126 6	0.026 2
2:1	0.126 9	0.063 7
1:1	0.126 1	0.125 9
1:2	0.125 5	0.256 5

表 2 CPZ 自组装体冻干粉的冻干曲线

Tab. 2 Lyophilization curves of CPZ self-assemblies freeze-dried powders

区段	末温度/℃	时间/h
预冻阶段	-25	1
	-40	4
	-30	28
冻干阶段	0	5
	40	7

1.6.2 水溶液 pH 对 CPZ 自组装体制备的影响 CPZ 结构中磷酸基上的羟基可解离得到磷酸负离子, 由于同性相斥, 造成 CPZ 自组装体不稳定。弱酸性环境可能抑制 CPZ 的解离, 增强自组装体

的稳定性。分别用 pH 6.5, 7.0, 7.4, 8.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)作为水相, 用注入法制备 CPZ 自组装体冻干粉, 测得冻干前后粒径及 Zeta 电位的变化, 考察不同 pH 值对 CPZ 解离的影响。另外分别取 0%, 0.05%, 0.1%, 0.15%醋酸水溶液作为水相, 制备 CPZ 自组装体冻干粉, 同上考察, 筛选最优 pH 值。

1.7 性质表征

1.7.1 形貌表征 取适量 CPZ 自组装体冻干粉加水重新分散并稀释至适宜浓度, 取 100 μL 置于铜网上, 1 min 后用 2%磷钨酸溶液(pH=7.0)负染, 在透射电镜(transmission electron microscopy, TEM)下观察 CPZ 结构。

1.7.2 粒径和 zeta 电位 取适量 CPZ 自组装体冻干粉加水重新分散并稀释至适宜浓度, 采用纳米激光粒度测定仪测定粒径及 Zeta 电位, 温度为 25 °C, 体积 1 mL。

1.7.3 含量测定 取 5 mg CPZ, 准确称定, 置于 10 mL 量瓶中, 流动相定容, 摇匀, 再吸取 1 mL 稀释至 10 mL 量瓶, 摇匀, 制得 CPZ 对照品溶液。再取 CPZ 自组装体冻干粉 5 mg, 准确称定, 置于 10 mL 量瓶中, 流动相定容, 摇匀, 制得 CPZ 自组装体样品溶液, 进样测定 CPZ 自组装体的含量。

2 结果与讨论

2.1 CPZ 含量测定方法的建立

CPZ 在 HPLC 中的保留时间为 8.72 min, 其峰形对称, 分离完全, 无杂质峰干扰, 表明此方法专属性良好, 见图 5。

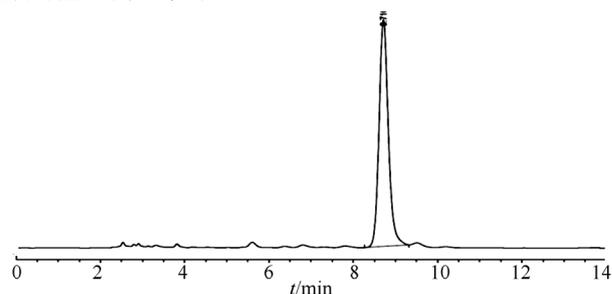


图 5 CPZ 的 HPLC 色谱图

Fig. 5 HPLC chromatogram of CPZ

以浓度 $C(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 对峰面积 A 对进行线性回归, 线性方程为 $A=13.404 0C-23.956 0(r=0.999 2)$, 线性范围为 $5\sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 线性关系较好, 可满足 CPZ 含量测定要求。CPZ 和 CPZ 自组装体制剂的日内, 日间精密度 $\text{RSD}<2\%$, 符合要求。最低

定量限为 8 ng(信噪比 10 : 1), 最低检测限为 2 ng(信噪比 3 : 1)。

回收率(%)=(加 CPZ 的自组装体样品中 CPZ 含量-自组装体中 CPZ 含量)/加入 CPZ×100%。测得加样回收率为 95%~105%, 表明该方法回收率良好。结果见表 3。

表 3 CPZ 测定的回收率测定结果

Tab. 3 Recovery of CPZ determination

样品	称样量/ mg	峰面积	浓度/ mg·mL ⁻¹	含药量/ mg	回收率/ %
CPZ 自组装体	-	63.33	0.51	5.11	-
加样 1	6.09	140.47	1.12	11.16	99.34
加样 2	6.18	145.70	1.16	11.57	104.53
加样 3	6.11	139.70	1.11	11.10	98.03

2.2 CPZ 自组装体的最佳制备工艺

在注入法制备 CPZ 自组装体的过程中, 机械搅拌器的搅拌速度初步选择在 500~700 r·min⁻¹。注射器针头规格对 CPZ 自组装体的粒径与 Zeta 电位影响不大。当搅拌速度在 700 r·min⁻¹时, 整个装置容易出现晃动, 并且溶液容易从烧瓶中溅出, 所以最后选择了 600 r·min⁻¹。其他最佳制备工艺还包括 5#针头(内径 0.232 mm), CPZ 乙醇溶液的推注速度为 0.5 mL·min⁻¹, 最后的油相/水相体积比为 1 : 2。

2.3 CPZ 自组装体的最佳处方

2.3.1 最佳甘露醇用量 与脂质体类似, 为了维持 CPZ 分子双分子层构成的自组装体囊泡结构, CPZ 自组装体冻干时需加入冻干保护剂。本研究选择了可注射和常用的甘露醇作为冻干保护剂。CPZ 自组装体的冻干粉在水重新分散后的粒径及 Zeta 电位比冻干前的原始自组装体混悬液相应参数水平均显著下降, 但 PDI 值除 CPZ : 甘露醇(1 : 1)组外, 其余各组均明显升高, 见表 4。这可能是因为 CPZ 自组装体冻干过程中, CPZ 双分子层发生破裂, 在水重新分散时, 双分子层重新组合,

出现了粒径下降和不均匀的情况。

表 4 甘露醇用量对冻干前后 CPZ 自组装体参数的影响

Tab. 4 Influence of mannitol on the sizes and zeta potentials of CPZ self-assemblies before and after lyophilization

甘露醇比例	尺寸/nm		PDI		Zeta 电位/mV	
	冻干前	冻干后	冻干前	冻干后	冻干前	冻干后
CPZ : 甘=10 : 1	87.86	11.12	0.238	0.761	-24.7	-10.7
CPZ : 甘=5 : 1	85.74	5.717	0.243	0.445	-18.4	-12.0
CPZ : 甘=2 : 1	78.12	3.428	0.267	0.270	-25.0	-8.0
CPZ : 甘=1 : 1	91.21	4.327	0.295	0.198	-28.0	-4.3
CPZ : 甘=1 : 2	82.24	2.863	0.236	0.351	-26.8	-16.6

注: 甘=甘露醇。

Note: “甘” refers to mannitol.

当 CPZ : 甘露醇质量比为 1 : 2 时, CPZ 冻干粉外观饱满, 质地疏松, 无干瘪结块现象, 见图 6。加水重新分散后, 前 4 组分散速率较慢并且有可见颗粒, 而 CPZ : 甘露醇(1 : 2)组分散快, 混悬均匀。因此 CPZ 自组装体处方的甘露醇比例越大, 冻干粉的外观越趋于疏松饱满, 重分散性更好。最终确定甘露醇用量为 CPZ : 甘露醇=1 : 2。

甘露醇是最常用的冻干保护剂^[21]。甘露醇性质稳定, 其多元醇基团可取代水分子为双分子层囊泡结构提供支持。在本研究中, 甘露醇能与 CPZ 自组装体中的极性头形成氢键而代替了原有水的位置, 起到保护作用^[22]。本研究中随甘露醇比例增大, CPZ 自组装体冻干粉外观趋于疏松饱满, 水重分散性好, 也说明了上述机制。

2.3.2 最佳水溶液 pH 值 在注入法制备 CPZ 自组装体的过程中, 水溶液的 pH 值是重要参数。水相的 pH 差异可直接影响 CPZ 分子解离, 从而影响 CPZ 自组装体的稳定性和冻干粉重分散后的稳定性。本研究首先考察了常用的磷酸缓冲液, 并在其基础上进一步研究了不同浓度的醋酸水溶液, 对 CPZ 自组装体对其冻干粉的影响。



图 6 不同比例的 CPZ/甘露醇处方的 CPZ 自组装体冻干粉外观

Fig. 6 Appearance of CPZ self-assemblies freeze-dried powders with different CPZ/mannitol ratios

不同 pH 值的 PBS 作为水相制得的 CPZ 冻干粉重分散后,并不能抑制 CPZ 分子解离, CPZ 分子间斥力强,粒径小于 10 nm 甚至更小。用 0%~0.15%浓度范围的醋酸溶液作为水相,考察对 CPZ 自组装体的影响。当 0.05%醋酸溶液作为水相时, CPZ 自组装体冻干前后粒径, PDI 基本不变, Zeta 电位稍有下降,结果见表 5。因此选择 0.05%醋酸溶液作为最优 pH 调节剂,可有效抑制 CPZ 分子解离,得到稳定的 CPZ 自组装体。

2.4 CPZ 自组装体的灭菌

用 HPLC 测定过滤和辐照对 CPZ 自组装体中 CPZ 含量的影响。未灭菌组 CPZ 含量为 9.51%; 过 0.45 μm 无菌滤膜后 CPZ 含量为 9.50%; 而 $^{60}\text{Co}\gamma$

射线照射后 CPZ 含量为 7.5%, 有部分 CPZ 经辐照后转化为齐多夫定,见图 7。最终确定过 0.45 μm 无菌滤膜作为灭菌方法。

规模化生产时过滤灭菌是保证制剂无菌的一种有效手段^[23]。CPZ 自组装体属于纳米级别,粒径约为 100 nm 左右。0.22 μm 无菌滤膜过滤灭菌比较彻底,但会截留较多自组装体,药物损失较多。 $^{60}\text{Co}\gamma$ 射线照射灭菌会引起 CPZ 降解。因此最终确定 0.45 μm 无菌滤膜作为 CPZ 自组装体制备的灭菌方法^[24]。

2.5 CPZ 自组装体的性质

2.5.1 微观结构 在 TEM 下发现 CPZ 自组装体为囊泡结构,粒径 100 nm 左右,呈类球形,见图 8。

表 5 醋酸溶液对 CPZ 自组装体冻干前后参数的影响($n=3$)

Tab. 5 Effect of acetic acid solutions on the parameters of CPZ self-assemblies ($n=3$)

醋酸浓度/%	pH		粒径/nm		PDI		Zeta/mV	
	冻干前	冻干后	冻干前	冻干后	冻干前	冻干后	冻干前	冻干后
0	3.73	3.82	104.7 \pm 10.96	119.8 \pm 15.44	0.15 \pm 0.06	0.41 \pm 0.04	-44.77 \pm 1.33	-33.77 \pm 1.33
0.05	3.49	3.66	80.77 \pm 10.88	88.40 \pm 10.83	0.13 \pm 0.05	0.20 \pm 0.02	-42.50 \pm 1.14	-29.43 \pm 0.90
0.1	3.38	3.66	71.84 \pm 3.93	88.40 \pm 10.83	0.14 \pm 0.01	0.49 \pm 0.09	-44.07 \pm 1.81	-37.77 \pm 1.72
0.15	4.28	4.57	48.59 \pm 9.62	40.39 \pm 17.0	0.15 \pm 0.02	0.28 \pm 0.04	-41.17 \pm 0.32	-36.27 \pm 0.61

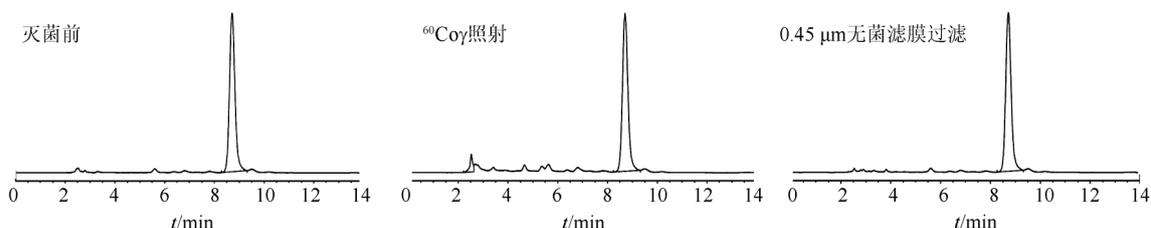


图 7 CPZ 自组装体冻干粉灭菌前后 HPLC 色谱图

Fig. 7 HPLC chromatograms of CPZ lyophilized powder before and after sterilization

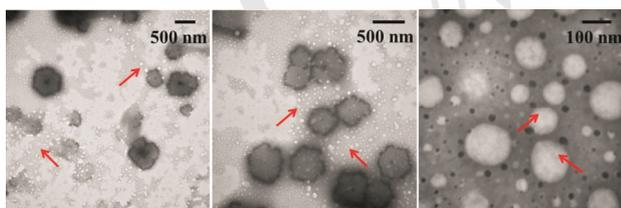


图 8 最佳处方工艺制备的 CPZ 自组装体 TEM 照片

Fig. 8 TEM images of CPZ self-assemblies prepared with the optimal formulation and preparation method

2.5.2 粒径和 Zeta 电位 采用最优处方工艺制备的 CPZ 自组装体冻干粉,水重新分散后其粒径为 (80.77 \pm 10.88)nm($n=3$), PDI 值 0.20 \pm 0.02($n=3$), Zeta 电位为-(29.43 \pm 0.90)mV($n=3$),绝对值接近 30 mV,可增强自组装体稳定性。

2.5.3 药物含量 采用 HPLC 测定 CPZ 自组装体

中的药物含量,采用外标一点法计算得到 CPZ 自组装体冻干粉中 CPZ 含量为(15.43 \pm 0.39)%($n=3$)。

3 结论

本研究系统考察了 CPZ 自组装冻干粉的规模化制备工艺及灭菌方法。目前本实验室已按照此制备工艺和灭菌方法进行了中试规模制备,稳定性试验正在进行中,未来还需要进一步开展其药动学和安全性评价。本研究为 AIDS 治疗提供了一种新选择。

REFERENCES

- [1] LIU X N, CHAI Q, HAN W N. Research progress of nucleoside sulfur compounds [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(2): 246-249.
- [2] AQUARO S, CALIO R, BALZARIN J, et al. Macrophages and HIV infection: therapeutic approaches toward this

- strategic virus reservoir [J]. *Antiviral Res*, 2002(55): 209-225.
- [3] AQUARO S, BAGNARELLI P, GUENCI T, et al. Long-term survival and virus production in human primary macrophages infected by human immunodeficiency virus[J]. *J Med Virol*, 2002, 68(4): 479-488.
- [4] 金义光. 自组装药物传递系统[J]. *国际药学研究杂志*, 2010, 37(3): 165-169.
- [5] JIN Y. Effect of temperature on the state of the self-assembled nanoparticles prepared from an amphiphilic lipid derivative of acyclovir [J]. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 2007, 54(1): 124-125.
- [6] JIN Y, TONG L, AI P, et al. Self-assembled drug delivery systems. 1. Properties and *in vitro/in vivo* behavior of acyclovir self-assembled nanoparticles (SAN)[J]. *Int J Pharm*, 2006, 309(1/2): 199-207.
- [7] JIN Y, AI P, XIN R, et al. Morphological transformation of self-assembled nanostructures prepared from cholesteryl acyl didanosine and the optimal formulation of nanoparticulate systems: effects of solvents, acyl chain length and poloxamer 188[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2008, 326(1): 275-282.
- [8] JIN Y, AI P, XIN R, et al. Self-assembled drug delivery systems. Part 3. *In vitro/in vivo* studies of the self-assembled nanoparticulates of cholesteryl acyl didanosine [J]. *Int J Pharm*, 2009, 368(1/2): 207-214.
- [9] JIN Y, CHEN S, XIN R, et al. Monolayers of the lipid derivatives of isoniazid at the air/water interface and the formation of self-assembled nanostructures in water [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2008(64): 229-235.
- [10] JIN Y, LIAN Y, DU L. Self-assembly of N-acyl derivatives of gemcitabine at the air/water interface and the formation of nanoscale structures in water [J]. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp*, 2012, 393(1): 60-65.
- [11] JIN Y, LIAN Y, DU L, et al. Self-assembled drug delivery systems. Part 6: *In vitro/in vivo* studies of anticancer N-octadecanoyl gemcitabine nanoassemblies [J]. *Int J Pharm*, 2012, 430(1/2): 276-281.
- [12] JIN Y, QI N, TONG L, et al. Self-assembled drug delivery systems. Part 5: Self-assemblies of a bolaamphiphilic prodrug containing dual zovudine [J]. *Int J Pharm*, 2010, 386(1/2): 268-274.
- [13] JIN Y, XIN R, TONG L, et al. Combination anti-HIV therapy with the self-assemblies of an asymmetric bolaamphiphilic zidovudine/didanosine prodrug [J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(3): 867-876.
- [14] JIN Y, XING L, TIAN Y, et al. Self-assembled drug delivery systems. Part 4. *In vitro/in vivo* studies of the self-assemblies of cholesteryl-phosphonyl zidovudine [J]. *Int J Pharm*, 2009, 381(1): 40-48.
- [15] JIN Y, YANG F, DU L. Nanoassemblies containing a fluorouracil/zidovudine glyceryl prodrug with phospholipase A2-triggered drug release for cancer treatment [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013(112): 421-428.
- [16] DU L N, LI M, SU C, et al. *In vitro* pharmacodynamic evaluation of anti-HIV cholesteryl-phosphoryl zidovudine self-assemblies [J]. *J Int Pharm Res(国际药学研究杂志)*, 2013, 40(1): 69-72.
- [17] JIN Y, XIN R, AI P, et al. Self-assembled drug delivery systems. 2. Cholesteryl derivatives of antiviral nucleoside analogues: Synthesis, properties and the vesicle formation [J]. *Int J Pharm*, 2008, 350(1/2): 330-337.
- [18] XIE H, YUAN H L, CHEN Y F, et al. Clinical rational drug use for pharmaceutical excipients of injection [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2016, 33(4): 488-492.
- [19] DU L, JIA J, GE P, et al. Self-assemblies of 5'-cholesteryl-ethyl-phosphoryl zidovudine [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016(148): 385-391.
- [20] SANDLE T. *Sterility, Sterilization and Sterility Assurance for Pharmaceuticals: Technology, Validation and Current Regulations* [M]. UK: Woodhead Publishing, 2013: 1-20.
- [21] PATEL K, MUNJAL B, BANSAL A. Effect of cyclophosphamide on the solid form of manitol during lyophilization [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017(101): 251-257.
- [22] 田晓娜. 一种新型三联苯衍生物的纳米混悬液的制备及体内外评价[D]. 山东: 山东大学, 2014.
- [23] SANDLE T. *Pharmaceutical Microbiology: Essentials for Quality Assurance and Quality Control* [M/OL]. Elsevier, 2016: 147-160.
- [24] 兰珊. 清肺注射液的药学研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.

收稿日期: 2017-06-27
(本文责编: 曹粤锋)