

文章编号: 1674-5566(2016)05-0775-11

DOI:10.12024/jsou.20160301706

海洋候选药物 FGFC1 冻干粉针剂处方工艺研究

徐蓓蕾^{1,2}, 吴文惠¹, 朱全刚², 田虹³, 张若曦²

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437; 3. 赤峰学院附属医院, 内蒙古 赤峰 024005)

摘要: 为了优化 FGFC1 粉针剂处方和制备工艺, 选用不同的助溶剂、赋形剂, 通过考察 FGFC1 粉针剂的溶解度、外观及 pH 筛选适宜处方, 并制备 3 种 FGFC1 粉针剂, 通过外观、FGFC1 含量、pH 作为考察指标考察 FGFC1 粉针剂的稳定性, 优化制备工艺。发现当 FGFC1: 枸橼酸钠: 甘露醇 = 1: 3: 10、-48 °C 冻干 48 h 制得的粉针剂外观性状良好、复溶时间为 (15.33 ± 1.53) s, pH 为 6.86 ± 0.03 , 在葡萄糖注射液、甘露醇注射液中 30 °C 水浴 24 h 含量无明显变化, 表明 FGFC1 高温环境下稳定, 还发现高湿和强光促进 FGFC1 粉针剂中 FGFC1 降解, 低温条件下性质稳定。研究结果显示, FGFC1 粉针剂处方合理, 制备工艺可行。

关键词: FGFC1; 粉针剂; 稳定性; 处方工艺

中图分类号: R 944.2⁺7; R 917 **文献标志码:** A

血栓性疾病是由血栓形成和血栓栓塞两种病理过程所引起的疾病, 具有发病率、死亡率及致残率高的特点, 其导致的死亡人数占全球总死亡人数的 51%, 远远超过肿瘤和感染性疾病等造成的死亡人数。动脉粥样硬化及血栓栓塞并发症在国内外均为人口死亡与致残的第一位原因, 是威胁中老年人身体健康的重要疾病之一^[1-2]。目前, 溶栓药物已经成为临床诊断心脑血管疾病的常规治疗方法, 并且确定了用药指导原则^[3-4]。溶栓药物大多是纤溶酶原激活物或类似物, 能直接或间接激活纤维蛋白溶解酶原变成纤维蛋白溶解酶, 并降解纤维蛋白^[5]。目前常用的临床溶栓药物有 3 类: 第一代溶栓药物, 以链激酶和尿激酶为代表, 效果显著, 但是没有特异性, 容易导致全身纤溶而增加出血危险等不良反应, 且链激酶具有免疫原性, 可引起过敏反应^[6]; 第二代溶栓药物, 以组织型纤维酶原激活剂为代表, 与第一代溶栓药相比, 溶栓作用强, 对纤维蛋白特异性高, 对纤维酶原激活作用较弱, 全身性纤溶反应低, 但是大量使用仍会引起出血反应^[7]; 第

三代溶栓药物是利用基因工程和单克隆抗体技术对第二代产品进行改造制成的新型纤溶酶原激活剂产品, 如瑞替普酶、替奈普酶、靶向溶栓剂等, 半衰期长、特异性高、溶栓作用强, 但是价格昂贵, 存在一定的副作用^[8]。虽然第二代与第三代溶栓药相比第一代溶栓药物有了一定的进步, 但是仍存在一定的问題。因此研制效果好、副作用小的溶栓药物具有十分重要的临床意义。

近年来, 随着溶栓基础研究深入, 提出了通过小分子化合物激活血液中的纤溶酶原激活剂而作用于体内的纤溶系统溶解血栓的新理论, 发现了近百种小分子纤溶活性化合物, 涉及到多酚、氨基磺酸或其盐、吡啶衍生物、萘、生物碱和酰胺等, 它们能作用于纤溶酶原和尿激酶前体且使生理的纤溶反应平稳地进行, 国内外研究开发这些化合物正成为探索新型纤溶疗法药物的一个重要途径^[9]。

海洋微生物因其具有极其丰富多样的种类, 并且能够生存于低温、缺氧、高压等独特的海洋生态环境中, 使其能够产生具有优良生物活性且

收稿日期: 2016-03-24 修回日期: 2016-05-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2011AA090701); 国家自然科学基金(81341082, 81502955); 上海市创新行动计划(14431906000)

作者简介: 徐蓓蕾(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物制药。E-mail: 823464687@qq.com

通信作者: 吴文惠, E-mail: whwu@shou.edu.cn

结构新颖的天然化合物,海洋微生物代谢产物已成为药物创新与新药开发的重要来源^[10-11]。与一些传统的临床溶栓药物相比,从海洋生物资源中获取的小分子纤溶活性化合物,具有安全性高、成本低及来源丰富等优点。

本课题组前期从海洋微生物长孢葡萄穗霉 FG216 的代谢产物中发现了一种新型纤溶活性小分子化合物 FGFC1 (Fungi Fibrinolytic Compound 1),属于吡喃并异吡啶酮类衍生物,纯品为褐色粉末,分子量为 869,易溶于甲醇等有机试剂,微溶于水^[12-13]。药效学和毒理学研究表明 FGFC1 是一种安全有效的溶血栓化合物,药代动力学研究发现其消除半衰期约为 22.37 min^[14]。但是,由于具有溶解度低、口服吸收效果差、半衰期短、水溶液遇强酸、强光及强氧化剂不稳定等特点,导致 FGFC1 难以制成临床所接受的普通制剂,而目前临床适用于急性心肌梗塞、急性脑梗塞等急症治疗的最好剂型是注射剂型,因此如果克服 FGFC1 难溶于水的缺陷,制备冻干粉针剂具有重要的临床意义。近年来,冻干粉针剂成为药品制剂生产中的创新剂型,其制备在低温环境下进行,不会使药物失去生物活力或发生变性,因此冻干粉针剂在有着巨大的发展潜力^[15]。本课题就如何将 FGFC1 制成临床上可使用的安全、有效、稳定的药剂进行研究。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

FGFC1 来源于上海海洋大学实验室,纯度 > 98%, 乙酸铵为分析纯,甲醇为色谱纯,L-赖氨酸为 BR 级,甘露醇为药用级,碳酸氢钠、枸橼酸钠、甘露醇注射液、葡萄糖注射液、生理盐水注射液及灭菌注射用水等均为注射级。

主要仪器为 Agilent 1260 高效液相色谱仪、比朗 FD-C-50 真空冷冻干燥机和泰宏 LRH-150-YG 药物稳定性试验箱等。

1.2 HPLC 法检测 FGFC1 的含量及可行性评价

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 柱(4.6 × 25 mm, 5 μm); 流速: 1 mL/min; 流动相: V(甲醇): V(0.05 mol/L 乙酸铵缓冲盐) = 85: 15; 紫外检测波长: 265 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 室温。

1.2.2 溶液的配制

(1) 对照品溶液: 取适量 FGFC1 对照品,精密称定 1.0240 mg, 置 10 mL 棕色容量瓶中, 甲醇溶解、定容至刻度, 得到对照品溶液。(2) 供试品溶液: 取适量 FGFC1 粉针剂, 加水复溶, 移取 0.2 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度。(3) 阴性对照溶液: 取 FGFC1 粉针剂的空白辅料适量, 精密称定, 同“供试品溶液”方法配制。

1.2.3 系统适应性实验

取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液, 按 1.2.1 色谱条件分别进样测定。

1.2.4 标准曲线

精密称取 FGFC1 标准品置于容量瓶中, 甲醇定容, 以此为母液。依次稀释母液, 配置成浓度范围是 0.64 ~ 256 μg/mL 的标准品溶液, 以 1.2.1 色谱条件进样, 并且以 FGFC1 峰面积(A) 为纵坐标, 标准液浓度(μg/mL) 为横坐标, 进行线性回归。

1.2.5 日内精密度试验

取高、中、低 3 个浓度的标准液, 连续进样 5 次, 经高效液相进样检测后计算 RSD 值。

1.2.6 日间精密度试验

取高、中、低 3 个浓度, 每天进样 1 次, 连续 3 天, 经高效液相进样检测后计算 RSD 值。

1.2.7 加样回收率试验

精密称取 FGFC1 粉针剂样品适量, 配制成一定浓度的溶液(FGFC1 浓度为 103.22 μg/mL), 然后加入 102.4 μg/mL 的 FGFC1 标准溶液 1.6 ~ 2.4 mL, 进样检测后计算平均加样回收率及 RSD 值。

1.2.8 重复性试验

取 6 份样品, 按 1.2.1 条件稀释进样, 并计算 FGFC1 含量及 RSD 值。

1.3 处方筛选

1.3.1 助溶剂种类的筛选

FGFC1 在碱性条件下相对稳定, 故选择碳酸氢钠、枸橼酸钠、苯甲酸钠、去氧胆酸钠、L-赖氨酸、L-精氨酸等偏碱性物质作为助溶剂。

1.3.2 助溶剂用量选择

确定助溶剂的种类后, 根据 FGFC1 与助溶剂的比例(质量比为 1:0.5、1:1、1:3、1:5、1:10、1:20) 确定助溶剂的用量, 每份取 FGFC1 20 mg, 加入纯化水至其完全溶解计算 FGFC1 的溶解度。

1.3.3 助溶剂稳定性考察

将优化后的 3 组溶解后置于 30 ℃ 恒温水浴锅水浴 24 h, 考察 FGFC1 的稳定性。

1.3.4 赋形剂种类的筛选

选择甘露醇、葡萄糖和乳糖作为赋形剂。将 FGFC1: 助溶剂: 赋形剂按一定比例混合, 加入适量的纯化水, 溶解后放入 -20 ℃ 冰箱冷冻后进行真空干燥 (-48 ℃、冻干 48 h), 考察样品的外观性状。

1.3.5 赋形剂用量选择

赋形剂的添加量会对冻干样品的性状产生一定的影响, 制备不同比例 (FGFC1: 赋形剂) 的冻干粉针剂样品, 考察其复溶性和外观。

1.4 粉针剂样品质量考察

1.4.1 pH 的测定

将粉针剂样品加适量纯化水复溶, 溶解后测定 pH。

1.4.2 外观及复溶时间的测定

粉针剂样品, 外观性状观察, 加水后振摇溶解, 并记录时间^[16], 平行操作 3 份。

1.5 稳定性试验

1.5.1 与常用输液的配伍性

将优化后的 3 种冻干粉针剂样品采用甘露醇注射液、葡萄糖注射液、生理盐水注射液 50 mL 进行溶解, 并于 30 ℃ 恒温水浴 24 h 考察样品稳定性, 分别于 0、4、8、12、24 h 取样, 测定 FGFC1 含量, 与 0 h 相比较。

1.5.2 影响因素考察

分别制备优化后的 3 种冻干粉针剂样品各 3 批, 分为枸橼酸钠组、碳酸氢钠组和 L-赖氨酸组, 并进行高温、高湿、强光试验, 于规定时间 (5 d 和 10 d) 取样, 并检测样品中 FGFC1 的含量, 与 0 d 相比较^[17]。

1.5.3 加速试验

分别制备优化后的 3 种冻干粉针剂样品各 3 批, 分为枸橼酸钠组、碳酸氢钠组和 L-赖氨酸组, 并密封放置于 (40 ± 2) ℃、相对湿度 75% ± 5% 的药物稳定性试验箱中, 分别于 0、1、2、3 个月检测 FGFC1 的含量、样品溶液的 pH 并观察外观。

1.5.4 低温试验

分别制备优化后的 3 种冻干粉针剂样品各 3 批, 分为枸橼酸钠组、碳酸氢钠组和 L-赖氨酸组, 并密封放置于 4 ℃ 冰箱中, 于 8 个月后测 3 组粉

针剂的 FGFC1 含量、pH 并观察外观。

1.5.5 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{X} \pm S$ 表示, 组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 HPLC 法的可行性评价

2.1.1 系统适应性实验

由图 1 可见基质对主药峰无干扰, 辅料对 FGFC1 的检测没有干扰。

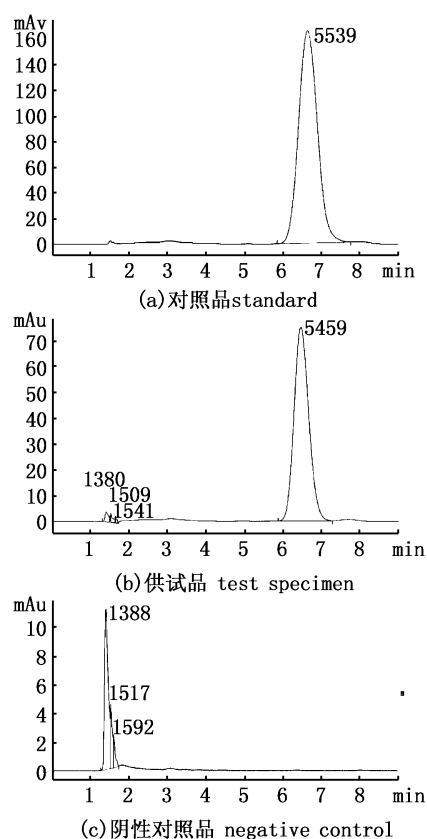


图 1 FGFC1 的 HPLC 谱图

Fig.1 HPLC photographs of Fungi Fibrinolytic Compound 1

2.1.2 标准曲线

根据 HPLC 法检测结果得到标准曲线及线性回归方程: $y = 21.631x + 6.2487$, $R^2 = 1.0000$ 。说明 FGFC1 在 0.64 ~ 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 本含量测定方法具有良好的线性关系。

2.1.3 日内精密度

检测结果表明,高、中、低3个浓度的RSD值($n=5$)分别为0.10%、0.22%、0.48%,说明含量测定方法的日内精密度良好。

2.1.4 日间精密度

检测结果表明,高、中、低3个浓度的RSD值

($n=3$)分别为0.38%、0.47%、1.41%,说明含量测定方法的日间精密度良好。

2.1.5 加样回收率

由表1可知,平均回收率为98.72%,RSD=1.16% ($n=9$),说明含量测定方法可靠性强。

表1 加样回收率
Tab.1 Sample recovery rate

样品量/ μg sample weight	加入量/ μg standard addition amount	实测量/ μg measured value	平均回收率 % average recovery rate	RSD /%
206.44	163.84	367.39		
206.44	163.84	370.75		
206.44	163.84	370.57		
206.44	204.8	408.80		
206.44	204.8	405.39	98.72	1.16
206.44	204.8	405.21		
206.44	245.76	450.57		
206.44	245.76	448.80		
206.44	245.76	449.30		

2.1.6 重复性试验

检测结果表明,RSD=0.68% ($n=6$),说明FGFC1的HPLC含量测定方法重复性良好。

2.2 处方筛选

2.2.1 助溶剂种类及用量的筛选

由表2可知,L-赖氨酸、L-精氨酸、碳酸氢钠的助溶效果最好,由于L-精氨酸作为助溶剂溶解后,溶液静置后会析出乳白色沉淀,故选择L-赖

氨酸和碳酸氢钠作为助溶剂。

由表3可知,L-赖氨酸组(1:5)、碳酸氢钠组(1:0.5、1:1)及枸橼酸钠组(1:3)的助溶效果较好,但碳酸氢钠组(1:0.5)溶解速度慢于同组1:1比例,枸橼酸钠组1:3溶解速度高于1:5,所以确定碳酸氢钠组(1:1)、L-赖氨酸组(1:5)和枸橼酸钠组(1:3)助溶效果最佳。

表2 不同助溶剂的溶解效果
Tab.2 Solubilization effects of different cosolvents

助溶剂 cosolvents	溶解度/(mg/mL) solubility		
	1:0.5	1:5	1:20
苯甲酸钠 Calcium benzoate	-	-	0.58 ± 0.03
枸橼酸钠 Sodium citrate	-	2.50 ± 0.01	0.8 ± 0.08
L-赖氨酸 L-lysine	6.66 ± 0.03	10.03 ± 0.15 **	6.67 ± 0.03
L-精氨酸 L-arginine	6.67 ± 0.03	6.66 ± 0.07	2.87 ± 0.03 **
碳酸氢钠 Sodium bicarbonate	6.66 ± 0.03	2.20 ± 0.06 **	0.83 ± 0.06 **
去氧胆酸钠 Sodium deoxycholate	-	2.84 ± 0.08	2.03 ± 0.06
丁二酸钠 Sodium succinate	-	2.14 ± 0.07	0.83 ± 0.04

注:**表示与1:0.5组比较, $P < 0.01$;

Note: ** indicates compared with 1:0.5 group, $P < 0.01$.

表 3 不同比例助溶剂的溶解效果
Tab.3 Solubilization effects of different proportions of cosolvents

助溶剂 the proportion of cosolvents	溶解度/(mg/mL) solubility					
	1:0.5	1:1	1:3	1:5	1:10	1:20
FGFC1: 碳酸氢钠 FGFC1: Sodium bicarbonate	6.66 ± 0.03	6.66 ± 0.02	2.85 ± 0.04 **	2.22 ± 0.03 **	1.05 ± 0.03 **	0.83 ± 0.06 **
FGFC1: L-赖氨酸 FGFC1: L-lysine	6.66 ± 0.03 ^{##}	6.66 ± 0.06 ^{##}	6.66 ± 0.04 ^{##}	10.03 ± 0.15	6.66 ± 0.07 ^{##}	6.67 ± 0.02 ^{##}
FGFC1: 枸橼酸钠 FGFC1: Sodium citrate	-	2.85 ± 0.07 ^{&&}	3.33 ± 0.05	2.5 ± 0.01 ^{&&}	1.00 ± 0.04 ^{&&}	0.8 ± 0.08 ^{&&}

注: - 表示加入大量水后仍未能完全溶解,助溶效果不明显。**表示 FGFC1: 碳酸氢钠(1:1)作为对照组,两组差异极显著($P < 0.01$)。##表示 FGFC1: L-赖氨酸(1:10)作为对照组,两组差异极显著($P < 0.01$)。&&表示 FGFC1: 枸橼酸钠(1:3)作为对照组,两组差异极显著($P < 0.01$)。

Note: - indicates a large amount of water added is still not completely dissolved, solubilization effect is not obvious. ** indicates there is a significant difference between the two groups [FGFC1: sodium bicarbonate (1:1) as control group, $P < 0.01$]. ## indicates there is a significant difference between the two groups [FGFC1: L-lysine (1:10) as control group, $P < 0.01$]. && indicates there is a significant difference between the two groups [FGFC1: sodium citrate (1:3) as control group, $P < 0.01$].

2.2.2 助溶剂稳定性的考察

由图 2 可知,3 组样品的 FGFC1 含量没有明显变化,说明加入 3 种助溶剂的 FGFC1 水溶液是稳定的。

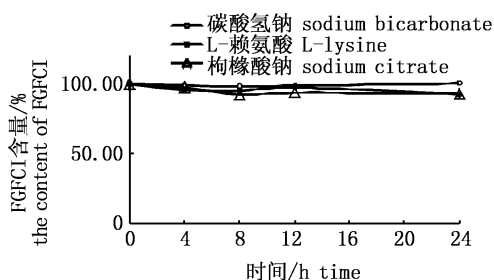


图 2 助溶剂-FGFC1 水溶液的稳定性
Fig.2 The stability of cosolvent- FGFC1 aqueous solution

2.2.3 赋形剂种类及用量筛选

由表 4 可知,甘露醇的赋形效果好,因此选择甘露醇作为赋形剂。由表 5 ~ 7 可知,当 FGFC1: 碳酸氢钠: 甘露醇 = 1: 1: 5、FGFC1: L-赖氨酸: 甘露醇 = 1: 5: 10、FGFC1: 枸橼酸钠: 甘露醇 = 1: 3: 10 时,粉针剂外观良好且复溶时间低于 30 s。

表 4 赋形剂的赋形效果
Tab.4 Shaping effect of excipients

赋形剂 excipients	外观 appearance
甘露醇 Mannitol	疏松、光滑饱满、白色
乳糖 Lactose	网状、部分有萎缩现象、不光滑饱满
葡萄糖 Glucose	网状、不光滑饱满、膨胀起泡

表 5 不同质量比甘露醇对含碳酸氢钠的冻干粉外观和复溶时间的影响

Tab.5 Effect of different weight ratios of mannitol on the appearance and redissolution time of freeze-dried powder with sodium bicarbonate as cosolvent

FGFC1: 碳酸氢钠: 甘露醇 FGFC1: Sodium bicarbonate: Mannitol	外观 appearance	复溶时间/s redissolution time
1: 1: 1	疏松、光滑、饱满	40.33 ± 2.52 **
1: 1: 5	疏松、光滑、饱满	25.00 ± 1.73
1: 1: 10	疏松、光滑、饱满	44.33 ± 1.53 **
1: 1: 20	疏松、光滑、饱满	79.67 ± 1.53 **
1: 1: 40	疏松、光滑、饱满	535.67 ± 2.52 **

注: ** 表示两组差异极显著(1:1:5 作为对照组, $P < 0.01$)。

Note: ** indicates there is a significant difference between the two groups (1:1:5 as control group, $P < 0.01$).

表 6 不同质量比甘露醇对含 L-赖氨酸的冻干粉外观和复溶时间的影响
Tab. 6 Effect of different weight ratios of mannitol on the appearance and redissolution time of freeze-dried powder with L-lysine as cosolvent

FGFC1: L-赖氨酸: 甘露醇 FGFC1: L-lysine: Mannitol	外观 appearance	复溶时间/s redissolution time
1:5:1	疏松、部分膨胀起泡	64.66 ± 1.53 **
1:5:5	疏松、部分膨胀	35.00 ± 2.65 *
1:5:10	疏松、光滑、饱满	22.33 ± 0.58
1:5:20	疏松、光滑、饱满	51.67 ± 3.06 **
1:5:40	疏松、饱满	-

注: * 表示两组差异显著(1:5:10 作为对照组, $P < 0.05$)。 ** 表示两组差异极显著(1:5:10 作为对照组, $P < 0.01$)。

Note: * indicates there is a significant difference between the two groups (1:5:10 as control group, $P < 0.05$). ** indicates there is a significant difference between the two groups (1:5:10 as control group, $P < 0.01$).

表 7 不同质量比甘露醇对含枸橼酸钠的冻干粉针剂外观和复溶时间的影响
Tab. 7 Effect of different weight ratios of mannitol on the appearance and redissolution time of freeze-dried powder with sodium citrate as cosolvent

FGFC1: 枸橼酸钠: 甘露醇 FGFC1: Sodium citrate: Mannitol	外观 appearance	复溶时间/s redissolution time
1:3:1	疏松、部分网状	757.67 ± 4.04 **
1:3:5	疏松、部分塌陷	40.33 ± 1.53 **
1:3:10	疏松、光滑、饱满	25.67 ± 0.58
1:3:20	疏松、饱满、流动性差	66.67 ± 2.52 **
1:3:40	疏松、饱满、流动性差	167.67 ± 2.52 **

注: ** 表示两组差异极显著(1:3:10 作为对照组, $P < 0.01$)。

Note: ** indicates there is a significant difference between the two groups (1:3:10 as control group, $P < 0.01$).

2.3 粉针剂样品质量考察

2.3.1 pH 检测

由表 8 可知, 枸橼酸钠组的 pH 更接近血液的 pH。

表 8 3 种粉针剂样品的 pH

Tab. 8 The pH value of three powder injection samples

粉针剂成分 The composition of powder injection	pH
FGFC1: 碳酸氢钠: 甘露醇(1:1:5) FGFC1: Sodium bicarbonate: Mannitol	9.20 ± 0.06 **
FGFC1: L-赖氨酸: 甘露醇(1:5:10) FGFC1: L-lysine: Mannitol	9.53 ± 0.03 ** ##
FGFC1: 枸橼酸钠: 甘露醇(1:3:10) FGFC1: Sodium citrate: Mannitol	6.86 ± 0.03

注: ** 表示两组差异极显著(FGFC1: 枸橼酸钠: 甘露醇作为对照组, $P < 0.01$)。 ## 表示两组差异极显著(FGFC1: 碳酸氢钠: 甘露醇作为对照组, $P < 0.01$)。

Note: ** indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium citrate: Mannitol as control group, $P < 0.01$). ## indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium bicarbonate: Mannitol as control group, $P < 0.01$).

2.3.2 外观及复溶时间的测定

由表 9 可知, 3 种粉针剂样品的复溶时间低于 30 s, 且枸橼酸钠组复溶速度较快, 3 组外观均良好。

2.4 稳定性试验

2.4.1 与常用输液的配伍性

由图 3 可知, 碳酸氢钠组和 L-赖氨酸组粉针剂样品在 3 种输液中基本稳定, 枸橼酸钠组在葡萄糖和甘露醇注射液中稳定, 在生理盐水中不稳定。

2.4.2 影响因素试验

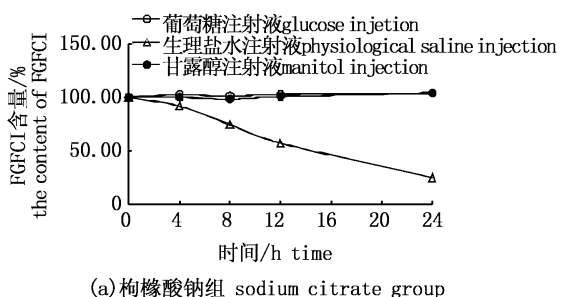
图 4 表明, 在强光条件下, L-赖氨酸组基本稳定, 碳酸氢钠组与枸橼酸钠组则有一定程度的降解。相对湿度 90% ± 5% 的高湿条件下, 枸橼酸钠组基本稳定, L-赖氨酸组和碳酸氢钠组都有一定程度的降解, 且碳酸氢钠组降解程度大。相对湿度 75% ± 5% 的高湿条件下, 枸橼酸钠组基本稳定, L-赖氨酸组和碳酸氢钠组均有一定程度的降解, 并且 L-赖氨酸组的降解程度高于碳酸氢钠组。60 °C 与 40 °C 高温条件下, 碳酸氢钠组均比较稳定, 而 L-赖氨酸组与枸橼酸钠组均有一定程度的降解。因此, 枸橼酸钠组在高湿条件下比较稳定, 在高温和强光条件下不稳定, L-赖氨酸组在强光条件下稳定, 在高湿与高温条件下不稳定, 且高温、高湿条件不同, 降解的速度不同。碳酸氢钠组在高温条件下较稳定, 在高湿与强光条件下不稳定性, 且相对湿度不同, 降解的速度不同。

表 9 3 种粉针剂样品的复溶时间及外观

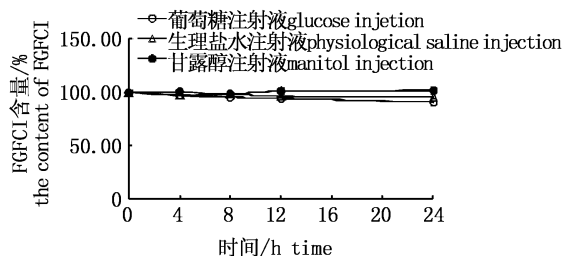
Tab.9 The apparence and redissolution time of three powder injection samples

n = 3

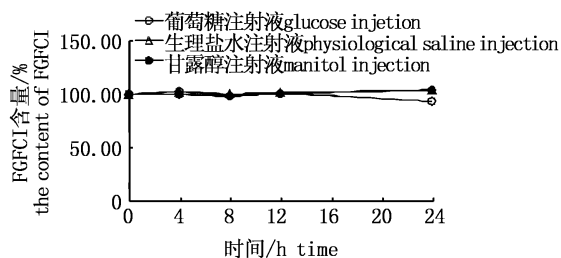
粉针剂成分 the composition of powder injection	加水量/mL the amount of water	复溶时间/s redissolution time	外观 apparence
FGFC1、碳酸氢钠、甘露醇(1:1:5) FGFC1: Sodium bicarbonate: Mannitol	2	20.00 ± 1.00 *	白色、疏松
FGFC1、L-赖氨酸、甘露醇(1:5:10) FGFC1: L-lysine: Mannitol	2	20.67 ± 1.53 *	疏松、白色、表层部分浅黄
FGFC1: 枸橼酸钠: 甘露醇(1:3:10) FGFC1: Sodium citrate: Mannitol	4	15.33 ± 1.53	白色、疏松

注: * 表示与枸橼酸钠组差异显著($P < 0.05$)。Note: * indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium citrate: Mannitol as control group, $P < 0.05$).

(a) 枸橼酸钠组 sodium citrate group



(b) L-赖氨酸组 L-lysine group



(c) 碳酸氢钠组 sodium bicarbonate group

图 3 粉针剂在常用输液中的稳定性

Fig.3 The stability of powder injection in common infusion

2.4.3 加速试验

由表 10 可知,在加速试验条件下放置 3 个月,枸橼酸钠组粉针剂的外观没有变化,碳酸氢钠组与 L-赖氨酸组粉针剂的外观产生了明显变化,3 组粉针剂的 pH 没有发生明显变化(表 11)。

图 5 表明,枸橼酸钠组含量下降最慢,碳酸氢钠组次之,L-赖氨酸组降解最多。

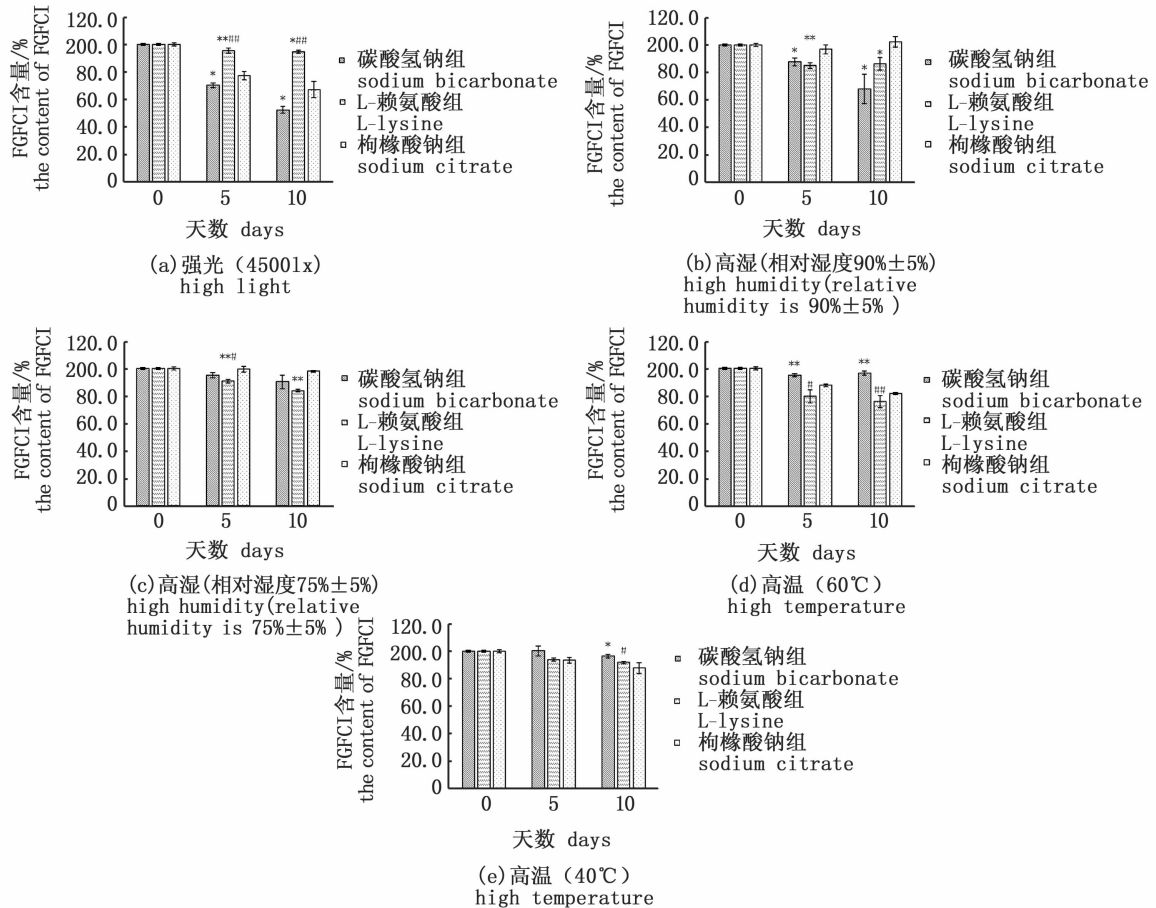
2.4.4 低温试验

由表 11 可知,低温下贮藏 8 个月,枸橼酸钠组的外观无变化,碳酸氢钠组及 L-赖氨酸组外观均有明显变化。表 12、图 6 表明,在低温环境下,3 组粉针剂的 FGFC1 含量和溶液 pH 基本不变。

3 讨论

本文采用冷冻干燥技术制备 FGFC1 冻干粉针剂,冷冻干燥技术适用于对热敏感和在溶液中不稳定的药物。由于 FGFC1 的溶解性差,其水溶液在强光、强酸、强氧化剂条件下等均不稳定,故决定采用冻干法制备 FGFC1 粉针剂。冻干粉针剂具有稳定性好、含水量低和易于保存的特点^[15]。

为了改善药物的溶解性,可选择加入助溶剂。选择助溶剂时应根据药物自身的结构特点和理化性质进行选择。本文根据 FGFC1 水溶液遇强酸、强氧化剂等均不稳定、在强碱条件下相对稳定的特性,选择偏碱性物质如枸橼酸钠、碳酸氢钠等作为助溶剂。根据助溶效果进行筛选,选择枸橼酸钠、碳酸氢钠及 L-赖氨酸作为助溶剂,并确定了 3 种助溶剂的最佳质量比为 FGFC1: 碳酸氢钠 = 1:1、FGFC1: L-赖氨酸组 = 1:5、FGFC1: 枸橼酸钠 = 1:3。助溶剂比例不同,助溶效果也不同,助溶剂用量过高或过低,均会降低其助溶效果,而且助溶剂不仅增加了 FGFC1 的溶解度,还提高了 FGFC1 的稳定性(30 °C 恒温水浴 24 h, FGFC1 含量无变化)。

图4 不同因素对粉针剂稳定性的影响 ($n=3$)Fig. 4 The influence of different factors on the stability of powder injection ($n=3$)

* 表示与枸橼酸钠组差异显著 ($P < 0.05$)。** 表示与枸橼酸钠组差异极显著 ($P < 0.01$)。

表示两组差异显著 (FGFC1: 碳酸氢钠: 甘露醇作为对照组, $P < 0.05$)。## 表示两组差异极显著 (FGFC1: 碳酸氢钠: 甘露醇作为对照组, $P < 0.01$)。

* indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium citrate: Mannitol as control group, $P < 0.05$). ** indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium citrate: Mannitol as control group, $P < 0.01$).

indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium bicarbonate: Mannitol as control group, $P < 0.05$). ## indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium bicarbonate: Mannitol as control group, $P < 0.01$).

表10 粉针剂样品放置不同时间的外观变化

Tab. 10 The appearance changes of the powder injection sample stored for different times period $n=3$

粉针剂 Powder injection	0个月 0 month	1个月 1 month	2个月 2 months	3个月 3 months
碳酸氢钠组 Sodium bicarbonate group	浅黄色、表层白色、疏松	橘黄色、表层白色、疏松	橘黄色、表层白色、疏松	橘黄色、表层白色、疏松
L-赖氨酸组 L-lysine group	白色带部分淡黄色、疏松	亮黄色、表层颜色不均匀、疏松	亮黄色、表层部分深黄色、疏松	亮黄色、表层部分深黄色、疏松
枸橼酸钠组 Sodium citrate group	白色、疏松	白色、疏松	白色、疏松	白色、疏松

合格的冻干粉应具有良好的外观、疏松细腻,加水后溶解迅速且完全。因此,在真空冷冻干燥的过程中,常加入赋形剂起支撑作用,目前

常用的赋形剂有甘露醇、葡萄糖、乳糖、左旋糖酐和聚乙烯吡咯烷酮等^[18]。本文选用葡萄糖、乳糖、甘露醇作为赋形剂,考察粉针剂的外观,发现

表 11 粉针剂样品放置不同时间的 pH 变化

Tab. 11 The pH changes of the powder injection sample stored for different times period $n = 3$

粉针剂 Powder injection	0 个月 0 month	1 个月 1 month	2 个月 2 months	3 个月 3 months
碳酸氢钠组 Sodium bicarbonate group	9.07 ± 0.05 **	9.04 ± 0.06 **	9.14 ± 0.08 **	9.12 ± 0.08 **
L-赖氨酸组 L-lysine group	9.51 ± 0.04 * ** #	9.18 ± 0.03 * ** #	9.01 ± 0.05 **	9.01 ± 0.05 **
枸橼酸钠组 Sodium citrate group	6.79 ± 0.04	6.87 ± 0.01	6.87 ± 0.02	6.94 ± 0.01

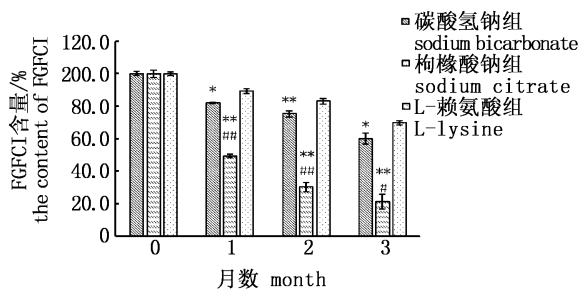


图 5 加速试验对粉针剂稳定性的影响 ($n = 3$)

Fig. 5 Accelerated stability test of powder injection ($n = 3$)

* 表示两组差异极显著 (FGFC1: 枸橼酸钠: 甘露醇作为对照组, $P < 0.01$)。* * 表示两组差异极显著 (FGFC1: 枸橼酸钠: 甘露醇作为对照组, $P < 0.01$)。# 表示两组差异显著 (FGFC1: 碳酸氢钠: 甘露醇作为对照组, $P < 0.05$)。## 表示两组差异极显著 (FGFC1: 碳酸氢钠: 甘露醇作为对照组, $P < 0.01$)。

* indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium citrate: Mannitol as control group, $P < 0.05$). * * indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium citrate: Mannitol as control group, $P < 0.01$). # indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium bicarbonate: Mannitol as control group, $P < 0.05$). ## indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium bicarbonate: Mannitol as control group, $P < 0.01$).

表 12 粉针剂样品放置于冰箱中 8 个月产生的外观变化

Tab. 12 The appearance changes of powder injection sample stored in 4 °C refrigerator for 8 months $n = 3$

粉针剂 powder injection	0 个月 0 month	8 个月 8 months
碳酸氢钠组 Sodium bicarbonate group	浅黄色、表层白色、疏松	土黄色、表层白色、疏松
L-赖氨酸组 L-lysine group	白色带部分淡黄色、疏松	米黄色、疏松
枸橼酸钠组 Sodium citrate group	白色、疏松	白色、疏松

表 13 在冰箱中放置 8 个月的粉针剂样品的 pH
Tab. 13 The pH of powder injection sample stored in 4 °C refrigerator for 8 months $n = 3$

粉针剂 powder injection	0 个月 0 month	8 个月 8 months
碳酸氢钠组 Sodium bicarbonate group	9.07 ± 0.05 **	9.07 ± 0.08 **
L-赖氨酸组 L-lysine group	9.51 ± 0.04 * ** #	9.56 ± 0.02 * ** #
枸橼酸钠组 Sodium citrate group	6.79 ± 0.04	6.76 ± 0.01

注: * * 表示两组差异极显著 (FGFC1: 枸橼酸钠: 甘露醇作为对照组, $P < 0.01$)。## 表示两组差异极显著 (FGFC1: 碳酸氢钠: 甘露醇作为对照组, $P < 0.01$)。

Note: * * indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium citrate: Mannitol as control group, $P < 0.01$). ## indicates there is a significant difference between the two groups (FGFC1: Sodium bicarbonate: Mannitol as control group, $P < 0.01$).

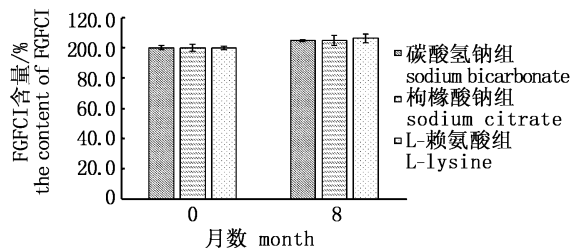


图 6 低温对粉针剂的影响 ($n = 3$)

Fig. 6 Effect of low temperature on powder injection ($n = 3$)

乳糖和葡萄糖作赋形剂时,粉针剂的外观不疏松饱满、部分有萎缩现象,因此选甘露醇作为赋形剂。经过赋形剂最佳用量的考察发现,助溶剂的种类不同,甘露醇的最适用量也不相同。赋形剂用量不同会影响粉针剂的外观^[19]。当赋形剂含量过低或过高时,导致复溶时间的增加。

本文以助溶效果、pH、外观及复溶时间为指标,制定了 3 种粉针剂 [W (FGFC1): W (枸橼酸钠): W (甘露醇) = 1: 3: 10, W (FGFC1): W (碳酸

氢钠): $W(\text{甘露醇}) = 1:1:5$, $W(\text{FGFC1}): W(\text{L-赖氨酸}): W(\text{甘露醇}) = 1:5:10$], 并且考察 3 种粉针剂的稳定性。首先, 为确保临床用药安全有效, 考察了 3 种粉针剂与 3 种临床常用输液的配伍性, 荣敏等^[20]曾做过类似研究。根据研究结果, 碳酸氢钠组与 L-赖氨酸组粉针剂在临床上可以使用 3 种注射液作为溶媒, 枸橼酸钠组粉针剂在临床上应避免使用生理盐水作为溶媒, 并且 FGFC1 粉针剂应在临用前溶解, 放置于室温(低于 30 °C)下, 一般不应超过 24 h。

影响因素试验结果表明, 高温、高湿、强光对 3 种粉针剂的影响程度不同。枸橼酸钠组在高湿条件下比较稳定, 在高温和强光条件下不稳定; L-赖氨酸组在强光条件下稳定, 在高湿与高温条件下不稳定, 且高温、高湿条件不同, 降解的速度不同; 碳酸氢钠组在高温条件下较稳定, 在高湿与强光条件下不稳定性, 且相对湿度不同, 降解的速度不同。在 $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $75\% \pm 5\%$ 的条件下进行 3 个月的加速试验, 发现 3 种粉针剂的稳定性: 枸橼酸钠组最好、碳酸氢钠组次之、L-赖氨酸组降解速度最快, 且碳酸氢钠组和 L-赖氨酸组外观产生明显变化, 加速试验结果与影响因素试验结果相吻合。由于高温、高湿对 3 种粉针剂均有严重影响, 因此进行低温试验, 将 3 种粉针剂在 4 °C 冰箱中避光密封保存 8 个月。低温条件下, 3 种粉针剂的含量、pH 和枸橼酸钠组外观均没有变化, 而碳酸氢钠组与 L-赖氨酸组外观产生明显变化。因此, 根据低温试验和加速试验的结果, 确定 3 种处方工艺中最优化的是: $W(\text{FGFC1}): W(\text{枸橼酸钠}): W(\text{甘露醇}) = 1:3:10$, FGFC1 含量为 10 mg, -48 °C 冷冻干燥 48 h。

由于枸橼酸钠组冻干粉针剂样品在高湿条件下含量稳定, 高温及强光条件下均有一定程度的降解, 在低温条件下长时间储存性质稳定, 因此, 市售 FGFC1 注射剂应采用棕色瓶包装, 并于 4 °C 冰箱中密闭存放。

参考文献:

[1] 刘龙涛, 史大卓, 陈可冀. 心血管血栓性疾病"瘀毒"致病临床表征初探[J]. 世界中医药, 2012, 7(2): 152 - 154.
LIU L T, SHI D Z, CHEN K J. A preliminary study of cardiovascular thrombotic disease "Ecchymosis" pathogenic clinical characterization [J]. World Chinese Medicine,

2012, 7(2): 152 - 154.

- [2] 阮长耿, 余自强. 提高血栓性疾病的诊治水平[J]. 中华内科杂志, 2007, 46(11): 889 - 890.
RUAN C G, YU Z Q. Improve the diagnosis and treatment of thrombotic diseases [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2007, 46(11): 889 - 890.
- [3] 溶栓性药物的作用机理分析[J]. 医药世界, 2002(10): 44.
Mechanism analysis of thrombolytic drugs [J]. Medical & Pharmaceutical World, 2002(10): 44.
- [4] 何建国, 程显声. 肺血栓栓塞症的流行病学[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(24): 1730 - 1731.
HE J G, CHENG X S. Epidemiology of pulmonary thromboembolism [J]. National Medical Journal of China, 2002, 82(24): 1730 - 1731.
- [5] 王贵鑫. 溶栓药物的药理学研究进展[J]. 血栓与止血学, 2011, 17(5): 234 - 236.
WANG G X. Review of pharmacological studies on thrombolysis drug [J]. Chinese Journal of Thrombosis and Hemostasis, 2011, 17(5): 234 - 236.
- [6] 姚天赐, 许云禄. 溶血栓药物研究进展[J]. 海峡药学, 2010, 22(6): 1 - 5.
YAO T C, XU Y L. The advances of thrombolytic drugs [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2010, 22(6): 1 - 5.
- [7] 张立夏. 抗血栓药物概况[J]. 中国医药指南, 2012, 10(15): 454 - 456.
ZHANG L X. An overview of antithrombotic drugs [J]. Guide of China Medicine, 2012, 10(15): 454 - 456.
- [8] 赵友春, 赵淑梅, 王革, 等. 第三代溶血栓药物研究进展[J]. 药学进展, 2004, 28(2): 72 - 75.
ZHAO Y C, ZHAO S M, WANG G, et al. The recent development of third-generation thrombolytics [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2004, 28(2): 72 - 75.
- [9] 吴文惠, 包斌. 微生物来源的具有促进纤溶作用的低分子化合物的研究进展[C]//全国海洋生物技术与海洋药物学术会议论文集. 大连: 中国药学会, 2006: 621 - 625.
WU W H, BAO B. Research progress of Microbial origin promote fibrinolytic molecular compound [C]//National Marine Biotechnology and Marine Drugs Conference Proceedings. Dalian: Chinese Medicine Institute, 2006: 621 - 625.
- [10] MOLINSKI T F, DALISAY D S, LIEVENS S L, et al. Drug development from marine natural products [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2009, 8(1): 69 - 85.
- [11] 张书军, 焦炳华. 世界海洋药物现状与发展趋势[J]. 中国海洋药物, 2012, 31(2): 58 - 60.
ZHANG S J, JIAO B H. Status and development trend of world marine drugs [J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2012, 31(2): 58 - 60.
- [12] 张艳, 吴文惠, 周培根, 等. 海洋微生物来源纤溶活性化合物的筛选及其分离[J]. 中国海洋药物, 2008, 27(6):

- 39-43.
ZHANG Y, WU W H, ZHOU P G, et al. Screening and isolation of fibrinolytic active compound from marine microorganism[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2008, 27(6): 39-43.
- [13] 王永先. 纤溶活性化合物对蛋白质结晶特性影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
WANG Y X. Investigation of effects of fibrinolytic compounds on protein crystallization characteristics [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.
- [14] SU T W, WU W H, YAN T, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of a novel marine fibrinolytic compound in Wistar rat following intravenous administrations[J]. Journal of Chromatography B, 2013, 942-943: 77-82.
- [15] 刘天宇. 冻干粉针剂冻干工艺及质量技术探讨[J]. 黑龙江中医药, 2015, 44(5): 67-68.
LIU T Y. Explore Freeze-drying and quality technology of Freeze-dried powder[J]. Heilongjiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2015, 44(5): 67-68.
- [16] 胡雄伟, 宋洪涛. 核黄素磷酸钠粉针剂处方及制备工艺研究[J]. 解放军药学学报, 2011, 27(4): 314-317.
HU X W, SONG H T. A study on the formulation and preparation technology of riboflavin sodium phosphate injectable powder [J]. Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army, 2011, 27(4): 314-317.
- [17] 崔福德, 龙晓英. 药剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 77.
CUI F D, LONG X Y. Pharmaceutics[M]. Beijing: People's Health Press, 2011: 77.
- [18] 刘丽达, 王凯. 注射用红景天制备工艺的研究[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(8): 29-30.
LIU L D, WANG K. Study on the preparation of Hong Jingtian injection [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2011, 7(8): 29-30.
- [19] 谭欢欢, 邢志华, 沈云, 等. 羧基壳聚糖纳米冻干粉的制备及表征[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2014, 30(1): 13-17.
TAN H H, XING Z H, SHEN Y, et al. Preparation and characterization of lyophilized powder of hydroxycamptothecin chitosan nanoparticles [J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2014, 30(1): 13-17.
- [20] 荣敏. 注射用哌拉西林钠/他唑巴坦钠与四种临床常用溶媒配伍的稳定性研究[J]. 中国医药指南, 2012, 10(23): 31-32.
RONG M. Injection of Piperacillin sodium/Tazobactam sodium with four commonly used in clinical research of the stability of the solvent compatibility [J]. Guide of China Medicine, 2012, 10(23): 31-32.

A study on the formulation of FGFC1 power injection

XU Beilei^{1,2}, WU Wenhui¹, ZHU Quangang², TIAN Hong³, ZHANG Ruoxi²

(1. College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China; 3. Affiliated Hospital of Chifeng University, Chifeng 024005, Inner Mongolia, China)

Abstract: To optimize the formulation and preparation technology of Fungi Fibrinolytic Compound 1 (FGFC1) powder injection by experiments, the appearance, drug content, water content, redissolving time and pH of the freeze-dried FGFC1 powder were investigated to determine the best formulation and preparation technology. When the formulation craft is FGFC1: Sodium citrate: mannitol = 1:3:10, -48 °C freeze-dried for 48 h, the appearance of the powder injection is well, the average redissolving time is (15.33 ± 1.53) s, pH = 6.86 ± 0.03, concentration of FGFC1 has no obvious change in glucose injection and mannitol injection. This freeze-dried power is stable in high humidity conditions, and has a certain degree of degradation at high temperature and strong light environment, and drug properties are very stable under low temperature conditions. The FGFC1 freeze-dried power formulation is reasonable, and the preparation technology is feasible.

Key words: FGFC1; power injection; stability; formulation