



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102813682 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201210253863. 0

(22) 申请日 2012. 07. 19

(73) 专利权人 李振刚

地址 230026 安徽省合肥市金寨路 96 号科大东区 19-303

(72) 发明人 李振刚

(74) 专利代理机构 安徽合肥华信知识产权代理有限公司 34112

代理人 余成俊

(51) Int. Cl.

A61K 9/127(2006. 01)

A61K 9/48(2006. 01)

A61K 36/13(2006. 01)

A61K 31/337(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1256949 C, 2006. 05. 24, 说明书实施例 1-9.

CN 1947703 A, 2007. 04. 18, 说明书实施例

1-6.

CN 101062095 A, 2007. 10. 31, 权利要求

1-10.

WO 2008140203 A1, 2008. 11. 20, 说明书实施例 1-11.

CN 102151302 A, 2011. 08. 17, 权利要求

1-10.

US 2009110739 A1, 2009. 04. 30, 说明书实施例 1-5.

康艳敏等. 紫杉醇脂质体的制备及质量考察. 《中国药房》. 2008, 第 19 卷 (第 28 期), 2208-2210.

吕陈峰等. 胆固醇氧化酶转化蛋黄胆固醇工艺的优化. 《无锡轻工大学学报》. 2001, 第 20 卷 (第 6 期), 555-559.

审查员 王芳菲

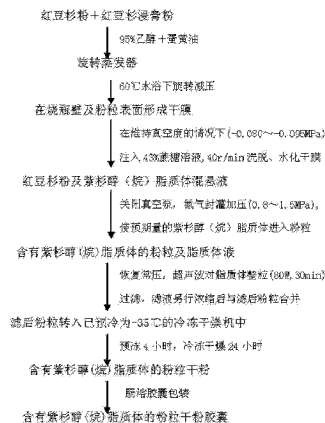
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉的技术

(57) 摘要

本发明公开了一种薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉的技术,属于医药技术领域。本发明把传统的中草药炙制方法与先进的紫杉醇(烷)脂质体的制备、富集技术相结合,炮制出富含紫杉醇(烷)脂质体、易于口服吸收、高效抗癌、低毒副作用的红豆杉粉。具体包括以下步骤:用 95% 乙醇与蛋黄油作为液体辅料,以红豆杉粉和红豆杉浸膏粉作为炙制底物,共同置于薄膜蒸发器中,在恒温(60℃水浴)、减压、不断旋转的操作下进行炙制,经水化后形成紫杉醇(烷)脂质体,然后使用真空/压力法将紫杉醇(烷)脂质体富集于红豆杉粉粒之内,使红豆杉粉成为一种富含紫杉醇(烷)脂质体的,便于口服吸收、高效低毒副作用的抗癌中草药。



1. 一种薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1)取材:

①取红豆杉浸膏粉:以 100g 作为批量单位取红豆杉浸膏粉,脱脂除杂并磨成细粉,精确测定红豆杉浸膏粉的紫杉烷含量及紫杉醇含量;

②取处方量蛋黄油:以 500g 作为批量单位取蛋黄粉,制作蛋黄油,除去蛋黄油中的蛋白质,精确测定蛋黄油的卵磷脂含量后,按紫杉烷类:卵磷脂:胆固醇处方量比 1:29:0.75 取处方量蛋黄油;

③取处方量红豆杉粉:以红豆杉胶囊每粒含紫杉醇 4.5mg 为参照量计算:

红豆杉粉处方量 = 红豆杉浸膏所含紫杉醇总毫克量 \div 4.5 \times 每个胶囊所含红豆杉粉重量;

(2)用 95% 乙醇和处方量蛋黄油作为液体辅料,以红豆杉浸膏粉和处方量红豆杉粉为炙制底物,在蒸发器内混合均匀,水浴,减压、旋转、蒸干,直至在蒸发器的瓶壁上及粉粒表面形成干膜;

(3)在继续维持瓶内真空度 $-0.080 \sim -0.095\text{MPa}$ 的情况下,向旋转瓶内注入适量冷冻保护剂,室温下缓慢旋转,待瓶壁上的干膜浸透后,继续旋转,直至将瓶壁上的干膜冲洗下来,形成粗制的紫杉醇脂质体与红豆杉粉的混悬液;

(4)继续旋转水化,并用超声波对脂质体整粒,缩小粒径;

(5)然后关闭真空泵,用氮气封灌加压至 $0.8 \sim 1.5\text{MPa}$,使含有紫杉醇脂质体及冷冻保护剂的溶液可控量地进入红豆杉粉粒的组织内部或者直到粉粒拒绝吸收液体为止;

(6)恢复常压,将瓶内粉粒混悬液倒入不锈钢离心过滤袋中,低速离心,使固液分离;

(7)将离心后的红豆杉粉粒连同浓缩后的滤液转置于冷冻干燥机中,预冻 4 小时,冷冻干燥 24 小时,制成干粉;用肠溶胶囊包装。

2. 根据权利要求 1 所述的薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉的方法,其特征在于:步骤(2)中所述的蒸发器为薄膜蒸发器。

3. 根据权利要求 1 所述的薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉的方法,其特征在于:步骤(3)中所述的冷冻保护剂为 43% 蔗糖溶液。

4. 根据权利要求 1 所述的薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉的方法,其特征在于:步骤(4)中所述的超声波功率为 80W,频率为 30-40KHz。

5. 根据权利要求 1 所述的薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉的方法,其特征在于:步骤(7)中所述的冷冻干燥机已经预冷为 -35°C 。

薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉的技术

[0001] 技术领域

[0002] 本发明涉及一种薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉的技术,属于医药技术领域。

背景技术

[0004] 近年来由于现代制药技术对中药粉炮制工艺的渗透,使得中药粉的药效显著地提高,先后出现了浓缩中药药粉、纳米中药粉、中药超微颗粒等新型粉剂,这些新型粉剂的出现,对于多数的中草药来说,避免了煎煮麻烦、服用不便的缺点,并使药物的有效成份得到一定程度的浓缩或者比较充分的释放,从而较大幅度地提高了药粉的药效。但是,磨细、释放、浓缩仅仅是对药物的物理加工,不涉及生化反应,只能在一定程度上提高药效,而不能改善药性。对于那些有效成分含量甚微、不溶或难溶于水、热敏性的中药来说,还远远不能解决问题。例如对于像紫杉醇(抗癌有效成分)这样含量甚微的红豆杉粉来说,即便是处方量红豆杉粉中的紫杉醇充分释放,也无济于药效的提高。另外,把红豆杉粉经过提取、浓缩做成浓缩中药药粉,其中紫杉醇含量也不过 0.6% 左右,它不仅距离紫杉醇针剂的纯度(99.5% 以上)遥不可及,就是做口服制剂也因含量太低,而且不溶于水,难以被胃肠吸收,很难说能有什么疗效。

[0005] 目前最好的紫杉醇抗癌制剂是紫杉醇脂质体的针剂,它使紫杉醇可溶于水、易于被组织细胞吸收。但是,制备紫杉醇脂质体针剂需要纯度很高的紫杉醇(99% 以上)为原料,它要经过紫杉醇提纯、分离、重结晶等复杂的工艺,因而成本高、价格贵,使广大癌症患者难以接受。此外,它不能口服,必须到医院静脉滴注,而且容易引起注后过敏反应,给患者的治疗带来不便。

[0006] 在国内外大规模制造紫杉醇脂质体针剂的大背景下,制备紫杉醇脂质体的技术已是驾轻就熟,加之,近年来我国中医药界把难溶于水的中药有效成分制成口服脂质体方面的成果又为我们把紫杉醇类脂质体化提供了可靠的技术基础。例如,已制成人参皂苷脂质体、香菇多糖脂质体等。显然,此类中药脂质体已经不是某一种提纯的化合物的脂质体(如紫杉醇针剂的紫杉醇脂质体),而是由多种皂苷或多糖组成的同类化合物的复合脂质体。同理,我们可以将红豆杉中的紫杉醇同类化合物(紫杉醇类)一起脂质体化,然后通过真空浓缩、冷冻干燥,使这些脂质体可控量地富集于红豆杉的粉状颗粒之中。

[0007] 另外,紫杉醇口服制剂(饮片、胶囊)迄今未能广泛应用,一个重要原因是肠道细胞对紫杉醇(烷)的吸收率低($< 6\%$)。因为小肠、肝、肾的细胞、以及肿瘤的癌细胞对紫杉醇具有外排作用,它们的细胞膜中存在一种跨膜糖蛋白——P-糖蛋白,一种与肿瘤多药耐药性有关的蛋白,是一种 ATP 能量依赖性的外排泵,将进入细胞的药物(如紫杉醇)泵出细胞外,降低药物在细胞内的浓度而影响药效。

发明内容

[0008] 本发明的目的是克服现有技术中的不足,提供一种把传统的中草药炙制方法与先

进的紫杉醇(烷)脂质体的制备、富集技术相结合的薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉技术,炮制出富含紫杉醇(烷)脂质体、易于口服吸收、高效抗癌、低毒副作用的红豆杉粉。

[0009] 为了实现上述目的本发明采用如下技术方案:

[0010] 一种薄膜超声法炙制富含紫杉醇脂质体的红豆杉粉的技术,包括以下步骤:

[0011] (1)取材:

[0012] ①取红豆杉浸膏粉:以 100g 作为批量单位取红豆杉浸膏粉,脱脂除杂并磨成细粉,精确测定红豆杉浸膏粉的紫杉烷含量及紫杉醇含量;

[0013] ②取处方量蛋黄油:以 500g 作为批量单位取蛋黄粉,采用超声强化法自制蛋黄油,除去蛋黄油中的蛋白质,精确测定蛋黄油的卵磷脂含量后,按紫杉烷类:卵磷脂:胆固醇处方量比 1:29:0.75 取处方量蛋黄油;

[0014] ③取处方量红豆杉粉:以红豆杉胶囊每粒含紫杉醇 4.5mg 为参照量计算:

[0015] 红豆杉粉处方量 = 红豆杉浸膏所含紫杉醇总毫克量 \div 4.5 \times 每个胶囊所含红豆杉粉重量;

[0016] (2)用 95% 乙醇和处方量蛋黄油作为液体辅料,以红豆杉浸膏粉和处方量红豆杉粉为炙制底物,在蒸发器内混合均匀,在 60℃ 水浴,20-30 r \cdot min⁻¹ 的条件下,减压、旋转、蒸干,直至在蒸发器的瓶壁上及粉粒表面形成干膜;

[0017] (3)在继续维持瓶内真空度 -0.080 ~ -0.095MPa 的情况下,向旋转瓶内注入适量冷冻保护剂,室温下缓慢旋转,待瓶壁上的干膜浸透后,继续旋转,直至将瓶壁上的干膜冲洗下来,形成粗制的紫杉醇(烷)脂质体与红豆杉粉的混悬液;

[0018] (4)继续旋转水化,并用超声波对脂质体整粒,缩小粒径;

[0019] (5)然后关闭真空泵,用氮气封灌加压至 0.8 ~ 1.5MPa,使含有紫杉醇(烷)脂质体及冷冻保护剂的溶液可控量地进入红豆杉粉粒的组织内部或者直到粉粒拒绝吸收液体为止;

[0020] (6)恢复常压,将瓶内粉粒混悬液倒入不锈钢离心过滤袋中,低速离心,使固液分离;

[0021] (7)将离心后的红豆杉粉粒连同浓缩后的滤液转置于冷冻干燥机中,预冻 4 小时,冷冻干燥 24 小时,制成干粉;用肠溶胶囊包装。

[0022] 所述步骤(2)中的蒸发器为薄膜蒸发器。

[0023] 所述步骤(3)中的冷冻保护剂为 43% 蔗糖溶液。

[0024] 所述步骤(4)中的超声波功率为 80W,频率为 30-40KHz。

[0025] 所述步骤(7)中的冷冻干燥机已经预冷为 -35℃。

[0026] 本发明的优点:

[0027] (1)本发明沿袭中草药的炙制炮制工艺,把由红豆杉天然浸出的紫杉醇(烷),实施脂质体化后,富集于红豆杉的粉状颗粒之内,完善地解决了紫杉醇(烷)难溶于水、难于吸收的问题。

[0028] (2)这种紫杉醇粗制物中的许多紫杉烷类不仅有抗癌作用,而且具有抗多药耐药性(抑制 P-糖蛋白的活性),显著地增加了紫杉醇(烷)类在肠道及肿瘤的吸收,提高了药效,降低了毒副作用。

[0029] (3) 红豆杉粉的粉状颗粒具有最大的吸收表面积与最大的吸收空间,可以让紫杉醇(烷)脂质体可控量地富集到粉粒之内,使其具有与紫杉醇脂质体针剂可比的效应。

[0030] (4) 把这些粉状颗粒装入肠溶胶囊直接口服,就避免了胃液消化破坏、煎煮失效的问题。

[0031] (5) 这种含有紫杉醇(烷)脂质体的红豆杉粉的加工程序较紫杉醇脂质体针剂简单,不需要进行高纯度紫杉醇(99%以上)的分离、提纯工艺,大幅度地降低了成本,减少了污染,是一种高效、低毒、廉价、服用方便的口服制剂,利于广大癌症患者的使用与治疗。

附图说明

[0032] 图 1 为炙制红豆杉粉工艺流程图。

具体实施方式

[0033] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

实施例

[0034] (1) 取材:

[0035] ①取红豆杉浸膏粉 100g (昆明格林杨生物工程有限公司供应,紫杉醇含量为 1%),进行脱脂除杂并磨成细粉,精确测定红豆杉浸膏的紫杉烷含量及紫杉醇含量;

[0036] ②取处方量蛋黄油:取蛋黄粉 500g,按超声强化法自制蛋黄油,除去蛋黄油中的蛋白质,使含 80% 左右的卵磷脂及少量胆固醇,精确测定蛋黄油的卵磷脂含量后,按紫杉烷类:卵磷脂:胆固醇处方量比为 1:29:0.75 取处方量蛋黄油;

[0037] ③取处方量红豆杉粉:以市售红豆杉胶囊每粒含紫杉醇 4.5mg 为参照量计算:

[0038] 红豆杉粉处方量 = 100g 浸膏所含紫杉醇总毫克量 \div 4.5 \times 每个胶囊所含红豆杉粉重量;

[0039] (2) 工艺方法:

[0040] 用 1500-2000ml 95% 乙醇和处方量蛋黄油作为液体辅料,以 100g 红豆杉浸膏粉和处方量红豆杉粉为炙制底物,全部物料在薄膜蒸发器内混合均匀后,在 60℃ 水浴,20-30 r \cdot min⁻¹ 的条件下,减压、旋转、蒸干,直至在旋转瓶的玻璃壁上及粉粒表面形成干膜。在继续维持瓶内真空度 0.080 ~ -0.095MPa 的情况下,向旋转瓶内注入 1000ml 43% 蔗糖溶液,室温(25℃)下缓慢旋转约 1-3 min,待瓶壁上的干膜浸透后,继续 40 r \cdot min⁻¹ 旋转,直至将瓶壁上的干膜冲洗下来,形成粗制的紫杉醇(烷)脂质体与红豆杉粉的混悬液。继续旋转水化 1 小时,并用超声波(80W,30-40KHz,30min)对脂质体整粒,缩小粒径。然后关闭真空泵,用氮气封灌加压(0.8 ~ 1.5MPa),使含有紫杉醇(烷)脂质体及蔗糖的溶液可控量地进入红豆杉粉粒的组织内部或者直到粉粒拒绝吸收液体为止。恢复常压,将瓶内粉粒混悬液倒入不锈钢离心过滤袋(100 目),低速离心(1000g 左右),使固液分离。将离心后的红豆杉粉粒连同浓缩后的滤液转置于已经预冷为 -35℃ 的冷冻干燥机中,预冻 4 小时,冷冻干燥 24 小时,制成干粉。用肠溶胶囊包装。

[0041] 按康艳敏-梅兴国的离心法,测出紫杉烷(含紫杉醇)的包封率为 65.14 \pm 1.63 % (RSD=1.82)。紫杉烷定量按金涛方法测定,其中紫杉醇含量占 40% 左右。

[0042] (3) 动物抑瘤试验

[0043] 依 Maharaj 法, 将上述冷冻干燥后的富含紫杉醇(烷)脂质体的红豆杉干粉过筛(≤ 50 目), 取 50g 混悬于 200ml 液体石蜡中, 以 260rpm 搅拌分散, 加入 10% (w/v) 邻苯二甲酸醋酸纤维素的丙酮-乙醇(9:1) 溶液 20ml, 继续搅拌 5min 使形成微囊, 再加入氯仿 75ml 继续高速搅拌使微囊球固化, 离心除去混悬介质。将微囊混悬于氯仿中, 于室温下通风干燥即得富含紫杉醇(烷)脂质体的红豆杉粉肠溶微囊。此种微囊在给小鼠灌胃喂药后, 可避免胃肠消化液对脂质体的破坏。

[0044] 小鼠 S_{180} 肉瘤由中科院北京药物研究所提供, 以腹水型传代保种, 临用时抽取 S_{180} 肉瘤瘤液腹水, 以灭菌生理盐水 1:4 稀释备用。用体重 18g-22g 的昆明种小鼠 50 只, 每只小鼠前肢腋下注射 0.2ml S_{180} 瘤株细胞悬液(细胞浓度: 2×10^7 /ml)。24h 后按体重随机分为 5 组, 每组 10 只, 雌雄各半。5 个组分别做以下实验:

[0045] ①灌胃空白对照组(水) ②灌胃紫杉醇组(30mg/Kg)

[0046] ③灌胃低剂量紫杉醇脂质体肠溶微囊组(15mg/Kg)

[0047] ④灌胃高剂量紫杉醇脂质体肠溶微囊组(30mg/Kg)

[0048] ⑤注射紫杉醇脂质体组(15mg/kg; 注射给药途径为尾静脉, 给药体积为 0.2ml)。

[0049] 各组于接种后 1、3、5d 分别地按相应剂量给予注射紫杉醇脂质体液或灌胃药物, 并观察记录动物服药后的行为变化。分别于用药前、和接种后第 11d 处死前称体重, 随即处死动物, 解剖剥离肿瘤并称重。根据以下公式计算抑瘤率:

[0050] 肿瘤抑瘤率 = $(1 - \text{给药组平均瘤重} / \text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$

[0051] 检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计方法采用配对 t 检验。结果见下表:

[0052]

[0053]	组别	剂量 mg/Kg	动物数	死亡数	瘤重 (g)	抑瘤率 (%)
[0054]						

[0055]	灌胃空白对照组(水)		10	0	1.70 ± 0.21	
--------	------------	--	----	---	-------------	--

[0056]	灌胃紫杉醇组	30mg/Kg	10	0	1.65 ± 0.25	
--------	--------	---------	----	---	-------------	--

[0057]	灌胃低剂量紫杉醇	15mg/Kg	10	0	1.39 ± 0.87	15.23
--------	----------	---------	----	---	-------------	-------

[0058]	脂质体肠溶微囊组					
--------	----------	--	--	--	--	--

[0059]	灌胃高剂量紫杉醇	30mg/Kg	10	0	0.95 ± 0.38**	44.69
--------	----------	---------	----	---	---------------	-------

[0060]	脂质体肠溶微囊组					
--------	----------	--	--	--	--	--

[0061]	注射紫杉醇脂质体组	15mg/kg	10	0	0.92 ± 0.25**	45.48
--------	-----------	---------	----	---	---------------	-------

[0062]

[0063] 注: * 表示与对照组相比, $P < 0.05$; ** 表示与对照组相比, $P < 0.01$ 。

[0064] 由上表可见, 灌胃高剂量紫杉醇脂质体肠溶微囊组(30mg/Kg)和注射紫杉醇脂质体组(15mg/kg)的抑瘤效应显著并基本上相同; 而灌胃低剂量紫杉醇脂质体肠溶微囊组(15mg/Kg)有比较微弱的抑瘤作用, 但与对照组相比, 无显著性差异($P > 0.05$)。说明小鼠口服紫杉醇脂质体肠溶微囊可以起到与注射紫杉醇脂质体相同的效果; 只不过需要前者的剂量是后者的一倍左右。这可能是因为微囊的脂质体的包封率(65%左右)要比注射紫杉醇

脂质体的包封率(90%以上)低,以及口服后脂质体要被胃肠消化液破坏掉一部分。这可以通过提高包封率及加强在消化道中的保护来逐步缩小微囊的剂量。给药后动物行为和小鼠体重变化率均与对照组接近,可见无明显的毒副反应。

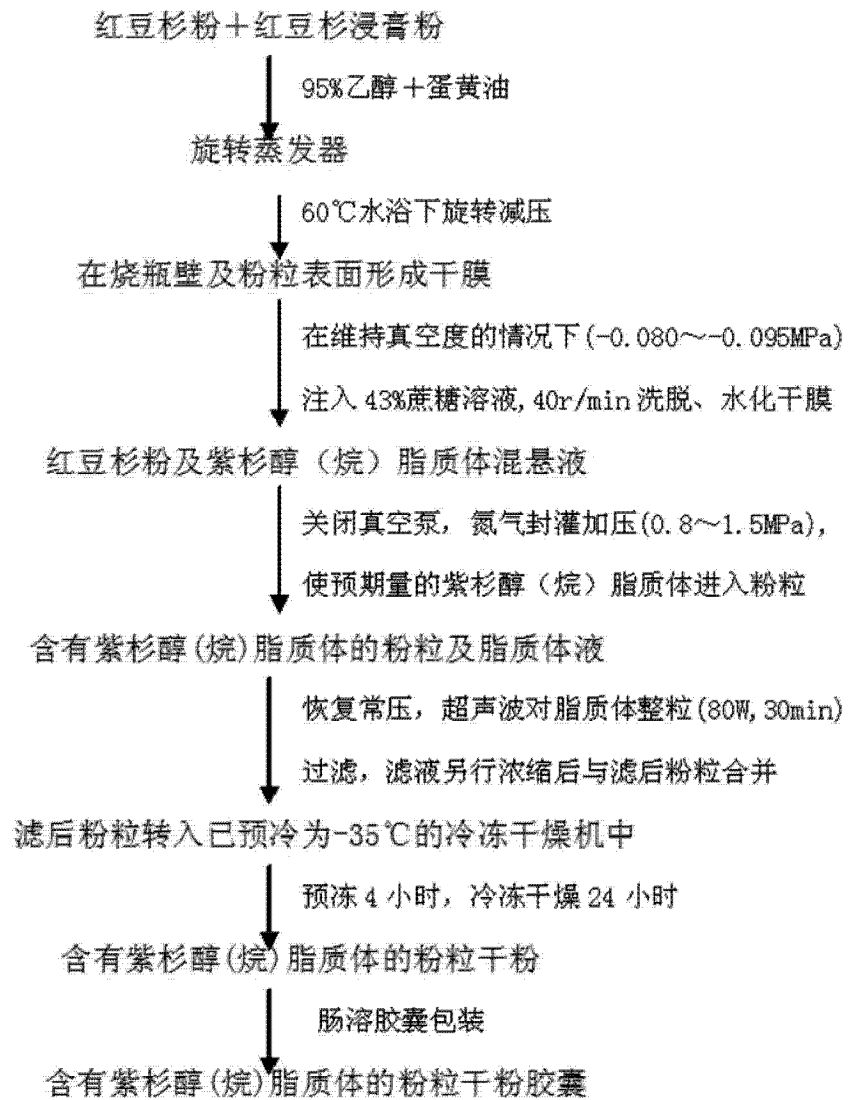


图 1