

研究论文

TE-01 静脉注射乳剂的制备及处方工艺优化

孙子杭¹, 胡凯莉¹, 胡红霞², 徐玮², 王燕飞¹, 涂亮星¹, 奉建芳^{1*} (1. 上海中医药大学穆拉德中药现代化研究中心, 上海 201203; 2. 武汉同源药业有限公司研究所, 武汉 430074)

摘要: 目的 制备 TE-01 静脉注射乳剂并进行处方工艺优化。方法 采用高压均质方法制备 TE-01 乳剂, 并通过正交设计优选 TE-01 静脉注射乳剂的最佳处方及其制备工艺。结果 TE-01 静脉注射乳剂最佳处方及工艺为蛋黄卵磷脂含量 1.2%, 分散转速 16 000 r·min⁻¹, 均质压力 550 bar。结论 高压均质法可以制备出性质稳定的 TE-01 乳剂。

关键词: TE-01; 静脉注射乳剂; 处方工艺优化

中图分类号: TQ460.60

文献标识码: A

文章编号: 1672-2981 (2012) 04-0241-04

doi: 10.3969/j.issn.1672-2981.2012.04.001

Preparation and formulation optimization of TE-01 intravenous emulsion

SUN Zi-hang¹, HU Kai-li¹, HU Hong-xia², XU Wei², WANG Yan-fei¹, TU Liang-xing¹, FENG Jian-fang^{1*} (1. Murad Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203; 2. Institute of Wuhan Tongyuan Pharmaceutical Ltd., Wuhan 430074)

Abstract: Objective To prepare and optimize the formulation and preparation procedure of TE-01 intravenous emulsion. **Methods** High pressure homogenization method was used to prepare TE-01 intravenous emulsion. The formulation and preparation procedure of TE-01 intravenous emulsion were optimized by orthogonal experiments. **Results** The optimal formulation consisted of 1.2% lecithin phospholipids with the dispersion rate at 16 000 r·min⁻¹, and the homogenization pressure was 550 bar. **Conclusion** Stable TE-01 emulsion can be prepared by high pressure homogenization method.

Key words: TE-01; intravenous emulsion; formulation optimization

近年来静脉注射乳剂作为药物载体应用越来越广泛, 静脉注射乳剂具有以下优点: 作为油相的精制大豆油及作为乳化剂的大豆磷脂对人体无毒, 可迅速代谢; 有利于药物的储存, 增加药物的稳定性; 可降低毒性和刺激性, 延长药效时间等。

TE-01 (分子式为 C₂₁H₂₃C₁₂NO₆) 是二氢吡啶钙通道阻滞剂, 具有降压作用, 尤其是对心脏手术期间的急性血压升高有特效, 且效果可持续 72 h, 适用于口服药物无效或患者不方便使用口服药物时使用, 起效迅速, 疗效显著, 已获得 FDA 的批准。TE-01 是水难溶性物质, 将其溶于油相中制成含药静脉注射乳剂, 有利于增加药物溶解度及稳定性, 与目前许多静脉注射经肾和 (或) 肝代谢的抗高血压药不同, TE-01 静脉注射乳剂可以在血液和组织中被代谢, 因而不在于体内蓄积。但本品制剂价格昂贵, 国内尚无进口, 因此本品具有较高的研究价值。本文参考了国外上市产品的处方, 并

对其进行了处方及工艺的优化, 以制备具有较好稳定性的 TE-01 静脉注射乳剂。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC-20 高效液相色谱仪及紫外检测器 (日本岛津); FA-25 型高剪切分散乳化机 (上海弗鲁克流体机械制造有限公司); Nicomp380 Z3000 粒度分析仪 (苏州微流纳米生物技术有限公司); 恒温磁力搅拌器 (上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); NanoGenizer 型高压均质机 (苏州微流纳米生物技术有限公司); 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器); 超声波清洗器 (上海冠特超声仪器有限公司); AL204 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); PHSJ-3F 型实验室 pH 计、旋涡混合器 (上海精科实业有限公司); 真空干燥器 (上海齐欣科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

作者简介: 孙子杭, 女, 硕士研究生, 主要从事中药新型给药系统的研究, Tel: 18917248010, E-mail: antasports5566@163.com

* 通讯作者: 奉建芳, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药新型给药系统的研究, Tel: (021) 51322046, E-mail: fjf@shutcm.edu.cn

TE-01 (武汉同源药业, 纯度 > 99%); 大豆油 (铁岭北亚药用油有限公司); 甘油 (湖南尔康制药有限公司, 药用级); 纯化蛋黄磷脂 (Lipoid E80, Lipoid, 德国, 药用级); 油酸 (上海东尚实业有限公司, 药用级); 水为双蒸水。

2 方法与结果

2.1 考察指标的测定方法

2.1.1 乳剂粒径测定方法 采用粒度仪测定乳剂的粒径, 将乳剂稀释一定倍数, 置于粒度仪中测定其粒径。

2.1.2 稳定常数的测定方法 采用乳剂离心前后光密度变化百分率 (即稳定常数 K_c), 考察其离心稳定性。取灭菌后的乳剂, 以 $4\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ 转速离心 15 min, 分别精密量取离心前、后样品 $50\ \mu\text{L}$ 至 $10\ \text{mL}$ 量瓶中, 用水稀释至刻度, 于 $500\ \text{nm}$ 处测定吸光度 (离心前样品为 A_0 , 离心后样品为 A)。计算稳定性常数 $K_c = |A_0 - A| / A_0$ 。 K_c 越小, 稳定性越好。

2.1.3 外观评价方法 一等为白色乳剂, 无油滴, 静止时不分层, 摇动后不挂壁; 二等为白色乳剂, 无油滴, 静止时不分层, 摇动后液体从内壁快速滑落, 可见蓝色乳光; 三等为白色或淡黄色乳剂, 静止时不分层, 摇动后液体从内壁滑落较慢, 有挂壁, 可见淡蓝色乳光, 四等为白色或淡黄色乳剂, 静止略有分层, 振摇后可分散, 液体滑落更慢, 挂壁更多; 五等为白色或淡黄色乳状液, 液面可见油滴或油层。

2.1.4 药物含量的测定方法

① 色谱条件 色谱柱: 十八烷基硅烷键合硅胶柱 ($200\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$); 流动相: 乙腈-甲醇-pH 3.00 磷酸盐缓冲液 (2.2:1:1.2); 检测波长: $220\ \text{nm}$; 流速: $1.5\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: $20\ \mu\text{L}$; 柱温: $40\ ^\circ\text{C}$ 。在此色谱条件下, 样品中 TE-01 峰形良好, 辅料对其测定无干扰, 应用该色谱条件可满足分离及检测要求, 色谱图见图 1。

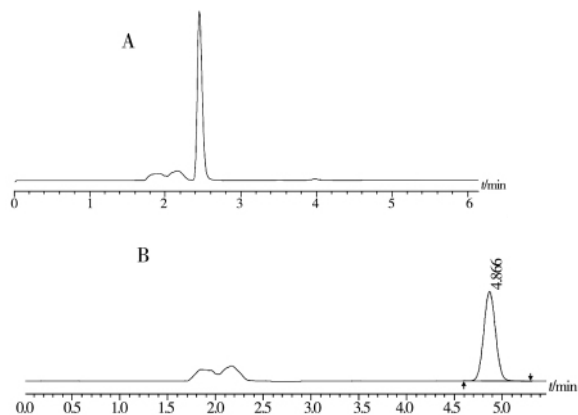


图 1 TE-01 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatogram of TE-01

A. 空白乳剂 (blank emulsion); B. TE-01

② 供试品溶液的配制 取乳剂 $40\ \mu\text{L}$ 放入 $10\ \text{mL}$ 容量瓶中, 加破乳剂 $1\ \text{mL}$, 用甲醇定容, 摇匀即得。

③ 线性关系考察 取 TE-01 适量, 精密称定, 用流动相配成浓度分别为 2.5 、 2 、 0.5 、 0.2 、 0.05 、 $0.02\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液; 分别取各浓度溶液 $20\ \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 记录色

谱图及峰面积, 以 TE-01 的峰面积 y 对浓度 x 进行线性回归, 标准曲线方程为: $y = 3\ 961 \times 10^4 x + 480.9$, $r^2 = 0.9998$, 结果表明, TE-01 在 $0.02 \sim 2.5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

④ 回收试验^[1] TE-01 供试品适量, 分别配制高、中、低 3 种浓度的溶液各 3 份, 作为供试品溶液。分别取上述溶液各 $20\ \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪, 记录峰面积, 计算得平均回收率 99% , RSD 为 0.9% ($n=9$), 结果表明, 该方法测定 TE-01 含量回收率较高。

⑤ 精密度试验 配制高、中、低 3 种浓度的 TE-01 对照品溶液, 进样 $20\ \mu\text{L}$, 于日间连续测定, 计算 RSD 分别为 1.9% 、 1.7% 、 1.5% , 结果表明方法精密度良好。

⑥ 稳定性试验 取浓度为 $0.2\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品溶液, 分别于 0 、 2 、 4 、 6 、 $8\ \text{h}$ 测定峰面积, 求得 RSD 为 0.03% , 表明供试液在 $8\ \text{h}$ 内稳定。

⑦ 重复性试验 配制浓度为 $0.2\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试品溶液, 连续进样 6 次, RSD 为 1.1% , 符合实验要求。

2.2 TE-01 静脉注射乳剂处方及工艺单因素考察

在参考文献^[2-4]和预试验基础上, 确定乳剂的初步处方和制备工艺: 大豆油 10% 、甘油 2.25% 、油酸 0.5% 、磷脂 1.2% 、TE-01 0.5% , 称取油相各成分置于容器中, 搅拌至完全分散; 称取水相各成分, 置于容器中搅拌至完全分散。然后将油相、水相加热至 $70\ ^\circ\text{C}$ 并保持恒定, 将油相缓慢滴加到水相中, 高速剪切 $10\ \text{min}$, 过高压乳匀机均质即得, 以粒径和稳定常数为指标, 进行单因素考察。

2.2.1 大豆油浓度的选择^[5] 在 $100\ \text{mL}$ 乳剂中, 蛋黄卵磷脂用量为 $1.2\ \text{g}$, 投药量为 $50\ \text{mg}$, 考察不同大豆油浓度对乳剂含量、稳定常数和粒径的影响。结果显示蛋黄卵磷脂浓度对乳剂稳定常数的影响不明显; 乳剂的粒径随大豆油用量增大而增大, 其含量随大豆油用量增大而减小, 故选择大豆油浓度为 10% , 筛选结果见表 1。

2.2.2 乳化剂浓度的选择^[6] 在 $100\ \text{mL}$ 乳剂中, 大豆油用量为 $10\ \text{g}$, 投药量为 $50\ \text{mg}$, 考察不同蛋黄卵磷脂浓度对乳剂含量、稳定常数和粒径的影响。结果显示蛋黄卵磷脂浓度对乳剂含量的影响不明显; 乳剂粒径随聚蛋黄卵磷脂用量的增加而减小。当蛋黄卵磷脂浓度为 1.2% 时, 稳定常数最小, 故选择乳化剂的浓度为 1.2% , 筛选结果见表 1。

表 1 大豆油、蛋黄卵磷脂用量对乳剂性质的影响

Tab 1 Effect of soybean oil and lecithin phospholipid content on emulsion

组分 (composition)	浓度 (concentration) /%	粒径 (particle size) / nm	稳定常数 (stability parameter)	含量 (content) /%
大豆油	10	203 ± 3.12	0.05 ± 0.03	84 ± 0.85
	20	227 ± 1.40	0.05 ± 0.01	80 ± 1.17
	30	245 ± 2.56	0.06 ± 0.02	79 ± 1.13
磷脂	0.6	224 ± 2.96	0.10 ± 0.09	87 ± 1.24
	1.2	203 ± 3.12	0.05 ± 0.03	84 ± 0.85
	1.8	191 ± 1.54	0.05 ± 0.05	86 ± 1.59

2.2.3 分散转速^[7] 在高速分散搅拌下, 将油相缓缓加入水相中, 补足注射用水, 经高压均质形成乳剂, 考察不同分散转速对乳剂稳定性的影响。结果显示: 分散转速在一定范围内增加乳剂的含量增加、粒径减小, 有利于乳剂的稳定性, 分散 16 000 与 19 000 r · min⁻¹ 粒径和稳定常数无明显差异, 故选择分散转速为 16 000 r · min⁻¹, 结果见表 2。

表 2 分散转速对乳剂性质的影响

Tab 2 Effect of dispersion rate on emulsion

分散转速 (dispersion rate) /r · min ⁻¹	粒径 (particle size) /nm	稳定常数 (stability parameter)	含量 (content) /%
10 000	198±2.25	0.04±0.03	76±0.74
13 000	203±3.12	0.05±0.03	84±0.85
16 000	197±3.26	0.04±0.02	93±1.61
19 000	194±3.27	0.04±0.02	87±0.18

2.2.4 高压均质工艺^[8-9] 压力分 350、550、750 bar 3 个水平; 均质次数分为 5、10、15 次 3 个水平。比较不同均质压力和均质次数对乳剂粒径和稳定性的影响。结果显示: 增大乳均压力和增加乳均次数均能使乳剂粒径减小, 稳定性增加, 含量降低, 且当乳均压力为 550 bar, 乳均次数为 10 次时, 外观为一等, 故选择此高压均质工艺。高压乳均压力和均质次数考察结果见表 3。

表 3 均质次数和压力对乳剂性质的影响

Tab 3 Effect of the pressure and times of homogenization on emulsion

工艺参数 (parameter)	水平 (level)	粒径 (particle size) /nm	稳定常数 (stability parameter)	含量 (content) /%	外观 (appearance)
均质次数	5 次	236±4.04	0.07±0.01	83±0.72	二等
	10 次	203±3.12	0.05±0.03	84±0.85	一等
	15 次	195±1.11	0.01±0.02	75±0.94	二等
均质压力	350 bar	252±3.57	0.01±0.02	96±0.71	二等
	550 bar	203±3.12	0.05±0.03	84±0.85	一等
	750 bar	178±2.97	0.02±0.01	78±1.40	一等

2.3 正交试验

由单因素考察结果可知, 蛋黄卵磷脂、分散转速及均质压力以对乳剂的性质影响较大。采用正交设计法以稳定常数、粒径、含量为指标, 考察不同水平的三因素对乳剂质量的影响^[10-11], 由于是多指标正交试验, 故采用综合比较法对多指标进行评分, 评分规则: 以试验 2 粒径 247 nm 为例, 设定粒径最小值 152 nm 为 10 分, 最大值 272 nm 为 0 分, 根据公式 10 - (粒径各数值 - 最小值) / (最大值 - 最小值) 得到试验 2 粒径 247 nm 所对应的分数为 9.21, 同理, 稳定常数最小值 0.02 设为 10 分, 最大值 0.09 设为 0 分; 含量最大值 82% 为 10 分, 最小值 68% 为 0 分, 各考察指标数值的评分根据上公式得出。因素水平表见表 4, 正交试验结果和方差分析见表 5、6。

根据表 5~6, 对正交试验结果进行直观分析和方差分析, 可知各影响因素对乳剂质量的影响大小依次为 B>C>A, 从而得到最佳处方工艺组合为 B₃A₂C₂, 即蛋黄卵磷脂含量为 0.72 g, 分散转速为 16 000 r · min⁻¹, 均质压力为 550 bar。

2.4 TE-01 静脉注射乳剂最佳处方及工艺验证

TE-01 静脉注射乳剂的处方为: TE-01 0.5 g、大豆油 100.0 g、蛋黄卵磷脂 12.0 g、油酸 0.1 g、甘油 22.5 g、注射用水至 1 000 mL。

表 4 因素水平表

Tab 4 Factor and level of orthogonal design

水平 (level)	因素 (factor)		
	A 磷脂浓度 (phospholipid concentration) /%	B 分散转速 (dispersion rate) / r · min ⁻¹	C 均质压力 (pressure) /bar
1	0.6	10 000	350
2	1.2	13 000	550
3	1.8	16 000	750

表 5 正交设计方案与结果

Tab 5 Orthogonal design

组别 (group)	A	B	C	D	稳定常数 (stability parameter)	粒径 (particle size) /nm	含量 (content) /%	综合评分 (score)
1	1	1	1	1	0.06 (4.29)	272 (0)	80 (8.57)	4.29
2	1	2	2	2	0.07 (2.86)	247 (9.21)	82 (10)	7.36
3	1	3	3	3	0.03 (8.57)	245 (9.23)	79 (7.86)	8.55
4	2	1	2	3	0.02 (10)	194 (9.65)	68 (0)	6.55
5	2	2	3	1	0.04 (7.14)	191 (9.68)	82 (10)	8.94
6	2	3	1	2	0.06 (4.29)	212 (9.50)	78 (7.14)	6.98
7	3	1	3	2	0.09 (0)	152 (10)	78 (7.14)	5.71
8	3	2	1	3	0.05 (5.71)	199 (9.61)	77 (6.43)	7.25
9	3	3	2	1	0.03 (8.57)	197 (9.63)	82 (10)	9.40
k ₁	6.73	5.52	6.17	7.54				
k ₂	7.49	7.85	7.77	6.68				
k ₃	7.45	8.31	7.73	7.45				
R	0.76	2.79	1.60	0.86				

表 6 方差分析表

Tab 6 Analysis of variance

方差来源 (source of variance)	离差平方和 (sum of square)	自由度 (freedom)	F 值 (F value)	显著性检验 (significance)
A	1.092	2	0.818	
B	13.459	2	10.073	$P < 0.10$
C	4.984	2	3.731	

注 (note): $F_{0.10}(2, 2) = 9.00$.

取处方量的油酸、TE-01 加入大豆油中, 加热搅拌至溶解, 制成油相; 甘油、蛋黄卵磷脂加入水中, 搅拌溶解后充氮气 15 min, 制成水相。水相、油相均加热至 70 °C 备用。将油相缓慢注入水相中, 在转速为 16 000 r · min⁻¹ 分散均匀, 制成初乳; 然后在 550 bar 高压均质机中均质 10 次, 制成乳剂, 用氢氧化钠溶液调节乳剂 pH 7.0, 充氮气, 压橡皮塞, 压铝盖, 121 °C 条件下灭菌 15 min 即得终乳制剂。测定其粒径为 (364 ± 4.46) nm, 稳定常数为 (0.17 ± 0.02), TE-01 含量为 (83 ± 0.63)%, 故本品质量稳定, 粒径、含量和稳定常数符合静脉注射用乳剂的要求。

3 讨论

3.1 乳剂粒径

对于静脉注射乳剂粒径大小的要求, 到目前为止尚未有正式规定, 但若乳剂粒径过大容易阻塞毛细血管, 为保证其安全性, 乳剂的粒径应控制在 1 000 nm 以下。本实验所制备乳剂的粒径在 200~400 nm, 符合安全性要求。

3.2 搅拌温度的选择

实验中, 油相需要加热搅拌才能溶解, 过高的温度会使大豆油氧化降解, 导致乳剂有关物质增加, 所以溶解过程中保持油相的温度为 70 °C, 将油相置于水浴中加热, 可以防止局部温度过高。

3.3 乳化剂的选择

乳化剂很大程度决定了静脉注射乳剂的稳定性、生物利用度等性质, 因此, 选择良好的乳化剂至关重要。静脉注射乳剂的制备多采用蛋黄卵磷脂作为乳化剂, 其中以 Lipoid 公司生产的 Lipoid E80 最佳。因 Lipoid E80 主要含有 80% 的磷脂酸, 还含有 8% 的脑磷脂、3% 的鞘磷脂、少量溶血磷脂以及微量的带负电荷的其他磷脂, 所以既可以供帮助形成脂肪乳所需要的溶血磷脂 (但溶血磷脂有较高的溶血性, 其在磷脂乳化剂中的含量控制在较低的水平为好), 又可以使得脂肪乳表面呈负电荷, 制得的脂肪乳效果较好。本实验选用 Lipoid E80 作为乳化剂, 并对其浓度进行了筛选, 选择磷脂含量为 1.2% 所准备的乳剂质量较好。

3.4 稳定剂的选择

为了提高乳剂的稳定性, 考虑加入稳定剂。乳剂的界面膜往往因载入药物而发生改变, 失去稳定性, 需要加入能定位在界面膜的稳定剂, 它通常是半亲水、半亲油、表面活性不高的物质, 因为能增大分子间作用力和乳滴的表面电荷, 所以可提高界面膜的稳定性。本实验选用油酸作为稳定剂, 有增大乳剂界面膜强度、使乳剂 zeta 电位绝对值升高的作用。

3.5 大豆油对乳剂的影响

用于制备注射乳剂的大豆油要严格控制其质量, 碘值、酸价、皂化价、过氧化值、折光率及黏度等应符合药典要求, 质量不合格的大豆油对乳剂的制备有一定影响, 氧化降解的杂质会使乳剂不稳定。

4 小结

本文以离心稳定常数、粒径、含量为主要质量评价指标, 采用单因素法筛选了影响乳剂制备的因素和水平, 正交设计试验优化了处方和工艺, 由最佳处方及工艺制备的 TE-01 静脉注射乳剂符合注射要求, 稳定性好。

参考文献

- [1] 贾娜, 曹华, 胡凯莉. TRH-03 肠溶微丸的制备及处方优化[J]. 中 南 药 学, 2011, 9 (10): 737-739.
- [2] 吴国豪. 长链脂肪乳剂及中长链脂肪乳剂水解速率的比较研究[J]. 肠外与肠内营养, 2002, 9 (1): 41-44.
- [3] 林巧平, 周建平. 药物载体脂肪乳的研究与应用[J]. 药学进展, 2005, 29 (8): 359.
- [4] Ogawa S, Decker EA, Mc Clements DJ. Production and characterization of o/w emulsions containing cationic droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes[J]. J Agric Food Chem, 2003, 51 (9): 2806-2812.
- [5] 晁利刚. 复方环丙沙星乳剂的研制及其质量评价[D]. 河南: 河南农业大学, 2009.
- [6] 曹海燕. 维生素 E 静脉纳米乳剂的制备与研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2005.
- [7] 杨青艳, 吴道澄, 吴红, 等. 氟尿嘧啶纳米乳剂的制备及性质[J]. 解放军药学学报, 2005, 21 (3): 170-173.
- [8] 赵晓. 莪术醇静脉注射亚微乳剂的研究[D]. 北京: 北京协和医学院药物研究所, 2008.
- [9] 乔飞. 鸦胆子油微乳的处方研究及质量评价[D]. 广东: 广东药学院, 2009.
- [10] 李学涛. 异长春花碱静脉注射乳剂的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [11] 张建春, 李培勋, 王原. 环磷酰胺微乳制剂的研制[J]. 中国医院医药杂志, 2003, 23 (1): 9.

(收稿日期: 2012-02-10; 修回日期: 2012-03-10)