

文章编号: 1006-2858(2009)01-0006-05

华蟾素注射乳剂的制备及制剂质量的研究

董岩¹, 罗蒙蒙², 姜同英¹, 邱敦有¹, 梁鑫³, 王思玲¹

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁沈阳 110016 2. 沈阳市药品快速检验所, 辽宁沈阳 110013

3. 沈阳药科大学生命科学与生物制药学院, 辽宁沈阳 110016)

摘要: 目的 制备稳定合格的华蟾素注射乳剂, 完善已有的含量测定方法, 并对制剂的质量进行研究。方法 采用高压乳匀法制备华蟾素注射乳剂, 并在华蟾素注射液中5羟色胺含量测定方法(WS3-B-3045-98)的基础上, 建立准确、稳定、操作简便的华蟾素注射乳剂中指标性成分含量的测定方法。结果 5羟色胺含量的最佳测定条件为温度不低于20℃, 且在加入显色剂后30~35 min内测定, 乳剂中5羟色胺含量为(11.25±0.54) mg L⁻¹; 华蟾素注射乳剂的粒径为(87.7±16.1) nm, zeta电位为-23.7 mV, 渗透压偏高渗, H₁₈值为5.31, 黏度为3.922×10⁻³ Pa·s, K_e为2.5%。结论 华蟾素注射乳剂各项指标基本符合《中华人民共和国药典》2005版静脉注射制剂及部颁标准中华蟾素制剂含量的要求。

关键词: 华蟾素; 乳剂; 含量测定; 高压乳匀法; 5羟色胺

中图分类号: R94 **文献标志码:** A

华蟾素是以传统中药材中华大蟾蜍 (*Bufo bufo gargarizans* Cantor) 或黑眶蟾蜍 (*Bufo melanostictus* Schneid) 的阴干全皮为主要原料, 经提取精制而成。蟾皮性辛、凉, 微毒, 具有清热解毒、利水消肿、抗癌止痛等多种功效^[1]。华蟾素成分复杂, 其水溶性成分中含有大量的吲哚类生物碱, 如5羟色胺(5-HT)、蟾蜍色胺、蟾蜍特尼、蟾蜍硫磺等; 另外还含有蟾毒灵、脂蟾毒配基、华蟾酥毒基等蟾毒内脂类成分以及还原糖、氨基酸、蟾蜍毒苷元与精氨酸复合物等多种成分^[2-4]。药理实验表明, 华蟾素具有抗肿瘤、抗病毒、消炎、止痛及提高机体免疫力等多种药理作用, 且华蟾素中所含有的水溶性及脂溶性成分均具有抗肿瘤活性^[3-5-8]。乳剂作为药物载体在体内具有选择性分布并且能相对地起到缓释长效的作用, 提高药物疗效, 降低毒性及不良反应, 具有实用价值^[9]。利用相似相溶原理使蟾皮提取物中的蟾毒内脂类脂溶性成分被乳剂中的油相包裹, 既可以提高脂溶性成分的溶解度, 提高制剂的稳定性, 也可以改善药物在体内的组织分布特征, 增强药效, 并降低蟾毒内脂类成分的不良反应。目前还未见华蟾素注射乳剂的上市产品, 作者将其制成符合《中华人民共和国药典》2005版关于静脉注射制剂及部颁标准中华

蟾素制剂含量要求的稳定合格的注射用乳剂, 同时建立准确、稳定、简便的含量测定方法, 并对其基本性质进行研究。

1 仪器与材料

722光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂), 自动平衡微型离心机(北京医用离心机厂), JY92-II超声波细胞粉碎机(浙江宁波新芝科器研究所), NanoGenizer纳米高压均质机(苏州微流纳米生物技术有限公司), 集热式恒温加热磁力搅拌器(河南巩义市英峪予华仪器厂), Nicomp380 Z3000粒度测定仪(苏州微流纳米生物技术有限公司), Delsa440SX电势粒度仪(美国BECKMAN COULTER公司), Vapro5220渗透压计(美国WESCOR公司), WMY-01数字温度计(上海医用仪表厂), 乌氏黏度计(自制)。

干蟾皮提取液(自制), 大豆卵磷脂(上海太伟药业有限公司), 精制大豆油(辽宁铁岭北亚药用油有限公司), E₈(德国BASF公司), 5羟色胺对照品(中国药品生物制品检定所), 其他试剂(分析纯, 市售)。

2 方法与结果

收稿日期: 2008-04-01

作者简介: 董岩(1980-), 男(汉族), 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士研究生, E-mail: dongyan00@hotmail.com; 王思玲(1962-), 女(汉族), 辽宁沈阳人, 教授, 博士, 主要从事生物大分子给药系统及微粒分散药物制剂的研究, Tel: 024-23986346 E-mail: wangsl@163.com

2.1 华蟾素注射乳剂的制备

2.1.1 蟾皮提取液的制备

取干燥蟾皮适量,洗净,40℃烘干,将烘干的蟾皮剪碎,称取 100 g 转移至圆底烧瓶中。蟾皮加水煎煮 3 次,第 1 次加 6 倍量的水并浸泡 1 h,第 2、3 次加 5 倍量的水,每次煎煮 90 min 合并提取液,过滤,提取液浓缩至每毫升含生药 0.5 g 的溶液。浓缩液加无水乙醇至醇体积分数达到 60%,4℃下放置 24 h 过滤,挥去滤液中的乙醇并浓缩至每毫升含生药 1 g 的溶液,再次加无水乙醇至醇体积分数达到 85%,4℃下放置 48 h 过滤,挥去滤液中的乙醇并浓缩至每毫升含生药 2 g 的溶液。上述提取液加 300 g L⁻¹的磺基水杨酸溶液不出现浑浊。

2.1.2 处方筛选及工艺参数的确定

以乳剂的外观、稳定常数为考察指标,经单因素试验考察处方因素对注射乳剂的影响,初步确

定乳剂的处方为精制大豆油 20~40 g L⁻¹、乳化剂(大豆卵磷脂与 E₆₈的质量比为 1:2)25~35 g L⁻¹、甘油丙二醇(质量比 1:1)混合物 200~400 g L⁻¹。采用正交试验方法,以精制大豆油(A)、乳化剂(B)及甘油丙二醇混合物(C)为考察因素,选用 L₉(3⁴)正交表以乳剂的稳定常数为考察指标筛选最优处方,正交试验结果及分析见表 1。用极差分析方法分析正交试验结果,可见精制大豆油(A)是影响乳剂稳定性的最主要因素,其次是甘油丙二醇混合物(C),乳化剂的影响最小,即 A>C>B。由各因素的综合平均值可知,此三因素的最优组合为 A₁B₂C₃,即华蟾素注射乳剂的最优处方为蟾皮提取液适量(每毫升含生药 2 g,5-HT 含量为 1.295 g L⁻¹)、精制大豆油 30 g L⁻¹、大豆卵磷脂 10 g L⁻¹、E₆₈ 20 g L⁻¹、甘油 150 g L⁻¹、丙二醇 150 g L⁻¹,注射用水适量。

Table 1 The results of orthogonal experiment

No	Factor				K _e /%
	A ρ/(g L ⁻¹)	B ρ/(g L ⁻¹)	C ρ/(g L ⁻¹)	D	
1	20	25	200	1	8.4
2	20	30	300	2	4.5
3	20	35	400	3	5.7
4	30	25	300	3	2.7
5	30	30	400	1	2.2
6	30	35	200	2	3.9
7	40	25	400	2	6.8
8	40	30	200	3	5.5
9	40	35	300	1	4.4
K ₁	18.6	17.9	17.8		
K ₂	8.8	12.2	11.6		
K ₃	16.7	14.0	14.7		
K ₁	6.2	6.0	5.9		
K ₂	2.9	4.1	3.9		
K ₃	5.6	4.7	4.9		
R	3.3	1.9	2.1		

以乳剂的外观、稳定常数为考察指标,经单因素试验确定乳剂制备的工艺参数为初乳化温度 60℃、乳化 20 min 超声细胞粉碎机 400 W 间歇超声 10 min 高压匀质机固定压力 100 MPa 下循环 4 次。

2.1.3 乳剂的制备

称取处方量的精制大豆油及大豆卵磷脂,加

入适量乙醇,水浴加热到 60℃使大豆卵磷脂均匀分散于精制大豆油中,挥去乙醇,得油相;蟾皮提取液、E₆₈、甘油、丙二醇及注射用水加热使澄清,继续加热、搅拌使温度达到 60℃并保持恒定,得水相。恒温 60℃下将水相缓慢加入油相中并不断搅拌,继续搅拌 20 min 得初乳。初乳用超声细胞粉碎机 400 W 间歇超声 10 min 转移至高压匀质

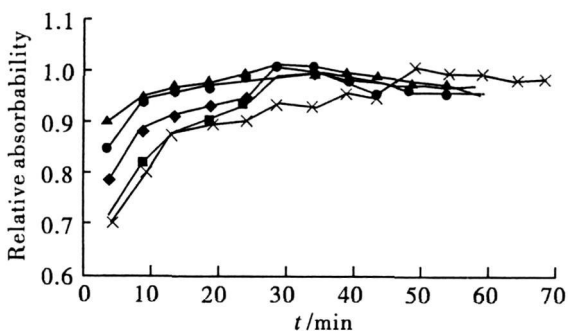
机中,固定压力 100 MPa下循环 4 次,然后灌装、充氮气、封口,100 °C煮沸灭菌 30 min 得注射乳剂。

2.2 乳剂中药物含量的测定

华蟾素成分复杂,目前主要根据吲哚类生物碱的特性,以 5-HT 为对照品,采用分光光度法测定本品中总生物碱的含量,以控制华蟾素制剂的质量。作者在部颁标准 WS₃-B3045-98 测定华蟾素注射液中 5-HT 含量方法的基础上,建立准确、稳定、操作简便的含量测定方法,为严格控制制剂质量及乳剂的进一步研究奠定基础。

2.2.1 温度及放置时间对 5-HT 含量测定的影响

精密称取 5-HT 标准品 5.43 mg 置于 25 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取 5 mL 置于 50 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得对照品溶液。分别精密吸取 5-HT 对照品溶液 2 mL 置于 10 mL 量瓶中,用水稀释成 5 mL,摇匀,加入质量浓度为 150 g L⁻¹的对二甲氨基苯甲醛的盐酸溶液(浓盐酸与水的体积比为 2:1)至刻度,摇匀。分别在 (10±0.5)、(15±0.5)、(20±0.5)、(25±0.5)、(30±0.5) °C 下放置,在不同时间点取样,照《中华人民共和国药典》2005 版分光光度法,以水为空白,在 555 nm 波长处测定吸光度,以各温度下吸光度与该温度下吸光度最大值的比值(相对吸光度)对时间作图,结果如图 1 所示。结果表明,温度在 15~30 °C 时,对照品溶液经过比色后,在 30~35 min 内进行测定,结果较为可靠,此结果与文献报道一致^[19]。实验中发现,当温度为 (10±0.5) °C 时,放置 50 min 吸光度才达最大值,但当温度低于 20 °C 时,达峰前吸光度值变化较大。因此最佳测定条件应为温度不低于 20 °C,且在加入显色剂后 30~35 min 内测定 5-HT 的含量。



×—(10±0.5) °C; ■—(15±0.5) °C; ▲—(20±0.5) °C; ◆—(25±0.5) °C; ●—(30±0.5) °C

Fig 1 The relative absorbability of different temperatures and time

2.2.2 标准曲线及线性关系考察

精密量取对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中,用水稀释成 5 mL,摇匀,加质量浓度为 150 g L⁻¹对二甲氨基苯甲醛的盐酸溶液(浓盐酸与水的体积比为 2:1)至刻度,摇匀,25 °C 下放置 30 min。照《中华人民共和国药典》2005 版分光光度法,以水为空白,在 555 nm 波长处测定吸光度(A)。以吸光度(A)为纵坐标,质量浓度(ρ)为横坐标,绘制标准曲线。得到线性回归方程为 $A=50.093\rho+6.98\times 10^{-2}$, $r=0.9997$ 。

2.2.3 样品含量测定

精密量取华蟾素注射乳剂 4 mL 置于带刻度试管中,加入适量的氯仿,涡旋 1 min 避光放置 24 h 4000 r min⁻¹离心 15 min 将离心得到的上清液全部取出置于 10 mL 量瓶中并用水稀释至刻度。精密量取 5 mL 置于 10 mL 量瓶中,按“2.2.2”条方法,测定 5-HT 含量。结果自制华蟾素注射乳剂中 5-HT 的含量为 (11.25±0.54) mg L⁻¹ (n=3) 即平均值为 11.25 mg L⁻¹,符合部颁标准中 5-HT 含量不得少于 5.0 mg L⁻¹ 的规定。

2.2.4 回收率的测定

按照华蟾素乳剂处方制备空白乳剂。取空白乳剂 2 mL 分别置于 9 支带刻度试管中,分别加入质量浓度为 46 mg L⁻¹的 5-HT 标准品溶液 0.5、1.0、1.5 mL 各 3 支,涡旋,混合均匀。按“2.2.3”条方法处理,在 555 nm 波长处测定吸光度,平均回收率为 96.3%, RSD=2.30% (n=9)。

2.3 乳剂基本性质的研究

2.3.1 粒径分布的测定

应用 PSS380 激光电泳粒度测定仪,对华蟾素注射乳剂的粒径分布进行测定,粒径的 Nicomp 分布图谱见图 2。华蟾素注射乳剂的 Nicomp 分布体积质量径为 (87.7±16.1) nm 且 Nicomp 分布强度质量径和体积质量径均是单一分布,说明乳剂粒径均一;华蟾素注射乳剂的粒径分布符合《中华人民共和国药典》2005 版中关于“静脉用乳状液型注射液分散相球粒的粒度 90% 应在 1 μm 以下,不得有大于 5 μm 的球粒”的规定。乳剂室温避光放置 3 个月后乳剂的粒径为 (89.2±18.4) nm,说明乳剂较稳定。

2.3.2 其他性质的测定

应用 Delsa 440 SX 电势粒度仪测定华蟾素注射乳剂的 zeta 电位。按照华蟾素注射液说明书

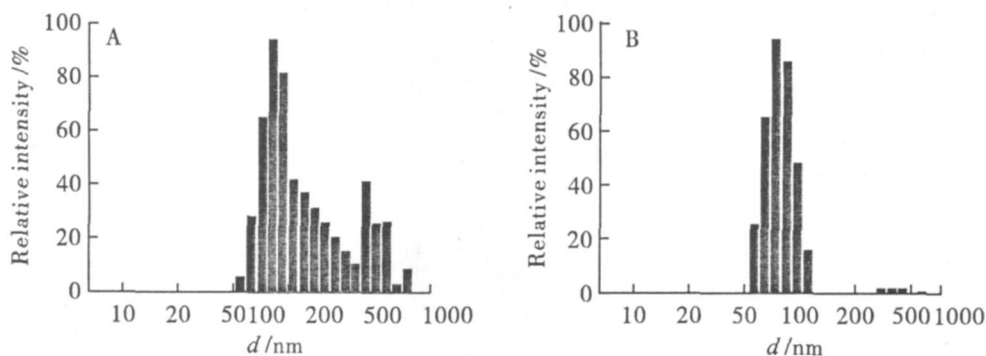


图 2 华蟾素乳剂强度加权粒径分布 (A) 和体积加权粒径分布 (B)

中“静脉滴注, 一次 10~20 mL, 用 50 g L⁻¹ 的葡萄糖注射液 500 mL 稀释后缓慢滴注”的使用方法, 将乳剂用 50 g L⁻¹ 葡萄糖注射液稀释 25 倍后测定渗透压为偏高渗。应用 PB-10 型 pH 计测定华蟾素注射乳剂的 pH 值。采用乌氏黏度计测定乳剂的黏度^[11] (25 °C 下水的 η 为 $8.904 \times$

10^{-4} Pa·s)。采用离心分光光度法测定乳剂的稳定性常数 (K_c)^[12], 上述相关测定结果如表 2 所示。由表 2 结果可见, 华蟾素注射乳剂各项指标基本符合《中华人民共和国药典》2005 版静脉注射剂的要求。

Table 2 The results of Huachansu emulsion properties experiment

No	V(zeta potential) /mV	Osmotic pressure / (mOsmol kg ⁻¹)	pH	$\eta \times 10^3$ /Pa·s	K_c /%
1	—	391	5.28	3.922	2.8
2	—	394	5.30	3.922	2.3
3	—	389	5.34	3.922	2.4
Average	-23.7	391	5.31	3.922	2.5

3 讨论

a 部颁标准中 5-HT 含量的测定方法是利用在酸性条件下对二甲氨基苯甲醛与吲哚类生物碱反应生成紫红色物质的特性, 采用分光光度法测定吲哚类生物碱的含量。部颁标准中仅仅规定了“室温及放置 30 min 测定”的测定条件。实验过程中发现, 温度及放置时间对 5-HT 含量的测定有较大影响, 这与有关文献报道的比色时间对华蟾素注射液的含量测定结果影响较大相符^[12]。为了建立准确、稳定的含量测定方法以便严格控制制剂的质量, 作者考察了温度及放置时间对 5-HT 含量测定的影响, 从而确定最佳的测定条件。采用相对吸光度代替吸光度对时间作图, 可以减少因仪器及实验操作带来的误差, 可以将吸光度的变化趋势更加直观的表现出来。

b 在测定乳剂药物含量过程中尝试过多种破乳方法, 其中有机溶剂破乳法比较简便、适用。采用乙醇、甲醇、丙酮破乳时, 油相可以溶于溶剂中, 但当加入显色剂后由于盐酸的作用油会从有机溶剂中析出, 使溶液变浑浊, 严重影响测定的结果。

当使用氯仿破乳时, 油及磷脂均会溶于氯仿, 油水两相完全分离, 从而排除油的干扰, 实验结果表明该方法稳定、可靠。

参考文献:

- [1] 江苏中医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 2713-2713.
- [2] 代丽萍, 王智民, 高惠敏, 等. 蟾皮化学成分的分离与结构鉴定 [J]. 药学学报, 2007, 42(8): 858-861.
- [3] 苏永华, 黄雪强, 张大志, 等. 华蟾素注射液中蟾毒内脂类成分含量检测 [J]. 中成药, 2003, 25(1): 24-27.
- [4] 杨立宏, 金向群, 张薇. 中华大蟾蜍皮化学成分的研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(4): 292-295.
- [5] 韩鸿彬. 华蟾素抗肿瘤作用及其机制的研究进展 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2005, 12(2): 160-162.
- [6] 殷立新, 李志恩, 亢泽坤. 华蟾素注射液的临床应用进展 [J]. 中医药信息, 1998(5): 21-22.
- [7] 朱晓燕. 华蟾素注射液及其活性成份抗肿瘤机制的研究进展 [J]. 世界肿瘤杂志, 2006, 5(4): 272-275.

- [8] 代丽萍, 王智民, 高惠敏, 等. 蟾皮和华蟾素注射液
中蟾蜍甙含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32
(3): 224—226
- [9] 高晓黎, 毕殿州, 孙殿甲, 等. 去氢骆驼蓬碱静脉注
射乳剂在动物体内的药代动力学 [J]. 药学学报,
2000, 35(3): 224—227.
- [10] 张敏. 时间对华蟾素注射液含量测定的影响 [J]. 安
徽中医学院学报, 2005, 24(5): 45—45
- [11] 李桂玲, 苏德森, 林瑞红, 等. 新型麻醉药异丙酚静
注乳剂的制备及其物理性质的测定 [J]. 沈阳药科
大学学报, 1999, 16(2): 92—94
- [12] 韩继洪, 苏德森. 抗癌药物 FT-207 脂肪乳剂物理性
质的研究 [J]. 沈阳药学院学报, 1991, 8(1): 14—
17

Preparation of Huachansu parenteral emulsion and studies on the quality of preparation

DONG Yan¹, LUO Meng², JIANG Tong-ying³, QIU Dun-you¹, LIANG Xi¹, WANG Si-ling¹
(1. School of Pharmacy Shenyang Pharmaceutical University Shenyang 110016 China; 2. Shenyang Drug
Instant Inspection Institute Shenyang 110013 China; 3. School of Life Science and Biopharmaceutics
Shenyang Pharmaceutical University Shenyang 110016 China)

Abstract Objective To prepare stable and valid Huachansu (traditional Chinese medicine) intravenous e-
mulsion, consummate the method of content determination and study the quality of preparation. Methods The
Huachansu intravenous emulsion was prepared by the high pressure homogenizer method. The accurate sta-
ble and convenient method of the content determination was built on the basis of the content determination of
5-HT in the injection (WS-B3045-98). Results The preferable coprimetric conditions were that the ab-
sorbability was determined in 30—35 minutes after the developer was added and the temperature was not less
than 20 °C; the content of 5-HT in emulsion was $(11.25 \pm 0.54) \text{ mg L}^{-1}$; the particle size distribution of
Huachansu parenteral emulsion was $(87.7 \pm 16.1) \text{ nm}$, zeta potential was -23.7 mV , osmotic pressure was
slightly higher than the osmotic pressure of human plasma, pH value was 5.31, viscosity was $3.922 \times$
 10^{-3} Pa s and K_c was 2.5%. Conclusions The Huachansu parenteral emulsion meets the requirements of in-
travenous preparation in China Pharmacopoeia and Huachansu injection's content in department standard.
Key words Huachansu emulsion; content determination; high pressure homogenizer method; 5-HT