

分类号_____

学号 641709200671277

学校代码 10487

華中科技大學

硕士学位论文

丙泊酚脂肪乳的制备工艺 及质量控制研究

学位申请人：高 洁

学 科 专 业：生物化学与分子生物学

指 导 教 师：杨祥良 教授

答 辩 日 期：2008 年 5 月 29 日

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science**

**Studies on Preparation and Quality Control of
Propofol Fat Emulsion**

Candidate : Jie Gao

Major : Biochemistry and Molecular Biology

Supervisor : Prof. Xiangliang Yang

Huazhong University of Science & Technology

Wuhan 430074, P.R.China

May, 2008

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除文中已经标明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名:

日期: 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权华中科技大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密☐, 在_____年解密后适用本授权书。
 本论文属于
 不保密☐。

(请在以上方框内打“√”)

学位论文作者签名:

日期: 年 月 日

指导教师签名:

日期: 年 月 日

摘 要

本文研究了丙泊酚静脉注射脂肪乳剂的处方、制备工艺、理化性质、并探索了影响乳剂中游离药物浓度的因素。

1.以粒径, ζ 电位, pH 值, 120 小时机械外力震荡, 40 °C、60 °C放置一个月的稳定性为指标,对脂肪乳的处方进行筛选。结果表明在乳剂处方中加入维生素E(V_E)会导致乳剂表面出现油滴;加入 EDTA 可以避免乳剂在制备过程中与金属离子反应产生杂质。最终确定处方为:丙泊酚(1%)、大豆油(10%)、油酸(0.06%)、卵磷脂(1.2%)、甘油(2.25%)、EDTA(0.005%)、注射用水。

2.选用高压匀质法制备脂肪乳。高剪切 6000 转/分钟, 10 分钟制备初乳, 将初乳 800 bar 高压匀质 6 个循环, 调 pH 值到 8.8, 装入安瓿, 充氮气, 30 分钟高温灭菌得脂肪乳, 粒径为 213.0 nm、多分散指数(PDI) 0.089、 ζ 电位-34.7 mV。用高压均质法制备脂肪乳效果好, 耗时短, 易于规模化生产。

3.建立了丙泊酚脂肪乳的 HPLC 分析方法并进行了初步的质量研究。自制丙泊酚脂肪乳的游离脂肪酸, 过氧化值, 含量测定, 有关物质均符合药典上的相关规定。

4.丙泊酚脂肪乳的注射疼痛是临床使用时的一个普遍的副作用, 而游离药物浓度是产生丙泊酚脂肪乳注射疼痛的主要原因。对影响脂肪乳中游离药物浓度的因素进行探索, 得出使用 LCT/MCT 混合制剂可以显著减少游离药物的浓度。

本文研制的丙泊酚静脉乳剂理化性质稳定, 毒副作用低, 具有良好的应用前景。发现使用 LCT/MCT 混合制剂作为油相可以明显减少游离药物的浓度, 对减少丙泊酚脂肪乳临床使用时的刺激性很有意义。

关键词: 丙泊酚 静脉注射脂肪乳 制备工艺 理化性质 游离药物的浓度

Abstract

This research has been studied on the formulation, preparation, and the physical and chemical properties of intravenous fat emulsion of propofol. Factors that impact the free drug concentration in the fat emulsion have also been explored.

1. All of the particle size, zeta potential, pH, 120 hours of mechanical shocks, the stability to place the emulsion under 40 °C and 60 °C for a month are indicators to filtrate the fat emulsion formulation. The results showed that the emulsion with vitamin E (V_E) added in will lead to drops of oil appearing on the emulsion surface; adding EDTA into the emulsion can avoid impurities produced by the reaction of emulsion and the metal ions during the course of preparation. The final formulation of intravenous fat emulsion of propofol: propofol (1%), soya bean oil (10%), oleic acid (0.06 %), lecithin (1.2%), glycerol (2.25%), EDTA (0.005%).

2. Fat Emulsion is prepared by the method of high-pressure homogenization. Primary emulsion prepared by a high shearing speed of 6000 rotation per minute for 10 minutes, is then cycled for six times with high pressure homogenization of 800 bars, and adjusted to pH of 8.8. After that, the primary emulsion is filled into the ampoule bottles full of nitrogen, and sterilized for 30 minutes, and the final fat emulsion is prepared. The final fat emulsion is characterized with the diameter of 213.0 nm, and poly disparity index (PDI) of 0.089, zeta potential of -34.7 mV. In conclusion, fat emulsion could be prepared using high-pressure homogenization, which is effective, short time-consuming and easy to engaging into large scale production.

3. HPLC analysis method for the propofol fat emulsion is established and a preliminary method on the quality of the emulsion is also conducted. The determination of free fatty acids, the peroxide value, and other related materials of propofol fat emulsion had complied with the relevant provisions of the pharmacopoeia.

4. Pain after injecting propofol fat emulsion is a common side effect during clinical applications, and the free drug of propofol is the main reason for the pain. To explore the impact of free drug concentration of the emulsion, it is clearly showed that the use of MCT can lead a significant reduction in the concentration of free drugs.

The intravenous propofol fat emulsion prepared in this research is well stable of physical and chemical properties, and of low toxicity, which has a good prospect. In the mean time, it is found that usage of medium/long chain triglycerides can significantly reduce the concentration of free drugs, and it's of great significance to reduce the irritation of propofol fat emulsion during clinical applications.

Key words: propofol; intravenous fat emulsion; preparation; physical and chemical properties; free drug concentration

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	II
1 绪 论	1
1.1 丙泊酚.....	1
1.2 脂肪乳.....	4
1.3 脂肪乳中的游离药物浓度.....	10
1.4 本文的研究内容和意义.....	14
2 丙泊酚脂肪乳的处方及制备工艺的研究.....	15
2.1 前言.....	15
2.2 实验部分.....	15
2.3 结果与讨论.....	20
2.4 小结.....	29
3 理化性质及稳定性研究.....	31
3.1 前言.....	31
3.2 实验部分.....	31
3.3 结果与讨论.....	36
3.4 小结.....	45
4 脂肪乳中游离药物的浓度的测定.....	46
4.1 前言.....	46
4.2 实验部分.....	46
4.3 结果与讨论.....	48
4.4 小结.....	51
5 总结与展望	53
致 谢	54
参考文献	55

1 绪 论

1.1 丙泊酚

1.1.1 丙泊酚的理化性质

丙泊酚的化学名为 2,6-二异丙基苯酚 (2,6-disopropylphenol)，属烷基酚，丙泊酚的分子质量为 178，室温下为无色液体。结构式见图 1.1：

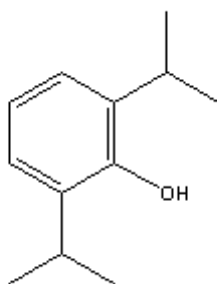


图 1.1 丙泊酚的化学结构

从结构看，丙泊酚与已知的任何一种静脉全麻药均不同。丙泊酚具有高脂溶性，室温下为油状，不溶于水。临床制剂为白色的等渗乳化剂，每毫升含丙泊酚 10 mg，以及甘油、纯化的卵磷脂，氢氧化钠、大豆油和水。

1.1.2 丙泊酚的临床应用

丙泊酚 (2,6-二异丙基苯酚)，作为一种静脉麻醉药应用于临床已经 12 年，以其起效迅速、作用时间短、清醒快、易于控制和不良反应少等特点，被麻醉医师广泛用于全麻诱导，硬膜外麻醉辅助镇静，无痛人流，无痛胃镜等领域。其术后恶心、呕吐率低等优点，进一步奠定其门诊手术首选全麻药物的地位。在腹腔镜、宫腔镜等短小手术的应用中，其麻醉深度的良好控制性和苏醒迅速、平稳已被广泛认同。

丙泊酚具有降低颅内压，脑代谢，抗氧化作用，广泛应用于神经外科麻醉。研究认为，丙泊酚含酚基氢氧根，与抗氧化剂维生素 E 相似，它的化学结构不同于其

它镇静催眠药，具有吞噬清除自由基，抑制脂质过氧化的作用，临床剂量的丙泊酚具有抗脂质过氧化，减轻脑组织缺血、缺氧，再灌注所导致的细胞膜和细胞内膜结构的损害，可发挥脑保护作用^[1]。Javadov 等^[2]研究发现丙泊酚可抑制线粒体膜通透性转换孔而抑制脂质过氧化反应，从而可以抑制心肌缺血再灌注引起的细胞凋亡。丙泊酚可舒张在体、离体人和正常动物的气道平滑肌，抑制插管引起的支气管收缩，减少插管后的哮喘^[3]。抑制高气道反应性患者术后支气管痉挛的发生，而且此气道舒张作用不受上皮细胞完整性的影响^[4]。临床研究的结果表明 2 mg/kg 丙泊酚即可使需机械通气的慢性阻塞性肺疾病患者产生明显的支气管舒张作用^[5]。有报道，一例全麻手术患者术中出现哮喘持续状态时，给予 20 mg 丙泊酚后气道阻力由 40 cmH₂O 降到 30 cmH₂O，表明丙泊酚能抑制支气管痉挛，具有支气管保护作用^[6]。刁玉刚等^[7]通过对豚鼠哮喘模型研究显示丙泊酚对哮喘豚鼠气道平滑肌有舒张作用，此作用与前列环素、NO 胞浆可溶性尿苷酸环化酶及电压依赖性 Ca²⁺通道无关，而与 ATP 敏感性 Ca²⁺通道有关，丙泊酚抑制细胞内 Ca²⁺释放和细胞外 Ca²⁺内流，从而剂量依赖性地使气管平滑肌舒张。王亚平等^[8]研究发现，临床相关剂量的丙泊酚可有效地减弱乙酰胆碱(ACH)介导的离体人肺叶支气管平滑肌的收缩反应，显著降低哮喘组气管平滑肌对 ACH 的反应性，具有明显气道保护作用^[9]。丙泊酚能明显抑制抗原激发致敏大鼠的气道渗出，且随剂量增加对肺内气道的渗出抑制作用更强^[10]。其它动物实验也表明丙泊酚能显著缓解炎症介质如组胺等诱导的气道痉挛^[11]。也有研究报道，丙泊酚增加离体气管上皮纤毛摆动频率，浓度增加其作用也增加^[12]。适用于麻醉时间较长或患有呼吸道疾患的患者。丙泊酚对单肺通气时缺氧性血管收缩抑制轻微，对肺内分流无明显影响，无明显的低氧血症和高碳酸血症，适合于需单肺通气的心胸科手术麻醉^[13]。丙泊酚有明显的扩张外周阻力血管的作用，用于高血压或肺动脉高压患者麻醉，可减少降压药用量及种类。

1.1.3 丙泊酚的研究进展

20 世纪 70 年代在研究苯酚衍生物的过程中，发现丙泊酚有催眠作用。1974 年世界上首次合成成功，1977 年 Key 与 Rolly 首先作临床报告，确认丙泊酚可作静

脉诱导药物。1980 年 James 等人在动物实验中发现其具有麻醉效应，早期临床制剂为聚氧乙基蓖麻油溶液(cremophor EL)，但聚氧乙基蓖麻油易导致过敏反应。1981 年阿斯利康（意大利）公司用大豆油作为赋形剂，研制开发出了脂肪乳剂的丙泊酚注射剂，1986 年以商品名“得普利麻”上市。1989 年通过美国 FDA 并推荐临床使用。1993 年 12 月经中国 SFDA 批准在内地上市。丙泊酚注射剂自 1986 年以来，已被用于全麻的诱导和维持。

我国于上世纪 90 年代中期开始从国外进口丙泊酚，目前共有丙泊酚进口药品批准文号 23 个，生产企业包括阿斯利康、芬兰 Leivas、德国费森尤斯卡比、雅培、瑞典 Zeneca、意大利 Astrazeneca 等。自从丙泊酚在我国上市以后，由于其优良的性能及较小的副作用，很快就受到市场的青睐，应用面不断扩大，应用量持续上升。现在，丙泊酚已是我国应用十分广泛的药品。据统计，从 1999 年开始，丙泊酚在我国医院中的用药普及率已达 60%~70%，目前已达 90%左右。近几年，丙泊酚在我国市场上的销售额不断上升。据 SFDA 南方医药经济研究所数据，2004 年，在我国典型城市样本医院用药金额为 10483.67 万元，在排行榜前 100 位药品中，丙泊酚列名列第 34 位，比上年上升了 10 位；2005 年前三季度为 9990.49 万元。在 2004 年国内批发领域畅销药 100 强中，丙泊酚列第 26 位，销售额 27240 万元，占批发领域 0.7%的份额。

目前，国内制药企业仅有 3~4 家有丙泊酚注射液药品试生产批号，由于生产批件未转正，这数家制药企业生产的丙泊酚注射液无法参与大型药品招标工作。国内现在医药市场使用的丙泊酚注射液 90%以上的产品是费森尤斯卡比公司和北京费森尤斯卡比公司分装、阿斯利康公司、百特公司和芬兰 Leiras oy 公司等进口药品。国际市场情况，丙泊酚注射液已在全世界 100 多个国家和地区获得广泛使用。其中，德国费森尤斯集团（含中国北京费森尤斯卡比公司）全球年销售额约数十亿欧元。不久前，美国 FDA 批准丙泊酚注射液可用于一般儿童的麻醉用药。由于我国脂肪乳药物载体制剂与国际先进水品存在的差距，国内制药企业生产的同类品种在数量上，短时间内还无法和这些国外同类品种与其竞争；进口丙泊酚注射液药品价格对我国大多数普通的消费群体来讲还存在着价格昂贵。所以，瞄准国际先进水品的丙

泊酚脂肪乳剂注射液进行仿制不仅利国利民，更将进一步提高我国的制药水平。

1.2 脂肪乳

1.2.1 脂肪乳的优点

含药静脉注射用脂肪乳剂中，大部分药物分布在油相或油水界面，避免与水直接接触。对于易水解或对水敏感的药物，这种隔离起到了增加稳定性的作用。静脉注射用脂肪乳剂不含或仅含少量有机溶剂，对血管刺激性较小；同时，外水相中药物较少，可有效降低由药物引起静脉炎的可能，增强患者的顺应性；另外，静脉注射用脂肪乳剂具有一定的靶向性，可降低非靶区药物的浓度。静脉注射用脂肪乳剂是亚微型微粒分散体系，作为药物载体具有明显的淋巴系统和单核-巨噬细胞系统（MPS）靶向性，即乳剂中的药物可被动靶向至淋巴液及富含 MPS 的脏器组织。另外，乳滴可被巨噬细胞大量吞噬，因此将抗炎药物制成乳剂静注后易浓集于炎症部位，提高抗炎活性，降低不良反应。含药静脉注射用脂肪乳剂可解决普通静脉注射制剂所面临的诸多问题。同时，与其它微粒药物传递系统相比，还具有以下优势：1.已具备扩大生产的条件和技术，更易实现产品化；2.有长期临床实践经验，易为临床所接受；3.稳定性大大改进，无需苛刻的贮运条件，使用方便。近年来日臻成熟的乳剂生产工艺和乳剂辅料也为含药静脉注射用脂肪乳剂的开发生产创造了条件。

1.2.2 脂肪乳的处方

含药静脉注射用脂肪乳近来应用日趋广泛。近年来上市的品种有：地西洋、丙泊酚、全氟碳、依托咪酯、前列腺素 E、氟比洛芬乙氧基 α -乙酯、棕榈酸地塞米松、脂溶性维生素和前列地尔等静脉注射乳剂。脂肪乳用于临床已有 40 多年的历史，1961 年 Wretling 研究和应用以大豆油为油相，以卵黄磷脂为乳化剂，甘油为张力剂的脂肪乳剂：Introlipid，命名为英脱利匹特，为静脉亚微乳剂的发展奠定了基础。

之后 Groves 等研究出具代表性的亚微乳处方：大豆油 20 g，卵磷脂 1.2 g，甘油 2.25 g 加水至 100 g。这之后发展的脂肪乳大多数都是以这个处方为基础稍加改进而来的。最初用于危重病人的肠外能量供给，近年来载药脂肪乳受到人们的重视和利用。

长链甘油三酸酯（LCT）、中链甘油三酸酯(MCT)以及长链甘油三酸酯和中链甘油三酸酯的混合物经常作为脂肪乳的油相。大豆油一直以来是最常用的油相，典型的精致大豆油包括：共轭亚油酸 50%~57%；亚麻酸 5%~10%；油酸 17%~26%；棕榈酸 9%~13%；硬脂酸 3%~6%；精制红花油中共轭亚油酸含量稍高、油酸含量比较低而不含硬脂酸；使用中链甘油三酸酯主要的优点是增加药物的溶解度，中链甘油三酸酯对药物的增溶作用是长链甘油三酸酯的 100 倍；制备脂肪乳时，使用中链甘油三酯与长链混合时可制备比单纯使用长链甘油三酯更加稳定且毒性更低的脂肪乳。常用油相及推荐浓度见下表：

表 1.1 常用的油相和推荐的浓度

油相	推荐浓度	参考文献
大豆油	10~20% w/w	14
红花油	10~20% w/w	14
芝麻油	10~20% w/w	15
谷物油	10~20% w/w	16
调味油	20% w/w	17
调味油：大豆油（1：1）	最高 30%	18
调味油：中链油（1：1）	最高 30%	18
椰子油	30%	19
中链/长链 混合物	10~20% w/w 最高 30%	20,18
天然的甘油三油酸酯	50%	21
罂粟碘化酯	10%	22
种子油	10%	22
纯化鱼油	10%	22
低凝点的高级润滑油	10%	23

Chi-Feng Hunga^[24]等研究使用 5%维生素 E 做为油相可以得到 37℃下稳定存放 30 天的脂肪乳同时还可以降低卵磷脂的溶血作用等毒性。Hesson Chung^[25]等研究使

用不同油相时乳剂粒子大小与稳定性的变化,发现棉籽油,亚麻油,樱草油作为油相制备的乳剂粒径很大且不稳定,而角鲨稀,矿物油,豆油制备的乳剂粒径小且稳定,同时他们还发现,脂肪乳载药后,越稳定的乳剂释药速度越慢。另外,油相的比例越大,制备的乳剂粒径也相应的增大。所以油相的选择对于载药脂肪乳体系十分重要。

卵磷脂作为一种安全无毒的乳化剂,已被美国 FDA 批准供静脉注射用。卵磷脂中含有蛋黄卵磷脂,磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺(约占总量的 90%),磷脂酰丝氨酸和磷脂酰甘油(2%~5%),其中少量的磷脂酰丝氨酸和磷脂酰甘油(2%~5%)具有离子化形式,可使乳滴表面带有静电斥力,产生液滴表面电荷(ζ 电位,近似约-40~-50 mV),这对乳剂的稳定性具有至关重要的作用。

另外据报道卵磷脂加 F68 作为混合乳化剂可以使磷脂的水解产物尽量减少并延长乳剂的存放时间,这与 F68 的高昙点可以抵抗高压匀质过程中的脱水作用有关,随 F68 量增大,脂肪乳粒径有减小的趋势,对包封率无明显作用。但 F68 在临床应用时随着量的增加可能会有溶血作用。

因为卵磷脂和 F68 等乳化剂在临床使用时有一些生理上的副作用,Eva Melzer^[26]等使用乙基纤维素这种高分子作为脂肪乳的乳化剂,可以得到稳定的脂肪乳且有很好的生理耐受性,避免了溶血等副作用。这种脂肪乳在 15 °C 制备时得到的是 O/W,而在 30 °C 制备时得到的是 W/O,这与乙基纤维素与油相的结合能力随温度的升高而升高有关。

脂肪乳中的附加剂一般包括渗透压调节剂(如甘油),抗氧化剂(如 V_E),稳定剂(如油酸),金属离子螯合剂(如 EDTA),助乳化剂(如司盘 80, 卞泽 30 等^[24]),防腐剂(如壳聚糖^[27])等。

在脂肪乳的处方中加入油酸可以增加乳剂的稳定性,这是因为油酸可以形成稳定的复合凝聚膜,增大膜的强度和使脂肪乳的 ζ 电位升高。油酸的表观 pH 为 7.4~7.5,故油酸大量电离,定位在油水界面上,使脂肪乳的 ζ 电位绝对值升高, ζ 电位的绝对值随油酸浓度的增大而升高。

Muhannad Jumaa^[28]等研究一种含有 2%~2.5% F68 和 0.5%壳聚糖的载药脂肪

乳，这种脂肪乳在高压灭菌前后可以保持乳剂的稳定。且壳聚糖可以作为脂肪乳的防腐剂，能够抑制微生物的生长^[27]。

Jhi-Joung Wang^[28]等在纳布啡脂肪乳中加入助乳化剂卞泽 30 和卞泽 98 可以防止脂肪乳中卵磷脂的溶血作用。

但并不是所有的药物都可以制备成脂肪乳，空白脂肪乳可以较长时间的稳定存在，但在脂肪乳中加入药物后，药物会与脂肪乳中的成分发生不可预知的复杂反应，导致脂肪乳不稳定，所以制备脂肪乳之前要先考察脂肪乳载药之后的稳定性。

1.2.3 脂肪乳的制备与工艺

早期的含药脂肪乳通常是在临用前将药物加入市售的空白脂肪乳中，振摇，即得之^[29]。如临床上使用的两性霉素 B 溶液(Fungizone)，可以通过这种方法制备其脂肪乳从而降低两性霉素 B 的肾毒性。该法虽然简单，但容易发生相分离、沉淀或结饼等物理变化，故仅在临床用药时偶有应用。

脂肪乳的制备方法主要有高压均质法、超声波法、微射流法。

初乳一般可选择使用高剪切机制备，选择适宜的转速和时间通过高剪切能使乳剂的平均粒径达到 1 μm 左右。高剪切的速度不能过快，过快会导致油相不完全的分散在水相中而漂油，使乳剂不稳定，粗乳的粒径要达到 20 μm 以下。用磷脂作为乳化剂时，其相转化温度（70~80 $^{\circ}\text{C}$ ）附近粒径较小，乳剂比较稳定；并且此时油相的黏度较低，外部施加的力所做的功较小，利于乳化，考虑到剪切过程中乳剂温度会升高，所以最佳制备温度是 40 $^{\circ}\text{C}$ ~70 $^{\circ}\text{C}$ ，在这个温度范围内根据乳化剂，油相，药物的稳定性进一步选择最优的制备温度。

使用不同设备制备脂肪乳的物理稳定性顺序如下：涡旋<高剪切<高压匀质<微流态化。使用微流态化器进行乳化可以获得 40~200 nm 之间的乳剂，且粒径分布较窄，获得的乳剂也具有更高的稳定性。高压匀质方法为主流技术。使用高压匀质机生产脂肪乳时，在生产工艺上要对初乳制备的温度，搅拌时间，速度；高压匀质的温度，压力及匀化次数进行筛选。匀化时，在低温的条件下，油相的粘度较大，不利于乳化。而高温时，可降低油相的粘度，有利于乳剂的形成，但温度升高会使

界面模膨胀，同时也增大了乳滴的动能，使乳滴之间的相互碰撞加速，容易使乳滴聚集产生大粒子，进一步导致乳剂破裂，且温度过高卵磷脂及注射用大豆油易被水解。一般可选择在磷脂的相转化温度（70℃～80℃）附近匀化，同时在匀化过程中必须让乳液每次全部通过高压匀质机匀化后，方可进行下一次高压匀化，从而确保所有的乳滴得到相同次数的匀化处理。

匀化后将脂肪乳过 0.45 微米膜过滤，以去除乳剂中的大粒子。

因为脂肪乳是一种热力学与动力学不稳定系统，加热时乳滴如果受热不均匀容易碰撞聚集从而破乳。所以在灭菌时一般使用旋转式高压灭菌锅避免乳滴受热不均。灭菌后应将制剂以冰水浴迅速降温，以尽量避免余热对亚微乳剂进一步产生影响。在灭菌过程中，乳剂受热，油相会产生游离脂肪酸，使乳剂 pH 下降，所以对灭菌工艺进行优选，控制游离脂肪酸的含量，121℃，15 min 和 115℃，30 min 是脂肪乳灭菌的两种比较公认的条件。还有一种方法是把脂肪乳的各原料先进行无菌处理后再做成脂肪乳，但这种方法成本较高。

制备好的乳剂进行灌装，Freitas 和 Muller^[30]等人证明含硅的玻璃瓶可以消除纳米粒子的增长。另外脂肪乳不可以使用塑料容器，因为塑料容器会透过氧气。

1.2.4 脂肪乳的质量控制

注射用脂肪乳的质量标准一般要包含以下几点：外观、颜色及表面有无油滴存在、粒径大小及分布、ζ 电位、pH 值、相对密度、渗透压含量测定、有关物质、游离脂肪酸、甲氧苯胺值、过氧化值、溶血磷脂、细菌内毒素、无菌、与生理盐水和葡萄糖配伍稳定性试验和稳定性试验的研究。

脂肪乳在热力学及动力学上均属于不稳定体系，因此物理稳定性是影响载药亚微乳产品开发和投向市场的重要因素。粒径对脂肪乳的稳定性与毒性有直接影响。制剂达到足够小的粒径并具有较窄的粒度分布范围时，才能满足剂在注射使用时的安全性及分散体系的稳定性要求。一般来说，乳剂的粒径保持在 200～500 nm 可以保持最好的物理稳定性，且在体内不会发生栓塞。人肺部的毛细血管在 4 μm 到 9 μm 之间，如果脂肪乳含有大于 5 μm 的大粒子，或者粒子不够稳定在放置过程中聚集

合并成为大于 5 μm 的粒子就会在肺部发生栓塞，所以脂肪乳的质量控制中要关注这部分（即使只占很少一部份）大粒子的数量，并将它控制在一个较小范围内。另外，粒径还受油相浓度的影响，当油相的浓度大于 10 会显著的增大粒径和降低稳定性。Venkatesh 等人^[31]报道：表面活性剂膜组成的不同会导致纳米离子密度的不同，而这会表现在粒径的差异上。作者认为这种差异可影响亲油性不同的药物的载药量，药物的组织分布和释药动力学。

卵磷脂具表面电荷可以提高乳剂的稳定性，电荷的减少会增加絮凝和合并的速度。因此，在评估稳定性时，测量电位十分重要。脂肪乳的电位小于 -20 mV 时，粒子间的排斥力将无法克服由粒子热运动引起的聚合作用，导致乳液破坏。能使脂肪乳稳定存在的 ζ 电位范围是 -20~-40 mV 之间。

乳剂的物理和化学稳定性是 pH 依赖的，但乳剂中不可以加缓冲盐，因为缓冲盐会促进脂肪酸的水解，所以一般是加入少量的氢氧化钠来调节 pH 值，当 pH 值小于 5 时，乳滴之间的静电排斥力会减少，粒径会增大，脂肪乳最佳的 pH 值是 6~7，因为在这个 pH 值范围内，一方面，卵磷脂在乳滴周围可以形成良好的保护膜；另一方面，在这个 pH 值下可以降低卵磷脂的水解。但在制备时要把脂肪乳调到偏碱性，因为在灭菌和储运过程中，pH 值有降低的趋势，一般在灭菌前把 pH 值调到 8 左右。

卵磷脂制成的乳剂在储运中会水解，可形成溶血磷脂，溶血磷脂有利于脂肪乳的形成和稳定，但有较高的溶血性，应控制在较低水平。另外，油相与磷脂在加热过程中水解产生游离脂肪酸，纯磷脂遇空气氧化并分解游离出胆胺，胆酸等，这些因素都可以使 pH 值下降。临床使用的脂肪乳多为不饱和脂肪酸，其中的不饱和双键化学性质不稳定，在空气中容易发生酯质过氧化反应，产生过氧化物。脂质过氧化物可进一步裂解成对人体有害的脂质氧化产物，其潜在的危害是细胞膜脂质层，蛋白质和 DNA，削弱机体的免疫功能，诱导细胞凋亡，组织损伤，器官功能障碍和致癌。所以在脂肪乳的制备过程中要监控过氧化值的变化。脂肪乳发生脂质氧化的关键是其分子中含有不饱和双键，如能减少脂肪乳剂中的不饱和双键的数量或采用含不饱和双键的中链甘油三脂，则可减轻脂肪乳剂的过氧化反应。

综上所述,在生产肠外脂肪乳成熟的药剂技术基础上,制备水溶性差或不溶性药物的静脉给药制剂是可行的。多年来在临床营养领域的应用中已证实,这种药物载体系统的重要优势之一是其很好的安全性和耐受性。因此药物乳剂的优势显而易见,没有乳剂技术,一些药物至今都不可能静脉给药。Diazepam-Lipuro、Etomidate-Lipuro、Propofol-Lipuro、and Disoprivan 产品的成功及优势表明,肠外脂肪乳作为药物载体具有很好的前景。

1.3 脂肪乳中的游离药物浓度

1.3.1 丙泊酚的刺激性

注射疼痛是应用丙泊酚麻醉诱导时常见的不良反应。在门诊手术的33个常见麻醉问题中其发生频率名列第三。据文献报道,成人注射疼痛发生率为28%~90%^[32],多于其他常用静脉麻醉药,如硫喷妥钠(7%),地西洋(丙烯/乙二醇溶剂37%,豆油溶剂(0%),咪唑安定(1%),依托咪酯(24%~68%)。儿童注射疼痛发生率为28%~85%^[33,34],随年龄减小而发生率和严重程度增高。另一种丙泊酚的产品ampofol (Amphasta Pharmaceuticals, Inc, RanchoCucamonga, CA)在给予利多卡因的情况下注射疼痛的发生率仍高达39%。

许多因素影响疼痛产生及程度,包括注射部位、静脉口径、注射速度、丙泊酚水相浓度、血液缓冲效应、静脉输液的速度、丙泊酚温度、注射器材料、与之混注的药物等。麻醉药的注射疼痛大多是由于制剂的非生理性渗透浓度或pH值的直接效应,刺激静脉壁内皮和中膜之间的传入神经末梢,介导疼痛的轴突可能属于有髓鞘的A δ 纤维。如渗透浓度高的地西洋7.8 mmol/L和依托咪酯5.0 mmol/L,浓度降至低于1%时,渗透浓度接近血浆,注射疼痛减少。但丙泊酚制剂近乎等渗,渗透浓度0.303 mmol/L并不高,pH值6.0~8.5并不会引起注射疼痛。注射技术的因素包括:1. 静脉口径有决定性影响,使用肘静脉下发生注射疼痛,因药液注入血流中央,高浓度接触敏感的血管壁的机会少;2. 静脉壁暴露于丙泊酚的时间:慢速注射时疼痛比快速注射严重,因后者药液更快地被血液从静脉局部取代,注速越慢,刺激性成分与内皮

接触时间越长, 介质释放增加, 注射疼痛发生率升高; 3. 由于相似的原因, 注入药物而未停止输液时。注射疼痛发生率较停止输液者为高, 其强度与输液速度成正比。生理机制认为注射疼痛分为两种, 一是直接刺激, 二是延迟疼痛, 是由于刺激成分接触血管内皮时引起疼痛介质如来自激肽酶系统的缓激肽释放, 局部血管扩张、通透性增加, 刺激成分进一步作用于神经末梢, 形成疼痛刺激, 表现轻度延迟的痛感。

丙泊酚的注射疼痛经大量研究表明是由于水相中的药物浓度而引起的: 丙泊酚乳液中, 水相在外, 脂相在内, 注射时仅水相中的药物接触静脉内壁, 从而导致了疼痛。所以, 减少丙泊酚在水相中的浓度, 可降低注射疼痛的发生率。文献^[35]报道注射液引起注射疼痛的原因是水溶液中的游离药物与血管神经末梢直接接触, 激活了血浆激肽释放酶-激肽系统, 从而引起注射疼痛, 其发生率与水相中游离药物浓度有关, 游离药物浓度越高, 越易引起注射疼痛。Hiroshi Ohmizo DDS^[36]等研究发现引起丙泊酚注射疼痛的原因是水相中药物的浓度, 且和水相中药物浓度成正比, 但与血液中缓激肽的浓度不成比例关系。因此游离药物浓度是注射制剂研究的重要指标。

在临床使用中, 减慢注射速度或在给药时停止输液, 注射疼痛发生减少, 强度降低; 经手背细小静脉注射疼痛发生率(30%~39%)高于较为粗大的前臂或肘静脉(2.5%~3.0%), 3~12岁儿童亦然; 使用前用5%葡萄糖稀释疼痛的发生率也相应减轻; 与室温药液比较, 冷却至4℃的丙泊酚可使疼痛发生率下降一半; 药液抽取后放置过久, 可与塑料相互作用产生刺激性颗粒而导致疼痛, 改用玻璃注射器可减少其发生。使用0.2 μm的滤器可以显著降低注射疼痛发生率和严重程度, 可能的机制包括滤过细小的玻璃颗粒(来自于安瓿)、塑料颗粒(来自于注射器)、不溶性的水相丙泊酚颗粒以及改变药液流动形式等。

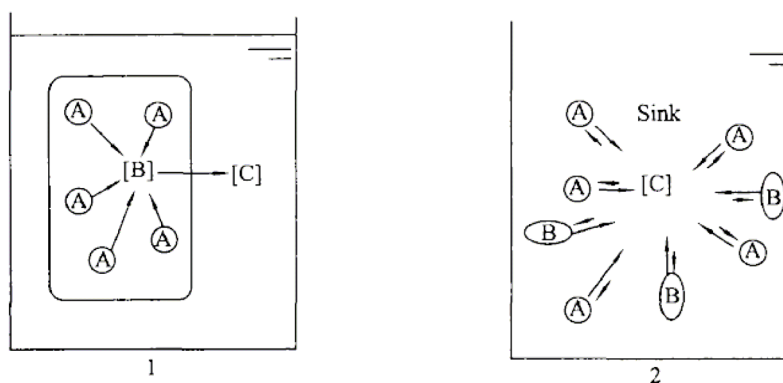
临床上采用有全身镇痛作用或局麻作用的药物。最常用的为利多卡因。Yoshitaka Fujii^[37]等研究在日本的成人中使用随机双盲试验临床使用利多卡因40 mg, 甲氧氯普安(胃复安)10 mg和氟比洛芬50 mg都可以减少丙泊酚的注射疼痛。Yoshitaka Fujii MD^[38]等使用安慰剂和利多卡因与丙泊酚合用做随机双盲试验得出结论: 在年轻人中, 使用10 mg利多卡因与丙泊酚合用的疼痛发生率为70%; 20 mg为50%; 40 mg为30%; 使用安慰剂的为80%; 而在老人组中, 使用安慰剂与丙泊酚合用时的疼痛发生

率为75%；使用10 mg利多卡因与丙泊酚合用时的疼痛发生率为65%；20 mg时为25%；40 mg时为20%；所以临床推荐年轻人群使用40 mg利多卡因，老年人20 mg与丙泊酚合用避免疼痛。Sedat Kaya MD^[39]等研究表明，临床使用利多卡因与丙泊酚合用可以减少注射疼痛，如果静脉注射的同时使用止血带进行静脉压迫比单纯使用利多卡因合用更能减少注射疼痛。另外，临床上还使用氯胺酮，米索前列醇，芬太尼，咪唑安定，阿司匹林，甲氧氯胺酮，硝酸甘油等配伍丙泊酚使用减少注射时的疼痛。从制剂的角度出发减少水相中的药物浓度可以降低丙泊酚的刺激性。Ryusuke Ueki^[40]等研究发现临床使用解热镇痛药氟比洛芬与丙泊酚合用，可减少丙泊酚的刺激性，经过试验测定加氟比洛芬后制剂中游离的丙泊酚浓度变小。减少刺激性的机制还可能是以下几点：氟比洛芬的解热镇痛效果。但是氟比洛芬是一种解热镇痛药的前药，需要时间来发挥解热镇痛的效果；氟比洛芬保护了血管内膜，但这没有任何文献报道；加氟比洛芬降低了制剂的pH值，但加氟比洛芬前后制剂的pH值没有变化。所以可以确定降低丙泊酚的刺激性的机制是因为加入氟比洛芬后减少了水相中丙泊酚的药物浓度。

1.3.2 游离药物浓度的测定

脂肪乳中药物大部分被包裹在脂相中，小部分游离在水相中，当把乳剂注入静脉中去，药物从纳米粒中慢慢释放，被人体吸收发挥药效。体外药物释放试验可以模拟药物在人体内的药物释放过程。体外释药是评价微粒给药系统的一项重要指标，通过体外释药试验可控制制剂质量、预测体内释药行为、了解微粒结构及释药机制。脂肪乳体外释药试验的难点在于：1.所包裹的药物都是亲脂性药物，在水中溶解度较低，因此体外释药试验所用的介质须尽可能满足漏槽条件；2. 由于脂肪乳的粒径较小，较难将脂肪乳与释出的游离药物快速有效地分离；3.由于油相(脂肪酸甘油三酯)的代谢会影响药物的释出，为更好地模拟脂肪乳在体内释药的行为，特别是亲脂性较强的药物，须在释放介质中加入相应的脂解酶或白蛋白来模拟体内的环境，这样得到的结果才可能预测脂肪乳的体内释药行为。目前，常用的测定方法有1.膜扩散法，如广泛应用的静态和动态透析测定法。将样品置于浸在释放介质中的

透析袋内，于不同时刻从释放介质中取样，直接测定；2.样品分离法，将被测分散体系直接加入释放介质中，取样后，通过膜过滤或离心等手段从释放介质中分离药物，再进行分析测定，这种方式使给药体系直接与释放介质接触，比较好地模拟了体内给药后的情况，但分散相与连续相的快速分离是关键问题；3.在线方法，分散系统直接被大量释放介质稀释，释放出的药物不经分离而直接测定。这要求分析方法足够灵敏，并对药物具有良好的选择性和专一性，但不能准确模拟乳化制剂的释药行为；4.连续流动法，将分散体系加入样品池中，释放介质从样品池内不断流过，流出的介质被过滤后，可用于分析测定。5.反向透析法，将样品或经稀释的样品作为外相，将释放介质装入透析袋放入样品中，于不同时间取透析袋测定透析袋里面的药物浓度。透析法与反向透析法的区别见图 1.2



The schematic illustration of the dialysis bag diffusion technique (1) and the reverse dialysis bag technique (2) where drug concentration is represented by A in the oily droplets, B in the internal aqueous phase of the dialysis bags and C in the sink solution

图 1.2 透析法与反向透析法

本研究采用反向透析法测量游离药物的浓度，将脂肪乳稀释后装入烧杯，将与脂肪乳等渗的甘油溶液装入透析袋放入烧杯中的脂肪乳中。因为脂肪乳中的液滴无法通过透析袋的小孔，只有游离在水相中的药物才可以通过透析袋，又因为透析袋中的甘油溶液体积很小不可能达到漏槽条件，所以不会引起脂肪乳中药物的进一步释放。通过测量透析袋中的药物浓度就反映出了脂肪乳水相中游离的药物浓度。

1.4 本文的研究内容和意义

丙泊酚脂肪乳临床使用广泛,但是我国医院 90%以上都来自进口,国内只有 3-4 家厂家生产,本研究可以生产质量稳定可靠,与市售进口静安相当的乳剂,具有广阔的市场前景。静脉注射脂肪乳近年来应用越来越广泛,它可以解决药物的水不溶问题,还可以起到缓释,靶向等作用,而这些作用都与药物包裹在脂性纳米粒中有关,所以研究药物包裹在脂性纳米粒中与水相中的游离药物浓度就有很大意义。

研究的主要内容包括:

1. 以脂肪乳粒径大小, ζ 电位, pH 值以及稳定性为指标,对丙泊酚脂肪乳进行处方优选,确定最优处方。
2. 用高压均质法、超声波法制备脂肪乳,确定制备工艺。考察剪切时间和速度对初乳粒径大小和稳定性影响,不同的均质压力和循环次数对脂肪乳粒径及稳定性的影响,并对不同的 pH 值调节工艺对脂肪乳性质的影响进行研究,最终确定最优工艺。
3. 对丙泊酚脂肪乳进行了方法学研究,建立 HPLC 检测方法。
4. 对制备的脂肪乳进行质量研究,测定自制丙泊酚脂肪乳的粒径, ζ 电位, pH 值,游离脂肪酸,过氧化值,甲氧基苯胺值、含量测定、有关物质等。
5. 对筛选出的优化处方参照药典进行了加速实验、配伍稳定性实验等质量标准方面的研究。
6. 建立测定脂肪乳中游离药物浓度的方法,并探索脂肪乳处方中对游离药物浓度的影响因素。

2 丙泊酚脂肪乳的处方及制备工艺的研究

2.1 前言

丙泊酚（2,6-二异丙基苯酚），作为一种静脉麻醉药应用于临床已经 12 年，以其起效迅速、作用时间短、清醒快、易于控制和不良反应少等特点，被麻醉医师广泛用于全麻诱导，硬膜外麻醉辅助镇静，无痛人流，无痛胃镜等领域。丙泊酚具脂溶性而不溶于水，早期临床制剂为聚氧乙基蓖麻油溶液(cremophor EL)，但聚氧乙基蓖麻油可引起体内组胺释放，造成部分患者出现药物型皮疹、呼吸急促、支气管痉挛、低血压等不良反应。将难溶或微溶于水的药物制成静脉注射制剂，是药剂专业的难题之一。常用的解决方法有：1.制成可溶性盐；2.加入助溶剂；3.使用混合溶剂；4.使用增溶剂。然而，并不是所有的难溶性药物都可制成注射制剂，并且也可能出现稀释时药物析出、注射部位疼痛或引发静脉炎、附加剂对人体产生毒性等问题。难溶性药物往往具有一定的亲脂性，将其溶解或增溶于适宜的油相中制成含药静脉注射用脂肪乳剂，可提高药物的溶解度。该法不需引入有机溶剂即可大大提高载药量并实现静脉注射，同时也可避免上述问题。

2.2 实验部分

2.2.1 实验仪器及试剂

Agilent1100 高效液相色谱仪（Agilent 公司），BME100L 高速剪切机（上海威宇机电制造有限公司），NanoGenizer高压均质机（苏州微流纳米生物技术有限公司），UV-2102PC 紫外可见分光光度计（尤尼柯仪器有限公司），Nicomp380 Z3000型激光衍射粒度分析仪（苏州微流纳米生物技术有限公司）。

注射级卵磷脂（美国 lipid 公司），注射级油酸（美国 lipid 公司），注射级大

豆油（铁岭北亚药用油公司），维生素 E。

2.2.2 酸性与碱性条件下的药物稳定性

精密量取丙泊酚原料药适量，用异丙醇稀释成 1 mL 中含丙泊酚 2 mg 的溶液，摇匀，精密量取该溶液适量，加甲醇稀释至每 1 mL 约含丙泊酚 0.2 mg 的溶液。取 0.2 mg/mL 的丙泊酚溶液 10 mL，加入 0.1 mol/L 盐酸 3 mL，放置，中和，取 20 μ L 进样高效液相色谱仪测定。同法测定加 0.1 mol/L 氢氧化钠的样品。

2.2.3 热条件下的药物稳定性

将丙泊酚原料药分别放入 40 $^{\circ}$ C 和 60 $^{\circ}$ C 的恒温箱中，分别于第 0、5、10 天取样，精密量取丙泊酚原料药适量，用异丙醇稀释成 1 mL 中含丙泊酚 1 mg 的溶液，摇匀，精密量取该溶液适量，加甲醇稀释至每 1 mL 约含丙泊酚 0.1 mg 的溶液。HPLC 测定丙泊酚的含量变化。

2.2.4 丙泊酚表观分配系数的测定

油相和水相中药物浓度的比值为油水分配系数 P (严格地讲应为药物表观分配系数)，可用下式表示：

$$P = \frac{C_o}{C_w} = \frac{C_o}{C_s - C_o}$$

C_o —丙泊酚在油相中的浓度；

C_w —丙泊酚在水相中的浓度；

C_s —丙泊酚在油相中的表观溶解度。

可以通过配制丙泊酚在正辛醇中的已知浓度的溶液，将其与等体积水相溶液混合，通过测定水相层中药物浓度，利用 $C_o = C_s - C_w$ 求得油相中的药物浓度，再求药物的油/水分配系数。

取用水饱和过的正辛醇溶液配置成含丙泊酚 5 mg/mL 的油相，取此溶液 20 mL

与用正辛醇饱和过的水等体积混合置 37 ℃摇床中震摇 2 天，静置一晚，取水相测丙泊酚的浓度，计算油水分配系数。

2.2.4 处方筛选

2.2.4.1 脂肪乳组分的选择

本处方主要参考 1989 年由美国 FDA 批准，德国费森尤斯卡比股份有限公司上市的丙泊酚注射液处方。目前，丙泊酚的脂肪乳注射液在我国临床麻醉中应用广泛，规格有 10 mL*0.1 g；20 mL*0.2 g；50 mL*0.5 g 三种，我们拟定制备注射用丙泊酚脂肪乳的规格为 20 mL*0.2 g。静脉注射用脂肪乳剂是近年来发展较快的药物新剂型，它是以甘油三酯为油相，精制天然卵磷脂为乳化剂，甘油为等渗剂，经高压均质制成的 O/W 型乳剂。油酸是众所周知的稳定剂，由于脂肪乳中的油相和卵磷脂极易和空气中的氧气反应，所以在乳剂中还可加入适量的抗氧化剂维生素 E。在脂肪乳的制备过程中剪切、匀质等过程容易引入金属离子，所以在处方中设计金属离子螯合剂 EDTA。拟定的处方见表 2.1：

表 2.1 处方设计表

序号	油酸 (mL)	EDTA	V _E (g)
A	----	0.005%	---
B	0.12	0.005%	---
C	0.36	----	----
D	0.24	0.005%	0. 08
E	0.24	----	0. 20
F	0.12	0.005%	----

* 每个处方中包含丙泊酚 4 g，大豆油 40 g，甘油 9 g，纯化卵磷脂 4.8 g，注射用水加至 400 mL。

2.2.4.2 脂肪乳的制备

在预实验的基础上，初步拟定制备方法为：称量丙泊酚，大豆油，油酸混合搅

拌溶解作为油相，甘油，卵磷脂，EDTA， V_E 混合搅拌溶解作为水相。将油相与水相混合，7500 转/分钟，20 分钟高剪切，进行 800 Pa，8 个循环匀质制备脂肪乳。将制备好的脂肪乳调 pH 值到 8.8，装入安瓿瓶中，冲入氮气保护。30 分钟高温灭菌。

2.2.4.3 脂肪乳质量的评价指标及方法

肉眼观察乳剂的外观，好的丙泊酚脂肪乳剂呈乳白均一，表面无油滴、静止时不分层，振摇后不挂壁或液体从内壁迅速划落。

乳滴粒径及电位，脂肪乳在热力学及动力学上均属于不稳定体系，因此物理稳定性是影响载药亚微乳产品开发和投向市场的重要因素。粒径对脂肪乳的稳定性与毒性有直接影响。制剂达到足够小的粒径并具有较窄的粒度分布范围时，才能满足制剂在注射使用时的安全性及分散体系的稳定性要求。一般来说，乳剂的粒径保持在 200-500 nm 可以保持最好的物理稳定性，且在体内不会发生栓塞。卵磷脂具表面电荷可以提高乳剂的稳定性，电荷的减少会增加絮凝和合并的速度。因此，在评估稳定性时，测量电位十分重要。脂肪乳的电位小于 -20 mV 时，粒子间的排斥力将无法克服由粒子热运动引起的聚合作用，导致乳液破坏。能使脂肪乳稳定存在的电位范围是 -20~-40 mV 之间。

pH 值，当 pH 小于 5 时，乳滴之间的静电排斥力会减少，粒径会增大，脂肪乳最佳的 pH 是 6-7，因为在这个 pH 范围内，一方面，卵磷脂在乳滴周围可以形成良好的保护膜；另一方面，在这个 pH 下可以降低卵磷脂的水解。但在制备时要把脂肪乳调到偏碱性，因为在灭菌和储运过程中，pH 有降低的趋势。

脂肪乳的稳定性，用恒温加速实验法留样考察：取适量不同处方的亚微乳样品于 40 °C 的条件下保存 1 个月，每 10 天进行亚微乳的外观、粒度、Zeta 电位、pH 值的考察，另外将制备好的脂肪乳进行 120 小时外力振荡试验，观察脂肪乳的外观、粒度、Zeta 电位、pH 值。

2.2.5 乳化设备的选择

在相同条件下使用剪切、剪切-超声、剪切-匀质、直接匀质、all-in-one 制备脂

肪乳。选择乳化设备。

2.2.6 初乳

初乳的制备中影响因素有：温度，剪切时间和转速。选用处方 B 的组分，将丙泊酚、大豆油、油酸混合搅拌溶解作为油相，甘油、卵磷脂、EDTA 和水混合搅拌溶解作为水相。将油相与水相混合按照表 2.2 的条件高剪切制备初乳。得到的初乳按照预实验方案制备乳剂。

表 2.2 高剪切

试验号	转速（转）	时间（分钟）	温度（℃）
1	7000	10	室温
2	7000	20	60
3	6000	10	60
4	6000	20	室温

2.2.7 高压匀质工艺

匀质的工艺在脂肪乳的制备中是关键的一步，涉及到匀质的温度，压力和循环次数几个考察项目。制备脂肪乳的油相与水相，60℃下 6000 转/分钟高剪切 10 分钟制备初乳，将制得的初乳分别在室温（25℃）和 60℃下高压匀质，均采用 400 bar、600 bar、800 bar 的压力匀质 10 次，且每次匀质完一次，取样测定制得的脂肪乳的粒径、PDI 和电位。

2.2.8 调 pH 及灭菌

匀质后调 pH 至 8.8 左右，装入 20 mL 安瓿瓶，充入氮气，封口。30 min 高温灭菌得到自制丙泊酚脂肪乳。

2.3 结果与讨论

2.3.1 酸性与碱性条件下的药物稳定性

丙泊酚在酸碱条件下的高效液相色谱图见图 2.1 和 2.2。由图可见丙泊酚在酸性和碱性条件下均不稳定，分解产生杂质。

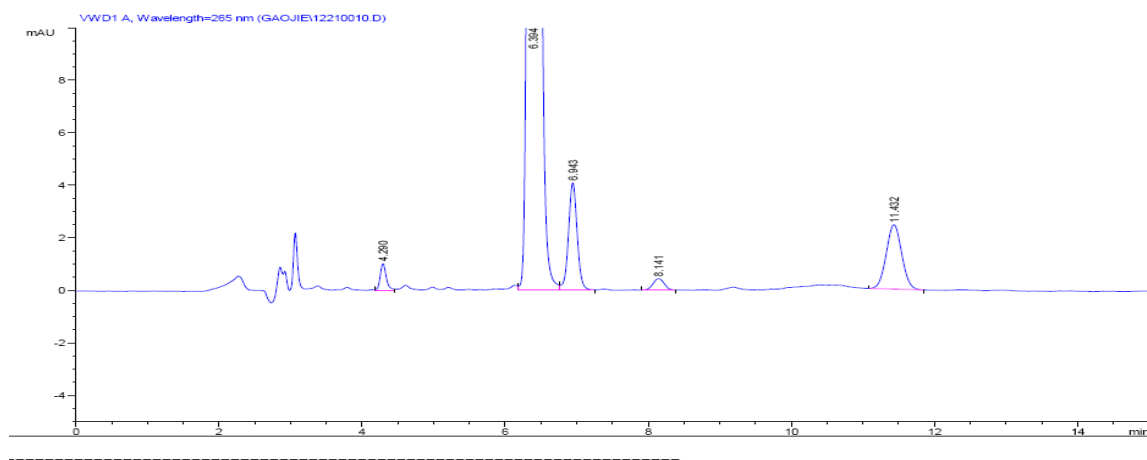


图 2.1 丙泊酚在酸性条件下的稳定性

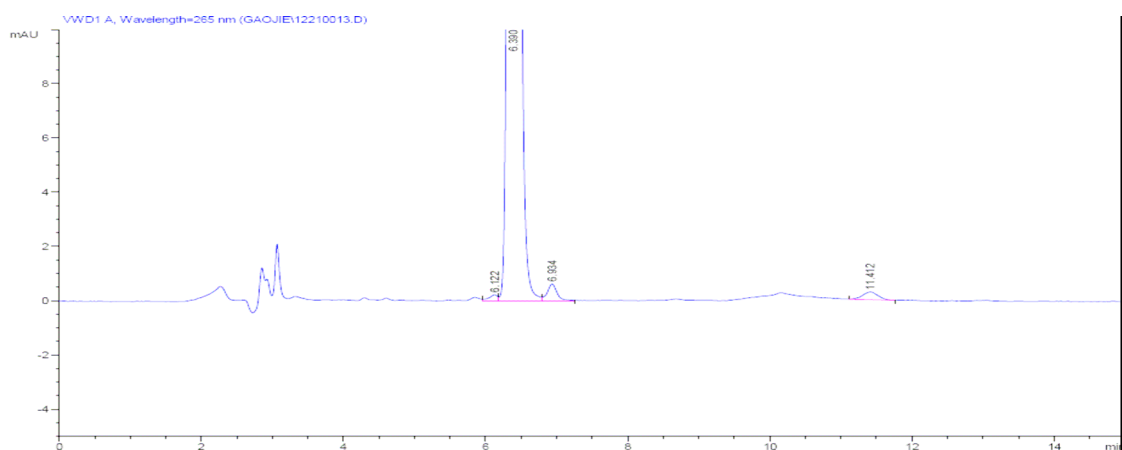


图 2.2 丙泊酚在碱性条件下的稳定性

2.3.2 热条件下的药物稳定性

记录高效液相色谱图，记录含量变化，结果见表 2.3

表 2.3 影响因素试验结果 (%)

	0 天	5 天	10 天
40℃	99.6%	104.9%	88.8%
60℃	99.6%	98.6%	82.6%

由以上结果可知，丙泊酚在高温下长时间放置不能稳定存在。

2.3.3 丙泊酚表观分配系数的测定

通过测定水相中药物浓度计算得出丙泊酚的表观分配系数，结果见表 2.4。

表 2.4 丙泊酚油水分配系数测定结果

	C _s (mg/mL)	C _w (mg/mL)	C _o (mg/mL)	P	logP
1		0.0127	4.9873	392.7008	2.5941
2	5.00	0.0126	4.9874	395.8254	2.5975
3		0.0120	4.9874	395.8254	2.5975
平均 logP=2.5964≈2.60					
RSD=0.076%					

由上述结果可知丙泊酚脂溶性强，在水中溶解度较小。

2.3.4 处方筛选

2.3.4.1 粒度仪测粒径稀释倍数的考察

将脂肪乳稀释不同倍数用粒度仪测定粒径，记录粒径与 PDI，结果见表 2.5

表 2.5 不同稀释倍数测粒径结果

倍数	100	200	500	800	1000	2000	5000	8000	10000	12000	15000
粒径 (nm)	207.5	214.8	224.2	237.6	231.0	234.4	237.8	223.8	206.8	211.7	238.7
PDI	0.190	0.071	0.064	0.018	0.030	0.073	0.077	0.020	0.057	0.119	0.068

有上述结果可知稀释倍数在 800-8000 之间测得的粒径均较稳定，所以选用稀释倍数为 1000 倍来测定粒径。

2.3.4.2 处方考察结果

按 2.4.2.2 的制备方法制备表 2.6 中的几种处方，考察几种处方的质量评价指标，结果见表 2.6。

表 2.6 丙泊酚脂肪乳的处方筛选

	A	B	C	D	E	F
外观	白色 无油滴	白色 无油滴	白色，无油 滴	白色，有少 量油滴	白色，有少 量油滴，	白色 无油滴
粒径(nm)	250.0	235.0	214.5	243.2	252.0	229.3
PDI	0.137	0.131	0.076	0.110	0.168	0.156
电位(mV)	-3.107	-40.480	-41.870	-40.310	-38.650	-43.500
pH	7.30	7.90	8.26	8.06	7.74	7.60

*处方 C 和 E 开封后脂肪乳很快变为黄色

表 2.7 40 ℃放置 10 天的质量评价

	A	B	C	D	E
外观	白色，有少量 油滴	白色，有少量 油滴	白色，有少量 油滴	白色，有少量 油滴	白色，有少量 油滴
粒径(nm)	250.5	232.3	203.6	237.0	237.4
PDI	0.131	0.094	0.042	0.163	0.156
电位(mV)	-38.8	-42.1	-37.9	-65.7	-77.9
pH	6.88	7.13	8.15	7.65	7.75

*处方 C 和 E 开封后脂肪乳很快变为黄色

表 2.8 40 °C 放置 20 天的质量评价

	A	B	C	D	E
外观	白色, 有少量 油滴	白色, 有少量 油滴	白色, 有少量 油滴	白色, 有少量 油滴	白色, 有少量 油滴
粒径(nm)	229.8	228.8	210.5	256.7	243.6
PDI	0.043	0.104	0.083	0.177	0.084
电位(mV)	-57.7	-64.5	-67.0	-70.9	-76.4
pH	6.57	7.16	8.04	7.94	7.88

*处方 C 和 E 开封后脂肪乳很快变为黄色

表 2.9 40 °C 放置 30 天的质量评价

	A	B	C	D	E
外观	白色, 有少量 油滴	白色, 有少量 油滴	白色, 有少量 油滴	白色, 有少量 油滴	白色, 有少量 油滴
粒径(nm)	243.2	215.5	215.9	259.0	248.0
PDI	0.133	0.103	0.105	0.149	0.066
电位(mV)	-59.4	-67.7	-69.6	-63.5	-61.2
pH	7.21	7.73	7.79	7.54	7.54

*处方 C 和 E 开封后脂肪乳很快变为黄色

表 2.10 120 小时机械外力震荡的质量评价

	A	B	C	D	E
外观	白色, 有少量 油滴	白色 无油滴	白色, 无油滴	白色, 有少量 油滴	白色, 有少量 油滴
粒径(nm)	256.1	226.6	224.9	233.7	233.7
PDI	0.126	0.099	0.131	0.652	0.089
电位(mV)	-37.03	-36.99	-42.20	-79.90	-64.90
pH	6.69	7.26	8.08	7.82	6.95

*处方 C 和 E 开封后脂肪乳很快变为黄色

在脂肪乳的处方中加入油酸可以增加乳剂的稳定性, 这是因为油酸可以形成稳

定的复合凝聚膜,增大膜的强度和使脂肪乳的 ζ 电位升高。油酸的表观 pH 值为 7.4~7.5,故油酸大量电离,定位在油水界面上,使脂肪乳的 ζ 电位绝对值升高, ζ 电位的绝对值随油酸浓度的增大而升高。由以上结果可知 A 处方中不加油酸, ζ 电位不能达到是乳剂稳定的值。在乳化过程中剪切,匀质等过程容易引入金属离子,而铁离子可以与丙泊酚发生反应,产生杂质。处方 C 和 E 中未加 EDTA,制备好的乳剂在空气中放置一段时间按就会变为黄色;或充氮后呈白色,但开封后与空气接触一段时间很快就变成黄色。 V_E 具有抗氧化作用,可以防止大豆油等被空气中的氧气氧化,但在本实验中,处方中加入 V_E 后脂肪乳有油滴漂浮。

在乳剂稳定性试验中,40℃下放置 1 个月,每 10 天取样一次,考察乳剂的外观,粒径, PDI, ζ 电位和 pH 值发现:对于乳剂的粒径和 PDI,放置过程中变化不大,电位随着放置过程而不断减小到-70 mV 以下,能使脂肪乳稳定存在的电位范围是-20~-40 mV 之间,说明高温放置时乳剂不稳定,同时发现处方中加入 V_E 电位减少的比不加的处方快,也说明加入 V_E 后使本脂肪乳稳定性下降。pH 值在放置过程中有少许下降,这是因纯磷脂遇空气易氧化并分解出胆胺,胆酸等,同时油相在加热过程中水解产生游离脂肪酸。120 小时机械外力震荡试验中各指标的变化趋势与高温放置试验中一致。

综上所述,选定处方 B 为最优处方。同时丙泊酚脂肪乳不可以高温存放,在高温下乳剂趋于不稳定,这也与适应性研究中丙泊酚的热稳定性结果一致。

2.3.5 剪切

制备脂肪乳剪切后只能形成粒径为微米的粒子,且有油滴漂浮;剪切-超声后乳剂破乳,明显有大量黄色油状物漂浮;剪切-匀质可制备符合粒径要求的脂肪乳;直接匀质得到的脂肪乳粒径不均一;all-in-one 制备乳剂,药物不能溶解。由以上结果选用剪切-匀质制备脂肪乳。

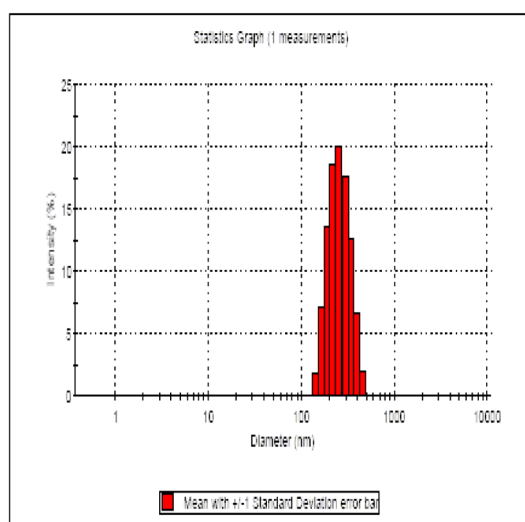
不同高剪切条件下制备的脂肪乳的结果见表 2.11

表 2.11 不同高剪切条件下制备脂肪乳

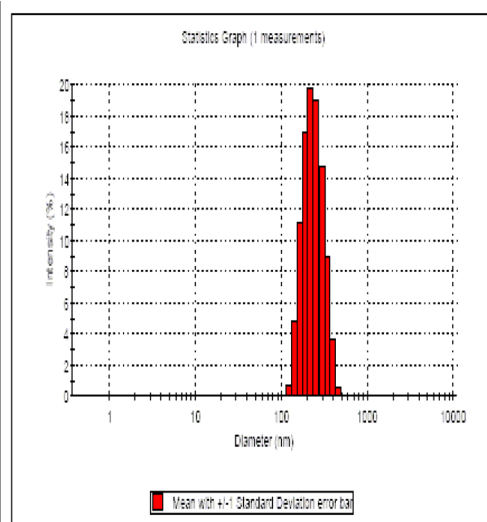
试验号	性状	粒径(nm)	PDI	ζ 电位(mV)
1	乳白，有细小油滴	222.6	0.089	-26.6
2	无油滴	244.6	0.071	-32.1
3	无油滴	210.0	0.076	-27.4
4	乳白，有细小油滴	208.0	0.073	-28.2

试验 1-4 得到脂肪乳粒径分布见图（2.3）

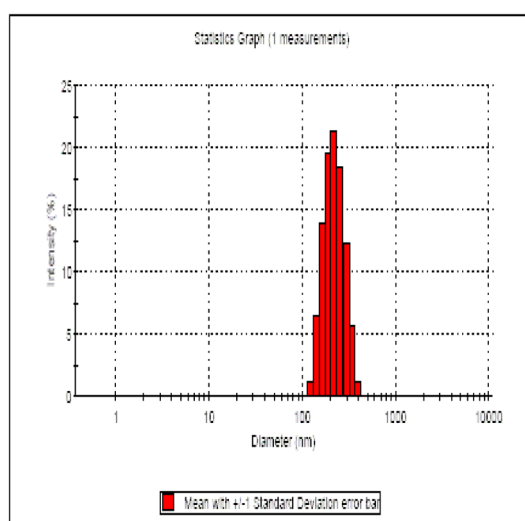
试验 1 制备脂肪乳粒径图



试验 2 制备脂肪乳粒径图



试验 3 制备脂肪乳粒径图



试验 4 制备脂肪乳粒径图

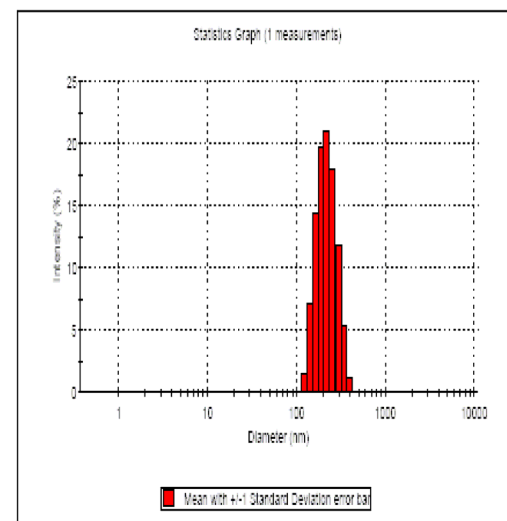
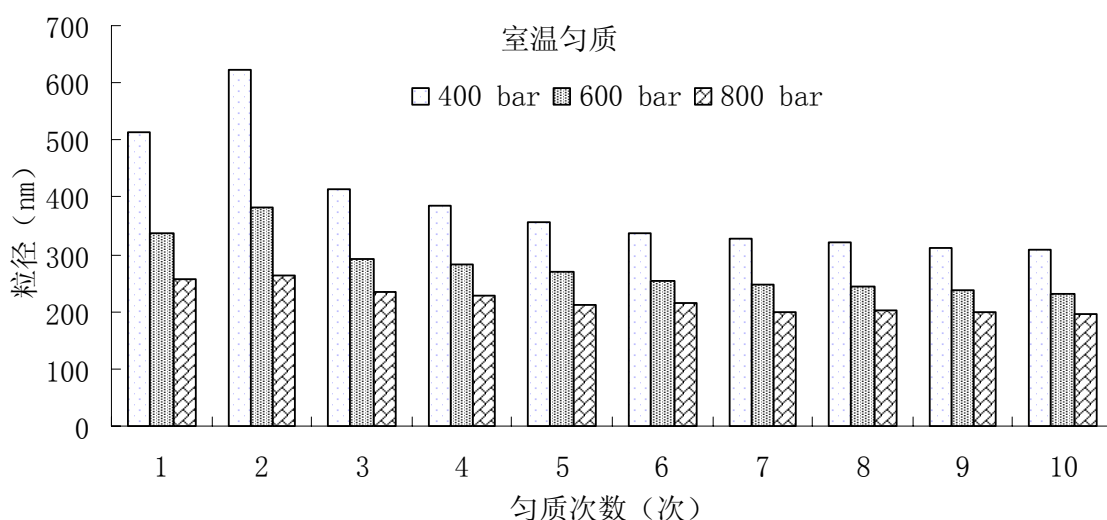


图 2.3

由上述结果可知剪切 7000 转/分钟时得到的乳剂粒径比 6000 转/分钟下大，所以选用 6000 转/分钟。在 6000 转/分钟的条件下，剪切 10 分钟和 20 分钟得到乳剂粒径大小相差不大，但在室温（25 °C）下制得的乳剂有细小油滴漂浮，且由于磷脂在 70~80 °C 时处于相转变温度，在这个温度下剪切，油/水界面张力最低，可形成小乳滴。如果低于此温度，则乳滴平均直径增大。在转相温度下制备的乳剂粒径较小，乳剂比较稳定。在表面活性剂的相转变温度下较易形成较小乳滴是因为在此温度下非离子表面活性剂分子聚集在油/水界面的倾向较大，乳化剂的乳化能力相对较强，油/水界面张力相对较低易行成乳化剂膜的缘故。而且此时油相的粘度较低，外部施加的剪切力所做的功也较小，也利于乳化，另外考虑到剪切过程中温度会升高，选用 60 °C；又因为升高温度会导致乳剂的不稳定性。所以尽量减少升温的时间。综上所述确定高剪切的工艺为将油相与水相加热到 60 °C，6000 转/分钟高剪切 10 分钟。

2.3.6 高压匀质工艺

25 °C 和 60 °C 下不同匀质压力和次数结果见图 2.5。



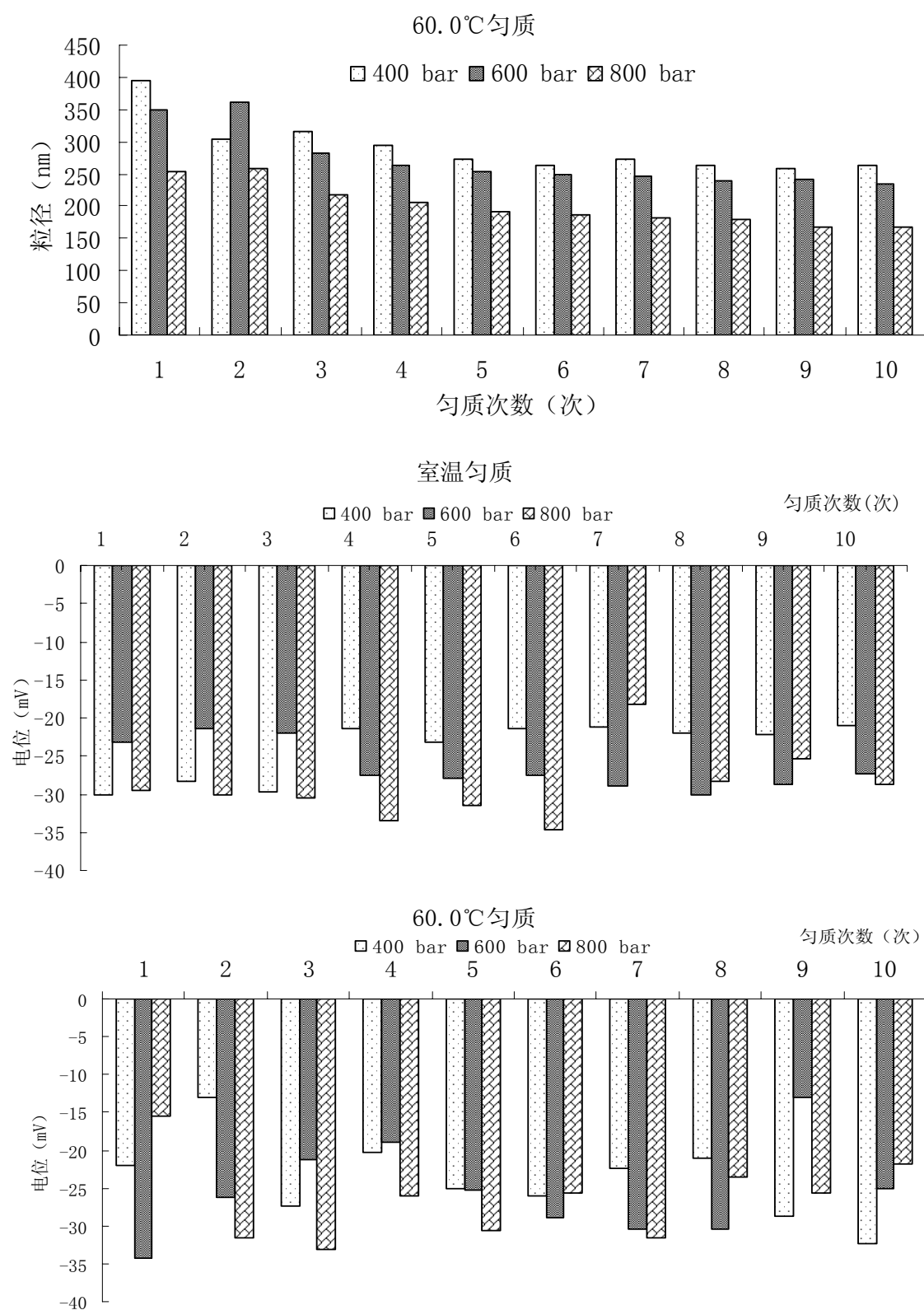


图 2.5 匀质条件的考察

高压匀质机的工作原理：均质是由柱塞泵和均质阀共同作用使物料在均质阀区发生细化和均匀混合的过程。物料通过柱塞泵吸入并加压，在柱塞作用下进入压力大小可调节的阀组中，经过特定宽度的限流缝隙（工作区）后，瞬间失压的物料以极高的流速（1000 至 1500 米/秒）喷出，碰撞在阀组件之一的碰撞环上，产生了三种效应：1.空穴效应：被柱塞压缩的物料内积聚了极高的能量，通过限流缝隙时瞬间失压，造成高能释放引起空穴爆炸，致使物料强烈粉碎细化。2.撞击效应：物料通过限流缝隙时以上述极高的速度撞击到特制的碰撞环上，造成物料粉碎。3.剪切效应：高速物料通过阀腔通道和限流缝隙时会产生强烈的剪切。

由以上实验结果可知：匀质过程中压力越大，升温越快，800 bar 下快速升温。观察 60 °C 制备得到的乳剂 400 bar 的明显漂油，600 bar 极少量漂油，而 800 bar 未观察到油滴。但放置 2 天后变为黄色。说明乳剂在制备中不能温度过高，否则容易生成杂质。在 25 °C 下制备的乳剂 400 bar、600 bar 和 800 bar 均未见漂油，且颜色始终保持乳白。所以选用 25 °C 作为匀质的压力。25 °C 匀质条件下，乳剂的粒径随着压力和循环次数的增加而降低。800 bar 的压力下粒径可以达到要求，匀质 5 次后粒径变化不大，但匀质 6 次之后电位出现双峰，可能是匀质过程产生了杂质。考虑到工业上节省成本的要求，600 bar 下的到的乳剂 PDI 较小，选用 800 bar，6 个循环。

2.3.7 调 pH 及灭菌

匀质后将 pH 值调至 8.8 左右，高温灭菌 30min，结果见表 2.12；2.13

表 2.12 脂肪乳灭菌前后

	Size (nm)	PDI	电位(mV)	pH
调 pH 前	210.3	0.050	-15.7	4.67
调 pH 后	222.7	0.019	-31.0	8.80
灭菌后	213.5	0.089	-34.7	7.92

表 2.13 三批样品调 pH 值结果

	I	II	III
灭菌前	8.64	8.79	8.80
灭菌后	7.90	7.74	7.92

由以上结果可知，在灭菌过程中，乳剂受热，油相会产生游离脂肪酸，使乳剂 pH 值下降，乳剂质量标准要求 pH 值在 7.0~8.5 之间，在放置过程中油相还会产生游离脂肪酸使乳剂 pH 值下降，所以在灭菌前将 pH 值调高一些，调至 8.8，灭菌后为 7.92 左右，符合国家药典上有关规定。

灭菌前后粒径基本不变，证明乳剂在加热下比较稳定。负的电位在调 pH 值前后增大很多，这是因为作为乳化剂的卵磷脂，它是以磷脂酰胆碱为主要成份的混合物，还包括磷脂酸、磷脂酰乙醇胺等少量酸性磷脂，这些磷脂对乳剂的稳定起着非常重要的作用。酸性磷脂的 pKa 在 3~5 左右，环境的 pH 值大于 pKa 时，磷脂荷负电，使乳滴表面带有负电荷。

应注意的是在灭菌后，应将制剂以冰水浴迅速降温，以尽量避免余热对乳剂进一步产生影响。为避免静脉乳剂受热不均引起乳剂破裂，应采用旋转灭菌。

2.3.8 处方与工艺的确定

根据以上的试验结果，确定丙泊酚脂肪乳的优化工艺为：丙泊酚、大豆油、油酸混合均匀作为油相，甘油、卵磷脂、水、EDTA 混合均匀作为水相。将两相加热到 60℃在高速搅拌下混合高剪切 6000 转/分钟，10 分钟作为初乳。将初乳 800 bar，6 个循环高压匀质，调 pH 值为 8.8，装入安瓿，充氮，封口。30 min 高温灭菌得产品。

2.4 小结

本章对脂肪乳的处方和制备工艺进行了优化。最终确定处方为：丙泊酚（1%）、大豆油（10%）、油酸（0.06%）、卵磷脂（1.2%）、甘油（2.25%）、EDTA（0.005%）。

使用高压匀质法制备脂肪乳，60 ℃高剪切 6000 转/分钟 10 分钟制备初乳，25 ℃将初乳 800bar 高压匀质 6 个循环，调 pH 到 8.8，装入安瓿，充氮气。30 分钟高温灭菌得脂肪乳粒径为 213.0 nm、多分散指数（PDI）0.089、电位-34.7 mV。

3 理化性质及稳定性研究

3.1 前言

脂肪乳为热力学不稳定体系，所以它的稳定性是一个重要的评价指标，本章对乳剂的理化性质及稳定性进行研究。

3.2 实验部分

3.2.1 实验仪器与药品

Agilent1100高效液相色谱仪(Agilent 公司), ODS2 5 μ m C₁₈柱(依利特), BME100L高速剪切机(上海威宇机电制造有限公司), NanoGenizer高压均质机(苏州微流纳米生物技术有限公司), 紫外可见分光光度计(尤尼柯仪器有限公司) Nicomp380 Z3000激光衍射粒度分析仪(苏州微流纳米生物技术有限公司) 丙泊酚对照品(sigma 公司), 丙泊酚脂肪乳(自制), 静安(德国费森尤斯集团)。

3.2.2 分析方法的建立

3.2.2.1.检测波长的确定

将丙泊酚对照品用流动相溶解制成适宜浓度,经紫外分光光度法扫描最大吸收波长。

3.2.2.2 样品溶液的制备

(1) 待测品溶液

精密量取丙泊酚脂肪乳适量,用异丙醇稀释成1 mL中约含丙泊酚1 mg的溶液,摇匀,精密量取该溶液适量,加甲醇稀释至每1 mL约含丙泊酚0.1 mg作为待测品溶液。

(2) 对照品溶液

精密量取丙泊酚对照品适量,用异丙醇稀释成 1 mL 中约含丙泊酚 1 mg 的溶液,摇匀,精密量取该溶液适量,加甲醇稀释至每 1 mL 约含丙泊酚 0.1 mg 作为对照品溶液。

(3) 空白溶液

取异丙醇与甲醇按 1:9(体积比)配成空白溶液。

3.2.2.3 色谱条件的选择

为使杂质及降解产物与主成分的分离度满足含量测定的要求。根据色谱柱柱效情况,选择适合的流动相组成十分必要。根据相关文献^[41]报道,我们选取甲醇—水—冰醋酸(70:29:1)、甲醇—水—冰醋酸(78:22:1)、甲醇—乙腈—水(60:15:25)几种流动相进行了研究筛选。

3.2.2.4 空白干扰试验

精密称取空白辅料适量,加流动相配制成约 0.1 mg/ml 的空白辅料溶液作为空白对照溶液,在上述色谱条件下,取空白溶液 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图。

3.2.2.5 线性关系

精密称取丙泊酚对照品 100 mg,置 100ml 量瓶中,加异丙醇适量溶解并稀释至刻度,摇匀。依次精密量取 1 ml, 2 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml 分别置于 50ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。在上述色谱条件下,依次精密量取 20 μ L, 注入液相色谱仪,记录色谱图,

3.2.2.6 精密度试验

精密量取线性关系项下 0.1 mg/mL 溶液 20 L, 依法操作, 注入液相色谱仪, 连续进样 6 次, 测量峰面积值。

3.2.2.7 稳定性研究

取线性关系项下的 0.1 mg/mL 溶液, 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 进样, 考察峰面积的变化。

3.2.2.8 检测限

在高效液相色谱仪检测器稳定操作的该项检测条件下, 不断将预试溶液稀释, 减少进样量, 直至其主峰为噪音的 3 倍 ($S/N > 3$)。将丙泊酚对照品溶液稀释制成每

1 mL 含 0.25 μg 的溶液，精密吸取 20 μL ，注入液相色谱仪，测得最低检测限。

3.2.2.9 回收率试验

精密称取丙泊酚 800、1000 mg 按处方量加入辅料，混均匀，得样品溶液。分别精密量取样品溶液各 1 g，置 10 ml 量瓶，加异丙醇稀释至刻度，摇匀，精密量取 1 ml，置 10 mL 量瓶中，甲醇定容即得浓度为 0.08 mg/mL、0.10 mg/mL 的溶液，精密量取 20 μL 进样，注入液相色谱仪，记录色谱图。

3.2.3 物理性质

根据《药品注册管理办法》和新药研究指导原则的有关规定和要求，对本品质量相关问题进行了研究。

取自制丙泊酚测乳剂的 pH 值。用超纯水稀释 1000 倍，采用激光粒度仪测定粒径及电位

3.2.4 化学性质

3.2.4.1 游离脂肪酸

1.测定法：精密量取样品与对照品溶液各 1 mL，分别置 20 mL 具塞试管中，加异丙醇—正庚烷—0.5 mol/L 硫酸溶液（40:10:1）混合液 5.0 mL。振摇 1 分钟，放置 10 分钟。供试品溶液管精密加正庚烷和水各 3 mL，对照品溶液管精密加正庚烷 2 mL 和水 4 mL，密塞，上下翻转 10 次，静置至少 15 分钟，使分层，分别精密量取上层液 3 mL，置 10 mL 离心管中，加尼罗蓝指示液 [取尼罗蓝 $[(\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O})_2 \cdot \text{SO}_4]$ 0.04 g，加水 200 mL，使溶解后，加正庚烷 100 mL 振摇，弃去上层正庚烷。反复操作 4 次。取下层水溶液 20 mL，加无水乙醇 180 mL，混匀，即得。本液应置棕色瓶中，室温下可存放一个月]1 mL，在通氮条件下，用氢氧化钠滴定液（0.01 mol/L）滴定至溶液显粉红色。供试品溶液消耗氢氧化钠滴定液（0.01 mol/L）的毫升数不得大于对照品溶液消耗氢氧化钠滴定液（0.01 mol/L）的毫升数。

2.对照品溶液的制备：取棕榈酸约 0.64 g，精密称定，置 500 mL 量瓶中，加正庚烷溶解并稀释至刻度，摇匀。

3.2.4.2 过氧化物值

1.测定法：精密量取本品 10 mL，置 250 mL 圆底烧瓶中，于 60℃ 水浴真空旋转蒸发除去水分。加入醋酸—氯仿（3:2）混合液 30 mL，振摇溶解后，加入饱和碘化钾溶液 0.5 mL，准确振摇萃取 1 分钟，然后加入水 30 mL，边剧烈振摇边立即用硫代硫酸钠滴定液（0.01 mol/L）滴定至溶液黄色几乎消失。加入淀粉溶液 1mL，摇匀，继续滴定至上层水相的蓝色消失。照下式计算，过氧化值不得过 3 mmol/kg。

$$\text{供试品的过氧化值} = \frac{10 \times (V - V_0) \times F}{M}$$

式中，V 为供试品消耗硫代硫酸钠滴定液（0.01 mol/L）的容积，mL；

V₀ 为空白试验消耗硫代硫酸钠滴定液（0.01 mol/L）的容积，mL；

M 为供试品的重量，g；

F 为硫代硫酸钠滴定液浓度的校正因子。

2.空白试验：按测定法进行空白试验，空白试验中硫代硫酸钠滴定液（0.01 mol/L）的消耗不得过 0.1 mL。

3.2.4.3 甲氧基苯胺值

测定法：精密量取本品 10 mL，置 250 mL 圆底烧瓶中，加入无水乙醇 20 mL，于 60℃ 水浴真空旋转蒸发除去水份。自“加入无水乙醇 20 mL 起，依法重复操作三次除尽水分。残渣加 20%异丙醇的异辛烷溶液溶解并移至 25 mL 量瓶中，加上述溶液稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液作为供试品溶液。取供试品溶液，照紫外—可见分光光度法（中国药典 2005 年版二部附录 IVA），在 350 nm 的波长处，以 20% 异丙醇的异辛烷溶液作空白，测得的吸光度为 A₀。

精密量取供试品溶液 5 mL 至具塞试管中，再精密加入 0.25% 4-甲氧基苯胺的冰醋酸溶液（临用新配）1 mL，加塞，振摇，避光放置 10~30 分钟（不超过 30 分钟）；另精密量取 20%异丙醇的异辛烷溶液 5 mL 代替供试品溶液，同法操作，制成试剂空白溶液。以试剂空白溶液作空白，在 350 nm 波长处测得的吸光度为 A。按下式计算，甲氧基苯胺值不得过 2.2。

$$\text{甲氧基苯胺值} = \frac{25 \times (1.2 \times A - A_0)}{V \times B}$$

式中 V 为供试品的取样量, mL;

B 为供试品中大豆油 的标示量, g/mL;

1.2 为加入 4- 甲氧基苯胺的冰醋酸溶液后的溶液稀释因子。

3.2.4.4 含量测定

精密量取本品适量, 用异丙醇稀释制成每 1 mL 中约含丙泊酚 1 mg 的溶液, 摇匀, 精密量取该溶液适量, 加甲醇稀释制成每 1 mL 约含丙泊酚 0.1 mg 作为供试品溶液。另精密量取丙泊酚对照品适量, 同法制备, 作为对照品溶液。精密量取上述两种溶液各 20 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算, 即得。

3.2.4.5 有关物质

照含量测定项下的高效液相色谱法测定。

取丙泊酚含量测定项下的供试品溶液作为供试品溶液: 另精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。取对照溶液 20 μ L 注入液相色谱仪, 调整检验灵敏度, 使主成份的峰高为满量程的 10-15%。精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μ L, 分别注入, 记录色谱图至主成份峰保留时间的 3 倍。供试品溶液色谱图中各未知杂质峰面积不得大于对照溶液主成份峰面积的 1/10。各未知杂质峰面积之和不得大于对照溶液主成份峰面积的 1/2。

2,6—二异丙基—1,4—苯醌: 有关物质项下记录的供试品溶液色谱图中 2,6—二异丙基—1,4—苯醌 (相对于丙泊酚的保留时间为 0.87) 的峰面积与校正因子 0.0317 的乘机不得大于对照溶液色谱图中丙泊酚峰面积的 1/10. (不得过 0.1% (w/w))

3,3',5,5'—四异丙基联苯酚: 有关物质项下记录的供试品溶液色谱图中 3,3',5,5'—四异丙基联苯酚的峰面积与校正因子 0.0439 的乘机不得大于对照溶液色谱图中丙泊酚峰面积的 1/10 (不得过 0.1% (w/w))

3.2.5 配伍稳定性

将丙泊酚与生理盐水/葡萄糖 1:2 到 1:10、1:20 混合，分别在 0 min，10 min，30 min，1 h 测量配伍后的稳定性指标。

3.3 结果与讨论

3.3.1 分析方法

3.3.1.1 紫外最大吸收波长的选择

将丙泊酚对照品用流动相溶解制成适宜浓度，经紫外分光光度法扫描，在 265 nm 波长处有吸收较大，选择 265 nm 处的波长作为检测波长。

3.3.1.2 色谱条件的确定

流动相筛选试验结果见表 3.1

表 3.1 流动相筛选试验结果

流动相配比	峰分离情况
甲醇—水—冰醋酸 (70:29:1)	保留时间较后
甲醇—水—冰醋酸 (78:21:1)	主成分峰形较理想，主成分峰的保留时间较合适
甲醇—乙腈—水 (60:15:25)	主峰有肩峰

经过试验，其中以甲醇—水—冰醋酸（78:21:1）为流动相时，供试品溶液中主成分与各相关杂质的峰分离良好，主成分峰形好，未见明显拖尾。选用此条件作为流动相。

3.3.1.3 空白干扰

空白辅料在上述色谱条件下色谱图显示辅料不干扰丙泊酚的含量测定。

3.3.1.4 色谱条件与系统适用性试验

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，甲醇—水—冰醋酸（78:22:1）为流动相；检测波长为 265 nm，流速 1 ml/min，柱温 30 ℃。在此色谱条件下，取供试品溶液进样 20 μL，记录色谱图，理论板数按丙泊酚计算为 16729，结果见图 3.1。

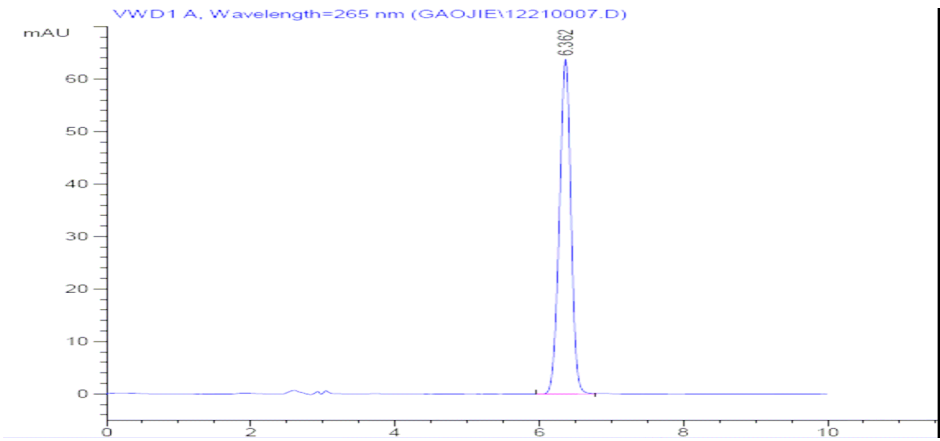


图 3.1 色谱条件与系统适用性试验

3.3.1.5 线性

在此色谱条件下，以丙泊酚的浓度为横坐标（X），以峰面积为纵坐标（Y），求得回归方程为： $y=6982.4x+43.642$ 。结果表明，当进样量在 0.02~0.2 mg/mL 之间范围内，丙泊酚的浓度与峰面积呈良好线性关系。

表 3.2 线性关系试验结果

浓度（mg/ml）	0.02	0.04	0.08	0.1	0.12	0.16	0.2
峰面积	184.8	321.1	606.9	735.9	881.4	1162.6	1457.5

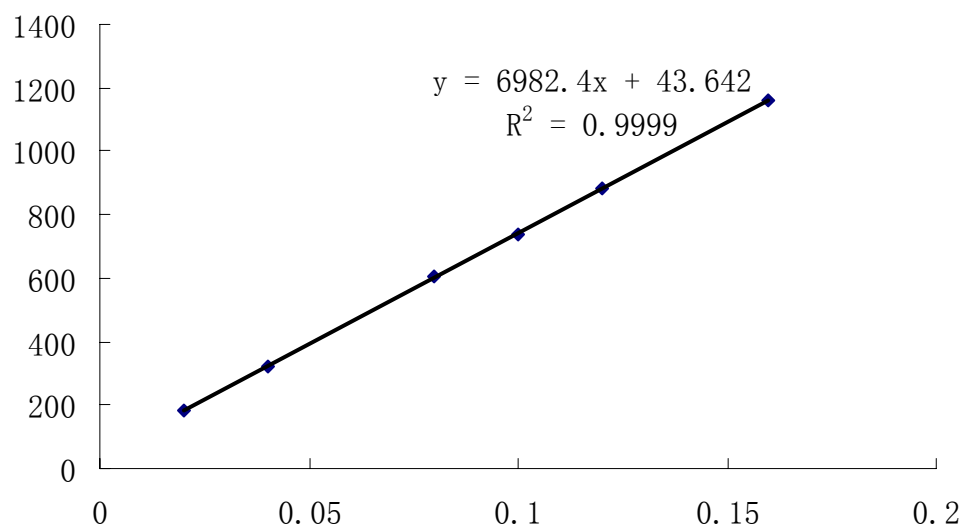


图 3.2 浓度—峰面积线性关系图

3.3.1.6 精密度

表 3.3 精密度试验结果

序号	1	2	3	4	5	6
峰面积	735.9	741.5	742.3	744.1	743.8	739.9
平均峰面积	741.25					
RSD (n=6)	0.41%					

3.3.1.7 稳定性

表 3.4 稳定性试验结果

间隔时间	0	1	2	4	6	8
峰面积	735.9	743.8	743.1	750.3	747.6	752.1
平均峰面积	745.47					
RSD	0.79%					

试验证明，待测液在 8 小时内避光放置，稳定性良好。

3.3.1.8 检测限

试验结果见图 3.3，最小检出量为 2 ng

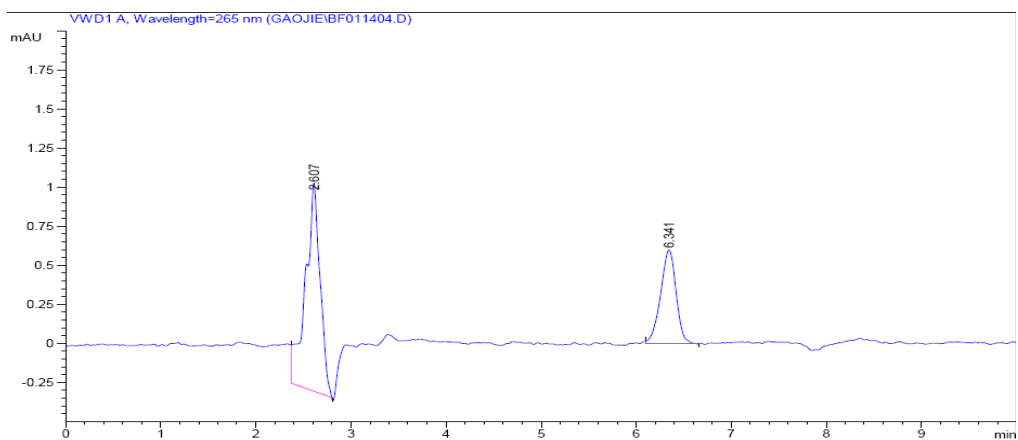


图 3.3 最小检测限

3.3.1.9 回收率

表 3.5 回收率试验结果

序号	对照品加入量(mg)	峰面积	对照品测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)
1	8.22	617.6	8.23	100.12%	99.16%
2	8.17	615.5	8.19	100.24%	
3	8.10	593.9	7.91	97.65%	
4	10.7	804.7	10.90	101.87%	
5	10.08	735.5	9.91	98.31%	
6	10.90	780.2	10.55	96.79%	

RSD= 1.9 % (n=6)

因为配置样品时加入 1200 mg 药品时不能溶解于溶剂中，所以回收率没有进行高浓度的试验。

3.3.2 物理性质

乳剂是多相分散系，具有热力学不稳定性，分散相液滴有自动聚集的趋势。因此物理稳定性是影响载药亚微乳产品开发和投向市场的重要因素。为提高乳剂的稳定性，必须加入第三种物质。这些物质主要包括表面活性剂、聚合物、固体粉末、

无机离子等。其中最重要的是乳化剂—表面活性剂。

1. 乳剂的稳定性

乳剂的稳定性主要涉及油/水界面膜的物理性质，液滴间的电性排斥作用，聚合物吸附膜的空间阻碍作用，相体积比和液滴大小与分布，分散介质的黏度等。

界面膜的性质：乳剂中分散液滴表面形成牢固的有弹性的并可即时修复的界面膜是保持稳定性的重要条件。乳化剂形成界面膜时分子排列紧密，分子间侧向作用强烈，并具有一定的黏度与厚度才可使乳剂稳定。

静电斥力稳定作用：乳剂中液滴可因电离、吸附和摩擦而带有某种电荷，产生静电斥力稳定作用。如离子型表面活性剂电离荷电；非离子型乳化剂从分散介质中吸附离子荷电；液滴的介电常数小于分散介质的介电常数而荷负电。

聚合物的空间稳定作用：聚合物做乳化剂，在分散液滴表面的吸附层具有黏弹性好，界面层厚等特点，可阻碍液滴合并而增加乳剂的稳定性。

固体粉末的稳定作用：若粉末对油/水相中某一相能润湿，可起稳定作用。如能被水相润湿，则易行成稳定的 O/W 型乳剂。被油相润湿，则易行成稳定的 W/O 型乳剂。

2. 乳剂不稳定性的一般表现

乳剂的不稳定性表现为分层与沉降、絮凝（聚集）、聚结、变型和破乳。

分层（creaming）：乳剂中分散相与分散介质存在密度差而引起的液滴上浮或下沉的现象。只是使分散相液滴浓度不再均匀分布于整体乳剂中。如为 O/W 型乳剂分层后上层中油滴浓度远大于下层中的。但乳剂整体的分散度不变。

絮凝（flocculation）：乳剂中分散相液滴在范德华力作用下发生的聚集（aggregation），体系呈比较疏松的状态，但并不合并，稍加搅动即可再分散。

聚结（coalescence）：絮凝的液滴聚合体（aggregate）合并成较大液滴。如聚结的最终结果导致液滴聚合体沉淀析出，称为聚沉（coagulation）。

破乳（demulsion）：乳剂完全破坏为油，水两相。絮凝和聚结是破乳的前奏，此时液滴合并出现油滴。破乳主要是由破坏了乳剂中分散液滴的保护膜。引起破乳的常见因素有：**a. 化学因素**：如向以脂肪酸钠为乳化剂的 O/W 型乳剂中加酸可破乳；

b.温度因素：升温可使乳剂中分散液滴的吸附保护膜膜强削弱，液滴合并破乳。升温可降低外相黏度，从而增加液滴碰撞与合并的机会；c.反向乳化剂：如向脂肪酸钠 O/W 型乳剂中加入少量的氯化钙，可使乳剂破坏 c.反向乳化剂：通过吸附剂，除掉乳化剂或吸附膜而有利于液滴合并破乳。一般微孔滤膜、素烧陶瓷过滤，亦可除掉部分乳化剂膜而有利于液滴合并破乳。

表 3.6 自制脂肪乳的物理性质

	Size(nm)	PDI	电位(mV)	pH
自制脂肪乳	213.0	0.089	-34.7	7.92
静安	225.3	0.052	-34.6	8.05

脂肪乳注射剂的质量要求除符合注射剂的一般规定外，特别对乳粒大小均匀性、稳定性要求高。粒径对脂肪乳的稳定性与毒性有直接影响。制剂达到足够小的粒径并具有较窄的粒度分布范围时，才能满足脂肪乳剂在注射使用时的安全性及分散体系的稳定性要求。卵磷脂具表面电荷可以提高乳剂的稳定性，电荷的减少会增加絮凝和合并的速度。能使脂肪乳稳定存在的 ζ 电位范围是-20~-40 mV 之间。乳剂的物理和化学稳定性是 pH 值依赖的，国家标准规定乳剂的 pH 值为 7~8.5，自制脂肪乳符合国家要求。

3.3.3 化学性质

3.3.3.1 游离脂肪酸

表 3.7 游离脂肪酸的检查

对照品	1	2	3	样品	1	2	3
消耗	0.6	0.7	0.6	消耗	0.4	0.5	0.5
NaOH(mL)				NaOH(mL)			
平均		0.63		平均		0.46	

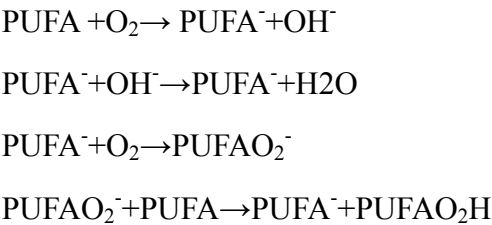
油相在加热过程中水解产生游离脂肪酸。供试品溶液消耗氢氧化钠滴定液（0.01mol/L）的毫升数小于对照品溶液消耗氢氧化钠滴定液（0.01mol/L）的毫升数。符合规定。

3.3.3.2 过氧化物值

表 3.8 过氧化物值的检查

样品	1	2	3
过氧化物值	1.6	1.89	4.16
平均		2.55	

临床应用的脂肪乳剂多为多不饱和脂肪酸(PUFA)，其中的不饱和双键化学性质不稳定，在空气中容易发生脂质过氧化反应，产生过氧化物，对机体造成不良影响，其反应过程如下：



脂质过氧化物可进一步裂解成对人体有害的脂质氧化产物，其潜在的危害是细胞膜脂质层，蛋白质和 DNA，削弱机体的免疫功能，诱导细胞调亡，组织损伤，器官功能障碍和致癌。过氧化物值是油脂新鲜度的灵敏指标，其值增高表明过氧化物增多。过氧化物除对动物细胞中的线粒体及多种酶有强大杀伤作用外，还能继续分解成多种有害物质，如醛、酮、酸、环氧化物类，导致植物油氧化劣变，增加植物油的挥发性，降低营养价值。进口复核标准中曾控制此项，但目前国标尚无要求。除原料中带入的过氧化物外，脂肪乳注射液在生产和贮藏过程中也会产生过氧化物。因此，控制过氧化物的含量对保证产品质量和安全性有重要意义。

脂肪乳剂发生脂质氧化的关键是其分子中含有不饱和双键，如能减少脂肪乳剂中不饱和双键的数量或采用不含不饱和双键的中链甘油三酯(MCT)，则可减轻脂肪乳剂的过氧化反应。这一现象已被多项实验所证实：有人将中性粒细胞与 LCT、MCT/LCT 和结构脂肪乳剂共同培养，发现长链甘油三酯的稳定性最差；还有人观察了全营养混合液(TNA)保存时间与血浆丙二醛(MDA)浓度的关系，发现随着保存时间的延长，血浆 MDA 浓度逐渐升高，PUFA 的含量逐渐下降^[42]。

脂肪乳剂的化学稳定性还受多种环境因素影响：直接威胁脂肪乳剂化学稳定性

的因素是环境中氧气的存在，虽然目前国外已有不透气的醋酸乙烯(EVA)输液袋，但广泛采用的还是氧气可以自由透过的聚乙烯。由于上述原因，脂肪乳剂应保存在玻璃瓶中，如配成 TNA 后盛于输液袋，应及时应用，避免长期保存^[43]。

保存条件如光线照射、保存温度和保存时间也严重影响脂肪乳剂的化学稳定性，室温保存 1 周的 TNA 中脂质过氧化物已超过警戒值。日光中的紫外线能够加速脂肪乳剂的过氧化作用，如 TNA 直接接受紫外线照射，其成分变化更快。

本产品过氧化物值基本符合规定。因为在制备过程中无法实行氮气保护隔绝空气，脂肪乳与氧气接触导致个别样品过氧化物值超标。在制备过程中充入氮气保护可避免这个问题。

3.3.3.3 甲氧基苯胺值

表 3.9 甲氧基苯胺值测定结果

样品	1	2	3
甲氧基苯胺值	3.11	2.60	4.24
平均	3.32		

甲氧基苯胺值存在的问题也是制备过程中无法保证在氮气氛下，脂肪乳中各成分与空气中的氧气接触被氧化^[44]。

3.3.3.4 含量测定

按含量测定项下的方法。测定 6 批样品含量的数据，结果见表 。

表 3.10 6 批样品含量测定数据

批号	含量（标示量%, n = 3）
1	95.72
2	98.23
3	99.08
4	96.78
5	97.87
6	95.20

结论：含量测定符合标准

3.3.3.5 有关物质

记录色谱图，各未知杂质峰面积之和小于于对照溶液主成份峰面积的 1/2。各杂质含量符合标准。

3.3.4 配伍稳定性

3.3.4.1 与葡萄糖的配伍

表 3.11 配伍稳定性

	0min		10min		30min		1h	
1: 1	241.0	0.041	270.0	0.089	232.2	0.086	231.9	0.075
1: 3	267.0	0.073	220.1	0.086	241.0	0.055	228.8	0.057
1: 5	225.9	0.058	231.8	0.033	229.1	0.068	229.6	0.030
1: 10	225.3	0.067	236.4	0.007	229.0	0.039	227.2	0.009
1: 20	227.3	0.113	234.1	0.075	236.4	0.064	238.3	0.093

3.3.4.2 与生理盐水的配伍

表 3.12 配伍稳定性

	0min		10min		30min		1h	
1: 1	230.2	0.049	226.2	0.141	224.8	0.095	229.8	0.065
1: 3	234.0	0.053	239.6	0.046	234.6	0.028	242.9	0.036
1: 5	228.7	0.037	228.5	0.083	222.5	0.041	231.4	0.047
1: 10	227.6	0.077	222.2	0.088	223.3	0.074	224.9	0.040
1: 20	226.2	0.030	229.0	0.056	227.5	0.036	228.9	0.042

以上结果表明，在短时间内脂肪乳与生理盐水和葡萄糖配伍稳定性良好。

3.4 小结

建立了丙泊酚脂肪乳的 HPLC 分析方法并进行了初步的质量研究。自制丙泊酚脂肪乳的游离脂肪酸, 过氧化值均符合药典上的相关规定, 甲氧基苯胺值略微超标, 这与制备工艺中缺乏氮气氛, 乳剂在制备过程中接触空气中的氧气有关, 工艺过程中充氮气保护可改善。

4 脂肪乳中游离药物的浓度的测定

4.1 前言

大量文献报道,丙泊酚脂肪乳在临床使用时注射疼痛是常见的副作用,而注射疼痛是因为乳剂中游离药物的浓度而引起的,本章讨论了影响乳剂中游离药物浓度的因素。

本研究使用反向透析法研究脂肪乳中游离药物的浓度,将脂肪乳置于烧杯中,将装有 2 mL 与脂肪乳等渗的甘油水溶液的透析袋(截留相对分子质量为 10000)置于脂肪乳中。由于脂肪乳中的大部分药物包裹在油滴中,而纳米粒无法通过透析袋的孔隙,所以游离在水相中的药物透过透析袋的孔隙进入透析袋。经过一段时间,水相中的游离药物浓度与透析袋中的药物浓度达到平衡,另外因为透析袋中甘油水溶液体积很小,不能构成漏槽条件,所以不会引起油相中的药物的释放。通过测量透析袋中药物的浓度就反应出了脂肪乳中游离药物的浓度。

4.2 实验部分

4.2.1 主要仪器与药品

Agilent1100 高效液相色谱仪(Agilent 公司),250mm×4.6mmHypersil ODS2 5 μ m C₁₈ 柱(依利特),透析袋(截留相对分子质量 10000)。

丙泊酚脂肪乳(自制),PEG-660-12-羟基-硬脂酸(basf 中国),泊洛沙姆 188(basf 中国)、MCT(basf 中国)。

4.2.2 油相对游离药物浓度的影响

1.按已有工艺条件制备三批脂肪乳,油相成份分别为:

处方一:大豆油(LCT)(10%)

处方二：大豆油（5%）/MCT（5%）

处方三：MCT（10%）

处方中其他成分含量相同，均含丙泊酚（1%）、油酸（0.06%）、卵磷脂（1.2%）、甘油（2.25%）、EDTA（0.005%）、注射用水。

2.将制备好的脂肪乳按体积比，乳剂：5%葡萄糖=1：4 稀释，装入 250 mL 烧杯中。

3.每个透析袋中装入 2.6%的甘油水溶液 2 mL，每个烧杯中放入 3 个透析袋。

4.搅拌透析 24 小时。取出透析袋，经离心后 HPLC 测定透析袋中药物浓度。

5.分别 HPLC 测定各处方中药物的含量

4.2.3 表面活性剂对游离药物浓度的影响

1.按已有工艺根据 FDA 的安全限量和文献支持制备含不同表面活性剂的脂肪乳：

a.在水相中加泊洛沙姆 188 分别占总量的质量百分数 0.2%、0.4%、0.8%；

b.在水相中加 PEG-660-12-羟基-硬脂酸（solutol HS 15）分别占占总量的质量百分数 0.05%、0.1%、0.15%、0.2%。

处方中其他成分含量相同，均含丙泊酚（1%）、大豆油（10%）、油酸（0.06%）、卵磷脂（1.2%）、甘油（2.25%）、EDTA（0.005%），注射用水。

2.将制备好的脂肪乳按体积比，乳剂：5%葡萄糖=1：4 稀释，装入 250 mL 烧杯。

3.每个透析袋中装入 2.6%的甘油水溶液 2 mL，每个烧杯中放入 3 个透析袋。

4.搅拌透析 24 小时。取出透析袋，经离心后 HPLC 测定透析袋中药物浓度。

5.分别 HPLC 测定各处方中药物的含量

4.3 结果与讨论

4.3.1 油相对脂肪乳游离药物的浓度的影响

透析袋中的游离药物浓度经过乳剂中药物浓度的校正后。以油相中 MCT 的含量为横坐标, HPLC 测游离药物的浓度的峰面积为纵坐标做油相-游离药物的浓度关系图, 试验结果见图 4.1。

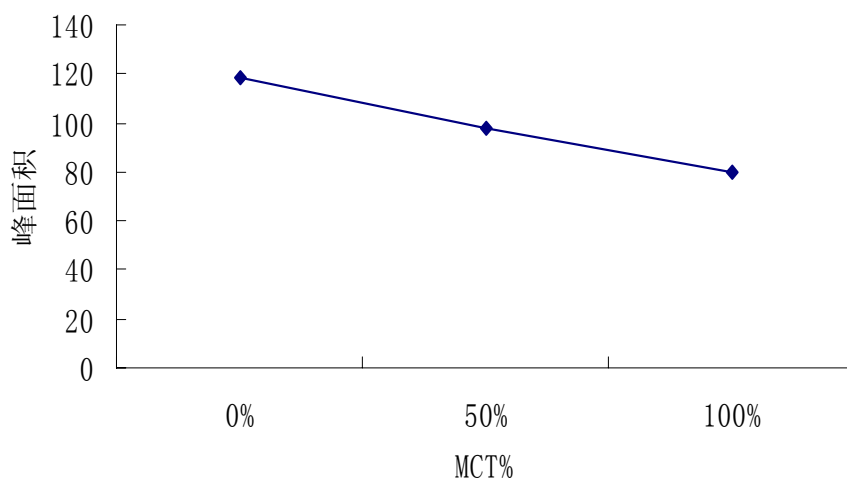


图 4.1 油相与游离药物的浓度的关系

脂肪乳剂的主要成分为脂肪酸甘油三酯, 其中的脂肪酸有多种, 根据脂肪酸分子结构中碳链的长度可分为短链脂肪酸(2C~4C)、中链脂肪酸(6C~12C)和长链脂肪酸(14C~24C); 由于人体不能合成亚油酸、亚麻酸和二十碳四烯酸, 这3种脂肪酸必须从外界摄取, 因此称之为必需脂肪酸, 其它脂肪酸称为非必需脂肪酸; 脂肪酸碳链中的碳原子间有的完全以共价键结合, 称为饱和脂肪酸, 有的则含有不饱和双键, 称为不饱和脂肪酸, 含有1个不饱和双键的称为单不饱和脂肪酸, 含有多个不饱和双键的称为多个不饱和脂肪酸。

脂肪乳在初始阶段, 其主要是被作为一种高能量制剂应用于营养不良和重症病人的营养支持治疗中。可是随着其应用对象、范围的扩大, 其缺点也显现出来, 主要表现为LCT水解问题以及其高含量的多不饱和n-6 FA中的亚油酸(18: 2n6)和花生四烯酸(AA)(20: 5n6)所引起的一些效应。AA是血栓素A₂、前列腺素(PGI₂、PGE₃、

PCD₂)及白三烯B₄的前体物质, 这些衍生物具有非常强的缩血管作用和化学趋向性, 参与了许多疾病的发生和发展^[45,46]。因此, 大量应用LCT乳剂对于免疫性疾病、心血管系统疾病、危重症脏器功能衰竭等病人将会产生不良影响。为此, MCT被引入到了LE当中, 从而弥补了传统LCT乳剂的不足^[47]。

从 1984 年开始, 中链甘油三酯(MCT)引起了人们的注意, 中链甘油三酯的脂肪酸碳链中不含不饱和双键, 是饱和脂肪酸, 因此化学性质稳定, 不易发生过氧化反应。MCT 有以特点: MCT 的分子量较小, 溶解度大, 能够直接被组织代谢, 因此半衰期较短, 代谢和清除快而完全, 不易沉积于肝、肺和网状内皮系统, 不易再酯化, 能够减轻吞噬系统负荷。MCT 代谢后不产生花生四烯酸类物质, 因此对免疫系统没有抑制作用。MCT 代谢生成的酮体是免疫活性细胞和肠粘膜上皮细胞的代谢底物, 对免疫功能具有促进作用^[48]。

但 MCT 亦有其不足之处: 不能提供必需脂肪酸, 应用纯 MCT 可引起代谢性酸中毒和神经系统副作用。静脉大量、快速输入 MCT, 如辛酸钠, 可能会产生以下毒副作用, 如麻醉作用, 脑病, 甚至可能昏迷。而且在中链甘油三酯水解产物中不含必需脂肪酸, 如单独使用中链甘油三酯一周以上, 则需补充长链甘油三酯。因而单纯的中链甘油三酯不宜作为合适的脂肪来源。所以, 将 MCT 与 LCT 按一定比例进行物理混合后形成的脂肪乳剂, 可达到扬长避短的效果。

近年来, 有关中、长链甘油三酯(MCT/LCT)混合制剂的代谢研究表明: MCT/LCT 混合制剂的混合方式对其水解速度没有显著性影响; 而在脂肪乳剂的水解过程中, 总脂肪酸的释放率主要取决于 MCT 在混合制剂中的量, 而不是其混合方式^[49]。含有 50% MCT 的脂肪乳剂已被证明在脂肪乳中使用是安全的。当使用 MCT 与 LCT 混合制剂时, 该混合制剂不但能提供快慢代谢兼备, 比 LCT 的脂肪乳剂更为有效的能源, 还可以提供必需脂肪酸, 且其所提供的脂肪酸谱比 LCT 更接近于正常人的脂肪酸谱^[50], 且临床上未发现动物实验中所见的毒副作用^[51]。

在本研究中使用 MCT/LCT 混合制剂可以显著降低游离药物的浓度, 减少丙泊酚的注射疼痛, 且油相中使用 MCT 还可以减少游离脂肪酸的量。另外脂肪乳剂发生脂质氧化的关键是其分子中含有不饱和双键, 如能减少脂肪乳剂中不饱和双键

的数量或采用不含不饱和双键的中链甘油三酯(MCT)，则可减轻脂肪乳剂的过氧化反应。所以使用 MCT/LCT 混合制剂比单纯使用 LCT 具更多的优越性。

4.3.2 表面活性剂与游离药物的浓度的关系

4.3.2.1 solutol HS 15 对游离药物浓度的影响

透析袋中的游离药物浓度经过乳剂中药物浓度的校正后。以 solutol HS 15 的浓度为横坐标，游离药物的浓度峰面积为纵坐标做 solutol HS 15-游离药物的浓度关系图，实验结果见图 4.2

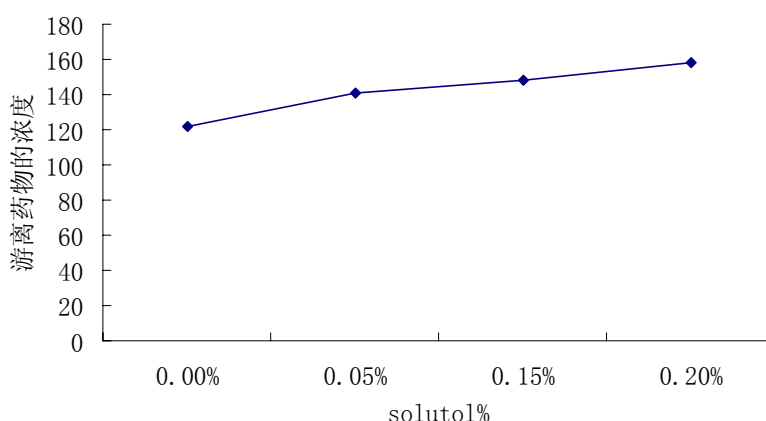


图 4.2 solutol HS 15-游离药物的浓度关系

Jumaa 等^[52]根据 Langmur 膜平衡原理进行的研究发现，在制乳过程中加入 PEG-660-12-羟基-硬脂酸(Solutol HS15)后，这种非离子表面活性剂与磷脂一样，也能在乳滴表面形成紧密的混合膜，且所得乳剂在不同 pH 和电解质下的稳定性均高于仅以磷脂为乳化剂所得乳剂；当混合乳化剂中 Solutol HS15 的质量分数小于 60 %时，乳剂具有良好的灭菌及贮存稳定性，这是由于：1.降低 SolutolHS15 的质量分数可能会增加 zete 电位，从而增加乳剂的稳定性；2.增加磷脂的含量会导致混合乳化剂的云点升高，也使得相转变温度(PIT)升高，从而使乳剂有较高的灭菌稳定性。另外还发现，离子化的脂肪酸(月桂酸钠、硬脂酸钠)能增强 O/W 界面上磷脂和 Solutol HS15 分子间的相互作用^[53]。

在脂肪乳中加入 solutol HS 15 可以得到稳定的脂肪乳，但由以上结果可知在处

方中加入 solutol HS 15 后游离药物的浓度有所增加,这可能是因为 solutol HS 15 是一种水溶性的表面活性剂,对药物在水相中具有增溶作用有关。

4.3.2.2 泊洛沙姆 188 对游离药物的浓度的影响

透析袋中的游离药物浓度经过乳剂中药物浓度的校正后。以泊洛沙姆 188 的浓度为横坐标,游离药物的浓度峰面积为纵坐标做 F68-游离药物的浓度关系图,实验结果见图 4.3

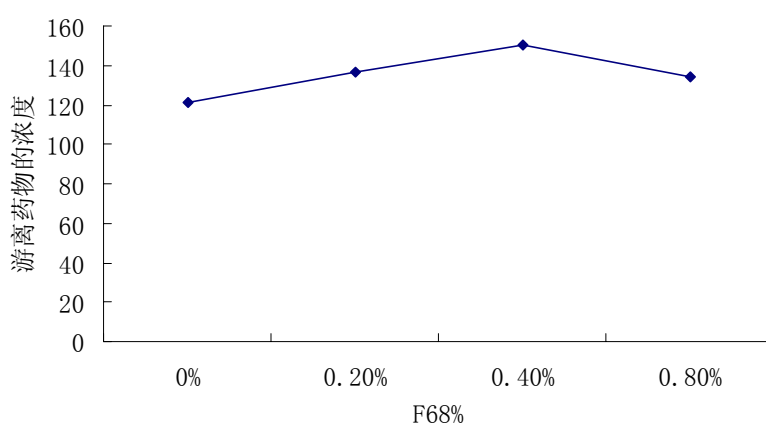


图 4.3 泊洛沙姆 188 (F68) - 游离药物的浓度关系

有文献报道,在制乳过程中联合使用磷脂和非离子共聚物表面活性剂泊洛沙姆 188,可在乳滴表面形成致密的混合膜,且其中非离子表面活性剂还具空间稳定作用,故能增加乳剂稳定性^[54]。

由以上实验结果可知,在处方中加入泊洛沙姆 188,可以得到的稳定的脂肪乳,但游离药物的浓度先增加后又有减小的趋势。增加可能是因为 F68 在水中形成胶束,对药物在水中有增容的作用。而接着增加泊洛沙姆 188 的量,水相中胶束浓度增加,使水相的黏度变大,油相中的药物不易透入水相中,使水相中药物浓度减少。

4.4 小结

通过一系列影响因素的研究,得出使用 LCT/MCT 混合制剂可以显著减少游离药物的浓度。且使用 LCT/MCT 混合制剂在制剂上具有优于单纯使用长链油的优点,

提出可以使用 LCT/MCT 混合制剂来降低注射痛等副作用，制备质量更加优越的丙泊酚静脉注射脂肪乳。

5 总结与展望

本文用高压匀质法制备了丙泊酚静脉注射脂肪乳，以脂肪乳的稳定性为指标筛选最优的处方与制备工艺，并对其进行了初步的质量研究。通过反向透析法测量了脂肪乳中游离丙泊酚的浓度，摸索影响游离丙泊酚浓度的因素。为临床应用减轻丙泊酚注射疼痛提供依据。

1.以粒径，PDI， ζ 电位，120 小时机械外力震荡，稳定性为指标筛选最优处方，得到外观乳白均一，稳定性良好的脂肪乳剂。

2.选取高剪切、高压匀质的方法制备脂肪乳，优选了剪切与匀质的最优工艺。实验结果表明，在 60℃，6000 转/分钟 10 分钟剪切初乳分散的较好。匀质中压力越大，粒径越小，循环次数 5 次以上粒径趋于稳定，变化不大。最终确定 800bar，6 个循环匀质。

3.确立了初步的乳剂质量标准。自制脂肪乳粒径为 213.0 nm、多分散指数(PDI) 0.089、 ζ 电位-34.7 mV。游离脂肪酸、过氧化值达、含量和有关物质测定可以达到药典相关要求。

4.建立了丙泊酚脂肪乳的 HPLC 检测方法。色谱条件为：采用 250mm×4.6mmHypersil ODS2 5 μ m C18 柱。柱温：30℃，流速：1mL/min，回归方程为： $y=6982.4x+43.642$ 。建立的方法简单，准确，重现性好，可作为本制剂的质量控制方法。

5.丙泊酚脂肪乳在临床使用中注射疼痛是一个普遍的副作用，研究表明引起注射疼痛的原因是脂肪乳中游离的药物引起的。本文研究了影响游离药物浓度的因素，得出使用 LCT/MCT 混合制剂可以显著减少游离药物的浓度。而加入水溶性的表面活性剂增加了游离药物的浓度。

自制丙泊酚静脉注射脂肪乳质量稳定可靠，相当于市售产品。研究发现使用 LCT/MCT 混合制剂可以显著降低游离药物的浓度，且 LCT/MCT 混合制剂作为油相优于单纯使用 LCT 的脂肪乳。今后可以进一步开发 LCT/MCT 混合制剂丙泊酚静脉注射脂肪乳。

致 谢

本论文是在导师杨祥良教授的统筹规划、万江陵副教授，周小顺工程师，陈华兵讲师的具体指导、周井炎教授的关怀与帮助下完成的。师长们严谨的科学态度、渊博的知识、踏踏实实做事、老老实实做人的态度、永不停息的奋斗精神，对我的人生之路有极为重要的影响。谨此向两年多来关心和培养我的导师杨祥良教授表示衷心的感谢，向指导我具体工作并在生活中给予我关心和帮助的万江陵老师，周小顺工程师，陈华兵讲师表示特别的感谢。

本文在实验过程中曾得到徐辉碧教授、刘卫副教授、李翱高工、叶晓川教授、赵彦兵博后、张丽霞博后、孙晓辉博后等指导和建议，在此表示诚挚的感谢。

同时特别感谢毛成文、赵小智、韩瑞玲、易涛、牟东升、祝红达等同学，感谢他们在实验中给予的帮助和支持。

感谢药物所姜闪闪、沈亮、户美玲、李正邦、张聪、张蜜、肖玲、王杏、鞠慧丽、刘琳、张丹、夏宏涛、陈留林、裴兴、马永刚、张学亮、周辉、王伟、刘子维等同学在实验中给予的帮助，感谢代东梅、周小顺、刘文双、李进、贺容丽、肖峰等各位纳米药业有限公司的老师给予的无私帮助。

感谢我的父母，他们的支持为我提供了一个良好的家庭环境，使我能够专心于自己的学业。

最后再一次对在我求学过程中培养、关心和帮助过我的老师、同学表示诚挚的感谢！

参考文献

- [1] 于荣国. 异丙酚对大鼠脑星状神经细胞抗坏血酸释放的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2003, 23(12):919-921
- [2] Javadov SA, Lim KH, Kerr PM, et al. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial Permeability transition [J]. Cardiovas Res., 2000, 45(3): 360-369
- [3] Farnes W, Rooke GA, Wu RS, et al. Comparison of the effects of thiopental, etomidate, propofol and on respiratory resistance after tracheal intubation [J]. Anesth., 1996, 84: 1307-1311
- [4] Hashiba E, Sato T, Hirota K, et al. The relaxant effect of propofol on guinea pig tracheal muscle is independent of airway epithelial function and adrenoceptor activity [J]. Anesth. Analg., 1999, 89: 191-196
- [5] Yamakage M, Hirshman CA, Croxton TL, et al. Inhibitory effects of thiopental sodium, ketamine and propofol on voltage-dependent Ca^{2+} channels in porcine tracheal smooth muscle cells [J]. Anesthesiology, 1995, 83: 1274-1282
- [6] Kakinohana M, Fujimoto T, Kakimoto O. Propofol anesthesia for an emergent caesarean section in a patient with asthma [J]. Masui., 1999, 48: 900-903
- [7] 刁玉刚, 祖剑宇, 马虹, 等. 异丙酚对哮喘豚鼠离体气管平滑肌张力的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2003, 23:908-911
- [8] 王亚平, 常业恬, 杨东林, 等. 异丙酚对离体人气管平滑肌的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2002,22:165-166
- [9] Lin CC, Shyr MH, Tan PPC, et al. Mechanism underlying the inhibitory effects of propofol on the contraction of canine airway smooth muscle[J]. Anesthesiology, 1999, 91: 750-759
- [10] 崔海, 王俊科, 孙燕红, 等. 异丙酚和氯胺酮对哮喘大鼠气道痉挛及气道渗出的作

- 用[J]. 中华麻醉学杂志,2003,23:185-187
- [11]Hirota Y, Sato Y, Hashimoto Y, et al. Relaxant effect of propofol on the air way of dogs [J]. Br. J. Anesth., 1999, 83: 292-295
- [12]印春铭, 王俊科. 异丙酚和安氟醚对支气管粘液纤毛运输功能的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2003,23:485-748
- [13]马虹, 崔涌, 王俊科. 异丙酚和氯胺酮对单肺通气犬肺内分流的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2003,23:757-759
- [14]Wretling A.. Development of fat emulsions[J]. J. Parenter. Enter. Nutr., 1981, 5: 230-235
- [15]Zeringue H. J., Brown M. L. and Singleton W. S.. Effect of saline electrolyte on particle sizes in fat emulsions by electronic counting [J]. J. Am. Oil Chem. Soc., 1964, 41: 688-691
- [16]Yalin M., Oner F., Oner L., et al. Preparation and properties of a stable intravenous lorazepam emulsion [J]. J. Clin. Pharm. Ther., 1997, 22: 39-44
- [17]Kurihara A., et al. Pharmacol. Res., 1996(13): 305-310
- [18]Jumaa M. and Muller B.W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions [J]. Int. J. Pharm., 1998, 163: 81-89
- [19]Jonkman de Vries J. D., Van den Bemt B. J., ten Bokkel Huinink W. W., et al. Pharmaceutical development of a parenteral formulation of the investigational anticancer drug clonidine [J]. PDA J. Pharm. Sci. Technol., 1997, 51: 89-95
- [20]Müller R. H. and Heinemann S.. Fat emulsions for parenteral nutrition. III: Lipofundin MCT/LCT regimens for total parenteral nutrition (TPN) with low electrolyte load [J]. Int. J. Pharm., 1994, 101: 175-189
- [21]Lundberg B. B.. A submicron lipid emulsion coated with amphipathic polyethylene glycol for parenteral administration of paclitaxel (Taxol) [J]. J. Pharm. Pharmacol., 1997, 49:16-21

- [22]Tibell A. and Norrlind B.. Cyclosporin A in fat emulsion carriers: studies on the immunosuppressive potential, using the hetero [J]. Transpl. Int., 1994, 7: 438–441
- [23]Herman C. J. and Groves M. J.. Hydrolysis kinetics of phospholipids in. thermally stressed intravenous lipid emulsion formulations [J]. J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44: 539–542
- [24]Hung C. F., Fang C. L., Liao M. H., et al. The effect of oil components on the physicochemical properties and drug delivery of emulsions: Tocol emulsion versus lipid emulsion [J]. Int. J. Pharm., 2006, 335: 193-202
- [25]Chung H., Kim T. W., Kwon M., et al. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system [J]. J. Control. Release, 2001, 71: 339–350
- [26]Melzera E., Kreuterb J., Danielsa R.. Ethylcellulose: a new type of emulsion stabilizer [J]. Eur. J. Pharm. and Biopharm, 2003, 56: 23–27
- [27]Jumaa M., Furkert F. H., Müller B. W. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosanq[J]. Eur. J. Pharm. and Biopharm, 2002, 53: 115–123
- [28]Wang J. J., Sung K.C., Hu O. Y. P., et al. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs[J]. J. Control. Release, 2006, 115: 140–149
- [29]Pinnamaneni S, Das N G, Das S K. Comparison of oil—inwamremulsions manufactured by microfluidization and homogenization [J]. Phazmaz, 2003, 58(8): 554-558
- [30]Freitas C. and Müller R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid Nan particle (SLN™) dispersions [J]. Int. J. Pharm., 1998, 168: 221–229
- [31]Venkatesh S., Li J., Caldwell K.D., et al. Compositional Heterogeneity in Parenteral Lipid Emulsions after Sedimentation Field-Flow Fractionation [J]. J. Pharm. Sci.,

1998, 87: 859–866

- [32]Nathanson M H, Gajraj N M, Russell J A. Prevention of pain on injection of propofol: a comparison of lidocaine with alfentanil[J]. Anesth Analg, 1996, 82; 469-471
- [33]Valtonen M, Iisalo E, Kanto J, et al. comparison between propofol and thiopentone for induction of anesthesia in children[J]. Anesthesia, 1998, 43:696-699
- [34]Valtonen M, Iisalo E, Kanto J, et al, Propofol as an induction agent in children: pain on injection and pharmacokinetics [J]. Acta. Anaesthesiol Scand., 1989, 33: 152-155
- [35]Yamakage M, Iwasaki S, Satoh J, et al. Changes in concentrations of free propofol by modification of the solution [J]. Anesth. Analg., 2005, 101(2):385-388
- [36]Hiroshi Ohmizo DDS, Shinju Obara MD, Hiroshi Iwama MD. Mechanism of injection pain with long and longmedium chain triglyceride emulsive propofol [J]. Can. J. Anesth., 2005, 52(6): 595–599
- [37]Yoshitaka F and Michiyo I. Comparison of Lidocaine, Metoclopramide, and Flurbiprofen Axetil for Reducing Pain on Injection of Propofol in Japanese Adult Surgical Patients: A Prospective, Randomized, Double-Blind, Parallel-Group, Placebo-Controlled Study [J]. Clinical Therapeutics, 2008, 30(2):
- [38]Yoshitaka F, Yuka S. Influence of aging on lidocaine requirements for pain on injection of propofol. Journal of Clinical Anesthesia, 2006(18): 526–529
- [39]Sedat Kaya, Selim Turhanoglu, Haktan Karaman, et al. Lidocaine for Prevention of Propofol Injection-Induced Pain: A Prospective, Randomized, Double-Blind, Controlled Study of the Effect of Duration of Venous Occlusion with a Tourniquet in Adults[J]. Medical Inc., 2007
- [40]Ryusuke U, Masaaki T, Tsuneo T, et al. Emulsion of flurbiprofen axetil reduces propofol injection pain due to a decrease in free propofol concentration [J]. J. Anesth., 2007, 21:325–329
- [41]单国瑾, 吴新民, 苏玉, 等. HPLC-荧光检测测定人全血中丙泊酚浓度[J]. 临床, 麻

醉学杂质. 2001,17(12): 666-668

- [42]Wu GH, Jarstrand C, Nordenstrom J. Phagocyte—induced lipid peroxidation of different intravenous fat emulsions and counteractive effect of vitamin E [J]. Nutrition, 1999, 15(5):359
- [43]Steger PJ, Muhlebach SF. Lipid peroxidation of lipid emulsions TPN bags: the influence of tocopherols [J]. Nutrition, 1998, 14(2):179
- [44]Tamilvanan S, Benita S. The potential of lipid emulsion for ocular delivery of lipophilic drug [J]. Eur. J. Pharm. biopharm., 2004, 58(2): 357-368
- [45]Carpentier YA, Simoons C, Siderova V, et al. Recent developments in lipid emulsion: relevance to intensive care [J]. Nutrition, 1997, 13(9): 73-78
- [46]Simopoulos AP. Human requirement for n-3 polyunsaturated fatty acids[J]. Poult. Sci., 2000, 79(7): 961-970
- [47]Adolph M. Lipid emulsions in parenteral nutrition [J]. Ann. Nutr. Metab., 1999, 43(1): 1-13
- [48]Toshiaki Tba. TPN supplemented with medium-chain triacylglycerols prevents atrophy of the intestinal mucosa in septic rats[J]. Nutrition, 1998, 14(9): 667
- [49]Nobuaki S, Richard J, Deckelbaum, et al. Hydrolysis of mixed lipid emulsions containing medium-chain and long-chain triacylglycerol with lipoprotein lipase in plasma-like medium. JPEN, 1994, 18: 112
- [50]Jiang ZM, Zhang SY, Wang XR, et al. A comparison of medium-chain and long-chain triglycerides in surgical patients. Annals of Surgery, 1993, 217: 175
- [51]Dennison AR, Ball M, Crowe PJ, et al. The metabolic consequences of infusing emulsions containing medium chain triglycerides for parenteral nutrition: a comparative study with conventional lipid. Ann. R. Coll. Surg. Engl., 1986, 68: 119
- [52]Jumaa M, Müller B W. Parenteral emulsions stabilized with a mixture of phospholipids and PEG-660-12-hydroxy-stearate: evaluation of accelerated and long-term stability [J]. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2002, 54(2): 207-212

- [53] Buszelloa K, Harnisch S, Müller R H, et al. The influence of alkali fatty acids on the properties and the stability of parenteral O/W emulsions modified with Solutol HS 15 [J]. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2000, 49(2):143-149
- [54] Trotta M, Pattarino F, Ignoni T.. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylethanolamine mixtures[J]. Eur. J. Pharm. Biopharm., 2002, 53(2): 203-208