

紫苏醇亚微乳的处方工艺优化与稳定性研究^Δ

刘琳^{1,2*}, 华海婴^{2#}, 赵永星³(1.郑州大学附属郑州中心医院药学部, 郑州 450007; 2.郑州大学医药科学研究所, 郑州 450052; 3.郑州大学药学院, 郑州 450001)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)33-3128-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.33.18

摘要 目的:优化紫苏醇亚微乳注射液制备处方工艺,并对制剂的稳定性进行考察。方法:采用高压匀质法制备紫苏醇亚微乳,采用单因素法和正交试验优化处方工艺。以包封率为指标,大豆油用量、大豆磷脂S75-泊洛沙姆188(F68)的比例、匀质转速、匀质次数为因素,并考察最优处方工艺所制得的制剂在离心、高温、光照、加速试验中的稳定性。结果:最优处方工艺中,大豆油用量为12.5 g、大豆磷脂(S75)-泊洛沙姆188(F68)的比例为2:1、匀质转速为1 400 r/min、匀质次数为8。所制微乳的粒径呈单峰分布,平均粒径为270~300 nm, Zeta电位为41.5~46.7 mV,包封率为48.7%~62.3%,离心后未见分层和油滴。与0时比较,高温、强光、加速条件下制剂各项指标均无明显变化。结论:所制紫苏醇亚微乳具有较好的物理化学稳定性。

关键词 紫苏醇;亚微乳;处方;制备工艺;稳定性

Optimization of the Preparation Technology and Stability Study of Perilla Alcohol Submicron Emulsion

LIU Lin^{1,2}, HUA Hai-ying², ZHAO Yong-xing³(1.Dept. of Pharmacy, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China; 2.Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 3.College of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the preparation technology of Perilla alcohol submicron emulsions, and to investigate the stability of the preparation. METHODS: Perilla alcohol submicron emulsion was prepared by pressure homogenization. The preparation technology was optimized by single factor and orthogonal experiment with entrapment efficiency as index using the amount of soybean oil, the proportion of granulesten (S75) to poloxamer 188 (F68), rotation rate and times of homogenization as factors. The stability of Perilla alcohol submicron emulsion was investigated under conditions of centrifugation, high temperature, strong light and acceleration test. RESULTS: The optimal preparation technology was as follows: 12.5 g soybean oil, the ratio of S75 to F68 of 2:1, rotation rate of 1 400 r/min, homogenization times of 8 times. There was one apex on particle size distribution curves; mean particle size were 270-300 nm, Zeta-potential were 41.5-46.7 mV, and entrapment efficiency was 48.7%-62.3%. No stratification and oil bloom was found after centrifugation. No significant change was found in each index under conditions of high temperature, strong light and acceleration test, compared with 0 h. CONCLUSIONS: Perilla alcohol submicron emulsion has the good physical and chemical stability.

KEYWORDS Perilla alcohol; Submicron emulsion; Formulation; Preparation technology; Stability

紫苏醇[(S)-(-)-perillyl alcohol, POH]是一种广谱、高效、低毒和具有防治肿瘤作用的单萜类物质^[1],其药理作用主要为解热、抗菌、和血、止痛和定喘等。紫苏醇对乳腺癌、直肠癌、皮肤癌都有一定的疗效,目前已处于临床研究阶段。但POH口服胶囊制剂Ⅱ期临床试验表明,其有较大的胃刺激刺激性,已经有患者口服后因无法耐受而退出临床研究的病例报道^[2]。本课题前期已完成了POH亚微乳(POH-SE)制备及其含量测定的研究工作^[3];相分布和体外释放试验表明该亚微乳有缓释作用^[4-5]。为保证POH-SE在贮存及运输过程中的质量稳定性

以及临床的应用安全性,本文旨在优化POH-SE的制备处方工艺,并对制剂的稳定性进行考察。

1 材料

1.1 仪器

Nano-ZS90型激光纳米粒度分析仪(英国马尔文仪器公司);PHS-3C精密pH计(上海雷磁创益仪器仪表有限公司);Agilent 1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)。

1.2 药品与试剂

POH原料药(美国Sigma公司,批号:218391,纯度:≥96%);POH-SE(郑州大学附属郑州中心医院自制,批号:20070721,规格:40 mg:2 ml);注射用大豆油(辽宁铁岭北亚豆油厂);大豆磷脂S75(上海太伟药业有限公司);泊洛沙姆188(F68)(德国BASF公司);甘油(药用级,郑州化学试剂三厂);壳聚糖(山东奥康生物科技有限公司);乙腈、甲醇均为色谱

Δ 基金项目:河南省重点科技攻关计划资助项目(No.092102310028)

* 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0371-67690015。

E-mail:liuliner9@126.com

通信作者:研究员,硕士。研究方向:抗肿瘤药物制剂及其药理学。电话:0371-66658210。E-mail:hhyly@aliyun.com

纯;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 POH-SE 处方

油相:POH 2.0 g,大豆油适量,大豆磷脂 S75 适量;水相:泊洛沙姆 188(F68)适量,甘油 2.25 g,壳聚糖 50 mg,蒸馏水加至 100 ml。

2.2 POH-SE 的制备

将大豆磷脂 S75 适量加入至注射用大豆油 12.5 g 中,磁力搅拌下加热至 80 ℃ 搅拌至大豆磷脂 S75 全部溶解作为油相,然后加入 POH 2.0 g;另取处方量泊洛沙姆 188(F68)适量、甘油 2.25 g,于 80 ℃ 下分散于适量注射用水中,作为水相,水相中加入 50 mg 壳聚糖(先溶解于 2% 乙酸中)。在磁力搅拌下将 80 ℃ 的油相滴加入水相中,置于高速匀质分散机中匀质数次,每次 3 min,制得初乳(控制温度在 40~50 ℃)。以 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液或盐酸溶液调节 pH 至 7.0,注射用水稀释定容至处方量,超声 10 min(控制温度在 40~50 ℃),制得终乳。灌装,充氮气,115 ℃ 灭菌 30 min,冰水浴迅速降温即得。

2.3 质量评价指标

2.3.1 外观性状。亚微乳属热力学不稳定体系,在灭菌过程后或是长期储存中可能产生各种不稳定现象(分层、絮凝、破乳等)。物理稳定性良好的 POH-SE 外观均呈白色、不分层、不挂壁、均匀致密,为流动性好、表观无油滴的白色液体。

2.3.2 粒径和表面电位。取灭菌后的 POH-SE 50 μl,置于 10 ml 量瓶中,加蒸馏水稀释至刻度,涡旋混合均匀制成混悬液,用 Nano-ZS90 型激光纳米粒度分析仪测定其平均粒径和表面电位。结果 POH-SE 的粒径分布均匀,平均粒径 270~300 nm, Zeta 电位 41.5~46.7 mV,电位绝对值较高,表明 POH-SE 有较好的物理稳定性。

2.3.3 包封率。取“2.3.2”项下 POH-SE 混悬液 2 ml,4 ℃、25 000 r/min(离心半径为 16 cm)离心 30 min,采用高效液相色谱法取上清液 10 μl 进样测定 POH 浓度^[9]。按公式计算包封率,包封率=[(W₁-W₂)/W₁]×100%。式中,W₁代表 POH-SE 混悬液中 POH 的药物浓度,W₂代表上清液中游离的 POH 浓度。结果 POH-SE 的包封率为 48.7~62.3%。

2.4 POH-SE 的处方优化

2.4.1 单因素试验。采用单因素试验法分别考察油相、乳化剂的配比、pH、初乳制备温度、匀质温度、匀质转速、匀质次数、终乳乳化时间、乳剂灭菌条件对 POH-SE 粒径、电位及包封率的影响。结果表明,选用大豆油为油相,用量控制在处方量的 10%~17.5% (m/m),大豆油用量为 10.0~15.0 g 时,POH-SE 的平均粒径无明显变化,且灭菌对粒径无明显影响,Zeta 电势绝对值随大豆油用量的增加而逐渐减少。大豆磷脂 S75-泊洛沙姆 188(F68)比例在 1:3、1:2、2:1 时,POH-SE 的 Zeta 电位无明显差异,绝对值均在 30 mV 以上,且电势分布较窄,有利于乳剂的稳定。磷脂存在相转化温度^[6],在其相转化温度(70~80 ℃)附近制备成的亚微乳粒径较小,同时在 80 ℃ 时油相的黏度较低,选择 80 ℃ 作为乳剂初乳的制备温度。乳化过程中温度控制在 40~50 ℃,以 1 400、1 600、1 800 r/min 的转速匀质 6、8、10 次,均可制得 POH-SE,匀质转速和次数的具体取值需进一步优化;POH-SE 在进行高压灭菌过程(115 ℃、30 min)中,可以保持药物及各种性质的稳定性。

2.4.2 正交试验设计。根据单因素试验考察结果,筛选 4 个因

素,分别为:大豆油用量(A)、大豆磷脂 S75-泊洛沙姆 188(F68)比例(B)、匀质转速(C)、匀质次数(D),以包封率为指标,采用 4 因素 3 水平正交试验设计优化处方。因素水平表见表 1;正交试验结果及极差分析见表 2;方差分析结果见表 3。

表 1 正交试验因素水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A, g	B, g/g	C, r/min	D, 次
1	10.0	1:3	1 400	6
2	12.5	1:2	1 600	8
3	15.0	2:1	1 800	10

表 2 正交试验结果及极差分析

Tab 2 Result of orthogonal experiment and range analysis

编号	因素				包封率, %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	48.72
2	1	2	2	2	50.86
3	1	3	3	3	51.14
4	2	1	2	3	57.76
5	2	2	3	1	47.49
6	2	3	1	2	62.13
7	3	1	3	2	55.46
8	3	2	1	3	50.28
9	3	3	2	1	51.62
K ₁	157.85	153.81	171.16	160.17	
K ₂	162.69	151.76	159.21	163.94	
K ₃	159.78	166.47	147.67	163.39	
	52.61	51.43	53.16	54.27	
	53.21	54.73	57.69	53.78	
	54.61	50.39	49.81	53.89	
极差	1.98	4.51	7.74	3.87	

表 3 方差分析结果

Tab 3 Result s of variance analysis

因素	离均差平方和	自由度	F	P
A	1 122.1	2	487.6	<0.01
B	78.6	2	34.8	<0.05
C	25.4	2	12.3	<0.1
误差	2.8	2		

$F_{0.01}(2,2)=99.00; F_{0.05}(2,2)=19.00; F_{0.1}(2,2)=9.00$

由表 2 和表 3 结果可知,因素对包封率的影响大小顺序依次为:C>B>D>A;最佳配方为 A₂B₃C₁D₂,即大豆油用量为 12.5 g、大豆磷脂 S75-泊洛沙姆 188(F68)比例为 2:1、匀质转速为 1 400 r/min、匀质次数为 8 次。

2.5 稳定性研究

2.5.1 离心试验。分别取优化处方后制备的 3 批 POH-SE,每批取样 3 份,置于 10 ml 离心管中,以离心半径 16 cm、4 000 r/min 离心 30 min,观察分层情况。结果均未见分层现象,乳液表面均无油滴。

2.5.2 高温光照试验。取 POH-SE 充氮、密封,均在 4 500 lx 条件下升温至 40、60 ℃,放置 10 d,分别于 0、5、10 d 时考察 POH-SE 的外观、pH、粒径、电位及药物含量,结果见表 4。

2.5.3 加速试验。参考《药剂学》(7 版)中药物加速试验的规定进行操作,取 POH-SE 3 批,在 30 ℃、相对湿度为 60% 的条件下放置 6 个月,于第 0、1、2、3、6 个月时取出,考察 POH-SE 的外观、pH、粒径及药物含量,每批重复 4 次,结果见表 5。

表4 POH亚微乳高温光照试验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab 4 Results of high temperature and light test of Perilla alcohol submicron emulsion($\bar{x} \pm s, n=3$)

时间,d	40 °C(4 500 lx)					60 °C(4 500 lx)				
	外观	pH	粒径,nm	电位,mV	含量,%	外观	pH	粒径,nm	电位,mV	含量,%
0	乳白色液体	6.21 ± 0.03	270.0 ± 1.23	41.25 ± 2.36	92.46	乳白色液体	6.22 ± 0.02	271.0 ± 1.28	41.85 ± 2.36	92.48
5	乳白色液体	6.23 ± 0.04	272.5 ± 1.45	41.86 ± 4.01	91.86	乳白色液体	6.23 ± 0.01	271.9 ± 1.35	41.94 ± 2.87	92.97
10	乳白色液体	6.24 ± 0.02	273.6 ± 1.86	42.21 ± 3.97	92.91	乳白色液体	6.24 ± 0.05	272.3 ± 1.42	42.36 ± 2.36	92.04

表5 POH亚微乳留样加速稳定性试验结果($\bar{x} \pm s, n=4$)Tab 5 Results of accelerated stability test of Perilla alcohol submicron emulsion($\bar{x} \pm s, n=4$)

时间,个月	批次1				批次2				批次3			
	外观	pH	粒径,nm	含量,%	外观	pH	粒径,nm	含量,%	外观	pH	粒径,nm	含量,%
0	乳白色液体	6.21 ± 0.42	271.2 ± 2.3	92.4	乳白色液体	6.36 ± 0.23	268.4 ± 2.1	92.0	乳白色液体	6.58 ± 0.30	262.6 ± 5.6	93.2
1	乳白色液体	6.22 ± 0.26	283.6 ± 3.1	92.1	乳白色液体	6.39 ± 0.19	273.5 ± 3.9	91.8	乳白色液体	6.61 ± 0.28	265.3 ± 4.8	93.0
2	乳白色液体	6.21 ± 0.12	289.3 ± 5.2	91.8	乳白色液体	6.42 ± 0.76	284.6 ± 4.2	91.0	乳白色液体	6.69 ± 0.63	270.6 ± 3.6	93.8
3	乳白色液体	6.30 ± 0.93	291.0 ± 4.6	91.6	乳白色液体	6.46 ± 0.83	292.9 ± 5.3	90.6	乳白色液体	6.71 ± 0.32	276.8 ± 3.9	93.3
6	乳白色液体	6.46 ± 0.67	292.6 ± 1.9	91.5	乳白色液体	6.55 ± 0.91	297.5 ± 3.6	90.1	乳白色液体	6.72 ± 0.21	279.8 ± 2.7	93.0

3 讨论

亚微乳的粒径、表面电荷等理化特征影响着其物理稳定性及药物的靶向性,所以在优化处方时以粒径和电位作为指标优选最佳处方。因此粒径小、粒度分布均匀、Zeta电位绝对值大等理化特性是保证亚微乳稳定的必要条件。文献报道,稳定的乳剂Zeta电位绝对值应高于20 mV,否则易发生絮凝、聚集现象^[7]。制备粒径小而均匀的分散系,是亚微乳物理稳定性良好的基本保证。本研究制备的POH-SE平均粒径为270~300 nm,粒度分布均匀,Zeta电位为41.5~46.7 mV,具有较高的物理稳定性。

在POH-SE的制备中,选择泊洛沙姆和大豆磷脂作为乳化剂和辅助乳化剂,能提高该体系的昙点至125 °C^[8]。通过粒度和电位测定来考察其稳定性发现,POH-SE灭菌前后粒径无明显变化,而单独使用泊洛沙姆188制备的乳剂灭菌后可能发生乳滴合并和分层现象。水相中加入的壳聚糖使POH-SE成阳离子亚微乳剂,具有较高的电位,提高了POH-SE的稳定性。并且用壳聚糖制得的亚微乳,可以较好地透过实体瘤、保存在瘤体内以提高疗效^[9],同时明显降低了副作用。除此之外,壳聚糖还具有独特的跨细胞膜基团,这就使其为载体的POH-SE药物透过细胞的能力大大提高^[10-11]。

参考文献

- [1] Crowell PL. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes[J]. *J Nutr*, 1999, 129(3):775S.
- [2] Ripple GH, Gould MN, Stewart JA, et al. Phase I clinical trial of perillyl alcohol administered daily[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(5):1 159.
- [3] 王海婴,刘琳,赵永星,等.紫苏醇亚微乳剂的制备及其HPLC法测定[J].中国医药工业杂志,2008,39(6):447.
- [4] 王海婴,赵永星,刘琳.紫苏醇亚微乳中药物的相分布和

体外释放研究[J].中国医药工业杂志,2009,40(1):32.

- [5] Liston BW, Nines R, Carlton PS, et al. Perillyl alcohol as a chemopreventive agent in n-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(10):2 399.
- [6] Savic S, Lukic M, Jaksic I, et al. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: the influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential[J]. *J Colloid Interface Sci*, 2011, 358(1): 182.
- [7] 崔福德.药理学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2012: 160-161.
- [8] Shi S, Chen H, Cui Y, et al. Formulation stability and degradation kinetics of intravenous cinnarizine lipid emulsion [J]. *Int J Pharm*, 2009, 373(1/2):147.
- [9] Su M, Zhao MM, Luo YF, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of vinorelbine delivered in parenteral lipid emulsion[J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2011, 13(2):152.
- [10] Lavertu M, Methot S, Khanh TN, et al. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(2):4 815.
- [11] Mistry PH, Mohapatra SK, Dash AK. Effect of high-pressure homogenization and stabilizers on the physicochemical properties of curcumin-loaded glycerol monooleate/chitosan nanostructures[J]. *Nanomedicine*, 2012, 7(12): 1 863.

(收稿日期:2014-02-24 修回日期:2014-05-21)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅