

长春瑞滨纳米乳剂的制备及稳定性影响因素考察

付茂琦^{1,2}, 余祥彬^{1,3*}

[摘要] 目的 研制长春瑞滨静脉脂肪乳剂,并考察其稳定性及其影响因素。方法 通过制备初乳、高压均质、灌装封口、旋转热压灭菌等工序制备得到长春瑞滨静脉脂肪乳注射液。采用正交设计,以乳剂粒径、pH值变化和药物含量作为指标,考察不同温度对其稳定性的影响。结果 3批中试产品用动态光散射法测定平均粒径<300 nm、粒度分布均匀、无>1 μm粒子。乳剂在5℃低温时保存6个月,温度逐渐升高会显著影响其稳定性,导致粒径增大和pH值降低。结论 本研究探索提供的关键设备参数、工艺条件及工程配套等,将利于指导实现长春瑞滨含药纳米静脉脂肪乳剂的产业化中试生产。

[关键词] 长春瑞滨;乳剂;制备;稳定性;粒径

[中图分类号] R94

[文献标志码] A

[文章编号] 1674-0440(2018)09-0709-05

DOI: 10.13220/j.cnki.jipr.2018.09.010

Preparation of the Active Ingredient nanoemulsion and factors influencing the stability

FU Mao-qi^{1,2}, YU Xiang-bin^{1,3*}

(1. Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 2. Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz 55099, Germany;
3. Chenxing Pharmaceutical Co., Ltd, Fuzhou 350007, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the intravenous lipid emulsion of Active Ingredient, stability of the emulsion and factors influencing the stability. **Methods** The Active Ingredient intravenous lipid emulsion injection was prepared by the processing process including the colostrum preparation, high pressure homogenization, filling and sealing, and rotary hot pressing sterilization. The effect of different temperatures on the stability of the emulsion was investigated by the orthogonal design using the emulsion particle size, pH and drug content as indicators. **Results** The three batches of pilot products were characterized by the emulsion particles with the average particle size <300 nm, uniform particle size distribution and no more than 1 μm particles, as detected by the dynamic light scattering method. The emulsion showed an excellent stability at 5℃ within 6 months, but a gradual increase of the temperature significantly affected the stability of the emulsion, which caused the increase of particle size and decrease of pH. **Conclusion** The key parameters, processing conditions and engineering supports from the present study might be helpful for the industrial production of the drug-containing lipid nanoemulsion of Active Ingredient for intravenous injection.

[Keywords] Active Ingredient; emulsion; preparation; stability; emulsion particle size

长春瑞滨(异长春花碱,去甲长春花碱诺维体, Active Ingredient, Active Ingredient,图1),化学名为3',4'-二去氢-4'-去氧-8'-去甲长春花碱,分子式C₄₅H₅₄N₄O₈,相对分子质量778.93,是一种新的长春碱半合成衍生物,为广谱抗肿瘤药,主要通过阻滞着丝点微管蛋白的聚合,使细胞分裂止于有丝分裂中期,属于细胞周期特异性药物。该药是现有化学药物中治疗非小细胞癌和乳腺癌最有效的药物之一,对小细胞

肺癌、恶性淋巴瘤、卵巢癌、食管癌也有较好疗效,也适用于黑素瘤、肾癌等。

目前使用的长春瑞滨注射液有一定临床效果,但其普通水针剂型输注中易导致神经毒性和血液毒性^[1],静注药外漏可引起静脉炎、局部皮肤坏死等,所以考虑将其制备成静脉纳米脂肪乳注射液,减少药物在给药部位的吸收,降低其在给药部位可能产生的毒性及刺激性;同时,由于药物存在于油

基金项目:福建省科技厅自然科学基金资助项目(2015J01677);福建省卫计委科技基金资助项目(2015-1-76)

作者简介:付茂琦,女,讲师,在读博士研究生,研究方向:药物新剂型与新技术, E-mail: fumaoci@hotmail.com

作者单位:1. 350004 福州,福建医科大学(付茂琦,余祥彬);2. 55099 美因茨,德国美因茨大学药学院(付茂琦);3. 350007 福州,福州辰星药业有限公司(余祥彬)

*通讯作者:余祥彬,男,主任药师,研究方向:药物新剂型与新技术, E-mail: 13905004666@139.com

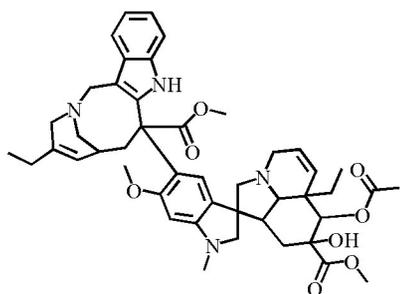


图1 长春瑞滨的化学结构式

Fig.1 The chemical structure of Active Ingredient

水两相界面膜中,因此能显著提高药物的稳定性。

本研究采用超高压均质工艺制备纳米乳剂优化出长春瑞滨乳剂的中试制备工艺,并对其成品稳定性及其影响因素进行考察,以保证成品的质量,为进一步临床研究提供可靠数据。

1 仪器与试剂

Nanogenizer 30K 超高压均质机,美国 Genizer LLC公司;高速剪切机,上海弗鲁克(FLUKO)公司;XSZ-G型光学显微镜,重庆光电仪器有限公司;NicompTM 380动态光散射粒度测定仪,美国 Santa Barbara PSS公司;AccuSizerTM 780光学粒径检测仪,美国 Santa Barbara PSS公司;pHS-3B精密pH计,上海精科仪器厂;LC-2010A型高效液相色谱仪,日本岛津公司。

长春瑞滨(批号160701,纯度>99%),广州汉方现代药业;注射用大豆油(批号:110803),铁岭北亚注射用油厂;注射用蛋黄磷脂E80和注射用油酸(批号:1010379/25),德国Lipoid GmbH公司;注射用甘油(批号:20160201),浙江遂昌甘油厂;乙二铵四乙酸二钠(EDTA-2Na),杭州杰恒化工有限公司;注射用水(自制),其他所用试剂均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 初乳制备方法的选择

2.1.1 油相制备 处方配比为长春瑞滨125 mg(0.25 g/L)、注射用大豆油10%、精制蛋黄卵磷脂1.2%、甘油2.2%。按处方称取原料药物、大豆油、蛋黄卵磷脂备用(氮气保护),在高速剪切机连续搅拌下保持大豆油水浴温度60℃,缓慢加入蛋黄卵磷脂,继续搅拌约10 min,搅拌至卵磷脂完全溶解。将长春瑞滨加入并搅拌至完全溶解在油相中,搅拌5 min。

2.1.2 水相制备 按处方量,称取甘油,量取灭菌注射用水,将甘油加入水中,搅拌均匀。

2.1.3 初乳形成 干胶法(方法1):在持续搅拌条件下,将油相缓慢加入部分水相中,搅拌3 min,按处方量补足注射用水量,继续搅拌5 min,制得初乳。湿胶法(方法2):在持续搅拌条件下,将全部水相缓慢加入油相中,然后搅拌8 min得到白色乳状液即初乳。

两种方法制得的初乳从外观和物理性质两方面比较(表1),虽无显著性差异,但方法1有部分油相未完全转入水相导致烧杯壁有少量残留,油相损失。在大批量生产中若采用方法1,因油相损失而导致主药损失很难避免,故宜采用方法2。乳剂粒径的大小及分布取决于高压均质过程。

表1 干胶法和湿胶法制得初乳的外观和物理性质

Tab.1 Appearance and physical properties of two raw emulsions made by the dry emulsion and wet emulsion methods

制备方法	粒径(μm)	含量(%)	黏度(MPa·s)	离心后外观(2506×g, 5 min)
干胶法	4	98	2.2	分层,可见少量油滴
湿胶法	9	94	2.0	分层,可见较多油滴

2.2 高压均质制备工艺研究

2.2.1 正交实验 实验设计:选择均化时间、均化压力及均化次数作为考察因素,每个因素设定3个水平(表2),根据多因素水平表,选择正交表 $L_9(3^4)$ 进行实验。按2.1处方配比制得初乳后,将其按正交表的设计安排实验并制备纳米乳剂(表3),并以制备的乳剂经稳定性加速实验后的稳定常数、含量、乳滴粒径为指标,考察不同水平的3因素对乳剂质量的影响^[2-4]。由于是多指标正交实验,故采用综合比较法对各指标进行评分。评分规则:以实验3粒径290 nm为例,设定粒径最小值197 nm为10分,最大值317 nm为0分,根据以下公式,Grade(G_{PD})= $10 - (PD_{(x)} - PD_{(min)}) / (PD_{(max)} - PD_{(min)})$ 得实验3粒径290 nm所对应的分数为9.2;同理,稳定常数最小值1.6%设为10分,最大值8.4%设为0分,Grade(G_{Kc})=

表2 考察因素水平表

Tab.2 Factors and levels

水平	乳化时间(A, min)	乳化压力(B, psi)	循环次数(C)
1	5	10 000	1
2	10	15 000	3
3	15	20 000	5

表3 正交实验安排和结果

Tab.3 Experimental design and results for the orthogonal design

实验号	乳化时间 (A)	均化压力 (B)	循环次数 (C)	误差项 (D)	稳定常数 (K_s , %)	含量 (%)	乳滴粒径 (PD, nm)	综合评分
1	1	1	1	1	5.1	82	317	4.3
2	1	2	2	2	6.3	84	292	7.4
3	1	3	3	3	2.5	81	290	8.6
4	2	1	2	3	1.6	70	239	6.6
5	2	2	3	1	3.2	84	236	8.9
6	2	3	1	2	5.6	80	267	7.0
7	3	1	3	2	8.4	80	197	5.7
8	3	2	1	3	4.2	79	244	7.3
9	3	3	2	1	2.5	84	242	9.4
K_1	6.8	5.5	6.2	7.5				
K_2	7.5	7.9	7.8	6.7				
K_3	7.5	8.3	7.7	7.5				
R	0.7	2.8	1.6	0.8				

$10 - (K_{e(x)} - K_{e(min)}) / (K_{e(max)} - K_{e(min)})$; 含量最大值84%为10分, 最小值70%为0分, $Grade(G_c) = 10 - (C_{(x)} - C_{(min)}) / (C_{(max)} - C_{(min)})$ 。各考察指标数值的评分根据上公式得出(表3、表4)。

表4 正交实验方差分析表

Tab.4 Variance analysis of the orthogonal design

方差来源	离差平方和	自由度(N')	F值	P值
A	1.089	2	0.8182	<0.1
B	13.46	2	10.07	
C	4.99	2	3.733	

取长春瑞滨乳剂用注射用水稀释500倍, 适当调节光强度至约300, 室温下动态光散射法(DLS法)测定粒径, 开始测定至Time history曲线趋于直线时, 停止测定, 保存数据。每个样品测定3次, 取平均值, 以此结果来反映制备工艺效果; 考察乳剂样品在经上述循环后, 乳滴粒度的变化, 是否团聚合并粒径变大, 并比较各批次样品之间的差异, 以此反映各样品的稳定性^[3]。

正交实验结果和方差分析表明(表3, 表4), 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即选择高压均化操作的最佳条件为压力20 000 psi, 均化次数为3次, 乳化时间10 min。

2.2.2 最佳制备工艺的验证 为进一步验证所选

工艺的重复性和可靠性, 对2.2.1优选的条件进行了3组重复性实验加以验证, 并以每个实验制备的纳米乳外观、粒径变化、pH值的波动作为考察指标(表5)。实验结果表明, 优选工艺重复性优良, 可初步作为未来工业化生产的模拟工艺。

表5 工艺重复性验证结果

Tab.5 Repeatability test results

实验编号	外观	粒径(nm)	pH值
1	不挂壁, 无油花	268±6	7.5±0.2
2	不挂壁, 无油花	275±9	7.3±0.2
3	不挂壁, 无油花	266±5	7.1±0.3

2.3 成品乳质量评价指标

2.3.1 成品乳的含量测定方法 色谱条件: 色谱柱Inersil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-磷酸二氢钾(40:60); 检测波长267 nm; 流速1.0 ml/min; 柱温30℃; 进样量20 μl。色谱图见图2。

样品制备: 精密量取乳剂0.5 ml以乙腈稀释并定容至10 ml, 过0.22 μm微孔滤膜作为供试液。

方法学验证结果表明, 辅料对样品的测定无干扰, 长春瑞滨在100~500 mg/L与峰面积线性关系良好, $A = 12.236C + 64.645$, $r = 0.9995$ 。回收率、精密度、重复性和稳定性结果分别为: 99.5%~100.8%, 0.42%~1.18%, 0.92%和0.62%, 符合测定要求。

2.3.2 平均粒径、多分散系数和ζ电位 精密量取成品乳剂0.1 ml, 加水100 ml稀释, 用粒度分析仪进

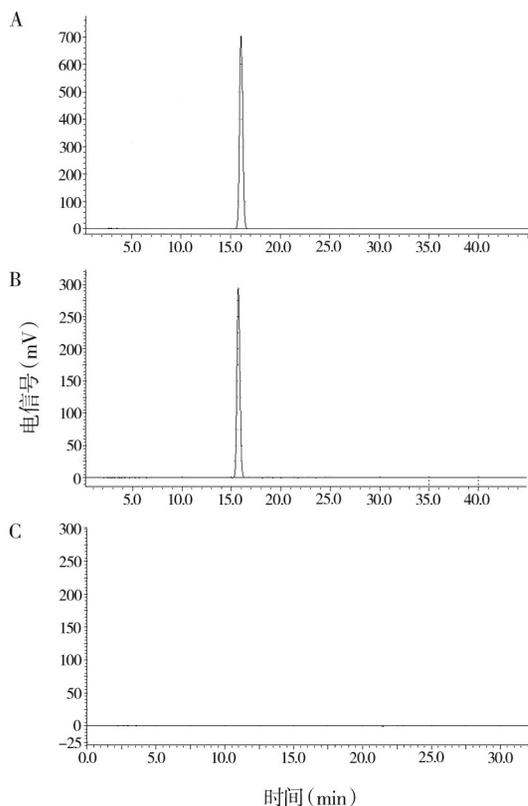


图2 长春瑞滨原料药(A)、乳剂(B)和空白辅料(C)HPLC色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms for the active pharmaceutical ingredient Active Ingredient (A), drug-loaded emulsion (B) and blank excipient (C)

行测定。

2.3.3 稳定性参数的测定 精密量取成品乳剂0.1 ml置100 ml量瓶中,用水定容,以水为空白测定其在267 nm处的吸光度(A_0)。另取长春瑞滨纳米乳剂1 ml置离心管中,离心(2506×g)15 min后,精密吸取下层溶液0.1 ml置100 ml量瓶中,用水定容,以水为空白测定其在267 nm处的A值。通过计算得到的稳定性参数越大说明乳剂分层现象越严重,稳定性越差;反之则说明乳剂越稳定^[4]。

2.4 制剂稳定性及影响因素考察

2.4.1 温度对载药乳剂粒径的影响 不同的保存温度下,载药乳剂粒径的变化情况见图3。结果显示,乳剂的粒径随储存时间延长和保存温度的升高而明显变大。5℃条件储存6个月后,乳剂粒径由(281±4)增大至(293±3)nm;而40℃条件下,粒径增大更为明显,由(289±6)增大至(348±12)nm。

2.4.2 温度对载药乳剂pH的影响 乳剂最初的pH为6.8,将样品放置在不同温度下进行考察。不同储存温度对长春瑞滨纳米乳剂pH值波动的影响

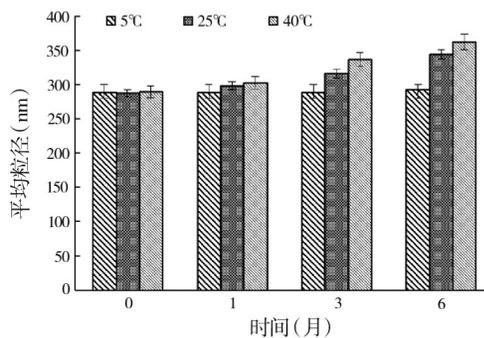


图3 储存温度对载药乳剂粒径的影响

Fig.3 Effect of the temperature on the particle size of drug-loaded emulsion

情况见图4。在5~60℃保存条件下,乳剂pH值的变化随储存温度升高和保存时间延长而明显加剧。5℃储存条件下,乳剂的pH在30 d内几乎无变化;当温度升高到60℃时,乳剂的pH值在30 d内下降了1.49个单位。这种现象产生的原因可能是由于较高温度条件下,游离脂肪酸增多,使体系pH值降低所致^[5]。

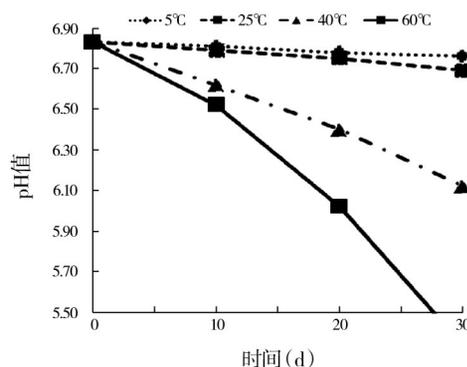


图4 不同储存温度对载药乳剂pH值的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.4 Effect of the temperature on the pH of drug-loaded emulsion ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.4.3 温度对载药乳剂药物含量的影响 载药长春瑞滨脂肪乳在储存温度较低时,药物的降解速率缓慢。前期实验表明,5℃条件下,将载药乳剂放置3个月,药物含量无明显变化。但当储存温度升高时,药物降解随之加快,导致主药含量降低^[6]。随储存温度进一步升高,载药乳剂的降解速度逐渐加快,40℃时,样品储存6个月后,剩余药量为初始含量的78.2%;而在50℃,储存6个月后,药物含量已降至48.4%;在80℃的条件下,储存0.5个月,下降为39.6%。温度变化从40℃到80℃,反应速率常数从每月2.48%提高到97.6%。

2.4.4 乳剂体系中大粒子的检测 静脉给药纳米乳剂中较大粒子的检测极为重要^[7]。原因有两点:①检测较大粒子并控制使其含量最低,保证乳剂生产过程质量始终如一,因为这些较大粒子易减慢过滤灭菌的速度;②通过检查较大粒子,可监测乳剂的稳定性,因为较大粒子的形成会触发乳剂的逐级破坏。同时,出于对静脉注射乳剂安全性的考虑,根据美国 USP<729>规定,乳剂体系中 $>5\ \mu\text{m}$ 的大粒子必须 $<0.05\%$ ^[8]。

本文采用 Nicomp380 及其数据处理系统对 3 批乳剂中 $>1\ \mu\text{m}$ 粒子进行分析,通过 DLS 精密检测,长春瑞滨乳剂的平均粒径 $<0.3\ \mu\text{m}$,未发现 $>1\ \mu\text{m}$ 大粒子。

采用 AccuSizerTM 780 光学粒径检测仪,利用其单粒子光学传感技术及数据处理系统对 3 批乳剂的粒子进行了分析,结果为 $>5\ \mu\text{m}$ 粒子比例分别是 $<0.007\%$ 、 $<0.008\%$ 和 $<0.008\%$ 。

3 讨论

本文对长春瑞滨脂肪乳的制备进行了系统实验研究。①通过干胶法和湿胶法两种不同工艺的比较实验,确定了初乳的制备工艺。②以研究配备 Y 型交互均质容腔的控温型 Nanogenizer 超高压均质机的应用为重点,以制备粒径小、分布均匀的乳剂为目的,采用正交实验方法,确定了静脉脂肪乳制备的高压均化工艺及参数为:用 Y 型交互均质腔将初乳在 20 000 psi 压力下均化 1 次,测定长春瑞滨含量,调整 pH 值,然后在 20 000 psi 下均化 2 次,温度控制在约 20℃,即得成品乳。③温度对于载药乳剂的稳定性影响较大,随着温度的升高,乳剂的粒径, pH 值和药物含量都会受到不同程度的影响和变化^[9]。长期稳定性考察结果可知,长春瑞滨乳剂适宜在较低温度 5℃ 保存,其理化性质无明显变化,制剂性质稳定。④对于直径范围在 200 ~ 400 nm 的 O/W 型纳米乳剂来说,区别乳剂好坏的关键是能否查出并测量出大粒子^[10]。根据 3 批中试产品的检验结果,用动态光散射法测定平均粒径 $<300\ \text{nm}$ 、粒度分布均匀、无 $>1\ \mu\text{m}$ 粒子,符合美国《药典》对 $>5\ \mu\text{m}$ 的大粒子比例均 $<0.05\%$ 的要求。

本文通过中试实验获得长春瑞滨静脉脂肪乳制备的关键工艺及参数,并对其稳定性及影响稳定

性的因素进行考察,使其制剂的质量得以保证,并为临床研究提供确实可靠的数据^[11-12]。其过程能为以后新药开发和制剂工艺筛选提供有益经验。

致谢 本研究得到福建省科技厅和卫计委基金资助。同时,感谢美国 Genizer 公司提供硬件设备支持,福州辰星药业和上海宣泰医药科技有限公司提供制剂工艺协助,上海奥法美嘉生物科技有限公司提供纳米乳大粒子测定服务。

【参考文献】

- [1] 秦日升. 长春瑞滨的血液毒性特点及临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2005, 10(3): 312-313.
- [2] Ishii F, Sasaki I, Ogata H. Effect of phospholipid emulsifiers on physicochemical properties of intravenous fat emulsions and/or drug carrier emulsions [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1990, 42(7): 513-515.
- [3] Davis SS, Hansrani PK. The influence of emulsifying agents on the phagocytosis of lipid emulsions [J]. *Int J Pharm*, 1985, 23: 69.
- [4] LeVein HH, Giordano P, Spletzer J. The mechanism of removal of *in vivo* injected fat [J]. *Arch Surg*, 1961, 83: 169-179.
- [5] Yamaguchi T, Tanabe N, Fukushima Y, et al. Distribution of prostaglandin E1 in lipid emulsion in relation to release rate from lipid particles [J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, 42: 646-650.
- [6] Schulz LT, Elder EJ Jr, Jones KJ, et al. Stability of sodium nitroprusside and sodium thiosulfate 1: 10 intravenous admixture [J]. *Hosp Pharm*, 2010, 45(10): 779-784.
- [7] Aaronson S. Active Ingredient in the treatment of perioperative hypertension: assessing safety events in the ECLIPSE trials [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2009, 7(5): 465-472.
- [8] Mirtallo JM, Dasta JF, Kleinschmidt KC, et al. State of the art review: intravenous fat emulsions: current applications, safety profile, and clinical implications [J]. *Ann Pharmacother*, 2010, 44(4): 688-700.
- [9] 崔福德. 药剂学, 第 7 版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 375-376.
- [10] Driscoll D, Etzler F, Barber TA, et al. Physicochemical assessments of parenteral lipid emulsions: light obscuration versus laser diffraction [J]. *Int J Pharmaceut*, 2001, 219: 21-37.
- [11] 王浩, 侯惠民. 制剂技术百科全书 [M] // Swarbrick J, Boylan JC. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. 北京: 科学出版社, 2009: 735-741.
- [12] 陆彬. 药物新剂型与新技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 72-89.

(收稿日期: 2018-07-03 修回日期: 2018-09-02)