

# 大蒜素亚微乳注射液的制备与质量评价

魏晓莹, 李淑斌\*, 高娜, 刘丹, 吴威, 鲍洁

(沈阳万爱普医药生物科技有限公司, 沈阳 110179)

**摘要** 采用高压匀质机对大蒜素亚微乳的初乳进行均质化, 并以 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌, 无菌分装, 制成大蒜素亚微乳注射液。采用 HPLC 法测定大蒜素的含量, 以外观、pH、粒径及其分布、包封率、有关物质限度、含量为指标考察大蒜素亚微乳的稳定性。优选的处方外观质量较好, 粒径在 100~150 nm, 包封率达 96.5%, 在加速及长期试验条件下留样 12 个月, 各项检查指标基本无变化。结果表明所制得大蒜素亚微乳注射液的理化性质较稳定, 此制剂为提高难溶性大蒜素药物的稳定性及降低其血管刺激性奠定了基础, 并改善了临床使用时患者的顺应性。

**关键词** 大蒜素; 亚微乳; 制备; 包封率; 稳定性; 刺激性

中图分类号 R944 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2011)03-0233-05

## Preparation and quality evaluation of allitride submicron emulsion injection

WEI Xiao-ying, LI Shu-bin\*, GAO Na, LIU Dan, WU Wei, BAO Jie

Shenyang One-up Bio-Pharma Co., Ltd., Shenyang 110179, China

**Abstract** The aim of this study was to prepare and evaluate allitride submicron emulsion injection. The submicron emulsion injection was prepared by high-pressure homogenizer, sterilized by 0.22  $\mu\text{m}$  filter membrane and subsequent sterile-packing. Allitride was determined by HPLC. The physical appearance, pH value, particle size distribution, entrapment efficacy, impurities and the allitride content were used as the indexes to evaluate the stability of allitride submicron emulsion injection. It was shown that the optimized formulation of allitride submicron emulsion injection had stable physical appearance, with mean particle size of 100-150 nm, and the entrapment efficacy of 96.5%. All the indexes kept unchanged after the accelerated stability test and long-time stability test. These results demonstrated the stability of allitride submicron emulsion injection, which established the foundation for improving insoluble allitride stability, reducing the vascular stimulation, and subsequently improving the patient compliance during the clinical use.

**Key words** allitride; submicron emulsion; preparation; entrapment efficacy; stability; irritation

大蒜素是百合科葱属植物蒜的有效成分之一, 其化学名为三硫二丙烯, 现已人工合成<sup>[1]</sup>, 结构式见图 1。大蒜素属于挥发油类药物, 颜色为淡黄色, 有浓烈的大蒜气味, 并具有多种药理活性, 其有效成分具有抗菌消炎作用, 能够很好的抑制血小板聚集, 降血压、降血脂, 并且对多种肿瘤细胞有显著杀伤作用<sup>[2]</sup>。目前, 应用较多的大蒜素剂型有普通注射液、肠溶微丸、胶囊、软胶囊、片剂, 等, 但大蒜素口服制剂对胃有刺激性, 与胃肠道直接接触会刺激胃肠道的蠕动, 从而引起疼痛、腹泻以及损伤胃肠道黏膜, 患者依从性差, 且易被胃液

破坏, 口服生物利用度较低。而普通注射剂需加入增溶剂或助溶剂, 在治疗过程中会出现一些不良反应<sup>[3]</sup>。另外, 大蒜素具挥发性、刺激性和特殊的蒜臭, 制备普通注射剂使大蒜素更多地暴露于光热条件下, 会增加药物分解的概率, 进一步引起大蒜素不稳定。

亚微乳乳滴粒径介于乳剂和微乳之间, 通过乳化作用, 大蒜素被包裹在微小的乳粒中, 较好地隔绝了周围环境对药物的影响, 而且乳滴粒径小, 具有一定的被动靶向作用。本试验制备了大蒜素亚微乳注射液, 可提高大蒜素稳定性, 降低药物分解

变质的概率,减少血管刺激性,降低增溶剂的不良反应,降低其特异性蒜臭的挥发。

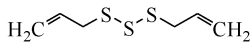


Figure 1 Chemical structure of allitride

## 1 材料

### 1.1 试剂与药品

大蒜素原料药(江苏清江药业有限公司,纯度:90.6%,批号:090618);蛋黄卵磷脂(德国 Lipoid 公司,批号:1031334);注射用大豆油,注射用中链油(铁岭北亚药用油有限公司);自制大蒜素亚微乳注射液(批号:091021);葡萄糖注射液,氯化钠注射液(沈阳志鹰制药厂);大蒜素注射液(规格:30 mg/mL,济南利民制药有限责任公司生产,批号:0910716)。

### 1.2 仪器

NS1001L 2K 高压乳匀机(意大利 GEA Niro Soavi 公司);FSS cw380 动态激光粒度和 Zeta 电位分析仪(美国 Nicomp 公司);FA23004 精密电子天平(上海恒平科学仪器有限公司);XS 105 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司);YM-10 超滤离心管(截留相对分子质量 8 000 ~ 10 000,美国 Millipore 公司);DZS-706 型多参数水质分析仪(上海精密科学仪器有限公司);KL-009(I)精密 pH 计(福建福安市科立龙电子有限公司);JEM-1200EX 透射电镜仪(日本 Jeol 公司),LabAlliance Model500 高效液相色谱仪(美国 SSI 公司)。

### 1.3 动物

SD 大鼠,雌雄各半,体重 180 ~ 230 g,沈阳市东陵区龙元经济动物养殖场提供,SPF 级,合格证号:SCXK(辽)2003-009;家兔,新西兰大耳白,雌雄各半,体重 2.0 ~ 2.3 kg,由沈阳药科大学实验动物中心提供,SPF 级,合格证号:SYXK(辽)2003-0012。

## 2 方法与结果

### 2.1 大蒜素亚微乳注射液的制备

称取蛋黄卵磷脂 1.0 g,维生素 E 0.2 g,注射用大豆油 3.0 g 和注射用中链油 3.0 g 混合后,加热并不断搅拌至溶液全部澄清,加入大蒜素原料 1.5 g 使之全部溶解作为油相;再称取甘油 2.5 g

溶解于适量注射用水中,于适宜温度搅拌后加至上述油相混合物中,形成初乳,加适量氢氧化钠溶液调节溶液 pH 至 6.0,补加注射用水至 100 mL,混匀,经高压乳匀机精乳化 3 次,并以 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,最后无菌灌装至 2 mL 安瓿瓶中,即得大蒜素亚微乳注射液。

### 2.2 大蒜素亚微乳体内外含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱: C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-水-甲酸(87:13:0.1),检测波长: 220 nm,柱温: 35 °C,流速: 1.0 mL/min。

2.2.2 制剂的含量测定 精密量取本品适量(约相当于大蒜素 7.5 mg),置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,超声 10 min,作为供试品溶液;另精密称取大蒜素对照品适量,加甲醇溶解并稀释制成每毫升中含 75 mg 大蒜素的溶液,作为对照品溶液。精密量取供试品溶液与对照品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法以峰面积计算。经测定,大蒜素亚微乳中大蒜素的含量为 15 mg/mL,样品标示量为 100.5%。在本色谱条件下,各辅料不影响大蒜素的测定,专属性良好,在 25.5 ~ 127.5 μg/mL 浓度范围内线性关系良好,线性方程为  $A = 29\ 626c + 36\ 251$  ( $r = 0.999\ 7$ ),精密密度、回收率及溶液稳定性均符合要求。

### 2.3 大蒜素亚微乳注射液的质量评价

2.3.1 大蒜素亚微乳的外观性状及微观形态 本品外观性状为白色乳状液体,略带黏性,略有特异性蒜臭味。将大蒜素亚微乳注射液以磷酸盐缓冲液稀释 10 倍,滴于铜网上,1% 磷钨酸染色,负染 30 min,干燥后用透射电镜(TEM)观察。通过透射电镜观察到制备的大蒜素亚微乳注射液为大小均匀的球形或椭球形粒子,如图 2 所示。

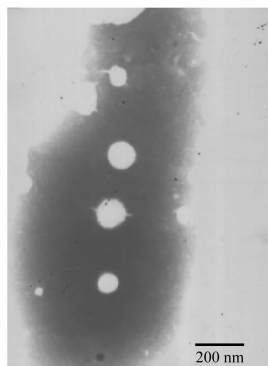


Figure 2 Microphotograph of allitride submicron emulsion injection by transmission electron microscope ( $\times 20\ 000$ )

2.3.2 大蒜素亚微乳的粒径分布 取本品1支,精密吸取其中0.1 mL,用纯化水分别稀释至100倍,混匀,作为供试液,用动态激光散射粒径测定仪测定。测得的大蒜素亚微乳注射液的平均光强径为152.9 nm;体积径为115.7 nm,所得制剂粒径较小、分布均匀、分布范围较窄。

2.3.3 大蒜素亚微乳注射液的包封率测定 采用超滤离心法测包封率,将超滤离心管(截留相对分子质量8 000~10 000)用注射用水洗去甘油,精密吸取本品250  $\mu$ L,加入超滤离心管中,离心(10 000 r/min)30 min。取出全部滤出液,按上述含量测定方法计算游离的大蒜素含量;同时精密吸取超滤离心前的样品,计算溶液中大蒜素的总溶质量;计算大蒜素亚微乳样品的包封率为96.5%。

#### 2.3.4 稳定性试验

配伍稳定性试验 取大蒜素亚微乳注射液5 mL,按临床用法分别加入到5%葡萄糖注射液或0.9%氯化钠注射液250 mL中,分别在第0,0.5,2,6小时吸取稀释液,考察其含量、pH及平均粒径的变化。测定结果如表1。

**Table 1** Characters of allitride submicron emulsion injection after being diluted by 5% glucose solution and 0.9% NaCl solution

Solvent	t/h	pH	Particle size/nm	Content/%
0.9% NaCl	0	6.2	131	98.47
	0.5	6	122.7	97.71
	2	6.2	134.2	96.64
	6	6.1	124.2	96.26
5% Glucose	0	6.1	141.5	98.03
	0.5	6.1	129.4	97.51
	2	6	143.4	97.55
	6	6.2	148.3	94.58

结果表明,0.9%氯化钠注射液对本品的稳定性优于5%的葡萄糖注射液,与葡萄糖注射液配伍6h后有较大乳粒。

影响因素试验 以大蒜素亚微乳的外观、pH、粒径、含量、有关物质、包封率为指标,考察其在高温(60 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、(40 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,低温4~8 $^{\circ}$ C、光照条件下,放置5,10 d的稳定性,另外将样品冷冻放置24 h,再室温放置24 h,作为一次冻融循环,于第3次循环完成后取样,考察各项指标。结果如表2所示。

**Table 2** Influential factor test results of allitride submicron emulsion injection

Condition	t/d	Appearance	Content/%	pH	Particle size /nm	Related substance /%	Entrapment efficacy/%
60 $^{\circ}$ C	0	White emulsion	100.5	6.0	105.5	12.51	96.5
	5	Slightly yellow emulsion	30.1	5.5	125.3	47.33	85.1
40 $^{\circ}$ C	5	White emulsion	65.6	5.9	136.4	22.17	91.0
	10	Slightly yellow emulsion	61.0	5.8	188.6	15.03	86.9
4~8 $^{\circ}$ C	5	White emulsion	100.7	6.0	108.9	13.87	96.3
	10	White emulsion	98.1	6.0	113.9	13.58	96.6
Illumination(4 500 lx)	5	White emulsion	78.5	5.8	134.2	45.58	92.8
	10	Slightly yellow emulsion	59.6	5.7	128.9	62.25	88.1
Freeze thawing	3 Times	Demulsification	99.2	5.8	302.5	12.83	76.9

结果表明,本品在60 $^{\circ}$ C高温条件下放置5 d,含量下降均超过5%,乳滴平均粒径稍有增大,所以不再进行10 d的考察;在低温(4~8 $^{\circ}$ C)下,各项指标均无明显变化。光照条件下部分药物降解,含量下降显著,包封率随温度和光照强度的增强而降低。冻融循环3次后粒径增幅较大,有破乳现象,包封率下降较快。综上所述,本品在此包装条件下,宜在遮光,密封,阴凉处贮存,不宜冷冻保存。

加速和长期稳定性试验 以大蒜素亚微乳的外观、粒径、pH、含量、有关物质为指标,考察样品加速及长期试验6个月的样品稳定性。加速试验条件为25 $^{\circ}$ C下避光放置6个月,分别于0,1,2,3,

6月取样,长期试验条件为20 $^{\circ}$ C下避光放置12个月,分别于0,3,6,9,12个月取样测定。测定结果如表3。

**Table 3** Stability results of allitride submicron emulsion injection

T/ $^{\circ}$ C	t/month	Content/%	pH	Particle size/nm	Related substance/%
25 $\pm$ 2	0	100.5	6.0	105.5	12.51
	1	99.8	5.9	117.0	12.67
	2	100.6	5.9	119.4	12.19
	3	100.4	5.8	155.2	12.82
	6	96.4	5.8	188.9	12.60
	20 $\pm$ 2	3	100.9	6.0	117.7
6		101.9	5.9	105.4	12.18
9		100.6	5.9	149.5	12.59
12		102.3	6.0	178.5	12.00

加速试验结果表明,本品在模拟上市包装的条件下,在 $(25 \pm 2)$  °C 条件下放置 6 个月,亚微乳剂外观性状没有破乳、分层等现象,含量稍有下降,有关物质含量略有升高,乳滴的平均粒径有所增大,但均在限度范围内,其他各项质量指标均未见明显改变,说明本品在此包装条件下物理及化学稳定性较好。

长期试验结果表明,在模拟上市包装条件下,经 $(20 \pm 2)$  °C、遮光,密封条件下贮存留样 12 个月试验考察,各项指标无明显变化,说明本品在此包装条件下 12 个月内物理及化学稳定性较好,此项实验仍在进行中。

**2.3.5 大蒜素亚微乳注射液的刺激性考察** 取家兔 8 只,雌雄各半,平均分成两组,采用自体左右耳自身对比法进行试验。一组给予大蒜素注射液(乳剂)的供试品溶液,另外一组给予大蒜素注射液(市售)的供试品溶液作为对照组,两组家兔每只分别右耳静脉缓慢滴注供试品溶液 1.2 mg/kg (给药容积为 5 mL/kg),左耳静脉注射等容积的灭菌 5% 葡萄糖注射液,每日 1 次,连续 3 日;每日肉眼观察动物一般状况、行为、体征及给药局部反应(颜色、红斑、水肿、充血程度及范围),末次给药后 48 h,处死动物,分别剪取双耳注射处耳静脉及周围组织约 5 cm,肉眼观察有无红肿、水肿、丘疹形成,并用 10% 的甲醛固定后,石蜡切片,HE 染色,显微镜下观察其炎性细胞浸润、血管周围组织出血、血栓形成及坏死等情况,并判断血管刺激性反应程度。

结果表明,给药期间动物的一般状况、行为及活动正常。大蒜素注射液(乳剂)连续给药 3 d,肉眼观察家兔耳静脉血管及周围组织,未见红肿、充血等异常现象。显微镜观察,5% 葡萄糖注射液组和大蒜素注射液(乳剂)组血管内皮细胞、血管腔及周围组织在距注射部位 1 cm 和 5 cm 处均未见异常;血管周围组织未见炎性细胞浸润及坏死;管腔内无血栓形成。而大蒜素注射液市售对照组家兔耳静脉血管及周围组织可见红肿、充血现象。

**2.3.6 大鼠药代动力学试验** 取健康 SD 大鼠 72 只,雌雄各半,体重 180 ~ 230 g,随机分成两组,分别给予大蒜素亚微乳注射液或大蒜素注射液,每组再随机分成 6 组,每小组采集两个时间点。给药前禁食 12 h,自由饮水,按 30 mg/kg 的剂量经大鼠尾

静脉注射,第 1 组于给药后 0.2 min,第 2 组于给药后 0.5、4 min,第 3 组于给药后 1、5 min,第 4 组于给药后 1.5、6 min,第 5 组于给药后 2、8 min,第 6 组于给药后 3、10 min 经大鼠眼球后静脉丛取静脉血 0.4 mL,置肝素化试管中,迅速进行全血样品处理。

体内含量测定方法:色谱条件同制剂含量测定方法,精密称取大蒜素对照品适量,加乙腈溶解制成浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  的贮备液,避光、冷藏保存作为对照品贮备液;分别精密吸取大蒜素贮备液,加乙腈依次配制 1.25、2.5、5、10、25、50  $\mu\text{g/mL}$  的标准系列溶液,避光、冷藏保存作为大蒜素标准系列溶液;精密称取丙泊酚对照品 30.0 mg,加乙腈溶解制成浓度为 3 000  $\mu\text{g/mL}$  的溶液,再精密吸取 2.5 mL 用乙腈定容至 50 mL,得浓度为 150  $\mu\text{g/mL}$  的溶液,避光、冷藏保存作为内标溶液。取全血 300  $\mu\text{L}$ ,迅速加入内标 200  $\mu\text{L}$  及乙腈 200  $\mu\text{L}$ ,涡流 30 秒,静置 1 min,于 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液 20  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪,记录色谱图,按内标法计算,即得。

自制亚微乳注射液与市售大蒜素注射液两组试验相比,亚微乳的半衰期略有延长,药时曲线下面积 AUC 略大于普通注射液,表观分布容积略低于注射液,说明在同样剂量条件下,大蒜素亚微乳在体内能够维持稍长的循环时间,使其有更多的机会达到各组织,更好地浓集于组织细胞中达到治疗效果。其相对生物利用度为 122.8%,结果见表 4,图 3 所示。

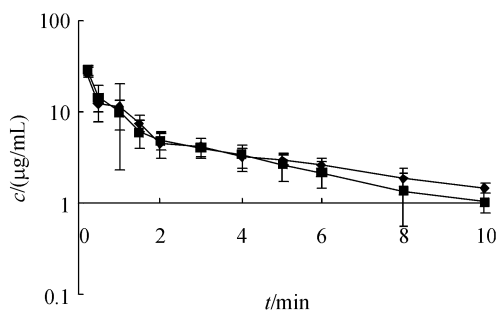
**Table 4** Main pharmacokinetic parameters (30 mg/kg,  $n = 6$ )

Parameter	Emulsion	Injection
$t_{1/2}/\text{min}$	5.44	3.92
$K_e/(\text{min}^{-1})$	0.291	0.263
$\text{AUC}_{0-t}/(\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL})$	56.5	46.0
$\text{AUC}_{0-\infty}/(\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL})$	64.8	52.1
$\text{CL}/(\text{L}/\text{min} \cdot \text{kg}^{-1})$	0.301	0.295
MRT/min	2.86	2.62
$V_z/(\text{L}/\text{kg})$	1.30	1.71

### 3 讨论

#### 3.1 包封率的研究

大蒜素属于易挥发的不稳定性药物,将其制成亚微乳注射液,使药物分布在油相中,可以减少主药与环境中的光和热的接触,降低大蒜素分解变质的概



—◆— Submicron emulsion; —■— Allitride injection

Figure 3 Mean plasma concentration-time curves of rats after intravenous administration of 2 formulations (30 mg/kg) ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

率,使其稳定性有所提高;同时能够掩盖大蒜素的蒜臭味,降低其刺激性,在一定程度上提高了患者的顺应性。另外,本品粒径较小,物理稳定性较好,采用普通的包封率测定方法如盐析法、离心法很难将油相和水相彻底分离。本文用截留相对分子质量 8 000 ~ 10 000 的超滤离心管在离心 30 min 后可将油相和水相彻底分离,界面清晰。采用超滤离心法测定包封率,操作简便,时间短,无需特殊仪器,准确度高,重现性好,是乳剂包封率测定的较好方法。

### 3.2 配伍稳定性的研究

本品在临床应用时,可以与适量的 0.9% 氯化钠注射液或 5% 的葡萄糖注射液在规定的时间内配伍使用。但是为保证配伍后无菌和无热原,在与

上述两种注射液配伍后,宜在 2 h 内输注完毕,余液不可以再用;此外溶液配制 2 h 以后不宜再使用。

### 3.3 药代动力学的研究

亚微乳剂由于具有一定的粒径大小,可较强的激活巨噬细胞的吞噬作用,使药物快速的分布于组织器官中,且乳滴粒径小更具有良好的稳定性<sup>[4]</sup>。由于大蒜素体内半衰期较短,药代动力学测定存在一定难度,本文建立了较好的大蒜素亚微乳药代动力学试验方法,试验结果表明大蒜素亚微乳可增加大蒜素体内半衰期,提高药物在血液中的滞留时间。

### 参考文献

- [1] 贾江滨(Jia JB),刘静(Liu J),谭亚非(Tan YF). 大蒜素化学成分研究进展[J]. 广东药学(*Guangdong Pharm J*),1999,9(1):1-5.
- [2] 斯日古楞(Siri GL),敖长金(Ao CJ). 大蒜提取物的药理作用及对机体免疫功能影响的研究进展[J]. 内蒙古科技与经济(*Inn Mong Sciencetech Economy*),2004,(10):71-74.
- [3] 郭瑞霞(Guo RX). 静脉输注大蒜素注射液不良反应及护理[J]. 护理研究(*Chin Nurs Res*),2009,23(5B):1284.
- [4] Sateesh K, Ramesh P. Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats [J]. *J Invest Dermatol*,2007,127(1):154-162.

## · 企业介绍 ·

### 宜昌人福药业有限责任公司

宜昌人福药业有限责任公司(以下简称公司)成立于2001年8月,为国家麻醉药品定点生产企业,上市公司武汉人福医药集团和国药集团药业股份公司分别为公司第一、二大股东。公司拥有总资产7.2亿元,注册资本2.9亿元,员工1600余人。拥有各类药品注册批文200余个,建有小容量注射制剂、冻干粉针剂、片剂、胶囊剂等11条药品剂型的生产线。

公司主导产品为芬太尼系列麻醉镇痛药品,是国际上能够生产芬太尼品类最多的制药企业,同时也是国内研发生产麻醉药品及其相关麻醉科用药实力最强的单位。2010年公司麻醉药品占国内市场份额的58%,连续8年位居行业排名第一。

公司在发展历程中先后获得了“国家高新技术企业”、“全国五一劳动奖状”、“国家高技术产业化示范基地”、“全国模范劳动关系和谐企业”、“全国守合同重信用单位”等荣誉称号。在未来的发展过程中,公司将秉承“人人健康,家家幸福”的企业理念,力争成为全球最大的麻醉科用药供应商。