

甘草酸二铵磷脂复合物注射液的初步稳定性研究

陈乃兴¹, 陈晓瑾^{2*} (1.富阳市场口人民医院, 浙江 富阳 311411; 2.杭州市第六人民医院, 杭州 310014)

摘要: 目的 制备合适的甘草酸二铵磷脂复合物注射液, 并考察其初步稳定性。方法 以粒径、过氧化值、pH 为指标, 分别考察了不同种类溶媒和 pH 值对注射液稳定性的影响。通过影响因素实验的结果确定最佳处方, 并对最适处方进行加速实验。结果 以 5% 葡萄糖注射液为溶媒的处方在高温 60 °C 和强度 4 500 Lx 光照下放置 10 d 理化性质没有发生明显变化, 且初步加速实验也显示出良好的稳定性。结论 甘草酸二铵磷脂复合物葡萄糖注射液质量稳定, 粒径符合肝脏靶向性要求。

关键词: 甘草酸二铵磷脂复合物注射液; 处方筛选; 初步稳定性

中图分类号: R927.11

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)06-0520-04

Preliminary Stability Study of Diammonium Glycyrrhizinate Phospholipid Complex Injection

CHEN Naixin¹, CHEN Xiaojin^{2*} (1.Fuyang Changkou Hospital, Fuyang 311411, China; 2.The Sixth People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare an appropriate diammonium glycyrrhizinate phospholipid complex injection, and examine its initial stability. **METHODS** The influence of different solvents and pH values were investigated, using particle size, peroxide value and pH as indicators. The optimal formulation was determined by factor experiment, and undergone acceleration experiment. **RESULTS** The physical and chemical properties of 5% gluconse formulation did not change significantly under 10 days of high temperature and illumination, as well as under acceleration experiment. **CONCLUSION** The diammonium glycyrrhizinate phospholipid complex 5% gluconse injection was stable. It meets the requirements of liver targeting.

KEY WORDS: diammonium glycyrrhizinate phospholipid complex injection; formulation; initial stability

甘草酸二铵(diammonium glycyrrhizinate)经广泛研究证实具有较强的抗炎、保护肝细胞膜及改善肝功能等作用, 临床上常用于治疗各种急慢性肝病^[1-2], 也有报道可用于治疗急性重症病毒性心肌炎^[3]。在临床应用中甘草酸二铵主要以注射液的形式给药, 包括注射液、冻干粉针和输液。甘草酸二铵在体内易与血浆蛋白结合导致游离药物浓度低, 因而注射剂的给药剂量都很大, 易发生药物蓄积引起伪醛固酮症^[4]。大量研究发现, 许多天然活性成分如水飞蓟素、槲皮素、甘草次酸等对磷脂有特殊的亲和力, 可结合形成复合物, 并表现出与母体药物显著不同的生物学特性和药理活性。天然药物磷脂复合物可改善母体药物吸收差、胃肠道刺激性较大或不良反应较强的缺点, 而且磷脂复合物的药理作用更强, 且迅速、持久。本研究将磷脂和甘草酸二铵制备成磷脂复合物, 形成的胶体微粒可以增强肝脏靶向性, 提高甘草酸二铵对细胞膜的亲和性, 改善甘草酸二铵血浆蛋

白结合率高的缺点, 减少药物的体内蓄积。此外, 磷脂具有药物和药用辅料的双重性质, 可促使膜结构受损的肝细胞恢复正常, 保护肝细胞膜^[5], 并且磷脂作为药物载体, 在体内易降解, 无毒性和免疫原性。

本实验对甘草酸二铵磷脂复合物注射液进行了初步的处方筛选, 并且进行了初步稳定性考察, 为今后实际生产提供实验依据。

1 仪器与试药

甘草酸二铵(本实验室自制, HPLC 含量为 97.8%); 注射用大豆磷脂(上海金伴药业有限公司, 批号: 080501); 767 针用活性炭和灭菌注射用水均由杭州市第六人民医院制剂室提供, 其余均为分析纯。

RE-2000 旋转蒸发器(上海亚荣生化); 粒径测定仪(Malvern Nano-S90); PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); DY-3 型电动熔封机(河南省滑县万古电器厂)。

作者简介: 陈乃兴, 男, 主管药师 Tel: (0571)63577517 E-mail: sunjianer12@163.com
Tel: (0571)85463950 E-mail: xiaojinchen@163.com

*通信作者: 陈晓瑾, 女, 硕士, 主管药师

2 方法

2.1 甘草酸二铵磷脂复合物注射液的制备

2.1.1 甘草酸二铵磷脂复合物的制备 精密称取 10 g 的磷脂加入到圆底烧瓶中,用适量二氧六环溶解,待完全溶解后,加入 10 g 甘草酸二铵,水浴加热至 80 ℃,磁力搅拌并且冷凝回流。混合物在 80 ℃水浴中反应至溶液澄清后,旋转蒸发除去有机溶剂,干燥后收集样品。

2.1.2 甘草酸二铵磷脂复合物注射液的制备 精密称取适量的甘草酸二铵磷脂复合物,用溶媒溶解到 20 g·L⁻¹,用 0.05%的活性炭除去杂质,采用氮气保护。80 ℃保温 30 min 后,布什漏斗过滤。用相应溶媒稀释至 10 g·L⁻¹后,再分别用 0.45 和 0.22 μm 的微孔滤膜过滤。灌装到 10 mL 的安瓿中,充氮气后熔封。从称样开始到灌封结束控制在 8 h 内,最后安瓿采用 100 ℃流通蒸气灭菌 45 min。

2.2 磷脂复合物注射液处方筛选

按“2.1.2”项下方法进行注射液的制备,分别考察了不同种类溶媒和不同 pH 条件对注射液稳定性的影响。采用的溶媒为 pH 值为 7.0, 8.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)、三乙胺溶液(pH 8.0)、注射用水和 5%葡萄糖注射液。此外,考虑到甘草酸二铵的酸性可改变原有溶液的 pH 值,选用一个 pH 后调的处方,即药液稀释到 10 mg·mL⁻¹后再次调节到 pH 8.0(PBS 8.0 后调)。

将样品进行 4 500 Lx 强度的光照试验和温度为 40 ℃的高温实验,根据初步稳定性结果筛选处方。实验第 0, 5, 10 天取样,观察注射液外观变化,测定甘草酸二铵磷脂复合物的粒径、多聚分散系数(PdI)、pH 值、过氧化值。

2.3 过氧化值的测定

精密移取样品溶液 4 mL,加入 30 mL 混合溶剂(冰醋酸-氯仿=3:2),精密加入 0.5 mL 新制的 KI 饱和溶液,振摇 30 s,在暗处放置 2 min。加入 30 mL 水,振摇 30 s 后用 0.01 mol·L⁻¹浓度的 Na₂SO₃ 溶液滴定,滴定至显黄色时加入 1.5 mL 淀粉指示液,继续滴定至蓝色消失。同时作空白对照。

过氧化值的计算:过氧化值=1.25×(a-b)。其中,a 为供试品消耗的 Na₂SO₃ 滴定液(0.01 mol·L⁻¹)的毫升数;b 为空白液消耗的 Na₂SO₃ 滴定液(0.01 mol·L⁻¹)的毫升数。

过氧化值不得超过 0.25 mol·L⁻¹,同时空白消耗的 Na₂SO₃ 滴定液不得超过 0.1 mL。

2.4 甘草酸二铵磷脂复合物注射液初步稳定性研究

根据处方筛选结果,选定何时处方进行初步稳定性研究。根据“2.1.2”项下方法制备 3 批注射液样品,放置在 40 ℃烘箱中观察 1 个月,测定稳定性相关指标。

3 结果

3.1 磷脂复合物的处方筛选

3.1.1 外观变化 高温放置 10 d 后,注射用水和三乙胺处方出现粉末状沉淀,5%葡萄糖注射液略带微黄色。光照条件下除了 PBS 处方乳光程度加深外,其余处方没有显著变化。

3.1.2 含量变化 经 HPLC 测定,初步稳定性实验注射剂中甘草酸二铵的含量均在 98%~102%之间,含量没有发现显著变化。

3.1.3 pH 值变化 磷脂复合物注射液经过高温和光照后,pH 值与 0 时刻相比并没有显著的变化。在不同溶媒中的 pH 值有较大的差异,灭菌注射用水 pH 值下降最为明显,加入复合物后从 9.06 降低到 4.37,磷酸盐缓冲液和三乙胺也有不同程度的下降。结果见表 1。

表 1 高温和光照条件下注射液 pH 的变化

Tab 1 Changes of pH values under high temperature and illumination

处 方	pH 值				
	常温	60 ℃		4 500 Lx	
	0 d	5 d	10 d	5 d	10 d
PBS 7.0	6.52	6.53	6.48	6.56	6.48
PBS 8.0	7.20	7.20	7.16	7.22	7.17
PBS 8.0 后调	8.02	8.01	7.94	8.05	7.96
三乙胺	7.89	7.59	7.61	7.79	7.70
注射用水	4.37	4.38	4.40	4.41	4.38
5%葡萄糖	4.35	4.34	4.34	4.35	4.34

3.1.4 粒径变化 粒径在高温条件和强光照条件下的变化见表 2 和表 3。磷脂复合物在不同的溶媒中,粒径差异很大。在粒径和粒径分布上,磷脂复合物在 PBS 中 PdI 值较小,一般都在 0.1 以下,提示粒径分布较窄,粒径单一,但是 PBS 在高温和强光照下粒径均有增长。三乙胺处方中粒径不再是单一峰,其中粒径较大的峰在放置 10 d 后变为 500 nm 左右,变化显著,可见在高温和光照下稳定性较差。采用注射用水为溶媒时在高温 10 d 后,粒径减小为原来一半,而且 PdI 也显著增大,提示注射液不稳定。5%葡萄糖注射液粒径变化最小。

表 2 高温条件下注射液粒径的变化/nm

Tab 2 Changes of particle size under high temperature/nm

处 方	0 d		5 d		10 d	
	PdI	体积平均粒径	PdI	体积平均粒径	PdI	体积平均粒径
PBS 7.0	0.065	54.1	0.069	43.0	0.049	66.5
PBS 8.0	0.096	39.5	0.149	33.5	0.154	38.2
PBS 8.0 后调	0.079	73.0	0.095	68.1	0.100	85.2
三乙胺	0.375	22.2 99.8% 319 0.2%	0.356	22.1 99.8% 526 0.02%	0.342	24.5 99.8% 509 0.2%
注射用水	0.178	47.7	0.167	36.4	0.462	28.4
5%葡萄糖	0.164	44.9	0.173	45.4	0.166	48.1

表 3 强光照射下注射液粒径的变化

Tab 3 Changes of particle sizes under illumination

处方	0 d		5 d		10 d	
	PdI	体积平均粒径	PdI	体积平均粒径	PdI	体积平均粒径
PBS 7.0	0.065	54.1	0.034	68.8	0.077	92.9
PBS 8.0	0.096	39.5	0.109	38.1	0.068	69.6
PBS 8.0 后调	0.079	73.0	0.061	68.4	0.061	77.3
三乙胺	0.375	22.2 99.8% 319 0.2%	0.348	22.1 99.9% 310 0.1%	0.347	25.1 99.8% 566 0.2%
注射用水	0.178	47.7	0.190	40.2	0.185	37.8
5%葡萄糖	0.164	44.9	0.180	47.5	0.164	47.0

3.1.5 过氧化值 各处方在高温和光照放置 5, 10 d 后测定的过氧化值结果见表 4。过氧化值超标的有 PBS 7.0 在强光条件下放置 10 d, 注射用水在高温放置 10 d, 以及三乙胺高温和强光放置 10 d, 其余均在限度范围内。

根据初步筛选结果可以发现, 采用 5%葡萄糖为溶媒时, 磷脂复合物注射液在高温和光照下较为稳定, pH 值和粒径变化都较小, 过氧化值也在允许范围内, 因此初步稳定性实验采用 5%葡萄糖处方。

3.2 初步稳定性实验结果

5%葡萄糖处方在 40 ℃烘箱中放置 1 个月后

观测, 结果显示稳定, 见表 5。

表 4 高温和光照下过氧化值的变化

Tab 4 Changes of peroxide values under high temperature and illumination

处 方	过氧化值				
	常温			4 500 Lx	
	0 d	5 d	10 d	5 d	10 d
PBS 7.0	0.12	0.18	0.14	0.18	0.21
PBS 8.0	0.09	0.16	0.16	0.11	0.18
PBS 8.0 后调	0.13	0.15	0.13	0.15	0.18
三乙胺	0.08	0.19	0.33	0.16	0.21
注射用水	0.09	0.15	0.28	0.15	0.19
5%葡萄糖	0.14	0.13	0.19	0.08	0.15

表 5 甘草酸二铵磷脂复合物注射液加速实验结果

Tab 5 Acceleration experiment results of diammonium glycyrrhizinate phospholipid complex injection

批 号	0 d			1 个月		
	1	2	3	1	2	3
平均粒径/nm	57.4	56.1	53.9	57.0	56.5	57.5
PdI	0.165	0.174	0.172	0.169	0.175	0.173
体积平均粒径	51.9±8.3	48.9±8.6	44.0±8.4	47.2±8.8	47.8±9.0	46.8±9.0
pH 值	4.34	4.33	4.34	4.35	4.34	4.33
过氧化值	0.14	0.11	0.13	0.10	0.07	0.08

4 讨论

磷脂复合物注射液中由于磷脂容易氧化产生过氧化物质, 导致药物磷脂复合物产生聚集或分

离, 因此磷脂复合物注射液中粒径和过氧化值的测定显得格外重要。本实验通过强光照射和高温实验, 测定粒径、过氧化值和 pH 值筛选稳定的磷

脂复合物注射液处方。根据筛选结果可以得知甘草酸二铵磷脂复合物在水中不能稳定存在,而且在离子强度大的溶液中粒径会增加。5%葡萄糖处方在 40 ℃条件下放置 1 个月仍显示稳定,粒径、pH 值、过氧化值等均没有显著变化,表明磷脂复合物在 5%葡萄糖溶液中稳定性优良。

载体的粒径大小影响微粒从血中的清除率及在单核巨噬系统内的分布,纳米粒静脉注射后一般被网状内皮系统(RES)的单核巨噬细胞摄取,主要分布于肝、脾、肺和骨髓等。一般粒径<10 nm 的毫微粒会缓慢积蓄到骨髓,>7 μm 的微粒主要被单核白细胞摄取进入肺组织或肺气泡,其余<7 μm 小微粒主要被动靶向到肝脏和脾脏。此外,粒径<100 nm 的粒子在血液中的停留时间将会延长^[6],特别是 50 nm 左右粒子能够穿透肝血窦,容易进入肝细胞内从而有利于实现肝实质细胞靶向给药^[7]。本研究得到的甘草酸二铵磷脂复合物葡萄糖注射液的粒径在 55 nm 左右,可以被动靶向于肝脏,将药物有效地送到肝脏的病变部位,减少用药的剂量和给药次数,提高药物的治疗指数,降低药

物不良反应。

REFERENCES

- [1] CHEN W H, LU L G. Effects of glycyrrhizin on the treatment of liver disease [J]. Int J Digestive disease(国际消化病杂志), 2006, 26(2): 106-109
- [2] ZHAO R, LÜ L. Pharmacological research and clinical development of diammonium glycyrrhinate [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2008, 4(3): 31-36
- [3] MA L, GE J B, ZHU X F, et al. Observation on the effect of diammonni glycyrrhizinatis in the treatment of serious type of acute virus myocarditis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(10): 958-960.
- [4] KOGA K, TOMOYAMA M, OHYANAGI K. Pharmacokinetics of glycyrrhizin in normal and albumin-deficient rats [J]. Biopharm Drug Dispos, 2008, 29(7): 373-381
- [5] HU G P, LIU K, WANG S, et al. Polyunsaturated phosphatidylcholine (essentiale) for chronic hepatitis: A systematic review [J]. Chin J Evidence-Based Med(中国医药指南), 2005, 5(7): 543-548.
- [6] TOMII Y. Lipid formulation as a drug carrier for drug delivery [J]. Curr Pharm Des, 2002, 8(6): 467-474.
- [7] HIROSUE S, MULLER B G, MULLIGAN R C. Plasmid DNA encapsulation and release from solvent diffusion nanospheres [J]. J Controlled Release, 2000, 70(122): 231-242.

收稿日期: 2011-12-24