

· 工艺与制剂 ·

## 注射剂常用增溶性药用辅料的安全与增溶研究

张海燕<sup>1,2</sup>, 齐云<sup>3</sup>, 廖永红<sup>3</sup>, 史新元<sup>4</sup>, 鄢丹<sup>5</sup>, 邬伟魁<sup>1</sup>, 杨明<sup>1,6\*</sup>

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;

2. 西南交通大学材料先进技术教育部重点实验室, 成都 610003;

3. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 4. 北京中医药大学, 北京 100102;

5. 中国人民解放军第 302 医院, 北京 100039; 6. 成都中医药大学, 成都 611137)

**[摘要]** 目的: 研究聚氧乙烯脱水山梨醇单油酯、聚乙二醇-12-羟基硬脂酸酯、聚乙二醇 300 等辅料的安全与增溶情况。方法: 采用高效液相法检测辅料的增溶情况, 采用溶血性和刺激性试验评价辅料的安全性。结果: 辅料的安全性与增溶情况相差较大。结论: 为更客观地筛选注射剂的增溶性辅料, 应将其放入制剂中进行研究。

**[关键词]** 注射剂; 药用辅料; 增溶; 安全

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0001-04

## Study on Safety and Solubilization of Solubilizing Excipients Used in Injections

ZHANG Hai-yan<sup>1,2</sup>, QI Yun<sup>3</sup>, LIAO Yong-hong<sup>3</sup>, SHI Xin-yuan<sup>4</sup>, YAN Dan<sup>5</sup>, WU Wei-kui<sup>1</sup>, YANG Ming<sup>1,6\*</sup>

(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2. Key Lab. of Advanced Technology of Materials, Chinese Education Ministry, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610003, China;

3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China;

4. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 5. China Military Institute

of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China;

6. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the safety and solubilization of excipients solubilizing excipients used in injections. **Method:** Solubilization was measured by HPLC and hemolysis and irritation were used for the safety evaluation of excipients. **Result:** Safety and solubilization of solubilizing excipients were different. **Conclusion:** As more objective screening for injection solubilizing excipients, it should be researched into the preparation.

**[Key words]** injections; solubilizing excipients; solubilization; safety

**[收稿日期]** 20110105(006)

**[基金项目]** 中医药行业科研专项项目(200708006); 重大新药创制重大专项(2009ZX09103-393); 中药新型给药系统技术平台“十一五”重大新药创制项目(2009ZX09310-005)

**[第一作者]** 张海燕, 讲师, 在读博士, 从事中药新制剂、新技术、新工艺和医用生物材料研究, Tel: 0791-7119010, E-mail: haiyansl@163.com

**[通讯作者]** \* 杨明, 教授, 博士, 从事中药炮制学、中药制剂学及中药新制剂、新技术、新工艺研究, Tel: 0791-7118658, E-mail: yangming16@126.com

在中药注射剂生产中, 聚氧乙烯脱水山梨醇单油酯(吐温 80)被广泛用于难溶性有效成分的增溶, 然而, 吐温 80 并非普遍适用的增溶剂, 其应用存在一个安全适宜范围。吐温 80 增溶无效的中药注射剂可进一步研究制剂中复方配伍增溶或其他药用辅料增溶。本研究对多种注射剂常用增溶性药用辅料的安全性与增溶效果进行了研究, 为中药注射剂增溶性辅料的选择提供参考。所用增溶性药用辅料包括胶束增溶剂: 吐温 80、泊洛沙姆 188、聚氧乙烯(35)氢化蓖麻油(RH-35)、聚氧乙烯(40)氢化蓖麻

油 (RH-40)、聚乙二醇-12-羟基硬脂酸酯 (Solutol HS 15); 潜溶剂: 聚乙二醇 400、聚乙二醇 300、丙二醇; 助溶剂: 葡甲胺, 包合增溶: 羟丙基倍他环糊精。

### 1 材料

**1.1 仪器** Multiskan Ascent 酶标仪 (美国 Thermo Electron 公司), 雷磁 PHS-3B 型精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司), Napco 5410 型二氧化碳孵箱 (NAPCO, USA), BCN-1360 型超净工作台 (北京东联哈尔仪器制造有限公司), XDS-1B 倒置显微镜 (重庆光电仪器公司), 培养板, 细胞刮刀 (美国 Corning 公司), UV755B 紫外分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司), QYC-200 恒温摇床 (上海福玛实验设备有限公司), Agilent 1100 高效液相色谱仪: 四元泵, 在线脱气机, 自动进样器, 柱温箱, DAD 检测器, HP ChemStation 数据处理工作站。

**1.2 试药** L6 细胞 (大鼠骨骼肌肌原细胞) 培养 6~10 代, 保持亚融合密度 (以保持其成肌细胞的状态), 细胞生长在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 含 10% 胎牛血清的 DMEM (Gibco) 的培养基中。传代使用 0.05% trypsin/0.53 mm EDTA (Gibco)。谷氨酰胺为 Sigma 公司产品, 胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶均为 Gibco 公司产品, 碱性磷酸酶 (ALP) 测定试剂盒为中生北控科技有限公司产品, 其他试剂为国产分析纯。安全实验用水为三蒸水。新西兰大耳白, 由北京通利试验动物养殖场提供, 合格证号 SCXK (京) 2009-0003, 穿心莲内酯 (批号 110797-200307), 黄芩苷 (批号 110715-200815)、芦丁 (批号 100080-200707), 补骨脂素 (批号 110739-200814)、阿魏酸 (批号 110773-200611) 对照品购自中国药品生物制品检定所, 柚皮素 (上海同田生物技术有限公司, 09020121), 橙花叔醇 (美国 Alfa, 7212-44-4)。丙二醇 (韩国 SK, 批号 GX90727818), 聚乙二醇 300

(SASOL 公司, 批号 07/25), 聚乙二醇 400 (SASOL 公司, 批号 06/215), RH-35 (BASF 公司, 批号 99580047G0), RH-40 (BASF 公司, 批号 05986036W0), 吐温 80 (江苏晨牌, 批号 081201), Solutol HS 15 (BASF 公司, 批号 72690524U0), 泊洛沙姆 188 (上海协泰), 所用有机溶剂皆为色谱纯。

### 2 方法与结果

**2.1 刺激性试验** 取对数生长期 L6 细胞悬液接种于 6 孔板, 每孔按  $1.8 \times 10^6$  cells 接种过夜, 这个浓度不足以使细胞贴壁单层融合而发展为不育肌管。试验前先吸尽生长介质, 洗涤后代之以不含血清的培养基。测定物以临床浓度并进行系列稀释。药物用 HBBS 液与介质 (无血清) 按 1:1 混合液配制, 每一浓度三复孔, 每孔加 1 mL, 空白孔加入同体积混合液。于孵箱中孵育 1 h 后, 显微镜下观察, 弃上清, 用 200  $\mu$ L 1.25% TritonX-100-R (Sigma, St, Louis, MO) 溶解细胞, 溶胞液于 2 500 r 离心 10 min, 取上清测定 CK 活力。并按下公式计算胞内 CK 残留率 (percent CK retained) = 药物组 CK / 空白对照组 CK  $\times$  100%。

刺激性分级: 轻微 (slight), 原浓度或临床浓度, 胞内 CK 残留率  $\geq$  75%; 中度 (moderate), 原浓度条件, 残留率 = 25% ~ 75%, 或按 1:2 稀释, 残留率  $>$  50%; 显著 (marked), 原浓度条件或按 1:2 稀释, 残留率  $\leq$  25%; 严重 (severe), 原浓度按 1:5 稀释, CK 残留率  $\leq$  10%。或按耗竭 (Depletion of CK) 率进行分级 (注: 2 种方法由于来源于不同文献, 分级略有不同): 轻微, 临床浓度, 胞内 CK 耗竭率  $\leq$  25%; 中度, 临床浓度条件, 耗竭率 25% ~ 75%, 或按 1:2 稀释临床浓度, 耗竭率  $<$  50%; 显著 (marked), 临床浓度或按 1:2、1:3 稀释条件下, 耗竭率  $\geq$  75%; 严重, 临床浓度数倍稀释, 耗竭率 100%。结果见表 1。

表 1 造成残率为 50% 和 75% 的 10 个样品质量分数

L6 细胞肌酸激酶 (CK) 残留率	PEG300	PEG400	PEG600	丙二醇	P188	RH-40	RH-35	Solutol HS 15	葡甲胺	羟丙基 $\beta$ -环糊精
50	28.43	29.3	26.7	28.24	26.2	20.77	26	0.74	6.18	9.67
75	22.48	17.6	15.7	22.86	11.0	13.52	18.58	0.34	4.13	1.98

从表 2 可见, 致 L6 细胞 CK 残率为 50% 的样品浓度, 由高至低 (低刺激  $\rightarrow$  高刺激) 为 PEG400  $<$  PEG300  $<$  丙二醇  $<$  PEG600  $<$  P188  $<$  RH-35  $<$  RH-40  $<$  羟丙基  $\beta$ -环糊精  $<$  葡甲胺  $<$  Solutol HS 15,

而残率 75% 的顺序为丙二醇  $<$  PEG300  $<$  RH-35  $<$  PEG400  $<$  PEG600  $<$  RH-40  $<$  P188  $<$  葡甲胺  $<$  羟丙基  $\beta$ -环糊精  $<$  Solutol HS15。显然, Solutol HS15 对肌肉刺激性最大, 而聚乙二醇 400、丙二醇对肌肉刺激

性最低。中药注射剂临床前研究应当选择适合的辅料以减少注射剂的毒副作用。

**2.2 溶血性试验** 根据红细胞破裂释放出来的血红蛋白在可见光波长段具有最大吸收的原理,采用酶标仪法测定中药注射剂的溶血程度,具有操作简便,稳定性好,能消除常规试管观察法带来的主观误差等缺点,对临床安全用药有指导意义。

取兔血(或羊血)数毫升,放入含玻璃珠的三角烧瓶中振摇 10 min,或用玻璃棒搅动血液,除去纤维蛋白原,使之成为脱纤血液。加入 0.9% NaCl 溶液约 10 倍量,摇匀,1 000 ~ 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,除去上清液,沉淀的红细胞再用 0.9% NaCl 溶液按上述方法洗涤 2~3 次,至上清液不显红色为止。将所得红细胞用 0.9% NaCl 溶液配成 2% 的混悬液,供试验用。取洁净试管进行编号,设样品管、阴性对

照管和阳性对照管,并设样品对照管。按表 2 所示依次加入 2% 红细胞悬液、含受试物的 0.9% 溶液或 0.9% 氯化钠、蒸馏水,混匀后,立即置 37 °C ± 0.5 °C 的恒温箱中进行温育 3 h。离心 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清,在酶标仪上,540 nm 处测定。

表 2 各组样品试管体外溶血试验方法

样品类别	阴性对照	阳性对照	样品	样品对照
2% 红细胞悬液	1.5	1.5	1.5	
生理盐水	1.5	-	-	1.5
蒸馏水	-	1.5	-	-
受试物	-	-	1.5	1.5

溶血率 = (样品管 - 阴性对照管 - 样品对照管) / (阳性对照 - 阴性对照) × 100%。

参考评价标准:溶血率 > 5% 表明有溶血发生,并进行统计学处理。见表 3。

表 3 造成家兔红细胞溶血率为 5% 和 20% 的 10 个样品质量浓度

溶血率	PEG300	PEG400	PEG600	丙二醇	P188	RH-40	RH-35	Solutol HS 15	葡甲胺	羟丙基 β-环糊精
5	11.64	4.80	16.50	14.15	9.00	0.58	0.63	0.07	0.01	0.56
20	14.93	6.26	27.66	>15	15.06	2.19	2.58	0.12	0.02	0.77

注:丙二醇致 20% 溶血剂量未能测出,因丙二醇在能配制的最大终浓度 15% 也达不到 20% 的溶血率。

从表 3 可见,致红细胞 5% 及 20% 溶血的样品质量浓度,由高至低(低刺激→高刺激)为 PEG600 < 丙二醇 < PEG300 < P188 < PEG400 < RH-24 < RH-40 < 羟丙基 β-环糊精 < Solutol HS15 < 葡甲胺。显然,葡甲胺最易引起红细胞破裂,而丙二醇至溶血毒副作用最小。中药注射剂临床前研究应当选择适合的辅料以减少注射剂的毒副作用。

**2.3 增溶性试验** 选用中药部颁标准中 8 种中药注射液的难溶成分为增溶研究对象,考察了 8 种增溶性辅料对 8 种难溶中药成分的增溶作用,以评价增溶性辅料对中药难溶成分的增溶适宜性。

**2.3.1 辅料水溶液制备** 分别精密称取丙二醇、聚乙二醇 300、聚乙二醇 400、RH-35、RH-40、吐温 80、Solutol HS 15、泊洛沙姆 188 适量,用双蒸水将其分别配成 1%、2% 水溶液,备用。

**2.3.2 供试液制备** 分别称取 50 mg 阿魏酸、反丁烯二酸于 1.5 mL 离心管中,分别加入质量浓度为 1.0% 的上述辅料水溶液,每 h 超声 15 min,连续 4 h 后,静置,离心(12 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min)。取上清液稀释 10 倍。

称取 35 mg 橙花叔醇于 5 mL 量瓶中,分别加入

1.0% 的上述增溶剂溶液,超声 15 min·h<sup>-1</sup>,连续 4 h 后,置 10 mL 分液漏斗中静置 16 h。对于加入增溶剂 P188,PEG400,PEG300,丙二醇的溶液,取下层清液适量,过 0.45 μm 膜,各取 10 μL 作 HPLC 测定;对于其余溶液,取下层清液 100 μL 于 10 mL 量瓶内,加 20% 乙腈定容至刻度,过 0.45 μm 膜,备用。

分别称取适量芦丁和穿心莲内酯于具塞锥形瓶中,恒温(20 °C 空气浴)震荡 12 h,分别加入 2.0% 的上述辅料水溶液,离心,上清液过滤,稀释适宜倍数,备用。

**2.3.3 色谱条件** 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,柱温常温,进样体积 10 μL,检测波长参考文献报道<sup>[1-3]</sup>,所用其他色谱条件均经预试验自定。结果见表 4。

8 种有效成分的增溶辅料研究结果显示,总体而言,吐温 80, RH-35, RH-40, Solutol HS 15 等非离子型表面活性剂的胶束增溶较好,而 PEG300, PEG400 和丙二醇等潜溶剂的增溶效果较差。可能是由于增溶机理不同,潜溶剂的有效增溶量较大,远大于 2%。

### 3 讨论

综上,无论是溶血,还是肌肉刺激性,聚乙二醇

表 4 8 种有效成分的增溶辅料考察

成分	类别	中药注射剂	药效浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	有效增溶辅料
补骨脂素	香豆素类	补骨脂注射液	$\geq 80 - 130$	HP- $\beta$ -CD, 吐温 80, HS15, RH-40, RH-35
黄芩苷	黄酮类	银黄注射液/清开灵注射液	$\geq 5\ 000$	无
柚皮素	黄酮类	健骨注射液	$\geq 50^1$	HP- $\beta$ -CD, 吐温 80, HS15, RH-40, RH-35
阿魏酸	黄酮类	复方当归注射液	$\geq 15$	均可
阿魏酸	黄酮类	当归寄生注射液	$\geq 0.8$	均可
反丁烯二酸	有机酸类	肿节风注射液	$\geq 30$	均可
橙花叔醇	挥发油类	香丹注射液	2	均可
芦丁	黄酮类	红茴香注射液	$\geq 4\ 000$	无
穿心莲内酯	二萜内酯类	穿心莲注射液	2 500	无

300 及丙二醇均显示出低毒性的特征,而聚乙二醇-12-羟基硬脂酸酯,无论是致溶血或致肌肉损伤均相当明显。相较于其他辅料,安全性较低,应慎重用于中药注射剂,以免加重中药注射剂毒副作用。

辅料对 8 种有效成分的增溶研究结果显示,总体而言,吐温 80, RH-35, RH-40, Solutol HS 15 等非离子型表面活性剂的胶束增溶较好,而 PEG300、PEG400 和丙二醇等潜溶剂的增溶效果较差。结合安全与增溶研究结果,总体而言增溶性较好的增溶性辅料,其安全性较差。具体原因有待进一步研究分析。

另有初步研究结果提示,葡甲胺对黄芩苷的增溶效果明显,但增溶液的颜色改变较大,可能是因为葡甲胺偏碱性对黄芩苷的增溶起到一定作用,也可能是黄芩苷在葡甲胺碱性水溶液中水解生成了黄芩素。从分子结构上分析,之所以对黄芩苷增溶效果明显,可能是其中的氨基与黄芩苷中的羟基发生反应生成一种新的化合物,具体原因有待于研究分

析。文献<sup>[4]</sup>报道,葡甲胺与美洛昔康可在水中形成分子复合物而增溶。另有报道<sup>[5]</sup>,水飞蓟宾葡甲胺以盐的形式存在,有别于水飞蓟宾与葡甲胺的简单混合,明显改善了水飞蓟宾在水中的溶解性能。本研究只是在简单条件下对中药难溶性纯品进行增溶研究,存在一定的局限性,在中药注射剂中的研究有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S]. 2010:174,282,124,207,251.
- [2] 张兴旺,牛迎风,陶燕铎,等. RP-HPLC 法测定唐古特铁线莲中芦丁的含量[J]. 分析实验室,2009, 28 (B05):64.
- [3] 卜筱茜,郭增军,宋增艳,等. 二香合心软胶囊中橙花叔醇的含量测定[J]. 西北药学杂志,2007,22(2):59.
- [4] 赵骏,张钧寿. 葡甲胺对美洛昔康增溶作用的研究[J]. 中国药科大学学报,2003,34(5):423.
- [5] 林建广,周忠,王超,等. 水飞蓟宾葡甲胺的结构与溶解性[J]. 天然产物研究与开发,2009,21(2):214.

[责任编辑 全燕]