

神经酸口服乳剂的处方及制备工艺优化[△]

陈文静^{1*}, 付加雷², 孙丹丹², 于蓓蓓², 生立嵩², 闫雪生^{2#}(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)04-0458-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.04.13



摘要 目的 制备神经酸口服乳剂, 对其处方及制备工艺进行优化, 并考察其稳定性。方法 通过机械法制备神经酸口服乳剂。在单因素实验的基础上, 以乳剂外观、离心稳定性、离心稳定常数(K_c)、粒径为指标, 采用正交实验设计, 以油酸用量、辛基苯酚聚氧乙烯醚-10用量、丙二醇用量为因素, 对其处方进行优化; 以乳化温度、剪切时间、高压均质压力、高压均质循环次数为因素, 对其制备工艺进行优化; 采用高效液相色谱法测定神经酸含量, 采用高温试验、加速试验和长期试验考察神经酸口服乳剂的稳定性。**结果** 最优处方及制备工艺为神经酸原料药1 g、油酸用量5%、辛基苯酚聚氧乙烯醚-10用量4%、丙二醇用量2%、乳化温度60℃、剪切时间2 min、高压均质压力40 MPa、高压均质循环2次。经3次实验验证, 所得神经酸口服乳剂的平均粒径为158.05 nm (RSD=1.58%, $n=3$), 平均 K_c 为0.39 (RSD=1.49%, $n=3$), 外观呈均一乳白色, 均无分层现象。高温试验结果显示, 神经酸口服乳剂在高温环境中易出现分层现象, 神经酸的含量有所增加; 加速试验及长期试验结果显示, 神经酸口服乳剂在室温下放置6个月的外观、神经酸含量均无明显变化。**结论** 所得最优处方及制备工艺稳定、可行, 可用于神经酸口服乳剂的制备; 神经酸口服乳剂不宜放置于高温环境中, 在室温环境下放置6个月的稳定性较好。

关键词 神经酸口服乳剂; 处方优化; 制备工艺优化; 正交实验设计; 高效液相色谱法; 样品稳定性

Optimization of formulation and preparation technology of Neuritic acid oral emulsion

CHEN Wenjing¹, FU Jiale², SUN Dandan², YU Beibei², SHENG Lisong², YAN Xuesheng²(1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare Neuritic acid oral emulsion, to optimize its formulation and preparation technology, and to investigate its stability. **METHODS** Neuritic acid oral emulsion was prepared by mechanical method. On the basis of single factor experiment, the appearance, centrifugal stability, centrifugal stability constant (K_c) and particle size of the emulsion as indexes, the formulation was optimized by orthogonal design, taking the dosage of oleic acid, octylphenol polyoxyethylene ether-10 and propylene glycol as factors, the preparation technology was optimized by taking emulsification temperature, shear time, pressure of high-pressure homogenization and cycle times of high-pressure homogenization as factors. The content of neuritic acid was determined by high performance liquid chromatography. The stability of Neuritic acid oral emulsion was investigated by high temperature test, accelerated test and long-term test. **RESULTS** The optimal formulation and preparation technology were as follows: neuritic acid of 1 g, oleic acid of 5%, octylphenol polyoxyethylene ether-10 of 4%, propylene glycol of 2%, emulsification temperature of 60℃, shear time of 2 min, homogenization pressure of 40 MPa and cycle times of twice. After three experiments, the average particle size of Neuritic acid oral emulsion was 158.05 nm (RSD=1.58%, $n=3$), the average K_c was 0.39 (RSD=1.49%, $n=3$), and the appearance was uniform milky white, there was no stratification. The results of high temperature test showed that Neuritic acid oral emulsion was prone to stratification in high temperature environment, and the content of neuritic acid increased. The results of accelerated test and long-term test showed that there was no significant change in the appearance or the content of neuritic acid when Neuritic acid oral emulsion was placed at room temperature for 6 months. **CONCLUSIONS** The formulation and preparation technology are stable and feasible, and can be used for the preparation of Neuritic acid oral emulsion. Neuritic acid oral emulsion should not be placed in high temperature environment. It has good stability at room temperature for 6 months.

KEYWORDS Neuritic acid oral emulsion; formulation optimization; preparation technology optimization; orthogonal design; high performance liquid chromatography; sample stability

[△] 基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(No.2019-0209)

* 硕士研究生。研究方向: 中药制剂新剂型、新制剂及物质基础。E-mail: chwjzyy@163.com

通信作者: 研究员, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 中药制剂新剂型、新制剂及物质基础。E-mail: tcmysx@126.com

神经酸是一种含24个碳原子和1个双键的不饱和脂肪酸, 最早被发现于哺乳动物的神经组织中^[1]。神经酸是构成大脑神经细胞和神经组织的核心天然成分, 能促进受损神经组织修复和再生, 对防止脑神经细胞衰老有很大作用^[2]。神经酸具有多种药理活性, 如健脑益智、

增强免疫、防治脑病和艾滋病等^[3-6]。由于神经酸难溶于水、生物利用度低且不稳定,需避光低温保存,使得其临床应用受到限制。乳剂作为一种药物传递系统,具有改善药物溶解度、提高生物利用度等特点^[7]。因此,将水溶性差、脂溶性好的神经酸制成乳剂可以有效避免其难溶于水和在制剂中分散不均等问题。但乳剂为热力学不稳定体系,易发生分层、破裂、絮凝、转相等现象,故需要筛选出合适的处方及工艺参数,以保证所得乳剂的稳定性。基于此,本研究利用机械法制备神经酸口服乳剂,采用正交实验设计,以神经酸口服乳剂外观、离心稳定性、离心稳定常数(centrifugal stability constant, K_c)、粒径为指标,油酸用量、乳化剂用量、丙二醇用量为因素,对其处方进行优化;以乳化温度、剪切时间、高压均质压力、高压均质循环次数为因素,对其制备工艺进行优化;采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定神经酸的含量,采用高温、加速和长期试验考察神经酸口服乳剂的稳定性,旨在为神经酸口服乳剂的研究及开发提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有UV-Vis2450型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司),UltiMate 3000型HPLC仪及配备的自动进样器、柱温箱、检测器(美国Thermo Fisher Scientific公司),BSM 220.4型电子天平(上海卓精电子科技有限公司),BT-1100型电子天平(启东友铭衡器有限公司),HH-4型数显电子恒温水浴锅(常州博远实验分析仪器厂),MS-H280型恒温磁力搅拌器(山东博科科学仪器有限公司),JRJ-300-I型剪切乳化搅拌机(上海标本模型厂),FB-110Q型高压均质机(上海励途机械设备有限公司),90 Plus PALS型纳米粒度电位仪(北京海鑫瑞科技有限公司),X-30R型全能高速冷冻离心机(美国Beckman Coulter公司)等。

1.2 主要药品与试剂

神经酸原料药(批号20190015,纯度>85%)购自西安万方生物科技有限公司;神经酸对照品(批号20201115,纯度>98%)购自南京普怡生物科技有限公司;油酸(批号20201030)购自天津市科密欧化学试剂有限公司;乳化剂辛基苯酚聚氧乙烯醚-10(octylphenol polyoxyethylene ether-10, OP-10,批号C12199604)购自上海麦克林生化科技有限公司;丙二醇(批号100420210103)购自湖南尔康制药股份有限公司;甲醇、乙腈、磷酸均为色谱纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 神经酸口服乳剂的制备

取神经酸原料药1 g,溶于一定量的油酸中,于适宜乳化温度下保温,作为油相;取一定量的OP-10与丙二醇,溶于适量水中,于同一乳化温度下充分溶解,作为水相;将上述油相缓慢滴入水相中,搅拌,加完油相后再继

续搅拌5 min,然后加入剩余处方量的水(于同一乳化温度下保温),于剪切乳化搅拌机中以4 000 r/min剪切一定时间,充分混合均匀,制成初乳。取初乳,在一定压力下于高压均质机中循环数次,即得^[8]。

2.2 神经酸口服乳剂的评价指标

2.2.1 外观

合格的乳剂应符合如下外观特征:静止时不分层,无油滴漂浮在表面,振摇后不挂壁或液体能迅速滑落,色泽均一。

2.2.2 离心稳定性

取神经酸口服乳剂适量,置于离心管中,以4 000 r/min离心15 min,不应有分层现象^[9]。如有分层现象标记为“-”,无需测定粒径及 K_c ;如无分层现象标记为“+”,需测定粒径及 K_c 。

2.2.3 粒径的测定

取神经酸口服乳剂50 μ L,用水稀释80倍,装入专用树脂比色皿中,置于纳米粒度电位仪中,于温度25 $^{\circ}$ C、测试角90 $^{\circ}$ 条件下测定3次,计算平均粒径。普通乳剂粒径范围为1~100 μ m,亚微乳粒径范围为0.1~1.0 μ m,口服乳剂粒径范围符合两者之一即可^[10],且粒径越小,乳剂越优^[7]。

2.2.4 K_c 的测定

取神经酸口服乳剂适量,置于离心管中,以4 000 r/min离心15 min,取出,用移液枪精密量取试管底部样品50 μ L,置于10 mL量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,以水为空白,采用紫外-可见分光光度计于500 nm波长处测定吸光度(A)^[11]。同法测定未经离心的神经酸口服乳剂的吸光度(A_0),按下式计算 K_c : $K_c=(A_0-A)/A_0$ ($0 < K_c < 1$)。 K_c 越小,表明上浮或下沉的油滴越少,乳剂稳定性越好^[12]。

2.3 神经酸口服乳剂处方的优化

2.3.1 单因素实验

(1)油酸用量:取神经酸原料药1 g,固定OP-10用量7%、丙二醇用量5%,乳化温度70 $^{\circ}$ C,以4 000 r/min剪切一定时间,在一定压力下于高压均质机中循环数次,按“2.1”项下方法操作,考察不同油酸用量(5%、10%、15%、20%、25%、30%)对神经酸口服乳剂外观、离心稳定性、粒径及 K_c 的影响。结果显示,当油酸用量为5%时,所得口服乳剂呈均一乳白色,但振摇后有挂壁现象;粒径虽符合口服乳剂的粒径范围,但偏大; K_c 虽为最小,但所得口服乳剂静置24 h内可见分层现象。当油酸用量为10%时,所得口服乳剂呈均一乳白色,振摇后不挂壁,亦未出现分层现象,粒径、 K_c 相对较小,故选择油酸用量为10%。结果见表1。

(2)OP-10用量:取神经酸原料药1 g,固定丙二醇用量5%、油酸用量10%,乳化温度70 $^{\circ}$ C,以4 000 r/min剪切一定时间,在一定压力下于高压均质机中循环数次,按“2.1”项下方法操作,考察不同OP-10用量(2%、4%、

表1 不同油酸用量对神经酸口服乳剂各指标的影响

油酸用量/%	外观	离心稳定性	粒径/nm	K_c
5	乳白色,黏稠	+	589.65	0.30
10	乳白色	+	358.63	0.86
15	乳白色	+	178.53	0.94
20	有油滴	-	/	/
25	有油滴	-	/	/
30	有油滴	-	/	/

+:离心后无分层现象;-:离心后有分层现象;/:无需测定

6%、8%、10%、12%)对神经酸口服乳剂外观、离心稳定性、粒径及 K_c 的影响。结果显示,当OP-10用量为4%时,所得口服乳剂呈均一乳白色,振摇后不挂壁,亦未出现分层现象,粒径及 K_c 均为最小,故选择OP-10用量为4%。结果见表2。

表2 不同OP-10用量对神经酸口服乳剂各指标的影响

OP-10用量/%	外观	离心稳定性	粒径/nm	K_c
2	乳白色	+	234.23	0.84
4	乳白色	+	201.79	0.81
6	乳白色	+	254.48	0.91
8	黏稠	-	/	/
10	黏稠	-	/	/
12	黏稠	-	/	/

+:离心后无分层现象;-:离心后有分层现象;/:无需测定

(3)丙二醇用量:取神经酸原料药1g,固定油酸用量10%、OP-10用量4%,乳化温度70℃,以4000r/min剪切一定时间,在一定压力下于高压均质机中循环数次,按“2.1”项下方法操作,考察不同丙二醇用量(2%、4%、6%、8%、10%、12%)对神经酸口服乳剂外观、离心稳定性、粒径及 K_c 的影响。结果显示,当丙二醇用量为4%时,所得口服乳剂呈均一乳白色,振摇后不挂壁,亦未出现分层现象, K_c 为最小,粒径相差不大,故选择丙二醇用量为4%。结果见表3。

表3 不同丙二醇用量对神经酸口服乳剂各指标的影响

丙二醇用量/%	外观	离心稳定性	粒径/nm	K_c
2	乳白色	+	181.87	0.48
4	乳白色	+	171.01	0.12
6	乳白色	+	148.23	0.27
8	乳白色	+	170.07	0.37
10	乳白色	+	171.68	0.39
12	乳白色	+	180.06	0.35

+:离心后无分层现象

2.3.2 正交实验

在单因素实验的基础上,以油酸用量(A%)、OP-10用量(B%)、丙二醇用量(C%)为因素,神经酸口服乳剂粒径及 K_c 为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计对神经酸口服乳剂的处方进行优化。神经酸口服乳剂处方的因素与水平见表4,设计方案与结果见表5,方差分析结果见表6。

由表5、表6可知,各因素对神经酸口服乳剂粒径的影响由大到小依次为 $A>C>B$,但上述影响均无统计学意义($P>0.05$)。各因素对神经酸口服乳剂 K_c 的影响由

表4 神经酸口服乳剂处方的因素与水平

水平	A/%	B/%	C/%
1	5	2	2
2	10	4	4
3	15	6	6

表5 神经酸口服乳剂处方正交实验的设计方案与结果

序号	A	B	C	D(空白)	粒径/nm	K_c
1	1	1	1	1	125.98	0.28
2	1	2	2	2	157.97	0.16
3	1	3	3	3	227.77	0.27
4	2	1	2	3	219.11	0.88
5	2	2	3	1	167.54	0.59
6	2	3	1	2	197.85	0.39
7	3	1	3	2	275.09	0.85
8	3	2	1	3	205.51	0.43
9	3	3	2	1	187.47	0.61
粒径	均值I	170.57	206.73	176.45	160.33	
	均值II	194.83	177.01	188.18	210.30	
	均值III	222.69	204.36	223.47	217.46	
	极差R	52.12	29.72	47.02	57.13	
K_c	均值I	0.24	0.67	0.36	0.49	
	均值II	0.62	0.39	0.55	0.47	
	均值III	0.63	0.42	0.57	0.53	
	极差R	0.40	0.28	0.21	0.06	

表6 神经酸口服乳剂处方正交实验的方差分析结果

指标	差异来源	偏差平方和	自由度	均方	F	P
粒径	A	4080.6884	2	2040.3442	0.70	>0.05
	B	1637.2510	2	818.6255	0.28	>0.05
	C	3593.5434	2	1796.7717	0.62	>0.05
	D(误差)	5812.8174	2	2906.4087		
K_c	A	0.3049	2	0.1524	54.00	<0.05
	B	0.1420	2	0.0710	25.15	<0.05
	C	0.0774	2	0.0387	13.72	>0.05
	D(误差)	0.0056	2	0.0028		

注: $F_{0.05(2,2)}=19.00$

大到小依次为 $A>B>C$;其中,油酸用量、OP-10用量对神经酸口服乳剂 K_c 的影响有统计学意义($P<0.05$),而丙二醇用量对 K_c 的影响无统计学意义($P>0.05$)。综合考虑,得最优处方为 $A_1B_2C_1$,即油酸用量为5%,OP-10用量为4%,丙二醇用量为2%。

2.4 神经酸口服乳剂制备工艺的优化

2.4.1 单因素实验

(1)乳化温度:取神经酸原料药1g,按“2.3”项下最优处方,固定剪切时间4min、高压均质压力50MPa、高压均质循环次数4次,按“2.1”项下方法操作,考察不同乳化温度(50、60、70、80℃)对神经酸口服乳剂外观、离心稳定性、粒径及 K_c 的影响。结果显示,当乳化温度为70℃时,所得口服乳剂呈均一乳白色,振摇后不挂壁,亦未出现分层现象,粒径、 K_c 相对较小,故选择乳化温度为70℃。结果见表7。

(2)剪切时间:取神经酸原料药1g,按“2.3”项下最优处方,固定乳化温度70℃、高压均质压力50MPa、高压均质循环次数4次,按“2.1”项下方法操作,考察不同

表7 不同乳化温度对神经酸口服乳剂各指标的影响

乳化温度/℃	外观	离心稳定性	粒径/nm	K_c
50	乳白色	+	135.80	0.29
60	乳白色	+	146.54	0.26
70	乳白色	+	138.40	0.18
80	乳白色	+	159.03	0.35

+: 离心后无分层现象

剪切时间(0、2、4、6、8 min)对神经酸口服乳剂外观、离心稳定性、粒径及 K_c 的影响。结果显示,所得口服乳剂呈均一乳白色,振摇后不挂壁,亦未出现分层现象。当剪切时间超过4 min后,粒径及 K_c 基本无明显变化,且两者相对较小,故选择剪切时间为4 min。结果见表8。

表8 不同剪切时间对神经酸口服乳剂各指标的影响

剪切时间/min	外观	离心稳定性	粒径/nm	K_c
0	乳白色	+	246.88	0.56
2	乳白色	+	180.32	0.53
4	乳白色	+	165.59	0.34
6	乳白色	+	170.60	0.35
8	乳白色	+	173.98	0.31

+: 离心后无分层现象

(3)高压均质压力:取神经酸原料药1 g,按“2.3”项下最优处方,固定乳化温度70 ℃、剪切时间4 min、高压均质循环次数4次,按“2.1”项下方法操作,考察不同高压均质压力(20、40、60、80 MPa)对神经酸口服乳剂外观、离心稳定性、粒径及 K_c 的影响。结果显示,所得口服乳剂呈均一乳白色,振摇后不挂壁,亦未出现分层现象。当高压均质压力为60 MPa时,粒径略有增加但不明显,且符合口服乳剂的粒径范围, K_c 无明显变化且为最小,故选择高压均质压力为60 MPa。结果见表9。

表9 不同高压均质压力对神经酸口服乳剂各指标的影响

高压均质压力/MPa	外观	离心稳定性	粒径/nm	K_c
20	乳白色	+	147.88	0.49
40	乳白色	+	155.81	0.43
60	乳白色	+	170.65	0.33
80	乳白色	+	192.04	0.36

+: 离心后无分层现象

(4)高压均质循环次数:取神经酸原料药1 g,按“2.3”项下最优处方,固定乳化温度70 ℃、剪切时间4 min、高压均质压力60 MPa,按“2.1”项下方法操作,考察不同高压均质循环次数(2、4、6、8次)对神经酸口服乳剂外观、离心稳定性、粒径及 K_c 的影响。结果显示,所得口服乳剂呈均一乳白色,振摇后不挂壁,亦未出现分层现象。随着高压均质循环次数的增加, K_c 无明显变化;粒径虽逐渐增加,但可能与“过做功”导致乳滴合并有关^[13]。综合考虑,选择高压均质循环次数为4次。结果见表10。

2.4.2 正交实验

在单因素实验的基础上,以乳化温度($A/℃$)、剪切时间(B/min)、高压均质压力(C/MPa)、高压均质循环次

表10 不同高压均质循环次数对神经酸口服乳剂各指标的影响

高压均质循环次数	外观	离心稳定性	粒径/nm	K_c
2	乳白色	+	170.05	0.43
4	乳白色	+	178.43	0.40
6	乳白色	+	198.63	0.45
8	乳白色	+	215.74	0.59

+: 离心后无分层现象

数($D/次$)为因素,神经酸口服乳剂粒径及 K_c 为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计对神经酸口服乳剂的制备工艺进行优化。神经酸口服乳剂制备工艺的因素与水平见表11,设计方案与结果见表12,方差分析结果见表13。

表11 神经酸口服乳剂制备工艺的因素与水平

水平	$A/℃$	B/min	C/MPa	$D/次$
1	60	2	40	2
2	70	4	60	4
3	80	6	80	6

表12 神经酸口服乳剂制备工艺正交实验的设计方案与结果

序号	$A/℃$	B/min	C/MPa	$D/次$	粒径/nm	K_c
1	1	1	1	1	162.31	0.29
2	1	2	2	2	175.41	0.31
3	1	3	3	3	215.74	0.36
4	2	1	2	3	188.84	0.32
5	2	2	3	1	180.40	0.30
6	2	3	1	2	177.85	0.37
7	3	1	3	2	209.03	0.38
8	3	2	1	3	196.90	0.48
9	3	3	2	1	195.54	0.41
粒径	均值I	184.49	186.73	179.02	179.42	
	均值II	182.36	184.24	186.60	187.43	
	均值III	200.49	196.38	201.72	200.49	
	极差R	18.13	12.14	22.70	21.08	
K_c	均值I	0.32	0.33	0.38	0.33	
	均值II	0.33	0.36	0.35	0.35	
	均值III	0.42	0.38	0.34	0.39	
	极差R	0.10	0.05	0.04	0.05	

表13 神经酸口服乳剂制备工艺的正交实验方差分析结果

指标	差异来源	偏差平方和	自由度	均方	F	P
粒径	A	589.191 3	2	294.595 6	0.868	>0.05
	B	246.7022	2	123.351 1	0.363	>0.05
	C	801.663 3	2	400.831 6	1.180	>0.05
	D	679.090 1	2	339.545 0	1.000	>0.05
	误差	246.702 2	2	123.351 1		
K_c	A	0.019 5	2	0.009 8	5.000	>0.05
	B	0.003 9	2	0.002 0	1.000	>0.05
	C	0.002 2	2	0.001 1	0.500	>0.05
	D	0.004 4	2	0.002 1	1.000	>0.05
	误差	0.019 5	2	0.009 8		

由表12、表13可知,乳化温度、剪切时间、高压均质压力、高压均质循环次数对粒径及 K_c 的影响均无统计学意义($P>0.05$)。其中,高压均质压力是影响神经酸口

服乳剂粒径最主要的因素,其次是高压均质循环次数,剪切时间对粒径影响最小,即 $C>D>A>B$,得到粒径方面的最优工艺为 $A_2B_2C_1D_1$ 。乳化温度是影响神经酸口服乳剂稳定性最主要的因素,其次是高压均质循环次数和剪切时间,即 $A>D=B>C$,得到稳定性方面的最优工艺为 $A_1B_1C_3D_1$ 。综合分析,因素 A 、因素 B 虽不是粒径的主要影响因素,但却是 K_c 的主要影响因素,故因素 A 、因素 B 取 A_1 、 B_1 水平;因素 C 是粒径的主要影响因素,故因素 C 取 C_1 水平;因素 D 均以 D_1 水平为优,故取 D_1 水平。最终得到最优制备工艺为 $A_1B_1C_1D_1$,即乳化温度为 $60\text{ }^\circ\text{C}$,剪切时间为 2 min ,高压均质压力为 40 MPa ,高压均质循环次数为 2 次。

2.5 最优处方及制备工艺的验证

取神经酸原料药 1 g ,以神经酸口服乳剂外观、离心稳定性、粒径及 K_c 为指标,按“2.3”“2.4”项下最优处方及最优制备工艺制备神经酸口服乳剂。每样品平行操作 3 次,取平均值。结果显示,3批神经酸口服乳剂的平均粒径为 158.05 nm ($RSD=1.58\%$, $n=3$),平均 K_c 为 0.39 ($RSD=1.49\%$, $n=3$),表明所得处方及制备工艺稳定、可行。结果见表14。

表14 神经酸口服乳剂的验证结果

序号	外观	离心稳定性	粒径/nm	K_c
1	乳白色	+	155.44	0.39
2	乳白色	+	158.31	0.38
3	乳白色	+	160.40	0.39
平均值			158.05	0.39
RSD/%			1.58	1.49

+:离心后无分层现象

2.6 神经酸的含量测定

2.6.1 色谱条件

以Amethyst C_{18} -H($250\text{ nm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$)为色谱柱,以乙腈- 0.05% 磷酸溶液($98:2$, V/V)为流动相;流速为 1 mL/min ;检测波长为 203 nm ;柱温为 $25\text{ }^\circ\text{C}$;进样量为 $5\text{ }\mu\text{L}$ ^[14]。

2.6.2 对照品溶液的制备

精密称取神经酸对照品适量,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,混匀,制得质量浓度为 0.328 mg/mL 的对照品溶液。

2.6.3 供试品溶液的制备

精密量取按最优处方及制备工艺制得的神经酸口服乳剂 0.2 mL ,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解,超声(功率 250 W ,频率 40 kHz)处理 15 min ,放冷,加甲醇定容,摇匀,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.6.4 空白对照溶液的制备

按“2.3”“2.4”项下最优处方及制备工艺制得缺神经酸原料药的空白口服乳剂,再按“2.6.3”项下方法制备空白对照溶液。

2.6.5 专属性试验

分别取上述对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶

液,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可知,空白对照溶液色谱图在对照品相应位置上没有吸收峰,表明处方中的辅料对神经酸的测定无干扰;对照品溶液中神经酸的理论板数为 $24\text{ }251$,供试品溶液中神经酸的理论板数为 $23\text{ }779$ 。

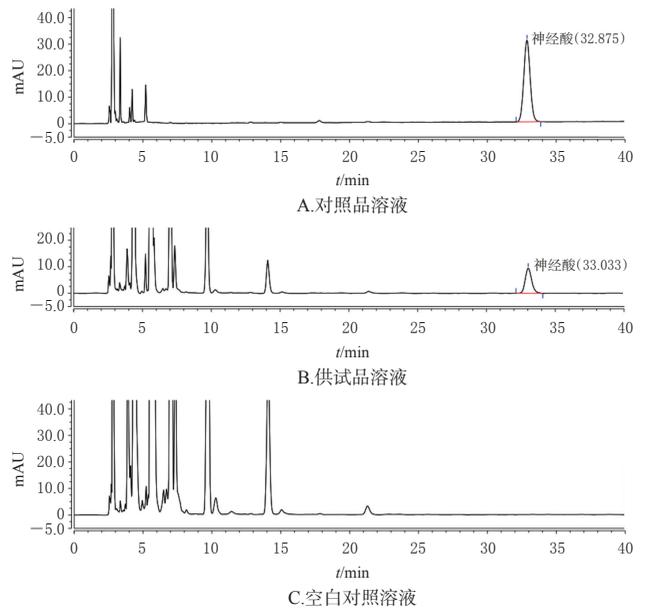


图1 神经酸对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液的HPLC图

2.6.6 线性关系考察

精密吸取“2.6.2”项下对照品溶液,用甲醇稀释并定容,制得质量浓度为 $0.164\text{ }0$ 、 $0.082\text{ }0$ 、 $0.041\text{ }0$ 、 $0.020\text{ }5$ 、 $0.010\text{ }25\text{ mg/mL}$ 的系列工作溶液,再另取“2.6.2”项下对照品溶液,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以对照品质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得神经酸的回归方程为 $Y=30.071\text{ }0X+0.019\text{ }2$ ($r=0.999\text{ }9$),表明神经酸检测质量浓度的线性范围为 $0.010\text{ }25\sim 0.328\text{ }0\text{ mg/mL}$ 。

2.6.7 精密度试验

取“2.6.6”项下质量浓度为 $0.010\text{ }25\text{ mg/mL}$ 的对照品溶液,按“2.6.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果显示,神经酸峰面积的 RSD 为 1.05% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6.8 稳定性试验

取“2.6.3”项下供试品溶液,分别于室温下放置 0 、 2 、 4 、 6 、 8 、 12 、 24 h 时按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,神经酸峰面积的 RSD 为 1.01% ($n=7$),表明供试品溶液于室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.6.9 重复性试验

取按最优处方及制备工艺制得的神经酸口服乳剂,共 6 份,按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果显示,神经酸含量的 RSD 为 1.29%

($n=6$),表明方法重复性良好。

2.6.10 加样回收率试验

精密移取已知含量的按最优处方及制备工艺制得神经酸口服乳剂,共6份,加入等量的对照品,按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率。结果见表15。

表15 神经酸的加样回收率试验结果($n=6$)

已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
0.8725	0.84	1.7102	99.73	104.60	2.77
0.8725	0.89	1.8226	106.75		
0.8725	0.84	1.7323	102.36		
0.8725	0.94	1.8742	106.56		
0.8725	0.98	1.9141	106.29		
0.8725	0.87	1.7941	105.93		

2.6.11 样品含量测定

按“2.3”“2.4”项下最优处方及制备工艺制得神经酸口服乳剂,共3批,按“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定并按标准曲线法计算样品含量。结果显示,口服乳剂中神经酸的含量分别为8.4732、8.7092、8.4823 mg/mL,平均含量为8.5549 mg/mL($RSD=1.56\%$, $n=3$)。

2.7 样品稳定性试验

2.7.1 高温试验

按“2.3”“2.4”项下最优处方及制备工艺制得神经酸口服乳剂。取适量,于60℃下放置10d,分别于第5天、第10天时取样,按2020年版《中国药典》(四部)“稳定性重点考察项目”考察高温条件下样品的稳定性^[9],并按“2.6.11”项下方法测定其中神经酸的含量。结果显示,于60℃下放置5d后,神经酸口服乳剂外观由均一乳白色变为上层淡黄色、下层白色,出现分层现象;神经酸的含量明显升高,由8.6882 mg/mL增加到16.2492 mg/mL,表明神经酸口服乳剂不适宜放置于高温环境中,应于较低温度中保存(因第5天时神经酸口服乳剂的外观、含量均发生了变化,故未对第10天的样品进行检测)。

2.7.2 加速试验

按“2.3”“2.4”项下最优处方及制备工艺制得神经酸口服乳剂。取3批样品,于温度(40±2)℃、相对湿度(75±5)%条件下放置6个月,分别于放置0、1、2、3、6个月时取样,按2020年版《中国药典》(四部)“加速试验”规定考察样品的稳定性^[9],并按“2.6.11”项下方法测定其中神经酸的含量。结果显示,神经酸口服乳剂外观均呈均一乳白色,无分层现象,且神经酸的含量变化不大。结果见表16。

2.7.3 长期试验

按“2.3”“2.4”项下最优处方及制备工艺制得神经酸口服乳剂。取3批样品,于温度(25±2)℃、相对湿度(60±5)%条件下放置6个月,分别于放置0、3、6个月时取样,按2020年版《中国药典》(四部)“长期试验”规定考察样品的稳定性^[9],并按“2.6.11”项下方法测定其中神经

酸的含量。结果显示,神经酸口服乳剂外观均呈均一乳白色,无分层现象,且神经酸的含量变化不大。结果见表17。

表16 神经酸口服乳剂的加速试验结果

批次	时间/月	外观	分层现象	含量/(mg/mL)
1	0	均一乳白色	无分层	8.7799
	1	均一乳白色	无分层	8.6516
	2	均一乳白色	无分层	8.6631
	3	均一乳白色	无分层	8.6389
	6	均一乳白色	无分层	8.6307
	2	0	均一乳白色	无分层
1		均一乳白色	无分层	8.6616
2		均一乳白色	无分层	8.6782
3		均一乳白色	无分层	8.6539
6		均一乳白色	无分层	8.6445
3		0	均一乳白色	无分层
	1	均一乳白色	无分层	8.6399
	2	均一乳白色	无分层	8.6317
	3	均一乳白色	无分层	8.5809
	6	均一乳白色	无分层	8.5525

表17 神经酸口服乳剂的长期试验结果

批次	时间/月	外观	分层现象	含量/(mg/mL)
1	0	均一乳白色	无分层	8.7462
	3	均一乳白色	无分层	8.6956
	6	均一乳白色	无分层	8.7173
2	0	均一乳白色	无分层	8.7032
	3	均一乳白色	无分层	8.6320
	6	均一乳白色	无分层	8.7062
3	0	均一乳白色	无分层	8.6733
	3	均一乳白色	无分层	8.6367
	6	均一乳白色	无分层	8.7305

3 讨论

研究指出,在采用机械法制备神经酸口服乳剂时,不需要考虑混合顺序,制备的乳剂质量较好^[10]。笔者在单因素实验中发现,油相用量越大,所得口服乳剂的 K 就越大,乳剂就越不稳定,油滴越易析出;随着乳化剂用量的增加,乳剂稳定性亦有所增加,但当乳化剂用量超过6%时,会导致油相与水相无法均匀混合,从而使乳剂的稳定性变差。升高乳化温度可以降低油相的黏度,有利于剪切力的传递及乳剂的形成,但温度过高会导致乳剂的稳定性下降,这可能是由于温度过高导致油水界面膜膨胀,增加乳滴的动能,使大量的乳滴聚合并,粒径增大^[15]。在一定的剪切速度下,剪切时间的延长可使乳剂趋于稳定,粒径逐渐缩小;当剪切时间超过4 min时,粒径出现增加的趋势,这可能是由于外界过高的能量使更多的乳滴产生,使得乳滴之间的挤压、碰撞更为剧烈,导致乳滴出现合并现象,从而增加乳剂的平均粒径^[13]。此外,本课题组发现,高压均质压力越大,所得乳剂越稳定, K 越小,但粒径有增加的趋势,这可能是由于“过做功”而引起的“粒径反弹”,即乳剂在高压均质机中受到高压而产生强烈的剪切、撞击和空穴作用,使得乳剂超微细化,但过度做功会使单位体积内油水两相接触面积

增大、分子热运动加速,导致油相分子之间的碰撞更加频繁,油滴之间互相吸附和融合,诱发合并现象,从而增大乳剂的平均粒径^[13]。

本课题组还发现,不同乳化温度、剪切时间、高压均质压力、高压均质循环次数对所得口服乳剂稳定性及粒径的影响均存在一定差异,故采用正交实验设计对制备工艺进行优化。但在优化制备工艺时发现,在所选水平中,各因素对粒径及*K_w*的影响均无统计学意义,可能是在单因素实验中,各水平条件下所得乳剂的粒径、*K_w*变化较小。综合粒径及*K_w*得到最优处方及制备工艺为神经酸原料药1 g、油酸用量5%、OP-10用量4%、丙二醇用量2%、乳化温度60℃、剪切时间2 min、高压均质压力40 MPa、高压均质循环2次。在此处方工艺条件下,所得神经酸口服乳剂的平均粒径为158.05 nm,平均*K_w*为0.39,外观、离心稳定性及粒径均符合外观为均一乳白色、离心后不分层、粒径在乳剂范围内的要求^[11]。

本课题组在参考相关文献^[14]的基础上,考察了不同色谱柱(Diamondsil C₁₈、Acclaim™120 C₁₈、Amethyst C₁₈-H,规格均为250 nm×4.6 mm, 5 μm)对色谱峰峰形、出峰时间的影响,结果发现,以Amethyst C₁₈-H为色谱柱时,色谱峰峰形更好,出峰时间较短。同时,本课题组又考察了乙腈-0.05%磷酸溶液不同比例(90:10、94:6、98:2、99:1, *V/V*)对色谱峰峰形及出峰时间的影响,结果发现,当乙腈与0.05%磷酸溶液比例为98:2(*V/V*)时,所得色谱峰峰形好且出峰快。

样品的稳定性试验结果显示,神经酸口服乳剂应避免置于高温环境中保存,因高温环境可使乳剂出现分层现象,使神经酸的含量明显升高;该制剂应于较低温度下保存,室温环境放置6个月的稳定性较好。

综上所述,所得最优处方及制备工艺稳定、可行,可用于神经酸口服乳剂的制备;所建含量测定方法操作简便、可行,可用于神经酸口服乳剂的含量测定;神经酸口服乳剂不适宜放置于高温环境中,在室温环境中放置6

个月的外观及含量无明显变化,稳定性较好。

参考文献

- [1] 玛依乐·艾海提,侯晨,孟永宏,等.神经酸的来源与功能研究进展[J].中国油脂,2019,44(10):105-109.
- [2] 刘速速,周庆礼,孙华,等.神经酸的功能及提纯工艺研究进展[J].中国油脂,2019,44(10):142-146.
- [3] 龚蜜,王亚南,王素娟,等.神经酸的研究进展[J].中国蜂业,2011,62(7):50-53.
- [4] 李文保,孙昌俊,王飞飞,等.神经酸及其在预防和治疗脑病中的应用研究进展[J].药学进展,2014,38(8):591-596.
- [5] 王性炎,王姝清.神经酸研究现状及应用前景[J].中国油脂,2010,35(3):1-5.
- [6] 王泽宇,胡佳,康敏,等.神经酸制备方法研究进展[J].亚太传统医药,2016,12(1):46-49.
- [7] 刘英波,李江.苗药大果木姜子油口服乳剂的研制[J].中国医院药学杂志,2013,33(16):1364-1366.
- [8] 叶伟文.鸦胆子油乳剂的处方优化及其药代动力学研究[D].广州:广东药学院,2014.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:23,457-459.
- [10] 方亮.药剂学[M].8版.北京:人民卫生出版社,2016:120.
- [11] 陈西翌.雷公藤内酯醇干乳的制备及其抗肿瘤作用的研究[D].福州:福建医科大学,2016.
- [12] 潘明明.地昔尼尔乳剂的制备及其安全性初步评价[D].南京:南京农业大学,2015.
- [13] 李瑞强.大豆油脂脂肪乳体的制备及稳定性研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2013.
- [14] 吴乐艳,侯雯清,孙孔春,等.反相高效液相色谱法测定神经酸片中神经酸含量[J].昆明医科大学学报,2020,41(6):11-14.
- [15] 方成玲.鸦胆子油口服干乳颗粒剂的研究[D].广州:广东药学院,2012.

(收稿日期:2021-09-08 修回日期:2022-01-05)

(编辑:陈宏)

(上接第445页)

- [11] 郑振兴,胡瀚文,曾利,等.基于HPLC指纹图谱结合化学计量学评价不同产地佛手药材质量[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(21):174-180.
- [12] 王美华,赵邯涛,潘梦雪,等.益胃汤物质基准的HPLC指纹图谱分析及多组分含量测定[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(17):9-15.
- [13] 吴安,张誉晴,赵志峰,等.经典名方枇杷清肺饮的UPLC指纹图谱及多指标成分含量分析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(14):12-20.
- [14] 韩光明,张艳艳,刘加秀.正交试验优选蒲苓盆炎康胶囊中落新妇苷的提取工艺[J].中国药房,2015,26(31):4421-4423.
- [15] 胡梦梅.土茯苓化学成分分离及抗炎活性研究[D].广州:

广州中医药大学,2014.

- [16] 魏焯,董振咏.蒲苓盆炎康颗粒的临床应用研究[J].临床合理用药杂志,2008,1(1):59-60.
- [17] 孙仙玲.参蒲盆炎颗粒的药学研究[D].南京:南京中医药大学,2016.
- [18] 周晓梅.蒲苓盆炎康颗粒联合复方黄柏洗液灌肠治疗慢性盆腔炎疗效分析[J].内蒙古中医药,2017,36(14):86-87.
- [19] OH Y, KWON Y S, JUNG B D. Anti-inflammatory effects of the natural compounds cortex phellodendri and *Humulus japonicus* on pelvic inflammatory disease in mice[J]. Int J Med Sci, 2017, 14(8):729-734.

(收稿日期:2021-09-12 修回日期:2022-01-18)

(编辑:陈宏)