

阿魏酸川芎嗪固体脂质纳米粒的处方优化及质量评价^Δ

孙陶利^{1,2*},戴智^{1,2},蒋鹏程^{1,2},吴柱^{1,2},刘卫平^{1,2},卜振军³,唐靖^{1,2},王建芬^{1,2},马宁^{1,2#}(1.长沙医学院药学院,长沙 410219;2.新型药物制剂研发湖南省重点实验室培育基地,长沙 410219;3.湖南九典制药股份有限公司,湖南浏阳 410329)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)31-4434-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.31.29

摘要 目的:优化阿魏酸川芎嗪(FATM)固体脂质纳米粒(FATM-SLN)的处方,并进行质量评价。方法:采用乳化-超声法制备FATM-SLN。以粒径、包封率为指标,以单硬脂酸甘油酯、蛋黄卵磷脂(PC)、泊洛沙姆188(P188)、硬脂酸钠用量为因素,通过单因素试验和正交试验优化FATM-SLN处方,并进行验证试验。考察所制FATM-SLN的外观形态、粒径分布、Zeta电位、稳定性和体外释放度。结果:最优处方为FATM 10 mg、单硬脂酸甘油酯 300 mg、PC 200 mg、P188 200 mg、硬脂酸钠 10 mg、纯化水 20 mL。所制FATM-SLN呈类球形实体粒子,外观形态较圆整,粒径分布为40~800 nm,平均粒径为106.23 nm,多分散系数为0.254,Zeta电位为-34.8 mV,包封率为73.32%,载药量为1.20%;4℃下10 d内外观无明显变化(RSD<2%)。其在0.5~1 h内释药最快,1 h的累积释放度达到60.47%;8 h后释药趋于平稳,累积释放度为93.46%,药物基本释放完全。结论:成功优化FATM-SLN的处方;所制FATM-SLN的粒径小、包封率高、稳定性好。

关键词 阿魏酸川芎嗪;固体脂质纳米粒;处方优化;正交试验;粒径分布;质量评价

Formulation Optimization and Quality Evaluation of Ferulic Acid Ligustrazine Solid Lipid Nanoparticles

SUN Taoli^{1,2}, DAI Zhi^{1,2}, JIANG Pengcheng^{1,2}, WU Zhu^{1,2}, LIU Weiping^{1,2}, BU Zhenjun³, TANG Jing^{1,2}, WANG Jianfen^{1,2}, MA Ning^{1,2}(1.School of Pharmacy, Changsha Medical University, Changsha 410219, China; 2.Key Laboratory Breeding Base of Hunan Oriented Fundamental and Applied Research of Innovative Pharmaceutics, Changsha 410219, China; 3.Hunan Jiudian Pharmaceutical Co., Ltd., Hunan Liuyang 410329, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the formulation of ferulic acid ligustrazine (FATM) solid lipid nanoparticles (FATM-SLN), and conduct the quality evaluation. METHODS: Emulsification ultrasonic method was used to prepare FATM-SLN. Using particle size and entrapment efficiency as indexes, amount of glyceryl monostearate, egg yolk lecithin (PC), poloxamer 188 (P188), and sodium stearate as factors, single factor test and orthogonal test were used to optimize the formulation; and verification test was conducted. The appearance morphology, distribution of particle size, Zeta potential, stability and *in vitro* release degree of prepared FATM-SLN were investigated. RESULTS: The optimal formulation was as follows as FATM of 10 mg, glyceryl monostearate of 300 mg, PC of 200 mg, P188 of 200 mg, sodium stearate of 10 mg, and purified water of 20 mL. The prepared FATM-SLN showed spherical solid particles, appearance morphology was round, distribution of particle size was 40-800 nm, particle size was 106.23 nm, polydispersity index was 0.254, Zeta potential was -34.8 mV, entrapment efficiency was 73.32%, drug loading was 1.20%; the appearance had no obvious changes within 10 d in 4℃ (RSD<2%). The drug-release in 0.5-1 h was the fastest, the cumulative release degree reached to 60.47%; it tended to be stable after 8 h, the cumulative release degree reached to 93.46%, and drugs were basically released completely. CONCLUSIONS: FATM-SLN formulation is successfully optimized, and the prepared FATM-SLN has small particle size, high entrapment efficiency and good stability.

KEYWORDS Ferulic acid ligustrazine; Solid lipid nanoparticles; Formulation optimization; Orthogonal test; Distribution of particle size; Quality evaluation

川芎嗪在临床上主要用于缺血性脑血管疾病的治
疗,取得了较好的疗效。但川芎嗪代谢快、半衰期短,应

Δ 基金项目:湖南省教育厅高校科研专项(No.15A025);湖南省重点研发计划、创新平台与人才计划项目(No.湘科规材[2016]8号);湖南省高校科研项目(No.湘教通[2012]596号)

* 讲师,硕士。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0731-88602853。E-mail:taoli198803@126.com

通信作者:教授,博士。研究方向:药物新剂型、药动学。电话:0731-88602646。E-mail:761472615@qq.com

用时需频繁给药,易引起蓄积中毒^[1-2]。阿魏酸具有抗血小板凝集、抑制血栓形成、保护心肌等药理活性,在治疗心、脑、肾等疾病方面效果较好,且毒副作用较低^[3]。川芎嗪和阿魏酸的某些药理作用一致,有研究发现,两者配伍应用具有明显的协同作用^[4]。根据两药配伍使用的启示,谭载友等^[5-6]从传统方剂补阳还五汤、血府逐瘀汤和十全大补汤中分别提取分离出了一种抗血小板凝集的化合物,其结构包括阿魏酸和川芎嗪的主要结构,故将

其命名为阿魏酸川芎嗪(FATM)。随后,大量研究证明,FATM在抗血小板聚集、抑制血栓形成及在大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护方面,效果均优于川芎嗪和阿魏酸,且毒副作用更低^[6-8]。但目前关于FATM的研究主要集中在药理活性及含量测定方面^[7-9],对其制剂的研究较少,主要是其普通制剂的研究。

固体脂质纳米粒(SLN)是20世纪90年代兴起的一种新型药物递送剂型,是由多种类脂材料(如三酰甘油、豆磷脂等)形成的固体颗粒,具有物理稳定性高、可控制药物释放、避免药物降解或泄漏、靶向性良好、无毒等优点^[10]。与传统的药物制剂相比,将药物包封在生理相容且耐受性好的SLN骨架中可提高药物的生物利用度^[11-13]。本研究拟采用乳化-超声法制备FATM-SLN,并优化其处方,以期临床提供物理稳定性高、疗效好、副作用小的新型FATM制剂。

1 材料

1.1 仪器

TG16台式高速离心机(长沙英泰仪器有限公司);Nano-ZS90激光粒径测定仪(英国Malvan公司);759S紫外-可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);LVEM5台式透射电子显微镜(美国Delong公司)。

1.2 药品与试剂

阿魏酸、川芎嗪原料药(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号:20160303、20160212,纯度:98.1%、98.0%);FATM(长沙医学院药理学实验室合成,批号:20160416,纯度:98.0%);甲醇(批号:20160223,色谱纯)、磷酸(批号:20121114,优级纯)、蛋黄卵磷脂(PC,批号:20151222,分析纯)、硬脂酸钠(批号:20131209,分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司;乙酸丁酯(江苏强盛功能化学股份有限公司,批号:20120910,分析纯);单硬脂酸甘油酯(上海恒信化学试剂有限公司,批号:20130107,纯度:95.0%);泊洛沙姆188(P188,深圳市优普惠股份有限公司,批号:WPWI625C,规格:F68,纯度:98.5%);葡聚糖凝胶G50(上海如吉生物有限公司,批号:20151112)。

2 方法与结果

2.1 FATM-SLN的制备

取处方量的FATM、PC、乙酸丁酯、单硬脂酸甘油酯,置于50 mL的烧杯中,70℃水浴使其溶解,作为油相;再取处方量的P188、硬脂酸钠、纯化水,置于20 mL烧杯中,70℃水浴使其溶解,作为水相;将油相注入水相中,70℃下5 000 r/min剪切5 min,探头超声(功率:30 kHz)5 min,迅速置于冰水浴中,冷却至室温,即得FATM-SLN。

2.2 FATM含量测定方法的建立

2.2.1 检测波长的确定 精密称取FATM约0.010 2 g,置于50 mL量瓶中,加甲醇超声溶解并定容,得FATM贮

备液。精密移取上述贮备液1 mL,置于10 mL量瓶中,加甲醇稀释并定容,以甲醇为空白对照,用紫外-可见分光光度计在200~500 nm波长范围内进行扫描。结果显示,FATM最大吸收波长为320 nm,故确定320 nm为检测波长。

2.2.2 辅料影响的考察 取FATM-SLN 1 mL,用甲醇破乳并定容至25 mL,得供试品溶液。精密称取FATM-SLN处方中所有辅料,制备成不含FATM的空白SLN,作为阴性样品;精密吸取阴性样品1 mL,用甲醇破乳并定容至25 mL,即得空白溶液。将供试品溶液和空白溶液在200~500 nm波长范围内进行扫描。结果显示,辅料在320 nm波长处没有吸收,对FATM的测定无干扰。

2.2.3 标准曲线的绘制 精密称取FATM 0.014 2 g,置于50 mL量瓶中,用甲醇溶解并定容,制得质量浓度为0.284 mg/mL的对照品贮备液。精密移取上述对照品贮备液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置于10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制得系列质量浓度对照品溶液。在320 nm波长处测定系列质量浓度对照品溶液的吸光度值,以溶液质量浓度为横坐标(x)、吸光度值为纵坐标(y)绘制标准曲线,得标准曲线方程为 $y=0.075 01x-0.029 71$ ($r=0.999 4$)。FATM检测质量浓度的线性范围为2.48~28.40 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.4 精密度试验 分别制备5.68、11.36、22.72 $\mu\text{g/mL}$ 低、中、高3个质量浓度的FATM-SLN甲醇溶液,在320 nm波长处测定其吸光度,各重复测定3次,考察精密度。计算得吸光度值的RSD分别为0.24%、0.94%、0.55%($n=3$),表明方法精密度良好,满足测定要求。

2.2.5 准确度试验 按照处方量制备9份空白SLN,分别加入处方原料量80%、100%、120%的FATM,混匀,各平行制备3份。每个样品吸取1 mL,用甲醇定容至25 mL,过滤。在320 nm波长处测定其吸光度,代入回归方程计算其质量浓度,并计算方法回收率。结果显示,低、中、高水平样品的平均方法回收率分别为98.9%、99.2%、101.1%,RSD分别为0.72%、1.11%、1.23%($n=3$),表明方法准确度良好,符合相关规定。

2.3 FATM-SLN包封率和载药量的测定方法

本试验采用葡聚糖凝胶柱色谱分离法根据分子筛原理分离游离FATM和FATM-SLN。操作如下:将葡聚糖凝胶G50用纯化水充分溶胀,装柱;吸取1 mL FATM-SLN上柱,用蒸馏水洗脱,收集带有乳光部分的洗脱液(FATM-SLN);吸取0.5 mL该部分洗脱液,加甲醇至25 mL进行破乳;另吸取0.5 mL FATM-SLN直接用甲醇破乳并定容至25 mL量瓶中;在320 nm波长处测定吸光度,代入回归方程计算FATM含量,按公式计算包封率和载药量。包封率($\%$)= $c_{\text{封}}/c_{\text{总}}\times 100\%$,式中 $c_{\text{封}}$ 为FATM-SLN通过葡聚糖凝胶后的药物量, $c_{\text{总}}$ 为FATM-SLN的总量;载药量($\%$)= $c_{\text{包}}/c_{\text{加}}\times 100\%$,式中 $c_{\text{包}}$ 为被包封的药物

量, c_m 为处方中加入的药物总量。

2.4 处方研究与工艺优化

2.4.1 单因素试验 通过单因素试验分别考察不同用量单硬脂酸甘油酯(300、400、500、600、700 mg)、PC(400、500、600、700、800 mg)、P188(400、500、600、700、800 mg)、硬脂酸钠(10、20、30、40、50 mg)对FATM-SLN包封率和粒径的影响。结果显示,单硬脂酸甘油酯用量越大,包封率越小(依次为69.8%、66.2%、53.1%、40.1%、35.5%),粒径越大(依次为89.1、98.3、125.1、143.5、188.4 nm),故确定其用量应小于400 mg;PC用量越大,包封率越小(依次为67.2%、57.2%、45.8%、34.8%、33.4%),粒径越大(依次为93.2、137.4、166.4、193.5、198.5 nm),故确定其用量应小于400 mg;P188对包封率的影响不大,但对粒径有一定影响,粒径依次为96.8、93.2、104.0、108.8、125.3 nm,故确定其用量应小于500 mg;硬脂酸钠用量对包封率和粒径均有一定的影响,当硬脂酸钠的用量大于40 mg时,包封率会降至60%以下,粒径会增大至170 nm以上,故确定其用量在10~30 mg范围内为宜。

2.4.2 正交试验 单因素试验结果显示,单硬脂酸甘油酯、PC、P188、硬脂酸钠中任何一种辅料用量的增大都会引起FATM-SLN粒径的增大,因此应在不影响FATM-SLN包封率的情况下尽量减少上述4种材料的用量。按照正交设计法,选择4因素[单硬脂酸甘油酯用量(A, mg)、PC用量(B, mg)、P188用量(C, mg)、硬脂酸钠用量(D, mg)]3水平,按 $L_9(3^4)$ 表设计试验,以包封率为指标优化处方。因素与水平见表1,正交试验设计与结果见表2,方差分析结果见表3。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A, mg	B, mg	C, mg	D, mg
1	200	200	200	10
2	300	300	300	20
3	400	400	400	30

表2 正交试验设计与结果

Tab 2 Orthogonal test design and results

序号	A	B	C	D	包封率, %
1	1	1	1	1	69.12
2	1	2	2	2	50.01
3	1	3	3	3	37.90
4	2	1	2	3	67.00
5	2	2	3	1	71.32
6	2	3	1	2	68.32
7	3	1	3	2	44.09
8	3	2	1	3	50.45
9	3	3	2	1	69.10
\bar{K}_1	52.343	60.070	62.630	69.847	
\bar{K}_2	68.660	57.260	62.037	54.140	
\bar{K}_3	54.547	58.440	51.103	51.783	
R	16.517	2.810	11.527	18.064	

表3 方差分析结果

Tab 3 Results of variance analysis

误差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	$F_{0.05}(2, 2)$	P
A	483.760	2	241.388	40.499	19	<0.05
B	11.945	2	5.973	1.000	19	>0.05
C	252.754	2	126.377	21.160	19	<0.05
D	578.537	2	289.265	48.433	19	<0.05

由表2和表3结果可知,各因素对FATM-SLN包封率影响程度依次为D>A>C>B, A、C、D对包封率有显著影响($P<0.05$),而B对包封率无显著影响($P>0.05$)。综合考虑,最终选择 $A_2B_1C_1D_1$ 为最优处方,即单硬脂酸甘油酯(脂质材料)300 mg、PC 200 mg、P188 200 mg、硬脂酸钠10 mg。

2.4.3 验证试验 以最优处方制备3批FATM-SLN,测定3批样品的粒径、包封率、载药量。结果显示,3批样品的粒径分别为107.60、106.10、105.00 nm,平均值为106.23 nm, RSD为1.30%;包封率分别为71.46%、73.33%、75.16%,平均值为73.32%, RSD为1.85%;载药量分别为1.15%、1.19%、1.27%,平均值为1.20%, RSD为0.09%。根据包封率测定方法测定FATM-SLN样品中FATM的平均含量为0.35 mg/mL (RSD为1.88%, $n=3$)。

2.4.4 稳定性试验 将FATM-SLN置于25℃和4℃环境中放置10 d,考察温度对FATM-SLN稳定性的影响。结果,放置在25℃下的3批样品出现不同程度的白色絮状物,吸光度的RSD>3%;放置在4℃下的样品外观无明显变化,吸光度的RSD<2%,表明样品在4℃下放置10 d基本稳定。

2.4.5 外观形态、粒径分布及Zeta电位 利用透射电子显微镜观察FATM-SLN的表面形态。将FATM-SLN加超纯水稀释10倍,取适量滴加在覆盖碳膜的铜网上,用1%磷钨酸染色,室温放置至形成薄膜后用透射电子显微镜观察。结果其形态为类球形实体粒子,外观形态较圆整,粒径在40~800 nm范围内。吸取一定量的FATM-SLN,加超纯水稀释10倍,用激光粒径测定仪测定其粒径及电位。结果,其平均粒径为106.23 nm,多分散系数(PDI)为0.254, Zeta电位为-34.8 mV。FATM-SLN的透射电镜图见图1,粒径分布及Zeta电位图见图2。

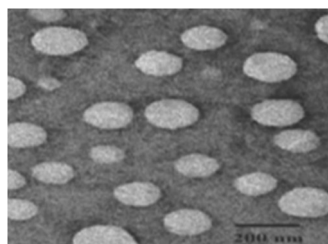


图1 FATM-SLN的透射电子显微镜图($\times 300\ 000$)

Fig 1 Transmission electron micrograph of FATM-SLN($\times 300\ 000$)

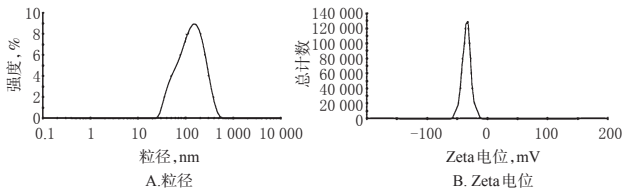


图2 FATM-SLN的粒径分布及Zeta电位图

Fig 2 Particle size distribution and Zeta potential diagram of FATM-SLN

2.4.6 体外释药考察 精密吸取1 mL FATM-SLN溶液,放入透析袋中,再加入5 mL 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4),并置于含44 mL PBS的100 mL广口瓶中,37 °C恒温水浴。分别放置0.5、0.75、1、2、4、8、12 h,按时分别取透析溶液3 mL(取液同时向广口瓶中补加3 mL新鲜介质),过滤后通过测定其中FATM含量,计算累积释放度。结果显示,FATM-SLN在0.5~1 h内释放最快,1 h的累积释放度达到60.47%;8 h后趋于平稳,8 h的累积释放度为93.46%,药物基本释放完全。FATM-SLN的体外释放曲线见图3。

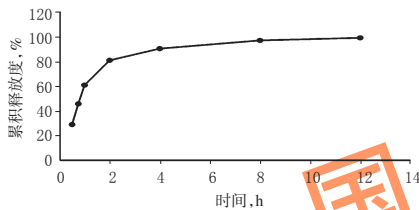


图3 FATM-SLN的体外释放曲线

Fig 3 Release curve of FATM-SLN in vitro

3 讨论

制备纳米粒的材料较多,大致可分为脂质材料和聚合物,前者制成的纳米粒称为固体脂质纳米粒,后者称为聚合物纳米粒。由于大部分聚合物纳米粒在体内降解后有一定的毒性^[14],所以本研究选择具有可控制药物释放、生理相容性及靶向性良好的单硬脂酸甘油酯和乙酸丁酯为复合脂质材料,两者复合使用所得纳米粒粒径小、稳定性高。表面活性剂选用PC、P188、硬脂酸钠,PC为天然乳化剂,属于动物磷脂,具有更好的生物活性和人体利用率;P188为非离子表面活性剂,是常用的供注射用的合成乳化剂;硬脂酸钠为阴离子表面活性剂,具有优良的乳化能力,与非离子表面活性剂联合使用,临界胶束浓度更低、乳化效果更强。复配乳化剂可有效降低纳米粒的粒径、提高稳定性,因此本研究选用PC、P188、硬脂酸钠为复配乳化剂。

FATM-SLN的制备受到许多因素如复合脂质材料的混合比、搅拌时间、匀质压力、超声功率等影响。本研究处方的筛选分为两步,第一步:以单因素试验筛选影响FATM-SLN包封率和粒径的因素;第二步:以包封率为考察指标设计正交试验,进一步优选处方,筛选出

FATM-SLN的最优处方,再进行一系列的质量评价。结果表明,本处方制备的FATM-SLN物理稳定性良好,包封率>70%,为FATM制成的长循环固体脂质纳米粒(FATM-LCN)注射用冻干制剂及为临床提供物理稳定性高、疗效好、副作用小的新型FATM制剂奠定了一定的技术基础。

参考文献

- [1] Tóth ŠJ, Pekárová T, Varga J, *et al*. Intravenous administration of tetramethylpyrazine reduces intestinal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41(4):817-829.
- [2] 田宇光. 川芎嗪与冰片处方配比与组合物的巴布剂基质处方的正交设计优化研究[J]. *生物技术世界*, 2014(2): 109-110, 162.
- [3] 胡静波, 胡晓, 苏卫, 等. 复方阿魏酸钠/天麻素缓释双层片的处方优化[J]. *中国药房*, 2013, 24(23): 2148-2151.
- [4] 杨家荣, 张密霞, 常亮堂, 等. 川芎嗪、阿魏酸及其配伍对心肌缺血再灌注模型大鼠的保护作用及对黏附分子的影响[J]. *中草药*, 2008, 39(7): 1054-1056.
- [5] 谭载友. 一种预防和治疗血栓形成的化合物及其制备方法, 中国: 1274722A[P]. 2000-11-29.
- [6] 谭载友, 江涛, 唐春萍, 等. 阿魏酸川芎嗪的抗血小板聚集作用[J]. *中国新药杂志*, 2003, 12(7): 529-531.
- [7] 赵润英, 郝伟, 孟祥军, 等. 阿魏酸川芎嗪抗血栓形成作用及其对血小板中性粒细胞黏附的影响[J]. *中国医科大学学报*, 2012, 41(10): 900-903, 925.
- [8] 赵润英, 郝伟, 孟祥军, 等. 阿魏酸川芎嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及分子机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(19): 230-234.
- [9] 吕洁, 孟祥军, 邹春阳, 等. 阿魏酸川芎嗪口崩片制备工艺研究[J]. *中国药事*, 2011, 25(4): 339-341.
- [10] 王贤儿, 钟希文, 梅全喜, 等. 固体脂质纳米粒在中药经皮给药中的研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(13): 1860-1862.
- [11] Pan Y, Tikekar RV, Nitin N. Distribution of a model bioactive within solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers influences its loading efficiency and oxidative stability[J]. *Int J Pharm*, 2016, 511(1): 322-330.
- [12] Cacciatore I, Ciulla M, Fornasari E, *et al*. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13(8): 1121-1131.
- [13] 严春临, 张季, 刘敏, 等. 星点设计-效应面法优化吴茱萸次碱固体脂质纳米粒处方[J]. *中草药*, 2015, 46(9): 1307-1313.
- [14] 王瑞华. 他克莫司固体脂质纳米粒制备及理化性质研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.

(收稿日期: 2016-12-15 修回日期: 2017-03-13)

(编辑: 邹丽娟)