

# 正交设计优化盐酸川芎嗪脂质体的制备工艺

杨宜华, 李英璇, 张鑫, 惠康雨, 王婷玉, 刘毅\*

(徐州医学院药学院, 江苏徐州 221004)

**[摘要]** 目的: 优选盐酸川芎嗪脂质体的制备工艺, 为川芎嗪的临床应用提供参考。方法: 采用 HPLC 测定盐酸川芎嗪含量, 流动相甲醇-0.2% 三乙胺水溶液(加冰乙酸调节 pH 5.0)(60:40), 检测波长 295 nm。利用薄膜分散法制备盐酸川芎嗪脂质体, 以包封率为评价指标, 磷脂和胆固醇为膜材, 通过正交试验考察水合时间、胆固醇和磷脂质量比、盐酸川芎嗪和磷脂质量比、磷脂质量分数对制备工艺的影响, 考察脂质体包封率、形态、粒径、稳定性和 Zeta 电位。结果: 最佳制备工艺条件为水合时间 30 min, 胆固醇-磷脂(1:2), 盐酸川芎嗪-磷脂(1:15), 磷脂质量分数 3%; 盐酸川芎嗪脂质体包封率(70.27 ± 0.58)%, 外观接近球形, 粒径(22.9 ± 6.8) nm, Zeta 电位(-29.79 ± 1.24) mV, 于 4 °C 保存 2 周后稳定性良好。结论: 优选的制备工艺合理、稳定, 可促进盐酸川芎嗪的体内吸收并延长其作用时间。

**[关键词]** 盐酸川芎嗪; 脂质体; 薄膜分散法; 粒径分布

**[中图分类号]** R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0020-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014220020

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.0926.001.html>

**[网络出版时间]** 2014-10-10 9:26

## Optimization of Preparation Technology of Ligustrazine Hydrochloride Liposomes by Orthogonal Design

YANG Yi-hua, LI Ying-xuan, ZHANG Xin, HUI Kang-yu, WANG Ting-yu, LIU Yi\*

(School of Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize preparation technology of ligustrazine hydrochloride liposomes which provides a reference for clinical application of ligustrazine. **Method:** Ligustrazine hydrochloride was quantified by HPLC method, mobile phase consisted of methanol-0.2% triethylamine solution (glacial acetic acid adjusted pH to 5.0) (60:40) with detection wavelength of 295 nm. Ligustrazine hydrochloride liposomes were prepared by film dispersion method with phospholipid and cholesterol as raw materials, taking encapsulation efficiency as index, orthogonal design was adopted to optimize preparation process with hydration time, weight ratio of cholesterol to phospholipid, weight ratio of ligustrazine hydrochloride to phospholipid and the concentration of phospholipid as factors. encapsulation efficiency, morphology, particle size, Zeta potential and stability of ligustrazine hydrochloride liposomes were investigated. **Result:** Optimum preparation technology was as follows: hydration time of 30 min, ratio of cholesterol to phospholipid 1:2, ratio of ligustrazine hydrochloride to phospholipid 1:15, the concentration of phospholipid 3%; under these conditions, liposomes were nearly spherical with average encapsulation efficiency of (70.27 ± 0.58)%, particle size of (22.9 ± 6.8) nm and Zeta potential of (-29.79 ± 1.24) mV, they were stable under 4 °C for 2 weeks. **Conclusion:** This optimized preparation technology is rational and stable, which can help to improve absorption and prolong effective time.

**[Key words]** ligustrazine hydrochloride; liposomes; film dispersion method; size distribution

**[收稿日期]** 20140609(013)

**[基金项目]** 徐州市科技计划项目(XZZD1225);江苏省大学生实践创新训练计划项目(2012JSSPITP1869);徐州医学院药学院院长人才基金(2011YKJ005)

**[第一作者]** 杨宜华, 硕士, 讲师, 从事药物新剂型与新制剂, Tel:0516-83262139, E-mail:nancyyh@126.com

**[通讯作者]** \* 刘毅, 博士, 副教授, 从事药物合成及新药开发, Tel:0516-83262137, E-mail:njuliuyi2003@gmail.com

川芎嗪是从川芎中提取的有效成分,为川芎根茎中主要活性生物碱。盐酸川芎嗪化学名称为2,3,5,6-四甲基吡嗪盐酸盐二水物,具有抗血小板聚集、扩张小动脉、改善微循环和活血化瘀的作用,临床用于心绞痛、脑血管及肺动脉高压等呼吸系统疾病的治疗<sup>[1-3]</sup>。脂质体作为一种药物载体,具有生物可降解性及相容性好、低毒、减少药物不良反应及剂量等优点<sup>[4-7]</sup>。目前临床应用的盐酸川芎嗪剂型主要为注射剂和片剂,在血液中消除快而维持有效时间短。本实验拟将盐酸川芎嗪制成脂质体,有助于增加其吸收,延长作用时间,为该药物新制剂的研发提供参考与实验依据。

## 1 材料

85-1型恒温磁力搅拌器(国华电器有限公司),PHS-3C型pH计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂),LC-20AD型高效液相色谱仪(SPD-20A型检测器,日本岛津公司),Tecnai G2 Spirit型透射电镜(美国FEI公司),Nicomp 380 ZLS型粒度分析仪(美国PSS公司)。

大豆磷脂酰胆碱S100(注射级,德国Lipoid公司),胆固醇(美国Sigma公司),盐酸川芎嗪原料药(纯度>98%,上海诺泰化工有限公司),盐酸川芎嗪对照品(含2,3,5,6-四甲基吡嗪盐酸盐83.9%,规格30 mg,批号110817-201006,中国食品药品检定研究院),甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯。

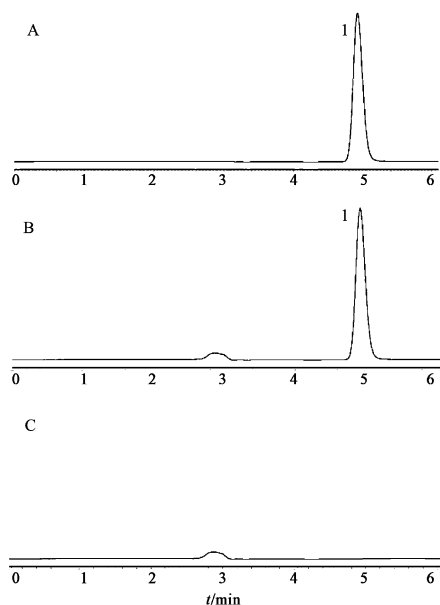
## 2 方法与结果

**2.1 盐酸川芎嗪脂质体的制备** 称取适量磷脂和胆固醇,置于圆底烧瓶中,用二氯甲烷使其充分溶解,于50℃水浴旋转蒸发除去二氯甲烷,在瓶壁上形成均匀类脂薄膜。称取一定量盐酸川芎嗪原料药,加pH 7.4磷酸盐缓冲液(PBS)溶解,倒入上述圆底烧瓶中,超声混匀,置于磁力搅拌器上水合,经0.45 μm微孔滤膜过滤,即得乳白色的脂质体混悬液。

### 2.2 指标成分含量及包封率测定

**2.2.1 色谱条件**<sup>[8]</sup> Hypersil ODS C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相甲醇-0.2%三乙胺水溶液(加冰乙酸调pH 5.0)(60:40),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温室温,检测波长295 nm,进样量20 μL。理论塔板数按盐酸川芎嗪峰计不低于4 717。盐酸川芎嗪对照品和脂质体均于保留时间4.9 min处出峰,而空白脂质体在此处不出峰,见图1。

**2.2.2 标准曲线的建立** 精密称取盐酸川芎嗪对照品20 mg,置于50 mL量瓶中,加甲醇稀释到刻度,得储备液。精密量取该储备液0.1,0.5,1,1.5,



A. 对照品;B. 供试品;C. 空白样品;1. 盐酸川芎嗪

图1 盐酸川芎嗪脂质体HPLC

2 mL,分别置于25 mL量瓶中,用甲醇定容得系列对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件测定,以质量浓度为纵坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.000\ 05X - 1.081\ 7$ ( $r = 0.999\ 6$ ),线性范围1.6~32.0 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.2.3 精密度试验** 取16.0 mg·L<sup>-1</sup>盐酸川芎嗪对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件连续进样5次,计算盐酸川芎嗪含量的RSD 0.17%,表明日内精密度良好。按2.2.1项下色谱条件连续进样5 d,每天在同一时间进样,计算盐酸川芎嗪含量的RSD 0.37%,表明日间精密度良好。

**2.2.4 稳定性试验** 取盐酸川芎嗪脂质体0.5 mL,用甲醇破乳并定容至50 mL,制成供试品溶液,分别于0,2,4,6,8 h按2.2.1项下色谱条件测定,计算峰面积的RSD 0.98%,表明供试品溶液在8 h内稳定性较好。

**2.2.5 加样回收率试验** 分别量取16.0 mg·L<sup>-1</sup>盐酸川芎嗪对照品溶液1,2,3 mL,加入不含盐酸川芎嗪的空白脂质体中,用甲醇破乳并定容至25 mL,按2.2.1项下色谱条件测定,计算回收率( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )分别为(100.30 ± 0.85)%,(100.40 ± 0.80)%,(100.93 ± 0.61)%。

**2.2.6 包封率的测定** 精密移取脂质体2 mL,加甲醇破乳并定容至100 mL,稀释1倍,按2.2.1项下色谱条件测定,计算盐酸川芎嗪质量。精密移取脂质体2 mL置于透析袋内,两端用透析夹夹紧,选

择 pH 7.4 PBS 为透析液,置于磁力搅拌器上搅拌,透析 6 h 达平衡后,将透析袋内溶液完全转移至量瓶中,加入甲醇破乳并定容,按 2.2.1 项下色谱条件测定盐酸川芎嗪含量,计算包封率。

**2.3 制备工艺优化** 在预试验基础上,选择水合时间、胆固醇和磷脂质量比、盐酸川芎嗪和磷脂质量比、磷脂质量分数为考察因素,每个因素选取 3 个水平,精密称取盐酸川芎嗪 20 mg,共 9 份,以包封率为评价指标,采用正交试验优选制备工艺,试验安排及结果见表 1,方差分析见表 2。

表 1 盐酸川芎嗪脂质体制备工艺  $L_9(3^4)$   
正交试验安排及直观分析

No.	A 水合时间 /min	B 胆固醇- 磷脂	C 盐酸川 芎嗪-磷脂	D 磷脂 /%	包封率 /%
1	30	1:2	1:5	1	37.88
2	30	1:4	1:10	2	51.94
3	30	1:6	1:15	3	59.93
4	40	1:2	1:10	3	63.29
5	40	1:4	1:15	1	52.12
6	40	1:6	1:5	2	39.33
7	50	1:2	1:15	2	67.85
8	50	1:4	1:5	3	41.73
9	50	1:6	1:10	1	45.58
$K_1$	49.917	56.340	39.647	45.193	
$K_2$	51.580	48.597	53.603	53.040	
$K_3$	51.720	48.280	59.967	54.983	
R	1.803	8.060	20.320	9.790	

表 2 包封率方差分析

方差来源	SS	F	P
A(误差)	6.038	1.000	
B	128.023	20.706	<0.05
C	648.183	107.351	<0.01
D	161.191	26.696	<0.05

注:  $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

由直观分析可知,各因素对脂质体药物包封率的影响程度为  $C > D > B > A$ 。以极差最小的 A 因素为误差项进行方差分析,结果发现因素 B、D 具有显著性影响,因素 C 则具有极显著性影响,最佳工艺条件为  $A_1B_1C_3D_3$ ,即水合时间 30 min,胆固醇-磷脂(1:2),盐酸川芎嗪-磷脂(1:15),磷脂质量分数 3%。精密称取盐酸川芎嗪 20 mg,据最佳工艺制备 3 批盐酸川芎嗪脂质体,计算包封率(70.27 ± 0.58)%,表明优选的制备工艺稳定可行。

**2.4 脂质体的形态、粒径与电位测定** 取适量盐酸川芎嗪脂质体混悬液,在电镜下观察,结果显示脂质体外观接近球形,形态较为完整,见图 2。利用粒度分析仪测定粒径(22.9 ± 6.8) nm, Zeta 电位(-29.79 ± 1.24) mV,粒径分布见图 3。

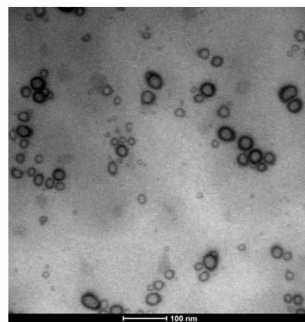


图 2 盐酸川芎嗪脂质体 SEM(×50 000)

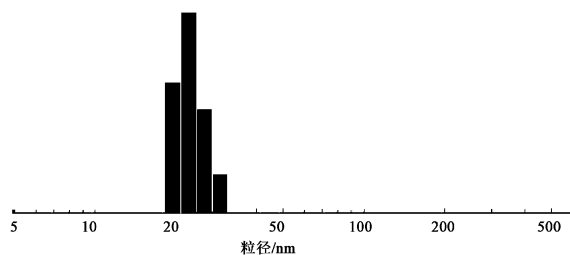


图 3 盐酸川芎嗪脂质体的粒径分布

**2.5 脂质体的物理稳定性** 取按最佳工艺制备的 3 批脂质体,在 4 °C 冰箱放置 2 周,观察无分层、沉淀及破乳现象,粒径基本不变,渗漏率(4.52 ± 0.24)%,表明该制剂稳定性良好。

### 3 讨论

预试验考察了脂质体的制备方法,结果发现逆相蒸发法及乙醇注入法制备的盐酸川芎嗪脂质体的包封率均较薄膜分散法低;硫酸铵梯度法与薄膜分散法制备的盐酸川芎嗪脂质体包封率相近,但后者制备简单,故采用薄膜分散法。

采用 pH 分别为 5.0,6.5,7.0,7.4,8.0 的 PBS 缓冲液作为水合介质制备脂质体,以加热煮沸稳定性考察 pH 的影响,结果显示当 pH 7.4 时,脂质体加热 30 min 仍基本保持不变,而其他 pH 的样品均出现不同程度的絮状沉淀,故选择 pH 7.4 的 PBS 缓冲液,与文献[9]报道磷脂稳定的 pH 6.0 ~ 8.0 一致。磷脂的水解受 pH 的影响,而水解产物可使脂质体混悬液的 pH 下降,加速脂质体的进一步水解。因此,在脂质体的混悬液中加入缓冲液可使脂质体处于最稳定的 pH 范围。

# 正交试验优化麝香中多肽类成分的提取工艺

徐志伟<sup>1</sup>, 才凤<sup>2</sup>, 李洪江<sup>2</sup>, 李双<sup>2</sup>, 解雨婷<sup>3</sup>, 翟廷君<sup>1\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2. 辽宁省药物研究院, 沈阳 110015;  
3. 沈阳药科大学, 沈阳 110016)

**[摘要]** 目的: 优选麝香总多肽的研磨提取工艺, 为麝香的品种鉴定与质量评价提供参考。方法: 采用福林酚法测定麝香总多肽含量。以麝香总多肽含量为指标, 通过正交试验考察提取时间、溶剂种类及用量对提取工艺的影响。结果: 最佳提取工艺为三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(pH 8.0, 0.025 mol·L<sup>-1</sup>), 料液比 1:100, 研磨时间 3 h, 放置过夜; 麝香总多肽平均质量分数达 20.71%, 经冷冻干燥技术处理后麝香总多肽收率 62.4%。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 获得麝香总多肽的提取率较高, 为麝香的品质分析提供实验依据。

**[关键词]** 福林酚法; 麝香; 总多肽; 冷冻干燥法

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; R284.2; R282.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0023-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220023

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20141010.1121.020.html>

**[网络出版时间]** 2014-10-10 10:17

## Optimization of Extraction Process of Polypeptides from Moschus by Orthogonal Design

XU Zhi-wei<sup>1</sup>, CAI Feng<sup>2</sup>, LI Hong-jiang<sup>2</sup>, LI Shuang<sup>2</sup>, XIE Yu-ting<sup>3</sup>, ZHAI Yan-jun<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;  
2. Pharmaceutical Research Institute of Liaoning Province, Shenyang 110015, China;

**[收稿日期]** 20140402(020)

**[基金项目]** 国家教育部博士基金项目(20112133110001); 辽宁省自然科学基金项目(2010010264-401); 沈阳市科委基金项目(F12-277-1-13)

**[第一作者]** 徐志伟, 在读硕士, 从事中药品种鉴定与质量评价研究, Tel:15140635679, E-mail:375390398@qq.com

**[通讯作者]** \* 翟廷君, 教授, 博士生导师, 从事中药品种鉴定与质量评价研究, Tel:0411-85890138, E-mail:lnzyzyj@sohu.com

### [参考文献]

[1] 蒋跃绒, 陈可冀. 川芎嗪的心脑血管药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(5):707.

[2] 杨雪梅. 川芎嗪药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(3):215.

[3] 张国清, 赵江花. 川芎嗪在心血管疾病中的药理作用研究进展[J]. 中国当代医药, 2009, 16(4):142.

[4] Schnyder A, Huwyler J. Drug transport to brain with targeted liposomes[J]. NeuroRX, 2005, 2(1):99.

[5] Oku N, Tokudome Y, Asai T, et al. Evaluation of drug targeting strategies and liposomal trafficking [J]. Curr

Pharm Des, 2000, 6(16):1669.

[6] Venkateswarlu V, Manjunath K. Preparation, characterization and *in vitro* release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles[J]. J Control Release, 2004, 95(3):627.

[7] Allen T M. Liposomal drug formulations: rationale for development and what we can expect for the future[J]. Drugs, 1998, 56(5):747.

[8] 杨宜华, 王萌萌, 董凯, 等. HPLC法测定注射用盐酸川芎嗪的含量[J]. 徐州医学院学报, 2014, 34(5):306.

[9] 张岩. 盐酸青藤碱柔性脂质体的制备及评价[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2008.

[责任编辑 刘德文]