

盐酸川芎嗪在冷冻干燥工艺中的稳定性研究

孙丹丹¹, 王志国¹, 焦玥¹, 王丹巧^{1*}, 王建农^{2*}

1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京市中医药防治重大疾病基础研究重点实验室, 北京 100700

2. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091

摘要: 目的 对盐酸川芎嗪在冻干制备工艺中的稳定性进行考察, 为保障含有该成分的其他冻干粉针剂产品的质量提供依据。方法 采用 HPLC 法测定盐酸川芎嗪的量。色谱条件: 流动相为甲醇-水 (45:55), 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL, 检测波长为 295 nm。检测盐酸川芎嗪在升华干燥 0、12、24、48 h 后的含量变化。结果 盐酸川芎嗪在 10.5~168 μg/mL 内呈良好的线性关系, 回归方程为 $Y=25.837X+10.669$ ($R^2=1$)。此方法检测盐酸川芎嗪在升华干燥 12 h 后含量减少 9%, 24 h 其含量减少 40% 以上, 48 h 几乎完全损失。结论 盐酸川芎嗪在冷冻干燥过程中随时间延长会因升华而使含量损失加重。

关键词: 冷冻干燥; 盐酸川芎嗪; 稳定性; 升华

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)01-0100-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.01.018

Experimental study of change of content of tetramethylpyrazine hydrochloride in process of freeze-drying preparation

SUN Dandan¹, WANG Zhiguo¹, JIAO Yue¹, WANG Danqiao¹, WANG Jiannong²

1. Experimental Research Center, Beijing Key Laboratory of TCM Basic Research on Prevention and Treatment of Major Disease, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

Abstract: Objective To study the stability of tetramethylpyrazine hydrochloride in the process of freeze-drying preparation, and to provide a basis for freeze-drying powder injections which contain tetramethylpyrazine hydrochloride. **Methods** To determinate the content of tetramethylpyrazine hydrochloride by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). It was the chromatographic conditions that mobile phase constitution was methanol-water, and methanol: water = 45:55, flowing rate was 1.0 mL/min; and column temperature was 40 °C, sample volume: 10 μL. Detecting wavelength was set at 295 nm, and the content of tetramethylpyrazine hydrochloride at different sublimation-drying was detected at 0 h, 12 h, 24 h and 48 h. **Results** Tetramethylpyrazine hydrochloride showed good linear relationship between the concentration of 10.5 μg/mL and 168 μg/mL, and the regression equation was $Y=25.837X+10.669$ ($R^2=1$). The content of tetramethylpyrazine hydrochloride reduced respectively 9% and 50% at 12 h and 24 h during the course of sublimation-drying, and almost completely lost at 48 h. **Conclusion** The content of tetramethylpyrazine hydrochloride lost more with the extension of the course of freeze-drying process.

Key words: freeze drying; TMP hydrochloride; stability; sublimation

川芎嗪是从川芎中提取的重要活性物质, 具有广泛的药理作用, 常用于治疗心脑血管疾病、呼吸系统疾病、泌尿系统疾病、肝硬化、肿瘤等疾病。川芎嗪难溶于水, 故常将其制成磷酸盐和盐酸盐,

并采用冷冻干燥技术制成冻干粉针剂, 以改善其成型性、水溶性及稳定性^[1], 便于临床应用。

本课题组自拟的活血行气、祛风除湿、通络止痛的 CQ 复方冻干粉针 (简称 CQ 复方) 其主要成

收稿日期: 2017-02-13

基金项目: 国家科技部国际科技合作专项 (2010DFA31890); 中国中医科学院自主选题研究项目 (ZZ2013003)

第一作者: 孙丹丹 (1990—), 女, 研究生, 研究方向为中药药理。E-mail: sdd900827@163.com

*通信作者: 王丹巧, 女, 医学博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药药理、中西医结合老年医学基础研究。E-mail: dq_wang96@sohu.com;

王建农, 男, 医学博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药活性成分研究。E-mail: wangjiannong2008@sina.com

分之一为川芎嗪。前期研究工作表明,该复方对于多种神经源性疼痛、骨癌痛及癌侵袭痛、镜像痛等动物模型有良好的镇痛作用^[2-5]。在该方冻干粉针研制过程中,发现盐酸川芎嗪含量减少较为明显,不能保证其在最终制剂中的质量。已知盐酸川芎嗪在冻干过程中易升华,但其含量如何随冻干时间发生变化,变化的程度如何,均尚缺少详细的数据。因此,本文对盐酸川芎嗪在冷冻干燥过程中的稳定性,即其含量随时间发生的变化及程度进行考察和研究。

1 材料

1.1 主要试剂

盐酸川芎嗪对照品(中国食品药品检定研究院,质量分数为 83.9%,批号 110817);盐酸川芎嗪原料药(北京市燕京药业有限公司,批号 120607);甲醇(Fisher Chemicals,批号 070011)。

1.2 主要仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Agilent G 1314B 可变波长 UV-检测器(美国 Agilent 公司),冻干机(ALPHA 2-4 LSC 型,德国 Marin Christ 公司),分析天平(BSA423s-cw,德国赛多利斯),西林瓶(棕色 15 mL 规格,沧州海康药用包装有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(45:55),体积流量为 1.0 mL/min,色谱柱温度为 25℃,进样量 10 μL,检测波长为 295 nm。

2.2 标准曲线

精密称取盐酸川芎嗪对照品 4 mg,置于 10 mL 量瓶中,用超纯水溶解并稀释至刻度,摇匀配制成浓度为 336 μg/mL 的溶液,梯度稀释为 168、84、42、21、10.5 μg/mL 不同浓度的溶液。取上述制备的不同浓度对照品,进样 10 μL,以样品质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标作线性回归,结果表明盐酸川芎嗪对照品溶液的质量浓度在 10.5~168 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系,线性回归程为 $Y=25.837 X+10.669$ ($R^2=1$)。

2.3 CQ 复方冻干粉针剂的制备工艺及含量测定

2.3.1 处方 CQ 复方中的主要成分之一为盐酸川芎嗪,其他成分及剂量由于涉及保密予以回避。根据实验用的剂量对 CQ 复方各成分进行称量,超纯水溶解,其中盐酸川芎嗪的质量浓度为 40 mg/mL。

经初步尝试,未加辅料的 CQ 复方冻干粉针剂质地疏松,加水后迅速溶解,因此确定该复方冻干粉针不添加辅料。

2.3.2 除热原和除菌 采用 0.05%活性炭,常温搅拌吸附 30 min,0.45 μm 膜过滤,进行吸附杂质、脱色和除热原。进一步无菌条件下使用 0.22 μm 过滤除菌。

2.3.3 低共熔点的测定 采用电阻法测量 CQ 复方的低共熔点。溶液的电阻取决于其浓度和温度,在冷冻时,样品的电阻明显上升直至完全冷冻;反之,在对其加热时,电阻明显下降。根据温度/电阻曲线的交点可确定共熔点。本文利用 Lyo control LC-1 成套共熔点测试系统,由 LyoLog LL-1 软件记录电阻变化与温度变化,采用降温 and 升温法测定的共熔点范围在 -20~-15℃,测量曲线见图 1。

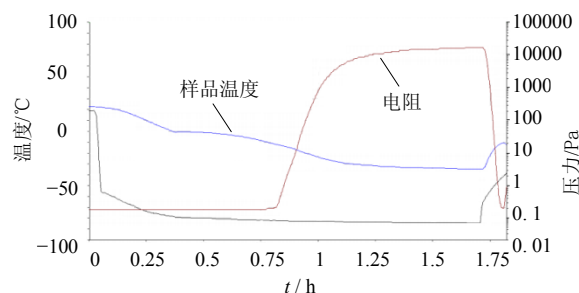


图 1 CQ 复方低共熔点的测定曲线

Fig. 1 Determination curve of eutectic point of CQ compound

2.3.4 灌装体积的确定 进行冷冻干燥的药液装量要符合一定的要求(厚度一般为 10~15 mm),若药液装量过厚,会使干燥的过程中传热效果变差,不利于除去制品中的水分,导致制品中水分含量过高^[6]。结合剂量要求,最后确定灌装体积为 6 mL(选用西林瓶的规格为 15 mL)。

2.3.5 冷冻干燥条件 一般预冻温度应低于共熔点 10℃左右,根据测定的共熔点,CQ 复方的预冻温度应设在 -30℃,考虑导热油和制品温度有一定出入,故设置导热油的温度为 -45℃,具体冷冻干燥条件见表 1。

表 1 CQ 复方冻干粉针的冷冻干燥条件

Table 1 Freeze-drying condition of CQ compound

项目	导热油温度/℃	时间/h	真空度/Pa
预冻	-45	4	
升华干燥	-25	20	13
	0	12	15
解析干燥	25	12	25

2.3.6 CQ 复方冻干粉针剂的制备及成分含量的测定 CQ 复方冻干粉针剂的制备工艺初步定为：称量原料药、超纯水溶解配液、0.05%活性炭常温吸附 30 min 除热原、0.22 μm 膜过滤除菌、灌装 6 mL、半加塞、冷冻干燥（条件见表 1）、压塞、轧盖。按上述制备工艺在中试车间内完成 CQ 复方冻干粉针，具体冻干曲线见图 2。

抽取 CQ 复方冻干粉针剂 4 瓶，加入 10 mL 超纯水溶解后，然后稀释 100 倍，采用 HPLC 法对 CQ 复方成分进行含量测定，发现冻干粉针剂中盐酸川芎嗪的含量约为投料量的 80%，有约 20% 的损失，结果见表 2。而其他成分含量无损失。

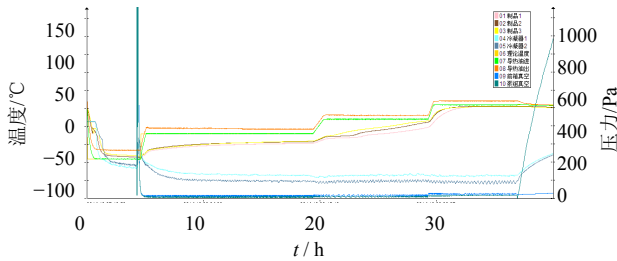


图 2 CQ 复方冻干粉针的冻干曲线

Fig. 2 Freeze-drying curve of CQ compound

表 2 CQ 复方冻干粉针中盐酸川芎嗪的含量

Table 2 Content of tetramethylpyrazine hydrochloride in CQ compound lyophilized powder

序号	盐酸川芎嗪/mg	投料量/mg	剩余率/%
1	200.58	240	83.58
2	192.42	240	80.18
3	183.84	240	76.60
4	192.89	240	80.37
均值	192.43	240	80.18

2.4 盐酸川芎嗪冻干供试品的制备及含量的测定

称量盐酸川芎嗪 20 g，加入超纯水溶解，配制质量浓度为 40 mg/mL 溶液 500 mL，按 CQ 复方冻干粉针剂的制备工艺除热原除菌后分装于西林瓶中，每瓶 6 mL，分为 4 批，每批 20 瓶，批号为 20150212-0、20150212-12、20150212-24、20150212-48。因实验室 Christ ALPHA 2-4 LSC 型冻干机功能限制，故预冻在 -80℃ 冰箱进行，升华干燥的条件设置为：温度为 -25℃，真空度为 18.0 Pa，4 个批次的样品升华干燥的时间分别为 0、12、24、48 h。由于实验室冻干机的板层无制冷功能，升华干燥的实际温度变化见图 3，真空下样品温度在

-25℃ 以下的时间仅约为 1.5 h，其后缓慢升温，最后维持在 2℃ 左右。

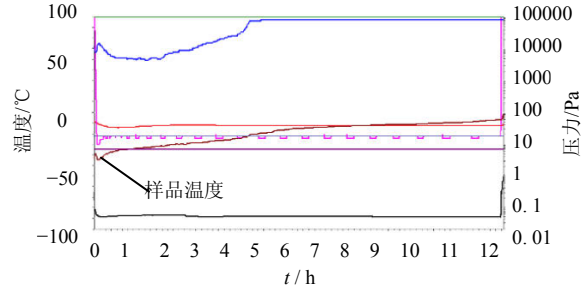


图 3 盐酸川芎嗪的冻干曲线

Fig. 3 Freeze-drying curve of tetramethylpyrazine hydrochloride

取上述 4 批盐酸川芎嗪冻干供试品各 5 瓶（其中 20150212-0 批次为 3 瓶），加入 10 mL 超纯水溶解，然后稀释 100 倍，其中 20150212-48 批次的样品不作稀释，采用 HPLC 法检测盐酸川芎嗪的含量。检测结果表示为 $\bar{x} \pm s$ ，应用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析，多组间比较用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，方差齐者用 LSD 检验，方差不齐者用 Games-Howell 检验。结果表明，在该冷冻干燥的条件下，盐酸川芎嗪含量随升华干燥时间的延长而减少，升华干燥 12 h 后盐酸川芎嗪含量较未冻干溶液减少了 9%，24 h 后其含量减少 40% 以上，而 48 h 后几乎完全损失，均有统计学意义，见表 3。

表 3 盐酸川芎嗪冻干供试品的含量

Table 3 Content of tetramethylpyrazine hydrochloride lyophilized powder

批号	n	盐酸川芎嗪/mg	剩余率/%
20150212-0	3	189.96±4.48	100.00
20150212-12	5	172.91±13.51*	91.03
20150212-24	5	111.28±14.27***	58.58
20150212-48	5	0.0016±0.00***	0.0008

与 20150212-0 比较: *P<0.05, ***P<0.001

*P<0.05, ***P<0.001 vs 20150212-0 group

3 讨论

本实验在未添加辅料的 CQ 复方冻干粉针研制过程中，发现其成分之一的盐酸川芎嗪的量减少了约 20%。进一步的考察结果显示了盐酸川芎嗪在冷冻干燥过程中随时间延长含量逐渐减少的过程，升华干燥至 12 h 盐酸川芎嗪的量较未冻干溶液减少了 9%，至 24 h 其含量减少 40% 以上，而 48 h 几乎完全损失。

研究表明,川芎嗪盐酸盐的熔点为 91 °C,易升华;磷酸盐的熔点为 173~177 °C,相对不易升华^[1]。但其分别以乳糖和甘露醇为骨架剂,对磷酸川芎嗪溶液升华干燥 25 h 后(-20 °C 升华 10 h, 0 °C 升华 5 h, 10 °C 升华 5 h, 25 °C 再干燥 5 h),磷酸川芎嗪的量分别为原来的 71.6%和 79.8%,提示川芎嗪磷酸盐的升华现象也较明显^[7]。而另外的文献报道,采用甘露醇作为冻干填充剂,在注射用天麻川芎嗪和注射用丹参川芎嗪的制备中,盐酸川芎嗪含量的变化不甚明显^[8]。因此,川芎嗪的盐酸盐和磷酸盐含量在冻干过程中的稳定性问题均尚缺乏一致性结果。尽管如此,为减少川芎嗪升华引起的含量变化,添加填充剂或骨架剂是目前通常采用的重要方法。然而,也有不需要添加填充剂或骨架剂的盐酸川芎嗪复方冻干制剂(如本课题组自拟 CQ 复方冻干粉针剂)。无论上述哪种情况,其冻干制剂制备时,如何根据盐酸川芎嗪易升华的特性,制定工艺流程,决定配方中川芎嗪的投料量,目前尚缺乏可参考的数据。

本文针对盐酸川芎嗪在冷冻干燥过程中其含量随时间发生变化的过程及程度进行了考察,补充了盐酸川芎嗪冻干稳定性研究的具体数据,提示在含

有盐酸川芎嗪的复方冻干粉针剂制备过程中,应考虑其升华损失导致的含量变化。该研究对含有盐酸川芎嗪的冻干粉针剂质量保障具有参考意义。

参考文献

- [1] 周昌奎, 吴晓华. 川芎嗪临床应用及研究进展 [J]. 海峡药学, 2004, 16(6): 3-5.
- [2] 李 鹏, 张美玉, 王丹巧, 等. 青藤碱对 SSNI 模型大鼠镇痛效应及脑内兴奋性氨基酸递质的影响 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(10): 1365-1369.
- [3] 王 晔, 王丹巧, 崔 悦, 等. CQM 对三叉神经痛模型大鼠的镇痛效应及其对脑内兴奋性氨基酸递质的影响 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3554-3559.
- [4] 张 莹. CQ 复方对胫骨转移性癌痛模型大鼠的镇痛作用及机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.
- [5] 孙丹丹. CQ 复方对癌侵袭镜像痛模型小鼠的镇痛作用及机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2015.
- [6] 董 亮, 翟 雷, 赵祖南. 冻干曲线程序的设定以及对产品质量的影响 [J]. 甘肃科技纵横, 2010, 39(6): 54-55.
- [7] 吴 艳. 磷酸川芎嗪冻干粉针的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2006.
- [8] 梁纪军. 注射用天麻川芎嗪的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.