

川芎嗪双羟萘酸盐缓释纳米混悬剂的制备及体外释放研究

卓虹伊^{1,2}, 陈 梁¹, 王春蕊³, 周 洁³, 赵 誉³, 李 维², 李寒梅^{3*}, 邹 亮^{2,4*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 成都大学医学院, 四川 成都 610106

3. 成都大学药学与生物工程学院, 四川 成都 610106

4. 成都大学农业农村部杂粮加工重点实验室, 四川 成都 610106

摘要: 目的 制备川芎嗪(Lig)双羟萘酸盐(Lig-PAM)缓释纳米混悬剂(Lig-PAM-NSps), 并考察其体外释放特性。方法 采用难溶性盐技术制备 Lig-PAM, 并对其理化性质进行表征。采用微型介质研磨法制备 Lig-PAM-NSps, 以平均粒径、多分散指数(PDI)、稳定系数(SI)为评价指标综合加权评分, 通过单因素和正交试验优化处方工艺参数, 对制备的 Lig-PAM-NSps 进行表征, 并考察其稳定性及体外药物释放情况。结果 Lig 与 PAM 以物质的量为 1:1 制备的 Lig-PAM 复合率为(97.48±0.04)%, 与 Lig 相比, Lig-PAM 在水和模拟体液中的溶解度分别降低了 95.50%和 77.39%; 傅里叶红外光谱(FT-IR)和 X 射线粉末衍射(XRD)表明 Lig 与 PAM 形成了 Lig-PAM。经正交试验优化后, 按最佳处方工艺制得 Lig-PAM-NSps 的平均粒径为(585±5) nm, PDI 为 0.328±0.015, SI 为 0.928±0.012; 扫描电镜显示 Lig-PAM-NSps 呈大小分布均一的圆球形, 粒径在 600 nm 左右, 且在 60 d 内物理稳定; 体外释放结果表明 48 h 内 Lig-PAM-NSps 与 Lig 溶液相比具有明显的缓释作用, 并呈现一级释药特征 [$\ln(1-Q)=0.153\ 67\ t+80.458\ 14$, $r=0.998\ 26$]。结论 Lig-PAM-NSps 制备工艺稳定, 在体外可缓慢释放 Lig。

关键词: 川芎嗪; 双羟萘酸; 难溶性盐; 纳米混悬剂; 缓释; 体外释放特性; 微型介质研磨法; 正交试验

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)03-0616-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.03.010

Preparation and *in vitro* release study of ligustrazine pamoate sustained-release nanosuspension

ZHUO Hong-yi^{1,2}, CHEN Liang¹, WANG Chun-rui³, ZHOU Jie³, ZHAO Yu³, LI Wei², LI Han-mei³, ZOU Liang^{2,4}

1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. College of Medical, Chengdu University, Chengdu 610106, China

3. College of Pharmacy and Biological Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China

4. Key Laboratory of Coarse Cereal Processing of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu University, Chengdu 610106, China

Abstract: Objective To prepare ligustrazine pamoate (Lig-PAM) sustained-release nanosuspension (Lig-PAM-NSps) and determine its *in vitro* release characteristics. **Methods** Lig-PAM was prepared by hydrophobic salt formation method and its physicochemical properties were characterized. Then, Lig-PAM-NSps was prepared by miniaturized medium grinding method. The prescription and preparation process of Lig-PAM-NSps were optimized by the single factor and orthogonal experiment with average particle size, polydispersity index (PDI) and stability coefficient (SI) as indicators. Lig-PAM-NSps was characterized, and its stability and *in vitro* release was also investigated. **Results** The compound ratio of Lig-PAM prepared by Lig and PAM in the amount of 1:1 was (97.48 ± 0.04)%. Compared with Lig, the solubilities of Lig-PAM in water and simulated body fluids were decreased by 95.50% and 77.39%, respectively. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray powder diffraction (XRD) showed that

收稿日期: 2019-08-31

基金项目: 四川省科技厅应用基础研究(2019YJ0661); 四川省科技创新苗子工程(2019061); 四川省教育厅高校科研创新团队项目(17TD0010)

作者简介: 卓虹伊, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。E-mail: 1215035595@qq.com

*通信作者 李寒梅, 研究员, 研究方向为注射用缓控释给药系统和具有生物响应性的智能释药系统研究。E-mail: lihanmei@cdu.edu.cn

邹 亮, 教授, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术研究。E-mail: zouliangcdu@126.com

the Lig and PAM formed Lig-PAM. The optimum prescription size of Lig-PAM-NSps was (585 ± 5) nm, PDI was (0.328 ± 0.015) and SI was (0.928 ± 0.012) . The scanning electron microscopy (SEM) showed that Lig-PAM-NSps was spherical with uniform size distribution, and the particle size was about 600 nm and its physical stability was good within 60 d. The results of *in vitro* release showed that Lig-PAM-NSps had obvious sustained-release effect compared with Lig solution within 48 h, and showed the first-order release characteristics [$\ln(1-Q) = 0.153\ 67\ t + 80.458\ 14$, $r = 0.998\ 26$]. **Conclusion** The preparation progress of Lig-PAM-NSps is stable and can release Lig slowly *in vitro*.

Key words: ligustrazine; pamoate; insoluble salt; nanosuspension; sustained release; *in vitro* release characteristics; miniaturized medium grinding method; orthogonal experiment

川芎嗪 (ligustrazine, Lig) 是从伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎中分离提纯的生物碱单体, 具有扩张血管、抑制血小板聚集、防止血栓形成等多种生理活性, 临床应用广泛^[1-3]。然而, Lig 在体内半衰期短, 代谢快, 生物利用度低, 需频繁给药, 患者顺应性差^[4]。近年来, 众多研究者通过对 Lig 进行化学结构修饰以改善其生物利用度, 延长其体内作用时间^[5-6]。但是, 化学结构修饰过程复杂耗时, 且可能影响 Lig 的药效并存在潜在的毒副作用。难溶性盐技术是将药物与疏水性的酸或碱形成水难溶性的盐, 以提高药物在体内的滞留时间, 实现药物缓释^[7-8]。双羟萘酸 (pamoate, pamoic acid, PAM) 是一种常见的用于制备难溶性盐的疏水有机酸, 目前, 许多以 PAM 为疏水有机酸, 采用难溶性盐技术制备的缓释制剂已经获得美国 FDA 批准上市, 如注射用双羟萘酸曲普瑞林、帕瑞肽双羟萘酸盐长效注射剂等^[9-10]。因此, 本实验拟采用难溶性盐技术制备川芎嗪双羟萘酸盐 (Lig-PAM), 通过降低 Lig 的溶解度达到缓释的目的。

纳米混悬剂 (nanosuspension, NSps) 是由药物粒子与少量稳定剂组成的亚微胶体分散体系^[11], 近年来广泛用于长效制剂的开发^[12-14], 与脂质体、微球、纳米粒等体系不同, 纳米混悬剂不借助载体材料, 无需将药物溶解至辅料中, 给药过程不受包封率的影响, 具有载药量高^[15-17], 剂量控制准确, 制备工艺简单, 适于规模化大生产等优点^[18]。本实验采用微型介质研磨法^[19]制备 Lig-PAM 缓释纳米混悬剂 (Lig-PAM-NSps), 以小型西林瓶为研磨腔体, 选用氧化锆珠为研磨介质, 依靠药物与介质、瓶壁以及药物与药物之间的相互撞击力将微米级药物破碎成纳米级药物^[20-21]。

本实验首先采用难溶性盐技术制备水难溶性的 Lig-PAM, 考察其溶解特性, 并通过傅里叶红外光谱 (FT-IR)、X 射线粉末衍射 (XRD) 对其结构进

行初步评价。然后, 采用微型介质研磨法制备 Lig-PAM-NSps, 通过单因素和正交试验进行处方优化, 考察 Lig-PAM-NSps 的粒径、多分散指数 (PDI) 以及稳定系数 (SI), 利用扫描电镜 (SEM) 观察其形貌, 并考察其体外释放行为。

1 仪器与材料

Nicolet IS10 FT-IR 光谱仪, 美国尼高力仪器公司; D8 ADVANCE X 射线粉末衍射仪, 德国布鲁克公司; SU8020 场发射扫描电子显微镜, 日本日立公司; Agilent 1100 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; ZEN3600 纳米粒度仪, 英国马尔文公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 常州澳华仪器有限公司; RE-2000B 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SHB-III 循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; BCJ-07A3 磁力搅拌器, 上海一恒仪器有限公司; TGL-16C 高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; FE20 pH 计, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司。

川芎嗪, 质量分数 $\geq 99\%$, 萨恩化学技术 (上海) 有限公司, 批号 EH230112; 双羟萘酸 (帕莫酸), 质量分数 $\geq 98\%$, 北京百灵威科技有限公司, 批号 LB20P16; 羟丙基甲基纤维素 (HPMC)、聚维酮 (PVP) K30 均购于湖北葛店人福药用辅料有限责任公司; 波洛沙姆 188 (P188) 购于德国巴斯夫公司; 分析纯聚山梨酯 80 (Tween 80, T80)、甲醇、乙醇、乙腈均购于成都科隆化学品有限公司; 色谱纯甲醇购于美国 Sigma-Aldrich 公司。

2 方法与结果

2.1 Lig 含量分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-水 (60:40); 检测波长 280 nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L; 体积流量 1.0 mL/min, 理论塔板数按 Lig 峰计算不低于 2 000。色谱图见图 1。

2.1.2 线性关系考察 精密称取 Lig 对照品约 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶液溶解后定容,

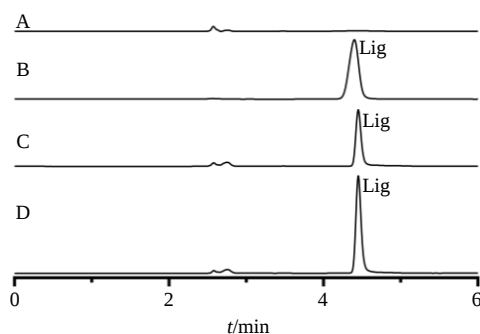


图 1 空白溶剂 (A)、Lig 对照品 (B)、Lig-PAM 样品 (C) 和 Lig-PAM-NSps 样品 (D) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank solvent (A), Lig reference substance (B), Lig-PAM sample (C), and Lig-PAM-NSps sample (D)

配制质量浓度约为 1.0 mg/mL 的 Lig 对照品储备液, 以 Lig 对照品储备液用甲醇稀释为质量浓度分别为 3.9、7.8、15.6、31.2、62.4、124.8 $\mu\text{g/mL}$ 的 Lig 对照品溶液, 注入液相色谱仪, 测定不同质量浓度 (C) Lig 的峰面积 (A), 并线性拟合, 得出拟合方程为 $A=24.627 C+10.087$, $r=1.000 0$, 表明 Lig 在 3.9~124.8 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.1.3 供试品溶液的配制 精密量取 Lig-PAM-NSps 溶液 1 mL 至 50 mL 量瓶中, 甲醇溶解定容得供试品溶液, 0.22 μm 滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.1.4 精密度考察 分别取低 (3.9 $\mu\text{g/mL}$)、中 (15.6 $\mu\text{g/mL}$)、高 (62.4 $\mu\text{g/mL}$) 质量浓度的 Lig 对照品溶液, 分别于 1 d 内连续进样 6 次, 计算各质量浓度的 RSD 值, 考察日内精密度。结果显示低、中、高 3 种质量浓度 Lig 对照品溶液峰面积 RSD 值分别为 0.69%、0.22%、0.13%。每个质量浓度样品于 3 d 内连续测定, 考察日间精密度, 结果显示 3 种质量浓度对照品溶液峰面积 RSD 值均小于 0.96%, 符合测定要求。

2.1.5 稳定性考察 取“2.1.3”项下供试品溶液 6 份, 均分别于 0、1、2、3 d 注入液相色谱仪, 记录峰面积计算含量。结果显示 RSD 值为 1.1%, 表明供试品溶液在 3 d 内稳定性良好。

2.1.6 加样回收率考察 取 Lig 含量已知的 Lig-PAM-NSps 溶液 1 mL, 分别精密加入低 (3.9 $\mu\text{g/mL}$)、中 (15.6 $\mu\text{g/mL}$)、高 (62.4 $\mu\text{g/mL}$) 质量浓度的 Lig 对照品溶液, 按“2.1.3”项下方法处理, 注入液相色谱仪测定 Lig 含量, 计算回收率, 结果分别为 (102.28 $\pm$ 0.31)%、(99.02 $\pm$ 0.22)%、(99.57 $\pm$ 0.11)%, RSD 分别为 0.30%、0.23%、0.25%, 说明方法回收率良好。

2.1.7 重复性考察 按照“2.1.3”项下方法操作, 平行处理 6 份样品, 注入液相色谱仪测定峰面积, 计算 RSD 值。结果显示 RSD 值为 0.36%, 说明方法重复性良好。

2.1.8 定量限和检测限 取 Lig 对照品溶液, 逐步稀释, HPLC 测定各质量浓度对应信噪比 (S/N)。以 S/N=10 为定量限, 以 S/N=3 为检测限。结果显示, 定量限为 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 检测限为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2 Lig-PAM 的制备

前期预试验中, 对 Lig 和 PAM 反应物质的量比、反应温度、反应溶剂等因素进行了初步考察, 除反应物质的量比外, 其他各因素条件下复合率无显著性差异, 同时, 结合参考文献报道^[22], 确定 Lig-PAM 的制备方法为分别取 0.550 3 g Lig 和 1.585 2 g PAM (物质的量比为 1:1), 加入 200 mL 四氢呋喃, 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下磁力搅拌, 待溶液澄清后, 旋转蒸发除尽有机溶剂, 收集瓶壁黄色固体粉末, 得 Lig-PAM, 阴凉避光保存。

2.3 Lig-PAM 的复合率及溶解性测定

2.3.1 复合率的测定 Lig-PAM 以离子键结合, 当其在溶液中时, Lig 和 PAM 便会解离, 且解离无需条件^[23]。本实验对甲醇、乙醇、乙腈 3 种解离溶剂进行考察, 分别精密称取 Lig-PAM 10 mg, 加入解离溶剂定容至 10 mL, HPLC 进行含量测定 (以 Lig 计), 平行实验 3 次, 结果 Lig-PAM 在甲醇、乙醇、乙腈中的解离度分别为 (105.78 $\pm$ 0.39)%、(106.24 $\pm$ 4.40)%、(87.41 $\pm$ 2.91)% ($n=3$), 甲醇、乙醇为解离溶剂时, 药物解离完全, 考虑到乙醇价廉易得且毒副作用相对较小, 确定乙醇为解离溶剂。

以乙醇为解离溶剂, 对 Lig-PAM 复合率进行考察。精密称取 Lig-PAM 10 mg, 加入蒸馏水定容至 10 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液注入液相色谱仪测定 Lig 含量; 另精密称取 Lig-PAM 10 mg, 加入乙醇定容至 10 mL, 同法操作。平行实验 3 次, 计算复合率为 (97.48 $\pm$ 0.04)%。

解离度 = 解离溶液中 Lig 含量 / Lig-PAM 中 Lig 含量

复合率 = 1 - 蒸馏水中 Lig 含量 / 解离溶液中 Lig 含量

2.3.2 平衡溶解度的测定 分别取过量 Lig、Lig-PAM 于离心管中, 加入适量蒸馏水及磷酸缓冲盐溶液 (PBS, pH 5.0、7.4、9.0), 于 37.0 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中, 100 r/min 恒温震荡 24 h, 取出, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液过 0.22 μm 滤膜, 滤液稀释后

入液相色谱仪测定含量, 计算 Lig 和 Lig-PAM 在不同溶液中的平衡溶解度 (以 Lig 计算)。结果如表 1, 与 Lig 相比, Lig-PAM 在蒸馏水中的溶解度降低了 95.50%, 在模拟体液中溶解度降低了 77.39%, 有望在体内获得良好的缓释效果。

2.4 Lig-PAM 的结构表征

2.4.1 红外光谱 (FTIR) 分别取 Lig、PAM、Lig 和 PAM 物理混合物及 Lig-PAM 适量, 与溴化钾混匀压片后于样品台, $400\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$ 扫描, 进行 FTIR 分析, 结果如图 2 所示。Lig-PAM 红外图谱中分别在 $1\,508$ 、 $2\,457$ 、 $2\,969\text{ cm}^{-1}$ 处出现羧酸盐羰基的振动峰, 胺盐的伸缩振动峰以及甲基的不对称伸缩振动峰, 说明 Lig 与 PAM 形成了 Lig-PAM。

2.4.2 X-射线衍射 (XRD) XRD 条件: Cu 靶辐射, 2θ 角范围 $10^\circ\sim90^\circ$; 扫描速率 $6^\circ/\text{min}$, 扫描步长 0.02° 。分别取适量 Lig、PAM、Lig 和 PAM 物理混合物以及 Lig-PAM, 玻璃板压平后检测。结果如图 3 所示, Lig 的特征衍射峰 2θ 分别为 10.11° 、 15.28° 、 21.14° 、 27.40° 、 29.04° 、 29.70° , PAM 的

表 1 Lig、Lig-PAM 在不同溶剂中的平衡溶解度 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

溶解介质	平衡溶解度/($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	Lig	Lig-PAM
蒸馏水	4.430 ± 0.230	0.199 ± 0.039
PBS (pH 5.0)	3.275 ± 0.041	0.143 ± 0.005
PBS (pH 7.4)	3.127 ± 0.103	0.707 ± 0.143
PBS (pH 9.0)	—	0.921 ± 0.083

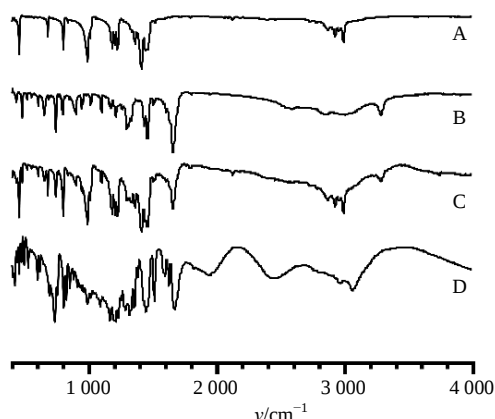


图 2 Lig (A)、PAM (B)、Lig 和 PAM 物理混合物 (C) 及 Lig-PAM (D) 的 FTIR 图

Fig. 2 FTIR spectra of Lig (A), PAM (B), physical mixture of Lig and PAM (C), and Lig-PAM (D)

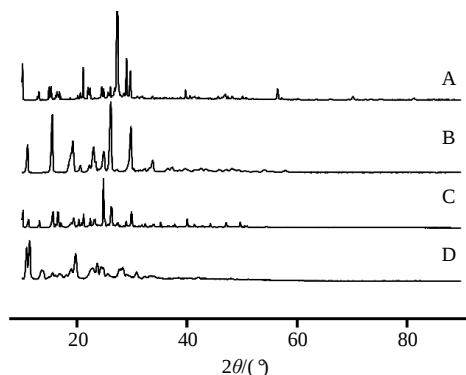


图 3 Lig (A)、PAM (B)、Lig 和 PAM 物理混合物 (C) 及 Lig-PAM (D) 的 XRD 图

Fig. 3 XRD spectra of Lig (A), PAM (B), physical mixture of Lig and PAM (C), and Lig-PAM (D)

特征衍射峰 2θ 分别为 11.01° 、 15.51° 、 19.25° 、 23.03° 、 24.87° 、 26.13° 、 29.80° ; Lig 和 PAM 衍射峰峰形尖锐, 峰强度大, 晶型完整。物理混合物特征峰 2θ 分别为 10.19° 、 11.20° 、 15.69° 、 19.06° 、 21.16° 、 23.23° 、 24.83° 、 26.29° 、 29.89° , 与 Lig 和 PAM 基本一致。Lig-PAM 特征峰 2θ 分别为 11.40° 、 13.58° 、 18.98° 、 19.76° 、 22.41° 、 22.80° 、 23.70° 、 28.30° ; 未观察到 Lig 和 PAM 的特征衍射峰, 同时, 特征峰钝化, 强度降低, 说明 Lig-PAM 结晶度降低, 但仍以晶体形式存在。

2.5 Lig-PAM-NSps 的制备

采用微型介质研磨法制备 Lig-PAM-NSps。取适量直径为 $0.4\sim0.6\text{ mm}$ 的氧化锆珠, 置于 10 mL 西林瓶中, 加入适量 Lig-PAM 和稳定剂溶液, 于磁力搅拌器一定转速搅拌研磨数小时, 即得。

2.5.1 Lig-PAM-NSps 粒径与多分散指数 (PDI) 的测定 取适量 Lig-PAM-NSps, 加蒸馏水稀释, 采用纳米粒度仪测定粒径和 PDI, 重复测定 3 次, 取平均值。

2.5.2 Lig-PAM-NSps 稳定系数 (SI) 的测定^[24] 取适量 Lig-PAM-NSps 于离心管中, $1\,500\text{ r/min}$ 离心 30 min , 取上层混悬液适量, 蒸馏水稀释, 纳米粒度仪测定粒径, 重复测定 3 次, 取平均值。

$\text{SI} = \text{离心后平均粒径} / \text{离心前平均粒径}$

2.6 Lig-PAM-NSps 处方工艺优化

以平均粒径、PDI 和 SI 为指标, 分别对稳定剂种类、复配稳定剂比例、药物与稳定剂比例、氧化锆珠用量、搅拌转速、搅拌时间 6 个因素进行考察。

2.6.1 稳定剂种类 在参考文献报道^[25-26]及前期预试验基础上, 固定稳定剂用量为 1% ^[27], 药物与稳

定剂比例为 4:1, 氧化锆珠用量为 3.0 mL, 搅拌转速 800 r/min, 搅拌时间 1.0 h。以平均粒径、PDI 和 SI 为指标, 对 HPMC、PVP K30、P188、T80 4 种稳定剂进行考察。结果如表 2, 不同稳定剂制备的 Lig-PAM-NSps 粒径和 SI 值差别较大, 与以 P188 和 T80 为稳定剂相比, HPMC 和 PVP K30 为稳定剂时, 平均粒径较小且 SI 值较大, 考虑到稳定剂的复配可增加混悬剂的稳定性^[28-29], 因此, 继续考察 HPMC 和 PVP K30 2 种稳定剂以不同比例复配时平均粒径、PDI 和 SI 的变化。结果如表 3, 当 HPMC 与 PVP K30 比例为 1:4 时, 平均粒径为 (721±40) nm, PDI 为 0.413±0.042, SI 值为 0.930±0.067, 综合指标较优, 因此, 初步确定稳定剂用量为 1%, HPMC 与 PVP K30 比例为 1:4, 进一步对其他因素进行考察。

2.6.2 药物与稳定剂比例考察 固定稳定剂用量为 1%, HPMC 与 PVP K30 比例为 1:4, 氧化锆珠用量为 3.0 mL, 搅拌转速 800 r/min, 搅拌时间 1.0 h, 考察药物与稳定剂不同比例时平均粒径、PDI 和 SI 的变化, 结果如表 4 所示, 随着稳定剂用量的增加, Lig-PAM-NSps 平均粒径先减小后增加, SI 稳定系数先增加后减小, 分析原因可能是当稳定剂用量较小时, 药物颗粒周围不能分布足够的稳定剂, 易发生沉降团聚导致粒径变大, 随着稳定剂用量的增加, 表 2 稳定剂种类对 Lig-PAM-NSps 平均粒径、PDI、SI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of types of stabilizer on average particle size, PDI, and SI of Lig-PAM-NSps ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂种类	平均粒径/nm	PDI	SI
HPMC	779±43	0.445±0.063	0.863±0.055
PVP K30	830±40	0.416±0.027	0.657±0.046
P188	975±60	0.370±0.013	0.591±0.016
T80	1 230±50	0.379±0.081	0.835±0.020

表 3 HPMC 与 PVP K30 比例对 Lig-PAM-NSps 平均粒径、PDI、SI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of ratio of HPMC to PVP K30 on average particle size, PDI, and SI of Lig-PAM-NSps ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

HPMC-PVP K30	平均粒径/nm	PDI	SI
1:4	721±40	0.413±0.042	0.930±0.067
2:3	911±3	0.359±0.028	0.658±0.019
1:1	1 061±29	0.713±0.067	0.870±0.052
3:2	1 031±67	0.591±0.023	0.569±0.063
4:1	746±41	0.455±0.015	0.731±0.065

表 4 药物与稳定剂比例对 Lig-PAM-NSps 平均粒径、PDI、SI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of ratio of drug to stabilizer on average particle size, PDI, and SI of Lig-PAM-NSps ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物-稳定剂	平均粒径/nm	PDI	SI
8:1	1 259±53	0.319±0.060	0.572±0.010
6:1	1 118±102	0.351±0.067	0.729±0.073
4:1	721±40	0.413±0.042	0.930±0.067
2:1	840±43	0.456±0.034	0.900±0.046

药物颗粒表面张力降低, 阻止了粒子间的聚集沉降, 随着稳定剂用量进一步的增加, 过量稳定剂形成胶束, 药物颗粒被包覆在胶束中, 颗粒粒径变大^[30], 当药物与稳定剂比例为 4:1 时, 各项指标较优, 以该比例进行其他因素的考察。

2.6.3 氧化锆珠用量的考察 固定稳定剂浓度为 1%, HPMC 与 PVP K30 比例为 1:4, 药物与稳定剂比例为 4:1, 搅拌转速 800 r/min, 搅拌时间 1.0 h, 考察氧化锆珠用量不同时平均粒径、PDI 和 SI 的变化。结果如表 5 所示, 随着氧化锆珠用量的增加, 平均粒径先减小后增加, SI 值先增加后减小, 分析其原因可能是由于少量的氧化锆珠不能达到充分的搅拌作用, 过量的氧化锆珠在固定的研磨腔体内, 搅拌子不能充分带动研磨介质转动, 反而降低研磨效果, 当氧化锆珠用量为 3.0 mL 时, 各项指标较优, 以该用量进行其他因素的考察。

2.6.4 搅拌转速的考察 固定稳定剂用量为 1%, HPMC 与 PVP K30 比例为 1:4, 药物与稳定剂比例为 4:1, 氧化锆珠用量为 3.0 mL, 搅拌时间 1.0 h, 考察转速不同时平均粒径、PDI 和 SI 的变化。结果如表 6 所示, 随着搅拌转速的增加, 平均粒径先减小后增加, SI 值先增加后减小, 分析其原因可能是转速过小, 药物与稳定剂碰撞几率减小, 搅拌不充分导致粒径较大, 随着转速增加, 药物和稳定剂碰撞几率和强度增大, 稳定剂充分分散吸附于药物颗粒

表 5 氧化锆珠用量对 Lig-PAM-NSps 平均粒径、PDI、SI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of dosage of zirconia on average particle size, PDI, and SI of Lig-PAM-NSps ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

氧化锆珠用量/mL	平均粒径/nm	PDI	SI
2.5	782±66	0.388±0.028	0.850±0.084
3.0	721±40	0.413±0.042	0.930±0.067
3.5	749±41	0.354±0.036	0.835±0.070
4.0	1 324±180	0.718±0.044	0.787±0.165

表 6 转速对 Lig-PAM-NSps 平均粒径、PDI、SI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Effect of stirring speed on average particle size, PDI, and SI of Lig-PAM-NSps ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌转速/(r·min ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI	SI
600	829±34	0.386±0.023	0.778±0.041
800	721±40	0.413±0.042	0.930±0.067
1 000	735±6	0.317±0.005	0.780±0.030
1 200	1 071±36	0.346±0.025	0.610±0.016

粒表面,使得粒径减小,但当转速进一步增大,平均粒径明显增加,可能是由于转速过大导致研磨腔体内产生气泡,反而降低粒子之间的碰撞,使得药物颗粒粒径增大^[31]。因此,确定搅拌转速为 800 r/min 进行其他因素的考察。

2.6.5 搅拌时间的选择 固定稳定剂用量为 1%, HPMC 与 PVP K30 比例为 1:4,药物与稳定剂比例为 4:1,氧化锆珠用量为 3.0 mL,搅拌转速 800 r/min,考察搅拌时间不同时平均粒径、PDI 和 SI 的变化,结果如表 7 所示。随着搅拌时间的增加,平均粒径和 PDI 均减小,其原因可以解释为充足的搅拌时间可以使药物粒子碰撞次数增多,同时,稳定剂充分分散吸附于药物颗粒表面,从而使得粒径减小。

表 7 搅拌时间对 Lig-PAM-NSps 平均粒径、PDI、SI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 7 Effect of stirring time on average particle size, PDI, and SI of Lig-PAM-NSps ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌时间/h	平均粒径/nm	PDI	SI
1.0	721±40	0.413±0.042	0.930±0.067
1.5	700±25	0.349±0.015	0.842±0.019
2.0	640±10	0.346±0.058	0.911±0.018
2.5	611±18	0.277±0.023	0.923±0.027

2.6.6 Lig-PAM-NSps 制备工艺正交试验设计 在各单因素实验基础上,选取对 Lig-PAM-NSps 制备处方工艺影响较大的 4 个因素:HPMC 与 PVP K30 比例(A)、药物与稳定剂比例(B)、氧化锆珠用量(C)、搅拌时间(D),每个因素选择 3 个水平,按照 L₉(3⁴) 正交表设计试验进行处方工艺的优化,如表 8 所示。

以平均粒径、PDI 和 SI 为评价指标,采用综合加权评分^[32],粒径权重系数为 0.5, PDI 权重系数为 0.3, SI 权重系数为 0.2,综合评分计算公式为综合评分=(1-粒径/最大粒径)×0.5×100+(1-PDI/最大 PDI)×0.3×100+SI/最大 SI×0.2×100,正交试验的直观分析结果可知(表 9),影响 Lig-PAM-NSps 制备处方工艺主次顺序为 C>B>D>A,最优处方

表 8 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果Table 8 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A	B	C/mL	D/h	平均粒径/nm	PDI	SI	综合评分
1	1:1 (1)	2:1 (1)	3.0 (1)	1.0 (1)	961	0.571	0.706	48
2	1:1	4:1 (2)	3.5 (2)	1.5 (2)	1 006	0.553	0.674	47
3	1:1	6:1 (3)	4.0 (3)	2.0 (3)	1 304	0.528	0.489	37
4	1:4 (2)	2:1	3.5	2.0	1 018	0.598	1.050	52
5	1:4	4:1	4.0	1.0	1 324	0.718	0.787	35
6	1:4	6:1	3.0	1.5	829	0.327	0.842	62
7	4:1 (3)	2:1	4.0	1.5	1 967	0.823	0.637	12
8	4:1	4:1	3.0	2.0	540	0.489	1.089	68
9	4:1	6:1	3.5	1.0	697	0.264	0.904	69

表 9 直观分析

Table 9 Intuitive analysis

水平	A	B	C	D
K ₁	44.00	37.33	59.33	50.67
K ₂	49.67	50.00	56.00	40.33
K ₃	49.67	56.00	28.00	52.33
R	5.67	18.67	31.33	12.00

及制备工艺为 A₃B₃C₁D₃ (HPMC 与 PVP K30 比例为 4:1,药物与稳定剂比例为 6:1,氧化锆珠用量为 3.0 mL,搅拌时间为 2.0 h);方差分析结果可知(表 10),氧化锆珠用量(C)对 Lig-PAM-NSps 的制备工艺影响显著,其他因素均对 Lig-PAM-NSps 的制备无显著性影响。

2.6.7 工艺验证试验 按最佳处方工艺 A₃B₃C₁D₃

表 10 方差分析
Table 10 Analyses of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	64.220	2	1.00	
B	544.890	2	8.49	
C	1 776.890	2	27.67	$P < 0.05$
D	253.556	2	3.95	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

(HPMC 与 PVP K30 比例为 4 : 1, 药物与稳定剂比例为 6 : 1, 氧化锆珠用量为 3.0 mL, 搅拌时间为 2.0 h) 制备 3 批 Lig-PAM-NSps, 测得平均粒径依次为 (573 ± 1) 、 (585 ± 5) 、 (595 ± 12) nm, PDI 依次为 0.363 ± 0.022 、 0.328 ± 0.015 、 0.345 ± 0.042 , SI 值依次为 0.915 ± 0.049 、 0.928 ± 0.012 、 0.931 ± 0.060 , 以上实验结果表明, 采用微型介质研磨法制备 Lig-PAM-NSps 的制剂工艺稳定可行。

2.7 Lig-PAM-NSps 的表征

2.7.1 外观及粒径分布 制剂外观色泽均一, 呈淡黄色混悬溶液, 如图 4-A, 取最优工艺条件下 Lig-PAM-NSps 溶液适量, 蒸馏水稀释, 纳米粒度仪测定粒径, 粒径分布图如图 4-B, 粒径分布在 600 nm 左右。

2.7.2 扫描电镜 (SEM) 的观察 取 Lig-PAM 和 Lig-PAM-NSps 适量, 蒸馏水分散后于室温自然干燥, 扫描电镜下观察形貌, 结果如图 5 所示, Lig-PAM 原料药呈不规则片状簇晶, 直径在几微米至几十微米不等, 采用微型介质研磨法制备成 Lig-PAM-NSps 后, 呈大小均一的圆形, 粒径在 600 nm 左右, 与纳米粒度仪测定结果基本一致。

2.8 Lig-PAM-NSps 储存稳定性考察

将 Lig-PAM-NSps 分别放置于低温 (4°C) 和

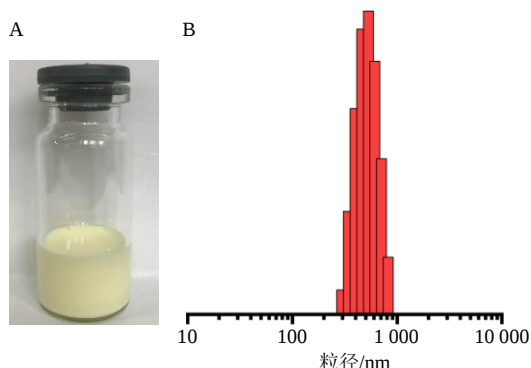


图 4 Lig-PAM-NSps 的外观 (A) 和粒径分布 (B)
Fig. 4 Appearance (A) and particle size distribution (B) of Lig-PAM-NSps

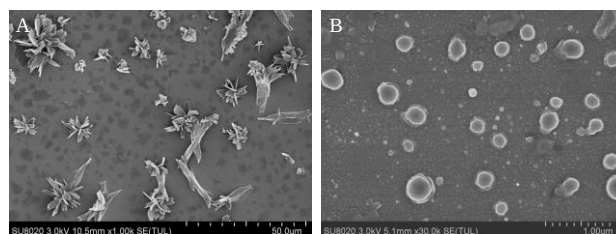


图 5 Lig-PAM (A) 和 Lig-PAM-NSps (B) 的 SEM 图
Fig. 5 SEM images of Lig-PAM (A) and Lig-PAM-NSps (B)

室温 (RT), 于 1、3、7、10、15、30、45、60 d 取样, 蒸馏水稀释相同倍数测定粒径和 PDI, 结果如图 6, Lig-PAM-NSps 在 4°C 和 RT 条件下放置 60 d, 粒径在 600 nm 左右, PDI 指数在 0.4 左右, 表明 Lig-PAM-NSps 在 60 d 内物理稳定。

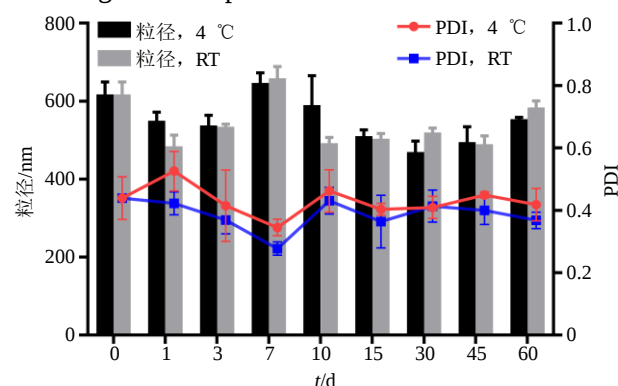


图 6 Lig-PAM-NSps 的粒径和 PDI 随时间和温度的变化
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Variation of particle size and PDI of Lig-PAM-NSps over time and temperature ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.9 Lig-PAM-NSps 体外溶出考察

采用透析袋法测定 Lig 和 Lig-PAM-NSps 在 PBS ($\text{pH } 7.4$) 中的释放行为。取 Lig-PAM-NSps 溶液 1 mL (相当于 2 mg Lig) 及等质量浓度的 Lig 溶液于截留相对分子质量 3 500 的透析袋内, 释放介质体积为 50 mL, 转速 100 r/min, 温度为 $(37.0 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$, 于释放后 0.08、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 取样 1 mL, 补充等温、等体积释放介质, 通过 HPLC 测定含量 (以 Lig 计), 计算药物累积释放率。结果如图 7 所示, Lig 溶液在 2 h 时累积释放率达到 87.25%, 而 Lig-PAM-NSps 在 2 h 时累积释放率为 23.48%, 48 h 内累积释放率为 82.82%, 说明 Lig-PAM-NSps 可以延长 Lig 释放时间, 达到缓释的效果。分别以零级释放、一级释放和 Higuchi 方程对 Lig-PAM-NSps 体外释放曲线进行拟合, 体外释放模型符合一级方程: $\ln(1 - Q) = 0.153\ 67\ t + 80.458\ 14$, $r = 0.998\ 26$ 。

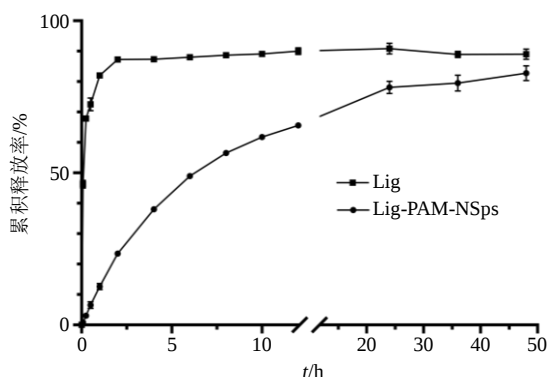


图 7 Lig 和 Lig-PAM-NSps 在 PBS (pH 7.4) 中的体外药物释放曲线 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 *In vitro* release profile of Lig and Lig-PAM-NSps in phosphate buffer solution (pH 7.4) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3 讨论

药物成盐是控制药物溶解度最直接、最常用的方法^[33]。本实验采用难溶性盐技术制备 Lig-PAM，通过降低 Lig 在水中的溶解度，改善 Lig 体内半衰期短、代谢快、生物利用度低、需频繁给药、患者顺应性差的问题。难溶性盐技术不需要对药物进行化学改性，避免了药物化学结构修饰可能带来的毒副作用，Lig-PAM 进入体内，缓慢解离为 Lig 和 PAM，既保持药物原型，又达到缓释的目的。

本实验借助微型介质研磨法制备 Lig-PAM-NSps，通过控制药物颗粒粒径，达到缓释的目的。Leng 等^[34]提出纳米混悬剂制备过程中，需根据实际情况选择合适的粒径。当需增加药物溶解度时，控制药物颗粒粒径在 100~200 nm 范围内较好，当需要达到缓释长效的目的时，控制药物颗粒粒径在 800~1 000 nm 较好^[35-36]。因此，本实验综合考虑药物颗粒粒径的均一性和稳定性，优化的 Lig-PAM-NSps 平均粒径、PDI、SI 分别为 (585±5) nm、0.328±0.015、0.928±0.012，既避免药物颗粒粒径过小，缓释效果不佳，又避免药物颗粒粒径过大，易发生沉降、团聚等问题。

本实验结合难溶性盐技术与纳米混悬技术，制备的 Lig-PAM-NSps 体外释放结果表明其在 48 h 内有一定的缓释效果，但是，由于体内代谢环境复杂，受诸多因素的影响，通过体外释放结果对药物缓释能力进行评价有局限性，因此，本实验将进一步对药物的体内代谢情况进行考察，同时，后期将从药效、临床应用等方面进行深入研究。

参考文献

[1] 李玉梅, 杨欣欣, 韩旭, 等. 川芎嗪与黄芪甲苷配伍

对人脐静脉内皮细胞血管生成的作用及机制探讨 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 722-727.

[2] 刘彦超. 丹参川芎嗪联合阿托伐他汀对 2 型糖尿病合并颈动脉粥样硬化患者的血脂及颈动脉血流参数的影响 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(9): 1794-1797.

[3] 彭川. 磷酸川芎嗪注射液联合阿替普酶治疗急性脑梗死的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(2): 308-312.

[4] Guo M, Liu Y, Shi D. Cardiovascular actions and therapeutic potential of tetramethylpyrazine (active component isolated from *Rhizoma Chuanxiong*): Roles and mechanisms [J]. *BioMed Res Int*, 2016, doi: 10.1155/2016/2430329.

[5] Chen H, Li G, Zhan P, et al. Ligustrazine derivatives. Part 5: Design, synthesis and biological evaluation of novel ligustrazinyloxy-cinnamic acid derivatives as potent cardiovascular agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2011, 46(11): 5609-5615.

[6] 刘峥. Liguzinediol 衍生物的设计合成, 正性肌力活性及药代动力学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.

[7] 林霞, 李其彬, 石晓宇, 等. 美金刚长效注射剂的制备及其评价 [J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(5): 587-595.

[8] 张芳, 杨志强, 王杏林. 长效注射剂释药技术研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(5): 547-555.

[9] Zenaty D, Blumberg J, Liyanage N, et al. A 6-month trial of the efficacy and safety of triptorelin pamoate (11.25 mg) every 3 months in children with precocious puberty: A retrospective comparison with triptorelin acetate [J]. *Horm Res Paediatr*, 2016, 86(3): 188-195.

[10] Nedelman J, Fisch R, Hu K, et al. Population pharmacokinetics of subcutaneous pasireotide in healthy volunteers and Cushing's disease patients [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2018, 57(7): 855-866.

[11] Müller R H, Gohla S, Keck C M. State of the art of nanocrystals-special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011, 78(1): 1-9.

[12] 孔冬倩. 新型纳米混悬长效释药系统的构建与评价 [D]. 保定: 河北大学, 2016.

[13] 聂凡茹, 艾汝经, 周欣欣, 等. 番荔枝总内酯纳米混悬剂的制备及其体外抗肿瘤作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(1): 24-28.

[14] Mittapelly N, Thalla M, Pandey G, et al. Long acting ionically paired embonate based nanocrystals of donepezil for the treatment of Alzheimer's disease: A proof of concept study [J]. *Pharm Res*, 2017, 34(11): 1-11.

- 2322-2335.
- [15] 王震芳, 张智强, 葛振华. 蛇床子素 3 种制剂的制备、表征及药动学比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3615-3621.
- [16] Qian Y S, Ramamurthy S, Candasamy M, *et al.* Production, characterization and evaluation of kaempferol nanosuspension for improving oral bioavailability [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2016, 17(6): 549.
- [17] 董丹丹, 郑 岩, 刘会珍, 等. 田蓟苷纳米混悬剂冻干粉缓释片制备工艺研究 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2841-2847.
- [18] 汪小涵, 王聪颖, 刘 肖, 等. 晶型对落新妇苷纳米混悬剂体内行为的影响 [J]. 中国药房, 2019, 30(4): 458-463.
- [19] Romero G B, Keck C M, Müller R H. Simple low-cost miniaturization approach for pharmaceutical nanocrystals production [J]. *Int J Pharm*, 2016, 501(1/2): 236-244.
- [20] 申宝德, 连王权, 沈成英, 等. 微型化介质搅拌法制备难溶性黄酮类化合物纳米混悬剂 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4413-4418.
- [21] 刘 肖, 刘 娟, 庞建云, 等. 微型化介质搅拌法制备槲皮素纳米混悬剂 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(15): 2984-2988.
- [22] Bush, Julie, Kay. Olanzapine pamoate dihydrate: European Patent, 1838716 [P]. 2011-06-01.
- [23] 顾琼艳, 吴美媛. 奥氮平双羟萘酸盐长效注射剂体外溶出度的测定 [J]. 中国药师, 2014, 17(12): 2053-2056.
- [24] Dong X, Niu Y, Ding Y, *et al.* Formulation and drug loading features of nano-erythrocytes [J]. *Nanoscal Res Lett*, 2017, 12(1): 202.
- [25] 刘罗娜, 李小芳, 仲 粒, 等. 以甘草酸为稳定剂制备黄芩苷固体纳米晶体 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2057-2064.
- [26] 张文君. 藤黄酸纳米混悬剂的制备及研究 [D]. 沈阳: 辽宁大学, 2015.
- [27] Wang Y, Zheng Y, Zhang L, *et al.* Stability of nanosuspension in drug delivery [J]. *J Controlled Rel*, 2013, 172(3): 1126-1141.
- [28] 王莉芳, 陈孝男, 李 军, 等. 龙血竭酚类提取物纳米混悬剂的制备及体外溶出研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2236-2243.
- [29] Ali H S M, York P, Ali A M A, *et al.* Hydrocortisone nanosuspension for ophthalmic delivery: A comparative study between microfluidic nanoprecipitation and wet milling [J]. *J Controlled Rel*, 2011, 149(2): 175-181.
- [30] 潘振中. 高效氯氟氰菊酯纳米混悬剂的制备研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [31] 罗开沛. 水飞蓟素纳米混悬剂及其固体化研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [32] 金 滔. 羟喜树碱 MePEG-PLA 纳米粒的制备及其体外抗肿瘤研究 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2013.
- [33] Serajuddin A T. Salt formation to improve drug solubility [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(7): 603-616.
- [34] Leng D, Chen H, Li G, *et al.* Development and comparison of intramuscularly long-acting paliperidone palmitate nanosuspension with different particle size [J]. *Int J Pharm*, 2014, 472(1/2): 380-385.
- [35] Liu G, Zhang D, Jiao Y, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of riccardin D nanosuspension with different particle size [J]. *Colloids Surf B Biointerf*, 2013, 102: 620-626.
- [36] Müller R H, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspension as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1): 3-19.