

川芎嗪聚乳酸纳米粒的包封率测定

李争艳¹, 毛春芹¹, 曾莉^{2*}, 陆兔林¹

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046; 2. 南京中医药大学图书馆, 江苏 南京 210046)

摘要:目的 建立川芎嗪聚乳酸纳米粒包封率测定方法。方法 采用 Hypersil ODS2(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-水(52:48), 流速为 1 mL/min, 柱温: 30 ℃, 检测波长为 279 nm 的色谱条件, 低温超速离心法测定包封率。**结果** 该方法可以用于测定川芎嗪聚乳酸纳米粒的包封率。

关键词: 川芎嗪; 聚乳酸; 纳米粒; 包封率

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 1000-5005(2011)01-0077-03

Determination of Entrapment Efficiency of Tetramethylpyrazine Poly(lactic Acid) Nanoparticles

LI Zheng-yan, MAO Chun-qin, ZENG Li*, LU Tu-lin

(1. School of Pharmacy of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210046, China; 2. Nanjing University of Chinese Medicine Library, Nanjing, 210046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for determining the entrapment efficiency of tetramethylpyrazine poly(lactic acid) nanoparticles. **METHODS** The determining was performed by HPLC with Hypersil ODS2(250mm×4.6mm, 5μm) column at 30℃. The mobile phase was methanol-water(52:48), the flow rate 1.0 ml/min and the UV detection wavelength 279 nm. Ultracentrifugation method with low temperature was used to determine the entrapment efficiency of tetramethylpyrazine poly(lactic acid) nanoparticles. **CONCLUSION** The designed method can be used for determining the entrapment efficiency of tetramethylpyrazine poly(lactic acid) nanoparticles.

KEY WORDS: tetramethylpyrazine; poly(lactic acid); nanoparticles; entrapment efficiency

文献报道, 腹部手术后发生腹腔粘连者达 90% 以上^[1]。近年来, 具有可生物降解和生物相容性的聚乳酸作为载体材料的纳米控释系统的研究受到广泛关注^[2]。川芎嗪经研究发现其具有较强的抗腹腔粘连作用^[3-4]。为了达到缓释性并且提高临床疗效, 本试验将川芎嗪制备成川芎嗪聚乳酸纳米粒, 采用低温超速离心法分离川芎嗪聚乳酸纳米粒溶液中的游离川芎嗪, 以高效液相色谱法测定该纳米粒溶液中药物含量及包封率。

1 材料

电子分析天平(FA1104N)(上海精密科学仪器有限公司), Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司), KQ-500E 型医用超声清洗器(昆山超声仪器有限公司), 85-2 型恒温磁力搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), 高速冷冻离心机(HITACHI-55P-7)。

川芎嗪对照品(经归一化法测得纯度大于

99%, 可用于含量测定, 南京泽郎医药科技有限公司), 聚乳酸(MW=20 000, 济南济南岱罡生物科技有限公司)。

甲醇为色谱纯, 水为重蒸水(自制), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 川芎嗪聚乳酸纳米粒的制备^[5]

称取适量聚乳酸, 溶于丙酮, 并超声 5 min, 得聚乳酸丙酮溶液, 精密称取川芎嗪适量, 溶于聚乳酸丙酮溶液中, 作为油相。一定浓度的泊洛沙姆溶液作为水相。将上述油相在磁力搅拌的条件下快速注入已恒温至 35 ℃ 的水相中, 在恒温 35 ℃ 的条件下继续磁力搅拌 70 min, 即得川芎嗪聚乳酸纳米粒溶液。

2.2 色谱条件

*收稿日期: 2010-08-11; 修稿日期: 2010-10-05

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2008459); 南京中医药大学重点培育基金(09XPY05)

作者简介: 李争艳(1986-), 女, 江苏南京人, 南京中医药大学 2008 级硕士研究生。*通信作者: zengbingli@163.com

采用 Hypersil ODS2 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-水 (52:48), 流速为 1 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长为 279 nm。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取川芎嗪对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 1.022 mg 的溶液, 即得对照品溶液。

2.4 线性关系考察

精密量取对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 使浓度分别为 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL。在上述色谱条件下重复进样两次, 每次 10 μL, 测定峰面积值。以峰面积平均值和质量浓度进行回归处理, 结果表明, 川芎嗪在 10.22~102.2 μg/mL 线性良好, 回归方程为 $Y = 31.0329X + 58.2160$, $r = 0.9998$ 。

2.5 精密度试验

取同一对照品溶液进行试验, 每次进样 10 μL, 连续进样 6 次, 测定川芎嗪峰面积值, 计算得 RSD 为 0.13%。

2.6 川芎嗪聚乳酸纳米粒供试品溶液制备条件的考察

为确定供试品溶液制备条件, 精密量取 0.2 mL 川芎嗪聚乳酸纳米粒溶液, 置于 5 mL 量瓶中, 采用 $L_4(2^3)$ 正交表进行设计, 对是否添加破膜剂 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF), 混匀方式进行考察, 其制备条件因素水平设计见表 1, 正交试验结果见表 2。

表 1 $L_4(2^3)$ 正交表

水平	因素		
	A (是否添加 DMF)	B (混匀方式)	C (空白)
1	添加 0.5 mL DMF	超声 5 min	1
2	不加 DMF	振摇	2

表 2 正交试验结果

NO	A	B	C	每份样品中 川芎嗪含量/μg	
				Ij	IIj
1	1	1	1	198.58	
2	1	2	2	199.39	
3	2	1	2	195.14	
4	2	2	1	198.63	
Ij	397.97	393.72	397.21		
IIj	393.78	398.02	394.54	CT = 156715.16	
SSj	4.39	4.63	1.79		

经比较分析, 同时从省时、经济以及效率的前

提出发, 确定供试品溶液的最佳制备条件为: A₁B₂。即精密量取 0.2 mL 样品溶液, 置于 5 mL 量瓶中, 加入 0.5 mL N,N-二甲基甲酰胺, 摇匀, 加甲醇稀释至刻度, 即得。

表 3 方差分析表

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值
B	4.6265	1	4.6265	2.5871
A	4.3871	1	4.3871	2.4532
C(空白)	1.7883	1	1.7883	

注: $F_{1-0.05}(1, 1) = 161.4$, $F_{1-0.01}(1, 1) = 4052$ 。

2.7 稳定性试验

取供试品溶液, 每次进样 10 μL, 在 0、2、4、6、8、10 h 各进样 1 次测定川芎嗪 10 h 内的峰面积值, RSD 为 0.21%。结果表明样品在 10 h 内稳定。

2.8 重复性试验

平行精密量取 0.2 mL 川芎嗪聚乳酸纳米粒溶液, 按 2.6 项下供试品溶液的最佳制备条件制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 每次 10 μL, 测定川芎嗪的含量, 结果川芎嗪平均含量为 981.25 μg/mL, RSD = 0.45% (n = 6), 表明本法重复性良好, 可以用于含量测定。

2.9 准确度试验

精密量取 0.1 mL 川芎嗪聚乳酸纳米粒溶液, 置于 5 mL 量瓶中, 平行 9 份, 每 3 份 1 组, 分别精密加入浓度为 0.1122 mg/mL 川芎嗪对照品溶液 0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL, 按照上述供试品溶液最佳制备方法制备, 即加入 0.5 mL N,N-二甲基甲酰胺, 振摇, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得。按上述色谱条件重复进样 2 次, 每次进样 10 μL, 测定峰面积值, 计算加样回收率。结果见表 4。

表 4 加样回收率实验

NO	样品含量 /μg	对照品 加入量 /μg	实测量 /μg	加样 回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD/%
1	98.13	89.76	186.89	99.88		
2	98.13	89.76	186.87	98.87		
3	98.13	89.76	187.56	99.64		
4	98.13	112.2	209.67	99.41		
5	98.13	112.2	210.18	99.86	100.17	1.38
6	98.13	112.2	210.22	99.90		
7	98.13	134.64	235.94	102.35		
8	98.13	134.64	236.32	102.34		
9	98.13	134.64	232.73	99.97		

结果表明本品回收率符合要求。

由以上实验结果可知,川芎嗪的转移率非常高,则可以通过加入的川芎嗪总量和测定离心分离后的游离药物含量,认为两者之差即为纳米粒中的药物含量,然后用其与川芎嗪总量之比计算包封率。

2.10 包封率的测定方法

取适量川芎嗪聚乳酸纳米粒混悬溶液至离心管,低温超速离心(4℃, 25 000 r/min) 60 min,精密量取上清0.2 mL,置于5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。将溶液在上述色谱条件下进行测定,得游离药物量(W_f),另设制备时加入的药物量为(W_s)。

$$\text{包封率}(\%) = (W_s - W_f) / W_s \times 100\%$$

3 包封率的测定

按照2.10项下包封率的测定方法,取适量川芎嗪聚乳酸纳米粒混悬溶液共3份至离心管,低温超速离心(4℃, 25 000 r/min) 60 min,精密量取上清0.2 mL,置于5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得。将溶液在上述色谱条件下进行测定,由外标两点法测得数据,结果见表5。

表5 3批样品包封率测定结果

NO	包封率/%	平均包封率/%
1	43.06	
2	40.61	41.78
3	41.68	

4 讨论

包封率是评价纳米粒质量的重要指标,测定纳米粒包封率和载药量的方法很多,主要有葡聚糖凝胶柱层析法、超滤膜过滤法、微型柱离心法等,笔者曾尝试用葡聚糖凝胶柱层析法及透析法,结果发现葡聚糖柱层析法的分离效果与纳米粒的

粒径密切相关,并且终点的判断带有很强的主观性,重现性较差。透析法需要较长的时间,故也不适宜用来测定包封率。本试验确定的高效液相色谱法操作简便、快捷,且不受外界环境干扰,灵敏度、稳定性及重现性都很高,是测定川芎嗪纳米粒包封率的有效方法。

在上述的方法学研究中,对川芎嗪聚乳酸纳米粒溶液中川芎嗪的总含量的测定方法进行了研究,结果表明川芎嗪在纳米粒的制备过程中转移率较高,且该测定方法也可将所测成分最大限度检出。

经试验研究,川芎嗪在所用溶剂中的溶解度大于投料量,即川芎嗪在该溶剂中未有析出沉淀。由上可知,由投料量减去上清溶液中游离川芎嗪的测得量计算得出包封率的测定方法是可行的。并且由投料量直接减去游离川芎嗪的测得量得出包封率的测定方法更加快捷、经济。

参考文献:

- [1] Scott Coomers D, Whawell SA, Vipond MN, et al. Hunan intraperitoneal fibrinolytic response to surgery[J]. Bri J. Surg, 1995, 82: 414.
- [2] 张志清,康英,王育红. 聚乳酸纳米粒给药系统研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(9): 555- 557.
- [3] 董秀清,阳晓,叶任高,等. 川芎嗪抗腹膜间皮细胞损伤的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 2(8): 441- 443.
- [4] 郝丽荣,王春梅,李春玲. 川芎嗪防治腹膜纤维化作用的实验研究[J]. 中国血液净化, 2006, 5(8): 437- 439.
- [5] 刘月新,谭牛仔,田育望,等. 吡嗪酮聚乳酸纳米粒制备工艺研究[J]. 中南药学, 2008, 6(6): 641- 644.

(编辑:李伟东)