

SPG膜乳化法制备丹参酮II_A聚乳酸-羟基乙酸微球的工艺优化

张梦¹, 潘林梅¹, 朱华旭^{1*}, 郭立玮^{1*}, 潘永兰¹, 鲁明明²

(1. 南京中医药大学, 中药复方分离工程重点实验室, 南京 210023;
2. 江苏南星药业有限责任公司, 南京 210046)

[摘要] 目的: 优选 SPG 膜乳化法制备丹参酮 II_A-聚乳酸-羟基乙酸 (PLGA) 微球的工艺条件。方法: 采用 SPG 膜乳化法制备丹参酮 II_A-PLGA 微球。在单因素试验基础上, 以载药量、包封率及多分散系数 (PDI) 的综合评分为因变量, 通过响应面法考察 PLGA 质量浓度、流动相流速、聚乙烯醇 (PVA) 质量浓度及油水相体积比等自变量对方工艺的影响。结果: 最佳处方工艺为 PLGA 质量浓度 44.29 g·L⁻¹, 流动相流速 825.68 r·min⁻¹, PVA 质量浓度 2.5 g·L⁻¹, 油水相体积比 1:7.86; 制备的丹参酮 II_A-PLGA 微球表面光滑圆整且粒径均一, 平均粒径 2.338 μm, PDI 指数 0.328, 载药量 1.20%, 包封率 89.57%, 与预测值相对误差较小。结论: 采用 SPG 膜乳化法制备微球的工艺简单、方便, 可用于提高丹参酮 II_A 的生物利用度。

[关键词] 丹参酮 II_A; SPG 膜乳化法; 响应面法; 处方工艺; 粒径

[中图分类号] R283.6; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)05-0006-05

[doi] 10.11653/syjf2014050006

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131218.1412.011.html>

[网络出版时间] 2013-12-18 14:12

Preparation of Tanshinone II_A-loaded Polylactic Acid-Glycolic Acid Microspheres by SPG Membrane Emulsification Technique

ZHANG Meng¹, PAN Lin-mei¹, ZHU Hua-xu^{1*}, GUO Li-wei^{1*}, PAN Yong-lan¹, LU Ming-ming²

(1. Key Laboratory of Separation Engineering for Chinese Medicine Compound,

[收稿日期] 20130823(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973950);江苏省科技厅产学研联合创新资金(前瞻性研究项目)项目(BY2012036);江苏省中管局项目(LZ11199)

[第一作者] 张梦, 在读硕士, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel:15950577683, E-mail:zhangmeng200838@163.com

[通讯作者] * 郭立玮, 研究员, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel:025-86798066, E-mail:guoliwei815@126.com;

* 朱华旭, 博士, 研究员, 从事中药复杂体系物质基础与生物药剂学研究, Tel:025-86798393, E-mail:huaxu@126.com

[参考文献]

- [1] 周俊. 中药复方——天然组合化学库与多靶作用机理[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(2):67.
- [2] Fidock D A, Rosenthal P J, Croft S L, et al. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening [J]. Nat Rev Drug Discov, 2004, 3(6):509.
- [3] 郭立玮. 中药膜分离领域的科学与技术问题[J]. 膜科学与技术, 2003, 23(4):209.
- [4] 郭立玮, 陆敏, 付廷明, 等. 基于中药复方小分子药效物质组“溶液结构”特征的膜分离技术优化原理与方法初探[J]. 膜科学与技术, 2012, 32(1):1.
- [5] Israelachvili J N. Intermolecular and surface forces; revised third edition [M]. New York: Academic press, 2011:137.
- [6] Dunitz J D, Gavezzotti A. How molecules stick together in organic crystals: weak intermolecular interactions [J]. Chem Soc Rev, 2009, 38(9):2622.
- [7] Klant A. Cosmo-Rs: from quantum chemistry to fluid phase thermodynamics [M]. Leverkusen: Elsevier Science Publishing Company, 2005:71, 89.
- [8] 钱智磊, 李欢, 朱华旭, 等. 黄连解毒汤中指标性成分药动学与药效学相关性的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):122.
- [9] 李欢, 朱华旭, 潘林梅, 等. 黄连解毒汤全方和不同极性部位的活性筛选[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):124.
- [10] 朱华旭, 潘林梅, 李欢, 等. 黄连解毒汤全方与“组合-配伍”提取的比较研究[J]. 中成药, 2010, 32(10):1815.

[责任编辑 全燕]

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Jiangsu Nanxing Pharmaceutical Co. Ltd, Nanjing 210046, China)

[Abstract] Objective: To prepare tanshinone II_A-loaded poly(lactic acid-glycolic acid) (PLGA) microspheres by SPG membrane emulsification technique. **Method:** Based on single factor tests, with composite score of drug loading, encapsulation efficiency and polydispersity index (PDI) as dependent variable, response surface methodology was adopted to optimize prescription process by taking flow rate of mobile phase, volume ratio of oil-water phase, PLGA and PVA concentration as independent variables. **Result:** Optimum prescription process was as follows: PLGA concentration 44.29 g·L⁻¹, circulation speed 825.68 r·min⁻¹, PVA concentration 2.5 g·L⁻¹ and volume ratio of oil-water 1:7.86; These prepared tanshinone II_A-loaded PLGA microspheres had smooth rounded surface and uniform size with average size of 2.338 μm, PDI index of 0.328, drug loading efficiency of 1.20% and encapsulation efficiency of 89.57%, relative errors of these parameters were small by comparing with the predictive values. **Conclusion:** SPG membrane emulsification technique was simple and effective, it could improve bioavailability of tanshinone II_A.

[Key words] tanshinone II_A; SPG membrane emulsification method; response surface methodology; prescription process; particle size

SPG膜乳化技术^[1-2]作为一种新型乳化方法,相比于传统的机械搅拌、均质乳化和超声乳化法,具有能耗低、操作条件温和、包封率高等优点。丹参酮II_A是从丹参中提取的脂溶性成分,为二萜醌类化合物,在心血管疾病、抗肿瘤、抗衰老等方面具有显著疗效^[3-5]。但丹参酮II_A的水溶性差且半衰期短,临床主要使用其磺酸盐注射剂,在一定程度上改变了丹参酮II_A的结构和药理作用。本实验利用SPG膜乳化法制备粒径可控的丹参酮II_A聚乳酸-羟基乙酸微球,采用响应面法优选处方工艺,旨在不改变丹参酮II_A结构的基础上提高其生物利用度,同时通过制备相应粒径的丹参酮II_A聚乳酸-羟基乙酸微球以达到一定的被动靶向作用。

1 材料

SPG膜乳化装置(自制,见图1),SPG膜(膜管长度12.5 cm,膜孔径1.0 μm,日本Miyazaki公司),BT60-600型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司),DF-101S型智能集热恒温加热磁力搅拌器(河南省予华仪器有限公司),I-6型冷冻干燥机(德国Ehrisa公司),754型二阶导数紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司),AUW120D型1/10万电子天平(日本岛津),TGL-16C型高速离心机(上海安亭科学仪器制造厂),S-4800型场发射扫描电镜(日本日立公司),MASTERSIZER 2000型马尔文激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司)。

丹参酮II_A对照品(中国食品药品检定研究院,批号110766-200619),丹参酮II_A原料药(昆明盛蕾

生物科技有限公司,质量分数43%),聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA,PLA:PGA=50:50,相对分子量12 kDa,山东省医疗器械研究所),聚乙烯醇1788(PVA 1788,上海阿拉丁试剂有限公司),聚乙二醇4000(PEG 4000,中国医药集团上海化学试剂公司),乙腈为色谱纯,水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

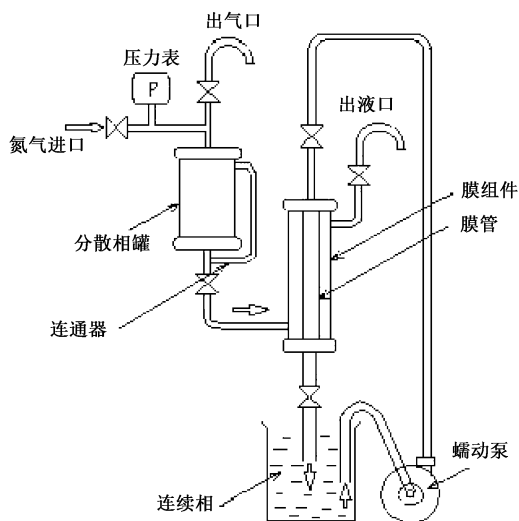


图1 SPG膜乳化装置

2 方法与结果

2.1 SPG膜乳化的原理^[1] 连续相在SPG膜管的内壁循环流动,分散相在一定压力下被挤压通过孔径分布均一的SPG膜孔形成液滴,液滴在自身界面张力和膜管内壁连续相的剪切力作用下剥离膜表

面而分散在连续相中,最终在连续相中乳化剂和稳定剂的共同作用下形成单分散性良好的 O/W 型或 W/O 型乳液,见图 2。

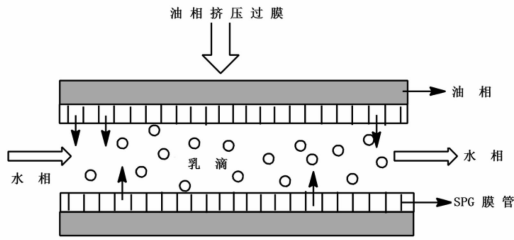


图 2 SPG 膜乳化的原理

2.2 丹参酮 II_A 微球的制备 精密称取适量丹参酮 II_A 原料药和 PLGA 溶解在一定体积的二氯甲烷中(分散相),连续相为溶解了适量 PEG 4000(乳化剂)和 PVA(稳定剂)的水溶液,开启蠕动泵使连续相在 SPG 膜管(1.0 μm)内壁循环一段时间,连接一定压力将分散相挤压通过膜孔,进入连续相中形成单分散性良好的 O/W 型乳液,至分散相过膜结束后停止,立即将乳液放置在室温下搅拌 >6 h,随着分散相溶剂二氯甲烷不断向连续相中扩散而挥发,PLGA 逐渐析出固化成 PLGA 微球,静置分层,水洗 3 次,冷冻干燥,即得粉末状丹参酮 II_A-PLGA 微球。

2.3 表面形貌和粒径分布的测定 取少量冻干微球悬浮于水中,用吸管吸取少量滴在铝箔(锡纸)上,均匀摊开,自然晾干。剪下一小块铝箔用导电胶固定在样品台上,喷金 70 s 后,利用扫描电子显微镜(SEM)观察微球形态。取适量干燥微球使其均匀分散在水中,采用马尔文粒度分析仪测定平均粒径及多分散系数(PDI),PDI 值越小代表微球粒径分布越均匀。

2.4 载药量与包封率的测定 精密称取适量丹参酮 II_A-PLGA 微球,加入定量乙腈超声 30 min,放至室温过夜降解,于 8 000 r·min⁻¹离心 5 min,取上层液体作为样品,运用二阶导数紫外分光光度计在 270 nm 处测定吸收度(A),计算载药量和包封率。

$$\text{载药量} = \text{微球中药物质量} / \text{微球质量} \times 100\%;$$

$$\text{包封率} = \text{微球中药物质量} / \text{投入总药量} \times 100\%$$

2.5 标准曲线的绘制 精密称取丹参酮 II_A 对照品 23.10 mg 置于 25 mL 棕色量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,得储备液。分别精密吸取该储备液 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0 mL 置 5 mL 棕色量瓶中,加乙腈稀释至刻度,摇匀,即系列丹参酮 II_A 对照品稀释液,于 270 nm 处测定 A,以 A 为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标,得回归方程 $A = 0.0799C + 0.0254$ ($R^2 = 0.9996$),线性范围 2.772 ~ 9.24 mg·L⁻¹。

2.6 处方工艺优选 在单因素试验基础上,利用响应面法中 Box-Behnken 试验设计,控制乳化压力 0.10 MPa,乳化剂 PEG 4000 和丹参酮 II_A 质量浓度依次为 0.5, 0.75 g·L⁻¹,选取 PLGA 质量浓度、流动相流速、PVA 质量浓度、油水相体积比为自变量,微球的载药量(Y₁)、包封率(Y₂)及 PDI(Y₃)的综合评分为因变量,权重系数依次为 0.4, 0.4, 0.2,综合评分(Y) = Y₁ × 40% + Y₂ × 40% - Y₃ × 20%,进行四因素三水平的中心组合试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

表 1 丹参酮 II_A-PLGA 微球处方工艺

Box-Behnken 试验因素水平

水平	X ₁ PLGA 质量 浓度/g·L ⁻¹	X ₂ 流动相 流速/r·min ⁻¹	X ₃ PVA 质量 浓度/g·L ⁻¹	X ₄ 油水相 体积比
-1	30	500	0.5	1:5
0	40	1 000	1.5	1:15
1	50	1 500	2.5	1:25

表 2 丹参酮 II_A-PLGA 微球处方工艺 Box-Behnken 试验安排

No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	载药量 /%	包封率 /%	PDI	综合评分 /%
1	-1	-1	0	0	0.899	46.05	0.268	18.73
2	1	-1	0	0	0.770	65.16	0.717	26.23
3	1	1	0	0	1.044	31.87	0.210	12.95
4	1	1	0	0	0.790	66.82	0.706	26.90
5	0	0	-1	-1	0.982	66.68	0.635	26.94
6	0	0	1	-1	1.277	83.34	0.531	33.72
7	0	0	-1	1	0.977	66.32	0.210	26.88
8	0	0	1	1	0.816	55.45	0.008	22.50
9	-1	0	0	-1	0.704	36.06	0.542	14.60
10	1	0	0	-1	0.876	74.12	0.622	29.87
11	-1	0	0	1	0.64	32.78	0.053	13.36
12	1	0	0	1	0.647	54.72	0.736	22.00
13	0	-1	-1	0	1.041	68.11	0.787	27.48
14	0	1	-1	0	1.055	71.62	0.960	28.88
15	0	-1	1	0	1.133	76.92	0.610	31.10
16	0	1	1	0	0.985	66.89	0.530	27.04
17	-1	0	-1	0	1.026	52.58	1.000	21.24
18	1	0	-1	0	0.923	78.07	1.000	31.40
19	-1	0	1	0	1.082	55.45	0.679	22.48
20	1	0	1	0	0.962	81.37	0.791	32.77
21	0	-1	0	-1	0.915	62.17	0.311	25.17
22	0	1	0	-1	0.790	53.67	1.000	21.58
23	0	-1	0	1	0.748	50.77	0.643	20.48
24	0	1	0	1	0.706	47.93	1.000	19.25
25	0	0	0	0	1.028	69.85	0.300	28.29
26	0	0	0	0	1.041	70.67	0.289	28.63
27	0	0	0	0	1.044	70.89	0.293	28.72

运用程序 Design-Expert 8.0.5 软件对响应值与各因素进行二次回归拟合,得回归方程 $Y = 28.55 + 5.48X_1 - 1.05X_2 + 0.57X_3 - 2.28X_4 + 1.61X_1X_2 + 0.033X_1X_3 - 1.66X_1X_4 - 1.37X_2X_3 + 0.59X_2X_4 - 2.79X_3X_4 - 4.52X_1^2 - 2.86X_2^2 + 2.97X_3^2 - 4.04X_4^2$ ($r = 0.9941$), 方程中各项系数绝对值的大小直接反映了各因素对指标值的影响程度,系数的正负反映了影响的方向,即各因素对响应值的影响程度依次为 PLGA 质量浓度 > 油水相体积比 > 流动相流速 > PVA 质量浓度。二次模型的方差分析见表 3,显示模型的 $P < 0.0001$,说明选用的模型极显著;失拟项 $P = 0.0994 > 0.05$,说明模型的拟合度良好,未知因素对试验结果干扰很小,回归方程系数

$r = 0.9941$,说明该模型能解释 99.41% 响应值的变化,得到的模型拟合程度代表性好,试验误差小,该回归方程可用于分析和预测 SPG 膜乳化法制备丹参酮 II_A-PLGA 微球的处方工艺。

由表 3 可知, X_1, X_2, X_3 的偏回归系数极显著, X_4 的偏回归系数显著,二次项的偏回归系数均极显著,交互项 X_1X_2, X_1X_4, X_3X_4 的偏回归系数极显著, X_2X_3 的偏回归系数显著,与回归方程的拟合结果较为一致。分别固定 X_1, X_2, X_3, X_4 为 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, 1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}, 1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, 1:15$,应用 Design-Expert 8.0.5 软件绘制另外 2 个因素对综合评价的空间三维响应面,见图 3。结果显示 Y 随着 PLGA 质量浓度的增加先变大后趋于平衡,随着流动相流速的增加先变

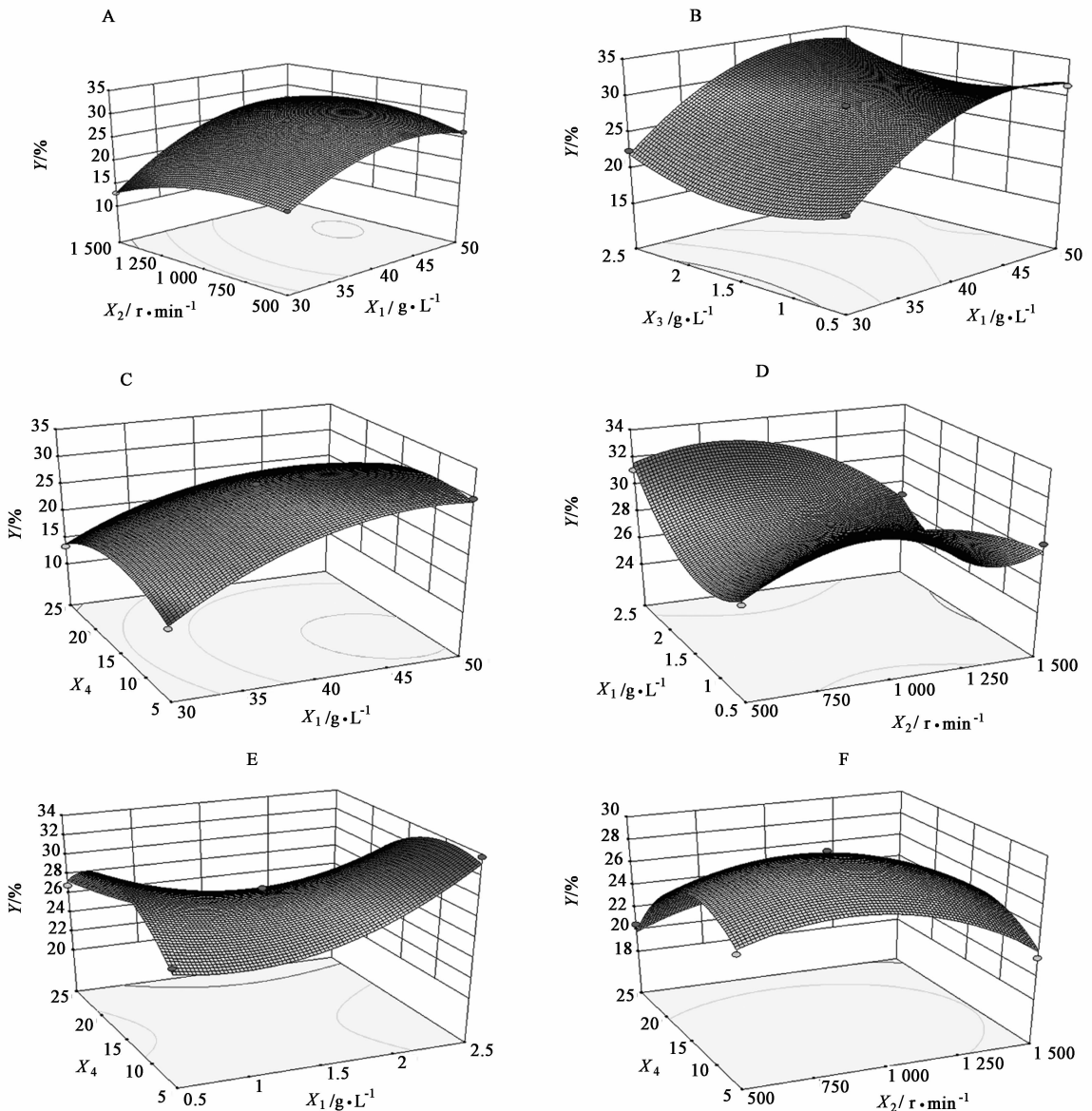


图 3 各影响因素交互作用对丹参酮 II_A-PLGA 微球处方工艺的影响

大后减小,随着 PVA 质量浓度的增加先减小后变大,随着油水相体积比的减小先变大后减小。根据响应面曲线预测最佳处方工艺为 PLGA 质量浓度 $44.29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,流动相流速 $825.68 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,PVA 质量浓度 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,油水相体积比 1:7.86。

表 3 微球处方工艺回归模型方差分析

方差来源	SS	<i>f</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	836.83	14	59.77	144.41	<0.000 1
X_1	360.91	1	360.91	871.96	<0.000 1
X_2	13.21	1	13.21	31.91	0.000 1
X_3	3.84	1	3.84	9.28	0.010 1
X_4	61.61	1	62.61	151.26	<0.000 1
X_1X_2	10.40	1	10.40	25.13	0.000 3
X_1X_3	4.225×10^{-3}	1	4.225×10^{-3}	0.010	0.921 2
X_1X_4	10.99	1	10.99	26.55	0.000 2
X_2X_3	7.45	1	7.45	18.01	0.001 1
X_2X_4	1.39	1	1.39	3.36	0.091 5
X_3X_4	31.14	1	31.14	75.23	<0.000 1
X_1^2	109.04	1	109.04	263.45	<0.000 1
X_2^2	43.75	1	43.75	105.70	<0.000 1
X_3^2	46.91	1	46.91	113.34	<0.000 1
X_4^2	87.23	1	87.23	210.74	<0.000 1
残差	4.97	12	0.41		
失拟差	4.86	10	0.49	9.46	0.099 4
纯误差	0.10	2	0.051		
总差	841.80	26			

注: $P < 0.001$ 差异极显著; $P < 0.05$ 差异显著。

2.7 验证试验 按优选的处方工艺制备 3 批丹参酮 II_A-PLGA 微球,显示表面光滑圆整无黏连(图 4),粒径均一,平均粒径 $2.338 \mu\text{m}$,PDI 指数 0.328(图 5),载药量 1.20%,包封率 89.57%,综合评价 36.24%,与预测值 36.06% 相对误差较小,RSD 均 <3%,说明建立的模型合理有效,实验值与预测值吻合良好。

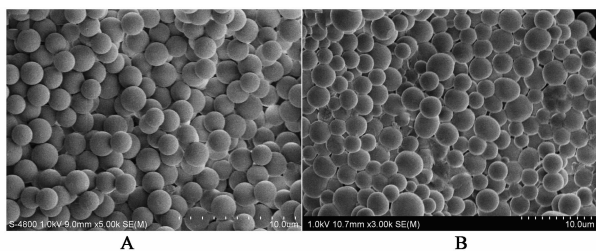


图 4 空白 PLGA 微球(A)和丹参酮 II_A-PLGA 微球(B)的 SEM

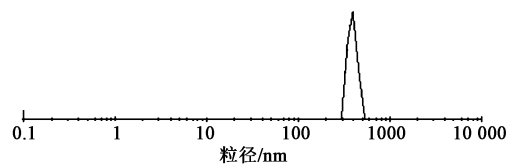


图 5 丹参酮 II_A-PLGA 微球的粒径分布

3 讨论

采用乳化-溶剂挥发法^[8]制备的丹参酮 II_A-PLGA 微球的载药量约 1.6%^[6-8]。本文利用 SPG 膜乳化法制备丹参酮 II_A-PLGA 微球,载药量约 1.2%,但包封率约 90%,可明显减少药物损失并提高产率,说明 SPG 膜乳化法用于制备单分散可控粒径的高包封率微球具有一定优势。

研究过程中发现,提高丹参酮 II_A 的加入量会造成聚乳酸微球中混存过载的丹参酮 II_A 橙红色结晶,这正是目前无论采用何种方法均难以提高丹参酮 II_A-PLGA 微球载药量的症结。原因可能是由于丹参酮 II_A 与 PLGA 化学结构存在差异,两者在固化过程中随着二氯甲烷挥发而析出的速率不同,致使某种程度上 PLGA 在固化时未能完全包裹析出的丹参酮 II_A。

[参考文献]

- [1] Oh D H, Balakrishnan P, Oh Y K, et al. Effect of process parameters on nanoemulsion droplet size and distribution in SPG membrane emulsification[J]. Int J Pharm, 2011, 404(1/2):191.
- [2] Doan T V P, Couet W, Olivier J C. Formulation and *in vitro* characterization of inhalable rifampicin-loaded PLGA microspheres for sustained lung delivery[J]. Int J Pharm, 2011, 414(1/2):112.
- [3] 林峰,石杰.丹参活性成分的药效药理作用[J].医学信息,2011,24(6):3813.
- [4] 秦海燕,索志荣.丹参水提物的体外抗氧化活性分析[J].西南科技大学学报,2012,27(2):82.
- [5] 王江峰,周卸来,袁红,等.丹参酮 II_A 对人肺癌细胞株 A549/CDDP 细胞增殖和凋亡的影响[J].实用肿瘤杂志,2010,25(6):685.
- [6] 王炎,冯年平,南忆蕾,等.丹参酮 II_A 聚乳酸载药纳米粒体内药物分布初步研究[J].中药材,2011,34(9):1392.
- [7] Lee K H, Liapi E, Buijs M, et al. Considerations for implantation site of VX₂ carcinoma into rabbit liver[J]. J Vasc Interv Radiol, 2009, 20(1):113.
- [8] 何杨,刘彬丽,李木子,等.快速膜乳化-溶剂萃取/挥发法制备水飞蓟宾 PLGA 微球的工艺优选[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(1):1.

[责任编辑 仝燕]