

# 20(S)-原人参二醇聚乳酸-羟基乙酸缓释微球的制备

陈玉玺, 王冰, 浦益琼, 蔡贞贞, 张彤\*

(上海中医药大学, 上海 201203)

**[摘要]** 目的:制备20(S)-原人参二醇聚乳酸-羟基乙酸微球。方法:以聚乙烯醇为乳化剂,乙酸乙酯和二氯甲烷混合液为油相,采用乳化溶剂挥发法制备20(S)-原人参二醇聚乳酸-羟基乙酸微球,在单因素试验基础上,以微球收率、包封率、载药量的综合评分为指标,通过正交试验设计优选处方工艺,并进行体外释放特性研究。结果:优选的处方工艺为O/W体积比1:50,PVA质量分数0.5%,投药量20 mg。制备的微球外观圆整,平均粒径约1.16 μm,收率35.58%,包封率41.76%,载药量19.61%。微球在前0.5 h内的释放量18.24%,至192 h时,累积释放量高达98.99%。结论:该优选处方和制备工艺稳定可行,制备的微球具有明显的缓释效果。

**[关键词]** 20(S)-原人参二醇;微球;聚乳酸-羟基乙酸;乳化溶剂挥发法

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0004-04

## Preparation of 20(S)-protopanaxadiol Poly(lactic Acid-glycolic Acid) Sustained Release Microspheres

CHEN Yu-xi, WANG Bing, PU Yi-qiong, CAI Zhen-zhen, ZHANG Tong\*

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare 20(S)-protopanaxadiol poly(lactic acid-glycolic acid) (PLGA) microspheres. **Method:** 20(S)-protopanaxadiol PLGA microspheres were prepared by emulsion-solvent evaporation method, with poly(vinyl alcohol) (PVA) as emulsifier, mixture of ethyl acetate and methylene chloride as oil phase. Based on single factor test, with composite score of microspheres yield, encapsulation efficiency and drug-loading as index, formulation technology was optimized by orthogonal test, then to investigate its *in vitro* release characteristics. **Result:** Optimized formulation technology was as following: volume ratio of O/W 1:50, the mass fraction of PVA 0.5%, feeding dosage 20 mg. These prepared microspheres had round appearance with average particle size of about 1.16 μm, microspheres yield of 35.58%, encapsulation efficiency of 41.76%, drug loading of 19.61%. *In vitro* release of these microspheres within the first 0.5 h was 18.24%, and cumulative release was up to 98.99% in 192h. **Conclusion:** This optimized formulation and preparation technology was stable and feasible. These prepared microspheres had significant sustained release effect.

**[Key words]** 20(S)-protopanaxadiol; microspheres; poly(lactic acid-glycolic acid); emulsion-solvent evaporation method

20(S)-原人参二醇[20(S)-PPD]为原人参二醇型皂苷的苷元,来源于人参、三七、西洋参等五加科人参属植物及葫芦科绞股蓝属植物绞股蓝。据报道,20(S)-PPD具有明显的抗抑郁作用,且毒副作用

用很小,但其难溶于水,致使口服生物利用度较低,临床疗效受到限制<sup>[1-5]</sup>。微球是一种新剂型,是固体或液体药物溶解和(或)分散在高分子材料基质中,形成的微小球状实体,粒径在1~250 μm<sup>[6]</sup>。微

**[收稿日期]** 20121016(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81173560);上海市教委项目(2010JW22);教育部新世纪人才计划项目(NCET-10-0944)

**[第一作者]** 陈玉玺,硕士,从事中药制药技术及体内过程研究,Tel:021-51323068,E-mail:yuxi59@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \*张彤,博士,教授,从事中药制药及中药分析技术研究,Tel:021-51322318,E-mail:zhangtdmj@yahoo.com.cn

球通过控制药物释放速率达到缓控释作用,也可调整微球粒径使药物具有靶向性。聚乳酸-羟基乙酸[PLGA]为微球常用载体材料,由于具有良好生物相容性、生物可降解性和较低毒性,已被美国FDA批准用于药物制剂和医用材料制备<sup>[7-8]</sup>。本实验以PLGA为载体材料,采用乳化溶剂挥发法制备20(S)-PPD缓释微球,通过单因素及正交试验优化制备工艺,并对制备的缓释微球进行收率、载药量、包封率及粒径等评价<sup>[9-13]</sup>。

## 1 材料

1100系列高效液相色谱系统(美国Agilent公司),DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂),Anke LXJT-II B型低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂),DZF-6050型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司),Naso-ZS 90型激光粒径测定仪(英国Malvern公司),XL-30ESEM型环境扫描电镜(荷兰Philips-FEI公司)。

20(S)-原人参二醇原料药(上海经科化学科技有限公司,批号20090216),20(S)-原人参二醇对照品(中国药品生物制品检定所,批号111747-200501),聚乳酸-羟基乙酸(PLGA,75:25,济南岱罡生物工程有限公司),聚乙烯醇1750±50(PVA1750,国药集团上海试剂有限公司),聚乙烯醇0588(PVA0588,上海紫一试剂厂),聚乙烯吡咯烷酮(PVPK23-27,上海晶纯实业有限公司),聚乙烯吡咯烷酮(PVPK29-32,上海晶纯实业有限公司),(辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇辛基苯基-聚乙烯二醇(IGEPAL CA-630,美国Sigma公司),泊洛沙姆188(Poloxamer 188,BASF公司),试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 PLGA微球的制备** 采用乳化溶剂挥发法制备。称取适量20(S)-PPD和PLGA,将PLGA溶解于适量有机溶剂中制得有机相(O相),于40℃水浴中,将有机相缓慢注入一定浓度的水相(W相)中,乳化适当时间后,将样品置于40℃水浴中,以适当速度磁力搅拌4h,使有机相充分挥发,离心(3000 r·min<sup>-1</sup>)10min,分离已固化的微球,并用水洗涤3次,最后将微球置于37℃真空干燥36h,即得白色微球,备用。

### 2.2 微球载药量和药物包封率的测定

**2.2.1 色谱条件** Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),流动相乙腈-水(88:12),流速1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温25℃,检测波长203 nm。理论塔板数按20(S)-PPD峰计算不低于

7 000。

**2.2.2 标准曲线的绘制** 取20(S)-PPD对照品约10 mg,精密称定,置10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液。分别将20(S)-PPD储备液稀释为质量浓度0.021 36,0.106 8,0.213 6,0.534 0,1.068 0 g·L<sup>-1</sup>的系列对照品溶液,分别精密吸取上述对照品溶液与储备液各20 μL注入高效液相色谱仪,按2.2.1项下色谱条件进行测定,记录峰面积,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程 $Y = 13\ 004X + 40.405$ ( $r = 0.999\ 6$ ),表明20(S)-PPD质量浓度在0.021 36~1.068 0 g·L<sup>-1</sup>呈良好线性关系。

**2.2.3 样品测定** 称取20(S)-PPD微球5 mg,精密称定,加二氯甲烷0.5 mL涡旋,充分破坏微球结构,加甲醇定容至5 mL,离心,收集上清液,用0.45 μm微孔滤膜滤过,按2.2.1项下色谱条件测定药物含量,计算微球载药量和包封率。

$$\text{载药量} = (\text{微球中药量} / \text{干燥后微球总量}) \times 100\% ;$$

$$\text{包封率} = (\text{实际载药量} / \text{理论载药量}) \times 100\%$$

**2.3 单因素试验考察** 按2.1项下方法制备微球,以微球收率为指标,分别考察PVA质量分数、乳化速度及PLGA质量浓度等因素对空白微球制备工艺的影响。

**2.3.1 乳化速度** 称取PLGA 100 mg,溶于1 mL二氯甲烷中制得O相,将O相缓慢注入0.1% PVA1750(80 mL)W相中,考察不同乳化速度下(2 000,1 700,1 300,850 r·min<sup>-1</sup>)对微球制备工艺的影响,按微球收率=(干燥后微球总量/原料药和PLGA总量)×100%计算微球收率,结果分别为0.98%,5.99%,7.28%,67.91%。表明当乳化速度850 r·min<sup>-1</sup>时,所得微球的粒径较大,不符合微球的要求;当乳化速度在1 700~2 000 r·min<sup>-1</sup>时,微球的收率较低。故确定乳化速度1 300 r·min<sup>-1</sup>。

**2.3.2 PLGA质量浓度** 分别称取PLGA 100,200,300,400 mg,固定乳化速度(1 300 r·min<sup>-1</sup>)及其他条件不变分别制备微球,结果收率分别为35.14%,47.56%,36.17%,34.64%。表明当PLGA质量浓度为200,300,400 g·L<sup>-1</sup>时,W相表面有大量团块状的物体存在,得到的成品肉眼可见粒径大,不符合微球的粒径要求。故选择PLGA质量浓度100 g·L<sup>-1</sup>。

**2.3.3 油相选择** 固定乳化速度1300 r·min<sup>-1</sup>,乳化时间5 min,其他条件同2.3.1项下,分别选择乙酸乙酯-二氯甲烷(1:4)、甲醇-二氯甲烷(1:4)、丙

酮-二氯甲烷(1:4)、二甲亚砜-二氯甲烷(1:4)、二氯甲烷为 O 相制备微球,结果收率分别为 45.18%, 1.80%, 16.73%, 31.34%, 43.03%。故选择乙酸乙酯-二氯甲烷(1:4)为混合油相。

**2.3.4 水相类型** 预试验发现以聚乙烯吡咯烷酮为 W 相时,效果较聚乙烯醇好。分别选用 PVA1750, PVA0588, PVPK23-27, PVPK29-32 为 W 相进行微球制备试验。将 PLGA 100 mg 溶解于 1 mL 乙酸乙酯-二氯甲烷混合溶剂(1:4)中制得 O 相,缓慢注入 80 mL 0.25% 的各 W 相中乳化,按 2.1 项下方法制备微球。结果微球收率依次为 17.23%, 29.78%, 0.40%, 5.58%。故选定 PVA0588 为 W 相。

**2.3.5 O/W 体积比** 选择 PVA0588 为水相,其他条件同 2.3.4 项,分别于 O/W 体积比为 1:50, 1:80, 1:150, 1:200 条件下制备微球,计算微球收率分别为 68.01%, 49.50%, 47.69%, 24.15%。故选择 O/W 体积比为 1:50。

**2.3.6 PVA 质量分数考察** PVA 水溶液浓度太高会浑浊,故选择 PVA 质量分数分别为 0.1%, 0.5%, 1%, 2% 条件下,固定 O/W 体积比 1:50,其他条件同 2.3.4 项制备微球,计算微球收率分别为 75.44%, 70.66%, 70.14%, 57.53%。虽然 PVA1750 质量分数为 2%, 1% 时收率高,但肉眼可见很多尘埃状物质混在里面。故选用质量分数 0.5% 的 PVA1750 溶液作为 W 相。

**2.3.7 药物在油相中溶解度** 量取选定的混合油相乙酸乙酯-二氯甲烷(1:4)1 mL,加入过量 20(S)-PPD 药物达到过饱和状态,涡旋 30 s,过滤,取 50  $\mu$ L 于 5 mL 量瓶,用甲醇定容,微孔滤膜过滤,HPLC 测定药物含量。结果药物在油相中溶解度 32.76  $g \cdot L^{-1}$ 。表明,将 100 mg PLGA 溶解于 1 mL 乙酸乙酯-二氯甲烷(1:4),加入 20(S)-PPD 原料药约 30 mg 时,溶液出现浑浊,即在制备微球时,加入 20(S)-PPD 质量应 < 30 mg。

**2.4 正交试验优化处方** 在单因素试验基础上,选择对微球收率有明显影响的 O/W 体积比、PVA0588 质量分数、投药量为考察因素,以微球收率、包封率及载药量为考察指标,对指标进行综合评价,通过正交试验优化工艺条件。综合评分 = 收率  $\times$  0.3 + 包封率  $\times$  0.4 + 载药量  $\times$  0.3。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

直观分析显示 O/W 体积比对处方工艺的影响最大,其次是 PVA 质量分数,投药量影响最小。方

表 1 20(S)-原人参二醇聚乳酸-羟基乙酸微球处方工艺正交试验因素水平

水平	A		B		C	
	O/W 体积比	PVA0588 质量分数/%	投药量/mg			
1	1:50	0.5	15			
2	1:80	0.25	20			
3	1:150	0.1	25			

表 2 20(S)-原人参二醇聚乳酸-羟基乙酸微球处方工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D (空白)	收率 /%	包封率 /%	载药量 /%	综合评分
1	1	1	1	1	39.14	37.51	12.56	30.51
2	1	2	2	2	40.10	39.01	16.23	32.50
3	1	3	3	3	32.04	31.60	19.76	28.18
4	2	1	2	3	40.63	42.47	17.46	34.41
5	2	2	3	1	21.31	18.65	17.53	19.11
6	2	3	1	2	8.90	8.81	12.91	10.07
7	3	1	3	2	3.61	3.29	18.27	7.88
8	3	2	1	3	10.53	10.20	12.68	11.04
9	3	3	2	1	2.78	2.00	12.02	5.24
$K_1$	30.397	24.267	17.207	18.287				
$K_2$	21.197	20.883	24.050	16.817				
$K_3$	8.053	14.497	18.390	24.543				
R	22.344	9.770	6.843	7.726				

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	756.612	2	7.491	>0.05
B	147.689	2	1.462	>0.05
C	80.267	2	0.795	>0.05
D(误差)	101.01	2		

差分析表明 A, B, C 因素均对综合评分无显著性的影响。确定最佳工艺组合为  $A_1B_1C_2$ , 即 O/W 体积比 1:50, PVA 质量分数 0.5%, 投药量 20 mg。

**2.5 验证试验** 按优选的处方及工艺制备 3 批 20(S)-PPD 微球(每批样品量 42 mg),按 2.2 项下方法测得微球平均载药量 19.61% (RSD 1.89%), 平均包封率 41.76% (RSD 5.57%), 平均收率 35.58% (RSD 4.12%)。将适量制得的微球混悬于 0.02% 吐温 80 溶液中超声 1 min,使其均匀分散,采用激光粒度分析仪测定微球的粒径。结果 3 批 20(S)-PPD 微球的平均粒径 1.16  $\mu$ m。采用扫描电镜观察微球表面形态,将 20(S)-PPD 微球用适量去离

子水分散到硅片上,挥发干燥后,镀金,电镜中观察微球的形状,大小和表面形态。结果见图1。表明优化的微球制备工艺稳定、重复性好。

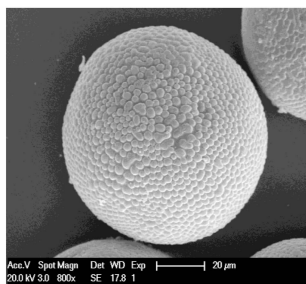


图1 20(S)-原人参二醇聚乳酸-羟基乙酸微球扫描电镜下表面形态( $\times 800$ )

**2.6 体外释放考察** 称取适量微球(含药约2 mg),用10 mL释放介质(pH 7.4磷酸盐缓冲液,1% IGEAL CA-630和4%泊洛沙姆188)置于15 mL具塞玻璃试管中,在37℃恒温水浴振荡器上以100 r·min<sup>-1</sup>振荡,定时取出全部释放液,并补充10 mL新鲜释放介质。按2.2.1项下色谱条件测定释放介质中20(S)-PPD含量,计算微球中药物的累积释放量。释放曲线见图2。

$$Q = \frac{C_i V + \sum_0^i C_i V'}{WF} \times 100\%$$

式中 $Q$ 为药物的累积释放量, $C_i$ 为各时间点药物浓度, $V$ 为释放介质体积, $V'$ 为取样体积, $W$ 为微球质量, $F$ 为微球中药物含量。

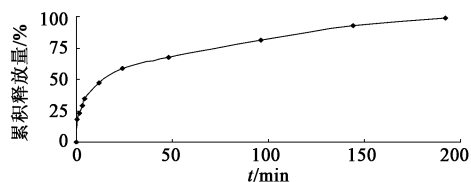


图2 20(S)-原人参二醇聚乳酸-羟基乙酸微球体外释放曲线

由图2可知,微球在前0.5 h内的释放量18.24%,符合2010年版《中国药典》规定;至192 h时,累积释放量高达98.99%,基本释放完全,具有一定的缓释效果。

### 3 讨论

二氯甲烷具有低沸点、水溶性低的特点,是采用乳化溶剂挥发法制备聚合物微球的理想有机溶剂。本实验选用乙酸乙酯-二氯甲烷为混合油相时,微球收率最高,但乙酸乙酯沸点较高,故应适当调小其用量以减少微球固化时间,所以选定乙酸乙酯-二氯甲烷(1:4)为混合油相。本试验选用聚乳酸-羟基乙酸

为载体材料,采用单因素试验结合正交试验优化20(S)-PPD微球的处方和制备工艺,制得的3批微球表面光滑、流动性好、粒径均一、载药量较为理想、封装率较好,其缓释作用有助于持续发挥作用,提高药效,但尚需对其体内释药性能进行研究,为开发新型制剂提供实验依据。

### [参考文献]

- [1] 惠永正,杨子荣,杨志奇,等. 20(S)-原人参二醇在制备抗抑郁药物中的应用,中国:CN1895256A[P]. 2007-01-17.
- [2] Xu C, Teng J, Chen W, et al. 20(S)-protopanaxadiol, an active ginseng metabolite, exhibits strong antidepressant-like effects in animal tests [J]. Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry, 2010, 34(8):1402.
- [3] 张文静,蔡兵,吴卢飞,等. 20(S)-原人参二醇对嗅球损毁抑郁模型大鼠抗抑郁作用研究[R]. 上海:第五届中国中医药实验动物科技交流会,2009.
- [4] Changjiang Xu, Jijun Teng, Weidong Chen, et al. 20(S)-protopanaxadiol, an active ginseng metabolite, exhibits strong antidepressant-like effects in animal tests [J]. Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry, 2010, 34(8):1402.
- [5] 韩美华,陈婧,陈士林,等. 20(S)-原人参二醇药质体的制备及体外评价[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7):842.
- [6] 陈庆华,张强. 药物微囊化新技术及应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:110.
- [7] 高科攀,陈庆华. 聚酯类微球注射剂体外加速释放试验方法的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(7):150.
- [8] 王静,吴运景,徐效义. 生物降解乙交酯与丙交酯共聚物缓释中药大黄蛰虫栓的生物相容性研究[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(7):1331.
- [9] 刘晓睿. 布比卡因微球的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2005.
- [10] 臧远芳,傅春升,孙洪胜. 新鱼腥草素钠乳酸-羟基乙酸共聚物微球的制备工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):49.
- [11] 蒋朝军,杨清敏,胡筱菲,等. 新型利培酮 PLGA 微球的制备及体外释放研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(2):126.
- [12] 陈永顺,陈黎. 水飞蓟宾明胶微球的制备及体外释放[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24):23.
- [13] 李祥,陈志良. 塞来昔布微球的制备及体外释放考察[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(11):918.

[责任编辑 全燕]