

三七总皂苷联合淫羊藿苷壳聚糖微球的制备工艺

苏韶, 李娜, 田景振*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 制备三七总皂苷联合淫羊藿苷壳聚糖微球, 研究制备工艺参数对载药微球的药物包封率的影响。方法: 以壳聚糖为载体, 采用乳化交联法制备三七总皂苷联合淫羊藿苷壳聚糖微球。在单因素考察的基础上, 以包封率和载药量为指标采用正交试验设计优选最佳制备工艺。结果: 最佳制备工艺条件为选取乳化剂质量分数4%, 壳聚糖质量分数4%, 油水比8:1, 搅拌速度400 r·min⁻¹。结论: 所得载药微球外表形态良好, 包封率高, 工艺稳定。

[关键词] 三七总皂苷; 淫羊藿苷; 壳聚糖; 制备工艺; 正交设计

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0030-04

Preparation Technology of Total Saponins from *Panax notoginseng* Combined with Icariin Chitosan Microspheres

SU Ming, LI Na, TIAN Jing-zhen*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare total saponins of *Panax notoginseng* combined with icariin chitosan microspheres (PNS-ICA-CS-MS) and study influence of preparation technology parameters on drug encapsulation efficiency of PNS-ICA-CS-MS. **Method:** PNS-ICA-CS-MS was prepared by emulsion crosslinking method with chitosan as carrier. Based on result of single factor test, optimum preparation technology was optimized by orthogonal design method with drug loading and encapsulation efficiency as indexes. **Result:** Optimum preparation technology conditions were the concentration of emulsifier 4%, the concentration of chitosan 4%, proportion of oil-water 8:1 and stirring speed 400 r·min⁻¹. **Conclusion:** PNS-ICA-CS-MS were good shape and high encapsulation rate and its technology was stable.

[Key words] total saponins of *Panax notoginseng* (PNS); icariin (ICA); chitosan; preparation technology; orthogonal design

三七总皂苷(PNS)是五加科人参属植物三七的主要有效活性成分, 含有多种单体皂苷, 可通过对神经元蛋白的影响而保护损伤的神经元^[1-2], 修复诱导骨髓间质干细胞分化^[3]。淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim.、箭叶淫羊藿 *E.*

sagittatum (S. et Z) Maxim.、柔毛淫羊藿 *E. pubescens* Maxim. 或朝鲜淫羊藿 *E. koreanum* Nakai 的干燥叶^[4]。淫羊藿苷(ICA)是淫羊藿茎叶中提取的总黄酮的主要有效成分, 具有促进人成骨细胞增殖和分化的作用^[5]。经初步研究发现, 三七总皂苷和淫羊藿苷多维组合具有促进成骨细胞和神经生长的作用。为增强疗效, 延长作用时间, 缩短骨折愈合的时间, 可将这2种组合药物做成具有缓释作用的微球, 以控制药物的释放速度, 达到长效的目的, 避免反复给药的不便。

1 材料

淫羊藿苷(纯度90%, 南京泽朗医药有限公司), 三七总皂苷(纯度92%, 云南云科药业有限公司)

[收稿日期] 20110611003

[第一作者] 苏韶, 硕士研究生, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 0531-89628597, E-mail: suming0926@hotmail.com

[通讯作者] * 田景振, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究, Tel: 0531-89628597, E-mail: tianjingzhen@163.com

司),人参皂苷 Rb_1 对照品(批号 110704-200921,中国药品生物制品检定所),淫羊藿苷对照品(批号 110737-200415,中国药品生物制品检定所),壳聚糖(CS,脱乙酰度 $\geq 90.0\%$,国药集团化学试剂有限公司),液体石蜡、脱水山梨醇酐单油酸酯(天津富宇精细化工有限公司),其余试剂均为分析纯。

DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义宏华仪器设备有限公司),BS-110S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),JJ-1 型增力电动搅拌器(金坛市医疗仪器厂),ZK-92A 型电热真空干燥器(上海实验仪器有限公司),BA300 型光学显微镜及显微摄像仪(Motic 厦门奥迪实业集团有限公司),1200 型高效液相色谱仪(美国安捷伦)。

2 方法与结果

2.1 三七总皂苷联合淫羊藿苷壳聚糖微球的制备

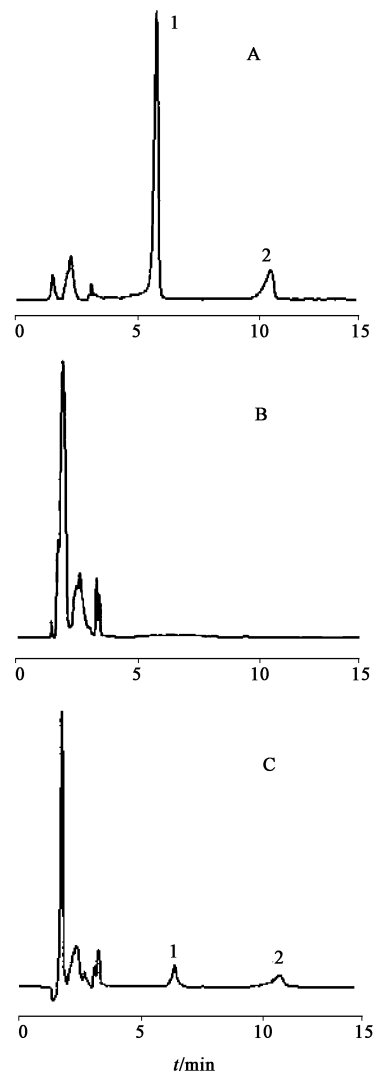
精密称取一定量的壳聚糖溶于 1% 乙酸溶液中,分别精密称取一定量三七总皂苷及淫羊藿苷,加入到上述溶液中,40 °C 恒温水浴磁力搅拌,使其充分溶解,构成水相;油相液体石蜡;乳化剂脱水山梨醇酐单油酸酯(span-80)。在持续搅拌的条件下,用注射器向含有一定比例乳化剂的油相中逐滴加入水相,乳化 30 min 后,缓缓加入一定量戊二醛饱和甲苯溶液,交联固化 90 min。静置,倾去上层乳液,依次用石油醚,2% 亚硫酸氢钠清洗微球,丙酮脱水,抽滤,真空干燥,得棕黄色粉末。

2.2 微球药物包封率与载药量的测定

2.2.1 色谱条件 ASM-Kromasil- C_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μ m),流动相乙腈-水(30:70~34:66),流速 1.0 mL \cdot min $^{-1}$,检测波长 203 nm,进样量 20 μ L,以人参皂苷 Rb_1 和淫羊藿苷为对照品。得 Rb_1 对照品、淫羊藿苷对照品、空白微球和含药微球的色谱图(图 1)。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密称取 60 °C 干燥至恒重的人参皂苷 Rb_1 对照品 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 Rb_1 对照品溶液。分别取上述对照品溶液 0.5,1,1.5,2,2.5 mL 置 5 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,进样分析。以峰面积对人参皂苷 Rb_1 质量浓度进行线性回归,得回归方程 $Y = 16\,260 X - 1\,528.8$ ($R^2 = 0.999\,3$),说明人参皂苷 Rb_1 在 0.1~0.5 g \cdot L $^{-1}$ 线性关系良好。

精密称取在 105 °C 干燥至恒重的淫羊藿苷对照品 5 mg,置于 5 mL 量瓶中,加色谱甲醇充分溶解,定容,摇匀,即得淫羊藿苷对照品溶液。将上述对照



A. 对照品;B. 空白微球;C. 载药微球;
1. 淫羊藿苷;2. 人参皂苷 Rb_1

图 1 三七总皂苷联合淫羊藿苷壳聚糖微球 HPLC

品溶液依次稀释成 27.5, 35.0, 42.5, 50.0, 57.5, 65.0, 72.5 mg \cdot L $^{-1}$ 系列对照品溶液。以峰面积对淫羊藿苷质量浓度进行线性回归,得回归方程为 $Y = 46\,005 X - 168.45$ ($R^2 = 0.999\,2$),淫羊藿苷在 27.5~72.5 mg \cdot L $^{-1}$ 线性关系良好。

2.2.3 精密度试验 分别将 0.3 g \cdot L $^{-1}$ 人参皂苷 Rb_1 溶液,0.05 g \cdot L $^{-1}$ 淫羊藿苷溶液按 2.2.1 项下测定峰面积,连续测定 5 次,计算精密度,结果人参皂苷 Rb_1 与淫羊藿苷的精密度 RSD 均 $< 2\%$,表明精密度良好。

2.2.4 回收率试验 精密称取已知准确含量的载药壳聚糖微球 150 mg,共 6 份,分别置于 5 mL 量瓶中,依次加入高、中、低 3 种不同质量浓度的人参皂苷 Rb_1 及淫羊藿苷对照品溶液,甲醇定容,涡旋震荡

10 min, 超声 2 h, 滤过, 取 20 μL 进样, 按标准曲线方程计算其平均回收率分别为 100.37% (RSD 1.29%), 100.07% (RSD 1.60%)。结果见表 1, 2。

表 1 人参皂苷 Rb_1 回收率试验

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.247	0.135	0.381	99.7	100.37	1.29
2	0.245	0.135	0.382	100.5		
3	0.245	0.250	0.501	101.2		
4	0.244	0.250	0.503	101.8		
5	0.246	0.361	0.596	98.2		
6	0.246	0.361	0.612	100.8		

表 2 淫羊藿苷回收率试验

No.	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.152	0.135	0.289	100.7	100.07	1.60
2	0.150	0.135	0.278	97.5		
3	0.149	0.250	0.394	98.7		
4	0.149	0.250	0.405	101.5		
5	0.151	0.361	0.516	100.8		
6	0.150	0.361	0.517	101.2		

2.2.5 包封率与载药量的测定 将干燥微球研成粉末, 精密称取 50 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容。将其密封, 涡旋震荡 30 min, 超声 2 h, 滤过, 按 2.2.1 项下测定微球中药物的含量。

$$\text{载药量} = \frac{\text{微球中药物质量}}{\text{含药微球质量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{微球中药物含量}}{\text{理论药物含量}} \times 100\%$$

2.3 单因素考察微球制备工艺

2.3.1 乳化剂质量分数考察 固定其他条件, 在油相中分别加入质量浓度 2%, 3%, 4%, 5%, 6% 的 span-80, 制备微球。结果显示, 当乳化剂质量分数 < 2% 时, 制备过程乳化困难, 乳滴大小不一, 所得微球形态不规则, 粒径分布不均匀。当乳化剂质量分数 > 5% 时, 微球清洗困难。

2.3.2 乳化时间 固定其他条件, 控制乳化时间分别为 15, 30, 45, 60, 75 min, 制备微球。分散时间 < 15 min 乳化不完全, 有较多大乳滴, 制得的微球粒径不均一; 分散时间 > 30 min 后, 分散时间对微球形态粒径分布影响不大。

2.3.3 搅拌速度 固定其他条件, 在转速分别为 100, 200, 300, 400, 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下制备微球, 当乳化搅拌速度 < 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 壳聚糖溶解乳化不完全, 有大量粒径较大乳滴, 所得微球粒径较大, 大小

不一; 转速 > 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 微球粒径显著减少, 并随着转速提高粒径减小, 粒径分布趋向均匀; 转速 > 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 粒径分布并无明显变化, 粒径显著变小, 不符合实际要求。

2.3.4 油水比 固定其他条件, 油水比取 1:1, 5:1, 10:1 制备微球。当油水比 < 1:1 时, 乳化困难, 体系黏度较大, 壳聚糖溶液不能很好的分散, 所得微球形较差, 分布不均匀; 当油水比高于 5:1, 制备时乳化容易, 制得微球形态良好。随着油水比的增大, 微球的粒径变小, 分布均匀。

2.3.5 壳聚糖质量分数 固定其他条件, 以壳聚糖质量浓度分别为 1%, 3%, 5% 制备微球。结果当壳聚糖质量分数 < 1% 时, 以黏度太小, 不易成球, 得到微球形状差, 粘连严重; 在 3% 时, 制备的微球形态较好, 粒径分布均匀; > 5% 时, 因黏度较大, 制备困难, 所得微球大小不均一。

2.3.6 交联时间 固定其他条件, 交联时间分别为 30, 60, 90, 120 min 制备微球, 90 min 时微球就已制备成功, 再延长交联时间微球并无变化。更长的交联时间会造成药物损失, 所以确定微球交联时间为 90 min。

2.3.7 PNS 与 ICA 投量比 前期试验研究中, 通过观察对小鼠成骨细胞的增殖分化的影响, 初步确定了 PNS 与 ICA 的药物最佳配伍比例为 5:2。现固定其他条件, 加入 PNS-ICA 投药量分别为 1:1, 2:1, 3:1, 5:1, 8:1 制备微球, 结果 PNS-ICA 载药量分别为 1:5, 2:3, 2:1, 8:3, 7:2, 投药量之比为 5:1 时, 其载药量与最佳配伍比例较相符。

2.4 正交试验设计优化处方 在工艺及处方考察的基础上, 选取了乳化剂质量分数 (A)、壳聚糖质量分数 (B)、油水比 (C) 和搅拌速度 (D) 为因素, 每个因素考察 3 个水平, 进行正交设计, 以三七总皂苷和淫羊藿苷的包封率为指标进行加权评分, 二者权重各 50%, 采用 $L_9(3^4)$ 正交实验优化处方。因素水平表见表 3, 正交试验及结果见表 4, 方差分析结果见表 5。

由结果看出, 各因素作用主次为 $C > A > D > B$ 。表中的方差分析表明油水比对微球的制备有显著性意义。从直观分析得知最佳制备工艺组合为 $A_2B_3C_1D_3$, 即选取乳化剂质量分数 4%, CS 质量分数 4%, 油水比 8:1, 搅拌速度 400 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.5 验证试验 根据优选的制备工艺及处方, 制备 3 批微球, 测定微球包封率及载药量, 观察外观形态及粒径。验证性试验表明, 最佳制备工艺重现性良

表3 三七总皂苷联合淫羊藿苷壳聚糖微球制备工艺正交试验因素水平

水平	A 乳化剂质量 分数/%	B 壳聚糖 质量分数/%	C 油水比	D 搅拌速度 /r·min ⁻¹
1	3	2	8:1	200
2	4	3	10:1	300
3	5	4	12:1	400

表4 三七总皂苷联合淫羊藿苷壳聚糖微球制备工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	三七总皂 淫羊藿苷		加权 评分
					苷包封率/ %	包封率 /%	
1	1	1	1	1	18.24	46.95	63.35
2	1	2	2	2	14.21	27.78	40.00
3	1	3	3	3	18.62	22.63	37.75
4	2	1	2	3	19.36	39.69	56.45
5	2	2	3	1	16.72	25.27	39.15
6	2	3	1	2	68.16	39.91	92.50
7	3	1	3	2	4.36	23.67	28.40
8	3	2	1	3	50.43	34.24	73.45
9	3	3	2	1	17.76	18.94	33.20
K ₁	47.033	49.400	76.433	45.233			
K ₂	62.700	56.867	43.217	53.633			
K ₃	45.017	54.483	35.100	55.883			
R	17.683	5.083	41.333	10.650			

表5 加权评分方差分析

因素	SS	f	F	P
A	562.212	2	13.688	
B(误差)	41.072	2	1.000	
C	2 877.672	2	70.064	
D	189.045	2	4.603	<0.05

注: $F_{(\alpha=0.05)} = 19.00$, 以因素 B 作为误差项进行统计分析。

好。在光学显微镜下观察其外观形态, 结果表明所得载药微球成球性好, 外观圆整, 表面光滑, 分散性和流动性好, 粒径分布狭窄, 50 ~ 80 μm 的微球占 91.3%, 平均粒径为 $(63.71 \pm 1.86) \mu\text{m}$; 三七总皂苷包封率、载药量分别为 $(68.74 \pm 0.693)\%$, $(16.32 \pm 0.155)\%$; 淫羊藿苷包封率、载药量分别为 $(44.24 \pm 0.87)\%$, $(3.3 \pm 0.161)\%$ 。

3 讨论

本试验采用乳化交联法制备三七总皂苷联合淫羊藿苷壳聚糖微球, 经戊二醛交联固化得到的微球结构较致密, 球形及大小分布较理想。交联剂选

用的是戊二醛的饱和甲苯溶液。戊二醛水溶液在油相中也会形成乳液, 与壳聚糖乳液混在一起, 会使壳聚糖乳滴发生聚并, 交联速度明显减慢, 而选用戊二醛的饱和甲苯溶液, 因为甲苯溶液可以溶解在油相中, 进入乳液体系后, 戊二醛从油相逐渐渗透到壳聚糖小乳滴中参加反应^[6]。

骨缺损导致的骨不连和延迟愈合一直是困扰骨科临床治疗的难题。传统的骨缺损治疗正向着基于生物材料和骨组织工程的方向转变, “生长因子 + 支架材料”骨修复模式成为攻克这一难题的理想选择^[7]。本课题组前期试验表明, PNS 和 ICA 多维组合具有促进成骨细胞和神经生长的作用, 现将其二者共同制成缓释制剂, 拓宽了微球制备的研究思路。研究发现纳米羟基磷灰石具有很好的骨诱导性, 并在促进成骨细胞分化、新生骨血管化等发面具有其他物质无法比拟的优越性能^[8]。将本试验研制的微球, 载入羟基磷灰石柱体中形成一种带药的医疗器械, 为临床治疗骨折不愈提供一种理想的骨修复模式。

[参考文献]

[1] 卢忠朋, 王乃平, 钟振国. 三七皂苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 诱导的 NG108-15 细胞损伤的保养作用 [J]. 中医药学刊, 2004, 22(5): 872.

[2] 李志强, 雷君. 脊髓损伤早期 Fos 蛋白表达变化及三七总皂苷的影响 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2002, 8(2): 104.

[3] 撒亚莲, 李海标. 三七总皂苷诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞 [J]. 中山医科大学报, 2002, 23(6): 409, 437.

[4] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 306.

[5] 殷晓雪, 陈仲强, 党耕町, 等. 淫羊藿苷对人成骨细胞增殖与分化的影响 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4): 289.

[6] 胡雪, 魏炜, 雷建都, 等. T 型微通道装置制备尺寸均一壳聚糖微球 [J]. 过程工程学报, 2008, 8(1): 130.

[7] 华锦明, 蔡丽君. 骨组织工程支架及相关问题研究进展 [J]. 中国骨肿瘤骨病, 2004, 4(2): 80.

[8] 叶成红, 奚延斐. 纳米羟基磷灰石在骨科的应用及其抗癌性能的研究进展 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 36(12): 7097.

[责任编辑 仝燕]