

三七总皂苷白蛋白微球的制备工艺

吴静澜, 陈红汝, 陈白霜, 张永萍*
(贵阳中医学院 药学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的:探索以三七总皂苷为原料制备白蛋白微球的可行性。方法:以加热固化法制备微球,通过正交试验考察白蛋白用量、超声乳化时间、固化温度、固化时间等因素,优选出最佳制备工艺,用光学显微镜及电子扫描显微镜进行形态研究,高效液相色谱法测定包封率。结果:最佳工艺为白蛋白用量 300 mg,超声乳化时间 15 min,固化温度 105 ℃,固化时间 20 min。结论:以三七总皂苷为原料制备白蛋白微球具有一定的可行性。

[关键词] 三七总皂苷;白蛋白微球;正交试验;制备工艺

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0017-04

Preparation Technology of Albumin Microspheres for Total Saponins from *Panax notoginseng*

WU Jing-lan, CHEN Hong-ru, CHEN Bai-shuang, ZHANG Yong-ping*

(Department of Pharmacy, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the preparation technology of albumin microspheres with total saponins from *Panax notoginseng* as raw material. **Method:** Microspheres were prepared by thermal curing method, optimized preparation process by orthogonal test, investigated the amount of albumin, time of phacoemulsification, temperature and time of curing and so on, morphological study by optical microscope and electron scanning microscope, determinate entrapment efficiency by HPLC. **Result:** the amount of albumin was 300 mg, time of phacoemulsification was 15 min, temperature of curing was at 105 ℃, time of curing was 20 min. **Conclusion:** It is feasible that prepare albumin microspheres with panax notoginseng saponins as raw material.

[Key words] total saponins from *Panax notoginseng*; albumin microspheres; orthogonal test; preparation technology

椎板切除术是脊柱外科最常用的手术方式,但术后大量的瘢痕粘连可引起医源性椎管狭窄使疼痛复发,也给再次手术带来困难和危险。防止椎板切除术后硬膜周围瘢痕粘连形成仍是目前骨科领域亟待解决的难题之一^[1]。目前市场上应用的防粘连药物多为屏障隔离机制,如透明质酸、玻璃酸、羧甲基

纤维素钠等。而此类药物均需在彻底止血的情况下才能发挥作用,但是椎管手术等不易制止骨面渗血,故效果较差。三七总皂苷(PNS)具有抗血栓、抗炎、镇痛、抗菌等作用,具有良好的促纤溶作用与抗纤维化瘢痕形成的作用,应用于临床治疗各种出血疾病,软组织损伤及颅脑外伤、冠心病、心绞痛、高胆固醇血症^[2]。白蛋白微球制剂(albumin microspheres)是人或动物血清白蛋白与药物一起制成的一种球状制剂^[3]。将 PNS 制成的三七总皂苷白蛋白微球(PNS-BSA-MS),由于其为蛋白类,与人体组织的亲和性好,而且 PNS-BSA-MS 为一定粒度的微球,具有润滑椎体,阻隔各种细胞的增生、细胞间质的合成和沉积作用,因此 PNS-BSA-MS 应用于椎板切除术有望解

[收稿日期] 20110506(002)

[第一作者] 吴静澜,副教授,硕士研究生导师,从事药物新制剂新技术与新剂型研究, Tel: 0851-56501305, E-mail: lanawu1073@sina.com

[通讯作者] *张永萍,教授,硕士研究生导师,从事药物新制剂新技术与新剂型研究, Tel: 0851-5652346, E-mail: gyzhyp@yahoo.com.cn

决术后硬膜周围瘢痕粘连形成的问题。

本试验采用加热固化法制备 PNS-BSA-MS,用正交试验考察了白蛋白用量、超声乳化时间、固化温度、固化时间等因素,优选出最佳的制备工艺。

1 材料

Waters 高效液相色谱仪(威玛龙色谱数据工作站), Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), XSP-8F-0400 型生物显微镜(梧州奥卡), JSM-6490LV 型电子显微镜(日本电子), INCA-350 型 X 射线能谱仪(日本电子), AE/240 型电子分析天平(上海梅特勒仪器有限公司), DF-1 型热式磁力搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), TDL-5A 型低速主动平衡离心机(湖南星科科学仪器公司)。

对照品:三七皂苷 R₁(批号 110745-200517, 供含量测定用)、人参皂苷 Rg₁(批号 110703-200424, 供含量测定用)、人参皂苷 Rb₁(批号 110704-200420, 供含量测定用)均购自中国药品生物制品检定所。PNS(昆明双星科技有限公司, 批号 090910, 纯度 88%), 乙腈为色谱纯, 甲醇为分析纯, 水为纯净水, 牛血清白蛋白(尚柏生物技术有限公司), 胃蛋白酶(美国西格玛公司), 蓖麻油(成都金山化学试剂有限公司), 山梨糖醇酐油酸酯(Span-80, 成都金山化学试剂有限公司), 磷酸二氢钾(西陇化工股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 微球的制备 根据文献[4-5]及预试验, 确定 PNS-BSA-MS 的基本制备工艺为取 PNS 适量(约 25 mg), 溶于 1 mL 蒸馏水中, 加入牛血清白蛋白(BSA)使溶解, 然后逐滴加入到 50 mL 强力搅拌蓖麻油中, 加 Span-80 2 mL, 继续搅拌 5 min, 超声均化, 得初乳。另取蓖麻油 50 mL, 加热至固化温度, 搅拌下将初乳加入, 恒温固化所需时间^[6]。冰水浴搅拌冷却, 离心, 倾去上层油液, 再用适量乙醚洗涤 3 次, 挥去乙醚, 即得 PNS-BSA-MS 微球^[7]。

2.2 正交设计筛选最佳处方工艺 在一定范围内对白蛋白的用量、超声乳化时间、固化温度、固化时间各取 3 个水平进行筛选, 按正交表 L₉(3⁴) 进行实验。见表 1。

2.3 微球形态、粒径及分布测定 在 10 × 40 倍光学显微镜下观察所制微球的色泽、表面等, 并测定 200 个微球的粒径及粒径分布, 求出平均粒径; 用电子显微镜观察微球的形态、圆整度。结果粒径在

1.21 ~ 21.69 μm, 3 批样品的粒径分布见图 1 ~ 3, 平均粒径分别为 6.93, 5.24, 5.25, 6.19, 5.93, 6.10, 6.80, 7.37, 7.99 μm; 电镜下观察微球, 结果表明微球分散性和流动性良好, 基本无粘连, 微球表面光滑, 球形完好, 见图 4。

表 1 PNS-BSA-MS 处方工艺正交试验因素水平

水平	A 白蛋白用量/mg	B 超声乳化时间/min	C 固化温度/℃	D 固化时间/min
1	200	10	105	10
2	300	15	125	20
3	400	20	145	30

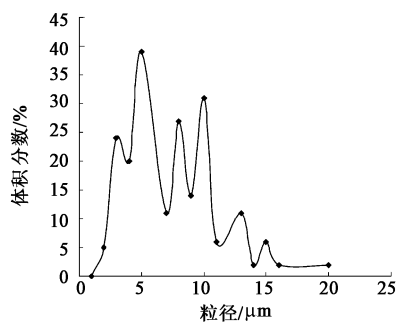


图 1 1 水平粒径分布

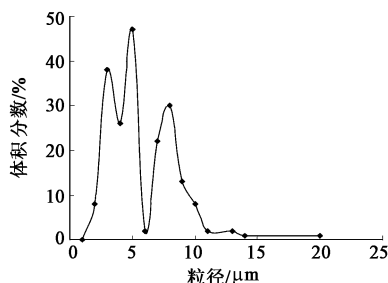


图 2 2 水平粒径分布

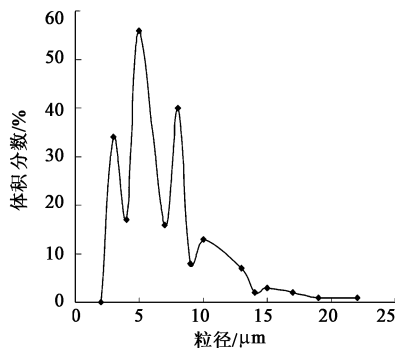


图 3 6 水平粒径分布

2.4 微球载药量的测定

2.4.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 203

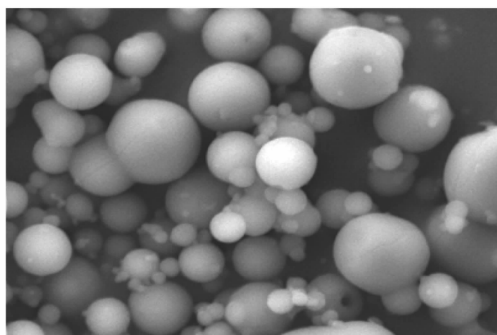


图4 PNS-BSA-MS 微球电镜扫描照片(×2 000)

nm,柱温 30 ℃。流动相乙腈-水按表 2 线性梯度洗脱^[8]。

表 2 PNS-BSA-MS 处方工艺流动相乙腈-水线性梯度洗脱

t/min	乙腈/%	水/%
0	20	80
30	46	54
40	55	45
45	55	45

2.4.2 标准曲线绘制 精密称取三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 3.25, 2.47, 2.14 mg; 用甲醇定容于 10 mL 的量瓶中。取三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 对照品溶液 2, 4, 6, 8, 10 μL, 进样测定, 峰面积(X), 与质量浓度(Y)做线性回归, 结果见表 3。

表 3 PNS-BSA-MS 处方工艺线性关系测定

指标成分	回归方程	r	线性范围/μg
三七皂苷 R ₁	Y = 245 387X + 637 406	0.999 2	0.650 ~ 3.250
人参皂苷 Rg ₁	Y = 221 010X + 15 100	0.999 9	0.490 ~ 2.470
人参皂苷 Rb ₁	Y = 196 930X + 228 120	0.999 3	0.428 ~ 2.140

2.4.3 精密度试验 取对照品溶液于测定条件下进样 10 μL, 并重复 5 次以 3 种成份峰面积分别计算三七皂苷 R₁, 人参皂苷 Rg₁, 人参皂苷 Rb₁ RSD 分别为 0.93%, 0.83%, 2.77%。

2.4.4 回收率试验 分别精密称量已知含量的三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 同批微球样品约 25 mg 5 份, 加入 pH 2.5 的磷酸盐缓冲溶液 20 mL, 胃蛋白酶为 0.5% 10 mL, 温度为 (37 ± 0.5) ℃, 恒温振荡水解时间为 12 h, 水解使药物从微球中释放出来, 分别加入一定量的三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁, 水浴挥干, 用甲醇定容于 10 mL 的量瓶中并编号, 进样 10 μL。结果见表 4。

2.4.5 测定方法 精密称取微球约 50 mg, 加入 pH

表 4 三七皂苷白蛋白微球主要成分回收率试验

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率/%
三七皂苷 R ₁	0.45	0.46	0.89	96.70	99.1
	0.43	0.49	0.90	97.83	
	0.45	0.45	0.92	104.46	
	0.43	0.48	0.91	99.55	
	0.43	0.46	0.87	96.84	
人参皂苷 Rg ₁	0.70	0.74	1.43	97.57	97.8
	0.68	0.76	1.42	96.78	
	0.68	0.71	1.38	98.57	
	0.68	0.68	1.35	98.06	
	0.68	0.74	1.41	98.12	
人参皂苷 Rb ₁	0.73	0.68	1.38	96.28	98.0
	0.73	0.67	1.37	95.91	
	0.73	0.69	1.41	99.41	
	0.73	0.74	1.45	98.78	
	0.73	0.71	1.42	99.72	

2.5 的磷酸盐缓冲溶液溶液 8 mL, 胃蛋白酶为 0.5% 4 mL, 温度为 (37 ± 0.5) ℃, 恒温振荡水解时间为 12 h, 水解使药物从微球中释放出来, 并水浴挥干, 用甲醇定容于 10 mL 的量瓶中并编号, 并用 0.45 μm 的滤头滤过即得供试品溶液, 进样 10 μL, 记录高效液相色谱仪测得的峰面积, 带入回归方程得到三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 质量浓度, 按下式计算载药量及包封率。

$$\text{载药量} = \text{测得微球中药物质量} / \text{微球质量} \times 100\% \text{ [9]}$$

$$\text{包封率} = \text{微球中的药物含量} / \text{投药量} \times 100\% \text{ [10]} (\text{投药量} = \text{PNS 用量} \times \text{PNS 的纯度})$$

2.4.6 正交试验 结果见表 5。对试验结果进行直观分析, 确定影响因素的大小序是固化温度 > 超声乳化时间 > 白蛋白用量 > 固化时间; 最优处方 A₂B₂C₁D₂, 即白蛋白用量 300 mg, 超声乳化时间 15 min, 固化温度 105 ℃, 固化时间 20 min。

3 讨论

微球制备中乙醚洗涤微球的用量和次数可能会影响微球的载药量, 在后续试验中应予考察。根据资料胃蛋白酶水解时间为 2 h, 在实际操作测定载药量、包封率时可以延长为 12 h, 使微球能完全水解, 使药物释放完全。

三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 为三七的有效成分, 因此选择此 3 种成分作为该制剂的

表 5 PNS-BSA-MS 处方工艺正交试验

No.	A	B	C	D	三七皂苷 R ₁ /%	人参皂苷 R _{g₁} /%	人参皂苷 R _{b₁} /%	总载药量 /% ¹⁾	包封率 /%	粒径标准 偏差/S	综合 评分 ²⁾
1	1	1	1	1	1.638	2.002	4.614	8.254	50.8	6.93	70.0
2	1	2	2	2	1.600	1.706	5.007	8.313	46.9	5.24	73.5
3	1	3	3	3	1.638	2.233	4.468	8.339	51.1	5.25	75.3
4	2	1	2	3	1.413	2.447	3.621	6.491	48.9	6.19	63.7
5	2	2	3	1	3.125	2.119	2.803	8.047	89.1	5.93	87.4
6	2	3	1	2	2.038	2.489	5.190	9.717	95.6	6.10	96.4
7	3	1	3	2	1.600	1.622	2.800	6.022	89.4	6.80	76.9
8	3	2	1	3	1.656	2.600	2.566	6.822	97.4	7.37	82.3
9	3	3	2	1	1.825	1.910	2.632	6.367	69.2	7.99	67.7
K ₁	218.8	210.6	248.7	225.1							
K ₂	247.5	243.2	204.9	246.8							
K ₃	226.9	239.4	239.6	221.3							
R	9.6	10.9	14.6	8.5							

注: ¹⁾总载药量 = 三七皂苷 R₁% + 人参皂苷 R_{g₁}% + 人参皂苷 R_{b₁}%; ²⁾综合评分的总分为 100 分,其中总载药量占 40%,包封率占 40%,粒径标准偏差占 20%。

质量控制指标。本文采用高效液相色谱法对三七总皂苷白蛋白微球的有效成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 R_{b₁} 含量进行测定,并就该测定方法进行了方法学研究,研究表明,本法简单,重复性较好,可以得到满意的结果,但由于含量测定的方法为梯度洗脱,导致基线漂移,经过调整流动相比例与洗脱时间,得到了比较满意的洗脱方法。

[参考文献]

[1] 唐欣,杨述华. 预防椎板切除术后硬膜周围粘连的研究概况[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2003,13(12):754.
 [2] 沈映君. 中药药理学[M]. 上海:上海科技出版社,1997:120.
 [3] 钟延强,蒋雪涛,孙其荣. 白蛋白微球制剂[J]. 药学实践杂志,1995,13(4):208.
 [4] 杨秀岭,张志清,董立,等. 阿昔洛韦白蛋白微球的制备及体外释药[J]. 中国药学杂志,2000,35(3):171.

[5] 志清,杨秀岭,孙莉,等. 依托泊苷白蛋白微球的制备[J]. 中国药学杂志,2000,35(10):676.
 [6] 伍三兰,黄建耿,李高. 氟尿嘧啶白蛋白磁亚微球的制备及释药特性[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(7):522.
 [7] 石红欣,吴清,任天池,等. 制备工艺对槐定碱白蛋白微球体外释药特性的影响[J]. 北京中医药大学学报,2008,3(4):277.
 [8] 耿仕霞. HPLC 法测定复方三七注射液中三七总皂苷的含量[J]. 齐鲁药事,2006,2(4):216.
 [9] 崔福德. 药剂学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:380.
 [10] 兰婷,郝红,刘荣杰,等. 盐酸乌拉地尔 PLLA 微球的制备及性能研究[J]. 高校化学工程学报,2009,23(9):840.

[责任编辑 仝燕]