

超临界 CO₂ 抗溶剂法制备芹菜素微粒的工艺研究

薛 淼, 颜庭轩, 王志祥*, 黄德春, 王为彦

中国药科大学药学院 制药工程教研室, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 采用超临界 CO₂ 抗溶剂法制备芹菜素微粒, 以微粒的平均粒径为评价指标, 在单因素试验的基础上设计正交试验优选芹菜素微粒的制备工艺, 并考察其体外溶出速率。方法 对微粒进行粒度分布、扫描电镜 (SEM) 分析、傅里叶红外吸收光谱 (FTIR) 检测及差示扫描量热 (DSC) 法以验证优选的最佳工艺; 进行芹菜素原料与芹菜素优选工艺微粒的体外溶出测试。结果 正交试验得出的优选工艺条件: 丙酮及二甲基亚砷共溶剂比例为 24 : 1, 结晶温度 40 °C, 结晶压力 10 MPa, 溶液体积流量 2.0 mL/min, 芹菜素质量浓度 8 mg/mL; 在此条件下可制备得到粒径明显小于芹菜素原料的芹菜素微粒, SEM 显示芹菜素微粒呈不规则状; FTIR 与 DSC 观察结果表明芹菜素微粒未发生化学结构的改变; 体外溶出测试显示芹菜素优选工艺微粒的溶出速率明显高于原料药的溶出速率。结论 超临界 CO₂ 抗溶剂法可用于制备芹菜素微粒, 且可推测经处理后的芹菜素生物利用度提高, 为制备超细微粒提供参考。

关键词: 超临界抗溶剂法; 芹菜素; 微粒; 体积平均粒径; 共溶剂; 溶出速率; 生物利用度; 正交试验

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2014)11 - 1551 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.010

Preparation process of apigenin particles by supercritical CO₂ anti-solvent method

XUE Miao, YAN Ting-xuan, WANG Zhi-xiang, HUANG De-chun, WANG Wei-yan

School of Pharmaceutical Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To prepare the apigenin particles by supercritical CO₂ anti-solvent technology, to optimize the preparation process of apigenin particles on the basis of single factor experiments using the average particle size as evaluation index through orthogonal test design, and to investigate the *in vitro* dissolution rate. **Methods** The particle size distribution, scanning electron-microscope (SEM) analysis, infrared spectrum (IR), and differential scanning calorimetry (DSC) were used to validate the selected process. The external dissolution rates of apigenin ingredient and apigenin particles of the optimal process were tested to speculate the bioavailability of apigenin. **Results** The optimal process conditions by orthogonal test were set as follows: The proportion of acetone and dimethyl sulfoxide (DMSO) was 24 : 1, temperature was 40 °C, pressure was 10 MPa, solution volumetric flow rate was 2.0 mL/min, and mass concentration of apigenin was 8 mg/mL. Under the optimal conditions, the volume average particle size was obviously smaller than that of ingredient. And the shapes of apigenin were irregular. FTIR and DSC analyses showed that the chemical structure did not change. The results showed that the *in vitro* dissolution rate of apigenin particles of the optimal process was significantly larger than that of apigenin ingredient. **Conclusion** The supercritical CO₂ anti-solvent technology is feasible to prepare apigenin particles and promote its bioavailability, and it provides a reference basis for preparing ultrafine particles.

Key words: supercritical anti-solvent method; apigenin; particle; volume average particle size; co-solvent; dissolution rate; bioavailability; orthogonal test

芹菜素属于黄酮类化合物^[1], 具有抑制致癌物质的活性; 可作为治疗 HIV 和其他病毒感染的抗病毒药物; 为 MAP (mitogen-activated protein) 激酶

抑制剂; 治疗各种炎症; 可作为抗氧化剂; 具有镇静、安神、降压等作用。与其他黄酮类物质 (槲皮素、山奈黄酮) 相比具有低毒、无诱变性等特点。

收稿日期: 2013-12-03

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2012763); 大学生创新药物研制能力提高项目“国家级大学生创新创业训练计划项目”(J1030830)

作者简介: 薛 淼 (1987—), 女, 江苏盐城人, 硕士, 主要研究方向为制药工程学。Tel: 18017330532 E-mail: ashley1219@live.cn

*通信作者 王志祥 (1966—), 男, 教授, 博士生导师, 从事化工与制药工程领域教学与科研。

Tel: (025)83271258 E-mail: chinawzx@sohu.com

熔点 347~348 °C, 几乎不溶于水, 部分溶于热乙醇, 溶于稀 KOH 溶液。研究表明, 芹菜素为难溶性药物, 溶解度低, 在肝肠循环、口服吸收中存在生物利用度低的缺点, 将其制备成超细微粒, 微粒粒径小, 溶出速率高, 比表面积大, 可增强药物对胃肠黏膜的黏附, 从而提高其生物利用度, 增强疗效^[2]。

超临界抗溶剂 (supercritical anti-solvent, SAS) 法是一种新型的制粒技术, 其基本原理为将溶质溶于有机溶剂中形成溶液, 选择一种与溶剂互溶但不能溶解溶质的超临界流体 (常用 CO₂) 作为抗溶剂, 当抗溶剂与溶液接触时, 抗溶剂迅速扩散至溶剂, 使溶剂体积膨胀, 溶质在溶剂中的溶解度下降, 在极短的时间内形成较大的过饱和度, 溶质结晶析出粒径较小的微粒。该技术已成功用于制备布洛芬/EC-PVP^[3]、吡哌美辛^[4]、茶碱^[5]、阿莫西林^[6]、聚合原花青素^[7]、黄芩素^[8]等超细微粒。与传统的芹菜素制备方法: 醇提、萃取、色谱分离、结晶等相比, SAS 技术具有反应条件温和、颗粒粒径分布窄、生物组分不易失活、有机溶剂残留少等优点。本实验采用美国 Applied Separations 公司研发的 Helix 超临界结晶制粒系统制备芹菜素, 旨在研究 SAS 法制备芹菜素超细微粒的可行性, 以芹菜素超细微粒的体积平均粒径 (D_V) 为指标, 考察了溶液体积流量、结晶压力、结晶温度、芹菜素质量浓度对粒径的影响, 通过正交试验设计优选微粒制备工艺, 采用马尔文粒度仪、扫描电镜 (SEM)、傅里叶红外吸收光谱 (FTIR)、差示扫描量热 (DSC) 法和溶出速率测试对优选工艺的超细微粒进行表征, 为研究超临界 CO₂ 抗溶剂法制备芹菜素超细微粒提供参考。

1 仪器与材料

Helix 型超临界微粒制备系统、L-1500 高压输液泵 (美国 Applied Separations 公司); SDC-6 低温恒温槽 (南京星辰生物科技有限公司); TYW-2 空气压缩泵 (苏州市同一机电有限公司); MS2000 激光粒度仪 (英国 Malvern 公司); FT/IR-4100 傅里叶变换红外光谱仪 (日本 Jasco 公司); JSM-5900 SEM 扫描电镜 (日本电子公司); Netzsch DSC 204 差示扫描量热仪 (Netzsch Geraetebau GmbH)。

芹菜素原料 (质量分数 >98%), 西安康培基生物科技有限公司; 丙酮 (分析纯)、二甲基亚砜 (DMSO), 南京化学试剂有限公司; 蒸馏水; CO₂ (质量分数 >99%), 南京同广气体公司。

2 方法与结果

2.1 芹菜素超细微粒的制备工艺

将芹菜素溶于丙酮和 DMSO 的混合溶液, 配制成一定质量分数的溶液; SAS 过程^[9]: 检查系统的气密性, 将芹菜素溶液以设定的体积流量由高压输液泵输入结晶釜内; 启动结晶釜的加热器, 待釜内外温度达到预定值后, 将由低温恒温槽液化, 高压泵压缩并经预热器预热后的 CO₂ 从釜内通入结晶釜内; 待温度及压力稳定后, 打开釜顶出口, 调节微调阀至预定流速; 此时含有溶剂的超临界 CO₂ 经节流阀降温降压进入分离釜, 在分离釜中实现溶剂的回收, CO₂ 则经转子流量计排出; 泵完溶液后动态平衡 25 min 以洗脱溶剂残留, 最后关闭 CO₂ 进口阀, 将釜内气体排空后, 打开结晶釜取出微粒, 进行表征。

2.2 单因素试验

2.2.1 共溶剂比例的影响 芹菜素在丙酮中溶解度较小, 添加 DMSO 可提高芹菜素在共溶剂中的溶解度, 共溶剂进入釜内, DMSO 与超临界流体结合使溶液更快达到过饱和, 迅速结晶产生微粒。在结晶温度 40 °C, 结晶压力 10 MPa, 溶液体积流量 1 mL/min, 芹菜素质量浓度 6 mg/mL 的条件下, 考察了丙酮及 DMSO 共溶剂比例分别为 4:1、9:1、24:1、49:1 对芹菜素微粒 D_V 的影响, 所得芹菜素微粒的形貌皆为不规则形, D_V 分别为 4.159、3.576、3.696、3.997 μm 。结合丙酮及 DMSO 共溶剂比例为 9:1 时溶剂排干时间过长, 选择丙酮及 DMSO 共溶剂比例为 24:1, 可得到粒径较小、分布较均匀的芹菜素微粒。

2.2.2 结晶温度的影响 在结晶压力 10 MPa, 溶液体积流量 1 mL/min, 芹菜素质量浓度 6 mg/mL, 丙酮及 DMSO 共溶剂比例为 24:1 的条件下, 考察了结晶温度分别为 30、35、40、45、50 °C 对芹菜素微粒 D_V 的影响, 所得到的微粒 D_V 分别为 4.541、4.269、3.483、2.845、4.360 μm 。随着结晶温度的升高, 芹菜素微粒的 D_V 先减小后增大; 当温度达到 45 °C 时, 芹菜素微粒的 D_V 达到最小值 2.845 μm 。

2.2.3 结晶压力的影响 在结晶温度为 40 °C, 溶液体积流量 1 mL/min, 芹菜素质量浓度 6 mg/mL, 丙酮及 DMSO 共溶剂比例为 24:1 的条件下, 考察了结晶压力分别为 6、8、10、12、14 MPa 对芹菜素微粒 D_V 的影响, 所得到的微粒 D_V 分别为 4.398、3.734、2.983、3.299、4.132 μm 。表明, 随着结晶

压力的升高, 芹菜素微粒的 D_V 先减小后增大; 当压力达到 10 MPa 时, 芹菜素微粒的 D_V 达到最小值 2.983 μm 。

2.2.4 溶液体积流量的影响 在结晶压力 10 MPa, 结晶温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 芹菜素质量浓度 6 mg/mL, 丙酮及 DMSO 共溶剂比例为 24:1 的条件下, 考察了溶液体积流量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL/min 对芹菜素微粒 D_V 的影响, 所得到的微粒 D_V 分别为 3.013、3.267、3.983、4.328、4.603 μm 。随着溶液体积流量的升高, 芹菜素微粒的 D_V 逐渐增大。

2.2.5 芹菜素质量浓度的影响 在结晶压力 10 MPa, 结晶温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 溶液体积流量 1 mL/min, 丙酮及 DMSO 共溶剂比例为 24:1 的条件下, 芹菜素质量浓度达 10 mg/mL 后, 再增加其质量浓度芹菜素不易溶解, 且实验过程中易出现仪器喷嘴堵塞现象, 且粒径减小趋势减缓, 故考察了芹菜素质量浓度分别为 2、4、6、8、10 mg/mL 对芹菜素微粒 D_V 的影响, 所得到的微粒 D_V 分别为 4.797、4.326、3.483、3.194、3.061 μm 。随着芹菜素质量浓度的升高, 芹菜素微粒的 D_V 逐渐减小。

2.3 正交试验设计优选处方

超临界 CO_2 抗溶剂法所制备芹菜素微粒 D_V 与各制备工艺参数有关; 本实验以单因素试验为基础, D_V 为指标, 考察结晶温度 (A)、结晶压力 (B)、溶液体积流量 (C)、芹菜素质量浓度 (D) 4 个因素对微粒 D_V 的影响, 加入空白组, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计进行试验, 其因素水平见表 1, 其他工艺条件为 CO_2 排气流量 2.5 L/min, 丙酮和 DMSO 的体积比为 24:1。试验设计及结果见表 1, 方差分析见表 2。

根据直观分析与方差分析得出, 各因素对芹菜素微粒 D_V 的影响从大到小依次为 $A > B > D > C$, 即结晶温度 > 结晶压力 > 芹菜素质量浓度 > 溶液体积流量; 方差分析结果表明, 相对于空白列, 因素 A、B、D 具有显著性 ($P < 0.1$), 因素 C 不具有显著性。以芹菜素 D_V 为指标所得到的优选工艺组合为 $A_2B_3C_4D_4$, 即结晶温度 40 $^{\circ}\text{C}$, 结晶压力 10 MPa, 溶液体积流量 2.0 mL/min, 芹菜素质量浓度 8 mg/mL。在建立极差分析及方差分析的基础上, 对优选工艺组合 $A_2B_3C_4D_4$ 进行验证, 3 次验证试验得出的微粒 D_V 分别为 2.924、2.867、2.902 μm (RSD 为 0.992%), 结果表明, 由极差分析及方差分析得到的制备芹菜素微粒的优选工艺有效可靠。

表 1 $L_{16}(4^5)$ 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of $L_{16}(4^5)$ orthogonal test

试验号	A/ $^{\circ}\text{C}$	B/ MPa	C/ (mL·min ⁻¹)	D/ (mg·mL ⁻¹)	E (空白)	D_V / μm
1	35 (1)	6 (1)	0.5 (1)	4 (1)	(1)	4.435
2	35 (1)	8 (2)	1.0 (2)	6 (2)	(2)	4.269
3	35 (1)	10 (3)	1.5 (3)	8 (3)	(3)	4.116
4	35 (1)	12 (4)	2.0 (4)	10 (4)	(4)	3.871
5	40 (2)	6 (1)	1.0 (2)	8 (3)	(4)	3.731
6	40 (2)	8 (2)	0.5 (1)	10 (4)	(3)	3.029
7	40 (2)	10 (3)	2.0 (4)	4 (1)	(2)	3.187
8	40 (2)	12 (4)	1.5 (3)	6 (2)	(1)	4.099
9	45 (3)	6 (1)	1.5 (3)	10 (4)	(2)	3.558
10	45 (3)	8 (2)	2.0 (4)	8 (3)	(1)	3.357
11	45 (3)	10 (3)	0.5 (1)	6 (2)	(4)	3.293
12	45 (3)	12 (4)	1.0 (2)	4 (1)	(3)	4.174
13	50 (4)	6 (1)	2.0 (4)	6 (2)	(3)	4.317
14	50 (4)	8 (2)	1.5 (3)	4 (1)	(4)	4.012
15	50 (4)	10 (3)	1.0 (2)	10 (4)	(1)	3.301
16	50 (4)	12 (4)	0.5 (1)	8 (3)	(2)	4.129
K_1	16.691	16.041	14.886	15.808	15.192	
K_2	14.046	14.667	15.475	15.978	15.143	
K_3	14.382	13.897	15.785	15.333	15.636	
K_4	15.759	16.273	14.732	13.759	14.907	
R	2.645	2.376	1.053	2.219	0.729	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1.134	3	16.435	$P < 0.05$
B	0.960	3	13.913	$P < 0.05$
C	0.183	3	2.652	
D	0.767	3	11.116	$P < 0.05$
E (误差)	0.069	3		

$F_{0.05}(3,3)=9.28$ $F_{0.01}(3,3)=29.50$

2.4 优选工艺的微粒表征

2.4.1 粒径及形貌分析 采用马尔文 2000 激光粒度仪, 分别将芹菜素原料和由优选工艺制得的芹菜素微粒置于蒸馏水中进行超声分散, 待分散均匀后测定其粒径分布。可知芹菜素 D_V 由原料的 23.340 μm 减少到优选工艺的 2.861 μm 。采用高分辨场发射 SEM 观察颗粒的形貌, 结果见图 1, 芹菜素原料为不规则的颗粒状, 经处理过后的芹菜素微粒呈细小薄片状且粒径明显小于芹菜素原料。

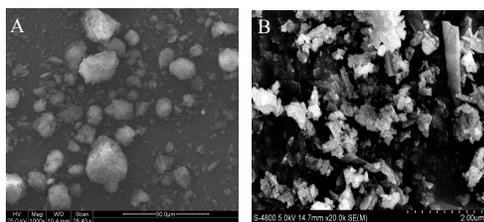


图 1 芹菜素原料 (A) 和优选工艺微粒 (B) 的 SEM 图
Fig. 1 SEM diagrams of apigenin ingredient (A) and apigenin particles of optimal process (B)

2.4.2 FTIR 检测 采用红外光谱仪通过 KBr 压片法测定芹菜素的 FTIR 光谱图, 结果见图 2, 可知经超临界 CO₂ 处理的芹菜素与芹菜素原料相比, FTIR 图未发生明显的变化, 表明芹菜素经过超临界 CO₂ 处理后未发生化学结果的变化。

2.4.3 DSC 分析 DSC 分析结果见图 3, 可知芹菜素的吸收峰在 364.3 °C, 经超临界 CO₂ 处理后的芹菜素微粒的吸收峰在 366 °C, 吸收峰的位置无明显变化。

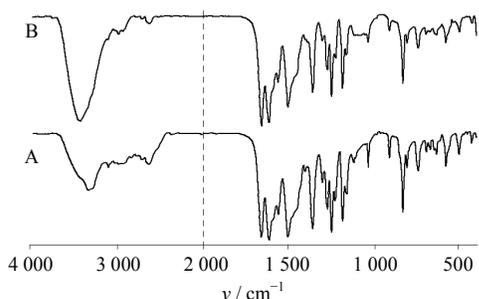


图 2 芹菜素原料 (A) 和优选工艺微粒 (B) 的 FTIR 图
Fig. 2 FTIR spectra of apigenin ingredient (A) and apigenin particles of optimal process (B)

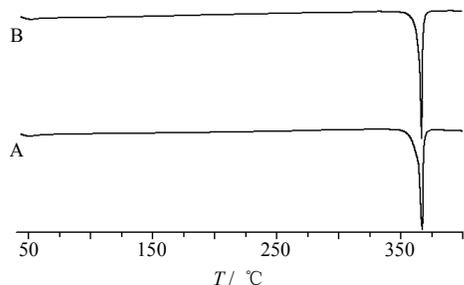


图 3 芹菜素原料 (A) 和优选工艺微粒 (B) 的 DSC 图
Fig. 3 DSC diagrams of apigenin ingredient (A) and apigenin particles of optimal process (B)

2.5 体外溶出速率测定

2.5.1 线性关系考察 取芹菜素 5 mg, 用甲醇^[10]溶解并在 50 mL 量瓶中定容, 得到质量浓度为 100 μg/mL 的储备液。分别量取 1、2、4、6、8 mL 储

备液于 100 mL 量瓶中用 pH 7.4 缓冲溶液定容得到 1~8 μg/mL 的溶液, 以缓冲溶液为空白样品, 于 274 nm 波长处测定吸光度 (A) 值。以 A 值 (Y) 对芹菜素质量浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程 $Y=0.0949X-0.0128$, $r=0.9999$, 结果表明, 芹菜素在 1~8 μg/mL 与 A 值线性关系良好^[11-12]。

2.5.2 溶出曲线的测定 溶出度测定按《中国药典》2010 年版二部附录 XC 中第二法, 以 pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液 900 mL 为溶出介质, 75 r/min 分别将芹菜素原料 10 mg 和等量药物的芹菜素超细微粒均匀撒于液面^[13], 在 5、10、15、20、30、45、60、90、120 min 分别取溶液 5 mL, 用 0.22 μm 滤膜滤过后, 于 274 nm 处测定 A 值, 按回归方程计算累积释放率。体外溶出实验结果见图 4, 经超临界 CO₂ 抗溶剂法处理过的芹菜素微粒的溶出速率明显高于芹菜素原料, 溶出度得到明显提高。

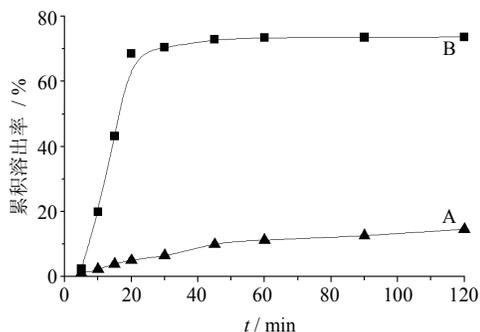


图 4 芹菜素原料 (A) 和优选工艺微粒 (B) 的体外溶出曲线

Fig. 4 Dissolution profiles of apigenin ingredient (A) and apigenin particles of optimal process (B)

3 讨论

固体药物的释放和溶出是被人体吸收和利用的前提, 溶出速率是确定口服固体制剂性能和衡量其质量的重要参数, 是一个影响人体生物利用度的药剂学方面的因素。本实验采用超临界 CO₂ 抗溶剂法制备芹菜素超细微粒, 以丙酮与 DMSO 为混合溶剂, 体积比为 24:1, 在 CO₂ 排气体积流量 3 L/min 的条件下, 采用正交试验设计优化芹菜素微粒的制备工艺, 得到结晶温度 40 °C, 结晶压力 10 MPa, 溶液体积流量 2.0 mL/min, 芹菜素质量浓度 8 mg/mL 的优选工艺。在此优选工艺的条件下得到的芹菜素 D_v 为 2.898 μm, 电镜显示得到的芹菜素微粒为分布均匀的不规则形。FTIR 与 DSC 结果表明经超临界 CO₂ 抗溶剂法处理后的芹菜素微粒的化学结构未发生变化。体外溶出测试结果则表明经超临

界 CO₂ 抗溶剂法处理后的芹菜素微粒溶出速率显著提高。本实验为研究如何提高芹菜素口服制剂的生物利用度提供了参考。

实验证明, 超临界 CO₂ 抗溶剂法制备芹菜素微粒可行, 在此实验基础上结合工艺阶段的合理设计进行更深入的研究可为如何提高芹菜素及黄酮类药物的生物利用度提供新的思路。

参考文献

- [1] 王海娣, 刘艾林, 杜冠华, 等. 芹菜素药理作用的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(18): 1561-1565.
- [2] 车尔玺, 姜同英, 王思玲, 等. 纳米晶体技术在水难溶性药物口服制剂中应用的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(12): 1003-1008.
- [3] 蔡锦源, 党蓓蕾, 王秋玲, 等. 超临界 CO₂ 抗溶剂法制备布洛芬/EC-PVP 缓释复合微粒 [J]. 药学学报, 2012, 47(6): 791-796.
- [4] Varughese P, Li J, Wang W, *et al.* Supercritical antisolvent processing of γ -indomethacin: Effects of solvent, concentration, pressure and temperature on SAS processed indomethacin [J]. *Powd Technol*, 2010, 201(1): 64-69.
- [5] Roy C, Vrel D, Vega-González A, *et al.* Effect of CO₂-antisolvent techniques on size distribution and crystal lattice of theophylline [J]. *J Supercritic Fluids*, 2011, 57(2): 267-277.
- [6] Montes A, Tenorio A, Gordillo M D, *et al.* Screening design of experiment applied to supercritical antisolvent precipitation of amoxicillin: Exploring new miscible conditions [J]. *J Supercritic Fluids*, 2010, 51(3): 399-403.
- [7] Yang L, Huang J M, Zu Y G, *et al.* Preparation and radical scavenging activities of polymeric procyanidins nanoparticles by a supercritical antisolvent (SAS) process [J]. *Food Chem*, 2011, 128(4): 1152-1159.
- [8] 黄娟, 颜庭轩, 王志祥, 等. 超临界 CO₂ 抗溶剂法制备黄芩素微粒的工艺研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 970-973.
- [9] 乐龙, 黄德春, 刘巍, 等. 超临界流体抗溶剂结晶技术在药物制粒领域中的应用 [J]. 药学进展, 2007, 31(12): 560-563.
- [10] 朱亮, 李盈. HPLC 法测定 Beagle 犬血浆中芹菜素的浓度 [J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(10): 1264-1265.
- [11] 郑阳, 张志丽, 王立红, 等. 菲诺贝特固体分散体制备工艺研究及比较 [J]. 中国药剂学杂志, 2012, 10(2): 46-52.
- [12] 刘雅莉, 袁文蛟, 刘小红, 等. 芹菜素固体分散体的制备及其体外溶出研究 [J]. 中国药剂学杂志, 2005, 3(2): 26-34.