

超临界 CO₂ 抗溶剂法制备黄芩素微粒的工艺研究

黄娟, 颜庭轩, 王志祥*, 黄德春, 刘尚德, 汤腾飞

中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 采用超临界 CO₂ 抗溶剂法制备黄芩素微粒, 以微粒的体积平均粒径为评价指标, 优化制备黄芩素微粒的工艺。**方法** 在单因素试验的基础上设计正交试验优选黄芩素微粒的制备工艺, 并对优选的工艺组合进行了粒度分布、扫描电镜分析、红外吸收光谱法 (IR) 及差示扫描量热法 (DSC) 的表征。**结果** 正交试验得到的优选工艺条件: 溶液体积流量 0.75 mL/min, 结晶压力 8 MPa, 结晶温度 48 °C, 黄芩素质量浓度 4 mg/mL; 在此工艺条件下制备得到的黄芩素微粒的大小明显小于黄芩素原料, 扫描电镜显示制备出的黄芩素微粒为不规则形状; IR 和 DSC 结果表明黄芩素微粒的化学结构没有发生变化, 热力学性质发生了变化, 并且经处理过的黄芩素的纯度变高。**结论** 超临界 CO₂ 抗溶剂法制备黄芩素微粒可行, 为制备超细微粒提供参考依据。

关键词: 超临界 CO₂; 抗溶剂法; 黄芩素; 微粒; 体积平均粒径

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)08-0000-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.08.000

Research on preparation of baicalein particles by supercritical CO₂ anti-solvent technology

HUANG Juan, YAN Ting-xuan, WANG Zhi-xiang, HUANG Dei-chun, LIU Shang-de, TANG Teng-fei

School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China

Abstract: **Objective** Baicalein particles were prepared by using supercritical CO₂ anti-solvent technology. With volume average particle size as the evaluation index the preparation process of baicalein was optimized. **Methods** On the basis of single factor experiments orthogonal experimental design was used to optimize the preparation process of baicalein particles. The experiments such as particle size distribution, scanning electro microscope analysis (SEMA), infrared spectrum (IR) and differential scanning calorimetry (DSC) were used to analyze the particles. **Results** The orthogonal experimental optimization process conditions were set as follows: solution volumetric flow rate 0.75 mL/min, pressure 8 MPa, temperature 48 °C and mass concentration of baicalein 4 mg/mL. Under the optimum conditions, the volume average particle size was obviously smaller than the ingredient. And the shapes of baicalein were irregular. IR and DSC analysis showed that the chemical structure didn't change and the thermodynamic properties of baicalein might transfer. Meanwhile, the purity of baicalein became higher. **Conclusion** Supercritical CO₂ anti-solvent technology was feasible to prepare baicalein particles and it provided a reference basis for preparing ultrafine particles at the same time.

Key words: supercritical; anti-solvent; baicalein; particle; volume average particle size

黄芩素为黄酮类化合物, 是唇形科植物黄芩的主要有效成分之一。具有抗菌、抗病毒、抑制炎症反应、保肝、利胆、利尿、抗癌等作用, 有很好的临床应用价值^[1]。研究表明, 黄芩素因溶解度较低, 存在肝肠循环、口服吸收差、生物利用度较低等^[2]

缺点。超细化的黄芩素微粒粒径小, 比表面积大, 可增强药物对胃肠黏膜的黏附, 延长其在胃肠道内吸收时间, 从而利于提高药物吸收和生物利用度。

超临界 CO₂ 抗溶剂法 (supercritical anti-solvent, SAS)^[3] 作为一种新型绿色制备超细微粒的方法,

收稿日期: 2012-09-24

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

作者简介: 黄娟 (1987—), 女, 江苏泰兴人, 硕士, 主要研究方向为制药工程学。

Tel: (025)83271258 15365079935 E-mail: chinahuangjuan@126.com

*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的教学与科研。Tel: (025)83271258 E-mail: chinawzx@sohu.com

在化工、生物工程、医疗和制药等各个领域有着广泛的应用前景。SAS 法与传统的喷雾干燥、气流粉碎、研磨、冷冻干燥等方法相比具有产品粒径小、分布窄、无污染、生物成分不易失活等优点。超临界抗溶剂技术的基本原理是把溶质溶于有机溶剂中形成溶液,选择一种不能溶解溶质却与溶剂互溶的超临界流体(通常为 CO_2)作为抗溶剂,当抗溶剂与溶液接触时,抗溶剂迅速扩散到溶剂,使溶剂体积膨胀,溶质在溶剂中溶解度下降,在极短的时间内形成较大的过饱和度,使溶质结晶析出粒径较小的超细微粒。该技术已经成功的用于制备茶碱^[4]、吡啶美辛^[5]、阿莫西林^[6]、埃罗替尼、氟维司群^[7]、聚合原花青素^[8]等超细微粒。本实验采用美国 Applied Separations 公司研制的 Helix 超临界结晶制粒系统制备黄芩素微粒,考察了溶液体积流量、结晶压力、结晶温度和黄芩素质量浓度对体积平均粒径的影响,设计了 $L_9(3^4)$ 正交试验优化制备工艺,最后采用粒度仪、扫描电镜、红外吸收光谱(infrared spectrum, IR)和差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC)对优选工艺的微粒进行表征。

1 仪器与材料

Helix 超临界结晶制粒系统、L—1500 高压输液泵(美国 Applied Separations 公司);TYW—2 空气压缩机(苏州市同一机电有限公司);SDC—6 低温恒温槽(南京新辰生物科技有限公司);MS2000 激光粒度仪(英国马尔文公司);BS124S 分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];FT/IR—4100 傅立叶变换红外光谱仪(日本 JASCO 公司);S—4800 高分辨场发射扫描电镜(日本日立公司);Netzsch DSC 204 差示扫描量热仪(Netzsch Geraetebau GmbH)。

黄芩素(质量分数>98%,陕西慈缘生物技术有限公司);丙酮(分析纯)、乙醇(分析纯)南京化学试剂有限公司;蒸馏水(中国药科大学自制); CO_2 (质量分数>99%,南京上元工业气体厂)。

2 方法与结果

2.1 黄芩素微粒的制备

检查系统的气密性,打开釜顶 CO_2 的进口阀,启动结晶釜的加热器,待釜内外达到预定的温度后,将钢瓶中的 CO_2 经低温恒温槽冷却,由高压泵压缩并经预热器预热后,从釜顶通入结晶釜内。待温度和压力稳定后,打开釜底 CO_2 出口阀,并调节微调节阀至预定的体积流量。将黄芩素溶于丙酮和乙醇的

混合溶剂(丙酮和乙醇的体积比为 2:1)中配置成所需质量浓度的溶液,由高压输液泵以设定的体积流量从釜顶泵入结晶釜内,含有溶剂的 CO_2 经节流阀降压升温进入分离釜,在分离釜中实现溶剂的回收, CO_2 则经转子流量计排出,如此泵完溶液后再洗脱 20 min,最后关闭 CO_2 进口阀,将釜内气体排空后,打开结晶釜取出微粒,进行性能表征。

2.2 单因素试验

2.2.1 溶液体积流量的影响 在结晶压力 10 MPa,结晶温度 36 $^{\circ}\text{C}$,黄芩素质量浓度 6 mg/mL 的条件下,考察了溶液体积流量分别为 0.5、0.75、1.0、1.25、1.5 mL/min 对黄芩素微粒体积平均粒径的影响,结果体积平均粒径分别为 8.228、9.155、9.906、12.000、13.741 μm 。随着溶液体积流量的增大,黄芩素微粒的体积平均粒径逐渐增大。

2.2.2 结晶压力的影响 在结晶温度 36 $^{\circ}\text{C}$,溶液体积流量 1 mL/min,黄芩素质量浓度 6 mg/mL 的条件下,考察了结晶压力分别为 8、10、12、14、16 MPa 对黄芩素微粒体积平均粒径的影响,结果体积平均粒径分别为 9.050、9.906、10.671、11.563、12.284 μm 。随着结晶压力的增大,黄芩素微粒的体积平均粒径逐渐增大。

2.2.3 结晶温度的影响 在结晶压力 10 MPa,溶液体积流量 1 mL/min,黄芩素质量浓度 6 mg/mL 的条件下,考察了结晶温度分别为 32、36、40、44、48、52 $^{\circ}\text{C}$ 对黄芩素微粒体积平均粒径的影响,结果体积平均粒径分别为 13.956、9.906、9.866、8.642、8.150、10.966 μm 。随着结晶温度的升高,黄芩素微粒的体积平均粒径先减小后增大;当温度达到 48 $^{\circ}\text{C}$ 时,黄芩素微粒的体积平均粒径达到最小值 8.150 μm 。

2.2.4 黄芩素质量浓度的影响 在结晶温度 36 $^{\circ}\text{C}$,结晶压力 10 MPa,溶液体积流量 1 mL/min 的条件下,考察了黄芩素质量浓度分别为 2、4、6、8、10 mg/mL 对黄芩素微粒体积平均粒径的影响,结果体积平均粒径分别为 13.999、10.894、9.906、11.849、13.535 μm 。随着黄芩素质量浓度的增大,黄芩素微粒的体积平均粒径先减小后增大;当黄芩素质量浓度达到 6 mg/mL 时,黄芩素微粒的体积平均粒径达到最小值 9.906 μm 。

2.3 正交试验

2.3.1 正交试验设计 在单因素试验的基础上,以体积平均粒径为指标,选择溶液体积流量(A)、结晶压力(B)、结晶温度(C)和黄芩素质量浓度(D)

4 个因素进行考察, 采用 $L_9(3^4)$ 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 排气体积流量 3 L/min, 丙酮和乙醇的体积比 2:1。试验设计及结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果					
Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test					
试验号	A/ ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	B/ MPa	C/ $^{\circ}\text{C}$	D/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	体积平均 粒径 / μm
1	0.50 (1)	8 (1)	40 (1)	4 (1)	8.659
2	0.50 (1)	10 (2)	44 (2)	6 (2)	9.277
3	0.50 (1)	12 (3)	48 (3)	8 (3)	8.472
4	0.75 (2)	8 (1)	44 (2)	8 (3)	7.997
5	0.75 (2)	10 (2)	48 (3)	4 (1)	8.218
6	0.75 (2)	12 (3)	40 (1)	6 (2)	9.513
7	1.00 (3)	8 (1)	48 (3)	6 (2)	8.075
8	1.00 (3)	10 (2)	40 (1)	8 (3)	9.456
9	1.00 (3)	12 (3)	44 (2)	4 (1)	8.560
K_1	26.408	24.731	27.628	25.437	
K_2	25.728	26.951	25.834	26.865	
K_3	26.091	26.545	24.765	25.925	
R	0.680	2.220	2.863	1.428	

表 2 方差分析				
Table 2 Variance analysis				
方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
B	0.932	2	12.104	$P<0.1$
C	1.395	2	18.117	$P<0.1$
D	0.351	2	4.558	
A (误差)	0.077	2		

$F_{0.1}(2, 2)=9.00$ $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

2.3.2 正交试验结果分析 由直观分析及方差分析可知, 各因素对黄芩素微粒体积平均粒径的影响从大到小依次为 $C>B>D>A$, 即结晶温度>结晶压力>黄芩素质量浓度>溶液体积流量; 方差分析结果表明, 相对于因素 A, 因素 B、C 具有显著性 ($P<0.1$), 因素 D 不具有显著性。在试验范围内以体积平均粒径为指标所得到的优选工艺组合为 $A_2B_1C_3D_1$, 即溶液体积流量 0.75 mL/min, 结晶压力 8 MPa, 结晶温度 48 $^{\circ}\text{C}$, 黄芩素质量浓度 4 mg/mL。

2.3.3 优选工艺验证 在建立极差分析及方差分析的基础上, 对优选工艺组合 $A_2B_1C_3D_1$ 进行验证, 3

批验证试验的体积平均粒径分别为 6.757、6.681、6.814 μm (RSD 为 0.99%), 结果表明由极差分析及方差分析得到的制备黄芩素微粒的优选工艺可靠。

2.4 优选工艺的微粒表征

2.4.1 粒度分布及形态分析 采用马尔文 2000 激光粒度仪测量黄芩素微粒的粒度分布, 分别将黄芩素原料和优选工艺的微粒置于蒸馏水中超声分散, 待分散均匀后测定, 粒度分布见图 1。由图可知体积平均粒径由原料的 20.008 μm 减小到优选工艺的 6.681 μm , 且分布明显变窄。

采用高分辨场发射扫描电镜观察颗粒的形貌, 结果见图 2, 黄芩素原料和经处理过的黄芩素微粒均为不规则的形状, 且经处理过的黄芩素微粒的粒径明显小于黄芩素原料。

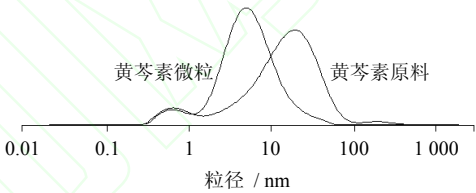
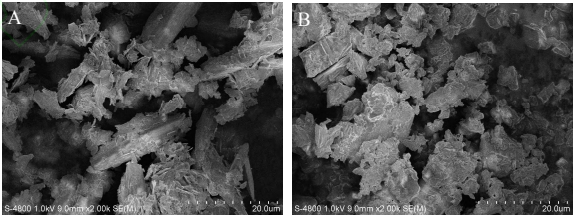


图 1 粒度分布图
Fig. 1 Size distributions of baicalein particles



A-黄芩素原料 B-黄芩素优选工艺微粒
A-baicalein ingredients B-baicalein particles of the optimal process

图 2 扫描电镜图
Fig. 2 Diagram of scanning electron microscopy

2.4.2 IR 和 DSC 结果分析 采用 KBr 压片法测定黄芩素的 IR, 结果见图 3-I, 由图可知经过超临界 CO_2 处理的黄芩素和黄芩素原料相比, IR 图没有发生明显的变化, 表明经超临界 CO_2 处理后黄芩素的化学结构没有发生变化。

DSC 结果见图 3-II, 由图可知黄芩素原料的吸热峰在 258.2 $^{\circ}\text{C}$, 经超临界 CO_2 处理过的黄芩素微粒的吸热峰为 265.2 $^{\circ}\text{C}$, 吸热峰的位置升高了 8 $^{\circ}\text{C}$, 热力学性质发生了变化, 且处理过后的黄芩素峰宽明显变窄, 说明经处理过黄芩素的纯度变高。

3 讨论

本实验以丙酮和乙醇为混合溶剂, 体积比 2:1,

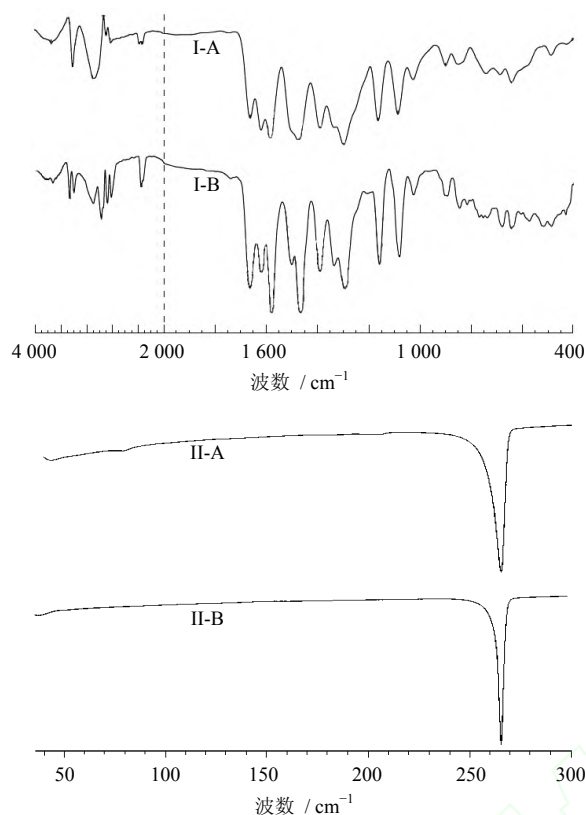


图3 黄芩素原料 (A) 和黄芩素优选工艺微粒 (B) 的 IR 图 (I) 和 DSC 图 (II)

Fig. 3 Infrared spectrograms (I) and diagrams of baicalein ingredients (A) and baicalein particles of the optimal process (B)

采用超临界 CO_2 抗溶剂法制备黄芩素微粒, 在 CO_2 排气体积流量 3 L/min 的条件下, 采用正交试验设计优化制备黄芩素微粒的工艺, 得到的优选条件为溶液体积流量 0.75 mL/min , 结晶压力 8 MPa , 结晶温度 $48 \text{ }^\circ\text{C}$, 黄芩素质量浓度 4 mg/mL 。优选工艺得到的黄芩素微粒较小的体积平均粒径为 $6.681 \mu\text{m}$, 电镜显示得到的黄芩素微粒为不规则的形状。IR 和 DSC 结果表明黄芩素微粒的化学结构没有发生变化, 热力学性质发生了变化, 处理过的微粒 DSC 吸热峰比原料高 $8 \text{ }^\circ\text{C}$, 且峰宽变窄, 表明经处

理过黄芩素的纯度变高。

本实验为进一步研究提高黄芩素口服制剂的生物利用度奠定基础。实验证明, 超临界 CO_2 抗溶剂法制备黄芩素微粒是可行的, 对这一方法进行更深入的研究可为制备超细微粒提供参考依据, 用于制备气雾剂等其他药物剂型。

参考文献

- [1] 高燕, 顾振纶, 蒋小岗, 等. 黄芩素药理学研究新进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1765-1767.
- [2] Liu J, Qiu L Y, Gao J Q, *et al.* Preparation, characterization and *in vivo* evaluation of formulation of baicalein with hydroxypropyl- β -cyclodextrin [J]. *Int J Pharm*, 2006, 312(1/2): 137-143.
- [3] 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.
- [4] Roy C, Vrel D, Vega-González A, *et al.* Effect of CO_2 -antisolvent techniques on size distribution and crystal lattice of theophylline [J]. *J Supercritical Fluids*, 2011, 57(2): 267-277.
- [5] 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]. *Powder Technology*, 2010, 201(1): 64-69.
- [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 Supercritical Fluids*, 2010, 51(3): 399-403.
- [7] Tien Y C, Su C S, Lien L H, *et al.* Recrystallization of erlotinib hydrochloride and fulvestrant using supercritical antisolvent process [J]. *J Supercritical Fluids*, 2010, 55(1): 292-299.
- [8] 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 Chemistry*, 2011, 128(4): 1152-1159.