

## • 药剂与工艺 •

## 正交试验设计优选九节龙皂苷 I 聚乳酸微球的制备工艺

程江雪<sup>1,2</sup>, 王 荣<sup>1</sup>, 王晓娟<sup>1\*</sup>, 严筱楠<sup>1</sup>, 唐志书<sup>2</sup>

1. 第四军医大学口腔医院 药剂科, 陕西 西安 710032

2. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046

**摘要:** 目的 筛选溶剂蒸发法制备九节龙皂苷 I 聚乳酸微球 (ADS-I-PLA-MS) 最佳工艺。方法 采用 HPLC-ELSD 测定方法, 以包封率和载药量为评价指标, W/O/W 溶剂蒸发法制备微球; 通过单因素和正交试验设计, 考察内水相九节龙皂苷 I (ADS-I) 甲醇溶液的质量浓度、ADS-I 甲醇溶液与聚乳酸 (PLA) 二氯甲烷溶液体积比、PLA 二氯甲烷溶液质量浓度和聚乙烯醇 (PVA) 体积等因素对 ADS-I-PLA-MS 包封率及载药量的影响。结果 溶剂蒸发法制备 ADS-I-PLA-MS 的最佳工艺条件为 ADS-I 甲醇溶液质量浓度为 8 mg/mL、ADS-I 甲醇溶液与 PLA 二氯甲烷溶液体积比为 1 : 13、PLA 二氯甲烷溶液质量浓度为 90 mg/mL、PVA 体积为 500 mL。结论 优选出的 ADS-I-PLA-MS 制备工艺合理可行。

**关键词:** 九节龙皂苷 I; 聚乳酸; 微球; HPLC-ELSD; 正交设计

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2012)10 - 1923 - 05

## Optimization on preparation technology of ardisioside-I polylactic acid microspheres by orthogonal design

CHENG Jiang-xue<sup>1,2</sup>, WANG Rong<sup>1</sup>, WANG Xiao-juan<sup>1</sup>, YAN Xiao-nan<sup>1</sup>, TANG Zhi-shu<sup>2</sup>

1. Department of Pharmacy, Stomatology Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

2. Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

**Abstract: Objective** To select the optimum conditions for the preparation of ardisioside-I polylactic acid microspheres (ADS-I-PLA-MS) by solvent evaporation method. **Methods** HPLC-ELSD was used for the evaluation with encapsulation efficiency (EE) and drug loading as indexes. Microspheres were prepared using W/O/W evaporation method. Through single factor and orthogonal tests, the effects of the concentration of inner-water ADS-I methanol solution, volume ratio of ADS-I methanol solution-PLA methylene chloride solution, concentration of PLA methylene chloride solution, and the volume of polyvinyl alcohol (PVA) on EE and drug loading were investigated. **Results** The optimum conditions for the preparation of ADS-I-PLA-MS were as follows: the concentration of ADS-I methanol solution 8 mg/mL, the volume ratio of ADS-I methanol solution-PLA methylene chloride solution 1 : 13, the concentration of PLA methylene chloride solution 90 mg/mL, and the volume of PVA 500 mL. **Conclusion** This optimized ADS-I-PLA-MS preparation technology is reasonable and feasible.

**Key words:** ardisioside-I (ADS-I); polylactic acid (PLA); microsphere; HPLC-ELSD; orthogonal design

九节龙 *Ardisia pusilla* A. DC. 为紫金牛科紫金牛属植物, 药用全草, 主要含三萜皂苷, 九节龙皂苷 I (ardisioside I, ADS-I) 可作为其标识性成分。ADS-I 对人脑胶质瘤细胞 U87<sup>[1]</sup>和 SHG-44<sup>[2]</sup>具有明显的抑制作用, 可引起胶质瘤细胞凋亡, 且不影响脑内正常胶质细胞, 具有广阔的开发前景。

ADS-I 的动物实验表明, *po* 给药后肠内仅能检测到 2 种代谢产物, 却无原形药物; 静脉给药后肠内既检测不到任何代谢产物, 也检测不到原形药物<sup>[3]</sup>。而原位给药方式可使药物直接作用于病灶部位, 减少系统化疗引起的不良反应, 提高药物疗效<sup>[4]</sup>。若将 ADS-I 制备成可植入缓释剂型, 绕过血脑屏障,

收稿日期: 2012-03-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30973952); 陕西省资源主导型产业关键技术 (链) 项目 (2011KTCL03-01)

作者简介: 程江雪, 女, 在读研究生, 研究方向为中药新剂型新工艺的应用研究。Tel: (029)84773998 E-mail: xueling\_jiaojiao@126.com

\*通讯作者 王晓娟 Tel: (029)84776189 E-mail: WXJYH231@fmmu.edu.cn

网络出版时间: 2012-07-18 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120718.1658.001.html>

直接作用于颅脑肿瘤部位,则可大大提高其生物利用率。本实验首先通过 ADS-I 与辅料的相互作用试验,单因素和正交试验设计,优选 ADS-I 聚乳酸微球(ADS-I-PLA-MS)<sup>[5]</sup>的制备工艺,为将 ADS-I 制备成可植入缓释剂型奠定基础。

## 1 仪器与材料

Waters 2695 色谱仪、Alltech ELSD 2000ES 型蒸发光散射检测器(美国 Alltech 公司),DL-720 超声仪(浙江石浦海天电子仪器厂),BT125D 十万分之一电子天平(Sartorius 公司),FJ-200 高速分散均质机(上海标本模型厂),LD5-10 型低速离心机(北京医用离心机厂),101-2 型电热鼓风干燥箱(北京科伟永兴仪器有限公司),WD-A 药物稳定仪(天津市药典标准仪器厂)。

ADS-I(药粉,批号 111028,质量分数大于 99%,实验室自制),聚乳酸(PLA,济南岱罡生物科技有限公司),聚乙烯醇(PVA,17-88,中国医药集团上海化学试剂公司),氯化钠(NaCl,分析纯,郑州派尼化学试剂厂),二氯甲烷(分析纯,天津市福晨化学试剂厂);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);水蒸气(实验室自制)。

## 2 方法与结果

### 2.1 ADS-I-PLA-MS 的制备

采用传统复乳溶剂蒸发法(也称液中干燥法)制备。精密称取一定量 PLA 溶于适量二氯甲烷中,超声使之充分溶解成一定质量浓度。精密移取一定量的 ADS-I 甲醇溶液,使 ADS-I 甲醇溶液与 PLA 二氯甲烷溶液形成一定比例,且二者体积之和约 4.5 mL,超声分散 60 s。快速磁力搅拌下加入高速分散均质机搅拌中的含有 0.5% PVA 的 1% NaCl 水溶液中,分散 15 min 后,将混悬液在 60 °C 下快速磁力搅拌蒸发有机溶剂。将挥干有机溶剂的混悬液在 2 500 r/min 转速下离心 10 min 后抽滤,水洗 3 次,真空干燥 3 d,即得 ADS-I-PLA-MS。

### 2.2 ADS-I 定量测定方法的建立

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Welch materials INC C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(75:25),体积流量 1.0 mL/min,检测器漂移管温度 82 °C,载气(压缩空气)体积流量 2.0 L/min。

**2.2.2 ADS-I 对照品溶液的配制** 称取 ADS-I 对照品 12.53 mg 置 50 mL 量瓶中,甲醇超声溶解,定容至 50 mL,即得 250.6 μg/mL ADS-I 对照品溶液。

**2.2.3 样品的处理** 精密称取约 100 mg ADS-I-PLA-MS,溶于 3 mL 二氯甲烷中,超声 15 min,使 PLA 充分溶解后,加 5 mL 甲醇,混合均匀,使 PLA 沉淀,2 500 r/min 转速下离心 10 min,滤过,甲醇洗涤,完全蒸发续滤液中溶剂,向其中加入甲醇,定容至 5 mL 量瓶中;过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。按照“2.2.1”项下色谱条件进行 HPLC-ELSD 测定。

**2.2.4 线性关系考察** 分别用 0.45 μm 微孔滤膜滤过“2.2.2”项下所配对照品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件,将对照品溶液进行 HPLC-ELSD 测定,进样量分别为 4、6、8、10、20 μL,以峰面积积分的自然对数为纵坐标(Y),其对应进样质量的自然对数为横坐标(X),进行线性回归,得回归方程  $Y=1.3116X+5.8972$ ,  $r=0.9999$ ,结果表明 ADS-I 在 1.00~5.01 μg 线性关系良好。

**2.2.5 专属性试验** 按照“2.2.1”项下色谱条件,将 ADS-I 空白对照溶液、ADS-I 对照品溶液和 ADS-I-PLA-MS 样品进行测定,考察色谱情况。结果在本色谱条件下,ADS-I 具有良好的吸收,对照无干扰,基线噪音小,色谱图见图 1。

**2.2.6 精密度试验** 精密吸取 250.6 μg/mL 对照品溶液 8 μL 重复进样 6 次,按上述色谱条件测定,计算得 ADS-I 峰面积的 RSD 为 1.1%。

**2.2.7 稳定性试验** 按照“2.1”项下制备方法制备 1 批载药微球,按照“2.2.3”项下样品处理方法处

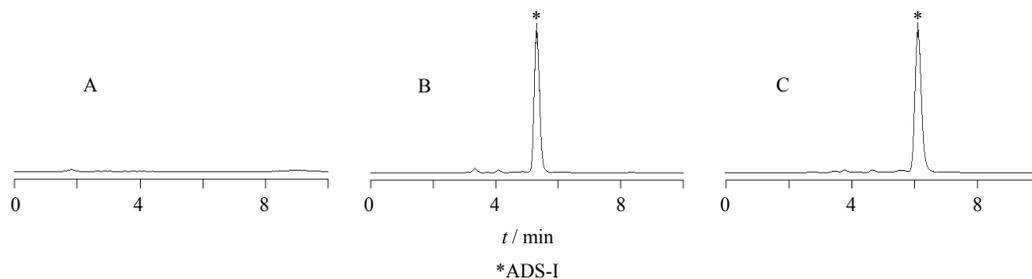


图 1 ADS-I 空白(A)、ADS-I 对照品(B)和 ADS-I-PLA-MS 样品(C)的 HPLC-ELSD 色谱图

Fig. 1 HPLC-ELSD chromatograms of ADS-I blank (A), ADS-I reference substance (B), and ADS-I-PLA-MS sample (C)

理样品后,精密吸取此样品溶液,分别在0、2、4、6、8、10 h 进样测定,进样量为30  $\mu$ L,计算得 ADS-I 峰面积的 RSD 为 1.2%,结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

**2.2.8 重复性试验** 精密称取同 1 批 ADS-I-PLA-MS 6 份,每份约 50 mg,按照“2.2.3”项下样品处理方法处理后,进样 30  $\mu$ L 进行测定,以外标两点法计算样品中 ADS-I 质量分数的 RSD 为 3.5%。

**2.2.9 回收率试验** 称取已测定载药量的 ADS-I-PLA-MS (ADS-I 为 0.62%) 6 份,每份 50 mg,分别加入 ADS-I 对照品 2.00 mg,按照“2.2.3”项下样品处理方法处理后,进样 10  $\mu$ L 进行测定,根据回归方程计算 ADS-I 的回收率,结果平均回收率为 99.20%,RSD 为 1.9%。

## 2.3 ADS-I 与 PLA、PVA 及 NaCl 的相互作用试验

**2.3.1 高温加速试验** 取 ADS-I 粉末分别与 PLA、PVA 按一定比例混合均匀;取 ADS-I 甲醇溶液与 PLA 二氯甲烷溶液、PVA 水溶液、NaCl 水溶液按

一定质量比混合均匀;置恒温烘箱内 60  $^{\circ}$ C 下放置 10 d,于第 10 天取样,观察样品外观、质量的变化。结果见表 1。

**2.3.2 高湿加速试验** 取 ADS-I 粉末分别与 PLA、PVA 按一定比例混合均匀,置称量瓶内摊成厚度 $\leq$ 10 mm,敞口;取 ADS-I 甲醇溶液与 PLA 二氯甲烷溶液、PVA 水溶液、NaCl 水溶液按一定质量比混合均匀;置相对湿度为 92.5%的恒湿干燥器内,室温(25  $^{\circ}$ C)下放置 10 d,于第 10 天取样,观察样品外观、质量的变化。结果见表 1。

**2.3.3 强光照射加速试验** 取 ADS-I 粉末分别与 PLA、PVA 按一定比例混合均匀,置称量瓶内摊成厚度 $\leq$ 10 mm,敞口;取 ADS-I 甲醇溶液与 PLA 二氯甲烷溶液、PVA 水溶液、NaCl 水溶液按一定质量比混合均匀;置光照箱内(4 500 $\pm$ 500) lx 照射 10 d,于第 10 天取样,观察样品外观、质量的变化。结果见表 1。试验结果表明 ADS-I 与 PLA、PVA、NaCl 之间无相互作用。

表 1 高温、高湿及光照加速试验结果

Table 1 Acceleration tests of high temperature, humidity, and light

试验类型	原辅料混合比例	外观变化		质量 / mg	
		0 d	10 d	0 d	10 d
高温加速	ADS-I	淡黄色	淡黄色	4.26	4.23
	ADS-I-PLA (1:10)	透明	透明	4.01	3.99
	ADS-I-PVA (1:50)	白色	白色	4.37	4.40
	ADS-I-PLA-PVA-NaCl (1:10:50:100)	浑浊	浑浊	4.08	4.10
高湿加速	ADS-I	淡黄色	淡黄色	4.19	4.16
	ADS-I-PLA (1:10)	透明	透明颗粒变小	4.13	4.14
	ADS-I-PVA (1:50)	白色	白色	4.43	4.40
	ADS-I-PLA-PVA-NaCl (1:10:50:100)	浑浊	浑浊	4.28	4.26
强光照射加速	ADS-I	淡黄色	淡黄色	4.50	4.49
	ADS-I-PLA (1:10)	透明	透明颗粒变小	4.38	4.37
	ADS-I-PVA (1:50)	白色	白色	4.16	4.13
	ADS-I-PLA-PVA-NaCl (1:10:50:100)	浑浊	浑浊	4.05	4.06

## 2.4 包封率和载药量的计算

按照“2.2.3”项下方法处理样品,经 HPLC-ELSD 测定得微球内 ADS-I 质量,计算包封率及载药量。

包封率=微球内 ADS-I 质量/ADS-I 投料量

载药量=微球内 ADS-I 质量/ADS-I 微球质量

## 2.5 ADS-I-PLA-MS 制备工艺优化

本实验采用溶剂蒸发法制备 ADS-I-PLA-MS,是从乳状液中除去分散相挥发性溶剂以制备微球的

方法。

**2.5.1 单因素试验** 在预试验基础上,以内水相质量浓度 10 mg/mL,内水相体积与 PLA 体积比为 1:10,PLA 质量浓度为 50 mg/mL,连续相为含 1% NaCl 的 0.5% PVA 水溶液,搅拌时间为 15 min,外水相体积 200 mL 为固定条件,对 ADS-I 甲醇溶液质量浓度、ADS-I 甲醇溶液与 PLA 二氯甲烷溶液体积比、PLA 二氯甲烷溶液质量浓度及 PVA 体积比分别进行考察。结果见表 2。结果显示,在 ADS-I 甲

醇溶液质量浓度为 10 mg/mL 时包封率最大, 15 mg/mL 时载药量最大, 但 3 水平的载药量均 ≤ 0.20%; 6、15 mg/mL 的包封率与 10 mg/mL 的差异太大, 故缩小范围进行正交试验; ADS-I 甲醇溶液

表 2 单因素试验设计与结果

Table 2 Design and results of single factor test

影响因素	水平	包封率 / %	载药量 / %
ADS-I 甲醇溶液	6 mg/mL	18.76	0.12
	10 mg/mL	30.19	0.17
	15 mg/mL	13.49	0.20
ADS-I 甲醇溶液与 PLA 二氯甲烷	1 : 9	27.03	0.21
	1 : 10	30.19	0.19
	1 : 11	31.95	0.23
PLA 二氯甲烷溶液	30 mg/mL	9.73	0.18
	50 mg/mL	30.19	0.19
	70 mg/mL	36.45	0.18
	90 mg/mL	32.41	0.15
PVA 体积	200 mL	30.19	0.19
	300 mL	34.29	0.57
	400 mL	60.73	0.63

与 PLA 二氯甲烷溶液体积比为 1 : 11 时包封率最大, 3 水平的载药量均小于 0.25%, 但包封率及载药量均相差不大, 故放大范围进行正交试验; PLA 二氯甲烷溶液质量浓度为 70 mg/mL 时包封率最大, 50 mg/mL 时载药量最大, 故选择后 3 者进行正交试验; PVA 体积为 400 mL 时包封率及载药量均最大, 故选择 300、400、500 mL 进行正交试验。

**2.5.2 正交试验设计及结果** 在单因素试验结果的基础上, 对所选择的 ADS-I 甲醇溶液质量浓度(A)、ADS-I 甲醇溶液与 PLA 二氯甲烷溶液体积比(B)、PLA 二氯甲烷溶液质量浓度(C)及 PVA 体积(D) 4 因素, 分别取其 3 水平进行正交试验, 应用  $L_9(3^4)$  正交表安排试验, 按照“2.1”项下的制备方法进行试验, 以 HPLC-ELSD 为测定方法, 包封率和载药量的综合评分(综合评分 = 包封率 × 0.8 + 载药量 × 0.2) 为指标进行考察。试验设计及结果见表 3, 方差分析见表 4。

**2.5.3 试验结果分析** 从综合评分的直观分析结果来看, 对试验结果影响的顺序为 D > C > A > B。从方差分析看, 相对于因素 B, 因素 D 对试验结果有

表 3  $L_9(3^4)$  正交试验设计与结果

Table 3 Design and results of  $L_9(3^4)$  orthogonal test

试验号	A / (mg·mL <sup>-1</sup> )	B	C / (mg·mL <sup>-1</sup> )	D / mL	包封率 / %	载药量 / %	综合评分
1	8 (1)	1 : 9 (1)	50 (1)	300 (1)	65.48	1.15	52.61
2	8 (1)	1 : 11 (2)	70 (2)	400 (2)	65.30	0.66	52.37
3	8 (1)	1 : 13 (3)	90 (3)	500 (3)	89.60	0.61	71.80
4	10 (2)	1 : 9 (1)	70 (2)	500 (3)	71.65	1.15	57.55
5	10 (2)	1 : 11 (2)	90 (3)	300 (1)	64.84	0.64	52.00
6	10 (2)	1 : 13 (3)	50 (1)	400 (2)	65.40	1.00	52.52
7	12 (3)	1 : 9 (1)	90 (3)	400 (2)	70.65	1.04	56.73
8	12 (3)	1 : 11 (2)	50 (1)	500 (3)	74.36	1.38	59.76
9	12 (3)	1 : 13 (3)	70 (2)	300 (1)	58.04	0.76	46.58
$K_1$	176.78	166.89	164.89	151.19			
$K_2$	162.07	164.13	156.50	161.62			
$K_3$	163.07	170.90	180.53	189.11			
R	13.71	6.77	24.03	37.92			

表 4 方差分析

Table 4 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	45.039	2	5.830	
C	99.160	2	12.835	
D	255.823	2	33.112	$P < 0.05$
B(误差)	7.726	2		

显著影响, 因素 A、B、C 无显著性。试验中发现, 当 PLA 质量浓度为 90 mg/mL, ADS-I 甲醇溶液与 PLA 二氯甲烷溶液体积比为 1 : 13 时结果为最佳, 且从单因素试验和正交试验观察, 发现二者比例若再增大, 载药量则会减小; 而 PVA 体积若再增大, 则收集微球困难。综合以上分析结果, 选择 ADS-I-PLA-MS 最佳制备工艺为  $A_1B_3C_3D_3$ 。

## 2.6 ADS-I-PLA-MS 的形态观察

电子扫描显微镜观察(图2)可知,所得微球形圆整,球面光滑无突起,微球整体分散度好,大小较均匀。微球无空隙或裂纹,表面未见药物结晶,证明药物包埋在PLA内部,ADS-I-PLA-MS制备成功。

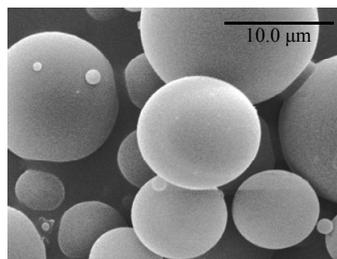


图2 ADS-I-PLA-MS 扫描电镜图

Fig. 2 SEM of ADS-I-PLA-MS

## 2.7 验证试验

按照上述优选的制备工艺重复制备3批ADS-I-PLA-MS,按“2.1”项下色谱条件进行测定,结果包封率分别为80.99%、84.47%、84.36%,载药量分别为0.54%、0.57%、0.57%。结果显示该工艺重复性较好。

## 3 讨论

近年来,关于可生物降解聚合物的载药微球制备方法的报道较多,但多为可与聚合物共溶于二氯甲烷或其他有机试剂中的药物,如紫杉醇和BCNU等<sup>[6-7]</sup>。而关于水溶性药物的聚乳酸载药微球报道较少,ADS-I的聚乳酸载药微球更是首次尝试。《中国药典》2010年版中对微球的包封率做了明确规定,故本实验使用W/O/W溶剂蒸发法,采用HPLC-ELSD进行ADS-I的定量分析,通过考察药物包封率和载药量对ADS-I-PLA-MS的制备工艺进行优选。

复乳化法是在传统乳化工工艺上进行改良的微球制备工艺,但多存在药物突释的现象<sup>[8]</sup>。由于NaCl减少PLA分子间的电屏障而作为絮凝剂;而亲水聚合物PVA与电解质NaCl的共同存在,使PLA分子间布满了PVA和NaCl,形成均匀疏松的PLA微球结构,可有效解决突释现象<sup>[9]</sup>。因此在预试验时考察了外水相PVA水溶液中NaCl的质量浓度对包封率及载药量的影响。考察过程中发现NaCl为1%时,由于NaCl使得微球内外相之间“通道”的物质交换减少,而包封率最高,但对于载药量几乎无影响。继而考察外水相PVA水溶液质量浓度、超声分散时

间及搅拌时间,发现PVA水溶液质量浓度为0.5%、1%、2%、3%时包封率及载药量均无差异;在超声分散至澄清(约55s)后,超声分散时间对包封率和载药量均无显著影响;搅拌时间为5、10、15、20min时,包封率和载药量亦均无差异,但搅拌时间为15min后,乳化液中泡沫不再变化,故最终确定外水相为含1%NaCl的0.5%PVA水溶液,超声分散时间为60s,搅拌时间为15min,以此条件进行正交实验。通过对正交实验结果的分析 and 方差分析,最终确定最佳制备工艺为ADS-I甲醇溶液质量浓度为8mg/mL、ADS-I甲醇溶液与PLA二氯甲烷溶液体积比1:13、PLA二氯甲烷溶液质量浓度为90mg/mL、PVA体积为500mL。该工艺合理可行,为今后将其制成缓释植入剂,实现原位给药提供了依据。

## 参考文献

- [1] Xiong J, Cheng G, Tang H F, *et al.* Ardipusilloside I induces apoptosis in human glioblastoma cells through a caspase-8-independent FasL/Fas-signaling pathway [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2009, 27(2): 264-270.
- [2] 玉石, 李娟, 张晓楠. 九节龙皂苷诱导胶质瘤SHG-44细胞凋亡的实验观察 [J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(14): 2616-2618.
- [3] Wang X J, Cui H, Wang R, *et al.* Metabolism and pharmacokinetic study of ardipusilloside I in rats [J]. *Planta Med*, 2012, 78(6): 565-574.
- [4] 麻育源, 兰青. 人脑胶质瘤间质内化疗研究进展 [J]. *中国神经肿瘤杂志*, 2004, 2(3): 227-231.
- [5] 林雅铃, 张安强, 王炼石. 磷酸川芎嗪星型聚乳酸缓释微球的制备与体外释放研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(10): 1627-1631.
- [6] Seong H, An T K, Khang G, *et al.* BCNU-loaded poly (D, L-lactide-co-glycolide) wafer and antitumor activity against XF-498 human CNS tumor cells *in vitro* [J]. *Int J Pharm*, 2003, 251(1/2): 1-12.
- [7] Ong B Y S, Ranganath S H, Lee L Y, *et al.* Paclitaxel delivery from PLGA foams for controlled release in post-surgical chemotherapy against glioblastoma multiforme [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(18): 3189-3196.
- [8] 罗宇燕, 张永明, 吴传斌, 等. 一种聚乳酸聚乙醇酸缓释微球的制备工艺 [J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(11): 875-878.
- [9] Tan Z Y, Liao Q J, Xiao L B, *et al.* Characteristics of epristeride microspheres with two emulsifying preparation methods [J]. *J China Pharm Univ: Eng Ed*, 2003, 34(4): 309-312.