

文章编号:1000-5862(2020)02-0190-06

三七总皂苷壳聚糖纳米粒冻干粉的制备工艺研究

蔡险峰,谢振,资鹏鹏,徐贤柱,游清徽,王曼莹*
(江西师范大学生命科学学院,江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室,江西 南昌 330022)

摘要:为提高三七总皂苷壳聚糖纳米粒(PNS-NPs)的稳定性,采用冷冻干燥法制备冻干粉并优化其冻干工艺。通过离子凝胶法制备PNS-NPs,以再分散性、粒径分布及微观形态及药物渗漏率为指标,进行全面实验和配伍实验筛选最优冻干工艺。结果表明:PNS-NPs冻干粉最佳制备工艺为预冻时间12 h、冻干保护剂为2.5%蔗糖+2.5%海藻糖。在该条件下制得的冻干粉分散性好、无粘连,扫描电镜显示其微观形貌呈球形;分散后粒径为 (138.30 ± 3.15) nm,相比于冻干前原液有所增加,但各组分药物渗漏率均未超过5%。PNS-NPs冻干粉有望成为PNS纳米新剂型。

关键词:三七总皂苷;壳聚糖;冻干保护剂;冻干粉

中图分类号:R 283.1 **文献标志码:**A **DOI:**10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2020.02.14

0 引言

三七总皂苷(Panax notoginseng saponins, PNS)是我国重要药用植物三七的主要活性成分之一,具有活血化瘀、消炎镇痛^[1]、抗肿瘤^[2]、抗炎、抗衰老^[3]等药理作用,广泛用于心脑血管疾病防治。但PNS在临床应用上还存在不足,如口服制剂存在疗效缓慢、胃肠道稳定性差、黏膜透过性低等问题,生物利用度低^[4];PNS注射制剂可能引发急性胃炎、皮疹、过敏性休克等过敏反应^[5-6],存在一定的安全隐患。为解决上述问题,通过纳米技术研发新型PNS口服制剂以提高PNS口服生物利用度是目前的重点研究方向之一。因纳米载体表面能较高,在分散剂中易聚集、沉降,且内含药物易泄漏,稳定性较差。目前,采用冷冻干燥法制备纳米载体冻干粉是提高其稳定性的常用方法。吴超群等^[7]采用沉淀-高压匀质法制得甘草总黄酮纳米混悬液,为改善其稳定性,采用冷冻干燥法进一步固化成冻干粉。王翀等^[8]采用离子凝胶法制备5-氟尿嘧啶壳聚糖纳米粒混悬液,并通过优化冻干工艺得到稳定性良好的壳聚糖纳米粒冻干粉。

本文采用离子凝胶法制备三七总皂苷壳聚糖纳

米粒(PNS-NPs),以甘露糖、蔗糖、葡萄糖和海藻糖为单一冻干保护剂,两两配伍为混合冻干保护剂,以冻干粉的再分散性、复溶后的粒径分布、微观形态及PNS主要成分渗漏率为指标,考察冻干保护剂种类、浓度及配伍对PNS-NPs冻干粉的影响,旨在为其临床应用提供实验基础。

1 实验材料

1.1 实验试剂

三七总皂苷原料药(云南三七科技药业有限公司),三七总皂苷混合标准品(中国食品药品检定研究院),水溶性低分子量壳聚糖(实验室自制,相对分子质量约为6 000 Da,脱乙酰度 $\geq 93\%$),甘露醇、海藻糖、氯化钠、葡萄糖、三聚磷酸钠(阿拉丁生化科技股份有限公司),蔗糖(生工生物工程股份有限公司)。

1.2 实验器材

FD-1-50冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司),URH-11-10T超纯水制造系统(四川优普超纯科技有限公司),BSA124S-CW分析天平、PB-10 pH计(赛多利斯科技有限公司),MS-M-S10磁力搅拌器(大龙兴创实验仪器有限公司),HL-2S恒流泵

收稿日期:2019-10-16
基金项目:国家十三五专项(2018ZX09721002-008),江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室开放基金(YRD201911)和江西省普通本科高校中青年教师发展计划访问学者专项资金资助项目。
作者简介:蔡险峰(1968-),男,浙江温州人,副教授,主要从事壳聚糖药用辅料的开发与利用研究。E-mail:jxcxf68@126.com
通信作者:王曼莹(1944-),女,江西南昌人,教授,博士,主要从事食品工业用酶制剂研究与应用。E-mail:wangmy8888@sina.com

(上海青浦沪西仪器厂有限公司),DW-HL388 超低温冷冻储存箱(中科美菱低温科技股份有限公司),UFC500396 超滤离心管(Millipore),S-3400N 扫描电镜(HITACHI),Zetasizer Nano ZS 纳米激光粒度仪(Malvern),高效液相色谱仪(Waters).

2 实验方法

2.1 PNS-NPs 的制备

称取适量水溶性低分子量壳聚糖溶于超纯水配制成 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,经 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤;另配制 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的三聚磷酸钠水溶液,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤备用.上述壳聚糖溶液的 pH 值用 $1\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸溶液调节至 4.0,加入一定量 PNS 原料药搅拌至充分混匀.在磁力搅拌条件下,通过恒流泵以 $16\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的滴加速度向其中缓慢滴加适量三聚磷酸钠溶液,在室温下搅拌 1 h,即得具明显淡蓝色乳光的 PNS-NPs 混悬液^[9-10].

2.2 预冻时间的考察

冻干粉的质量与样品的预冻时间长短密切相关,预冻时间过短易出现喷瓶现象,而预冻时间过长则效率过低且造成资源浪费.因此,首先对预冻时间进行考察.方法如下:取适量新制 PNS-NPs 纳米粒悬液至样品瓶中,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中分别预冻 2、4、8、12、24 h 后立即进行冷冻干燥 48 h.观察冻干样品的状态,选取合适的预冻时间.

2.3 冻干保护剂类型和浓度对冻干粉的影响

冻干保护剂的类型和浓度直接影响样品冻干效果,本研究选取常用的甘露醇、蔗糖、海藻糖和葡萄糖作为冻干保护剂,每种保护剂均设 4 个浓度水平,进行 2 因素 4 水平的全面试验.根据表 1 进行分组试验,具体操作如下:取新鲜制备的 PNS-NPs 纳米混悬液适量置于样品瓶中,加入等体积 2 倍预设浓度的冻干保护剂,混匀后移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中预冻 12 h,然后立即冷冻干燥 48 h.对照组则以超纯水替代冻干保护剂溶液,其他条件一致.所得冻干粉加入原体积超纯水震摇,考察冻干粉的复溶性.

表 1 试验分组表				%
类型	浓度			
	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4
甘露醇	1	3	5	7
蔗糖	1	3	5	7
葡萄糖	1	3	5	7
海藻糖	1	3	5	7

2.4 冻干保护剂配伍对冻干粉的影响

单种冻干保护剂通常各有优缺点,因此可将 2 种或多种保护剂按一定比例组成混合保护剂,以达到优于单种冻干保护剂的效果.本文选取甘露醇、蔗糖、海藻糖和葡萄糖这 4 种冻干保护剂进行两两配伍(甘露醇+蔗糖、甘露醇+海藻糖、甘露醇+葡萄糖、蔗糖+海藻糖、蔗糖+葡萄糖、葡萄糖+海藻糖),组成不同的混合保护剂.各混合保护剂均由 2 种质量分数均为 5% 的单种保护剂以 1:1 的比例混合.冻干操作方法同 2.3 节中所述.

2.5 冻干粉的表征

2.5.1 粒径和分散度分析 选取复溶性良好的冻干粉样品,加入原体积纯水复溶并超声分散,用 Malvern Zetasizer Nano ZS 测定其粒径和分散度;以新制 PNS-NPs 纳米混悬液为对照,计算样品粒径变化率,计算公式为:粒径变化率 $= ((s_n - s_0)/s_0 - 1) \times 100\%$,其中 s_n 为待测样品粒径, s_0 为冻干前样品原液粒径.

2.5.2 冻干粉微观形貌表征 在全面试验、粒径和分散度分析的基础上,选取最优工艺制备 PNS-NPs 冻干粉进行微观形貌表征.样品制备参照 I. Nallamuthu 等^[11]的方法并稍作修改:冻干粉加入原体积超纯水震摇复溶,超声分散 5 min;取适量复溶液滴于硅片上,喷金后扫描电镜观测.

2.6 药物渗漏率的测定

2.6.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C18 色谱柱($250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),以乙腈(A)-水(B)为流动相梯度洗脱($0 \sim 20\text{ min}$, 20% A; $20 \sim 45\text{ min}$, 20% ~ 46% A; $45 \sim 55\text{ min}$, 46% ~ 55% A; $55 \sim 60\text{ min}$, 55% A),流动速度为 $1.5\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量为 $25\text{ }\mu\text{L}$,检测波长为 203 nm,柱温为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[12].

2.6.2 PNS 标准曲线的绘制 称取适量 PNS 混合标准对照品,配制 $1\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液.然后吸取适量储备液,分别配置质量浓度为 50、100、200、250、400、500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,进样并测定峰面积.以峰面积对对照品浓度作图并进行线性回归,得 PNS 中各组分线性回归方程及线性范围.

2.6.3 渗漏率的测定 通过高效液相色谱法测定最优条件下制备的 PNS-NPs 冻干粉药物包封率(以 R1、Rg1、Re、Rb1 和 Rd 计),并与冻干前原液比较,考察在该条件下药物渗漏情况,渗漏率计算公式为:渗漏率 $= (L_{E_0} - L_{E_1})/L_{E_0} \times 100\%$,其中 L_{E_0} 为冻干前纳米混悬液的包封率, L_{E_1} 为最优工艺下制备的冻干粉的包封率.

包封率测定的方法如下^[13]:往冻干粉中加入原体积溶液复溶,取适量移至超滤离心管($M_w = 5\ 000\ D$),13 000 rpm 离心 15 min,取滤液测定游离药物含量;冻干前混悬液包封率测定则直接超滤离心后测定.另取 1 份 PNS-NPs 混悬液加入适量甲醇和稀盐酸裂解纳米粒,供测定总药量用.包封率计算公式为:包封率 = (药物总量 - 游离药量)/药物总量 $\times 100\%$.

2.7 统计学方法

本文计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达,组间差异采用 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 表示在统计学意义上具有显著性差异,处理软件为 origin 2018.

3 结果与分析

3.1 预冻时间对冻干粉的影响

不同预冻时间对冻干粉的影响如表 2 所示.当样品预冻时间低于 4 h 时,冻干过程中出现明显的喷瓶现象,样品喷至样品瓶口;当预冻时间达 8 h 时未出现喷瓶现象,但样品出现上浮现象;当样品预冻时间为 12 h 和 24 h 时,样品无上浮也没有出现喷瓶现象.综合考虑冻干效果和效率,选择样品预冻时间为 12 h.

表 2 预冻时间对冻干粉的影响

预冻时间/h	现象
2	出现喷瓶
4	出现喷瓶
8	出现上浮,无喷瓶
12	无上浮,无喷瓶
24	无上浮,无喷瓶

3.2 冻干保护剂配伍对冻干粉的影响

保护剂的类型及其浓度对冻干粉再分散性的影响如图 1 所示.当保护剂质量分数为 1% 时,以蔗糖、甘露醇、葡萄糖和海藻糖为保护剂组均无法用原体积超纯水震摇分散成均一胶体溶液.其中蔗糖组震摇后存在肉眼可见的颗粒状不溶物;甘露醇、葡萄糖和海藻糖组则震摇后存在片状不溶物.当保护剂质量分数为 3% 时,各组均呈肉眼可见粒状不溶物.当保护剂质量分数达 5% 时,蔗糖组和海藻糖组震摇后可迅速分散成具淡蓝色乳光的胶体溶液,甘露

醇和葡萄糖组则呈片状不溶物.当保护剂质量分数升至 7% 时,海藻糖组呈粒状不溶物,蔗糖、甘露醇和海藻糖组震摇后则均呈片状不溶物,粘连严重.

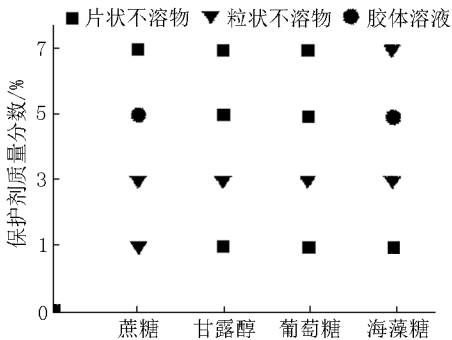


图 1 冻干保护剂的类型和浓度对冻干粉的影响

3.3 冻干保护剂配伍对冻干粉的影响

以蔗糖、甘露醇、葡萄糖和海藻糖为保护剂,两两配伍组成的混合保护剂对冻干粉再分散性影响如图 2 所示.甘露醇与其他 3 种冻干保护剂配伍制备的冻干粉均无法震摇分散均匀.其中甘露醇 + 海藻糖组震摇后呈片状不溶物,甘露醇 + 蔗糖组和甘露醇 + 葡萄糖组呈颗粒状不溶物;蔗糖 + 海藻糖组、蔗糖 + 葡萄糖组、海藻糖 + 葡萄糖组冻干粉加入超纯水震摇后分散性良好,立即恢复成稳定的胶体溶液.

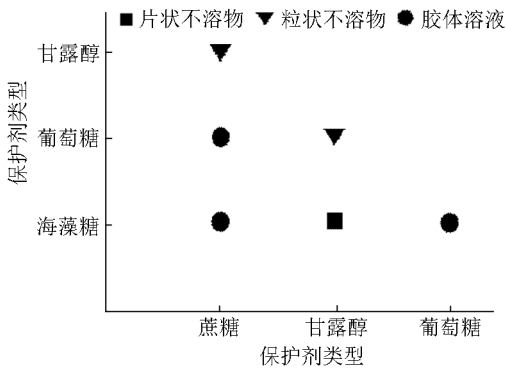


图 2 冻干保护剂配伍对冻干粉的影响

3.4 粒径和分散度测定

在全面实验中,5% 的蔗糖组(a)和 5% 海藻糖组(b)再分散性良好;在冻干保护剂配伍实验中,蔗糖 + 葡萄糖组(c)、蔗糖 + 海藻糖组(d)、海藻糖 + 葡萄糖组(e)再分散性良好.选取上述样品进行粒径和分散度测定,结果如表 3 所示.

表 3 冻干保护剂冻干粉对粒径和分散度的影响

组别	粒径/nm	粒径变化率/%	分散度
蔗糖组	139.30 \pm 0.96	25.95	0.140 \pm 0.008
海藻糖组	184.87 \pm 3.75	67.15	0.192 \pm 0.010
蔗糖 + 葡萄糖组	193.90 \pm 7.50	75.32	0.175 \pm 0.021
蔗糖 + 海藻糖组	138.30 \pm 3.15	25.05	0.158 \pm 0.012
葡萄糖 + 海藻糖组	641.50 \pm 45.82	480.02	0.834 \pm 0.120
冻干前原液	110.60 \pm 2.45	0.00	0.152 \pm 0.009

葡萄糖组 + 海藻糖组冻干复溶后粒径增加 480.02%,且分散度达到 0.834,这表明该组样品复溶后形成的混悬液稳定性差、易聚沉. 海藻糖组与蔗糖 + 葡萄糖组冻干粉复溶后粒径和分散度均显著增加($P<0.05$),蔗糖组和蔗糖 + 海藻糖组复溶后粒径与冻干前原液相近,且分散度与原液在统计学意义上无显著性差异($P>0.05$).

各样品复溶后粒径分布如图 3 所示. 由图 3 可知:海藻糖组与蔗糖 + 葡萄糖组冻干粉复溶后粒径分布相比于蔗糖组和蔗糖组 + 海藻糖组明显加宽,且蔗糖组 + 海藻糖组粒径分布比蔗糖组更为集中. 因此,以 2.5% 蔗糖 + 2.5% 海藻糖为混合冻干保护剂制备的 PNS-NPs 冻干粉质量最佳.

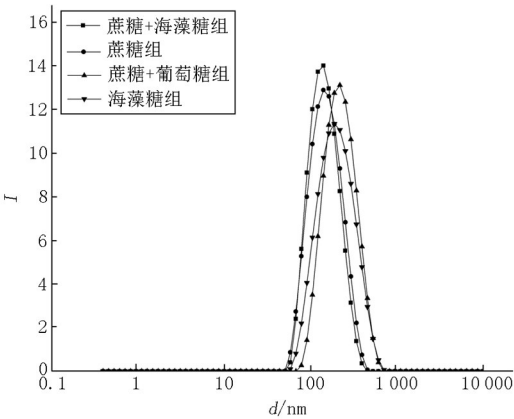


图 3 冻干粉复溶粒径分布图

3.5 冻干粉微观形态观察

扫描电镜结果显示,以 2.5% 蔗糖 + 2.5% 海藻糖为混合冻干保护剂制备的 PNS-NPs 冻干粉复溶

后呈球形(见图 4),粒度均匀、无粘连,符合冻干工艺要求.

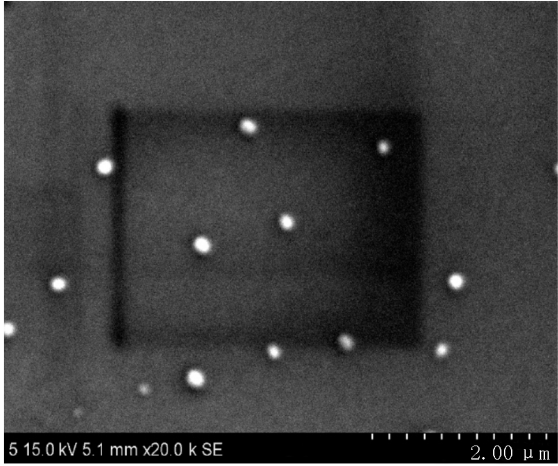


图 4 PNS-NPs 冻干粉扫描电镜图(20 000 倍)

3.6 渗漏率的测定

在上述色谱条件下,PNS 主要组分分离效果良好,其色谱图如图 5 所示.

分别以 PNS 标准对照品中 R1、Rg1、Re、Rb1 和 Rd 组分浓度为横坐标,对应峰面积为纵坐标,绘制各组分标准曲线(见图 6).

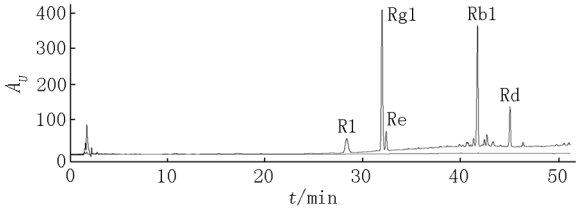


图 5 PNS 色谱图

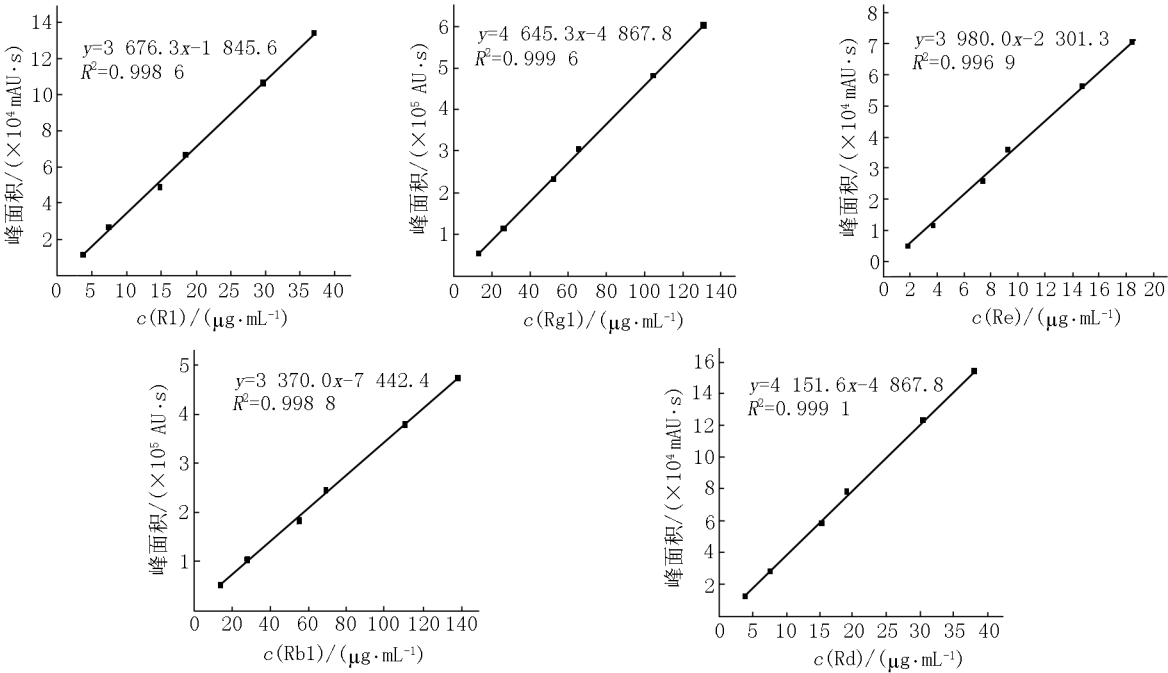


图 6 PNS 主要成分的标准曲线图

通过标准曲线求得冻干前、后超滤液中 PNS 含量,并计算得最优条件下制备的 PNS-NPs 冻干粉中各组分渗漏情况,结果见表 4.

表 4 最优冻干粉中药物组分渗漏率 $n=3$

组分	渗漏率/%
R1	2.55 ± 0.62
Rg1	1.66 ± 0.35
Re	1.90 ± 0.41
Rb1	0.52 ± 0.09
Rd	1.24 ± 0.24

表 4 结果表明:该制备工艺下 PNS 主要组分渗漏率较低. 其中 Rb1 渗漏率最低仅为 $(0.52 \pm 0.09)\%$; 渗漏最多的组分为 R1, 其渗漏率达到 $(2.55 \pm 0.62)\%$; 各组分渗漏率均低于 5% , 符合冻干粉制备工艺要求.

4 结论

本文研究了样品预冻时间、冻干保护剂种类、浓度及配伍对 PNS-NPs 冻干粉的影响,结果表明上述因素对冻干粉的再分散性均有一定的影响. 在冷冻干燥前,样品需充分预冻以发生玻璃化作用,预冻时间长则玻璃化转变温度高,样品稳定性好,不易出现喷瓶现象. 综合预冻效果和预冻效率,确定样品在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻时间为 12 h.

通过全面实验和保护剂配伍实验筛选出再分散性良好的冻干粉制备工艺,并对所筛选工艺下制备的冻干粉进行粒径和分散度分析,进一步筛选出最优工艺,并通过扫描电子显微镜对最优工艺条件下制备的冻干粉进行微观形貌分析. 当单以蔗糖、甘露醇、葡萄糖或海藻糖为保护剂时,仅 5% 蔗糖和 5% 海藻糖组冻干粉可复溶,且海藻糖组冻干前后粒径变化较大,相比于冻干前粒径增加 67.15% . 以蔗糖为保护剂时冻干效果较好的原因可能是蔗糖的大量羟基在脱水过程中与壳聚糖形成氢键,起到保护壳聚糖纳米粒结构的作用. 此外,蔗糖可参与壳聚糖玻璃态的形成. 当以葡萄糖为冻干保护剂时,PNS-NPs 冻干粉无法复溶,推测其原因是葡萄糖具有较高的分子流动性,影响冻干保护效果^[14]. 而以甘露醇为冻干保护剂效果不佳的原因可能是甘露醇形成结晶,促进了纳米粒的聚集和融合,对纳米粒的骨架架

构起到破坏作用^[15]. 在以蔗糖、甘露醇、葡萄糖和海藻糖两两配伍组成的混合保护剂中,蔗糖 + 葡萄糖组、蔗糖 + 海藻糖组和海藻糖 + 葡萄糖组冻干粉可复溶,其中均有蔗糖或海藻糖存在,这与采用单种冻干保护剂的结果相符. 且蔗糖 + 海藻糖组具有与冻干前原液最接近的粒径分布及分散度,应是蔗糖与海藻糖在冻干过程中产生了协同作用. 因此,以 2.5% 蔗糖 + 2.5% 海藻糖为混合冻干保护剂制备 PNS-NPs 冻干粉效果较佳,所得冻干粉在复溶性、再分散性、形貌、药物渗漏率等方面均符合要求,有望成为 PNS 新剂型.

5 参考文献

[1] 陈红艳,陈安,卢芳国,等. 三七总皂苷的药理研究进展 [J]. 湖南中医杂志,2019,35(1):154-157.

[2] 卢晓燕,王琰,陈旻静,等. 三七总苷抑制黑色素瘤 A375 细胞增殖的作用及机制研究 [J]. 中药材,2017,40(5):1199-1202.

[3] 屈泽强,谢智光,王乃平,等. 三七总皂苷抗衰老作用的实验研究 [J]. 广州中医药大学学报,2005(2):130-133.

[4] Xiong Jing, Guo Jianxin, Huang Luosheng, et al. The use of lipid-based formulations to increase the oral bioavailability of panax notoginseng saponins following a single oral gavage to rats [J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2008, 34(1):65-72.

[5] 王陈翔,周子晔,叶其葵. 57 例血栓通注射液所致不良反应分析 [J]. 药学实践杂志,2009,27(4):313-314.

[6] 阎琰. 注射用血栓通所致不良反应统计与分析 [J]. 中国处方药,2017,15(11):47-48.

[7] 吴超群,李小芳,牟倩倩,等. 甘草总黄酮纳米混悬剂冻干粉的表征及稳定性考察 [J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(2):29-33.

[8] 王翀,陈云娜. 5-氟尿嘧啶壳聚糖纳米粒冻干粉的制备 [J]. 安徽医学,2017,38(9):1095-1098.

[9] 周海玲. 叶酸偶联壳聚糖载姜黄素/阿霉素纳米粒的制备及研究 [D]. 太原:中北大学,2017.

[10] Koppolu B P, Smith S G, Ravindranathan S, et al. Controlling chitosan-based encapsulation for protein and vaccine delivery [J]. Biomaterials, 2014, 35(14):4382-4389.

[11] Nallamuthu I, Devi A, Khanum F. Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, re-

ained antioxidant activity and enhanced bioavailability [J]. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences,2015,10 (3):203-211.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:11-12.

[13] Abul Kalam M,Khan A A,Khan S,et al. Optimizing indo-methacin-loaded chitosan nanoparticle size,encapsulation, and release using Box-behnken experimental design [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2016, 87:329-340.

[14] Mensink M A,Frijlink H W,van der Voort Maarschalk K, et al. How sugars protect proteins in the solid state and during drying(review): mechanisms of stabilization in re-lation to stress conditions [J]. European Journal of Phar-maceutics and Biopharmaceutics,2017,114:288-295.

[15] Souillac P O,Middaugh C R,Rytting J H. Investigation of protein/carbohydrate interactions in the dried state. 2. Diffuse reflectance FTIR studies [J]. Int J Pharm,2002, 235(1/2):207-218.

The Study on Preparation Technology of Lyophilized Powder of Panax Notoginseng Saponin Chitosan Nanoparticles

CAI Xianfeng,XIE Zhen,ZI Pengpeng,XU Xianzhu,YOU Qinghui,WANG Manying*

(College of Life Science,Key Laboratory of the Conservation and Sustainable Utilization for Subtropical Plant Resources of Jiangxi Province,Jiangxi Normal University,Nanchang Jiangxi 330022,China)

Abstract:To improve the stability of panax notoginseng saponin chitosan nanoparticles (PNS-NPs), freeze-dried powder is prepared by freeze-drying method and its freeze-drying process is optimized. PNS-NPs are prepared by ion cross-linking method. The optimal lyophilization process is performed by comprehensive experiments and compatibil-ity experiments with re-dispersibility,particle size distribution,microscopic morphology and drug leakage rate. The results show that the optimal preparation process of PNS-NPs lyophilized powder is 12 h pre-freezing time and 2.5% sucrose + 2.5% trehalose mixed protective agent. The lyophilized powder prepared by this condition has good dispersibility and no adhesion. Scanning electron microscopy result shows that the microscopic morphology is spheri-cal. The particle size after dispersion is (138.30 ± 3.15) nm,which is increased compared with the original solu-tion before lyophilization,but the drug leakage rates don't exceed 5%. PNS-NPs freeze-dried powder is expected to become a new nano-drug formulation of PNS.

Key words:panax notoginseng saponins;chitosan;lyoprotectant;lyophilized powder

(责任编辑:刘显亮)