

丹参酮 II A 纳米囊的制备及其性能评价

吴俊洪, 罗惠都, 何丽冰, 王利胜, 涂 星, 卢 映, 黄雨威(广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 制备丹参酮 II A 纳米囊, 并评价其性能。**方法** 采用乳化-溶剂挥发法制备丹参酮 II A 纳米囊, 以包封率为指标, 单因素试验结合正交试验优化制备工艺与处方, 并评价纳米囊的粒径形态。**结果** 以乙酸乙酯-水(1:2)、0.5 mL 司盘-80、丹参酮 II A-壳聚糖(1:5)、乙醇 0.4 mL 为最佳处方, 在温度为 50 ℃, 搅拌速度为 300 r/min 条件下乳化, 然后超声 30 s, 即得纳米囊。所得纳米囊外观圆整, 平均粒径 (172±10) nm, 包封率高达 73.2 %。**结论** 乳化-溶剂挥发法适用于制备丹参酮 II A 纳米囊, 且工艺稳定。

关键词: 丹参酮 II A; 纳米囊; 乳化-溶剂挥发法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)01-0101-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.01.027

Preparation and Evaluation of Tanshinone II A Nanocapsules

WU Junhong, LUO Huidu, HE Libing, WANG Lisheng, TU Xing, LU Ying, HUANG Yuwei (Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006)

Abstract: **Objective** To prepare the tanshinone II A nanocapsules and to evaluate its quality. **Methods** Tanshinone II A nanocapsules were prepared by emulsion solvent diffusion method and were optimized by both of single factor test and orthogonal design with encapsulation ratio as index. The shape and diameter of tanshinone II A nanocapsules were investigated. **Results** The optimal formulas were obtained under the following conditions: the recipe consisting of ethyl acetate-water(1:2), 0.5 mL of span-80, Tan II A -chitosan(1:5), and 0.4 mL of ethanol, emulsification after stirring in the speed of 300r/min at 50 ℃, and ultrasonic time being 30 s. Under the optimal conditions, the obtained tanshinone II A nanocapsules were uniform and round, and had the average diameter of (172 ± 10) nm, the entrapment ratio reached 73.2 %. **Conclusion** Emulsion solvent diffusion method is applicable for the preparation of tanshinone II A nanocapsules, the process being steady.

Keywords: Tanshinone II A; Nanocapsules; Emulsion solvent diffusion method

丹参酮 II A(tanshinone II A, Tan II A)是丹参的主要脂溶性有效成分, 常用于心血管疾病的治疗^[1]。丹参酮 II A 水溶性差, 普通口服制剂存在吸收差, 稳定性差, 生物利用度低等缺点, 影响临床疗效。纳米囊是粒径在 1~1000 nm 的新型药物载体, 将药物纳米囊化不仅可增加药物在水中的溶解度, 降低药物的毒副作用, 还可以根据其粒径大小在体内分布不同而实现靶向给药^[2]。丹参酮 II A 制成纳米囊可改善其体内吸收, 提高生物利用度, 因此, 本实验采用单因素试验结合正交试验优化丹参酮 II A 纳米囊的制备工艺及处方组成。

1 仪器与试药

AUW-120D 精密分析天平, 日本岛津公司; 85-

2A 双数显恒温磁力加热搅拌器, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; JY92-2D 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TG1650-WS 台式高速离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司; DZF-6050 型真空干燥箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; DIONEX P680 液相色谱仪及 UVD170U 检测器, 美国戴安公司; JEM-2000EX 透射电镜, 日本 JEOL 公司; ZATASIZER 1000HA 粒度仪, 英国马尔文有限公司。

丹参酮 II A, 纯度 ≥ 98 %, 南京泽朗医药有限公司; 壳聚糖, 广州市齐云生物技术有限公司; 乙酸乙酯, 广州化学试剂厂; 冰乙酸, 天津市百世化工有限公司; 司盘-80, 广州化学试剂厂; 无水乙醇, 天津市百世化工有限公司; 戊二醛, 天津市大茂化学试剂厂;

收稿日期: 2012-09-04

作者简介: 吴俊洪, 男, 硕士研究生, 研究方向: 药物制剂新剂型与新技术。Email: 120539768@qq.com。通讯作者: 王利胜, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术的研究。Email: wlis68@126.com。

基金项目: 广东省大学生创新实验项目(1057211010)。

甲醇(色谱纯),美国 DIKMA TECHNOLOGIES 公司。

2 方法与结果

2.1 丹参酮ⅡA 含量的测定^[3]

2.1.1 色谱条件与系统适应性 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(85:15) (V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm; 柱温: 室温; 进样量: 10 μL。以丹参酮ⅡA 色谱峰面积计算, 保留时间为 12.047 min, 理论塔板数不小于 4000, 见图 1。

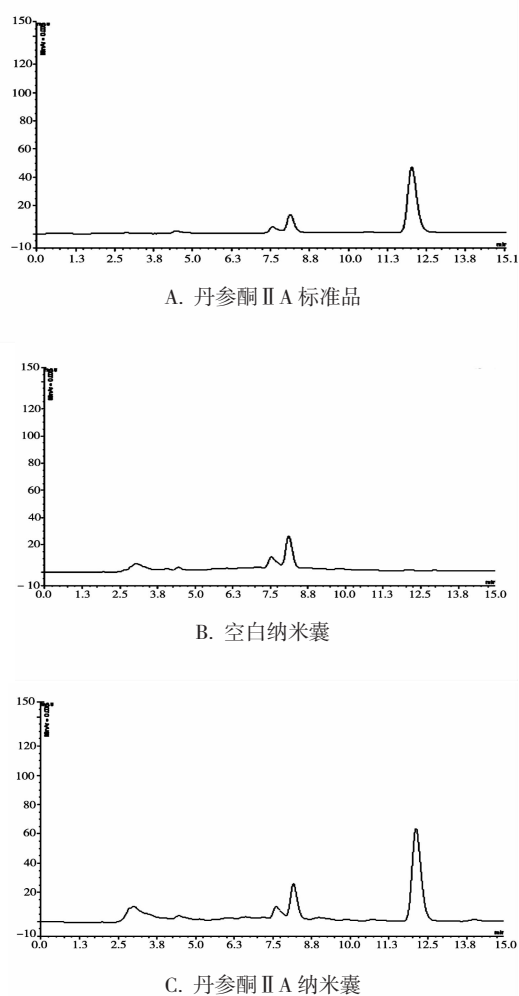


图1 丹参酮ⅡA 的 HPLC 图谱

Figure 1 HPLC results of tanshinone II A

2.1.2 标准曲线的绘制 精密称取丹参酮ⅡA 25.00 mg, 置于 50 mL 容量瓶, 用甲醇溶解并定容, 即得 0.5 mg/mL 丹参酮ⅡA 溶液。精密量取丹参酮ⅡA 溶液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL, 分别置于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容, 分别得到浓度为 0.005, 0.025, 0.05, 0.075, 0.10 mg/mL 的标准溶液。按上述色谱条件, 依次进样, 以峰面积对

浓度进行线性回归, 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 646.86X + 0.2567$, $r = 0.9999$ 。结果表明, 丹参酮ⅡA 在 0.005~0.10 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.1.3 精密度和稳定性试验 取 0.05 mg/mL 丹参酮ⅡA 标准溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 连续进样 5 次, 以峰面积计算含量, 其 RSD 为 1.04 %。取 0.05 mg/mL 丹参酮ⅡA 标准溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 分别在 0, 3, 6, 9, 12 h 进样, 以峰面积计算含量, RSD 为 2.09 %。

2.1.4 回收率试验 按处方比例取辅料 3 份, 分别加入丹参酮ⅡA 对照品 0.8, 1.0, 1.2 mg, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 甲醇定容, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 各平行进样 3 次, 计算回收率分别为 99.5 %、99.6 % 和 99.8 %, 平均回收率为 99.6 %。

2.2 丹参酮ⅡA 纳米囊的制备

2.2.1 纳米囊制备 精密称取丹参酮ⅡA 10 mg, 溶于乙酸乙酯 7.5 mL, 加入司盘-80 适量, 作为油相; 另取壳聚糖适量, 溶于 1 % 醋酸, 加入乙醇适量, 作为水相。在一定的温度下, 将油相缓慢加入水相中, 保持恒定的速率搅拌约 15 min, 即得初乳, 冰浴下探头超声, 制成 O/W 乳剂, 迅速将乳剂冷却至 20 ℃, 加入戊二醛 0.3 mL, 低速搅拌固化 1 h。高速离心, 分离上层纳米囊, 用蒸馏水洗 3 遍, 观察纳米囊形态, 测定其粒径及包封率, 真空干燥, 即得。

2.2.2 制备工艺条件筛选 以包封率为指标, 考察制备温度、搅拌速率、超声时间对纳米囊制备的影响。
①制备温度: 分别在 30 ℃、40 ℃、50 ℃下制备纳米囊, 考察温度对包封的影响。结果显示, 其包封率分别为 44.0 %、55.8 % 和 59.3 %, 因此, 选择 50 ℃用于进一步研究。
②搅拌速率: 在 50 ℃下, 选择 300, 400, 500 r/min 3 种搅拌速率制备纳米囊, 其包封率分别为 66.5 %、59.3 % 和 55.3 %, 因此, 选择转速 300 r/min 用于进一步考察。
③超声时间: 在搅拌速率 300 r/min, 温度 50 ℃下, 考察超声时间 30, 60, 90 s 对纳米囊形成的影响, 其包封率分别为 67.9 %、60.4 % 和 62.1 %, 因此, 最佳超声时间为 30 s。

2.2.3 制剂处方优选^[4] 在单因素试验的基础上, 以包封率为指标, 正交试验考察芯壁比、司盘-80 用量、乙酸乙酯-水之比及乙醇的加入量等因素, 优化纳米囊的处方组成, 正交试验因素水平表见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	A 乙酸乙酯-水(V/V)	B 司盘-80/mL	C 芯壁比	D 乙醇/mL
1	1:2	0.3	1:3	0.4
2	1:3	0.5	1:4	0.5
3	1:4	0.7	1:5	0.6

表 2 正交实验结果
Table 2 Results of orthogonal test

编号	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	60.2
2	1	2	2	2	70.7
3	1	3	3	3	64.1
4	2	1	2	3	45.0
5	2	2	3	1	66.0
6	2	3	1	2	42.5
7	3	1	3	2	50.7
8	3	2	1	3	67.4
9	3	3	2	1	59.4
K ₁	65.013	51.977	56.720	61.853	
K ₂	51.170	68.010	58.343	54.637	
K ₃	59.150	55.347	60.270	58.843	
R	13.843	16.033	3.550	7.216	

表 3 方差分析结果
Table 3 Results of variance analysis

Error source	SS	df	MS	F	P
A	289.697	2	144.849	15.287	<0.05
B	428.785	2	214.393	22.627	
C(Error)	18.950	2	9.475	1.000	
D	78.836	2	39.418	4.160	

注：F_{0.05}(2,2)=19.00。

由表 2 和表 3 结果可知，R_B>R_A>R_D>R_C，纳米囊制备的各影响因素大小顺序为 B>A>D>C，其中 B(司盘的用量)具有显著性差异。因此，由包封率确定的最佳处方组成为 A₁B₂C₃D₁，即乙酸乙酯-水(1:2)，司盘加入量为 0.5 mL，芯壁比为 1:5，乙醇加入量为 0.4 mL。

按照上述最佳处方 A₁B₂C₃D₁ 和正交试验中最好的 2 号 A₁B₂C₂D₂ 处方，分别制成 3 批纳米囊。结果包封率分别为 73.2 %、71.4 %，故确定 A₁B₂C₃D₁ 为丹参酮ⅡA 纳米囊的处方。

2.2.4 纳米囊的包封率测定 精密称取纳米囊重量的十分之一，加入 5 mL 甲醇，探头超声，得丹参酮ⅡA 提取液，定容至 10 mL，0.22 μm 滤膜过滤，取续滤液 10 μL，根据 2.2.1 项的色谱条件测定丹参酮ⅡA 的浓度，按以下公式计算包封率。

包封率=C_{TanⅡA}×10 mL×10/10 mg×100 %

2.3 纳米囊的性能评价

2.3.1 纳米囊的形态 取制备好的丹参酮ⅡA 纳米囊适量，用 2 %的磷钨酸染色，置于透射电镜下观察形态。结果显示，丹参酮Ⅱ纳米囊呈球形，外观光滑，分散较均匀。

2.3.2 纳米囊的粒径及粒度分布 用 ZATASIZER 1000HA 粒径仪测定丹参酮ⅡA 纳米囊平均粒径为 172 nm，PDI 为 0.381，粒度分布均匀，见图 2。

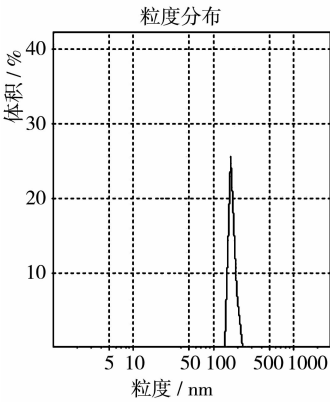


图2 丹参酮Ⅱ纳米囊的粒径分布图
Figure 2 Size distribution of tanshinoneⅡA nanocapsules

3 讨论

预实验曾以壳聚糖和三聚磷酸钠作囊材，采用复凝聚法制备丹参酮ⅡA 纳米囊，但包封效果差，囊体外观及圆整度不理想。而乳化-溶剂挥发法先将药物制备成纳米级乳粒，再挥干溶剂得到纳米囊，方法简单，包封效果稳定，适用于水溶性差药物的纳米囊化。

黏度与界面张力均随着温度的上升而降低，故提高温度有利于乳化，因此，选择初乳的制备温度为 50 ℃。超声时间增加，纳米囊的包封率下降，这可能与超声过程中成囊体系的温度快速增加，加快了丹参酮ⅡA 的降解及降低乳剂的稳定性有关。

纳米囊粒径小，表面积大，稳定性差，因此，制备时需要加入较大量的表面活性剂^[9]。与亲水性表面活性剂相比，亲油性表面活性剂更有利于提高 O/W 乳剂的稳定性，因此，本实验选择司盘作为表面活性剂。由正交试验直观分析和方差分析结果可知司盘的用量对纳米囊的包封率具有显著性影响。其加入量少会引起纳米囊包封药物的能力降低，过高则使纳米囊形成粘稠状半固体，不利于给药。

丹参酮ⅡA 纳米囊粒径小，并应用壳聚糖作为囊材，具有组织相容性好及生物粘附性等特点，属于新型主动靶向制剂，其体内组织分布特点可在后续研究中逐步阐明。

参考文献：

[1] 石远，姜同英，王思玲. 丹参酮ⅡA 及其制剂开发[J]. 世界临床药物，2007，28(7)：439-443.
[2] 许利敏，李新中，肖菁. 齐墩果酸聚氧基丙烯酸正丁酯纳米囊在小鼠体内的肝靶向研究[J]. 中国医院药学杂志，2007，27(9)：1198-1200.
[3] 郑金聪，林王椿，姚步华. 高效液相色谱法测定丹参酮ⅡA 含量的系统适用性优化[J]. 中国医学导报，2010，7(32)：49-50.
[4] 王利胜，郭琦，张英丰，等. 芎冰微乳的制备及质量评价[J]. 中国中药杂志，2011，36(2)：142-146.
[5] 陆彬. 中药新剂型与新技术[M]. 北京：化学工业出版社，2007：249-250.

(编辑：宋威)