

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00817

## 鼻用人参皂苷 Rg3 壳聚糖微球的制备

唐文燕,高静,丁雪鹰,高申\*

第二军医大学药学院药剂学教研室,上海 200433

**[摘要]** 目的:以壳聚糖为载体材料,人参皂苷 Rg3 为模型药物,制备鼻腔给药微球。方法:采用复乳化化学交联技术制备人参皂苷 Rg3 鼻用微球。利用 Statistic 软件进行多元线性回归和二项式拟合,求得方程。以载药量,包封率及 40~60  $\mu\text{m}$  微球所占比例为指标,用星点设计-效应面优化法选取较佳工艺条件,扫描电镜观察微球表面形态。结果:据效应面优选的较佳处方范围为:投药比为 0.4~0.5;有机相与水相之比为 0.4~0.6;初乳与油相比为 0.13~0.17。以此优选处方制备的三批微球形态良好,球形圆整,平均粒径为  $(44.99 \pm 12.59) \mu\text{m}$ ,载药量为  $(10.25 \pm 0.08)\%$ ,包封率为  $(30.61 \pm 1.46)\%$ 。结论:所优化的制备工艺稳定,适于鼻用人参皂苷 Rg3 壳聚糖微球的制备。

**[关键词]** 人参皂苷;壳聚糖;微球体;药物制备;药物设计

**[中图分类号]** R 943.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0817-05

### Preparation of Ginsenoside Rg3-loaded chitosan microspheres for intranasal administration

TANG Wen-yan,GAO Jing,DING Xue-ying,GAO Shen\*

Department of Pharmaceutics,School of Pharmacy,Second Military Medical University,Shanghai 200433,China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To prepare ginsenoside Rg3-loaded chitosan microspheres for intranasal administration. **Methods:** The chitosan microspheres were prepared by the O/W/O combined with multiple emulsification chemical crosslink technique. Quadratic polynomial equation and linear regression equation were fitted by the statistic software,and the resulting equations were used to produce response surface graphs. The best experiment conditions were screened by central composite design (CCD) using drug load,encapsulation efficiency,and the proportions of microspheres (with diameter of 40-60  $\mu\text{m}$ ) as variables. The shape of microspheres was observed by scanning electron microscope. **Results:** The best ranges of the prescription included; drug to carrier material ratio:0.4-0.5;organic phase and water phase ratio:0.4-0.6;and first emulsion and oil phase ratio:0.13-0.17. The 3 batches of microspheres prepared according to the above condition were well-shaped (full sphere),with the mean drug loading capacity being  $(10.25 \pm 0.08)\%$  and the encapsulation efficiency being  $(30.61 \pm 1.46)\%$ . **Conclusion:** The optimized technique has a good reproducibility and can be used for preparation of Rg3-loaded chitosan microspheres for intranasal administration.

**[KEY WORDS]** ginsenoside; chitosan; microspheres; drug preparation; drug design

[Acad J Sec Mil Med Univ,2008,29(7):817-821]

人参皂苷 Rg3 是存在于天然药物人参中的一种四环三萜皂苷,具有多方面的药理作用,如抗肿瘤<sup>[1-2]</sup>、神经保护<sup>[3]</sup>、促进记忆<sup>[4]</sup>、抗血管增生<sup>[5]</sup>等。但是人参皂苷 Rg3 人口服后血浆浓度很低,3.2 mg/kg 口服后的  $c_{\text{max}}$  值仅为  $(16.0 \pm 6.0) \text{ ng/ml}$ ,  $t_{\text{max}}$  值仅为  $(0.66 \pm 0.10) \text{ h}$ <sup>[6]</sup>。一般认为,口服后血药浓度很低的原因大致有三:一是口服后经胃肠道吸收的药量少;二是口服后进入胃肠道内的药物被其中的酶或肠道细菌所代谢;三是药物虽可被胃肠黏

膜吸收,但被肠壁或肝脏的酶所代谢,即首过效应。

鼻腔可作为药物吸收部位,因为鼻黏膜上有大量的细微绒毛,可大大增加上皮细胞的药物吸收面积,上皮细胞下分布着丰富的血管网,流经鼻腔的静脉血不经过肝脏可直接进入体循环<sup>[7]</sup>;鼻腔中 pH 为 6.5~7.1,对药物吸收影响很小;分子量较大的药物也可通过鼻黏膜吸收。因此,鼻黏膜给药特别适合在胃肠道不稳定、在胃肠道内不易被吸收或首过作用强的药物。但鼻腔中纤毛的正常生理摆动能

**[收稿日期]** 2008-01-28 **[接受日期]** 2008-03-26

**[基金项目]** 全军医药卫生科研基金(2006172006)。Supported by Medical and Health Research Funds of PLA(2006172006)。

**[作者简介]** 唐文燕,硕士。E-mail:twy.yazi@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:021-25070392,E-mail:ggss99@126.com

将滴入的药物很快清除,影响药物吸收。若将药物制成亲水性凝胶微球制剂,能延长药物在鼻腔中滞留时间<sup>[8-9]</sup>,以提高药物的吸收。

本文采用具有生物黏附性和吸收促进作用的壳聚糖(chitosan)作为载体材料,制备了鼻黏膜用人参皂苷 Rg3 壳聚糖微球。

### 1 材料和方法

1.1 药品、试剂及仪器 人参皂苷 Rg3(大连富生药业有限公司,纯度 93.58%,批号:070221);壳聚糖(南通生物制品有限公司,100目,脱乙酰度 91.72%);液体石蜡(国药化学试剂),化学纯;甲醛(国药化学试剂),分析纯;乙腈(J&K Chemical, Ltd.),色谱纯;其余试剂均为分析纯。剪切乳化搅拌机(上海标本模型厂);磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司);光学显微镜(EUROMEX, Holland);S-520型扫描电镜(日本日立);LC-10A型高效液相色谱仪(日本岛津)。

1.2 壳聚糖微球的制备 以复乳法<sup>[10-11]</sup>为基础制备 Rg3 壳聚糖微球,取处方量壳聚糖溶于 5%醋酸溶液中形成水相。将 Rg3 溶解于二氯甲烷中形成有机相,将有机相滴入水相中超声制得初乳;以液体石蜡(含 2% Span80)作为油相,将初乳滴入油相搅拌制成复乳;搅拌 30 min 后,加甲醛固化,固化 3 h 后,静置,倾去油相,沉淀经石油醚洗涤,无水乙醇脱水,真空干燥即得。

### 1.3 Rg3 含量测定方法的建立及方法学考察

1.3.1 色谱条件 Diamond ODS 色谱柱(200 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈:水(55:45);流速 1 ml/min;检测波长 203 nm;室温进样;进样量 20 μl。

1.3.2 标准曲线的绘制 分别配制 1、2.5、5、10、25、50、100 μg/ml 的 Rg3 系列标准溶液,按 1.3.1 色谱条件分析,测定峰面积,以浓度对峰面积回归得到标准曲线。

1.3.3 精密度试验 配制低、中、高(25、50、100 μg/ml)3种浓度 Rg3 溶液,分别按 1.3.1 项下色谱条件分析,测其峰面积。1 d 内测定 5 次及每天测定 1 次,连续 5 d,计算日内与日间精密度。

1.3.4 回收率试验 精密称取空白微球 9 份,每 3 份为一组,分别加入低、中、高(25、50、100 μg/ml)浓度的 Rg3 溶液,加稀硝酸溶液(1:5)4 ml 于 70℃ 水浴消解 30 min,放冷,再用甲醇定容至 10 ml,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后用流动相稀释到适当倍数,按 1.3.1 项下色谱条件分析,测定峰面积,代入标准曲线计算回收率。

1.4 包封率和载药量的测定 取含药微球约 50 mg,精密称定后置于 10 ml 容量瓶中,按 1.3.4 项下回收率试验方法处理,按 1.3.1 项下色谱条件测定 Rg3 浓度,根据下列公式计算每一处方微球的载药量和包封率。载药量=微球中药物量/微球重量×100%;包封率=微球中药物量/投药量×100%。

1.5 微球的粒径及形态考察 在带标尺的光学显微镜下观察干态微球的球形及分散性,选择具有代表性的区域,测定 500 个微球,计算平均粒径。将干态微球均匀散在样品平台上,用导电胶固定后溅金,用扫描电镜观察微球表面形态。

1.6 星点设计优化微球制备工艺 在预实验的基础上,选择对 Rg3 壳聚糖微球性质影响较显著的 3 个因素为考察对象,即投药比(X<sub>1</sub>)、有机相与水相比(X<sub>2</sub>)、初乳与油相比(X<sub>3</sub>)。采用三因素五水平表(表 1),以包封率(Y<sub>1</sub>)、载药量(Y<sub>2</sub>)和 40~60 μm 粒径微球所占比例(Y<sub>3</sub>)为评价指标,并作为因变量,分别对各因素、各水平用 Statistic 软件进行二项式拟合。经逐步回归计算,求得复相关系数较高的目标函数,固定 3 个自变量之一为中值,其他 2 个自变量为横坐标,并绘制效应面(response surface)图,由图选取较佳工艺条件,并按优化的工艺条件制备 3 批微球。

表 1 星点设计优化微球制备工艺的因素水平表  
Tab 1 Independent variables and correspondent values in coded and physical form of CCD

Independent variable	Level				
	-1.682	-1	0	1	1.682
X <sub>1</sub> (W/W)	0.5	0.702 7	1	1.594 5	2
X <sub>2</sub> (V/V)	0.5	0.702 7	1	1.594 5	2
X <sub>3</sub> (V/V)	0.066 7	0.080 2	0.1	0.159 5	0.2

X<sub>1</sub>: Drug and carrier material ratio; X<sub>2</sub>: Organic phase and water phase ratio; X<sub>3</sub>: First emulsion and oil phase ratio

## 2 结果

### 2.1 Rg3 含量测定 HPLC 法的方法学考察结果

2.1.1 标准曲线 回归方程为: C=0.000 7A-2.525 3(r<sup>2</sup>=0.999 3),表明浓度在 1~100 μg/ml 范围内线性关系良好。HPLC 图谱见图 1。在此色谱条件下,Rg3 的保留时间为 5.3 min 左右。各组分峰分离效果好,空白微球不干扰 Rg3 微球的测定。

2.1.2 精密度与回收率 结果见表 2。Rg3 壳聚糖微球的回收率在 98%~102% 之间,而日内日间精密度均小于 2%,表明该含量测定方法回收率和精密度符合要求。

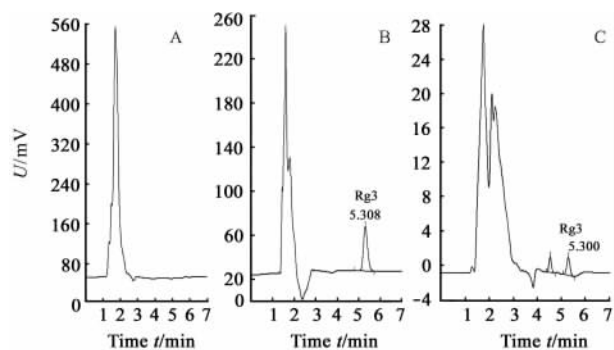


图 1 Rg3 含量测定 HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatography of Rg3 content determination

A: Non-loaded microsphere; B: Rg3 standard solution; C: Rg3-loaded microsphere

表 2 方法回收率与精密度结果

Tab 2 Recovery and precision of HPLC

Concentration $\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	Recovery/% (n=3)	Inter-day RSD/%	Intra-day RSD/%
25	98.97±0.33	0.918	1.07
50	99.53±0.72	0.883	1.33
100	101.12±0.39	0.827	1.29

2.2 Rg3 微球制备工艺优化结果 见表 3。

二项式回归方程及其复相关系数如下：

$$Y_1 = -15.20445 - 39.12614X_1 + 17.69138X_2 + 723.28081X_3 + 11.37559X_1^2 - 8.77773X_2^2 - 2279.19745X_3^2 + 9.56869X_1X_2 - 61.25310X_1X_3 - 14.57971X_2X_3 (r=0.8315)$$

$$Y_2 = -9.61607 - 9.24557X_1 + 4.58785X_2 + 295.57791X_3 + 1.89888X_1^2 - 3.65380X_2^2 - 986.18820X_3^2 + 6.20663X_1X_2 - 18.07232X_1X_3 + 3.34036X_2X_3 (r=0.7724)$$

$$Y_3 = 53.86277 + 27.99942X_1 + 9.91994X_2 - 428.67169X_3 - 7.24955X_1^2 - 5.70773X_2^2 + 3693.33211X_3^2 + 0.23814X_1X_2 - 101.97252X_1X_3 - 316.16971X_2X_3 (r=0.8558)$$

从拟合方程的复相关系数可见, 3 个方程采用二项式方程拟合效果较好, 3 个因素对包封率、载药量及粒径均有影响。

分别以  $Y_1$ 、 $Y_2$ 、 $Y_3$  值为因变量, 固定影响最小的自变量为中值, 相对于另 2 个自变量的效应面三维图见图 2~4。

表 3 星点设计优化微球制备工艺结果

Tab 3 Experimental design with experimentally determined values of different dependent variables

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1 / \%$ (n=3)	$Y_2 / \%$ (n=3)	$Y_3 / \%$ (n=3)
1	0.7027	0.7027	0.0802	11.93±0.20	4.92±0.73	46.00±6.08
2	1.5945	0.7027	0.0802	11.57±0.27	7.11±0.91	35.67±6.11
3	0.7027	1.5945	0.0802	21.71±0.32	8.96±0.46	0
4	1.5945	1.5945	0.0802	17.98±0.92	11.05±0.10	0
5	0.7027	0.7027	0.1595	28.96±0.19	11.95±0.24	63.67±14.47
6	1.5945	0.7027	0.1595	12.20±0.52	7.50±0.68	46.33±12.58
7	0.7027	1.5945	0.1595	27.36±1.18	11.29±0.25	0
8	1.5945	1.5945	0.1595	23.40±0.50	14.38±0.55	0
9	0.5	1	0.1	28.26±1.70	9.42±0.38	20.33±5.77
10	2	1	0.1	9.62±0.13	6.41±1.98	40.00±7.81
11	1	0.5	0.1	9.75±0.24	4.87±1.02	30.33±13.32
12	1	2	0.1	12.28±0.65	6.14±0.24	10.00±7.00
13	1	1	0.0667	8.78±0.81	4.39±0.13	58.33±9.45
14	1	1	0.2	9.51±0.84	4.76±0.12	56.33±14.01
15-20	1	1	0.1	10.77±0.55	5.38±0.48	40.33±12.22

$X_1$ : Drug/chitosan;  $X_2$ : Organic phase/water phase;  $X_3$ : First emulsion/oil phase;  $Y_1$ : Encapsulation efficiency;  $Y_2$ : Drug loading capacity;  $Y_3$ : Ratio of 40-60  $\mu\text{m}$  microspheres

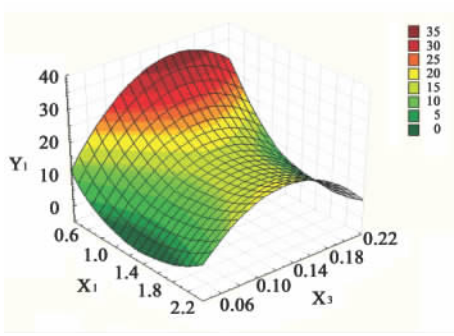


图2 包封率( $Y_1$ )对投药比( $X_1$ )及初乳与油相比( $X_3$ )的预测效应面图

Fig 2 Response surface of encapsulation efficiency as a function of  $X_1$  and  $X_3$   
Organic phase and water phase ratio  $X_2=1$

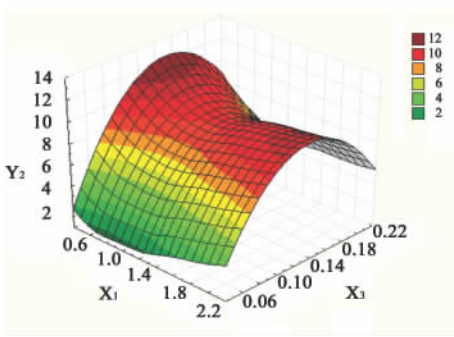


图3 载药量( $Y_2$ )对投药比( $X_1$ )及初乳与油相比( $X_3$ )的预测效应面图

Fig 3 Response surface of drug loading capacity as a function of  $X_1$  and  $X_3$   
Organic phase and water phase ratio  $X_2=1$

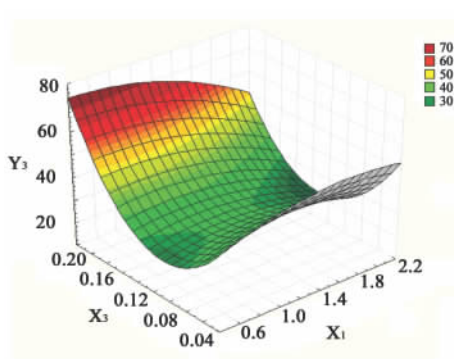


图4 40~60  $\mu\text{m}$  微球所占比例( $Y_3$ )对投药比( $X_1$ )及初乳与油相比( $X_3$ )的预测效应面图

Fig 4 Response surface of proportion of 40-60  $\mu\text{m}$  microspheres as a function of  $X_1$  and  $X_3$   
Organic phase and water phase ratio  $X_2=1$

根据效应面优选的较佳处方范围为  $X_1:0.4\sim 0.5$ ;  $X_3:0.13\sim 0.17$ 。其中有机相与水相比对方影响较小,则选取原则为刚好能溶解药物的有机溶剂量,取  $X_2$  范围为  $0.4\sim 0.6$ 。即较佳处方为:投药比( $X_1$ ): $0.45$ ;有机相与水相比( $X_2$ ): $0.5$ ;初乳与油相比( $X_3$ ): $0.15$ 。照此条件制备的3批Rg3壳聚糖微球,其平均包封率、载药量和40~60  $\mu\text{m}$  微球所占比例的数据结果见表4。

表4 优化处方制备Rg3微球实测值与预测值的比较

Tab 4 Predicted and measured values of microspheres prepared according to optimal experimental conditions

Parameter	Predicted	Measured( $n=3$ )	Variance <sup>a</sup>
$Y_1$	30.28	$30.61\pm 1.46$	-1.09
$Y_2$	10.56	$10.25\pm 0.08$	2.94
$Y_3$	56.78	$52.00\pm 3.00$	8.42

<sup>a</sup>: Variance (%) = (predicted value - measured value)/predicted value  $\times 100\%$ .  $Y_1$ : Encapsulation efficiency;  $Y_2$ : Drug loading capacity;  $Y_3$ : Ratio of microspheres which size between 40  $\mu\text{m}$  and 60  $\mu\text{m}$

由表4可见,包封率、载药量及40~60  $\mu\text{m}$  微球所占比例得到的实测值与预测值偏差均较小,表明优选处方的制备工艺较为稳定。重复3次测定所得结果的平均值与预测值很接近,表明所得的拟合方程可以较好地描述指标与因素之间的关系。由光镜可见微球球形圆整,分散性良好,粒径大小均匀。图5为粒径分布直方图。

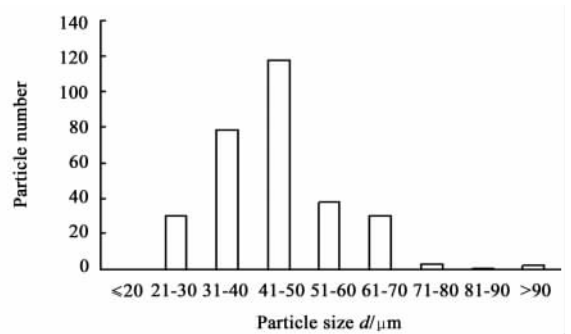


图5 粒径分布直方图

Fig 5 Size distribution of Rg3-loaded chitosan microspheres

其中40~60  $\mu\text{m}$  的微球占总数的52.0%,微球平均粒径为( $44.99\pm 12.59$ )  $\mu\text{m}$ 。

图6为载药微球的扫描电镜(SEM)图片,由图片可见,微球表面较粗糙,球形圆整,形态良好,含药微球表面有很多微小孔洞,可能是复乳法制备时溶解药物的有机溶剂挥发排走后形成的。

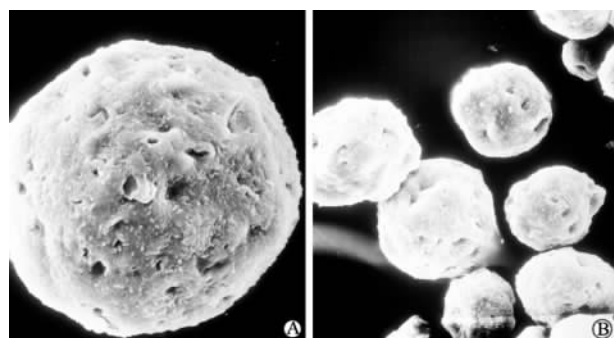


图6 含药微球扫描电镜照片

**Fig 6 SEM photography of Rg3-loaded chitosan microspheres**  
A: Single microsphere; B: Microspheres. Original magnification:  $\times 1\ 500$  (A);  $\times 1\ 000$  (B)

### 3 讨论

壳聚糖是由甲壳素脱乙酰基后得到的一种天然高分子氨基多糖,是唯一在自然界存在的碱性多糖,分子中含有大量游离的氨基和羟基,可与黏液中的糖蛋白形成氢键而产生黏附作用,因此具有良好的生物吸附性,同时分子结构中带正电荷,可与带负电荷的黏膜相互作用打开细胞间紧密连接接口,促进药物间转运<sup>[12]</sup>,所以可增强药物的透膜能力,是良好的黏膜吸收促进剂。

在星点设计时,如果采用多指标优化实验,各指标的优选条件可能会相互矛盾,即对某一指标有利的条件可能对其他指标不利,这时,可采用综合指标(overall desirability, OD)来考察指标的综合效果<sup>[13]</sup>。由于本实验中的3个指标均为欲达到最大化的指标,对因素水平的选择趋势一致,因此不再采用OD来优化工艺。

星点设计是多因素五水平的实验设计,是在二水平析因设计的基础上加上极值点和中心点构成的,通常实验表是以代码的形式编排的,实验时再转化为实际操作值,一般水平取值为0、 $\pm 1$ 、 $\pm \alpha$ ,其中0为中值, $\alpha$ 为极值, $\alpha = (F)^{1/4}$ ,F为析因设计部分实验次数, $F = 2^k$ (k为因素数),所以三因素的 $\alpha = (2^3)^{1/4} = 1.682^{[13]}$ 。

鼻黏膜给药微球的粒径对药物在鼻腔中分布影响较大。当粒径小于 $10\ \mu\text{m}$ 时,微球会随气流进入

支气管,而当粒径很大时,微球主要分布在外鼻腔非纤毛区,药物吸收差。因此,鼻黏膜给药微球的粒径最好在 $40\sim 60\ \mu\text{m}$ 范围内<sup>[14]</sup>,本研究制备的Rg3壳聚糖微球平均粒径为 $(44.99 \pm 12.59)\ \mu\text{m}$ , $40\sim 60\ \mu\text{m}$ 的微球占总数的52.0%,符合此要求。

### [参考文献]

- [1] Park I H, Piao L Z, Kwon S W, Lee Y J, Cho S Y, Park M K, et al. Cytotoxic dammarane glycosides from processed ginseng[J]. Chem Pharm Bull, 2002, 50: 538-540.
- [2] Keum Y S, Han S S, Chun K S, Park K K, Park J H, Lee S K, et al. Inhibitory effects of the ginsenoside Rg<sub>3</sub> on phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression, NF- $\kappa$ B activation and tumor promotion[J]. Mut Res, 2003, 523-524: 75-85.
- [3] Kim S, Nah S, Rhim H. Neuroprotective effects of ginseng saponins against L-type Ca<sup>2+</sup> channel-mediated cell death in rat cortical neurons[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 365: 399-405.
- [4] 张晶, 王世荣, 陈全成, Long P H, Kang J S. 人参皂苷 Rg<sub>3</sub> (R), Rg<sub>3</sub> (S), Rg<sub>5</sub>/Rk<sub>1</sub> 对乙醇致小鼠记忆阻碍改善作用的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28: 283-284.
- [5] Yue P Y K, Wong D Y L, Wu P K, Leung P Y, Mak N K, Yeung H W, et al. The angiostatic effects of 20(R)-ginsenoside Rg<sub>3</sub>[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72: 437-445.
- [6] 庞焕, 汪海林, 富力, 苏成业. 20(R)-人参皂苷 Rg<sub>3</sub> 人体药代动力学研究[J]. 药学报, 2001, 36: 170-173.
- [7] Costantino H R, Illum L, Brandt G, Johnson P H, Quay S C. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects[J]. Int J Pharm, 2007, 337(1-2): 1-24.
- [8] Gavini E, Rassa G, Muzzarelli C, Cossu M, Giunchedi P. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 68: 245-252.
- [9] Wang J, Tabata Y, Morimoto K. Aminated gelatin microspheres as a nasal delivery system for peptide drugs: evaluation of *in vitro* release and *in vivo* insulin absorption in rats[J]. J Control Rel, 2006, 113: 31-37.
- [10] 敦洁宁, 邓树海, 苗彩云, 张娜. 大蒜素壳聚糖微球的研究[J]. 山东大学学报(医学版), 2005, 43: 452-454.
- [11] 吴婉莹, 李云谷. 金雀异黄酮壳聚糖微球的制备方法[J]. 中国中药杂志, 2002, 27: 353-355.
- [12] Zhang X, Zhang H J, Wu Z M, Wang Z, Niu H, Li C. Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 68: 526-534.
- [13] 吴伟, 崔光华. 星点设计-效应面优化法及其在药学中的应用[J]. 国外医学: 药学分册, 2000, 27: 292-298.
- [14] 陈建明, 毛世瑞, 毕殿洲. 褪黑激素明胶微球的鼻腔给药[J]. 药学报, 2000, 35: 786-789.

[本文编辑] 尹茶