

# 透明质酸钠微球制备工艺的研究

李丹<sup>1\*</sup>, 初阳<sup>2</sup>(1.沈阳医学院奉天医院药学部, 沈阳 110024; 2.中国医科大学附属第一医院药学部, 沈阳 110024)

中图分类号 R944.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)01-0051-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.01.18

**摘要** 目的:制备透明质酸钠微球,为进一步制备透明质酸钠缓释制剂提供参考。方法:采用乳化-交联法制备。对方因素、工艺因素进行单因素试验,在此基础上以包封率为指标,以海藻酸钠质量分数(A)、透明质酸钠与海藻酸钠质量比(B)、交联时间(C)和分散转速(D)为因素设计正交试验优化制备工艺,再通过考察最佳工艺制备的微球的粒径和包封率进行验证试验。结果:优化工艺中A为2%、B为1:3、C为90 min、D为200 r/min。验证试验中微球的平均粒径为 $(107.8 \pm 5.51) \mu\text{m}$ 、包封率为 $(58.92 \pm 3.06)\%$ 。结论:乳化-交联法制备透明质酸钠微球工艺简单、易行。本研究可为进一步制备透明质酸钠缓释制剂奠定基础。

**关键词** 透明质酸钠;微球;制备工艺;正交试验

## Preparation Technology of Sodium Hyaluronate-loaded Microspheres

LI Dan<sup>1</sup>, CHU Yang<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Fengtian Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China; 2.Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110024, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Sodium hyaluronate-loaded microspheres, and to provide reference for sustained-release preparation. METHODS: Sodium hyaluronate-loaded microspheres were prepared by emulsion-cross linking method. The single factor test was performed for prescription factor and technology factor. The preparation technology of microspheres was optimized by orthogonal test with encapsulation efficiency (EE) as index using the concentration of sodium alginate (A), ratio of sodium hyaluronate to sodium alginate (B), crosslinking time (C) and dispersion speed (D) as factors. The investigating particle size and EE of microspheres verification test was carried out by particle size and EE of microspheres. RESULTS: The optimal technology was as follows: A of 2%, B of 1:3, C of 90 min and D of 200 r/min. The EE of the microspheres was  $(58.92 \pm 3.06)\%$  with mean diameter of  $(107.8 \pm 5.51) \mu\text{m}$ . CONCLUSIONS: The emulsion-cross linking method is simple, feasible and lays the foundation for the preparation of Sodium hyaluronate-loaded sustained-release preparation.

**KEYWORDS** Sodium hyaluronate; Microspheres; Preparation technology; Orthogonal test

- modified with non-ionic surfactants as effective non-viral carrier for gene transfer[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2006, 49(2):158.
- [4] 卫晓晓, 焦海胜. 卡马西平口腔速崩片的制备及质量评价[J]. *中国药房*, 2011, 22(5):425.
- [5] Kuu WY, Hardwich LM, Akers MJ, et al. Correlation of laboratory and production freeze drying cycles[J]. *Int J Pharm*, 2005, 302(1/2):56.
- [6] Yang SY, Zheng Y, Chen JY, et al. Comprehensive study of cationic liposomes composed of DC-Chol and cholesterol with different mole ratios for gene transfection[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2013, 101:6.
- [7] 杨硕晔, 王杏林, 杨志强, 等. HPLC法测定洛莫司汀-碘海醇复方脂质体的药物含量及包封率[J]. *药物评价研究*, 2009, 32(1):38.
- [8] 陈召红, 刘舫阳, 魏亚超. 脂质体包封率测定方法研究进展[J]. *解放军药学学报*, 2011, 27(1):79.
- [9] Torchilin VP, Weissig V. 脂质体[M]. 邓意辉, 徐晖, 主译. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2007:1.
- [10] 陈浩, 戴俊东, 王玉蓉, 等. 薄膜超声法制备褪皮素脂质体研究[J]. *药学实践杂志*, 2012, 30(1):32.
- [11] 刘洋, 张振中, 邵彦江, 等. 载基因纳米阳离子脂质体前体制剂的制备及性质研究[J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(1):72.
- [12] 邓礼荷, 韦敏燕, 汤晨懿, 等. 冻干工艺及保护剂对羟基喜树碱脂质体质量的影响[J]. *中国医药工业杂志*, 2012, 43(1):30.
- [13] 刘娟, 卢荣, 樊君, 等. 响应面法优化BSA冻干脂质体的处方工艺[J]. *西北大学学报:自然科学版*, 2011, 41(6):1001.
- [14] Konica Minolta Medical & Graphic, Inc. *Liposome compositions containing X-ray contrast agents, and production*: JP, 2006298838[P]. 2006-11-02.

\*副主任药师, 硕士。研究方向: 药剂学。电话: 024-85715668。

E-mail: lidanjerry@126.com

(收稿日期: 2013-04-08 修回日期: 2013-06-05)

透明质酸(Hyaluronic acid, HA)及其钠盐是广泛存在于人体及动物体内的一种黏多糖,是体内重要的生理活性物质,广泛应用于食品、日化和医药领域<sup>[1-2]</sup>;其在组织形成、细胞调控及血管生成方面都起着重要的作用<sup>[3]</sup>。HA本身具有良好的生物相容性、高黏弹性和毒副作用小等优点,既可延缓皮肤衰老,补充皮肤水分;又可促进伤口愈合,防止疤痕产生<sup>[4-5]</sup>。虽然已有上市的含HA的化妆品<sup>[6]</sup>,但其仅作为保湿剂出现,并非作为主要成分使用,因此药用效果不明显,也不适合大规模药用。

本文以透明质酸钠为模型药物,海藻酸钠为骨架材料,采用乳化-交联法制备了包载透明质酸钠的海藻酸钠微球。该制剂处方选择和制备工艺的关键是利用微球所形成的不溶性骨架,以降低透明质酸钠的释放速度,延长释药时间,从而达到提高生物利用度的目的。本研究可为进一步制备透明质酸钠缓释制剂奠定基础。

## 1 材料

DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器有限公司);FA1104电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);UV-9100型紫外分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司);DMBA450生物数码显微镜(麦克迪实业集团有限公司);LS320激光粒度仪(美国Beckman公司)。

三乙醇胺(天津市博迪化工有限公司);透明质酸钠(山东福瑞达生物医药有限公司,批号:0911062,药用级,含量:99.5%);海藻酸钠(河北大唐生物工程股份有限公司,药用级);海藻酸钠微球(沈阳医学院奉天医院药学部);对羟基苯甲酸乙酯、氯化钙、聚山梨酯80均为药用级;二氯甲烷、异丙醇、液体石蜡、丙三醇、硬脂酸、白凡士林、阿利新蓝均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 透明质酸钠含量测定方法的建立

精密称量透明质酸钠,用去离子水溶解后配成质量浓度为53.15、106.3、212.6、318.9、425.2 mg/L的标准溶液,摇匀。取上述标准溶液各1 ml,加入10 ml量瓶中,加6 ml阿利新蓝染料染色,混合后用去离子水稀释至刻度,作为显色溶液。在510 nm波长处测定各溶液的吸光度值。以透明质酸钠质量浓度( $\rho$ )为横坐标,标准溶液与显色溶液的吸光度差值( $A$ )为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为: $A=0.0017\rho+0.1848$ ( $r=0.9980, n=5$ )。结果表明,透明质酸钠检测质量浓度线性范围为53.15~425.2 mg/L。低、中、高3个质量浓度(53.15、212.6、425.2 mg/L)的标准溶液的日内精密度RSD分别为1.88%、0.80%、0.63%( $n=5$ );日间精密度RSD分别为2.57%、1.05%、0.84%( $n=5$ );平均回收率为(97.9±1.80)% ,RSD=1.84%( $n=3$ )。

### 2.2 透明质酸钠微球的制备

称取适量透明质酸钠,精密称定,溶于蒸馏水中,超声溶解后,将适量海藻酸钠细粉溶于其中配成一定浓度的海藻酸钠溶液,静置除去气泡,后用医用9号注射器缓缓滴入搅拌的混合油相中。以一定的分散转速磁力搅拌分散一定时间后,加入适量用氯化钙饱和的交联剂,固化<sup>[7]</sup>。将制得的微球分别用异丙醇洗涤2~3次,抽滤后,40℃干燥6 h,密封贮藏备用。

### 2.3 透明质酸钠包封率及载药量的测定

取制备的海藻酸钠微球50 mg,置于蒸馏水5 ml中超声10 min;37℃放置24 h,取上清液置于10 ml量瓶中,研磨微球至其破碎,离心15 min,将上清液吸取于量瓶中,用蒸馏水稀

定容至10 ml;用0.45 μm微孔滤膜滤过。测定上清液中的药物含量,计算微球中药物的包封率及载药量:包封率=微球中包裹的透明质酸钠质量/透明质酸钠加入量×100%;载药量=微球中包裹的透明质酸钠质量/微球的质量×100%。

## 2.4 处方因素的考察

经过多次预试验,确定对包封率影响较大的几个处方因素,考察结果如下。

2.4.1 海藻酸钠质量分数。固定其他的因素,考察海藻酸钠的质量分数。分别配成含有1%透明质酸钠的1%、2%、3%海藻酸钠溶液,滴入二氯甲烷与植物油等比例组成的混合油相中,以300 r/min转速分散15 min,加入交联剂90 min后制备海藻酸钠微球,其水相与交联剂体积比为1:1,透明质酸钠与海藻酸钠质量比为1:2。结果显示,当海藻酸钠质量分数为1%时,黏度较低,无法成球;当海藻酸钠质量分数为2%时,可成球,且干燥后球之间无粘连,镜下观察微球形态较好,包封率为(45.17±6.12)%( $n=3$ );当海藻酸钠质量分数为3%时,虽然包封率较高(57.28±5.54)%( $n=3$ ),但由于黏度较大,微球形态不佳。因此,选择海藻酸钠质量分数为2%。

2.4.2 混合油相比例。固定海藻酸钠质量分数为2%,制备方法同“2.4.1”项,选择植物油与二氯甲烷的混合油相,体积比为3:1、2:2、1:3,并加入2%油酸山梨坦作为油相的表面活性剂,制备海藻酸钠微球。结果显示,当体积比为3:1和2:2时,混合油相黏度大,干燥后微球粘连严重,微球形态不佳,包封率分别为(38.94±8.46)%( $n=3$ )和(37.25±8.14)%( $n=3$ )。因此,选择体积比为1:3,此时包封率为(45.17±6.12)%( $n=3$ )。

2.4.3 交联剂加入体积。以2%海藻酸钠溶液作为内水相,植物油与二氯甲烷体积比为1:3的混合油为油相,令水相与加入交联剂的体积比为2:1、1:1、1:2,按“2.4.1”项下方法制备海藻酸钠微球。结果包封率依次为(38.97±4.43)%、(45.17±6.12)%和(43.86±7.35)%( $n=3$ ),表明当体积比超过1:1后,再提高交联剂的量,微球的包封率基本不再变化,粒径减小不明显。因此,选择水相与交联剂体积比为1:1。

2.4.4 透明质酸钠与海藻酸钠质量比。分别配制透明质酸钠与海藻酸钠质量比为1:4、1:2、1:1的溶液为水相,水相与交联剂的体积比为1:1,按“2.4.3”项下方法制备海藻酸钠微球。结果包封率依次为(48.93±8.69)%、(45.17±6.12)%和(31.96±7.54)%( $n=3$ ),载药量依次为(6.99±1.64)%、(11.29±2.16)%和(12.78±2.71)%( $n=3$ ),表明透明质酸钠与海藻酸钠比例增加,微球载药量增加,包封率明显降低。因此,综合考虑,选择质量比为1:2。

## 2.5 工艺因素的考察

经过多次预试验,确定了对包封率影响较大的几个工艺因素,考察结果如下。

2.5.1 分散时间。以2%海藻酸钠溶液为水相,透明质酸钠与海藻酸钠质量比为1:2,含2%油酸山梨坦、混合油相比例为1:3的混合油为油相,水相与交联剂体积比为1:1,以300 r/min转速分散5、15、30 min,加入交联剂90 min后制备海藻酸钠微球,制备方法同“2.2”项。结果包封率分别为(37.4±4.37)%、(45.17±6.12)%和(46.26±8.49)%( $n=3$ ),表明随着时间增加,包封率增加,但时间过长会使微球粘连。因此,选择分散时间为15 min。

2.5.2 分散转速。固定分散时间为15 min,分别在100、300、500 r/min下按“2.4.1”项下方法制备海藻酸钠微球。结果包封

率分别为(56.48 ± 8.96)%、(45.17 ± 6.12)%和(34.32 ± 7.34)% (n=3),表明随转速增加,包封率下降,但转速过低微球粒径大,分布不均。因此,选择分散转速为300 r/min。

2.5.3 交联时间。固定分散转速为300 r/min,交联时间分别为30、90、150 min下按“2.2”项下方法制备海藻酸钠微球。结果包封率分别为(31.76 ± 3.62)%、(45.17 ± 6.12)%和(47.03 ± 5.73)% (n=3),表明随着交联时间延长,包封率增加,但增加到90 min后,再延长交联时间,包封率提高不明显,且微球有粘连现象。因此,交联时间选择90 min。

### 2.6 包载透明质酸钠的海藻酸钠微球处方的优化

根据单因素考察结果,选取透明质酸钠质量分数、透明质酸钠与海藻酸钠质量比、交联时间和分散转速为因素进行正交试验,以包封率为指标对处方进行优化,筛选出包封率高、形态好的微球最优处方。影响因素及因素水平取值见表1,正交试验设计及试验结果见表2,极差分析见表3,方差分析见表4。

表1 影响因素及因素水平取值

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(海藻酸钠质量分数,%)	B(透明质酸钠/海藻酸钠质量比)	C(交联时间,min)	D(分散转速,r/min)
1	1.5	1:3	60	200
2	2	1:2	90	300
3	2.5	1:1	120	400

表2 正交试验设计及试验结果

Tab 2 Orthogonal design and results

试验号	因素				包封率, %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	44.51
2	1	2	2	2	48.02
3	1	3	3	3	30.29
4	2	1	2	3	57.55
5	2	2	3	1	37.67
6	2	3	1	2	36.64
7	3	1	3	2	32.48
8	3	2	1	3	24.35
9	3	3	2	1	38.68

表3 正交试验结果极差分析

Tab 3 Results of analysis of range

项目	A	B	C	D
K <sub>1</sub>	40.94	44.85	35.17	40.29
K <sub>2</sub>	43.95	36.68	48.08	39.05
K <sub>3</sub>	31.84	35.2	33.48	37.40
R	12.12	9.65	14.6	2.89

表4 正交试验结果方差分析

Tab 4 Results of analysis of variance

因素	偏差平方和	自由度	F比	F	P
A	238.8	2	18.93	19	>0.05
B	161.9	2	12.84	19	>0.05
C	382.9	2	30.36	19	<0.05
D	12.61	2	1.000	19	>0.05
误差	12.61	2			

由表2可见,各因素对指标的影响程度顺序为C>A>B>D,最佳水平为A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>,即海藻酸钠质量分数为2%,透明质酸钠与海藻酸钠质量比为1:3,交联时间为90 min,分散转速

为200 r/min。

由表3可见,交联时间对微球的包封率有显著影响,而海藻酸钠质量分数、透明质酸钠与海藻酸钠质量比及分散转速对包封率影响不明显。

### 2.7 验证试验

按最优处方制备3批微球,其形态圆整、粒径分布均匀,测得包封率为(58.92 ± 3.06)%,载药量为(10.96 ± 1.12)%;将微球分散于水中,滴入激光粒度测定仪,测得微球平均粒径为(107.8 ± 5.51) μm。

### 3 讨论

氯化钙的水溶液相当于水相,其在油相中也以液滴形式被分散,因此与海藻酸钠液滴接触几率很小,且液滴各点交联不均,交联效果不佳。用氯化钙饱和的二氯甲烷可与油互溶,加入后,可以在海藻酸钠液滴周围形成均匀的交联剂浓度,即液滴各点交联均匀。故本文选择氯化钙溶液饱和的二氯甲烷为交联剂。

一次性加入交联剂,只是在最初形成交联剂的浓度梯度,随着交联剂的消耗,浓度梯度降低,交联效果会变差,内层交联不完全,所以包封率较低,粒径稍大,但形态较好。分次加入交联剂可以在不同时间点始终保持着浓度梯度,交联效果好,交联程度深,包封率高,粒径小,形态好。

分散转速显著影响微球粒径及形态。当分散转速为100 r/min时,提供的外力不足以降低水相的粒径,使得微球大小不一;但由于转速低,水相中药物渗漏量小,包封率较高。当转速为500 r/min时,粒径虽小,但包封率降低,体系黏度增加,出现粘连现象。

因本文中剂型为中间剂型,最终剂型为乳膏剂,故对粒径考虑不多,只是在验证试验时测量了粒径,试验时也只是在显微镜下观察了微球的形态,未照电镜。

### 参考文献

- [1] 陈建英,汪敏,刘杰,等.注射用交联透明质酸钠凝胶的制备及其体外抗酶降解性的研究[J].中国生化药物杂志,2008,29(4):262.
- [2] 南艳微,郑晓玲.多层海藻酸-壳聚糖聚电解质膜微球的制备与体外释放特性研究[J].中国药房,2013,24(17):1581.
- [3] 凌沛学,贺艳丽,白若琬,等.玻璃酸钠结构及理化性质的研究进展[J].中国生化药物杂志,2000,21(3):152.
- [4] 吴钢,刘斐,张传芸,等.透明质酸钠伤口愈合水凝胶促进体表脓肿切开引流术后残腔愈合的研究[J].中国修复重建外科杂志,2008,22(9):1082.
- [5] 赖晓文,何晓升,钟晓春,等.不同时期增生性瘢痕组织内透明质酸含量与含水量的相关性[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(2):323.
- [6] 刘彤.透明质酸及其在化妆品中的应用[J].广州化工,2009,37(8):71.
- [7] Li R, Zhang X, Shi H. Effect of manufacturing parameters on the release profiles of casein-loaded alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation[J]. *J Control Release*, 2011, 152(Suppl 1):e154.

(收稿日期:2013-03-27 修回日期:2013-07-16)