

黄芩苷壳聚糖纳米粒的制备及表征

吴瑛^{1,3}, 李阳², 李凤琴², 杨华生², 王芳^{2*}

(1. 江西省肿瘤医院, 南昌 330029; 2. 江西中医药大学, 南昌 330004;
3. 湘雅萍矿合作医院, 江西 新余 338000)

[摘要] **目的:** 制备和评价黄芩苷壳聚糖纳米粒 (BS-CS-NPs)。 **方法:** 采用离子交联法制备 BS-CS-NPs, 以包封率和粒径为评价指标, 通过单因素试验考察搅拌时间、转速、壳聚糖 (CS) 溶液 pH、CS-黄芩苷 (BC) 投料比、CS-多聚磷酸钠 (TPP) 质量浓度比对制备工艺的影响; 以载药量和包封率的综合评分为指标, 通过正交试验考察 CS-BC 投料质量比、CS-TPP 质量浓度比及 CS 溶液 pH 对制备工艺的影响; 采用电子显微镜观察 BC-CS-NPs 的形态, 激光粒度分析仪测定粒径大小和 Zeta 电位, HPLC 检测包封率和载药量, 检测波长 280 nm, 流动相甲醇-0.2% 磷酸 (47:53)。 **结果:** 最佳制备工艺为 CS-TPP 质量浓度比 5:1, CS 溶液 pH 4, CS-BC 投料质量比 2:1, 搅拌时间 15 min, 转速 1 000 r·min⁻¹; BC-CS-NPs 外观圆整, 粒度分布均匀, 平均粒径 (314.32 ± 12.36) nm, 包封率 (54.73 ± 0.26)%, 载药量 (23.68 ± 0.32)%, 多分散系数 0.335 ± 0.041, Zeta 电位 (24.58 ± 0.36) mV。 **结论:** 优化的制备工艺稳定可行, BS-CS-NPs 形态为均一的类球形实体粒子, 形状规则, 形态饱满。

[关键词] 黄芩苷; 壳聚糖; 纳米粒; 离子交联法; 包封率; 载药量; 粒径分布

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0015-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150015

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1538.010.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:38

Preparation and Characterization of Baicalin-chitosan Nanoparticles

WU Ying^{1,3}, LI Yang², LI Feng-qin², YANG Hua-sheng², WANG Fang^{2*}

(1. Jiangxi Province Tumor Hospital, Nanchang 330029, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
3. Xiangya Pingkuang Cooperation Hospital, Xinyu 338000, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare and assess of baicalin-chitosan nanoparticles (BC-CS-NPs). **Method:** BC-CS-NPs were prepared by ionic cross-linking. Single factor experiments were used to inspect effects regularity of stirring time, rotation rate, pH of chitosan (CS) solution, feeding ratio of CS-baicalin (BC) and concentration ratio of CS-sodium tripolyphosphate (TPP) on encapsulation efficiency and particle size; With composite score of drug loading and encapsulation efficiency as index, orthogonal test was adopted to optimize preparation technology of BC-CS-NPs by taking pH of CS solution, feeding ratio of CS-BC and concentration ratio of CS-TPP as factors; morphology of BC-CS-NPs was observed by electron microscope, particle size and Zeta potential were determined by laser particle size analyzer, HPLC was employed to determine drug loading and encapsulation efficiency with mobile phase of methanol-0.2% phosphoric acid (47:53) and detection wavelength at 280 nm. **Result:** Optimum preparation conditions were as follows; stirring time of 15 min, rotation rate of

[收稿日期] 20131112 (026)

[基金项目] 江西省自然科学基金项目 (20114BAB215042); 江西省教育厅青年基金项目 (GJJ12533); 江西省卫生厅中医药科研计划项目 (2010A091)

[通讯作者] * 王芳, 讲师, 从事药剂学研究, Tel: 0791-87118645, E-mail: cat689apple@163.com

1 000 r·min⁻¹, pH of CS solution 4, CS-BC (2:1) and CS-TPP (5:1); these prepared BC-CS-NPs had round appearance and uniform particle size distribution, mean diameter of BC-CS-NPs was (314.32 ± 12.36) nm, entrapment efficiency and drug-loading efficiency were (54.73 ± 0.26)% and (23.68 ± 0.32)%, polydispersity was 0.335 ± 0.041, Zeta potential was (24.58 ± 0.36) mV. **Conclusion:** This optimized preparation process was stable and feasible, BC-CS-NPs showed uniform spherical solid particles with regular shape and full form.

[**Key words**] baicalin; chitosan; nanoparticles; ionic cross-linking; encapsulation efficiency; drug loading; particle size distribution

黄芩苷 (baicalin, BC) 是从黄芩干燥根中提取得到的黄酮类成分, 具有抑菌、清热、利胆、保肝等药理活性, 能明显抑制大鼠脑组织匀浆铁依赖脂质过氧化, 对大鼠感染性脑水肿模型、脑缺血再灌注损伤模型的保护作用显著, 提示其在抗脑损伤方面具有广阔应用前景^[1]。但 BC 亲水性与亲油性均较差, 生物利用度低, 且易氧化变质, 临床应用受到极大限制。壳聚糖 (chitosan, CS) 是天然多糖中唯一带正电荷的碱性多糖, 来源丰富, 研究显示 CS 能打开上皮细胞密连接, 促进药物分子通过组织上皮转运, 改善药物生物有效性, 且具备低毒及优异生物相容性等优势^[2]。故本实验以 CS 为载体材料, 拟通过离子交联法制备黄芩苷壳聚糖纳米粒并对其质量评价, 为研制 BC 抗脑损伤有效新制剂的开发提供参考。

1 材料

S-570 型扫描电子显微镜 (日本日立公司), 1260 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司), SIGMA3-18K 型高速冷冻离心机 (德国 SIGMA 公司), FreeZone 4.5 L 型冷冻干燥机 (美国 Labconco 公司), Bettersize2000E 型纳米粒度仪 (英国马尔文公司), HF6A 型多头磁力加热搅拌器 (常州国华电器有限公司), S-4800 型扫描电镜 (日本 Hitachi 公司)。

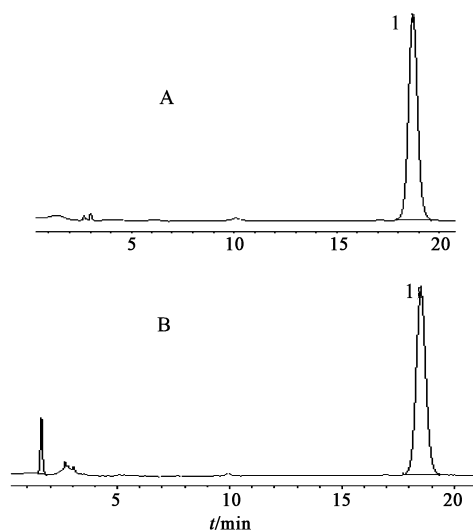
黄芩苷对照品 (BC, 中国食品药品检定研究院, 批号 110715-200514), BC 提取物 (纯度 ≥ 95%, 上海景森生物科技有限), 壳聚糖 (CS, 济南海贝得生物制品有限公司, 脱乙酰度 95%), 多聚磷酸钠 (TPP, 汕头市西陇化工厂有限公司), 聚乙二醇 400 (PEG400, 上海西陇化工厂有限公司), 试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 检测条件的建立

2.1.1 色谱条件 Aglient TC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 检测波长 280 nm, 流动相甲醇-0.2% 磷酸 (47:53), 流速 1 mL·min⁻¹, 进样

量 20 μL, 柱温 30 °C。理论塔板数按黄芩苷峰计不得低于 3 000, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 黄芩苷
图 1 黄芩苷壳聚糖纳米粒 HPLC

2.1.2 标准曲线绘制 精密称取黄芩苷对照品 (经五氧化二磷室温减压干燥至恒重) 适量, 配成 62.2 mg·L⁻¹ 的储备液。分别精密量取储备液 0.1, 1, 2, 4, 6, 8 mL 于 10 mL 量瓶中, 加流动相定容至刻度, 摇匀, 得系列对照品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 32.073X + 8.9527$ ($r = 0.9999$), 线性范围 0.622 ~ 49.76 mg·L⁻¹。

2.1.3 供试品溶液的制备 称取黄芩苷壳聚糖纳米粒 (BC-CS-NPs) 粉末 2.0 mg, 加入 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸 1.0 mL 使分散, 超声 5 min, 离心 (40 000 r·min⁻¹, 15 min, 下同), 收集上清液, 重复操作 3 次, 合并上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.4 精密度试验 取同一对照品溶液 (24.88 mg·L⁻¹) 适量, 按 2.1.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算 BC 峰面积的 RSD 0.12%, 表明仪器精密度良好。

2.1.5 重复性试验 称取同批 BC-CS-NPs 样品 6

份,每份 2.0 mg,按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算 BC 质量分数的 RSD 1.79%,表明该方法重复性良好。

2.1.6 回收率试验 称取空白 CS-NPs 2.0 mg,按 2.1.3 项下方法制备空白 CS-NPs 溶液,平行 9 份,每 3 份为 1 组,依次精密加入 BC 对照品储备液适量,漩涡混匀 5 s,离心,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算 BC 平均回收率 100.73%,RSD 0.93%。

2.1.7 包封率和载药量的测定 称取 BC-CS-NPs 粉末适量(m_1),按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定 BC 质量(m_2),BC 的初始投入量记为 m_3 ,计算包封率(m_2/m_3)和载药量(m_2/m_1)。

2.2 BC-CS-NPs 的制备与表征

2.2.1 BC-CS-NPs 的制备 将 CS 溶解于 2% 乙酸水溶液(50 mL)中,配成 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CS 溶液;取 BC 10 mg,加入 PEG400 10 mL 使溶解,缓慢滴入 CS 溶液中,于 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌,加完 BC 溶液后继续搅拌 10 min,用 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节 pH 5;以 2 滴/s 加入 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TPP 溶液 20 mL,于 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌,加完 TPP 溶液后继续搅拌 20 min,得 BC-CS-NPs 乳液,于 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,冷冻干燥,即得。

2.2.2 粒径及 Zeta 电位测定 取适量 BC-CS-NPs 乳液,加水稀释 10 倍,运用纳米粒度分析仪测定粒径及 Zeta 电位。

2.2.3 电镜观察形态 取少量 BC-CS-NPs 乳液滴在铜网上,滴至铺有碳膜铜网上,静置 2 min,用滤纸吸干混悬液,滴加 2% 磷钨酸溶液(pH 6.2)负染 2 min,自然干燥后用电子显微镜观察纳米粒形态。

2.3 单因素试验考察^[3-4]

2.3.1 CS 和 BC 投料质量比 按 2.2.1 项下方法制备 BC-CS-NPs,固定其他辅料用量,考察 CS 和 BC 投料质量比分别为 1:1,2:1,4:1,6:1 对 BC-CS-NPs 包封率的影响,结果包封率分别为 24.56%,31.08%,60.19%,57.46% ($n=3$),说明投药量对 BC-CS-NPs 包封率影响较大。

2.3.2 CS 与 TPP 质量浓度比 按 2.2.1 项下方法制备 BC-CS-NPs,固定其他辅料用量,考察 CS 与 TPP 质量浓度比分别为 1:2,1:1,2:1,3:1,4:1,5:1,6:1,7:1,8:1,9:1 对 BC-CS-NPs 粒径及包封率的影响,结果发现只有当 CS-TPP 介于 3:1~7:1 时,才能形成包封率较高、稳定性较好的纳米粒。

2.3.3 CS 溶液 pH 用 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 调节 CS 溶液的 pH 分别为 3,4,5,6,其余条件不变,按 2.2.1 项下方法制备 BC-CS-NPs 乳液,计算 BC 包封率依次为 24.56%,62.20%,64.85%,52.32% ($n=3$),说明 CS 溶液 pH 对 BC-CS-NPs 的包封率影响较大。

2.3.4 转速 按 2.2.1 项下方法制备 BC-CS-NPs 乳液,搅拌转速分别为 500,1 000,1 500,2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,其余条件不变,计算 BC 包封率依次为 53.76%,54.55%,60.17%,58.54%,说明转速对 BC-CS-NPs 的包封率影响较小,并且转速太快容易使液体飞溅,综合考虑,选择转速 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.3.5 搅拌时间 按 2.2.1 项下方法制备 BC-CS-NPs,固定其他辅料用量,分别考察 TPP 溶液滴加完毕后继续搅拌时间(15,30,60,90 min)对 BC-CS-NPs 包封率的影响,计算 BC 包封率分别为 55.7%,53.87%,55.32%,60.48% ($n=3$),故选择搅拌时间 15 min。

2.4 正交试验 在单因素试验基础上,选择 CS-BC 投料质量比、CS-TPP 质量浓度比及 CS 溶液 pH 为考察因素,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,以载药量和包封率为指标,参考文献[5-6]的统计方法,在正交试验中引入理想函数(desirability function, DF)对纳米粒制备工艺进行综合评价。数据的统计学处理公式为 $D_i = d_1 + d_2 + d_3 + \dots + d_k$,其中 k 为考察指标的个数。如果 $Y_i \leq Y_{\min}$,则 $d_i = 0$;如果 $Y_{\min} \leq Y_i \leq Y_{\max}$,则 $d_i = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$;如果 $Y_i \geq Y_{\max}$,则 $d_i = 1$ 。 D_i 及 d_i 分别代表总理想函数及每个非独立因素的理想函数, Y_i 为每个非独立因素的试验值, Y_{\max} 和 Y_{\min} 为试验条件下 Y_i 可接受的最大值和最小值。因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 黄芩苷壳聚糖纳米粒制备工艺正交试验因素水平

	A	B	C
水平	CS-TPP 质量浓度比	CS-BC 投料质量比	CS 溶液 pH
1	3:1	2:1	3
2	5:1	4:1	4
3	7:1	6:1	5

由直观分析可知,各因素对制备工艺的影响顺序为 $A > C > B$ 。方差分析表明因素 A, C 对制备工艺具有显著性影响,因素 B 则无显著性影响,确定最佳处方组合为 $A_2B_1C_2$,即 CS-TPP 质量浓度比 5:1,CS 溶液 pH 4,CS-BC 投料质量比 2:1。

2.5 验证试验 按优化的工艺条件制备 3 批 BC-

表 2 黄芩苷壳聚糖纳米粒制备工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D (空白)	包封率 /%	载药量 /%	总分
1	1	1	1	1	20.27	10.80	0.27
2	1	2	2	2	45.33	7.63	0.74
3	1	3	3	3	49.21	5.35	0.72
4	2	1	2	3	56.16	25.33	1.90
5	2	2	3	1	60.30	11.30	1.30
6	2	3	1	2	56.30	13.40	1.23
7	3	1	3	2	66.30	6.73	1.22
8	3	2	1	3	51.23	7.28	0.87
9	3	3	2	1	40.92	7.69	0.63
K_1	0.58	1.13	0.79				
K_2	1.47	0.97	1.09				
K_3	0.91	0.86	1.08				
R	0.89	0.27	0.30				

表 3 总分方差分析

方差来源	SS	f	F	P
A	1.24	2	10.04	<0.1
B	0.11	2	0.12	>0.1
C	0.17	2	9.19	<0.1
D(误差)	9.18	2		

注： $F_{0.1}(2,2) = 9$ 。

CS-NPs, 计算 ($\bar{x} \pm s$) 包封率 (54.73 ± 0.26)%, 载药量 (23.68 ± 0.32)%, 粒径 (314.32 ± 12.36) nm。

2.6 BC-CS-NPs 粒径、Zeta 电位和形态观察

2.6.1 BC-CS-NPs 粒径、Zeta 电位测定 取 BC-CS-NPs 粉末适量, 用水分散, 通过粒度仪测得 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$) 纳米粒的平均粒径 (314.32 ± 12.36) nm, 多分散系数 (polydispersity, PDI) = 0.335 ± 0.041 , 见图 2, Zeta 电位 (24.58 ± 0.36) mV。

2.6.2 BC-CS-NPs 形态观察 按优化的工艺条件制备 BC-CS-NPs 乳液, 取适量乳液滴在铜片上, 真空干燥后用电镜观察, 结果显示纳米粒形态为均一的类球形实体粒子, 形状规则, 形态饱满, 见图 3。

3 讨论

CS 是一种天然高分子阳离子聚合物, 具有良好生物可降解性及生物相容性, 将 BC 溶解在 CS 酸性介质中, 当加入 TPP 后, 在负离子的引力作用下, CS 聚集在一起形成颗粒, 随着 CS 聚集, BC 以物理结合方式包裹或吸附在纳米粒中。

TPP 阴离子与 CS 正电荷氨基集团分子内和分

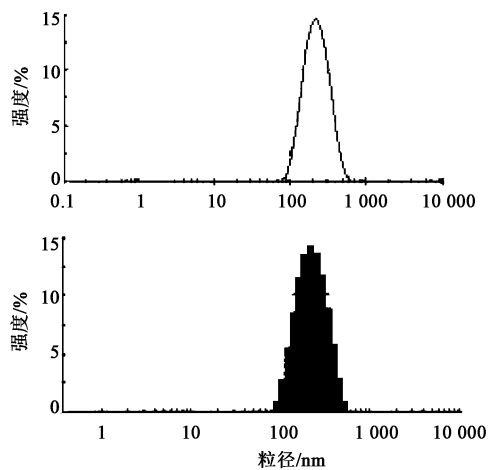


图 2 黄芩苷壳聚糖纳米粒的粒径和多分散指数

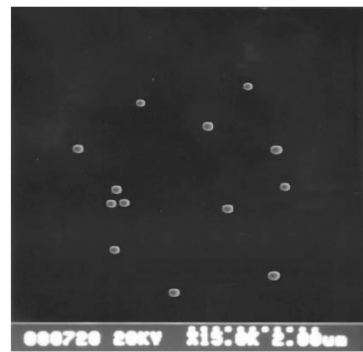


图 3 黄芩苷壳聚糖纳米粒 SEM ($\times 10\,000$ 倍)

子间的交联是离子凝聚法制备 CS-NPs 的关键, 药物在包裹材料中溶解性对制备工艺具有重要影响。BC 脂溶性和水溶性均差, 前期研究发现其在 PEG-400 中溶解度为水中溶解度的 29.25 倍^[7], 故本文采用 PEG-400 为黄芩苷的潜溶剂, 以增加其在 CS 乙酸溶液中的溶解度。

pH 对 BC-CS-NPs 粒径和包封率具有显著影响^[8]。pH 越低, CS 所带正电荷越多, 可引起已形成的微粒在 TPP 阴离子周围结合成更大的颗粒, 致使物理稳定性降低; pH 过高, CS 所带正电荷减少, 在 TPP 阴离子周围的聚合数量降低, 无法生成稳定纳米粒, 只能以疏松絮凝状态存在, 致使包封率下降。前期对 BC 溶液的稳定性进行研究, 结果表明该成分稳定性受 pH 影响显著, 最稳定的 pH 4.3, 结合正交试验数据, 最终确定制备 BC-CS-NPs 的最佳 pH 4.0。

[参考文献]

[1] 辛文好, 宋俊科, 何国荣, 等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 6(1): 50.

新疆维药欧芹根总黄酮的乙醇提取工艺优选及其大孔树脂筛选

陈妍^{1*}, 乌莉娅·沙依提², 马亮英¹

(1. 新疆医科大学第二附属医院药剂科, 乌鲁木齐 830063;

2. 新疆医科大学附属中医医院药学部, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的: 优选欧芹根总黄酮的提取工艺并筛选适合其富集纯化的大孔树脂型号。方法: 采用UV测定总黄酮含量, 检测波长510 nm。以总黄酮提取率和浸膏得率的综合评分为指标, 通过正交试验考察提取时间、提取次数、乙醇体积分数及乙醇用量对欧芹根总黄酮提取工艺的影响; 采用静态吸附-洗脱试验优选适合富集欧芹根总黄酮的大孔树脂型号。结果: 最佳提取工艺条件为加6倍量70%乙醇提取2次, 每次1 h; 总黄酮提取率和浸膏得率分别约0.75%, 14%。欧芹根总黄酮精制工艺中分离纯化效果最好的大孔吸附树脂为D101型。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 筛选的大孔树脂分离纯化效果良好, 为欧芹根的药物开发提供参考。

[关键词] 欧芹根; 总黄酮; 大孔树脂; 芦丁; 浸膏得率; 静态吸附-洗脱试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0019-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150019

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140609.1538.009.html>

[网络出版时间] 2014-06-09 15:38

Optimization of Ethanol Extraction Technology for Total Flavonoids in Roots of *Petroselinum crispum* and Screening of Its Type of Macroporous Resin

CHEN Yan^{1*}, Wuliya · Shayiti², MA Liang-ying¹

(1. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University,

Urumqi 830063, China; 2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of

Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

[收稿日期] 20131122(018)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区高校科研计划青年教师科研启动基金项目(XJEDU2009S48)

[通讯作者] * 陈妍, 硕士, 主管中药师, 从事中维药的开发利用及维药物质基础研究, Tel:13201380316, E-mail:chenyan5711@sina.com

- [2] 姚金凤, 郭晨阳, 杨红, 等. 壳聚糖纳米粒在药物输送中的应用研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(1):90.
- [3] 赵静, 曾建国, 邹剑锋, 等. 黄芩苷-血根碱离子对壳聚糖纳米粒的制备及表征[J]. 中草药, 2012, 43(4):676.
- [4] 何黎黎, 邓黎, 林芸竹. 红景天苷壳聚糖纳米粒的制备及其体外释放性能研究[J]. 中草药, 2013, 44(5):552.
- [5] Trapani A, Sitterberg J, Bakowsky U, et al. The potential of glycol chitosan nanoparticles as carrier for low water soluble drugs[J]. Int J Pharm, 2009, 375(1/2):97.
- [6] Lee Y S, Lowe J P, Gilby E, et al. The initial release of cisplatin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres[J]. Int J Pharm, 2010, 383(1/2):244.
- [7] 欧水平, 王森, 杨明, 等. 黄芩苷溶解性能的测定与表征[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(20):3954.
- [8] Garcia-Fuentes M, Alonso M J. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? [J]. J Control Release, 2012, 161(2):496.

[责任编辑 刘德文]