

鞣花酸微球的制备及体外释放度考察

张华*, 靳诗英, 周海梅, 陈文, 祝世发
(石河子大学药学院, 新疆石河子 832002)

[摘要] 目的:优化鞣花酸微球的制备工艺并考察其体外释药机制,为该制剂的体内药物动力学研究提供参考。方法:采用 HPLC 测定鞣花酸含量,流动相乙腈-0.1% 磷酸水(23:77),检测波长 254 nm。以微球释放度为考察指标,通过正交试验考察海藻酸钠、壳聚糖、氯化钙质量分数及海藻酸钠-药物质量比对鞣花酸微球处方工艺的影响,利用零级动力学方程、一级动力学方程和 Higuchi 方程进行体外释放度拟合。结果:最佳处方工艺为海藻酸钠-鞣花酸(3:1),海藻酸钠 2%,氯化钙 2%,壳聚糖 0.1%;微球在 48 h 内平均释放度 80.14%,体外释放符合 Higuchi 方程 $Q = 0.131t^{1/2} - 0.0469$ ($r = 0.9664$)。结论:该处方工艺稳定可行、重复性好。鞣花酸微球体外释放具有缓释性能。

[关键词] 鞣花酸;微球;体外释放度;释放行为

[中图分类号] R283.6;R284.1;R284.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)07-0011-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015070011

Preparation and *in vitro* Release of Ellagic Acid Microspheres ZHANG Hua*, JIN Shi-ying, ZHOU Hai-mei, CHEN Wen, ZHU Shi-fa (School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation process of ellagic acid microspheres and investigate its *in vitro* release mechanism for pharmacokinetic. **Method:** HPLC was employed to determine the content of ellagic acid with mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid water (23:77) and detection wavelength at 254 nm. Taking release as index, orthogonal test was adopted to optimize formulation process with contents of sodium alginate, chitosan, calcium chloride and mass ratio of sodium alginate-drug as factors, zero-order kinetics equation, first order kinetics equation and Higuchi equation were taken to fit *in vitro* release of ellagic acid microspheres. **Result:** Optimum formulation was as following: sodium alginate to ellagic acid of 3:1, sodium alginate of 2%, chitosan of 0.1%, calcium chloride of 2%. Release of ellagic acid microspheres was 80.14% within 48 h, its *in vitro* release fitted Higuchi equation of $Q = 0.131t^{1/2} - 0.0469$ ($r = 0.9664$). **Conclusion:** This optimized process is stable, practicable and repeatable. Ellagic acid microspheres show sustained release performance.

[Key words] ellagic acid; microspheres; *in vitro* release; release behavior

鞣花酸又名并没食子酸、胡颓子酸,是广泛存在于各种坚果、软果植物中的一种天然多酚组分^[1]。该化合物具有优异的抗突变^[2-3]、抗癌变功效,能与金属离子螯合^[4],具有抗氧化作用,能与人体内有害自由基结合^[5-6],维护细胞膜的流动和蛋白质的构象,防止辐射诱发的 DNA 断裂,抑制人体免疫缺陷病毒,增强机体免疫力。随着对鞣花酸的深入研究,发现其对许多肿瘤^[7]均有治疗作用,包括白血病、肝癌、前列腺癌^[8]等,被认为是最有开发潜力的天然化学抗癌药之一。近年来,国内外对鞣花酸的研究较多,主

要是关于石榴皮、叶和籽中鞣花酸提取工艺^[9]和含量测定方面的报道^[10],其中石榴皮中鞣花酸提取物含量已达 40%,但关于鞣花酸制剂方面的研究较少,同时国内市面上尚未出现相关剂型。本实验拟从石榴皮中提取鞣花酸,通过锐孔凝固浴法制备鞣花酸微球并优化其制备工艺,考察鞣花酸微球的释放机制,为该制剂的体内药物动力学研究提供参考。

1 材料

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津),LG16-3 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),ZRS-8G 型

[收稿日期] 20140715(006)

[基金项目] 兵团青年科技创新专项(2013CB013);兵团医药专项课题(2011BA056);石河子大学优秀青年-联合项目(2012ZRKXYQ-YD25)

[通讯作者] *张华,硕士,讲师,从事药物新剂型的研究,Tel:0993-2057010,E-mail:zh_pha@shzu.edu.cn

智能溶出实验仪(天津市天大天发科技有限公司), DHG-9240 型电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司)。鞣花酸对照品(纯度 >95%, 成都曼斯特生物科技有限公司), 鞣花酸提取物(自制), 海藻酸钠(国药集团化学试剂有限公司), 壳聚糖(北京普博欣生物科技有限责任公司), 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 鞣花酸提取物的制备 精密称取过 60 目筛石榴皮粗粉 50 g, 共 3 份, 各加入 60% 乙醇 600 mL, 回流提取 2 次, 每次 30 min, 合并滤液, 于 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 上清液浓缩。加入溶液总体积 2% 的浓硫酸, 90 °C 水浴搅拌酸化 6 h, 趁热过滤, 得鞣花酸提取物, 计算鞣花酸质量分数 52.60%。

2.2 鞣花酸微球制备 采用锐孔凝固浴法。取壳聚糖适量, 溶于 1% 乙酸中, 加入无水氯化钙, 搅拌, 得壳聚糖氯化钙凝固液。另取海藻酸钠溶于水中, 加入适量鞣花酸提取物, 搅匀, 得混悬液。吸取海藻酸钠鞣花酸溶液, 置于 60 °C 水浴中, 于 600 r·min⁻¹ 搅拌, 滴至壳聚糖氯化钙凝固液中, 滴完后加 4 倍量 60 °C 水不断搅拌, 自然冷却至室温, 用氢氧化钠溶液调 pH 5, 加适量戊二醛固化 60 min, 抽滤, 水洗 3 次后抽滤, 放入 45 °C 烘箱中烘干, 即得。

2.3 体外药物释放度的测定

2.3.1 色谱条件^[11] Agilent C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.1% 磷酸水(23:77), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 30 °C。

2.3.2 释放介质配置 取 0.2 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 250 mL, 加入 0.2 mol·L⁻¹ 氢氧化钠 118 mL, 用水稀释至 1 L, 摇匀, 得 pH 6.8 磷酸盐缓冲液。

2.3.3 标准曲线的绘制 精密称取鞣花酸对照品 10 mg, 加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液溶解并定容至 100 mL 量瓶中, 分别精密移取 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 20.0 mL 至 100 mL 量瓶中, 摇匀, 定容, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 按 2.3.1 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 $Y = 84\,993X - 3\,920$ ($r = 0.998\,1$), 线性范围 2.5 ~ 20 mg·L⁻¹。

2.3.4 精密度试验 取 12 mg·L⁻¹ 鞣花酸对照品溶液, 按 2.3.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 计算鞣花酸峰面积的 RSD 1.9%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液配制 12 mg·L⁻¹ 鞣花酸供试液, 超声 10 min, 置 37 °C 水浴中, 分别于 0, 4, 8, 10, 20, 24, 48 h 取样品适量,

10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 按 2.3.1 项下色谱条件, 计算峰面积的 RSD 1.6%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.3.6 回收率试验 称取鞣花酸微球 7.5 mg, 置于 500 mL 量瓶中, 加入适量鞣花酸对照品, 加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液制成 6, 12, 18 mg·L⁻¹ 共 3 个质量浓度的溶液, 于 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 过 0.45 μm 滤膜, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算平均加样回收率 96.85%, RSD 1.4%。

2.3.7 释放度测定 精密称取鞣花酸微囊 1.0 g, 采用浆法测定释放度, 选择 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 900 mL 为释放介质, 转速 120 r·min⁻¹, 温度 (37 ± 0.5) °C, 分别于放入后 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 24, 35, 48 h 取样, 每次取样 5 mL 置离心管中, 同时补充等体积等温度的释放介质, 于 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 按 2.3.1 项下色谱条件测定, 计算各时间点的鞣花酸累积释放量 (Q)^[12]。

$$Q = \frac{C_n \times V + \sum_{i=1}^n C_i \times V_i}{W \times DL} \times 100\%$$

式中 C_n 为第 n 个时间点样品的质量浓度, V 为释放介质总体积, V_i 为第 i 个时间点的取样体积, C_i 为第 i 个时间点样品的质量浓度, W 为微球总质量, DL 为微球载药量。

2.4 微球处方工艺优化 选择海藻酸钠、壳聚糖、氯化钙质量分数及海藻酸钠-药物质量比为考察因素, 每个因素选取 3 个水平, 按 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验, 以微球释放度为评价指标, 试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。由直观分析可知, 各因素对方工艺的影响顺序为 $D > A > C > B$ 。以极差最小的 B 因素为误差项进行方差分析, 结果表明因素 A, C, D 均对释放度具有显著性影响, 确定最优水平组合为 $A_1B_2C_3D_1$, 即海藻酸钠-药物(3:1), 海藻酸钠 2%, 氯化钙 2%, 壳聚糖 0.1%。称取鞣花酸提取物 2.0 g, 按优选的处方制备 3 批鞣花酸壳聚糖-海藻酸钠微球, 按 2.3 项下方法测定释放度, 见图 1。结果显示在该优化工艺条件下, 微球在 48 h 内的平均释放度 80.14%, RSD 0.7%, 表明该优工艺稳定可行。

2.5 体外释放行为拟合 微球在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 900 mL 释放介质中的累积释放度曲线分别用零级动力学方程、一级动力学方程和 Higuchi 方程进行拟合, 比较各方程的相关系数 (r)^[13], 结果拟合方程分别为 $Q = 0.013\,7t + 0.105\,5$ ($r = 0.925\,4$),

表 1 鞣花酸微球处方工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of formulation process of ellagic acid microspheres

No.	A 海藻酸钠 /%	B 壳聚糖 /%	C 氯化钙 /%	D 海藻酸钠-鞣花酸	释放量 /%
1	2.0	0.05	1.0	3.0:1	75.22
2	2.0	0.10	1.5	3.5:1	69.51
3	2.0	0.15	2.0	4.0:1	63.24
4	2.5	0.05	1.5	4.0:1	50.50
5	2.5	0.10	2.0	3.0:1	68.17
6	2.5	0.15	1.0	3.5:1	67.08
7	3.0	0.05	2.0	3.5:1	69.66
8	3.0	0.10	1.0	4.0:1	58.22
9	3.0	0.15	1.5	3.0:1	64.50

表 2 鞣花酸微球处方工艺方差分析

Table 2 Variance analysis of formulation process of ellagic acid microspheres

方差来源	SS	F	P
A	86.75	447.16	<0.01
B(误差)	0.19	1.00	
C	58.98	304.04	<0.01
D	274.38	1 414.35	<0.01

注: $F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

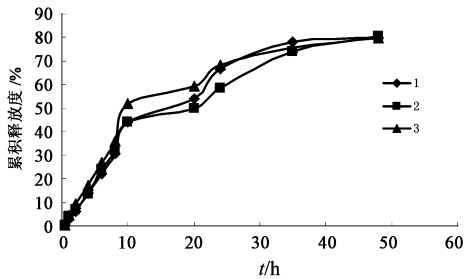


图 1 鞣花酸微球释放量曲线

Fig. 1 Release curves of ellagic acid microspheres

$\ln(1 - Q) = -0.0304t - 0.1446$ ($r = 0.9472$), $Q = 0.131t^{1/2} - 0.0469$ ($r = 0.9664$), 其中 Higuchi 方程拟合的 r 最大, 说明该方程能较好地描述鞣花酸微球的体外释药特征, 该制剂缓释作用明显。

3 讨论

在微球制备过程中, 海藻酸钠质量分数太低, 壳聚糖海藻酸钠电聚电解质膜过薄, 不能形成微胶囊, 或形成的微胶囊机械强度低, 不能有效地对芯材进行包埋; 海藻酸钠质量分数过高, 体系黏度大, 挤出困难且挤出后易变形成饼状物, 包埋效果也不好。鞣花酸微球体外释放试验显示释放曲线在 0~8 h 内上升较快, 主要来自于吸附在微囊表面的药物分子和海藻酸钠材料遇水后通过水合作用在微囊表面形成的凝胶层, 药物通过凝胶层扩散。随后溶剂通过空隙渗入囊内, 凝胶骨架被溶解, 骨架崩散^[14-15], 在 35~48 h 开始趋于平缓, 显示出了鞣花酸微球的

缓释性能。

[参考文献]

[1] Angelika R, Ronald E W. Ellagic acid content of red raspberry juice as influenced by cultivar, processing, and environmental factors [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41 (11): 1951-1960.

[2] Barch D H, Rundhaugen L M, Pillay N S. Ellagic acid induces transcription of the rat glutathione S-transferase-Ya gene [J]. Carcinogenesis, 1995, 16 (3): 665-668.

[3] Ekkel C, Bedaf M M, Pieter M, et al. Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione S-transferase theta 1-1 levels [J]. Carcinogenesis, 1998, 19 (11): 2055-2057.

[4] Lin S S, Hung C F, Tyan Y S, et al. Ellagic [correction of ellagica] acid inhibits arylamine N-acetyltransferase activity and DNA adduct formation in human bladder tumor cell lines (T24 and TSGH 8301) [J]. Urol Res, 2001, 29 (6): 371-376.

[5] Lin S S, Hung C F, Ho C C, et al. Effects of ellagic acid by oral administration on N-acetylation and metabolism of 2-aminofluorene in rat brain tissues [J]. Neurochem Res, 2000, 25 (11): 1503-1508.

[6] Smith W A, Gupta R C. Determining efficacy of cancer chemopreventive agents using a cell-free system concomitant with DNA adduction [J]. Mutat Res, 1999, 425 (1): 143-152.

[7] 郑英俊, 梁武, 彭荣章. 鞣花酸抗肿瘤作用的分子机制 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2007, 34 (1): 11-14

[8] 郑英俊, 阳宁, 彭荣章, 等. 鞣花酸对前列腺癌 PC-3 细胞生长和凋亡的影响 [J]. 湖北职业技术学院学报, 2009, 12 (2): 101-105

[9] 周倩, 戴衍朋, 孙立立. 石榴皮在炒炭过程中没食子酸和鞣花酸含量变化规律的研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39 (22): 4349-4351.

[10] 周本宏, 吴振华, 刘春, 等. 高效液相色谱法测定石榴皮中鞣花酸的含量 [J]. 广东药学报, 2005, 21 (6): 693-694.

[11] 张华, 裴桂珍, 李桂华, 等. 鞣花酸片剂的制备及其含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (13): 39-42.

[12] 杨丽娜. 利福平海藻酸钠微球栓塞剂的体外释放性质研究 [D]. 北京: 中国药品生物制品检定所, 2011.

[13] 储成顶, 王世亮, 许媛媛, 等. 缓释制剂的体外释放拟合模板及释放拟合应用 [J]. 数理医学杂志, 2012, 25 (6): 631-633.

[14] 陈莉敏, 李柱来, 王津. 茶普生缓释微球制备工艺及性能研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19 (5): 878-880, 889.

[15] 吴菁菁, 吕敏, 刘克海. 壳聚糖-海藻酸钠黄芩微囊的制备及释放性能评价 [J]. 中成药, 2011, 33 (12): 2178-2180.

[责任编辑 刘德文]