

甘草总黄酮微海绵的制备及体外释放度评价

洪军辉¹, 乡世健¹, 曹思玮¹, 阮世发¹, 安伯超¹, 陈活记¹,
翁立冬¹, 刘莉¹, 张璐¹, 朱红霞^{2*}, 刘强^{1*}

(1. 南方医科大学, 广州 510515; 2. 南方医科大学 中西医结合医院, 广州 510315)

[摘要] 目的: 优选甘草总黄酮微海绵的制备工艺并考察其体外释放度。方法: 利用类乳剂溶媒扩散法制备甘草总黄酮微海绵, 以微海绵得率、包封率及分散系数为指标, 通过星点设计-效应面法考察聚乙烯醇用量、药物与乙基纤维素的比例、搅拌速度对甘草总黄酮微海绵制备工艺的影响。利用紫外分光光度法测定甘草总黄酮微海绵的包封率, 检测波长 335 nm; 建立 HPLC 同时测定甘草总黄酮中甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 和光甘草定的含量, 检测波长 300 nm, 流动相乙腈-甲醇-0.2% 磷酸水溶液梯度洗脱; 利用透析法比较甘草总黄酮及甘草总黄酮微海绵中 6 个成分的体外释放度。结果: 甘草总黄酮微海绵的最佳制备工艺为聚乙烯醇用量 2.69%, 药物-乙基纤维素(6:1), 搅拌速度 1 100 r·min⁻¹, 搅拌时间 4 h。8 h 内甘草总黄酮中甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 和光甘草定的累积释放度分别为 87.47%, 86.83%, 76.98%, 78.48%, 86.58% 和 56.58%, 24 h 内甘草总黄酮微海绵中这 6 个成分的累积释放度分别为 91.45%, 89.74%, 77.57%, 82.64%, 87.74% 和 67.74%。结论: 利用类乳剂溶媒扩散法制备的甘草总黄酮微海绵粒径大小均匀、工艺稳定且操作简便。甘草总黄酮微海绵具有明显的缓释作用。

[关键词] 甘草; 总黄酮; 微海绵; 甘草苷; 甘草查尔酮 A; 缓释性能; 体外释放度

[中图分类号] R283.6; R942; R284.1; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0012-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140012

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1143.058.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 11:43

Preparation and *in Vitro* Release of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Flavonoids Microsponges

HONG Jun-hui¹, XIANG Shi-jian¹, CAO Si-wei¹, RUAN Shi-fa¹, AN Bai-chao¹, CHEN Huo-ji¹,
WENG Li-dong¹, LIU Li¹, ZHANG Lu¹, ZHU Hong-xia^{2*}, LIU Qiang^{1*}

(1. Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Traditional Chinese Medicine-Integrated Cancer Center of Southern Medical University,
Guangzhou 510315, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation technology of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids microsponges and investigate its *in vitro* release. **Method:** Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids microsponges were prepared by quasi-emulsion solvent diffusion method, taking yield of microsponges, encapsulation efficiency and dispersion coefficient as indexes, central composite design-response surface methodology was adopted to investigate effect of dosage of polyvinyl alcohol (PVA), ratio of drug and ethyl-cellulose, stirring speed on preparation procedure of the microsponges. Encapsulation efficiency of the microsponges was determined by UV spectrophotometry. The content of six major ingredients in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids were

[收稿日期] 20170213(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573611); 广东省科技计划项目(2014A010107013); 广州市科技计划项目(201604016089)

[第一作者] 洪军辉, 在读硕士, 从事中药药剂学和经皮给药研究, Tel:15625090094, E-mail:506617440@qq.com

[通讯作者] * 朱红霞, 副主任医师, 从事儿科临床研究, Tel:13189091972, E-mail:gzzhx2002@163.com;

* 刘强, 博士, 教授, 从事中药药剂学和经皮给药研究, Tel:13189091968, E-mail:gzlq2002@163.com

investigated simultaneously by HPLC, detection wavelength was 300 nm, mobile phase was acetonitrile-methanol-0.2% phosphoric acid aqueous solution for gradient elution. Difference of *in vitro* release between Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids and the microsponges was compared by dialysis method. **Result:** Optimum preparation technology of the microsponges were as follows: PVA amount of 2.69%, drug-ethyl-cellulose (6:1), stirring speed of 1 100 r·min⁻¹, stirring time of 4 h. Within 8 h, cumulative release rates of liquiritin, isoliquiritin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, licochalcone A and glabridin in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids were 87.47%, 86.83%, 76.98%, 78.48%, 86.58% and 56.58%; within 24 h, cumulative release rates of these components were 91.45%, 89.74%, 77.57%, 82.64%, 87.74% and 67.74%, respectively. **Conclusion:** Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids microsponges are homogeneous with an obvious sustained release property, and the optimum preparation technology is stable and simple.

[**Key words**] Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; total flavonoids; microsponges; liquiritin; licochalcone A; sustained release; *in vitro* release

甘草总黄酮是从甘草中提取分离出来的有效部位,具有保肝护肝、抗氧化、抗溃疡、抗肿瘤等药理作用^[1-6]。其酶抑制作用主要体现在抑制酪氨酸酶的活性,进而抑制黑色素的合成,该有效部位抑制酪氨酸酶活性的作用是曲酸的 25 倍,是维生素 C 的 80 倍^[7]。甘草总黄酮还能抑制多巴色素互变酶的活性、阻碍 5,6-二羟基吲哚的聚合,因此富含甘草总黄酮的产品在治疗黄褐斑上取得了良好的效果^[7]。此外,亦有研究表明甘草总黄酮中甘草苷、甘草素及异甘草苷对醛糖还原酶有一定的抑制作用^[8]。目前,甘草总黄酮主要以口服为主,制备成胶囊、分散片和微丸等剂型^[9-11],用于治疗胃溃疡、炎症及抑郁症等;还有一些将甘草总黄酮应用到化妆品中,例如忘忧草系列产品^[7],虽然甘草总黄酮对黄褐斑具有一定的治疗作用,但口服给药时通常会出现首过效应,导致有效药物浓度偏低,治疗效果较差。为了提高药物的有效浓度,将甘草总黄酮制备成缓释制剂^[10-11],对治疗疾病或美白祛斑具有重要意义。

微海绵是一种内部含有很多孔隙,表面有很多孔道开口的聚合物微球,润滑油、芳香剂、矿物油、遮光剂和药物等成分都可以包裹在微海绵中,根据不同的需求制成不同制剂,用于皮肤或胃肠道给药^[12-13],在延长药物释放时间、提高药物稳定性、降低药物副作用、提高药物生物利用度尤其是局部生物利用度方面^[14-15]显示出了较大的优势。目前,与微海绵技术相结合的药物都是单体化合物,主要有酮洛芬,5-氟尿嘧啶,丹皮酚等^[14-15],而将微海绵技术与中药有效部位相结合的研究并无文献报道。本实验拟制备甘草总黄酮微海绵,以其得率、包封率等为指标,通过星点设计-效应面法优化制备工艺^[14,16],并对其体外释放度进行考察,以期提高甘

草总黄酮在皮肤局部的生物利用度,增强其美白祛斑的疗效,探究微海绵技术应用在中药有效部位的可行性,为其他中药原材料的制剂研究和开发提供实验依据。

1 材料

U400/80-220 型单相串激电动搅拌器(上海微特电机有限公司),H-3000N 型扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司),Mastersize2000 型激光衍射粒度分析仪(英国 Malven 公司),1260 型高效液相色谱仪和 Cary 8454 型紫外-可见分光光度仪(美国 Agilent 公司),CP225D 型电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司),MSE225S 型电子天平(德国赛多利斯公司),G-MAG HS4 型磁力搅拌器(德国 IKA 集团)。

甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 和光甘草定对照品(成都克洛玛生物科技有限公司,批号分别为 140729,140404,140827,130814,150924,150411,纯度均为 98%),甘草总黄酮提取物(惠州九惠制药股份有限公司,批号 20150910),聚乙烯醇(上海阿拉丁试剂有限公司),乙基纤维素(天津市大茂化学试剂厂),水为蒸馏水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 甘草总黄酮微海绵的制备^[14-15] 选择水和聚乙烯醇为外相,乙基纤维素和二氯甲烷为内相,其中乙基纤维素为增塑剂,可增加制剂的可塑性。称取适量聚乙烯醇于烧杯中,加入一定量水,放置过夜,使之溶胀完全,作为外相;在 60 °C 下制备内相,加入冷却至室温的外相中,搅拌形成乳剂;继续搅拌 4 h 使有机溶剂挥发,加水静置过夜,过滤,分离微海绵,用水洗涤,常温干燥 24 h,即得。

2.2 微海绵得率的测定 按得率 = $m_{ms}/m_{m} \times 100\%$ 计算, 式中 m_{ms} 为甘草总黄酮微海绵的质量, m_{m} 为最初的投入量 (即乙基纤维素质量 + 甘草总黄酮质量), 平行 3 次, 取平均值。

2.3 甘草总黄酮的含量测定

2.3.1 对照品溶液及供试品溶液的制备 精密称定甘草苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇使溶解并定容至刻度, 摇匀, 得 226.8 mg·L⁻¹ 甘草苷对照品溶液。称取甘草总黄酮微海绵 0.5 g, 置于 25 mL 量瓶中, 加入适量甲醇, 超声 20 min 使溶解并定容至刻度, 得供试品溶液。

2.3.2 标准曲线的制作 精密吸取 226.8 mg·L⁻¹ 甘草苷对照品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加入 10% 氢氧化钾溶液 0.5 mL, 放置 5 min, 用甲醇稀释至刻度, 以相应的溶剂为空白溶液, 于 335 nm 处测定吸光度 A , 以质量浓度为纵坐标, A 为横坐标, 得回归方程 $Y = 65.834X - 0.021 (R^2 = 0.9987)$, 线性范围 4.536 ~ 27.216 mg·L⁻¹。

2.3.3 精密度试验 取 226.8 mg·L⁻¹ 甘草苷对照品溶液 0.5 mL, 按 2.3.2 项下方法显色后测定 A , 结果 RSD 0.3% ($n = 6$), 说明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取供试品溶液适量, 共 6 份, 按 2.3.2 项下方法显色, 测定 A , 计算 RSD 2.1%, 说明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取供试品溶液适量, 按 2.3.2 项下方法显色, 每隔 10 min 测定 1 次 A , 共 6 次, 结果 RSD 1.0%, 说明供试品溶液显色后在 60 min 内稳定。

2.3.6 加样回收率试验 取供试品溶液 0.25 mL (甘草总黄酮微海绵质量浓度 0.2 g·L⁻¹), 平行 6 份, 加入 226.8 mg·L⁻¹ 甘草苷对照品溶液 0.22 mL, 按 2.3.2 项下方法显色, 测定 A , 结果平均加样回收率 98.10%, RSD 2.9%。

2.4 包封率的测定^[17-18] 取甘草总黄酮微海绵适量, 按 2.3 项下方法测定, 按包封率 = $m_1/m_2 \times 100\%$ 计算, 式中 m_1 为甘草总黄酮微海绵中甘草总黄酮的质量, m_2 为甘草总黄酮的投入量。

2.5 粒径分布的测定 利用 Mastersize2000 型激光衍射粒度分析仪进行测定, 分散剂为水, 粒径扫描范围 0.02 ~ 2 000 μm, 颗粒折射率 1.520, 粒径分布均匀性用分散系数表示, 分散系数 = $(\psi_{84} - \psi_{16})/4 + (\psi_{95} - \psi_{5})/6.6$ 。式中 ψ_{84} , ψ_{16} , ψ_{95} 和 ψ_{5} 分别表示粒径分布的体积百分比。

2.6 制备工艺的优选 以聚乙烯醇用量、药物与乙基纤维素的比例和搅拌速度为考察因素, 选用 3 因素 5 水平星点设计, 采用 Design-Expert 8.0 软件处理, 确定聚乙烯醇用量 0.64 ~ 7.36 g, 药物与乙基纤维素的比例 0.64 : 1 ~ 7.36 : 1, 搅拌速度选择 660 ~ 2 340 r·min⁻¹。以甘草总黄酮微海绵得率、药物包封率和分散系数为评价指标, 试验安排及结果见表 1。

表 1 甘草总黄酮微海绵制备工艺的星点试验分析
Table 1 Central composite test analysis for preparation of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids microsponges

No.	A 聚乙烯醇 用量/g	B 药物/乙基 纤维素	C 搅拌速度 /r·min ⁻¹	得率 /%	分散 系数	包封率 /%
1	2.00	1.98	1 000	52.08	0.870	30.17
2	6.00	2.00	1 000	44.08	2.612	26.57
3	2.01	6.00	1 000	55.87	1.021	51.88
4	6.00	3.01	1 000	42.38	1.295	46.57
5	2.00	2.00	2 000	52.27	1.547	37.66
6	6.01	2.00	2 000	30.67	2.279	24.00
7	2.00	6.00	2 000	50.28	1.603	42.60
8	6.00	6.02	2 000	39.29	2.741	36.59
9	0.64	4.02	1 500	62.19	0.934	48.86
10	7.36	4.00	1 500	37.27	2.905	43.36
11	4.00	0.64	1 500	60.89	1.320	40.81
12	4.01	7.36	1 500	64.79	2.078	53.31
13	4.00	3.92	660	65.08	1.701	54.24
14	4.00	4.00	2 340	36.87	2.906	35.70
15	4.00	4.02	1 500	54.78	2.752	53.81
16	4.01	3.94	1 500	58.18	2.654	57.04
17	4.00	4.00	1 500	55.90	3.034	50.40
18	4.01	4.02	1 500	57.77	2.812	54.26
19	4.00	4.00	1 500	63.37	3.029	57.67
20	4.01	4.00	1 500	53.97	1.862	50.64

利用 Design-Expert 8.0 软件对各个效应值及其影响因素进行统计分析, 得回归方程分别为微海绵得率 = $57.60 - 7.03A + 1.12B - 5.08C + 0.64AB - 1.39AC + 0.57BC - 4.48A^2 + 0.16B^2 - 4.04C^2$, 分散系数 = $2.70 + 0.53A + 0.046B + 0.32C - 0.13AB - 0.018AC + 0.21BC - 0.31A^2 - 0.39B^2 - 0.18C^2$, 药物包封率 = $54.25 - 2.77A + 5.88B - 3.33C + 0.74AB - 1.35AC - 3.02BC - 4.58A^2 - 4.25B^2 - 4.99C^2$, 采用 Design-Expert 8.0 软件对各个拟合方程进行方差分析, 见表 2。结果发现对微海绵得率

的影响具有显著性意义的为因素 A, C 及 A^2, C^2 , 对微海绵粒径分布的影响具有显著性意义的为因素

A, C 及 A^2, B^2 , 对药物包封率的影响具有显著性意义的为因素 B 及 A^2, B^2, C^2 。

表 2 各因素对效应值影响的方差分析

Table 2 ANOVA for response surface quadratic model

方差来源	得率		分散系数		包封率	
	F	P	F	P	F	P
A	15.82	0.002 6	20.59	0.001 1	2.65	0.134 7
B	0.40	0.540 6	0.16	0.701 1	11.93	0.006 2
C	8.26	0.016 6	7.68	0.019 7	3.84	0.078 6
AB	0.08	0.787 9	0.76	0.402 4	0.11	0.745 1
AC	0.36	0.560 9	0.01	0.906 7	0.37	0.558 2
BC	0.06	0.810 6	1.92	0.195 7	1.85	0.203 5
A^2	6.78	0.026 4	7.59	0.020 3	7.66	0.019 8
B^2	0.01	0.928 0	11.86	0.006 3	6.59	0.028 1
C^2	5.50	0.040 9	2.42	0.151 2	9.08	0.013 1

2.7 验证试验 利用 Design-Expert 8.0 软件对各个因素水平进行分析,用归一值来评价最优处方。结果显示最优工艺条件为聚乙烯醇用量 2.69%, 药物-乙基纤维素(6:1), 搅拌速度 $1\ 090\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 根据实际情况, 搅拌速度调整为 $1\ 100\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 微海绵得率、包封率及分散系数的预测值分别为 61.38%, 56.36%, 1.39, 最优处方的归一值 0.857。取一定量甘草总黄酮, 按优选的工艺进行 3 次验证试验, 结果微海绵得率、包封率及分散系数的平均值分别为 60.76%, 52.84%, 1.06, 说明拟合方程的预测是可靠的。

2.8 甘草总黄酮微海绵的形态学观察 制备的甘草总黄酮微海绵为黄色粉末, 见图 1; 扫描电镜下分布均匀, 微海绵呈多孔状球体结构, 见图 2。利用 Mastersize2000 型激光衍射粒度分析仪对甘草总黄酮微海绵的粒度大小和粒径分布均匀性进行测定, 结果微海绵表面积平均粒径 $(11.01 \pm 0.98)\ \mu\text{m}$, 体积平均粒径 $(24.28 \pm 1.09)\ \mu\text{m}$, 分散系数 1.06 ± 0.12 。

2.9 甘草总黄酮微海绵中指标成分的含量测定 [19-20]

2.9.1 色谱条件 采用 Agilent HC-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流速 $1.0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL, 检测波长 300 nm, 流动相乙腈(A)-甲醇(B)-0.2% 磷酸水溶液(C) 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 15% ~ 22% A, 75% ~ 66% C; 5 ~ 10 min, 22% ~ 32% A, 66% ~ 54% C; 10 ~ 20 min, 32% ~

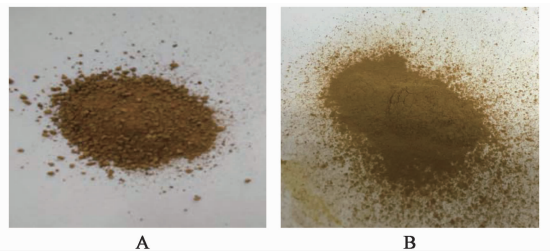


图 1 甘草总黄酮(A)和甘草总黄酮微海绵(B)的外观
Fig. 1 Surface of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids and Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids microsponges

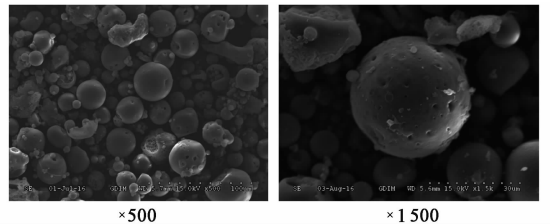
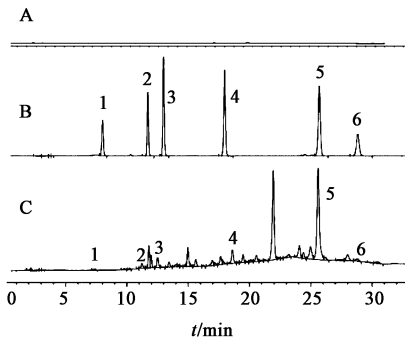


图 2 甘草总黄酮微海绵的扫描电镜
Fig. 2 SEM of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids microsponges

45% A, 54% ~ 35% C; 20 ~ 30 min, 45% A, 35% C; 30 ~ 40 min, 45% ~ 15% A, 35% ~ 75% C)。见图 3, 结果显示阴性样品溶液在与对照品溶液相对应的位置上无色谱峰, 说明空白微海绵对检测无干扰。

2.9.2 对照品溶液及供试品溶液的制备 精密称取甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 及光甘草定对照品适量, 置于 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度分别为 $41.12, 40.64, 64.24, 46.48, 55.20, 60.72\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$



A. 阴性样品; B. 对照品; C. 供试品; 1. 甘草苷; 2. 异甘草苷; 3. 甘草素; 4. 异甘草素; 5. 甘草查尔酮 A; 6. 光甘草定

图 3 甘草总黄酮微海绵的 HPLC

Fig. 3 HPLC chromatograms of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids microsponges

表 3 甘草总黄酮微海绵中指标成分的标准曲线

Table 3 Calibration curves of index ingredients in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids microsponges

溶剂	成分	回归方程式	R^2	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
甲醇	甘草苷	$Y = 54.65X - 243.07$	0.999 4	2.57 ~ 257
	异甘草苷	$Y = 67.33X - 491.36$	0.999 0	5.08 ~ 508
	甘草素	$Y = 78.12X - 212.11$	0.997 9	4.015 ~ 401.5
	异甘草素	$Y = 113.41X - 213.68$	0.998 3	2.905 ~ 290.5
	甘草查尔酮 A	$Y = 45.35X + 769.95$	0.998 7	40.0 ~ 800
	光甘草定	$Y = 44.71X - 319.51$	0.998 5	3.795 ~ 379.5
含 30% PEG400 的生理盐水	甘草苷	$Y = 45.77X - 25.35$	0.999 8	16.25 ~ 325
	异甘草苷	$Y = 77.87X + 48.84$	0.999 5	12.8 ~ 256
	甘草素	$Y = 60.07X + 50.14$	0.999 3	16.3 ~ 163
	异甘草素	$Y = 42.15X + 88.10$	0.999 3	18.75 ~ 187.5
	甘草查尔酮 A	$Y = 49.82X + 143.67$	0.998 3	19.7 ~ 197
	光甘草定	$Y = 18.94X + 24.23$	0.999 3	18.5 ~ 185

光甘草定峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 1.4%, 1.4%, 1.4%, 1.3% 和 1.3%, 说明仪器精密度良好。

2.9.5 重复性考察 精密称取甘草总黄酮微海绵约 7 mg, 共 6 份, 按 2.9.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.9.1 项下色谱条件进行测定, 计算甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 和光甘草定质量分数分别为 7.7, 13.4, 10.8, 7.4, 72.8, 12.1 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.6%, 1.3%, 2.4%, 1.1%, 2.7% 和 0.8%, 说明本方法重复性较好。

2.9.6 稳定性考察 精密称取甘草总黄酮微海绵约 3 mg, 按 2.9.2 项下方法制备供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 时按 2.9.1 项下色谱条件测定, 计算甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔

的混合对照品溶液。取甘草总黄酮微海绵样品约 2 mg, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声使溶解, 放冷, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得供试品溶液。

2.9.3 标准曲线的建立 取甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 和光甘草定对照品溶液适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 分别加甲醇或含 30% 聚乙二醇 400 (PEG400) 的生理盐水溶解并稀释至刻度, 按 2.9.1 项下条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 见表 3。

2.9.4 精密度考察 精密移取同一混合对照品溶液, 按 2.9.1 项下色谱条件重复测定 6 次, 结果甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 和

酮 A 和光甘草定峰面积的 RSD 分别为 0.4%, 0.6%, 0.4%, 0.3%, 0.5%, 1.9%, 说明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.9.7 加样回收率试验 平行精密称取甘草总黄酮微海绵适量, 共 6 份, 分别精密加入甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 和光甘草定对照品适量, 按 2.9.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.9.1 项下色谱条件测定, 计算各成分的平均加样回收率分别为 100.6%, 102.1%, 101.8%, 97.8%, 102.0% 和 97.5%, RSD 依次为 2.2%, 1.3%, 2.5%, 2.4%, 1.9%, 1.7%, 表明该方法的准确度较好。

2.9.8 样品测定 精密称取甘草总黄酮微海绵样品 6.83, 6.61, 6.74 mg, 按 2.9.2 项下方法制备供试

品溶液,按 2.9.1 项下色谱条件测定,结果甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 和光甘草定的质量分数平均值分别为 7.6, 13.4, 10.7, 7.5, 72.8, 12.1 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

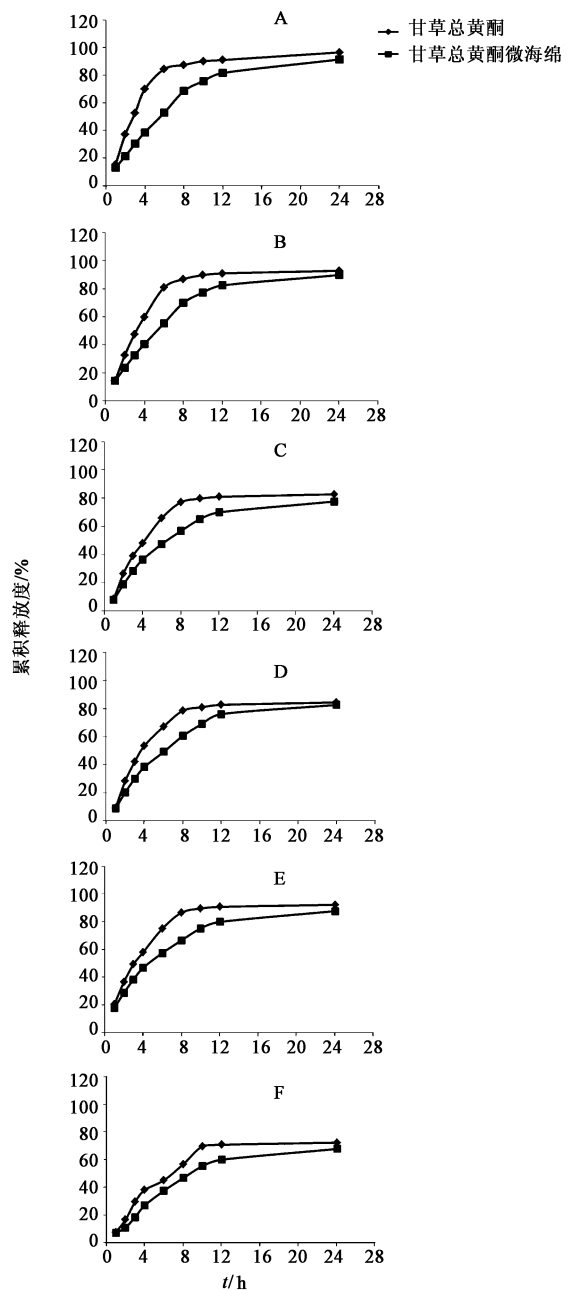
2.10 体外释放度的测定^[21-22] 分别剪取一段透析袋,置于沸水中煮沸 2 min,除去袋内空气,一端用线绳扎紧,分别取甘草总黄酮和甘草总黄酮微海绵混悬液各 5.0 mL 装入预处理透析袋中,再将另一端扎紧,置于烧杯中,加入含 30% PEG400 的生理盐水 50 mL,放置于磁力搅拌器上,转速 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,温度 $(37\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$,分别于 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 各取样 1 mL,每次取样后向透析液补液 1 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.9.1 项下色谱条件测定,计算各成分的累积释放度,见图 4。结果 8 h 内甘草总黄酮中甘草苷、异甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 和光甘草定的累积释放度分别为 87.47%, 86.83%, 76.98%, 78.48%, 86.58% 和 56.58%,而 24 h 内甘草总黄酮微海绵中这 6 个成分的累积释放度分别为 91.45%, 89.74%, 77.57%, 82.64%, 87.74% 和 67.74%,说明甘草总黄酮微海绵具有一定的缓释作用。

3 讨论

微海绵是由交联聚合物构成,主要通过类乳剂溶媒扩散法和自由基悬浮聚合法 2 种方法制备,但由于后者在制备过程中需要添加催化剂或升温或辐射启动才能聚合,操作繁琐,而且反应体系中的两相毒性较强,所以本文选择类乳剂溶媒扩散法制备微海绵。

课题组前期对单一成分与微海绵相结合进行了研究,本文将甘草总黄酮与微海绵技术相结合,建立了同时测定甘草总黄酮中 6 个成分的含量测定方法,以得率、包封率及分散系数为指标,优选了甘草总黄酮微海绵的制备工艺。实验过程中发现随着药物与乙基纤维素的比例增加,微海绵的包封率均呈现先增加后减小的趋势。乙基纤维素是有机相中的聚合物,在能否顺利形成微海绵球体和药物能否被包裹上具有重要的影响;聚乙烯醇溶于水后,作为外相,影响了内相在搅拌过程中微海绵孔隙的形成,是影响微海绵释药行为的重要因素。微海绵的得率则与聚乙烯醇用量和搅拌速度密切相关,聚乙烯醇用量过大,呈过饱和状态,用水洗涤过滤时,随滤液一起流失,而搅拌速度过大或过小,都会在搅拌过程中使药物沉淀于容器底部,导致微海绵得率的降低。

通过对甘草总黄酮含量的方法学考察,发现微



A. 甘草苷; B. 异甘草苷; C. 甘草素; D. 异甘草素; E. 甘草查尔酮 A; F. 光甘草定

图 4 甘草总黄酮及甘草总黄酮微海绵中 6 个成分的体外释放曲线
Fig. 4 *In vitro* release curves of six components in *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids microsponges* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma flavonoids*

海绵技术能够有效包裹甘草总黄酮,且甘草总黄酮微海绵内 6 个成分的含量较为稳定,制备方法稳定性较好。研究结果表明微海绵技术不仅可以与单体化合物相结合,还能够应用于中药有效部位,对中药原材料制剂的开发和研究具有重要意义。此外,体外释放试验结果表明将甘草总黄酮制成微海绵后,能延长药物释放时间,达到一定的缓释作用。结合

微海绵的结构和研究结果,初步推断微海绵作为一种聚合物微球,内部的孔隙并不是与药物的功能团直接相关,而是药物溶解后,在两相的相互作用下,进入微海绵的孔隙内。药物被包裹进入微海绵内部孔隙后,与游离药物直接溶出不同,需要溶剂进入微海绵的孔隙后才能实现药物的溶解,进而从孔隙中释放出来,达到缓释长效的作用。后续将进行甘草总黄酮微海绵在皮肤中的滞留量、渗透速率及药效学研究,为甘草总黄酮微海绵与外用化妆品的适宜性研究奠定基础。

[参考文献]

[1] 景晶,赵金英,华冰,等.甘草总黄酮抑制硫代乙酰胺诱导肝纤维化大鼠肝组织中 TGF- β_1 及 Caspase-3 的表达[J].中国中药杂志,2015,40(15):3034-3040.

[2] Kim Y W, Ki S H, Lee J R, et al. Liquiritigenin, an aglycone of liquiritin in Glycyrrhizae radix, prevents acute liver injuries in rats induced by acetaminophen with or without buthionine sulfoximine [J]. Chem Biol Interact,2006,161(2):125-138.

[3] 傅乃武,刘朝阳,张如意,等.甘草黄酮类和三萜类化合物抗氧化作用的研究[J].中药药理与临床,1994(5):26-29.

[4] 贾国惠,贾世山.甘草中黄酮的药理作用研究进展[J].中国药学杂志,1998,33(9):3-6.

[5] 赵世元,农智新,钟振国.甘草总黄酮体内抗肿瘤作用的实验研究[J].广西医学,2006,28(9):1348-1350.

[6] Fukai T, Marumo A, Kaitou K, et al. Anti-helicobacter pylori flavonoids from licorice extract [J]. Life Sci, 2002,71(12):1449-1463.

[7] 王明利,李春明,董萍,等.甘草黄酮治疗黄褐斑临床疗效观察[J].辽宁药物与临床,2003,6(3):128-129.

[8] Tawata M, Aida K, Noguchi T, et al. Anti-platelet action of isoliquiritigenin, an aldose reductase inhibitor in licorice [J]. Eur J Pharmacol, 1992,212(1):87-92.

[9] 刘永,文振催,黄志刚,等. HPLC 法同时测定甘草总黄酮分散片中甘草素和甘草查尔酮 A 的含量[J].今日药学,2016,26(1):19-21.

[10] 余琳,李小芳,冉茂莲,等.星点设计-效应面法优化甘草总黄酮骨架缓释片处方[J].中药与临床,2014,5

(6):16-18.

[11] 陈丽华,冯怡,徐德生,等.含甘草总黄酮效应组分微丸的制备及性质考察[J].中药材,2008,31(3):434-438.

[12] Embil K, Nacht S. The Microsponge Delivery System (MDS): a topical delivery system with reduced irritancy incorporating multiple triggering mechanisms for the release of actives [J]. J Microencapsul, 1996, 13(5): 575-588.

[13] Chadawar V, Shaji J. Microsponge delivery system [J]. Curr Drug Deliv, 2007, 4(2): 123-129.

[14] LI S S, LI G F, LIU L, et al. Evaluation of paeonol skin-target delivery from its microsponge formulation; *in vitro* skin permeation and *in vivo* microdialysis [J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79881.

[15] Amrutiya N, Bajaj A, Madan M. Development of microsponges for topical delivery of mupirocin [J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2009, 10(2): 402-409.

[16] 臧巧真,唐涛,龙凯花,等.星点设计-效应面法优化 α -细辛脑纳米粒原位凝胶的处方及其体外释放性能考察[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(13):7-10.

[17] 伍蔚萍,孙文基,阎宏涛,等.分光光度法测定甘草中总黄酮的含量[J].药物分析杂志,2005,25(4):469-472.

[18] 周斌,常军,刘可越,等.紫外分光光度法测定甘草中总黄酮的含量[J].安徽农业科学,2009,37(31):15246-15247.

[19] 左婷,翁立冬,刘莉,等. HPLC 同时测定甘蒲祛斑凝胶中甘草素、异甘草素、甘草查尔酮 A 的含量[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(8):73-76.

[20] 任明,许真真. HPLC-UV 切换波长法同时测定复方甘草合剂中甘草苷,异甘草苷,甘草素和甘草酸[J].山东医药,2016,56(11):35-37.

[21] 闫鑫,吕邵娃,郭玉岩,等.槲皮素-PLGA 嵌段共聚物纳米粒冻干粉的制备及体外释放性能考察[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(14):10-13.

[22] 纪周新,刘琳琳,李艺养,等.丹参素脂质体的制备及体外释放度研究[J].中国药师,2015,18(10):1649-1651.

[责任编辑 刘德文]