

黄连总生物碱明胶微球的制备工艺优选

贾永艳*, 袁玉霞, 周宁, 田效志, 李杰
(河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的: 优选黄连总生物碱明胶微球的制备工艺。方法: 采用乳化交联法制备黄连总生物碱明胶微球, 以包封率和载药量的综合评分为指标, 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验考察明胶质量分数、投药量、交联剂用量与水油比对制备工艺的影响。结果: 最佳制备工艺为明胶质量分数 12%, 投药量 1.7%, 交联剂用量 15%, 水相油相比 1:12。载药微球呈圆球形, 表面光滑, 包封率 63.73%, 载药量 6.50%。结论: 优化的制备工艺稳定可行, 制备的微球质量较好。

[关键词] 黄连总生物碱; 盐酸小檗碱; 明胶微球; 正交试验

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0011-03

[doi] 10.11653/syfy2013110011

Optimization of Preparation Technology of Coptis Total Alkaloids Gelatin Microsphere

JIA Yong-yan*, YUAN Yu-xia, ZHOU Ning, TIAN Xiao-zhi, LI Jie
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation technology of Coptis total alkaloids gelatin microsphere. **Method:** Coptis total alkaloids gelatin microsphere was prepared by emulsified cross linking method, with composite score of encapsulation efficiency and drug loading as index, effects of the concentration of gelatin, the dosage of crosslinking agent, feeding dosage and ratio of oil phase-water phase on preparation technology was investigated by orthogonal design. **Result:** Optimal preparation technology was obtained with the concentrations of gelatin 12%, the dosage of Coptis total alkaloids 1.7%, ratio of water phase to oil phase 1:12, the dosage of crosslinking agent 15%. These drug loaded microsphere were spherical with smooth surface, encapsulation efficiency was 63.7%, drug loading was 6.50%. **Conclusion:** This optimized preparation technology was reliable and stable, the prepared microsphere had good quality.

[Key words] Coptis total alkaloids; berberine hydrochloride; gelatin microsphere; orthogonal design

黄连性寒, 味苦, 具有清热、燥湿、解毒、泻火之功效, 常用于治疗湿热痞满、呕吐吞酸、泻痢、黄疸、高热神昏等症。现代研究表明, 黄连的有效部位为生物碱, 包括小檗碱、黄连碱、甲基黄连碱、巴马亭、药根碱、表小檗碱、木兰花碱等, 但以小檗碱为主(约 80%)。黄连生物碱具有增强细胞吞噬、促进机体免疫、降血糖、降血脂及广谱抗菌作用, 但其在患

处浓度低, 作用时间短, 为克服该不足, 拟将其制成缓释制剂, 以提高药物疗效及患者顺应性^[1]。明胶微球具有可生物降解、低毒、廉价易得等优点^[2], 能延缓或控制药物释放, 达到理想的释药目的, 同时还可增加制剂稳定性、掩盖药物的不良嗅味。本实验采用正交试验优选黄连生物碱明胶微球的制备工艺, 并考察其体外释放度, 为后续研究奠定基础。

1 材料

85-2 型恒温磁力搅拌器(金坛市杰瑞尔电器有限公司), AL204 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司), UV-2201 型紫外分光光度计(日本岛津), SUNNY XS-A5 型显微镜(宁波舜宇仪器有限公司), JEOL JSM-7100F 型扫描电镜(日本电子公司), D-

[收稿日期] 20121220(013)

[基金项目] 郑州市科技攻关项目(083SGYS33264-4)

[通讯作者] * 贾永艳, 教授, 硕士生导师, 从事药物制剂新技术与新剂型研究, Tel: 13526862076, E-mail: hunzyjy@126.com

800L 型智能溶出实验仪(天津大学无线电厂)。

盐酸小檗碱对照品(批号 0713-9906, 中国药品生物制品检定所), 黄连(河南省中原正信有限公司, 经河南中医学院陈随清教授鉴定符合 2010 年版《中国药典》要求), 明胶(佛山市化工实验厂), 山梨醇酐单油酸酯(司盘-80, 天津市瑞金特化学品有限公司), 液体石蜡(烟台市双双化工有限公司), 试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄连总生物碱的提取分离 称取黄连药材, 加 0.2% 硫酸浸提, 提取液用石灰中和至 pH 5.0, 过 D101 型大孔树脂柱, 用 75% 酸性甲醇洗脱 5 次, 收集洗脱液, 浓缩, 干燥, 即得, 经测定总生物碱纯度 95%。

2.2 包封率、载药量的测定

2.2.1 检测波长的选择 精密称定盐酸小檗碱对照品适量置于 25 mL 量瓶中, 加 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸溶解, 稀释至刻度, 配制成 1 g·L⁻¹ 的对照品溶液; 另取黄连总生物碱适量同法制成黄连总生物碱溶液; 取明胶适量同法制成明胶溶液; 以 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸为空白, 采用紫外分光光度计于 190 ~ 400 nm 扫描。结果盐酸小檗碱、黄连总生物碱在 346 nm 处有稳定的最大吸收, 明胶则无吸收, 说明辅料对盐酸小檗碱含量测量无干扰, 故选择 346 nm 为检测波长。

2.2.2 标准曲线的建立 精密称取盐酸小檗碱对照品适量, 加 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸制成 40 mg·L⁻¹ 的盐酸小檗碱母液。分别精密吸取该母液 1, 1.5, 1.8, 2, 2.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 制成系列质量浓度的对照品溶液, 分别在 346 nm 处测定吸收度(A)。以 A 为纵坐标, 样品质量浓度为横坐标, 得回归方程 $Y = 0.0694X + 0.0059$ ($R^2 = 0.9991$), 表明盐酸小檗碱在 4.0 ~ 10.0 mg·L⁻¹ 线性关系良好。

2.2.3 精密度试验 精密称取盐酸小檗碱母液, 配制低、中、高(6.0, 8.0, 10.0 mg·L⁻¹) 3 种质量浓度的溶液, 于 1 d 内分别测定 3 次 A, 计算日内误差; 同法, 每日测定 1 次, 连续测定 3 d, 计算日间误差。结果日内精密度 RSD 0.14%, 日间精密度 RSD 0.15%, 表明仪器精密度良好。

2.2.4 回收率试验 准确称取样品 9 份, 分别加入盐酸小檗碱对照品适量(低、中、高 3 个质量浓度水平), 置于锥形瓶中, 加 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸溶液 50 mL, 摇匀, 超声处理 1 h, 于 -4 °C 放置 24 h, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 测定 A, 计算盐酸小檗碱含量, 结果平均回收率 99.45%, RSD 0.92%。

2.2.5 样品测定 取含药微球 8 mg, 精密称定, 置锥形瓶量中, 精密加入 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸 50 mL, 称重, 超声处理 1 h, 于 -4 °C 放置 24 h, 放至室温, 加 0.1 mol·L⁻¹ 乙酸补足缺失的质量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 收集续滤液, 测定 A, 计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = \text{微球含药量} / \text{投药量} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \text{微球含药量} / \text{微球质量} \times 100\%$$

2.3 黄连总生物碱明胶微球的制备 采用乳化-化学交联法^[3-5] 制备。将明胶加入黄连总生物 PBS(pH 5.7) 溶液中, 于 65 °C 溶解作为水相; 液体石蜡、司盘-80 混匀作为油相; 将水相加入油相中, 搅拌乳化 40 min, 转入冰水浴, 搅拌冷却至 5 °C, 加入甲醛, 搅拌 15 min, 加 20% 的 NaOH 溶液调节 pH 至 8, 搅拌 15 min, 加异丙醇、丙酮洗涤, 抽滤, 干燥, 即得。

2.4 制备工艺优选 在预试验基础上, 选取明胶质量分数、投药量、交联剂用量与水油比为考察因素, 通过 L₉(3⁴) 正交设计安排试验, 重复试验 2 次, 以包封率和载药量的综合加权评分为评价指标, 综合评分 = ($X_i / X_{\text{最大值}} \times 80\% + Y_i / Y_{\text{最大值}} \times 20\%$)。采用 SPSS 17.0 统计分析软件对试验结果进行方差分析。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 黄连总生物碱明胶微球的制备工艺
正交试验因素水平

水平	A 明胶质量 分数/%	B 投药量 /%	C 交联剂 用量/%	D 水相 油相比
1	8	1.3	15	1:8
2	10	1.5	30	1:10
3	12	1.7	40	1:12

由直观分析可知, 各因素对制备工艺的影响顺序为 $C > A > D > B$; 以极差最小的 B 因素为 D 误差项进行方差分析, 表明因素 C 具有显著性影响, 最优处方拟定为 A₃B₃C₁D₃, 即明胶质量分数 12%, 投药量 1.7%, 交联剂用量 15%, 水油比 1:12。

2.5 验证试验 按优选处方工艺连续制备 3 批黄连总生物碱明胶微球, 结果平均包封率 63.73% (RSD 1.98%), 平均载药量 6.50% (RSD 3.84%), 表明优选的制备工艺稳定可行。制得的微球经光学显微镜(×40)、扫描电镜(×250)观察与分析, 显示微球呈球形, 为一个多孔球体, 外观圆整, 粒径较均匀, 分散性良好, 见图 1~2。

2.6 体外累积释放度的测定^[5-8] 根据《中国药典》2010 年版二部附录释放度测定法中第二法进行

表2 黄连总生物碱明胶微球的制备工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	包封率 /%	载药量 /%	综合 评分
1	1	1	1	1	55.70	7.50	1.64
2	1	2	2	2	22.35	3.25	0.68
3	1	3	3	3	37.40	6.55	1.19
4	2	1	2	3	49.30	5.80	1.42
5	2	2	3	1	47.00	5.50	1.35
6	2	3	1	2	50.25	7.10	1.50
7	3	1	3	2	47.20	4.60	1.30
8	3	2	1	3	70.65	7.75	2.00
9	3	3	2	1	52.00	6.05	1.49
K_1	3.51	4.36	5.14	4.48			
K_2	4.27	4.03	3.59	3.48			
K_3	4.79	4.18	3.84	4.61			
R_j	53.5	52.7	54.1	53.4			

表3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	0.138	2	0.069	15.33	>0.05
B(误差)	0.009	2	0.005	1.00	
C	0.231	2	0.115	25.67	<0.05
D	0.127	2	0.064	14.11	>0.05

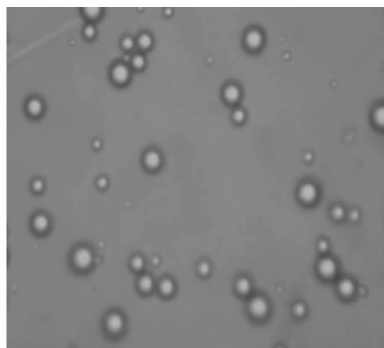
注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

图1 黄连总生物碱明胶微球显微镜照片

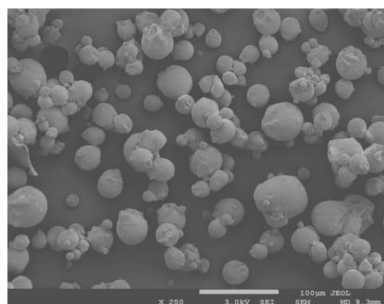


图2 黄连总生物碱明胶微球 SEM

测定,用人工肠液测定微球的释放度。精密称取微球 0.249 g,在人工肠液中进行释放度测定,转速 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度 $(37.0 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$,于设定时间取样,同时补加相同体积的稀释液,测定释放液中总生物碱含量。结果得体外释放模型 $Q = 0.994t +$

$22.618 (R^2 = 0.916)$; $\text{LN}(1 - Q) = -0.232t + 4.631 (R^2 = 0.9436)$; $Q = 30.526t^{1/2} - 5.661 (R^2 = 0.9774)$;表明微球中生物碱按 Hguchi 方程释放,12 h 释放率达 85%,符合缓释、长效要求。

3 讨论

明胶微球包封率的测定方法包括乙醇法^[4]、乙酸法^[9]、酶解法^[10]等,其中前两者较后者实验材料更易获取,且成本较低,故本实验选用乙酸法,即 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸溶解超声法。

明胶微球作为药物载体具有可包裹吸附药物、在骨架崩解前长时间保持载药能力等优势,因而备受关注。本实验采用乳化-交联法制备黄连总生物碱明胶微球,由预试验获知黄连总生物碱明胶微球的包封率受明胶质量分数、投药量、交联剂用量、水相油相体积比影响较大,而搅拌速度在一定范围内对微球粒径的影响不大($>95\%$ 在 $5 \sim 15 \mu\text{m}$),故试验中舍弃粒径大小,选取包封率和载药量的综合加权评分为指标。

[参考文献]

- [1] 陆彬.口服结肠定位给药系统新进展[J].中国药学杂志,2000,35(4):221.
- [2] 唐磊,王高磊,田忠贞,等.鼻腔黏膜给药明胶微球的制备[J].济南大学学报:自然科学版,2010,24(1):75.
- [3] 詹国平,郝丽.艾叶挥发油明胶微球的制备及其性能表征[J].中南大学学报:自然科学版,2011,42(8):2240.
- [4] 曹丰亮.姜黄素肺靶向明胶微球的制备及性质研究[J].制剂与质量,2009,32(3):424.
- [5] 陈永顺,陈黎.水飞蓟宾明胶微球的制备及体外释药[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):23.
- [6] 陈娇婷,孙湘婷,张道英,等.断血流皂苷微球的制备及体外释药[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(2):15.
- [7] 杨黎燕,杨威,尤静,等.茶碱 β -环糊精聚合物微球的制备与缓释性能[J].中国实验方剂学杂志,2012,17(16):8.
- [8] 张雯,张兴祥.青风藤提取物聚乳酸缓释微球的制备及体外释药性能的研究[J].中国中药杂志,2010,35(16):2142.
- [9] 张伟,商丹.小檗碱磁性药物微球的制备及控制释放[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(47):9287.
- [10] 葛庆华,何雯,陈庆华.胰酶-超声法测定甲氨蝶呤明胶微球的药物含量[J].中国医药工业杂志,1990,21(12):554.

[责任编辑 全燕]