

汉黄芩素白蛋白微球的制备及其体外释放

陈永顺, 姜华军, 李志荣*

(湖北医药学院附属太和医院药学部, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的: 制备汉黄芩素白蛋白微球, 并考察其体外释放及稳定性。方法: 以白蛋白为载体, 采用乳化交联法制备汉黄芩素白蛋白微球。在单因素考察基础上, 利用正交设计优化汉黄芩素白蛋白微球制备工艺, 并对微球的粒径和体外释放特性进行研究。结果: 制得的微球形态圆整, 平均粒径 $(0.95 \pm 0.14) \mu\text{m}$, 平均载药量 $(53.58 \pm 3.26)\%$, 平均包封率 $(62.54 \pm 3.17)\%$, 体外释放符合 Higuchi 方程, $Q = 10.4028 t^{1/2} - 1.2056$ ($r = 0.9982$)。结论: 本实验获得了较理想的汉黄芩素白蛋白微球, 其体外释放特性符合缓释制剂特征。

[关键词] 汉黄芩素; 白蛋白微球; 体外释放

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0032-04

Preparation and its *in vitro* Release of Wogonin Albumin Microspheres

CHEN Yong-shun, JIANG Hua-jun, LI Zi-rong*

(Department of Pharmacy, Taihe Hospital Affiliated with Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare wogonin albumin microspheres, and evaluate its *in vitro* release behavior and stability. **Method:** The microspheres were prepared by emulsion cross-linking method with albumin as carrier. Based on single-factor test, preparation technology of wogonin albumin microspheres were optimized by orthogonal design test, investigated size of microspheres and *in vitro* release property. **Result:** Prepared microspheres were round and surface was smooth, the average particle size was $(0.95 \pm 0.14) \mu\text{m}$, the average drug loading was $(53.58 \pm 3.26)\%$ and the average entrapment efficiency was $(62.54 \pm 3.17)\%$, *in vitro* release was in line with Higuchi equation $Q = 10.4028 t^{1/2} - 1.2056$ ($r = 0.9982$). **Conclusion:** This paper obtained ideal wogonin albumin microspheres, its *in vitro* release characteristics was in line with property of sustained-release preparation.

[Key words] wogonin; albumin microspheres; *in vitro* release

汉黄芩素(wogonin)为唇形科植物黄芩的主要活性成分之一, 是一种黄酮类化合物, 具有抗炎、抗肿瘤活性等生物活性, 广泛作用于肿瘤细胞生成的各个通路, 对肿瘤细胞具有较好的选择性并能增强耐药肿瘤细胞对传统药物的敏感性, 尤其能抑制肝肿瘤细胞, 对 CCl_4 、 β -半乳糖胺和酒精引起的肝损伤具有保护作用^[1-2]。目前有关其剂型仅见脂质体^[3]的报道。白蛋白微球是以白蛋白作为载体, 包封或

吸附药物后, 经过分离而形成的实心球体, 其直径一般在几微米到几十微米, 具有无毒、生物可降解、缓释长效等特点, 能提高药物的选择性和生物利用度, 维持较高的血药浓度或靶器官浓度。将汉黄芩素制备成白蛋白微球, 使其能增强在肝部位的靶向性、提高生物利用度、降低剂量、减少不良反应。本实验以白蛋白为载体, 采用乳化交联法制备汉黄芩素白蛋白微球, 通过正交实验设计优化微球制备工艺, 并对工艺的重复性及药剂学性质进行探讨, 为研究汉黄芩素缓释制剂提供参考。

1 材料

SX-40 型扫描电子显微镜(日本明石公司), Agilent1100 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司), TG16A-WS 型台式高速离心机(湖南塞特湘仪

[收稿日期] 20111112(007)

[第一作者] 陈永顺, 硕士, 药师, Tel: 0719-8801107, E-mail: cys1222cys@sina.com

[通讯作者] *李志荣, 主管药师, 从事医院药学研究, Tel: 0719-8801107, E-mail: wz330@sina.com

器有限公司), AYW220D 型电子天平(日本岛津公司), MD-25-14000 型透析袋(上海绿鸟科技有限公司)。

汉黄芩素原料药(上海同田生物技术有限公司, 纯度 $\geq 98.5\%$, 批号 20101208), 汉黄芩素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110203-100426), 20% 人血白蛋白(上海生物制品研究所), 25% 戊二醛(广东汕头西陇化工厂), 脱水山梨醇酐单油酸酯(司盘 80, 广州凌飞化工有限公司), 蓖麻油(通辽市威宁化工有限责任公司), 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 白蛋白微球的制备 采用乳化交联法制备汉黄芩素微球^[4], 将适量汉黄芩素溶于人血清白蛋白水溶液中, 搅拌条件下取 1 mL 加入含有司盘 80 的 100 mL 蓖麻油中, 高速搅拌, 一定温度超声乳化 10 min, 倾入同样搅拌速度下的 150 mL 乙醚中, 立即加入戊二醛, 维持搅拌 15 min, 15 °C 下放置 1 h, 离心分离, 乙醚洗涤, 挥去乙醚即得。

2.2 白蛋白微球载药量及包封率的测定

2.2.1 色谱条件^[5] Kromasil C₁₈ 色谱柱(6.0 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水-乙酸(60:40:0.5), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 275 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。

2.2.2 标准曲线的建立 精密称取汉黄芩素对照品 20 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 流动相溶解, 制成含汉黄芩素 200 mg·L⁻¹ 的溶液, 分别精密量取上述溶液 1, 2, 3, 4, 5, 6 mL 置于 10 mL 量瓶中, 流动相定容至刻度, 摇匀, 取 20 μL 进样, 测定峰面积, 以药物峰面积(A)对样品质量浓度(C)进行线性回归, 回归方程为 $A = 285\ 207C + 6\ 425$ ($r = 0.999\ 8$), 表明汉黄芩素在 20 ~ 120 mg·L⁻¹ 具有良好的线性关系。

2.2.3 载药量和包封率的测定 精密称取汉黄芩素微球粉末适量, 置于研钵中加入少许流动相充分研磨, 于 50 °C 超声处理 30 min, 冷却至室温, 微孔滤膜过滤, 滤液转移到 50 mL 量瓶中, 流动相定容至刻度, 取 20 μL 进样, 计算微球中药物含量, 按下式计算载药量和包封率。

$$\text{载药量} = \frac{\text{微球中药物质量}}{\text{微球质量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{微球中药物质量}}{\text{投入的总药量}} \times 100\%$$

2.3 正交设计试验 在单因素考察的基础上, 选取影响微球性质较显著的 4 个因素作为考察对象, 即乳化剂质量分数(A)、交联剂用量(B)、白蛋白质量分数(C)、搅拌速率(D)。以微球载药量和包封率

为指标进行评分, 综合评分为两者之和, 权重相同, 通过 L₉(3⁴) 正交设计试验优选出最佳工艺条件, 因素水平表见表 1, 结果见表 2, 3。

表 1 汉黄芩素白蛋白微球制备工艺正交试验因素水平

水平	A 乳化剂 质量分数/%	B 交联剂 用量/mL	C 白蛋白 质量分数/%	D 搅拌速率 /r·min ⁻¹
1	1.5	0.15	10	2 000
2	2	0.20	15	2 500
3	2.5	0.3	20	3 000

表 2 汉黄芩素白蛋白微球制备工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	载药量 /%	包封率 /%	综合评分
1	1	1	1	1	54.87	63.18	118.05
2	1	2	2	2	47.28	61.57	108.85
3	1	3	3	3	49.58	59.95	109.53
4	2	1	2	3	43.27	51.12	94.39
5	2	2	3	1	41.88	43.52	85.4
6	2	3	1	2	42.45	35.56	78.01
7	3	1	3	2	34.56	42.26	76.82
8	3	2	1	3	30.41	31.98	62.39
9	3	3	2	1	31.1	30.19	61.29
K ₁	336.43	289.26	258.45	264.74			
K ₂	257.80	256.64	264.53	263.68			
K ₃	200.50	248.83	271.75	266.31			
R	45.31	13.48	4.43	0.88			

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	3 104.77	2	1 552.39	2 659.86	<0.01
B	306.63	2	153.31	262.69	<0.01
C	29.55	2	14.78	25.32	<0.05
D(误差)	1.17	2	0.58	1.00	

注: $F_{0.01}(2, 2) = 99$, $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

表 2, 3 结果分析表明, 影响汉黄芩素白蛋白微球质量的因素顺序为乳化剂质量分数(A) > 交联剂用量(B) > 白蛋白质量分数(C) > 搅拌速率(D), 最佳实验条件为 A₁B₁C₃D₃, 即乳化剂质量分数 1.5%, 交联剂用量 0.15 mL, 白蛋白质量分数 20%。按照优化处方制备 6 批汉黄芩素白蛋白微球, 测得其平均粒径(0.95 ± 0.14) μm, 平均载药量(53.58 ± 3.26)%, 平均包封率(62.54 ± 3.17)%, 见图 1。在扫描电镜下, 微球形态圆整, 表面光滑(图 2)。

2.4 体外释放试验 采用动态透析法测定汉黄芩

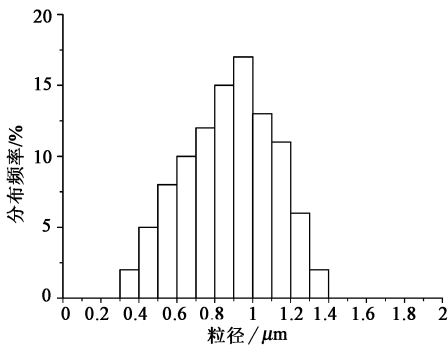


图 1 汉黄芩素白蛋白微球粒径分布

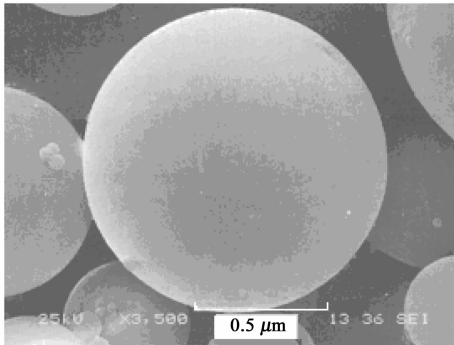
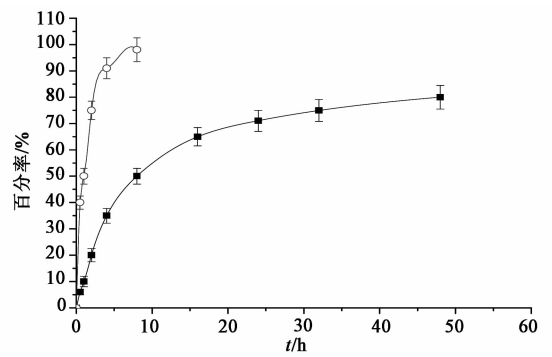


图 2 汉黄芩素白蛋白微球的扫描电镜 (×3 500)

素微球的体外释放^[6]。称取微球适量(约含汉黄芩素 10 mg), 装入处理好的透析袋中, 两端系紧, 置于转篮中。以 100 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 为释药介质, 在 (37 ± 0.5) °C, 100 r·min⁻¹ 条件下进行体外释药试验。分别于 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48 h 取出释药介质 5 mL, 补加等量新鲜介质。将取出的释药介质过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液进行测定, 根据标准曲线计算累计释放率 (Q), 以 Q 对时间 (t) 作图, 累积释放曲线见图 3。运用不同的数学模型 (Higuchi, Weibull, Neibergull, 零级释药模型及一级释药模型) 对汉黄芩素白蛋白微球的累积释放数据进行拟合, 发现其体外释放符合 Higuchi 模型, 方程 $Q = 10.4028 t^{1/2} - 1.2056$ (r = 0.9982)。同时精密称取汉黄芩素 100 mg, 按上述处理方法同法处理。从图 3 中可以看出, 汉黄芩素微球 48 h 释放达 86.6%, 与其原料药相比, 具有一定的缓释作用。



■. 汉黄芩素白蛋白微球; ◇. 汉黄芩素原料

图 3 汉黄芩素白蛋白微球与汉黄芩素原料药释放曲线 ($\bar{x} \pm s$)

2.5 稳定性初步考察 将汉黄芩素白蛋白微球分装于小瓶内, 密封后分别置冰箱 (4 °C), 室温 (25 °C) 和 37 °C 条件下贮存 3 个月, 测定药物载药量, 包封率以及 48 h 累积释放率, 结果见表 4。经 t 检验, 微球的载药量, 包封率以及 48 h 累积释放率在留样前后均无显著性差异, 其外观均无明显变化, 说明汉黄芩素白蛋白微球在室温下放置 3 个月, 质量稳定。

3 讨论

白蛋白微球的制备方法主要有乳化固化法、去溶剂法、聚合物分散法等。为了得到较高的包封率和载药量, 在预试验基础上, 最终采用乳化固化法制备汉黄芩素白蛋白微球。研究结果显示交联剂用量及乳化剂质量分数等对汉黄芩素微球的粒径及分散性均有较大的影响, 故在制备时需严格控制其用量。实验中曾尝试使用明胶作为载体, 但其制得的微球载药量及包封率偏低且粘连严重, 而用白蛋白作为微球载体制得的微球质量较好且人血白蛋白为血液中的正常成分, 生物相容性更好, 更安全。

由于蓖麻油黏度较大, 在制备过程中易产生大量气泡, 制得的微球粒径较大, 超声匀化时须除去气泡, 以免微球粒径均一性较差。用乙醚充分洗涤, 是为了减少微球一定程度的黏连。

由释放结果可知, 以白蛋白为载体材料制备的汉黄芩素微球具有明显的缓释作用, 且成本低廉, 适宜大规模开发应用。该微球载药量较高, 外观圆

表 4 汉黄芩素白蛋白微球放置 3 个月的稳定性试验 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度/°C	载药量	包封率	累积释放率			
			1 h	3 h	12 h	48 h
新鲜制备	53.36 ± 3.17	62.08 ± 3.49	5.64 ± 0.53	16.21 ± 2.48	51.78 ± 3.27	85.50 ± 4.25
4	52.12 ± 2.48	61.82 ± 2.82	5.51 ± 0.46	16.53 ± 2.74	50.96 ± 3.82	84.83 ± 3.14
25	52.83 ± 2.56	61.94 ± 2.74	5.38 ± 0.43	16.16 ± 2.97	51.26 ± 2.43	84.95 ± 3.45
37	51.94 ± 2.93	61.50 ± 2.58	5.36 ± 0.64	15.95 ± 1.88	51.40 ± 2.96	85.05 ± 2.62

硫磺熏蒸怀牛膝工艺筛选

仇立志¹, 赵海霞^{2*}, 李宝国¹

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

[摘要] 目的: 研究硫磺熏蒸对怀牛膝中蜕皮甾酮的影响。方法: 采用高效液相色谱法测定硫磺熏蒸后蜕皮甾酮的含量, XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (15: 85), 检测波长 250 nm, 柱温 25 °C, 流速 0.8 mL · min⁻¹。结果: 硫磺用量 100 g · m⁻³, 熏蒸 1 次, 熏蒸 2 h, 此时蜕皮甾酮的量最高; 蜕皮甾酮在 0.408 ~ 2.448 μg 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 34.167X + 61$ ($r = 0.9996$)。结论: 硫磺熏蒸对怀牛膝中蜕皮甾酮含量有一定影响, 随硫磺用量增加、熏蒸时间延长、熏蒸次数增加而呈减少趋势。

[关键词] 怀牛膝; 硫磺熏蒸; 蜕皮甾酮; 高效液相色谱法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0035-03

Screening of Sulfur Fumigation Technology for *Achyranthes bidentata*

QIU Li-zhi¹, ZHAO Hai-xia^{2*}, LI Bao-guo¹

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ji'nan 250014, China;

2. Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Ji'nan 250011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate influence of sulfur fumigation on ecdysterone from *Achyranthes bidentata*. **Method:** The content changes of ecdysterone after fumigation of sulfur was determined by HPLC, XB-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), mobile phase acetonitrile-water (15: 85), detection wavelength 250 nm, column temperature 25 °C, flow rate 0.8 mL · min⁻¹. **Result:** Conditions of maximum amount of ecdysterone was: the amount of sulfur 100 g · m⁻³, fumigation once for 2 h; Linear relationship of ecdysterone in the range of 0.408-2.448 μg was good, the regression equation was $Y = 34.167X + 61$ ($r = 0.9996$).

[收稿日期] 20110624(004)

[基金项目] 山东省科技厅重大科技专项(2008GG3002008)

[第一作者] 仇立志, 硕士, 从事中药新药开发及中药炮制原理研究, Tel: 18906449162, E-mail: qiulizhi0@163.com

[通讯作者] * 赵海霞, 主任药师, 博士后, 从事中药新药开发及中药炮制原理的研究, Tel: 13793188011, E-mail: zhaohx1115@126.com

整, 平均粒径在 1 μm 左右, 粒径分布在肝靶向微球要求范围内, 关于汉黄芩素白蛋白微球在动物体内的组织分布将进一步进行评价。

[参考文献]

- [1] 杨莉, 尤启冬, 杨勇, 等. 汉黄芩素抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国药科大学, 2009, 40(6): 576.
- [2] 任晓东, 符伟, 张晓芸, 等. 天然产物汉黄芩素的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(9): 777.
- [3] 柯学, 许颖, 严菲, 等. 汉黄芩素脂质体的制备及大鼠

体内药动学[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(6): 502.

- [4] 邓树海. 现代药物制剂技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 217.
- [5] 许颖, 柯学, 平其能. HPLC 法测定大鼠静脉注射汉黄芩素的血药浓度及其药动学研究[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(1): 35.
- [6] 邹东娜, 张典瑞, 张学顺, 等. 苦参碱白蛋白微球的制备及性质[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(12): 824.

[责任编辑 全燕]