

水飞蓟宾明胶微球的制备及体外释药

陈永顺, 陈黎*

(湖北医药学院附属太和医院药学部, 湖北 十堰 442000)

[摘要] 目的: 制备水飞蓟宾明胶微球, 并考察其体外释放性能。方法: 采用乳化交联法制备水飞蓟宾明胶微球。在单因素考察的基础上, 利用正交设计优化水飞蓟宾明胶微球制备工艺, 并对微球的粒径、形态、体外释放特性及初步稳定性进行研究。结果: 制得的微球形态圆整, 平均粒径 $(1.45 \pm 0.27) \mu\text{m}$, 平均载药量 $(56.24 \pm 3.17)\%$, 平均包封率 $(79.54 \pm 5.07)\%$, 体外释放符合 Higuchi 方程, $Q = 15.627 5t^{1/2} - 1.502 8$ ($r = 0.998 5$), 在室温下放置 3 个月质量稳定。结论: 实验制备的水飞蓟宾明胶微球初步稳定, 其体外释放特性符合缓释制剂特征。

[关键词] 水飞蓟宾; 明胶微球; 体外释放

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0023-04

Preparation and *in vitro* Release of Silybin Gelatin Microsphere

CHEN Yong-shun, CHEN Li*

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

[Abstract] **Objective:** To prepare silybin gelatin microsphere, and evaluate its *in vitro* release performance. **Method:** Silybin gelatin microsphere were prepared by emulsion chemical cross-linking method. Based on result of single-factor test, preparation technology was optimized by orthogonal test. And studies on particle size, shape, *in vitro* release characteristics and preliminary stability. **Result:** The microsphere were round and smooth. Average particle size was $(1.45 \pm 0.27) \mu\text{m}$, drug loading rate was $(56.24 \pm 3.17)\%$ and average entrapment was $(79.54 \pm 5.07)\%$. Drug release *in vitro* profile could be described by Higuchi equation $Q = 15.627 5t^{1/2} - 1.502 8$ ($r = 0.998 5$). The microsphere was stable at room temperature for 3 months. **Conclusion:** In this study, silybin gelatin microsphere was preliminary stable, its *in vitro* release characteristics conformed with characteristics of sustained-release formulations.

[Key words] silybin; gelatin microsphere; *in vitro* release

水飞蓟宾(silybin)是从菊科植物水飞蓟果实中提取的一种二氢黄酮类成分, 具有改善肝功能和稳定肝细胞膜的作用, 对肝硬化、急慢性肝炎和代谢中毒性肝损伤疗效确切, 是目前公认的疗效确切的肝损伤修复药物^[1]。但其水溶性较差, 口服给药生

物利用度低^[2], 因此有必要开发其新剂型有利于提高其生物利用度而增加其疗效。利用微球作药物载体, 使静注后微球被网状内皮系统摄取, 通过控制微球的粒径使其能被动地趋向于肝脏, 从而达到提高疗效, 降低不良反应的目的^[3]。本实验以明胶为载体材料, 制备出一定粒径范围的水飞蓟宾明胶微球, 并对影响其质量的关键因素进行了研究。

1 材料

SX-40 型扫描电子显微镜(日本明石公司), Agilent 1100 型高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司), NanoZS 型激光散射粒径分析仪(英国 Malvern 公司), TG16A-WS 型台式高速离心机(湖南塞特湘

[收稿日期] 20110801(012)

[第一作者] 陈永顺, 硕士, 主管药师, 从事药物新剂型与新制剂研究, Tel: 0719-8801107, E-mail: eys1222cys@sina.com

[通讯作者] * 陈黎, 副主任药师, 副教授, 从事中药新制剂及现代化研究, Tel: 0719-8801157, E-mail: chenli@sina.com

仪器有限公司), A UW220D 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)。

水飞蓟宾(盘锦格林恩生物资源开发有限公司, 批号 20100928), 水飞蓟宾对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110856-200604) A 型明胶(淮南药用明胶厂), 液体石蜡(北京丽康伟业科技有限公司), 失水山梨醇月桂酸酯(Span 80, 上海德颖生物科技有限公司), 甲醇为色谱纯, 醋酸、异丙醇、戊二醛、乙醚等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 水飞蓟宾明胶微球的制备^[4] 将液体石蜡温度控制在 55 ℃ 左右, 把含有水飞蓟宾的明胶溶液, 缓慢加入到含有 Span 80 的上述液体石蜡中, 电磁搅拌一定时间使其形成 W/O 乳剂, 然后降温到 25 ℃ 时, 加入适量戊二醛溶液, 并置于加有冰块的水浴中, 使温度控制在(5 ~ 8) ℃, 搅拌固化 30 min, 置入 4 ℃ 冰箱中继续固化 24 h, 倾倒入上层油相, 并用适量异丙醇脱水, 抽滤, 最后用适量异丙醇和乙醚交换冲洗数次, 即得干燥粉末状水飞蓟宾明胶微球。

2.2 水飞蓟宾明胶微球载药量及包封率的测定

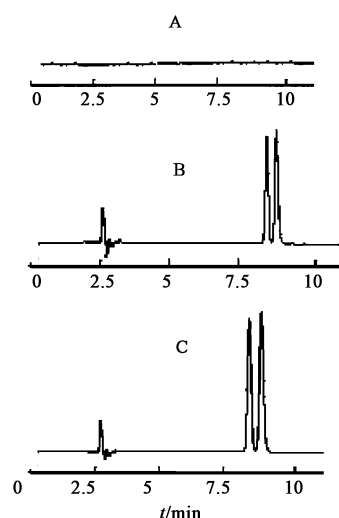
2.2.1 色谱条件^[5] Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇-0.35 mol·L⁻¹ 乙酸(48:52), 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 288 nm, 进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液及供试品溶液的制备 精密称取水飞蓟宾对照品适量, 加甲醇溶解制成含水飞蓟宾 100 mg·L⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶液。

精密称取水飞蓟宾微球粉末适量, 置于研钵中加入少许甲醇充分研磨, 超声处理 30 min, 用微孔滤膜过滤, 加甲醇稀释至 100 mL, 作为供试品溶液。

按处方比例制备不含药物的明胶微球, 按供试品溶液制备方法操作, 得空白溶液。在上述色谱条件下, 分别取对照品溶液、空白溶液、供试品溶液进样测定, 记录色谱图(图 1)可见水飞蓟宾为典型双峰。

2.2.3 标准曲线的建立 分别精密量取标准储备液 0.1, 0.5, 1, 2, 4, 8 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用流动相定容至刻度, 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 $A = 285.026C + 703.5$ ($r = 0.9995$), 表明



A. 空白样品; B. 对照品; C. 供试品
图 1 水飞蓟宾明胶微球 HPLC

水飞蓟宾在 1 ~ 80 mg·L⁻¹ 具有良好的线性关系。

2.2.4 回收率、精密度试验 将高、中、低 3 种质量浓度(80, 20, 1 mg·L⁻¹) 的对照品溶液与少量水飞蓟宾明胶微球(58.56%) 离心上清液混合, 采用 2.2.2 中方法提取水飞蓟宾, 测定, 计算回收率, 结果高、中、低质量浓度的回收率分别为 97.2%, 98.5%, 97.8%。

取回收率试验中的 20 mg·L⁻¹ 的溶液, 在 1 d 内重复 5 次和分散于 1 周内重复 5 次测定, 计算日内、日间精密度。结果, 日内精密度 RSD 0.82%, 日间精密度 RSD 0.95%。

2.2.5 载药量和包封率的测定^[6] 精密称取水飞蓟宾微球粉末适量, 置于研钵中加入少许流动相充分研磨, 超声处理 30 min, 冷却至室温, 用微孔滤膜过滤, 滤液转移到 50 mL 量瓶中, 再用流动相定容至刻度, 取 20 μL 进样, 计算得微球中药物含量, 按下式计算载药量和包封率。

载药量 = (微球中药物的质量/称取的微球的质量) × 100%; 包封率 = (微球中包封的含量药/投入的总药量) × 100%

2.3 正交设计优化水飞蓟宾明胶微球的制备工艺 在单因素考察的基础上, 选取对明胶微球性质影响较显著的 4 个因素作为考察对象, 即明胶溶液质量浓度(A)、O/W 相比(B)、Span80 加入量(C)、搅拌速率(D)。以微球的载药量(S₁)、包封率(S₂)、粒径(S₃) 绿原酸等指标采用多指标全概率评分法^[7] 来进行综合评分, 三者互不相容, 权重不同, 本

文权重比按微球的载药量、包封率、粒径 1:1:0.5 计算,通 $L_9(3^4)$ 正交设计试验优选出最佳工艺条件。结果见表 2,以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析结果见表 3。

表 1 水飞蓟宾明胶微球制备工艺正交试验因素水平

水平	A 明胶质量 浓度/%	B O/W 相比比例	C Span80 加入量/%	D 搅拌速率 /r·min ⁻¹
1	12	3:1	1.0	1 000
2	10	4:1	1.5	1 500
3	8	5:1	2.0	2 000

表 2 水飞蓟宾明胶微球制备工艺正交试验安排

No.	A	B	C	D	载药量 $S_1/\%$	包封率 $S_2/\%$	粒径 $S_3/\mu\text{m}$	综合评分 S
1	1	1	1	1	51.80	80.15	1.25	0.329 0
2	1	2	2	2	50.35	75.53	0.92	0.300 8
3	1	3	3	3	60.51	78.52	1.57	0.364 7
4	2	1	2	3	40.28	53.06	1.08	0.245 8
5	2	2	3	1	35.82	52.51	0.94	0.226 5
6	2	3	1	2	52.24	63.10	0.85	0.281 2
7	3	1	3	2	32.50	61.24	1.35	0.253 6
8	3	2	1	3	31.46	60.52	0.82	0.222 8
9	3	3	2	1	40.15	72.19	1.04	0.275 5
K_1	0.994 5	0.828 5	0.833 0	0.831 1				
K_2	0.753 6	0.750 1	0.822 2	0.835 7				
K_3	0.751 9	0.921 4	0.844 8	0.833 3				
R	0.080 9	0.057 1	0.007 5	0.001 5				

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	1.29×10^{-2}	2	6.5×10^{-3}	3 711.57	<0.01
B	4.9×10^{-3}	2	2.45×10^{-3}	1 400.37	<0.01
C	8.4×10^{-5}	2	4.2×10^{-5}	24.24	<0.05
D	3.5×10^{-6}	2	2×10^{-6}	1.00	
误差	3.5×10^{-6}	2	2×10^{-6}		

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

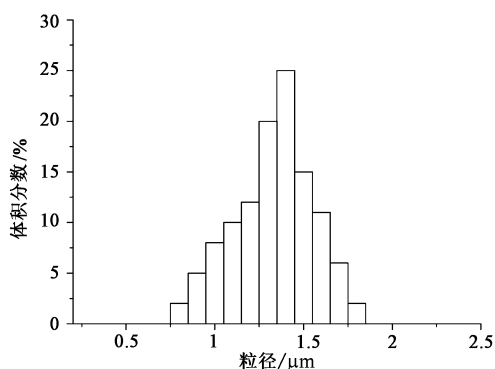
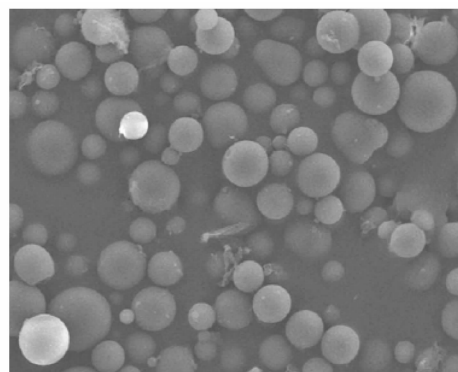


图 2 水飞蓟宾明胶微球粒径分布

表 2,3 结果表明,影响水飞蓟宾明胶微球质量的因素顺序为 $A > B > C > D$,最佳条件为 $A_1B_3C_3D_3$,即明胶质量浓度 12%,O/W 相比例 5:1,Span80 加入量 2%,搅拌速率 $2\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。按照优化处方制备 6 批水飞蓟宾明胶微球,用激光粒度测定仪分别测定粒径和 zeta 电位,平均粒径为 $(1.45 \pm 0.27)\ \mu\text{m}$,粒径分布见图 2,Zeta 电位为 $-(38.54 \pm 5.29)\ \text{mV}$,其平均载药量为 $(56.24 \pm 3.17)\%$,平均包封率为 $(79.54 \pm 5.07)\%$ 。在扫描电镜下可见微球形态圆整,表面光滑,分散性良好,无粘连(图 3)。

图 3 水飞蓟宾明胶微球的扫描电镜($\times 1\ 000$)

2.4 水飞蓟宾明胶微球体外释放试验 采用动态透析法测定水飞蓟宾微球的体外释放^[8]。分别称取 3 批微球适量(约含水飞蓟宾 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 $(37 \pm 0.5)\ ^\circ\text{C}$, $100\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下进行体外释药试验。分别于 0.5,1,2,4,6,8,12,16,24 h 取出释药介质 5 mL,然后补加等量新鲜介质。将取出的释药介质经孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤后取续滤液测定,根据标

准曲线计算累积释放率(Q),以 Q 对时间(t)作图,累积释放曲线见图 4,并进行 Higuchi 方程拟合,方程 $Q = 15.6275t^{1/2} - 1.5028$ ($r = 0.9985$)。从图 4 中可以看出,水飞蓟宾明胶微球在 24 h 释放缓慢而均匀,24 h 内累积释药达 82.5%,具有一定的缓释效果。

2.5 水飞蓟宾明胶微球稳定性的初步考察 将水飞蓟宾明胶微球分装于小瓶内,密封后分别置冰箱(4℃)、室温(25℃)和 37℃条件下贮存 3 个月,测定药物载药量、包封率、粒径以及 24 h 累积释放率,结果见表 4。经 t 检验,微球的载药量、包封率、粒径以及 24 h 累积释放率在留样前后均无显著性差异,

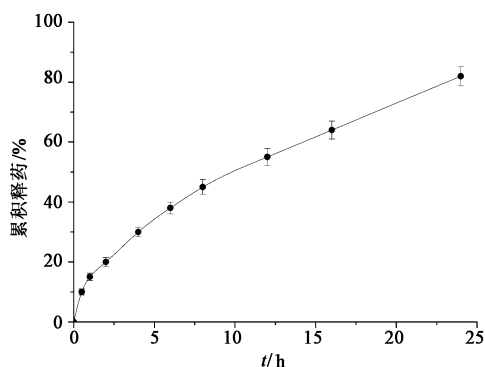


图 4 水飞蓟宾明胶微球药释放曲线($\bar{x} \pm s, n = 3$)

其外观均无明显变化,说明水飞蓟宾明胶微球质量稳定。

表 4 水飞蓟宾明胶微球放置 3 个月的稳定性($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度/℃	载药量/%	包封率/%	粒径/ μm	累积释放率/%				
				1 h	2 h	6 h	12 h	24 h
新鲜制备	56.31 \pm 2.05	79.29 \pm 3.50	1.46 \pm 0.23	18.60 \pm 0.43	21.27 \pm 2.32	39.71 \pm 3.53	55.53 \pm 4.32	85.07 \pm 4.24
4	55.12 \pm 1.82	78.82 \pm 2.61	1.52 \pm 0.16	18.54 \pm 0.27	21.58 \pm 1.80	39.24 \pm 3.16	55.65 \pm 3.18	83.43 \pm 3.80
25	54.83 \pm 2.60	78.14 \pm 2.52	1.56 \pm 0.18	18.31 \pm 0.48	21.87 \pm 1.93	39.24 \pm 2.05	55.33 \pm 3.49	85.02 \pm 3.56
37	54.84 \pm 2.93	77.95 \pm 2.73	1.55 \pm 0.13	18.36 \pm 0.55	21.39 \pm 1.62	39.41 \pm 2.88	55.90 \pm 2.81	84.44 \pm 3.56

3 讨论

在微球的制备中,需要同时考察微球的粒径、载药量、包封率及外形等多个指标,本实验采用多指标综合评分法,得到水飞蓟宾明胶微球的较佳工艺,同时为其可能的工业化生产提供参考。本实验中制备的微球拟用于静脉给药,将其粒径控制在 1 μm 左右,使其能被网状内皮系统的巨噬细胞吞噬,在肝脏有较多分布,从而提高疗效^[3]。研究结果显示,明胶溶液的浓度及 O/W 相比对水飞蓟宾明胶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。本实验中使用明胶作为载体,具有靶向性、缓释性、无免疫原性、可生物降解等特点^[9]。由释放结果可以看到,以明胶为载体材料制备的水飞蓟宾微球具有明显的缓释作用,有利于持续发挥药理作用,提高药效。本研究将进一步进行体内实验,观察其在动物体内主要器官的药物分布,评价其肝靶向性。

[参考文献]

[1] 王忠原,汤佳,陈莉. 水飞蓟宾衍生物的研究进展[J].

药学进展,2009,33(8):360.

[2] 李金柱,李伟. 水飞蓟宾的结构改造研究进展[J]. 中华实用中西医杂志,2007,20(20):1818.
 [3] 崔福德. 药剂学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:457.
 [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] 贾乐姣,张典瑞,王言才. 水飞蓟宾纳米结构脂质载体中主药含量及包封率测定[J]. 中国药学杂志,2009,44(8):1400.
 [6] 郭军,彭博,佟佳伟,等. 关节腔注射用青藤碱微球的制备及其性质考察[J]. 中国药剂学杂志,2008,6(5):256.
 [7] 周琴妹,陈晓斌. 用多指标试验全概率评分法研究敛疮液制备工艺[J]. 中成药,2005,27(3):347.
 [8] 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.
 [9] 于莲,张传美,李爱臣,等. 参芎明胶微球的制备工艺研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(3):667.

[责任编辑 全燕]