

葛根素生物黏附微球的制备及评价

郭 莹，严礼辉，王 华，熊 阳*

(浙江中医药大学，浙江 杭州 310053)

摘要：目的 制备葛根素生物黏附微球。方法 乳化-溶剂挥发法制备黏附微球。在单因素试验基础上，以葛根素加入量、乙基纤维素黏度、乙基纤维素与卡波姆934P比例、搅拌速度为影响因素，包封率及载药量为评价指标，正交试验优化制备工艺。溶解测定仪测定不同时间点葛根素含有量，绘制体外释放曲线。再通过测定胃黏膜上的滞留率来评价其生物黏附性。结果 最佳条件为葛根素加入量200 mg，乙基纤维素黏度45 mPa·s，乙基纤维素与卡波姆934P比例2:1，搅拌速度1200 r/min，载药量59.7%，包封率90.8%。所得微球呈球形或类球形，载药后微球粒径增大，形态饱满，可在体外持续释放药物9 h，生物黏附性良好，在大鼠胃黏膜的滞留率达92.6%。结论 该方法稳定可靠，可为葛根素生物黏附微球的工业化生产和应用提供实验依据。

关键词：葛根素；生物黏附微球；制备

中图分类号：R944 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2017)06-1175-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.013

Preparation and evaluation of puerarin bioadhesive microspheres

GUO Ying, YAN Li-hui, WANG Hua, XIONG Yang*

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

KEY WORDS: puerarin; bioadhesive microspheres; preparation

葛根素具有扩张冠状动脉和脑血管、降低心肌耗氧量、增加脑血流量等药理作用，大多以注射剂形式用于临床，常用于心脑血管疾病的治疗^[1-2]，疗效确切^[3]，但其不良反应的报道也日益增多。口服制剂具有服用方便等优点，但溶解度小，生物利用度有待提高^[4-5]，故新型制剂的开发正成为研究热点。

生物黏附微球可在黏膜表面滞留较长时间，并持续释放药物^[6-9]，具有延缓药物在胃肠道停留时间、提高吸收程度和生物利用度等优点，同时有着长效、缓控释等特性^[10]。本实验采用乳化-溶剂挥发法制备葛根素生物黏附微球，在单因素试验基础上采用正交试验优化制备工艺，并评价其体外释放度、生物黏附性等。

1 材料与试药

1.1 材料 LC-10AD 高效液相色谱仪（配置手动

进样器、LC-10ADVP 泵、SPD-10AVP 检测器，日本岛津公司）；S-3000N 扫描电镜、E-1010 离子溅射仪（日本日立公司）；AG135 电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）；Universal 32 高速离心机（德国 Hettich 公司）；XK96-B 快速混匀器（江苏康泰医疗器材厂）；微孔滤膜（海宁市圣华医药化工设备厂）。

1.2 试药 葛根素对照品（西安艾沃生物科技有限公司，含有量99%）；乙基纤维素（上海卡乐康包衣技术有限公司）；卡波姆934P（武汉鑫恒隆科技有限责任公司）。丙酮（分析纯，杭州高晶精细化工有限公司）；Span-80（分析纯，天津市大茂化学试剂厂）；液体石蜡（分析纯，无锡海硕生物有限公司）；石油醚（分析纯，上海强顺化学试剂有限公司）；甲醇（色谱纯，天津市四友精细化学品有限公司）；其他试剂均为分析纯。

收稿日期：2016-08-15

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81503206）；浙江省卫生厅项目（2010KYB076）；浙江省自然科学基金资助项目（LY16H280007）

作者简介：郭 莹（1978—），女，博士，副教授，研究方向为中药活性成分体内过程评价。E-mail：171646369@qq.com

*通信作者：熊 阳（1979—），女，博士，教授，研究方向为新型给药系统。E-mail：xyxnb@126.com

2 方法和结果

2.1 生物黏附微球制备 将乙基纤维素在搅拌条件下溶解于 10 mL 丙酮中, 加入卡波姆 934P 和葛根素, 混合 24 h 后, 10 ℃下边搅拌边加入 30 mL 液体石蜡中(含 0.6 mL Span-80), 密封搅拌 30 min, 20 ℃下敞口搅拌直至溶液澄清, 离心, 去除上清液, 往离心管中加入适量石油醚, 涡旋震荡 30 s, 离心, 收集产物, 挥去残留的石油醚, 干燥, 整粒, 即得。

2.2 葛根素含有量测定 精密称取葛根素对照品适量, 蒸馏水溶解, 配制成质量浓度为 25.6 μg/mL 的溶液, 系列稀释成 0.2~25.6 μg/mL, HPLC 检测^[11], 结果见图 1 和图 2。再以质量浓度(X)对峰面积(Y)回归, 得回归方程为 $Y = 57.949X - 1.118.6$ ($r = 0.9999$), 在 0.2~25.6 μg/mL 范围内线性关系良好。

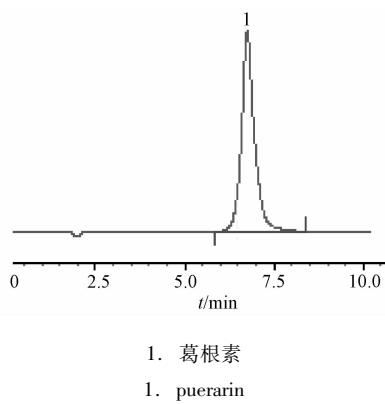


图 1 对照品 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of reference substance

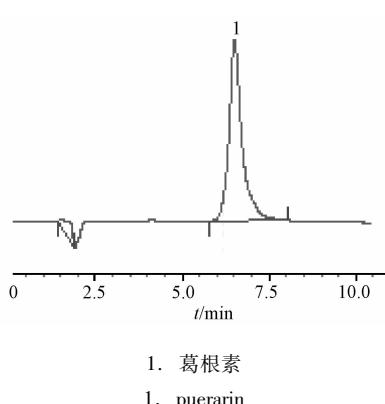


图 2 微球 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of microspheres

2.3 载药量和包封率测定 取微球 50 mg, 加 50 mL 蒸馏水超声, 离心, 取上清液 1 mL, 定容至 50 mL, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, HPLC 法检测,

将峰面积代入“2.2”项下回归方程, 计算微球中含药量, 并测定载药量和包封率。

2.4 单因素试验

2.4.1 葛根素加入量 控制搅拌速度 800 r/min, 乙基纤维素黏度 45 mPa·s, 乙基纤维素与卡波姆 934P 比例 1:1, 加入葛根素 50、100、200、300、400 mg, 考察其对载药量和包封率的影响, 结果见图 3。由图可知, 载药量和包封率均随加入量增加而逐渐提高, 在 200 mg 时最大, 而在 400 mg 时载药量仍有所增加, 但包封率明显下降。

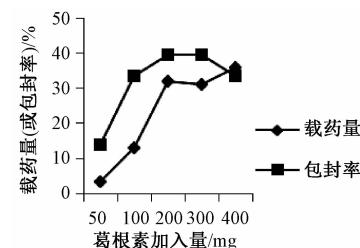


图 3 葛根素加入量对载药量和包封率的影响

Fig. 3 Effects of puerarin consumption on drug loading and entrapment efficiency

2.4.2 乙基纤维素黏度 控制乙基纤维素与卡波姆 934P 比例 1:1, 搅拌速度 800 r/min, 葛根素加入量 100 mg, 乙基纤维素黏度 10、20、45、70 mPa·s, 考察其对载药量和包封率的影响, 结果见图 4。由图可知, 载药量随乙基纤维素黏度增加而逐渐提高, 在 20 mPa·s 时最大, 而包封率在 45 mPa·s 时最大。

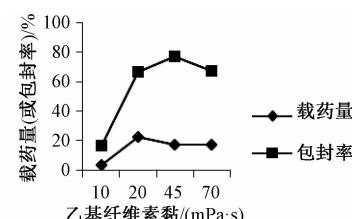


图 4 乙基纤维素黏度对载药量和包封率的影响

Fig. 4 Effects of ethyl cellulose viscosity on drug loading and entrapment efficiency

2.4.3 乙基纤维素与卡波姆 934P 比例 控制搅拌速度 800 r/min, 乙基纤维素黏度 45 mPa·s, 葛根素加入量 100 mg, 乙基纤维素与卡波姆 934P 比例 0:1、1:0、1:1、2:1、4:1、6:1、8:1, 考察其对载药量和包封率的影响, 结果见图 5。由图可知, 载药量随两者比例增加而逐渐降低, 而包封率在两者比例 1:1 时最大。

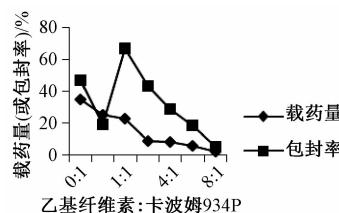


图5 乙基纤维素与卡波姆934P比例对载药量和包封率的影响

Fig. 5 Effects of ratio of ethyl cellulose to Carbomer 934P on drug loading and entrapment efficiency

2.4.4 搅拌速度 控制乙基纤维素与卡波姆934P比例1:1, 乙基纤维素黏度45 mPa·s, 葛根素加入量100 mg, 搅拌速度400、600、800、1 200 r/min, 考察其对载药量和包封率的影响, 结果见图6。由图可知, 搅拌速度在600 r/min时, 载药量最大; 在800 r/min时, 包封率最大。

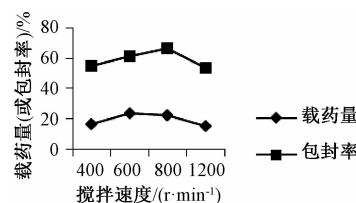


图6 搅拌速度对载药量和包封率的影响

Fig. 6 Effects of stirring speed on drug loading and entrapment efficiency

2.5 正交试验 在单因素试验基础上, 以葛根素加入量(A)、乙基纤维素黏度(B)、乙基纤维素与卡波姆934P比例(C)、搅拌速度(D)为影响因素, 按照 $L_9(3^4)$ 正交表安排试验。因素水平见表1, 设计结果见表2, 方差分析见表3。由表2和表3可知, 各因素影响程度依次为D>C>A>B, 最优工艺为 $A_2B_3C_2D_3$, 即葛根素加入量200 mg, 乙基纤维素黏度45 mPa·s, 乙基纤维素与卡波姆934P比例2:1, 搅拌速度1 200 r/min。

表1 因素水平

Tab. 1 Factors and levels

水平	因素			
	A 葛根素加入量/mg	B 乙基纤维素黏度/(mPa·s)	C 乙基纤维素与卡波姆934P比例	D 搅拌速度/(r·min⁻¹)
1	100	10	1:1	600
2	200	20	2:1	800
3	300	45	3:1	1 200

2.6 验证试验 按最优工艺制备葛根素生物黏附微球, 测定包封率和载药量($n=6$)。结果, 该工

表2 试验设计与结果

Tab. 2 Design and results of tests

编号	因素				载药量/%		包封率/%		综合评分	
	A	B	C	D	1	2	1	2	1	2
1	1	1	1	1	26.3	20.8	57.2	52.8	41.8	36.8
2	1	2	2	2	48.4	44.0	78.2	76.4	63.3	60.2
3	1	3	3	3	58.8	51.3	62.3	64.9	60.6	58.1
4	2	1	2	3	59.3	61.9	90.2	85.9	74.8	73.9
5	2	2	3	1	13.9	17.9	42.3	44.6	28.1	31.3
6	2	3	1	2	30.4	34.6	61.6	63.2	46.0	48.9
7	3	1	3	2	24.2	22.7	64.4	63.3	44.3	43.0
8	3	2	1	3	43.0	44.1	81.0	79.5	62.0	61.8
9	3	3	2	1	24.5	21.6	86.6	83.6	55.6	52.6
I	320.7	314.5	297.3	246.1						
II	303.0	306.7	380.3	305.7						
III	319.3	321.7	265.4	391.1						
R	17.8	15.0	115.0	145.0						

注: 综合评分中载药量、包封率权重均为50%

表3 方差分析

Tab. 3 Analysis of variance

来源	离均差平方和	自由度	均方	F值	P值
A	32.4	2	16.2	4.17	>0.05
B	18.8	2	9.4	2.41	>0.05
C	1 173.8	2	586.9	151.1	<0.01
D	1 770.6	2	885.3	227.9	<0.01
误差	35.0	9	3.9	—	—

注: $F_{0.05}(2,9)=4.26, F_{0.01}(2,9)=8$

艺稳定可靠, 载药量59.7%, 包封率为90.8%。

2.7 微球形态测定 微球用导电碳胶固定于样品台, 用离子溅射仪在真空条件下镀金, 扫描电镜观察其形态, 结果见图7和图8。由图可知, 微球呈球形或类球形, 载药后微球粒径相对增大, 形态饱满。

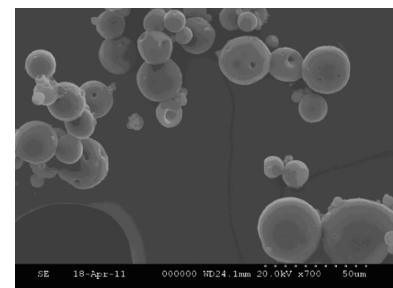


图7 空白微球扫描电镜图

Fig. 7 Scanning electron microscope image of blank microspheres

2.8 体外释放试验 采用溶解测定仪, 以900 mL 0.1 mol/L HCl (pH 2.0)为溶解介质, 温度保持在 $(37 \pm 0.2)^\circ\text{C}$, 搅拌速度100 r/min, 在适当时间间隔取样(等量新鲜溶解介质补充), 用0.014 mol/L NaOH溶液调pH至5.0左右,

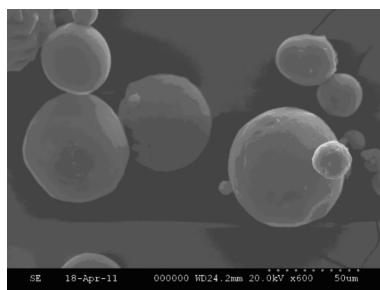


图8 载药微球扫描电镜图

Fig. 8 Scanning electron microscope image of drug-loaded microspheres

0.45 μm微孔滤膜过滤。取经过滤后样品注入色谱仪，按“2.2”项下方法检测，结果见图9。由图可知，微球可在体外连续9 h 缓慢持续释放药物。

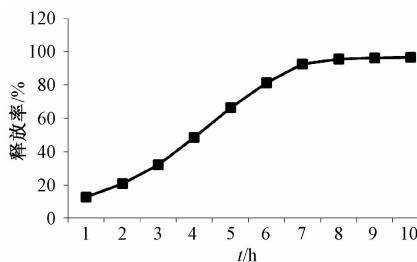


图9 微球体外释放曲线

Fig. 9 In vitro release curve of microspheres

2.9 生物黏附性试验 精密称取葛根素生物黏附微球50 mg，共8份，均匀铺在切好的大鼠胃黏膜上，充分水化，冲洗，冲洗液60 °C下干燥，精密称定质量，计算滞留率，结果见表4，可知微球具有较好的生物黏附性。

表4 滞留率测定结果

Tab. 4 Results of retention rate determination

指标	序号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
微球量/mg	2.8	3.1	3.9	4.8	5.4	2.5	3.0	4.3
胃黏膜滞留率/%						92.6		

3 讨论

葛根素生物黏附微球可在体外缓慢释放葛根素，具有长效、缓释、控释等特点。离体实验表

明，它具有较好的生物黏附性，与文献[12]一致，具有提高口服药物生物利用度（如水飞蓟宾生物黏附微球的生物利用度比其混悬液提高约7.7倍）、药理活性等作用，有望克服葛根素在水中微溶、生物利用度低等缺点，具体有待后期实验作进一步验证。

参考文献：

- [1] Liu X J, Zhao J, Gu X Y. The effects of genistein and puerarin on the activation of nuclear factor-kappa B and the production of tumor necrosis factor-alpha in asthma patients[J]. *Pharmazie*, 2010, 65(2): 127-131.
- [2] Gao L, Ji X, Song J, et al. Puerarin protects against ischemic brain injury in a rat model of transient focal ischemia[J]. *Neurotol Res*, 2009, 31(4): 402-406.
- [3] Wang N, Zhang Y M, Wu L, et al. Puerarin protected the brain from cerebral ischemia injury via astrocyte apoptosis inhibition[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 79: 282-289.
- [4] 李明娟, 倪健, 尹兴斌. 改善中药口服生物利用度的制剂技术研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(2): 307-311.
- [5] 刘德杰, 张慧, 安飞. 生物黏附微球的研究进展[J]. 药学研究, 2016, 35(8): 479-483.
- [6] Fernandes M, Goncalves I C, Nardeccchia S, et al. Modulation of stability and mucoadhesive properties of chitosan microspheres for therapeutic gastric application[J]. *Int J Pharm*, 2013, 454(1): 116-124.
- [7] 夏攻, 张亚兰, 高敬轩, 等. 绿原酸生物黏附微球的制备及其体外释放特性的研究[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(2): 153-155.
- [8] 周晓东, 于立军. 硝苯地平生物黏附微球的制备及释药机制研究[J]. 中国药房, 2012, 23(17): 1599-1601.
- [9] 金小平. 双嘧达莫生物黏附微球的制备及体外释放度测定[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(22): 1912-1914.
- [10] Ali M S, Pandit V, Jain M, et al. Mucoadhesive microparticulate drug delivery system of curcumin against *Helicobacter pylori* infection: Design, development and optimization [J]. *J Adv Pharm Technol Res*, 2014, 5(1): 48-56.
- [11] 郭莹, 万海同, 张莉, 等. 不同中药复方有效部位组合对脑缺血大鼠血浆中葛根素代谢变化的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(23): 2531-2534.
- [12] 唐直婕, 周定利, 柯玲玲, 等. 水飞蓟宾生物黏附微球的生物利用度[J]. 重庆医科大学学报, 2014, 39(7): 1020-1023.