

• 药剂与工艺 •

优选大黄总蒽醌结肠定位壳聚糖微球的制备工艺

刘喜纲¹, 刘沛¹, 陈大为², 常金花¹, 李忠思¹, 刘丽艳¹, 刘翠哲^{1*}

1. 河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000

2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: 目的 优选大黄总蒽醌(RTA)壳聚糖(CS)口服结肠定位微球的制备工艺。方法 以包封率和粒径为考察指标, CS为载体材料, 采用乳化-交联法制备 RTA 壳聚糖微球(RTA-CMS), 并用正交试验优选最佳制备工艺, 再采用肠溶材料 Eudragit S100 进行包衣。结果 优选的最佳工艺为 CS 质量分数为 2.5%, RTA 与 CS 质量比为 1:4, 液体石蜡与二氯甲烷的比例为 1:1, 司盘-80 用量为 2%, 微球包封率为 64.5%, 粒径为 $(248.8 \pm 54.2) \mu\text{m}$, 包衣后粒径为 $(269.3 \pm 172.7) \mu\text{m}$ 。结论 根据优选工艺制备的 RTA-CMS 包封率较高, 微球形态良好, 可用于 RTA 结肠定位 CMS 的制备。

关键词: 大黄总蒽醌; 结肠定位; 壳聚糖; 微球; 制备

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)01-0038-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.01.009

Optimization of preparation technology of colon-specific chitosan microspheres of rhubarb total anthraquinones

LIU Xi-gang¹, LIU Pei¹, CHEN Da-wei², CHANG Jin-hua¹, LI Zhong-si¹, LIU Li-yan¹, LIU Cui-zhe¹

1. Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

2. College of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To optimize the preparation technology of colon-specific chitosan microspheres of rhubarb total anthraquinones (RTA-CMS). **Methods** With chitosan as material, RTA was made into microspheres. According to the entrapment efficiency (EE) and particle diameter, the best preparation technology was selected using orthogonal design. The enteric material Eudragit S100 was used to coat the CMS. **Results** The best preparation technology was as follows: The concentration of chitosan was 2.5%; The mass ratio of RTA and chitosan was 1:4; The ratio of paraffin and dichloromethane was 1:1; The amount of span-80 was 2%. The EE of CMS was 64.5%. The particle diameter of the CMS was $(248.8 \pm 54.2) \mu\text{m}$, and the mean diameter was $(269.3 \pm 172.7) \mu\text{m}$ after coating. **Conclusion** RTA-CMS prepared with the best preparation technology has a high EE. And the microspheres form is good. The technology could be used to prepare colon-specific RTA-CMS.

Key words: rhubarb total anthraquinones; colon-specific; chitosan; microspheres; preparation

大黄为常用药材, 文献报道其发挥“泻下”药效作用的是蒽醌类成分, 作用部位在大肠^[1-2]。蒽醌类成分包括结合蒽醌(苷)和游离蒽醌(苷元), 主要的泻下机制是口服结合蒽醌到达结肠后, 被酶解

为游离蒽醌发挥泻下药效, 而直接口服游离蒽醌因上消化道的吸收破坏, 泻下作用较弱。结合蒽醌在提取精制过程中又易失去糖变成游离蒽醌, 泻下药效减弱, 因此目前含大黄制剂中的大黄多为粗提取

收稿日期: 2014-07-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81073146, 81341143); 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZH2012050); 河北省高校重点学科建设项目

作者简介: 刘喜纲, 男, 副主任药师, 研究方向为中药制剂现代化。Tel: (0314)2290629 E-mail: liuxg@mail.sina.com

*通信作者 刘翠哲, 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药制剂现代化及中药药理学。

Tel: (0314)2290359 E-mail: liucuizhexy@163.com

物或药材粉入药。若采用口服结肠定位给药系统使游离蒽醌到达结肠释放,则可保证大黄蒽醌的泻下药效。

壳聚糖(chitosan, CS)具有很好的生物相容性和生物降解性,能特异性地被结肠中菌群产生的酶所降解,可作为结肠定位给药系统的载体材料^[3-5]。本实验将大黄药材经过提取精制得到的大黄总蒽醌(rhubarb total anthraquinones, RTA)达50%以上(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚之和)的提取物,采用乳化-交联法制备壳聚糖微球(chitosan microspheres, CMS)^[6-8],再用pH控释衣膜包衣,依据CS具有结肠特异性酶降解的特性^[9]和衣膜具有的pH敏感特性,制备pH-酶双控型口服结肠定位给药系统——大黄总蒽醌壳聚糖微球(RTA-CMS),使RTA大部分在结肠释放。

1 仪器与材料

ZRD6-B型药物溶出仪,上海黄海药检仪器厂;SPD-10A高效液相色谱仪、SSX-550扫描电子显微镜,日本岛津公司;DMBA450生物数码显微镜,麦克迪实业集团有限公司;FA1104电子天平,上海民桥精密科学仪器有限公司;Mastersizer 2000激光粒度测定仪,英国马尔文公司;DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市英峪予华仪器厂。

RTA提取物,自制,批号20050916,总蒽醌量54.4%;CS,浙江省玉环县化工厂;25%戊二醛,沈阳市新民制药厂;聚山梨酯80,大连艺秀分子筛化剂有限公司;司盘-80,天津市博迪化工有限公司;泊洛沙姆188,上海昌为贸易有限公司;Eudragit L100、S100,德国罗姆公司;甲醇为色谱纯,其他为分析纯。

2 方法与结果

2.1 微球的评价指标

2.1.1 RTA-CMS包封率 将50 mg RTA-CMS置于10 mL乙醇溶液中,超声5 min,放置2 h,研磨5 min至得到黄色溶液,将溶液转移至25 mL容量瓶中,继续加乙醇浸泡研磨3次,将溶液一并转移至容量瓶中,定容,离心,取上清液进行定量测定,计算微球中药物的包封率(entrapment efficiency, EE),定量测定方法参见文献报道^[10]。

2.1.2 RTA-CMS粒子大小测定 取适量干燥的RTA-CMS及包衣的微球,用激光粒度测定仪测定粒径及其粒度分布。

2.1.3 RTA-CMS外观形态观察 取适量干燥的

RTA-CMS,于显微镜下观察其外观形态。

2.2 RTA-CMS的制备工艺

2.2.1 制备方法 称取一定量脱乙酰度的CS细粉超声溶解于0.5%醋酸水溶液中;精密称取一定量的RTA分散于一定质量分数的聚山梨酯80水溶液中,加入CS醋酸溶液配制成药物混悬液,静置除去气泡后用注射器缓缓滴入搅拌的含有一定量司盘-80的二氯甲烷-液体石蜡混合油相中,分散15 min,加入戊二醛进行交联、固化。将制得的微球分别用异丙醇、丙酮、石油醚洗涤2~3次,抽滤后,40℃干燥6 h,密封储存。

2.2.2 CS种类对包封率和粒径的影响 分别采用脱乙酰度为75.6%、85.2%、92.3%的1%CS溶液作为水相,其他条件同“2.2.1”项制备RTA-CMS,测定微球的包封率和平均粒径。结果包封率分别为47.45%、56.32%、0,平均粒径分别为(241.8±104.2)、(248.5±89.8)、0 μm。

脱乙酰度为92.3%的CS无法呈球态,脱乙酰度为75.6%的CS制备得到的微球成球较好,但包封率较低,脱乙酰度为85.2%的CS成球较好,骨架紧密,包封率尚可,本实验选择相对分子质量为 1×10^5 ,脱乙酰度为85.2%的CS为载体材料,与文献中报道较适宜成球的脱乙酰度基本一致^[11]。

2.2.3 CS质量分数的影响 实验中以脱乙酰度为85.2%的CS,配制CS质量分数分别为1.0%、2.0%、3.0%的溶液,制备RTA-CMS,测定包封率和平均粒径。结果包封率分别为57.22%、61.11%、50.32%,平均粒径分别为(229.4±107.3)、(251.3±83.8)、(231.6±183.2) μm。

质量分数为1%时,成球较好且包封率尚可;质量分数为2%时,黏度较适中,可以均匀地在油相中分散,加入交联剂后成球最好,且干燥后球之间无粘连,镜下观察球形态较好,包封率较高;当CS溶液质量分数增加到3%时,黏度已经很大,不易从注射器中滴下,交联后有的不是球状。因此,CS质量分数选择为2%。

2.2.4 RTA与CS质量比 实验中以脱乙酰度为85.2%的CS,配制成2.0%的溶液,分别配制RTA与CS质量比为1:2、1:4、1:6的CS混悬液,制备RTA-CMS,测定包封率和平均粒径。结果包封率分别为45.21%、63.45%、66.45%,平均粒径分别为(261.4±128.5)、(242.3±83.3)、(227.2±71.4) μm。

药物与 CS 比例增加,微球所含药物的量增加,包封率明显降低。比例为 1:2 时有药物泄露,形态较差,因此,选择 RTA 与 CS 质量比为 1:4。

2.3 RTA-CMS 的处方工艺优化

在单因素考察的基础上,选取了对包封率影响较大的 4 个因素:CS 质量分数(A)、RTA 与 CS 质量比(B)、混合油相二氯甲烷-液体石蜡比例(C)和油相中表面活性剂用量(D)为考察因素,进行正交设计,以包封率为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化处方,筛选出包封率高的处方。试验设计的因素和水平以及结果见表 1。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Table 1 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A/%	B	C	D/%	包封率/%
1	1.5 (1)	1:4 (1)	2:1 (1)	2 (1)	26.63
2	1.5 (1)	1:5 (2)	1:1 (2)	4 (2)	24.09
3	1.5 (1)	1:6 (3)	1:2 (3)	6 (3)	18.07
4	2.0 (2)	1:4 (1)	1:1 (2)	6 (3)	63.40
5	2.0 (2)	1:5 (2)	1:2 (3)	2 (1)	17.75
6	2.0 (2)	1:6 (3)	2:1 (1)	4 (2)	9.07
7	2.5 (3)	1:4 (1)	1:2 (3)	4 (2)	56.17
8	2.5 (3)	1:5 (2)	2:1 (1)	6 (3)	9.07
9	2.5 (3)	1:6 (3)	1:1 (2)	2 (1)	60.23
K_1	68.79	146.20	44.76	104.61	
K_2	90.22	50.91	147.72	89.33	
K_3	125.47	87.37	91.99	90.54	
R	56.68	95.29	102.96	14.07	

极差 R 反映各因素对指标的影响程度, R 值越大对包封率的影响越大,反之则影响越小。由表 1 可见,二氯甲烷-液体石蜡的比例对包封率的影响最大,最优水平为 2 水平;RTA 与 CS 的质量比的影响较大,水平 1 最优;CS 溶液质量分数的影响较小,最优为 3 水平;司盘-80 用量的影响最小,1 水平最好。因此各因素最优水平组合为 $A_3B_1C_2D_1$ 。

2.4 验证试验

按照优化的工艺制备 3 批 RTA-CMS,测定包封率和粒径,结果见表 2。

2.5 RTA-CMS 外观形态及其释放度考察

2.5.1 RTA-CMS 外观形态观察 取干燥的未包衣 RTA-CMS,于扫描电镜(SEM)下观察其外观形态,见图 1。

2.5.2 释放度考察 将约 50 mg 的 RTA-CMS 放入

表 2 3 批 RTA-CMS 的包封率和粒径

Table 2 EE and particle diameter of three batches of RTA-CMS

试验号	包封率/%	平均粒径/ μm	载药量/%
1	65.79	235.4 ± 78.5	11.31
2	62.58	242.8 ± 93.6	10.21
3	65.13	248.8 ± 54.2	11.12

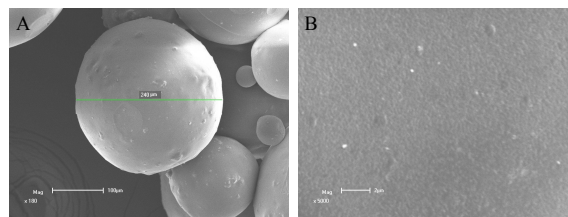


图 1 未包衣 RTA-CMS 的形态 (A, $\times 180$) 和表面 (B, $\times 5000$) 的 SEM 图

Fig. 1 SEM photos of modality (A, $\times 180$) and surface (B, $\times 5000$) of uncoated RTA-CMS

缝制的网袋中,参照《中国药典》2010 年版二部附录,浆法,根据胃肠道 pH 值变化的特点,采用三段式测定方法,即分别模拟胃液、小肠液和结肠液中释放,以 0.1 mol/L 的 HCl 溶液 250 mL (pH 1.0) 为溶出介质检测 2 h,转速为 100 r/min,模拟胃液中释放;2 h 后将袋取出放入 250 mL 的 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中检测 3 h,模拟小肠液中释放;3 h 后再取出放入 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中(含一定结肠内容物,模拟结肠液中释放)^[9],转速调为 50 r/min,3 种介质中均含 0.05% SDS,分别在 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0 h 取出 1 mL 溶出介质,同时补充 1 mL 相应的新鲜介质,滤过后,测定。根据外标峰面积法定量,任一时刻的药物释放量均为累积释放量,结果见图 2。

参照文献方法^[7]对制备的 RTA-CMS 进行包衣,考察包衣的 RTA-CMS 在人工胃液、人工小肠液和人工结肠液中的释放情况,结果见图 2。由释放曲线可知,未包衣微球药物在胃液及小肠液中释放将近 40% 的药物;而微球包衣后,在胃及小肠液中释放减少,约为 15%,药物集中在结肠液中释放,因此,包衣后的 RTA-CMS 具有结肠定位释药的特点。

2.5.3 RTA-CMS 粒子大小测定 取适量干燥的 RTA-CMS 及包衣后的 RTA-CMS,用激光粒度测定仪测定粒径及其粒度分布,结果见图 3。未包衣的 RTA-CMS 平均粒径为 $(248.8 \pm 54.2) \mu\text{m}$,包衣后平均粒径为 $(269.3 \pm 172.7) \mu\text{m}$ 。

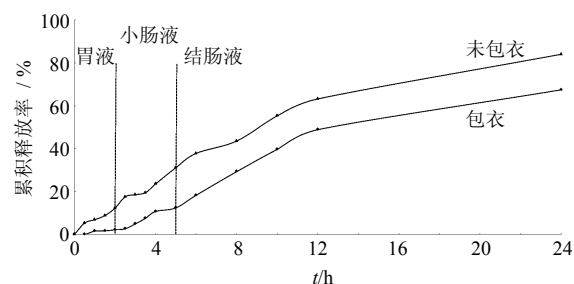


图2 包衣和未包衣的 RTA-CMS 释放度比较

Fig. 2 Comparison on release curves of uncoated and coated RTA-CMS

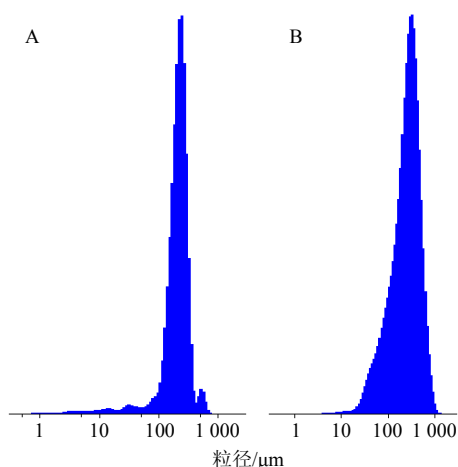


图3 未包衣 (A) 和包衣 (B) RTA-CMS 的粒度分布图

Fig. 3 Particle diameter distribution of uncoated (A) and coated (B) RTA-CMS

3 讨论

大黄清热解毒、泻下焦火，起泻下作用的是蒽醌类成分，其在大黄中以2种形式存在：游离蒽醌和结合蒽醌，其泻下机制有2种：一是结合蒽醌经小肠吸收后，经肝脏转化为游离蒽醌转运至大肠刺激神经丛增加肠蠕动作用而致泻；二是结合蒽醌上有 β -糖苷键结合糖，口服之后不被上消化道的 α -糖苷键酶水解，当其进入大肠后被肠内 β -糖苷键酶水解，释放出游离蒽醌而发挥泻下作用^[1]。而直接口服游离蒽醌因上消化道的吸收破坏，泻下作用较弱。结合蒽醌在提取精制过程中又易失去糖变成游离蒽醌，泻下药效减弱，因此目前含大黄制剂中的大黄多为粗提取物或药材粉入药，限制了将其进一步研制成新制剂，同时由于不同产地药材中有效成分的量差异大，导致药效差别较大。文献报道大黄蒽醌具有肾毒性^[12]，口服大黄蒽醌后吸收的部分可能产生肾毒性，实验中用口服结肠定位微球使大黄蒽醌到达大肠后再释放以发挥其泻下作用，有可能

减少蒽醌的吸收，减小或避免肾毒性的发生，对大黄蒽醌的应用是一个有益的结果。同时对所制备的RTA结肠定位微球进行了生物黏附性和泻下作用考察，发现其泻下作用与同等剂量药材相当、生物黏附性良好^[13]。

本实验选择包封率、粒径、微球形态作为微球单因素考察的主要指标，除本实验报道考察的各因素外，还考察了其他因素的影响，包括：水相中表面活性剂种类和浓度、油相组成、油相中表面活性剂种类和浓度、分散的时间、交联的时间等因素，确定了水相中表面活性剂为聚山梨酯80，用量为2%；二氯甲烷和液体石蜡混合为油相；油相中表面活性剂为司盘-80，用量为2%；分散时间15 min；交联时间150 min。在以上单因素考察的基础上，筛选出对包封率影响较大的4个因素进行了正交试验，以包封率为考察指标，分析因素变化对结果的影响。结果RTA与CS质量比和混合油相的比例极差较大，说明大黄蒽醌与CS质量比是引起包封率变化的主要原因，这与CS的载药量有关，理论上应该是CS占的比例越大包封率越高，但结果包封率与CS的量不成正比，原因可能是所选的范围CS的量足以载药，变化是由其他因素影响。油相的组成对微球的粒径以及成球性影响很大，液体石蜡单独作为油相时，由于液体石蜡黏度大，水相滴入后需要较大转速才能搅拌成球，并且较难滤过，微球呈不规则颗粒状且粘连严重；单用二氯甲烷作为油相时，由于二氯甲烷黏度低，不易成球，且沸点低，易挥发，实验中需补加；因此选用二者联合作为油相，实验结果显示，二者的比例为1:1时效果最好。

采用Eudragit对制备得到的微球进行包衣，以释放度为指标对包衣材料及浓度进行了初步的筛查，分别选择Eudragit L100、Eudragit S100和Eudragit L100-Eudragit S100 (1:1)作为包衣液对CMS进行包衣，结果不同型号的包衣材料和浓度对药物的释放均有一定的影响，根据释放的结果最终选择Eudragit S100作为包衣材料，质量分数为3%。

由于CS具有被结肠酶降解的特点，在考察微球的释放情况时，在结肠液中加入大鼠结肠内容物，使释放介质中含酶，同时根据胃肠道pH梯度的特点，分别采用3种介质：0.1 mol/L HCl, pH 6.8的缓冲液和pH 7.4的缓冲液，分别模拟胃、小肠和结肠3部分来考察RTA-CMS在3部分的释放情况。

参考文献

- [1] 郑虎占, 董泽宏, 余靖. 中药现代研究与应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1997.
- [2] Zheng Q X, Wu H F, Guo J, *et al.* Review of rhubarbs: chemistry and pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(1): 9-32.
- [3] 卢晓慧, 周毅生. 壳聚糖在口服结肠定位给药系统中的应用 [J]. 广东药学院学报, 2011, 27(1): 99-103.
- [4] 唐勤, 顾勇, 李纳, 等. 姜黄素磷脂复合物壳聚糖微球在大鼠体内药动学研究 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 1939-1943.
- [5] 周闻舞, 顾海铮. 壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 290-295.
- [6] Wang Q Z, Chen X G, Li Z X, *et al.* Preparation and blood coagulation evaluation of chitosan microspheres [J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2008, 19(3): 1371-1377.
- [7] 李可欣, 陈大为, 赵秀丽, 等. 分散-交联法制备氟尿嘧啶壳聚糖微球的研究 [J]. 中国药学杂志, 2005, 40(18): 1392-1395.
- [8] 唐勤, 孙晓辉, 陈毫, 等. 制备方法和工艺对姜黄素-磷脂复合物-壳聚糖微球体外性质的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2377-2385.
- [9] Liu H, Yang X G, Nie S F, *et al.* Chitosan-based controlled porosity osmotic pump for colon-specific delivery system: Screening of formulation variables and *in vitro* investigation [J]. *Int J Pharm*, 2007, 332(1/2): 115-124.
- [10] Liu C Z, Liu X G, Tong J M, *et al.* Design and evaluation of San-huang dispersible tablet—an efficient delivery system for traditional Chinese medicine [J]. *Pharm Dev Technol*, 2009, 14(5): 506-515.
- [11] 魏农农, 陆彬. 结肠定位包衣氟尿嘧啶脂质体的制备、形态与体外释放 [J]. 药学学报, 2003, 38(1): 53-56.
- [12] 郭鹏, 张铁军, 朱雪瑜, 等. 大黄毒性的现代研究与减毒对策 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1671-1674.
- [13] 刘沛, 佟继铭, 刘喜纲, 等. 大黄总蒽醌结肠定位微球的生物黏附性及泻下作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 165-168.