

生物黏附性三七总皂苷-白及多糖-海藻酸钠复合微球的制备及表征

吴雨佳^{1,2}, 王令充^{1,2#}, 张 雯^{1,2}, 李俊松^{1,2}, 狄留庆^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 利用白及多糖(BSP)的生物黏附性,与海藻酸钠(SA)混合作为复合载体,以具有缓释特性的三七总皂苷(PNS)分散体作为包封药物,制备具有生物黏附性的PNS-BSP-SA复合微球。方法 采用离子交联法制备微球,通过单因素试验和正交设计考察并优化处方工艺。通过扫描电镜(SEM)、粒径分布、差示扫描量热法(DSC)分析、溶胀性能测定、体外黏附性能评价、体外释放研究对微球进行表征。结果 PNS-BSP-SA复合微球圆整度较好,表面粗糙不平有褶皱,粒径分布较窄,PNS原料药以无定形态均匀分散于微球中。最佳处方工艺制备的微球工艺稳定,重现性较好,与直接加入PNS原料药制备的微球相比,PNS分散体微球的载药量、包封率和得率均明显增加,分别为10.34%、51.25%、82.21%,而PNS原料药微球的载药量、包封率、得率分别为4.04%、12.16%、61.35%。BSP的加入增加了SA微球的溶胀性能,明显增加了其在大鼠胃部的滞留率。PNS-BSP-SA复合微球中人参皂苷Rg₁的释放较PNS原料药缓慢。结论 BSP增加了微球的生物黏附性,将PNS制备为分散体,提高了微球的载药量、包封率和得率,并使微球具有一定的缓释性能。

关键词: 白及多糖;三七总皂苷;分散体;海藻酸钠;生物黏附;离子交联法;微球;缓释;正交设计;差示扫描量热法;溶胀性能;黏附性能;滞留率;三七皂苷R₁;人参皂苷Rg₁;人参皂苷Re;人参皂苷Rb₁;人参皂苷Rd

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)20-4896-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.009

Preparation and characterization of bioadhesive *Bletilla striata* polysaccharide and sodium alginate microspheres loaded with *Panax notoginseng* saponins

WU Yu-jia^{1,2}, WANG Ling-chong^{1,2}, ZHANG Wen^{1,2}, LI Jun-song^{1,2}, DI Liu-qing^{1,2}

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective Because of the adhesion of *Bletilla striata* polysaccharide (BSP), it was mixed with sodium alginate (SA) as a composite carrier to prepare mucoadhesive PNS-BSP composite microspheres. *Panax notoginseng* saponins (PNS) dispersion with sustained release property was used as an encapsulating drug. **Methods** The composite microsphere was prepared by ion cross-linking method. The formulation process was investigated and optimized by single factor test and orthogonal design. The microspheres were evaluated by scanning electron microscope (SEM), particle size distribution, DSC, swelling properties, *in vitro* mucoadhesive properties, and *in vitro* release characteristics. **Results** PNS-BSP composite microspheres had good roundness, rough surface and wrinkles. The microspheres showed a narrow size distribution. PNS was uniformly dispersed in microspheres in an amorphous state. The microspheres prepared by the best prescription process were stable in process and reproducible. Compared with the microspheres prepared by directly adding PNS, the drug loading, encapsulation efficiency and yield of PNS dispersion microspheres were increased significantly, which were 10.34%, 51.25%, and 82.21%, respectively. The drug loading, encapsulation efficiency, and yield were 4.04%, 12.16%, and 61.35% of PNS microspheres. The addition of BSP increased the swelling properties of the SA microspheres, and significantly increased the retention rate in the stomach of rats. The release of ginsenoside Rg₁ in PNS-BSP microspheres was released slower compared to PNS. **Conclusion** The bioadhesion of microspheres was increased by the

收稿日期: 2019-05-13

基金项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX18_1617)

作者简介: 吴雨佳(1994—),女,硕士,从事中药药剂学研究。Tel: (025)85811521 E-mail: 18305171806@163.com

*通信作者 狄留庆,博士生导师,教授,从事中药药剂学研究。Tel: (025)85811521 E-mail: diliuqing@njucm.edu.cn

#并列第一作者 王令充,副教授,从事中药药剂学研究。Tel: (025)85811521 E-mail: 993wlc@njucm.edu.cn

addition of BSP. The drug loading, encapsulation efficiency, and yield of the microspheres were increased by the preparation of PNS as a dispersion, and the microspheres also had a certain sustained-release effect.

Key words: *Bletilla striata* polysaccharide; *Panax notoginseng* saponins; dispersion; sodium alginate; bioadhesive; ion cross-linking method; microspheres; sustained-release effect; orthogonal design; differential scanning calorimetry; swelling properties; mucoadhesive properties; retention rate; notoginsenoside R₁; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rb₁; ginsenoside Rd

白及多糖 (*Bletilla striata* polysaccharide, BSP) 是白及中提取的一种黏性多糖, 主要成分为葡甘聚糖, 含有物质的量比约为 3.0 : 1 或 3.5 : 1 的甘露糖和葡萄糖^[1-2], 具有止血凝血、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理活性。BSP 是一种天然高分子材料, 具有良好的生物相容性、自身降解性、无毒副作用、黏膜黏附性等特点^[3-4], 已成为缓控释系统、生物黏附靶向系统、基因转移和组织工程中的新型辅料^[5-7]。本课题组前期研究中发现, BSP 具有一定的生物黏附性, 与生物黏附聚合物如海藻酸钠 (sodium alginate, SA) 合用可增强其黏附性^[8]。三七总皂苷 (*Panax notoginseng* saponins, PNS) 是五加科人参属植物三七的主要活性部位, 具有止血活血等药理活性^[9-15]。利用 BSP 的生物黏附特性与常见生物黏附聚合物复合, 构建具有胃黏膜保护作用的生物黏附给药系统, 并以 PNS 作为包封药物, 用于治疗消化性溃疡, 可以发挥其在伤口愈合、止血、抗菌和抗炎中的治疗作用, 以期达到药辅合一的效果, 从而延长药物在胃部的滞留时间, 增强局部治疗作用。本研究选择 SA 微球作为基础载体, 将 PNS 制成疏水性高分子材料分散体混悬分散于 SA 与 BSP 的混合溶液中, 经离子交联法制备 PNS-BSP-SA 复合微球, 并进行处方工艺优化和表征。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; Milli-Q Synthesis 108 超纯水仪, 美国密理博公司; BT 25S 电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; XP6 百万分之一天平, 瑞士 Mettler-Toledo 公司; MicroCL 21R 微量离心机, 德国 Thermo Fisher 公司; RE-2000A 旋转蒸发器, 巩义市予华仪器有限责任公司; DZF-6050 真空干燥箱, 上海申贤恒温设备厂; ZRS-8GD 智能溶出试验仪, 天津天大天发公司; 200 F3 差示扫描量热仪, 德国 Netzsch 公司; S4800 扫描电子显微镜 (SEM), 日本 Hitachi 公司; LS-13320 激光粒度仪, 美国 Beckman Coulter 公司; 85-2 型恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司; BT00-300M 蠕动泵, 兰格恒流泵有限公司;

KQ-500DE 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; HY-45 恒温气浴生物摇床, 江苏省金坛市金城国盛实验仪器厂。

1.2 药品与试剂

PNS, 批号 JZ2018031006, 质量分数 > 75%, 南京景竹生物科技有限公司; 对照品三七皂苷 R₁ (R₁)、人参皂苷 Rg₁ (Rg₁)、人参皂苷 Re (Re)、人参皂苷 Rb₁ (Rb₁)、人参皂苷 Rd (Rd) 均购自上海源叶生物科技有限公司, HPLC 测定各对照品质量分数均 ≥ 98%, 批号分别为 P02D7F25164、Z13O8L45576、B10M8S35243、Z16J9X52719、Z13N8X48155; BSP, 多糖质量分数 ≥ 90%, 批号 SNT171022, 西安斯诺特生物技术有限公司; SA, 批号 M20M8Y36367, 上海源叶生物科技有限公司; 聚丙烯酸树脂 II, 黏度 ≤ 50 mPa·s, 批号 S04J6H1, 上海源叶生物科技有限公司; 无水氯化钙、磷酸二氢钾、氢氧化钠、氯化钠、盐酸均为分析纯, 国药化学集团试剂有限公司; 无水乙醇、甲醇均为分析纯; 乙腈, 色谱纯。

1.3 动物

SD 大鼠, 雄性, 体质量 180~220 g, 南京中医药大学实验动物中心提供, 许可证号 SYXK (苏) 2014-0001。

2 方法与结果

2.1 PNS 分散体的制备

称取药物与载体比例为 1 : 1 的 PNS 原料药和聚丙烯酸树脂 II 各 1 g, 加入适量乙醇分别溶解, 待充分溶解至澄清, 将 2 种溶液混合均匀, 45 °C 旋转蒸发除去有机溶剂, 40 °C 真空干燥 24 h, 粉碎过 300 目筛备用。

2.2 SA、SA-BSP、PNS-BSP-SA 复合微球的制备

配制 15 mg/mL 的 SA 溶液 (0.3 g SA 溶于 20 mL 水中), 15 mg/mL SA、30 mg/mL BSP 混合溶液 (0.3 g SA、0.6 g BSP 溶于 20 mL 水中), 15 mg/mL SA、30 mg/mL BSP、PNS 分散体的混悬溶液 (0.3 g SA、0.6 g BSP 和适量 PNS 分散体溶于 20 mL 水中), 以及 15 mg/mL SA、30 mg/mL BSP、PNS 的混合溶液 (0.3 g SA、0.6 g BSP 和适量 PNS 原料药溶于 20 mL

水中),采用离子交联法制备微球。使用注射器(13 mm×0.45 mm)将混合溶液逐滴滴入 CaCl₂ 溶液(称量一定量的 CaCl₂ 溶于水)中,室温持续搅拌交联一段时间,抽滤收集微球,纯水冲洗 2 次,40 ℃真空干燥 24 h,即得。

2.3 PNS-BSP-SA 复合微球中 5 种皂苷类成分含量测定方法的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);以乙腈-水为流动相,梯度洗脱:0~13 min, 20%乙腈;13~16 min, 20%~24%乙腈;16~20 min, 24%~26%乙腈;20~45 min, 26%~46%乙腈;45~50 min, 46%~75%乙腈;50~55 min, 75%~90%乙腈;55~60 min, 90%乙腈;60~65 min, 90%~20%乙腈;65~70 min, 20%乙腈;体积流量为 1.3 mL/min;柱温 30 ℃;检测波长 203 nm;进样量 20 μL。色谱图见图 1。

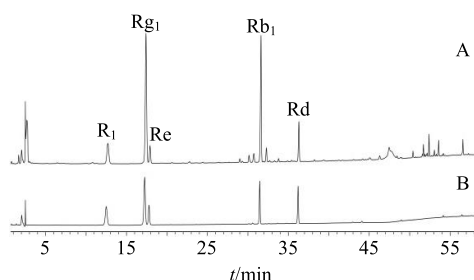


图 1 PNS-BSP-SA 复合微球供试品 (A) 及 5 种皂苷类成分混合对照品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of PNS-BSP-SA composite microspheres (A) and five saponin components mixed reference substances (B)

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取微球样品适量,置于 5 mL 量瓶中,加入 70%甲醇定容至刻度,超声 3 h,补足减失的质量,摇匀,取续滤液,14 000 r/min 离心 10 min,进样。

2.3.3 线性关系考察 精密称取 R₁ 对照品 3.291 mg、R_{g1} 对照品 5.140 mg、Re 对照品 2.091 mg、R_{b1} 对照品 3.820 mg、R_d 对照品 3.002 mg,置于 5 mL 量瓶中,加 70%甲醇定容至刻度,配制成质量浓度分别为 0.658 2、1.028 0、0.418 2、0.764 0、0.600 4 mg/mL 的混合对照品储备液。精密吸取上述混合对照品储备液 1 mL,为各成分标准曲线最高质量浓度。另外精密吸取同一混合对照品溶液 1 mL,置于 2 mL 量瓶中,加 70%甲醇定容至刻度,混匀。按此法配制不同质量浓度的混合对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,分别获得各成分峰面积对质量浓度的回归方程为 R₁ $Y=4\,019.3\,X-15\,343$,

$r=0.999\,9$,线性范围 5.14~658.20 μg/mL; R_{g1} $Y=4\,771.7\,X-23\,594$, $r=0.999\,9$,线性范围 8.03~1\,028.00 μg/mL; Re $Y=3\,941.8\,X-8\,661.8$, $r=0.999\,9$,线性范围 3.27~418.20 μg/mL; R_{b1} $Y=3\,362.03\,X-12\,879.36$, $r=1.000\,0$,线性范围 5.97~764.00 μg/mL; R_d $Y=3\,960\,X-11\,148.24$, $r=1.000\,0$,线性范围 4.69~600.40 μg/mL。5 种成分的质量浓度在线性范围内与峰面积线性关系良好。

2.3.4 精密度试验 精密吸取同一份混合对照品溶液(R₁、R_{g1}、Re、R_{b1}、R_d 质量浓度分别为 0.219 4、0.342 7、0.139 4、0.254 7、0.200 1 mg/mL),连续进样 6 次,以各成分的峰面积值分别计算,结果 R₁、R_{g1}、Re、R_{b1}、R_d 5 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.87%、0.26%、0.39%、0.14%、0.16%,表明仪器精密度良好。

2.3.5 重复性试验 精密称取微球样品适量,平行 6 份,置于 5 mL 量瓶中,加入 70%甲醇定容至刻度,超声 3 h,补足减失的质量,摇匀,取续滤液,14 000 r/min 离心 10 min,进样。计算 R₁、R_{g1}、Re、R_{b1}、R_d 5 种成分质量分数的 RSD 分别为 0.76%、0.84%、0.76%、1.12%、1.18%,表明方法重复性良好。

2.3.6 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样 20 μL,按“2.3.1”项下条件测定,计算 R₁、R_{g1}、Re、R_{b1}、R_d 5 种成分峰面积的 RSD 分别为 0.43%、0.27%、0.31%、0.40%、0.39%,可见供试品溶液中各成分在 24 h 内稳定。

2.3.7 加样回收率试验 称取已知含量的微球适量,平行 6 份,分别加入混合对照品溶液 0.5 mL(R₁、R_{g1}、Re、R_{b1}、R_d 质量浓度分别为 0.392 2、1.491 6、0.204 8、2.270 2、0.570 6 mg/mL),按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算各成分的回收率和 RSD。结果 R₁、R_{g1}、Re、R_{b1}、R_d 5 种成分的回收率均在 95%~105%,分别为 101.59%、102.49%、102.39%、99.98%、102.65%,RSD 分别为 1.94%、2.12%、2.24%、1.58%、1.59%,表明该方法准确可行。

2.4 载药量和包封率的测定

供试品溶液的制备方法同“2.3.2”项下。供试品溶液中 PNS 的含量按“2.3.1”项下色谱条件进行测定,并按下述公式计算载药量、包封率和得率。

载药量=微球中 PNS 原料药质量/微球总质量

包封率=微球中 PNS 原料药质量/PNS 投药量

得率=微球总质量/总投料量

2.5 PNS-BSP-SA 复合微球的处方工艺考察

采用单因素试验考察 SA 与 BSP 质量比、SA 与 PNS 分散体质量比、交联剂 CaCl_2 质量浓度、交联时间、搅拌速度对复合微球形态、载药量和包封率的影响。

2.5.1 SA 与 BSP 质量比 设定 SA 与 PNS 分散体质量比为 1:1, CaCl_2 质量浓度为 50 mg/mL, 交联时间为 10 min, 搅拌速度为 200 r/min, 考察 SA 与 BSP 质量比为 1:1、1:2、1:3 时对复合微球性质的影响。结果表明, 随着 BSP 比例的增加, 复合微球的载药量下降, 包封率提高, 但变化不大。但是当 SA 与 BSP 质量比增加到 1:3 时, 由于混合溶液黏度变大, 使得滴制困难且易拖尾, 综合考虑下, 最终选择 SA 与 BSP 质量比为 1:2。

2.5.2 SA 与 PNS 分散体质量比 其余条件不变, 考察 SA 与 PNS 分散体质量比为 1:0.5、1:1.0、1:1.5 和 1:2.0 时对复合微球性质的影响。结果表明, 包封率呈现先增大后减小的趋势。两者比例从 1:1.0 上升到 1:1.5, 载药量有明显的增加, 而从 1:1.5 上升到 1:2.0 时, 载药量增加不明显。两者比例为 1:0.5 时, 载药量和包封率均较低。综合考虑下, 选择 SA 与 PNS 分散体质量比为 1:1.0~1:2.0, 进行后续考察。

2.5.3 交联剂 CaCl_2 质量浓度 其余条件不变, 考察 CaCl_2 质量浓度分别为 30、40、50、70 mg/mL 时对复合微球性质的影响。结果显示, 随着 CaCl_2

质量浓度的增加, 载药量逐渐减小, 包封率呈现先增加后减小的趋势。这是由于交联剂质量浓度增加使复合微球交联更为致密, 质量增加。综合考虑下, 选择 CaCl_2 质量浓度为 30~50 mg/mL, 进行后续考察。

2.5.4 交联时间 考察交联时间分别为 10、20、30、40 min 时对复合微球性质的影响。结果显示随着交联时间的增加, 复合微球的包封率逐渐下降。而交联时间过短, 会使交联不充分, 复合微球成型性较差, 综合考虑下选择交联时间为 10~30 min, 进行后续考察。

2.5.5 搅拌速度 考察交联搅拌速度为 200、250、300、400 r/min 时对复合微球性质的影响。结果表明搅拌速度的大小对复合微球载药量和包封率的影响同交联时间相似, 随着搅拌速度的增加, PNS 溶出增加, 包封率逐渐下降。因此选择搅拌速度为 200~300 r/min, 进行后续考察。

2.6 正交试验优化处方工艺

根据单因素考察结果, 选取 4 个因素 SA 与 PNS 分散体质量比 (A)、交联时间 (B)、 CaCl_2 质量浓度 (C)、搅拌速度 (D), 每个因素考察 3 个水平, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 其他条件为 SA 与 BSP 质量比为 1:2。以包封率和得率总和为指标进行综合评分, 采用直观分析和方差分析法判断处方工艺优劣, 结果分别见表 1、2。由分析结果可知, 各因素对包封率和得率总和影响的大小顺序为 CaCl_2 质量浓度>搅拌速度>交联时间>SA 与 PNS 分散体

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/min	C/(mg·mL ⁻¹)	D/(r·min ⁻¹)	包封率/%	得率/%	总和/%
1	1:1.0 (1)	10 (1)	30 (1)	200 (1)	49.29	63.94	113.23
2	1:1.0 (1)	20 (2)	40 (2)	250 (2)	47.08	80.24	127.31
3	1:1.0 (1)	30 (3)	50 (3)	300 (3)	46.54	87.08	133.62
4	1:1.5 (2)	10 (1)	40 (2)	300 (3)	51.13	74.72	125.85
5	1:1.5 (2)	20 (2)	50 (3)	200 (1)	51.51	81.78	133.29
6	1:1.5 (2)	30 (3)	30 (1)	250 (2)	45.63	64.11	109.74
7	1:2.0 (3)	10 (1)	50 (3)	250 (2)	52.24	75.04	127.28
8	1:2.0 (3)	20 (2)	30 (1)	300 (3)	46.29	66.57	112.86
9	1:2.0 (3)	30 (3)	40 (2)	200 (1)	53.41	76.61	130.01
K_1	374.16	366.36	335.83	376.53			
K_2	368.88	373.46	383.17	364.33			
K_3	370.15	373.37	394.19	372.33			
R	5.28	7.10	58.36	12.20			

表 2 方差分析
Table 2 Variance analysis

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A (误差)	5.063 5	2	1.000 0	
B	11.062 0	2	2.184 7	
C	640.934 0	2	126.579 5	$P < 0.01$
D	25.608 9	2	5.057 6	

质量比, 并且由方差分析结果可知, CaCl_2 质量浓度对复合微球的包封率和得率总和具有显著性影响。由此得出各因素的最佳组合为 $A_1B_2C_3D_1$, 即 SA 与 PNS 分散体质量比为 1:1, 搅拌速度为 200 r/min, 交联时间为 20 min, CaCl_2 质量浓度为 50 mg/mL。

结合单因素试验中载药量测定结果, SA 与 PNS 分散体质量比为 1:1 时, 复合微球载药量过低, 比例为 1:3 时, 溶液黏度较大, 复合微球粒径较大, 部分微球呈不规则球状, 由于此因素对复合微球指标无显著性影响, 因此比例调整为 1:1.5。故最终处方和工艺因素确定为 SA-BSP-PNS 分散体 1:2:1.5, CaCl_2 质量浓度 50 mg/mL, 交联时间 20 min, 搅拌速度 200 r/min。

2.7 验证试验

按最佳处方工艺制备 3 批 PNS-BSP-SA 复合微球, 测定载药量、包封率和得率, 进行工艺验证, 结果见表 3、4。结果表明, 制备的 3 批复合微球工艺稳定, 重现性较好。与直接加入 PNS 原料药制备

表 3 PNS 分散体复合微球工艺验证 ($n=3$)

Table 3 Process validation of PNS dispersion microspheres ($n=3$)

批次	载药量/%	包封率/%	得率/%
1	10.41	50.32	80.16
2	10.33	52.60	84.42
3	10.26	50.83	82.04
均值	10.34	51.25	82.21
RSD/%	0.72	2.34	2.60

表 4 PNS 原料药复合微球工艺验证 ($n=3$)

Table 4 Process validation of PNS microspheres ($n=3$)

批次	载药量/%	包封率/%	得率/%
1	4.07	11.85	59.51
2	3.96	12.10	62.25
3	4.09	12.54	62.30
均值	4.04	12.16	61.35
RSD/%	1.75	2.89	2.61

的复合微球相比, PNS 分散体复合微球的载药量、包封率和得率均明显增加。

2.8 PNS-BSP-SA 复合微球的表征

2.8.1 外观形态 采用 SEM 观察所制备的 PNS-BSP-SA 微球的整体形态以及表面结构。在检测前, 样品先被分散黏附于导电胶带上并喷金, SEM 的操作加速电压为 3.0 kV。由图 2 可见, 复合微球整体呈球状, 圆整度较好, 且表面分布不均匀, 较粗糙, 有许多褶皱, 可见大颗粒物质, 推测为聚丙烯酸树脂 II 载体基质, 可减缓药物的释放。载药后微球粒径变大, 这与加入的疏水材料有关。

2.8.2 粒径分布 采用激光粒度仪对 PNS-BSP-SA 复合微球进行粒径测定, 结果见图 3。由图 3 可知, 微球粒径分布较窄, 平均粒径为 $(882.9 \pm 162.2) \mu\text{m}$ 。

2.8.3 差式扫描量热法 (DSC) 分析 将 PNS 原料药、PNS 分散体、SA-BSP 复合微球 (SA-BSP 为 1:2)、PNS-BSP-SA 复合微球进行 DSC 图谱分析。以空白坩埚为参比物, 另一坩埚放入 6~8 mg 的样品, 温度范围 20~300 $^{\circ}\text{C}$, 升温速率 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, N_2 为保护气, 保护气体积流量 60 mL/min; 吹扫气体积流量 40 mL/min。由图 4 可知, PNS 原料药在

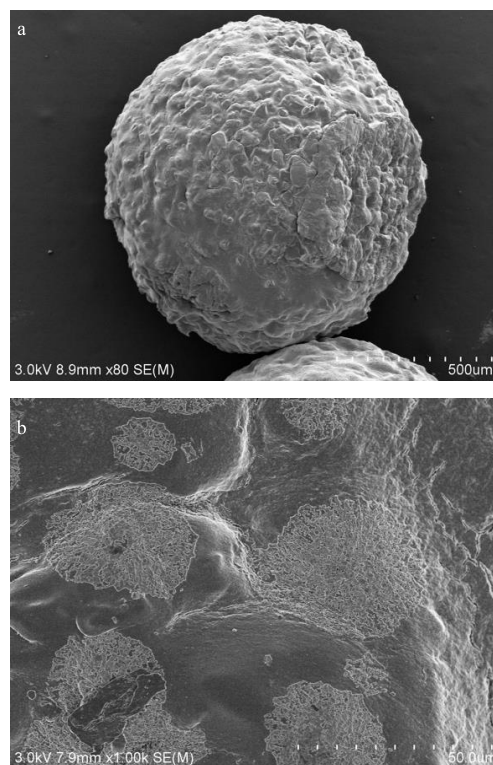


图 2 PNS-BSP-SA 复合微球的扫描电镜图 (a- $\times 80$, b- $\times 1000$)
Fig. 2 SEM image of BSP-PNS composite microsphere (a- $\times 80$, b- $\times 1000$)

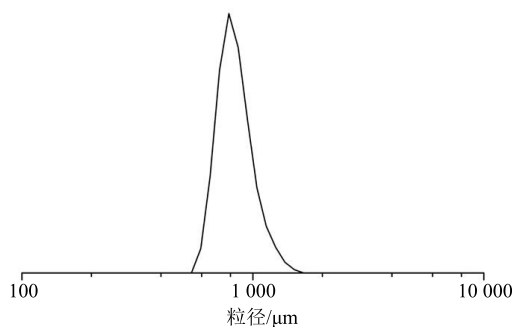


图 3 粒径分布图

Fig. 3 Particle size distribution

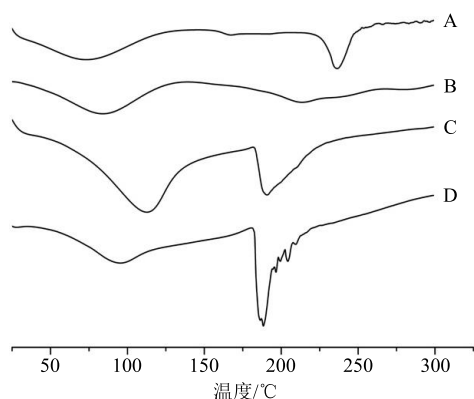


图 4 PNS 原料药 (A)、PNS 分散体 (B)、SA-BSP 复合微球 (C) 和 PNS-BSP-SA 复合微球 (D) 的 DSC 图

Fig. 4 DSC thermograms of PNS (A), PNS dispersion (B), SA-BSP composite microsphere (C), and BSP-PNS-SA composite microsphere (D)

236.4 °C 处有一明显吸热峰,判定为其熔融峰,PNS 分散体仍然存在 PNS 原料药的熔融峰,但相对位置有所改变,为 213.8 °C,并且其熔融峰吸收强度较 PNS 原料药减弱^[16]。说明原料药被载体包覆,其结晶度进一步降低,导致熔融峰吸收强度降低。SA-BSP 复合微球 (SA-BSP 为 1:2) 在 112.8 °C 和 190.9 °C 存在吸热峰,载药后,PNS-BSP-SA 复合微球在 95.5 °C 和 188.3 °C 处存在吸热峰,PNS 原料药的熔融峰消失,SA-BSP 复合微球 (SA-BSP 为 1:2) 的熔融峰依然存在。说明 PNS 的结晶度完全消失,以无定形态均匀分散于微球中^[17],聚丙烯酸树脂 II 以及微球对 PNS 的包载可起到减缓药物释放的效果,并提高药物在胃肠道的稳定性。

2.8.4 溶胀性能测定 精密称取干燥复合微球 100 mg 置于 pH 1.2 的盐酸溶液中,(37±1) °C 恒温振荡。每隔一段时间取出擦净表面水分,迅速称质量 (W_t),计算不同时间的溶胀率 (SR)^[18],并绘制 t -SR 溶胀曲线。由图 5 可知,PNS-BSP-SA 复合微球在 5 min 时便达到最大溶胀率,为 (63.71±2.64) %,

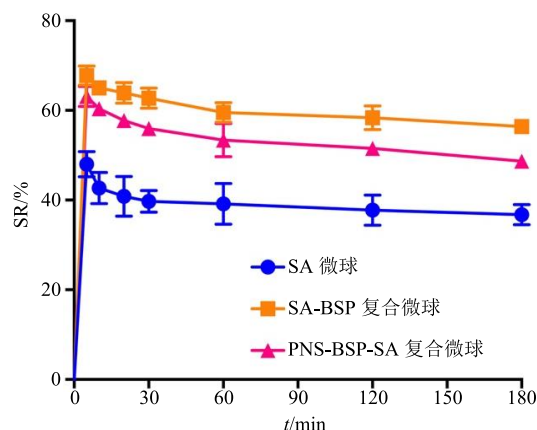


图 5 不同微球的溶胀性能比较

Fig. 5 Comparison on swelling properties of different microspheres

随着时间的延长,其溶胀率缓慢减小。与 SA 微球和 SA-BSP 复合微球相比,PNS-BSP-SA 复合微球的溶胀率明显大于 SA 微球,但稍小于 SA-BSP 复合微球。

$$SR = (W_t - W_0) / W_0$$

W_0 为干燥微球质量, W_t 为 t 时刻微球质量

2.8.5 体外黏附性能评价 雄性 SD 大鼠,禁食不禁水 24 h 后 ip 10% 水合氯醛,解剖取出胃,沿胃大弯剪开,使用生理盐水彻底冲洗干净,用 502 胶水固定在玻璃片上。将 50 mg (100~170 粒) 微球均匀洒在胃黏膜上,置于相对湿度保持在 92.5% (饱和硝酸钾溶液) 的密封容器中,使复合微球充分水化溶胀,20 min 后取出。将玻璃片固定在 45° 支架上,调节蠕动泵转速,使 0.1 mol/L HCl (pH 1.2) 以 6 mL/min 的速度冲洗胃组织 5 min,收集冲洗液中的微球并计数,计算复合微球在大鼠胃部的滞留率^[19-20]。

$$\text{滞留率} = N / N_0$$

N 为滞留的微球数目, N_0 为微球总数

由表 5 可知,加入了 BSP 的 SA 微球在胃部的滞留率明显增加,有显著性差异 ($P < 0.01$)。载药

表 5 不同微球在大鼠胃部的滞留率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Comparison of retention rate of different microspheres in rat stomach ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	滞留率/%
SA 微球	88.59±2.17
SA-BSP 复合微球	99.08±0.91**
PNS-BSP-SA 复合微球	98.33±2.08**

与 SA 微球比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs SA microspheres

后复合微球在大鼠胃部的滞留率几乎没有变化,载药复合微球有很强的黏附性,滞留率达 98%。

2.8.6 体外释药特性研究 按《中国药典》2015 年版四部规定的溶出度与释放度测定法中第三法(小杯法)进行释放度研究。以 200 mL 水作为溶出介质,温度 $(37.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$, 转速 100 r/min, 分别于 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 h, 取样 1 mL (同时补加同温度等量释放介质), 以 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液 20 μL 进行 HPLC 测定, 计算 PNS 原料药、物理混合物、PNS 分散体、PNS-BSP 复合微球中 Rg_1 的累积释放率, 并绘制时间-累积释放率曲线。

由图 6 可知, 与 PNS 原料药和原料药与载体的物理混合物相比, PNS 分散体和 PNS-BSP-SA 复合微球中 Rg_1 的释放明显减慢, 其中, PNS 分散体中 Rg_1 在 12 h 内的累积释放率达 75% 左右, PNS-BSP-SA 复合微球中 Rg_1 在 12 h 累积释放率达 90% 以上, 且两者均有一定的缓释效应。说明将 PNS 制备成 PNS 分散体可减慢药物释放, 进一步制备成微球可以达到较好的缓释效果。这可能是因为 PNS 原料药的结晶度进一步降低, 药物以无定形分散于微球中, 从而使微球中药物的累积释放率进一步提高。

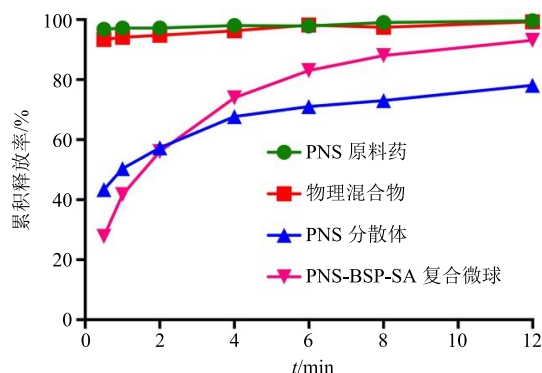


图 6 Rg_1 的体外释放曲线 ($n=3$)

Fig. 6 In vitro release curves of Rg_1 ($n=3$)

3 讨论

由于 BSP 作为固体制剂的成型性较差, 且前期研究发现 BSP 的生物黏附性相对较弱, 因此从众多的生物黏附制剂类型中选择了制备过程温和、不涉及有机试剂且粒径小、比表面大、载药量高、本身具有黏附性的 SA 微球^[21], 作为本课题制剂的基础载体。将 SA 与 BSP 复合后制备微球, 不仅可以发挥 BSP 的生物黏附性, 还可以弥补 SA 微球孔隙率大、机械强度较低的特点^[22]。本实验采用离子交联法制备复合微球, 该方法不涉及有机试剂, 且可以

避免油相对 BSP 黏度的影响, 更好地发挥其生物黏附性。

PNS 亲水性较强^[23], 制备微球时易导致药物泄露, 包封率降低。中药粉体改性技术可通过改变粉体的亲水性、疏水性、吸湿性、流动性、稳定性等性质, 使原料药更好地符合制剂的要求^[24]。因此, 本研究考虑使用液相分散法与固体分散技术相结合, 选择疏水性高分子材料作为 PNS 的载体, 制备 PNS 分散体, 以增强其疏水性并缓慢释药^[25-26]。前期研究结果发现, 聚丙烯酸树脂 II 可以起到包覆和粘合的作用, 使药物粒子聚集, 粒径变大, 比表面积减小, 导致药物在水中有阻碍的扩散, 释放减慢。研究结果也显示, 与 PNS 原料药微球相比, PNS 分散体微球的载药量、包封率和得率均明显增加, 且 PNS 分散体和 PNS-BSP-SA 复合微球中 Rg_1 的释放明显减慢。

溶胀性能是评价生物黏附微球黏附性能的重要参数。溶胀发生在微球黏附的第一步, 微球的溶胀能力就相当于微球从黏膜组织中吸收水分的能力, 从而使微球和黏膜之间发生黏合作用^[27-28]。因此, 测定微球的溶胀能力在一定程度上反映了微球的黏附性能。BSP 的加入可增加 SA 微球的溶胀性能, 并增加其在大鼠胃部的微球滞留率, 且载 PNS 后滞留率无明显变化。

本研究制备的 PNS-BSP-SA 复合微球圆整度较好, 且载药量、包封率、得率均较 PNS 原料药微球提高。与 SA 微球相比, 具有较强的黏膜黏附性能。微球具有一定的缓释性能, 微球中 Rg_1 在水中的释放相对于 PNS 原料药而言明显减慢。

参考文献

- [1] Liu J Y, Wang H C, Yin Y, et al. Controlled acetylation of water-soluble glucomannan from *Bletilla striata* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 89(1): 158-162.
- [2] 陈思思, 吴 蓓, 谭 婷, 等. 白及多糖 BSP-1 的分离纯化、结构表征及抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(8): 1921-1926.
- [3] 瞿 燕, 张 晨, 廖祯诚, 等. 白及多糖应用于医用生物材料的探讨 [J]. *中药与临床*, 2017, 8(5): 54-58.
- [4] He X, Fang J, Wang X, et al. *Bletilla striata*: Medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 195: 20-38.
- [5] 党婷婷, 王 济, 唐 鹏, 等. 活性氧响应的白及多糖载药胶束制备及其表征 [J]. *中草药*, 2018, 49(23): 5548-5553.

- [6] Wang Y, Liu J, Li Q, *et al.* Two natural glucomannan polymers, from *Konjac* and *Bletilla*, as bioactive materials for pharmaceutical applications [J]. *Biotechnol Lett*, 2015, 37(1): 1-8.
- [7] 程玉钊, 郝旭亮, 付丽娜, 等. 基于白及多糖的黄藤素纳米柔性脂质体膜剂的制备研究 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2551-2556.
- [8] Wang L C, Wu Y J, Li J S, *et al.* Rheological and mucoadhesive properties of polysaccharide from *Bletilla striata* with potential use in pharmaceuticals as bio-adhesive excipient [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120: 529-536.
- [9] 王莹, 褚扬, 李伟, 等. 三七中皂苷成分及其药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1381-1392.
- [10] Zhu B C, Zhang W T, Yang L, *et al.* Network pharmacology-based identification of protective mechanism of *Panax notoginseng* saponins on aspirin induced gastrointestinal injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 159-166.
- [11] 邓响潮, 李燕舞, 王汝俊. 三七总苷对应激大鼠胃黏膜褪黑素受体 mRNA 表达的影响 [J]. 中药材, 2008, 32(8): 1182-1184.
- [12] 邓响潮, 李燕舞, 王汝俊. 三七总苷对应激大鼠血清及胃黏膜氧自由基的影响 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(3): 41-43.
- [13] Peng J J, Li D X, Huang J Y, *et al.* Simultaneous determination of saponins in Dripping Pills made from *Astragali Radix* and *Panax notoginseng* by UPLC-ELSD [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(3): 267-274.
- [14] 刘静, 赵海霞, 吴秋月, 等. 基于 ATR/Chk1/P53 信号通路探讨三七总皂苷对自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 935-940.
- [15] 李丽, 马文娟, 贾琪, 等. 实时荧光定量 PCR 联合高通量测序分析杠柳毒苷与三七总皂苷配伍对大鼠肠道菌群的影响 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(3): 432-436.
- [16] 王美荣, 吴小青, 许海龙, 等. 曲美他嗪固体分散体的制备及缓释性能研究 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(12): 1401-1406.
- [17] Sharma H K, Lahkar S, Kanta Nath L. Formulation and *in vitro* evaluation of metformin hydrochloride loaded microspheres prepared with polysaccharide extracted from natural sources [J]. *Acta Pharmaceut*, 2013, 63(2): 209-222.
- [18] 易文清, 李新法, 陈金周, 等. 壳聚糖水凝胶微球的制备与溶胀性能 [J]. 功能高分子学报, 2010, 23(4): 396-399.
- [19] 刘陶世, 赵新慧, 狄留庆, 等. 黄连总碱-卡波姆复合物的制备、体外释药特性及其胃生物粘附性能评价 [J]. 中国医药科学, 2013, 3(22): 14-17.
- [20] Liu Y, Zhang J, Gao Y, *et al.* Preparation and evaluation of glyceryl monooleate-coated hollow-bioadhesive microspheres for gastroretentive drug delivery [J]. *Int J Pharm*, 2011, 413(1/2): 103-109.
- [21] Ching A L, Liew C V, Chan L W, *et al.* Modifying matrix micro-environmental pH to achieve sustained drug release from highly laminating alginate matrices [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 33(4/5): 361-370.
- [22] Zhang X, Hui Z, Wan D, *et al.* Alginate microsphere filled with carbon nanotube as drug carrier [J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 47(3): 389-395.
- [23] 赖玲, 刘华钢, 文丽, 等. 三七总皂苷口服制剂的处方前研究 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(9): 1050-1053.
- [24] 韩丽, 张定堃, 林俊芝, 等. 适宜中药特性的粉体改性技术方法研究 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3253-3259.
- [25] 赵立杰, 冯怡, 沈岚, 等. 相分散法降低中药制剂原料吸湿性机理初步探讨 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(6): 1057-1060.
- [26] 王灯节, 狄留庆, 康安, 等. 白及多糖配伍对三七总皂苷中 10 种成分药动学的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 737-746.
- [27] Szekealska M, Amelian A, Winnicka K. Alginate microspheres obtained by the spray drying technique as mucoadhesive carriers of ranitidine [J]. *Acta Pharm*, 2015, 65(1): 15-27.
- [28] Thombre N A, Gide P S. Floating-bioadhesive gastroretentive *Caesalpinia pulcherrima*-based beads of amoxicillin trihydrate for *Helicobacter pylori* eradication [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(2): 405-419.