

• 药剂与工艺 •

Box-Behnken 效应面法优化自组装法制备葛根素壳聚糖/海藻酸钠口服纳米粒的处方与工艺研究

颜 洁, 关志宇*, 朱卫丰*, 钟凌云*, 吴文婷, 邹 斌, 李 娜, 陈 鸿

江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 采用 Box-Behnken 效应面法筛选壳聚糖/海藻酸钠自组装制备葛根素纳米粒 (Pur-NPs) 的最优处方。方法 采用自组装法制备葛根素壳聚糖/海藻酸钠纳米粒 (Pur-CS/SA-NPs), 以壳聚糖质量浓度、壳聚糖 pH 值、海藻酸钠质量浓度、搅拌速度、搅拌时间、超声功率、投药量为考察因素, 以包封率、载药量、粒径、多分散指数 (PDI) 为评价指标, 进行单因素考察, 利用 Box-Behnken 效应面设计法筛选最优处方, 将最优处方进行表征及体外释放实验。结果 得到优化后自组装法最优的处方为壳聚糖质量浓度 0.45 mg/mL, 海藻酸钠质量浓度为 0.07 mg/mL, 壳聚糖 pH 值 4.33, 转速 316.49 r/min。为了实验操作方便, 将最优处方定为壳聚糖质量浓度 0.45 mg/mL, 海藻酸钠质量浓度为 0.07 mg/mL, 壳聚糖 pH 值为 4.3, 转速 300 r/min, 平行 3 次实验进行验证, 所得纳米粒包封率 (89.056 ± 1.680) %、载药量 (44.528 ± 0.840) %、平均粒径 (208.327 ± 1.870) nm、PDI 0.131 ± 0.006 。经过表征, 纳米粒形态完好, 由体外释放实验可知, 纳米粒经过拟合所符合的方程为 Higuchi 模型, 且在释放过程中无突释现象, 表明纳米粒在体外释放良好。结论 采用 Box-Behnken 效应面法优化了 Pur-CS/SA-NPs 的处方, 以平均粒径、PDI、包封率、载药量为指标评价该模型, 且经过表征及体外释放实验, 表明该模型预测性良好。

关键词: 葛根素; 纳米粒; Box-Behnken; 粒径; 多分散指数; 包封率; 载药量

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)23-5706-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.010

Self-assembly method of preparation of puerarin chitosan/sodium alginate oral nanoparticles by Box-Behnken response surface method

YAN Jie, GUAN Zhi-yu, ZHU Wei-feng, ZHONG Ling-yun, WU Wen-ting, ZOU Bin, LI Na, CHEN Hong

School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To screen the optimal formulation of puerarin nanoparticles (Pur-NPs) by self-assembly of chitosan/alginate by Box-Behnken response surface method. **Methods** Puerarin chitosan/sodium alginate nanoparticles (Pur-CS/SA-NPs) were prepared by self-assembly method. Taking chitosan concentration, chitosan pH, sodium alginate concentration, stirring speed, stirring time, ultrasonic power, and dosage as investigation factors, the encapsulation rate, drug loading, particle size, and polydispersity index (PDI) were used as evaluation index to investigate the optimal prescriptions using the Box-Behnken response surface design method, and the optimal formulation was characterized and released in *in vitro* experiments. **Results** The optimal formulation from the optimized self-assembly method was as following: chitosan concentration of 0.45 mg/mL, sodium alginate concentration of 0.07 mg/mL, chitosan pH of 4.33, and rotation speed of 316.49 r/min. For the convenience of experimental operation, the most optimal prescription was determined to be chitosan concentration of 0.45 mg/mL, sodium alginate concentration of 0.07 mg/mL, chitosan pH of 4.3, and

收稿日期: 2019-07-13

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项 (2017YFC1702904); 江西省教育厅科技计划项目 (GJJ170718); 江西省 2018 年度研究生创新专项 (YC2018-S287、YC2018-S285); 中药学一流学科科研项目 (JXSYLXK-ZHYA0049)

作者简介: 颜 洁, 在读硕士研究生, 从事药物新制剂与生物药剂学研究。Tel: 18317910014 E-mail: 1252704332@qq.com

***通信作者** 关志宇, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 从事药物新制剂与生物药剂学研究。Tel: 15879196566 E-mail: adlaiguan@126.com

朱卫丰, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (0791)87118614 E-mail: zwf0322@126.com

钟凌云, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制机制、饮片质量标准等研究。Tel: (0791)87118939 E-mail: ly1638163@163.com

rotation speed of 300 r/min. The results were verified by three parallel experiments, and the encapsulation efficiency, drug loading, average particle diameter, and PDI of obtained nanoparticles were $(89.056 \pm 1.680)\%$, $(44.528 \pm 0.840)\%$, (208.327 ± 1.870) nm and 0.131 ± 0.006 , respectively. After characterization, the morphology of the nanoparticles was intact. It can be seen from the *in vitro* release experiments that the equation fitted by the nanoparticles was Higuchi model, and there was no burst release during the release process, indicating that the nanoparticles were released well *in vitro*. **Conclusion** The prescription of puerarin chitosan/sodium alginate nanoparticles was optimized by Box-Behnken response surface method. The model was evaluated by average particle size, PDI, encapsulation efficiency and drug loading, and the characterization results and *in vitro* release test showed that the model had good predictability.

Key words: puerarin; nanoparticle; Box-Behnken; particle size; PDI; encapsulation efficiency; drug loading

葛根素 (puerarin, Pur) 是豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的主要有效成分, 具有多种生物学作用, 在临床各领域应用广泛, 主要可缓解冠心病心绞痛, 辅助治疗心肌梗死^[1-2]、脑梗死^[3]、突发性耳聋^[4], 促进神经功能恢复^[5-8]。Pur 为 BCS IV 类药物, 口服生物利用度低, 目前临床上只有注射液和滴眼液, 前者需长期用药, 患者使用顺应性差, 且易发生血管内溶血^[9-10]、过敏性哮喘、过敏性休克、发热等不良反应^[11-14]。口服给药是最易被接受的给药途径, 可自主用药, 且不直接损害皮肤和黏膜^[15-16], 安全性好, 因此新型口服给药系统已成为目前 Pur 研究的热点。本实验采用天然聚阳离子壳聚糖 (CS) 和天然聚阴离子海藻酸钠 (SA), 通过自组装法制备葛根素壳聚糖/海藻酸钠纳米粒 (Pur-CS/SA-NPs), 自组装法是利用带相反电荷的聚电解质在水溶液中通过静电相互作用, 以自组装形成壳聚糖-海藻酸盐纳米粒 (CS/SA-NPs)^[17-18]。且两者都是无毒、生物相容性好的天然高分子材料, 反应条件较为温和^[19-20], 所制备的纳米粒无突释现象。本实验通过单因素考察、Box-Behnken 效应面法优化制备 Pur-CS/SA-NPs, 以期提高 Pur 生物利用度, 为 Pur 新剂型的研究、临床应用及产业化生产奠定基础。

1 仪器与材料

SQP 万分之一分析天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; Nano-S 马尔文纳米粒度仪, 英国马尔文公司; Agilent A1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; ZNCL-BS140*140 磁力搅拌器, 西安远舰仪器设备有限公司; TECNAL G2 透射电子显微镜, 美国 FEI 公司; KQ200DA 超声仪, 昆山市超声仪器有限公司; PHS-25 pH 校准计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

Pur 对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号 110752-201816, 质量分数 > 95.5%; Pur, 成都普菲

德生物技术有限公司, 批号 18082401, 质量分数 > 98%; CS, 实验室自制, 脱乙酰度 > 99%; SA, Alfa Aesar 公司, 批号 10210832; 无水氯化钙, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 20171219; 胰蛋白酶 (CAS: 9002-07-7), Solarbio 公司, 批号 1030E0426; 胃蛋白酶 (CAS: 9001-75-6), Solarbio 公司, 批号 720A028。

2 方法与结果

2.1 自组装法制备 Pur-CS/SA-NPs

2.1.1 储备液的配制 分别称取 SA、氯化钙、CS 250.0 mg 于 10 mL 量瓶, 用水定容至刻度, 超声溶解放至冰箱储存。

2.1.2 制备方法 精密量取 CS 储备液溶液 400 μ L 置 5 mL 量瓶中用纯水定容至刻度线, 用 1% 的稀盐酸和饱和氢氧化钠溶液调节 CS 溶液 pH 值, 精密称取 Pur 10.0 mg 于 5 mL 量瓶中, 用 5% 的乙醇溶液定容至刻度线, 将 Pur 溶液加入 CS 溶液中, 搅拌均匀。另取 25 mL 烧杯, 加入 SA 储备液 50 μ L、氯化钙储备液 100 μ L, 加入 9.85 mL 纯水, 在磁力搅拌器下搅拌 10 min 混合均匀后超声 10 min, 将 Pur/CS 溶液通过 1 mL 注射针管缓缓滴入 SA/氯化钙混合溶液中, 滴加完全后超声 10 min, 超声后将混悬液在磁力搅拌器下搅拌一定时间, 至溶液明显乳光。

2.2 Pur-CS/SA-NPs 分析方法的建立

2.2.1 供试品溶液的配制 取“2.1.2”项下方法制备的 Pur-CS/SA-NPs 混悬液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度线, 即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取 Pur 对照品 10.0 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度线, 即得质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相甲醇-水 (30 : 70), 体积流量 1 mL/min, 进样量 10 μ L, 柱温 30 $^{\circ}$ C,

理论塔板数以 Pur 峰计为 18 130。

2.2.4 专属性考察 分别取 Pur 对照品溶液、自组装法制备的 Pur-CS/SA-NPs、空白纳米粒，过 0.22 μm 微孔滤膜，在“2.2.3”项色谱条件下进行 HPLC 测量。由图 1 可知，Pur-CS/SA-NPs 混悬液与对照品溶液相比在相同的保留时间处出现色谱峰，空白纳米粒样品溶液未出现色谱峰，故认为空白纳米粒对实验无干扰作用。

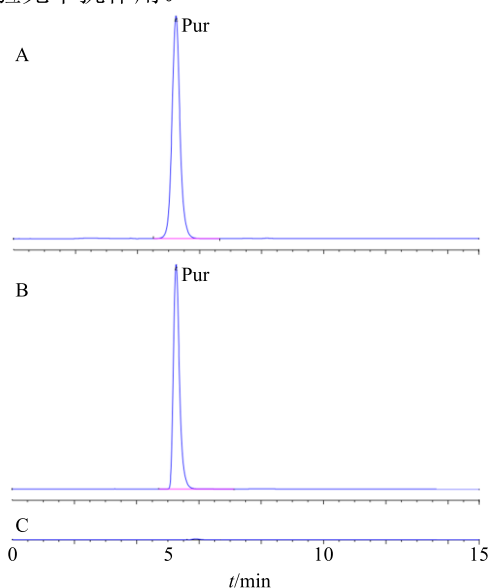


图 1 Pur 对照品 (A)、Pur-CS/SA-NPs 混悬液 (B)、空白纳米粒 (C)

Fig. 1 Puerarin standard (A), Pur-CS/SA-NPs suspension (B), and blank nanoparticles (C)

2.2.5 线性关系考察 精密量取 1.0 mg/mL Pur 对照品溶液 0.120、0.240、0.360、0.480、0.60、0.720 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度线，按“2.2.3”项色谱条件测定，记录色谱图。以 Pur 色谱峰面积作为纵坐标 (Y)，质量浓度作为横坐标 (X) 进行线性回归，计算回归方程及相关系数 (r^2)，得标准曲线为 $Y=91.595 X+35.980$ ， $r^2=0.9998$ ，表明 Pur 在 0.012~0.072 mg/mL 呈良好的线性关系。

2.2.6 精密度试验 取低、中、高 (0.015、0.030、0.060 mg/mL) 3 个质量浓度的 Pur 对照品溶液，在“2.2.3”项色谱条件下进样测定，每一质量浓度测定 6 次，记录其峰面积，计算精密度。结果表明 Pur 峰面积 RSD 值为 0.47%，说明该方法的精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.1”项下供试品溶液，按照“2.2.3”项下色谱条件，分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 进样分析，计算得 Pur 的峰面积 RSD

值为 0.33%，说明所制备的纳米粒稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 按照“2.1.2”项平行制备 6 份样品，并按“2.2.1”项制备供试品溶液，按“2.2.3”项下色谱条件进行，计算得 Pur 质量分数的 RSD 值为 0.47%，结果表明该方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 精密量取 1 mL “2.2.1”项下供试品溶液 9 份，分为 3 组，分别加入 Pur 对照品溶液，得到加样质量浓度分别为低、中、高 (0.015、0.030、0.060 mg/mL) 的溶液，按“2.2.3”项下色谱条件进行，计算回收率和 RSD，测得回收率均在 99.77%~102.95%，RSD 均小于 1.5%，结果表明该方法符合测定要求。

2.3 包封率和载药量的测定

取 Pur-CS/SA-NPs 混悬液 400 μL 置超滤离心管，于 12 000 r/min 高速离心 30 min 后取截留液，经 0.22 μm 滤膜滤过。精密量取续滤液 100 μL ，甲醇定容至 10 mL，混匀，按“2.2.3”项色谱条件进行测定。

$$\text{包封率} = (C - C_1) / C$$

$$\text{载药量} = W_1 / (W_1 + W_2)$$

C 为混悬液中总的 Pur 的质量浓度， C_1 为混悬液中未包封的药物的质量浓度， W_1 为包封的药物的质量， W_2 为所有辅料的质量

2.4 单因素考察

在上述储备液的基础上，分别考察 CS 质量浓度为 0.2、0.4、0.8、1.0、1.5 mg/mL，CS pH 值为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5，SA 质量浓度为 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL，氯化钙质量浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mg/mL，搅拌速度为 100、200、300、400、500 r/min，超声时间为 0、2、4、6、8、10 min，超声功率为 50、60、70、80、90、100 kHz，搅拌时间为 10、30 min 及 1.0、1.5、2.0 h，投药量为 5、10、15、20、25 mg 对 Pur-CS/SA-NPs 的粒径、PDI、包封率、载药量的影响。

通过单因素考察发现，CS 质量浓度、CS 溶液 pH 值、SA 质量浓度、搅拌速度这 4 个因素是影响粒径、PDI、包封率和载药量的最显著因素，故对这 4 个因素进行优化试验。其他单因素对纳米粒的影响如下：少量 Ca^{2+} 可使纳米粒粒径降低，但浓度过大会使混悬液有明显絮状物。短时间超声可使粒径降低，但对包封率和载药量的影响并不是很大，超声时间在 10 min 后，对纳米粒的粒径、PDI 等均无影响。超声功率越大纳米粒的粒径越小，且超声

功率在 90 kHz 之后对纳米粒粒径等均无影响。搅拌有助于混悬液分散, 时间越长所制备的 Pur-CS/SA-NPs 越佳。当投药量超过 10 mg 时, Pur-CS/SA-NPs 的包封率和载药量并没有显著性提高或降低, 故 Pur 投药量定为 10 mg。综合单因素考察结果, 氯化钙质量浓度为 0.05 mg/mL, 超声时间为 10 min, 超声功率 90 kHz, 搅拌时间 1.5 h, 投药量 10 mg, 所得纳米粒粒径和 PDI 最低, 且包封率和载药量最大。

2.5 Box-Behnken 效应面法优化处方

依据单因素实验结果, 采用 Box-Behnken 效应面法对自组装法制备 Pur-CS/SA-NPs 进行处方优化, 选取因素 A (CS 质量浓度)、B (SA 质量浓度)、

C (CS 溶液 pH 值)、D (转速), 试验设计见表 1。

根据 Design Expert 8.0.6 软件, 将平均粒径、分散系数 (PDI)、包封率、载药量每个指标定为 0~1 的归一值, 各指标归一值求几何平均数, 得总评归一值 (OD), 按公式 $OD=(d_1d_2\cdots d_k)^{1/k}$ 进行计算, k 为指标数^[21-22]。对于包封率、载药量取值越大越好, 平均粒径、PDI 取值越小越好的因素分别采用 Hassan 方法, 然后分别转换求得归一值 $d_{\max}$ 和 $d_{\min}$ 公式如下^[23]。自组装法 Box-Behnken 效应面法试验结果见表 1, 所得 OD 值各因素方差分析结果见表 2。

$$d_{\max}=(Y_i-Y_{\min})/(Y_{\max}-Y_{\min})$$

$$d_{\min}=(Y_{\max}-Y_i)/(Y_{\max}-Y_{\min})$$

表 1 自组装法制备 Pur-CS/SA-NPs Box-Behnken 响应曲面的试验安排与结果 ($n=3$)

Table 1 Experimental arrangement and results of preparation of Pur-CS/SA-NPs Box-Behnken response surface by self-assembly method ($n=3$)

试验号	A/(mg·mL ⁻¹)	B/(mg·mL ⁻¹)	C	D/(r·min ⁻¹)	粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%	OD 值
1	0.45 (0)	0.08 (0)	6.00 (+1)	450 (+1)	457.3	0.275	70.790	35.395	0.340
2	0.45	0.10 (+1)	6.00	300 (0)	429.1	0.311	73.170	36.585	0.405
3	0.45	0.08	4.50 (0)	300	225.6	0.118	87.960	43.980	0.899
4	0.60 (+1)	0.10	4.50	300	459.4	0.423	71.470	35.735	0.278
5	0.45	0.05 (-1)	6.00	300	441.3	0.396	75.980	37.990	0.372
6	0.30 (-1)	0.08	4.50	450	447.3	0.362	73.990	36.995	0.370
7	0.45	0.08	3.00 (-1)	450	434.4	0.375	76.980	38.490	0.409
8	0.60	0.08	6.00	300	396.4	0.277	77.780	38.890	0.520
9	0.30	0.05	4.50	300	436.5	0.335	76.440	38.220	0.431
10	0.45	0.08	6.00	150 (-1)	511.2	0.482	62.040	31.020	0.057
11	0.45	0.05	3.00	300	442.6	0.368	74.380	37.188	0.375
12	0.60	0.08	4.50	150	428.7	0.388	75.360	37.680	0.382
13	0.45	0.08	4.50	300	194.1	0.162	92.450	46.225	0.960
14	0.45	0.10	4.50	150	485.3	0.390	64.980	32.490	0.184
15	0.45	0.08	3.00	150	473.7	0.346	66.950	33.475	0.248
16	0.45	0.10	3.00	300	414.2	0.336	76.770	38.385	0.453
17	0.45	0.05	4.50	150	464.6	0.344	67.100	33.550	0.258
18	0.45	0.10	4.50	450	450.4	0.316	72.600	36.300	0.376
19	0.30	0.10	4.50	300	560.3	0.330	61.990	30.998	0.000
20	0.60	0.05	4.50	300	434.0	0.326	72.040	36.020	0.374
21	0.45	0.05	4.50	450	395.9	0.296	78.140	39.070	0.514
22	0.60	0.08	4.50	450	499.1	0.359	63.230	31.615	0.147
23	0.30	0.08	6.00	300	462.1	0.400	68.100	34.050	0.247
24	0.45	0.08	4.50	300	200.7	0.143	84.320	42.160	0.838
25	0.45	0.08	4.50	300	230.8	0.133	85.020	42.510	0.837
26	0.60	0.08	3.00	300	388.3	0.286	80.260	40.130	0.557
27	0.30	0.08	4.50	150	533.6	0.493	60.336	30.168	0.000
28	0.45	0.08	4.50	300	198.1	0.104	88.970	44.485	0.942
29	0.30	0.08	3.00	300	387.1	0.291	81.280	40.640	0.569

应用 Design Expert 8.0.6 软件以 A、B、C、D 为自变量, OD 值为因变量, 进行 2 次多项式逐步回归拟合, 得到方程: $OD = 0.990 + 0.053 A - 0.052 B - 0.056 C + 0.086 D + 0.084 AB + 0.071 AC - 0.150$

$AD - 0.011 BC - 0.016 BD + 0.031 CD - 0.290 A^2 - 0.270 B^2 - 0.210 C^2 - 0.360 D^2$ ($r^2 = 0.912$ 3, $P < 0.000$ 1), 其等高线图与 3D 曲线图见图 2。

Box-Behnken 效应面试验设计结果, 得到优化

表 2 自组装法制备 Pur-CS/SA-NPs OD 值各因素回归系数和方差分析 (ANOVA)

Table 2 Self-assembly method for Pur-CS/SA-NPs OD value regression coefficient and variance analysis (ANOVA)

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.770	14	0.130	10.400	<0.000 1	CD	3.721×10^{-3}	1	3.721×10^{-3}	0.310	0.589 0
A	0.034	1	0.034	2.810	0.115 6	A ²	0.550	1	0.550	45.140	<0.000 1
B	0.033	1	0.033	2.700	0.122 5	B ²	0.480	1	0.480	39.690	<0.000 1
C	0.037	1	0.037	3.070	0.101 4	C ²	0.280	1	0.280	22.700	0.000 3
D	0.088	1	0.088	7.220	0.017 7	D ²	0.860	1	0.860	70.910	<0.000 1
AB	0.028	1	0.028	2.310	0.151 1	残差	0.170	14	0.012		
AC	0.020	1	0.020	1.670	0.217 3	失拟项	0.160	10	0.016	4.820	0.071 7
AD	0.092	1	0.092	7.520	0.015 9	纯差	0.013	4	3.266×10^{-3}		
BC	5.063×10^{-4}	1	5.063×10^{-4}	0.042	0.841 3	总和	1.940	28			
BD	1.024×10^{-3}	1	1.024×10^{-3}	0.084	0.776 0						

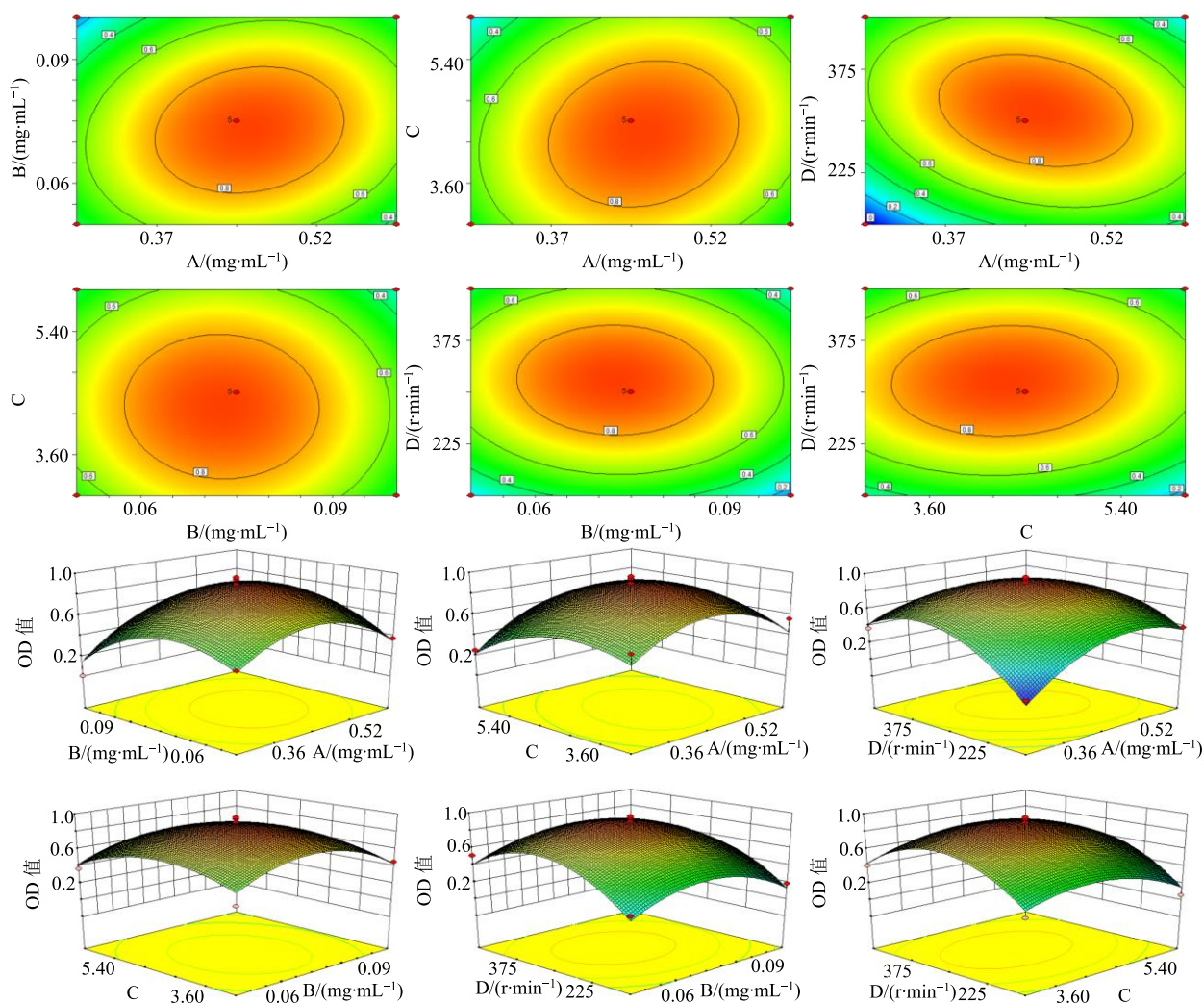


图 2 效应值 OD 与 A、B、C、D 4 个因素的等高线图和三维曲面图

Fig. 2 Contour map and 3D surface map of four factors of effect value OD and A, B, C and D

后自组装法最优的处方为 CS 质量浓度 0.45 mg/mL, SA 质量浓度 0.07 mg/mL, CS 溶液 pH 值 4.33, 转速 316.85 r/min。

2.6 最优处方验证试验

根据 Box-Behnken 效应面优化试验, 得到最佳

处方, 将最佳处方平行 3 次实验进行验证。为了操作方便, 将最优处方定为 CS 质量浓度 0.45 mg/mL, SA 质量浓度为 0.07 mg/mL, CS 溶液 pH 值为 4.30, 转速 300 r/min, 所得各评价指标与预测值接近, 表明建立的回归方程预测性良好, 结果见表 3。

表 3 预测值与实测值的比较 ($n = 3$)

Table 3 Comparison of predicted and measured values ($n = 3$)

比较项	平均粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%
预测值	208.818	0.130	88.276	44.138
实测值	208.327±1.870	0.131±0.006	89.056±1.680	44.528±0.840
RSD	0.940	0.003	0.860	0.430

2.7 Pur-CS/SA-NPs 的表征

取 Pur-CS/SA-NPs 混悬液适量, 滴入载玻片上, 缓慢盖上盖玻片, 防止产生气泡。调节显微镜, 使得偏光角度为 90°, 视野为暗黑色, 将样品玻片置入电子显微镜中观察。取稀释 10 倍的样品 10 μ L 滴在覆有支持膜的铜网上, 静置 5 min 后用滤纸吸干, 再滴加 0.5% 磷钨酸溶液 10 μ L 于铜网上染色 5 min, 静置挥干后置于透射电镜下观察。在电子显微镜和透射电镜下显示, 纳米粒呈现圆形, 且粒径分布均匀, 大小均一。结果见图 3。

2.8 Pur-CS/SA-NPs 体外释药实验

分别以人工胃液 (SGN) 和 (SIF) 为释放介质, 采用透析法测定 Pur-CS/SA-NPs 的体外释药行为^[24]。将 Pur-CS/SA-NPs 混悬液精密量取 2 mL 置透析袋 (截留相对分子质量 3 500) 中, 将 Pur 溶液量取同样质量置于透析袋内, 并扎紧两端, 置装有释放介质 150 mL 的烧杯中, 在 (37.0±0.5) °C、100 r/min 振荡条件下实验。分别于 0.25、0.50、0.75、1、2、3、4、6、8、10、12、24 h 取样 1 mL, 同时补充同温同量介质, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后测定, 计算药物质量浓度和累积释放率 (Q)。

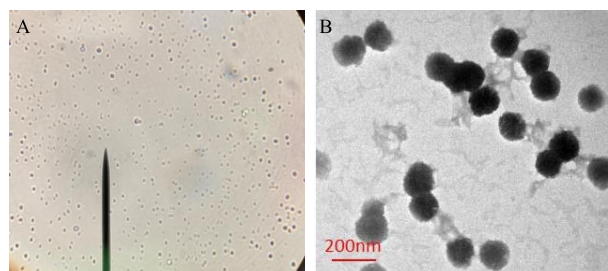


图 3 Pur-CS/SA-NPs 电子显微镜图 (A) 和 TEM 图 (B)
Fig. 3 Pur-CS/SA-NPs micrograph of electron microscope (A) and TEM (B)

$$Q_n = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / M$$

Q_n 为第 n 个时间点药物的 Q , C_n 为第 n 次取样时由标准曲线方程得到的各 Pur 质量浓度, V 为释放介质的总体积, V_i 为取样的体积, M 为透析袋内 Pur 的质量

根据模拟 SGN 和 SIF, 测定 Pur 和 Pur-CS/SA-NPs 在体外的累积释放率, 结果见图 4 和表 4。

由上述结果可知, Pur 原料药在 SIF 和 SGN 中 8 h 的 Q 达 99%, 在后续释放接近平稳, Pur-CS/SA-NPs 在 SIF 和 SGN 中在 8 h 后依然持续有释放, 经过拟合所符合的方程为 Higuchi 模型, 且在释放过程中无突释现象, 表明 Pur-CS/SA-NPs 在体外释放良好。

3 讨论

口服缓释纳米粒是新一代亚微粒给药系统, Pur 缓释纳米粒生物利用度高, 毒性低、生物相容性较好, 可较好地控制药物释放^[25]。

CS 是阳离子聚合物, 因其具有生物可降解性、

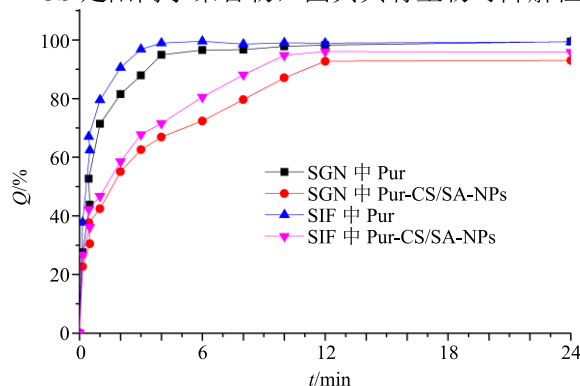


图 4 Pur 和 Pur-CS/SA-NPs 分别在 SGN 和 SIF 下 Q ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Q of Pur and Pur-CS/SA-NPs under SGN and SIF, respectively ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 4 Pur 和 Pur-CS/SA-NPs 分别在 SGN 和 SIF 下体外释放拟合公式
Table 4 Formula for fitting *in vitro* release of Pur and Pur-CS/SA-NPs under SGN and SIF

样品	模型	SGN	SIF
Pur	零级释放	$Q=10.617 t+46.843, r^2=0.738 6$	$Q=0.086 5 t+0.605 9, r^2=0.660 7$
	一级释放	$\ln(1-Q)=-0.530 2 t-0.497 1, r^2=0.955 1$	$\ln(1-Q)=-0.852 7 t-0.655 7, r^2=0.975 6$
	Weibull 函数	$\ln[\ln(1/(1-Q))]=0.356 9 t-0.534 5, r^2=0.794 1$	$\ln[\ln(1/(1-Q))]=0.369 4 t-0.154 5, r^2=0.831 4$
	Higuchi 模型	$Q=0.330 7 t^{1/2}+0.267 1, r^2=0.881 6$	$Q=0.275 3 t^{1/2}+0.434 2, r^2=0.824 1$
Pur-CS/ SA-NPs	零级释放	$Q=0.049 4 t+0.310 7, r^2=0.930 6$	$Q=0.051 4 t+0.363 5, r^2=0.919 8$
	一级释放	$\ln(1-Q)=-0.128 3 t-0.303 9, r^2=0.986 5$	$\ln(1-Q)=-0.165 7 t-0.347 3, r^2=0.985 9$
	Weibull 函数	$\ln[\ln(1/(1-Q))]=0.151 5 t-0.998 9, r^2=0.921 3$	$\ln[\ln(1/(1-Q))]=0.156 5 t-0.818 0, r^2=0.908 9$
	Higuchi 模型	$Q=0.198 6 t^{1/2}+0.164 7, r^2=0.990 5$	$Q=0.207 8 t^{1/2}+0.209 5, r^2=0.990 1$

生物相容性及靶向性等特点, 已成为纳米药物载体的研究热点^[26-27], 本实验采用的 CS 为自制水溶性 CS, 脱乙酰度 $\geq 99\%$ 。

SA 是一种天然亲水性胶体多糖的高分子材料, 含有许多游离羟基(-OH)和羧基(-COOH), 相邻的-COOH 可以很容易地与 Ca^{2+} 结合形成海藻酸钙明胶(CA)^[28-29]。加入少量的 Ca^{2+} 有利于 CS-SA 形成复合粒子, Ca^{2+} 与 CS 可以进一步通过静电作用, 使纳米粒的粒径变更小; 而当 Ca^{2+} 浓度持续增加时, 更多的 SA 分子与 Ca^{2+} 形成分子间复合作用, 使纳米粒产生凝胶化现象^[30-31]。在制备纳米粒时, SA 和氯化钙溶液要分别稀释后再混合均匀, 高浓度下 SA 和氯化钙溶液混合后有明显絮状物且溶液不澄清, 故在实验过程中要充分考虑 SA 和氯化钙的浓度及比例, 使纳米粒的粒径达到最佳。

本实验以 CS 和 SA 为主要材料, 采用自组合法制备 Pur-CS/SA-NPs 具有工艺简单, 无污染等优点但粒径控制是其主要技术难点。经过单因素考察, CS 质量浓度、CS 溶液 pH 值、SA 质量浓度、氯化钙质量浓度等因素均会影响 Pur-CS/SA-NPs 的制备。在制备纳米粒过程中, 向 SA/氯化钙混合溶液中加入 CS 溶液的速度不宜过快, 否则容易产生絮状物, 而导致纳米粒粒径增大。课题组采用缓慢滴加超声分散的方式, 有效地实现粒径控制, 且 PDI、包封率、载药量均较好。随后进行 Box-Behnken 效应面实验设计, 得到最佳 Pur-CS/SA-NPs 处方组成。通过处方验证实验表明, 实测值与预测值之间的偏差的绝对值较小, 且对优化后的纳米粒进行表征和体外释放试验, 结果显示纳米粒形态完整且具有缓释效果, 表明所建立的模型良好。

本实验通过制备口服 Pur-CS/SA-NPs, 在此研

究的基础上, 本课题将进一步研究所制备口服纳米粒在动物体内吸收及药物动力学, 以考察其体内缓释效果和体内外相关性, 以期促进 Pur 新剂型的进一步开发。

参考文献

- [1] 李 佳, 江 培. 葛根素的研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2014(1): 61-64.
- [2] 范群雄, 陈 昆. 葛根素注射液联合阿替洛尔治疗急性心肌梗死的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(12): 2354-2357.
- [3] 黄亚光, 王金凤, 杜利鹏, 等. 葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠缺血再灌注损伤研究 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3127-3133.
- [4] 张劲松. 葛根素注射液辅助治疗不稳定型心绞痛的临床研究及其代谢组学作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(8): 1454-1460.
- [5] 王 翠. 葛根素注射液联合巴曲酶治疗突发性耳聋的临床疗效观察 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(11): 2061-2064.
- [6] 何俊标. 葛根素注射液治疗急性脑梗塞的临床效果观察 [J]. 当代医学, 2009, 15(3): 93-94.
- [7] 刘 瑶, 李 伟. 葛根素治疗糖尿病肾病的研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 981-986.
- [8] Hao C H, Wang W T, Shao M X, *et al.* Effects of puerarin on experimental model of retinal vein occlusion in rats [J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6(2): 110-114.
- [9] Luo C F, Hou N, Tian J, *et al.* Metabolic profile of puerarin in rats after intragastric administration of puerarin solid lipid nanoparticles [J]. *Int J Nanomed*, 2013, 8: 933-940.
- [10] Wu J R, Zhang X M, Zhang B. Efficacy and safety of puerarin injection in treatment of diabetic peripheral neuropathy: A systematic review and Meta-analysis of

- randomized controlled trials [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(4): 401-410.
- [11] Yang X, Zhang H, Wang J, *et al*. Puerarin decreases bone loss and collagen destruction in rats with ligature-induced periodontitis [J]. *J Periodontal Res*, 2015, 50(6): 748-757.
- [12] Yi Y N, Tu L X, Hu K L, *et al*. The construction of puerarin nanocrystals and its pharmacokinetic and *in vivo-in vitro* correlation (IVIVC) studies on beagle dog [J]. *Colloid Surf B*, 2015, 133: 164-170.
- [13] 翟羽佳, 李凌冰. 葛根素纳米制剂的研究进展 [J]. 药学研究, 2016, 35(2): 97-99.
- [14] 葛根素注射剂不良反应及其影响因素分析 [J]. 药物流行病学杂志, 2005, 14(1): 14-17.
- [15] 徐杰. 葛根素新型给药途径的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(14): 1184-1187.
- [16] Liu L, Yao W D, Rao Y F, *et al*. pH-Responsive carriers for oral drug delivery: Challenges and opportunities of current platforms [J]. *Drug Deliv*, 2017, 24(1): 569-581.
- [17] 俞怡晨, 姚炎庆, 张亚琼, 等. 壳聚糖-海藻酸盐纳米粒子的制备及其对 BSA 的载药与释放特性 [J]. 功能高分子报, 2005, 18(4): 598-601.
- [18] 卢晓霆, 许中畅, 王田田, 等. 玉米多孔淀粉-海藻酸钠-壳聚糖-葡萄糖酚缓释微胶囊的制备及表征 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2252-2259.
- [19] 田大昕, 冯 驊, 冀小雄. 海藻酸钠/TiO₂ 纳米复合材料的制备与表征 [J]. 食品科学, 2009, 30(8): 33-35.
- [20] Liu L, Yang H, Lou Y, *et al*. Enhancement of oral bioavailability of salmon calcitonin through chitosan-modified, dual drug-loaded nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2019, 557: 170-177.
- [21] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用 [J]. 中国现代应用药学, 2007, 24(6): 455-457.
- [22] 徐玲霞, 刘水婷, 刘 骏, 等. Box-Behnken 效应面法优化吴茱萸次碱脂质液晶纳米粒的处方研究 [J]. 中草药, 2018, 49(21): 131-136.
- [23] 赵甜甜, 李小芳, 孙 强, 等. CCD 效应面结合多指标法优化黄芩总黄酮纳米混悬剂处方及其体外溶出研究 [J]. 中药材, 2018, 41(12): 2866-2870.
- [24] Liao D H, Liu X Y, Dai W, *et al*. N-trimethyl chitosan (TMC)-modified microemulsions for improved oral bioavailability of puerarin: Preparation and evaluation [J]. *Drug Deliv*, 2015, 22(4): 516-521.
- [25] Nagatoya K, Moriyama T, Kawada N, *et al*. Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction [J]. *Kidney Int*, 2002, 61(5): 1684-1695.
- [26] Fan W, Yan W, Xu Z S, *et al*. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique [J]. *Colloid Surf B*, 2012, 90: 21-27.
- [27] 陈田娥, 王 鸽, 陈敏婷, 等. TPGS-壳聚糖载紫杉醇胶束的制备及大鼠在体肠吸收研究 [J]. 中草药, 2018, 49(24): 5780-5786.
- [28] Yang L J, Guo J, Yu Y, *et al*. Hydrogen bonds of sodium alginate/Antarctic krill protein composite material [J]. *Carbohydr Polym*, 2016, 142: 275-281.
- [29] Jabeen S, Chat O A, Maswal M, *et al*. Hydrogels of sodium alginate in cationic surfactants: Surfactant dependent modulation of encapsulation/release toward Ibuprofen [J]. *Carbohydr Polym*, 2015, 133: 144-153.
- [30] Soukoulis C, Cambier S, Hoffmann L, *et al*. Chemical stability and bioaccessibility of β -carotene encapsulated in sodium alginate o/w emulsions: Impact of Ca²⁺ mediated gelation [J]. *Food Hydrocolloid*, 2016, 57: 301-310.
- [31] 蔡杰慧, 杨英全, 谢生桃, 等. 层层自组装芸香叶苷海藻酸钠/壳聚糖盐酸盐微球的制备及释药性研究 [J]. 高分子通报, 2018, 229(5): 60-68.