

白芍总苷微囊的制备及其体外释药机制的研究

李小伟, 鲁传华*, 谢俊俊

(安徽中医学院 安徽省现代中药研究与开发重点实验室, 现代中药安徽省工程技术研究中心, 安徽 合肥 230038)

摘要:目的 制备白芍总苷 PVA 微囊并探讨其包封率及药物释放情况。方法 采用悬浮界面交联法对不同质量浓度的 PVA 白芍总苷微囊的制备进行考察, 并采用紫外分光光度法绘制白芍总苷在人工肠液(pH 7.4)中的标准曲线。利用紫外分光光度法测定微囊的包封率和载药量, 测定优化工艺后微囊在 12 h 内溶出的量并作释放度考察曲线。结果 通过界面交联法得到的白芍总苷微囊, 干燥后平均粒径为 10 μm 左右, 其平均包封率和载药量依次为 71.08%、7.32%。结论 紫外分光光度法测定肠溶微囊中白芍总苷的包封率、载药量及释放方法可靠, 线性良好, 稳定性好, PVA 微囊使包封药物白芍总苷有肠溶特性。

关键词:白芍总苷; PVA 微囊; 包封率; 载药量; 溶出度

中图分类号:R284.2; R286.02

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)11-1740-04

Preparation and *in vitro* release mechanism of total glucosides of peony microcapsule

LI Xiao-wei, LU Chuan-hua, XIE Jun-jun

(Anhui Province Key Laboratory of R&D of Chinese Medicine, Research Center of Modern Chinese Medicine Engineering of Anhui Province, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

Abstract: Objective To prepare total glucosides of peony (TGP) microcapsules through using suspension interfacial crosslinking method and to discuss encapsulation efficiency and drug release. **Methods** In this experiment, the preparation process of PVA microcapsules with different concentration was investigated by suspension interfacial crosslinking method and the typical curve of the TGP in the artificial intestinal fluid (pH 7.4) was drawn with using UV spectrophotometry. Its encapsulation efficiency and drug loading rate were determined by UV spectrophotometry, the dissolution volume of optimized microcapsules within 12 h and the curve of the release were measured. **Results** After drying, the average of the particle diameter was 10 μm , the encapsulation efficiency was 71.08%, and the drug-loading rate was 7.32%. **Conclusion** The results show that this method is reliable, stability, and good linearity. TGP dressing PVA microcapsules have enteric release property.

Key words: total glucosides of paeony (TGP); PVA microcapsules; encapsulation efficiency; drug-loading rate; dissolution rate

白芍总苷是白芍的主要有效部位, 具有抑制和调节免疫反应、抗炎、止痛、保肝等作用, 其临床应用前景广阔^[1]。微囊化技术是把分散的固体物质颗粒、液滴或气体包封在一层膜中形成球状微胶囊的一种技术^[2]。本实验选择白芍总苷与天然高分子材料聚乙烯醇(PVA)相结合, 利用 PVA 具有包埋固定化载体具有强度高、化学稳定性好、抗分解性能强、对生物体无毒、价格低廉等一系列优点^[3~5], 采用悬浮界面交联的制备工艺制备了白芍总苷微囊, 并研究了微囊制备的影响因素, 通过扫描电镜对微囊的囊形与粒径进行测定和

紫外法对微囊中白芍总苷进行测定, 在此基础上, 确定了微囊的最佳制备工艺条件, 并测定了其体外释放度。以此方法制备的白芍总苷微囊达到缓慢释放, 提高和延长药物的疗效, 降低其不良反应的目的, 为白芍总苷的进一步的开发提供了参考。

1 材料与仪器

苯甲酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100419-200301), 白芍总苷(total glucosides of peony, TGP)(自制, 质量分数为 65.6%)。聚乙烯醇(PVA): 平均聚合度为 1750 $\pm$ 50, 天津市大茂化学试剂厂; 戊

收稿日期: 2009-02-26

作者简介: 李小伟(1981—), 男, 安徽省太和县人, 硕士研究生, 主要从事高分子分离膜制备及其在中药中的应用研究。

E-mail: lxweikaoyan2007@sina.com

* 通讯作者 鲁传华 Tel: (0551)5169146 Fax: (0551)5169222 E-mail: lch@ahtcm.edu.cn

二醛、硫酸、Span80 石蜡溶液均为化学纯。

UV250 可见-紫外分光光度计(上海分析仪器有限公司);电子扫描电镜仪;ZRS-4 智能药物溶出试验仪(天津大学无线电厂);SWQP 数字控温仪、SPC-15 超级恒温水温(南京桑力电子设备厂);85-2 恒温磁力搅拌器(江苏金坛市金坛金城国盛试验仪器厂)。

2 方法与结果

2.1 白芍总苷的测定方法

2.1.1 供试品溶液的制备:准确称取白芍总苷微囊样品 50 mg,在研磨中碾碎,置于 150 mL 圆底烧瓶,用 50 mg/mL NaOH 溶液 20 mL 溶解,于沸水浴中水解 2 h。水解液调节 pH 4.5,加入固体氯化钠至饱和,于 125 mL 分液漏斗中用乙醚萃取 4 次(20、20、15、15 mL),合并乙醚萃取液,加无水硫酸钠脱水,滤液回收乙醚至干,残渣用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液溶解,移至 25 mL 量瓶中,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液定容。吸取 2.0 mL 于 50 mL 量瓶中,用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液定容,即为供试品溶液。

2.1.2 标准曲线的绘制:取苯甲酸对照品 10 mg,用 85%乙醇溶解,分别配 5.00、4.00、3.00、2.00、1.00、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,定容于 10 mL 量瓶,测定在 227 nm 处的吸光度(A)。进行线性回归,得回归方程 $A=0.0855C+0.007$, $r=0.9997$ 。

2.1.3 回收率试验:精密称取白芍总苷粉末 10 mg,加入 85%乙醇溶解于 100 mL 量瓶中定容,得 0.100 mg/mL 白芍总苷溶液。精密吸取白芍总苷溶液 1、3、5、7 mL,转移至 100 mL 量瓶中,加入适量的空白微囊,用 85%乙醇定量至刻度,摇匀后测定吸光度,经计算得平均回收率为 102%,RSD 为 0.98% ($n=4$)。

2.1.4 样品测定:取供试品溶液,以 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液溶液作为参比溶液,在 227 nm 处测定吸光度,根据回归方程计算出苯甲酸的量,再由公式 白芍总苷质量=苯甲酸质量 $\times$ 480.27/122.12 计算白芍总苷的质量^[6]。

2.2 载药量和包封率的测定:精密称取 50 mg 微囊置 500 mL 烧瓶中,加蒸馏水至 200 mL, pH 值调至 9,保持微沸回流 2 h,放冷,滤过,调 pH 值至 4.5,加正丁醇萃取,减压蒸馏出正丁醇,以 85%乙醇定容于 10 mL 量瓶,在 227 nm 处测定其吸光度。用回归方程求出其质量浓度,换算得白芍总苷质量,计算载药量和包封率。

载药量=微囊中所含药物的质量/微囊的质量

包封率=微囊中所含药物的质量/投入的总药量 $\times$ 100%

2.3 制备工艺的考察

2.3.1 白芍总苷微囊的制备方法:称取适量的白芍总苷,加热溶于适量的 PVA 溶液中,然后加入到适量的 Span 石蜡溶液中,在一定的温度条件下搅拌至 PVA 均匀分散在 Span80 石蜡溶液中,然后再将戊二醛和 H_2SO_4 滴加到溶液中,固化一定的时间,抽滤,微囊用丙酮洗涤 2~3 次,真空干燥,得到淡棕色的粉末状固体微囊。

2.3.2 PVA 浓度对微囊制备的影响:分别考察了 4%、5%、6%、7%、8%、9% PVA 的成球情况,质量浓度低于 5% 高于 9% 的 PVA 不能成球,但低于 7% 的聚集和凝结特别严重,并且成球相对于 7% 的较小,见图 1。但质量浓度为 8% 的成球率太低,不利于微囊的制备,从成囊的实验情况可以得出选择 7% 的 PVA 最好。

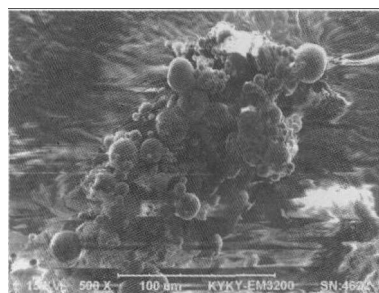


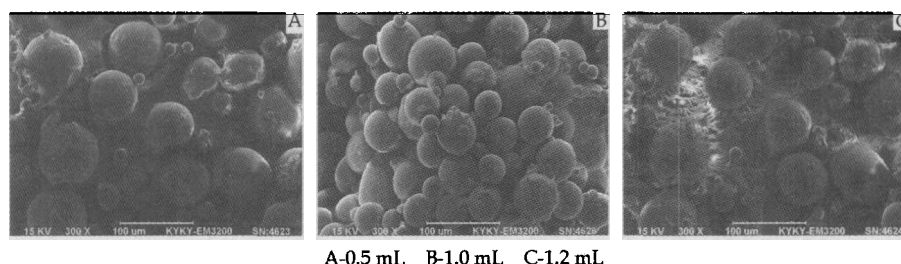
图1 7%PVA 制备的白芍总苷微囊的电镜图

Fig.1 Electron micrograph of TGP microcapsule prepared with 7% PVA

2.3.3 戊二醛体积对微囊制备的影响:在确定 PVA 为 7% 的条件下,考察了 25% 戊二醛体积为 0.5、1.0、1.2 mL 下的成囊情况,见图 2。可见戊二醛为 0.5 mL 时固化不完全,为 1.0 mL 还是有聚集状态的现象,当为 1.2 mL 时,固化完全,显示其强度达到了固化工艺的要求。

2.3.4 温度对微囊制备的影响:考察了 60、70、80、90 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的成囊情况,结果表明,在 60、80 $^{\circ}\text{C}$ 情况下,成囊率极低,且出现黏结在一起的情况。在 90 $^{\circ}\text{C}$ 下几乎不能成囊,70 $^{\circ}\text{C}$ 下成囊情况相对较好。

2.3.5 pH 值对成囊情况的影响:通过对 pH 值的研究,发现 pH 值的大小直接影响着戊二醛与 PVA 的交联作用,在 pH 值小于 5 时,基本不起交联作用,但可保持水溶液 PVA 的稳定性。为了加速 PVA 溶液与戊二醛的交联速度和增加 PVA 内部的交联,本实验采用调节 pH 值为 6.5,其交联度大大提高。同时调节其 pH 值接近中性,也不会对芍药总苷药性影响较大。



A-0.5 mL B-1.0 mL C-1.2 mL

图 2 不同戊二醛加入量的白芍总苷微囊的电镜图

Fig. 2 Electron micrographs of TGP microcapsule made with different glutaraldehyde volumes

2.3.6 白芍总苷微囊制备的最佳工艺:称取适量的白芍总苷,加热溶于 7% PVA 8 mL 溶液中,然后加入到 6% Span 80 石蜡 20 mL 溶液中,使含药的 PVA 均匀分散、悬浮在 Span 80 石蜡溶液中。在 70 °C 条件下搅拌至 PVA 均匀分散在 Span 80 石蜡溶液中,然后再将戊二醛和 H_2SO_4 滴加到溶液中,使其与悬浮的 PVA 颗粒表面发生交联、固化 50 min 后,抽滤,微囊用丙酮洗涤 2~3 次,真空干燥,得到淡棕色的粉末状固体微囊。取 3 批微囊分别测定包封率和载药量,见表 1。

表 1 优化工艺所得白芍总苷微囊的包封率和载药量

Table 1 Encapsulation efficiency and drug loading of TGP microcapsule by optimized methods

批号	包封率/%	载药量/%
1	69.23	6.79
2	71.48	7.54
3	72.52	7.63

2.4 白芍总苷微囊的扫描电镜图:精密称取适量 PVA 微囊,置研钵中干研至微囊呈粉末状,加少量 85% 乙醇溶液继续研磨成糊状,然后用 85% 乙醇溶液将糊状物转移至 100 mL 量瓶中,在超声仪中超声 30 min 后,加 85% 乙醇溶液至刻度,摇匀,滤过,收集续滤液。破碎前后的扫描电镜图片见图 3。破碎前的完整未经筛分的微囊呈球形,表面较光滑,基本无聚集和黏结,平均粒径为 10 μm 。单一破碎的一个囊壳,在囊壳的破损处,可以看出其囊壁厚度。

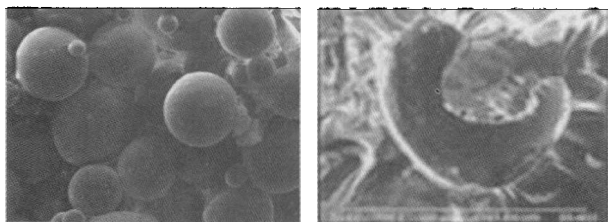


图 3 白芍总苷微囊的电镜图

Fig. 3 Electron micrographs of TGP microcapsule

2.5 体外释放性能的考察:将载药微囊约 50 mg 分别置于盛有 900 mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲液的溶出度仪转篮中,以 100 r/min 搅拌, $(37 \pm 0.5) ^\circ C$

条件下释药。在 20、40、60、80、100、160、220、280、340、400、460、520 min 时,精密吸取 5 mL 释放液,同时补加等量的缓冲液。将所取样液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按上述方法处理,在 227 nm 处测定吸光度,用回归方程求出其质量浓度,换算得白芍总苷的质量分数,并作体外释放曲线,见图 3。释药曲线前部分曲线陡直,释药迅速,150 min 时累计释药量即达 50%,稍有突释效应;后部分曲线平缓,释放较慢,分别按零级、一级、Higuichi 方程拟合释药行为,拟合方程分别为 $M_t = 0.0014t + 0.2143$, $r = 0.9302$; $\ln(1 - M_t) = -0.0058t + 0.1167$, $r = 0.9628$; $M_t = 0.0407t^{1/2} - 0.0027$, $r = 0.9916$,可见体外释放按 Higuichi 方程拟合最好。

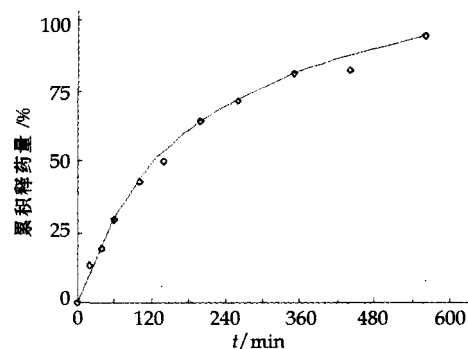


图 4 白芍总苷微囊的体外释放曲线

Fig. 4 In vitro release curve of TGP microcapsule

3 讨论

选用苯甲酸作为对照品^[1],因为白芍总苷中的成分芍药苷在紫外 230 nm 处有特征吸收峰,这是由该化合物中的苯甲酰基基团产生的,而苯甲酸也有同样的基团,根据紫外分光光度法的原理,两者有相同发色基团,且在紫外 230 nm 处都有特征吸收,可作为对照品来测定化合物。

参考文献报道^[1],75%、85%、95% 乙醇相对应的最大吸收波长分别为 228、227、226 nm。由于乙醇溶液中的水和乙醇在该波长段也有部分吸收,对照品溶液的最大吸收波长值有影响,分别讨论 75%、85%、95% 乙醇溶剂对标准曲线的影响,以苯

甲酸为标准,绘制标准曲线,以 85%乙醇配制的对照品溶液线性关系最好,故选用波长为 227 nm。

通过对 PVA 微囊制备的单因素考察,温度、搅拌时间、交联剂和 pH 值等因素则对成囊粒度影响比较大,从而优选出最佳的制备工艺,为 PVA 微囊的制备提供了进一步的参考依据。

从药物的释放曲线可以看出,白芍总苷微囊在 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中,达到了药物的缓释效果,可见白芍总苷微囊在体内生理环境条件下可以产生缓释、长效的药理作用。

采用悬浮界面交联法制备 PVA 微囊是一种具有很强临床应用潜力的生物材料,其生物相容性好、毒性小、强度高、操作简便且成本低廉,除了应用一般治疗之外,还可以通过包埋其他微生物病种来治疗更多的疾病^[7],因此 PVA 口服微囊的研制具有

更广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 吴英华,任凤莲,蔡小华,等.紫外分光光度法测定白芍总苷的含量[J].分析测试,2007,36(8):822-824.
- [2] 牟善松,屠美,丁珊,等.不同材料包裹的肝素缓释微囊生物相容性评价[J].材料导报,2003,17(5):79-81.
- [3] 高虹,俞耀庭,王满燕.以聚乙烯醇为载体制备微囊化脲酶基因工程菌的研究[J].离子交换与吸附,2003,19(6):540-546.
- [4] Prakash S, Chang T M S. Microencapsulated genetically engineered live *E. coli* DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats [J]. *Nature Med*, 1996, 2(8): 883-887.
- [5] 刘玉红,陈燕,易进海. HPLC 测定白芍总苷的含量[J]. 华西药理学杂志,2002,17(4):295.
- [6] Chen K C, Lin Y F. Immobilization of microorganisms with phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) gel [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16(1): 79-83.
- [7] 王满燕,俞耀庭, Chang T M S. 新型聚乙烯醇微囊的制备及其结构性能研究[J]. 高等学校化学学报,2005,26(5):865-869.

薄层扫描法评价六味地黄丸(胶囊)质量的模式识别研究

刘征辉^{1,2}, 孟宪生^{3*}, 叶挺祥^{1,2}, 赵洪芝^{1,2}, 程奕^{1,2}, 罗国安³

(1. 天津海世达检测技术有限公司, 天津 300381; 2. 天津市现代中药质量检验中心, 天津 300381; 3. 清华大学 化学系, 北京 100084)

摘要:目的 研究建立六味地黄丸(胶囊)的薄层扫描指纹图谱,为质量控制及科学评价提供简便可靠方法。方法 采用薄层色谱法建立了六味地黄丸(胶囊)的指纹图谱,收集不同厂家的 27 批产品进行了测定,并使用聚类分析法和主成分分析法对指纹图谱进行了模式识别研究。结果 27 个样本基本可分为 3 类,不同剂型的六味地黄丸薄层指纹图谱存在明显的差异。结论 此方法可较系统地用于六味地黄丸(胶囊)的质量控制。

关键词:六味地黄丸(胶囊);薄层扫描;指纹图谱;模式识别

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**B **文章编号:**0253-2670(2009)11-1743-04

六味地黄丸是滋补肾阴的经典名方,由宋代钱乙在《小儿药证直诀》中首创,由熟地黄、山茱萸(制)、牡丹皮、泽泻、山药、茯苓 6 味药材组成;用于肾阴亏损,头晕耳鸣,腰膝酸软,骨蒸潮热,盗汗遗精,消渴等症。《中国药典》2005 年版规定检测牡丹皮中的丹皮酚和山茱萸中马钱苷作为质量控制指标。虽然此方法简单易行,但尚不能全面控制六味地黄丸的内在质量。由于六味地黄丸的成分十分复杂,生产厂家众多,为全面评价其质量,需借助现代分析仪器和化学计量学方法进行研究,建立科学简便的评价方法并为临床药效评价提供科学依据。因

此本研究建立了六味地黄丸的薄层指纹图谱,并结合聚类分析法和主成分分析法等模式识别方法^[1-5],为六味地黄丸的质量评价提供一种更为直观、简便、高效的手段。

1 仪器与试剂

CAMAG Linomat 5 半自动点样仪;CAMAG ADC 2 薄层展开系统;CAMAG Reprostar 3 数码成像系统;CAMAG TLC Scanner 3 薄层色谱扫描仪;硅胶 G 高效板(20.0 cm×10.0 cm)(青岛海洋化工厂);其他试剂为分析纯。六味地黄丸各味药材品种经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定,符合《中国药典》2005

收稿日期:2009-02-19

基金项目:天津市科技发展计划项目(05SYSGX25000)

作者简介:刘征辉(1982—),男,河北保定人,研究实习生,主要从事中药质量控制及化学计量学方面的研究。

Tel: (022) 27950255 Fax: (022) 27950378 E-mail: liuzhenghui_2008@163.com

* 通讯作者 孟宪生 Tel: (010) 62772263 Fax: (010) 62781688 E-mail: mxsvvv@126.com