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

唐 勤，孙晓辉，陈 毫，徐晓玉，张继芬*

西南大学药学院 重庆市药效评价工程技术研究中心，重庆 400715

摘 要：目的 为提高姜黄素的口服吸收，研制姜黄素-磷脂复合物-壳聚糖微球，优选其制备方法和工艺。**方法** 分别采用离子凝聚法（滴入法、注入法）和乳化交联法制备姜黄素-磷脂复合物-壳聚糖微球，考察工艺条件对微球载药量和释药速率的影响，并对各方法制备的微球进行表征。**结果** DSC、IR 和 SEM 证实，3 种方法制得的微球均具有良好的球形，姜黄素仍以磷脂复合物的形式存在于壳聚糖微球中而并未解离。离子凝聚滴入法制备的微球载药量高达 5%以上，但粒径大，为（1.11±0.08）mm；无突释效应，累积释药量平稳增加。离子凝聚注入法制备的微球粒径最小，为（16.19±4.91）μm，载药量也达 5%以上；虽有较弱的突释效应，但释药最完全。乳化交联法制备的微球粒径居中，为（77.48±19.37）μm，但载药量仅在 1%左右，且突释效应强，释药量最低。磷脂复合物并没有改变壳聚糖微球的释药规律，各微球的药物释放均符合 Weibull 分布。**结论** 离子凝聚注入法更适合制备姜黄素-磷脂复合物-壳聚糖微球。

关键词：姜黄素；磷脂复合物；壳聚糖微球；离子凝聚法；乳化交联法

中图分类号：R283.6 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2012)12 - 2377 - 09

Effects of preparation methods and technologies on *in vitro* characteristics of curcumin-phospholipid complex-chitosan microspheres

TANG Qin, SUN Xiao-hui, CHEN Hao, XU Xiao-yu, ZHANG Ji-fen

The Engineering and Technology Center of Efficacy Evaluation in Chongqing, College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Objective In order to improve the bioavailability of curcumin (Cur) after ig administration, the curcumin-phospholipid complex-chitosan microspheres (Cur-PC-CMs) was developed and their preparation method and technology were optimized. **Methods** The Cur-PC-CMs were prepared by ion gel method [dropping (D) and injection (I) methods] and emulsion (E) cross-linking method. The effects of technological parameters on drug loading and releasing rate were compared. The microspheres prepared by different methods were characterized. **Results** SEM, DSC, and IR verified that all Cur-PC-CMs prepared by the three methods were spherical and Cur was distributed in CMs in the form of PC. The drug loading of Cur-PC-CMs prepared by ion gel method (dropping method) was over 5%, but the size was as large as (1.11 ± 0.08) mm with no bursting release and the accumulative release amount increased smoothly. The smallest microspheres were prepared by ion gel method (injection method), the size was (16.19 ± 4.91) μm and drug loading was also over 5%. The Cur could be released totally with a weak bursting release. The microspheres prepared by emulsion cross-linking method had middle size with (77.48 ± 19.37) μm, while the drug loading was only about 1%. The bursting release was strong but the release amount was the lowest. The release principals of CMs were not changed with the existence of PC and all the drug release fitted to the Weibull distribution. **Conclusion** The ion gel method (injection method) is more suitable to prepare PC in CMs loading Cur than the other methods.

Key words: curcumin (Cur); phospholipid complex (PC); chitosan microspheres (CMs); ion gel method; emulsion cross-linking method

姜黄素（curcumin，Cur）是姜科姜黄属姜黄 *Curcumae Longae Rhizoma*、莪术 *Curcumae Rhizoma*、郁金 *Curcumae Radix* 等药材中提取的一种天然有效成分，具有抗炎、抗菌、抗肝损伤、抗肿瘤、清除自由基、调血脂、抗动脉粥样硬化等多种药理活性，且安全性高、毒副作用小[1-3]。然而，姜黄素在酸性

收稿日期：2012-04-05

基金项目：重庆市自然科学基金（csct2011jjA0324）；重庆市卫生局中医药科技研究计划项目（2010-2-144）

作者简介：唐 勤（1988—），女，硕士研究生，研究方向为中药新药研发。E-mail: tangqin2010@yeah.net

***通讯作者** 张继芬 Tel: (023)68251225 13452138166 E-mail: zhjf@swu.edu.cn

网络出版时间：2012-09-28 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120928.1205.001.html

和中性条件下难溶，碱性条件下易降解，对光、热、强酸、强碱均不稳定，口服后大部分以原形排出体外（约 89%），生物利用度极低，不足 1%[4-6]。这给姜黄素的临床应用带来了很大难度。因此，有必要进一步研制开发姜黄素的新剂型。

磷脂复合物是药物与磷脂按 1∶1 或 1∶2 的比例，以共价键结合而成的一种药物载体，其磷脂能促进药物更好地从亲水环境转移通过亲脂环境的肠上皮细胞膜进入细胞，最后到达血液。已有研究证实，磷脂复合物能将姜黄素的口服生物利用度提高 3.5 倍[7]。壳聚糖是一种天然带正电荷的多糖类高分子物质，具有良好的生物黏附性，可延长药物在吸收部位的滞留时间，同时其正电荷可与生物膜的负电荷结合，打开消化道上皮间的紧密连接，促进药物的口服吸收[8-9]。

鉴于姜黄素的口服生物利用度极低，磷脂复合物[7]、自微乳给药系统[10]、壳聚糖纳米粒[11]、PLGA 纳米粒[12]等单一载体虽在一定程度上可提高生物利用度，但往往仍难以达到临床要求。本课题组前期研究已经证实，将磷脂类载体（脂质体）包裹于壳聚糖微球中，形成的载脂质体壳聚糖微球，可融合磷脂和壳聚糖的双重促吸收优势，较单一载体能更好的促进药物的口服吸收[13]。但脂质体药载比大，制得的载脂质体壳聚糖微球载药量低，不足 1%。

本研究拟构建一种磷脂复合物-壳聚糖微球（PC-CM）新型药物载体，能融合磷脂复合物和壳聚糖的双重促吸收作用，较单一载体更能显著提高姜黄素的口服吸收。通过考察微球制备方法和工艺对粒径、载药量、释药速率和微观结构的影响，制备出了载药量高于 5%、结构完整、释药较完全的姜黄素-磷脂复合物-壳聚糖微球（Cur-PC-CM），为其体内研究奠定了基础。

1 仪器与材料

梅特勒-托利多 EL2046 型电子天平（上海精天）；D101—S 型磁力搅拌器（江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司）；超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；UV3100 紫外（天美科技）；ZS90 纳米粒度及 Zeta 电位仪、Mastersizer 2000 激光粒度分析仪（英国 Malvern 公司）；200PC 热分析仪（德国 Netzsch 公司）；Spectrum GX 红外光谱分析仪（美国 PE 公司）；D800—LS 智能溶出试验仪（天大天发科技有限公司）。

姜黄素（质量分数＞95%，杭州绿天生物科技有限公司，批号 080321）；大豆磷脂（PC，质量分数＞90%，上海太伟药业有限公司，批号 100819）；胆固醇（广州天马精细化工厂，批号 050531）；壳聚糖（脱乙酰度 93.2%，黏度 300 mPa·s，金湖甲壳制品有限公司）；其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 姜黄素的测定[14]

2.1.1 紫外扫描 配制一定质量浓度的壳聚糖溶液、大豆磷脂溶液和姜黄素溶液，分别在 200～600 nm 进行紫外扫描，结果可知，姜黄素在 420 nm 处有最大吸收，而壳聚糖、大豆磷脂在 370～500 nm 内均无吸收，故采用分光光度法于 420 nm 处测定姜黄素的量。

2.1.2 线性关系考察 分别以甲醇和 0.5%聚山梨酯 80 为溶剂制备回归曲线。精密称取姜黄素 3.00 mg，定容至 100 mL，得质量浓度为 30.0 μg/mL 的储备液。精密吸取 2.0、1.0、0.5、0.1、0.05 mL 储备液，定容至 10 mL，得不同质量浓度的姜黄素对照品溶液，420 nm 测定吸光度（A）值。姜黄素在 0.15～6.00 μg/mL，其 A 值与甲醇溶液或 0.5%聚山梨酯 80 溶液的质量浓度均呈线性关系，回归方程分别为 A＝0.159 8 C＋0.001 6，r＝0.999 9；A＝0.148 9 C＋0.002 0，r＝0.999 9。

2.2 姜黄素-磷脂复合物（Cur-PC）的制备

采用改良的溶剂挥发法制备 Cur-PC：将姜黄素与 PC 按 1∶1 的物质的量比溶于适量无水乙醇中，50 ℃水浴搅拌 2 h 后匀速注入到 2%醋酸溶液中，继续水浴搅拌除尽乙醇，探头超声，即得。4 ℃，30 000 r/min 离心 2 h 分离游离药物，计算包封率，得 Cur-PC 分散液的平均包封率为（90.81±1.32）%（n＝3）。将水分散液稀释后直接用纳米粒度及 Zeta 电位仪测定粒径和 Zeta 电位，得 Cur-PC 分散液的平均粒径为（91.69±12.261）nm（n＝3），平均 Zeta 电位为（−13.73±4.37）mV（n＝3）。

包封率＝(投药量－游离药物量) / 投药量

2.3 Cur-PC-CM 的制备

2.3.1 离子凝聚滴入法 Cur-PC 分散液中加入一定量的壳聚糖，溶解后慢速搅拌下滴入到一定质量浓度的三聚磷酸钠（TPP）溶液中（针头在液面以上）。滴加完毕后，静置固化一定时间，收集微球，37 ℃干燥，得 Cur-PC-CM_D。工艺条件见表 1。

2.3.2 乳化交联法 Cur-PC 分散液中加入一定量的壳聚糖，溶解后作水相。水相逐滴加入到含 2%乳化

表 1 离子凝聚滴入法的制备工艺和载药量 (n=3)

Table 1 Technologies and drug loading of microspheres prepared by ion gel dropping method (n=3)

试验号	Cur-PC / (mg·mL^{-1})	壳聚糖 / %	TPP / %	载药量 / %
F0	1.33	2.0	3.0	3.281±0.499
F1	4.00	3.0	3.0	5.800±1.127
F2	1.33	3.0	3.0	2.083±0.220
F3	0.44	3.0	3.0	0.845±0.052
F4	0.33	3.0	3.0	0.671±0.057
F5	1.33	2.0	3.0	3.000±0.170
F6	1.33	2.5	3.0	2.459±0.190
F7	1.33	3.5	3.0	2.045±0.173
F8	4.00	3.0	1.5	5.819±0.051
F9	4.00	3.0	6.0	6.199±0.306
F10	4.00	3.0	9.0	5.280±0.267

F0 为 Cur-CM$_D$；F1～F4 比较 Cur-PC 质量浓度的影响；F2、F5～F7 比较壳聚糖质量浓度的影响；F1、F8～F10 比较 TPP 质量浓度的影响

F0: Cur-CM$_D$; the effect of Cur-PC concentration was compared by F1—F4; the effect of chitosan concentration was compared by F2 and F5—F7; the effect of TPP concentration was compared by F1 and F8—F10

剂（聚山梨酯 80-司盘 80 1∶1）的正己烷-二甲硅油（1∶1）油相中，搅拌乳化 1 h 后，逐滴加入 25%戊二醛，继续搅拌 30 min，静置，抽滤收集微球，用少量纯化水洗涤后 37 ℃干燥，得 Cur-PC-CM$_E$。工艺条件见表 2。

2.3.3 离子凝聚注入法 Cur-PC 分散液中加入一定量的壳聚糖，溶解后高速搅拌下注入到一定浓度的 TPP 溶液中（针头在液面以下）。注入完毕后，继续搅拌一定时间，抽滤收集微球，用少量纯化水洗涤后 37 ℃干燥，得 Cur-PC-CM$_I$。工艺条件见表 3。

用 Cur 直接分散于 2%醋酸中的混悬液代替 Cur-PC 分散液，同法操作，可制备姜黄素壳聚糖微球（Cur-CM）。

2.4 微球的制备方法比较

2.4.1 微球的载药量 取微球适量研细，精密称取细粉适量（W），加 0.1 mol/L 盐酸 5 mL，探头超声。立即取超声后的混悬液 1 mL，甲醇定容至 10 mL。样品用 0.45 μm 微孔滤膜滤过后，按“2.1”项方法测定药物的量（C），计算载药量（DL）。

$$DL = C \times 10 \times 5 / W$$

3 种方法制备 Cur-PC-CM 的工艺条件和载药量分别见表 1～3。整体而言，Cur-PC-CM$_E$ 载药量明显低于 Cur-PC-CM$_D$ 和 Cur-PC-CM$_I$。降低 Cur-PC 的质量浓度或增加壳聚糖的质量浓度，载药量降低，且载药量与 Cur-PC 和壳聚糖的质量浓度比呈线性关系（F2～F7），线性方程：Cur-PC-CM$_D$ Y=4.190 9

表 2 乳化交联法的制备工艺和载药量 (n=3)

Table 2 Technologies and drug loading of microspheres prepared by emulsion cross-linking method (n=3)

试验号	Cur-PC / (mg·mL^{-1})	壳聚糖 /%	25%戊二醛 / (mL·mg^{-1})	载药量 / %
F0	1.33	2.0	1.2	0.529±0.043
F1	2.67	2.0	1.2	0.996±0.074
F2	1.33	2.0	1.2	0.503±0.007
F3	0.44	2.0	1.2	0.413±0.014
F4	0.33	2.0	1.2	0.352±0.001
F5	1.33	1.0	1.2	0.707±0.012
F6	1.33	1.5	1.2	0.581±0.016
F7	1.33	2.5	1.2	0.498±0.024
F8	2.67	2.0	0.4	1.651±0.233
F9	2.67	2.0	1.6	0.546±0.040
F10	2.67	2.0	2.4	0.542±0.021

F0 为 Cur-CM$_E$；F1～F4 比较 Cur-PC 质量浓度的影响；F2、F5～F7 比较壳聚糖质量浓度的影响；F1、F8～F10 比较交联剂戊二醛用量的影响

F0: Cur-CM$_E$; the effect of Cur-PC concentration was compared by F1—F4; the effect of chitosan concentration was compared by F2 and F5—F7; the effect of glutaral concentration was compared by F1 and F8—F10

表 3 离子凝聚注入法的制备工艺和载药量 (n=3)

Table 3 Technologies and drug loading of microspheres prepared by ion gel injection method (n=3)

试验号	Cur-PC / (mg·mL^{-1})	壳聚糖 / %	TPP / %	载药量 / %
F0	0.133	0.2	0.3	5.386±0.482
F1	0.400	0.2	0.3	8.317±0.355
F2	0.200	0.2	0.3	4.677±0.133
F3	0.133	0.2	0.3	2.867±0.023
F4	0.067	0.2	0.3	1.600±0.131
F5	0.133	0.1	0.3	5.108±0.129
F6	0.133	0.5	0.3	1.293±0.055
F7	0.133	1.0	0.3	0.611±0.008
F8	0.200	0.5	0.3	1.912±0.029
F9	0.200	0.5	1.0	1.927±0.106
F10	0.200	0.5	1.5	1.993±0.142
F11	0.200	0.5	2.0	1.874±0.014

F0 为 Cur-CM$_I$；F1～F4 比较 Cur-PC 质量浓度的影响；F3、F5～F7 比较壳聚糖质量浓度的影响；F8～F11 为比较 TPP 质量浓度的影响

F0: Cur-CM$_I$; the effect of Cur-PC concentration was compared by F1—F4; the effect of chitosan concentration was compared by F3 and F5—F7; the effect of TPP concentration was compared by F8—F11

X+0.259 6（r=0.994 6）；Cur-PC-CM$_E$ Y=0.284 2 X+0.329（r=0.989 9）；Cur-PC-CM$_I$ Y=4.003 2 X+0.233 7（r=0.994 6）。就离子凝聚法而言，无论是滴入还是注入，TPP 质量浓度对载药量的影响都很小，仅在较高质量浓度时载药量略有降低；而乳化交联法中，减少戊二醛的用量，载药量明显升高。

2.4.2 微球的粒径 随机取 Cur-PC-CM$_D$ 50 粒，用游标卡尺测定其粒径，计算平均粒径为（1.11±0.08）mm；Cur-PC-CM$_E$ 和 Cur-PC-CM$_I$ 则是用水分散后，激光粒度分析仪测定粒径，Cur-PC-CM$_E$ 的平均粒径为（77.48±19.37）μm，Cur-PC-CM$_I$ 的平均粒径为（16.19±4.91）μm。

2.4.3 微球的形态 扫描电镜观察微球表面形态，结果见图 1。由图可知，3 种方法制备的微球均具有完整的球形，但表面结构存在差异：Cur-PC-CM$_D$ 表面有很多致密的褶皱；Cur-PC-CM$_E$ 表面不够光滑，有较多黏附物；而 Cur-PC-CM$_I$ 表面疏松多孔。

2.4.4 差热分析（DSC） 各微球研成细粉后进行 DSC 分析。工作条件：升温范围 30～300 ℃；升温速率 30 ℃/min；参比物为空铝坩埚；气氛为氮气（质量分数为 99.99%）。各方法制备的 Cur-PC-CM 的 DSC 图谱见图 2。从 DSC 图谱可以看出，姜黄素在 176.7 ℃时有明显的吸热峰。图 2-A 中，姜黄素-壳聚糖微球（Cur-CM）与机械混合物分别在 166.5、167.1 ℃有微弱的吸热峰；图 2-C 中，Cur-CM 与机械混合物分别在 170.5、160.0 ℃有微弱的吸热峰，较姜黄素原料药略有降低；而图 2-A、C 中的 Cur-PC-CM 在相应温度处均无吸热峰出现。图 2-B 显示，乳化交联法制备的微球，仅机械混合物在 182 ℃有微弱的吸热峰，而 Cur-CM 和 Cur-PC-CM 在相应温

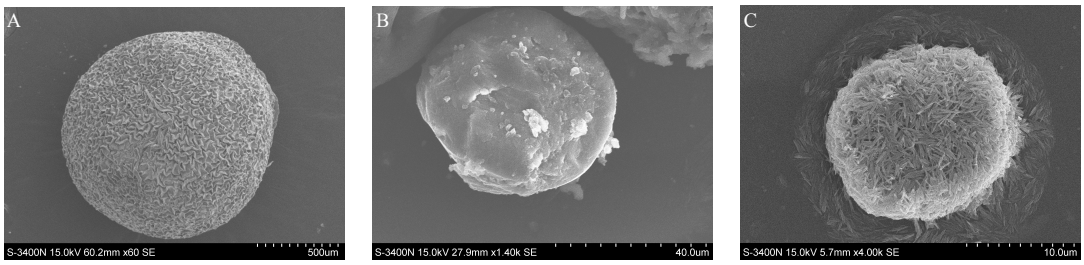
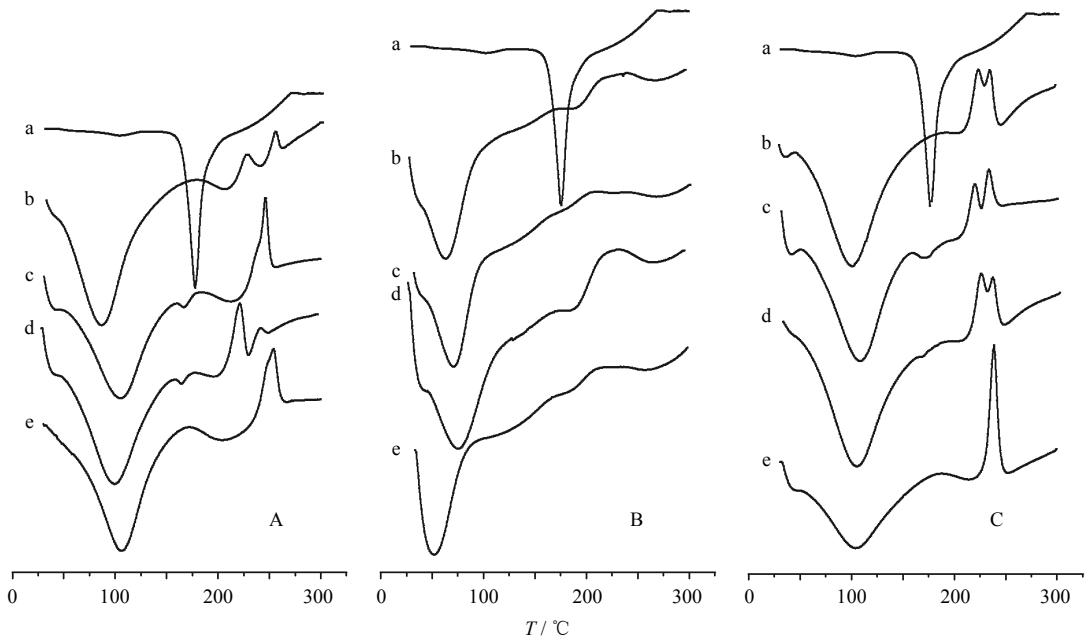


图 1 离子凝聚滴入法 (A)、乳化交联法 (B) 和离子凝聚注入法 (C) 制备的各微球的扫描电镜图谱

Fig. 1 SEM of microspheres prepared by ion gel dropping (A), emulsion cross-linking (B), and ion gel injection (C) methods



a-姜黄素 b-空白微球 c-姜黄素-壳聚糖微球 d-空白微球与姜黄素的机械混合物 e-姜黄素-磷脂复合物-壳聚糖微球

a-Cur b-blank microspheres c-Cur-CMs d-mixture of blank microspheres and Cur e-Cur-PC-CMs

图 2 离子凝聚滴入法 (A)、乳化交联法 (B) 和离子凝聚注入法 (C) 制备的各微球的 DSC 图谱

Fig. 2 DSC of microspheres prepared by ion gel dropping (A), emulsion cross-linking (B), and ion gel injection (C) methods

度处均无吸热峰出现。

2.4.5 红外光谱（IR）分析 各微球研成细粉后进行 IR 分析。光谱采集：室温，扫描范围 4 000～400 cm^{-1}，分辨率 4 cm^{-1}，扫描次数 50 次。各方法制备的 Cur-PC-CM 的 IR 图谱见图 3，主要的光谱数据见表 4。

图 3-A 中，空白微球、Cur-CM 和机械混合物在 2 360 cm^{-1} 附近和 1 631、1 603 cm^{-1} 附近均有吸收峰，且强度相似，与 Cur-PC-CM_D 有明显差别，后者在 2 360、1 603 cm^{-1} 附近无吸收峰；Cur-CM 在 1 511.88、1 276.42 cm^{-1}，机械混合物在 1 276.28 cm^{-1} 有姜黄素的特征吸收峰，而空白微球和 Cur-PC-CM_D 均无。由此证实，Cur-CM 中有姜黄素原药存在，而在 Cur-PC-CM_D 中，姜黄素未从磷脂复合物中解离出来。

图 3-B 中，空白微球、Cur-CM 和机械混合物在 2 927、2 868、1 512 cm^{-1} 附近均有吸收峰，且强度相似，而 Cur-PC-CM_E 仅在 2 926 cm^{-1} 有吸收峰，2 868、1 512 cm^{-1} 处吸收峰消失；Cur-CM 在 1 401.49 cm^{-1} 有姜黄素的吸收峰（1 400.61 cm^{-1}），机械混合物出现在 1 404.26 cm^{-1} 处，向高波数移动了 3.5 个单位，而空白微球和 Cur-PC-CM_E 均无。由此证实，在 Cur-PC-CM_E 中，姜黄素未从磷脂复合物中解离出来，而是以复合物的形式分布于壳聚糖微球中。

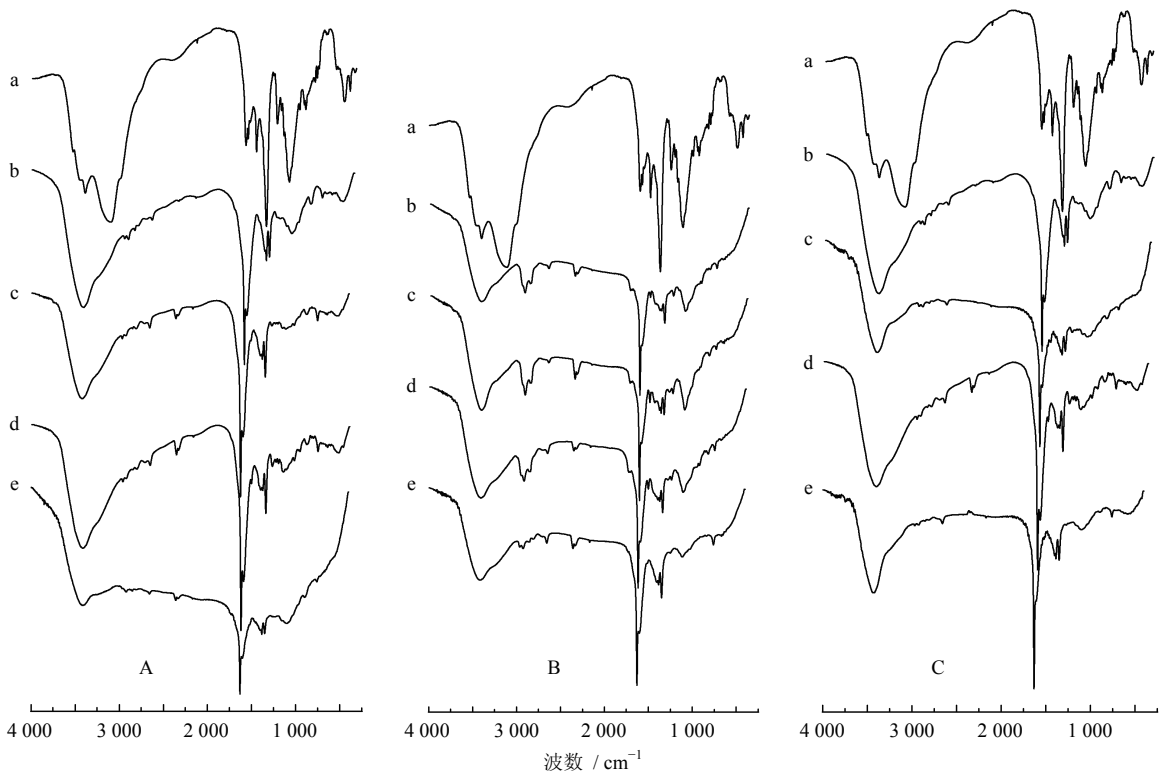
图 3-C 各样品的吸收峰位和强度与图 3-A 无明显差别，说明离子凝聚法制备 Cur-PC-CM，注入或是滴入对微球中各组分间的作用无明显影响。

2.5 Cur-PC-CM 的体外释放

2.5.1 累积释药率的测定 称取一定量（M）的微球，置于 10 mL 0.5%聚山梨酯 80 中，37 ℃恒温振荡，于 0.5、1、2、3、5、8、10、12、24、32、48 h 取出，3 000 r/min 离心 10 min，更换全部释放介质。直接测定介质中药物的量（C_n），必要时可用 0.5%聚山梨酯 80 稀释，按下式计算各时间点的累积释药率（Q_n）。

$$Q_n=(\sum_{i=0.5}^{n}\times 10C_n)/(M\times \mathrm{DL})$$

2.5.2 Cur-PC 质量浓度对姜黄素释放的影响 从图 4 可以看出：（1）整体而言，Cur-PC-CM_I 的释药速率快于 Cur-PC-CM_D，快于 Cur-PC-CM_E；Cur-PC-



a-姜黄素 b-空白微球 c-姜黄素壳聚糖微球 d-空白微球与姜黄素的机械混合物 e-姜黄素-磷脂复合物-壳聚糖微球
a-Cur b-blank microspheres c-Cur-CMs d-mixture of blank microspheres and Cur e-Cur-PC-CMs

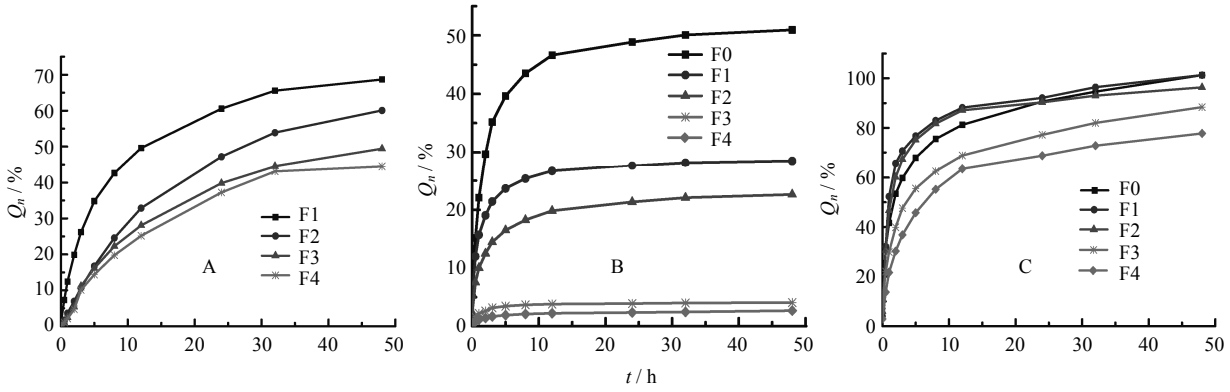
图 3 离子凝聚滴入法 (A)、乳化交联法 (B) 和离子凝聚注入法 (C) 制备的各微球的 IR 图谱

Fig. 3 IR spectra of microspheres prepared by ion gel dropping (A), emulsion cross-linking (B), and ion gel injection (C) methods

表 4 各方法制备的 Cur-PC-CMs 的 IR 图谱数据

Table 4 IR spectral data of Cur-PC-CMs prepared by different methods

样 品	波数 / cm^{-1}		
	离子凝聚滴入法	乳化交联法	离子凝聚注入法
姜黄素	3 412.73、3 129.30、1 626.98、1 602.69、1 510.09、1 400.61、1 278.04、1 232.72、1 204.07、1 145.20、1 209.47		
空白微球	3 424.85、2 659.20、2 360.17、1 631.07、1 604.54、1 385.00、1 350.43、1 100.59	3 420.10、2 928.38、2 868.91、2 659.18、2 360.58、1 630.93、1 511.67、1 384.76、1 350.43、1 250.21、1 115.95	3 424.58、2 659.21、2 360.07、1 631.01、1 604.24、1 385.41、1 350.47、1 100.46
空白微球和姜黄素的机械混合物	3 420.69、2 659.38、2 360.86、1 630.84、1 602.53、1 511.88、1 407.57、1 385.34、1 349.70、1 276.42、1 233.41、1 206.28、1 150.69	3 419.06、2 927.43、2 867.88、2 659.82、2 359.64、1 630.58、1 513.20、1 401.49、1 384.73、1 350.50、1 250.47、1 118.51	3 420.61、2 659.28、2 360.12、1 630.80、1 602.33、1 511.81、1 407.54、1 385.04、1 349.20、1 276.12、1 233.47、1 206.27、1 150.60
Cur-CM	3 421.25、2 658.58、2 360.75、1 630.99、1 603.79、1 385.11、1 350.09、1 276.28、1 117.28	3 422.07、2 927.08、2 869.23、2 659.03、2 360.65、1 630.94、1 512.05、1 404.26、1 384.73、1 350.64、1 250.11、1 117.35	3 425.33、2 658.60、1 631.09、1 605.45、1 385.19、1 349.87、1 272.61、1 106.25
Cur-PC-CM	3 422.71、2 659.63、1 631.17、1 399.93、1 385.14、1 350.22、1 098.98	3 417.93、2 926.82、2 657.64、2 359.22、1 631.04、1 384.84、1 350.65、1 113.74	3 423.57、2 658.71、1 631.12、1 399.88、1 385.20、1 349.96、1 094.98



A-离子凝聚滴入法 B-乳化交联法 C-离子凝聚注入法

A-ion gel dropping method B-emulsion cross-linking method C-ion gel injection method

图 4 Cur-PC 质量浓度对姜黄素释放的影响 (n=3)

Fig. 4 Effects of Cur-PC concentration on Cur releasing (n=3)

CM_D 的释药呈平稳递增趋势，而 Cur-PC-CM_I 12 h 后的释药缓慢，Cur-PC-CM_E 12 h 后几乎不再释药；（2）3 种方法下，减小 Cur-PC 的质量浓度，姜黄素的释放速率均减慢；（3）Cur-PC 质量浓度对姜黄素释放的影响在乳化交联法中体现最明显，Cur-PC 质量浓度从 2.67 mg/mL 降至 0.33 mg/mL 时，48 h 的累积释药率（Q_{48}）从 28.50%降至 4.06%；就离子凝聚法而言，其影响相对小些，滴入法 Cur-PC 质量浓度从 4.00 mg/mL 降至 0.33 mg/mL 时，Q_{48} 从 68.67%降至 49.42%，注入法 Cur-PC 质量浓度从 0.400 mg/mL 降至 0.067 mg/mL 时，Q_{48} 从 101.29%降至 77.73%；（4）与直接将药物载入壳聚糖微球中比较，先将药物制备成磷脂复合物再载入壳聚糖微球中，药物的释放速率减慢：乳化交联法非常明显，2、12、48 h 的 Q_n 分别从 29.71%降至 12.48%，从 46.62%降至 19.82%，从 50.94%降至 22.62%（比较 F0 和 F2）；离子凝聚法（注入法）也有所降低，2、12、48 h 的 Q_n 分别从 53.40%降至 39.93%，从

81.26%降至 68.78%，从 101.28%降至 88.35%（比较 F0 和 F3）。

2.5.3 壳聚糖质量浓度对姜黄素释放的影响 从图 5 可以看出：（1）整体而言，Cur-PC-CM_I 的释药速率快于 Cur-PC-CM_D 和 Cur-PC-CM_E，且 Cur-PC-CM_I 和 Cur-PC-CM_E 的突释效应很强；（2）3 种方法下，增加壳聚糖的质量浓度，姜黄素的释放速率均减慢；（3）在允许的范围内，壳聚糖质量浓度对释放速率的影响程度与制备方法有关：Cur-PC-CM_E 的壳聚糖质量浓度从 1.0%增至 2.5%，Q_{48} 从 36.23%降至 13.54%；Cur-PC-CM_D 的壳聚糖质量浓度从 2.0%增至 3.5%，Q_{48} 从 73.00%降至 56.85%；Cur-PC-CM_I 的壳聚糖质量浓度从 0.1%增至 1.0%，Q_{48} 从 98.26%降至 68.23%；（4）就离子凝聚法（滴入法）而言，药物制备成磷脂复合物后，从壳聚糖微球中的释放速率仅略有减慢：2、12、48 h 的 Q_n 分别从 18.10%降至 16.86%，从 48.40%降至 45.92%，从 77.52%降至 73.00%（比较 F0 和 F5）。

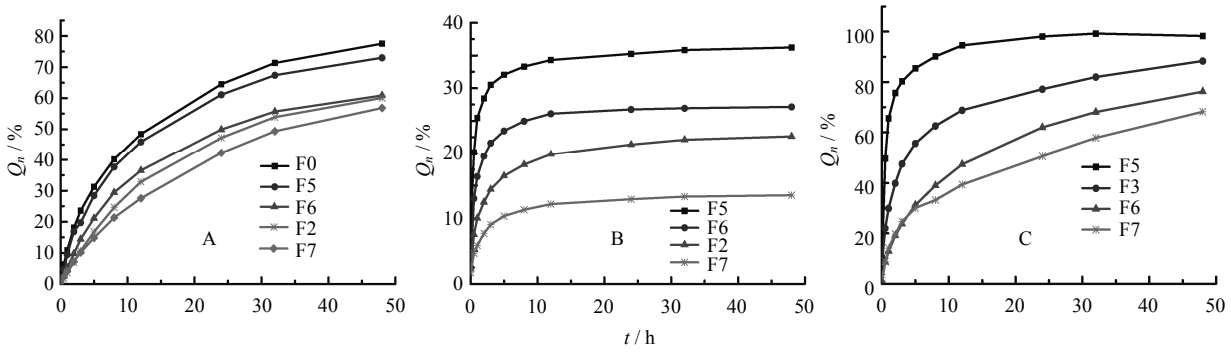
2.5.4 固化剂质量浓度/用量对姜黄素释放的影响 从图 6 中可以看出，离子凝聚法制备微球，固化剂 TPP 的质量浓度对药物的释放影响较小；而对乳化交联法而言，增加固化剂戊二醛的用量，姜黄素的释放速率减慢。

2.5.5 释放曲线拟合 分别用 Zero-order 方程、First-order 方程、Higuchi 方程、Ritger-Peppas 方程、Hixson-Crowell 方程、Baker-Lonsdale 方程和 Weibull 分布对 Cur-CMs 和 Cur-PC-CMs 的释放曲线进行拟合，各释放曲线均最符合 Weibull 分布，拟合方程见表 5。

3 讨论

3.1 载药量

就制备方法而言，离子凝聚法制备的 Cur-PC-CM 载药量明显高于乳化交联法，前者可高达 5%以上，后者仅约 1%。就工艺条件而言，磷脂复合物与壳聚糖的用量比对载药量有很大影响，且呈线性关系。滴入法的线性方程与注入法相近，说明滴入或是注入对载药量影响不大。固化剂 TPP 浓度对载

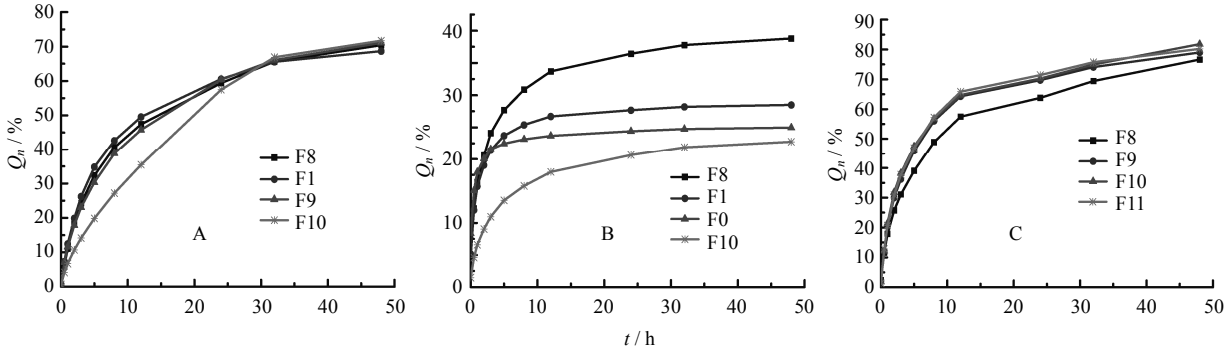


A-离子凝聚滴入法 B-乳化交联法 C-离子凝聚注入法

A-ion gel dropping method B-emulsion cross-linking method C-ion gel injection method

图 5 壳聚糖浓度对姜黄素释放的影响 (n=3)

Fig. 5 Effects of chitosan concentration on Cur releasing (n=3)



A-离子凝聚滴入法 B-乳化交联法 C-离子凝聚注入法

A-ion gel dropping method B-emulsion cross-linking method C-ion gel injection method

图 6 固化剂质量浓度和用量对姜黄素释放的影响 (n=3)

Fig. 6 Effects of amount and concentration of curing agent on Cur releasing (n=3)

表 5 各微球体外释放曲线的拟合方程

Table 5 Fitting equations of *in vitro* releasing curves of microspheres

制备方法	模 型	Cur-CMs	Cur-PC-CMs
离子凝聚	Zero-order	F0：$F=16.368+1.569\,t$，$r=0.910\,7$	F5：$F=14.666+1.503\,t$，$r=0.911\,1$
滴入法	First-order	F0：$\ln(1-Q)=-0.040\,t-0.095\,2$，$r=0.976\,2$	F5：$\ln(1-Q)=-0.035\,t-0.086\,5$，$r=0.972\,5$
	Higuchi	F0：$Q=1.969+12.021\,t^{1/2}$，$r=0.988\,3$	F5：$Q=0.889+11.508\,t^{1/2}$，$r=0.987\,2$
	Ritger-Peppas	F0：$F=14.921\,t^{0.443}$，$r=0.991\,5$	F5：$F=13.385\,t^{0.458}$，$r=0.989\,3$
	Hixson-Crowell	F0：$(1-Q)^{1/3}=0.961-0.01\,t$，$r=0.960\,5$	F5：$(1-Q)^{1/3}=0.964\,5-0.090\,t$，$r=0.970\,8$
	Baker-Lonsdale	F0：$3/2\,[1-(1-Q)^{2/3}]-Q=0.004\,t+0.002$，$r=0.997\,2$	F5：$3/2[1-(1-Q)^{2/3}]-Q=0.003\,t-0.001$，$r=0.991\,0$
	Weibul	F0：$\ln[-\ln(1-Q)]=0.693\,\ln t-2.137$，$r=0.997\,5$	F5：$\ln[-\ln(1-Q)]=0.711\,\ln t-2.318$，$r=0.994\,5$
乳化交联法	Zero-order	F0：$F=26.596+0.703\,t$，$r=0.687\,7$	F2：$F=11.283+0.319\,t$，$r=0.732\,7$
	First-order	F0：$\ln(1-Q)=-0.014\,t-0.288\,7$，$r=0.733\,3$	F2：$\ln(1-Q)=-0.004\,t-1.116$，$r=0.746\,1$
	Higuchi	F0：$Q=18.250+6.062\,t^{1/2}$，$r=0.863\,4$	F2：$Q=7.652+2.695\,t^{1/2}$，$r=0.894\,5$
	Ritger-Peppas	F0：$F=25.852\,t^{0.199}$，$r=0.950\,6$	F2：$F=11.045\,t^{0.204}$，$r=0.972\,8$
	Hixson-Crowell	F0：$(1-Q)^{1/3}=0.898-0.004\,t$，$r=0.717\,6$	F2：$(1-Q)^{1/3}=0.969-0.001\,t$，$r=0.741\,6$
	Baker-Lonsdale	F0：$3/2[1-(1-Q)^{2/3}]-Q=0.002\,t+0.009$，$r=0.793\,4$	F2：$3/2[1-(1-Q)^{2/3}]-Q=0.001\,t+0.006$，$r=0.811\,4$
	Weibul	F0：$\ln[-\ln(1-Q)]=0.307\,\ln t-1.335$，$r=0.951\,3$	F2：$\ln[-\ln(1-Q)]=0.256\,\ln t-2.222$，$r=0.973\,6$
离子凝聚	Zero-order	F0：$F=46.054+1.466\,t$，$r=0.774\,5$	F3：$F=36.025+1.373\,t$，$r=0.816\,1$
注入法	First-order	F0：$\ln(1-Q)=-0.304\,t$，$r=0.912\,1$	F3：$\ln(1-Q)=-0.073\,t-0.269$，$r=0.935\,0$
	Higuchi	F0：$Q=30.160+12.103\,t^{1/2}$，$r=0.918\,6$	F3：$Q=21.731+11.123\,t^{1/2}$，$r=0.950\,2$
	Ritger-Peppas	F0：$F=45.249\,t^{0.218}$，$r=0.987\,3$	F3：$F=34.151\,t^{0.257}$，$r=0.984\,3$
	Hixson-Crowell	F0：$(1-Q)^{1/3}=0.882-0.027\,t$，$r=0.926\,3$	F3：$(1-Q)^{1/3}=0.903-0.016\,t$，$r=0.905\,8$
	Baker-Lonsdale	F0：$3/2[1-(1-Q)^{2/3}]-Q=0.01\,t+0.019$，$r=0.914\,2$	F3：$3/2[1-(1-Q)^{2/3}]-Q=0.009\,t+0.003$，$r=0.956\,5$
	Weibul	F0：$\ln[-\ln(1-Q)]=0.474\,\ln t-0.625$，$r=0.999\,0$	F3：$\ln[-\ln(1-Q)]=0.458\,\ln t-1.008$，$r=0.997\,5$

药量的影响很小而戊二醛用量对载药量影响较大，说明固化方式是影响壳聚糖微球载药量的另一重要因素。

在药物质量浓度和其他条件相同的情况下，离子凝聚滴入法和乳化交联法制备的 Cur-PC-CM 载药量略低于 Cur-CM，离子凝聚注入法制备的 Cur-PC-CM 则是明显低于 Cur-CM。

3.2 结构表征

3 种方法制备的微球粒径差异很大：Cur-PC-CM_D、Cur-PC-CM_E 和 Cur-PC-CM_I 的粒径分别为 1.13 mm、77.48 μm 和 16.19 μm，但均为完整的球形。扫描电镜结果显示，3 种方法制备的微球均具有完整的球形，但表面结构存在差异：Cur-PC-CM_D 表面有很多致密的褶皱，这是由于干燥过程中水分蒸发，微球表面收缩而成，但未有缺损状况。Cur-PC-CM_E 表面不够光滑，凹凸不平，且有较多黏附物。Cur-PC-CM_I 表面可见到 TPP 细小结晶与壳聚糖交联固化而形成的疏松多孔结构。正是这种结构上的差异，导致了释药速率的不同。

DSC 和 IR 图谱显示，制备方法对姜黄素在壳聚糖微球中的存在形式可能有影响：离子凝聚法制备的 Cur-CM，能看到较明显的姜黄素吸收峰，说明姜黄素仍以微晶状态分布于壳聚糖微球中；而乳化交联法制备的 Cur-CM，姜黄素吸收峰消失，说明该制备方法可能改变了姜黄素的形态，以无定形状态存在。3 种方法制备的 Cur-PC-CM 的 DSC 和

IR 图谱中均无姜黄素吸收峰，说明在微球的制备过程中，Cur-PC 并未解离，仍保持复合状态。也就是说，Cur-PC 是以完整的复合形式分布在壳聚糖微球中，Cur-PC-CM 制备良好。

3.3 体外释放

整体而言，乳化交联法制备的微球突释效应最强，这可能与部分 Cur-PC 未包入微球而粘附于表面有关；12 h 后释放很缓慢，且难以释放完全，说明戊二醛的交联固化效果强于 TPP，对药物释放有很强的阻滞作用。离子凝聚注入法制备的微球释药最多，但也存在一定的突释效应，这可能与其疏松多孔结构有关。离子凝聚滴入法制备的微球无突释效应，药物释放始终平缓增加，但最终释放量略低于注入法。

3 种方法制备的微球体外释药均符合 Weibull 分布：$M_t/M_\infty = 1 - \exp(-at^b)$。Cur-$CM_D$ 和 Cur-PC-CM_D、Cur-CM_E 和 Cur-PC-CM_E、Cur-CM_I 和 Cur-PC-CM_I 的 b 值分别为 0.693 和 0.711、0.307 和 0.256、0.474 和 0.458。根据文献报道[15]，离子凝聚滴入法制备的微球，$0.69 < b < 0.75$，释放机制为正常 Euclidian 空间内的扩散；乳化交联法制备的微球，$b < 0.35$，释放机制为高度无序空间内的扩散；离子凝聚注入法制备的微球，$0.36 < b < 0.69$，释放机制为不规则碎片形或无序基质中的扩散。同时，各方法的壳聚糖微球和磷脂复合物-壳聚糖微球的 b 值在同一范围内，说明磷脂复合物的存在并没有改变壳聚糖微球的释药机制。

3 种方法制备的磷脂复合物-壳聚糖微球在粒径和体外药物释放方面存在较大差异。这种差异是否会导致体内药物吸收速率和吸收量的不同，有待体内药动学研究证实。

参考文献

[1] Srivastava R M, Singh S, Dubey S K, *et al*. Immuno-modulatory and therapeutic activity of curcumin [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(3): 331-341.

[2] 孙炤瑛, 牛建昭. 姜黄素联合雷帕霉素诱导去势难治性前列腺癌 Pten-CaP8 细胞自噬及凋亡研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 520-523.

[3] Anand P, Thomas S G, Kunnumakkara A B, *et al*. Biological activities of curcumin and its analogues (congeners) made by man and mother nature [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(11): 1590-1611.

[4] Tsai Y M, Jan W C, Chien C F, *et al*. Optimised nano-formulation on the bioavailability of hydrophobic polyphenol, curcumin, in freely-moving rats [J]. *Food Chem*, 2011, 127(3): 918-925.

[5] Ravindranath V, Chandrasekhara N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats [J]. *Toxicology*, 1980, 16(3): 259-265.

[6] 琚 辉, 郝存江, 尹 飞, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒的制备及表征 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 420-426.

[7] Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, *et al*. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats [J]. *Int J Pharm*, 2007, 330(1/2): 155-163.

[8] Ventura C A, Tommasini S, Crupi E, *et al*. Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: Interaction with biomembrane models and *in vitro* permeation studies [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68(2): 235-244.

[9] Li F, Li J N, Wen X J, *et al*. Anti-tumor activity of paclitaxel-loaded chitosan nanoparticles: An *in vitro* study [J]. *Mater Sci Eng C*, 2009, 29(8): 2392-2397.

[10] Cui J, Yu B, Zhao Y, *et al*. Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems [J]. *Int J Pharm*, 2009, 371(1/2): 148-155.

[11] Akhtar F, Rizvi M M A, Kar S K, *et al*. Oral delivery of curcumin bound to chitosan nanoparticles cured *Plasmodium yoelii* infected mice [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(1): 310-320.

[12] Shaikh J, Ankola D D, Beniwal V, *et al*. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 37(3/4): 223-230.

[13] 张继芬, 王 琴, 贾 兰, 等. 阿魏酸在脂质体壳聚糖缓释微球的制备及体外释放研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(22): 2972-2975.

[14] 赵琳琳, 韩 刚, 宋树美, 等. 姜黄素壳聚糖微球的制备及体外药物释放研究 [J]. 中药材, 2007, 30(2): 230-232.

[15] Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, *et al*. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms [J]. *Int J Pharm*, 2006, 309(1/2): 44-50.