

## pH 依赖型重芪结肠靶向微丸的制备及体外释放性能的评价

刘天易, 王 信, 杨田义, 曹广尚\*

山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011

**摘要:** 目的 制备 pH 值依赖型重芪结肠靶向微丸, 并对其进行体外释放性能评价。方法 采用正交试验法优选微丸的挤出-滚圆法制备工艺参数; 采用流化床进行微丸包衣; 采用单因素法考察包衣液处方; 以重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 为指标, 进行体外释放性能评价。结果 挤出-滚圆法制备 pH 值依赖型重芪结肠靶向微丸的最佳工艺参数为挤出速率为 60 r/min, 滚圆速度为 1 200 r/min, 滚圆时间为 5 min; 微丸包衣处方为 Eudrugit S100 增重 15%, 单硬脂酸甘油酯用量 1.5%, 柠檬酸三乙酯用量为 5%; 体外释放度实验表明, pH 值依赖型重芪结肠靶向微丸在人工胃液中 2 h 几乎不释放, 在人工小肠液中 4 h 累积释放度 < 10%, 在人工结肠液中 2 h 累积释放度 > 90%。结论 pH 值依赖型重芪结肠靶向微丸制备工艺合理可行, 具有良好的体外结肠释药特征。

**关键词:** 重楼; 黄芪; 结肠靶向微丸; 体外释放; 累积释放度; pH 值依赖; 正交试验; 挤出-滚圆法; 重楼皂苷 I; 重楼皂苷 II

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)18-3199-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.010

## Preparation and *in vitro* release evaluation of pH-dependent colon targeting pellets of *Paridis Rhizoma* saponin and *Astragali Radix* polysaccharide

LIU Tian-yi, WANG Xin, YANG Tian-yi, CAO Guang-shang

Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China

**Abstract: Objective** To prepare pH-dependent *Paridis Rhizoma* saponin (PRS) and *Astragali Radix* polysaccharide (ARP) colon targeting pellets for the treatment of colon cancer and finish its *in vitro* release performance evaluation. **Methods** The colon targeted pellets were prepared with extrusion-spheronization and air-flow coating method and the the process parameters were optimized by orthogonal design. The coating fluid prescription was investigated by single factor test. *In vitro* release performance evaluation of the pellets was evaluated with polyphyllin I and II as the indexes. **Results** The optimum technologic parameters of extrusion spheronization equipment were as follows: the rate of extrusion was 60 r/min, the rate of spheronization was 1 200 r/min, and the time of spheronization was 5 min. The optimum coating liquid formulation of pH-dependent colon targeting pellets was 15% weight gains of Eudrugit S100, 1.5% anti-plastering aid amount of Glycerin monostearate, and 5% plasticizer amount of TEC. *In vitro* release test showed that cumulative release rate of berberine hydrochloride was close to 0% in artificial gastric juice after 2 h and less than 10% in artificial intestinal fluid after 4 h, but the cumulative release rate in artificial colon juice after 2 h was more than 90%. **Conclusion** The preparation method can be applied to the preparation of colon targeted pellets and the pellets can achieve the targeted release in the colon.

**Key words:** *Paridis Rhizoma*; *Astragali Radix*; colon targeted pellets; *in vitro* release; cumulative release rate; pH-dependent; orthogonal design; extrusion-spheronization; polyphyllin I; polyphyllin II

重芪结肠靶向微丸是针对结肠癌患者便血、腹泻、局部疼痛、肠道菌群失衡常见症状<sup>[1]</sup>, 选用重楼、黄芪精制而成的中药新制剂, 方小力专、疗效

确切、服用方便。方中重楼 *Paridis Rhizoma* 具有较强的止血、镇痛作用, 并可诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[2-4]</sup>及抑菌作用<sup>[5]</sup>; 黄芪 *Astragali Radix* 可显著提高机

收稿日期: 2016-04-20

基金项目: 山东省中医药科技发展计划 (2013-082, 2015-086)

作者简介: 刘天易 (1983—), 男, 主管药师, 研究方向为中药新药及新技术、新剂型的研究。E-mail: morning958@163.com

\*通信作者 曹广尚 (1980—), 男, 主管药师, 硕士, 研究方向为中药新药与中药炮制原理的研究。

Tel: (0531)68617919 E-mail: cgs198041@163.com

体免疫力,发挥抗肿瘤作用,同时可平衡结肠癌肠道微生物菌群结构<sup>[6-7]</sup>。结肠靶向给药可有效避免肝、胃肠道的首关效应,提高结肠局部药物浓度,提高药效,同时微丸剂型体积较小,药物在肠道内表面分布面积大,转运时间长,有利于药物吸收,发挥长效作用,本研究制备重楼结肠靶向微丸,为临床结肠癌的防治提供新思路和新选择。

### 1 仪器与材料

HJ-400-P 挤出-滚圆制丸机,重庆荣凯机械制造有限公司;WBF-1 型多功能流化床,重庆英格制药机械有限公司;Aglient 1260 型高效液相色谱仪,安捷 Agilent 有限公司;AB135-S 型电子天平, Mettler Toledo 公司;ZB-1C 智能溶出试验仪,天津大学精密仪器厂。

对照品重楼皂苷 I (批号 111590-200402, 质量分数 92.1%)、重楼皂苷 II (批号 111591-200402, 质量分数 93.4%), 均购自中国食品药品检定研究院;微晶纤维素 (MCC), 台湾名台公司;糊精, 海盐六合药业有限公司;重楼总皂苷-羟丙基环糊精包合物, 总皂苷 45.5%, 重楼皂苷 I 15.6%, 重楼皂苷 II 14.6%, 自制;黄芪总多糖, 总多糖 61.3%, 自制;Eudrugit S100、Eudrugit L100、Eudrugit L100-55, 德国 Rohm 公司;滑石粉, 上海昌为医药辅料技术有限公司;单硬脂酸甘油酯, 北京华威锐科化工有限公司;柠檬酸三乙酯 (TEC), 上海迈瑞尔化学技术有限公司;十二烷基硫酸钠 (SDS), 湖南尔康制药有限公司;乙腈和磷酸溶液为色谱纯;水为纯净水;其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 载药微丸的制备

**2.1.1 软材的制备** 取 50% MCC、20%糊精、30%重楼和黄芪有效部位 (1:2) 混合物, 以 85%乙醇为黏合剂, 制备软材。

**2.1.2 正交试验优选微丸制备工艺** 采用挤出-滚圆法制备载药微丸。以挤出速率(A)、滚圆速度(B)、滚圆时间(C)为考察因素, 每个因素设定 3 个水平, 以微丸收率为考察指标, 采用正交试验优选微丸的制备工艺参数。将成型的微丸置于 50 °C 鼓风干燥箱中干燥, 收集 16~24 目的微丸。因素水平及正交试验结果见表 1, 方差分析结果见表 2。由以上数据分析可知, A、B、C 3 因素影响微丸得率的主次顺序为 B>C>A, 即滚圆速度>滚圆时间>挤出速率, 直观分析最佳制备工艺为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>。方差分析

表 1 正交试验设计及结果

**Table 1 Design and results of orthogonal test**

试验号	A/(r·min <sup>-1</sup> )	B/(r·min <sup>-1</sup> )	C/min	D (空白)	微丸收率/%
1	40 (1)	900 (1)	3 (1)	(1)	32.3
2	40 (1)	1 200 (2)	5 (2)	(2)	75.8
3	40 (1)	1 500 (3)	7 (3)	(3)	76.7
4	50 (2)	900 (1)	5 (2)	(3)	55.7
5	50 (2)	1 200 (2)	7 (3)	(1)	86.2
6	50 (2)	1 500 (3)	3 (1)	(2)	63.5
7	60 (3)	900 (1)	7 (3)	(2)	61.8
8	60 (3)	1 200 (2)	3 (1)	(3)	75.2
9	60 (3)	1 500 (3)	5 (2)	(1)	77.1
K <sub>1</sub>	184.80	149.80	171.00	195.60	
K <sub>2</sub>	205.40	237.20	208.60	201.10	
K <sub>3</sub>	214.10	217.30	224.70	207.60	
R	29.30	87.40	53.70	12.00	

表 2 方差分析

**Table 2 Analysis of variance**

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	150.95	2	6.28	
B	1 399.00	2	58.16	P<0.05
C	506.30	2	21.05	P<0.05
D (误差)	24.06	2		

结果可知, B、C 因素为显著因素 (B>C), A 为不显著性因素, 从提高效率角度考虑, A 因素可选择水平 3, C 因素可选择水平 2, 综合直观分析和方差分析结果, 拟定 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub> 为最佳提取工艺, 即挤出速率为 60 r/min, 滚圆速度为 1 200 r/min, 滚圆时间为 5 min。

#### 2.2 包衣微丸的制备<sup>[8]</sup>

取载药微丸适量, 置于流化床底喷包衣锅中, 风机频率 25 Hz, 进风温度 40 °C, 喷液速度 2 m/min, 喷枪压力 0.7 MPa。包衣结束后 40 °C 继续干燥 5 min, 微丸相互间不黏连, 将微丸从流化床内取出, 即得。

#### 2.3 重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 的定量测定方法<sup>[9]</sup>

**2.3.1 色谱条件** 采用 Kromasil C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水 (48:52) 为流动相; 检测波长为 203 nm, 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 40 °C。理论板数按重楼皂苷 I 峰计算应不低于 4 000。

**2.3.2 对照品溶液的制备** 取重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度

均为 0.4 mg/mL 的混合对照品溶液，即得。

**2.3.3 供试品溶液的制备** 取微丸适量，研细，取约 2.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 25 mL，称定质量，超声处理（功率 250 W，频率 50 kHz）30 min，放冷，再称定质量，以甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

**2.3.4 空白样品溶液的制备** 按微丸制备工艺、处方比例，不加重楼总皂苷有效部位，制得模拟制剂，按供试品溶液的制备方法制备样品，即得。

**2.3.5 专属性考察** 精密吸取对照品溶液、供试品溶液及空白样品溶液各 10 μL，注入高效液相色谱仪，供试品中重楼皂苷 I 和重楼皂苷 II 色谱峰能达到分离，且保留时间与对照品一致；空白样品溶液无干扰，见图 1。

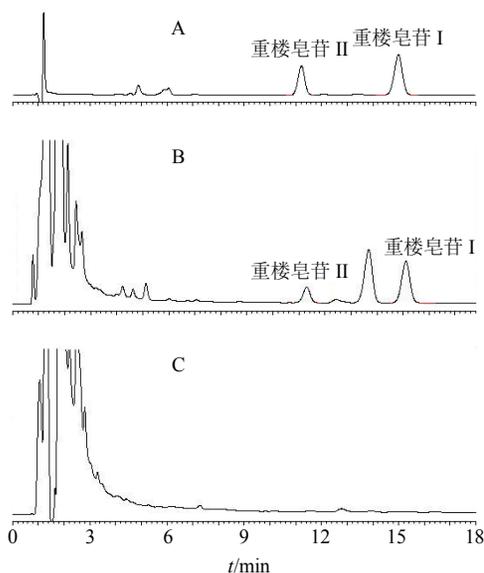


图 1 混合对照品 (A)、样品 (B) 及空白样品 (C) HPLC 图  
Fig. 1 HPLC of mixed reference solution (A), sample solution (B), and black samples (C)

**2.4 体外释放度的测定**

按《中国药典》2015 年版四部通则 0931 第一法进行试验，取适量微丸装于普通胶囊壳中，分别依次测定其在人工胃液（pH 1.2 的稀盐酸）2 h、人工肠液（pH 6.8 的磷酸缓冲液）4 h、人工结肠液（pH 7.6 的磷酸缓冲液）2 h 中的释放情况。转速为 100 r/min，介质温度为 (37.0±0.5) °C，于规定时间（在人工胃液中分别于 10、30、60、90、120 min 取样，人工肠液中分别于 30、60、120、240 min 取样，人工结肠液中分别于 10、20、30、60、90、120 min 取样）取释放液 5 mL，并迅速补充等体积等温度的溶出介质，滤过，测定重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 的

量，计算药物的累积释放度 (RR) [10]。

$$RR = (VC_n + \sum_{i=1}^n V^i C_{n-1}) / W$$

$C_n$  为第  $n$  次取样时释放介质中重楼皂苷 I、II 的质量浓度之和， $V$  为释放介质的体积， $V^i$  为第  $n$  次取样前的取样体积， $W$  为微丸中所能释放的重楼皂苷 I、II 质量总和

**2.5 包衣处方的优选**

**2.5.1 包衣材料的选择** 参考相关文献方法 [11]，分别配制 3 种常用的包衣液：称取 Eudragit S100、Eudragit L100、Eudragit L100-55 各 10 g，分别缓慢加至 100 mL 95%乙醇溶液中，搅拌溶解，将 5% TEC、1.5%单硬脂酸甘油酯加至上述 95%乙醇溶液中，继续搅拌分散均匀，过 50 目筛，即得。分别用以上 3 种包衣液进行包衣，包衣增重 20%，测定 RR，结果见表 3，绘制释药曲线，结果见图 2。结果表明，Eudragit S100、Eudragit L100、Eudragit L100-55 3 种包衣材料在 2 h 内（人工胃液中）几乎不释放，在人工肠液 4 h 的 RR 分别为 6.12%、78.56%、85.47%，在人工结肠液 2 h 的 RR 分别为 96.31%、95.86%、96.52%。因此选用 Eudragit S100 为结肠包衣材料。

**2.5.2 包衣增重的选择** 分别选取 10%、15%、20% 3 种包衣增重量对微丸进行包衣，测定 RR，结果见表 4，绘制释药曲线，结果见图 3。结果表明，包衣

表 3 不同包衣材料的 RR 测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Cumulative release rate of coated pellets with different coating materials ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

包衣材料	RR/%		
	人工胃液	人工肠液	人工结肠液
Eudragit S100	0.015±0.002	6.12±0.77	96.31±0.23
Eudragit L100	0.024±0.003	78.56±1.23	95.86±1.55
Eudragit L100-55	0.022±0.001	85.47±2.14	96.52±2.01

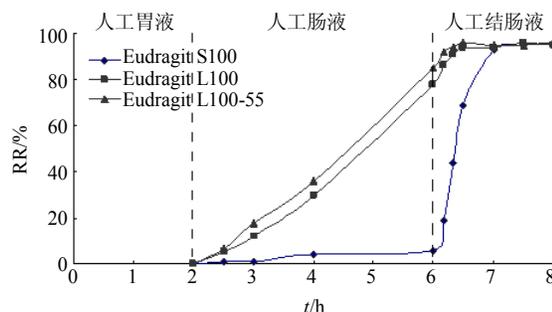


图 2 不同包衣材料的释药曲线 (n = 3)

Fig. 2 Release curves of coated pellets with different coating materials (n = 3)

表 4 不同包衣增重的 RR 测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 4 Cumulative release rate of coated pellets with different weight gains in coating levels ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

包衣增重/%	RR/%		
	人工胃液	人工肠液	人工结肠液
10	0.025 ± 0.003	25.34 ± 0.90	96.92 ± 0.41
15	0.016 ± 0.004	9.50 ± 0.36	95.29 ± 2.05
20	0.011 ± 0.001	7.55 ± 1.01	96.02 ± 1.11

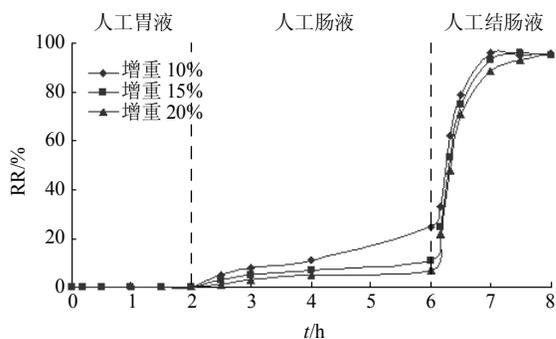


图 3 不同包衣增重的释药曲线  
Fig. 3 Release curves of coated pellets with different weight gains in coating levels

增重 15% 和 20% 释药曲线符合结肠靶向释药的要求, 为提高效率, 节省物料, 选择包衣增重为 15%。

**2.5.3 增塑剂用量的选择** 分别以含 3%、5%、7% TEC 的包衣液对微丸进行包衣, 观察形成的衣膜是否光滑完整, 并测定 RR, 结果见表 5, 绘制释药曲线, 结果见图 4。观察不同 TEC 用量包衣所得微丸, 5%、7% 用量所得微丸衣膜光滑完整, 由释药曲线可知, 5%、7% TEC 用量符合结肠靶向释药的要求, 为节省物料, 选择 TEC 用量为 5%。

**2.5.4 抗黏剂用量的选择** 分别以含 0.5%、1.0%、1.5% 单硬脂酸甘油酯的包衣液对微丸进行包衣, 观察包衣过程中微丸是否发生粘连。结果在包衣过程中, 0.5%、1.0% 单硬脂酸甘油酯用量包衣微丸有粘连现象, 1.5% 的单硬脂酸甘油酯用量微丸包衣无粘

表 5 不同 TEC 用量的 RR 测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 5 Cumulative release rate of coated pellets with different amounts of TEC ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

TEC 用量/%	RR/%		
	人工胃液	人工肠液	人工结肠液
3	0.023 ± 0.005	14.53 ± 1.32	96.11 ± 0.99
5	0.015 ± 0.001	9.50 ± 0.36	95.29 ± 2.05
7	0.010 ± 0.003	8.95 ± 2.16	95.78 ± 0.27

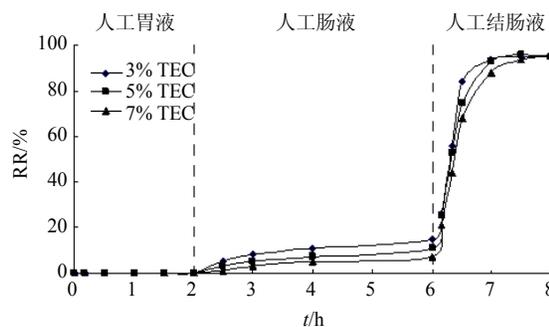


图 4 不同 TEC 用量的释药曲线  
Fig. 4 Release curves of coated pellets with different amounts of TEC

连现象, 因此选用抗黏剂单硬脂酸甘油酯的用量为 1.5%。

### 2.6 验证试验

按确定的制备工艺及包衣处方制备 3 批样品, 测定微丸收率及重楼皂苷 I、重楼皂苷 II 的量, 结果见表 6。测定 RR, 绘制释药曲线, 结果见图 5。由图可知, 结果 3 批微丸释药曲线均符合结肠靶向释药要求, 表明 3 批微丸制备工艺稳定可行, 具有良好的体外结肠释药特征。

### 3 讨论

本实验采用挤出-滚圆-流化床法包衣制备重楼结肠靶向微丸。实验结果表明, 以 Eudrugit S100 为包衣材料, 以 1.5% 单硬脂酸甘油酯为抗黏剂, 5%

表 6 3 批结肠靶向微丸收率及定量测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 6 Yield and contents of PRS I and II of colon-specific pellets with same membrane coating ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

批号	微丸收率/%	重楼皂苷 I/%	重楼皂苷 II/%
20160314	85.70 ± 0.16	1.046 ± 0.200	1.021 ± 0.360
20160318	86.10 ± 1.21	1.042 ± 0.890	1.019 ± 0.450
20160320	85.50 ± 1.01	1.044 ± 0.770	1.020 ± 0.780

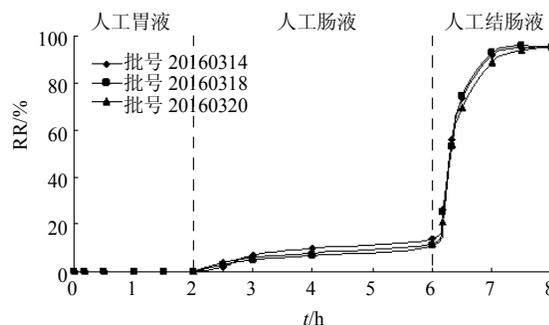


图 5 3 批结肠靶向微丸的释药曲线 ( $n = 3$ )  
Fig. 5 Release curves of three batches of colon-specific pellets with same membrane coating ( $n = 3$ )

柠檬酸三乙酯为增塑剂,包衣增重 15%,制备的微丸在人工胃液中 2 h 几乎无药物释放,在人工肠液中 4 h  $RR < 10\%$ ,在人工结肠液中 2 h  $RR > 90\%$ ,显示出所制备的重楼结肠靶向微丸具有良好的结肠靶向性,本研究后期还将进一步考察其在体内的结肠释药特性。

重楼总皂苷水溶性较差,直接制成微丸后药物难以释放,影响释放度的测定,因此本研究前期对重楼总皂苷进行了聚乙二醇分散、羟丙基环糊精包合等研究,最终选择重楼总皂苷-羟丙基环糊精作为原料进行微丸的制备。微丸制备常用 MCC、粉状纤维素、玉米芯粉、糊精、淀粉、乳糖等辅料,由于本微丸含有黏性较大的黄芪多糖成分,经预试验选用 MCC 和糊精作为制剂辅料,同时结合给药剂量和成型工艺,当药物-MCC-糊精质量比例为 3:5:2 时,制备的软材能被顺利挤出,微丸收率高。

滑石粉为微丸包衣常用的抗黏剂,但其容易导致微丸包衣膜不均匀,且容易阻塞流化床喷液枪头,本实验前期对抗黏剂滑石粉、单硬脂酸甘油酯、微粉硅胶的等进行了筛选,最终选定用量较少、抗黏效果较好的单硬脂酸甘油酯为抗黏剂。

针对结肠癌患者灌肠、栓剂给药方式不易接受,给药不方便的弊端,本研究精选临床常用抗肿瘤中药重楼、黄芪,经精制制备结肠靶向口服制剂,方小力专、服用方便、便于患者长期用药。

常见的结肠靶向给药类型主要有时间控制型、pH 依赖型、细菌降解型(酶型)等,由于时间依赖型易受食物影响,本研究未涉及。由于本制剂的定位为轻中度结肠癌的辅助治疗,考虑到癌症病理状态下,结肠内肠道菌群处于失衡状态,对细菌降解型(酶型)制剂药物的释放可能会产生一定的影响,因此,本研究制备适应性较好的 pH 依赖型结肠靶向制剂,以发挥更好的结肠癌治疗作用。

#### 参考文献

- [1] Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKTcells [J]. *J Hepatol*, 2008, 49(5): 821-830.
- [2] 李彤彤,高飞,段承俐,等. 云南重楼中血管内皮生长因子结合因子的活性研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(15): 2251-2256.
- [3] 付亚莉,赵振虎,善亚君,等. 重楼甾体总皂苷对血小板聚集的直接诱导作用及初步机制研究 [J]. *军事医学科学院院刊*, 2007, 31(5): 416-418.
- [4] 李晞,王继红,肖亚雄. 重楼提取液对人结肠癌 SW480 细胞增殖的影响及其作用机制 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(6): 601-603.
- [5] 陆克乔,张梦翔,施高翔,等. 云南重楼正丁醇提取物对白念珠菌生物膜形成的抑制作用 [J]. *中草药*, 2016, 47(3): 440-446.
- [6] Wang Y F, Yang X F, Cheng B, *et al.* Protective effect of Astragalus polysaccharides on ATP binding cassette transporter A1 in THP-1 derived foam cells exposed to tumor necrosis factor alpha [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(3): 393-394.
- [7] 韩榕徽,王洪新,唐富天,等. 黄芪多糖对异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚大鼠内皮功能的影响 [J]. *中草药*, 2015, 46(24): 3722-3726.
- [8] 叶晓莉,王选深,王彬辉,等. pH 依赖-时滞型大黄素结肠微丸制备及体外释药研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 1956-1962.
- [9] 杨培民,倪健,曹广尚. HPLC 法测定重楼克感滴丸中重楼皂苷皂苷 I 和重楼皂苷 II 的含量 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(3): 678-680.
- [10] 张丹参,梅艳飞,宋晓敏,等. 大黄结肠靶向微丸的制备及处方优化 [J]. *中草药*, 2016, 47(8): 1321-1326.
- [11] 凌霄,胡元利,陈飞龙,等. pH 依赖型黄连总生物碱结肠靶向微丸的制备及其体内外释放性能评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(21): 24-26.