

白益母草总生物碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球的制备

陈晓北* (赤峰学院医学院, 内蒙古赤峰 024000)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4418-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.32

摘要 目的:优化蒙药白益母草总生物碱的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球的处方工艺,制备微球并对其进行质量考察。方法:采用复乳-液中干燥法制备白益母草总生物碱PLGA微球,以处方中PLGA质量浓度、聚乙烯醇(PVA)浓度及内水相/油相体积比为因素,以微球的载药量、包封率、收率的综合评分为指标,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验优化制备微球的处方工艺,并考察微球形态、粒径及体外释药情况。结果:最优工艺为PLGA 200 mg/ml、PVA 2%、内水相/油相的体积比为1:5;验证试验中平均包封率为 $(83.2 \pm 2.4)\%$,平均载药量为 $(4.16 \pm 0.17)\%$,平均收率为 $(86.7 \pm 3.6)\%$,综合评分结果为 $(95.7 \pm 4.4)\%$,RSD均小于5.0%($n=3$);制备的微球形态圆整,表面光滑,粒径分布均匀,平均粒径为 $(22.3 \pm 2.4) \mu\text{m}$;微球24 h体外累积释放度为 $(82.3 \pm 3.5)\%$,符合一级释放模型($r=0.9724$)。结论:优选工艺稳定;制备的微球具有良好的缓释性能,质量符合要求。
关键词 白益母草;总生物碱;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;微球;工艺优化;正交试验;体外释药

Preparation of Poly(lactide-co-glycolide) Microspheres Containing Total Alkaloids of *Panzeria alaschanica* CHEN Xiao-bei (Medical School of Chifeng University, Inner Mongolia Chifeng 024000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the formulation and technology of poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres containing total alkaloids of *Panzeria alaschanica*, and to prepare microspheres and conduct quality investigation. METHODS: PLGA microspheres containing total alkaloids of *P. alaschanica* (PTPM) was prepared by double emulsion-solvent evaporation method. The formulation of microspheres was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal design using mass concentration of PLGA, PVA concentration, ratio of water phase to oil phase as factor, drug-loading amount, encapsulation efficiency, yield as index. The morphology, particle size and drug release of microspheres were all investigated. RESULTS: The optimal formulation was as follows as the mass concentration of PLGA 200 mg/ml, the concentration of PVA 2%, and the water phase-oil phase ratio 1:5. In validation test, average encapsulation efficiency was $(83.2 \pm 2.4)\%$, average drug-loading amount $(4.16 \pm 0.17)\%$, average yield $(86.7 \pm 3.6)\%$, and comprehensive score $(95.7 \pm 4.4)\%$; all RSDs were lower than 5.0% ($n=3$). Prepared microspheres were spherical with smooth surface and uniform particle size. The average particle size was $(22.3 \pm 2.4) \mu\text{m}$ and accumulative release rate of 24 h was $(82.3 \pm 3.5)\%$, which conformed to first-order release model ($r=0.9724$). CONCLUSIONS: Optimized technology is stable. Prepared microspheres show good sustained-release property, and fit to quality requirements.

KEYWORDS *Panzeria alaschanica*; Total alkaloids; Poly (lactide-co-glycolide); Microspheres; Technology optimization; Orthogonal test; Drug release *in vitro*

白益母草(*Panzeria alaschanica* Kupr.),为唇形科脓疮草属植物,又名脓疮草、白龙昌菜、白龙穿彩等,蒙药名为查干-都日布乐吉-额布斯,主要生长于我国的内蒙古鄂尔多斯西北部、阿拉善和陕西、宁夏等地区^[1]。白益母草具有活血调经、清热利尿、解毒消肿的功效,主治月经不调、产后腹痛、急性肾炎、乳痈、丹毒、疖肿、疥疮等症,疗效显著^[2]。蒙医视之为疮疾之圣药,同时广为蒙医专用于治疗高血压病、妇科疾病等,并认为其疗效较益母草好^[3]。

虽然目前对白益母草的基础研究还比较薄弱,但是已有的研究表明,黄酮和生物碱是其主要化学成分^[4-6],其中总生物碱的含量较高,推断其是白益母草发挥治疗作用的主要有效部位。但由于口服生物碱后的稳定性较差、有效浓度低、作用时间短,使其临床使用受到了限制。如何克服生物碱化合物的缺点,制备生物利用度高、用药量低的高效、长效制剂是目前的研究重点^[7-9]。微球技术利用载体材料的特性,包载药物制成微球制剂,可增加药物的水溶性,减少对胃肠道的刺激

性,降低毒性,减少肝脏首关效应等。微球制剂不仅能提高药物生物利用度、增强疗效,还具有缓释、靶向作用,减少药物的服用量,减少服药次数^[9]。生物降解聚合物乳酸-羟基乙酸共聚物[Poly(lactide-co-glycolide), PLGA]为常用的微球聚酯类载体材料之一,其由乳酸(LA)和羟基乙酸(GA)聚合而成,可在体内生物降解为乳酸和乙醇酸,两者最终均以二氧化碳和水的形式排出体外。其毒性低、安全性高、稳定性好,可包载药物并使其具有缓释作用^[10]。因此,笔者拟采用PLGA为成球材料,制备白益母草总生物碱PLGA微球(PTPM),再制成口服制剂以改善传统剂型的不足,扩大民族药的临床应用范围,以利于蒙药的现代化发展。

1 材料

1.1 仪器

Ultra-Turrax T8 高速匀浆器(德国IKA公司);J-25I 高速冷冻离心机、LS 230 激光粒度测定仪(美国Beckman公司);FD-1 真空冷冻干燥机(西安常仪仪器设备有限公司);S-450 电子扫描显微镜(日本Hitachi公司);紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司)。

* 主任药师。研究方向:中药药剂学。E-mail: cxb04032308@sina.com

1.2 药品与试剂

PLGA[美国 Birmingham Polymers 公司,批号:75DG040,组成:LA-GA(75:25),固有黏度:0.47 dl/g];所用药材经笔者鉴定为蒙药白益母草(*Panzeria alaschanica* Kupr.);盐酸水苏碱对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110712-200709,纯度:99.0%);雷氏盐、聚乙烯醇(PVA)、二氯甲烷等试剂均为市售分析纯或化学纯。

2 方法与结果

2.1 白益母草总生物碱的提取^[1]

取白益母草药材 200 g,加入 12 倍量 70% 乙醇提取 2 h,重提 1 次,合并滤液,4 ℃ 冰箱过夜;抽滤,浓缩,干燥备用。采用 SP825 树脂将生物碱类物质与黄酮类物质分离,无水乙醇纯化总生物碱,冷冻干燥后称质量,制得供试样品 5.356 g。

2.2 白益母草总生物碱含量测定方法的确定

精密量取盐酸水苏碱对照品溶液(0.983 3 mg/ml)0(空白)、2、4、6、8、10 ml 置于 50 ml 量瓶中,各精密加入新制的 2% 雷氏盐溶液 6 ml,摇匀,以 0.1 mol/L 盐酸稀释至刻度,摇匀,冰水浴中放置 1 h。分别取溶液适量,过滤,取续滤液,以未加盐酸水苏碱对照品的溶液为空白对照,按照紫外-可见分光光度法^[11],于 520 nm 波长处分别测定吸光度 A 。用空白试剂的 A 值减去不同质量浓度对照品的 A 值,得 ΔA 。以 ΔA 为纵坐标(y)、对照品溶液质量浓度为横坐标(x),绘制标准曲线,得方程 $y=0.524 6x+0.031 3(r=0.999 6)$,表明盐酸水苏碱对照品检测质量浓度线性范围为 39.33~196.66 $\mu\text{g/ml}$ 。精密度试验测定结果显示日内 RSD 为 0.11%,日间 RSD 为 0.14% ($n=5$);方法回收率试验结果显示平均回收率为 98.33% (RSD=0.37%, $n=6$);稳定性(20 min 内)试验结果显示吸光度的 RSD 为 1.57% ($n=5$),表明该方法中的显色系统在 20 min 内具有良好的稳定性。

按上述方法测定,白益母草药材(g)中总生物碱量为 10.87 mg。精密称取“2.1”项下供试样品 15.02 mg,按上述方法操作,测得其中总生物碱质量分数为 26.84%。

2.3 PTPM 的制备

采用复乳-液中干燥法制备微球^[10]。取 30 mg 白益母草总生物碱溶于一定体积的 0.1 mol/L 盐酸后(内水相 W_1),分散于 PLGA 的二氯甲烷溶液中油相(O)。将所得混悬液超声分散均匀,高速搅拌(4 000 r/min)2 min 得到 W_1/O 初乳,缓慢滴加至 200 ml 含有乳化剂 PVA 的外水相(W_2),得到 $W_1/O/W_2$ 复乳。将复乳置于 40 ℃ 水浴中,250 r/min 持续搅拌 6 h,挥发有机溶剂,固化微球,离心洗涤 3 次,冷冻干燥 24 h,得粉末状固体微球。

2.4 PTPM 的包封率和载药量的测定

精密称取微球冻干粉 20 mg 置于 10 ml 量瓶中,用二氯甲烷溶解并定容,摇匀。于 520 nm 波长处测定吸光度,由标准曲线方程计算白益母草总生物碱的含量,并计算载药量和包封率^[12]。载药量(%)=微球中白益母草总生物碱质量/微球质量 $\times 100\%$,包封率(%)=微球中白益母草总生物碱质量/投药量 $\times 100\%$ 。

2.5 正交设计优化制备工艺及验证

在复乳-液中干燥法制备微球的过程中影响因素很多,包括有机溶剂的组成、PLGA 分子质量、PLGA 质量浓度、 W_1/O 体

积比、PVA 浓度、搅拌速度、药物性质等^[10]。笔者在预试验的基础上,固定其他因素,并固定白益母草总生物碱的投药量为 30 mg,选取对 PTPM 的制备和性质影响较为显著的 3 个因素作为考察对象,即 PLGA 质量浓度(A, mg/ml)、PVA 浓度(B, %)、 W_1/O 体积比(C)3 个因素,每个因素选择 3 个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计安排试验。以微球的载药量(Y_1)、包封率(Y_2)、收率(Y_3)(收率=干燥微球质量/投药量 $\times 100\%$)为考察指标;根据指标因素对微球制备工艺贡献大小的差异分配不同的权重系数,即微球的载药量为 40%、包封率为 40%、收率为 20%;再计算多个指标的加权求和值 Y 进行综合评分: $Y=Y_1/Y_{\max 1}\times 40\%+Y_2/Y_{\max 2}\times 40\%+Y_3/Y_{\max 3}\times 20\%$,优选最优工艺条件。

正交试验因素与水平见表 1、试验结果见表 2、方差分析见表 3。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素		
	A(PLGA质量浓度),mg/ml	B(PVA浓度),%	C(W_1/O 体积比)
1	100	2	1:2.5
2	150	4	1:5
3	200	8	1:10

表 2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and result of orthogonal test

编号	A	B	C	Y_1 (载药量),%	Y_2 (包封率),%	Y_3 (收率),%	Y (综合评分),%
1	1	1	1	3.16	63.3	33.7	72.0
2	1	2	2	3.00	59.9	50.9	73.3
3	1	3	3	3.26	65.1	43.3	76.6
4	2	1	2	3.76	75.2	65.4	92.3
5	2	2	3	2.70	54.0	72.6	74.4
6	2	3	1	2.00	40.0	43.8	52.3
7	3	1	3	3.95	79.0	54.3	93.3
8	3	2	1	3.00	60.0	62.0	76.0
9	3	3	2	3.82	76.3	81.6	94.4
K_1	74.0	90.8	66.8				
K_2	73.0	74.6	87.7				
K_3	88.9	75.4	81.4				
R	14.9	16.2	20.9				

表 3 方差分析

Tab 3 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F	P
A	341.22	2	170.61	38.52	<0.05
B	403.89	2	201.95	45.64	<0.05
C	541.71	2	270.86	67.37	<0.05
空白	123.17	2	61.59		

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

结果表明,各因素对 PTPM 质量的影响顺序依次为 C、B、A;最优处方拟定为 $A_3B_1C_2$,即 PLGA 质量浓度为 200 mg/ml, PVA 浓度为 2%,内水相与油相的体积比为 1:5。方差分析结果表明,上述 3 个因素对 PLGA 微球的质量均具有显著性影响。

按照优化处方制备 3 批 PTPM,结果平均包封率为(83.2 \pm 2.4)%,平均载药量为(4.16 \pm 0.17)%,平均收率为(86.7 \pm 3.6)%,综合评分结果为(95.7 \pm 4.4)%,RSD 均小于 5.0% ($n=$

3)。验证试验结果表明,优化的制备工艺稳定、重现性良好。

2.6 PTPM的形态、粒径大小和分布考察

以电子扫描显微镜观察微球的形状和表面形态,激光粒度测定仪测定微球粒径的大小和分布。结果,优化工艺制备的PTPM的微球形圆整、表面光滑,详见图1;微球的平均粒径为 $(22.3 \pm 2.4) \mu\text{m}$,分布范围较窄,详见图2。

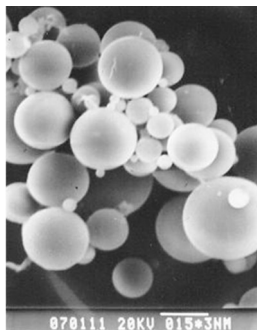


图1 PTPM微球的形态图
($\times 500$)

Fig 1 Microscope photograph of PTPM($\times 500$)

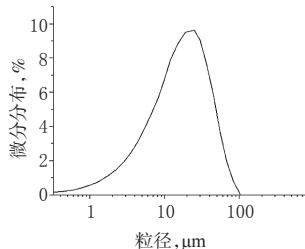


图2 PTPM的粒径分布图

Fig 2 Particle size distribution of PTPM

2.7 PTPM体外释药曲线的绘制及释药模型的确定

精密称取PTPM冻干粉约10 mg,置于21支10 ml具塞离心管中,准确加入新鲜制备的释放介质(pH 7.4磷酸盐缓冲溶液,含0.02% 聚山梨酯80、0.01%叠氮化钠)5 ml,浸于37 °C的水浴恒温振荡器中。分别在释放开始后的第1、2、4、8、12、18、24 h取出3支离心管,1 000 r/min离心(离心半径10 cm)10 min,弃去上清液,将离心出来的固体部分加二氯甲烷5 ml溶解,按照“2.2”项下方法测定微球中的残余药量,计算累积释药度(Q),绘制 $Q-t$ 体外释药曲线,见图3。

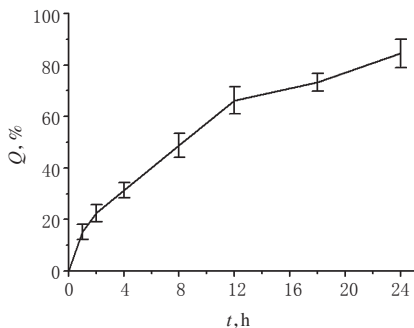


图3 PTPM的体外释药曲线

Fig 3 Drug release curve of PTPM *in vitro*

对体外释药结果用不同的释放模型(零级释放模型、一级释放模型、Higuchi释放模型)进行拟合,以相关系数 r 最大者为最优释放模型,结果见表4。

表4 PTPM释药模型拟合结果

Tab 4 Fitted drug release model of PTPM

拟合模型	方程式	r
零级释放模型	$Q=14.113 4+3.170 0t$	0.924 0
一级释放模型	$\ln(1-Q)=-0.020 6t-0.026 3$	0.972 4
Higuchi释放模型	$Q=0.368 8+18.144 0t^{1/2}$	0.957 1

由表4可知,一级释药模型更符合PTPM的体外释放模型。结合图3可知,药物在释放过程呈两相释放模式:在释放

初期出现较温和的突释现象,第1 h时释放了约15%的药物,这可能是微球浅层结构内药物的释放;随后药物释放进入了缓释阶段, Q_{24h} 为 $(82.3 \pm 3.5) \%$ 。

3 讨论

生物碱是一类具有生理活性的物质,很多生物碱类化合物具有保护心血管系统、中枢神经系统,以及抗炎、抗菌、抗病毒、保肝、抗癌等多方面的药理活性,是众多药用植物的有效成分之一^[13]。目前,生物碱类药品的主要剂型仍然是以片剂、胶囊等口服为主,每天需要服用2~3次,患者顺应性差;此外,由于首关效应和胃肠道理化环境和酶的影响,生物利用度也不高,很难达到理想的治疗效果。

药物微球制剂是一种新型的分散给药系统,药物分子分散或者吸附于高分子聚合物载体中,微粒大小一般在1~250 μm 范围内。微球制剂的载体材料包括蛋白类、多糖类、聚酯类、聚多元醇类等;新型载体材料包括聚氰基丙烯酸酯二酯聚合物、药物缓释星型聚合物、修饰的壳聚糖等^[14]。利用这些载体材料的特性,中药有效成分可以制成微球制剂,提高其生物利用度、减轻不良反应、掩盖不良异味,还可以改进中药的药物剂型,开发出具有缓控释和组织靶向性的制剂^[15]。

制备微球的常用方法包括复乳-液中干燥法、相分离法和喷雾干燥法等,其中复乳-液中干燥法最为常用^[10]。此法工艺简单,适于实验室制备;应用广泛,方法成熟,可用于多种类型药物的微球制备;包封率及得率较高,药物释放也较理想;加入各种类型的添加剂,可以在制备工艺过程中对药物起到较好的保护作用等^[16]。在本研究中,笔者从蒙药白益母草中提取总生物碱,采用微球制备常用的聚酯类高分子材料PLGA为成球材料,采用复乳-液中干燥法成功制备了PTPM,质量均符合要求。

目前,关于蒙药白益母草的文献报道非常少,主要是与其他药材配伍、制作汤剂供临床使用,尚无以白益母草总生物碱为主要成分的药品上市。本研究是基于已有的大量关于生物碱口服微球的论文报道而开展的基础性工作,研究工作还有待进一步深入。在下一步的动物实验中,笔者将研究该生物碱微球的药动学和药效学特点,深入阐明白益母草总生物碱制成微球后的缓释特征以及对生物利用度的提高作用。

参考文献

- [1] 朱亚民.内蒙古植物药志:第3卷[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,1993:464-466.
- [2] 郑亚夫,尹伟,林莉莉,等.白益母草的研究进展[J].中草药,2007,38(9):1 434.
- [3] 东珍,于秋红,朱丹.蒙药白益母草治疗痛经的临床观察[J].中央民族大学学报:自然科学版,2012,21(1):63.
- [4] 侯凤飞,郑亚夫,张海鸣,等.蒙药白益母草的化学成分研究[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(9):18.
- [5] 李雪丽,张美锋,朱丹.蒙药白益母草总生物碱的提取分离及含量测定[J].中华中医药杂志,2011,26(9):2 162.
- [6] 刘晓芳,李雪丽,朱丹.蒙药白益母草不同采收期及不同部位有效成分差异性[J].中华中医药杂志,2013,28(1):256.
- [7] 缪阳,陶玲,沈祥春.靶向微球在脏器疾病中的应用研

正交试验优选蒲苓盆炎康胶囊中落新妇苷的提取工艺

韩光明*,张艳艳,刘加秀(日照市中医医院,山东日照 276800)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4421-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.33

摘要 目的:优选蒲苓盆炎康胶囊中落新妇苷提取工艺。方法:以乙醇体积分数、浸渍时间、流速为因素,以浸膏得率和落新妇苷提取量为指标,设计正交试验优化蒲苓盆炎康胶囊组方药材(土茯苓、川芎、杜仲、三七、车前子)中落新妇苷的提取工艺。结果:最优提取工艺为加2倍量70%乙醇浸渍24h,再加70%乙醇溶液渗漉,流速3 ml/min,收集10倍生药量的渗漉液体积。验证试验中浸膏得率分别为6.79%、6.92%、6.84%,均值为(6.85±0.96)% (n=3);落新妇苷提取量分别为39.23、39.67、39.69 mg,均值为(39.53±0.66) mg (n=3)。结论:优化的蒲苓盆炎康胶囊中落新妇苷提取工艺稳定,可操作性强。

关键词 蒲苓盆炎康胶囊;土茯苓;落新妇苷;提取量;提取工艺;浸膏得率;正交试验

Optimization of the Extraction Technology of Astilbin in Puling Penyankang Capsules by Orthogonal Test

HAN Guang-ming, ZHANG Yan-yan, LIU Jia-xiu (Rizhao Hospital of TCM, Shandong Rizhao 276800, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the extraction technology of astilbin from medicinal herbs in Puling penyankang capsules. METHODS: The extraction technology of astilbin from ingredients (*Smilacis glabrae rhizoma*, *chuanxiong rhizoma*, *Eucommiae cortex*, *notoginseng radix et rhizoma*, *Plantaginis semen*) of Puling penyankang capsules was optimized with concentration of ethanol, immersion time and percolation speed as factors, and using the yield of extractum and the extraction amount of astilbin as index. RESULTS: The optimized extraction technology was as follows as 2-fold 70% ethanol, immersed for 24 h, percolated with 70% ethanol with percolation speed of 3 ml/min, 10-fold percolate volume was collected. In verification test, the yield of extractum were 6.79%, 6.92% and 6.84%, respectively, with average value of (6.85±0.96)% (n=3); the extraction amounts of astilbin were 39.23, 39.67 and 39.69 mg, with average value of (39.53±0.66) mg (n=3). CONCLUSIONS: The optimized extraction technology of astilbin in Puling penyankang capsules is stable and practical.

KEYWORDS Puling penyankang capsules; *Smilacis glabrae rhizoma*; Astilbin; Extraction amount; Extraction technology; Yield of extractum; Orthogonal test

蒲苓盆炎康胶囊系由蒲苓盆炎康颗粒改剂型而成,临床上用于治疗慢性盆腔炎。大量的研究及临床应用证明该组方具有解痉、抗炎、镇痛、改善微循环、调节内分泌等多种功效^[1-3]。蒲苓盆炎康颗粒在制剂中存在以下不足:组方中君药土茯苓中的镇痛、利尿及抗炎主要成分落新妇苷在水溶液中不稳定,尤其在加热的条件下,所以在原生产工艺生产的蒲苓盆炎康颗粒中,落新妇苷几乎被破坏。因此,有研究者改进制剂工艺方法,由颗粒改为胶囊,将土茯苓与方中其他药材车前子、杜

仲、三七、川芎一起用乙醇提取,并进行了渗漉法与浸渍法提取效果的比较研究^[3-5]。经工艺改进后,蒲苓盆炎康胶囊具有有效成分提取完全、生产周期缩短、服用量小、适应人群更广泛、服用更方便等优点。在本文中,笔者采用浸渍、渗漉法提取君药土茯苓中的落新妇苷^[6-7],再对提取工艺采用正交试验法进行优化,以确定更优提取工艺,使制剂工艺更加合理。

1 材料

1.1 仪器

究进展[J].中国药房,2013,24(13):1 225.
[8] 王绚,陈军,蔡宝昌.中药生物碱类成分贴剂的研究进展[J].中草药,2011,42(9):1 857.
[9] 许凉凉,伊辛,戎堃,等.微球载体材料研究概况及其在中药领域中的展望[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(10):239.
[10] Freiberg S, Zhu XX. Polymer microspheres for controlled drug release[J]. *Int J Pharm*, 2004, 282(1/2):1.
[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录23.

[12] 肖潮达,周雪,沈祥春,等.阿司匹林缓释微球的制备及其体外释药性能研究[J].中国药房,2014,25(45):4 275.
[13] 张德华,李茹,王永梅,等.生物碱的分类和鉴定方法研究进展[J].皖西学院学报,2010,26(5):69.
[14] 李俊松,冯怡,徐德生.中药缓、控释制剂研究现状及思考[J].中成药,2007,29(4):563.
[15] 贺秀婷,翟光喜,曹忠诚,等.中药微球制剂的研究进展[J].上海中医药杂志,2013,47(8):90.
[16] 艾国,梅兴国.缓释胸腺五肽微球的制备及体外释放的研究[J].中国药理学杂志,2007,42(11):836.

*副主任中药师。研究方向:中药制剂。电话:0633-8290867。
E-mail:hgm1976@163.com

(收稿日期:2015-01-19 修回日期:2015-08-15)
(编辑:刘 萍)