

· 论著 ·

响应面法优化肉苁蓉松果菊苷肠溶微球的制备

秦翠英, 李荣丽, 李云晶, 陈仁财, 韩 静 (沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 10016)

[摘要] 目的 制备肉苁蓉松果菊苷肠溶微球, 筛选最佳制备工艺, 并考察其体外释放特性。方法 用离子凝胶-干燥法制备肉苁蓉松果菊苷肠溶微球, 以包封率为考察指标, 用响应面法优化其制备工艺。结果 制备肉苁蓉松果菊苷肠溶微球最佳工艺参数: 海藻酸钠浓度 36.33 mg/ml、氯化钙浓度 10.82 mg/ml、壳聚糖浓度 10.93 mg/ml。结论 优选的工艺稳定、可行, 制备的微球包封率高、缓释效果较好。

[关键词] 肉苁蓉; 响应面法; 海藻酸钠; 离子凝胶-干燥法; 微球

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2017)05-0411-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.006

Optimization of the preparation process for echinacoside in *Herba Cistanche* enteric microspheres by response surface methodology

QIN Cuiying, LI Rongli, LI Yunjing, CHEN Rencai, HAN Jing (Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective** To prepare *Herba Cistanche* enteric release microspheres, optimize the preparation process and study the releasing characteristics of microspheres *in vitro*. **Methods** Ion gelatin-oven drying method was used to prepare *Herba Cistanche* enteric microspheres. The preparation process was optimized with the aid of a Box-Behnken design. **Results** The optimal preparation condition was 36.33 mg/ml of sodium alginate, 10.82 mg/ml of calcium chloride and 10.93 mg/ml of chitosan. **Conclusion** This technology is repeatable and feasible. The microspheres have high entrapment efficiency and good sustained release characteristics.

[Key words] *Herba Cistanche*; response surface methodology; sodium alginate; ion gelatin-oven drying method; microspheres

肉苁蓉(*Herba Cistanche*)俗称大芸, 主要产于我国新疆、甘肃、内蒙古等地, 化学成分主要为苯乙醇苷类、环烯醚萜类、木脂素类等^[1]。松果菊苷为从肉苁蓉中提取的苯乙醇苷类化合物, 具有抗氧化、增强记忆力、补肾等多方面的作用^[2,4]。研究表明松果菊苷水溶性好、半衰期短, 目前有研究将其制成微丸、脂质体等^[5,7]。本研究将肉苁蓉松果菊苷制成肠溶微球, 从而更好地提高药物的稳定性和减缓药物的释放, 并利用响应面法对肉苁蓉松果菊苷肠溶微球的制备工艺进行优化, 筛选出最优处方。

1 材料

1.1 仪器 电子天平(BAS124S, 赛多利斯科学仪器有限公司); 电热恒温水浴锅(HH-1, 北京科伟永兴仪器有限公司); 真空干燥箱(DZF-6020, 上海博迅实业有限公司); 紫外可见分光光度计(UV2800PC, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司); 超声波细胞粉碎机(JY92-2D, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 智能溶出试验仪(ZRS-6G, 天津市天大天发科技有限公司)。

1.2 试药 松果菊苷对照品(成都曼思特生物科技有限公司, 批号: MUST-13080801, 纯度 $\geq 98\%$); 肉苁蓉提取物(和田帝辰医药生物科技有限公司); 海藻酸钠(天津市博迪化工有限公司); 壳聚糖(济南海得贝生物工程有限公司); 碳酸氢钠; 微晶纤维素; 冰乙酸、无水甲醇等试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 肠溶微球的制备 分别称取适量肉苁蓉提取

[基金项目] 沈阳市科技局专项基金资助项目(F16-205-1-45)

[作者简介] 秦翠英, 硕士。研究方向: 药物制剂。Email: qincuiying0605@163.com

[通讯作者] 韩 静, 教授, 硕士生导师。研究方向: 天然活性物质提取分离技术应用研究, 纳米技术制药与工程研究。Tel (024) 23986442; Email: huagonglou314@163.com

物、海藻酸钠和 0.075 g 微晶纤维素加入蒸馏水中,超声溶解,制得载药混合液。称取适量壳聚糖、无水氯化钙、冰乙酸溶液制得氯化钙-壳聚糖溶液。将载药混合液以 5 ml/min 的速度滴入氯化钙-壳聚糖溶液中,搅拌 15 min 后抽滤得到肠溶微球,经蒸馏水洗涤后置于 45 ℃、0.1 MPa 真空干燥箱中干燥,即得肉苁蓉松果菊苷肠溶微球。

2.2 体外分析方法的建立

2.2.1 标准曲线的建立 称量 10.0 mg 的松果菊苷对照品,用甲醇定容至 50 ml,得母液。分别吸取母液 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 ml 于 10 ml 容量瓶中,用甲醇定容并摇匀。以甲醇作为空白,在 333 nm 处测定吸光度^[8,9]。以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。同时按照“2.1”项制备空白微球,研细,甲醇溶解,考察处方成分对松果菊苷测定的影响。

2.2.2 溶液稳定性考察 考察松果菊苷在蒸馏水、pH=1.2 盐酸和 pH=6.8 磷酸盐缓冲液(PBS)3 种溶液中的稳定性。配制 24 μg/ml 松果菊苷水溶液,置于室温下,于 0、2、4、6、8 和 12 h 测定其吸光度,考察溶液的稳定性。

2.2.3 精密度考察 配制低(8 μg/ml)、中(24 μg/ml)、高(40 μg/ml)3 个浓度的松果菊苷水溶液,分别连续测定 5 次。

2.2.4 重复性考察 取同一样品(24 μg/ml)6 份,按含量测定方法重复平行测定。

2.2.5 回收率测定 按处方配比称取肉苁蓉松果菊苷微球及空白微球,研细后,称取粉末适量并溶于甲醇中超声溶解。溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液适当稀释,测定其吸光度,以加入量和测得量之比求得回收率。

2.3 载药量和包封率的测定 取适量微球研细,称取粉末适量并溶于甲醇中超声溶解,溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液适当稀释,测定松果菊苷的含量。按下列公式计算载药量和包封率:载药量=(微球中的药品量/微球质量)×100%;包封率=(微球中的药品量/投药量)×100%。

2.4 单因素考察 以肉苁蓉松果菊苷肠溶微球的包封率、载药量、体外释放度及外观形态为考察指标,选取海藻酸钠浓度为 25、30、35、40、45 mg/ml,氯化钙浓度为 5、10、15、20、25 mg/ml,壳聚糖浓度为 0、5、10、15、20 mg/ml,交联时间为 5、10、15、20、25 min,进行单因素试验,初步优化制备工艺。

2.5 响应面法优化微球的制备工艺 根据单因素试验结果,采用 Box-Behnken 数据模型,选择海藻

酸钠浓度(A)、氯化钙浓度(B)和壳聚糖浓度(C)为响应面的 3 个因素,以包封率为响应值设计实验,其因素水平见表 1。

表 1 响应面试验的因素及水平

因素 ($\rho_{\text{H}}/\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	水平		
	-1	0	1
A. 海藻酸钠浓度	30	35	40
B. 氯化钙浓度	5	10	15
C. 壳聚糖浓度	5	10	15

2.6 微球的粒径及其粒径分布 采用显微计数法测定肉苁蓉松果菊苷微球的粒径,并绘出粒径分布图,以中位径 D_{50} 表示微球的平均粒径。

2.7 体外累积释放度的测定 精密称取一定量“2.5”项下最优处方工艺制备的肉苁蓉松果菊苷肠溶微球,置于透析袋中。分别以(37±0.5)℃经过脱气处理的 900 ml 蒸馏水、pH=1.2 盐酸、pH=6.8 PBS 为溶出介质,转速为 90 r/min,分别于 2、4、6、8、10、12、16、20、24 h 取样 10 ml,同时补充 10 ml 同温度、同体积的溶出介质。样品经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,用紫外分光光度仪测定释放液的吸光度,并计算释药百分率,绘制释药曲线。

3 结果

3.1 体外分析的结果

3.1.1 标准曲线的建立 以吸光度对松果菊苷浓度进行线性回归,经分析得回归方程为: $Y = 0.0232X - 0.0159$, $r^2 = 0.9997$,在 8~40 μg/ml 浓度范围内线性关系良好。空白微球在 333 nm 波长处对测定无干扰。

3.1.2 溶液稳定性考察 药物在蒸馏水、pH=1.2 盐酸、pH=6.8 PBS 溶液中的吸光度(A)值在 12 h 内基本无变化,稳定性较好。

3.1.3 精密度考察 低、中、高 3 个浓度样品的相对标准偏差分别为 1.0%、0.47% 和 0.52%,均<2%,精密度符合要求。

3.1.4 重复性考察 求得含量的标准相对偏差为 1.1%(<2%),符合测定要求。

3.1.5 回收率测定 结果表明该方法回收率在 98%~102% 之间,相对偏差<2%,符合测定要求。

3.2 单因素试验结果 由试验结果可知:随着海藻酸钠和氯化钙浓度的增加,释放速率先减慢后增快,当浓度过高时,微球易拖尾,包封率和载药量都较低;交联时间延长,药物释放速率变慢,但包封率显

著降低,壳聚糖浓度的增加对释放速率的影响不大,但能显著提高微球的包封率和载药量。综合考虑各因素,固定交联时间为 15 min,并选定海藻酸钠浓度为 30~40 mg/ml,氯化钙和壳聚糖浓度为 5~15 mg/ml。在其因素范围内,微球均具有较好的缓释性且载药量无较大差异,但包封率变化较明显,故以包封率为指标进一步作响应面优化分析。

3.3 响应面法分析与优化

3.3.1 响应面法试验结果 制备肉苁蓉松果菊苷肠溶微球的响应曲面试验设计方案与试验结果见表 2。

表 2 响应面试验设计和结果

试验号	A 因素	B 因素	C 因素	包封率(%)
1	-1	-1	0	68.85
2	1	-1	0	69.61
3	-1	1	0	60.64
4	1	1	0	79.42
5	-1	0	-1	63.26
6	1	0	-1	79.18
7	-1	0	1	72.39
8	1	0	1	76.83
9	0	-1	-1	75.35
10	0	1	-1	67.68
11	0	-1	1	69.89
12	0	1	1	82.48
13	0	0	0	89.72
14	0	0	0	87.83
15	0	0	0	88.78
16	0	0	0	87.32
17	0	0	0	88.33

3.3.2 模型的建立与分析 运用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验结果进行回归拟合,得到包封率(Y)对海藻酸钠浓度(A)、氯化钙浓度(B)、壳聚糖浓度(C)3个因素的二次多项回归拟合方程: $Y = 88.39 + 5.01A + 0.79B + 2.01C + 4.55AB - 2.87AC + 5.06BC - 9.87A^2 - 8.94B^2 - 5.61C^2$ 。

由肉苁蓉松果菊苷肠溶微球的响应面方差分析可知 $R^2 = 0.9960$ (表 3),说明该回归模型的拟合效果较好,可以用该模型进行试验结果的预测;模型的校正决定系数 $R^{2Adj} = 0.9908$,说明该模型能解释 99.08% 响应值的变化;此外,由 F 值可得 3 个因素对微球包封率的影响顺序依次是海藻酸钠浓度(A) > 壳聚糖浓度(C) > 氯化钙浓度(B),其中 A、C 为极显著($P < 0.01$)。交互项 AB、AC、BC 和二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 影响极显著,表明各影响因素对包封率的影响不是简单的线性关系。

表 3 响应面回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	F 值	P 值
模型	143.93	9	192.48	<0.0001
A	200.86	1	243.00	<0.0001
B	5.04	1	6.10	0.0428
C	32.47	1	39.28	0.0004
AB	82.84	1	100.22	<0.0001
AC	32.99	1	39.91	0.0004
BC	102.61	1	124.13	<0.0001
A^2	410.21	1	496.26	<0.0001
B^2	336.27	1	406.81	<0.0001
C^2	132.35	1	160.12	<0.0001
失拟项	2.40	3	0.94	0.4995
R^2	0.9960			
R^{2Adj}	0.9908			

3.3.3 各因素间的交互作用对包封率的影响 运用 Design-Expert 8.0.6 软件对海藻酸钠浓度、氯化钙浓度、壳聚糖浓度两两作交互作用分析,对其拟合作图,见图 1~3。

由图 1~3 可以看出,等高线均为椭圆形,故 A、B、C 3 个因素两两交互作用显著,对包封率的影响程度为:BC > AB > AC,结果与回归模型方差分析一致。此外,各交互作用的最佳作用点都落在试验范围内,说明该试验设计较为合理。

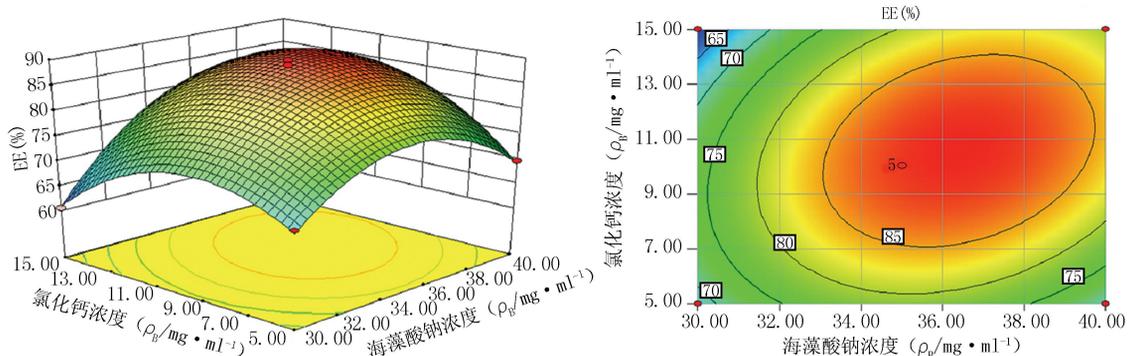


图 1 海藻酸钠浓度和氯化钙浓度的响应曲面及等高线图

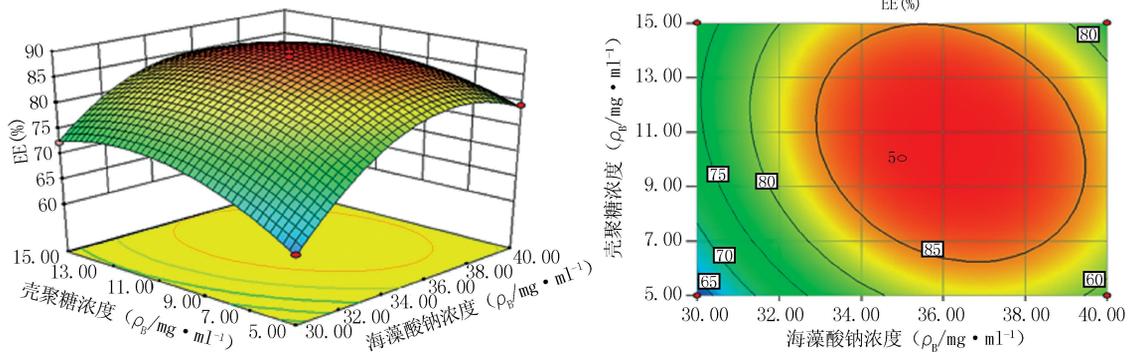


图2 海藻酸钠浓度和壳聚糖浓度的响应曲面及等高线图

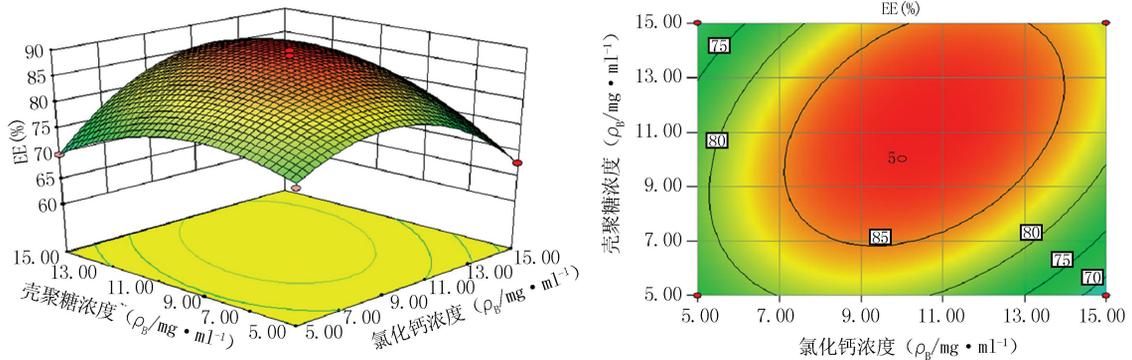


图3 氯化钙浓度和壳聚糖浓度的响应曲面及等高线图

在求取最优制备工艺时,采用响应面法能够综合考虑各因素对响应值的影响程度及趋势作出综合评价。得出最佳工艺参数:海藻酸钠浓度36.33 mg/ml、氯化钙浓度10.82 mg/ml、壳聚糖浓度10.93 mg/ml,在此处方条件下,包封率的理论值为89.31%。

3.4 验证试验 按照上述最优条件制备3批肉苁蓉松果菊苷肠溶微球,测得包封率分别为88.93%、89.17%、88.96%,平均值为89.02%,与理论值相比,相对误差为0.32%。因此,采用响应面法得到的肉苁蓉松果菊苷肠溶微球的制备工艺参数准确、方法可行。

3.5 微球的粒径及其粒径分布 采用最优工艺制备的微球大小均匀。大部分微球粒径分布在500~600 μm之间,微球的平均粒径为566.69 μm,粒径分布情况见图4。

3.6 体外累积释放度的评价 按“2.7”项下进行体外累积释放度测定,绘制释药曲线,结果见图5。在图中3种介质中,药物在pH=6.8 PBS的介质中累积释药量最大,说明药物主要在肠内释放。在体外释放试验中,累积释药量0.5 h内低于10%,12 h的累积释药量达到80%以上,说明微球有较好的缓释作用。

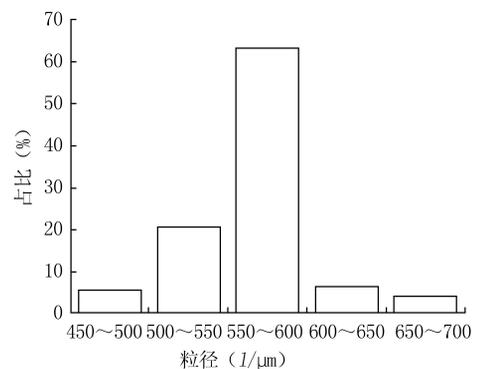


图4 肉苁蓉松果菊苷肠溶微球的粒径分布

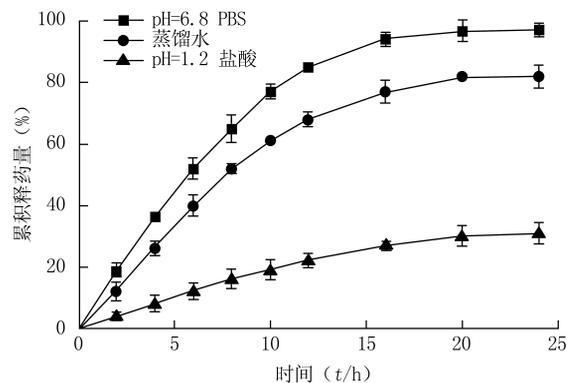


图5 肉苁蓉松果菊苷肠溶微球的体外释放曲线

(下转第432页)

试品溶液的制备均参照文献[1]。

3.4 阴性对照溶液的制备 经过文献^[1]检索,本处方中除金银花与忍冬藤药材均含有绿原酸,赤芍与白芍均含有芍药苷,当归与川芎均含有阿魏酸,连翘中含连翘酯苷 A,红花中含羟基红花色素 A,黄柏中含小檗碱,甘草中含甘草酸外,其余药材中未发现有待检测的 7 种成分;所以在制备 7 种成分的阴性对照溶液时,将相应药材去除。

3.5 7 种成分含量分析 对 10 批皮肤病血毒片含量测定的结果表明,7 种成分分别在不同批次间含量较为均一,因此可以作为该制剂功效成分的定量指标。

综上所述,由于本处方为大处方,本研究测定的 7 个成分及建立的方法,为提升该制剂质量标准 and 进一步检测其他功效成分奠定了基础。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 221, 193, 221, 193, 151, 158, 105, 41, 133, 171, 305, 87.

- [2] 魏明, 杨晓梅, 刘佳红, 等. 绿原酸的药理作用研究进展[J]. 陕西中医, 2016, 37(4): 511-512.
- [3] 扈晓佳, 殷莎, 袁婷婷, 等. 红花的化学成分及其药理活性研究进展[J]. 药学实践杂志, 2013, 31(3): 161-169.
- [4] 郑世存, 李晓宇, 欧阳兵, 等. 芍药苷药理作用研究新进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(2): 100-103.
- [5] 肖会敏, 王四旺, 王剑波, 等. 连翘抗病毒的研究进展[J]. 中国医药导报, 2010, 7(2): 9-10.
- [6] 梁娜, 孙少平, 罗跃娥, 等. 阿魏酸的研究进展[J]. 黑龙江中医药, 2009, 7(2): 39-40.
- [7] 陈阳峰, 钟晓红. 黄柏的药理作用及其活性成分提取[J]. 作物研究, 2015, 29(5): 564-568.
- [8] 吕春霞, 冯玉红. 甘草临床应用概况[J]. 内蒙古中医药, 2003, 22(S1): 42-43.
- [9] 王吉锡, 孟丹, 张玉瑶, 等. 甘草抗流感病毒作用的研究探讨[J]. 中医药信息, 2010, 27(1): 42-43.
- [10] 刘育辰, 陈有根, 王丹, 等. 甘草化学成分研究[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1251-1255.
- [11] 肖会敏, 何悦, 王四旺, 等. 四季抗病毒合剂的超快速液相色谱法指纹图谱研究及 4 个成分含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(3): 230-233.

【收稿日期】 2016-09-05 【修回日期】 2016-12-27

【本文编辑】 顾文华

(上接第 414 页)

4 讨论

本实验采用离子凝胶-干燥法, 利用海藻酸钠、壳聚糖和氯化钙 3 种物质制备肉苁蓉松果菊苷肠溶微球。海藻酸钠能与多价离子反应生成凝胶, 故海藻酸钠与氯化钙交联反应生成能够控制药物释放的凝胶。但肉苁蓉松果菊苷为水溶性药物, 仅用氯化钙和海藻酸钠反应制备的微球包封率极低。壳聚糖分子上有大量的伯氨基, 可以与海藻酸钠反应生成聚电解质复合物, 堵塞海藻酸钙骨架网眼, 从而可大大提高包封率。

本研究通过 Box-Behnken 的中心组合设计及响应面分析建立回归模型, 经分析得最佳工艺参数。在最优条件下, 进行 3 次验证试验, 测得包封率分别为 88.93%、89.17%、88.96%, 平均值为 89.02%。与理论值相比, 相对误差为 0.32%, 且重复性好, 证明优化结果可靠。此外, 体外释放试验表明, 药物在 pH=1.2 盐酸介质中不易释放, 主要在 pH=6.8 PBS 介质中释放, 且具有较好的缓释作用。但由于其为体外释放数据, 故肉苁蓉松果菊苷肠溶微球在体内的缓释效果还有待于进一步的研究。

【参考文献】

[1] 颜贵卉, 田金虎, 龙本文, 等. 肉苁蓉中苯乙醇苷类成分的研

究进展[J]. 中南药学, 2012, 10(9): 692-695.

- [2] Yang F, Wen D, Fang B, et al. Prevention of *Cistanche salsa* extract on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats[J]. CHM, 2013, 5(3): 199-204.
- [3] Zhang D, Li H, Wang JB. Echinacoside inhibits amyloid fibrillization of HEWL and protects against A β -induced neurotoxicity[J]. Int J Biol Maromol, 2015, 72: 243-253.
- [4] 罗光明, 黄远亮. 肉苁蓉松果菊苷药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(17): 58-60.
- [5] Li F, Yang X, Yang Y, et al. Phospholipid complex as an approach for bioavailability enhancement of echinacoside [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2015, 41(11): 1777-1784.
- [6] 天津市弗兰德医药科技发展有限公司. 一种肉苁蓉提取微丸及其制备方法[P]. CN101444558. 2009-06-03.
- [7] Li M, Li Y, Liu W, et al. The preparation of *Cistanche* phenylethanoid glycosides liquid proliposomes: Optimized formulation, characterization and proliposome dripping pills *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. Eur J Pharm Sci, 2016, 93: 224-232.
- [8] 李蒙, 付艳秋, 韩静, 等. 响应面法优化肉苁蓉苯乙醇苷回流提取工艺[J]. 中南药学, 2015, 13(8): 819-823.
- [9] 成杰, 杨鹏飞. 紫外分光光度法测定哈萨克斯坦产肉苁蓉中苯乙醇总苷的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(10): 633-633.

【收稿日期】 2016-11-25 【修回日期】 2017-04-05

【本文编辑】 顾文华