

计时,以小鼠头部没入水中 10 s 后不能浮出水面为体力耗竭,即刻计时,为小鼠游泳时间。结果显示太子产宁组能使小鼠游泳时间延长,与对照组相比,差异具有显著性,见表 1。

2.2 对失血性小鼠的补血作用^[2] 取健康小鼠 40 只,♂♀各半,随机分组,剪去鼠尾约 0.5 cm,使小鼠出血约 0.5 mL,同时测 Hb 和 RBC,失血 24 h 后再测 Hb 和 RBC,然后经胃给药, bid, 连续 7 d,于第 8 天采血测血红蛋白 Hb 和红细胞 RBC。结果:失血后小鼠的血红蛋白 Hb 和红细胞 RBC 明显低于

表 2 太子产宁和生化汤对失血小鼠红细胞数与血红蛋白的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Hb and RBC of Taizichanning mixture on bleeding mice($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 /n	剂量 /g·Kg ⁻¹	红细胞/T·L ⁻¹			血红蛋白/g·L ⁻¹		
			失血前	失血后 24 h	失血后 192 h	失血前	失血后 24 h	失血后 192 h
对照组	10	-	7.2±0.7	6.7±0.5	6.9±0.8	137.4±11.7	112.8±8.2	117.2±19.1
生化汤组	10	6	7.4±1.3	6.4±1.1	7.2±1.3 ^a	146.9±27.7	121.4±17.8	128.6±29.6 ^a
太子产宁组	10	6	7.6±0.6	6.5±0.5	8.1±0.6 ^b	145.2±11.1	119.3±8.4	141.5±12.1 ^b
	10	12	7.2±0.5	6.5±0.6	8.2±1.0 ^b	140.6±13.1	115.6±17.9	147.1±18.0 ^b

注:与对照组相比, ^aP>0.05, ^bP<0.01

2.3 对小鼠出血时间的影响^[2] 取(20±2)g 健康小鼠 30 只,♂♀各半,随机分成给药组和对照组,给药组灌服药物 4 d,对照组灌服等量生理盐水,末次给药后 15 min,测得小鼠断尾出血时间,结果显示,太子产宁组与对照组比较,出血时间缩短,差异具有极显著性,见表 3。

表 3 太子产宁和生化汤对小鼠出血时间的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effect of Taizichanning mixture on BT in cut tail mice($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	剂量/g·kg ⁻¹	出血时间/min
对照组	10	-	25.9±6.0
生化汤组	10	6	18.9±6.2 ^a
太子产宁组	10	6	13.8±5.4 ^b
	10	12	12.9±4.6 ^b

注:与对照组相比, ^aP<0.05, ^bP<0.01

3 讨论

本实验结果表明,太子产宁合剂具有补气生血及缩短出血作用,太子产宁合剂能延长小鼠的游泳

表 1 太子产宁和生化汤对小鼠游泳时间的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of Taizichanning mixture on swimming time($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	剂量/g·kg ⁻¹	游泳时间/min
对照组	10	-	5.0±3.4
生化汤组	10	6	6.1±6.0 ^a
太子产宁组	10	6	7.65±6.7 ^b
	10	12	11.5±7.5 ^b

注:与对照组相比, ^aP>0.05, ^bP<0.01

失血前,太子产宁组与对照组比较,有非常显著性提高,且 12 g·kg⁻¹较 6 g·kg⁻¹有稍强作用,见表 2。

时间,具有抗疲劳作用;对失血性血虚小鼠有一定养血作用,并能明显加快 Hb 和 RBC 的恢复且有所增加;能明显缩短小鼠出血时间和凝血时间,实验阳性组用生化汤作对照,其依据是生化汤是一传统治疗产后出血经验方,太子产宁既能补气,又可明显升血止血,且作用强于生化汤,这些为太子产宁在临床治疗中提供了实验依据,可验证中医治法上补气益血必然会摄血固冲、精血俱旺,气机血脉畅通,月经恢复正常的功能,亦为临床运用中药方剂、异病同治开辟了思路。

参考文献:

- [1] 左言富. 简明中成药辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002. 184 182.
- [2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 780 781, 1014 1012.

[收稿日期] 2005 08 04

苦参碱壳聚糖微球的制备及体外释药

张艳华^{1,2}, 魏玉辉¹, 刘志红³, 武新安¹ (1. 兰州大学第一医院药剂科, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000; 3. 厦门大学化工学院, 福建 厦门 361005)

[摘要] 目的:以壳聚糖为囊材制备苦参碱结肠靶向给药微球及评价其体外释药情况。方法:用乳化化学交联法制备微球,以微球的粒径分布百分数、载药量及包封率为优化指标对影响微球制备的主要因素用正交试验设计优化制备条件;并对最佳制备工艺制得的微球进行 3 种不同递质(人工胃液、人工肠液及大鼠结肠液)中的体外释放度评价。结果:制得的苦参碱壳聚

[基金项目] 甘肃省自然科学基金(编号 ZS0004 A23 073 Y) [作者简介] 张艳华,女,硕士研究生, E mail: zhangyh3@sina.com [通讯作者] 武新安,男,博士,教授,电话: 0934 8616392, E mail: wuxinan@hotmail.com

糖微球在电镜下,球形表面圆整,粒径分布适宜,微球平均粒径为 $(68.3 \pm 2.7) \mu\text{m}$,平均载药量为 $(16.0 \pm 0.5)\%$,平均包封率为 $(66.3 \pm 4.2)\%$ 。苦参碱壳聚糖微球在人工胃液中 2 h 不释药;在人工肠液中 4 h 内释放不到 1%,96 h 释药不到 10%;在含大鼠结肠内容物的磷酸盐缓冲液(pH 6.8)中 4 h 释放 10%左右,36 h 释药近 50%,此后释药趋于缓慢,96 h 释药近 80%。结论:苦参碱壳聚糖微球几乎不在上消化道释药,而是在结肠靶向释药。

[关键词] 苦参碱;壳聚糖;微球;制备;释放度

[中图分类号] R944.9 [文献标识码] A [文章编号] 1004-5213(2006)03-0307-04

Preparation and in vitro evaluation of chitosan microspheres containing matrine

ZHANG Yan hua^{1,2}, WEI Yu hui¹, LIU Zhi hong³, WU Xin an¹ (1. Department of pharmacy, First Hospital of Lanzhou University, Gansu Lanzhou 730000, China; 2. College of Pharmacy, Lanzhou University, Gansu Lanzhou 730000, China; 3. Department of Chemistry, Xiamen University, Fujian Xiamen 361005, China)

ABSTRACT; OBJECTIVE To prepare the chitosan microspheres containing matrine for the colon specific drug delivery and evaluate its release in vitro. **METHODS** The chitosan microspheres containing matrine were prepared by emulsion-chemical crosslink technique. The better preparation procedure with respect to particles size distribution, embedding rate and drug loading were optimized by the orthogonal experimental design. *In vitro* drug release were carried out in the artificial gastric artificial intestinal and the phosphate buffered saline (pH 6.8) containing rat colon contents. **RESULTS** The chitosan microspheres containing matrine was shown to have good spherical geometry, a smooth surface and suitable size distribution under scanning electron micrographs. Average diameter of microspheres was $(68.3 \pm 2.7) \mu\text{m}$, drug loading was $(16.0 \pm 0.5)\%$, embedding rate $(66.3 \pm 4.2)\%$. Little release and a little release of matrine from the microspheres were observed in the artificial gastric juice and in the artificial intestinal juice, respectively. However, the release of matrine was markedly increased in the phosphate buffered saline (pH 6.8) containing rat colon contents which was near to 10%, 50% and 80% at 4 h, 36 h and 96 h, respectively. **CONCLUSION** These findings suggest that the chitosan microspheres containing matrine may be useful a dosage form for colon specific drug delivery.

KEY WORDS matrine; chitosan; microspheres; preparation; drug release

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种尚未明确病因的非特异性炎性肠病,目前对它的治疗均不尽人意^[1]。我院用苦豆子总碱灌肠液治疗溃疡性结肠炎,临床疗效良好,不良反应少,但使用不便。苦豆子总碱中的主要有效成分是苦参碱(matrine),它具有显著的抗炎、抗溃疡及免疫调节作用,新近研究又发现其可抑制细胞分泌致炎因子^[2]。基于药理作用特点及我院苦豆子总碱的疗效,我们以苦参碱为模型药物,来研制便于临床使用的治疗溃疡性结肠炎的新剂型。

口服结肠定位给药系统(oral colon specific drug delivery system, OCSDDS)是目前国际上研究的热点之一,其对治疗结肠局部病变具有重要意义。目前已有多种 OCSDDS 类型及结肠靶向材料问世^[3],而壳聚糖为最广泛使用的缓控释材料之一,其易被结肠细菌酶降解,作为结肠靶向给药的材料具有较高的专属性,故本实验用乳化化学交联法,以壳聚糖为囊材试制苦参碱微球,旨在研制出特异性高的结肠靶向给药系统用于治疗溃疡性结肠炎。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器 壳聚糖(中科院兰州化学物理研

究所,脱乙酰度 80%);苦参碱(宁夏紫荆花制药有限公司,批号 030316,含量: $> 98\%$);Span 80(上海申宇医药化工有限公司,批号 020904);乙腈(山东禹王实业有限公司禹城化工厂,批号 040518);25%戊二醛溶液(天津市科密欧化学试剂开发中心,批号 031012);其他试剂均为分析纯。PERKIN ELMER (USA)高效液相色谱系统(series 2001C 泵, Diode Array Detector 235C 型检测器, PENELSON 数据处理器);光学显微镜(Olympus, 日本);JSM-5600LV 低真空扫描电子显微镜(日本电子光学公司);RG 3B 药物溶出仪(天津大学无线电厂)。

1.2 方法

1.2.1 用乳化化学交联法制备苦参碱壳聚糖微球

称取壳聚糖加入 5%的醋酸溶液中待其溶胀后,搅拌使溶解,抽滤,弃去不溶物,滤液静置,去气泡,备用。称取苦参碱溶于一定浓度的壳聚糖溶液中作为乳剂的内相。将苦参碱壳聚糖溶液逐滴加入含 Span 80 的油相中,以一定速度搅拌,乳化 30 min 后,逐滴加入 25%戊二醛饱和的甲苯溶液 3 mL,30 min 后再逐滴加入一定量 25%戊二醛溶液交联固化 90 min,停止搅拌,静置使微球沉降。倾取上层制

备液, 所得微球依次用乙醚、乙酸乙酯、甲醇洗涤 3 次, 抽滤, 收集洗液, 并与制备液合并后用于外漏苦参碱的测定。所得微球干燥, 用电子分析天平精密称重并记录。

1.2.2 用正交试验设计法优化制备工艺 为了优

表 1 正交试验因素与水平

Tab 1 Orthogonal factors and levels

因素	A 油相种类	B 乳化剂用量 /g·mL ⁻¹	C W/O 体积比 /g·mL ⁻¹	D 壳聚糖浓度 /%	E 苦参碱 /壳聚糖(质量比)	F 搅拌速度 /r·min ⁻¹	G 固化剂用量 /mL
水平 1	液状石蜡	0.75%	1:10	2	1:2	600	3
水平 2	液状石蜡/轻质液状石蜡(1:1)	1%	1:8	2.5	1:3	800	4
水平 3	轻质液状石蜡	1.25%	1:5	3	1:4	1000	5

1.2.3 正交试验设计数据的评价 以微球的粒径分布百分数、载药量及包封率为优化指标筛选苦参碱微球的最佳制备工艺。微球粒径用光学显微镜测定^[5], 选择 20~120 μm 的微球百分数作为评价指标之一。由于用戊二醛交联的壳聚糖微球极难溶于常用溶媒, 包括强酸, 故用 HPLC 法^[6] 测定递质中苦参碱的含量, 以此推算出微球内的含药量, 并计算微球的载药量及包封率:

$$\text{载药量} = [(\text{投药总量} - \text{递质中的药量}) / \text{微球的总重量}] \times 100\%$$

$$\text{包封率} = [(\text{投药总量} - \text{递质中的药量}) / \text{投药总量}] \times 100\%$$

1.2.4 微球体外释放度的测定 根据中国药典 2000 年版二部附录释放度测定法中第二法进行测定。用 3 种递质分别测定微球的释放度, 递质一: 人工胃液; 递质二: 人工肠液; 递质三: pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中加入大鼠结肠内容物。精密称取壳聚糖

化制备工艺, 根据预试验的结果及参考相关文献^[4], 选取对微球性质影响最明显的七个因素为考察对象, 每个因素设三个水平, 根据正交试验设计原理选取 L₁₈(3⁷) 正交试验表进行实验, 同一试验重复两次。试验因素及水平见表 1。

微球, 分别在递质一、递质二、递质三中进行释放度测定, 转速 100 r·min⁻¹, 温度(37.0±0.1) °C, 于设定时间取样, 同时补加相同量的稀释液。用 HPLC 法测定释放液中的苦参碱浓度, 计算苦参碱的累计释放百分数。

2 结果

2.1 正交设计试验结果 对重复制得的两批微球, 取其载药量、包封率及粒径分布百分数的平均值, 依据 3 个优化指标给出一个综合值, 来评价试验结果。正交试验结果见表 2。由以上正交设计试验的结果可知, 各因素对微球性质影响的大小顺序为: E>C>A>D>G>B>F。最终得到制备苦参碱壳聚糖微球的最优工艺为 A₁B₂C₃D₃E₁F₂G₂。

2.2 最佳工艺的重复性 以选定的最佳工艺制备 6 批微球, 测得其平均载药量为(16.0±0.5)%, 包封率为(66.3±4.2)%, 粒径为(68.3±2.7)μm, 粒子分布百分数如图 1。并用低真空扫描电子显微镜

表 2 正交设计试验结果

Tab 2 Orthogonal design and result

	A	B	C	D	E	F	G	载药量	包封率	粒径分布	综合指标
1	1	1	1	1	1	1	1	11.72	52.58	80.85	72.79
2	1	2	2	2	2	2	2	8.35	52.64	66.60	61.42
3	1	3	3	3	3	3	3	6.94	61.15	72.05	63.5
4	2	1	1	2	2	3	3	4.95	31.54	81.20	46.35
5	2	2	2	3	3	1	1	5.76	45.51	56.55	49.37
6	2	3	3	2	2	1	1	14.57	75.32	72.40	91.16
7	3	1	2	1	3	2	3	4.09	37.30	74.59	47.54
8	3	2	3	2	1	3	1	16.72	81.46	84.50	99.79
9	3	3	1	3	2	1	2	11.58	72.20	72.30	80.09
10	1	1	3	3	2	2	1	12.52	76.28	72.75	84.45
11	1	2	1	1	3	3	2	6.73	53.78	85.40	62.51
12	1	3	2	2	1	1	3	13.50	68.36	76.70	83.83
13	2	1	2	3	1	3	2	11.75	59.24	72.55	74.19
14	2	2	3	1	2	1	3	4.92	52.09	81.20	54.16
15	2	3	1	2	3	2	1	0.94	8.15	84.55	26.05
16	3	1	3	2	3	1	2	4.67	47.22	71.50	51.10
17	3	2	1	3	1	2	3	15.44	64.54	67.30	84.39
18	3	3	2	1	2	3	1	4.33	27.93	62.55	38.72
K ₁	428.50	376.42	372.18	366.88	506.15	391.34	371.17				
K ₂	341.28	411.64	355.07	368.54	365.19	395.01	420.47				
K ₃	401.63	383.35	444.16	435.99	300.07	385.06	379.77				
R	87.22	35.22	89.09	69.11	206.08	9.95	49.3				

G=1171.41

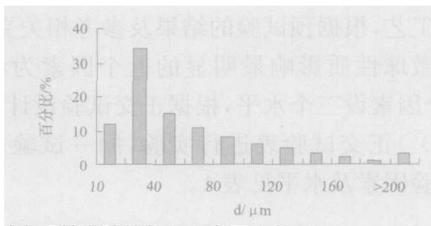


图 1 苦参碱壳聚糖微球的粒径分布百分数

Fig 1 Particle size distribution of matrine loaded chitosan microspheres.

扫描观察微球形态, SEM 照片显示所得微球分散性良好, 粒径分布适宜, 表面光滑、致密、无裂隙及孔洞、球形圆整。微球的 SEM 照片见图 2。结果显示微球制备工艺稳定, 重现性良好。

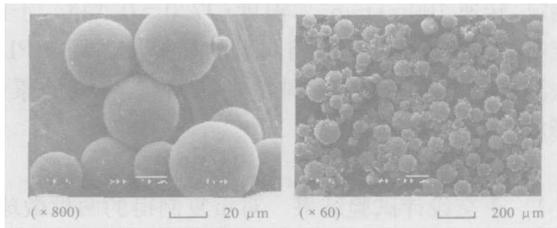


图 2 苦参碱壳聚糖微球的扫描电镜图

Fig 2 Scanning electron micrographs of chitosan microspheres containing matrine.

2.3 微球体外释放度测定结果 在人工胃液中苦参碱壳聚糖微球 2 h 无释放; 在人工肠液中 4 h 释药不到 1%, 96 h 释药不到 10%; 在大鼠结肠内容物中未见突释现象, 4 h 只释放 10% 左右, 此后释放明显增加, 36 h 释药 50% 左右, 而后释药缓慢, 96 h 释药近 80%。释放曲线见图 3。

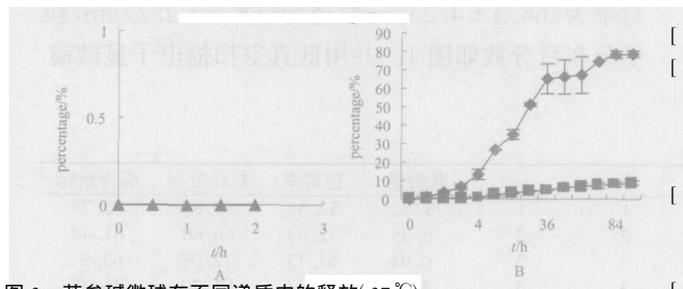


图 3 苦参碱微球在不同递质中的释放 (37°C)

A. ▲人工胃液; B. ■人工肠液; ◆大鼠结肠内容物溶液 (n=2)

Fig 3 The release profile of matrine from cross-linked chitosan microspheres in medium at 37°C.

A. ▲artificial gastric juice; B. ■artificial intestinal juice; ◆colon contents of rat (n=2)

3 讨论

本实验曾试图选择植物油作为油相, 但因植物油易被苦参碱皂化, 使乳滴易合并、破裂, 所制得的微球易粘连、粒径大小悬殊、分散性差, 故依据 thanoo 等报道的方法^[7], 即: 选取轻质和重质液蜡作为油相。戊二醛交联壳聚糖是一个瞬间反应, 当戊二

醛水溶液被分散在乳剂中时, 瞬间与壳聚糖产生交联, 但因分散不均匀, 使所得的微球几何形状差, 表面粗糙。为了获得外观良好的微球, 用戊二醛饱和的甲苯溶液来诱导交联。由于戊二醛饱和的甲苯可在油相中均匀分散, 可使戊二醛均匀分布于乳滴表面, 产生均匀交联使乳滴变硬形成球形, 此时, 再加入戊二醛进一步交联, 坚硬的球体即可获得^[8]。

由于制备的壳聚糖微球, 在强酸等溶剂中都很难溶解, 即使采取消解方式, 也不能消解完全^[9], 故本实验采取间接反推法来测定微球中所含药量。体外释药试验显示, 微球在上消化道不释放, 可结肠靶向。依据 Watts 等的研究^[10], 药物通过升结肠的转运率和其载体的粒径相关, 大粒径的颗粒比小粒径的移动较快, 所以制成粒径较小的微球可增长药物在升结肠的保留时间, 有望延长药物释放时间, 有利于药物最大限度的释放。

本试验用乳化化学交联法制备的苦参碱壳聚糖微球能特异性地在结肠部位缓慢释放苦参碱, 从而有望用于溃疡性结肠炎的治疗。

参考文献:

- [1] 杨君, 金岩, 何丽媛. 溃疡性结肠炎的药物治疗[J]. 辽宁药物与临床, 2004, 7(1): 41-43.
- [2] 邱耕, 涂植光, 李晓文. 苦参碱对内毒素致炎大鼠 PLA₂ 活性影响及其抗炎机制研究[J]. 中草药, 2002, 33(7): 630-632.
- [3] Reddy SM, Sinha VR, Reddy DS. Novel oral colon specific drug delivery systems for pharmacotherapy of peptide and non-peptide drugs[J]. Drugs of Today, 1999, 35(7): 537.
- [4] 王亚敏, 石庭森. 顺铂壳聚糖微球制备工艺的研究[J]. 军事医学科学院院刊, 1996, 20(3): 195-198.
- [5] 中国药典. 二部[S]. 2000. 附录 77.
- [6] Xinan Wu, F Yamashita, Xingguo Chen, et al. Determination of matrine in rat plasma by High performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetics studies[J]. Talanta, 2003, 59: 965-971.
- [7] BC Thanoo, MC Sunny, A Jayakrishnan. Controlled release of oral drugs from cross linked polyvinyl alcohol microspheres[J]. J. Pharm. Pharmacol, 1993, 45: 16-20.
- [8] B. chithambaka Thanoo, M. C. Sunny, A. Jayakrishnan. Cross linked chitosan Microsphere: Preparation and Evaluation as a Matrix for the Controlled Release of Pharmaceuticals[J]. J. Pharm. Pharmacol, 1992, 44: 283-286.
- [9] 郑爱萍, 刘海宏, 李宏斌, 等. 5-氟尿嘧啶壳聚糖微球的制备及体外释放特性[J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(4): 318-323.
- [10] P. J. Watts, L. Barrow, K. P. Steed, et al. The transit rate of different sized model dosage forms through the human colon and the effects of lactulose induced catharsis[J]. International Journal of Pharmace, 1992, 87: 215-221.

[收稿日期] 2004-04-28