

# 汉防己甲素壳聚糖微球的制备和质量研究

程国华<sup>1</sup>, 赵鑫<sup>2</sup>, 黄荣林<sup>2</sup> (1. 广州医学院附属肿瘤医院, 广州 510095; 2. 广东轻工职业技术学院, 广州 510300)

**摘要:**目的 对汉防己甲素壳聚糖微球的制备工艺和制得的微球的质量进行研究。方法 以壳聚糖为载体, 采用乳化交联法制备汉防己甲素壳聚糖微球。在单因素考察的基础上, 利用正交试验设计优化汉防己甲素壳聚糖微球制备工艺, 并对制得微球的粒径, 形态, 工艺重复性, 稳定性, 体外突释情况等进行研究。结果 制得的微球的形态圆整, 微球的平均粒径为  $(9.73 \pm 1.34) \mu\text{m}$ , 粒径在  $9 \sim 12 \mu\text{m}$  的占总数的 85% 以上, 载药量为  $(32.21 \pm 3.21)\%$ , 包封率为  $(40.33 \pm 5.32)\%$ , 最佳工艺条件重

基金项目: 广州市科技局项目 (2006Z3-E4121)

作者简介: 程国华, 男, 博士, 主任药师

Tel: (020) 83598100

E-mail: ghcheng661203@126.com

复性良好。结论 筛选的最佳处方工艺可制备性质优良的微球。

关键词:汉防己甲素;壳聚糖;微球;制备工艺;正交设计

中图分类号:R931.6 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2008)01-0047-04

## Preparation and Characteristics of Tetrandrine Chitosan Microspheres

CHENG Guo-hua<sup>1</sup>, ZHAO Xin<sup>2</sup>, HUANG Rong-lin<sup>2</sup> (1. Tumor Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510095, China; 2. Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare tetrandrine chitosan microspheres, and evaluate its characteristics. **METHODS** The microspheres were prepared by emulsion chemical cross-linking method using chitosan as wall material. Based on the result of single-factor selecting experiment, the preparation methods were evaluated by orthogonal experiment method. The mean diameter and the size distribution of microspheres, the drug loading, the envelop efficiency; the reproducibility of pharmaceutical technology and the stability of optimized microspheres were examined. **RESULTS** The tetrandrine chitosan microspheres were regular in their morphology. The average particle size of microspheres was  $(9.73 \pm 1.34) \mu\text{m}$ , with over 85% of the microspheres being in the range of 9 ~ 12  $\mu\text{m}$ ; The drug loading and their envelop efficiency were  $(32.21 \pm 3.21)\%$  and  $(40.33 \pm 5.32)\%$ , respectively. The reproducibility and stability of pharmaceutical technology was good. **CONCLUSION** The optimized preparation could prepare good qualities of tetrandrine chitosan microspheres.

**KEY WORDS:** tetrandrine; chitosan; microspheres; preparation; orthogonal experiment

汉防己甲素(粉防己碱, tetrandrine, TET),是从防己科植物防己根中提取的双苄基异喹啉类生物碱之一。长期的临床研究和实验已证明,汉防己甲素在治疗高血压和抗肿瘤方面有着良好的治疗作用<sup>[1]</sup>。由于汉防己甲素几乎不溶于水,临床所用制剂的溶解度不好,生物利用度低,不良反应大,患者的顺应性也差。而采用微球作为药物载体,静注后粒径适宜地微球即被肺毛细血管床机械滤过而具有肺靶向性,药物从微球中释放后浓集于靶区,达到提高疗效,降低不良反应的目的<sup>[2]</sup>。壳聚糖是甲壳素(chitin)经过脱乙酰化制得的,其所具有的生物可降解性、生物相容性、分解产物无毒性等一系列优点成为常用的微球载体材料<sup>[3]</sup>。本实验制备采用壳聚糖制备汉防己甲素并对其进行质量研究,为开发此药提供实验基础。

### 1 材料与仪器

TGI 6A-WS台式高速离心机(湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司);电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);L-1000显微镜(广州光学仪器厂);UV757CRT紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);RW20.n悬臂式搅拌机(广州仪科实验室技术有限公司)。

壳聚糖(脱乙酰度 > 80%, 80目,浙江磐安壳聚糖厂);汉防己甲素(陕西西安山川生物技术有限公司,批号:20060213,含量 > 98%);液状石蜡(天津市津沽工商实业公司);25%戊二醛(广东汕头西陇化工厂);其余试剂均为分析纯,纯化水为实验室自制。

### 2 方法和结果

#### 2.1 乳化-溶剂挥发法制备微球

采用乳化-化学交联法制备汉防己甲素壳聚糖微球。称取壳聚糖细粉加入醋酸溶液中溶胀,形成3%的壳聚糖的醋

酸溶液,再依次将NaCl和汉防己甲素适量溶于其中至完全溶解,作为水相;称取司盘0.3g,加入25mL液状石蜡中,作为油相;将水相油相按1:8比例混合于100mL烧杯中,1200r·min<sup>-1</sup>高速搅拌使其形成稳定的W/O乳剂,再逐渐滴加25%的戊二醛1mL,交联固化3h,停止搅拌。所得初产品用无水乙醚洗涤,再用丙酮脱水,于70℃常压干燥3h即得棕黄色微球粉末。

#### 2.2 微球载药量及包封率的测定

**2.2.1** 采用紫外分光光度法进行测定<sup>[4]</sup> 精密称取汉防己甲素对照品(广州市药检所提供),加入稀醋酸溶液,配制成浓度为30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的溶液,过滤,在波长200~600nm内扫描,溶液在波长279.0nm处有最大吸收,而辅料采用上述方法处理后,在此波长下无吸收,故用279.0nm作为检测波长。

**2.2.2** 标准曲线的建立 配制汉防己甲素对照品系列溶液,使其浓度分别为10.02, 20.04, 30.06, 40.08, 60.10, 80.16  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,按上述方法处理后,在279.0nm波长处测定吸收度,将相应的数据进行回归,得标准曲线  $A = 0.0092c - 0.026$  ( $c, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $R^2 = 0.9991$ ),汉防己甲素浓度在10.0~80.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内与吸收度呈良好的线性关系,方法回收率符合要求。

**2.2.3** 载药量和包封率的测定 精密称取微球粉末适量,置于研钵中加少许稀醋酸充分研磨,至成乳状液,然后转移到50mL量瓶中,并用稀醋酸少量多次清洗研钵,合并洗液于量瓶中,再用稀醋酸定容到刻度,摇匀,用微孔滤膜过滤,弃去初滤液,取续滤液用紫外可见分光光度计在波长279.0nm处测定吸光度,按下列公式计算载药量和包封率。

$$\text{载药量} = \frac{\text{微球中药物的质量}}{\text{称取的微球质量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{微球中药物质量}}{\text{投入的总药量}} \times 100\%$$

**2.2.4 粒径的测定** 取微球产品适量置载玻片上,用光学显微镜观察不少于 200 个微球,并将粒径范围划分为若干个单元,计算平均粒径  $D_{av}$ ,绘制粒径分布图。

### 2.3 单因素考察汉防己甲素壳聚糖微球制备工艺

**2.3.1 乳化剂浓度对微球质量的影响** 固定汉防己甲素和壳聚糖的重量比、水相和油相的体积比、壳聚糖浓度以及其他工艺参数,改变乳化剂的用量,使乳化剂的浓度分别为 6%, 11%, 17%, 分别制备微球,制得的微球的载药量和包封率随着乳化剂用量的增多,先增加后减少;乳化剂为 11% 时微球镜检时具有较好的分散性和圆整度。

**2.3.2 交联剂用量对微球质量的影响** 固定汉防己甲素和壳聚糖的重量比、水相和油相的体积比、壳聚糖浓度以及其他工艺参数,改变交联剂的用量,使交联剂的用量分别为 1, 2, 3 mL, 分别制备微球。交联剂用量为 1 mL 时,微球含药量、包封率相对较低,微球部分黏结,圆整度差,球形较大;而戊二醛用量为 3 mL 时,微球含药量、包封率相对较高,但微球黏结严重,圆整度一般。

**2.3.3 搅拌速率对微球质量的影响** 固定汉防己甲素和壳聚糖的重量比、水相和油相的体积比、壳聚糖浓度以及其他工艺参数,改变搅拌速率,使其分别为 800, 1 200, 1 500, 1 800  $r \cdot \text{min}^{-1}$  分别制备微球。当转速为 1 200  $r \cdot \text{min}^{-1}$  时,所生成的微球成形时间短,微球圆整,包封效果较佳。搅拌速率低时,微球粘连现象严重,当转速增大到 1 800  $r \cdot \text{min}^{-1}$  时,微球圆整性差,包封率低。

**2.3.4 温度对微球质量的影响** 固定汉防己甲素和壳聚糖

的重量比、水相和油相的体积比、壳聚糖浓度以及其他工艺参数,改变制备温度,使其分别为 0, 15, 30  $^{\circ}\text{C}$ , 分别制备微球。当温度为室温时,制备的微球包封率较高,且微球形态圆整,粒径较为均一;当温度较低时,镜检微球粘连现象严重;30  $^{\circ}\text{C}$  水浴下进行分散交联的微球圆整性差,包封率也不高。

### 2.4 正交设计优化微球的制备工艺

考虑到诸多因素对微球形成和质量的影响,本实验在单因素考察的基础上,选取影响微球性质较显著的 4 个因素作为考察对象,即交联剂的用量、乳化剂的用量、搅拌速率、反应温度,以粒径、跨距、载药量、包封率为指标,通过  $L_9(3^4)$  正交设计试验优选出最佳工艺条件,见表 1。

表 1 正交设计水平因素表

level	Factor			
	Temperature	Rotation speed	Emulsify con.	Amount of glutaral
	A/ $^{\circ}\text{C}$	B/ $r \cdot \text{min}^{-1}$	C	D/mL
1	0	1 000	8%	1
2	15	1 200	11%	2
3	30	1 400	14%	3

汉防己甲素壳聚糖微球的质量可通过微球的载药量 (S1)、包封率 (S2)、粒径 (S3)、跨距 (S4) 等指标采用多指标全概率评分法来综合衡量<sup>[5]</sup>。本实验四个指标同等重要,互不相容,且粒径、跨距越小越优,载药量、包封率越大越优。评分越高,质量越好。由表 2 的实验结果分析表明,影响汉防己甲素壳聚糖微球质量的因素影响顺序为搅拌速率 (B) > 乳化剂浓度 (C) > 搅拌温度 (A) > 交联剂用量 (D),最佳实验方案为  $A_2 B_2 C_3 D_1$ , 即搅拌温度为 15 $^{\circ}\text{C}$ , 搅拌速率为 1200 rpm, 乳化剂浓度为 14%, 交联剂的用量为 1 mL。

表 2 正交实验结果表

Tab 2 Results of orthogonal designing test

NO.	A	B	C	D	Drug	Envelop	Average	Span	Qualities
					Loading/%	efficiencies/%	diameter/ $\mu\text{m}$		
1	1	1	1	1	24.6	31.9	17.0	1.83	21.2
2	1	2	2	2	30.3	36.2	7.4	0.82	50.9
3	1	3	3	3	25.7	27.2	5.2	1.35	34.2
4	2	1	2	3	28.1	22.1	8.3	0.75	34.4
5	2	2	3	1	35.9	40.5	10.7	0.52	60.5
6	2	3	1	2	19.2	22.2	6.5	1.32	21.7
7	3	1	3	2	23.5	34.1	15.4	1.01	32.1
8	3	2	1	3	22.8	24.3	9.5	0.64	31.2
9	3	3	2	1	15.0	18.2	8.3	0.95	15.4
$k_1$	35.43	29.23	24.70	32.37					
$k_2$	38.87	47.53	33.57	34.90					
$k_3$	26.23	23.77	42.27	33.27					
R	12.64	23.76	17.56	2.53					

### 2.5 优选后制备工艺重复性的考察

按正交试验结果得出的最优生产工艺条件,重复实验 3 次,通过对各指标的测定,考察微球制备工艺的重复性。

按最优生产工艺重复制备汉防己甲素壳聚糖微球 3 批,

所得微球的平均粒径为  $(9.73 \pm 1.34) \mu\text{m}$ , 粒径在 9~12  $\mu\text{m}$  的占总数的 85% 以上,平均载药量为  $(32.21 \pm 3.21)\%$ , 平均包封率为  $(40.33 \pm 5.32)\%$ , 说明优选制备工艺的重复性良好。

在光学显微镜下观察,制得的微球呈圆形,表面光滑圆整,分布均匀,不粘连,见图 1。

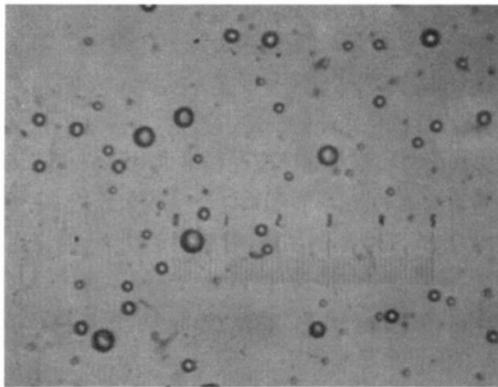


图 1 汉防己甲素壳聚糖微球显微照片 ( $\times 400$ )

**Fig 1** Optical microscope photo of tetrandrine chitosan microspheres ( $\times 400$ )

## 2.6 微球释放实验

采用动态透析法测定微球的体外释放。称取微球适量(约含 TET 100 mg),装入处理好的透析袋中,两端系紧,置于转篮中。以 100 mL 稀醋酸做为释药介质,在  $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ,  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下进行体外释药试验。分别于 10, 20, 30, 60, 120 以及 180 min 取出释药介质 5 mL,然后补加等量新鲜介质。将取出的释药介质经孔径为  $0.45 \mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤后取续滤液测定,由标准曲线计算药物浓度考察微球的体外突释情况。

微球在 3 h 体外释放平稳,无突释效应。见图 2。

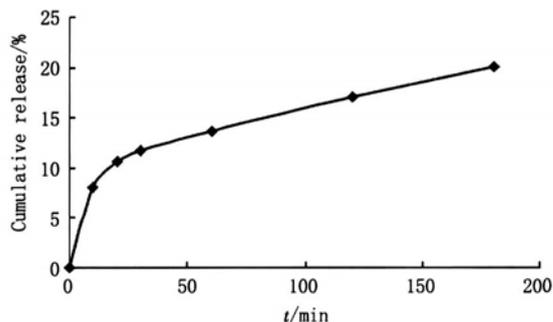


图 2 微球体外释药曲线

**Fig 2** Drug release curve of microspheres *in vitro*

## 2.7 微球稳定性的初步考察

将三批微球于室温下留样放置 3 个月,在放置前后分别记录外观变化,测定药物含量,粒径。

载药微球在室温,低温放样,其外观均无明显变化放置前后的微球药物含量(DL)和粒径( $D_{50}$ ),结果见表 3。经  $t$  检验,微球药物含量和粒径在留样前后均无显著性差异( $P > 0.05$ ),说明载药微球在室温下放置 3 个月,质量保持稳定。

## 3 讨论

**3.1** 在预实验的基础上,通过  $L_9(3^4)$  正交设计试验,考察了搅拌速率、乳化剂浓度、搅拌温度、交联剂用量对微球质量的影响,得到了重复性优良的最佳工艺条件。

表 3 汉防己甲素壳聚糖微球室温稳定性

**Tab 3** Stability of tetrandrine chitosan microspheres under ambient temperature

时间 /月	含量 /%			粒径 / $\mu\text{m}$		
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 1	No. 2	No. 3
0	32.12	29.32	30.12	9.7	10.2	10.7
1	31.43	29.75	33.12	10.3	9.5	11.2
2	31.55	30.50	32.45	9.2	10.2	9.8
3	31.35	30.41	31.38	10.1	10.8	10.8

**3.2** 在制备汉防己甲素壳聚糖微球时,应选择适宜的搅拌速率和温度。搅拌速率过慢时,形成微球的各辅料之间所受的剪切力较小,辅料分子间运动相对较慢,微球碰撞几率增加,容易相互粘连。搅拌速率过快时,体系中各辅料之间所受剪切力增大,分子间运动激烈,药物难于通过简单物理吸附,停留于基质中。而温度太低会阻碍壳聚糖分子之间的热运动;微球较难形成,而温度过高时,壳聚糖分子之间的约束力较小,分子运动激烈的缘故,药物又难于包裹其中。

**3.3** 在制备汉防己甲素壳聚糖微球时,需要使用适当的乳化剂和交联剂。乳化剂可以吸附于界面形成具有一定强度的界面膜,对乳滴起保护作用,乳滴在布朗运动下碰撞时不容易聚结。交联剂戊二醛主要是通过醛基与壳聚糖 2 位上的游离氨基结合,形成网状结构,而使其形成规整的固化形态,其用量也会影响所形成的微球质量。当用量太大时,固化剂与壳聚糖交联过度使形成的微球形态受损,粒径变小;用量不足时,固化剂与壳聚糖不能交联,形成的微球形庞大。

**3.4** 为了提高汉防己甲素的疗效,本实验研制了汉防己甲素壳聚糖微球,通过  $L_9(3^4)$  正交设计试验优选出最佳制备工艺条件,所得微球的各项质量指标良好,且微球粒径满足临床治疗要求。

## REFERENCES

- [1] LI F Q, LU B. Research of Tetrandrine pharmaceutical preparations [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 1999, 30(6): 475-477.
- [2] LU B. The new drug formulations and new technology(药物新剂型与新技术) [M]. Beijing: People's Health Press, 1998: 229-230.
- [3] ZHANG Z F, ZHOU J P, HUO M R. Chitosan microspheres drug delivery systems [J]. Prog Chem Sci(药学进展), 2006, (6): 263.
- [4] CHENG G H, JIAN X S, TAO T. Determination of tetrandrine content in tetrandrine microspheres [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2002, 25(10): 739-740.
- [5] WEI Y, LUO J Y. Preparation of TPP granules using multi-target orthogonal experiment and full probability scores [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1999, 24(5): 279-281.

收稿日期: 2007-09-14