

乳化外凝聚法制备姜油树脂海藻酸钠-壳聚糖微囊的工艺优化研究

刘利萍^{1*}, 毛威², 贾玉梅¹, 高雅丽¹

(¹ 绍兴文理学院化学化工学院, 绍兴 312000; ² 绍兴市药品检验所, 绍兴 312000)

摘要 目的: 优化姜油树脂海藻酸钠-壳聚糖微囊的制备工艺, 并对其稳定性进行考察。方法: 采用乳化外凝聚法制备微囊, 以微囊粒径和包封率为测定指标, 用均匀设计表 $U_{11}(11^6)$ 优选处方工艺; 影响因素实验考察微囊的稳定性。结果: 优化后的工艺条件为: 海藻酸钠浓度 2.0%、海藻酸钠与姜油树脂的质量比 3:1、 CaCl_2 浓度 1.0%、壳聚糖浓度 1.2%, 所得微囊外观形态良好, 平均粒径为 $842\ \mu\text{m}$ 、跨距为 0.14, 包封率为 $(69.82 \pm 1.05)\%$ 。微囊在高温、高湿和强光实验条件下, 载药量与外观形态稳定。结论: 在均匀设计所得优化条件下, 姜油树脂海藻酸钠-壳聚糖微囊的制备工艺重现性好, 微囊化是提高姜油树脂稳定性的有效方法之一。

关键词 姜油树脂; 海藻酸钠-壳聚糖微囊; 乳化外凝聚法; 均匀设计; 稳定性

中图分类号 R944 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2007)03-0229-04

Technology optimization of ginger oleoresin alginate-chitosan microcapsules prepared by emulsification external coacervation

LIU Li-ping¹, MAO Wei², JIA Yu-mei¹, GAO Ya-li¹

¹ College of Chemistry & Chemical Engineering, Shaoxing University, Shaoxing 312000;

² Shaoxing Institute for Drug Control, Shaoxing 312000, China

Abstract Aim: To optimize the preparation of the ginger oleoresin alginate-chitosan microcapsules and to study its stability. Methods: The microcapsules were prepared by emulsification external coacervation according to the uniform design arranged with $U_{11}(11^6)$ table. The mean diameter and drug entrapment ratio were determined as the evaluating indicator for the microcapsule formulation. Its stability was assessed by influence factors test. Results: The average diameter, span and entrapment ratio of microcapsules were $842\ \mu\text{m}$, 0.14 and $(69.82 \pm 1.05)\%$, respectively under the optimized conditions of 2.0% alginate sodium, 3:1 of the mass ratio of alginate sodium/ginger oleoresin, 1.0% calcium chloride and 1.2% chitosan. The stability test of the microcapsules showed no change of drug loading and shape under the experiment conditions of high temperature, humidity and strong light. Conclusion: It has good reproducibility to the preparation formulation of microcapsule optimized by the uniform design method. Microencapsulation is an effective measure to increase the stability of ginger oleoresin.

Key words ginger oleoresin; alginate-chitosan microcapsules; emulsification external coacervation; uniform design; stability

This study was supported by the Foundation of Educational Department of Zhejiang Province (No. 20041229)

通过超临界 CO_2 萃取法萃取姜科植物姜 (*Zingiber officinale* Roscoe) 根茎得到的姜油树脂是一种深棕色的油状黏稠液体, 姜酚 (gingerol) 是姜油树

脂的主要活性成分, 具有降血脂、健胃、抗溃疡、消炎镇痛及止吐等多种功效, 可作为其品质评价的主要指标^[1]。但是, 姜酚分子结构的 β -羟基酮使其化

* 收稿日期 2007-01-22 * 通讯作者 Tel: 0575-88813617 E-mail: llp@zscas.edu.cn

基金项目 浙江省教育厅基金资助项目 (No. 20041229); 绍兴市科技局科技计划资助项目 (No. 2005162)

学性质极不稳定,易分解成姜烯酚、姜酮及脂肪醛等物质,降低其药用价值。壳聚糖和海藻酸钠均是天然多糖,可通过静电自组装形成微囊,其制备条件温和,对敏感药物的性质影响较小^[2]。将姜油树脂进行微囊化可以提高姜酚的稳定性,掩盖刺激性,并使液态药物固态化。对姜油树脂的报道多集中在其药理作用和提取分离方法^[3,4],而有关微囊化的研究报道甚少。本文以海藻酸盐-壳聚糖为囊材,采用乳化外凝聚工艺并结合均匀设计法对姜油树脂微囊的制备处方进行优化,在此基础上考察姜油树脂微囊的稳定性,为姜油树脂的进一步开发应用提供依据。

1 材料和仪器

1.1 材料

姜油树脂(河南南阳张仲景现代中药发展有限公司,批号:2005001021);海藻酸钠(1%溶液黏度 ≥ 0.02 Pa.S(20℃),国药集团化学试剂有限公司,批号:F20050201);盐酸壳聚糖(脱乙酰度86.23%,浙江玉环县海洋生物化学有限公司,批号:HK05040614-1);香草醛(含量 $\geq 99.5\%$,中国医药集团化学试剂有限公司,批号:20050225);其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

SP-756P型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);Eclipse 80i型显微镜(日本尼康公司);BP121S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);Diamond型差热扫描分析仪(美国PE公司);SHH-100GD型药品强光照照射试验箱(重庆永生实验仪器厂)。

2 方法

2.1 姜油树脂微囊的制备

采用乳化外凝聚工艺制备姜油树脂微囊。按一定配比将海藻酸钠溶液、姜油树脂和少量增塑剂混匀并充分乳化后,用5.5号注射器将乳化液滴入到一定浓度的氯化钙溶液中固化30 min形成微囊,过滤并用蒸馏水洗涤微囊后将其转入壳聚糖溶液中孵化20 min,再用柠檬酸钠溶液置换微囊中过量的钙离子,最后用蒸馏水洗涤微囊,置40℃真空干燥12 h后备用。同法制备空白微囊。

2.2 姜油树脂中总姜酚含量测定

2.2.1 标准曲线绘制 由于未获得姜酚纯品,且香草醛和姜酚结构相似,二者的乙醇溶液在280 nm均有吸收峰(如图1所示),因此采用香草醛作为对照品^[5]。精密配制256 mg/L的香草醛乙醇储备液,并用乙醇稀释成不同浓度的标准溶液,在波长280 nm处测定吸收度A,并对浓度 c (mg/L)进行回归,得标准曲线为: $A = 0.0459c + 0.0001$ ($R^2 = 0.9994$, $n = 3$),在5.12~25.60 mg/L内线性良好。

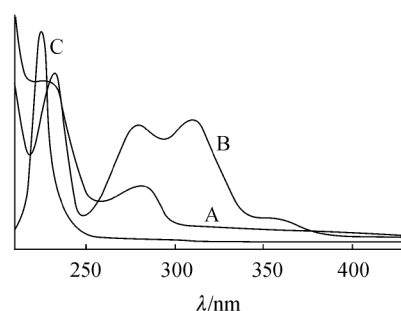


Fig.1 UV spectra of ginger oleoresin (A), vanillin (B) and blank alginate-chitosan microcapsule (C)

2.2.2 总姜酚含量测定 姜酚主要为6-,8-,10-姜酚的混合物,平均相对分子质量为304.46,香草醛相对分子质量为152.15,故姜酚与香草醛的换算系数为2.001,按照上述方法测得姜油树脂中总姜酚含量为 $(29.70 \pm 0.85)\%$ ($n = 3$)。

2.3 回收率测定

精密称取姜油树脂20 mg 3份,分别加入香草醛2.0 mg,混匀后按“2.2”项方法测定,计算得总姜酚的平均回收率为99.80%,RSD为0.86%($n = 3$)。

空白微囊的乙醇提取液的紫外扫描图谱如图1所示,在280 nm没有吸收峰。

分别配制低、中、高浓度的姜油树脂乙醇溶液,加入处方比例的空白微囊,用乙醇定容至25 mL量瓶中,超声20 min后,用0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液测定,计算姜酚的平均回收率为100.6%,RSD为0.32%($n = 3$)。

2.4 包封率测定

精密称取微囊20 mg(姜酚投料量为 m),加适量乙醇研磨并定量转移至25 mL量瓶中,密闭超声

20 min,用乙醇定容。溶液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液测定,计算微囊中姜酚含量 m_1 (g)。再称取同量的载药微囊置于 25 mL 量瓶中,用乙醇定容,振摇 1 min 后直接取样测定,计算微囊表面姜酚含量 m_2 (g)。则:

包封率 (%) = $(m_1 - m_2) / m \times 100\%$

2.5 微囊的形态观察和 DSC 测定

在光学显微镜下观察微囊的表观形态,测定 300 个微囊的定方向径,求算术平均值及跨距。

对姜油树脂、空白微囊、载药微囊进行差示扫描量热法(DSC)测定,根据图谱中各物质特征热力学峰位的迁移或消失说明囊心与囊材的相互作用。实验条件:温度 50~300 ℃、升温速率 10 ℃/min、氮气流保护、测样质量约 8~10 mg。

2.6 微囊稳定性研究

按照姜油树脂微囊的处方配比,精密称取姜油树脂与空白微囊充分混合,制得物理混合物备用。精密称取混合物与姜油树脂微囊各若干份于无色玻璃瓶中,根据《中国药典》2005 年版二部附录《药物稳定性试验指导原则》,分别于温度 40 ℃、60 ℃,湿度 75%、92.5% (25 ℃),光照强度 4 500 lx(25 ℃)条件下放置 10 d,进行热、湿度和光稳定性实验。于第 5 天和第 10 天取样,按照“2.4”项的方法测定残留姜酚含量,以 0 天的质量分数为 100% 做为基准,计算姜酚残留质量的相对百分率,并观察药物微囊的表观形态。

3 结果与讨论

3.1 姜油树脂微囊的制备工艺优化

根据单因素试验结果,将影响微囊形成的主要因素:海藻酸钠浓度 (X_1 , %)、海藻酸钠与姜油树脂的质量比 (X_2)、CaCl₂ 浓度 (X_3 , %) 和壳聚糖浓度 (X_4 , %) 作为考察因素,每个因素设计 10 个水平,采用均匀设计表 U₁₁(11⁶) 及使用表安排实验方案,考察不同实验条件下微囊的粒径 (Y_1) 和药物包封率 (Y_2 , %),实验安排与结果如表 1 所示。

应用 SPSS10.0 统计软件对微囊粒径和药物包封率进行多元逐步线性回归,分别得到回归方程:

$Y_1 = 844.78 - 152.22 X_4 + 68.15 X_1 X_4$,复相关系数 $R^2 = 0.927$, $S = 16.917$, $n = 10$, $F = 44.62 > F_{0.05}(2, 7) = 4.74$,回归显著。

$Y_2 = 69.12 - 2.49 X_2 + 10.03 X_4 + 0.96 X_1^2 - 6.66 X_4^2$,复相关系数 $R^2 = 0.983$, $S = 0.773$, $n = 10$, $F = 71.66 > F_{0.05}(4, 5) = 5.19$,回归显著。

Tab.1 Arrangement of U₁₁(11⁶) uniform design

No.	Factors				Mean size (Y_1 , μm)	Span	EE (Y_2 , %)
	X_1	X_2	X_3	X_4			
1	1	4:1	2	0.9	754.7	0.21	63.82
2	1	5:1	4	1.5	714.5	0.28	57.58
3	1.5	7:1	1	0.6	810	0.21	58.22
4	1.5	3:1	3	1.5	783.6	0.24	64.00
5	2	4:1	5	0.6	824.9	0.21	66.00
6	2	6:1	1	1.2	842.3	0.19	60.60
7	2.5	7:1	3	0.3	846.1	0.22	59.10
8	2.5	3:1	5	1.2	864.2	0.20	70.00
9	3	5:1	2	0.3	888.9	0.20	68.70
10	3	6:1	4	0.9	873.1	0.19	66.30

分析上述回归方程可知:影响微囊粒径的显著性因素是壳聚糖浓度 (X_4) 与海藻酸钠浓度 (X_1),当海藻酸钠浓度增大,得到的微囊粒径越大;当壳聚糖浓度增大会导致壳聚糖与海藻酸钠所形成的聚电解质复合物膜更加致密,从而使微囊粒径减小。对包封率有显著性影响的因素是海藻酸钠浓度 (X_1)、海藻酸钠与姜油树脂的质量比 (X_2) 以及壳聚糖浓度 (X_4),当海藻酸钠和壳聚糖浓度增大,海藻酸钠与姜油树脂的质量比减小时,药物的包封率提高。但是海藻酸钠浓度过大时,制得的微囊有拖尾现象。而 CaCl₂ 在所选择浓度范围内对微囊的粒径和包封率均无显著性影响。综合上述回归分析,得到微囊制备的优化条件为:海藻酸钠为 2.0%、海藻酸钠/姜油树脂质量比为 3:1、CaCl₂ 浓度为 1.0%、壳聚糖浓度为 1.2%,代入上述方程得到理论预测值分别为:微囊粒径为 $(825.68 \pm 33.16) \mu\text{m}$,包封率为 $(67.94 \pm 1.52)\%$ 。

3.2 优化工艺的验证

按照优化处方制备 3 批姜油树脂微囊,得到微囊表观形态如图 2。湿微囊球型圆整,表面光滑;干燥微囊大小均匀、无黏连,但干燥过程中脱水不均匀导致微囊表面有一定皱壁。测得微囊平均粒径为 842 μm、跨距为 0.14,包封率为 $(69.82 \pm 1.05)\%$,均在上述回归方程的理论预测值范围内。测得微囊的平均载药量以姜酚计为 $(5.64 \pm 0.08)\%$ 。

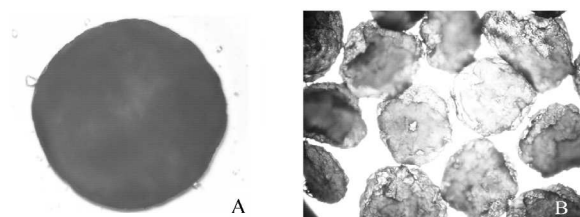


Fig.2 Optical micrograph of wet microcapsule (A) and dry microcapsule (B) with drug($\times 40$)

3.3 差热扫描图谱

由图 3 姜油树脂、空白微囊及载药微囊的 DSC 图谱可见,姜油树脂在 226 $^{\circ}\text{C}$ 有吸热蒸发峰,空白微囊在 219 $^{\circ}\text{C}$ 、256 $^{\circ}\text{C}$ 有两个放热峰,而载药微囊在 206 $^{\circ}\text{C}$ 、268 $^{\circ}\text{C}$ 有两个放热峰,这是载药微囊的物相变化所致,推知姜油树脂与囊材之间有强的分子间作用力和氢键形成。

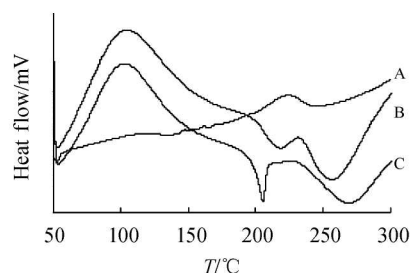


Fig.3 DSC curves of ginger oleoresin(A), blank microcapsule(B) and loading drug microcapsule(C)

3.4 稳定性

从表 2 实验数据可以看出,经过 10 d 稳定性实验,含药微囊中姜酚的含量基本保持不变且外表

Tab.2 Mean labeled percentage (%) of remnant gingerol in alginate-chitosan microcapsule and mixture in the stability experiments($n=3$)

Formulation	$t(\text{d})$	$T(^{\circ}\text{C})$		$E(\text{lx})$		Relative humidity (%)	
		40	60	4500	75	92.5	
Microcapsule	5	99.95	98.31	97.84	101.52	102.58	
	10	97.58	97.10	98.53	99.58	100.63	
Mixture	5	91.01	87.35	79.95	93.12	94.92	
	10	70.11	60.48	49.05	85.61	71.64	

Note: Contents of gingerol in microcapsule and mixture were $(5.64 \pm 0.08)\%$ and $(5.64 \pm 0.13)\%$, respectively at 0 day

形态稳定,而混合物中姜酚含量则明显降低,其中以光影响最为显著,其次是温度影响。对第 5 天、第 10 天的两组实验数据的配对 t 检验,均得到含药微囊和物理混合物有显著性差异($P \leq 0.05$)。再结合 DSC 的分析结果可推知,微囊化是提高姜油树脂稳定性的有效途径之一。

4 结 论

本文用乳化外凝聚法制备姜油树脂微囊,经均匀设计实验和 SPSS10.0 统计软件分析得到药物微囊制备的优化处方为:海藻酸钠浓度为 2.0%、海藻酸钠/姜油树脂质量比 3:1、 CaCl_2 浓度为 1.0% 和壳聚糖浓度为 1.2%,在该优化条件下制备的姜油树脂微囊呈球形且分散均匀,平均粒径和跨距分别为 842 μm 和 0.14,平均包封率为 $(69.82 \pm 1.05)\%$ 、载药量以姜酚计为 $(5.64 \pm 0.08)\%$ 。平均粒径和包封率均在回归方程的理论预测值范围内,说明制备工艺重现性好。DSC 和影响因素实验结果表明姜油树脂包裹于海藻酸钠/壳聚糖微囊中,其稳定性显著提高。

参 考 文 献

- [1] 黄雪松(Huang XS),宴日安(Yan RA),吴建中(Wu JZ). 姜酚的生物活性述评[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版)[J. Jinan Univ (Nat Sci Med Ed)], 2005, 26(3): 434-439.
- [2] Peniche C, Howland I, Carrillo O, et al. Formation and stability of shark liver oil loaded chitosan/calcium alginate capsules[J]. Food Hydrocoll, 2004, 18(5): 865-871.
- [3] Chrubasik S, Pittler MH, Roufogalis BD. Zingiberis rhizoma: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles[J]. Phytomedicine, 2005, 12(9): 684-701.
- [4] Balachandran S, Kentish SE, Mawson R. The effects of both preparation method and season on the supercritical extraction of ginger[J]. Sep Purif Technol, 2006, 48(2): 94-105.
- [5] 张明昶(Zhang MC),李健(Li J),蒙继昭(Meng JZ). 紫外分光光度法测定姜中姜辣素类化合物的含量[J]. 贵州医药(Guizhou Med J), 2003, 27(3): 283-284.