doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.03.015

蒜氨酸微丸 - 蒜酶肠溶双层片制备工艺优选及体外抗肿瘤作用评价*

方奕巍[1],朱文涛[2],陈金明[1△]

(1. 赣南医学院第一附属医院,江西 赣州 341000; 2. 江西青峰药业有限公司,江西 赣州 341000)

摘要:目的 优选蒜氨酸微丸 - 蒜酶肠溶双层片的制备工艺,并评价其体外抗肿瘤作用。**方法** 以蒜氨酸的累积释放率为评价指标,以崩解剂种类和用量、肠溶衣用量及微晶纤维素(MCC)与蒜氨酸的质量比为考察因素,采用单因素试验优选蒜氨酸微丸的制备工艺;以大蒜辣素产率为评价指标,以蒜酶层中 MCC 的用量、包衣温度为考察因素,采用单因素试验优选蒜氨酸微丸 - 蒜酶肠溶双层片的制备工艺;采用噻唑蓝比色法评价不同质量浓度蒜氨酸微丸 - 蒜酶肠溶双层片对肿瘤细胞 L02, Bel - 7402, HL - 60, HeLa 的生长抑制作用,并计算其细胞生长抑制率。**结果** 蒜氨酸微丸的最优制备工艺,以 5% 羧甲基淀粉钠为崩解剂,以 2% 十二烷基硫酸钠为润湿剂,MCC 与蒜氨酸质量比为 1∶1(*m* / *m*);蒜氨酸微丸 - 蒜酶肠溶双层片的最优制备工艺为,MCC 的用量为每片 72 mg,包衣温度为 25 ℃,包衣技术为挤出滚圆法。21.98 ~ 131.89 μg / mL(以大蒜辣素计)蒜氨酸微丸 - 蒜酶肠溶双层片对 L02 细胞的生长抑制率不超过 10%,以 L02 组为对照,其对 Bel - 7402, HL - 60, HeLa 肿瘤细胞的生长抑制率均显著升高($P < 0.05$),且呈浓度依赖关系。**结论** 优选的蒜氨酸微丸 - 蒜酶肠溶双层片的制备工艺稳定、可行,制备的产品具有明显体外抗肿瘤作用。

关键词:蒜氨酸;蒜酶;大蒜辣素;微丸;双层肠溶片;抗肿瘤

中图分类号:R932;R285.5;TQ460.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1006 - 4931(2022)03 - 0059 - 06

Optimization of Preparation Process of Enteric - Coated Alliin Pellets - Alliinse Bilayer Tablets and *in Vitro* Evaluation of Their Anti - Tumor Effect

FANG Yiwei[1], *ZHU Wentao*[2], *CHEN Jinming*[1]

(1. *The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi, China 341000; 2. Jiangxi Qingfeng Pharmaceutical Co., Ltd., Ganzhou, Jiangxi, China 341000*)

Abstract: Objective To optimize the preparation process of Enteric - Coated Alliin Pellets - Alliinse Bilayer Tablets, and to evaluate their anti - tumor effect *in vitro*. **Methods** The preparation process of alliin pellets was optimized by the single factor test

*基金项目:江西省卫生计生委中医药科研课题[2018A331]。

第一作者:方奕巍,男,硕士,主管药师,研究方向为药物新剂型,(电话)0797 - 8689370(电子信箱)385518825@qq.com。

△通信作者:陈金明,男,硕士,主治医师,研究方向为外科疾病的诊治及抗肿瘤药物的研发,(电子信箱)cjm198601@126.com。

nancy on brain development and function of SD rat offspring and the intervention of DHA[J]. Neurol Res, 2019, 41(11): 1008 - 1014.

[12] LIN J, WANG SQ, FENG YL, et al. Propofol exposure during early gestation impairs learning and memory in rat offspring by inhibiting the acetylation of histone[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(5): 2600 - 2611.

[13] MCDONALD AJ, MOTT DD. Functional neuroanatomy of amygdalohippocampal interconnections and their role in learning and memory[J]. J Neurosci Res, 2017, 95(3): 797 - 820.

[14] HUMEAU Y, CHOQUET D. The next generation of approaches to investigate the link between synaptic plasticity and learning[J]. Nat Neurosci, 2019, 22(10): 1536 - 1543.

[15] LUO FQ, HU Y, ZHAO WL, et al. Maternal Exposure of Rats to Isoflurane during Late Pregnancy Impairs Spatial Learning and Memory in the Offspring by Up - Regulating the Expression of Histone Deacetylase 2[J]. PLoS One, 2016, 11(8): 1 - 9.

[16] FUSCO S, SPINELLI M, COCCO S, et al. Maternal insulin resistance multigenerationally impairs synaptic plasticity and memory via gametic mechanisms[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 4799.

[17] QU WR, SUN QH, LIU QQ, et al. Role of CPEB3 protein in learning and memory: new insights from synaptic plasticity[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(14): 15169 - 15182.

[18] WANG DD, LI B, WU YP, et al. The effects of maternal atrazine exposure and swimming training on spatial learning memory and hippocampal morphology in offspring male rats via PSD95 / NR2B signaling pathway[J]. Cell Mol Neurobiol, 2019, 39(7): 1003 - 1015.

[19] 杨 静,李萌萌,郝济伟,等. 异氟烷不同间隔时间麻醉对发育期大鼠脑神经功能的急性损伤作用[J]. 中华危重病急救医学,2016,28(3):267 - 271.

(收稿日期:2020 - 12 - 07;修回日期:2021 - 07 - 08)

with the cumulative release rate of alliin as the evaluation index, and with the type and dosage of disintegrating agent, the enteric-coating dosage and the mass ratio of microcrystalline cellulose (MCC) to alliin as the investigation factors. The preparation process of Enteric-Coated Alliin Pellets-Alliinse Bilayer Tablets was optimized by the single factor test with the yield of allicin as the evaluation index, and with the amount of MCC in alliinase layer and coating temperature as the investigation factors. The inhibitory effect of Enteric-Coated Alliin Pellets-Alliinse Bilayer Tablets with different mass concentrations on the growth of tumor cells L02, Bel-7402, HL-60 and HeLa was evaluated by the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, and the cell growth inhibition rate was calculated. **Results** The optimal preparation process of alliin pellets was as follows: 5% sodium carboxymethyl starch was taken as the disintegrating agent and 2% sodium dodecyl sulfate was taken as the wetting agent, and the mass ratio of MCC to alliin was 1∶1 (m/m). The optimal preparation process of Enteric-Coated Alliin Pellets-Alliinse Bilayer Tablets was as follows: the dosage of MCC was 72 mg per tablet, the coating temperature was 25 ℃, and the coating technology was extrusion spheronization method. The growth-inhibitory rate of 21.98-131.89 μg/mL (calculated by allicin) of Enteric-Coated Alliin Pellets-Alliinse Bilayer Tablets on L02 cells was not more than 10%. Compared with those in the L02 group, the growth-inhibitory rates on Bel-7402, HL-60 and HeLa tumor cells increased significantly ($P < 0.05$), which showed a concentration-dependent manner. **Conclusion** The optimal preparation process of Enteric-Coated Alliin Pellets-Alliinse Bilayer Tablets is stable and feasible, and the prepared product has an obvious anti-tumor effect *in vitro*.

Key words: alliin; alliinse; allicin; pellets; enteric-coated bilayer tablets; anti-tumor

大蒜的主要有效成分为大蒜辣素[1-2]，由蒜氨酸在蒜酶催化裂解作用下产生，具有抗肿瘤活性等多种物理学活性[3-5]，但性质不稳定，在空气中易分解，故将蒜氨酸和蒜酶制备成新制剂[2]，使其进入人体后生成大蒜辣素，从而发挥治疗作用。微丸表面圆整，粒径均匀，流动性良好，有利于包衣工艺，并可将包衣微丸压制成片，提高药物与胃肠道的接触面积，使药物吸收完全，从而提高生物利用度，且使用方便[6]。本研究中制备了蒜氨酸微丸-蒜酶肠溶双层片，并以人宫颈癌细胞株HeLa、人肝癌细胞株Bel-7402、人白血病细胞株HL-60、人正常肝细胞L02为研究对象，初步评价了蒜氨酸微丸-蒜酶肠溶双层片的体外抗肿瘤作用。现报道如下。

1 仪器、试药与细胞

1.1 仪器

DP30A型单冲压片机（北京新龙立科技有限公司）；AT-7型溶出仪（瑞士Sotax公司）；JBZ-200型挤出滚圆造粒机（辽宁医联新药研究所）；小型流化床包衣机（沈阳药科大学制药厂）；Waters e2695型高效液相色谱仪（美国Waters公司）；YD-20KZ型硬度仪、FT-2000AE型脆碎度检查仪（天津市天大天发科技有限公司）；BGZ-140型电热鼓风干燥箱（上海博迅实业有限公司）；ME104E型电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司，精度为万分之一）；Varioskan Flash型连续光谱多功能酶标仪（美国Thermo Fisher公司）。

1.2 试药

蒜氨酸（由本实验室提取，纯度大于95%）；蒜氨酸对照品（上海源叶生物科技有限公司，批号为YY91278，含量为98%）；蒜酶（新疆埃乐欣药业有限公司，批号为201902012）；微晶纤维素（MCC，Dupont Nutrition USA，批号为P119832791）；低取代羟丙基纤维素（L-HPC，Shin-Etsu Chemical Co.，Ltd.，批号为5091344）；交联聚维酮（PVPP，德国BASF公司，批号为75892806170）；羧甲基淀粉钠（CMS-Na，安徽山河药用辅料有限公司，批号为181108）；丙烯酸树脂（Eudragit®L30D-55，德国Degussa公司，批号为B150814348）；羟苯乙酯（中国食品药品检定研究院，批号为100847-201604，含量为99.9%）；甲醇（色谱纯，天津市康科德科技有限公司）；甲酸（分析纯，上海凌峰化学试剂有限公司）；其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞

人宫颈癌细胞株HeLa、人肝癌细胞株Bel-7402、人白血病细胞株HL-60、人正常肝细胞L02均由江西中医药大学提供，均接种于15%灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素及100 U/mL链霉素的1640培养液中，置5%饱和相对湿度、37 ℃的CO_2孵箱中贴壁生长。

2 方法与结果

2.1 蒜氨酸分析方法[7-8]

2.1.1 外标溶液制备

取蒜氨酸对照品4.8 mg，精密称定，置100 mL容量瓶中，用纯水溶解并定容，即得质量浓度为48 μg/mL的蒜氨酸对照品溶液。

2.1.2 色谱条件

色谱柱：Kromasil C_{18}反相柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：磷酸盐缓冲液（pH=5）-甲醇（95∶5，V/V）；流速：0.5 mL/min；柱温：25 ℃；检测波长：214 nm；进样量：20 μL。

2.1.3 方法学考察

线性关系考察：取蒜氨酸对照品30.6 mg，精密称

定，置50 mL容量瓶中，用流动相定容，即得质量浓度为612 μg / mL的对照品贮备液；依次量取对照品贮备液0.1，0.2，0.5，1.0，2.0，5.0，10.0，20.0 mL，并用流动相定容至50 mL容量瓶中，即得质量浓度分别为1.22，2.45，6.12，12.24，24.48，61.20，122.40，244.80 μg / mL的系列对照品溶液。按2.1.2项下色谱条件进样测定，以蒜氨酸的色谱峰面积（A）为纵坐标、质量浓度（C，μg / mL）为横坐标进行线性回归，得回归方程 $A = 1.112 \times 10^4 C + 123.5$（$r = 0.9998$，$n = 8$）。结果表明，蒜氨酸的质量浓度在1.22 ~ 244.80 μg / mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：精密吸取质量浓度为61.20 μg / mL的对照品溶液适量，按2.1.2项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果蒜氨酸峰面积的 *RSD* 为0.73%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

加样回收试验：取蒜氨酸10 mg，精密称定，平行3份，置20 mL容量瓶中，用流动相定容；准确移取该溶液各1 mL，置10 mL容量瓶中，分别加入线性关系考察项下质量浓度为612 μg / mL的对照品贮备液各0.1，1.0，3.0 mL，用流动相稀释并定容，按2.1.2项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法计算加样回收率。结果蒜氨酸的平均加样回收率为98.60%，*RSD* 为0.86%（$n = 9$）。

2.1.4　蒜氨酸浓度计算

蒜氨酸浓度按公式 $C_X = A_X \times C_S / A_S$ 计算，其中，C_X 为供试品溶液浓度，A_X 为供试品溶液峰面积，C_S 为对照品溶液浓度，A_S 为对照品溶液峰面积。

2.2　大蒜辣素分析方法[9]

2.2.1　内标溶液制备

取羟苯乙酯15.1 mg，精密称定，置50 mL容量瓶中，用60%甲醇溶解并定容，即得质量浓度为302 μg / mL的内标贮备液；移取5 mL内标贮备液，置50 mL容量瓶中，定容，即得质量浓度为30.2 μg / mL的羟苯乙酯内标溶液。

2.2.2　色谱条件

色谱柱：Kromasil C_{18} 反相柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 - 1%甲酸（70∶30，V / V）；流速：1 mL / min；柱温：25 ℃；检测波长：242 nm；进样量：25 μL。

2.2.3　大蒜辣素浓度计算

大蒜辣素浓度按公式 $C_X = 4.71 \times D \times A_X \times C_S / A_S$ 计算，其中，4.71为校正因子，C_X 为供试品溶液浓度，D 为样品稀释倍数，A_X 为供试品溶液峰面积，C_S 为对照品溶液浓度，A_S 为内标峰面积。

2.3　蒜氨酸速释微丸制备

2.3.1　制备工艺

以MCC为填充剂，以2%十二烷基硫酸钠（SDS）溶液为润湿剂，加入适量崩解剂，采用挤出滚圆法制备蒜氨酸速释微丸，工艺参数设置为挤出频率30 Hz，滚圆频率40 Hz，滚圆时间30 s，60 ℃烘箱干燥12 h，以筛分法得到0.45 ~ 0.60 mm的丸芯，收集，称定质量，计算收率。

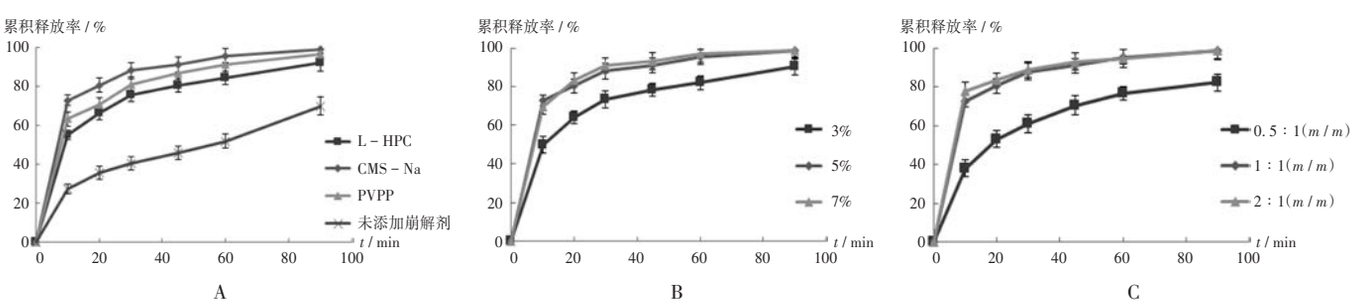
2.3.2　溶出试验

以蒜氨酸溶出度为考察指标，采用2020年版《中国药典（四部）》0931溶出度与释放度测定法，设置转速为100 r / min，温度为（37 ± 0.5）℃。取适量微丸，置装有溶出介质的溶出杯中，以人工肠液（pH 6.8磷酸盐缓冲液）为释放介质，分别测定溶出10，20，30，45，60，90 min时在人工肠液中的累积释放率。

2.3.3　工艺优选

崩解剂选择：以MCC为稀释剂，与蒜氨酸质量比为1∶1（m / m），不加入崩解剂或加入5% CMS - Na，L - HPC，PVPP，混匀，按2.3.1项下方法制备蒜氨酸速释微丸，按2.3.2项下方法测定其在人工肠液中的累积释放率。结果以CMS - Na为崩解剂时，药物释放最快，故选择CMS - Na为速释微丸的崩解剂。详见图1 A。

崩解剂用量选择：以MCC为稀释剂，与蒜氨酸质量比为1∶1（m / m），以2% SDS溶液为润湿剂，以CMS - Na为崩解剂，含量分别为3%，5%，7%，按2.3.1项下方法



A. 崩解剂　B. 崩解剂用量　C. MCC与蒜氨酸质量比

图1　蒜氨酸速释微丸工艺优选（$n = 6$）

A. Disintegrating agents　B. Disintegrating agent dosage　C. Mass ratio of MCC to alliin

Fig. 1　Process optimization of alliin rapid release pellets（$n = 6$）

制备速释微丸，按2.3.2项下方法测定其在人工肠液中的累积释放率。结果崩解剂用量为3%时累积释放率最小，用量为5%时的累积释放率与用量为7%时的曲线类似，故崩解剂用量选择5%。详见图1 B。

MCC与蒜氨酸质量比选择：以MCC与蒜氨酸质量比为筛选对象，分别为0.5∶1（*m* / *m*）、1∶1（*m* / *m*）、2∶1（*m* / *m*），以5% CMS－Na为崩解剂，以2% SDS溶液为润湿剂，混匀，按2.3.1项下方法制备速释微丸，按2.3.2项下方法测定其在人工肠液中的累积释放率。结果MCC与蒜氨酸质量比为1∶1（*m* / *m*）和2∶1（*m* / *m*）时的累积释放率曲线类似，且均高于质量比为0.5∶1（*m* / *m*）时的累积释放率，从增加微丸中主药蒜氨酸的占比考虑，最终选择MCC与蒜氨酸质量比为1∶1（*m* / *m*）。详见图1 C。

2.3.4 验证试验

按拟订优化条件，以MCC与蒜氨酸质量比为1∶1（*m* / *m*），以5% CMS－Na为崩解剂，以2% SDS溶液为润湿剂，采用挤出滚圆法连续制备3批蒜氨酸速释微丸，筛分法得到0.45～0.60 mm的丸芯，收集，称定质量，得其平均收率为（96.41±2.10）%（*n* = 3），在人工肠液中1.5 h的累积释放率为（93.72±4.14）%（*n* = 3），制备的微丸表面光洁、圆整，呈淡黄色。

2.4 蒜氨酸速释微丸肠溶包衣

以丙烯酸树脂（型号为Eudragit® L30D－55）为肠溶衣膜材料，以柠檬酸三乙酯为增塑剂，以滑石粉为抗粘剂，选择粒径为0.45～0.60 mm的蒜氨酸速释微丸，分3批分别配制包衣液，使包衣增重分别为5%，10%，15%（*m* / *m*），采用流化床包衣技术包制肠溶衣，制备蒜氨酸微丸，工艺参数设置为鼓风频率30 Hz，热风温度30～35 ℃，包衣液流速1.2 mL / min，物化压力1.0 MPa。按2020年版《中国药典（四部）》0931溶出度与释放度测定法，取适量蒜氨酸微丸，置转篮中，设置转速为100 r / min，介质温度为（37.0±0.5）℃，以人工胃液（pH 2.0）为释放介质，2 h后加入定量0.2 mol / L磷酸钠溶液，模拟人工肠液（pH 6.8），测定蒜氨酸微丸在人工胃液中2 h和人工肠液中1 h内的累积释放率。详见图2。可见，1）包衣增重10%和15%蒜氨酸微丸在人工胃液中2 h的累积释放率均小于5%，二者累积释放率曲线类似；包衣增重5%蒜氨酸微丸的累积释放率为（11.32±2.44）%（*n* = 6）。为减少主药蒜氨酸在胃液中因释放而造成的损失，包衣增重10%和15%的条件优于包衣增重5%。2）包衣增重5%和10%蒜氨酸微丸在人工肠溶液中1 h的累积释放率曲线类似，累积释放率分别为（92.31±4.85）%和（89.72±4.52）%（*n* = 6），包衣增重15%的累积释放率为（78.3±4.5）%（*n* = 6）。为提高主药蒜氨酸在人工肠液中的释放率，包衣增重5%和10%的条件优于包衣增重15%，故包衣增重选择10%。

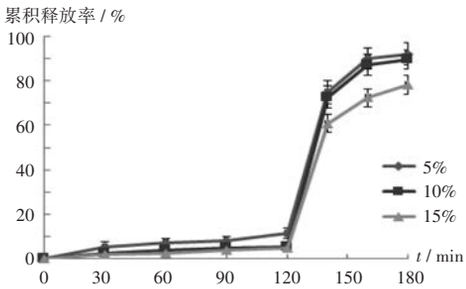


图2 包衣增重对蒜氨酸微丸中药物累积释放率的影响（*n* = 6）

Fig. 2 Effect of coating weight gain on cumulative drug release rate in alliin pellets（*n* = 6）

2.5 蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片制备

2.5.1 制备工艺

本研究中以MCC为填充剂，以CMS－Na为崩解剂，取处方量蒜酶层粉末，填入冲模中，以8 mm平头冲预压；再填入处方量蒜氨酸微丸层，以8 mm平头冲二次压成双层片，片面平整，无粘冲现象。当蒜氨酸－蒜酶的质量比（*m* / *m*）为1∶（0.5～1.5）时，大蒜辣素产率达到最高值[10]，故表1中蒜氨酸∶蒜酶的处方比例符合要求。

表1 蒜氨酸微丸－蒜酶双层片处方（mg / 片）

Tab. 1 Formulation of Enteric－Coated Alliin Pellets－Alliinse Bilayer Tablets（mg / tablet）

片层	成分	含量
蒜酶层	蒜酶	25
	MCC	22～172
	CMS－Na	3
蒜氨酸微丸层	蒜氨酸微丸	98
	CMS－Na	2

2.5.2 溶出试验

以大蒜辣素产率为考察指标，按2020年版《中国药典（四部）》0931溶出度与释放度测定法，设置转速为100 r / min，温度为（37±0.5）℃，取蒜氨酸微丸－蒜酶双层片，置装有人工肠液（pH 6.8）的溶出杯中，分别吸取溶出5，10，15，30，45，60 min时的溶出液1 mL，加入1 mL质量浓度为30.20 μg / mL的羟苯乙酯内标溶液，混匀，按2.2项下方法测定大蒜辣素的含量，得到人工肠液中1 h内的累积大蒜辣素产率。

2.5.3 工艺优选

蒜酶层中MCC用量选择：蒜酶吸湿性较强，流动性较差，可通过加入一定量的MCC加以改善。根据前期预试验结果，当MCC用量大于每片22 mg时蒜酶的流动性方可符合压片要求，将MCC用量上限控制在每片172 mg，使片剂总质量控制在每片200～300 mg。按表1处方压

片，MCC用量分别为每片22，72，122，172 mg，使片剂总质量分别为每片150，200，250，300 mg。以大蒜辣素产率为评价指标，按2.5.2项下方法测定。详见图3。可见，溶出0～30 min内，随着MCC用量的增加，大蒜辣素产率呈递增趋势；溶出超过30 min时，MCC用量为每片72，122，172 mg大蒜辣素产率的曲线几乎重合；溶出60 min时，MCC用量为每片22 mg压制的双层片的大蒜辣素产率最低，为(79.60 ± 4.51)%。为增加片剂中主药蒜酶占比，减少辅料添加量，故选择MCC的用量为每片72 mg。

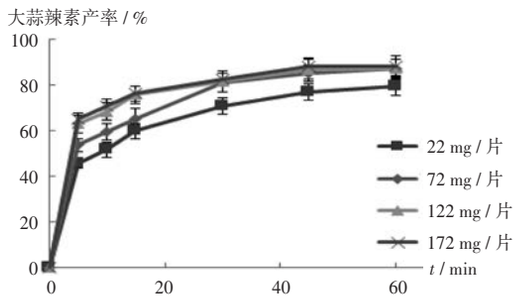


图3　蒜酶层中MCC用量对大蒜辣素产率的影响

Fig. 3　Effect of MCC dosage in alliinase layer on the yield of alliin

肠溶包衣温度选择：选用Eudragit® L30D－55为肠溶衣膜材料，以柠檬酸三乙酯为增塑剂，以滑石粉为抗粘剂，使包衣增重为10%(*m* / *m*)，采用流化床包衣技术对蒜氨酸微丸－蒜酶双层片进行包衣，参数设置为鼓风频率30 Hz，包衣液流速0.6 mL / min，物化压力1.0 MPa，分别在热风温度为25，30，35 ℃下包衣，按2.5.2项下方法测定蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片中大蒜辣素在人工肠液1 h的产率。结果分别为(86.92 ± 2.44)%、(78.34 ± 3.73)%、(66.52 ± 2.90)%(*n* = 3)。可见，大蒜辣素的产率随包衣温度的升高而降低，这与蒜酶的活性随温度升高而降低，导致大蒜辣素生成减少有关。3种温度下所得包衣片均为白色，且富有光泽，表面光滑，故选择包衣温度为25 ℃。

2.5.4　验证试验

按以上优选工艺，MCC与蒜氨酸质量比为1∶1(*m* / *m*)，以5% CMS－Na为崩解剂，以2% SDS溶液为润湿剂，采用挤出滚圆法连续制备3批蒜氨酸速释微丸，筛分法得到0.45～0.60 mm的丸芯，收集；按2.4项下方法包衣增重10%，得3批蒜氨酸微丸；以上3批蒜氨酸微丸按2.5项下方法压片、包衣制得3批蒜氨酸微丸－蒜酶双层肠溶片，每批100片。所得片剂均为白色，且富有光泽，表面光滑；制得片剂的硬度为39.2～44.8 N，脆碎度不超过0.4%；片剂的含量均匀度分别为4.94，5.18，3.61，均小于15.0，符合2020年版《中国药典(四部)》通则0941规定。

2.6　蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片溶出试验

按优选工艺，制备3批蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片，以大蒜辣素产率为考察指标，同2.5.2项下方法测定，首先采用人工胃液(pH 2.0)为释放介质，2 h后加入定量0.2 mol / L磷酸钠溶液，模拟人工肠液(pH 6.8)，测定大蒜辣素在人工胃液中2 h和人工肠液中1 h内的产率。详见图4。可见，制备的3批蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片中大蒜辣素产率曲线几乎重合，说明制备工艺的重复性较好；3批片剂在2 h内人工胃液中的大蒜辣素产率均低于5%，1 h内人工肠液中大蒜辣素产率分别为(88.51 ± 4.80)%、(85.20 ± 4.53)%、(86.34 ± 2.62)%(*n* = 6)，均高于85%，符合2020年版《中国药典(四部)》规定。

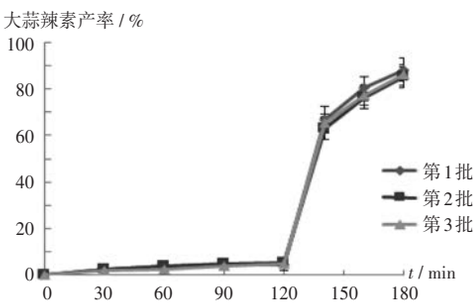


图4　蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片在人工胃液和人工肠液中的大蒜辣素产率(*n* = 6)

Fig. 4　The yield of alliin of Enteric－Coated Alliin Pellets－Alliinse Bilayer Tablets in artificial gastric juice and artificial intestinal juice(*n* = 6)

2.7　体外抗肿瘤作用

取蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片6片，置100 mL人工肠液中，按2.5.2项下方法测定累积释放率，30 min后开始取样，测得药液中大蒜辣素的质量浓度为1 318.91 μg / mL，此药液经1640培养液稀释，得质量浓度分别为131.89，109.91，87.93，65.95，43.96，21.98 μg / mL的系列试验药液[10－11]，经0.22 μm微孔滤膜滤过，除菌，测定所得药液对肿瘤细胞的抑制作用。

取对数生长期Bel－7402，HL－60，HeLa，L02细胞，以1 × 10^5的细胞浓度在96孔培养板中培养，待细胞贴满孔壁时加入系列试验药液，分别为Bel－7402组、HL－60组、HeLa组、L02组。采用噻唑蓝(MTT)比色法测定肿瘤细胞的抑制率，经药液作用后的细胞与0.5 mg / mL MTT于37 ℃共同孵育4 h，吸弃上清液，加入二甲基亚砜，完全溶解后使用酶标仪于492 nm波长处测定吸光度(*A*)，细胞生长抑制率(%) = (1 － $A_{实验组}$ / $A_{空白对照组}$) × 100%。数据以$\overline{X} \pm s$表示，行*t*检验。*P* < 0.05为差异有统计学意义。结果见表2。可见，蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片在人工肠

液中生成大蒜辣素溶液，该药液对人正常肝细胞L02的影响很小，抑制率最高不超过10%；以L02组为对照，对HL－60，Hela，Bel－7402肿瘤细胞的抑制作用均显著增强（$P<0.01$），且抑制强度由大到小排序为Bel－7402＞Hela＞HL－60（$P<0.05$）；对L02，HL－60，Hela，Bel－7402肿瘤细胞的抑制率随着药液浓度的增加而增大，且抑制效应呈浓度依赖性。

表2 不同质量浓度大蒜辣素蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片对肿瘤细胞的生长抑制率比较（%，$n=6$）

Tab. 2 Comparison of growth－inhibitory rate of Enteric－Coated Alliin Pellets－Alliinse Bilayer Tablets on tumor cells（%，$n=6$）

C（μg/mL）	L02组	HL－60组	Hela组	Bel－7402组
21.98	2.60±1.36	3.60±2.75	10.34±3.91*#	22.86±5.45*#△
43.96	3.30±2.28	7.30±2.09*	16.33±3.58*#	32.62±6.21*#△
65.95	4.79±2.66	13.39±4.18*	22.28±4.42*#	40.37±5.15*#△
87.93	6.83±3.39	21.64±3.39*	31.38±5.03*#	49.52±4.62*#△
109.91	8.56±4.83	32.56±4.23*	45.53±4.36*#	60.31±3.98*#△
131.89	9.71±3.61	48.69±5.96*	58.64±3.67*#	70.62±5.09*#△

注：与L02组比较，*$P<0.01$；与HL－60组比较，#$P<0.05$；与Hela组比较，△$P<0.05$。

Note: Compared with those in the L02 group, *$P<0.01$; Compared with those in the HL－60 group, #$P<0$ 05; Compared with those in the HeLa group, △$P<0.05$.

3 讨论

蒜氨酸储存过程中与蒜酶相遇后不稳定，易发生催化反应，生成大蒜辣素[1－2]，而大蒜辣素极不稳定。通过制备成肠溶微丸，可避免蒜氨酸与蒜酶发生反应。蒜酶性质不稳定，易吸潮，遇酸及有机溶剂易变性失活[11－12]。蒜氨酸微丸－蒜酶双层片压制成功后，通过包肠溶衣隔绝胃液，防止蒜氨酸和蒜酶进入肠道前丧失活性，避免蒜酶被胃酸破坏，提高制剂的稳定性和活性成分大蒜辣素的产率。包衣过程中要注意保证较低的温度，以最大限度地保留蒜酶的活性，故最终选择双层片的包肠溶衣温度为25 ℃。

双层片包衣后制备成肠溶双层片，连续考察了大蒜辣素在人工胃液中2 h和人工肠液中1 h的产率，通过包肠溶衣的方式，使蒜氨酸进入肠道后可大量释放，进而在蒜酶催化下生成大量大蒜辣素。在人工胃液中，主药蒜氨酸损失较小，大蒜辣素产率不超过5%。

本研究中评价了制备的蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片的体外抗肿瘤作用，模拟了肠溶片进入肠道后的崩解释放情况。结果显示，双层片崩解释放生成的溶出液（主要为大蒜辣素）对L02，HL－60，Hela，Bel－7402肿瘤细胞均有抑制作用，表明其被肠道所吸收而产生药效。

综上所述，优选的蒜氨酸微丸－蒜酶肠溶双层片制备工艺稳定、合理，体外溶出曲线良好，体外抗肿瘤作用明显，药物的稳定性提高，为该药物的中试研究和工业化生产奠定了基础。

参考文献

[1] 李新霞，林守峰，陈 坚. 大蒜辣素（二烯丙基硫代亚磺酸酯）性质及相关研究进展[J]. 天然产物研究与开发，2012，24(1)：132－135.
[2] 姚连初. 大蒜的开发利用研究概况[J]. 中国药业，2002，11(6)：78－79.
[3] 曹成章，胡树桥，赖海银，等. 大蒜素与化疗药物对食管癌细胞EC109疗效比较的实验研究[J]. 中国病理生理杂志，2017，33(10)：1845－1851.
[4] 陈逸恒，刘 燕，石 纬. 大蒜素抑制肿瘤生长机制的实验研究[J]. 中华肿瘤防治杂志，2010，17(15)：1168－1171.
[5] ZOU XJ，LIANG JY，SUN JY，et al. Allicin sensitizes hepatocellular cancer cells to anti－tumor activity of 5－fluorouracil through ROS－mediated mitochondrial pathway[J]. Journal of Pharmacological Sciences，2016，131(4)：233－240.
[6] 曹 超，李 扬，李 金，等. 微丸压片技术研究进展[J]. 中国医药工业杂志，2017，48(5)：631－637.
[7] 袁耀佐，杭太俊，张 玫，等. 蒜氨酸工作对照品的研究与建立[J]. 中国药学杂志，2009，44(15)：1177－1180.
[8] 王晓明，陈 坚. HPLC法测定蒜氨酸含量[J]. 新疆医科大学学报，2003，26(6)：602.
[9] 袁耀佐，顾 洁，杭太俊，等. 用替代对照品羟苯乙酯高效液相色谱方法测定大蒜辣素[J]. 分析化学，2008，36(8)：1083－1088.
[10] SHAO SL，ZHANG WW，LI XY，et al. The Study of Apoptosis Induced by Allicin in HT－9/HL－60 and its Transfection Cell[J]. Advanced Materials Research，2012，340：409－415.
[11] YANG YP，LI M，XU B，et al. Allicin induces apoptosis，cell cycle arrest and microtubule disassembly in human nasopharyngeal carcinoma KB cells[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences，2009，18(2)：114－120.
[12] 曹 红，袁耀佐，陈 坚. 大蒜蒜酶/蒜氨酸催化动力学及临床应用研究[J]. 时珍国医国药，2009，20(7)：1659－1661.

（收稿日期：2021－03－27；修回日期：2021－07－06）

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊
《中国药业》杂志 欢迎投稿！ 欢迎订阅！
邮发代号：78－130，各地邮局均可订阅；补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真：(023) 86592565
网上投稿：http://www.zhongguoyaoye023.com 或 中国药业在线投稿系统