

论 著
(药学研究)

壳寡糖修饰的盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 微球的制备及体外释放特性

吴铄珺, 刘文雅, 王曙东

【摘要】 目的 以单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物(mPEG-PLGA)为载体制备盐酸川芎嗪(TMPH)微球,用壳寡糖(COS)对微球进行修饰,并对其包封前后的体外药物释放行为进行考察。方法 采用复乳-溶剂挥发法制备壳寡糖修饰的盐酸川芎嗪缓释微球,通过单因素试验,以包封率为评价指标,考察影响微球质量的因素,采用正交试验进行优化,筛选出最佳的处方,并进行体外释药性能的考察。结果 mPEG-PLGA 浓度为 50 g/L,药物浓度为 30 g/L,内水相/油相比为 1:10,外水相/油相比为 4:1,最佳处方制备的盐酸川芎嗪微球表面光滑圆整,包封率在 60% 以上。经壳寡糖修饰后微球突释效应减少。结论 以 mPEG-PLGA 为载体材料,采用复乳-溶剂挥发法可以制备包封率较高的盐酸川芎嗪微球,壳寡糖修饰有减小突释效应的作用。

【关键词】 盐酸川芎嗪;壳寡糖;单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物;微球;体外释放

【中图分类号】 R944.9

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-271X(2019)03-0267-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.03.010

Preparation and *in vitro* release characteristics of tetramethylpyrazine hydrochloride-loaded mPEG-PLGA microspheres modified with chitosan oligosaccharideWU Shuo-jun¹, LIU Wen-ya², WANG Shu-dong²

(1. Pharmacy Department, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu, China; 2. Department of Pharmaceutical Preparation, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

【Abstract】 **Objective** To prepare tetramethylpyrazine hydrochloride microspheres with methoxy poly (ethylene glycol)-poly (lactide-co-glycolide) copolymer (mPEG-PLGA). Microspheres were modified with chitosan oligosaccharide (COS). The *in vitro* drug release behavior were investigated before and after the modification. **Methods** Tetramethylpyrazine hydrochloride microspheres modified with COS were prepared by emulsion-solvent evaporation method. The influence of formulation and manufacture was studied by the single factor experiments. The optimal formulation was verified by Orthogonal experimental. The characteristics of drug release were determined *in vitro*. **Results** The optimum prescription was 50 g/L mPEG-PLGA, 30 g/L Ligustrazine, internal water phase: oil phase=1:10, external water phase: oil phase=4:1. The surface of Ligustrazine microspheres prepared with optimal prescription was with a good appearance without adhesions. The encapsulation efficiency was over 60%. The burst effect of microspheres modified with COS was decreased.

Conclusion Emulsion-solvent evaporation method was developed to prepare mPEG-PLGA tetramethylpyrazine microspheres with higher entrapment efficiency. The microspheres modified with COS could decrease burst effect.

作者单位: 210046 南京, 南京中医药大学药学院(吴铄珺); 210002 南京, 东部战区总医院(原南京军区南京总医院)制剂科(刘文雅、王曙东)

通信作者: 王曙东, E-mail: nzwsd860161@163.com

[Key words] tetramethylpyrazine hydrochloride; chitosan oligosaccharide; mPEG-PLGA; microspheres; drug release *in vitro*

0 引言

川芎嗪是从中药川芎中提取的一种生物碱,具有改善微循环、抗血小板聚集以及活血化淤等作用^[1],且对多种疾病造成的神经元损伤有显著疗效^[2]。近年抗肿瘤作用也日益受到关注^[3],具有抗肿瘤,抑制肿瘤转移,逆转肿瘤多药耐药,提高药物敏感性的作用。盐酸川芎嗪在体内半衰期短,生物利用度低,普通制剂需频繁给药,血药浓度波动大,给患者带来了不便。将其制成缓释制剂有利于减轻不良反应,降低其毒副作用,减少对生物肌体组织器官的损害^[4],提高疗效。本实验以 mPEG-PLGA 为载体材料,制备了壳寡糖修饰的盐酸川芎嗪微球,并对其进行了制备工艺及体外释药行为考察,为盐酸川芎嗪的新型缓释制剂的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂 盐酸川芎嗪原料(北京燕京药业有限公司),盐酸川芎嗪对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110817-200305),单甲氧基聚乙二醇聚乳酸乙酸共聚物 mPEG-PLGA(济南岱罡生物工程有限公司),聚乙烯醇 PVA(上海五四试剂厂),壳寡糖(青岛博智汇力生物科技有限公司),甲醇为色谱纯,水为双蒸水,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 Waters 高效液相色谱仪(Waters 1525 双泵, Waters 2487 紫外检测器, Waters 717 自动进样器, Waters Empower 色谱软件);超声波细胞粉碎机 SM-650D(南京贝帝实验仪器有限公司);85-2 温控磁力搅拌器(江苏金怡仪器科技有限公司);ZS90 纳米粒径测定仪(厦门亿恩达科技有限公司);ER-182A 电子分析天平(日本 A&D 公司);TM3000 台式扫描电镜(上海辛茨精密仪器有限公司)

1.3 方法

1.3.1 壳寡糖修饰的盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 微球的制备 采用复乳-溶剂挥发法^[5]制备盐酸川芎嗪微球。精密称取 mPEG-PLGA 约 200 mg 溶于 5 mL 乙酸乙酯/二氯甲烷(3/2, V/V)的混合溶液中,作为

有机相备用。称取盐酸川芎嗪 150 mg 溶于 5 mL 的蒸馏水中,从中取 0.5 mL 作为内水相缓慢加入有机相中,冰浴下超声形成 w/o 的初乳。将初乳缓慢倾入含壳寡糖的 1%PVA 溶液 10 mL 中,超声 10 min 形成 w/o/w 的复乳,最后将复乳倾入 1%PVA 溶液 15 mL 中,磁力搅拌 4 h,挥发有机溶剂,固化的微球通过高速离心收集^[6],用去离子水洗涤 3 遍,冷冻干燥^[7],最终得到盐酸川芎嗪微球。

1.3.2 微球包封率和载药量的测定 取微球粉末约 25 mg,精密称定,加入 2 mL 乙腈使其充分溶解,再加入适量甲醇超声 30 min 后以甲醇定容至 50 mL,摇匀,滤过,取续滤液用 HPLC 进行测定。色谱条件^[8]:色谱柱:Sepax GP-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:V(水):V(甲醇)=52:48;检测波长:290 nm;流速:1 mL·min⁻¹;柱温:35 °C;进样量:10 μL。

对照品溶液的制备:取盐酸川芎嗪对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含盐酸川芎嗪 122.4 μg 的溶液,作为对照品储备液。精密量取 6 mL 上述储备液置 10 mL 容量瓶中,甲醇定容至刻度,即得对照品溶液。

供试品溶液的制备:取微球粉末约 25 mg,精密称定,加入 2 mL 乙腈使其充分溶解,再加入适量甲醇超声 30 min 后以甲醇定容至 50 mL,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

阴性样品溶液的制备:另按微球制备工艺,不加盐酸川芎嗪制备空白微球,按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

干扰试验:取以上对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液进样测定。

线性关系考察:精密吸取对照品储备液 1、2、4、6、8、10 mL 分别置 10 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀。精密吸取上述溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,以峰面积(A)为纵坐标,对照品浓度(C)为横坐标,进行线性回归。

精密度试验:精密吸取对照品溶液 10 μL,按上述色谱条件连续进样 6 次。

稳定性试验:取同一批号的样品,按供试品

溶液的制备方法进行测定,分别于 0、1、2、4、8 h 进样,记录峰面积。

重复性试验:取同一批号的样品 5 份,按供试品溶液的制备方法进行测定。

加样回收率试验:分别精密称取微球粉末约 2.5 mg 共 9 份,3 份一组,置 10 mL 量瓶中,加入 2 mL 乙腈使其充分溶解,每组分别加入对照品液储备液 3.2、4.0、4.8 mL,超声,甲醇定容至刻度,进样测定。

包封率=微球中药物质量/投入的总药量 $\times 100\%$

载药量=微球中药物质量/微球质量 $\times 100\%$

1.3.3 盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 微球制备的影响因素及正交试验 正交试验设计:通过单因素试验,确定了最佳有机溶剂为二氯甲烷:乙酸乙酯 2:3^[9],在此基础上,以包封率为考察指标,对 mPEG-PLGA 浓度(A)、药物浓度(B)、内水相/油相体积比(C)、外水相/油相体积比(D)四个因素进行考察,每个因素三个水平,采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,优选盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 微球制备工艺条件^[10]。最佳工艺验证试验:按最佳工艺条件制备三批微球,测定盐酸川芎嗪含量,计算包封率。

1.3.4 盐酸川芎嗪微球表面形态观察 除了对微球产品进行包封率的考察之外,还对壳寡糖修饰前后盐酸川芎嗪微球的形态进行观察,采用扫描电镜观察微球形态^[11]。

1.3.5 盐酸川芎嗪微球粒径及其分布的测定 将搅拌过后的混悬液倒入样品池中,用粒径分析仪测定其粒径大小及分布,PDI 越小表明微球粒径分布越窄,均一性越好。

1.3.6 盐酸川芎嗪微球体外释药试验 分别精密量取未经修饰盐酸川芎嗪微球混悬液、经壳寡糖修饰后微球混悬液及等质量的盐酸川芎嗪溶液(pH7.4 磷酸盐缓冲液)各 10 mL,置于预先处理好的透析袋中,密封后置于 90 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH7.4)中,于 100 r/min、 $(37\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 恒温水浴搅拌,分别于 1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h、48 h 取样 2 mL,用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中,并补加相同量的释放介质,按 1.3.2 项下色谱条件进行测定。计算累计释放率,绘制体外释药曲线。

2 结 果

2.1 微球包封率和载药量的测定 干扰试验示供试品色谱中,在与盐酸川芎嗪对照品色谱相应的保留时间处,有同一色谱峰,而阴性溶液在相应保留时间处则无峰出现,表明其对样品测定无干扰,色谱图见图 1。线性关系考察回归方程为 $A=13063948C+6088$ ($r=0.9999$),表明盐酸川芎嗪在 12.24~122.4 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内与其峰面积呈良好的线性关系。精密度试验示盐酸川芎嗪峰面积的 RSD 为 0.26%。稳定性试验示盐酸川芎嗪峰面积的 RSD 为 0.45%,表明样品溶液在 8 h 内稳定。重复性试验示盐酸川芎嗪峰面积的 RSD 为 0.53%,说明方法重复性良好。加样回收率试验示盐酸川芎嗪的平均回收率为 98.72%,RSD 为 1.04%,见表 1。

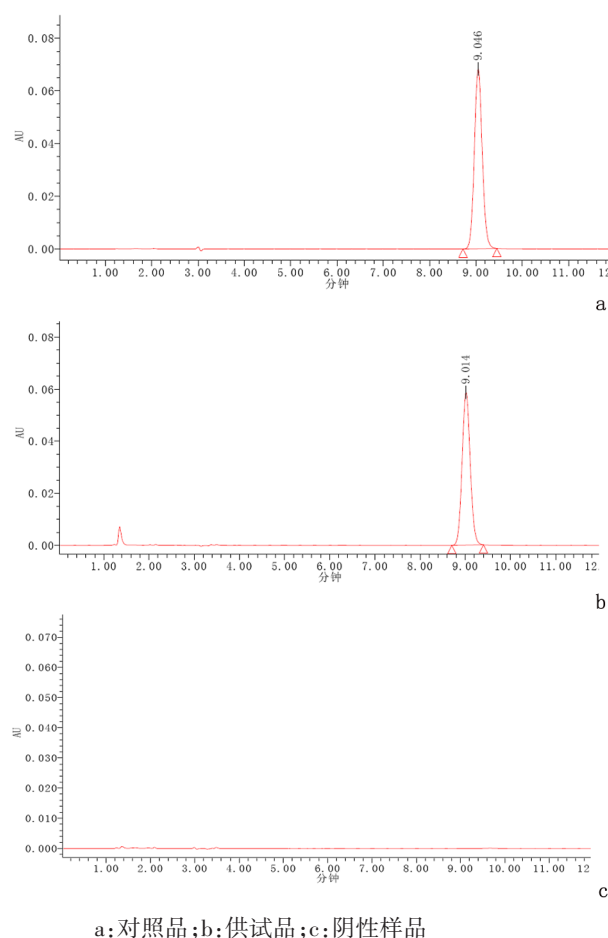


图1 盐酸川芎嗪微球的 HPLC 色谱图

表 1 盐酸川芎嗪加样回收率测定结果($n=3$)

样品取样量(mg)	样品川芎嗪含量(mg)	对照品加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
2.51	0.3739	0.3917	0.7575	97.92		
2.49	0.3710	0.3917	0.7614	99.69		
2.51	0.3739	0.3917	0.7584	98.16		
2.56	0.3814	0.4896	0.8613	98.02		
2.50	0.3725	0.4896	0.8620	99.98	98.72	1.04
2.45	0.3650	0.4896	0.8570	100.48		
2.55	0.3799	0.5875	0.9572	98.26		
2.53	0.3769	0.5875	0.9511	97.73		
2.52	0.3754	0.5875	0.9527	98.25		

2.2 盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 微球制备的影响因素及正交试验

2.2.1 正交试验设计 因素水平见表 2, 试验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4。由分析结果可知, 以包封率作为考察指标时, 影响因素的主次顺序依次为内水相/油相体积比>药物浓度>mPEG-PLGA 浓度>外水相/油相体积比, 其中药物浓度、内水相/油相体积比对包封率有显著影响, 采用四因素三水平的正交试验分析得出制备盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 微球的最佳制备工艺为 $A_3B_2C_2D_2$, 即 mPEG-PLGA 浓度为 50 g/L, 药物浓度为 30 g/L, 内水相/油相比为 1:10, 外水相油相比为 4:1, 具有较高的包封率。

表 2 盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 微球的因素水平表

水平	A	B	C	D
1	30	20	1:5	2:1
2	40	30	1:10	4:1
3	50	40	1:15	6:1

A: mPEG-PLGA 浓度(g/L); B: 药物浓度(g/L); C: 内水相/油相体积比; D: 外水相/油相体积比

2.2.2 最佳工艺验证试验 制备的盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 三批微球(批号: 20171120、20171124、20171129)包封率分别为 67.84%、65.32%、68.16%, RSD 分别为 0.47%、0.61%、0.52%。包封率在 60% 以上, 表明此工艺合理可行。

2.3 盐酸川芎嗪微球表面形态观察 扫描电镜照片可观察到盐酸川芎嗪微球整体分散均匀, 大小均一, 个体之间无明显粘连。图 2a 可观察到, 盐酸川芎嗪微球呈圆形, 表面光滑, 外观形态饱满, 微球表面继续放大至 1000 倍, 呈完整圆球形态, 见图 2b。

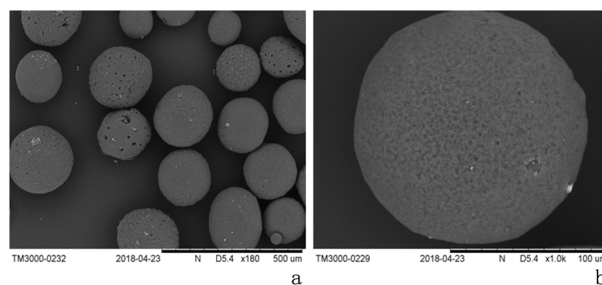
表 3 盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 微球的正交试验结果($n=2$)

试验号	mPEG-PLGA 浓度	药物浓度	内水相/油相体积比	外水相/油相体积比	包封率(%)
1	1	1	1	1	28.90
2	1	2	2	2	55.60
3	1	3	3	3	34.90
4	2	1	2	3	44.30
5	2	2	3	1	43.00
6	2	3	1	2	48.35
7	3	1	3	2	33.70
8	3	2	1	3	49.13
9	3	3	2	1	64.05
K_1	119.40	106.90	126.38	135.95	
K_2	135.65	147.73	163.95	137.65	
K_3	146.88	147.30	111.60	128.33	
R	27.48	40.83	52.35	9.32	

表 4 盐酸川芎嗪 mPEG-PLGA 微球的方差分析表

方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
mPEG-PLGA 浓度	127.29	2	63.64	7.76	>0.05
药物浓度	366.63	2	183.32	22.34	<0.05
内水相/油相体积比	485.59	2	242.80	29.59	<0.05
外水相/油相体积比(误差)	16.41	2	8.21	1.00	>0.05

$F_{0.05}(2, 2)=19.00, F_{0.01}(2, 2)=99.00$



a: 微球呈圆形, 表面光滑, 外观形态饱满; b: 放大至 1000 倍, 呈完整圆球形态

图 2 盐酸川芎嗪扫描电镜图

2.4 盐酸川芎嗪微球粒径及其分布的测定 盐酸川芎嗪微球粒径大小集中分布在 100~1000 μm 之间, 平均粒径为 180.5 μm , PDI 为 0.319, 大小较为均匀。见图 3。

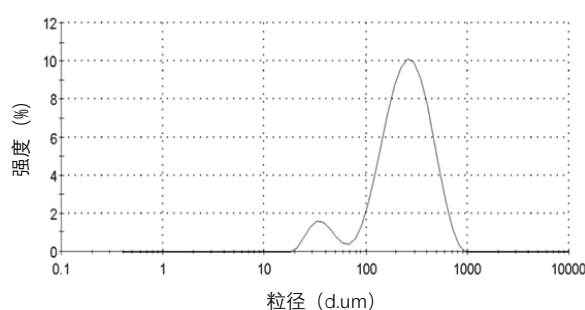
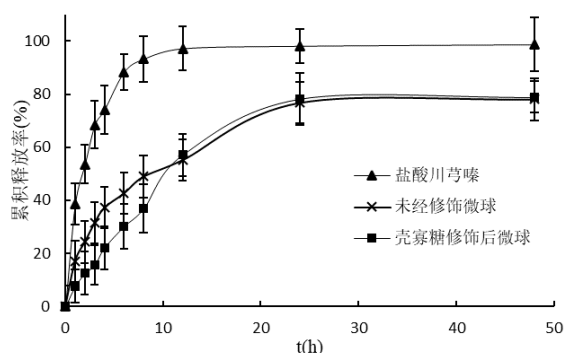


图3 盐酸川芎嗪微球粒度分布图

2.5 盐酸川芎嗪微球体外释药试验 盐酸川芎嗪原料药在释放介质中释放较快, 3 h 累积释放量接近 70%, 8 h 药物已基本释放完全; 而未经修饰的盐酸川芎嗪微球在释放前期存在一定的突释现象, 可能由少量吸附或包埋在微球表面的药物快速释放引起。经修饰后的微球突释效应减小, 24 h 达到平稳状态, 累积释放量 78.23%, 显示出一定的缓释特性, 这是由于 mPEG-PLGA 外层包裹的壳寡糖所致, 随着壳寡糖的降解修饰前后的微球释放接近。见图 4。

图4 盐酸川芎嗪和盐酸川芎嗪微球的释放曲线($n=3$)

3 讨论

微球作为一种新型给药体系, 为中药的现代化提供了有效的途径, 并且广泛应用于医药领域, 具有能保护药物免遭破坏、与某些细胞组织有特殊亲和性、控制药物释放速度、延长药物作用时间、减少药物不良反应及降低用药量等优点, 还可用于特定组织和器官的药物靶向释放等^[12]。本文选择盐酸川芎嗪作为模型药物, 制备了 mPEG-PLGA 作为药物载

体的微球。聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)和聚乙二醇(PEG)具有良好的生物相容性、无免疫原性, 由两者形成的嵌段共聚物目前已被广泛用作药物载体材料^[13]。PLGA 经过 PEG 修饰后, 可避免网状内皮系统(RES)的清除, 延长了其在体内的循环时间, 用其制备的微球具有良好的缓释作用。壳寡糖具有水溶性好、功能作用大、易被人体吸收、生物活性高等优势, 适合作为缓控释载体的修饰材料^[14-15]。

正交试验结果显示, 药物浓度对微球包封率的影响较大, 增加盐酸川芎嗪的用量在一定程度上可以提高载药量, 但随着药物浓度增加达到饱和, 包封率随之降低。另外, 随着内水相/油相体积比在一定程度内的增加, 载药微球的包封率随之增大, 这归因于油相体积增大而油相中 mPEG-PLGA 浓度不变, 使得 mPEG-PLGA 的量增加, 包裹在药物外的载体层增厚, 微球内的药物不易释放, 包封率有所增加。

未经壳寡糖修饰的 mPEG-PLGA 微球带负电荷, 壳寡糖本身带有正电荷, 通过静电吸附作用修饰到微球表面, 增加了制剂的稳定性。通过体外释放实验也可看出, 未经修饰的盐酸川芎嗪微球在释放前期药物快速释放, 这主要是由于川芎嗪是水溶性药物, 微球表面粘附的药物及微球在释放介质中溶胀后经由孔道释放的药物释放速度较快。修饰后的微球由于 mPEG-PLGA 外层包裹壳寡糖, 药物须经壳寡糖缓慢降解后释放, 故突释效应有所减小。

经壳寡糖修饰后的微球克服了盐酸川芎嗪半衰期短、生物利用度低的缺点, 延长了其在体内的循环时间, 使得用药间隔延长, 本研究采用复乳-溶剂挥发法制备盐酸川芎嗪微球, 过程简单快速, 操作简便, 条件温和。另外, 壳寡糖分子量小, 更容易进入细胞, 我们采用 CCK-8 法检测了载药微球对人乳腺癌 MCF-7 细胞株、人肺腺癌 A549 细胞株的抑制作用, 结果表明经壳寡糖修饰后的微球对肿瘤细胞有更强的靶向性, 拟进行下一步研究, 为川芎嗪靶向制剂的开发及应用提供参考。

[参考文献]

- [1] 吕磊, 张洁, 殷宇刚, 等. 川芎嗪减轻大鼠心肌缺血再灌

- 注损伤后心肌细胞凋亡及其机制研究[J]. 东南国防医药, 2016, 18(4): 361-362.
- [2] 彭春梅, 张宇, 唐勤, 等. 川芎嗪缓释制剂的研究进展[J]. 中成药, 2013, 4(35): 811-812.
- [3] 王生, 赵杨, 陶丽, 等. 川芎嗪对肿瘤介导的血液高凝的影响[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(5): 709-715.
- [4] 李健, 于耀宇, 赵振伟, 等. 罂粟碱明胶微球的合成和体外药物释放研究[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(1): 13-14.
- [5] Airen X, Mingfei Y, Guangkui X, *et al.* A physical model for the size-dependent cellular uptake of nanoparticles modified with cationic surfactants [J]. *Int J Nanomed*, 2012, 7(28): 3547-3554.
- [6] 王丽. 磷酸川芎嗪制剂研究进展[J]. 科学技术创新, 2018, 11(27): 46-47.
- [7] 何晋浙, 姚丽娜, 孙培龙. 响应面试验优化猴头菌素-PLGA 微球制备工艺及其体外释药性能[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 242-244.
- [8] 孙丹丹, 王志国, 焦玥, 等. 盐酸川芎嗪在冷冻干燥工艺中的稳定性研究[J]. 药物评价研究, 2018, 41(1): 100-102.
- [9] Meng FT, Ma GH, Qiu W, *et al.* W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles [J]. *Control Release*, 2003, 91(3): 407.
- [10] 戎堃, 刘彬丽, 李木子, 等. 不锈钢膜乳化法制备 PLGA 微球的初步研究与评价[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4): 1230-1321.
- [11] 宋克东, 刘天庆, 郭文华, 等. 包埋 PLGA 微球的可控释壳聚糖支架材料的研究[J]. 高校化学工程学报, 2010, 24(6): 988.
- [12] 李家萌, 杨毅梅. 基于纳米技术的中药现代化研究现状[J]. 医学研究生学报, 2016, 6(29): 648-650.
- [13] 吕丕平, 王玉霞, 崔一民, 等. 蛋白类药物缓释微球制剂的研究进展[J]. 临床药物治疗杂志, 2015, 13(3): 5-9.
- [14] 李丹丹, 马英, 柏韵, 等. 响应面法优化微波辅助果胶酶制备壳寡糖的工艺[J]. 食品工业科学, 2018, 5(12): 36.
- [15] Ma Y, Huang Q, Lv MY, *et al.* Chitosan-Zn chelate increases antioxidant enzyme activity and improves immune function in weaned piglets [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 158(1): 45-50.
- (收稿日期: 2018-09-06; 修回日期: 2018-12-05)
- (责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一超)