

载槐定碱 PLGA 微球制备工艺的优化

马玉花¹, 王 虹^{2,3}, 张广兴², 孙 磊², 王文苹^{2,3,4*}

(1. 青海民族大学药学院, 青海 西宁 810007; 2. 宁夏医科大学药学院, 宁夏 银川 750004; 3. 宁夏医科大学总医院, 宁夏 银川 750004; 4. 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 宁夏 银川 750004)

摘要: 目的 优化载槐定碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 微球的制备工艺。**方法** 采用 O/O 乳化溶剂蒸发法, 制备 PLGA 微球。以形态、粒径、载药量、包封率和体外释放度为指标, 单因素试验优化工艺。**结果** 制得的微球圆整、均匀, 平均粒径 $(17.16 \pm 3.94) \mu\text{m}$, 包封率 $(66.98 \pm 0.48)\%$, 体外突释较低, 缓释 12 d 时的释药量达 90%。**结论** 该制备工艺稳定可行, 所得槐定碱 PLGA 微球的载药量与包封率较高, 缓释显著。

关键词: PLGA; 槐定碱; 微球; O/O 乳化溶剂蒸发法; 单因素试验

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)04-0781-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.04.013

Process optimization of sophoridine-loaded PLGA microspheres

MA Yu-hua¹, WANG Hong^{2,3}, ZHANG Guang-xing², SUN Lei², WANG Wen-ping^{2,3,4*}

(1. School of Pharmacy, Qinghai University for Nationalities, Xining 810007, China; 2. School of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 4. Ningxia Engineering and Technology Research Center for Modernization of Hui Medicine, Yinchuan 750004, China)

ABSTRACT: **AIM** To optimize the preparation process of sophoridine-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. **METHODS** The PLGA microspheres were prepared by O/O emulsion-evaporation method. With morphology, particle size, drug loading, encapsulation efficiency and *in vitro* release as indices, the process was optimized by single factor experiment. **RESULTS** The obtained microspheres were round and uniform with the mean particle size of $(17.16 \pm 3.94) \mu\text{m}$, encapsulation efficiency of $(66.98 \pm 0.48)\%$, low *in vitro* initial burst release and drug release of 90% at 12 d for sustained release. **CONCLUSION** This preparation process is stable and feasible. The obtained sophoridine-loaded PLGA microspheres show high drug loading and encapsulation efficiency with significant sustained release.

KEY WORDS: PLGA; sophoridine; microspheres, O/O emulsion-evaporation method; single factor experiment

槐定碱是从豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* L 中提取得到的四环喹诺里西啶类生物碱^[1], 是一种高效低毒的广谱抗癌药物, 对肺癌的疗效尤为显著^[2], 其注射液在体内分布广、消除快^[3]。为提高槐定碱的抗癌疗效, 根据 7 ~ 30 μm 的微粒可被动靶向至肺部的特点^[4], 吴清等^[5]以白蛋白为载药材料制备槐定微球, 其体内肺靶向性良好, 30 min 内释药量约 30%, 12 h 即达

85% 以上。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 具有良好的生物相容性与可降解性, 作为微球骨架材料, 可缓慢释放药物, 但其疏水性强, 对水溶性药物的包载能力差。本课题组前期以 O/W 和 W/O/W 乳化溶剂蒸发法制备所得的微球载药量与包封率均极低 ($< 5\%$)。本实验采用 O/O 乳化溶剂蒸发法, 优化制备工艺, 以期得到粒径适宜、分布较窄、载药

收稿日期: 2015-10-08

基金项目: 2013 年宁夏回族自治区科技支撑国际合作项目 (宁科计字 [2013] 21 号)

作者简介: 马玉花 (1978—), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为药物新制剂及分析。Tel: 13897259425, E-mail: yuhuama612@163.com

* 通信作者: 王文苹 (1977—), 女, 博士, 教授, 研究方向为新型载药材料及给药系统。Tel: (0951) 68805812, E-mail: wangwen-pingg@sina.com

量与包封率较高、缓释性能良好的槐定碱 PLGA 微球,为相关肺靶向制剂的设计与开发奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器 ABS210S 电子天平(德国 Sartorius 公司);QL-861 涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);JY99-IIDN 细胞破碎仪(宁波新芝生物技术有限公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);TDL-40B 离心机(上海安亭科学仪器厂);FD-1C 冷冻干燥机(北京德天佑仪器有限公司);Phenix 生物倒置显微镜(凤凰光学集团有限公司);Microtrac X-100 粒径测定仪(美国霍尼韦尔公司);THZ-100B 恒温气浴摇床(上海一恒科学仪器有限公司);Modl-L2000 高效液相色谱仪(日立中国有限公司)。

1.2 试药 槐定碱原料药(南京景竹生物科技有限公司,批号 JZ130525);槐定碱标准品(中国食品药品检定研究院,批号 110784-200804);PLGA(山东医疗器械研究所,批号 12020707)。二氯甲烷、甲醇、乙腈均为色谱纯(美国 Fisher 公司);其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定槐定碱的含有量

2.1.1 色谱条件 5C18-AR-II 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.05% 三乙胺水溶液(磷酸调节 pH 至 4.0)-乙腈(90:10);检测波长 205 nm;柱温 35 ℃;体积流量 1.0 mL/min;进样量 10 μL。

2.1.2 线性试验和方法学验证 精密称取干燥至恒重的槐定碱标准品 20 mg,置于 50 mL 量瓶中,甲醇溶解并定容,稀释成系列质量浓度(20 ~ 400 μg/mL)的槐定碱标准溶液,在“2.1.1”项色谱条件下测定。结果表明,槐定碱标准溶液在 20 ~ 400 μg/mL 质量浓度(C)范围内,与峰面积(A)线性关系良好,标准曲线方程为 $C = 0.0002A - 1.302$, $R^2 = 0.9999$ 。3 种不同质量浓度(20、200、400 μg/mL)槐定碱标准溶液的日内、日间 RSD 值为 1.05%、0.44%、0.36%,说明仪器精密度良好,而且在 48 h 内稳定(RSD 值为 0.96%)。

2.2 槐定碱微球的制备 精密称取一定量 PLGA 与槐定碱,加入 1 mL 乙腈-二氯甲烷混合溶剂,涡旋溶解,作为内 O 相;量取 20 mL 液体石蜡(含 2.5% 司盘-80, m/V),作为外 O 相。在均质机剪切(8 000 r/min, 1 min)作用下,将上述内 O 相加

到外 O 相中,制备 O/O 初乳,再转移至 20 mL 液体石蜡溶液(含 2.5% 司盘-80, m/V)中,常温下磁力搅拌 3 h 固化,离心(4 000 r/min, 3 min)后收集微球,石油醚-异丙醇混合溶剂洗涤 2 次,冷冻干燥。然后,分别制备不同微球样品,备用。

2.3 槐定碱微球的形态大小观察及粒径测定

2.3.1 形态大小观察 取适量微球混悬液,固定于载玻片上,生物倒置显微镜观察其形态大小,拍照记录,结果见图 1。

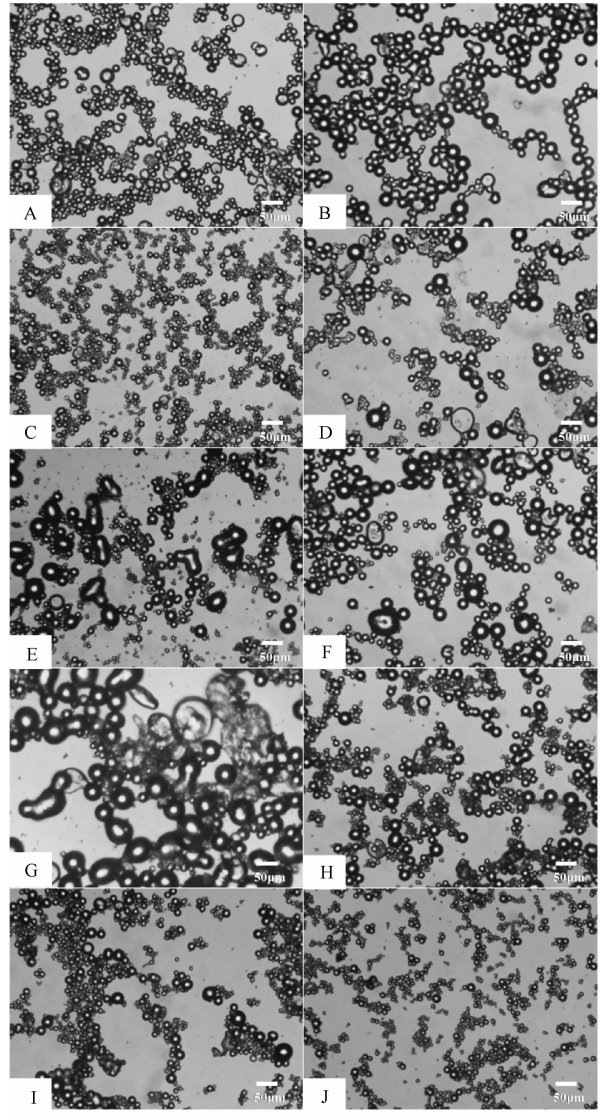


图 1 槐定碱 PLGA 微球的显微照片(A~J)
Fig. 1 Photomicrographs of sophoridine-loaded PLGA microspheres (A-J)

2.3.2 粒径测定 取微球粉末约 20 mg,均匀分散于 10 mL 0.5% (m/V) PVA 溶液中(含 0.1% 吐温-80),超声 10 min 后取适量混悬液,粒径测定仪测定,结果见表 1。

表 1 单因素试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 1 Results of single factor experiments ($\bar{x} \pm s, n=3$)

序列	外 O 相 (槐定碱/%)	内 O 相 (二氯甲烷/%)	固含物 /%	理论 载药量/%	载药 材料	载药量 /%	包封率 /%	粒径 / μm	PDI
A	—	10	10	10	PLGA	1.05 $\pm$ 0.01	10.46 $\pm$ 0.03	26.87 $\pm$ 4.34	8.68
B	1.0	10	10	10	PLGA	2.46 $\pm$ 0.10	24.63 $\pm$ 1.02	26.38 $\pm$ 4.62	9.25
C	2.5	10	10	10	PLGA	5.66 $\pm$ 0.02	56.63 $\pm$ 0.23	15.89 $\pm$ 3.42	6.83
D	2.5	20	10	20	PLGA	4.80 $\pm$ 0.06	47.98 $\pm$ 0.57	28.19 $\pm$ 9.99	7.62
E	2.5	30	10	30	PLGA	4.76 $\pm$ 0.05	47.58 $\pm$ 0.50	21.49 $\pm$ 6.64	13.27
F	2.5	10	15	10	PLGA	5.68 $\pm$ 0.11	56.76 $\pm$ 1.07	24.94 $\pm$ 5.12	6.24
G	2.5	10	20	10	PLGA	5.56 $\pm$ 0.07	55.56 $\pm$ 0.73	31.90 $\pm$ 4.23	8.45
H	2.5	10	10	20	PLGA	4.95 $\pm$ 0.03	24.77 $\pm$ 0.14	27.89 $\pm$ 9.69	19.37
I	2.5	10	10	30	PLGA	4.34 $\pm$ 0.05	14.46 $\pm$ 0.17	20.93 $\pm$ 5.10	9.17
J	2.5	10	10	10	PLGA-COOH	6.70 $\pm$ 0.05	66.98 $\pm$ 0.48	17.16 $\pm$ 3.94	7.88

由图 1 和表 1 可知，O/O 法所得的槐定碱微球由于处方工艺因素不同，其形态大小各异。其中，外 O 相经槐定碱饱和后（A/B/C），所得微球比不经槐定碱饱和时的圆整性更佳，粒径和粒度分布更小；随着内 O 相二氯甲烷含有量、固含物质量浓度及理论载药量增加（C~I），微球圆整性变差，粒径增大，粒度分布明显变宽；对于酯键封端和羧基末端 PLGA（PLGA-COOH）所得的微球而言，其圆整性、粒径大小及粒度分布均无明显差异。

2.4 槐定碱微球载药量与包封率测定 精密取微球粉末 10 mg，加入 0.5 mL 乙腈使其完全溶解，加入适量蒸馏水超声 30 min 后，蒸馏水定容至 5 mL；离心（12 000 r/min，10 min），取上清液，适当稀释后 HPLC 法测定槐定碱含有量，按下式计算微球载药量和包封率。

载药量 = （微球中槐定碱的含有量/微球重量） $\times$ 100%；包封率 = （实际载药量/理论载药量） $\times$ 100%

结果表明，外 O 相加入适量槐定碱后（A/B/C），所得微球载药量与包封率显著增加；随着内 O 相二氯甲烷含有量的增加（C/D/E），两者略有下降；固含物质量浓度的改变（C/F/G）对其结果几乎无影响；当理论载药量从 10% 增加至 20% 或 30% 时（C/H/I），微球实际载药量略有降低，而包封率显著降低；PLGA-COOH 所得微球（J）的载药量与包封率较 PLGA 微球（C）明显增加，包封率可达到 66.98%。

2.5 槐定碱微球体外释药行为研究 精密称取微球粉末 20 mg，均匀分散于 3 mL 磷酸盐缓冲液（pH 7.4，含 1% 吐温-20）中，置于恒温气浴摇床（120 r/min，37 ℃）。分别于 4 h、1 d、2 d、4 d、6 d、8 d、10 d、12 d、14 d 取样，离心

（4 000 r/min，3 min）后取上清液，同时补充等量同温缓冲液。样品稀释至一定倍数后，采用 HPLC 法测定样品中槐定碱的含有量，计算槐定碱微球的累积释放量，并绘制体外累积释药曲线。结果见图 2。

由图可知，10 种不同处方工艺所得槐定碱微球均具有明显的缓释特征，而且突释较低（4 h 内释药量均低于 20%），但后续释药行为存在明显差异。其中，随着 O 相中槐定碱含有量增加（A/B/C），微球释药速率渐趋缓慢；当内 O 相二氯甲烷含有量改变时（C/D/E），仅对微球突释略有影响，而对后期释药行为几乎无影响；在 3 种不同固含物质量浓度微球中（C/F/G），4 h 内突释几乎一致，后期释放中 10% 固含物质量浓度的微球释药速率较 20% 和 30% 略缓慢，而后两者的释药行为基本一致；不同理论载药量（C/H/I）对微球突释几乎无影响，但随着理论载药量增加，释药速率加快；对于两种不同载药材料微球而言，PLGA-COOH 较 PLGA 微球突释高，后期释药速度明显加快，释药曲线平缓。

根据表 1 单因素试验结果，可知最佳制备工艺为 J，即（1）外 O 相加槐定碱含有量为 25%，（2）内 O 相二氯甲烷的含有量为 10%；（3）固含物质量浓度为 10%；（4）理论载药量为 10%；（5）以 PLGA-COOH 为载药材料。所得槐定碱微球圆整、均匀，平均粒径为（17.16 $\pm$ 3.94） μm ，包封率达（66.98 $\pm$ 0.48）%，体外突释较低，可持续释药 12 d。

2.6 验证性试验 按最优工艺制备 3 批微球，测得其载药量与包封率分别为（6.85 $\pm$ 0.25）% 和（68.50 $\pm$ 2.51）%，体外释药曲线见图 2（J₁/J₂/J₃）。由此表明，优化所得槐定碱微球的制备工艺

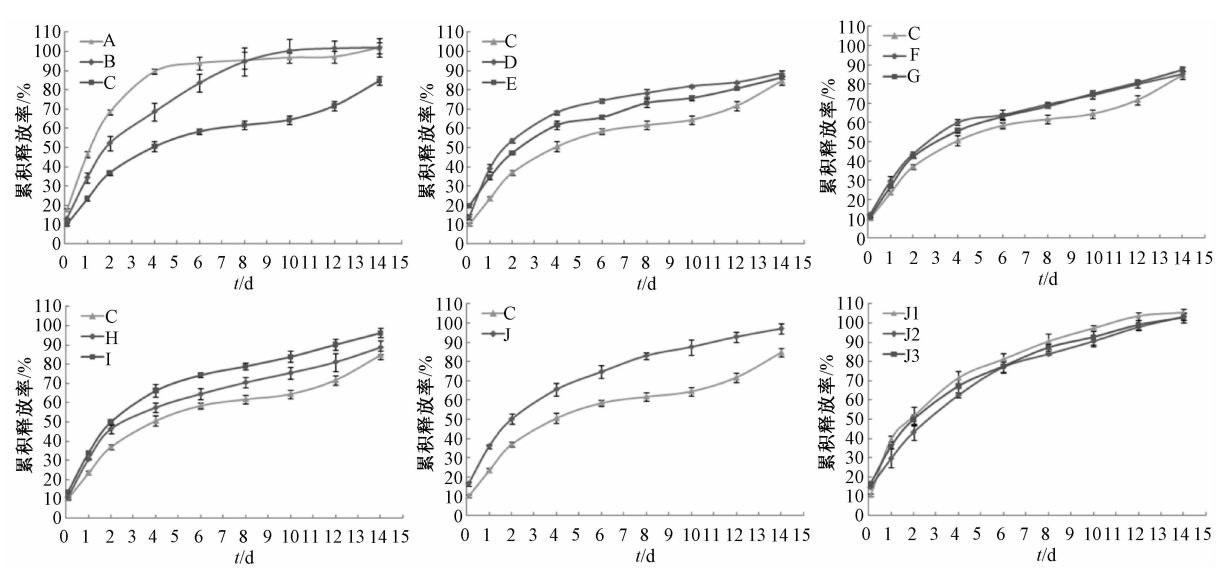


图 2 槐定碱 PLGA 微球的体外释药曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 *In vitro* release profiles of sophoridine-loaded PLGA microspheres ($\bar{x} \pm s, n=3$)

稳定，重复性良好。

3 讨论

微球的形态大小、载药量、包封率以及体外释药行为是评价微球制剂的重要指标和参数。在乳化溶剂蒸发法制备微球过程中，影响微球性质的因素众多，而且复杂，其中初乳的形成、溶剂移除及微球固化过程的影响较大^[6-9]。

本实验采用 O/O 乳化溶剂蒸发法，并于外 O 相加入适量槐定碱，一方面，改变了药物质量浓度梯度，从而有效阻止药物向外相的扩散损失；另一方面，可增加外 O 相黏度，使 O/O 初乳乳滴更稳定，不易发生黏连。在载药量与包封率得到显著提高的同时，所得微球圆整，粒径小，粒度分布窄。

二氯甲烷易挥发，而且可与液体石蜡混溶，因此随着内 O 相中二氯甲烷含有量的增加，内 O 相在外 O 相中的溶解度增大，在加速了微球固化速度的同时，也增加了药物在外相中的溶解度，导致微球圆整性变差，粒径变大，药物损失较多^[10]。

在通常情况下，随着理论载药量及固含物质量浓度的提高，可在不同程度上增加微球固化速度，从而提高微球载药量与包封率，但粒径相对较大^[11-12]。本实验在提高理论载药量与固含物后，微球粒径明显增大，但对其载药量与包封率结果几乎无影响，这可能是由于内外相溶液中药物浓度梯度增大所致。

PLGA 末端集团是影响聚合物亲水性的一个重要因素，对于亲水性药物而言，与 PLGA-COOH 的

亲和力较 PLGA 更强^[13]。在不影响微球粒径大小的同时，可使微球载药量与包封率有所提高。

药物从 PLGA 微球中释放的速率主要取决于其扩散和聚合物的降解^[14]。通常情况下，微球粒径越小，释药速率越快。但本实验 A ~ I 中，C 微球粒径最小，释放速率最慢，这可能是由于相对 C 微球而言，A/B/D/E/H/I 微球骨架中药物含有量较少，从而无法快速释放。在载药量相当的情况下 (C/F/G)，粒径越小，释药速率越快，这与之前的研究结果一致。对于两种末端不同的 PLGA 载药微球来说，PLGA-COOH 较 PLGA 微球突释高，后期释药速率较快，这是由于 PLGA-COOH 的亲水性更强所致。

参考文献：

- [1] 高 鹏, 钟 俊, 王国成. 槐定碱结构改造及其抗肿瘤活性[J]. 天津药学, 2013, 25(4): 1-5.
- [2] 田真真, 万红娇, 杨翠萍. 槐定碱的药理研究综述[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 219-221.
- [3] 黄圣凯, 陈静芬, 谢永新, 等. 槐定碱的气相色谱测定法及其在兔体内的药代动力学[J]. 药学学报, 1988, 23(8): 561-565.
- [4] 葛 蔓, 全东琴. 高靶向载体给药系统的分类及其设计原理[C] //2008 年中国药学会学术年会暨第八届中国药师周论文集. 北京: 中国药学会, 2008: 2203-2210.
- [5] 吴 清, 任天池, 张 玲, 等. 槐定碱白蛋白微球制备工艺研究[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(8): 551-554.
- [6] Choi H S, Seo S A, Khang G, et al. Preparation and characterization of fentanyl-loaded PLGA microspheres; *in vitro* release profiles[J]. *Int J Pharm*, 2002, 234(3): 195-203.

[7]

Hongkee S. Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent; effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres [J]. *J Controlled Release*, 1997, 47(3): 233-245.

[8]

Li W I, Anderson K W, Deluca P P. Kinetic and thermodynamic modeling of the formation of polymeric microspheres using solvent extraction/evaporation method [J]. *J Controlled Release*, 1995, 37(3): 187-198.

[9]

Chung T W, Huang Y Y, Liu Y Z. Effects of the rate of solvent evaporation on the characteristics of drug loaded PLLA and PL-LA microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2001, 212(3): 161-169.

[10]

Gupte A, Ciftci K. Formulation and characterization of Paclitax-el, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2004, 276(1-2): 93-106.

[11]

蒋朝军, 杨清敏, 胡筱菲, 等. 新型利培酮 PLGA 微球的制备及体外释放研究[J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(2): 124-127.

[12]

Maurya S D, Dhakar R C, Aggarawal S, *et al.* Design and e-valuation of SRM microsphere of metformin hydrochloride[J]. *IJCP*, 2010, 1(7): 1-5.

[13]

Sirsi S R, Schray R C, Wheatley M A, *et al.* Formulation of polylactide-co-glycolic acid nanospheres for encapsulation and sustained release of poly (ethylene imine) poly (ethylene gly-col) copolymers complexed to oligonucleotides[J]. *J Nanobio-technol*, 2009, 7: 1-12.

[14]

Wischke C, Schwendeman S P. Principles of encapsulating hy-drophobic drugs in PLA/PLGA microparticles [J]. *Int J Pharm*, 2008, 364(2): 298-327.

龙胆总苷提取物掩味树脂复合物的制备

向志芸, 李小芳*, 朱 宁, 周 维, 李培培
(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137)

摘要: **目的** 制备龙胆总苷提取物的掩味树脂复合物。**方法** 以 Amberlite IRA-400 阴离子交换树脂为药物载体, 制备龙胆总苷提取物; 以药物质量浓度、树脂与药物的比例、反应温度为指标, 优选掩味树脂复合物的制备方法。然后, 运用差示扫描量热法 (DSC) 和傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 对其进行表征。**结果** 在 335 ℃ 处, 出现了吸热峰和红外图谱的改变, 表明复合物是通过化学作用而结合。最佳制备条件为溶液质量浓度 8 mg/mL, 树脂与药物的比例 1.5 : 1, 反应温度 45 ℃。**结论** 该复合物能有效掩盖龙胆总苷的苦味。

关键词: 龙胆总苷提取物; 掩味; 树脂复合物; DSC; FTIR

中图分类号: R944 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2016)04-0785-06

doi:10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2016. 04. 014

Preparation of the resin complexes masking bitterness of *Gentianae Radix* total glycosides extract

XIANG Zhi-yun, LI Xiao-fang*, ZHU Ning, ZHOU Wei, LI Pei-pe
(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine; Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province—Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and MOST, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT: AIM To prepare the resin complexes masking bitterness of *Gentianae Radix* total glycosides extract. **METHODS** With Amberlite IRA-400 anion exchange resin as drug carrier, the *Gentianae Radix* total glycosides extract was prepared. With drug concentration, ratio of resin to drug and reaction temperature as indices, the preparation of resin complexes masking bitterness was optimized. Then they were characterized by differential

收稿日期: 2015-09-10
基金项目: 四川省教育厅重点项目 (15ZA0094)
作者简介: 向志芸 (1990—), 女, 硕士生, 从事中药新剂型及中新技术研究。Tel: 18380228578, E-mail: 498939565@qq.com
* 通信作者: 李小芳 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型及中新技术研究。E-mail: lixiaofang918@163.com