

红景天苷壳聚糖纳米粒的制备及其体外释放性能研究

何黎黎¹, 邓黎³, 林芸竹^{2*}

1. 西南民族大学, 四川 成都 610041

2. 四川大学华西第二医院, 四川 成都 610041

3. 四川大学 华西药学院靶向药物重点实验室, 四川 成都 610041

摘要: 目的 以壳聚糖为载体制备红景天苷壳聚糖纳米粒 (SA-CS-NPs) 并考察其体外释药特性。方法 采用溶剂扩散-离子交联法制备 SA-CS-NPs, 考察其粒径分布和形态, 并对 SA-CS-NPs 的包封率、载药量及其体外释药特性进行研究。结果 所制得的 SA-CS-NPs 呈球形或类球形, 平均粒径为 (247.5 ± 23.8) nm ($n=3$), Zeta 电位为 (23.4 ± 2.7) mV ($n=3$), 多分散指数 (PDI) 为 0.265 ± 0.071 ($n=3$); 平均包封率为 $(70.15 \pm 1.60)\%$, 平均载药量为 $(14.03 \pm 0.32)\%$ ($n=3$); 24 h 累积释放达 85% 以上。结论 溶剂扩散-离子交联法制备 SA-CS-NPs 具有合适的粒径和包封率, 并能达到缓释效果。

关键词: 红景天苷; 壳聚糖纳米粒; 溶剂扩散-离子交联法; 体外释药; 缓释

中图分类号: R283.6; R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)05-0000-00

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.000

Preparation and *in vitro* drug release properties of salidroside-chitosan nanoparticles

HE Li-li¹, DENG Li³, LIN Yun-zhu²

1. Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

2. West China Second Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China

3. Key Laboratory of Drug Targeting and Novel Drug Delivery Systems, Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective To prepare salidroside-chitosan nanoparticles (SA-CS-NPs) and to evaluate the properties of *in vitro* drug release. **Methods** SA-CS-NPs were firstly prepared by microemulsion-ionic crosslinking method. The particle size and polydispersity of SA-CS-NPs were determined and the morphology of nanoparticles was evaluated. The properties of encapsulation efficiency (EE), load efficiency (LE), and *in vitro* release of SA-CS-NPs were also evaluated using UPLC method. **Results** The nanoparticles were successfully prepared with the spherical shape or para-spherical shape. The mean particle size was (247.5 ± 23.8) nm with the polydispersity index (PDI) of 0.265 ± 0.071 , and the Zeta potential was (23.4 ± 2.7) mV ($n=3$). The EE was $(70.15 \pm 1.60)\%$ and the LE was $(14.03 \pm 0.32)\%$ ($n=3$). The cumulative release rate within 24 h of SA-CS-NPs was over 85%. **Conclusion** SA-CS-NPs are prepared by microemulsion-ionic crosslinking method show an appropriate particle size and EE, and could exhibit sustained release properties *in vitro*, which could meet the design requirements.

Key words: salidroside; chitosan nanoparticles; microemulsion-ionic crosslinking method; *in vitro* release; sustained-release

红景天 *Rhodiola crenulata* (Hook. f. et. Thoms.) H. Ohba 是继人参、刺五加之后所发展的又一种重要保健药源植物, 其主要有效成分为红景天苷 (salidroside, SA) [1]。研究表明红景天苷具有抗疲劳、抗衰老、抗微波辐射、抗病毒及抗肿瘤等多种

特异功效[2]。然而, 红景天苷存在半衰期短、代谢快、血药浓度波动大、生物利用度低等缺点[3], 且红景天苷水溶性强, 普通方法制备缓控释纳米粒包封率不高。为了解决上述问题, 在本研究中, 首次采用溶剂扩散-离子交联法制备红景天苷壳聚糖纳米

收稿日期: 2012-08-17

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项项目 (82000239)

作者简介: 何黎黎 (1981—), 女, 四川雅安人, 讲师, 博士, 研究方向为靶向给药系统。Tel: 13094430041 E-mail: lilihes@163.com

*通信作者 林芸竹 Tel: (028)85503716 E-mail: linyunzhu99@163.com

粒 (salidroside-chitosan nanoparticles, SA-CS-NPs), 并考察其性质和体外释药特性, 目前国内外尚未见相关报道。

1 仪器与试药

Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度及电位分析仪 (英国 Malvern 公司); S4800 型扫描电镜 (日本 Hitachi 公司); Optima L-80XP 超速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); Acquity 型超高效液相色谱 (美国 Waters 公司); BS210S 电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

红景天苷购自四川省食品药品检验所, 批号 110818; 壳聚糖 (chitosan, CS, 脱乙酰度 >90%, 平均相对分子质量为 50 000, Sigma 公司); 三聚磷酸钠 (TPP, 成都科龙化工试剂厂); 色谱甲醇 (Sigma 公司), 红景天苷普通片 (自制, 辅料为淀粉、HPMC、硬脂酸镁等, 每片含 10 mg 红景天苷), 其他试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 SA-CS-NPs 的制备

称取 1.0 g 壳聚糖溶于 100 mL 1% 乙酸水溶液中, 搅拌至完全溶解, 得到 10 mg/mL 的壳聚糖溶液作为水相备用。称取 TPP 适量, 溶于一定体积重蒸水中配置成 1 mg/mL 的 TPP 溶液。

参考文献方法并加以改进^[4]: 量取处方量的司盘-80 加入到 18 mL 液体石蜡中, 于 55 °C 恒温水浴中搅拌混匀。另精密称取红景天苷 8.00 mg 溶于一定体积上述壳聚糖溶液中, 将红景天苷壳聚糖混合溶液缓慢滴加到油相中并维持恒速搅拌。滴毕, 将乳液探头超声, 继续水浴搅拌 3 h 后, 缓慢滴加 2 mL TPP 溶液, 继续搅拌 0.5 h, 得到带乳光的油性溶液, 用石油醚洗涤数次, 离心, 真空干燥即得。

2.2 SA-CS-NPs 包封率和载药量的测定

采用 UPLC 测定样品中红景天苷的量, 计算包封率和载药量。

2.2.1 色谱条件 采用 C₁₈ BEH 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为甲醇-水 (15:85)^[5], 体积流量为 0.6 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长为 275 nm。色谱图见图 1 ($t_R=0.81$ min)。

2.2.2 线性关系考察 精密称取红景天苷对照品适量, 配置成 1.02 mg/mL 的溶液, 得对照品储备液。精密量取储备液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 得到质量浓度分别为 10.20、20.40、40.80、61.20、

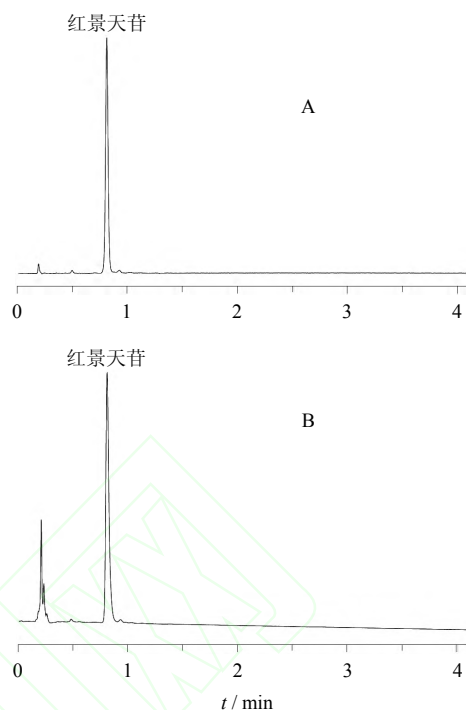


图 1 红景天苷对照品 (A) 和 SA-CS-NPs 样品 (B) 的 UPLC 图

Fig. 1 UPLC chromatograms of salidroside reference substance (A) and SA-CS-NPs sample (B)

81.60、102.0 μg/mL 的系列对照品溶液, 在上述色谱条件下取 1 μL 进样, 测定峰面积值。将峰面积值 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得到回归方程 $Y=382.55 X+329.72$, $r=0.999 9$, 表明红景天苷在 10.20~102.0 μg/mL 线性关系良好。

2.2.3 供试品溶液的制备 称取 SA-CS-NPs 粉末 2.0 mg, 加入 1.0 mL 0.1 mol/L 盐酸分散, 超声提取 5 min, 离心, 收集上清液, 重复操作 3 次, 合并上清液, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.4 回收率试验 取空白壳聚糖纳米粒粉末 2.0 mg (同“2.1”项下方法制备, 仅不加入 SA), 加入 0.1 mol/L 盐酸分散, 得空白壳聚糖纳米粒溶液, 平行 9 份, 每 3 份 1 组, 分别精密加入红景天苷对照品储备液适量, 漩涡混匀 5 s, 离心, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取 1 μL 进样, 测定峰面积值, 计算红景天苷的加样回收率, 结果平均回收率为 99.11%, RSD 为 1.15%。

2.2.5 精密度试验 取同一对照品溶液 (51.00 μg/mL) 进行试验, 每次进样 1 μL, 连续进样 6 次, 测定红景天苷峰面积值, 其 RSD 为 0.45%。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件, 在 0、1、2、4、6、8、10、12 h 分别

进样 1 次, 每次 1 μL , 测定红景天苷 12 h 内的峰面积值。经计算其 RSD 为 0.58%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 平行称取 SA-CS-NPs 样品 2.0 mg 各 6 份, 按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件, 每次进样 1 μL , 根据峰面积值计算红景天苷的量。结果显示样品中红景天苷质量浓度的 RSD 为 0.79%。

2.2.8 包封率和载药量的测定 称取 SA-CS-NPs 粉末适量 (m_1), 加入适量 0.1 mol/L 盐酸分散, 超声提取 5 min, 离心, 收集上清液, 重复操作 3 次, 合并上清液, 适当稀释, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定红景天苷的量 (m_2), 红景天苷的初始投入量记为 m_3 , 计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = m_2 / m_3$$

$$\text{载药量} = m_2 / m_1$$

2.3 SA-CS-NPs 制备工艺优化

2.3.1 壳聚糖和红景天苷投料质量比的影响 按照“2.1”项下方法制备 SA-CS-NPs, 固定其他辅料用量, 考察壳聚糖和红景天苷投料质量比分别为 2.5 : 1、5 : 1、10 : 1 对 SA-CS-NPs 包封率的影响, 结果包封率分别为 54.76%、67.90%、69.16%, 载药量分别为 18.30%、13.57%、8.24% ($n=3$)。随着壳聚糖用量的增加, SA-CS-NPs 的包封率有增加的趋势, 兼顾考虑所制备的纳米粒的包封率和载药量, 故选择壳聚糖和红景天苷投料质量比为 5 : 1。

2.3.2 司盘-80 用量的影响 按照“2.1”项下方法制备 SA-CS-NPs, 固定其他辅料用量, 考察司盘-80 与液体石蜡体积比分别为 0.5 : 9、1 : 9、2 : 9、3 : 9、4 : 9 对 SA-CS-NPs 包封率的影响, 结果包封率分别为 38.45%、67.16%、64.75%、68.20%、60.42% ($n=3$), 载药量分别为 7.71%、13.51%、12.84%、13.67%、12.10%。司盘-80 与液体石蜡体积比为 0.5 : 9 时, SA-CS-NPs 包封率较低; 司盘-80 用量过高, 油相黏度较大, 不利于纳米粒的形成, 故选择两者体积比为 1 : 9, 即加入 2 mL 司盘-80。

2.3.3 超声功率的影响 按照“2.1”项下方法制备 SA-CS-NPs, 固定其他辅料用量, 分别考察超声功率为 0、100、200、300 W 对 SA-CS-NPs 粒径和包封率的影响, 结果粒径分别为 378.6、320.8、269.5、247.0 nm ($n=3$), 包封率分别为 70.08%、64.90%、66.98%、59.46% ($n=3$)。随着超声功率增大, SA-CS-NPs 粒径有所降低, 同时包封率也随之降低,

兼顾考虑所制备的纳米粒的粒径和包封率, 选择超声功率为 200 W。

2.3.4 水浴温度的影响 按照“2.1”项下方法制备 SA-CS-NPs, 固定其他辅料用量, 分别考察水浴温度为 45、55、65、75 $^{\circ}\text{C}$ 对 SA-CS-NPs 粒径和包封率的影响, 结果粒径分别为 269.1、283.7、254.6、256.0 nm ($n=3$), 包封率分别为 65.72%、67.05%、64.40%、60.08% ($n=3$), 无明显差异。温度较高时纳米粒包封率降低, 温度较低时水相挥发时间较长, 因此选择水浴温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 为宜。

2.3.5 搅拌速率的影响 按照“2.1”项下方法制备 SA-CS-NPs, 固定其他辅料用量, 考察搅拌速率分别为 600、800、1 000 r/min 对 SA-CS-NPs 粒径和包封率的影响, 结果粒径分别为 267.3、279.0、273.7 nm ($n=3$), 包封率分别为 66.20%、67.05%、64.54% ($n=3$)。随着搅拌速率增加, 对 SA-CS-NPs 的粒径和包封率并无明显影响, 搅拌速率较高时会产生大量气泡, 因此选择搅拌速率为 600 r/min 为宜。

2.3.6 TPP 用量对 SA-CS-NPs 包封率的影响 按照“2.1”项下方法制备 SA-CS-NPs, 固定其他辅料用量, 考察 TPP 质量浓度分别为 1.0、2.0、3.0 mg/mL 对 SA-CS-NPs 粒径以及包封率的影响, 结果粒径分别为 261.1、266.3、271.5 nm ($n=3$), 包封率分别为 64.30%、65.01%、62.24% ($n=3$)。不同 TPP 用量对 SA-CS-NPs 的包封率和粒径并无明显改变, 因此选择 TPP 用量为 1.0 mg/mL。

2.3.7 优化的制备工艺 通过上述条件优化, 确定了 SA-CS-NPs 的制备工艺: 在烧杯中加入 18 mL 液体石蜡作为油相, 并加入 2 mL 司盘-80, 于 55 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中 600 r/min 搅拌混匀。精密称取红景天苷 8.00 mg 溶于 4 mL 10 mg/mL 壳聚糖 1% 乙酸水溶液中, 将红景天苷壳聚糖混合溶液缓慢滴加到油相中并维持恒速搅拌。滴毕, 将乳液探头超声 (60 s, 200 W), 继续水浴搅拌 3 h 后, 缓慢滴加 2 mL 1.0 mg/mL TPP 溶液, 继续搅拌 0.5 h, 得到带乳光的油性溶液, 用石油醚洗涤数次, 离心, 真空干燥即得。

2.4 SA-CS-NPs 的粒径、Zeta 电位和形态观察

取 SA-CS-NPs 粉末适量用重蒸水分散, 测定纳米粒的平均粒径及粒径分布。通过粒度仪测定, 所得纳米粒的平均粒径为 (247.5 ± 23.8) nm ($n=3$), 多分散系数 (polydispersity, PDI) 为 0.265 ± 0.071 ($n=3$) (图 1), Zeta 电位为 (23.4 ± 2.7) mV ($n=3$) (图 2)。

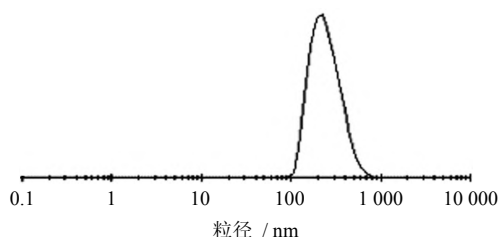


图1 SA-CS-NPs 的粒径和分散指数
Fig.1 Particle size and PDI of SA-CS-NPs

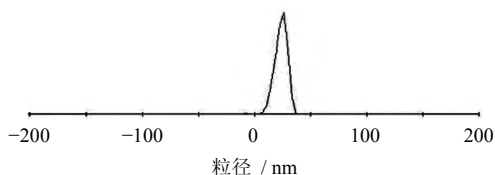


图2 SA-CS-NPs 的 Zeta 电位
Fig.2 Zeta potential of SA-CS-NPs

将 SA-CS-NPs 粉末均匀置于样品平台上,用导电胶固定后喷金。电压加至 5 kV,扫描电镜观察其形态和大小。结果见图 3,扫描电镜下可见纳米粒呈球形或类球形,形状规则,形态饱满。

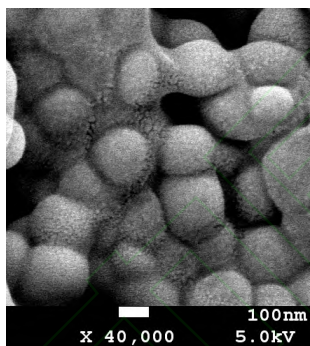


图3 SA-CS-NPs 的扫描电镜图
Fig.3 SEM photomicrograph of SA-CS-NPs

2.5 最佳工艺验证

按上述最佳制备工艺参数制备了 3 批 SA-CS-NPs,经计算 SA-CS-NPs 的包封率分别为 68.45%、70.36%、71.64%,平均包封率为 $(70.15 \pm 1.60)\%$;载药量分别为 13.70%、14.07%、14.33%,平均载药量为 $(14.03 \pm 0.32)\%$ 。

2.6 体外释药试验

称取 SA-CS-NPs 样品 5.0 mg,重悬于 5 mL 重蒸水中,然后转移入透析袋内(截留相对分子质量为 3 500),将透析袋放入盛有 50 mL pH 7.4 的 PBS 溶液的烧杯中,于 37 °C 恒温加热搅拌^[6]。分别于 0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h 取透析液 0.2 mL,同时补充等量的释放介质。按照“2.2.1”项下色谱

条件测定红景天苷的量,计算累积释放率。另取自制红景天苷普通片作为参照,根据 2010 年版《中国药典》附录溶出度测定法第二法(桨法)^[5],以 pH 7.4 的 PBS 溶液为溶出介质,转速为 50 r/min,同法测定红景天苷的量,计算累积释放率。

累积释放率 = $\{C_n[V_2 - (n-1)V_1] + (C_{n-1} + \dots + C_2 + C_1)V_1\} / W$

C_n 为各时间点取出后的样品质量浓度, V_1 为取样体积, V_2 为溶出介质体积, W 为红景天苷的量

SA-CS-NPs 体外释药曲线见图 4, 0~8 h 纳米粒释药较快, 8 h 累积释放量为 74.30%, 10 h 后释放趋于平缓, 24 h 累积释放量达 86.55%。红景天苷普通片 1 h 释药量几近达到最高值, 无缓控释效果。

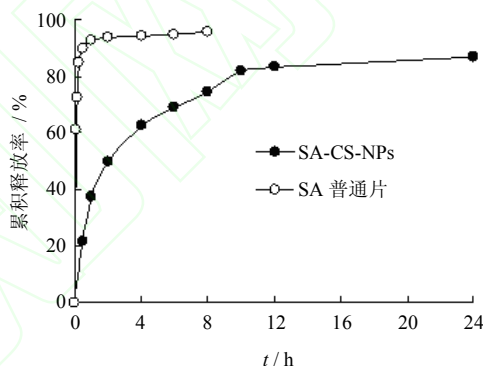


图4 体外释药曲线比较 ($n=3$)

Fig.4 Comparison of *in vitro* release drug curves ($n=3$)

3 讨论

壳聚糖纳米粒(chitosan nanoparticles)是一种新型的药物制剂载体,具有良好的靶向性以及缓释功能,能增加药物的吸收并提高药物的稳定性,口服纳米粒后可通过肠淋巴组织(GALT)的 Peyer's 区充分摄取,提高药物的生物利用度,因此,壳聚糖纳米粒在药物新剂型研究中得到了广泛的关注^[7-8],将其应用于包载亲水性大分子类药物(如疫苗、多肽、蛋白等)的研究已较为成熟^[9]。但是,由于红景天苷属于水溶性很强的小分子类药物,采用普通方法制备壳聚糖纳米粒面临包封率低的问题。

目前常用制备壳聚糖纳米粒的方法有共价交联法、离子交联法、自组装法、复凝聚法、溶剂扩散法等^[4,7-11],其中离子交联法的相关报道最多。但由于红景天苷具有很高的水溶性,普通方法难于包封,因此如何有效提高包封率就成了本研究的关键所在。实验设计时,就选择包封率作为重点指标予以考察,载药量仅需控制在 10%~20%即为合理。

本研究最初采用了离子交联法和复凝聚法来制备纳米粒, 由于红景天苷的水溶性很好, 制备得到的纳米粒的包封率一直较低 (低于 20%), 随后又运用溶剂扩散法进行制备, 得到的纳米粒成形性较差, 粘连现象明显。当结合了溶剂扩散法和离子交联法来制备红景天苷纳米粒, 能克服单一方法的缺点, 得到的纳米粒平均包封率为 $(70.15 \pm 1.60) \%$, 平均载药量为 $(14.03 \pm 0.32) \%$, 且纳米粒呈球形, 形态饱满, 粘连较少, 且有较好的缓释性能, 为后续实验奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 包文芳, 吴维春, 李葆华. 抗疲劳药用植物红景天 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2004.
- [2] 崔艳梅, 娄安如, 赵长琦. 红景天属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 2008, 44(3): 328-333.
- [3] 贾巍, 王曼莉, 杨长青. 红景天苷在大鼠体内的药动力学考察 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(1): 65-68.
- [4] 林晓洁, 张华, 金少钢, 等. 盐酸青藤碱壳聚糖纳米粒的制备及体外释放性能的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 22-25.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] 符华林, 黄平全, 付强, 等. 头孢噻唑钠-壳聚糖纳米粒的制备及相关性质的研究 [J]. 中国兽医科学, 2012, 42(6): 637-641.
- [7] Garcia-Fuentes M, Alonso M J. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? [J]. *J Controlled Release*, 2012, 161(2): 496-504.
- [8] 周闻舞, 顾海铮. 壳聚糖微/纳米粒在定向给药系统中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 290-295.
- [9] 郝英魁, 杨学东. 载药壳聚糖纳米粒的研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(17): 1292-1295.
- [10] Trapani A, Sitterberg J, Bakowsky U, *et al.* The potential of glycol chitosan nanoparticles as carrier for low water soluble drugs [J]. *Int J Pharm*, 2009, 375(1/2): 97-106.
- [11] 赵静, 曾建国, 邹剑锋, 等. 黄芩苷-血根碱离子对壳聚糖纳米粒的制备及表征 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 676-682.