

• 制剂与质量 •

磷酸川芎嗪星型聚乳酸缓释微球的制备与体外释放研究

林雅铃¹, 张安强², 王炼石^{2*}(1 华南农业大学资源环境学院 制药工程系, 广东 广州 510642; 2 华南理工大学材料科学与工程学院
高分子材料科学与工程系, 广东 广州 510641)

摘要:目的 制备磷酸川芎嗪星型聚乳酸载药微球, 研究制备工艺参数对载药微球的药物包封率的影响, 并对其体外释放特性进行表征。方法 以星型聚 L-乳酸(sPLLA)为聚合物基材, 采用复乳-溶剂挥发法制备磷酸川芎嗪(LP)星型聚乳酸载药微球(sPLLA/LP), 采用正交试验优化处方, 研究 sPLLA/LP 的体外缓释特性, 并用 FT-IR 和 SEM 对微球进行表征。结果 通过极差分析与方差分析建立 sPLLA/LP 的药物包封率与制备工艺参数之间的关系, 并在此基础上遴选出优化工艺。LP 与 sPLLA 结合良好, sPLLA/LP 微球缓释 7 d 后, sPLLA 出现部分降解。采用优化工艺所制备的 sPLLA/LP 微球具有良好的缓释效果, SEM 分析与缓释模型的拟合结果表明, 0~48 h 阶段的释药机制为药物扩散和聚合物降解协同作用; 48~144 h 阶段则主要为药物扩散释药。结论 采用复乳-溶剂挥发法制备的 sPLLA/LP 微球的药物包封率较高、体外释药平稳。

关键词: 磷酸川芎嗪; 星型聚乳酸载药微球; 包封率; 体外释放

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1627-05

Preparation of sPLLA/LP microspheres and its *in vitro* release propertiesLIN Ya-ling¹, ZHANG An-qiang², WANG Lian-shi²

(1 Department of Pharmaceutical Engineering, College of Resources and Environment, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China; 2 Department of Polymer Material Science and Engineering, College of Material Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: **Objective** To prepare star-shaped poly (*L*-lactic acid) loaded ligustrazine phosphate (sPLLA/LP) microspheres and study the influence of preparation technologies on drug encapsulation efficiency of sPLLA/LP microspheres and its *in vitro* drug release. **Methods** sPLLA/LP Microspheres were prepared using the method of solvent evaporation and W/O/W emulsion. To optimize the preparation technology, an orthogonal design was applied. FT-IR and SEM were applied to characterize sPLLA/LP microspheres. **Results** The optimized preparation technology was obtained based on range analysis and variance analysis. LP could combine with sPLLA well, and part of sPLLA were degraded after 7 d *in vitro* release. The release mechanism of sPLLA/LP microspheres was non-Fickian diffusing for the first 0~48 h, i.e., the synergetic effect of polymer degradation and drug diffusing, and Fickian diffusing mechanism for the next 48~144 h. **Conclusion** The results show that the drug encapsulation efficiency of sPLLA/LP microspheres is higher, with the smooth and steady LP release from the microspheres.

Key words: ligustrazine phosphate (LP); star-shaped poly (*L*-lactic acid) (sPLLA) drug-loaded microsphere; encapsulation efficiency; *in vitro* drug release

川芎嗪是伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 中的一种主要生物碱, 药用多为其水合磷酸盐, 临床上用于多种心脑血管病等的治

疗^[1]。药动力学研究发现该药的半衰期较短^[2-3], 如长期维持疗效需持续用药, 给临床用药带来不便。为提高临床疗效, 降低副作用, 延长作用时间, 往往需

①收稿日期: 2009-12-12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(07300675); 华南农业大学校长基金资助项目; 华南农业大学资源环境学院院长基金项目; 广东省高性能与功能高分子材料重点实验室开放基金项目。

作者简介: 林雅铃(1978-), 女, 博士, 讲师, 福建罗源人, 主要从事药用高分子材料和药物分析的教学与研究工作。

Tel: 13380097023 E-mail: linyaling@scau.edu.cn

要制成缓释制剂^[3-6]。研究发现,与线形聚乳酸相比,采用星型结构的聚乳酸作为药物载体,有利于药物的平稳释放。本实验在合成可生物降解型材料星型聚L-乳酸(sPLLA)的基础上,采用复乳-溶剂挥发法^[7-10]制备磷酸川芎嗪星型聚乳酸(sPLLA/LP)微球,通过正交试验设计优化微球制备工艺条件,并采用FTIR和SEM对sPLLA/LP微球进行表征,并对sPLLA/LP微球的体外缓释特性进行了探讨,为研制磷酸川芎嗪微球长效制剂提供参考。

1 材料与仪器

UV2300紫外可见分光光度计(上海天美科技有限公司), Nicolet 6700型红外光谱仪(美国ThermoFisher公司), Philips XL30扫描电子显微镜(荷兰Philips公司)。

磷酸川芎嗪原药,广东丽珠集团利民制药厂,批号050814;磷酸川芎嗪对照品(质量分数 $\geq 98\%$),贵州迪大科技有限责任公司提供;四臂星型聚L-乳酸(sPLLA,实验室合成^[9], $M_w = 1.1 \times 10^4$, $M_w/M_n = 1.35$);聚乙烯醇(PVA-224, $M_n = 6\ 000$,水解度95%,日本Nopco公司);二氯甲烷(DCM,分析纯,广州化学试剂厂);透析袋(截留相对分子质量3 000,上海绿鸟生物技术有限公司);PBS缓冲溶液($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 溶液, pH 7.2),实验室配制;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 磷酸川芎嗪的测定

2.1.1 标准曲线的绘制:精密称取干燥至恒重的磷酸川芎嗪对照品50 mg,置于100 mL量瓶中,用适量PBS缓冲溶液溶解,稀释至刻度,摇匀,得500 $\mu\text{g/mL}$ 储备液。分别精密量取储备液1.0、2.5、5.0、10.0、15.0 mL置100 mL量瓶中,用PBS缓冲溶液稀释至刻度,摇匀,于295 nm波长处测定吸光度(A)^[4],以A值对质量浓度(C)作直线回归,得标准曲线方程 $A = 0.034\ 2\ C$ ($r = 0.999\ 7$),说明磷酸川芎嗪水溶液在0~75 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。

2.1.2 精密度试验:将5 $\mu\text{g/mL}$ 磷酸川芎嗪对照品溶液分别在一天内测5次,连续测7 d,计算精密度,结果日内精密度为 $(99.7 \pm 0.72)\%$, RSD为0.72%,日间精密度为 $(99.6 \pm 0.84)\%$, RSD为0.84%。

2.1.3 回收率试验:精密称取磷酸川芎嗪对照品10 mg,加PBS缓冲溶液定容至100 mL,即得标准母液。取标准母液1、5、10 mL,以PBS缓冲溶液定容于100 mL量瓶中,配制成1、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 对照品

溶液,测定A值,按标准曲线方程计算其回收率分别为: $(99.0 \pm 0.6)\%$ (RSD为0.6%)、 $(99.7 \pm 0.5)\%$ (RSD为0.5%)和 $(100.2 \pm 0.8)\%$ (RSD为0.8%)。

2.2 磷酸川芎嗪聚乳酸微球的制备:采用复乳-溶剂挥发法制备。将磷酸川芎嗪溶解于去离子水,配制成50 mg/mL磷酸川芎嗪溶液。将sPLLA溶于适量的DCM中,得到sPLLA溶液;将一定体积的磷酸川芎嗪溶液在超声分散20 s的条件下分散于sPLLA溶液中,形成W/O混合液。将混合液倾入400 mL高速搅拌下的PVA水溶液中,混合5 min,形成高度分散的W/O/W型乳液。继而在40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴、250 r/min机械搅拌下完全蒸发乳液微滴中的DCM,离心、抽滤,收集白色微球产物,洗涤、干燥后得到加载磷酸川芎嗪的星型聚乳酸微球(sPLLA/LP)。

2.3 载药量和包封率的测定:精密称取适量的sPLLA/LP微球,加入到10 mL PBS缓冲溶液中,搅拌并超声分散30 min,使所载药物充分释放溶解后,离心分离,取清液^[8],以PBS缓冲溶液为空白对照液,在295 nm波长处测定吸光度,根据标准曲线方程计算磷酸川芎嗪的质量浓度。

载药量 = (微球中磷酸川芎嗪的质量/微球的质量) $\times 100\%$

包封率 = (微球中磷酸川芎嗪的质量/所投磷酸川芎嗪的总量) $\times 100\%$

2.4 正交试验优化处方:研究表明,采用复乳法制备载药微球的药物包封率受到制备工艺因素如外水相分散剂浓度、聚合物浓度、内水相体积、搅拌转速等的影响^[7-10]。本试验主要考察外水相分散剂PVA浓度(A)、搅拌转速(B)、载药量(C)和sPLLA浓度(D)对微球的药物包封率的影响,每个因素选4个水平,见表1。

表1 正交试验因素水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因 素			
	A/%	B/(r $\cdot$ min $^{-1}$)	C/%	D/(mg $\cdot$ mL $^{-1}$)
1	0.25	1 200	1.0	300
2	0.50	1 400	2.0	150
3	0.75	1 600	3.0	100
4	1.00	1 800	4.0	75

采用 $L_{16}(4^4)$ 正交表安排试验,以微球的包封率为评价指标,结果见表2。根据表2中的试验方案进行试验,每个试样重复3次,分别测试其药物包封率,取均值,其结果与极差分析见表2,方差分析见表3。可见因素A(PVA浓度)和B(搅拌转速)对包封率有

表 2 L₁₆(4⁴) 正交试验设计与结果

Table 2	Design and results of L ₁₆ (4 ⁴) orthogonal test					
试验号	A	B	C	D	误差列	包封率/%
1	1	1	1	1	1	39.6
2	1	2	2	2	2	12.6
3	1	3	3	3	3	39.1
4	1	4	4	4	4	20.1
5	2	1	2	3	4	30.4
6	2	2	1	4	3	15.4
7	2	3	4	1	2	51.5
8	2	4	3	2	1	38.3
9	3	1	3	4	2	54.3
10	3	2	4	3	1	28.9
11	3	3	1	2	4	37.1
12	3	4	2	1	3	42.4
13	4	1	4	2	3	34.6
14	4	2	3	1	4	57.1
15	4	3	2	4	1	18.7
16	4	4	1	3	2	6.8
K ₁ /4	27.9	39.7	24.7	47.7		
K ₂ /4	33.9	28.5	23.5	30.7		
K ₃ /4	40.7	34.1	47.2	26.3		
K ₄ /4	26.8	26.9	33.8	13.2		
R	13.9	12.8	23.7	34.4		

表 3 方差分析

Table 3	Analysis of variance				
方差来源	离差平方和	自由度	F 值	P>F 值	
A	399.64	3	6.40	0.0808	
B	462.51	3	7.41	0.0671	
C	1277.39	3	20.46	0.0168	
D	1198.12	3	19.19	0.0184	
误差	62.43	3			

$F_{0.05}(3,3)=9.28$ $F_{0.01}(3,3)=29.5$

影响(0.05<|P>F|<0.10), 因素 C(载药量)和 D(sPLLA 浓度)对包封率有显著影响(|P>F|<0.05)。因此, 最优的因素配合为 A3/B1/C3/D1, 即 PVA 浓度为 0.75%、搅拌转速为 1200 r/min、载药量为 3.0%、sPLLA 浓度为 300 mg/mL。

2.5 验证试验: 采用此处方进行验证试验, 试制 3 批, 其药物包封率为(61.4±1.2)%, 说明极差分析可较好地预测复乳-溶剂挥发法制备 sPLLA/LP 微球的“工艺-性能”关系, 并可为试验优化提供正确指导, 因此, 后续的 sPLLA/LP 微球均采用此工艺进行制备。

2.6 sPLLA/LP 微球的体外释药: 采用透析袋法^[11]测定 sPLLA/LP 微球的体外释放度。精确称取 LP 原药 10 mg 或按优选工艺制备的 sPLLA/LP 微球 200 mg, 装入预先处理好的透析袋中, 加入 5 mL pH 7.2 的 PBS 缓冲溶液, 两端密封, 放入含有 100 mL pH 7.2 的 PBS 缓冲溶液的具塞玻璃瓶中, 于(37±0.5)℃水浴恒温振荡, 100 次/min, 定时取

样 5.0 mL, 并补加 5.0 mL PBS 缓冲溶液。将所得样品离心分离取上层清液, 在 295 nm 处测定吸光度, 根据标准曲线计算累积释放(Q), 以 Q 对时间(t)作图, 见图 1。

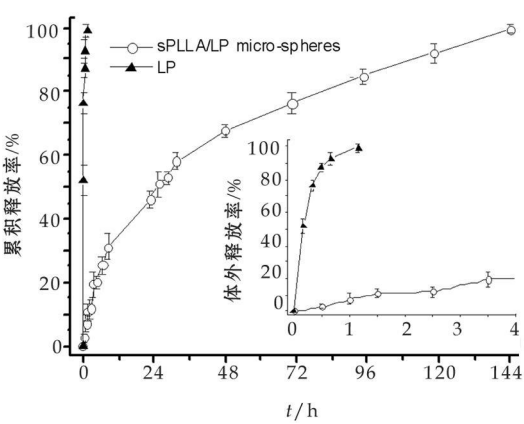


图 1 sPLLA/LP 微球的体外释放曲线

Fig 1 In vitro release curves of sPLLA/LP microspheres

可见, LP 原药在 1.2 h 已经达到 99% 释放, 而 sPLLA/LP 微球在 0~48 h 的释药速率较快, 48 h 时的累积释药率达(67.8±3.1)%, 而 48~144 h 的释药则趋于平稳。因此, 用零级方程、一级方程、Higuchi 方程、Hixson-Crowell 方程、Baker-Lonsdale 方程及 Ritger-Peppas 方程对 sPLLA/LP 微球在 0~48 h 和 48~144 h 的释药曲线分别进行拟合, 结果见表 4。

2.7 红外光谱分析: 采用 KBr 压片法制备红外样品。空白 sPLLA 微球、未释药的 sPLLA/LP 微球、释药 7 d 的 sPLLA/LP 微球与磷酸川芎嗪(LP)原药的红外光谱见图 2。谱线 4 中 3325 cm⁻¹是水合磷酸川芎嗪的-OH 伸缩振动峰, 1418 cm⁻¹和 486 cm⁻¹为磷酸川芎嗪的 C=N 伸缩振动峰; 谱线 2 在 3265 cm⁻¹处的吸收峰强度明显增强, 在 1418 cm⁻¹和 486 cm⁻¹处出现吸收峰, 说明磷酸川芎嗪已被包裹在聚乳酸微球中; 而谱线 3 在 3200~3300 cm⁻¹、1418 cm⁻¹和 486 cm⁻¹处的吸收峰消失, 谱线 3 与谱线 1 基本一致, 说明经过 7 d 的释药, sPLLA/LP 微球中的磷酸川芎嗪已基本释放完全, 这与 sPLLA/LP 微球的释药曲线是吻合的。

2.8 微观形态: sPLLA/LP 微球的外观为白色疏松粉末。样品经表面喷金后, 在 SEM 下观察, 未释药的 sPLLA/LP 微球表面光滑平整; 释药 7 d 后的 sPLLA/LP 微球表面粗糙, 并留有大量凹陷和空隙, 应为药物释放以及 sPLLA 基体部分降解所造成的。见图 3。

表 4 sPLLA/LP 微球的体外释放曲线的拟合

Table 4 Fitting of *in vitro* release curves of sPLLA/LP microspheres

释放时间	模 型	方 程	<i>r</i>
0~ 48 h	零级方程	$Q = 1.46t + 0.0982$	0.9647
	一级方程	$\ln(1 - Q) = 0.0238t + 0.0838$	0.9902
	Hixson Crowell 方程	$(1 - Q)^{1/3} = -0.00669t + 0.970$	0.9836
	Baker Lonsdale 方程	$1.5(1 - (1 - Q)^{2/3}) - Q = 0.00246t - 0.00268$	0.9963
	Higuchi 方程	$Q = 0.104t^{1/2} - 0.0205$	0.9971
	Ritger Peppas 方程	$\ln Q = 0.569 \ln t - 2.51$	0.9923
48~ 144 h	零级方程	$Q = 0.334t + 0.524$	0.9988
	一级方程	$\ln(1 - Q) = 0.0384t - 1.17$	0.8954
	Hixson Crowell 方程	$(1 - Q)^{1/3} = -0.00503t + 0.962$	0.9598
	Baker Lonsdale 方程	$1.5(1 - (1 - Q)^{2/3}) - Q = 0.00343t - 0.0708$	0.9695
	Higuchi 方程	$Q = 0.0626t^{1/2} + 0.243$	0.9973
	Ritger Peppas 方程	$\ln Q = 0.346 \ln t - 1.73$	0.9979

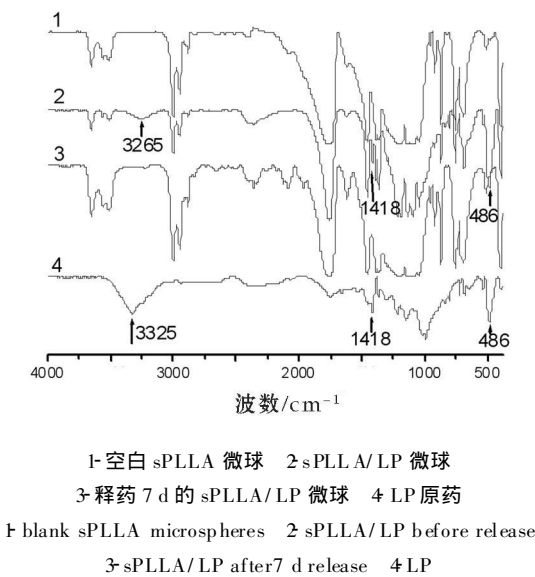
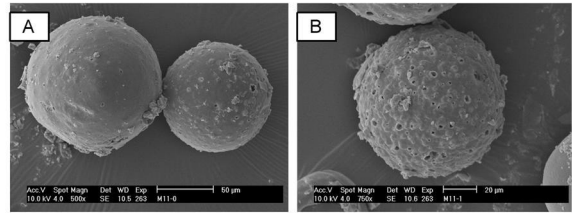


图 2 红外光谱图

Fig 2 FT-IR Spectra



A 释药前外观形貌 B 释药 7 d 后外观形貌

A before 7 d *in vitro* release B after 7 d *in vitro* release

图 3 sPLLA/LP 微球的 SEM 形貌

Fig 3 SEM Morphology of sPLLA/LP microspheres

3 讨论

sPLLA/LP 载药微球的释药曲线和表 4 中的拟合结果表明, sPLLA/LP 载药微球的 0~ 48 h 释放具有明显的缓释特征, 可用一级方程、Baker Lonsdale 方程、Higuchi 方程及 Ritger Peppas 方程拟合($r > 0.99$); 而 48~ 144 h 的释放则符合零级释放($r = 0.9988$), 亦可用 Higuchi 方程及 Ritger

Peppas 方程拟合($r > 0.99$)。其中, 对于圆球(微球)型制剂, Ritger Peppas 指出^[12], 时间项 t 指数 n 的意义为: (1) 当 $n < 0.43$ 时, 药物释放机制为 Fickian 扩散; (2) 当 $0.43 < n < 0.85$ 时, 药物释放机制为非 Fickian 扩散, 即药物扩散和骨架溶蚀协同作用; (3) 当 $n > 0.85$ 时, 药物释放机制为骨架溶蚀。在 0~ 48 h 阶段, sPLLA/LP 载药微球的 Ritger Peppas 方程的时间项 t 指数 n 为 0.569, 说明在释药初期, 聚合物基体即发生了部分降解, 此阶段 sPLLA/LP 载药微球的释药机制为药物扩散和聚合物降解协同作用, 故释药速率较快, 这与 SEM 观察到释药 7 d 后 sPLLA/LP 载药微球的表面粗糙以及 sPLLA 具有较快的降解速率^[13-14]是吻合的; 而在 48~ 144 h 阶段, sPLLA/LP 载药微球的释放符合零级释放, 其 Ritger Peppas 方程的时间项 t 指数 n 为 0.346, 说明此阶段的释药以扩散为主, 由于载药微球的表层已经发生部分降解, 微球表层的药物已基本释放完毕, 而微球内层的释药速率仅与药物扩散到微球表面的路径距离有关, 故释药速率较为稳定。

参考文献:

[1] 黄慕哲, 袁湘芷. 川芎嗪对心脑血管病等的作用[J]. 实用心脑血管病杂志, 1997, 5(1): 28-29
[2] 黄志力, 周 骋, 伍必英, 等. 盐酸川芎嗪静脉注射的药物动力学研究[J]. 中国药理学通报, 1989, (4): 240-241
[3] 蔡 伟, 董善年. 正常人口服磷酸川芎嗪的药代动力学研究[J]. 药学报, 1989, 24(12): 881-883
[4] 丁广斌, 沈 腾, 徐惠南, 等. 磷酸川芎嗪骨架片的研制及其体外释药[J]. 中国医药工业杂志. 2001, 32(4): 157-159
[5] 王利胜, 郭 琦, 韩 坚, 等. 川芎嗪在小鼠血、脑和肝中的药动学研究[J]. 中草药, 2009, 40(6): 935-938
[6] 蔡鑫君, 程巧莺, 赵 宁, 等. 喷雾干燥法制备川芎嗪壳聚糖微球的研究[J]. 中草药, 2008, 39(5): 679-682
[7] 林雅铃, 毛 葱, 张安强, 等. 均匀试验设计在水溶性药物聚乳酸微球制备中的应用[J]. 中国医院药学杂志. 2009, 29(7): 273-276

- [8] 程青, 卢文庆, 聂素云. 硫酸庆大霉素聚乳酸微球的制备及其体外缓释度的测定[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2006, 29(2): 55-58
- [9] Veronica L, Lujan F M. sPLLA nano and microparticles for drug delivery: An overview of the methods of preparation [J]. *Macromol Biosci*, 2007, 7(6): 767-783
- [10] McGinity J W, Donnell P B. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique [J]. *Ad Drug Deliv Rev*, 1997, 28(1): 25-42
- [11] 符旭东, 高永良. 缓释微球的释放度试验及体内外相关研究进展[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(8): 608-611
- [12] Ritger R L, Peppas N A. A simple equation for description of solute release I Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs [J]. *J Controlled Release*, 1987, 5(1): 23-26
- [13] Lin Y L, Zhang A Q. Synthesis and characterization of star-shaped poly(D, L-lactide)-block poly(ethylene glycol) copolymers [J]. *Polym Bull*. 2010 (Published Online, DOI 10.1007/s00289-010-0252-7)
- [14] Salaam L E, Dean D, Bray T L. *In vitro* degradation behavior of biodegradable 4-star micelles [J]. *Polymer*, 2006, 47: 310-318

无机陶瓷膜微滤耦合超声澄清痹通药酒提取液的研究

潘林梅, 黄敏燕, 郭立玮*

(南京中医药大学 复方分离工程实验室, 江苏 南京 210029)

摘要: 目的 研究无机陶瓷膜微滤耦合超声技术在痹通药酒澄清过滤中的应用。方法 以膜渗透通量、膜污染阻力分布等为指标, 考察间歇超声、连续超声与未耦合超声在痹通药酒澄清过滤中的差异, 进而对操作条件进行优化研究。结果 连续超声可显著增强膜的渗透性能, 渗透通量高达 $173 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, 通量提高率 31.6% , 同时还能有效降低膜污染阻力, 尤其对膜表面沉积层, 降幅达 50% 以上。一定范围内, 超声对膜过程的强化与操作压力呈正比, 与操作温度呈反比。结论 陶瓷膜微滤过程耦合超声技术是一种安全有效的膜分离手段。

关键词: 痹通药酒; 无机陶瓷膜微滤; 超声; 耦合

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1631-04

Inorganic ceramic membrane microfiltration process coupled with ultrasonic clarification in extracting solution of Bitong medicinal liquor

PAN Lin mei, HUANG Min yan, GUO Li wei

(Laboratory of Separation Engineering for Chinese Medicine Compound, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: Objective To study the application of inorganic ceramic membrane microfiltration coupled with ultrasonic in the process of refining Bitong medicinal liquor. **Methods** Using flux and membrane fouling resistance distribution as index, the differences of intermittent ultrasound, continuous ultrasound, and non-coupled ultrasound in the clarify with Bitong liquor were studied. **Results** Continuous ultrasound could significantly enhance the membrane permeability, permeation flux as high as $173 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, increase the rate of flux 31.6% , reduce membrane fouling resistance effectively, particularly, deposition on the membrane surface layer, and decrease more than 50% . Within a certain range, the enhance effect of ultrasound on the membrane process had a positive correlation against operating pressure and a negative correlation against the operating temperature. **Conclusion** Ceramic membrane microfiltration with on-line coupling with ultrasonic technique is a safe and effective mean of membrane separation

Key words: Bitong medicinal liquor; ceramic membrane microfiltration; ultrasound; coupling

痹通药酒为收载于《部颁标准》中药成方制剂第十九册的品种, 由制草乌、当归、丁香、高良姜 4 味药