

研究简报

淫羊藿苷壳聚糖/明胶微球的制备及其体外释放研究

张爱华¹, 姚康德^{*}

(天津大学高分子材料研究所, 天津 300072)

摘要: 本试验以壳聚糖、明胶为载药基质, 以中药淫羊藿苷为模拟药物, 通过乳化交联的方法制备淫羊藿苷/壳聚糖/明胶微球。考察微球的理化特性, 建立持续流动释放系统, 检测了微球的体外释放特性和影响因素。微球的理化特性受工艺条件如搅拌速度、乳化剂用量、交联剂用量等因素影响。微球的体外释放速率与微球的粒径、交联度负相关, 与载药量正相关。试验结果表明, 壳聚糖、明胶可作为缓释微球的载体基质, 微球制备工艺简单稳定, 微球的释放速率可控, 淫羊藿苷/壳聚糖/明胶微球是一种良好的药物释放体系。

关键词: 壳聚糖; 明胶; 微球; 淫羊藿苷; 体外释放

近年来, 可生物降解的高分子材料作为药物载体在医药上的应用愈来愈引人注目, 尤其是将药物包裹于高分子材料中制备的载药微球。微球可在体内特异性分布, 利用对特定器官、组织的靶向性和药物的缓释性来降低药物的毒副作用, 提高药物的生物利用度。缓释剂能够减少给药次数, 避免普通制剂因频繁给药产生的血药浓度峰谷现象, 提供了药物的安全性和有效性。中药缓释剂包括胃内滞留型、微球型、骨架型、凝胶型制剂。通过高分子包囊和合适的给药途径能够延长药物的生理指标, 提高药物稳定性, 并使药物的释放达到较为理想的效果^[1]。据报道, 目前已采用合成或天然高分子材料制备出了各种微球, 如: 壳聚糖、明胶、蜂蜡、乙基纤维素、牛血清白蛋白、纤维蛋白原、PLA 等。壳聚糖, 即(1,4)-2-氨基-2-脱氧- β -D-葡聚糖, 具有很好的生物相容性和生物可降解性, 在药物的控释、缓释、靶向以及智能释药系统中的应用受到广泛的关注^[2~4]。明胶是从胶原经过缓和水解得到的变性产物, 它保留了胶原的化学结构组成, 是由 18 种氨基酸形成的直链聚合物, 具有良好的生物相容性和生物可降解性^[5]。淫羊藿苷^[6]是淫羊藿的主要有效成分之一, 其分子式为 $C_{33}H_{40}O_{15}$, 能增加心脑血管血量, 促进造血功能、免疫功能及骨代谢, 具有抗衰老、抗肿瘤等功效。此外, 淫羊藿苷还能促进蛋白与 DNA 合成, 促进性激素样作用, 还有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。体外培养细胞发现淫羊藿苷既促进成骨细胞的增殖, 又促进其进一步分化成熟, 能够提高成骨细胞骨形成的功能; 促进骨组织蛋白质合成, 并且还有抑制体外培养的破骨细胞(osteoclast, OC)增殖和形成骨陷窝的作用^[7]。目前, 以生物降解的高分子材料作为淫羊藿苷的控制释放载体的研究并未见报道。本实验拟将壳聚糖和明胶以戊二醛交联后对淫羊藿苷进行包载, 并研究微球的体外释放行为。

1 材料与仪器

壳聚糖, 分子量 40 万, 脱乙酰度 85%(青岛海汇生物工程有限公司), 明胶(Sigma 公司), 淫羊藿提取物, 淫羊藿苷含量 95.5%(陕西慧科植物发展有限公司), 淫羊藿苷对照品(中国药品生物制品检定所), 50%戊二醛及其它试剂均为分析纯。

基金项目: 国家重大基础研究规划项目(G1999054305);

作者简介: 张爱华(1981-), 女, 天津大学硕士, 从事生物医用材料研究。

***** 联系人: 电话: 022-27401775, E-mail: tjaihua@yahoo.com.cn

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

ZRS-6 型智能溶出仪(天津大学无线电厂), 756MC 型紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂), PHILIP XL 30 扫描电镜(OXFORD, U.K.), 81-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂)。

2 实验方法

2.1 淫羊藿苷标准曲线的确定

精密称取在 105℃干燥至恒重的淫羊藿苷对照品 10.0mg, 置于 20mL 容量瓶中, 加无水甲醇使之溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液(每 1mL 中含淫羊藿苷 0.5mg)。

精密量取上述溶液 5mL, 置于 100mL 容量瓶中, 加无水甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品稀释溶液(每 1mL 含淫羊藿苷 25μg)。

精密称取对照品稀释溶液 0.0、1.0、2.0、3.0、5.0、7.0 与 9.0mL, 分别置于 10mL 容量瓶中, 加无水甲醇稀释至刻度, 摇匀, 在 270nm 的波长处测定紫外吸收度。以吸收度为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线。经线性回归得方程为 $Y=0.12804+0.04949X$, Y 为吸光度, X 为淫羊藿苷的浓度(μg/mL), 在 2.5~22.5μg/mL 范围内线性良好, 线性相关系数为 0.99938。

2.2 淫羊藿苷壳聚糖/明胶溶液的制备

将壳聚糖溶于 5% 的醋酸溶液中, 得到 3% 的壳聚糖溶液, 明胶溶于水中得到 7% 的明胶溶液, 将两种溶液混合, 搅拌, 混合液中壳聚糖、明胶的质量比为 3:7; 称取 10、20、50mg 的淫羊藿溶于 50% 乙醇中, 然后将淫羊藿乙醇溶液加入到壳聚糖/明胶溶液中, 配制成一定浓度的淫羊藿壳聚糖/明胶溶液。

2.3 含淫羊藿壳聚糖/明胶微球的制备

在 500mL 烧杯中加入 200mL 液体石蜡, 1mL Span80, 一定速度磁搅拌下逐滴加入壳聚糖/明胶溶液 20mL, 使水油比达到 1:10, 常温下搅拌, 乳化 15min, 逐滴加入 0.5mL 12.5% 戊二醛于乳液中, 使微球交联固化 3h。反应完成用 3 号砂芯漏斗真空抽滤, 用异丙醇、无水乙醚反复冲洗, 所得微球置于 50℃ 电热恒温鼓风干燥箱中干燥即得空白微球。

按照上面同样的方法加入淫羊藿苷壳聚糖/明胶溶液可得载淫羊藿苷的壳聚糖/明胶微球。

2.4 傅立叶变换红外光谱(FTIR)

将空白微球、载药微球和淫羊藿药物研磨成粉末, 用 KBr 压片在 BIO-RAD FTS 135 光谱仪上测定吸收光谱。

2.5 显微镜和扫描电镜(ESEM)观察

在显微镜下观察 500 粒微球, 并测其直径。将空白、载药微球制成干态样品, 真空溅金后用 PHILIP XL 30 ESEM 进行观察。

2.6 微球吸水溶胀

精密称取几份冷冻干燥的空白和载药微球各约 100mg, 分别置于 37℃ pH 值 7.2 磷酸盐缓冲溶液中, 一定时间后, 离心, 称量微球吸水后的重量。

2.7 微球载药量的测定

将载药微球研成粉末, 精确称取粉末样品, 将其浸于 37℃ 的盐酸溶液(pH=1.0)中 6h, 取上层清液于 80℃ 挥干溶剂, 用无水甲醇溶解, 定溶于 10mL 容量瓶中, 用紫外分光光度计于 270nm 处测定其吸光度, 对照淫羊藿苷标准曲线计算淫羊藿苷的浓度及含量。

2.8 淫羊藿苷壳聚糖/明胶微球的体外释放

取淫羊藿苷壳聚糖/明胶微球于玻璃管中, 玻璃管的两端用纱布封严, 放于 ZRS-6 型智能溶出仪溶出杯中, 溶出介质为 100mL pH=7.2 的磷酸盐缓冲溶液, 在温度 37℃、转速 100rpm 条件下进行药物释放。每隔一定的时间取样 5mL, 并立即补充等量新鲜的磷酸盐缓冲液, 取出液于 80℃ 挥干溶剂, 加无水甲醇溶解, 定溶于 10mL 容量瓶中, 用 756MC 型紫外分光光度计于 270nm 处测定吸光度, 对照淫羊藿苷标准曲线计算淫羊藿苷的浓度及含量, 绘制体外释放曲线。

3 结果

3.1 FTIR 分析

图 1 是空白微球、载药微球和药的 FTIR 谱图。在药的谱图中,1591 cm^{-1} 、1583 cm^{-1} 、1258 cm^{-1} 谱带是苯环的特征吸收峰,在空白微球谱图中,1662 cm^{-1} 是 C=N 的伸缩振动,这正是由于戊二醛交联壳聚糖和明胶的氨基生成的 C=N 双键伸缩振动。在载药微球中,既存在药的苯环和羰基特征吸收峰,又有空白微球的碳氮双键的特征吸收峰,这就说明载药微球中两种组分都存在。

3.2 微球大小及形貌

三种搅拌速度下制备的微球的粒径大小如表 1 所示。从表中可以看出,粒径较小的微球分布较窄。

空白微球与载药微球制备条件相同时,所制得的微球形貌几乎没有差别(见图 2)。淫羊藿苷是小分子,而且用量很少,不会影响到混合液的粘度,也就不会影响所形成乳液。微球的形状基本未发生变化,载药微球的表面较粗糙,有小颗粒,这些小颗粒可能是在微球制作过程中沾附在微球表面的药物,沾附的量非常少,对微球的溶胀及释放性能不会产生影响。

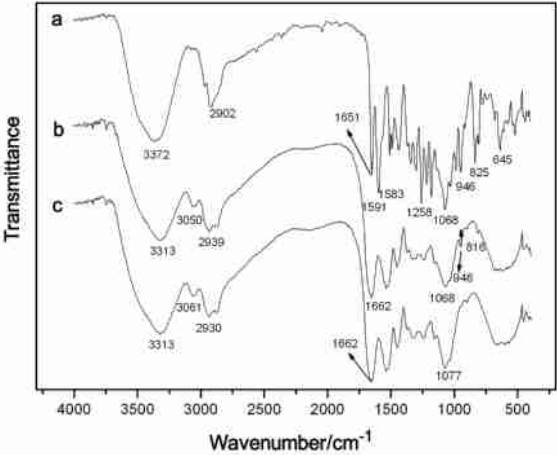
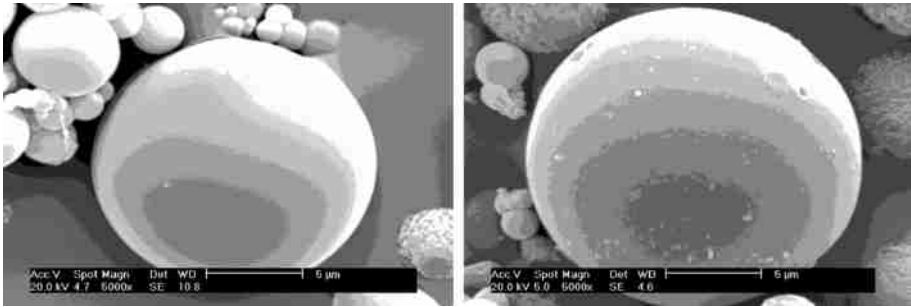


图 1 淫羊藿(a)、载药微球(b)和空白微球(c)的 FTIR 谱图
Figure 1 FTIR of icariin (a), drug microspheres (b) and blank microspheres (c)

表 1 微球的粒径
Table 1 Size of Microspheres

样品	粒径分布/ μm	平均粒径/ μm
1	3~20	8.2 $\pm$ 2.8
2	50~100	74.6 $\pm$ 15.7
3	90~160	116.4 $\pm$ 24.3



空白微球的形貌 载药微球的形貌
图 2 微球载药前后的形貌对比

Figure 2 SEM photography of no-loading and drug-loading microspheres in dry state

3.3 微球吸水溶胀

空白和载药微球的吸水溶胀曲线如图 3 所示。从图中可以看出,空白和载药微球有很强的吸水溶胀性,能够在几小时内达到溶胀平衡。聚合物的溶胀和药物的扩散是微球中药物释放的主要途径,微球的吸水溶胀性在很大程度影响着释药性能。

3.4 体外释放

3.4.1 粒径对微球释放性能的影响 图 4 是粒径对微球释放性能的影响曲线。从图中可以看出,粒径越小的者,药物释放的越快,这是由于药物释放的表面积增加的缘故。释药速率与微球的总表面积正相

关,因而释药速率与微球的粒径负相关。而且,粒径大的微球,由于药物从微球内部扩散到释放介质中所需要的时间较长,因此释药持续的时间较长。所以,微球的释药速率与微球的粒径负相关。

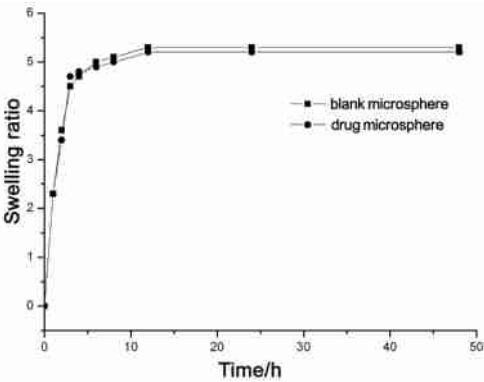


图 3 微球的溶胀曲线(载药微球的药物含量为 20mg/g, 粒径分布为 3~20 μ m)
Figure 3 Swelling of microspheres(the drug content of drug-loading microspheres: 20mg/g,the size of the drug-loading microspheres: 3~20 μ m)

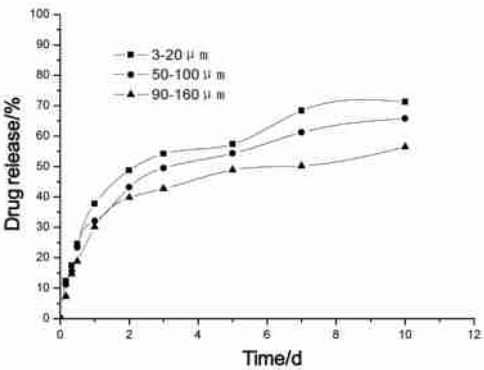


图 4 粒径对微球释放的影响
(微球的含药量为 20mg/g)
Figure 4 The influence on release rate of microspheres size(the drug content of drug-loading microspheres: 20mg/g)

3.4.2 药/材比对微球释放的影响 图 5 是药材比对微球释放的影响曲线。含药微球的释放过程分为三步:(1)药物分子在原位溶于扩散介质;(2)药物分子从原位通过聚合物的骨架扩散到微球表面;(3)药物分子穿过液膜进入溶液中。这三个过程都会影响药物的释放速率。从图中可以看出,在同样质量的载药基材下,投入的药物量越大,相同时间内释药越多。因为微球是在壳聚糖、明胶溶胀情况下通过扩散而进入释放介质,药物量大,微球膜内外药物的浓度差较大,单位时间内进入释放介质的量就大,释放的速度也快。

3.4.3 戊二醛加入量对微球释放性能的影响 图 6 是戊二醛加入量对微球释放的影响曲线。从图中可以看出,戊二醛加入量大的微球,释放药物的能力反而低。产生这种结果的原因可能是,戊二醛加入量大的微球中游离醛基的量也较大,游离醛基与淫羊藿苷有较好的亲和力,不利于微球对淫羊藿苷的释放。

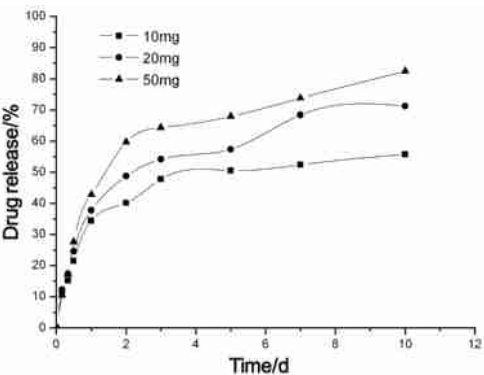


图 5 不同的药/材比对微球释放的影响
(粒径分布为 3~20 μ m)
Figure 5 The influence on release rate of drug contents (the size of the drug-loading microspheres: 3~20 μ m)

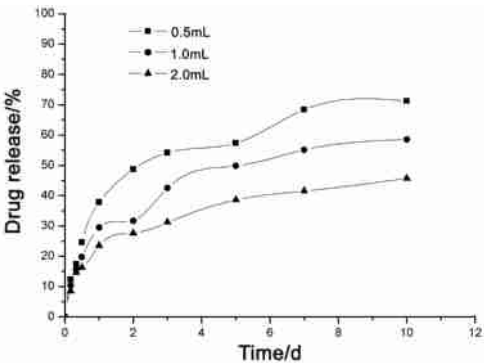


图 6 戊二醛加入量对微球释放的影响
(载药微球的药物含量为 20mg/g, 粒径分布为 3~20 μ m)
Figure 6 The influence on release rate of the quantity of cross-linking agent (the drug content of drug-loading microspheres: 20mg/g,the size of the drug-loading microspheres: 3~20 μ m)

4 讨论

壳聚糖/明胶微球的体外释放是扩散、聚合物的生物降解和聚合物的溶胀或溶解三种机制共同作用

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

的结果。由于释放体系中没有溶菌酶,壳聚糖/明胶聚合物网络在短时间内不会溶解和降解,所以微球的体外释药以扩散和聚合物的溶胀为主。壳聚糖/明胶微球具有很强的吸水溶胀特性,微球表面和内部的淫羊藿苷小分子通过聚合物网络中的孔隙扩散而进入释放介质中,微球内外药物的浓度差是药物向外扩散的动力之一。微球表面药物的溶解和扩散则形成了释药的突释效应^[8]。

壳聚糖、明胶作为缓释微球的载体基质可行;微球制备工艺简单稳定;微球的释放速率可控;淫羊藿苷/壳聚糖/明胶微球是一种良好的药物释放体系。

参考文献:

- [1] Schwarz C, Mehnert W. J Microencapsul, 1999, 16(2): 205~213.
- [2] Suzuki T, Mizushima Y. J Ferment Bioeng, 1997, 84 (2): 128~135.
- [3] Molinara G, Leroux J C, Damas J. Biomaterials, 2002, 23: 2717~2722.
- [4] Varum K M, Mildrid M M, Ragnhild J N H, et al. Carbohydr Res, 1997, 299:99~101.
- [5] Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-Jato J L, et al. Pharm Res, 1997, 14(10): 1431~1436.
- [6] 刘志龙,彭东军. 黑龙江医药,2004,1(17): 43~44.
- [7] 陈虹,张秀珍. 同济大学学报(医学版),2005,26:5~7.
- [8] Zhu S S. New preparation methods of medicine, Second press, Beijing: Beijing People Sanitation Publishing Company, 1993: 9~92.

Preparation and in vitro Release of Icariin-loaded Chitosan/Gelatin Microspheres

ZHANG Ai-hua, YAO Kang-de

(*Institute of Polymer Materials, Tianjin University, Tianjin 300072, China*)

Abstract: In this paper, icariin/chitosan/gelatin microspheres were achieved by emulsification and cross-linking methods. Physical and chemical characteristics of the microspheres were detected. A continual flowing system was used to determine releasing characteristics of microspheres and influencing factors. The study result indicated that the physical and chemical characteristics of microspheres were influenced by process conditions such as: rate of mixing round, quantity of emulsification and cross-linking agents, the in vitro release rate was negatively correlated with granule diameter and crossing-linking extent, positively correlated with drug contents. We can concluded that it was feasible for chitosan and gelatin to act as carriers of slow release of microspheres, and the release rate of drug from microspheres was adjustable.

Key words: Chitosan; Gelatin; Microsphere; Icariin; In vitro release