

阿司匹林- β -环糊精包合物PLGA微球的制备及其质量控制

卢建忠*,刘婷婷,刘冬蕊,白璐,赵心洁,张诗晨,马宁[#](吉林大学口腔医院牙周病科,长春 130021)

中图分类号 R943;R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2687-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.30

摘要 目的:制备阿司匹林- β -环糊精包合物聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球,并进行质量控制。方法:首先制备阿司匹林- β -环糊精包合物,再通过乳化溶剂挥发法制备阿司匹林- β -环糊精包合物PLGA微球,检测载药微球的形态和粒径,计算包封率和累积释放度。以包封率为指标,采用正交试验优化搅拌速度、聚乙烯醇(PVA)浓度、PVA体积、投料比。结果:最优处方工艺为搅拌速度4 000 r/min、PVA浓度3% (g/100 ml)、PVA体积30 ml、投药比1:10。所制微球为圆球形,表面光滑,包封率为(41.79 \pm 1.09)%,粒径较为均一,粒径范围为0.5~127.5 μ m;随着载药微球的降解,阿司匹林的释放速度较平缓,600 h内累积释放度为83%。结论:成功制得形态规则且具有缓释作用的阿司匹林- β -环糊精包合物PLGA微球。

关键词 阿司匹林; β -环糊精;包合物;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;微球;缓释

Preparation and Quality Control of Aspirin- β -cyclodextrin-PLGA Microspheres

LU Jianzhong, LIU Tingting, LIU Dongrui, BAI Lu, ZHAO Xinjie, ZHANG Shichen, MA Ning (Dept. of Periodontology, Stomatology Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare aspirin- β -cyclodextrin-PLGA microspheres, and control its quality. METHODS: Aspirin- β -cyclodextrin inclusion complexes were firstly prepared, and then aspirin- β -cyclodextrin-PLGA microspheres were prepared by emulsion-solvent evaporation method. The morphology and particle size of microspheres were detected, and entrapment efficiency and accumulative release rate were calculated. With entrapment efficiency as index, orthogonal test was adopted to optimize stirring speed, PVA concentration, PVA volume and feed ratio. RESULTS: The optimal formulation was as follows as stirring speed of 4 000 r/min, PVA concentration of 3% (g/100 ml), PVA volume of 30 ml, feed ratio of 1:10. Prepared microspheres were round and smooth in appearance. Entrapment efficiency of the microspheres was (41.79 \pm 1.09)%. The diameter were regular and ranged 0.5-127.5 μ m. As drug-loaded microspheres degraded, the release of aspirin was slow and its accumulative release rate was 83% within 600 h. CONCLUSIONS: Aspirin- β -cyclodextrin-PLGA microspheres are prepared successfully with regular morphology and good sustained-release.

KEYWORDS Aspirin; β -cyclodextrin; Inclusion complexes; PLGA; Microspheres; Sustained-release

阿司匹林(Aspirin)作为非选择性环氧化酶(COX)抑制剂,具有解热、镇痛、抗炎、抗风湿、促进尿酸排泄和抗血小板聚集等作用,在心脑血管疾病、风湿类风湿、消化道肿瘤等疾病的治疗和预防中发挥着重要作用^[1-2]。另外,阿司匹林可用于口腔慢性炎症的治疗,其对牙槽骨的吸收、破骨细胞的生成有抑制作用,但由于其抗凝血作用明显^[3]、水溶性差、易水解,在牙周炎等口腔疾病的临床治疗方面无法得到推广,因此阿司匹林局部缓释制剂的制备就尤为重要。包合物是一种分子的内部结构中全部或部分包入另一种分子,外层分子与内层小分子物质之间不发生化学反应,是一种物理变化,具有可改善内层分子的溶解性、提高其稳定性等优点^[4]。

缓释微球作为一种新型的载药模式,既可以通过调节和控制包含药物的释放速度达到长效给药的目的,同时又能够保持药物的稳定性、减少给药次数、降低给药刺激、提高药物的生物利用度、降低药物毒副作用、提高疗效^[5]。本研究拟采用聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为微球材料,制备阿司匹林- β -环糊精包合物PLGA微球,并进行质量控制。

1 材料

1.1 仪器

光学显微镜(日本Olympus公司);S-3000N扫描电子显微

* 硕士。研究方向:牙周病学。电话:0431-88796039。E-mail:874089176@qq.com

[#] 通信作者:教授,硕士生导师。研究方向:牙周疾病。电话:0431-88796039。E-mail:maningsh76@sina.com

镜(日本Hitachi公司);UV-4802H紫外分光光度仪(美国Unico公司);LR5-4.2高速离心机(北京雷勃尔离心机有限公司);Malvern激光粒度尺寸分析仪(英国Malvern公司)。

1.2 药品与试剂

阿司匹林对照品(批号:C100001998,纯度:99%)、 β -环糊精(批号:C10000508,纯度:98%)、PLGA(分子质量:20万)、聚乙烯醇(PVA,批号:G1509033,醇解度:87%~89%)均购自上海麦克林生化科技有限公司;二氯甲烷、乙酸乙酯、三聚磷酸盐(TPP)、无水乙醇、氯化钠、氢氧化钠、三氯化铁(天津市富宇精细化工有限公司,均为分析纯)。

2 方法与结果

2.1 微球制备

2.1.1 阿司匹林- β -环糊精包合物的制备 取1.4 g β -环糊精置于锥形瓶中,在恒温水浴条件下加入蒸馏水制备 β -环糊精近饱和溶液;取0.2 g阿司匹林溶于少量无水乙醇,缓慢滴加到 β -环糊精近饱和溶液中,50 $^{\circ}$ C条件下磁力搅拌2.5 h,4 $^{\circ}$ C冷藏24 h;然后减压抽滤,用无水乙醇洗涤3次获得滤饼,滤饼在50 $^{\circ}$ C条件下干燥获得疏松状包合物粉末^[6]。

2.1.2 阿司匹林- β -环糊精包合物PLGA微球的制备 ①取150 mg PLGA溶解于3 ml有机溶剂(二氯甲烷1 ml、乙酸乙酯2 ml)中,形成油相;②取适量阿司匹林- β -环糊精包合物、TPP [PLGA-TPP为64:1(mol/mol)]溶于4 ml蒸馏水中,形成内水相;③准确称取1 g PVA于烧杯中,加水溶解,将溶液导入100 ml量瓶中,烧杯冲洗液全部倒入量瓶中,定容至刻度,形成1%

(即 1 g/100 ml)的PVA溶液,作为外水相;④将内水相倒入油相中,磁力搅拌 3 min,加入 4 ml 1% PVA 溶液,磁力搅拌 3 min,加入 30 ml 1% PVA 溶液稀释,室温下磁力搅拌 4 h,待有机溶剂完全挥发,4 000 r/min 离心(离心半径:15 cm)10 min,蒸馏水洗涤,离心、洗涤重复 3 次,加入甘露醇,真空冷冻干燥 24 h,得阿司匹林-β-环糊精包合物 PLGA 微球。

2.1.3 空白 PLGA 微球的制备 取 4 ml 蒸馏水,作为内水相,其余步骤同“2.1.2”项下,制得空白 PLGA 微球。

2.2 质量控制

2.2.1 阿司匹林含量的测定 精密称取阿司匹林 50.2 g,少量无水乙醇溶解,加入 10 ml 蒸馏水,用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 至 9~10,沸水浴加热 15 min 并时时摇匀;再用 0.1 mol/L 的盐酸溶液调节 pH 至 3~4^[7],加入三氯化铁,水浴加热并时时摇匀[阿司匹林与 Fe³⁺ 的比为 1:1(mol/mol)];移入 50 ml 量瓶中并加蒸馏水定容,摇匀,制得阿司匹林标准贮备液。取该标准贮备液 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 ml,分别置于 50 ml 量瓶中,加适量蒸馏水,充分摇匀,定容。以空白溶液作为参比溶液,在 512 nm 波长处测定吸光度(A)。以 A 对阿司匹林质量浓度(c)进行线性回归,得回归方程为 $A=0.001184c+0.00925$ ($r=0.9995$),线性范围为 2~40 μg/ml。回收率试验结果显示,平均回收率为 98.99%,RSD 为 0.95% ($n=9$)。

2.2.2 包封率和载药量的测定 精密称取阿司匹林-β-环糊精包合物 PLGA 微球及空白 PLGA 微球各 5 mg,置于 50 ml 量瓶中,加少量二氯甲烷溶解,加适量蒸馏水充分摇匀,定容至刻度,超声振荡 4 h,静置 24 h 后离心取上清液,加入稍过量三氯化铁,调节 pH 至 3~4。在 512 nm 波长处测定吸光度,代入回归方程计算阿司匹林的量,计算载药量和包封率,载药量=微球内的阿司匹林的质量/微球总质量×100%,包封率=微球中阿司匹林的质量/阿司匹林的加入质量×100%。

2.3 正交设计试验优化处方工艺

在预试验的基础上,采用正交设计试验的方法,以搅拌速度(A, r/min)、PVA 浓度(B, %)、PVA 体积(C, ml)、投料比(D, mg/mg)为因素,以包封率为指标,优化处方工艺。因素与水平见表 1,正交试验设计与结果见表 2,方差分析结果见表 3。

表 1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A, r/min	B, %	C, ml	D, mg/mg
1	3 000	1	10	1:5
2	4 000	2	20	1:10
3	5 000	3	30	1:15

表 2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and results of orthogonal test

序号	A, r/min	B, %	C, ml	D, mg/mg	包封率, %
1	1	1	1	1	36.57
2	1	2	2	2	40.25
3	1	3	3	3	41.76
4	2	1	2	3	38.34
5	2	2	3	1	40.86
6	2	3	1	2	42.69
7	3	1	3	2	36.42
8	3	2	1	3	34.48
9	3	3	2	1	36.75
K ₁	118.58	111.33	113.74	114.18	
K ₂	121.89	115.59	115.34	119.36	
K ₃	107.65	121.20	119.04	114.58	
R	14.24	9.87	5.30	5.18	

表 3 方差分析结果

Tab 3 Analysis result of variance

变异来源	Ⅲ型平方和	自由度	F	P
A	37.022	2	18.511	<0.05
B	16.337	2	8.169	
C	4.925	2	2.463	
D	5.538	2	2.769	

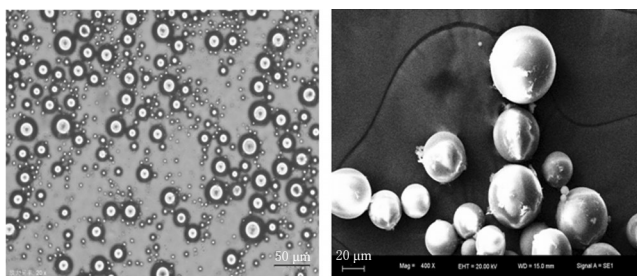
注: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

Note: $F_{0.05}(2, 2)=19.00$

由表 2 和表 3 可知,对包封率影响程度大小为搅拌速度>PVA 浓度>PVA 体积>投料比,其中搅拌速度对包封率有显著影响($P<0.05$)。综合考虑,选择最优处方工艺为 A₂B₃C₃D₂,即搅拌速度为 4 000 r/min, PVA 浓度为 3%, PVA 体积为 30 ml,投药比为 1:10。按所选处方工艺制得阿司匹林-β-环糊精包合物 PLGA 微球 3 批,测得其包封率分别为 41.76%、42.21%、41.39%,平均值为 $(41.79 \pm 1.09)\%$,表明该优化工艺可行。

2.4 微球外观形态、流动性、分散性、粒径分布的考察

取少量阿司匹林-β-环糊精包合物 PLGA 微球及空白 PLGA 微球,以去离子水分散,分别滴于载玻片和硅片上,相应处理后,分别以光学显微镜和扫描电镜观察微球表面形态,以了解微球的外观形态、流动性及分散性。将少量载药微球用双蒸水分散均匀,取 20 μl 溶液放入石英皿中并用双蒸水滴加至标志线,吹匀后放入可见光粒径分析仪中进行分析,采集数据后绘制粒径分布图。阿司匹林-β-环糊精包合物 PLGA 微球的光镜和电镜图见图 1,粒径分布见图 2。



A. 光镜照片

B. 电镜照片

图 1 阿司匹林-β-环糊精包合物 PLGA 微球的光镜和电镜图
Fig 1 Optical and electron microscope of aspirin-β-cyclodextrin-PLGA microspheres

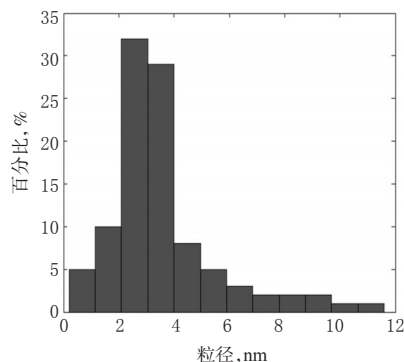


图 2 阿司匹林-β-环糊精包合物 PLGA 微球的粒径分布
Fig 2 Distribution of particle size of aspirin-β-cyclodextrin-PLGA microspheres

光镜下,阿司匹林-β-环糊精包合物 PLGA 微球呈圆形,表面光滑,粒径大小不一。电镜下,载药微球呈球形,表面光滑,粒径大小不一,无粘连。微球平均粒径范围为 0.5~127.5 μm,主要集中在 20~60 μm,呈正态分布。

2.5 体外释药特性

取干燥阿司匹林- β -环糊精包合物PLGA微球粉末各150 mg,用5 ml等张磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)分散,37 °C水浴,分别于6、12、18、24、48、72、96、120、168、216、264、312、360、408、456、552、600 h取3 ml上清液,并用新鲜PBS补足;加入稍过量的三氯化铁,调节pH至3~4。在512 nm波长下测定吸光度,计算阿司匹林含量和累积释放度,绘制释放曲线。阿司匹林- β -环糊精包合物PLGA微球的体外释放曲线见图3。

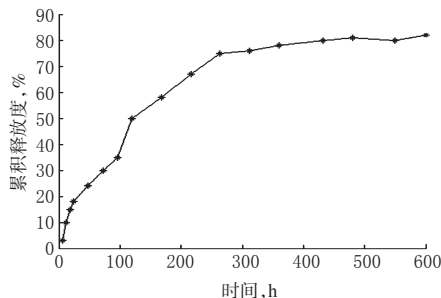


图3 阿司匹林- β -环糊精包合物PLGA微球的体外释放曲线

Fig 3 Release curve of aspirin- β -cyclodextrin-PLGA microspheres *in vitro*

由图3显示,阿司匹林的释放符合零级动力学模型,说明制备的载药微球具有缓释性,释放时间达到600 h,累积释放度为83%。释药初期具有突释性,24 h内突释量为18%,后期释放速度稳定,具有药物释放的平台期。

3 讨论

阿司匹林作为一种常见的解热、镇痛、抗炎类药物,其剂型多样,适用于不同疾病、不同人群。有学者对阿司匹林缓释制剂做过相关研究,本试验相比之前的研究主要有以下改进和优势:(1)本试验选取阿司匹林- β -环糊精包合物为目标药物,并对试验条件进行优化,因为阿司匹林在水中易分解为水杨酸,且随温度的升高,更容易分解。因此本试验制备包合物所选用的温度较低,且磁力搅拌时间较短,目的也是为了防止阿司匹林在试验过程中过多地分解。最终制得的包合物平均包封率为 $(86.4 \pm 1.5)\%$,在水中的溶解度同温度下比单纯阿司匹林提高约30倍。(2)本试验微球制备方法为W/O/W型,而不是S/O/O型或是W/O/O型,原因是阿司匹林- β -环糊精包合物为亲水性,选用W/O/W的方法可取得较高的包封率,而且操作简单,应为本类药物研究的首选方法。(3)本试验油相采用二氯甲烷与乙酸乙酯混合液(体积比为1:2),原因是单纯二氯甲烷挥发速度较快,不易控制试验条件,所得微球表面形态欠佳;而乙酸乙酯挥发速度较慢,与前者混合作为油相,试验条件容易控制,且所得微球表面形态较好。(4)体外释放试验结果显示,本试验所得微球材料体外释药试验稳定在600 h左右,稳定缓释时间较长。(5)本试验在制备微球过程中加入TPP,其具有缓冲作用。因为PLGA降解过程中产酸,会影响药物的缓释,加入TPP可维持局部pH值中性,有利于药物的缓释。(6)本试验选取了搅拌速度、PVA浓度、PVA体积、投料比4个影响因素,采用正交试验的方法确定了最优处方工艺。

由试验数据分析得到:(1)包封率随磁力搅拌器搅拌速度的增加而提高,当搅拌速度达到5 000 r/min时,包封率降低。

随着搅拌速度的提高,初乳及复乳液滴分散更加均匀,液滴粒径更加均一,微球成球率提高,包封率随之提高;当搅拌速度过高时,初乳及复乳液滴粒径过小,所得微球粒径相应减小,包埋药物容易扩散至外水相引起药物的损失,从而导致包封率的下降,因此搅拌速度设定为4 000 r/min较为适宜。(2)本试验采用1%、2%、3%浓度梯度的PVA溶液,在其他条件相同的情况下,包封率随PVA浓度的增加而提高。较高浓度的PVA溶液作为外水相,可以减少药物向外水相扩散,初乳及复乳液滴粒径大小更加均匀,微球成球率较高,因此PVA溶液浓度设定为3%。(3)本试验采用3种体积的PVA溶液作为对比,分别为10、20、30 ml,结果显示,30 ml组包封率较高。原因为后者使复乳相分散度更好、分散更加均匀,有利于有机溶液的挥发和成球,从而提高缓释微球的包封率。(4)一定范围内,包封率随投料比的增加而提高,即一定范围内,包封率随PLGA投入量的增加而提高;当PLGA投入量达到一定程度后,包封率反而下降。这可能是因为阿司匹林分子单元与更多PLGA分子接触,增加成球的可能性,阿司匹林得到有效的包封,减少药物扩散至外水相的量,包封率相应提高;当PLGA投入量增加到一定程度后,在缓释微球形成过程中,PLGA碎片增加,成球率下降,同时得到等质量微球材料中药物的比例减少,使微球有效成分减少,不符合研发目的^[8]。因此选择投料比为1:10,既保证了一定的包封率,又使微球材料中有效成分的比例得到保证。

本试验采用乳化溶剂挥发法制备阿司匹林- β -环糊精包合物PLGA微球,所制备的载药微球表面光滑、无粘连、粒径较均匀、包封率较高;体外释放试验结果显示,载药微球具有缓释的作用,释药时间可达600 h。

参考文献

- [1] 徐进.阿司匹林联合氯吡格雷治疗冠心病心绞痛的临床疗效评估[J].中国医药指南,2013,11(33):403.
- [2] Liu X,Zhou LY.The role of aspirin in gastrointestinal tumor[J].*Chin J Pract Inter Med*,2011,31(8):651.
- [3] 段金成. ω -3 多不饱和脂肪酸与阿司匹林对实验性动物牙周炎作用机制的探讨[D].昆明:昆明医学院口腔医学院,2010.
- [4] 单静颖.木犀草素 β -环糊精包合物稳定性的探讨[J].黑龙江医药科学,2011,27(1):49.
- [5] 缪阳,陶玲,沈祥春.靶向微球在各脏器疾病中的应用研究进展[J].中国药房,2013,24(13):1 225.
- [6] 何爱明,范景鹏,林世明.阿司匹林- β -环糊精包合物的制备工艺优选[J].福建师范大学福清分校学报,2010,doi:10.3969/j.issn.1008-3421.2010.05.007.
- [7] 朱柳腾,吕翠盈,孙龙生,等.可见分光光度法测定阿司匹林中水杨酸含量的探究[J].山东化工,2009,38(10):38.
- [8] Smeets R, Gerhards F, Stein JM, *et al*. A novel hemostatic delivery device for thrombin: biodegradable poly(D, L-lactide-co-glycolide) 50:50 microspheres[J]. *J Biomed Mater Res A*,2011,96(1):177.

(收稿日期:2016-02-29 修回日期:2016-03-26)

(编辑:邹丽娟)