

大黄素 soluplus 聚合物胶束的制备及质量评价

典灵辉*, 于恩江, 程纪伦, 郭向华, 黄紫荣, 张振声

(广东医学院药学院, 广东 东莞 523808)

[摘要] **目的:**制备大黄素的 soluplus 聚合物胶束并对其进行质量评价。**方法:**采用薄膜分散法制备大黄素聚合物胶束(Emo-PMs)。利用粒径测定仪、透射电镜、X-射线衍射对其进行表征;采用 HPLC 测定 Emo-PMs 的包封率和载药量,流动相甲醇-0.1%磷酸(75:25),检测波长 437 nm;采用动态膜透析法考察载药胶束的体外释药特性。**结果:**Emo-PMs 呈球形或类球形,平均粒径(65 ± 3.8)nm,多分散系数 0.099 ± 0.022 , Zeta 电位 $-(12.7 \pm 0.19)$ mV,平均包封率(88.25 ± 3.51)%,平均载药量(4.51 ± 0.72)%;大黄素以无定形状态或分子状态包载在聚合物胶束中;Emo-PMs 具有缓释作用,释放机制符合 Higuchi 方程。**结论:**制备的 Emo-PMs 粒径、包封率、载药量可控,具有缓释作用。

[关键词] 大黄素; soluplus; 聚合物胶束; 质量评价; 累积释放度; 载药量; 包封率

[中图分类号] R283.6;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0015-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160015

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140627.0946.097.html>

[网络出版时间] 2014-06-26 11:05

Preparation and Quality Evaluation of Emodin-loaded Soluplus Polymeric Micelles

DIAN Ling-hui*, YU En-jiang, CHENG Ji-lun, GUO Xiang-hua, HUANG Zi-rong, ZHANG Zhen-sheng
(School of Pharmaceutical Sciences, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare emodin-loaded soluplus polymeric micelles (Emo-PMs) and evaluate their quality. **Method:** Emo-PMs were prepared by film dispersion method using an amphiphilic copolymer soluplus. Emo-PMs were characterized by particle size analyzer, transmission electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD); release curve was determined by dynamic membrane dialysis; HPLC was employed to determine entrapment efficiency and drug loading with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid (75:25) and detection wavelength at 437 nm. **Result:** Emo-PMs showed spherical with a mean particle size of (65 ± 3.8) nm, polydispersity index of 0.099 ± 0.022 , Zeta potential of $-(12.7 \pm 0.19)$ mV, average encapsulation efficiency of (88.25 ± 3.51)% and average drug loading of (4.51 ± 0.72)%. Emodin entrapped in polymer micelles with amorphous or molecular form; release mechanism of Emo-PMs fitted Higuchi equation. **Conclusion:** These prepared Emo-PMs had exhibited *in vitro* sustained release, their particle size, encapsulation efficiency and drug loading were controllable.

[Key words] emodin; soluplus; polymeric micelles; quality evaluation; cumulative release; drug loading; encapsulation efficiency

大黄素为蒽醌类衍生物,是大黄的主要有效成分,具有抑菌消炎、抗氧化、抗肿瘤、调节胃肠活动及

抗肝肾纤维化等药理作用^[1]。该成分水溶性及口服生物利用度差,拟采用热熔挤出技术增加其水溶

[收稿日期] 20131221(008)

[基金项目] 广东省建设中医药强省项目(20131261);广东省卫生厅项目(A2013427);东莞市国际合作项目(20135081520012)

[通讯作者] *典灵辉,博士,副教授,从事药物缓控释与靶向制剂研究, Tel:0769-22896599, E-mail:dianlh@163.com

性,以促进吸收,但该技术的温度较高,不耐热的药物易降解。soluplus 是聚乙二醇-乙 烯基己内酰胺-醋酸 乙 烯 酯 共 聚 物,具 有 两 亲 性 结 构,常 作 为 热 容 挤 出 制 备 固 体 分 散 体 的 载 体 材 料 使 用,其 临 界 胶 束 浓 度 ($6.44 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 非 常 低,可 在 水 中 能 自 发 形 成 稳 定 的 新 型 给 药 系 统—聚 合 物 胶 束^[2]。将 两 亲 性 聚 合 物 溶 解 至 水 中,当 其 浓 度 高 于 临 界 胶 束 浓 度 时,可 聚 集 形 成 纳 米 聚 集 体,即 聚 合 物 胶 束。聚 合 物 胶 束 具 有 载 药 范 围 广、结 构 稳 定、组 织 渗 透 性 优 良、体 内 滞 留 时 间 长 等 特 点,目 前 基 于 聚 合 物 胶 束 为 载 体 治 疗 癌 症 或 其 他 疾 病 的 药 物 已 上 市 或 处 于 临 床 评 估 阶 段^[3-4]。本 实 验 以 soluplus 为 载 体 材 料,采 用 薄 膜 分 散 法 制 备 大 黄 素 聚 合 物 胶 束 并 对 其 进 行 体 外 评 价,为 该 制 剂 的 体 内 研 究 提 供 理 论 基 础。

1 材料

1200 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司),XW-80A 型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂),AG285 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),EM-1200EX 型透射电子显微镜(日本电子公司),Zetasizer Nano ZS90 型纳米粒度分析仪(英国 Malvern 公司),D-MAX 2200 VPC 型 X-射线衍射仪(日本 Rigaku 公司)。

超滤膜(截留相对分子质量 14 000 Da,上海医药工业研究院),大黄素对照品(山东新华制药有限公司,纯度 98%,批号 CAS 518-82-1),泊洛沙姆 407 (F_{127})及 soluplus(德国 BASF 公司),水为超纯水,甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

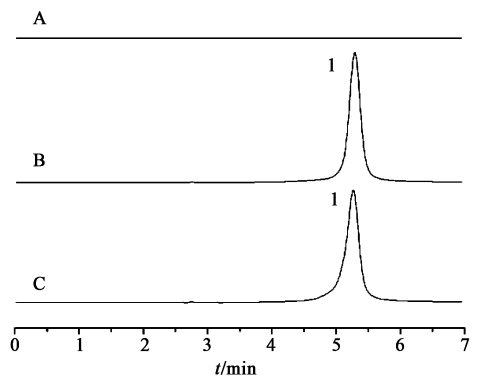
2 方法与结果

2.1 大黄素的含量测定

2.1.1 色谱条件 依利特 C_{18} 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸(75:25),柱温 35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长 437 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 20 μL ,见图 1。

2.1.2 标准曲线的建立 精密称取大黄素对照品 8 mg,加甲醇溶解并定容至 100 mL,得 80 mg·L⁻¹ 储备液。分别精密量取该储备液 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,2.0,4.0 mL 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,得系列对照品溶液,于 437 nm 处测定峰面积,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 104.7X - 42.229$ ($R^2 = 0.9996$),线性范围 0.8 ~ 32 mg·L⁻¹。

2.1.3 精密度试验 精密移取大黄素储备液适量,加甲醇稀释,配制低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液(1.6,4.8,16 mg·L⁻¹),计算日内精密度分别



A. 空白样品;B. 对照品;C. 供试品;1. 大黄素

图 1 大黄素聚合物胶束 HPLC

为 0.39%,0.13%,0.10%,日间精密度分别为 0.24%,0.11%,0.04%,均符合分析检测要求。

2.1.4 回收率试验 分别在 1 mL 空白聚合物胶束中加入 1.6,4.8,16 mg·L⁻¹ 的大黄素对照品溶液各 1 mL,计算回收率($n = 3$)分别为 106.18%,99.67%,108.45%,RSD 分别为 1.96%,0.97%,0.89%,表明回收率符合方法学要求。

2.2 大黄素聚合物胶束的制备 称取大黄素 5 mg 和 soluplus 100 mg 溶于适量有机溶剂(丙酮 0.2 mL)中,磁力搅拌使其完全溶解,混合均匀,于 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴磁力搅拌,挥去有机溶剂,得药物和聚合物的混合物薄膜;称取适量表面活性剂 F_{127} 溶于水中,配成 1% F_{127} 水溶液,加入混合物薄膜中,涡旋 5 min,于 650 r·min⁻¹ 磁力搅拌 2 h,即得大黄素聚合物胶束(Emo-PMs)溶液。

2.3 Emo-PMs 的质量评价

2.3.1 粒径及 Zeta 的测定 制备的 Emo-PMs 为呈黄色、淡蓝色乳光、透明的胶体溶液。将 Emo-PMs 溶液加入适量水中稀释,采用激光粒度仪测定粒径(65 ± 3.8) nm,多分散系数(PDI) 0.099 ± 0.022 ,Zeta 电位 $-(12.7 \pm 0.19)$ mV,见图 2。

2.3.2 Emo-PMs 的形态 取 Emo-PMs 滴至铺有碳膜的铜网上,用 2.0% 磷钨酸染色,自然干燥使粒子在铜网上浓缩沉积,利用透射电镜观察并拍照,结果发现 Emo-PMs 呈类球形,表面光滑,圆整,见图 3。

2.3.3 X-射线衍射法 取适量游离大黄素、空白胶束、Emo-PMs、空白胶束和大黄素的物理混合物进行 XRD 分析,测量电压和电流分别为 40 kV 和 25 mA,扫描角度 $3^{\circ} \leq 2\theta \leq 50^{\circ}$,扫描速率 0.9 min⁻¹,见图 4。结果显示游离药物及物理混合物 XRD 中显示了大黄素的晶体峰,载药胶束与空白胶束则均不显示药物的晶体峰,提示大黄素在 Emo-PMs 中可能以分

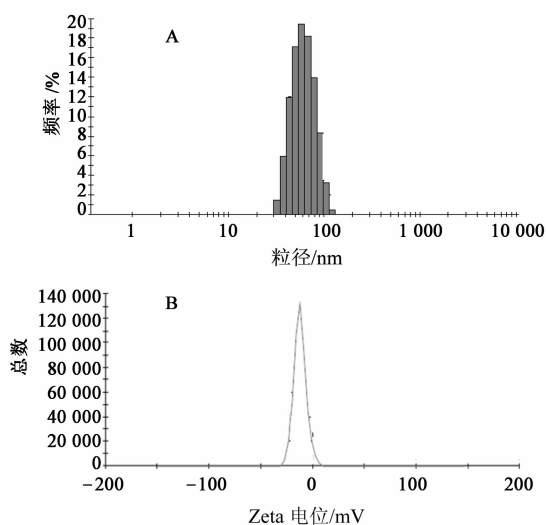


图2 大黄素聚合物胶束的粒径(A)和 Zeta 电位(B)测定

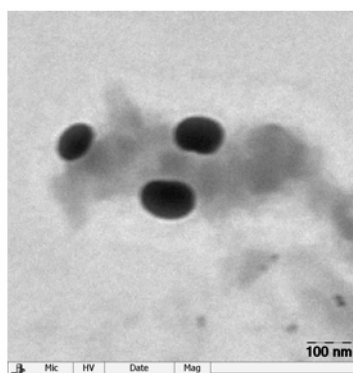
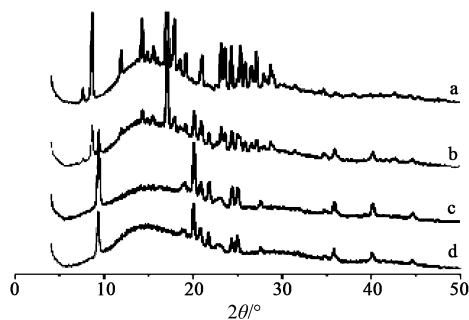
图3 大黄素聚合物胶束 TEM($\times 30\,000$ 倍)a. 大黄素原料药; b. 大黄素和空白样品的物理混合物;
c. 供试品; d. 空白样品

图4 大黄素聚合物胶束 XRD

子状态或无定形状态存在,说明药物基本封装在聚合物胶束中。

2.3.4 Emodin-PMs 的封装率与载药量测定 采用膜过滤法测定大黄素的封装率。膜过滤法是指未封装的药物以游离微晶(绝大部分)和溶解在介质(极小部分)共2种形式存在,故可采用微孔滤膜过滤截留游离微晶,已溶解的药物浓度可近似地认为是药

物的溶解度^[5]。精密量取稀释的 Emodin-PMs 溶液 0.5 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜滤去未封装的药物,滤液加甲醇破乳并定容至 10 mL 量瓶中,按 2.1.1 项下色谱条件测定大黄素含量。另精密量取稀释的 Emodin-PMs 溶液 0.5 mL 于 10 mL 量瓶中,加甲醇破乳并定容,采用 HPLC 测定药物含量,计算封装率和载药量分别为 $(88.25 \pm 3.51)\%$ 和 $(4.51 \pm 0.72)\%$ 。

2.3.5 Emodin-PMs 体外释放及其机制考察 大黄素为水难溶性药物,为满足漏槽条件,需在介质中加入有机溶剂,虽然加入有机溶剂与人体生理环境不符,但可通过比对游离药物和载药聚合物胶束的体外释放情况,为体内试验研究提供参考。选择 35% 乙醇为释放介质。将 Emodin-PMs 溶液 1 mL 装入透析袋中,置于装有释放介质 15 mL 的锥形瓶中,采用恒温 ($37\text{ }^\circ\text{C}$) 振荡法,分别在 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h 全部取出释放介质,同时补充等量等温的新鲜释放介质。以大黄素的丙二醇溶液为参照,按同样方法进行体外释放考察。采用 HPLC 测定释放介质中药物含量,计算累积释放度(Q),绘制释放曲线并进行释药数学模型拟合,结果见图 5,表明大黄素原料药在 48 h 内基本释放完全,达 94.50%;而 Emodin-PMs 在 48 h 内仅释放 33.42%,呈现明显的缓释作用,提示 soluplus 聚合物胶束适合作为缓释制剂的载体。分别采用零级动力学方程、一级动力学方程和 Higuchi 方程对 Emodin-PMs 溶液体外释放数据进行处理,结果见表 1。

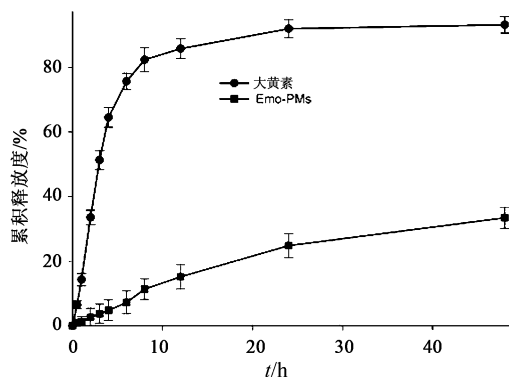
图5 大黄素聚合物胶束的体外释放曲线($\bar{x} \pm s, n=3$)

表1 大黄素聚合物胶束的不同释放模型拟合方程

动力学方差	回归方差	R^2
零级	$Q = 0.308t + 6.856$	0.865 2
一级	$\ln(1 - Q) = 0.005t - 11.035$	0.908 9
Higuchi	$Q = 4.251t^{1/2} - 1.198$	0.971 6

由表 1 可知,按 Higuchi 方程拟合的效果较好,表明 Emodin-PMs 释放是以扩散为主的释药方式^[6],药

物分子从胶束的疏水内核部位慢慢扩散至释放介质中。可能由于药物分子结构上羟基和疏水内核的羰基间存在氢键作用,导致药物释放更加缓慢^[7]。

3 讨论

聚合物胶束的制备主要采用薄膜分散法,透析法,溶剂挥发法等。薄膜分散法具有制备简单、耗时短、易实现工业化大生产和载药量高等优点^[8]。在预试验基础上,本文采用改良的薄膜分散法制备 Emo-PMs。聚合物在水中自组装为胶束,一般不需加入稳定剂或表面活性剂,但在 Emo-PMs 制备过程中发现加入适量的表面活性剂可增加聚合物胶束的稳定性,提高载药量和包封率^[9],可能是由于 F₁₂₇ 具有两亲性结构,在制备过程中参与了聚合物胶束的形成。F₁₂₇ 常作为制备纳米粒的稳定剂^[10],可提高载药量和包封率。

粒径大小及分布是影响胶束在体内分布和吸收的主要因素之一^[11],一般口服后被吸收的界限为 100 nm,小粒子(50 nm)的吸收大于较大粒子(3 μm)^[12],本文制备的 Emo-PMs 粒径约 65 nm,分布于口服吸收的最佳粒径范围内。

载药纳米粒的释放通常采用动态透析法。药物在释放介质中必须满足释放的漏槽条件,一般认为药物在释放介质中浓度低于其 10% 饱和和状态的浓度时,才能形成浓度梯度,否则不能真实反映药物的释放行为^[13]。大黄素在水中溶解度很小,使用水和 pH 7.4 磷酸盐缓冲液作为释放介质时,大黄素原料药溶液很快达到饱和,在透析袋中沉淀析出,无法评价及比较大黄素原料药和 Emo-PMs 的体外释放情况。在参考文献和预试验基础上,选用 35% 乙醇作为释放介质^[14]。由释放曲线可知,Emo-PMs 具有明显的缓慢作用,达到了缓释、长效的目的,说明药物基本完全包载于聚合物胶束中。Emo-PMs 释放机制符合 Higuchi 扩散方程,表明药物的释放释放过程主要为骨架扩散控制释放的机制。文献报道采用物理包埋法制备的胶束一般属于扩散释药机制^[15],与本文对 Emo-PMs 释放机制的模拟相符合。

[参考文献]

[1] 丁艳,黄志华. 大黄素药理作用研究进展[J]. 中药药理与临床,2007,23(5):236.
[2] Linn M, Collnot E M, Djuric D, et al. Soluplus® as an effective absorption enhancer of poorly soluble drugs *in vitro* and *in vivo* [J]. Eur J Pharm Sci, 2012, 45(3):336.
[3] Hamaguchi T, Matsumura Y, Suzuki M, et al. NK105,

a paclitaxel- incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend *in vivo* antitumor activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel [J]. Br J Cancer, 2005,92(7):1240.
[4] Nakanishi T, Fukushima S, Okamoto K, et al. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin [J]. J Control Release, 2001, 74(1/3):295.
[5] 杨小云. 槲皮素聚己内酯-聚乙二醇-聚己内酯嵌段共聚物胶束的研究[D]. 郑州:河南大学,2007.
[6] Teng Y, Morrison M E, Munk P, et al. Release kinetics studies of aromatic molecules into water from block polymeric micelles [J]. Macromol, 1998, 31(11):3578.
[7] Kataoka K, Matsumoto T, Yokoyama M, et al. Doxorubicin-loaded poly-(ethylene glycol)-poly (B-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance [J]. J Control Release, 2000, 64(1/3):143.
[8] Norris D A, Puri N, Sinko P J. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates [J]. Adv Drug Delivery Rev, 1998, 34(2/3):135.
[9] Alakhov V, Pietrzynski G, Patel K, et al. Pluronic block copolymers and Pluronic poly (acrylic acid) microgels in oral delivery of megestrol acetate [J]. J Pharm Pharmacol, 2004, 56(10):1233.
[10] Xiong X Y, Tam K C, Gan L H, et al. Release kinetics of hydrophobic and hydrophilic model drugs from pluronic F₁₂₇/poly (lactic acid) nanoparticles [J]. J Control Release, 2005, 103(1):73.
[11] Adams M L, Lavasanifar A, Kwon G S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery [J]. J Pharm Sci, 2003, 92(7):1343.
[12] Jones M C, Ranger M, Leroux J C, et al. pH-sensitive unimolecular polymeric micelles: synthesis of a novel drug carrier [J]. Bioconj Chem, 2003, 14(4):774.
[13] Cho Y W, Lee J, Lee S C, et al. Hydrotropic agents for study of *in vitro* paclitaxel release from polymeric micelles [J]. J Control Release, 2004, 97(2):249.
[14] 张洪. 大黄素固体脂质纳米粒的制备及理化性质的研究 [J]. 中国药师, 2010, 13(3):326.
[15] 毛世瑞, 田野, 王琳琳. 药物纳米载体-聚合物胶束的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(12):979.
[16] 易承学, 余江南, 徐希明. 纳米药物载体在中药制剂研发中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16):1936.

[责任编辑 刘德文]