

# 壳聚糖修饰的丹皮酚 PEG-PLGA 纳米粒的 制备及其体外释药性能考察

唐涛<sup>1</sup>, 臧巧真<sup>1</sup>, 龙凯花<sup>1</sup>, 王春柳<sup>2</sup>, 李晔<sup>2\*</sup>

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省中医药研究院, 西安 710003)

**[摘要]** **目的:**制备壳聚糖修饰的丹皮酚聚乙二醇-(聚乳酸-羟基乙酸共聚物)(PEG-PLGA)纳米粒,对其体外性质进行表征,考察纳米粒的体外释药性能,为丹皮酚的新型纳米制剂研究提供参考。**方法:**以 PEG-PLGA 为载体材料,壳聚糖为表面修饰剂,采用纳米沉淀法制备了壳聚糖修饰的丹皮酚 PEG-PLGA 纳米粒,利用正交试验优化处方工艺,并对其体外性质进行表征。以 pH 7.4 磷酸盐缓冲液为释放介质,考察壳聚糖修饰的丹皮酚 PEG-PLGA 纳米粒的体外释药行为。**结果:**载药纳米粒经壳聚糖修饰后,Zeta 电位由负电荷转为正电荷且更加稳定,粒径略有增加。制备出的纳米粒外观呈球形,平均粒径和 Zeta 电位分别为(96.6±3.2) nm,(30.61±0.34) mV,载药量及包封率分别为 10.87% 和 79.37%。体外释药试验表明载药纳米粒 24 h 的累计释放率 62.4%。**结论:**按优选的处方成功制备了壳聚糖修饰的丹皮酚 PEG-PLGA 纳米粒,该制剂的体外性质良好且具有一定的缓释特性。

**[关键词]** 丹皮酚;壳聚糖;纳米粒;表征;体外释药;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;聚乙二醇

**[中图分类号]** R283.6;R284.1;R942 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0008-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060008

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160219.1046.002.html>

**[网络出版时间]** 2016-02-19 10:46

## Preparation and *in Vitro* Release Properties of Paeonol-loaded PEG-PLGA Nanoparticles Modified by Chitosan

TANG Tao<sup>1</sup>, ZANG Qiao-zhen<sup>1</sup>, LONG Kai-hua<sup>1</sup>, WANG Chun-liu<sup>2</sup>, LI Ye<sup>2\*</sup>

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China;

2. Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare paeonol-loaded polyethylene glycol (PEG) -poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles modified by chitosan and investigate its *in vitro* release behavior. **Method:** Taking PEG-PLGA as carrier material, chitosan as surface modifier, paeonol-loaded PEG-PLGA nanoparticles modified by chitosan was prepared by nano precipitation method, formulation of this preparation was optimized by orthogonal design, characteristics of nanoparticles were evaluated. *In vitro* release of this preparation was characterized with phosphate buffer (pH 7.4) as medium. **Result:** After being modified by chitosan, particle size of paeonol-loaded PEG-PLGA nanoparticles increased, while its Zeta potential turned to positive charge, its shape was spherical. Mean particle size, Zeta potential, drug loading efficiency and encapsulation efficiency were (96.6±3.2) nm, (30.61±0.34) mV, 10.87% and 79.37%. Accumulated release rate of this nanoparticles reached 62.4% at 24 h. **Conclusion:** Paeonol-loaded PEG-PLGA nanoparticles modified by chitosan is prepared successfully, which shows a sustained-release characteristics with good *in vitro* properties.

**[Key words]** paeonol; chitosan; nanoparticles; characterization; *in vitro* release; poly (lactic-co-glycolic acid); polyethylene glycol

**[收稿日期]** 20150720(018)

**[基金项目]** 陕西省重点科技创新团队计划项目(2012KCT-18)

**[第一作者]** 唐涛,在读硕士,从事中药新型纳米给药系统研究,Tel:029-87251837, E-mail:tangtao\_academic@126.com

**[通讯作者]** \*李晔,硕士,研究员,从事中药新型给药系统研究,Tel:029-87251837, E-mail:liyelsj@163.com

丹皮酚又称牡丹酚,是从中药徐长卿和牡丹皮中提取分离得到的小分子化合物,是一种药理活性广泛、高效、低毒的中药有效成分<sup>[1]</sup>,具有抗炎、抗过敏、抗肿瘤、抗感染等广泛的药理作用,被誉为“天然抗生素”<sup>[2]</sup>。近年来,伴随着传统中药新用途研究的不断深入,研究发现丹皮酚可以通过扩张血管,从而达到抗室性心律失常及抗动脉粥样硬化的目的,还具有缺血组织保护作用,促进及改善血液微循环等药理作用<sup>[3,4]</sup>。但丹皮酚易挥发、易氧化,水溶性差,生物半衰期短和对胃肠道黏膜具有刺激性的特性,极大地限制了其临床应用。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)和聚乙二醇(PEG)具有良好的生物相容性,无免疫原性<sup>[5]</sup>,由两者形成的嵌段共聚物目前已被广泛用作药物载体材料。PLGA 经过 PEG 修饰后,可避免网状内皮系统(RES)的清除,延长了其在体内的循环时间,用其制备的纳米粒具有良好的缓释作用<sup>[6]</sup>。壳聚糖是目前发现的唯一的天然碱性多糖,具有良好的生物相容性、生物可降解性、低免疫原性等优点,适合作为缓控释载体的修饰材料。壳聚糖本身带有正电荷,可与带负电的细胞膜表面糖蛋白分子相互作用,壳聚糖修饰的纳米载体不仅对其具有保护作用,提高其稳定性,而且可以促进药物吸收,提高药物的缓释性<sup>[7-9]</sup>。本实验以 PEG-PLGA 为载体材料,壳聚糖为修饰剂,制备了壳聚糖修饰的丹皮酚 PEG-PLGA 纳米粒(CS/Pae-NPs),并对其进行了初步的质量评价及体外释药行为考察,为丹皮酚的新型纳米制剂的研究提供参考。

## 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),H-600 型透射电子显微镜(日本日立公司),Synergy 型超纯水系统(美国 Millipore 公司),HJ-6 型多头磁力加热搅拌器(常州国华电器有限公司),R-3 型旋转蒸发仪(瑞士布琦公司),TGL-18 型台式高速冷冻离心机(长沙英泰仪器有限公司),ZEN3600 型激光粒度仪(英国 Marlvern 公司)。透析袋(国药集团化学试剂有限公司,截留相对分子质量 8 kDa),壳聚糖(上海晶纯生化科技股份有限公司,脱乙酰度  $\geq 95\%$ ),丹皮酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号 708-9003),丹皮酚原料药(西安天一生物技术有限公司,质量分数  $\geq 99.0\%$ ),聚乙二醇-(聚乳酸-羟基乙酸共聚物)(PEG-PLGA,山东济南岱罡生物技术有限公司),泊洛沙姆 F68(德国 BASF 公司),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 壳聚糖修饰的丹皮酚纳米粒(CS/Pae-NPs)的制备** 采用纳米沉淀法制备。称取处方量丹皮酚和 PEG-PLGA 溶于丙酮中构成有机相,于  $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  磁力搅拌,将有机相缓慢滴加到水相(处方浓度的泊洛沙姆 F68 水溶液)中,继续搅拌 1 h,经  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  旋转蒸发除去有机溶剂,得载药纳米粒胶束溶液,即丹皮酚纳米粒(Pae-NPs)。称取一定量的壳聚糖溶于 3% 乙酸水溶液中,得  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  壳聚糖溶液。量取与 Pae-NPs 混悬液等体积的壳聚糖溶液,于持续搅拌下滴加至 Pae-NPs 混悬液中,继续充分搅拌 0.5 h,得略带淡蓝色乳光的 CS/Pae-NPs 混悬液。

### 2.2 CS/Pae-NPs 中丹皮酚分析方法的建立

**2.2.1 色谱条件** Agilent ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相甲醇-水(70:30),检测波长 274 nm,流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量 10  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.2 线性范围考察** 精密称取丹皮酚对照品 6.02 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,得  $0.602 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  丹皮酚储备液。精密量取该储备液适量,分别稀释成质量浓度为 12.04, 24.08, 36.12, 60.20, 72.24, 108.36  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的系列对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,以丹皮酚质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 44.634X - 0.22$  ( $r = 0.9999$ ),线性范围 12.04 ~ 108.36  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 精密移取 CS/Pae-NPs 混悬液 0.2 mL 于具塞试管中,加甲醇定容至 2 mL 后超声破乳 1 h,经 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

**2.2.4 精密度试验** 精密吸取同一对照品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,重复进样 6 次,结果丹皮酚峰面积的 RSD 0.8%,表明仪器精密度良好。

**2.2.5 重复性试验** 取同一批 CS/Pae-NPs 混悬液,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液 6 份,按 2.2.1 项下色谱条件测定,结果丹皮酚含量的 RSD 2.8%,表明该方法重复性良好。

**2.2.6 稳定性试验** 取同一供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 进行测定,结果丹皮酚峰面积的 RSD 1.2%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

**2.2.7 回收率试验** 按 2.1 项下方法操作制备空白 CS/NPs 混悬液,吸取适量,加入丹皮酚储备液适量,加甲醇稀释成低、中、高质量浓度(12.04, 36.12,

108.36 mg·L<sup>-1</sup>) 的供试品溶液 ( $n = 3$ ), 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算平均加样回收率分别为 (98.49 ± 1.65)%, (99.63 ± 2.21)%, (99.25 ± 1.29)%, RSD 分别为 1.2%, 1.9%, 1.9%, 满足方法学检测的要求。

**2.3 载药量及包封率的测定** 采用超滤离心法测定载药量及包封率。移取 CS/Pae-NPs 混悬液适量置于超滤离心管中, 9 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 0.5 h, 精密吸取外管中滤液 0.2 mL, 用甲醇定容至 2 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定游离药物量。CS/Pae-NPs 中丹皮酚总量按 2.2 项下方法测定。分别按公式  $DL = (W_0 - W_1) / W_i \times 100\%$  和  $EE = (W_0 - W_1) / W_0 \times 100\%$  计算 CS/Pae-NPs 的载药量 (DL) 及包封率 (EE), 式中  $W_0$  为 CS/Pae-NPs 中药物总量,  $W_1$  为 CS/Pae-NPs 中游离药物量,  $W_i$  为 CS/Pae-NPs 的总质量。

**2.4 CS/Pae-NPs 的制备工艺优化** 预试验发现壳聚糖的修饰使载药纳米粒的稳定性及粒径有所增加, 但对载药量及包封率几乎无影响。通过单因素试验考察制定了 Pae-NPs 的制备处方, 在此基础上, 选择泊洛沙姆 F68 质量分数, PEG-PLGA 质量浓度, PEG-PLGA 与丹皮酚质量比为考察因素, 每个因素选择 3 个水平, 以载药量为指标, 采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验优化制备工艺。试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。由直观分析可知, 各因素对制备工艺的影响顺序依次为  $C > B > A$ 。方差分析表明因素 C 对载药量影响显著, 其他因素则均无显著性影响。综合分析, 选择最佳处方组合 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>, 即泊洛沙姆 F68 质量分数 1%, PEG-PLGA 质量浓度 15 g·L<sup>-1</sup>, PEG-PLGA 与丹皮酚质量比 5:1。

**2.5 CS 修饰纳米粒前后的性质比较** 按 2.1 项下方法制备 Pae-NPs 和 CS/Pae-NPs, 处方组成相同, 均为 2.4 项下优选的处方。以粒径、多分散系数、载药量、包封率及 Zeta 电位为指标, 考察纳米粒经壳聚糖修饰前后的性质变化, 结果见表 3。

**2.6 纳米粒的外貌形态观察及粒径测定** 取 CS/Pae-NPs 混悬液 0.2 mL, 用水稀释至 2 mL, 利用激光粒度仪测定, 结果平均粒径 (96.6 ± 3.2) nm, 多分散系数 0.246 ± 0.017, 表明纳米粒粒径均匀且分散性良好。吸取少量 CS/Pae-NPs 混悬液滴至铜网上, 静置 10 min 后用滤纸吸干, 滴加 2% 磷钨酸溶液负染色 5 min, 自然挥干, 采用透射电子显微镜观察纳米粒的形态。结果显示 CS/Pae-NPs 呈圆球形, 大小均一, 粒子间未见粘连与聚集。

表 1 丹皮酚 PEG-PLGA 纳米粒制备工艺正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of preparation process of paeonol-loaded PEG-PLGA nanoparticles

No.	A 泊洛沙姆 F68 质量分数/%	B PEG-PLGA 质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	C PEG-PLG 与丹皮酚 质量比	D (空白)	载药量 /%
1	0.2	5	5:1	1	8.78
2	0.2	10	10:1	2	5.52
3	0.2	15	15:1	3	3.40
4	1.0	5	10:1	3	4.38
5	1.0	10	15:1	1	2.62
6	1.0	15	5:1	2	10.99
7	2.0	5	15:1	2	3.59
8	2.0	10	5:1	3	10.56
9	2.0	15	10:1	1	6.14

表 2 载药量方差分析

Table 2 Variance analysis of drug loading efficiency

方差来源	SS	F	P
A	1.342	1.174	>0.05
B	2.382	2.084	>0.05
C	74.985	65.604	<0.05
D(误差)	1.140		

注:  $F_{0.05}(2, 2) = 19$ 。

表 3 Pae-NPs 和 CS/Pae-NPs 的性质变化 ( $n = 3$ )

Table 3 Characteristics of Pae-NPs and CS/Pae-NPs ( $n = 3$ )

纳米粒	粒径 /nm	多分散系数	Zeta 电位 /mV	载药量 /%	包封率 /%
Pae-NPs	87.9 ± 2.7	0.134 ± 0.013	-8.73 ± 0.21	10.99	78.96
CS/Pae-NPs	96.6 ± 3.2	0.246 ± 0.017	30.61 ± 0.34	10.87	79.37

**2.7 体外释药试验** 分别精密量取 CS/Pae-NPs 混悬液 (含丹皮酚 4.14 mg) 和等质量的丹皮酚溶液 (pH 7.4 磷酸盐缓冲液) 各 10 mL, 置于预先处理好的透析袋中, 密封后置于 500 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 中, 于 75 r·min<sup>-1</sup>, (37 ± 0.5) °C 恒温水浴搅拌, 定时取样 2 mL, 同时补加等温同量释放介质, 样品经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 按 2.2.1 项下色谱条件测定, 计算累积释放率, 绘制体外释药曲线, 见图 1。结果显示丹皮酚原料药在释放介质中释放较快, 2 h 累计释放量接近 80%, 6 h 药物已基本释放完全, 累计释放量达 98.1%。CS/Pae-NPs 在释放前期存在一定的突释现象, 随后释放逐渐缓慢, 24 h 达到平稳状态, 累计释放量 62.4%, 显示出一定的缓释特性。

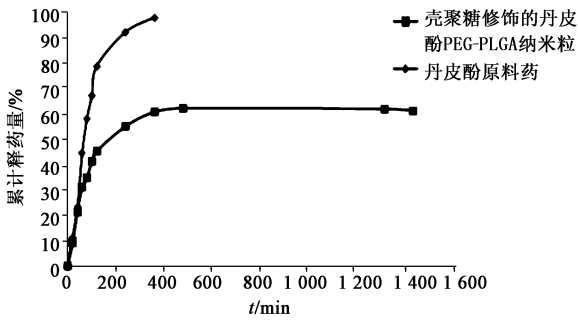


图 1 丹皮酚及 CS/Pae-NPs 体外释放曲线 (n = 3)

Fig. 1 *In vitro* release profiles of paeonol and CS/Pae-NPs (n = 3)

### 3 讨论

本文成功制备了壳聚糖修饰 PEG-PLGA 纳米粒作为丹皮酚的药物载体,由于两亲性共聚物能在水介质中发生微相分离,形成具有疏水性内核与亲水性外壳的超分子聚集体。这种纳米胶束主要作为难溶性药物的增溶载体,其疏水性内核包载药物,提高难溶性药物的溶解度,并可保护药物不降解,同时控制药物缓慢释放;而亲水性外壳有助于纳米胶束在血液中的长时间循环<sup>[10-11]</sup>。未经壳聚糖修饰的 PEG-PLGA 纳米粒带负电荷,壳聚糖是带正电的碱性多糖,通过静电吸附作用修饰到纳米粒表面<sup>[12]</sup>,且通过实验证明经壳聚糖修饰后,PEG-PLGA 纳米粒的稳定性明显提高。此外,经修饰的纳米载体由于表面带有正电荷,可与胃肠道黏膜表面负电荷的黏蛋白发生静电作用,延长载药载体的滞留时间<sup>[13]</sup>,促进药物的黏膜吸收,继而增强药效。体外释放试验表明载药纳米粒在 2 h 内释药较快,可能是由于药物吸附于纳米粒表面或者包载于纳米粒浅表,而 2 ~ 24 h 释药缓慢,其体外释放主要依赖于聚合物纳米粒的降解而释药<sup>[14-15]</sup>。提示纳米粒的粒径、包封率及载药量都有可能对体外释药产生一定影响,这有待后续实验进一步考察确认。

#### [参考文献]

[ 1 ] Riley C M, Ren T C. Simple method for the determination of paeonolin human and rabbit plasma by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and ultraviolet detection [ J ]. *J Chromatogr A*, 1989, 489 ( 2 ): 432-437.  
[ 2 ] 孙言才,沈玉先,孙国平,等. 丹皮酚的主要药理活性研究进展 [ J ]. *中成药*, 2004, 26 ( 7 ): 579-582.

[ 3 ] 冯巧巧,周勇,张岫美. 丹皮酚对麻醉犬冠脉结扎致心肌梗死的保护作用 [ J ]. *中国生化药物杂志*, 2008, 29 ( 5 ): 320-323.  
[ 4 ] 武继彪,隋在云,管华诗. 丹皮酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [ J ]. *中华中医药学刊*, 2008, 26 ( 9 ): 1887-1888.  
[ 5 ] Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, et al. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: *in vitro* nanoparticle degradation, *in vitro* drug release and *in vivo* drug residence in blood properties [ J ]. *J Control Release*, 2002, 79 ( 1/3 ): 123-135.  
[ 6 ] Essa S, Rabanel J M, Hildgen P. Characterization of rhodamine loaded PEG-PLGA nanoparticles ( NPs ): effect of poly (ethylene glycol) grafting density [ J ]. *Int J Pharm*, 2011, 411 ( 1/2 ): 178-187.  
[ 7 ] 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.  
[ 8 ] Diebold Y, Jarrín M, Sáez V, et al. Ocular drug delivery by liposome chitosan nanoparticle complexes ( LCS-NP ) [ J ]. *Biomaterials*, 2007, 28 ( 8 ): 1553-1564.  
[ 9 ] 黄秋燕,张宏亮,王捷,等. 壳聚糖苦丁茶纳米粒的制备及理化性质考察 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 ( 6 ): 10-13.  
[ 10 ] Corrigan O I, Li X. Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates [ J ]. *Eur J Pharm Sci*, 2009, 37 ( 3/4 ): 477-485.  
[ 11 ] Bondioli L, Costantino L, Ballestrazzi A, et al. PLGA nanoparticles surface decorated with the sialic acid, *N*-acetylneuraminic acid [ J ]. *Biomaterials*, 2010, 31 ( 12 ): 3395-3403.  
[ 12 ] 陈红丽,吕洁丽,晏杰,等. 壳聚糖修饰的 PLGA 纳米粒作为蛋白多肽类药物载体的研究 [ J ]. *功能材料*, 2011, 42 ( 2 ): 202-205.  
[ 13 ] Park J H, Saravanakumar G, Kim K, et al. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives [ J ]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2010, 62 ( 1 ): 28-41.  
[ 14 ] Win K Y, Feng S S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs [ J ]. *Biomaterials*, 2006, 27 ( 15 ): 2713-2722.  
[ 15 ] 吴瑛,李阳,李凤琴,等. 黄芩苷壳聚糖纳米粒的制备及表征 [ J ]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20 ( 15 ): 15-19.

[责任编辑 刘德文]