

紫花牡荆素壳聚糖微球的制备及体外释药性能考察

郝巧龙, 李霞, 张春春, 轩亚茹, 高尚辉, 张梅, 唐辉, 应雪*

(石河子大学药学院, 新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 新疆石河子 832000)

[摘要] 目的:制备紫花牡荆素壳聚糖微球,优化其制备工艺,并考察其体外释放性质。方法:以山梨糖醇酐单油酸酯和聚山梨酯-80 为乳化剂,液体石蜡为油相,戊二醛作交联剂,采用乳化交联法制备紫花牡荆素壳聚糖微球。利用 Design-Expert 8.0.6 软件优化紫花牡荆素壳聚糖微球的制备工艺,扫描电镜观察目标微球形态,动态透析法检测目标微球的体外释药性能。结果:紫花牡荆素壳聚糖微球最佳制备工艺条件为油水相比 6:1,交联时间 3 h,转速 $1\ 400\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$;目标微球形态较圆整、粒径分布较为均匀,平均粒径 $7.92\ \mu\text{m}$,载药量 29.20%,包封率 39.23%。紫花牡荆素壳聚糖微球在 4 h 的药物累计释放率 26.75%,之后释药平缓,释放变慢,48 h 的药物累计释放率 95%。微球在磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)中的释放遵循 Higuchi 方程。结论:优化的制备工艺简单易行。紫花牡荆素壳聚糖微球载药量较高,具有一定的缓释作用。

[关键词] 紫花牡荆素;壳聚糖;微球;载药量;乳化交联法;星点设计-效应面法

[中图分类号] R283.6;R284.1;R942 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0006-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016190006

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1122.076.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 11:22

Preparation of Casticin Chitosan Microspheres and Investigation of Its *in Vitro* Release Properties

HAO Qiao-long, LI Xia, ZHANG Chun-chun, XUAN Ya-ru, GAO Shang-hui, ZHANG Mei, TANG Hui, YING Xue*

(Key Laboratory of Special Phytomedicine Resources in Xinjiang, Ministry of Education, College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize preparation process of casticin chitosan microspheres and investigate its *in vitro* release characteristics. **Method:** Casticin chitosan microspheres were achieved by emulsion crosslinking method, taking liquid paraffin as oil phase, span-80 and tween-80 as emulsifier, and glutaraldehyde as crosslinking agent. Design-Expert 8.0.6 software was applied to optimize preparation procedure. Morphology of the microspheres was observed by scanning electron microscope (SEM). Dynamic dialysis method was used to determine *in vitro* release characteristic of casticin chitosan microspheres. **Result:** Optimum preparation process of microspheres was as following: ratio of oil phase to water phase of 6:1, crosslinking time of 3 h, rotation rate of $1\ 400\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$. Casticin chitosan microspheres had rounded shape and uniform particle size distribution, its average diameter was $7.92\ \mu\text{m}$, drug-loading was 29.20% and encapsulation efficiency was 39.23%. Release behavior of casticin chitosan microspheres was described by Higuchi model in phosphate buffer solution with pH of 7.4. Cumulative release amounts of casticin chitosan microspheres in 4 h and 48 h were 26.75% and 95%.

[收稿日期] 20150917(011)

[基金项目] 国家级大学生创新创业训练计划项目(201510759066);国家自然科学基金项目(81160396,81460540);石河子大学大学生创新创业训练计划项目(SRP2015256);石河子大学杰出青年科技人才培养计划项目(2012ZRKXJQ07);新疆生产建设兵团社会发展科技攻关与成果转化计划项目(2015AD007)

[第一作者] 郝巧龙,从事药物新剂型研究,Tel:13239936155,E-mail:1654018348@qq.com

[通讯作者] *应雪,博士,副教授,从事药物新剂型研究,Tel:13579455890,E-mail:yingxue2011@qq.com

respectively. **Conclusion:** This optimized preparation process is feasible and simple, casticin chitosan microspheres has high drug-loading with a sustained-release effect.

[Key words] casticin; chitosan; microspheres; drug-loading; emulsion crosslinking method; central composite design-response surface methodology

紫花牡荆素又叫蔓荆子黄素,属于多甲氧基黄酮类化合物。研究表明紫花牡荆素对人类白血病^[1]、乳腺上皮癌^[2]、人结肠癌^[3]、前列腺癌^[4]、人卵巢癌^[5]等细胞株的增殖有明显抑制作用,但对正常细胞的增殖无影响或影响很小。由于该成分存在水溶性较差、生物利用率低等问题,致使其在医学界应用受到限制。

壳聚糖又称脱乙酰甲壳素,是由自然界广泛存在的几丁质经脱乙酰作用得到的,化学名称为聚葡萄糖胺(1-4)-2-氨基-B-D 葡萄糖。其具有优良的生物官能性、相容性、安全性、微生物降解性等,已被应用在医药、食品、化工、化妆品、水处理、金属提取及回收、生化和生物医学工程等诸多领域,并取得了重大进展。壳聚糖还具有较好的肿瘤抑制作用,是一种具有广阔研究前景的新型药物辅料^[6]。

本实验以紫花牡荆素为模型药物,壳聚糖为载体材料,采用乳化交联法制备表面光滑、粒径分布良好的紫花牡荆素壳聚糖微球,利用星点设计-效应面法优化工艺条件,考察微球的表面形态,并评价该制剂的体外释药性能,以提高紫花牡荆素的稳定性及生物利用度,延长其作用时间,使目标微球具有较明显的缓释作用。

1 材料

TGL-16G 型台式离心机(上海安亭科学仪器制造厂),JSM-6490LV 型扫描电镜(日本电子株式会社),UV-2401PC 型紫外-可见分光光度仪(日本岛津公司),BP211D 型电子天平(德国 Sartorius 公司),PZE-6030 型真空干燥箱(真空度 < 133 Pa,上海精宏实验设备有限公司)。

紫花牡荆素(成都普瑞法科技开发有限公司,批号 14111206,纯度 > 98%),壳聚糖(上海蓝季科技发展有限公司,脱乙酰度 > 90%),液体石蜡(天津永晟精细化工有限公司),山梨糖醇酐单油酸酯(span-80,北京索莱宝科技有限公司),聚山梨酯-80(tween-80,天津市光复精细化工研究所),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 空白微球及紫花牡荆素壳聚糖微球的制备

精密称取适量壳聚糖粉末置烧杯中,加入 3% 冰乙

酸溶液 5 mL,超声 5 min,搅拌过夜,作为水相;取液体石蜡适量及乳化剂(span-80 和 tween-80)置烧杯中,混匀,作为油相。将已搅拌好的水相通过注射器以 $8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度缓慢滴入油相中,制成 W/O 型乳剂,反应 2 h 后加入交联剂固化 2 h,倒入离心管中,于 $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min,倾去油相,下层沉淀经石油醚洗涤 3 次,每次 5 mL,正丁醇脱水,真空干燥,得空白微球^[7]。取紫花牡荆素适量,置于烧杯中,加入甲醇 5 mL,超声溶解,加入含 3% 冰乙酸的壳聚糖溶液中,混匀,作为水相。随后制备方法同空白微球,得紫花牡荆素壳聚糖微球。

2.2 粒径的测定

取微球粉末适量置载玻片上,用电镜观察不少于 200 个微球,并将粒径范围划分为若干个单元,计算平均粒径。

2.3 紫花牡荆素的含量测定

2.3.1 检测波长的确定

取紫花牡荆素及壳聚糖适量分别溶于甲醇中,以甲醇作空白对照,于 200 ~ 600 nm 扫描。结果显示在 347 nm 处,紫花牡荆素有最大吸收,而壳聚糖吸收很小,对测定无干扰。

2.3.2 标准曲线的绘制

精密称量紫花牡荆素原料药 1.0 mg,置于 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,分别取 1,2,3,4,5,6,7,8 mL 溶于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,于 347 nm 处测定吸光度 A ,以 A 为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 0.0714X + 0.1381 (R^2 = 0.9984)$,线性范围 1.0 ~ 8.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3.3 回收率测定

精密吸取 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 紫花牡荆素溶液 1,4,8 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,依次加入空白壳聚糖微球 1.0 mg,加甲醇定容至刻度,配成低、中、高 3 个质量浓度的溶液($n = 3$)。取样适量,在 347 nm 处测定 A ,计算回收率分别为 99.07%,100.03%,101.14%,RSD 分别为 0.9%,0.9%,1.0%。

2.3.4 精密度试验

配制质量浓度分别为 1.0,4.0,8.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫花牡荆素溶液,在 347 nm 处连续测定 5 次 A ,连续测定 5 d,计算日内精密度 RSD 分别为 0.4%,0.1%,0.1%;日间精密度 RSD 分别为 0.8%,0.7%,1.0%。

2.4 载药量及包封率的测定

于研钵中充分研磨

已精密称取的适量微球粉末,使成乳状液后转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,超声助溶,经 0.2 μm 微孔滤膜过滤,弃去初滤液,在 347 nm 处测定 A,计算载药量和包封率。

$$\text{载药量} = \frac{\text{微球中药物质量}}{\text{微球质量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{微球中药物质量}}{\text{总投药量}} \times 100\%$$

2.5 星点设计-效应面法优选制备工艺 选择油水相比、交联时间、转速为考察因素,每个因素设计 5 个水平(编码 -1, 682, -1, 0, 1, 1. 682)。精密称取紫花牡荆素 1.0 mg,经单因素试验考察发现,固定其他因素不变,确定各个因素取值区间的端点,即油水相比 2:1 ~ 6:1,交联时间 1 ~ 5 h,转速 600 ~ 1 400 r·min⁻¹。采用星点设计-效应面法优选制备工艺,试验安排及结果见表 1。

表 1 紫花牡荆素壳聚糖微球制备工艺星点试验分析

Table 1 Central composite test analysis of preparation technology of casticin chitosan microspheres

No.	A 转速 /r·min ⁻¹	B 油水相比	C 交联时间/h	载药量 (Y ₁)/%	包封率 (Y ₂)/%
1	1 000	4:1	3	23.69	26.84
2	600	2:1	1	17.79	21.05
3	800	4:1	3	16.47	18.20
4	1 000	4:1	2	21.79	24.22
5	1 000	4:1	4	29.29	30.34
6	1 400	6:1	1	18.95	21.80
7	1 000	5:1	3	20.12	23.48
8	1 000	4:1	3	23.69	26.84
9	600	6:1	5	30.51	35.8
10	600	2:1	5	20.68	25.55
11	1 400	6:1	5	24.66	28.98
12	1 000	4:1	3	23.69	26.84
13	1 400	2:1	1	19.15	22.78
14	600	6:1	1	24.80	28.61
15	1 200	4:1	3	15.96	17.62
16	1 400	2:1	5	17.67	21.43
17	1 000	4:1	3	23.69	26.84
18	1 000	3:1	3	15.18	18.43
19	1 000	4:1	3	23.69	26.84
20	1 000	4:1	3	23.69	26.84

利用 Design-Expert 8.0.6 软件,以 Y₁ 和 Y₂ 为因变量,对各自变量进行二项式拟合^[8],得 Y₁ = 4.667 - 2.464B + 0.025A + 4.861C + 1.564AB - 1.570AC - 0.137BC + 0.280B² - 1.043A² - 0.544C² (R² = 0.896 0), Y₂ = 9.079 - 2.182B + 0.020A + 5.339C + 1.753AB - 1.756AC - 0.183BC + 0.250B² - 7.739A² - 0.579C² (R² = 0.806 1)。根据星点试验的设计原理,绘制各因变量与自变量的三维效应面和二维等高图,见图 1,2。

2.6 验证试验 由星点设计-效应面法得紫花牡荆

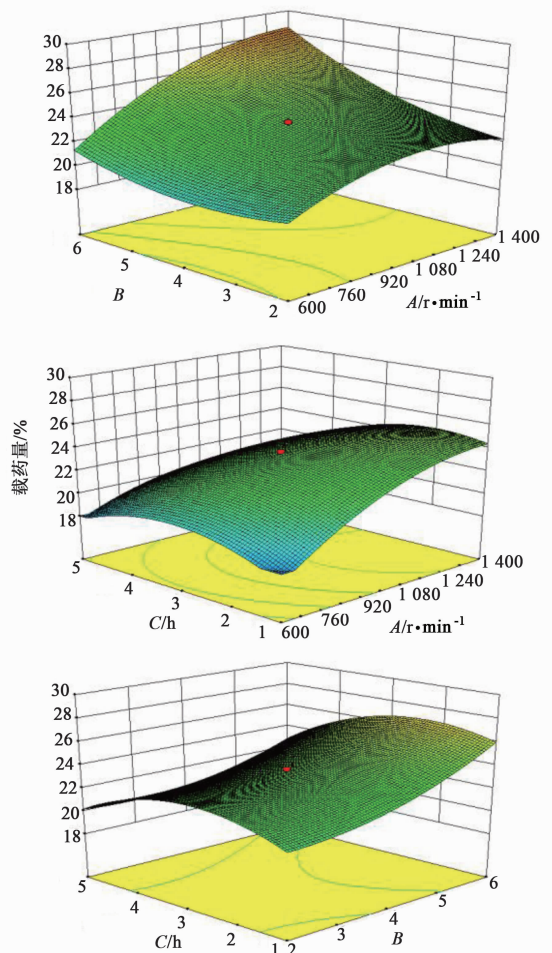


图 1 转速、交联时间和油水相比对紫花牡荆素壳聚糖微球载药量影响的三维效应面

Fig. 1 Three-dimensional response surfaces of drug-loading of casticin chitosan microspheres between rotating rate, crosslinking time and ratio of oil phase-water phase

素壳聚糖微球最佳制备工艺条件为油水相比 6:1,交联时间 3 h,转速 1 400 r·min⁻¹;载药量、包封率及平均粒径预测值分别为 29.45%, 33.55%, 8.12 μm。精密称取紫花牡荆素 1.0 mg,共 3 份,按优选的工艺条件制备样品,结果载药量 29.20%,包封率 39.23%,平均粒径 7.92 μm, RSD 分别为 0.8%, 0.6% 和 1.2%。说明建立的数学模型预测性较好。

2.7 外观形貌考察 取紫花牡荆素壳聚糖微球,将已真空干燥的微球粉末用导电胶带黏连固定后溅金,并固定在样品台上,通过架台的槽沟将样品微球送到停止点,在真空状态下观察微球表面。结果显示制备的紫花牡荆素壳聚糖微球粒径分布较均匀、跨距较小,微球较圆整、表面较光滑。

2.8 体外释药性能考察 于装有 pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)2 mL 的透析袋中加入已精密称取的适量载药微球,将透析袋放入装有溶出介质 PBS 100

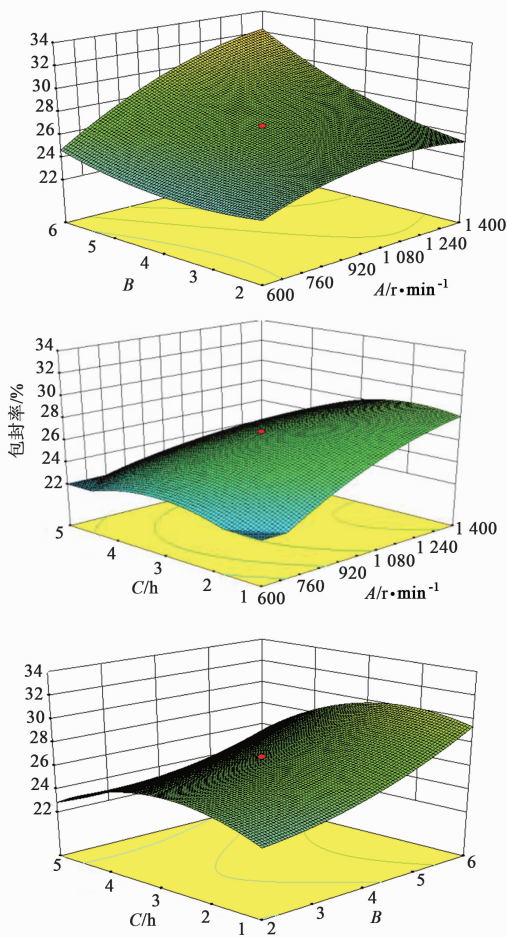


图 2 转速、交联时间和油水相比对紫花牡荆素壳聚糖微球包封率影响的三维效应面

Fig. 2 Three-dimensional response surfaces of encapsulation efficiency of casticin chitosan microspheres between rotating rate, crosslinking time and ratio of oil phase-water phase

mL 的锥形瓶中,置于恒温振荡器中,于 (37 ± 0.5) °C 恒温振荡 48 h。分别于 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 h 取样 5 mL,加甲醇溶解,同时补充等量等温的溶出介质。经 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,在 347 nm 处测定 A,计算药物累计释放率,见图 3。结果发现与原料药相比,紫花牡荆素壳聚糖微球具有明显的缓释效果,在 4 h 的药物累计释放率 26.75%,之后释药平缓,释放变慢,48 h 的药物累计释放率 95%。

3 讨论

壳聚糖中含有活泼的羟基和氨基,可与体内糖蛋白结合形成氢键,使得壳聚糖具有很好的生物黏附特性,使其有望成为药物的运送载体,增加药物的在体吸收;当药物进入体内并从微球中释放出来后,壳聚糖可被体内的生物酶分解随后被组织吸收完全,具有较好的生物可降解特性;同时由于壳聚糖分

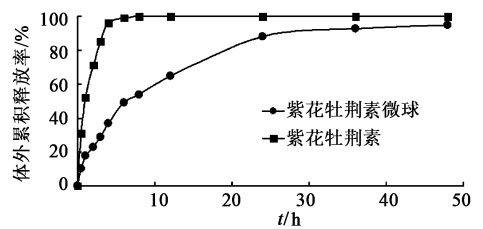


图 3 紫花牡荆素壳聚糖微球和原料药的体外释放曲线
Fig. 3 *In vitro* release curves of casticin chitosan microspheres and casticin

子带电,具有较强的化学反应能力,可与细胞膜作用,增强药物在细胞间的转运作用。文献报道壳聚糖还具有直接抑制肿瘤细胞增殖的作用^[9]。

紫花牡荆素可明显抑制癌细胞的增殖,本文以壳聚糖为载体材料,将目标药物紫花牡荆素制成缓释微球,其表面有丰富的多糖链,与很多细菌细胞壁结构类似,能够被特异细胞(或组织)识别,可靶向给药到达病灶部位后缓慢释放,增强其抗癌效果并延长作用时间。

[参考文献]

- [1] Shen J K, Du H P, Yang M, et al. Casticin induces leukemic cell death through apoptosis and mitotic catastrophe[J]. *Ann Hematol*, 2009, 88(8):743-752.
- [2] Haïdara K, Zamir L, Shi Q W, et al. The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action[J]. *Cancer Lett*, 2006, 242(2):180-190.
- [3] Ono M, Yanaka T, Yamamoto M, et al. New diterpenes and nor-diterpenes from the fruits of vitex rotundifolia [J]. *Nat Prod*, 2002, 65(4):537-541.
- [4] Díaz F, Chávez D, Lee D, et al. New diterpenes and nor-diterpenes from the fruits of vitex rotundifolia [J]. *Nat Prod*, 2003, 66(6):865-867.
- [5] Díaz F, Chávez D, Lee D, et al. Vitexicarpin a flavonoid from vitex trifolia, induces apoptosis in K562 cells via mitochondria-controlled apoptotic pathway [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2005, 40(1):27-31.
- [6] Lim S T, Martin G P, Berry D J, et al. Preparation and evaluation of the *in vitro* drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan [J]. *J Control Release*, 2000, 66(2/3):281-292.
- [7] 周雪,贺智勇,薛雨晨,等.葛根素缓释微球的高分子材料考察及制备工艺优选[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(9):14-18.
- [8] 于海峰,王洪光,徐元长,等.星点设计-效应面优化乳化交联法制备恩诺沙星壳聚糖微球[J]. *应用化工*, 2014, 43(4):688-695.
- [9] 令亚琴.壳聚糖抗肿瘤缓释药物的特征[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(8):1489-1496.

[责任编辑 刘德文]