

小檗碱聚乳酸微球的制备工艺及特性研究

刘英杰 张丽叶*

(北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 采用溶剂挥发法制备小檗碱聚乳酸微球, 选择小檗碱与聚乳酸的投料比、二氯甲烷与水的体积比和乳化剂 PVA 的质量分数 3 个因素为实验因素, 以包封率和载药量为优化指标, 采用 L9(3⁴) 正交试验优选最佳处方和制备工艺, 测定微球的粒径分布、包封率, 并进行体外释药试验。小檗碱聚乳酸微球的算术平均粒径为 $(53.0 \pm 3.5) \mu\text{m}$ ($n=500$), 载药量为 $(8.96 \pm 0.3) \%$ ($n=3$), 药物包封率为 $(83.4 \pm 0.5) \%$ ($n=3$), 37℃ 时 30 d 内微球体外累积释药量为 82.03%。小檗碱聚乳酸微球球形圆整, 释放良好, 分子量 2.5 万左右的聚乳酸较适宜制作微球。

关键词: 小檗碱; 聚乳酸微球; 水包油; 药物缓释

中图分类号: R94

引言

小檗碱(berberine)又称黄连素, 属于季铵生物碱类, 对溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌等均有抗菌作用, 多被用来制成胶囊和膜剂, 而缓释制剂只曾被制成脂质体^[1], 没有将其制成微球的报道, 原因是小檗碱水溶性好, 使用溶剂挥发法制备的微球包封率非常低。聚乳酸(PLA), 属于脂肪族聚酯, 具有优良的生物相容性, 酯键水解成为水和二氧化碳, 是一种理想的可生物降解药用高分子材料。聚乳酸微球的制备方法为溶剂挥发法^[2]。文献[3-4]在盐酸土霉素、辛伐他汀等药物聚乳酸微球的制备过程中, 考察了有机溶剂、聚乳酸浓度、表面活性剂浓度、搅拌速度等因素对微球包封率和粒径的影响; 文献[4-5]分析了药物含量、粒径等因素对微球释放性能的影响; 聚乳酸在缓释过程中的立体构象^[6]、药物释放后的细胞效应^[7-9]和非胃肠道给药系统的药物分配^[10]在其他相关文献也有所涉及。本文将制备一种新型的小檗碱聚乳酸缓释微球, 以聚乳酸为基质材料考察药物释放。

1 实验部分

1.1 主要原材料及仪器

聚乳酸(PLA), 数均分子量 2.5 万, 数均分子量

10 万; 小檗碱, 纯度大于 98%, 北京市永康药业有限公司; 透析袋(D22 mm), 截流分子量 8000~12000, 北京欣经科生物技术有限公司; 二氯甲烷、乙醇等试剂均为分析纯; 聚乙烯醇(PVA), Sigma 公司。

WFZ UV-2000 型紫外分光光度计, 龙尼柯上海仪器有限公司; 85-2 型恒温磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; S4700 扫描电镜, Hitachi。

1.2 微球的制备和体外释药

1.2.1 制备工艺

小檗碱 PLA 微球的制备采用溶剂挥发法制备。将 PLA 加二氯甲烷溶解, 加入小檗碱, 滴加无水乙醇, 使其完全溶解, 制成有机相(分散相)。取 100 mL 去离子水, 加 PVA 制成水相(连续相)。室温下将有机相加入水相混合制成水包油乳剂, 搅拌 7 h, 离心, 洗涤, 收集微球, 减压干燥即得。

由于实验过程中温度和搅拌速度已定, 小檗碱和聚乳酸的用量、油相(二氯甲烷)和水相的比例、以及水相中乳化剂的浓度这 3 个变量都很大程度上影响微球最终的包封率。本文选择小檗碱与聚乳酸的质量比(A)、二氯甲烷与水的体积比(B)和乳化剂 PVA 的质量分数(C)3 个因素为实验因素, 每个因素选择 3 个水平, 见表 1, 在该条件下制备 9 批微球样品, 以包封率和载药量为优化指标, 用正交试验优选最佳制备工艺。

1.2.2 体外释药

采用恒温振荡法测量微球的体外释药。称取小檗碱聚乳酸微球(30 mg), 置透析袋内, 扎紧袋口后置盛有 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的生理盐水的恒温振荡器中, 转

收稿日期: 2008-01-14

第一作者: 男, 1983 年生, 硕士生

* 通讯联系人

E-mail: lyzhang@mail.buct.edu.cn

速 100 r/min。每隔 3 d 取样 5 mL(同时补加等量同温介质),于 345 nm 处测定吸收度,由标准曲线计算药物浓度及累积释放率。

表 1 正交实验影响因素和水平表

Table 1 Factors and levels in the orthogonal experiments

水平	因素		
	A	B	C
1	0.01:0.3	10:80	3%
2	0.02:0.3	10:100	4%
3	0.035:0.3	10:120	5%

A 为小檗碱与聚乳酸的质量比;B 为二氯甲烷与水的体积比;C 为乳化剂 PVA 的质量分数

1.3 测试与表征

1.3.1 微球形态和粒径分布测定

光学显微镜法观察微球并计算其平均粒径^[2]。

1.3.2 聚乳酸微球中小檗碱质量浓度的测定

用紫外分光光度计法选择适当的波长,并制备小檗碱在二氯甲烷中的标准曲线和生理盐水中的标准曲线(线性范围:4~20 $\mu\text{g/mL}$)。

1.3.3 微球包封率和载药量的测定

用紫外分光光度计法由小檗碱和微球的质量得到药物的包封率和载药量^[2]。

2 结果与讨论

2.1 微球制备工艺的确定

以载药量和包封率为指标考察各因素对微球制备的影响,采用 L9(3⁴) 正交表优化工艺,结果见表 2。由表中数据,在 A、B、C 三因素中选择指标 K 最大者作为最佳水平,可优化出最佳工艺为 A1B2C1,最佳制备条件为小檗碱与聚乳酸的投料为 0.01:0.3、水与油相体积比为 10:100、乳化剂 PVA 质量分数为 3%。小檗碱与聚乳酸的投料比越小,小檗碱被聚乳酸包裹越完全,包封率越高。乳化剂 PVA 的用量如果太高,聚乳酸难行成微球,并且形成的微球多数粘在滤纸上,形状不规则,这也是正交 4、7、9 包封率低的原因。如果乳化剂的含量低于 3%,开始的两相混合,聚乳酸会迅速大量析出,包封率很低。但是小檗碱与聚乳酸的投料比不能太小,工艺 A1B2C1 理论上的载药量 3.3% 左右,考虑到最终的大工业生产,所以最终确定制备工艺为 A2B2C1。正交实验过程中没有加入 NaOH,这样可以拉开最终结果,便于优化,由于此时小檗碱的载药量还不是

很高,在水相中加入 NaOH,调节 pH 到 12,利用离子积的形式促使小檗碱尽多的溶解到二氯甲烷中从而提高包封率,按照 A2B2C1 工艺制备微球。分子量 2.5 万的聚乳酸制备的微球(微球 1)包封率为(83.4 \pm 0.5)% ($n=3$),载药量为(8.96 \pm 0.3)% ($n=3$),平均粒径为(53.0 \pm 3.5) μm ($n=500$),制备工艺稳定,重现性良好。

表 2 正交设计结果

Table 2 Result of the orthogonal experiments

序号	A	B	C	载药量/%	包封率/%
1	1	1	1	3.2231	42.0936
2	1	2	2	2.9748	26.0888
3	1	3	3	2.679	27.2455
4	2	1	2	1.4589	2.1883
5	2	2	3	6.037	39.6934
6	2	3	1	6.7681	38.7472
7	3	1	3	4.1328	3.5424
8	3	2	1	9.2056	18.6743
9	3	3	2	4.1168	3.5287
K ₁	0.954279	0.478243	0.995151		
K ₂	0.806289	0.844565	0.318058		
K ₃	0.257454	0.695214	0.704813		
极差	0.696825	0.366322	0.677093		

2.2 微球的粒径分布和形态观察

将微球 1 和微球 2(分子量 10 万的微球)作比较,见图 1。微球 1 平均粒径为 53.2 μm ,粒径在 40~70 μm 的微球占 63.5%。微球 2 粒径分布宽,不均匀,有大粒径微球抛尾。两种分子量聚乳酸相比,分子量 2.5 万的聚乳酸更适合微球的制备。

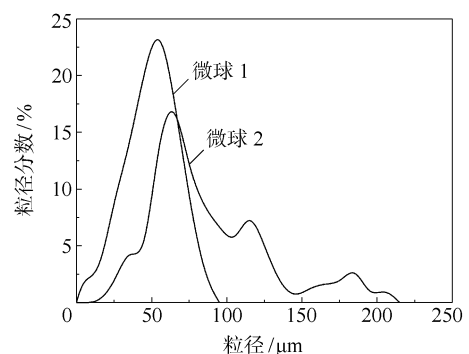


图 1 小檗碱聚乳酸微球粒径分布图

Fig. 1 Particle size distributions of PLA microspheres containing berberine

将微球 1 在光学显微镜和扫描电镜下观察其形貌,见图 2。由图 2(a)~(c)可见微球球形圆整,分散性好。图 2(d)为微球剖面。由图 2(c)可以看出

微球 1 表面有微孔和裂隙,这可成为微球内药物由球内向外扩散的通道。微球整体光滑,均匀,流动性良好。

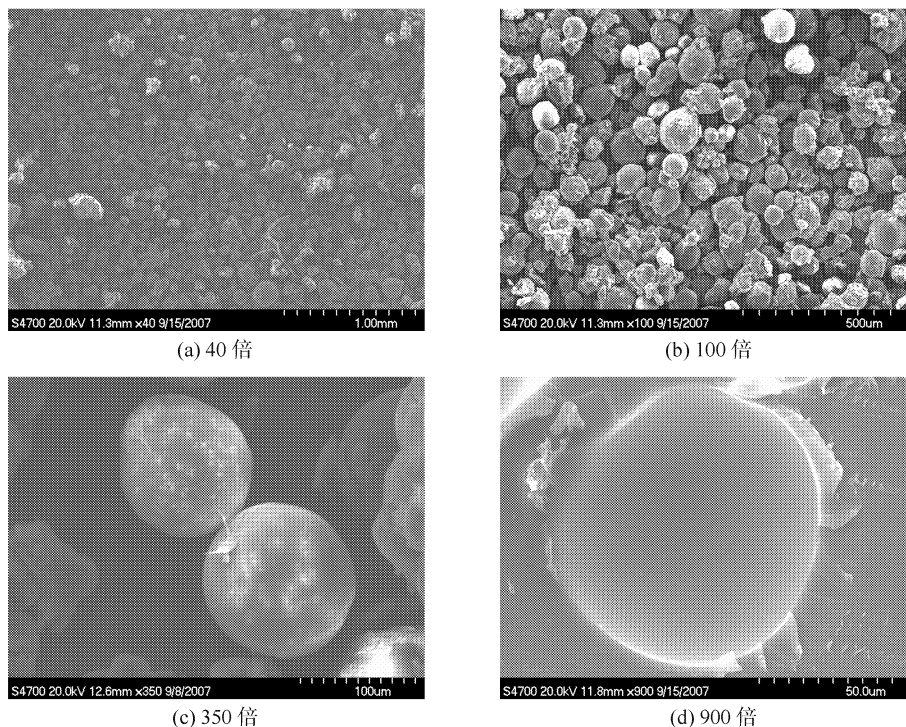


图 2 小檗碱聚乳酸微球的扫描电镜照片

Fig. 2 Scanning electron micrographs of the PLA microspheres containing berberine

2.3 微球体外释放性能考察

微球 1 在 37℃ 的累积释放曲线见图 3。在开始的 10 d 里由于微球分子量较高,微球内小檗碱释放缓慢。随着微球分子量的降解,在 10~25 d 内,释药特征呈直线,药物迅速释放。随着微球内药物含量减少,释放速度再次降低。微球在 30 d 内共释药达到 82.03%。微球 2 前 10 d 释放几乎为零,达不到医学用途。

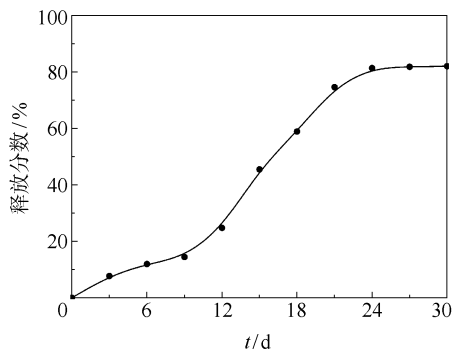


图 3 小檗碱聚乳酸微球在 37℃ 的累积释放曲线

Fig. 3 Accumulated release curve for the PLA microspheres containing berberine at 37℃

释放曲线呈现两阶段的释放规律,前期是扩散控释,后期是降解和溶蚀控制。将前期 24 d 的扩散控释释药数据分别用零级、一级和 Higuchi 动力学方程拟合。见表 3。由 r 可见零级动力学方程能更好地描述微球的扩散控释释药特征,药物缓释效果较好。

表 3 体内扩散控释的数学模型拟合结果

Table 3 Mathematical models of diffusion release rate in vitro

模型	拟合结果	相关系数
零级动力学方程	$y = 3.6173x - 7.9277$	$r = 0.9755$
一级动力学方程	$\ln(100 - y) = -0.0698x + 4.8656$	$r = 0.9383$
Higuchi 方程	$y = 17.374x^{1/2} - 19.043$	$r = 0.8874$

3 结论

采用溶剂挥发法制备了小檗碱聚乳酸微球,最佳工艺为:小檗碱与聚乳酸的投料为 0.02:0.3;水与油相体积比为 10:100;乳化剂 PVA 的浓度为 3%。调节水相的 pH 到 10,最大化的减小了小檗碱

在水相中的溶解量。制备的微球形状规则,表面光滑。

分子量 2.5 万的聚乳酸制得的微球,粒径小而均匀,粒径在 $40 \sim 70 \mu\text{m}$ 的微球占 63.5%,适宜微球的制备。

药物释放先慢后快再慢,释放过程用零级动力学方程拟合,为扩散控制释药。

参考文献:

- [1] 徐丽君,陆付耳,魏世超,等. 盐酸小檗碱脂质体的制备方法及其质量研究[J]. 中国医院药学杂志,2004,24(6):325-326.
- [2] Chognot D, Léonard M, Six J L, et al. Surface water-soluble copolymers for the preparation of controlled surface nanoparticles by double emulsion/solvent evaporation[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006, 51(1): 86-92.
- [3] 吴珍珍,李馨儒,胡应生,等. 辛伐他汀聚乳酸微球的制备及药剂学性质[J]. 中国新药杂志,2005,14(11): 1312-1315.
- [4] 李良,李国明. W/O 法制备盐酸土霉素/聚乳酸微球及其释药性能[J]. 中国现代应用药学杂志,2005,22(1):49-52.
- [5] 李德冠,姜丹,姜云垒,等. 聚乳酸微球的制备[J]. 吉林大学学报:理学版,2005,43(6):842-847.
- [6] Slager J, Domb A J. Hetero-stereocomplexes of D-poly(lactic acid) and the LHRH analogue leuprolide. Application in controlled release[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004, 58: 461-469.
- [7] Liang H F, Yang T F, Huang C T, et al. Preparation of nanoparticles composed of poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) block copolymers and evaluation of their uptake by HepG2 cells[J]. Journal of Controlled Release, 2005, 105(3):213-225.
- [8] Biggs D L, Lengsfeld C S, Hybertson B M, et al. In vitro and in vivo evaluation of the effects of PLA microparticle crystallinity on cellular response[J]. Journal of Controlled Release, 2003, 92(1-2):147-161.
- [9] 费正奇,胡蕴玉,张德志,等. 携载 rhBMP-2 微球的新型复合人工骨的释药及成骨活性研究[J]. 中华实验外科杂志,2006,23(2):151-156.
- [10] Kranz H, Bodmeier R. A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2007, 332(1-2): 107-114.

Preparation and characteristics of berberine polylactic acid microspheres

LIU YingJie ZHANG LiYe

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: Microspheres containing berberine and polylactic acid were prepared by an oil-in-water emulsifying solvent-evaporation process. The proportions of berberine and polylactic acid, dichloromethane and water, and concentration of PVA were taken as the three experimental factors in an $L9(3^4)$ orthogonal design in order to find the optimum conditions. The distribution of particle sizes, the encapsulation ratio and in vitro release rate were measured. The mean particle diameter was found to be $(53.0 \pm 3.5) \mu\text{m}$ ($n = 500$), the drug loading was $(8.96 \pm 0.3) \%$ ($n = 3$), and the encapsulation efficiency was $(83.4 \pm 0.5) \%$ ($n = 3$). The in vitro accumulated release rate of the microspheres was found to be 82.03% after 30 days at 37°C . These data indicate that PLA having molecular weight of 25000 is a suitable material for preparing berberine microspheres for controlled release.

Key words: berberine; polylactic acid microspheres; oil-in-water; in vitro release