

葛根素靶向缓释纳米球的制备及影响因素考查

★ 徐群英 (浙江省永康市第一人民医院 永康 321300)

摘要:目的:制备靶向缓释葛根素纳米球,并对其形态、载药量、包封率及药物利用率等纳米球质量进行研究。方法:采用乳化溶剂挥发法制备葛根素-PLGA纳米球,并用透射电镜观察其外观形态,利用HPLC测定药物含量。结果:制得葛根素-PLGA-NS其平均包封率为81.5%,平均载药量为2.05%,平均粒径为170.5 nm。结论:葛根素靶向缓释纳米球基本达到设计要求,该制剂有望成为一种新的药物靶向载体系统。

关键词:葛根素;乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA);纳米球;纳米载体

中图分类号:TQ 460.6 文献标识码:B

葛根素(GS)为异黄酮苷类,是从豆科植物野葛或甘葛藤的干燥根提取而成。葛根素药理学研究表明,葛根素可明显降低心肌耗氧量,改善微循环,显著减少低氧性内皮细胞凋亡等作用,临床疗效确切。但葛根素为水不溶性,口服后难以被吸收,绝对生物利用度很低,只有37.5%左右^[1]。近年来提高葛根素生物利用度制剂研究较多:如葛根素微粉,葛根素固体分散体,葛根素磷脂复合物,葛根素固体自微乳等^[2]。

纳米给药系统在实现靶向和缓释给药,以及提高难溶性药物的生物利用度,降低药物毒副作用等方面具有良好的应用前景^[3]。高分子材料乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA],因其优良的生物相容性和生物降解性,被广泛用作纳米球(nanosphere, NS)的载体材料,以其为载体的NS克服了纳米乳剂,纳米脂质体药物易泄露等缺点,成为国内外的研究热点之一,为一类新型的靶向给药载体^[4]。

本实验以PLGA为载体,Pluronic F68为乳化剂,成功的制备了粒径大小适中的GS-PLGA-NS,此制剂经静脉给药后可能会显著聚集于心肌并缓慢释药。

1 材料与仪器

1.1 仪器 79-1型磁力搅拌器(金坛市杰瑞尔电器有限公司),AG285型电子天平(瑞典METTLER TOLEDO公司),岛津高效液相色谱仪(包括LC-20AB泵,SPD-M20A紫外检测器及岛津Lc solution色谱工作站),C18色谱柱(依利特),超速冷冻离心机,纳米粒径分析仪(英国Malvern仪器公司),JEOL型高分辨透射电镜(日本电子株式会社)。

1.2 试剂 葛根素(江苏省南京苏朗医药科技开发有限公司) PLGA(LA/GA=75/25 MW=8600 济南岱罡生物科技有限公司) Pluronic F-68(西安罗森伯科技有限公司),甲醇(色谱纯),丙酮等其他试剂

均为分析纯。

1.3 标准溶液的配制 水相:0.5% pluronic F-68称取Pluronic F-68 0.5 g溶于100 mL的纯化水中

油相:精密称取葛根素 19.7 mg PLGA(75/25) 83.5 mg溶于5 mL丙酮中,备用。

2 方法与结果

2.1 GS-PLGA-NS胶体溶液的制备 取3 mL已配好的油相,将其用注射器针头缓慢注入到以一定速度(以不起泡为宜)搅拌的100 mL Pluronic F-68水相中,常温下磁力搅拌除尽丙酮,搅拌时间以3小时为宜。经0.25 μm微孔滤膜过滤即得GS-PLGA-NS胶体溶液。低温避光保存。

2.2 GS-PLGA-NS质量评价方法

2.2.1 形态及粒径观察 取GS-PLGA-NS胶体溶液适量,少量纯化水稀释后用1.5% (w/v)磷酸负染色,滴于镀膜的电镜铜网上,晾干后,置于透射电镜下观察纳米球的外观形态并拍摄照片;并取GS-PLGA-NS胶体溶液适量,用激光粒度分析仪测定其粒径及分布。结果表明,纳米球呈类球形,分布较均匀,电镜下计数500个纳米球,得平均粒径为170.5 nm。

2.2.2 包封率,载药量及利用率的测定 精密吸取GS-PLGA-NS胶体溶液500 μL超速冷冻离心(4500 r min⁻¹)2小时,精密吸取上清液10 μL HPLC法测定葛根素含量。计算未包封葛根素的量(M1),再精密吸取葛根素-PLGA-NS胶体溶液500 μL用一定体积的混合有机溶剂溶解葛根素和PLGA,测得葛根素的总量,计算胶体溶液中葛根素的含量(M2),M(PLGA)为PLGA的投药量,按下式计算包封率,载药量和药物利用率。

$$\text{包封率} = (M2 - M1) / M(PLGA) \times 100\%$$

$$\text{载药量} = (M2 - M1) / M(PLGA) \times 100\%$$

$$\text{药物利用率} = M2 / \text{投药量} \times 100\%$$

3 影响因素的考查

本实验采用单因素考查,只改变被考查因素的量值,其他条件不变;以载药量(DL),包封率(EE),药物利用率(DA),平均粒径(Dm)等作为因素考查的质量评价指标。

3.1 PLGA的浓度 将PLGA用丙酮配制成不同浓度的溶液,制成GS-PLGA-NS并测定DL,EE,DA和Dm等结果见表1。

表1 不同用量PLGA对DL,EE,DA,Dm的影响 (n=3)

用量/g·l ⁻¹	DL/%	EE/%	DA/%	Dm/nm
10.0	0.92±0.15	70.43±0.31	15.01±0.44	109.1±0.87
16.7	2.05±0.1	81.5±0.19	19.9±0.15	170.5±1.1
23.0	0.31±0.08	62.01±0.39	6.76±0.2	189.6±1.5
29.5	0.28±0.13	70.5±0.24	6.43±0.15	240.9±1.66
48.0	0.25±0.1	75.5±0.34	9.2±0.14	320.1±1.50

由表可见,不同用量的PLGA对DL,EE,DA有明显影响,在一定范围内随着PLGA浓度的增加,使GS-PLGA-NS的DL,EE,DA均有所增加。但随PLGA浓度的增加溶液较难通过0.25 μm微孔滤膜,也难形成纳米级的颗粒,纳米球收率较低,使DL,EE,DA均降低。

3.2 Pluronic F68浓度 将Pluronic F68配制成不同浓度的溶液,制备G-PLGA-NS并对其DL,EE,DR和Dm进行测定,结果见表2。

表2 不同浓度Pluronic F68对DL,EE,DR,Dm的影响 (n=3)

浓度/%	DL/%	EE/%	DA/%	Dm/nm
0.1	1.98±0.15	93.6±0.36	17.98±0.30	190.5±1.33
0.5	1.7±0.12	80.05±0.26	19.02±0.13	185±1.13
2.5	5.6±0.99	94.9±0.33	49.85±0.24	149.6±2.24
5.0	9±0.13	89.2±0.17	82.36±0.14	120.36±0.89
10.0	3.1±0.25	40.58±0.38	80.62±0.71	100.96±1.82

由表可见,Pluronic F68在一定浓度范围内(0.1%~0.5%)时,DL,EE,DR和Dm均改变较小;但当其浓度继续增大时,DL,DA显著增大,到达0.5%时最大;可是继续增加浓度(到10%)时,DL,EE,DR会明显下降。

3.3 水相的用量 以0.5% Pluronic F68水溶液为水相,PLGA的浓度为16.7 g/l,油相体积不变,水相体积增加,制备葛根素-PLGA-NS,并对其DL,EE,DR和Dm进行测定,结果见表3。

表3 水相变化对DL,EE,DR和Dm的影响 (n=3)

V油:V水	DL/%	EE/%	DA/%	Dm/nm
0.3:1	0.91±0.17	95.63±1.3	8.52±1.25	198.6±1.31
0.3:3	0.9±0.07	84.69±2.13	9.65±1.38	185.1±2.1
0.3:5	1.81±0.15	80.55±0.27	20.6±0.18	186.6±0.99
0.3:10	8.56±1.34	87.02±1.22	80.01±1.12	180.9±1.65

由表可见,水相的用量对所制备GS-PLGA-NS的EE,Dm的影响较小,不明显;但当水相体积继续增加由10 mL增至100 mL时,DL和DA显著提高。

3.4 有机溶剂的用量 水相体积不变,改变油相体积,制备GS-PLGA-NS并对其DL,EE,DR和Dm进

行测定,结果见表4。

表4 油相变化对DL,EE,DR和Dm的影响 (n=3)

V(ml)	DL/%	EE/%	DA/%	Dm/nm
1	1.1±0.35	87.1±0.58	11.05±0.36	305.5±2.4
3	1.8±0.13	78.6±0.19	20.27±0.18	190.86±1.2
5	2.1±0.12	95.23±1.08	20.11±0.59	163.2±1.39
7	0.8±0.2	79.95±1.15	9.56±0.45	295.63±0.85
10	5.01±0.24	94.11±0.92	45.12±0.21	150.6±2.83

由表可见,有机溶剂的用量对所制备GS-PLGA-NS的Dm的影响较大,无论太多或太少都会引起粒径变大;但在一定的范围内增加,DL和DA显著提高;只是由于本实验需要将有机溶剂在搅拌下除尽,若用量太多,只有增加搅拌时间才可除去,这样会对药物制剂的稳定性产生不利影响。

3.5 温度 将葛根素与PLGA的有机相分别加入至10,25,60℃水相中,制备葛根素-PLGA-NS,并对其DL,EE,DR和Dm进行测定,结果见表5。

表5 温度变化对DL,EE,DA和Dm的影响 (n=3)

温度(℃)	DL/%	EE/%	DA/%	Dm/nm
10	7.3±0.2	84.2±1.02	76.84±0.71	195±1.47
25	7.5±0.39	86.73±0.78	79.66±0.83	186±2.18
60	7.2±0.24	84.62±1.07	77.2±1.41	202±1.55

由表可见,温度对GS-PLGA-NS的DL,EE,DR和Dm均无明显影响,但是温度过高影响PLGA的稳定性,使其发生降解;温度过低不利于有机溶剂的挥发。故实验时选择室温条件较适宜。

4 讨论

(1)在多次实验过程中,发现诸多因素对于纳米粒的制备产生影响,故采用单因素考查方法对于部分影响因素进行考查研究即固定其他条件不变,通过改变某种因素从而对所制得的纳米粒的形态质量进行研究比较,得出制得所需纳米粒的最适条件。

(2)纳米给药系统由于其在实现靶向给药,缓控释等方面有着良好的应用前景而成为近代药剂学领域的研究热点之一。纳米粒对于心、脾或骨髓等部位具有靶向性,这种新剂型的研究得到广泛关注。

(3)本实验所得的纳米粒为普通纳米粒,如对其进行改造与修饰可以得到各种预期具有独特性质和特定作用的纳米粒,如制备磁性纳米粒,制备长循环纳米粒和制备免疫纳米粒等。

参考文献

- [1] 马家骅, 杨明, 曹世栋, 等. 葛根素的提取和含量测定[J]. 华西药理学杂志, 2006, 21(2): 206-207.
- [2] 唐志书, 郭东艳, 宋道. 葛根素普通粉及其微粉在Beagle犬体内的生物利用度[J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(8): 830-831.
- [3] L.C.Y. The research of liver targeted dosage system[J]. J Emerg Tradch in Med(Chinese), 2001, 10(6): 354-355.
- [4] Murakami Y, Tabata Y, Ikada Y. Tumor accumulation of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous injections[J]. Drug deliv, 1997, 4: 23.

(收稿日期: 2010-05-11 责任编辑: 曾文雪)