

葛根素聚合物胶束的制备及包封率的测定^Δ

马晓星^{1*}, 韩翠艳¹, 刘畅¹, 朱丹², 隋小宇¹, 袁橙¹, 黄海涛¹(1.齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2.齐齐哈尔中医院药剂科, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3122-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.29

摘要 目的:制备葛根素聚合物胶束并建立其包封率测定方法。方法:采用薄膜分散法制备葛根素聚合物胶束;以离心-微孔滤膜法分离胶束和游离药物,采用高效液相色谱法测定聚合物胶束包封率,色谱柱为 Diamonsil C₁₈(2),流动相为1%柠檬酸溶液-甲醇(65:35),流速为1 ml/min,检测波长为250 nm,柱温为室温。结果:制备的聚合物胶束形态为规则的球形或类球形,平均粒径为54.12 nm,多分散系数为0.122,Zeta电位为-13.60 mV;葛根素检测质量浓度线性范围为2~10 μg/ml($R^2=0.9994$),方法回收率平均值为99.2%(RSD=0.9%, $n=3$),游离药物回收率为95.3%(RSD=1.7%, $n=3$);葛根素胶束平均包封率为(35.5±2.12)%、载药量为(0.3±0.07)%($n=3$)。结论:薄膜分散法适用于制备葛根素聚合物胶束;所建立的葛根素含量及其包封率测定方法操作简单、准确、可靠。

关键词 葛根素聚合物胶束;薄膜分散法;高效液相色谱法;离心-微孔滤膜法;包封率

Preparation and Determination of Entrapment Efficiency of Puerarin Polymeric Micelles

MA Xiaoxing¹, HAN Cuiyan¹, LIU Chang¹, ZHU Dan², SUI Xiaoyu¹, YUAN Cheng¹, HUANG Haitao¹(1.College of Pharmacy, Qiqihar Medical University, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2.Dept. of Pharmacy, Qiqihar Hospital of TCM, Heilongjiang Qiqihar 161006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Puerarin polymeric micelles and establish a method to determine its entrapment efficiency. METHODS: Puerarin polymeric micelles were prepared by film dispersion method. The polymeric micelles and free drug were separated by centrifugal-millipore filter filtration method. The entrapment efficiency of puerarin polymeric micelles was determined by HPLC. Diamonsil C₁₈(2) column was used with 1% citric acid solution-methanol (65:35) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 250 nm, and column temperature was room temperature. RESULTS: The prepared polymeric micelles were spherical and spherical-like in shape with a mean particle size of 54.12 nm, polydispersity index of 0.122, Zeta potential of -13.60 mV; the linear range of puerarin was 2-10 μg/ml ($R^2=0.9994$) with average recovery rate of 99.2% (RSD=0.9%, $n=3$). The recovery rate of free drug was 95.3% (RSD=1.7%, $n=3$). The mean entrapment efficiency and drug-loading amount of puerarin were(35.5±2.12)% and (0.3±0.07)%, respectively ($n=3$). CONCLUSIONS: Film dispersion method is suitable for the preparation of Puerarin polymeric micelles. Established method is convenient, accurate and reliable for the content and entrapment efficiency determination of Puerarin polymeric micelles.

KEYWORDS Puerarin polymeric micelles; Film dispersion method; HPLC; Centrifugal-millipore filter filtration method; Entrapment efficiency

葛根素是中药葛根的主要有效成分,现代研究证明葛根素具有抗交感神经作用、钙拮抗作用和β-受体阻滞作用,可显著扩张冠状动脉和脑血管以及降血糖、抗氧化、保护脑神经、治疗骨质疏松等,临床上主要用于心脑血管疾病的治疗,其药源丰富、价廉、毒性小、安全范围广、疗效好,发展前景广阔^[1-3]。由于葛根素水溶性较差,且其口服生物利用度相对较低,目前多以注射剂给药;但葛根素注射剂自上市以来,相关不良反应报道日渐增多^[4-5],在临床应用中已发生多例急性血管内溶血不良现象,严重时甚至会导致死亡,故其目前在临床上的使用受限^[6-7]。聚合物胶束作为一种给药载体,是由亲水性和疏水性嵌段组成的两亲性共聚物制备形成的,属于热力学稳定体系;其作为递送难溶性药物的载体,可克服口服给药时的某些限制性因素,提高药物的生物利用度^[8]。目前,已有多种难溶性药物如多柔比星、紫杉醇、喜树碱及顺铂等通过包封进入胶

束的疏水内核而增溶、提高生物利用度的实例报道^[9]。笔者采用薄膜分散法制备葛根素单甲氧基聚乙二醇-聚己内酯(MPEG-PCL)聚合物胶束(以下简称葛根素聚合物胶束),同时建立高效液相色谱(HPLC)法测定葛根素含量,并计算其包封率,为葛根素口服制剂的开发奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

LC-1000型液相色谱仪(山东鲁南瑞红化工仪器有限公司);Nano-ZS90型纳米粒径仪(上海长方光学仪器有限公司);磁力搅拌机(北京金紫光科技发展有限公司);冷冻干燥机(宁波市新州双嘉仪器有限公司);SB-2000型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);电子天平(丹纳西赫特传感工业控制有限公司,十万分之一);HT7700型透射电镜(日本日立公司)。

1.2 药品与试剂

葛根素(原料药与对照品,上海金穗生物科技有限公司,批号:20140723,纯度:≥98%);MPEG-PCL(济南岱昂生物工程有限公司,分子质量:均为5 000,二者组成比:1:1);甲醇为

Δ 基金项目:齐齐哈尔市科学技术计划项目(No.SFGG-201332)

* 讲师,硕士。研究方向:制剂新技术与新剂型。E-mail: 13846244161@163.com

色谱纯,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 葛根素聚合物胶束的制备

精密称取 50 mg MPEG-PCL,置于茄形瓶中,以 20 ml 乙腈溶解,得透明的共聚物乙腈溶液;精密称取葛根素 2.52 mg,置于 50 ml 量瓶中,加入一定量的甲醇,超声 10 min(功率:200 W,频率:40 kHz),将葛根素完全溶解,然后用甲醇定容至刻度,混合均匀,得葛根素甲醇溶液;精密量取 10 ml 葛根素甲醇溶液加入盛有共聚物的乙腈溶液中,转移到茄形瓶中;60 °C 水浴减压旋转蒸发去乙腈,在茄形瓶中可看到一层均匀的透明药物与共聚物的混合物薄膜;加入 25 ml 预热至 60 °C 的超纯水,剧烈涡旋振荡 30 s,使混合物薄膜完全水化;水化液 50 °C 水浴磁力搅拌 2 h,形成葛根素胶束溶液;冷却至室温,使用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,收集含药的聚合物胶束滤液冷冻干燥保存。另在上述聚合物乙腈溶液中不加葛根素甲醇溶液,同法操作即制得空白胶束。

2.2 葛根素聚合物胶束形态、粒径及 Zeta 电位的测定

精密称取一定量葛根素胶束的冻干产品,用纯化水复溶,采用透射电镜观察胶束的形态,采用纳米粒径仪测定胶束的粒径和 Zeta 电位。结果,葛根素胶束形态为规则的球形或类球形,如图 1 所示;胶束平均粒径为 54.12 nm,胶束多分散系数(PDI)值为 0.122,Zeta 电位为 -13.60 mV,如图 2 所示。

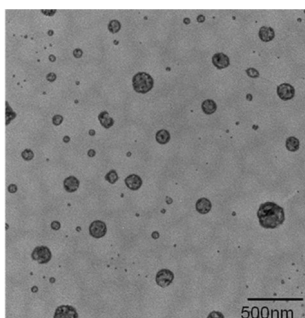


图 1 葛根素聚合物胶束透射电镜图

Fig 1 Transmission electron microscope photograph of Puerarin polymeric micelles

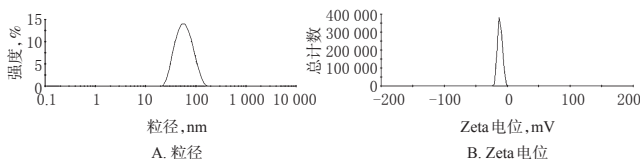


图 2 葛根素聚合物胶束粒径和 Zeta 电位分布图

Fig 2 Particle size and Zeta potential of Puerarin polymeric micelles

2.3 葛根素含量测定方法学考察

2.3.1 检测波长的选择 精密称取 2.54 mg 葛根素,置于 50 ml 量瓶中,加入一定量的 1% 柠檬酸溶液-甲醇(65:35)溶液,超声 10 min,使葛根素完全溶解,定容。精密量取上述葛根素溶液 10 ml,置于 50 ml 量瓶中,用 1% 柠檬酸溶液-甲醇(65:35)溶液定容,在 200~400 nm 波长内进行紫外扫描。结果,溶液在 250 nm 波长处有比较明显的紫外吸收,表明葛根素最大吸收波长为 250 nm,详见图 3。

2.3.2 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈(2)(250 mm×4.6

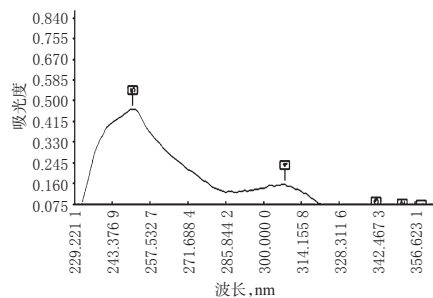


图 3 紫外扫描图谱

Fig 3 UV scanning spectrum

mm, 5 μm);流动相:1% 柠檬酸溶液-甲醇(65:35),流速:1 ml/min;柱温:室温;紫外检测器,检测波长:250 nm;进样量:20 μl。

2.3.3 溶液的制备 精密称取 2.54 mg 葛根素,置于 50 ml 量瓶中,加入一定量的流动相超声 10 min 使葛根素完全溶解,定容,制得 10.16 μg/ml 葛根素对照品溶液。分别精密量取空白胶束冻干粉、葛根素胶束 10 mg,置于 50 ml 烧杯中加适量甲醇超声 20 min 溶解,加甲醇定容,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,得阴性样品溶液和葛根素胶束样品溶液。3 种溶液按“2.3.2”项下色谱条件进样分析。结果表明,辅料等不干扰葛根素的分析。色谱图见图 4。

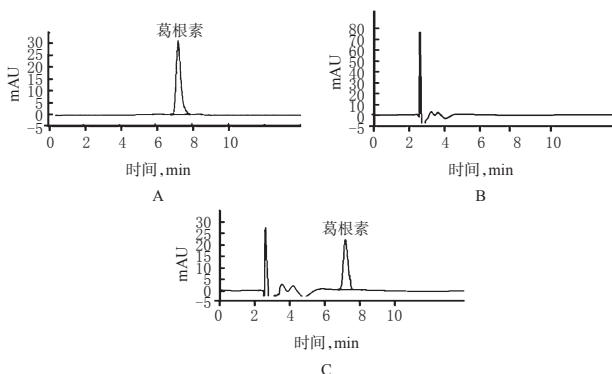


图 4 高效液相色谱图

A. 葛根素对照品溶液;B. 阴性样品溶液;C. 葛根素胶束样品溶液

Fig 4 HPLC chromatograms

A. puerarin control solution; B. negative sample solution; C. Puerarin polymeric micelles solution

2.3.4 标准曲线的建立 精密称取葛根素适量,用流动相制成 0.050 8 mg/ml 的对照品贮备液,备用。贮备液分别加流动相稀释为 2.032、4.064、6.096、8.128、10.16 μg/ml 的系列对照品溶液,进样测定。以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标,得回归方程: $y=74\ 432x+4\ 850.1$ ($R^2=0.999\ 4$)。结果表明,葛根素检测质量浓度线性范围为 2~10 μg/ml。

2.3.5 灵敏度试验 取 2.032 μg/ml 葛根素对照品溶液进行一系列稀释,分别进样测定。以信噪比为 3 时的质量浓度为最低检测限质量浓度,以信噪比为 10 时的质量浓度为最低定量限浓度。结果,葛根素的最低检测限质量浓度为 0.5 μg/ml,最低定量限质量浓度为 2.0 μg/ml,即最低检测限为 0.01 μg、最低定量限为 0.04 μg。

2.3.6 精密度试验 取葛根素对照品溶液低、中、高 3 个质量浓度(2.032、6.096、10.16 μg/ml),进样测定,同日内连续进样 5

次,计算日内精密密度;连续进样5 d,计算日间精密密度。结果,日内RSD=0.19%、日间RSD=1.8%(n=3),表明精密密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取葛根素胶束样品溶液,分别于放置0、4、8、24、72、168 h测定峰面积。结果,平均峰面积为685 641, RSD=1.5%(n=3),表明制备的样品溶液至少在168 h内稳定。

2.3.8 方法回收率试验 分别取10.08 μg/ml的葛根素对照品溶液4、6、8 ml,各置于10 ml量瓶中,各加入空白胶束对照溶液1 ml,以甲醇定容至刻度,混匀,进样测定。各质量浓度溶液进样3次,计算回收率。结果,方法回收率分别为99.5%、98.7%、99.4%(RSD分别为1.6%、0.4%、0.6%,n=3),平均方法回收率为99.2%(RSD为0.9%,n=3)。

2.4 葛根素聚合物胶束中葛根素包封率和载药量的测定

2.4.1 提取回收率试验 分别取2.032、4.064、10.16 μg/ml的葛根素药物溶液适量倒入离心管中,以4 000 r/min离心(离心半径:13.5 cm)10 min,用0.45 μm微孔滤膜过滤。取离心、过滤前后的药物溶液,进样分析,计算游离药物回收率。结果,平均回收率为95.3%(RSD=1.7%,n=3)。

2.4.2 包封率和载药量的测定 按“2.1”项下薄膜分散法制备载药胶束3份,采用离心-微孔滤膜法测定包封率和载药量。精密称取葛根素胶束溶液,倒入离心管中,4 000 r/min,离心(离心半径13.5 cm)10 min,分离水层;加适量甲醇将胶束破坏,使包裹的药物从胶束中游离出来,转移到50 ml量瓶中,用流动相定容至刻度,用0.45 μm微孔滤膜过滤。水层和滤液进样测定,记录峰面积,先计算出载药胶束中的葛根素质量浓度,然后计算葛根素聚合物胶束药物含量^[10],代入公式求得包封率(胶束中葛根素含量/葛根素投药量×100%)和载药量(胶束中葛根素含量/胶束量×100%)。结果,3批样品平均包封率为(35.5±2.12)%,平均载药量为(0.3±0.07)%。

3 讨论

聚合物胶束的粒径是药物在体内传递行为的关键因素。本研究制备的葛根素聚合物胶束平均粒径约为54.12 nm,小于100 nm,更容易被口服吸收,为今后葛根素口服制剂的研究提供了理论基础^[11];同时载药后的粒径比空白胶束粒径稍大,这与载药量的多少有关,一般载药量越高,粒径越大,系因包埋的药物使得胶束的核区增大所致^[12]。

包封率是评价聚合物胶束制剂的质量标准指标之一,采用恰当的方法将载药聚合物胶束与游离的药物分离是准确测定包封率的重要因素。一般分离聚合物胶束与游离药物的方法有透析法、超滤法、凝胶柱层析法等^[13]。透析法技术并不复杂,适用于分离小分子物质,但操作耗时;超滤法需要选用适宜的Millipore超滤管,适用范围窄^[14]。由于葛根素微溶于水,在水中的溶解度为0.462 g/100 ml^[15],故所制得的胶束溶液中未包封药物主要是以颗粒形式存在,离心过滤即可除去,所以本试验使用离心-微孔滤膜法分离载药聚合物胶束与游离的葛根素。结果显示,本试验制得的葛根素聚合物胶束包封率不

高,特别是载药量也较低,分析可能的原因为葛根素的水溶性与脂溶性均较差^[16],因此在球形的疏水核芯和亲水壳层区域均不易装载。

本试验建立了葛根素含量及其胶束包封率的测定方法,结果表明该方法操作简单、准确、可靠,可用于葛根素聚合物胶束中药物含量和包封率的测定。

参考文献

- [1] 吴先平,冯俊光,陈浩铭,等.葛根素对高血压患者围手术期心肌损伤的保护作用[J].中国中西医结合杂志,2006,26(3):255.
- [2] 陈小红.葛根素注射液治疗不稳定型心绞痛临床观察[J].中药材,2004,27(1):77.
- [3] 邵凌云,徐会敏,杨振华,等.关于葛根素注射剂不良反应的探讨[J].海峡药学,2009,21(9):169.
- [4] 王靖,吉民,华维一,等.葛根素研究进展[J].药学进展,2003,27(2):70.
- [5] 郭东艳,陈士林,杨大坚.葛根素衍生物4ac混悬液及其纳米粒在Beagle犬体内的药代动力学研究[J].时珍国医国药,2009,20(1):197.
- [6] 邵蓓新,冯国旗.关注葛根素注射液的不良反应[J].中国实用医药,2009,4(5):1 578.
- [7] 吴嘉瑞,张冰.葛根素注射剂不良反应流行病学特点研究[J].中药新药与临床药理,2009,20(6):588.
- [8] 徐巍,牟燕,李宏建.聚合物胶束提高难溶性药物生物利用度的研究进展[J].中国药房,2015,26(13):1 847.
- [9] Kwon GS, Okano T. Polymeric micelles as new drug carriers[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1996,21(2):107.
- [10] 赵丽娟,刘东华,刘志红,等.多西他赛Pluronic F127聚合物胶束的制备与表征[J].中国生化药物杂志,2011,32(2):107.
- [11] 典灵辉,于恩江,程纪伦,等.大黄素 soluplus 聚合物胶束的制备及质量评价[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(16):15.
- [12] 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.
- [13] 张美玲,刘恒戈,黄川生,等.去氢骆驼蓬碱PLGA纳米粒包封率测定方法的研究[J].农垦医学,2010,32(5):388.
- [14] 赵暖暖,作文英,张抗怀,等.HPLC法测定5-氟尿嘧啶纳米粒的药物包封率[J].药物分析杂志,2014,34(5):939.
- [15] 张岩峰.葛根素及其三种增溶剂口服吸收评价的研究[D].北京:北京中医药大学,2009.
- [16] 郭莹,李莎.葛根素脂质体包封率测定及制备工艺优化[J].中国中医急症,2012,21(1):55.

(收稿日期:2016-01-12 修回日期:2016-03-22)

(编辑:刘 萍)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅