

阿司匹林缓释微球的制备及其体外释药性能研究[△]

肖潮达^{1,2*}, 周雪¹, 沈祥春³, 肖海¹, 刘鲜林⁴, 魏云鹏¹, 陶玲^{1#}(1.贵阳医学院药剂教研室, 贵阳 550004; 2.军事医学科学院, 北京 100850; 3.贵阳医学院药理研究室, 贵阳 550004; 4.贵阳医学院电镜室, 贵阳 550004)

中图分类号 R944.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)45-4275-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.45.16

摘要 目的:制备阿司匹林缓释微球,并考察其体外释药性能。方法:采用改良的乳化溶剂挥发法,以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体材料、载药量和包封率为指标,固定PLGA为100 mg正交设计试验优化阿司匹林缓释微球的阿司匹林用量、外水相体积、丙酮-二氯甲烷体积比和聚乙烯醇(PVA)浓度,对最优处方所制微球进行验证和体外释药度考察。倒置显微镜和电子显微镜下观察微球表面形态,激光粒度分析仪考察微球粒径。结果:PLGA为100 mg时的最优处方:阿司匹林用量为20 mg,外水相体积为150 ml,丙酮-二氯甲烷体积比为1:1,PVA浓度为1 mg/100 ml;所制微球的平均粒径为139.95 μm,电镜下微球表面光滑圆整,载药量为8.6%,包封率为33%,240 h体外累积释药度为85.56%。结论:成功制得具有明显缓释作用的阿司匹林缓释微球。

关键词 阿司匹林;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;微球;乳化溶剂挥发法

Preparation of Aspirin Sustained-release Microspheres and Their Release Properties *in vitro*

XIAO Chao-da^{1, 2}, ZHOU Xue¹, SHEN Xiang-chun³, XIAO Hai¹, LIU Xian-lin⁴, WEI Yun-peng¹, TAO Ling¹
(1.Dept. of Pharmacy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2.Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 3.Research Division of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 4.Division of Electron Microscopy, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, CHina)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Aspirin sustained-release microspheres, and to investigate its release properties *in vitro*. METHODS: Modified emulsion-evaporation method was adopted. Using PLGA as carrier, with drug-loading amount and entrapment efficiency as index, setting PLGA as 100 mg, the preparation technology of Aspirin sustained-release microspheres was optimized by orthogonal test in respect of the amount of aspirin, water phase-oil phase proportion, ratio of acetone volume to dichloromethane volume and PVA concentration. The microspheres prepared by optimal prescription were validated and investigated in drug release *in vitro*. The appearance of the microspheres was observed by inverted microscope and electron microscope, and the particle size was investigated by laser particle size analyzer. RESULTS: When the amount of PLGA was 100 mg, the optimal formulation was as follows: the amount of aspirin 20 mg, water phase-oil phase proportion 1:50, ratio of acetone volume to dichloromethane volume 1:1, PVA concentration of 1 mg/100 ml. Average particle size was 139.95 μm, and the microspheres was smooth in appearance and round in shape. Other parameters were drug-loading amount of 8.6%, entrapment efficiency of 33%, 240 h accumulative release rate of 85.56%. CONCLUSIONS: Aspirin sustained-release microspheres with obvious sustained-release property are prepared successfully.

KEYWORDS Aspirin; PLGA; Microspheres; Emulsion-evaporation method

微球技术作为一种新型给药技术,既能通过调节和控制药物的释放速度实现缓释长效的目的^[1];同时又能保护药物,提高药物稳定性,减少给药次数和药物刺激,提高药物生物利用度,降低毒性和副作用,提高疗效^[2-3]。另外,微球还与某些细胞组织有特殊的亲和性,能被器官组织的网状内皮系统所吞噬,集中于靶区逐步扩散释放出药物或被溶酶体中的酶降

解而释放出药物,不同粒径范围的微球还可有针对性地作用于不同的靶组织^[4-5]。随着研究的不断深入以及无毒、具有生物相容性的材料的开发,微球在药剂学领域将有更广阔的发展前景,并将得到广泛应用。

聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)具有良好的生物相容性与生物可降解性^[6],利用PLGA研制药物的缓释微球制剂,可达到延长药物作用时间、提高药效、减少不良反应等目的^[6]。本研究以阿司匹林为水不易溶模型药物,选用PLGA为载体、丙酮和二氯甲烷混合溶剂为有机相,通过改良的乳化溶剂挥发法制备阿司匹林缓释微球;采用正交设计试验,以微球载药量和包封率为指标,考察制备过程中影响工艺处方的因素,并对其体外释药行为进行研究。

1 材料

△ 基金项目:贵州省科技计划项目(No.黔科合[2010]3142;黔科合J字[2013]2039);贵州省国际科技合作计划项目(No.黔科合外G字[2012]7041);贵阳市科技计划项目(No.筑科合同[2012]2)

* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型与新技术。E-mail: 1502172770@qq.com

通信作者:教授,硕士研究生导师。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0851-6908218-721。E-mail: 649511230@qq.com

1.1 仪器

BS223S型电子天平(北京赛多利斯仪器有限公司); HH-601型水浴恒温振荡器(江苏省金坛市医疗仪器厂); 08-2G型恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); S-3400N型扫描电镜(日本Hitachi公司); UV-PC2401紫外分光光度计(日本岛津公司); 透析袋(北京鼎国生物技术有限公司); XW-80型涡旋混合器(上海医科大学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

PLGA(济南岱罡生物工程有限公司,批号:111008,分子质量:3万);阿司匹林原料药(阿拉丁试剂公司,批号:111074,纯度:≥99%);丙酮(北京北化精细化工品有限责任公司,批号:8C1111877,分析纯);二氯甲烷(北京北化精细化工品有限责任公司,批号:7D1012223,分析纯);磷酸盐缓冲液(PBS,北京鼎国生物技术有限公司,浓度:0.1 mol/L);聚乙烯醇(PVA,日本可乐里公司,醇解度:80%)。

2 方法与结果

2.1 阿司匹林缓释微球的制备^[7]

取PLGA 100 mg,溶解于1 ml丙酮和二氯甲烷的混合溶剂中,加入一定量的阿司匹林,涡旋混匀,作为油相。冰浴条件下将油相缓慢加至一定浓度的PVA水溶液中,1 000 r/min搅拌15 min,继转为室温下500 r/min搅拌4 h继续固化,并挥去有机溶剂,静置沉淀。去除上清液,抽滤,纯水洗涤3次,收集微球,室温干燥,即得。

2.2 阿司匹林含量测定标准曲线的建立

精密称取阿司匹林5 mg,置于50 ml量瓶中,用二氯甲烷溶解并定容,配制成质量浓度为0.1 mg/ml的贮备液;用移液管分别精密移取0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10 ml的贮备液,置于25 ml量瓶中,二氯甲烷定容,得到质量浓度分别为2、4、8、16、32、40 μg/ml的标准液。采用紫外分光光度法,在276 nm波长处检测其吸光度(A)。以A对质量浓度(c)进行线性回归分析,得回归方程为: $A=0.0094c-0.0004$ ($r=0.99994, n=6$),阿司匹林检测质量浓度的线性范围为2~40 μg/ml。

2.3 精密度考察

分别精密吸取高(34.0 μg/ml)、中(18.0 μg/ml)、低(6.0 μg/ml)质量浓度的阿司匹林标准液,分别放置0、3、6、12、24 h测定吸光度,考察日间精密度;每日测定1次,连续测定5 d,考察日间精密度。结果表明,高、中、低质量浓度阿司匹林标准液的日内RSD分别为1.11%、0.87%、0.43%($n=5$),日间RSD分别为1.11%、1.10%、0.54%($n=5$)。

2.4 回收率试验

精密吸取阿司匹林贮备液1.6、2.0、2.4 ml,分别加入100 mg PLGA,各3份,置于50 ml量瓶中,用二氯甲烷溶解并稀释至刻度,摇匀。分别取上述溶液2 ml,在276 nm波长处检测吸光度,代入回归方程计算阿司匹林的质量浓度和回收率。结果,样品的平均回收率为99.77%,RSD为0.94%($n=9$)。

2.5 微球载药量和包封率的测定^[7-8]

精密称取约10 mg阿司匹林缓释微球,置于离心管中,加入5 ml二氯甲烷,涡旋使其充分溶解,混悬液在3 500 r/min(离心半径6.5 cm)离心10 min,重复3次,合并上清液,并用二氯甲烷定容至25 ml。以紫外分光光度计在276 nm波长处测定吸光度,代入回归方程计算阿司匹林质量浓度,按公式计算微球的载药量和包封率。载药量(%)=(微球中阿司匹林质量/

微球质量)×100%,包封率(%)=(微球中阿司匹林含量/投药量)×100%。

2.6 正交设计试验筛选处方工艺

根据单因素试验结果,选取对微球制备工艺影响较显著的4个因素作为考察对象,即阿司匹林用量(A,mg)、外水相体积(B,ml)、丙酮-二氯甲烷体积比(C)、PVA质量浓度(D,mg/100 ml)。固定PLGA为100 mg,每因素采取3个水平,以微球的载药量和包封率为指标,进行最佳工艺和处方考察。正交设计试验因素与水平取值见表1,结果见表2,极差分析见表3,方差分析见表4。

表1 正交设计试验因素与水平取值

水平	因素			
	A,mg	B,ml	C	D,mg/100 ml
1	10	50	1:9	0.5
2	20	100	1:3	1
3	40	150	1:1	2

表2 正交设计试验结果

试验号	A	B	C	D	载药量,%			包封率,%		
					1	2	3	1	2	3
					1	1	1	1	1	3.70
2	1	2	2	2	5.30	5.27	5.33	21.7	21.2	19.8
3	1	3	3	3	7.20	6.98	7.12	20.5	28.4	28.8
4	2	1	2	3	6.52	6.51	6.32	22.1	18.2	22.4
5	2	2	3	1	7.23	7.12	7.92	28.4	33.6	24.8
6	2	3	1	2	8.62	8.63	8.6	23.7	34.4	21.5
7	3	1	3	2	5.42	6.12	6.32	20.1	18.9	22.9
8	3	2	1	3	4.21	4.32	4.22	14.8	16.8	10.8
9	3	3	2	1	4.67	5.12	4.87	19.8	19.5	19.5

表3 正交设计试验极差分析

指标	项目	A	B	C	D
载药量	K ₁	46.60	46.61	48.00	46.33
	K ₂	67.47	50.92	49.91	59.61
	K ₃	45.27	61.81	61.43	53.40
	R	22.20	15.20	13.43	13.28
	主次因素	A>B>C>D			
包封率	优水平	A ₂	B ₃	C ₃	D ₂
	K ₁	173.2	157.4	154.8	178.4
	K ₂	229.1	191.9	184.2	204.2
	K ₃	163.1	216.1	226.4	182.8
	R	66.0	58.7	71.6	25.8
主次因素	C>A>B>D				
优水平	A ₂	B ₃	C ₃	D ₂	

表4 正交设计试验方差分析

指标	因素	离均差平方和	自由度	方差	F	P
载药量	A	0.018	2	0.009	10.429	<0.01
	B	0.021	2	0.001	8.304	<0.01
	C	0.032	2	0.016	11.131	<0.01
	D	0.000 8	2	0.000 4	2.375	
包封率	A	0.028	2	0.014	11.129	<0.01
	B	0.019	2	0.009 5	7.655	<0.01
	C	0.029	2	0.014 5	11.399	<0.01
	D	0.000 4	2	0.000 2	1.674	

由表3和表4结果表明,因素A、B、C对微球载药量和包封率有显著影响,因素D对微球载药量和包封率无显著影响,最佳处方工艺为A₂B₃C₃D₂,即PLGA为100 mg时阿司匹林缓释微球的阿司匹林用量为20 mg、外水相体积为150 ml、丙酮-二氯甲烷体积比为1:1、PVA质量浓度为1 mg/100 ml。

2.7 验证试验

按所选最优处方工艺制备3批阿司匹林缓释微球,测定其载药量为8.6%,包封率为33%,RSD均小于5.0%。验证结果表明,优化的制备工艺稳定,重现性良好。

2.8 体外释药性能研究

2.8.1 体外释放曲线绘制。取“2.7”项下最优处方工艺制备的3批阿司匹林缓释微球,混匀后精密称取40 mg,置入透析袋中,加入1 ml PBS溶液(0.1 mol/L, pH=7.4, 含0.02%叠氮钠)。将透析袋放入10 ml离心管中,加入PBS溶液5 ml,封口,在恒温水浴摇床中[温度(37.0±0.5)℃,转速148 r/min]振荡,分别在6、12、24、48、72、96、120、168、216、264、312、360、408 h取出1 ml,同时加入新鲜同温的PBS溶液1 ml。用紫外分光光度计测定取出待测液吸光度,代入回归方程计算阿司匹林含量,并计算累积释放度,绘制释放曲线。阿司匹林缓释微球的体外释放曲线见图1。

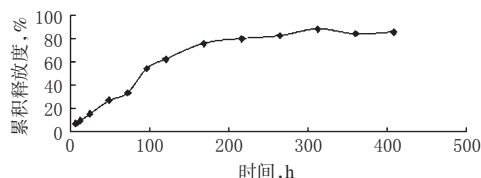


图1 阿司匹林缓释微球的体外释放曲线

Fig 1 Drug release profile of Aspirin sustained-release microspheres *in vitro*

由图1可见,在体外释放试验中,释放阿司匹林缓释微球所含80%药物所需时间均不低于100 h,完全释放所需时间均不低于200 h,说明微球有较好的缓释作用。

2.8.2 体外释药模型拟合。由于阿司匹林缓释微球408 h的累积释放度为85.56%,因此本试验采用零级动力学模型、一级动力学模型、Higuchi模型分别对最优处方工艺制备的微球的408 h内体外释放曲线进行拟合。拟合优度和数学释放模型结果见表5(Q为累积释放度,t为释放时间)。

表5 阿司匹林缓释微球体外释放的拟合结果

Tab 5 Results of release fitting of Aspirin sustained-release microspheres *in vitro*

释药模型	拟合方程	r ²
零级动力学模型	Q=0.002 1t+0.208 7	0.817 2
一级动力学模型	ln(1-Q)=-0.094 5t	0.984 5
Higuchi模型	Q=4.481 3t ^{1/2} +5.963 8	0.911 7

相关系数r越接近1,拟合效果越好。从表5结果可知,阿司匹林缓释微球的体外释药符合一级动力学模型。

2.9 微球的形态观察

取少量“2.7”项下最优处方工艺制备的阿司匹林缓释微球,在倒置显微镜(光镜)和扫描电子显微镜(电镜)下观察微球的外观形态。光镜下观察可见,阿司匹林缓释微球的形态圆整,表面光滑,分布较均匀,无粘连;电镜下观察可见,阿司匹林缓释微球外形为球形,球形度良好,表面光滑,略有小凹陷,为制备过程中有机溶剂挥发所致。阿司匹林缓释微球的

光镜图见图2,电镜图见图3。

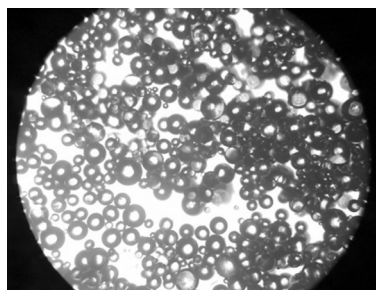


图2 阿司匹林缓释微球的光镜图

Fig 2 Light micrograph of Aspirin sustained-release microspheres

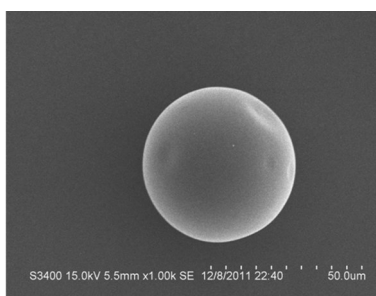


图3 阿司匹林缓释微球的电镜图

Fig 3 Electron micrograph of Aspirin sustained-release microspheres

2.10 微球的粒径测定

取“2.7”项下最优处方工艺制备的阿司匹林缓释微球1.2 g,分散在蒸馏水中,将所得微球的混悬液倒入激光粒度分析仪样品槽中,考察微球粒径分布情况,测量过程中以超声波震荡防止微球聚集。结果微球平均粒径为139.95 μm,径距为2.59 μm。

3 讨论

乳化溶剂挥发法是制备微球的一种常用方法,系将药物溶解、分散或乳化于含有骨架材料的溶剂中,然后将溶剂移除,形成微球。该法工艺简便、条件温和,有利于大规模工业化生产。

根据正交设计试验所得结果可知,对微球包封率有显著影响的3个因素中,影响最大的是丙酮-二氯甲烷体积比。二氯甲烷是最常用的溶剂,对聚合物具有良好的溶解性;丙酮较二氯甲烷易溶于水,从分散相扩散至连续相速度较快。二氯甲烷中加入丙酮作为潜溶剂,可使微球外层固化速度加快,减少药物随有机溶剂的外泄,提高载药量^[9];但丙酮比例较高时,太快的扩散速度会导致PVA与PVA之间的氢键形成,进而造成微球相互粘连,收率会有所降低,微球成球性也较差。合理调节这两个因素,可得到载药量高、外观形态光滑圆整的微球^[9]。研究还发现,随着外水相体积的增加,有机溶剂扩散速度加快,提高了载药量和包封率。

本研究所制阿司匹林缓释微球在刚开始释放时,药物释放速率极高,存在较强的突释效应(24 h时微球已释放超过20%),可能因为微球表面吸附的少量药物在释放初期迅速解吸附;12 h后,随着表面药物释放完全,微球的释放受到载体材料降解速度的限制,微球以较为恒定的速度缓慢释放药物。

微球体外释药模型拟合结果表明,阿司匹林缓释微球体外释药符合一级动力学模型。

阿司匹林目前为抗血栓常用药物,需要长期服用,且口服后由于集中释药,局部药物浓度过高,易导致胃肠道黏膜屏障破坏,出现水肿、糜烂甚至溃疡和出血。制备成微球制剂,可使阿司匹林达到缓慢释药的目的,甚至可减少给药剂量,从而减轻对胃肠道的刺激^[10-13]。

本研究以阿司匹林为模型药物,成功制备了阿司匹林缓释微球;通过正交设计试验优化处方工艺,获得的微球具有较高的载药量和包封率,并具有明显的缓释作用;240 h体外累积释放度为85.56%,能够达到延长药物作用时间及减少给药次数的目的,但初始的突释现象仍较为明显,有待进一步研究加以解决。

参考文献

- [1] Matsumoto A, Kitazawa T, Murata J, *et al.* A novel preparation method for PLGA microspheres using non-halogenated solvents[J]. *J Control Release*, 2008, 129(3):223.
- [2] Mao S, Shi Y, Li L, *et al.* Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68(2):214.
- [3] Xiao CD, Shen XC, Tao L. Modified emulsion solvent evaporation method for fabricating core-shell microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2013, 452(1/2):227.
- [4] 缪阳,陶玲,沈祥春.靶向微球在各脏器疾病中的应用研究进展[J]. *中国药房*, 2013, 24(13):1 225.

- [5] 丁红,邢桂琴,谢茵.阿霉素明胶微球的制备与特性研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2000, 20(7):387.
- [6] 缪阳,陶玲,沈祥春,等.氧化苦参碱缓释微球的制备及体外释药性能研究[J]. *中药材*, 2012, 35(9):23.
- [7] 洗远芳,侯瑞珍.乳化剂对阿司匹林微球制备的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(3):324.
- [8] 洗远芳,程凤梅,陈鸿玉,等.阿司匹林聚乳酸微球的体外加速释放试验[J]. *中国医院药学杂志*, 2008, 28(16):1 364.
- [9] Meng FT, Ma GH, Qiu W, *et al.* W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles[J]. *J Control Release*, 2003, 91(3):407.
- [10] Murakami H, Kawashima Y, Niwa T, *et al.* Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization poly(vinylalcohol) on the preparation and properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle[J]. *Int J Pharm*, 1997, doi:10.1016/S0378-5173(96)04854-5.
- [11] 张莎,李仲谨,余丽丽,等.阿司匹林明胶微球粒径分布及其影响因素的研究[J]. *化学与粘合*, 2009, 31(4):9.
- [12] 吴红,范黎,张慧.糖类交联明胶微球的制备及其释药特性研究[J]. *中国药房*, 2008, 19(1):36.
- [13] 何爱明,林世明,赖双光,等.阿司匹林壳聚糖微球的研制及药动学参数测定[J]. *复旦学报:医学版*, 2007, 34(3):463.

(收稿日期:2013-12-30 修回日期:2014-02-14)

国家卫生和计划生育委员会召开埃博拉出血热疫情防控工作电视电话会议

本刊讯 2014年11月2日,国家卫生和计划生育委员会召开埃博拉出血热疫情防控工作电视电话会议,就埃博拉出血热疫情防控工作进行再动员和再部署。国家卫生和计划生育委员会副主任崔丽出席会议并作重要讲话。

崔丽副主任传达了党中央、国务院领导的批示指示精神和国务院专题会议要求,要求各地务必将人民生命健康放在首位,坚持底线思维,未雨绸缪,采取有力措施加强防控,严防疫情输入。目前,埃博拉出血热疫情仍在西非三国蔓延。据世界卫生组织通报,截至10月31日,西非疫区三国病例已达13 540例,死亡4 941人。尤其是美国、西班牙等国家先后出现确诊病例,引起了国际社会高度关注。专家研判认为,西非埃博拉出血热疫情难以在短期内扑灭,疫情发展已对我国公共卫生安全构成威胁,疫情输入风险进一步加大。

崔丽副主任充分肯定了前一阶段国内埃博拉出血热疫情防控工作,截至目前,我国境内无埃博拉出血热病例报告,无我国公民境外感染报告。

崔丽副主任强调,要继续坚持“极端重视、密切关注、防控为主、内外结合、科学应对”的原则,狠抓各项措施落实。一要建立健全联防联控工作机制。各地在当地党委、政府的领导下,明确部门职责分工,加强部门协作联动,认真落实各项疫情防控措施。二要进一步加强口岸疫情防范。精确管理疫情

发生国来华或归国人员,细化实施方案,完善质检边检联动机制,依法、有序做好口岸卫生检疫等工作。三要进一步强化国内疫情防范和应对准备。各地根据疫情形势研判,做好检测试剂、药械和防护用品等准备;强化疫情监测和报告制度,确保做到“五早”。四要继续做好疫情发生国重点人群疫情防范。细化工作责任,加强属地化、网格化管理,确保疫情监测无死角、处置无漏洞。五要周密做好APEC会议疫情防控工作,加强对来自疫区国人员的管理,切实做好疫情应对准备工作。六要继续抓好广交会疫情防控工作,切实强化防控措施和落实属地政府和广交会承办方责任。七要强化宣传引导、国际合作和疫苗、药物研发等科技攻关。八要积极做好援非抗疫工作和我国公民在境外感染回国救治的准备工作。最后,在做好埃博拉出血热疫情防控工作的同时,也要做好人禽流感、中东呼吸综合征等突发公共卫生事件防范和应对准备。

国家卫生和计划生育委员会、公安部、质检总局、总后卫生部相关司局和中国疾控中心相关负责同志在主会场参加了会议,各省、自治区、直辖市和新疆生产建设兵团卫生和计划生育委员会、公安厅(局)和检验检疫局的负责同志在分会场参加了会议。广东省、北京市卫生和计划生育委员会分别就本省、市埃博拉出血热疫情防控工作进行了汇报。公安部、质检总局对埃博拉疫情防控工作作出了安排。