氧化苦参碱微球体外累积释放百分率的影响因素*

吴朝花[1,2]，姜 丰[1,2]，苏 菊[1,2]，周 雪[1,2]，沈祥春[2]，陶 玲[1,2**]
(1. 贵州医科大学 中药药剂学教研室，贵州 贵阳 550025；2. 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色重点实验室，贵州 贵阳 550025)

[摘 要] **目的**：考察改善氧化苦参碱(OMT)聚乳酸聚乙醇酸(PLGA)微球(MS)24 h 累积释放百分率的制备工艺。**方法**：采用乳化溶剂挥发法(W/O/W)制备 MS，保证载药量变化不大的情况下，以 24 h 累积释放百分率为指标考察聚乙烯酸(PVA)浓度、吐温浓度、搅拌速度、NaCl 浓度、PLGA 浓度、外水相体积对 MS 体外释放的影响。**结果**：最优处方为 PVA 浓度为 1 %，NaCl 浓度为 2 %，PLGA 浓度为 125 g/L，外水相体积为 100 mL，OMT-MS 载药量和包封率分别为 28.95%、93.27%，24 h 累积释放百分率为 8.11%。**结论**：在该条件下制备 OMT-MS 24 h 突释率得到改善。

[关键词] 氧化苦参碱；聚乙烯酸；聚乳酸－羟基乙酸共聚物；微球；24 h 释放百分率；体外释放
[中图分类号] R965.2 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)06-0674-05
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.06.011

A Study on the Influencing Factors of 24 h Cumulative Release Percentage of Oxymatrine Microspheres

WU Chaohua[1,2], JIANG Feng[1,2], SU Ju[1,2], ZHOU Xue[1,2], SHEN Xiangchun[2], TAO Ling[1,2]
(*1. Department of Pharmaceutics of Chinese Materia Medica, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore preparation technics for improvement of 24 h cumulative release percentage of oxymatrine (OMT) poly(1actic acid-co-glycolie acid)(PLGA) microspheres (MS). **Methods**: By the Emulsified solvent evaporation (W/O/W), the effects of the concentration of PVA, Tween, NaCl, PLGA and the stirring speed, external water phase volume on cumulative release percentage of OMT MS were investigated in the case of small changes in drug loading. **Results**: The optimal prescription: the concentrations of PVA, NaCl, and PLGA were 1 %, 2 %; and 125 g/L respectively; the volume of external water was 100 mL; the drug-loading rate and encapsulation efficiency of OMT-MS were 28.95% and 93.27% respectively, and the 24 h cumulative release percentage was 8.11%. **Conclusion**: The 24 h cumulative release percentage of microspheres could be improved when OMT-MS prepared under the mentioned condition.

[**Key words**] oxymatrine; polyvinyle acid; polylactic acid-glycolic acid copolymer; microspheres; 24 h cumulative release percentage; release in *vitro*

氧化苦参碱(oxymatrine，OMT)是从苦豆子、苦参、广豆根等豆科槐属植物中提取的喹啉里西啶类生物碱，具有强心、降压和抗心律失常等多种药理作用[1]。OMT 在临床广泛用于白血病、慢性乙型

*[基金项目]贵州省科学技术基金[黔科合 J 字(2013)2039]；贵州省科技厅社发公关项目[黔科合 SY 字(2015)3032]；贵州省高层次创新型人才[黔科合人才(2015)4029 号]；贵州省高等学校科技创新团队[黔教合人才团队(2014)31 号]；贵州省科技创新团队[黔科合人才团队(2015)4025 号]
**通信作者 E-mail：649511230@qq.com
网络出版时间：2017－6－17 网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170617.2321.012.html

肝炎、丙型肝炎、肝纤维化等治疗中，疗效确切，但OMT在体内消除快，给药次数频繁，且血药浓度峰谷波动性大，常见恶心、呕吐、上腹不适等不良反应，患者顺应性差[2]。微球（microspheres，MS）是药物溶解或分散于高分子材料中形成的粒径为1～250 μm的微小球状实体，可供注射、口服或皮下埋植等给药途径使用。MS制剂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长效的目的，又能保护药物不被体内酶降解，减少给药次数和剂量，提高疗效、药物稳定性以及病人顺应性。乳酸－羟基乙酸共聚物（PLGA）、聚乳酸（PLA）等生物可降解高分子聚合物为二氧化碳和水，具有良好的生物相容性和高度的安全性，已广泛应用在生物医药领域[5-6]。本课题组前期对OMT-PLGA-MS的制备及其药剂学性能进行了研究，累积释药百分率在24 h时达到35.8%[7]，为了更好的发挥该制剂的缓释作用，本研究进行了改善氧化苦参碱微球（OMT-MS）24 h累积释放百分率的研究。

1　材料与方法

1.1　试剂与材料

OMT对照品（成都普思生物科技有限公司）、OMT原料药（中国药科大学）、PLGA（50/50，分子量30 000，济南岱罡生物科技有限公司）、聚乙烯醇（PVA，分析纯，批号20150227，北京国人逸康科技有限公司）、磷酸盐缓冲液（PBS）透析袋（MD25，Solarbio公司）、明胶（上海润捷化学试剂有限公司），乙腈为进口色谱纯，二氯甲烷（ACE）、丙酮（DCM）、磷酸、三乙胺及氯化钠（NaCl）均为国产分析纯，水为纯化水，流动相使用前均用0.45 μm的微孔滤膜滤过。KQ3200型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）、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）、XH-C型涡旋混合器（金坛市白塔新宝仪器厂）、SHZ-D（Ⅲ）型循环水式真空泵（郑州博科仪器设备有限公司）、ME104型分析天平［梅特勒－托利多仪器（上海）有限公司］、PB-10型pH计（德国sartorius公司）、SHZ-88型水浴恒温振荡器（江苏金坛市医疗仪器厂）、Agilent 1100型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）。

1.2　方法

1.2.1　OMT-MS制备　称取适量OMT和明胶溶于纯水作为内水相，取300 μL内水相，加入含适量PLGA的ACE和DCM混合溶液中，置于10 mL具塞玻璃试管中，冰浴条件下反复涡旋超声多次，制成W/O初乳。将初乳缓慢加入含NaCl的PVA溶液中，高速搅拌得到W/O/W复乳。将W/O/W复乳立即用适量2% NaCl溶液稀释，冰浴中高速搅拌下固化适当时间，移去冰浴，低速搅拌挥去有机溶剂，抽滤，蒸馏水洗涤3次，室温干燥48 h，即得OMT-MS。

1.2.2　色谱条件　色谱柱为Ultiamte ® AQ-C18柱，流动相为乙腈∶水∶三乙胺（体积比为8∶92∶0.2，用磷酸调节pH至3.3），检测波长210 nm，流速1.0 mL/min，柱温为30 ℃，进样量20 μL[4]。

1.2.3　方法学考察　精密称取OMT对照品15 mg，纯水溶解并定容混于50 mL的量瓶中，配制成浓度为0.3 g/L OMT对照品储备液，分别配制成2、4、8、16、32、｝OMT溶液，0.45 μm微孔滤膜过滤，取续滤液，备用。各取20 μL进样，记录峰面积。以峰面积（y）对OMT浓度（x）进行线性回归，回归方程为 $y = 23.983x + 3.020\ 4$，$R^2 = 0.999\ 9$；检测稳定性、精密度及平均回收率。

1.2.4　MS载药量、包封率的测定　取MS 10 mg，置10 mLEP管中，加入二氯甲烷0.6 mL，涡旋至溶解，加入PBS缓冲液（pH7.4）10 mL，室温下搅拌直至二氯甲烷挥发完全，取上清液于25 mL容量瓶中定容至刻度，再将样品稀释5倍，0.45 μm微孔滤膜过滤后进样测定，计算载药量和包封率。

1.2.5　MS体外释放度考察　剪取适宜长度的透析袋（8 000－14 000）加热煮沸，将煮沸后的透析袋一端扎紧，检漏。精密称取OMT-MS 50 mg置于透析袋中，加PBS缓冲液（pH7.4，0.02 %含叠氮化钠）2 mL封口，具塞三角瓶中加入该缓冲液98 mL，（37 ± 0.5）℃ 100 r/min振荡，定时从袋外量取4 mL释放介质，同时补加等量同质同温释放介质。所得溶液经0.45 μm滤膜过滤后分别测定峰面积，代入标准曲线方程，并计算MS在取样点的累积释药百分率[7]，公式如下：

$$\text{累积释药百分率 } Q(\%) = (V_0 \times C_t + V_i \times \sum_{n=1}^{t-1} C_i)/(W \times X) \times 100\%$$

V_0为释放介质的总体积（mL），C_t为各时间点的实测药物浓度（g/L），V_i为每次取样体积（mL），C_i为时刻各取样点的实测药物浓度（g/L），W为投入的MS总重量（mg），X为MS载药量。

1.2.4　各因素对OMT-MS的影响　固定ACE∶DCM比值为7∶3时，OMT浓度为187.5 g/L，单因素考察各因素对OMT-MS载药量、包封率和24 h突

释量的影响。

1.2.4.1 不同乳化剂种类及浓度的考察　固定 PLGA 浓度为 125 g/L,外水相 100 mL,搅拌速度为 500 r/min,2% NaCl,PVA 浓度为 1%、1.5%、2%,Tween-80 浓度为 1%、1.5% 和 2%,考察不同浓度的 PVA 和 Tween-80 对 OMT-MS 载药量、包封率和 24 h 累积释放百分率的影响。

1.2.4.2 不同搅拌速度的考察　固定 PLGA 浓度为 125 g/L,1% PVA、2% NaCl,外水相 100 mL,考察搅拌速度为 500、650 及 800 r/min 时 OMT-MS 载药量、包封率和 24 h 累积释放百分率。

1.2.4.3 不同 NaCl 浓度的考察　固定 PLGA 浓度为 125 g/L,1% PVA,外水相 100 mL,搅拌速度为 500 r/min,考察 NaCl 浓度为 2%、3% 及 4 % 时 OMT-MS 载药量、包封率和 24 h 累积释放百分率。

1.2.4.4 不同 PLGA 浓度对 OMT-MS 的影响　固定 NaCl 浓度为 2%,1% PVA,外水相 100 mL、搅拌速度 500 r/min,考察 PLGA 浓度为 120、125 及 130 g/L时 OMT-MS 载药量、包封率和 24 h 累积释放百分率。

1.2.4.5 不同外水相体积的考察　固定 PLGA 浓度为 125 g/L,搅拌速度为 500 r/min,2% NaCl 浓度、1% PVA 浓度,考察外水相体积为 100、125 及 150 mL 时 OMT-MS 载药量、包封率和 24 h 累积释放百分率。

2　结果

2.1 方法学考察

OMT 溶液浓度在 2 ~ 64 mg/L 范围内线性关系良好,12 h 日内稳定性 RSD 为 0.37%(n = 6),表明 OMT 在 12 h 内稳定。精密度 *RSD* 值为 0.17%(n = 6),重复性 *RSD* 值分别为 1.06%、0.26% 及 0.21%,平均回收率分别为 99.37%、100.38%、99.13%,*RSD* 分别为 0.59%、1.31%、0.40%,均符合要求。

2.2 PVA 和 Tween-80 对 24 h 累积释放百分率的影响

使用 Tween-80 作为乳化剂,OMT-MS 载药量和包封率低,24 h 累积释放百分率高。PVA 浓度为 1 % 时,OMT-MS 载药量和包封率较高,24 h 累积释放百分率较低。见表 1 及图 1。

2.3 搅拌速度对 OMT-MS 24 h 累积释放百分率影响

当搅拌速度为 500 r/min 时,OMT-MS 载药量、包封率较高,24 h 累积释放百分率较低,见表 2 及图 2。

表 1　不同浓度 PVA 和 Tween-80 条件时 OMT-MS 的载药量、包封率和 24 h 累积释放百分率

Tab. 1　OMT-MS drug-loading rates, encapsulation efficiency, and 24 h cumulative release percentage with different concentration of PVA and Tween-80

乳化剂	浓度(%)	OMT-MS(%)		
		载药量	包封率	24 h 累积释放百分率
PVA	1	28.95	93.27	8.11
	1.5	19.74	63.61	19.89
	2	16.62	53.55	39.84
Tween-80	1	13.35	43.01	99.76
	1.5	14.68	47.29	93.12
	2	7.19	23.17	81.18

表 2　不同搅拌速度时 OMT-MS 的载药量、包封率和 24 h 累积释放百分率

Tab. 2　OMT-MS drug-loading rates, encapsulation efficiency, and 24h cumulative release percentage when different stirring speeds were adopted

搅拌速度 (r/min)	OMT-MS(%)		
	载药量	包封率	24 h 累积释放百分率
800	24.93	80.32	34.32
650	21.75	70.10	25.03
500	28.95	93.27	8.11

2.4 NaCl 浓度对 OMT-MS 累积释放百分率的影响

NaCl 浓度为 2% 时,OMT-MS 载药量、包封率较高,24 h 累积释放百分率较低,见表 3 及图 3。

表 3　不同 NaCl 浓度时 OMT-MS 的载药量、包封率和 24 h 累积释放百分率

Tab. 3　OMT-MS drug-loading rates, encapsulation efficiency, and 24 h cumulative release percentage when different concentrations of NaCl was used

NaCl 浓度(%)	OMT-MS(%)		
	载药量	包封率	24 h 累积释放百分率
2	28.95	93.27	8.11
3	16.41	52.88	11.60
4	13.99	45.07	21.42

2.5 PLGA 浓度对 OMT-MS 24 h 累积释放百分率的影响

PLGA 浓度为 125 g/L 时,制备的 OMT-MS 载药

量、包封率较高，24 h 累积释放百分率较低，见表 4 及图 4。

2.6　外水相体积对 OMT-MS 24 h 累积释放百分率的影响

外水相体积为 100 mL 时，制备的 OMT-MS 载药量、包封率较高，24 h 累积释放百分率较低，见表 5 及图 5。

表 4　不同 PLGA 浓度时 OMT-MS 的载药量、包封率和 24 h 累积释放百分率

Tab. 4　OMT-MS drug-loading rates, encapsulation efficiency, and 24 h cumulative release percentage when different concentrations of PLGA was used

PLGA 浓度(g/L)	OMT-MS(%)		
	载药量	包封率	24 h 累积释放百分率
120	22.55	72.67	32.41
125	28.95	93.27	8.11
130	14.74	47.49	22.46

表 5　不同外水相体积时 OMT-MS 的载药量、包封率和 24 h 累积释放百分率

Tab. 5　OMT-MS drug-loading rates, encapsulation efficiency, and 24 h cumulative release percentage when different external water phase volumes were used

外水相体积(mL)	OMT-MS(%)		
	载药量	包封率	24 h 累积释放百分率
100	28.95	93.27	8.11
125	17.67	56.95	26.23
150	4.51	14.54	96.42

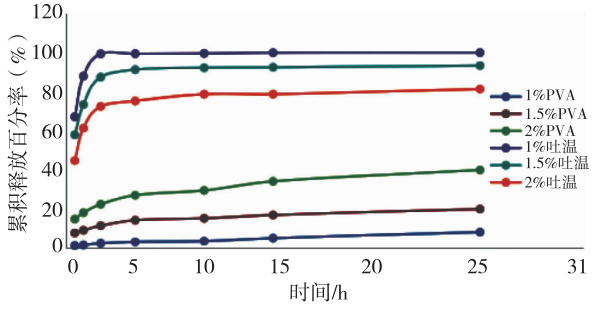


图 1　不同浓度 PVA 和 Tween-80 下 OMT-MS 24 h 累积释放曲线

Fig. 1　The 24 h cumulative release curve of OMT-MS with different concentrations of PVA and Tween-80

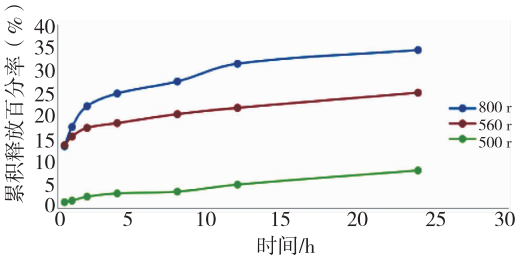


图 2　不同搅拌速度时 OMT-MS 24 h 累积释放曲线

Fig. 2　The 24 h cumulative release curve of OMT-MS at different stirring speeds

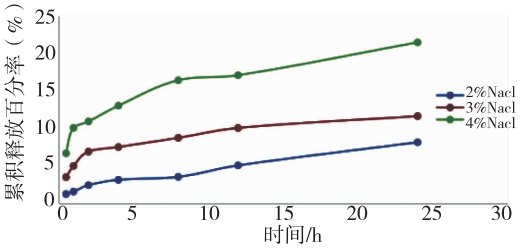


图 3　不同 NaCl 浓度时 OMT-MS 24 h 累积释放曲线

Fig. 3　The 24 h cumulative release curve of drug-loaded microspheres with different NaCl concentration

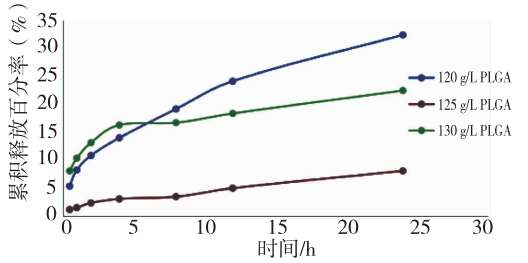


图 4　不同 PLGA 浓度时 OMT-MS 24 h 累积释放曲线

Fig. 4　The 24 h cumulative release curve of drug-loaded microspheres with different PLGA concentrations

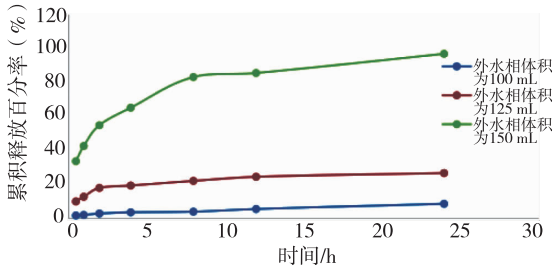


图 5　不同外水相体积时 OMT-MS 24 h 的累积释放曲线

Fig. 5　The 24 h cumulative release curve of drug-loaded microspheres with different external water volumes

3　讨论

实验室前期实验所制备 OMT-MS 获得了较高的载药量和包封率，突释也符合《中国药典》各版要求，但是聚集在微球表面的氧化苦参碱较多，24 h累积释放百分率达到 35.8 %[7]。为了更好的发挥微球的缓释效应，本研究对 PVA 浓度、吐温浓度、搅拌速度、NaCl 浓度、PLGA 浓度以及外水相体积进行考察，以期改善 MS 24 h 累积释放百分率。

使用 Tween-80 作为乳化剂 MS 成球性很差，形状不规则，突释严重。PVA 浓度为 1 % 时，微球成球性较好，载药量达到 28.95 %，显著高于其他处方；同时 PVA 浓度上升，溶液变粘稠，乳剂稳定性增加，阻碍药物向四周传送，突释降低[8]。但 PVA 浓度 >1% 时，可能由于外水相黏滞度过大，对在高速搅拌过程中形成乳滴的乳化稳定作用加强，避免乳滴聚集、叠连，从而形成小的乳滴[9]，进而 MS 的粒径较小，比表面积大，向外水相扩散药物增多，载药量和包封率下降；同时，外水相黏滞度增加也不利于有机溶剂向外相的扩散，MS 的固化速度减慢，药物从内相向外相的扩散过程变长[10]，也将导致导致载药量和包封率下降。较大的比表面积也导致 0.5 h 和 24 h 释放百分率均增大。

在 MS 制备中，搅拌速度是也是影响 MS 突释的重要因素，这是因为搅拌速度决定 MS 粒径大小，随着搅拌速度的增大，MS 粒径越小，MS 比表面积越大，微球中药物释放速率越快[11-12]。

在外水相加入渗透压物质后，如 NaCl，外水相渗透压提高，内外相渗透压差减小，从外水相迁移至内水相的水分减少，干燥过程中形成的孔道少，MS 表面光滑，内部结构致密，药物不易快速释放，降低突释。但 NaCl 在增加渗透压的同时，增加了连续相的极性，而 ACE 在极性的连续相中的溶解性很小[13]，从而导致 ACE 从油相向连续相扩散的速度变慢，最终导致 MS 固化之后还有少量 ACE 残留在微球中，在干燥过程中才缓慢释放，从而形成孔洞，加快药物的释放率。

PLGA 浓度的增加使有机相黏度加大，可减小搅拌时产生的对流，使得药物更加均一的分布在 MS 中，避免药物损失的同时也降低了突释[14]。但本研究发现 PLGA 浓度高于 125 g/L 时，MS 制备时粘连现象严重，从而产生粒径较大的微球，且微球黏连也增加，导致微球成球性差，形状不规则，突释加快。

综上所述，在一定范围内，降低搅拌速度、外水相体积、NaCl 浓度增加，以及增加 PLGA 浓度，MS 24 h 累积释放百分率现象可得到改善。

4　参考文献

[1] 石磊，史丽娟. 中药单体 - 氧化苦参碱药理作用研究新进展[J]. 山西医药杂志，20 15(2)：123 - 126.

[2]包玉羡. 氧化苦参碱的药理作用与临床应用[J]. 世界最新医学信息文摘，2014(6)：96 - 97.

[3]赵先英，高继宁，粟永萍，等. 乳酸 - 羟基乙酸共聚物多肽蛋白类药物微球控释系统的突释与控制[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2011(38)：7177 - 7180.

[4]王恺源，高永良. 影响 PLGA 微球突释的因素以及控制技术[J]. 中国新药杂志，2011(6)：557 - 562.

[5]冯晓健，吕秀玲，李学刚. 改良复乳法(W/O/W)制备聚乳酸载药微球[J]. 河北理工大学学报，2010(2)：91 - 93.

[6]罗斌华，丁洁琼，阎志飞，等. 阿霉素 - PLGA 微球体外释药特性的研究[J]. 解放军药学学报，2013(4)：340 - 342.

[7]缪阳，沈祥春，肖潮达，等. 氧化苦参碱缓释微球的制备及体外释药性能的研究[J]. 中药材，2012(10)：1675 - 1679.

[8] Mao SR，Xu J，Cai CF，et al. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres[J]. International Journal of Pharmaceutics，2007(334)：137 - 148.

[9] Han YD，Tian HY，He P，et al. Insulin nanoparticle preparation and encapsulation into poly(lactic - co - glycolic acid) microspheres by using an anhydrous system[J]. International Journal of Pharmaceutics，2009(378)：159 - 166.

[10]赵希青，孙晓雷，肖若蕾. PLGA 微球的影响因素及控制技术[J]. 湖北科技学院学报，2015(29)：451 - 453.

[11] Xuan J，Lin Y，Huang J，et a1. Exenatide-loaded PLGA mi-crospheres with improved glycemic control：In *vitro* bioactivi-ty and in vivo pharmacokinetic profiles after subcutaneous administration to SD rats[J]. Peptides，2013(46)：172.

[12]齐献利. 伊立替康微球突释效应的影响因素及控制方法[D]. 石家庄：河北科技大学，2015.

[13]叶美娣，郑彩虹. 乳酸 - 羟基乙酸共聚物(PLGA)微球控释系统的突释[J]. 中国现代应用药学杂志，2005(5)：371 - 374.

[14] Diab R，Brillauh J，Bardy A，et a1. Formulation and in vitro characterization of inhalable polyvinyl alcohol-free rifampicin-loaded PLGA microspheres prepared with sucrose palmitate as stabilizer：efficiency for ex vivo alveolar mac-rophage targeting[J]. Int J Pharm，2012(1 - 2)：833.

(2017-03-01 收稿，2017-05-16 修回)
中文编辑：文箐颖；英文编辑：苏晓庆