

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2016.04.003

正交试验优化甲氨蝶呤-壳聚糖-蒙脱土缓释微球的 制备工艺及其体外释放研究*

全先高 王 军 刘 景 丁 林 孙珊珊 王慧云
(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘 要 **目的** 优选一种新型药物缓释体系甲氨蝶呤(MTX)-蒙脱土(MMT)-壳聚糖(Cs)载药微球的制备工艺。**方法** 以 Cs、MMT 原料,采用反相悬浮聚合法制得一种新型药物缓释体系,以载药量为评价指标,以投药比、复合材料用量、乙醇用量、油水比为影响因素,采用正交试验 $L_9(3^4)$ 设计对制备条件进行优选,利用马尔文激光粒度仪测定器粒径和电位;通过体外释放实验探讨了载药微球在同模拟肠液中释放液中的释药规律。**结果** 最佳制备工艺为:药比为 2:1,复合材料用为 30%,乙醇占总体积的 1/12,油水比为 5:1;最优工艺制得的载药微球平均粒径为 557.4nm,载药量为 31.6%,Zeta 电位 20.8mV。**结论** 采用最佳工艺制备的微球黄载药量较高,形态和粒径较均匀,该缓释体系在模拟肠液中具有明显的缓释作用。

关键词 蒙脱土;壳聚糖;甲氨蝶呤;缓释微球

中图分类号:TB332 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2016)08-237-05

Preparation condition optimization of Methotrexate-Montmorillonite-Chitosan Sustained-Release Microsphere by orthogonal test

QUAN Xiangao, WANG Jun, LIU Jing, DING Lin, SUN Shanshan, WANG Huiyun
(School of Pharmaceutical Science, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract; Objective To optimize the preparation conditions of Methotrexate-Montmorillonite-Chitosan Sustained-Release. **Methods** The novel drug sustained-release system was prepared with Montmorillonite and Chitosan as the carrier material, Methotrexate as a model drug. $L_9(3^4)$ orthogonal test was adopted to optimize the preparation conditions which was designed with four factors of lecithin to proportion of drug, the amount of composite materials, the dosage of ethanol the ratio of oil/water, and drug-loading rate. The average particle size and Zeta potential of microspheres were characterized by Malvern zetasizer nano series. And in vitro the release experiments were used to study the drug release properties of Methotrexate-Montmorillonite-Chitosan microsphere. **Results** Results showed that the drug loading, the average particle size and Zeta potential were 31.6%, 557.4 nm and 20.8mv under the optimal conditions of the proportion of drug 2:1, the amount of composite materials 30%, the dosage of ethanol/the total volume 1/12, and the ratio of oil/water 5:1 respectively. **Conclusion** The microspheres under the optimal conditions of the proportion of drug has the size distribution homogeneously assumed and the good sphericity. The Methotrexate-Montmorillonite-Chitosan Sustained-Release system has obvious slow-release function in the simulated intestinal juice.

Keywords: Montmorillonite; Chitosan; Methotrexate; Sustained-Release Microsphere

伴随着新制剂的开发,壳聚糖(Cs)微球已经成为缓控释制剂、靶向制剂等新剂型研究的热点^[1-5]。据报道包含消炎药、抗癌药、生化制剂等

的 Cs 载药微球已经被制得^[6-8]。但由于 Cs 分子中含有大量亲水基团,在实际操作中其机械性能和抗水性差。近年来国内外学者主要通过和高分子接枝或共混的方法来改性 Cs^[9-10],而用无机材料对 Cs 改性的研究较少^[11-13]。本文利用天然黏土矿物

* [基金项目] 济宁医学院科研项目(JY2013KJ022); 济宁医学院科研项目(JY2013KJ010)

质 MMT 制备 Cs-MMT 插层纳米复合材料来改善其性能^[14],探索它作为新型药物缓释载体的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);马尔文激光粒度仪(英国马尔文公司);岛津 Irprestige-21 红外分光光度计(日本岛津公司);KQ-500DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);DZF-6020 型真空干燥器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂);SHB-B 型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。

Cs(脱乙酰度 90%,济南海得贝海洋生物工程有限公司);甲氨蝶呤(MTX)原料药(99.7%,北京亚希尔化工科技有限公司);醋酸(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);Span80(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);石油醚(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司);异丙醇(天津市广成化学试剂有限公司);MMT K-10(比表面积 240 m²/g,上海紫一试剂厂);戊二醛(w=0.25,分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 Cs-MMT 复合材料的制备 将精密称取 4g Cs 溶于 196ml 体积分数为 2% 的醋酸溶液中,用 0.1mol/L 的氢氧化钠溶液调节溶液 pH 为 5.0。精密称取 2.5g MMT 分散在 100ml 蒸馏水中,超声分散 1.5h。将 Cs 溶液缓慢加入 MMT 悬浮液中,控制滴速为 50ml/h,并大力搅拌。将混合物 60℃ 反应 24h,产物用蒸馏水洗涤直到洗涤用水的 pH 呈中性。抽滤,将得到的固体 60℃ 真空干燥 48h。干燥后用研钵研磨成粉末备用。

1.2.2 MTX-MMT-Cs 载药微球的制备 1.0g Cs 溶于 50ml 体积分数为 2% 的醋酸溶液中,配制成 Cs 溶液,加入已制备的 Cs-MMT 复合材料 0.4g,超声分散 1h 使分散均匀。再取 0.2g MTX 溶于 20ml 无水乙醇,将其加入上述溶液中,磁力搅拌 2h。取 200ml 石蜡与 8ml Span 80 混合搅拌 30min,将上述制得的复合溶液逐滴加入该混合体系中,超声分散 30min,缓慢加入戊二醛(体积分数 25%) 4ml,60℃ 下搅拌交联反应 3h。产物 3500r 离心分离 30min,加入石油醚洗涤弃去上层,用质量分数为 2% 的亚硫酸氢钠浸泡 1h,用异丙醇洗涤,抽滤得

产物,30℃ 真空干燥 24 h 即得载药微球。

1.2.3 MTX 标准曲线的绘制 以模拟胃液(pH = 1.2 的盐酸溶液)和模拟肠液(pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液)为溶剂分别配制浓度为 4.00、8.00、12.00、16.00、20.00、24.00 μg/ml MTX 标准溶液。再分别以模拟胃液、模拟肠液为空白溶液,在 200 ~ 350 nm 进行紫外扫描,确定 MTX 的最大吸收波长分别为 306nm 和 303 nm,绘制标准曲线如图 1,标准曲线方程为:

$$Y = 0.04608X - 0.02912, R^2 = 0.9999 \text{ (模拟胃液)}$$

$$Y = 0.04896X + 0.00703, R^2 = 0.9999 \text{ (模拟肠液)}$$

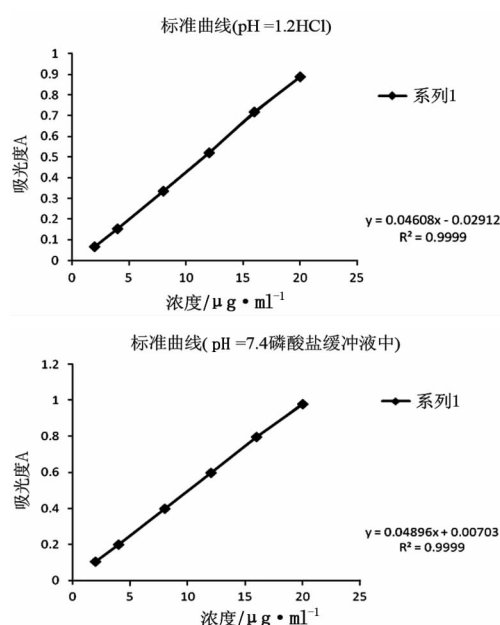


图 1 MTX 的标准曲线

1.2.4 微球载药量的测定 精确称取 0.03g 载药微球,置于 30ml, pH = 1.2 的盐酸溶液中,37℃ 搅拌 8h,过滤,取 10ml 滤液于 100ml 容量瓶中,定容,测定其吸光度,确定 MTX 的浓度,根据公式(1)计算载药量。

$$\text{载药量} = \frac{\text{微球中药物质量}}{\text{称取的微球质量}} \quad (1)$$

1.2.5 设计正交试验 实验影响因素有 Cs-MMT 复合材料用量: m(Cs-MMT)/m(Cs)、投药比: m(Asp)/m(Cs)、乙醇用量: Vethanol/V(w+o)、水油体积比: Vw/Vo、交联剂用量: Vglutaral/Vw、乳化剂用量: VSpan 80/Vo、搅拌速率等,其中前 4 者影响程度较大^[14]。设计正交试验 L₉(3⁴) 采考察合成条件对载药微球结构和载药量的影响,探索载药微球制备的最佳条件,因素水平见表 1。

表 1 因素水平

水平	因素			
	m(Cs-MMT)/m(Cs)	m(MTX)/m(Cs)	Vethanol/V(w+o)	Vw/Vo
1	0.1	1.00	1/12	1/7
2	0.3	1.50	1/9	1/5
3	0.5	2.00	1/6	1/3

1.2.6 表征 1)红外表征:用 FW-4A 型压片机溴化钾压片后,利用岛津 Irestige-21 红外分光光度计进行表征,分辨率 0.5 ~ 1cm,波数范围 4000 ~ 400cm⁻¹。2)微球平均粒径及电位测量:采用马尔文激光粒度仪(英国马尔文公司)测量载药微球粒径。用异丙醇为分散介质将产物分散后分别进行电位和粒径的测量。3)微球的显微形态表征:采用麦克奥迪 BA3009 透射偏光显微镜观察微球的形态。

1.2.7 体外释放实验 称取 0.3 g 载药微球,加入到 200 ml 已预热的模拟释放液中(在盐酸缓冲液和磷酸盐缓冲液中分别测定),密封,37℃ 磁力搅拌。每隔一定时间取样 5 ml,同时用已预热的 5 ml 释放液介质补充,在最大吸收波长下,测其吸光度,通过公式(2)计算累积释放量。

$$E_r = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_{drug} D} \quad (2)$$

其中: V_e 为释放介质置换体积; V_0 为起始释放液体积; C_i 为第 i 次置换时释放液中的药物浓度; n 为置换介质的次数; m_{drug} 为杂化微球的质量; D 为杂化微球载药量。

2 结果和讨论

2.1 正交实验结果分析

设计正交实验 $L_9(3^4)$,载药微球的质量可通过微球的载药量来衡量^[13]。载药量越高越优,质量越好。实验结果见表 2。

分析表 1 的实验结果可知,各因素对载药微球质量的影响次序为:投药比 > 复合材料用量 > 乙醇用量 > 油水比。确定载药微球的最佳制备方案为实验 6,即:Cs-MMT 复合材料占 Cs 质量的 30%,投药比为 2:1,乙醇占总体积的 1/12,油水比为 5:1,在此条件下制得载药微球载药量为 31.6%。

表 2 正交实验结果

因素	m(Cs-MMT)/m(Cs)	m(MTX)/m(Cs)	Vethanol/V(w+o)	Vw/Vo	载药量(%)
实验 1	0.1	1.00	1/12	1/7	14.61
实验 2	0.1	1.50	1/9	1/5	16.86
实验 3	0.1	2.00	1/6	1/3	28.00
实验 4	0.3	1.00	1/9	1/3	10.05
实验 5	0.3	1.50	1/6	1/7	20.65
实验 6	0.3	2.00	1/12	1/5	31.60
实验 7	0.5	1.00	1/6	1/5	9.35
实验 8	0.5	1.50	1/12	1/3	7.80
实验 9	0.5	2.00	1/9	1/7	18.00
K1	19.823	11.337	18.003	17.753	
K2	20.767	15.103	14.970	19.270	
K3	11.717	25.867	19.333	15.283	
R	9.050	14.530	4.363	3.987	

2.2 微球的表征

2.2.1 平均粒径及电位 最优制备工艺制得的载药微球平均粒径为 557.4nm,电位为 20.8mV。

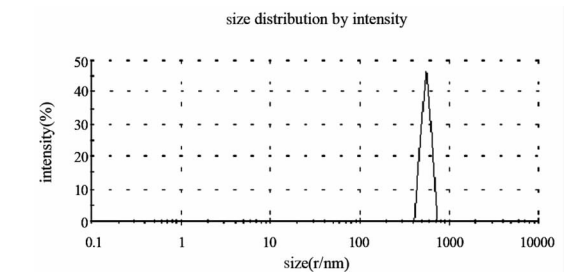


图 2 载药微球平均粒径测量图

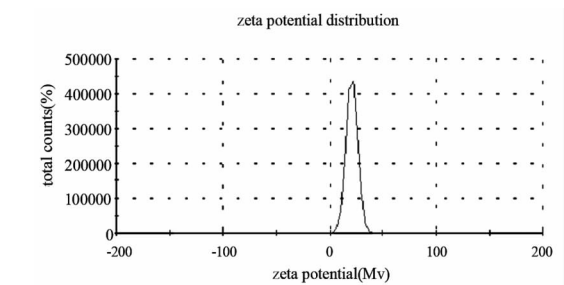


图 3 载药微球电位测量图

2.2.2 红外谱图表征 MMT 的特征吸收峰为 3620cm 处的 Al - O - H 的伸缩振动, Si - O 在 1088,1043 和 482cm 处的伸缩振动, Al-Al-OH 在 932 cm 处的伸缩振动,541cm 的 Al - O - Si 的伸缩振动。在 MTX 的红外谱图上,1615cm 为 - OH 的伸缩振动为羧基的振动。Cs 红外图谱上在 3420 cm 处是羟基的伸缩振动,而在 1599 cm 处为 NH₂

的伸缩振动吸收峰。从 MTX-MMT-Cs 缓释体系的红外谱图上可知,缓释体系中不仅含有 MMT 特征峰,如在 1000 ~ 1100cm 范围强的 Si - O - Si 骨架振动吸收峰, Si - O, Al - O 在 400 ~ 600cm 的弯曲振动吸收峰,和甲氨蝶呤的特征峰,比如在 1615cm 的羧基振动,以及壳聚糖的特征峰,在 1599 cm 处 NH₂ 的伸缩振动吸收峰。而且出现一些新的吸收峰,如 1300 和 1200cm 处的吸收峰,并且有些基团吸收峰发生迁移。这是由于 MTX 上的羧基和氨基,与 MMT 片层上的 -Si - OH 和 -Al - OH 形成了氢键,同时与 Cs 上的氨基、羟基也发生了化学反应的缘故。红外光谱结果表明,MTX 已成功载入 MMT-Cs 微球中,3 者之间通过氢键或化学键相连。见图 4。

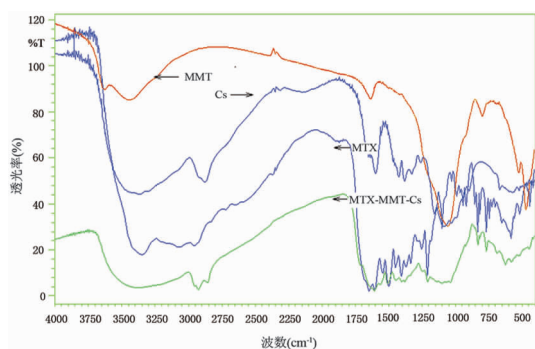


图 4 MTX, MMT, Cs 和载药微球的红外光谱图

2.2.3 微球显微照片 由图 5 可以看出该制备方法制得的载药微球成球性好,粒度分布较均匀。

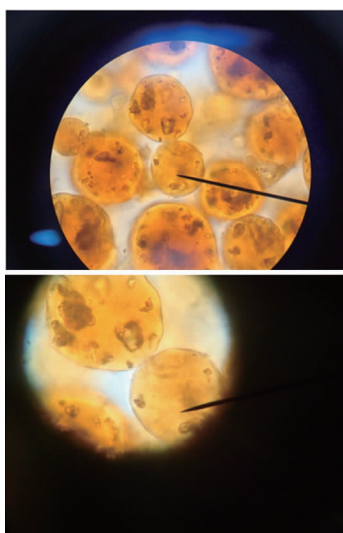


图 5 载药微球的显微照片

2.4 载药微球的体外释药研究

图 6 是载药微球在模拟肠液中的释放曲线。

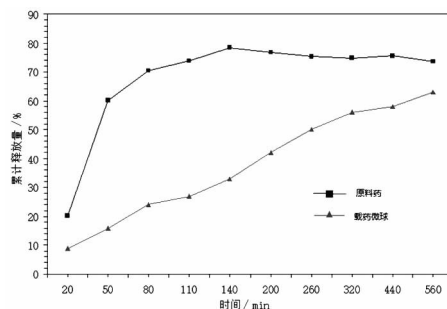


图 6 载药微球在模拟肠液中的释放曲线

图 6 为 MTX-MMT-Cs 载药微球和 MTX 原料药在模拟肠液中的释放情况,由图 6 可以 MYX 原料药累计释放量很快就达到了 60% 以上,而 MTX-MMT-Cs 载药微球在 6 h 后累计释放量才达到 60%, MTX-MMT-Cs 缓释微球在模拟肠液中具有缓释作用。

3 结论

1) 以 MTX、Cs 和 MMT 为复合载体,通过优化合成条件,成功制得 MTX-MMT-Cs 载药微球,该制备方法制备的载药微球成球性好、粒径分布均匀、载药量高。

2) 确定载药微球的最佳制备条件为:Cs-MMT 复合材料占 Cs 质量的 30%,投药比为 2:1,乙醇占总体积的 1/12,油水比为 5:1,在此条件下制得载药微球载药量为 31.6%。

3) MTX-MMT-Cs 缓释体系在模拟肠液中具有缓释作用释放。

参考文献:

- [1] Baldrick P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2010, 56(3): 290-299. DOI:10.1016/j.yrtph.2009.09.015.
- [2] Joshi G V, Kevadiya B D, Bajaj H C. Controlled release formulation of ranitidine-containing montmorillonite and Eudragit E-100[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2010, 36(9): 1046-1053. DOI:10.3109/03639041003642073.
- [3] Ajun W, Yan S, Li G, et al. Preparation of aspirin and probucol in combination loaded chitosan nanoparticles and in vitro release study[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 75(4): 566-574. DOI:10.1016/j.carbpol.2008.08.019.

(下转第 244 页)

- [2] 张忠华,高维平.植物多糖分析检测研究进展[J].吉林化工学院学报,2014,31(7):33-37. DOI:10.3969/j.issn.1007-2853.2014.07.009.
- [3] Li X, Wang L. Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of *Hohenbuehelia serotina* polysaccharides[J]. Int J Biol Macromol, 2016, 83: 270-276. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.11.060.
- [4] Siu KC, Xu L, Chen X, et al. Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharides isolated from alkaline extract of wild *Armillaria ostoyae* mushrooms[J]. Carbohydr Polym, 2016, 137: 739-746. DOI:10.1016/j.carbpol.2015.05.061.
- [5] He N, Yang X, Jiao Y, et al. Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits[J]. Food Chemistry, 2012, 133(3): 978-989. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.02.018.
- [6] Zhang Q, Xu Y, Zou S, et al. Novel functional polysaccharides from *Radix Polygoni Multiflori* water extracted residue: Preliminary characterization and immunomodulatory activity[J]. Carbohydr Polym, 2016, 137: 625-631. DOI:10.1016/j.carbpol.2015.11.023.
- [7] Wu X, Jiang W, Lu J, et al. Analysis of the monosaccharide composition of water-soluble polysaccharides from *Sargassum fusiforme* by high performance liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry[J]. Food Chem, 2014, 145: 976-983. DOI:10.1016/j.foodchem.2013.09.019.
- [8] 李卫燕,李萍,曹蔚.柱前衍生化高效液相色谱法测定当归酸性多糖单糖组成的新方法[J].科学技术与工程, 2015, 15(10): 151-154. DOI: 10.3969/j.issn.1671-1815.2015.10.030.
- [9] 陈志辉,谭丽容,罗明,等.香菇多糖柱前衍生化高效液相色谱指纹图谱研究[J].医药导报, 2015, 34(5): 649-654. DOI:10.3870/ydyb.2015.05.022.
- [10] 冯学珍,陈颖,伍善广.石莼多糖的单糖组成成分分析[J].食品工业科技, 2014, 35(7): 91-94.

(收稿日期 2016-01-18)

(上接第 240 页)

- [4] Yenilmez E, Baaran E, Yazan Y. Release characteristics of vitamin E incorporated chitosan microspheres and in vitro-in vivo evaluation for topical application[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84(2): 807-811. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.07.002.
- [5] Wei W, Ma G H, Wang L Y, et al. Hollow quaternized chitosan microspheres increase the therapeutic effect of orally administered insulin[J]. Acta Biomater, 2010, 6(1): 205-209. DOI:10.1016/j.actbio.2009.06.005.
- [6] Park J H, Saravanakumar G, Kim K, et al. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2010, 62(1): 28-41. DOI:10.1016/j.addr.2009.10.003.
- [7] Hamman J H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems[J]. Marine Drugs, 2010(4): 1305.
- [8] Patel H A, Shah S, Shah D O, et al. Sustained release of venlafaxine from venlafaxine-montmorillonite-polyvinylpyrrolidone composites[J]. Applied Clay Science, 2011, 51(1): 126-130. DOI:10.1016/j.clay.2010.11.013.
- [9] Chen Y, Zhou A, Liu B, et al. Tramadol hydrochloride/montmorillonite composite: Preparation and controlled drug release[J]. Applied Clay Science, 2010, 49(3): 108-112. DOI:10.1016/j.clay.2010.04.011.
- [10] Hua S, Yang H, Wang W, et al. Controlled release of ofloxacin from chitosan-montmorillonite hydrogel[J]. Applied Clay Science, 2010, 50(1): 112-117. DOI:10.1016/j.clay.2010.07.012.
- [11] Nanda R, Sasmal A, Nayak P L. Preparation and characterization of chitosan-poly(lactide) composites blended with Cloisite 30B for control release of the anticancer drug paclitaxel[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(2): 988-994. DOI:10.1016/j.carbpol.2010.09.009.
- [12] Kevadiya B D, Joshi G V, Patel H A, et al. Montmorillonite-alginate nanocomposites as a drug delivery system: intercalation and in vitro release of vitamin B1 and vitamin B6[J]. J Biomater Appl, 2010, 25(2): 161-177. DOI:10.1177/0885328209344003.
- [13] 钱勇,蒋彩云,高倩.温度及 pH 敏感的水凝胶微球合成及其药物缓释研究[J].化工时刊, 2011, 25(1): 1-6. DOI:10.3969/j.issn.1002-154X.2011.01.001.
- [14] 杨凤,赵伟,张欠.阿司匹林-蒙脱土-壳聚糖缓释微球的制备及其体外释放性能[J].功能高分子学报, 2010(1): 29-34.

(收稿日期 2016-03-26)