

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.01.015

阿司匹林-LDHs-壳聚糖微球的制备及其体外释放研究*

王启平¹ 李 慧² 王慧云² 孙珊珊² 丁 林² 张 波² 全先高^{2Δ}

(¹ 济宁市任城区卫生监督所, 济宁 272000; ² 济宁医学院药学院, 日照 276826)

摘 要 **目的** 制备阿司匹林-LDHs-壳聚糖微球, 并研究其体外释放性能。**方法** 以硝酸锌、硝酸铝和壳聚糖为原料, 以阿司匹林为模型药物, 采用乳化交联法制备阿司匹林-LDHs-壳聚糖微球, 应用傅立叶红外变换光谱仪 (FT-IR)、马尔文激光粒度仪、紫外可见分光光度计 (UV-spectrophotometer)、电光显微镜表征载药微球的结构、性能及形态; 以载药量和包封率为评价指标, 考察了阿司匹林用量、LDHs-壳聚糖用量, 阿司匹林/明胶, 戊二醛用量等影响因素对载药微球的影响; 通过体外释放实验探讨了载药微球在不同模拟释放液中的释药规律。**结果** 在 3% 阿司匹林用量、0.03gCs-LDHs、阿司匹林/明胶 1:8、戊二醛 0.5ml 制备的微球有最佳包封率和载药量。最优工艺制得的载药微球平均粒径为 2793nm。**结论** 所得微球粒径分布较均匀, 球形度好; 该微球更倾向于在 pH 较高的盐酸溶液中释放。

关键词 双层氢氧化物; 阿司匹林; 微球; 缓释

中图分类号: TB332 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2018)02-059-06

Preparation and in vitro releasing property of aspirin-LDHs-chitosan microspheres

WANG Qiping¹, LI Hui², WANG Huiyun², SUN Shanshan², DING Lin², ZHANG Bo², QUAN Xiangao^{2Δ}

(¹ Rengcheng Health inspection institute, Jining 272000, China;

² School of Pharmaceutical Science, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To prepare the aspirin - LDHs-chitosan Microspheres, and study its in vitro release properties. **Methods** The aspirin-LDHs-chitosan Microspheres were prepared with zinc nitrate, aluminiumnitrate and chitosan as raw material, aspirin as the model drug. The microspheres are characterized by Fourier transform infrared spectrometer (FTIR), Malvern laser particle size analyzer, UV-spectrophotometer (UV), as well as Electric microscope. The influence of dosage of aspirin, amount of Cs-LDHs, ratio of aspirin / gelatin and dosage of crosslinking agent on the drug-loaded and entrapment rate of microspheres were explored. And in vitro release experiments were used to study the drug release properties of the microsphere. **Results** Results showed that the average particle size was 2793nm under the optimal conditions of the dosage of aspirin 3%, the amount of Cs-LDHs 0.03g, the ratio of aspirin / gelatin 1:8, and the dosage of crosslinking agent 0.5ml respectively. **Conclusion** The shape and size of microspheres are uniform. aspirin - LDHs-Cs Microspheres is pH-sensitive and tends to show a larger release percentage in the phosphate buffer solution solution.

Keywords: Layered double hydroxide; Aspirin; Microspheres; Controlled-release

阿司匹林是人工合成的非选择性环氧酶抑制剂, 属于非甾体抗炎药。在临床上, 阿司匹林用来解热镇痛、消炎抗风湿; 还可对心血管疾病、糖尿病等有治疗作用。目前已研发的有肠溶剂、缓释与控

释剂、复方制剂、泡腾剂、环糊精包合物等多种剂型^[1-2]。目前研究缓释控释制剂将是阿司匹林剂型的发展方向^[2-4]。微球作为一种缓控释剂型, 采用高分子材料作为载体, 其中明胶、壳聚糖 (CS)、糊精等常被用作载体材料^[5-9]。近年来, 将药物插入 LDHs 层板之间, 形成药物-纳米杂化物因的研究报道屡见报道^[10-14], 但是把 Cs 插入 LDHs 形成

* [基金项目] 济宁医学院科研项目 (JY2013KJ022); 济宁医学院教师科研扶持基金 (JY2017KJ048)

Δ [通信作者] 全先高, E-mail: quanxg3696@163.com

有机高分子杂化纳米杂化物,再用来制备载药微球的报道却很少。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UV-2450 紫外分光光度计(日本岛津公司); Nano-ZS90 马尔文激光粒度仪(英国马尔文公司); 岛津 IRTracer-100 红外分光光度计(日本岛津公司); DZF-6020 型真空干燥器(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); ZRS-8G 智能溶出试验仪(天津天大天发科技有限公司); 生物显微镜(日本尼康)。

1.2 试剂

硝酸锌(AR, 上海研生实业有限公司); 硝酸铝(AR, 天津市巴斯长化工有限公司); 阿司匹林(99.7%, 北京亚希尔化工科技有限公司); 壳聚糖(Cs, 脱乙酰度90%, 天津市北方天医化学试剂厂); Span80(AR, 天津市凯通化学试剂有限公司); 石油醚(AR, 天津市富宇精细化工有限公司); 聚乙二醇(AR, 上海光明化工厂); 戊二醛($w = 0.25$, AR, 天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 方法

2.1 Cs-LDHs 的复合材料的制备

将 0.7000g Cs 溶于 35mL 的醋酸溶液中,加入 5.9500g 六水合硝酸锌和 3.7503g 九水合硝酸铝,制备成盐溶液。在通入氮气保护条件下,将 52ml 稀氨水(2%)碱液迅速加入到盐溶液中得到混合盐溶液。将混合液在 40℃ 条件下搅拌 3h,得到沉淀,将沉淀过滤洗涤后密封于烧杯中 60℃ 条件下交融 24h。24h 后取出沉淀在 100℃ 条件下真空干燥 5h 后,得到 Cs-LDHs。

2.2 ASP-Cs-LDHs 微球的制备

取 0.0300g 上述制备出的 Cs-LDHs 和 0.3000g 阿司匹林、2.5000g 明胶,加入 10ml 蒸馏水在 $(50 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的水浴中充分搅拌形成 A 液,作为水相。在 100ml 液体石蜡中加入 2ml span-80,充分搅拌形成 B 液,作为油相。将搅拌完全的 A 液缓慢滴入 B 液中,剧烈搅拌 10min 形成 C 液。将 C 液放入 4℃ 的水浴中并滴加 1ml 戊二醛搅拌,固化 1h。之后抽滤并分别用石油醚、乙醚洗涤数次。抽滤完成后在 40℃ 条件下真空干燥。干燥完成后得到 ASP-Cs-LDHs 微球。

2.3 阿司匹林标准曲线的绘制

精密称取 ASP 标准品 0.0040g 放入 200ml 容量瓶中,并用 95% 乙醇稀释至刻度线并定容。配置好后,分别吸取 10、20、30、40、50ml 至 100ml 容量瓶中,用 95% 乙醇定容。这样就得到 2、4、6、8、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5 个梯度的 ASP 溶液。通过紫外分光光度计光谱扫描,得到其最大吸收波长约 250nm。通过测量他们的吸光度 A 得到标准曲线(图 1),ASP 在 2 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在良好的线性关系,回归方程为 $A = 0.0044c + 0.0457$, $R^2 = 0.9992$ 。

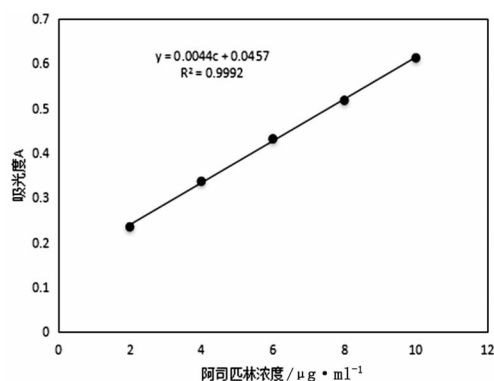


图 1 ASP 标准曲线图

2.4 ASP-Cs-LDHs 微球包封率、载药量的计算

精确称取 0.05g 载药微球置于烧瓶中,加入 50ml 95% 乙醇 37℃ 条件下搅拌 8h。过滤取 10ml 滤液于 100ml 容量瓶中,95% 乙醇定容。测吸光度,计算其包封率(公式 1)和载药量(公式 2):

$$\begin{aligned} \text{包封率} &= \text{微球中药物质量} / \text{投入的总药量} \quad (1) \\ \text{载药量} &= \text{微球中药物质量} / \text{称取的微球质量} \quad (2) \end{aligned}$$

2.5 ASP-Cs-LDHs 微球的表征

红外表征 采用压片机溴化钾压片,利用岛津 IRTracer-100 红外分光光度计进行表征,分辨率 0.5 ~ 1 cm^{-1} ,波数范围 7800 ~ 350 cm^{-1} 。

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)、以乙醇为分散介质将产物分散后分别进行电位和粒径的测量。

电光显微镜 以最佳制备条件下所得载药微球在电光显微镜下观察其形态。

紫外可见分光光度计:采用 UV-2450 双光束紫外可见分光光度计,测其吸光度。

2.6 ASP-Cs-LDHs 微球的体外释放实验

制备 pH = 1.2 的盐酸溶液(模拟胃液)和 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液(模拟肠液)。

称取 25mg ASP-Cs-LDHs 微球置于透析袋中,加入 5ml 预热的释放液分散盐酸缓释体系。密封后放入装有释放液的溶出杯中,每个溶出杯有释放液 400ml。模拟体内温度 37℃。分别于 30、60、90、120、150、180、240、300、360、420、480min 取样 5ml,取样后同时补充 5ml 释放介质。测其吸光度,计算其累计释放量(公式 3)

$$Er = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} \rho_i + V_0 C_n}{m_{drug} D} \times 100\% \quad (3)$$

Er 为阿司匹林的累计释放量,%; V_e 为释放介质置换体积,%; V_0 为起始释放液体积,ml; ρ_i 为第 i 次置换时,释放液中药物浓度, $g \cdot ml^{-1}$; n 为置换释放介质的次数; m_{drug} 为起始微球的质量, g ; D 为 ASP-Cs-LDHs 微球的载药量, %。

3 结果与讨论

3.1 影响阿司匹林包封率和载药量的因素

影响因素有阿司匹林含量、Cs-LDHs 用量、戊二醛用量、明胶用量等,考察制备条件对载药微球结构和载药量的影响,探索载药微球制备最佳条件。

3.1.1 阿司匹林含量的影响 固定 Cs-LDHs 用量为 0.030g,明胶用量为 2.50g,戊二醛用量为 1ml,改变阿司匹林的用量制备微球,并对其载药量和包封率进行测定,绘制阿司匹林含量对微球载药量与包封率的影响曲线。见图 2。

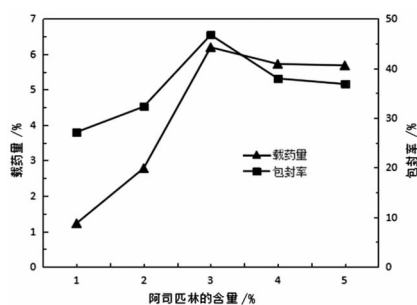


图 2 阿司匹林用量对微球包封率与载药量影响曲线

由图 2 可以看出投入阿司匹林的百分比不同对微球的包封率和载药量有很大影响,还可以看出包封率和载药量随着药量所占百分比的增大而增大,但当药量在 3% 时到达最大值,之后曲线下降。说明 3% 的阿司匹林是制备微球最大的饱和药量。阿司匹林与高分子载体和物质之间达到最大结合

程度,所以选择 3% 阿司匹林作为制备微球的最佳投入药量。

3.1.2 Cs-LDHs 投入量的影响 固定阿司匹林用量为 3%,明胶用量为 2.50g,戊二醛用量为 1ml,改变 Cs-LDHs 的用量制备微球,并对其载药量和包封率进行测定,绘制 Cs-LDHs 投入量对微球载药量与包封率的影响曲线。见图 3。

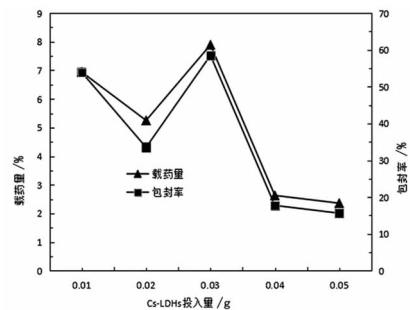


图 3 Cs-LDHs 不同投入量对微球包封率和载药量影响曲线

由图 3 得出随着 Cs-LDHs 投入量的增多,微球包封率和载药量均呈上升趋势,但在投入量为 0.03g 时达到最大值。之后曲线呈下降趋势。故当 Cs-LDHs 投入量为 0.03g 是制备微球的最佳投入量。

3.1.3 阿司匹林/明胶投入比的影响 固定阿司匹林用量为 3%,Cs-LDHs 用量为 0.030g,戊二醛用量为 1ml,改变阿司匹林/明胶比例制备微球,并对其载药量和包封率进行测定,绘制阿司匹林/明胶比例对微球载药量与包封率的影响曲线。见图 4。

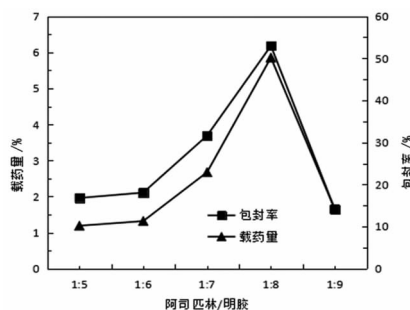


图 4 阿司匹林/明胶对微球包封率和载药量的影响曲线

由图 4 得出阿司匹林与明胶的投入比对微球包封率和载药量有很大影响,尤其是对包封率影响非常明显。由此得出在阿司匹林与明胶比例 1:8 的时候微球的包封率与载药量达到最高,说明此比例是药物与高分子物质的最佳比例。综合考虑选择 1:8 的阿司匹林/明胶来制备微球。

3.1.4 戊二醛用量的影响 固定阿司匹林用量为 3%, Cs-LDHs 用量为 0.030g, 胶用量为 2.50g, 改变戊二醛用量制备微球, 并对其载药量和包封率进行测定, 绘制戊二醛用量对微球载药量与包封率的影响曲线。见图 5。

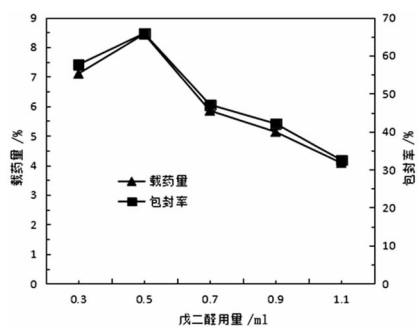


图 5 戊二醛用量对微球包封率和载药量的影响曲线

由图 5 得出戊二醛的用量对微球包封率和载药量是有影响的, 得出随着固化剂戊二醛用量的增加包封率和载药量是减少的, 所以戊二醛最合适的用量应是 0.5ml。

3.2 ASP-Cs-LDHs 微球的表征

3.2.1 微球的显微图 采用最优制备工艺制得的载药微球, 利用生物显微镜(日本尼康)观察其形态。见图 6。

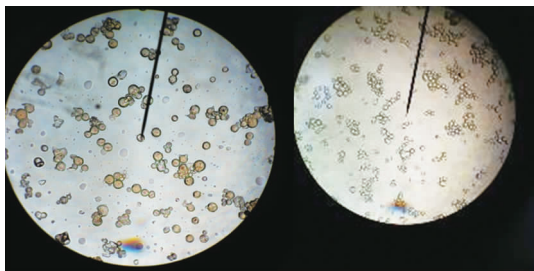


图 6 微球显微图片

由图 6 得出微球的成球性很好, 大小均匀。

3.2.2 微球的粒度分布 采用最优制备工艺制得的载药微球, 利用马尔文激光粒度仪测定其平均粒径。见图 7。

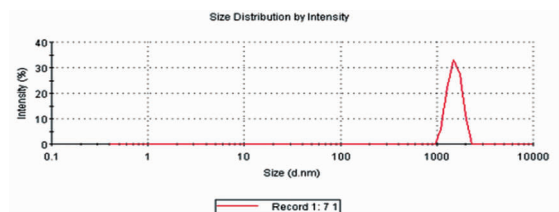
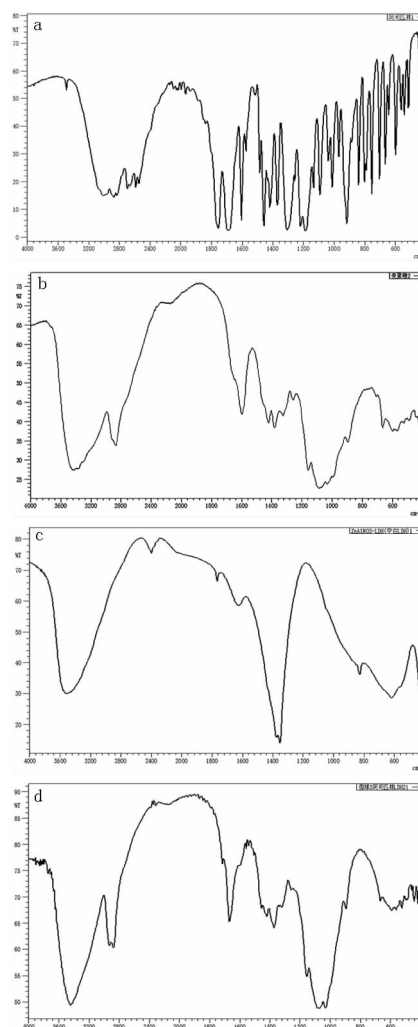


图 7 微球粒径分布

微球的平均粒径: 2793nm, PDI 多分散系数 0.436, 粒径合乎要求。

3.2.3 红外表征 图 8 为阿司匹林, Cs, LDHs 和载药微球的红外光谱图。阿司匹林(8a)的在 3300~2500cm 处的特征吸收峰为-COOH 特征宽吸收峰, 在 1740cm 处的特征吸收峰为苯环酯羰基 C=O 的伸缩振动峰, 在 1189cm 为 C-O-C 吸收峰, 在 1610、1574、14581cm 处的特征吸收峰为苯环的振动峰。壳聚糖(图 8b)在 3420cm 处是-OH 的伸缩振动, 而在 1599 cm 处为 NH₂ 的伸缩振动吸收峰。LDHs(图 8c)在 3500cm 左右处的吸收峰是层间水的伸缩振动谱带, 1369cm 为碳酸根离子的伸缩振动, 1621cm 为层间水分子中 O-H 的变形振动。载药微球(图 8d)中不仅含有 1369cm 为碳酸根离子的伸缩振动, 还含 1740cm 处的苯环酯羰基的伸缩振动峰有壳聚糖的特征峰, 而且有些基团吸收峰发生迁移。这是由于壳聚糖上的羟基和氨基, 与 LDHs 片层上的-OH 化学键合作用的缘故。



a: 阿司匹林; b: 壳聚糖; c: LDHs; d: 载药微球

图 8 红外红外光谱图

3.3 阿司匹林磁性微球的体外释放研究

由图9得出,在模拟胃液中,阿司匹林原料药在起初30min 就释放了约30%,在240min 几乎释放完全;而微球在240min 的累计释放度仅为20%左右,在420min 时累计释放度释放为24.37%,之后几乎保持恒定,最大的累计释放量为25.93%。由图10可知,在模拟肠液中,阿司匹林原料药在起初30min 释放为37%左右,在150min 中左右释放稳定;微球起初的1h 内释放比较缓慢,到150min 左右释放加快,在360min 释放稳定,最大累计释放量为58.03%。由图11可知,微球在模拟肠液中的累计释放度明显大于在模拟胃液中的累计释放度。

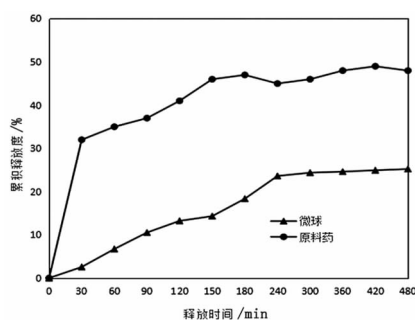


图9 微球在模拟胃液中的释放曲线
(pH=1.2 的盐酸溶液)

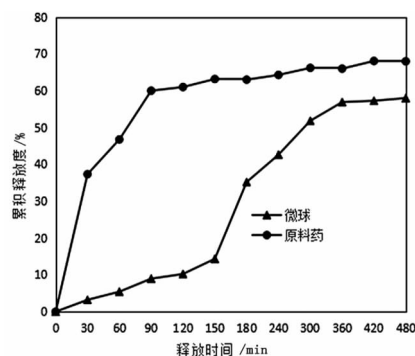


图10 微球在模拟肠液中的释放曲线
(pH=7.4 磷酸盐缓冲液)

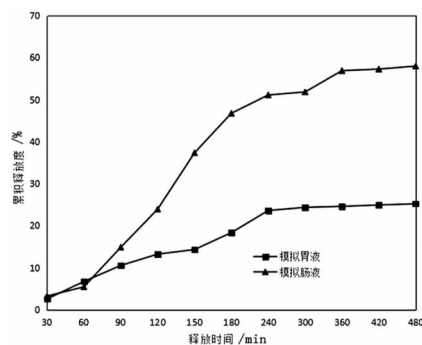


图11 微球在模拟肠液和模拟胃液中的释放曲线

4 结论

以 Cs 和 Cs-LDHs 为复合载体,通过优化合成条件,制备新型药物缓释微球 Cs-LDHs-阿司匹林;在阿司匹林用量为 3%、0.03g Cs-LDHs 用量为 0.03g、阿司匹林/明胶为 1:8,0.5ml 戊二醛用量为 0.5ml 的条件下,所制得成球性好、粒径分布均匀,其平均粒径为 2793nm;体外释放试验研究缓释微球微球的释放对 pH 值有一定的敏感性,在模拟肠液中缓释性更强。

参考文献:

- [1] 张培培,唐忠锋. 药物阿司匹林剂型的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2009,26(7): 542-545.
- [2] 陈有梅,刘博,周安宁,等. 盐酸西替利嗪/蒙脱土纳米复合物的制备及其结构与性能[J]. 复合材料学报,2010,27(1): 43-50.
- [3] Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications[J]. Prog. Polym. Sci. 2006. 31(7): 603-632. DOI: 10.1016/j.progpolymsci. 2006. 06. 001.
- [4] Wang SF, Shen L, Tong YJ, et al. Biopolymer chitosan/montmorillonite nanocomposites: preparation and characterization[J]. Polym Degrad Stab, 2005, 90(1): 123-131. DOI:10.1016/j.polymdegradstab. 2005. 03. 001.
- [5] Mao C, Qiu Y, Sang H, et al. Various approaches to modify biomaterial surfaces for improving hemocompatibility[J]. Adv Colloid Interface Sci, 2004, 110(1-2): 5-17. DOI:10.1016/j.cis. 2004. 02. 001.
- [6] Guo L, Liu G, Hong RY, et al. Preparation and characterization of chitosan poly(acrylic acid) magnetic microspheres[J]. Mar Drugs, 2010, 8(7): 2212-2222. DOI: 10.3390/md8072212.
- [7] 顾梦洁,王欢,胡新,等. 明胶微球制备方法的改进[J]. 实验室研究与探索,2015,34(4): 57-60.
- [8] 全先高,王军,刘景,等. 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[J]. 济宁医学院学报,2016,39(4): 237-240,244.
- [9] Zheng JP, Luan L, Wang HY, et al. Study on ibuprofen/montmorillonite intercalation composites as drug release system[J]. Applied Clay Science, 2007, 36(4): 297-301. DOI:10.1016/j.clay. 2007. 01. 012.
- [10] Sun Y, Gu L, Gao Y, et al. Preparation and characterization of 5-Fluorouracil loaded chitosan microspheres by a two-step solidification method[J]. Chem Pharm Bull, 2010, 58(7): 891-895. DOI:10.1248/cpb. 58. 891.

(下转第 68 页)

- [7] Chung HW, Lee SG, Kim H, et al. Serum high mobility group box-1 (HMGB1) is closely associated with the clinical and pathologic features of gastric cancer[J]. J Transl Med, 2009, 7: 38. DOI: 10. 1186/1479-5876-7-38.
- [8] Bao G, Qiao Q, Zhao H, et al. Prognostic value of HMGB1 overexpression in resectable gastric adenocarcinomas[J]. World J Surg Oncol, 2010, 8: 52. DOI: 10. 1186/1477-7819-8-52.
- [9] Yu SH, Spring TG. The interaction of nonhistone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 with subfractions of H1 histone immobilized on agarose[J]. Biochim Biophys Acta, 1977, 492(1): 20-28. DOI: 10. 1016/0005-2795(77)90210-0.
- [10] Bustin M, Lehn DA, Landsman D. Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes[J]. Biochim Biophys Acta, 1990, 1049(3): 231-243. DOI: 10. 1016/0167-4781(90)90092-g.
- [11] Riuzzi F, Sorci G, Donato R. The amphotericin (HMGB1)/receptor for advanced glycation end products (RAGE) pair modulates myoblast proliferation, apoptosis, adhesiveness, migration, and invasiveness. Functional inactivation of RAGE in L6 myoblasts results in tumor formation in vivo[J]. J Biol Chem, 2006, 281(12): 8242-8253. DOI: 10. 1074/jbc.M509436200.
- [12] Zhang Z, Wang M, Zhou L, et al. Increased HMGB1 and cleaved caspase-3 stimulate the proliferation of tumor cells and are correlated with the poor prognosis in colorectal cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34: 51. DOI: 10. 1186/s13046-015-0166-1.
- [13] van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1) [J]. Angiogenesis, 2008, 11(1): 91-99. DOI: 10. 1007/s10456-008-9093-5.

(收稿日期 2017-10-09)

(本文编辑:甘慧敏)

(上接第 63 页)

- [11] Huang L, Sui W, Wang Y, et al. Preparation of chitosan/chondroitin sulfate complex microcapsules and application in controlled release of 5-fluorouracil[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(1): 168-173. DOI: 10. 1016/j. carbpol. 2009. 11. 007.
- [12] Xu Z, Zhang J, Cong L, et al. Preparation and characterization of magnetic chitosan microsphere sorbent for separation and determination of environmental estrogens through SPE coupled with HPLC[J]. J Sep Sci, 2011, 34(1): 46-52. DOI: 10. 1002/jssc. 201000640.
- [13] 俞怡晨, 姚炎庆, 张亚琼, 等. 壳聚糖-海藻酸盐纳米粒子的制备及其对 BSA 的载药与释放特性[J]. 功能高分子学报, 2005(4): 598-601.
- [14] 全先高, 王慧云, 丁林, 等. 甲氧蝶呤/蒙脱土纳米插层化合物的制备及缓释作用研究[J]. 济宁医学院学报, 2014, 37(4): 251-255, 259.

(收稿日期 2017-09-15)

(本文编辑:石俊强)

· 简讯 ·

《济宁医学院学报》影响因子创历史新高

据 2017 年版中国科技期刊引证报告(CJCR)统计:《济宁医学院学报》全年载文总被引频次 591, 影响因子达到 0.577, 创历史新高。

本刊编辑部