

银杏内酯 B mPEG-PLA 聚合物胶束的制备和体外性质

宋力^{1*}, 何盛江², 张现涛²

(¹中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009; ²广东省中药研究所, 广州 510520)

摘要 以聚乙二醇单甲醚-聚丙交酯嵌段共聚物(mPEG-PLA)(50/50)作为载体, 制备银杏内酯 B(GB)聚合物胶束(GB-mPEG-PLA)。采用乳化-溶剂挥发制备 GB-mPEG-PLA 溶液, 再冷冻干燥保存, 并对制得的 GB-mPEG-PLA 的载药量、包封率、粒径与分布和胶束形态等进行表征, 采用透析法考察 GB-mPEG-PLA 的体外释放。所制得的 GB-mPEG-PLA 载药量为 7.5%, 包封率为 82.2%, 平均粒径为 74.5 nm; 扫描电镜显示胶束为类球形; GB-mPEG-PLA 释放曲线显示其具有一定的缓释作用。研究表明, mPEG-PLA 胶束是一种极具应用前景的纳米给药系统。

关键词 银杏内酯 B; 聚乙二醇单甲醚-聚丙交酯嵌段共聚物; 胶束; 缓释

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)06-0681-03

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140611

Preparation and *in vitro* characterization of ginkgolide B-loaded mPEG-PLA polymeric micelles

SONG Li^{1*}, HE Shengjiang², ZHANG Xiantao²

¹Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;

²Guangdong Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510520, China

Abstract Ginkgolide B-loaded mPEG-PLA polymeric micelles (GB-mPEG-PLA) was prepared by emulsification-solvent diffusion method. The drug loading, encapsulation efficiency, average particle size and size distribution of GB-mPEG-PLA were evaluated. Moreover, the *in vitro* release characteristics of GB-mPEG-PLA were investigated by dialysis. The average particle size of GB-mPEG-PLA was 74.5 nm, the drug loading and encapsulation efficiency were 7.5% and 82.2%, respectively. SEM image showed GB-mPEG-PLA was spherical in shape. In addition, the release profile of ginkgolide B from GB-mPEG-PLA exhibited an extended-release pattern. Therefore, GB-mPEG-PLA can be a promising nano-sized drug delivery system in the future.

Key words ginkgolide B; mPEG-PLA; micelle; sustained-release

This study was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JKQ2011020); the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. S2011010001294); Guangzhou Science and Technology Funds (No. 2012J4300092) and the Pearl-River Novel Program of Guangzhou (No. 2011J2200012)

银杏内酯 B(ginkgolide B, GB)是银杏叶内酯类中活性最强、特异性最高的成分, 是研究人员关注最多的活性成分之一。GB 在水中的溶解度低(仅 80 $\mu\text{g/mL}$), 制成注射液较困难, 口服相对生物利用度仅为注射的 20%, 为解决难溶性药物的制剂问题, 课题组选用生物可降解性和生物相容性良好、具有

高通透性的新型药物载体——聚乙二醇单甲醚-聚丙交酯嵌段共聚物(mPEG-PLA)为载体, 制备了载药聚合物胶束, 可提高药物的溶解度, 又避免网状内皮系统的吞噬, 减慢药物降解失活速度^[1-2], 以 GB 为模型药物, 采用乳化溶剂挥发法制备载药聚合物胶束, 并对其制备工艺进行优化, 并对其性质进行了

* 收稿日期 2014-06-16 * 通信作者 Tel:13813811786 E-mail:songli1973@163.com

基金项目 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(No. JKQ2011020); 广东省自然科学基金资助项目(No. S2011010001294); 广州市科技计划基金资助项目(No. 2012J4300092); 广州市珠江科技新星专项基金资助项目(No. 2011J2200012)

表征。

1 材料

1.1 药品与试剂

mPEG-PLA 嵌段聚合物(50/50)(实验室合成);透析袋 MD34(截留相对分子质量 8 000 ~ 14 000,北京盛科博源生物科技有限公司);其他试剂为分析纯或色谱纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 仪器

R-210 型旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司);LGJ-18S 冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司);激光粒度仪 Mastersizer 2000(英国马尔文仪器有限公司);Agilent1100 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);AY120 电子天平[岛津(中国)有限公司]。

2 方法与结果

2.1 聚合物胶束的制备

2.1.1 mPEG-PLA 载 GB 聚合物胶束的制备 采用乳化溶剂挥发法^[3]制备 mPEG-PLA 聚合物胶束,精密称取 mPEG-PLA 聚合物 200 mg 溶于纯化水 10 mL 中,磁力搅拌条件下缓慢加入一定浓度的 GB 无水乙醇溶液适量,继续搅拌至乙醇挥发完全(约 4 h),用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,收集滤液冷冻干燥 24 h,得白色饼状疏松的冻干粉,即为含药胶束。

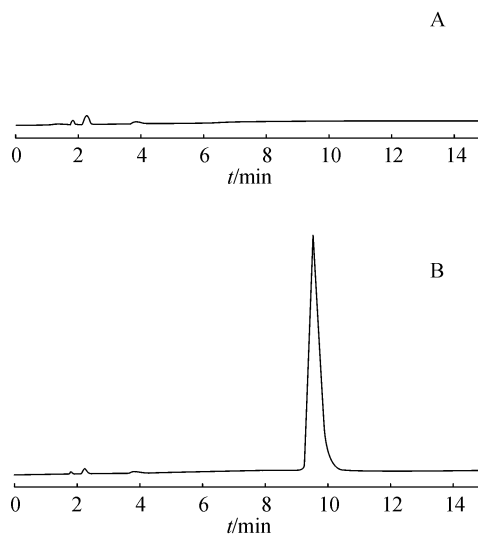
2.1.2 空白 mPEG-PLA 聚合物胶束的制备 精密称取 mPEG-PLA 聚合物 200 mg,溶解于纯化水 10 mL 中,搅拌约 4 h,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,收集滤液冷冻干燥 24 h,得白色饼状疏松的冻干粉,即为空白胶束。

2.2 含量测定方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱:Eclipse SB-C₁₈柱(4.6 mm $\times$ 150 mm,5 μm);流动相:甲醇-四氢呋喃-水(25:10:65);流速:1.0 mL/min;检测波长:225 nm;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;进样体积:10 μL 。

结果显示,GB 在 9.6 min 处出峰,峰形良好,无杂质干扰,理论塔板数和分离度均符合测定要求。专属性实验表明,mPEG-PLA 不干扰 GB 的测定,如图 1 所示。

2.2.2 标准曲线的建立 精密称定 GB 对照品约 500 mg 置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,作为储备液。分别精密量取储备液 0.1,0.5,



A: Control; B: GB

Figure 1 HPLC diagram of ginkgolide B(GB)

0.1,1.5,2.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,配制成系列溶液,质量浓度分别为 0.1,0.5,1.0,1.5,2.0 mg/mL。精密移取上述系列浓度溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图。用质量浓度(c)对峰面积(A)进行线性回归,得回归方程为 $A = 510\,410c + 877$, $r = 0.999\,9$,表明本品进样质量浓度在 0.1 ~ 2.0 mg/mL 范围内呈良好线性。

2.2.3 精密度测定 取上述质量浓度 1.0 mg/mL 溶液,连续进样 6 次,记录峰面积并计算相对标准偏差。结果 RSD 0.2%,符合含量测定要求。

2.2.4 加样回收率 分别精密称取 GB 对照品 5,10,15 mg,各 3 份,置于 10 mL 量瓶中,分别加入 mPEG-PLA 储备液(20 mg/mL)1 mL,用甲醇稀释至刻度,配制成低、中、高浓度系列溶液。按“2.2.1”项下条件测定,记录峰面积,计算回收率。3 个浓度的平均加样回收率为 99.8%。

2.2.5 样品稳定性 另制备 1.0 mg/mL 质量浓度的样品溶液,测定其在 1,2,4,8,12,24 h 的峰面积,计算其 RSD 为 0.41%,证明 GB 样品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.6 载药量和包封率的测定 精密移取胶束制备项下过滤前胶束溶液 1 mL 于超滤管中,10 000 r/min 离心 10 min,收集超滤液,按项下含量测定方法测定滤液中 GB 含量,计算游离 GB 量。计算载药量和包封率。

2.3 制备工艺优化

2.3.1 水相和油相体积比 考察水相与油相体积

比例对纳米胶束粒径、载药量、包封率的影响,如表1所示。

Table 1 Size, entrapment efficiency and drug loading of different W/O ratio micelle formulations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Formulation	W/O ratio	Size/nm	Entrapment efficiency/%	Drug loading/%
1	1:1	Precipitation	/	/
2	2:1	67.8 ± 2	60.6 ± 1.6	5.5 ± 2.7
3	5:2	74.5 ± 4	82.2 ± 5.6	7.5 ± 2.3

由表1可知,随着水相体积的增多,包封率、载药量、粒径均增加。考虑到处方3的包封率、载药量较高,且粒径在100 nm内,故采取水油相体积比为5:2。

2.3.2 GB溶液浓度 按表2考察GB溶液浓度即GB加入量对胶束粒径、载药量、包封率的影响。

Table 2 Size, entrapment efficiency and drug loading of different conc. of GB of micelle formations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Formulation	$c_{GB}/$ (mg/mL)	Size/nm	Entrapment efficiency/%	Drug loading/%
4	12.5	Precipitate	77.4 ± 2.8	8.6 ± 2.7
5	10	74.5 ± 4	82.2 ± 5.6	7.5 ± 2.3
6	7.5	90.2 ± 3	85.6 ± 4.2	6.0 ± 3.9

由表2可知,GB的加入量减少,载药量相对减低,包封率增大,粒径相对增大。综合考虑聚合物载药能力及避免GB的浪费,选择GB加入量为20 mg,质量浓度为10 mg/mL。

综上,选择水油相体积比5:2,GB加入量为20 mg,质量浓度为10 mg/mL,制备GB-mPEG-PLA聚合物胶束。

2.4 处方优化

2.4.1 粒径与电位 优化后的GB-mPEG-PLA溶液和GB-mPEG-PLA冻干粉复溶溶液,测定胶束粒径及分布。GB-mPEG-PLA溶液平均粒径为74.5 nm,多分散系数为0.177。GB-mPEG-PLA冻干粉复溶后平均粒径为110.3 nm,多分散系数为0.061。由上述结果可看出,冷冻干燥并没有破坏GB-mPEG-PLA的胶束结构,且粒径较冻干前稍大。最优处方制得的GB-mPEG-PLA载药胶束的平均粒径为74.5 nm,Zeta电位-15.1 mV。SEM电镜图显示胶束为类球形,粒径在50 nm左右,激光测定结果较低的原因是由于SEM电镜测定粒径过程中胶束脱水^[4]。

2.4.2 体外释放 将纳米胶束266 mg溶于PBS

溶液1 mL中,然后装入透析袋置于20 mL的PBS(pH 7.4)溶液中,分别在37℃条件下进行透析,在1,2,4,8,10,24 h精确取出透析液1 mL,同时补入相同体积的新鲜透析液,按“2.2.1”项下色谱条件测定GB浓度并计算累积释放百分率,以累积释药百分率(Q)对时间(t)作图,绘制GB-mPEG-PLA体外累积释药曲线(图2)。

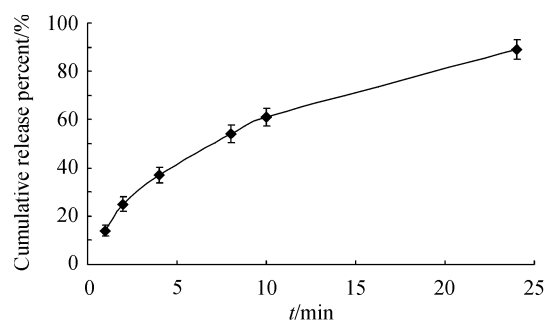


Figure 2 *In vivo* release profile of GB micelles ($\bar{x} \pm s, n=6$)

GB-mPEG-PLA在体外释放中突释现象不明显,说明吸附在载体材料表面上的药物相对较少,且24 h累积释放量达90%。

3 讨论

本研究采用两亲嵌段共聚物mPEG-PLA(50/50)制备得到GB-mPEG-PLA冻干粉,胶束包封率高,复溶后粒径约为110 nm,且呈较窄分布,胶束溶液pH在注射剂pH允许范围内。体外释放实验表明,胶束溶液具有一定缓释作用,提示银杏内酯B胶束是一个符合静脉注射并且具有临床应用价值的制剂。

参考文献

- [1] Mao SR, Tian Y, Wang LL. Research progress on drug nanocontainer-polymeric micelles[J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2010, 27(12): 979-986.
- [2] Cannavà C, Crupi V, Ficarra P, et al. Physico-chemical characterization of an amphiphilic cyclodextrin/genistein complex[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(5): 1064-1068.
- [3] Li Y, Qi XR. Preparation and *in vitro* characterization of ATRA loaded mPEG-PLA diblock copolymeric micelles[J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2008, 17(3): 219-224, 227.
- [4] Gaucher G, Dufresne MH, Sant VP, et al. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery[J]. *J Control Release*, 2005, 109(1/2/3): 169-188.