文章编号:1000-5404(2009)14-1349-04

论著

10-羟基喜树碱乳酸-羟基乙酸共聚物超声微泡制备及工艺优化

吴 青,朱照静 (重庆医科大学药学院药剂学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨超声微泡的制备条件对粒径、包封率、表面形态等的影响,确定制备超声微泡的最佳工艺条件。**方法** 以W/O/W型乳化溶剂挥发法制备微球,采用单因素实验和正交设计实验优化制备工艺。**结果** 制备超声微泡的最佳条件是10-羟基喜树碱(10-hydroxy-camptothecin, HCPT) 25 mg,乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 1.875 g,初乳和外水相体积比为1∶15,聚乙烯醇(PVA)浓度3%;此条件所制备超声微泡呈规则球形,表面光滑,电荷以-40~0 mV为主,粒径为500~1 000 nm,包封率为79.33%,载药量为0.478 3%,体外超声成像清楚。**结论** 优化制备条件,可制备出符合注射要求的超声微泡。

关键词: 10-羟基喜树碱;乳酸-羟基乙酸共聚物;超声微泡;制备;优化
中图法分类号: R943;R944.9;R979.1 **文献标识码:** A

Preparation and process optimization of HCPT-loaded PLGA microvesicles by ultrasound

WU Qing, ZHU Zhao-jing (Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of different technical conditions on the microvesicle size, envelopment rate, morphology of surface and so on in order to select the best technical conditions to prepare HCPT(10-hydroxy-camptothecin)-loaded PLGA microvesicles. Methods Microvesicles were prepared by a water/oil/water emulsion and solvent evaporation method. Various factors related to the envelopment rate and micmparticle size were studied, such as the ratio of water phase and oil phase, ultrasound power, and time, stirring time and so on. Single factor experiments and orthogonal design testing was carried out to optimize the technology of microvesicles preparation. Results The best processing conditions for microvesicles preparation were as following: HCPT 25 mg, PLGA 1.875 g, the ratio of internal and external phases 1∶15, and the PVA concentration 3%. These preparative variables produced global, smooth and glossy microvesicles. Electric charges were probably between -40 to 0 mV, microvesicles sizes ranged from 500 to 1 000 nm, envelopment rate was 79.33%, drug loading to the microvesicles was 0.478 3%, and ultrasonic imaging was clear *in vitro*. Conclusion Our optimize technical conditions can prepare injectable microvesicles by ultrasound.

Key words: camptothecin; poly(lactic-co-glycolic acid); microvesicles; preparation; optimization

随着超声影像技术的不断发展和超声微泡制备技术的不断改进,具有可视、无创、靶向性[1]的超声微泡在对组织、血栓及肿瘤的诊断与治疗中发挥了重要作用。10-羟基喜树碱(10-hydroxy-camptothecin, HCPT)来自喜树(camptotheca acuminata)的皮、果实,是目前唯一用于临床的DNA拓扑异构酶I(TOPO-I)抑制剂[2],其抗肿瘤活性强,抗瘤谱广,毒性较低,且与其他常用抗肿瘤药无交叉耐药性,广泛应用于肝癌、胃癌、头颈部癌症及白血病等多种恶性肿瘤的治疗。虽然HCPT是较有发展前景的抗癌药物,但其特殊的理化性质使得临床应用受到限制[3,4]。国内外学者利用微球[5]、脂质体[6-8]等作为其传递系统以提高治疗效率,但仍存在靶向性不够和受患部位药物的血药浓度低等问

作者简介:吴 青,女,浙江省瑞安县人,硕士研究生,主要从事药物制剂方面的研究。电话:(023)66981133,E-mail:wuqing1133@126.com

收稿日期:2008-10-16;修回日期:2008-11-21

题。我们研究了一种新型的载 HCPT 的乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid),PLGA]超声微泡来弥补这类问题。

1 材料与方法

1.1 仪器

VCX750 型超声波破碎仪(SONICS 公司),SHZ-88 型磁力搅拌器(巩义市英峪华仪器厂),800 型离心机(上海手术器械厂),UV-3150 型紫外可见分光光度计(SHIMADZU 公司),Elix 纯化水机(MILLIPORE 公司),LGJ-25 型冻干机(北京松源华兴科技发展有限公司),CX31 型光学显微镜(OLYMPUS 公司),Leica 光学显微系统(莱卡仪器有限公司),S3000N 型扫描电子显微镜(HITACHI 公司),Zetasizer nano 粒度仪(马尔文公司),Zeta 电位检测仪(马尔文公司)。

1.2 药品与试剂

PLGA(LA:GA=50:50,山东省医疗器械研究有限公司,批号:020521B),HCPT(绵阳高新区东方源生物科技有限公司),聚乙烯醇(PVA,Sigma 公司),二氯甲烷(成都市科龙化工试剂厂),超纯水。

1.3 方法

1.3.1 超声微泡制备 采用溶剂挥发化法制备 HCPT PLGA 超声微泡。称取 PLGA 1.875 g,HCPT 17.5 mg,加入盛有 5 ml 二氯甲烷的具塞试管中,振摇溶解(油相,O),加超纯水 0.5 ml(内水相,W_1),冰浴下超声振荡 60 s,功率 100 W(初乳,W_1/O),倒入 25 ml 2% PVA 溶液中(外水相,W_2),冰浴下超声振荡 60 s,功率 100 W(复乳,$W_1/O/W_2$),搅拌 3 h。离心,弃上清液。加适量超纯水,旋涡混合仪混合、洗涤、离心,重复 3 次。收集微泡,超纯水洗涤、离心,反复 3 次。用适量超纯水分散、冻干。

1.3.2 单因素考察 以 1.3.1 制备方法为基础,采用单因素考察法对内水相与油相体积比(W_1:O)、超声功率(U_{P1}、U_{P2})、超声时间(U_{T1}、U_{T2})、搅拌速度(V)这几个对超声微泡粒径影响较大的因素进行考察,以筛选制备粒径合格微泡的工艺。各因素水平见表 1。实验中考察主要因素时其余因素全部选择水平 2。实验结果用光学显微镜进行观察。

表 1 单因素考察实验方案

水平	W_1:O	U_{P1}(W)	U_{T1}(s)	U_{P2}(W)	U_{T2}(s)	V
1	1:5	50	30	50	30	低
2	1:10	100	60	100	60	中
3	1:20	200	90	200	90	高

1.3.3 含量测定方法学建立

1.3.3.1 储备液的配制 精密称取 PLGA 16.6 mg、PVA 30.2 mg 置于 100 ml 容量瓶中,0.4% 氢氧化钠定容,超声 5 min 振摇混合,静置 10 min,水层用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,配制成储备液Ⅰ。精密称取 HCPT 原料药约 15.7 mg,置100 ml 容量瓶中,0.4% 氢氧化钠溶解、混匀、定容。精密量取 5 ml,置 100 ml 容量瓶中,0.4% 氢氧化钠定容,配制成 7.85 μg/ml 储备液Ⅱ。

1.3.3.2 含量测定方法 取载药微泡冻干粉 19.8 mg,置具塞试管中,加 5 ml CH_2Cl_2 超声溶解,加入 5 ml 0.4% 氢氧化钠,振摇混合,静置 10 min,萃取;加入 3 ml 0.4% 氢氧化钠,振摇混合,静置 10 min,萃取;加入 2 ml 0.4% 氢氧化钠,振摇混合,静置 10 min,萃取;合并 3 次萃取液,以 0.4% 氢氧化钠为空白,于 414 nm 处测定吸收值。

1.3.3.3 标准曲线的绘制 精密称定 HCPT 24.5 mg 置 250 ml 容量瓶中,0.4% 氢氧化钠定容摇匀,即得 98 μg/ml HCPT 溶液。精密量取 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 ml,置于 50 ml 容量瓶中,0.4% 氢氧化钠定容、摇匀,即得 5.88、6.86、7.84、8.82、9.80、10.78、11.76 μg/ml 系列标准溶液。在 414 nm 处测定吸收值,绘制标准曲线,建立回归方程[9]。

1.3.3.4 回收率实验 精密称取处方量约 80%、100%、120% 的 HCPT 标准品,加入辅料配制成溶液测定,按 414 nm 处测定的吸收值计算。

1.3.3.5 精密度实验 取“1.3.3.3”中 5.88、8.82、11.76 μg/ml 的低、中、高 3 个浓度的 HCPT 溶液,每 2 小时测定 1 次吸收值,连续测 5 次,每天同一时间测定 1 次吸收值,连续 5 d。

1.3.3.6 稳定性实验 取“1.3.3.3”中 8.82 μg/ml 的 HCPT 溶液,分别于 1、2、4、8、12、24 h 测定吸收值。

1.3.4 工艺筛选 在单因素考察确定制备工艺的基础上,选择 A(HCPT 质量)、B(PLGA 质量)、C[初乳和外水相体积比(W_1/O:W_2)]、D(PVA 浓度)这 4 个主要影响包封率的因素进行考察[10]。采用四因素三水平的正交实验设计方案进行处方筛选,各因素水平见表 2。采用紫外分光光度法测定药物的吸收值,通过建立的回归方程计算得到药物含量,按照以下公式计算微泡载药量与包封率。

$$包封率(\%)=\frac{微泡中药物含量}{投药量}\times 100\%$$

$$载药量(\%)=\frac{微泡中药物含量}{微泡质量}\times 100\%$$

表 2 正交设计实验方案

水平	A	B	C	D
1	10.0 mg	1.250 g	1:5	2%
2	17.5 mg	1.875 g	1:10	3%
3	25.0 mg	2.500 g	1:15	4%

1.3.5 超声微泡研究 取少量冻干粉用超纯水稀释,所得的混悬液用光学显微系统(×400)和透射电镜观察超声微泡的形态。用 Zetasizer nano 粒度仪、Zeta 电位检测仪检测超声微泡的电荷、粒径分布情况。

1.3.6 体外超声成像 称取超声微泡冻干粉约 100 mg,加

250 ml PBS 分散,装入不透水的 PVC 保鲜袋中做成水囊,将超声诊断仪的探头贴紧水囊,开启仪器,调节频率(1.75 MHz/3.5 MHz)和机械指数(MI=0.6)。

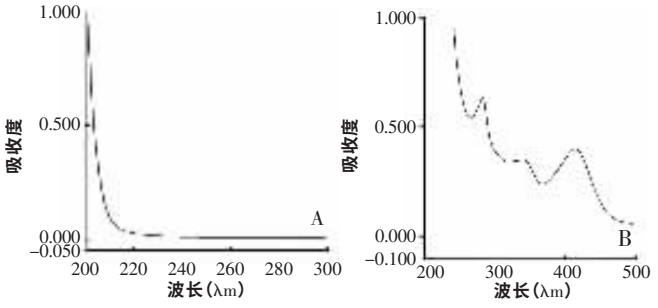
2　结果

2.1　单因素考察

根据实验结果选择 W_1:O 为1:10,制备初乳的超声功率为 200 W,时间 90 s;制备复乳的超声功率为 100 W,时间 60 s。搅拌速度为中速,可制备出粒径小于 7 μm,符合实验要求的微泡。

2.2　吸收波长的确定

分别取储备液Ⅰ和Ⅱ在一定波长范围内进行紫外扫描。PLGA-PVA 均无吸收峰,对实验测定无干扰(图 1A);HCPT 溶液有 3 处吸收峰(图 1B)。依照国标,选择 414 nm 作为含量测定的紫外检测波长。



A:储备液Ⅰ;B:储备液Ⅱ

图 1　储备液紫外吸收波长的测定

2.3　标准曲线结果

不同浓度的 HCPT 溶液的(x)在 414 nm 处的紫外吸收值(y),经回归计算得到标准曲线方程:y=0.073 7x−0.157 3(r=0.999 4),范围在 5.88~11.76 μg/ml,呈良好的线性关系。

2.4　回收率实验结果

高、中、低 3 个浓度的回收率分别为 99.0%、99.6%、99.9%,平均为 99.6%。RSD 为 0.33%。

2.5　精密度实验结果

日间和日内的 RSD 均小于 2%,说明该方法的日间和日内精密度均满足方法要求。

2.6　稳定性实验结果

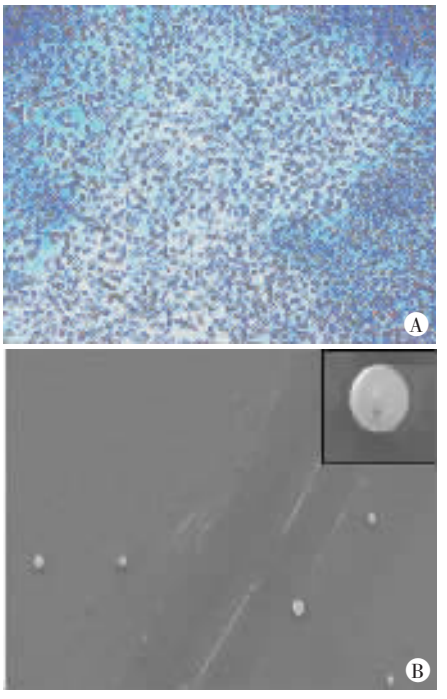
样品溶液分别于 1、2、4、8、12、24 h 测定吸收值,RSD 为 0.25%,说明样品溶液在 24 h 稳定。

2.7　工艺筛选结果

处方筛选的正交设计实验结果通过极差分析,得到 A>B>C>D,即说明因素 A 对结果造成的影响最大,其次是因素 B 和因素 C,而因素 D 对结果造成的影响最小。根据统计分析得出的最佳处方为 $A_3B_2C_3D_2$。方差分析得出,因素 A、B、C 对结果的影响具有统计学意义(P<0.05)。按照筛选出的最佳处方制备 3 批载药微泡,测得其包封率为 79.93%,平均载药量为 0.478 3%,粒径<7 μm。

2.8　超声微泡形态

在光学显微镜和透射电镜下观察,超声微泡呈圆球形,表面光滑,分散状态良好(图 2)。



A:光学显微镜观察(×1 500);B:透射电镜观察(×4 000)

图 2　超声微泡形态学观察

2.9　超声微泡电荷粒径

用 Zetasizer nano 粒度仪检测出超声微泡的粒径相对分布比较集中,分布在 500~1 000 nm,电荷在 −40~0 mV,这对其稳定性有一定的帮助。见图 3。

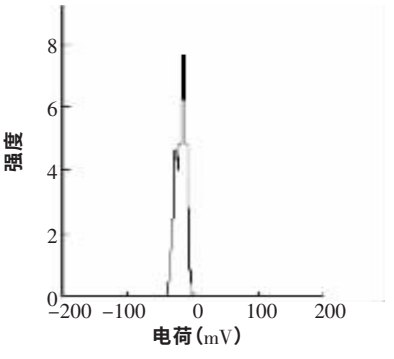


图 3　超声微泡电荷图

2.10　体外超声成像

图 4 中白色亮点为在超声作用下运动的微泡,下方白色弧形光带为水囊壁的图像,示微泡具有良好的反射超声信号的能力。

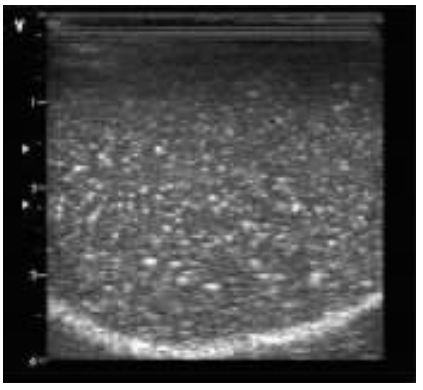


图4 超声下的微泡体外超声成像图

3 讨论

3.1 超声微泡材料的选用

近年来制剂学的迅猛发展让超声微泡得以很好的发展,很多领域都逐步开始了它的运用研究工作。制备超声微泡的材料很多,本研究采用的是新型聚合物PLGA,此高分子材料良好的生物降解性、生物相容性、降解速度可调节性和良好的可塑性,是FDA批准的可用于注射的药用辅料之一[11]。PLGA制备的超声载药微泡相对白蛋白、脂质体材料制备出的超声载药微泡稳定性较好,可延长使用时间和造影效果,并使局部持久高浓度,降低系统药物浓度和药物毒性刺激性[12]。另外,超声载药微泡由于大小关系可以被宿主巨噬细胞吞噬,药物在细胞内释放,可以直接作用于细胞内,起效更快、疗效更好。

3.2 制备方法

在超声微泡不断发展的同时也出现了多种制备技术,如乳化法、超声空化法、冷冻干燥法、喷射雾化法、薄膜-水化法、界面聚合法和原位聚合法等。目前还是多采用乳化法这种相对基本的方法。乳化法制备的超声微泡大都需要添加大量乳化剂和致孔剂,这使后处理时较难完全除去,且过程复杂。本研究中注射不加乳化剂和致孔剂的乳化溶剂挥发法制得的复乳超声微泡,增加剂型的稳定性的同时也增强其安全性。

3.3 工艺筛选

评价超声微泡含药量最主要的指标应该是载药量。而本研究在优化工艺筛选中,采用的是以包封率作为参考指标。从结果可以看出,所得的载药量比较低,所以相对的偏差比较大,影响会很大。所以选用数值相对大的包封率作为参考指标是为了减小实验与理论数值上的偏差。载药量低这一问题会是下一步研究载药超声微泡的一个重点。特别是解决类似HCPT在水中和有机项中溶解度都相当小,稳定性也不好的药物。除了制备中的几个主要影响因素的大小及相关性外,研究的范围还应该扩展到增加药物的溶解度,采用添加试药试剂来改变稳定性的问题[13],开发不同的制备方法[14]或者是如何增加或减小辅料的使用量,又能得到药效性稳定性更好的剂型。

参考文献:

[1] 童林艳, 胡长林, 李晋芳, 等. 两种不同开放血脑屏障方法的比较[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(18): 1749-1751.

[2] Jung L L, Zamboni W C. Cellular, pharmacokinetic, and pharmacodynamic aspects of response to camptothecins: can we improve it? [J]. Drug Ressist Updat, 2001, 4(4): 273-288.

[3] 张 力, 李 苏, 廖 海, 等. 羟基喜树碱Ⅰ期药代动力学及人体耐受性临床研究[J]. 癌症, 2001, 20(12): 1391-1395.

[4] 李 苏, 姜文奇, 张 力, 等. 羟基喜树碱(HCPT)不同给药方式的药理学比较[J]. 中国临床药理学杂志, 2001, 17(6): 427-430.

[5] Shenderova A, Burke T G, Schwendeman S P. The acidic microclimate in poly (lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins[J]. Pharm Res, 1999, 16(2): 241-248.

[6] Chow D S, Gong L, Wolfe M D, *et al*. Modified lactone/carboxylate salt equilibria *in vivo* by liposomal delivery of 9-nitro-camptothecin[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 922: 164-174.

[7] Tardi P, Choice E, Masin D, *et al*. Liposomal encapsulation of topotecan enhances anticancer efficacy in murine and human xenograft models [J]. Cancer Res, 2000, 60(13): 3389-3393.

[8] 周 卫, 丁逸梅, 王丽杰. 脂质体对羟喜树碱内酯环的保护[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(9): 688-690.

[9] Luo H, Birnbaum Y, Fishbein M C, *et al*. Enhancement of thrombolysis *in vivo* without skin and soft tissue damage by transcutaneous ultrasound[J]. Thromb Res, 1998, 89(4): 171-177.

[10] Takeuchi M, Ogunyankin K, Pandian N G, *et al*. Enhanced visualization of intravascular and left atrial appendage thrombus with the use of a thrombus-targeting ultrasonographic contrast agent (MRX-408A1): *In vivo* experimental echocardiographic studies[J]. J Am Soc Echocardiogr, 1999, 12(12): 1015-1021.

[11] 薛 敏, 毕秀丽, 黄桂华. 乳酸-羟基乙酸共聚物微球的研究进展[J]. 齐鲁药事, 2007, 26(4): 228-232.

[12] 谢 明, 周 梁. PLGA缓释微球在恶性肿瘤间质化疗中的应用[J]. 肿瘤, 2006, 26(8): 782-784.

[13] 陈红丽, 陈 汉, 李学敏, 等. 硫酸长春新碱PLGA微球的制备及其性质[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(3): 342-346.

[14] 樊 莉, 鲁 莹, 吴 诚, 等. 干扰素α-2b复合物PLGA微球的制备及影响因素[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(10): 674-678.

(编辑 张 维)