论著

文章编号:1000-5404(2010)21-2300-03

均匀试验设计在利多卡因缓释纳米微球制备中的应用

赵先英[1],刘毅敏[1],肖 湘[1],刘海红[1],粟永萍[2],李明春[1] (400038 重庆,第三军医大学:医学检验系暨药学院化学教研室[1],军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

【摘要】 目的 制备利多卡因载药微球,研究制备工艺参数对微球包封率和粒径的影响。方法 采用均匀试验设计法,以利多卡因(lidocaine, LID)为模型药物,以药物包封率、微球粒径为评价指标,基材及其用量为因素和水平进行 $U_8(8^5)$ 的实验,得出最佳制备工艺参数。结果 制备 LID-PLGA-Ns 的优选条件为:主药与包材基质的质量比为 1:6、内水相的体积比为 8:2、分散剂浓度 PVA 为 3.0%、超声乳化时间为 6 min、搅拌速度为 2 200(r/min),此时能得到包封率高、平均粒径小的载药微球。结论 应用均匀试验设计建立的多元二次模型可以较好地预测药微球的基本特性。

【关键词】 均匀试验设计;利多卡因;纳米微球;包封率;微球粒径
【中图法分类号】 R943;R944.9;R971.2 【文献标志码】 A

Applications of uniform design method in preparation of LIDA-PLGA sustained release nanospheres

Zhao Xianying[1], Liu Yimin[1], Xiao Xiang[1], Li Haihong[1], Su Yongping[2], Li Mingchun[1] ([1]Department of Chemistry, College of Pharmacy, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injuries, Department of Nuclear Medicine, Institute of Combined Injury, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To prepare the lidocaine-loaded nanospheres and study the effect of their preparation techniques on their drug encapsulation efficiency (DEE) and mean diameter (MD). Methods $U_8(8^5)$ experiments were performed using the uniform design method for basic materials and their volume with the DEE and MD of nanospheres as evaluation indexes and lidocaine as a drug model. Then, optimal preparation technique parameters of nanospheres were detected. Results The optimal conditions for preparation of LID-PLGA nanospheres were as follows. The mass ratio of the main drug and its encapsulation substrate was 1:6, the volume ratio of inner water phase was 8:2, the concentration of PVA was 3.0%, the phacoemulsification time was 6 min, and the stirring rate was 2 200 r/min. Conclusion Multiple secondary model established with uniform design method can rather accurately predict the basic characteristics of drug nanospheres.

【Key words】 uniform design; lidocaine; nanosphere; encapsulation efficiency; diameter of microsphere

Supported by the Opening Foundation of State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injuries (200714). Corresponding author: Liu Yimin, Tel: 86-23-68752216

微球是一种以适宜高分子材料为载体包裹或吸附药物而制成的球形或类球形的微粒,由于微球制剂具有集中于靶区逐步扩散释放出药物,或被溶酶体中的酶降解而释放出药物的特点,目前药物微球系统已经成为药物传递系统中极具发展潜力的研究领域[1,2]。利多卡因对中枢神经系统具有明显的抑制作用,是临床常用的局麻药,主要用于浸润麻醉、硬膜外麻醉、表面麻醉[3]。2006 年陆建华[4]和粟永萍等发现,将利多卡因注射到颈交感神经及其附近组织,通过颈交感神经阻滞(sympathetic block, SB),能使严重烧伤小鼠死亡率由 51% 降至 16%,使放射复合伤小鼠死亡率由 90% 降至 55%。此研究极大地扩大了利多卡因的临床应用范围,为临床严重创伤的早期救治带来了新的方法。

利多卡因可扩张外周血管,药物经血管吸收加速,使其作用周期缩短。同时由于利多卡因生物半衰期较短,仅为 1.5~2 h,因此临床上使用时需小剂量频繁给药以维持其药效,给患者带来巨大的痛苦和不便[5]。

【基金项目】 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金(200714)
【通信作者】 刘毅敏,电话:(023)68752216

因此,研究延长利多卡因一次性给药的作用时间,减少给药次数,增加生物利用度的药物剂型具有重要意义。近年来,国内外学者对制备微球的基质载体进行了一系列研究,其中以乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid),PLGA]的研究备受重视。PLGA 具有良好的生物相容性和安全性,同时因其含有亲水基团,所以在体内可生物降解为二氧化碳和水,且无明显的崩解现象而被广泛用作缓释微球的载体材料[6]。本研究以 PLGA 为聚合物基材,以聚乙烯醇[poly(vinyl alcohol),PVA]为分散介质,以利多卡因(lidocaine,LID)为模型药物,通过 W/O/W 复乳-干燥法制备 LID-PLGA 微球。采用均匀试验设计法[7]研究 5 个主要因素对药物包封率和微球粒径的影响,并试图建立性能-影响关系模型,在此基础上寻找最佳制备工艺参数,为利多卡因载药微球的制备提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

FS-250 超声乳化仪(上海生析超声仪器有限公司),PF-101B 集热式恒温磁力搅拌器(浙江省乐清县乐成电器厂),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),BT-2003 激光粒度仪(丹东百特仪器有限公司),利多卡因(LID,Sigma),乳酸-羟基乙酸共聚物 n(LA)∶n(GA)=75∶25(LA:乳酸,GA:羟基乙酸,中科院成都有机所),二氯甲烷、丙酮、聚乙烯醇(国产分析纯)。

1.2 LID-PLGA-Ns 的制备

采用改良的复乳-干燥法制备 LID-PLGA 载药微球[8,9]。准确称取一定量 PLGA 溶解于一定体积二氯甲烷-丙酮混合溶液中,将需包埋的 LID 药物溶解于上述溶液中,浸入冰水浴中超声乳化,得到初乳(W/O);再加入适当浓度的 PVA 溶液,继续超声乳化,得到复乳(W/O/W)。常压下磁力搅拌数小时,离心收集固化纳米微球,蒸馏水洗涤,冻干保存。

1.3 标准曲线的绘制

精密称取在真空干燥箱中干燥至恒重的 LID 0.600 0 mg,置于 100 ml 的容量瓶中,以 0.1 mol/L HCl 溶解、稀释至刻度,摇匀。分别准确吸取稀释液 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml 至 50 ml 容量瓶中,以 0.1 mol/L HCl 定容至刻度,以 263 nm 为测定波长测定光密度值。结果表明[10],LID 质量浓度 c 在 0~300 μg/ml 范围内与光密度值具有良好的线性关系,回归方程为 $A=0.001\ 974c+0.004\ 93$($r=0.9998$)。

1.4 利多卡因缓释纳米微球的药物包封率测定

精密称取载药微球约 10 mg,用二氯甲烷溶解,以 0.1 mol/L HCl 溶液涡旋萃取,离心收集此盐酸溶液,合并定容于 50 ml 容量瓶中,以 0.1 mol/L HCl 溶液为空白对照,在波长 263 nm 处测定光密度值,用标准曲线方程计算溶液中的药物量。根据下列公式计算微球包封率。

$$包封率=\frac{微球中\ LID\ 的含量}{所投\ LID\ 的总量}\times 100\%$$

1.5 利多卡因缓释纳米微球的粒径测定

取适量微球,用少量蒸馏水分散后,以焦磷酸钠为分散剂,用激光粒度分析仪测定微球的粒径。

1.6 均匀试验设计优化处方

结合前期单因素预试验的结果[11],选取对 LID 载药微球包封率(M_1)和平均粒径(M_2)影响较大的五个因素为考察对象。X_1:主药 LID 与包材基质 PLGA 的质量比(1∶1~1∶8);X_2:二氯甲烷和丙酮的体积比(9∶1~2∶8);X_3:PVA 浓度(0.5%~5%);X_4:超声乳化时间(0.5~6 min);X_5:搅拌速度(800~2 500 r/min)。因素与水平见表 1。选用 $U_8(8^5)$ 表安排各因素水平试验,如表 2 所示。

表 1 基材用量因素水平表

水平	因素				
	X_1	X_2	X_3(%)	X_4(min)	X_5(r/min)
1	1∶1	9∶1	0.5	0.5	800
2	1∶2	8∶2	1.0	1	1 000
3	1∶3	7∶3	2.0	1.5	1 200
4	1∶4	6∶4	2.5	2	1 400
5	1∶5	5∶5	3.0	3	1 600
6	1∶6	4∶6	3.5	4	2 000
7	1∶7	3∶7	4.0	5	2 200
8	1∶8	2∶8	5.0	6	2 500

表 2 均匀设计表[$U_8(8^5)$表]及试验结果

试验编号	因素及其水平					试验结果	
	X_1(m∶m)	X_2(V∶V)	X_3(%)	X_4(min)	X_5(r.m.p)	包封率(M_1,%)	平均粒径(M_2,nm)
A_1	1∶1	5∶5	2.0	2	2 500	67.2	270
A_2	1∶3	2∶8	2.5	5	1 000	71.6	560
A_3	1∶8	4∶6	0.5	3	1 600	77.8	450
A_4	1∶2	7∶3	5.0	4	1 400	68.7	500
A_5	1∶7	6∶4	3.5	1.5	800	80.5	540
A_6	1∶6	8∶2	3.0	6	2 200	88.4	300
A_7	1∶4	9∶1	1.0	1	1 200	89.6	520
A_8	1∶5	3∶7	4.0	0.5	2 000	82.3	420

2 结果

2.1 均匀试验结果的统计分析

按照均匀设计表的安排进行试验,将所得试验结果列入表 2 中。以试验结果为因变量,各因素为自变量,应用 SAS 8.0 软件进行统计(变量入选水平 $\alpha=0.05$),得到如下 2 个回归方程。结果表明在 $\alpha=0.05$ 时回归效果非常显著,因此该模型是可信的。

$$M_1=78.5-0.002\ 57X_1^2+0.001\ 09X_2^2+0.008\ 53X_3^3-0.002\ 26X_4X_5 \quad (1)$$

$r=0.998\ 8$, $F=123.7$ ($P<0.01$)

$$M_2=584.8-0.000\ 047\ 6X_5^2 \quad (2)$$

$r=0.978\ 8$, $F=83.7$ ($P<0.01$)

试验结果表明,在本试验范围内,主药 LID 与包材基质 PLGA 的质量比(X_1)较小、内向体积比(X_2)较大、分散剂 PVA 浓度(X_3)较大时,有利于提高药物的包封率(M_1)。超声乳化时间(X_4)的影响则较为复杂,当搅拌速度(X_5)较小时,超声乳化

时间较短,有利于提高药物的包封率,但是当搅拌速度较大时,超声乳化时间较长,则有利于提高药物的包封率。微球的平均粒径(M_2)仅与搅拌速度密切相关,转速越大,粒径越小。综合分析,制备 LID-PLGA-Ns 的优化条件为:主药与包材基质的质量比为 1∶6、内水相的体积比为 8∶2、分散剂浓度 PVA 为 3.0%、超声乳化时间为 6 min、搅拌速度为 2 200(r/min),此时能得到包封率高、平均粒径小的载药微球。

2.2 工艺验证

根据均匀设计试验优选的工艺条件安排了 3 个验证性试验,制备了 3 批微球,结果如表 3 所示。由表 3 可见,采用优化工艺制备得到的利多卡因缓释纳米微球的药物包封率和粒径与回归方程计算结果相近。

表 3 验症性试验的工艺与试验结果

试验编号	M_1(%)		M_2(nm)	
	实测值	预测值	实测值	预测值
B_1	84.5	86.5	310	300
B_2	80.6	88.7	320	280
B_3	88.7	84.9	340	320

3 讨论

微球的包封率和平均粒径是评价载药微球性能的 2 个重要指标[12],已有研究显示[13],主药与包材基质的质量比、内水相的体积比、分散剂浓度、超声乳化时间及搅拌速度等五大因素是影响这 2 个指标的主要因素。因此本研究通过均匀试验设计和逐步回归分析的方法建立了微球包封率和粒径与 5 个因素的之间的 2 次数学模型。在方程(1)中,因素 X_1 的回归系数为负,表明取值较小有利,X_2 和 X_3 的回归系数为正,表明取值较大有利。在方程(2)中,只含因素 X_5,表明该变量只与 X_5 有关,其回归系数为负,由于微球的粒径越小,越利于吸收,因此取值较大有利。

对于多因素水平的试验以往一般采用正交试验法。正交设计是根据正交性来挑选代表点,它在挑选代表点时有两个特点:均匀分散和整齐可比。“均匀分散”使试验点有充分的代表性;“整齐可比”使试验结果的分析十分方便,易于分析各因素对测定值影响的大小及其变化规律。但是为了做到“整齐可比”和“均匀分散”,试验的布点数目会比较多,至少要做 q^n 次实验(n 为因素的水平数)。而对于均匀设计,尤其在条件范围变化较大而需要进行多水平实验的情况下,均匀设计可极大地降低试验的次数,均匀设计只需要与因素水平数相等次数的 q 次试验即可达到正交设计的试验效果。其特点是在各因素考察范围内使试验点均匀的分散在所考察的范围内,均匀设计舍弃了正交设计的“整齐可比”性,故试验点在其试验范围内充分的“均匀分散”。这样每个试验点都有很好的代表性,而试验的次数大量减少[14]。本试验采用均匀设计法优化了利多卡因缓释纳米微球的制备工艺,既能保证试验点在试验范围内充分“均匀分散”,又较正交设计大大减少了试验次数,在很大程度上节约了人力和物力,缩短了试验的研究时间。同时,验证性试验表明,采用均匀试验设计建立的数学模型可以较好地预测利多卡因缓释纳米微球的包封率和粒径等重要性能指标,为利多卡因缓释纳米微球制备工艺的调整和优化提供指导。

参考文献:

[1] 陈智,田景振. 药用微球应用概况[J]. 齐鲁药事药学,2009,28(3):164-167.

[2] Hariharan S, Bhardwaj V, Bala I, *et al*. Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy [J]. Pharm Res, 2006, 23(1): 184-189.

[3] 翟莉莉. 氟烷、氯胺酮与利多卡因在小儿麻醉中的应用[J]. 中国实用医药,2010,5(20):19-21.

[4] 陆建华,粟永萍,程天民,等. 颈交感神经阻滞对放烧复合伤小鼠 HPA 轴的调节及相关机制研究[J]. 第三军医大学学报,2006,28(21):2111-2114.

[5] 张治然,王晓波,徐萍. 麻醉药物对硬膜外阻滞利多卡因药动学的影响[J]. 中国医院药学杂志,2007,27:(6):786-788.

[6] Matsumoto A, Matsukawa Y, Suzuki T, *et al*. Drug release characteristics of multi-reservoir type microspheres with poly(dl-lactide-co-glycolide) and poly(dl-lactide) [J]. J Control Release, 2005, 106(1/2): 172-180.

[7] 华南,刘卫,郭瑞臣. 均匀设计优选芎归巴布剂基质配比[J]. 中国医院药学杂志,2009,29(18):1537-1539.

[8] Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, *et al*. PLGA-based drug delivery systems: importance of the type of drug and device geometry[J]. Int J Pharm, 2008, 354(1/2): 95-103.

[9] Holgadoa A, Ariasb L, Cozara J, *et al*. Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing Effects on drug loading and release properties[J]. Int J of Pharm, 2008, 358 (1): 27-35.

[10] 赵先英,刘毅敏,肖湘,等. LID-PLGA 缓释纳米微球的含量测定及其释放度分析方法的研究[J]. 西南国防医药,2009,19(2):167-169.

[11] 赵先英,刘毅敏,肖湘,等. 乳酸-羟基乙酸共聚物缓释纳米微球的制备及体外释药评价[J]. 第三军医大学学报,2009,31(12):1155-1157.

[12] Avinash B, Steven J, Siegelb S, *et al*. Controlling the *in vitro* release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles [J]. Int J of Pharm, 2008, 346 (1/2): 151-159.

[13] 谷海刚,金旭,龙大宏,等. BSA-PLGA 微球的制备条件优化及不同添加剂对包封率的影响[J]. 中国生物医学工程学报,2007,26(6):931-935.

[14] 孙小英,吴莹,徐庆辉. 均匀设计及其在中药学领域中的应用[J]. 安徽医药,2009,13(7):822-824.

(收稿 2010-06-11 修回 2010-07-30)

(编辑 张 维)