技术方法

文章编号:1000-5404(2010)24-2666-03

氟维司群 PLA-mPEG 微球的制备和工艺优化

王九成,梁国正 (710072 西安,西北工业大学理学院应用化学系)

[摘要] **目的** 研究以聚乳酸-单甲氧基聚乙二醇嵌段共聚物(PLA-mPEG)为载体材料的氟维司群微球的最佳制备工艺。**方法** 采用"乳化-液中干燥法"制备氟维司群 PLA-mPEG 微球,对微球的外观形态、粒径、包封率、载药量、收率和体外释放等理化性质进行了检测。运用正交试验设计,以载药量为指标优化微球的制备工艺。**结果** 通过对正交试验结果进行假设检验,最佳制备工艺为:$A_3B_1C_1D_2$,即油相-水相体积比为1:60,聚乙烯醇在水相中的浓度为0.2%,PLA-mPEG在油相中的浓度为5%,乳化剪切速度为2 300 r/min。按优化条件制备的载药微球表面圆整,载药量、包封率和收率分别为18.0%、92.2%、85.4%,大部分微球的粒径为10~40 μm,药物体外释放76 h约为88%,释药特性符合 Higuchi 方程。**结论** 采用"乳化-液中干燥法"制备氟维司群 PLA-mPEG 微球载药量、包封率和收率均较高,且粒径均匀,具有较好的缓释效果。该法合理、可行,可用于氟维司群 PLA-mPEG 微球制剂的研究。

[关键词] 氟维司群;微球;PLA-mPEG 嵌段共聚物;正交设计

[中图法分类号] R943;R944.9;R979.1 **[文献标志码]** B

聚乳酸和乙醇酸的共聚物[Poly(lactic-co-glycolic acid),PLGA]是一种常用的制备微球的生物可降解材料,其虽然可以使药物达到缓释或控释作用,但其最大的缺点是其在体内降解过程中产生的乳酸和羟基乙酸,可增加体内环境的酸性,从而影响 pH 敏感性药物的稳定性,并对注射部位组织产生刺激作用,引起炎症反应。聚乳酸-单甲氧基聚乙二醇嵌段共聚物(PLA-mPEG)微球,可改善 PLGA 微球的缺点,是一种新的有效的微球载体材料[1]。

氟维司群(fulvestrant)是一种甾体类抗肿瘤药物,国外上市制剂——FASLODEX®是一种皮下注射给药的缓释制剂,由于其处方中使用了蓖麻油和乙醇,可引起过敏反应[2]。使用 PLA-mPEG(相对分子质量比为20 000:2 000)制备的氟维司群微球可明显改善 FASLODEX®的缺点,具有广阔的应用前景。本实验采用液中干燥法制备氟维司群 PLA-mPEG 微球,通过正交试验设计,以载药量、包封率、收率、表面形态为指标优化微球的制备工艺,使用获得的最佳制备工艺条件制备的载药微球具有良好的缓释性能。

1 材料与方法

1.1 仪器

高剪切混合乳化机(BME-100L 型,上海威宇机电制造有限公司),电热恒温水浴锅(HH·SY11-Ni 型,北京市长风仪器仪表公司),高效液相色谱仪(JASCO,PU-2089 四元梯度泵,UV-2075 紫外检测器,AS-2055 智能进样器,日本分光公司),N2000 色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司),SHA-A 水浴恒温振荡器(江苏金坛正基仪器有限公司),显微镜(日本 NIKON SE),扫描电镜(SEM,S800,Hitachi,Japan)。

1.2 药品与试剂

氟维司群(99.0%,西安力邦医药科技有限责任公司),氟维司群对照品(含量99.9%,西安力邦医药科技有限责任公司),单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物(自制),Tween-80(试药级,日本东京化成工业株式会社),聚乙烯醇(化学纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),二氯甲烷(分析纯,天津化学试剂有限公司),其他试剂均为色谱纯。

1.3 实验方法

1.3.1 乳化-液中干燥法(emulsion in liquid drying method,O/W)制备氟维司群 PLA-mPEG 微球的制备 取 PLA-mPEG 溶解在二氯甲烷中,加入氟维司群,超声使溶解后(油相)加入到含0.1% Tween-80 的聚乙烯醇水溶液(水相)中,高速剪切乳化10 min,置35 ℃水浴中搅拌5 h,待二氯甲烷挥发完全,过125 μm筛网过滤,收集滤液,滤渣弃去。将滤液通过10 μm 筛网过滤,收集滤渣。滤渣用适量蒸馏水洗涤5次,40 ℃真空干燥2 h,即得氟维司群微球。

1.3.2 正交试验设计 参考文献[3-7]及根据单因素考察结果,选择对微球制备工艺影响较显著的因素作为考察对象,即油相-水相体积比(A)、水相浓度(B,为聚乙烯醇的浓度)、油相浓度(C,为 PLA-mPEG 的浓度)和乳化剪切速度(D)4个因素,以微球载药量为主要考察指标。因素水平见表1。

表1 氟维司群微球制备工艺研究正交因素水平

因素水平	A	B(%)	C(%)	D(r/min)
1	1:15	0.05	5	3 000
2	1:30	0.1	10	2 300
3	1:60	0.2	20	1 600

1.3.3 微球的形态 取干燥微球适量,置载玻片上,加蒸馏水适量分散均匀,置显微镜下观察形状及大小。

1.3.4 载药量的测定(HPLC 法)及载药量、包封率、收率的计算 含量测定方法:以辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以甲

【通信作者】 梁国正,电话:(0512)61025828,E-mail:gzheng@nwpu.edu.cn

醇-乙腈-水(70∶7.5∶22.5)为流动相,流速 1.2 ml/min,检测波长为 285 nm。取氟维司群对照品溶液和供试品溶液分别进样 20 μl 进行测定,按外标法以峰面积计算即得[8]。

按下式计算载药量、包封率及收率。载药量(%) = 测得的微球中的药物量/微球称样量 ×100%。包封率(%) = 试验所得微球中的药物总量/药物投料量 ×100%。微球收率(%) = 试验所得微球的总量/(药物投料量 + 载体材料投料量) ×100%。

1.3.5 体外释放试验(HPLC 法)方法　根据《中国药典》有关释放度测定的规定[9],以 0.1% CTAB 溶液 200 ml 为溶出介质,温度 37 ℃,转速 100 r/min。在规定的时间取样 2 ml,滤过,按含量测定方法取续滤液,以 4 或 40 μg/ml 的氟维司群对照溶液为对照,按外标法以峰面积计算含量,并求释放度[8]。

1.4 统计学分析

使用 SAS Ⅴ 8.0 软件对正交试验所获得的载药量数据进行假设检验,分析各因素对制备工艺的影响。

2 结果

2.1 正交试验

由表 2 可知,各因素对载药量影响的顺序为 B > C > D > A,最佳工艺为 $A_3B_1C_1D_2$,即水相为含 0.2% 聚乙烯醇和 0.1% Tween-80 的水溶液,PLA-mPEG 在二氯甲烷中的浓度为 5%,油相-水相体积比为 1∶60,剪切速度为 2 300 r/min。将误差最小的因素 A 作为误差项进行方差分析,结果表明,因素 B、C、D 的 P 值分别为 0.187 2、0.269 2、0.433 0,以 $\alpha = 0.25$ 为检验水准,说明因素 B 对工艺有较为显著影响($P < 0.25$),其他因素对工艺影响不显著($P > 0.25$)。

表 2　正交试验结果

试验号	A	B	C	D	载药量(%)	微球形态
1	1	1	1	1	16.5	大部分为 5 ~ 10 μm 的球,较圆整
2	1	2	2	2	15.6	大部分为 10 ~ 30 μm 的球,较圆整
3	1	3	3	3	14.2	大部分为 30 ~ 50 μm 的球,较圆整
4	2	1	2	3	16.4	大部分为 30 ~ 40 μm 的球,较圆整
5	2	2	3	1	15.3	大部分为 1 ~ 10 μm 的球,较圆整
6	2	3	1	2	16.2	大部分为 20 ~ 40 μm 的球,较圆整
7	3	1	3	2	17.2	大部分为 20 ~ 40 μm 的球,较圆整
8	3	2	1	3	17.6	大部分为 40 ~ 50 μm 的球,较圆整
9	3	3	2	1	14.2	大部分为 10 μm 左右的球,较圆整
K_1	15.4	16.7	16.8	15.3		
K_2	16.0	16.2	15.4	16.3		
K_3	16.3	14.9	15.6	16.1		
R	0.9	1.8	1.4	1.0		

K_1、K_2、K_3 分别为 3 个水平载药量的均值;R 为极差

2.2 最佳工艺的放大验证

按表 2 得出的最佳制备工艺条件,放大 40 倍制备氟维司群载药微球,所得微球在显微镜下放大 150 倍观察,大部分微球的粒径为 10 ~ 40 μm,形态较圆整。载药量为 18.0%,包封率为 92.2%,收率为 85.4%,结果满意。

使用透射电镜观察微球形态,在放大 2 300 倍时显示微球的粒径在 20 ~ 30 μm,形态非常像蜂巢,这种结构利于载体材料被溶蚀以及药物的释放(图 1)。

2.3 体外释放

体外释放曲线见图 2。经优化的工艺制备的微球,其体外释放曲线较平缓,有一定的突释现象,但符合《中国药典》规定,且初始时的突释有利于药物尽快达到治疗浓度;76 h 药物释放约为 88%,$t_{1/2}$ 为 13.7 h,说明氟维司群微球具有一定的缓释作用。按 Higuchi 方程以累计释药量百分率 F 对时间 $t^{1/2}$ 回归,得方程 $F = 8.4641\ t^{1/2} + 17.48$,$r = 0.9731$,说明氟维司群微球的体外释药缓释效果较好。

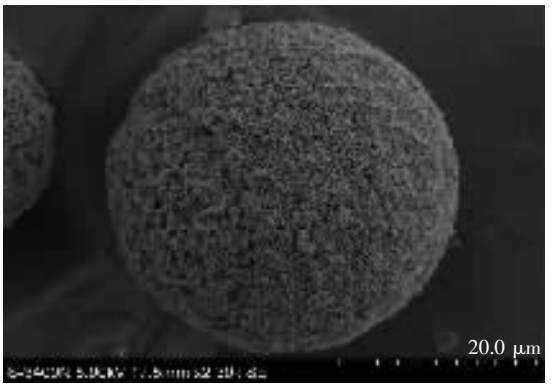


图 1　载药微球扫描电镜观察结果

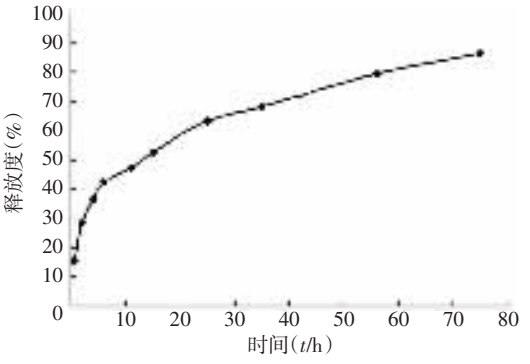


图 2　氟维司群 PLA-mPEG 微球体外释放曲线

3 讨论

氟维司群为脂溶性药物,其在水中的溶解度仅为 1 ng/ml,非常适宜采用 O/W 乳化-液中干燥法制备微球。评价微球制备工艺的参数指标主要有:载药量、包封率和收率,其中载药量在实验室研究中最为可靠,而包封率和收率则在产业化中常作为主要考察指标。本研究选择载药量作为工艺的评价指标。

影响 O/W 乳化-液中干燥法制备微球的因素很多,其中最重要的因素是水相(连续相)中乳化剂及其浓度的选择以及油相(分散相)中有机溶剂的选择。本研究选择聚乙烯醇作为乳化剂,其不但亲水性较强,还有增加生物黏合性的性质,能够在形成微球的过程中与 PLA-mPEG 分子互相渗透,且其疏水片段可渗透至有机溶剂中,有利于乳滴的稳定和粒径均一。聚乙烯醇的浓度越高,水相的黏度越大,微球的形成过程越稳定,但黏度过大不利于微球的洗涤。聚乙烯醇的浓度太小,微球在形成过程中会出现聚合,从而破裂。水相中含 0.1% 的 Tween-80 更有利于乳滴的稳定。我们在试验初期曾尝试过单独使用聚乙烯醇作乳化剂,发

现在微球形成过程中乳滴有聚合现象，加入0.1% Tween-80后聚合现象得到明显改善。

油相中有机溶剂的选择对微球的形成有着至关重要的作用。有机溶剂应在水中有一定的溶解度（<10%），且沸点较低。本研究选择了目前液中干燥法最适宜的有机溶剂二氯甲烷作为油相中的有机溶剂。

本研究显示，影响氟维司群微球载药量的因素为：水相乳化剂浓度>油相中载体材料浓度>乳化剪切速度>油相-水相体积比，其中后三者对载药量的影响不明显。乳化剪切速度的大小与微球粒径的大小有着密切的关系，剪切速度越大，微球粒微越小。本研究使用正交设计优化获得了最佳的氟维司群微球制备工艺，所得微球形态圆整，载药量、包封率、收率各项指标均可达到产业化需要，且缓释效果较好，具有广阔的应用前景。

参考文献：

[1] Wang J, Liang D, Liang G. A novel class of polymeric carriers based on PLA-MPEG for microsphere containing fulvestrant[J]. J Polymer Eng, 2010, 30(2): 81-94.
[2] Howell A. Fulvestrant ('Faslodex'): current and future role in breast cancer management[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 57(3): 265-273.
[3] Mao S, Xu J, Cai C, *et al*. Effect of W/O/W process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres[J]. Int J Pharm, 2007, 334(1/2): 137-148.
[4] 杜洋，黄华，胡荣. 醋酸地塞米松固体脂质纳米粒的制备与处方优化[J]. 中国医院药学杂志，2009，29(11)：888-890.
[5] 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.
[6] 吴青，朱照静. 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[J]. 第三军医大学学报，2009，31(14)：1349-1352.
[7] 石洋，李慧，徐淼，等. 正交设计优化川芎嗪乳酸-羟基乙酸共聚物微球处方与制备工艺[J]. 山东大学学报：医学版，2010，48(1)：154-158.
[8] 王九成，梁国正. 高效液相色谱法测定氟维司群微球的含量和体外释放度[J]. 中国生化药物杂志，2009，30(5)：333-335.
[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2005年版二部. 北京：化学工业出版社，2005：附录28-附录30，附录74-附录75.

（收稿：2010-07-26 修回：2010-09-01）
（编辑 张 维）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2010)24-2668-01

Graves病患者血清Ghrelin水平与甲状腺功能状态的关系

杨士军[1]，崔兆辉[2]，陆卫平[2]　（223300 江苏 淮安，南京医科大学附属淮安第一医院：核医学科[1]，内分泌科[2]）

【关键词】 生长激素释放肽；Graves病；甲状腺激素
【中图法分类号】 R581.1　【文献标志码】 B

Ghrelin为生长激素促分泌素受体的内源性配体，它可以促进生长激素的释放，正能量平衡时Ghre1in水平降低，负能量平衡时Ghrelin水平会升高[1-6]。而Graves病患者食欲亢进，体质量显著减轻，这与甲状腺功能状态有关，是一种显著的负能量平衡状态。Ghrelin与食物摄取及能量平衡的联系，提示这种激素可能与甲状腺功能状态有一定关系。本研究观察Graves病患者在药物治疗前后血清Ghrelin水平的变化，并分析血清Ghrelin水平与FT_3、FT_4、s-TSH的相关性，旨在为Graves病的病理研究和治疗提供参考。

1 对象与方法

1.1 对象

Graves病组，为我院门诊初诊的Graves病患者，共67例（男性18例，女性49例）。诊断标准：根据临床表现、体格检查和血清甲状腺激素结果（s-TSH<0.27 mIU/L、FT3>7.1 pmol/L、FT4>22 pmol/L），分别于确诊后给予甲巯咪唑30 mg/d治疗，3个月后空腹采血测定s-TSH、FT_3、FT_4、Ghrelin。患者受试前未服用其他药物，受试期间无感染及其他疾病。

正常对照组33例（男性9例，女性24例），为来我院体检人员，选择体格检查、血清检查、B超、胸透、心电图结果正常者，测定空腹血清s-TSH、FT_3、FT_4、Ghrelin。

1.2 方法

血清Ghrelin测定采用酶联免疫法测定，试剂盒购于上海亚培生物科技有限公司，严格按说明书操作。s-TSH、FT_3、FT_4测定采用电化学发光法，仪器由瑞士Roche公司生产，型号E170，试剂为专用配套试剂。

1.3 统计学处理

检测数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 11.0统计软件进行t检验和相关性分析。

2 结果

Graves病组及对照组血清Ghrelin测定结果见表1，初诊时Graves病患者血清Ghrelin明显低于对照组（$P<0.05$），治疗3个月后恢复正常水平，与对照组比较差异无统计学意义（$P>0.05$），与初诊比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。对Graves病患者血清Ghrelin水平与甲状腺激素进行相关性分析，结果显示，Graves病患者的血清Ghrelin水平与FT_3、FT_4浓度呈明显

（下转2677页）

【基金项目】 淮安市科技支撑计划(HAS2010027)
【通信作者】 陆卫平，E-mail：hyhalwp@sina.com