基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1321-05

超顺磁性硫酸链霉素 PLA-PEG 微球的制备和体外特征研究

吴 灿,刘传康,罗 聪,李 明
(重庆医科大学附属儿童医院骨科,重庆 400014)

【摘 要】目的:制备超顺磁性硫酸链霉素(Streptomycin sulfate,SM)PLA-PEG 微球(Superparamagnetic streptomycin sulfate PLA-PEG microspheres,spSPM),探索并建立一种准确、方便和有效的硫酸链霉素 HPLC 检测方法;研究此微球的特征,并对其在振荡磁场作用下的体外药物释放规律进行研究,为今后的动物实验及临床应用提供理论依据。方法:用化学共沉淀法合成超顺磁性壳聚糖 Fe_3O_4 纳米粒 (Superparamagnetic chitosan Fe_3O_4 nanospheres,spCFN),再用双乳化(W/O/W)溶剂挥发法制备 spSPM,检测其特征参数。将此 spSPM 在 37℃模拟体液中进行体外药物溶出试验,振荡磁场干预,用 HPLC 检测硫酸链霉素(SM)的释放量。结果:本实验制备的 spSPM 包封率 47.56% ± 1.39%,载药量 25.20% ± 1.52%,体积平均粒径为 2.467 μm,体外释放周期超过 7 d。结论:本实验制备的 spSPM 具有隐形微球的各项特征,可应用于进一步的研究中。

【关键词】硫酸链霉素;高效液相色谱;超顺磁性微球;聚乳酸 - 聚乙二醇;振荡磁场;控释
【中国图书分类法分类号】R944.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-19

Preparation and characterization of superparamagnetic streptomycin sulfate PLA-PEG microspheres

WU Can, et al
(*Department of Orthopdics, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: Preparation of superparamagnetic sulfate streptomycin PLA-PEG microspheres (spSPM), and try to establish of an accurate, convenient and effective detection method of high performance liquid chromatography (HPLC) about streptomycin sulfate(SM); to research the properties of this microspheres, and study the laws of drug release under oscillating magnetic field interfered in vitro.This will provide a theoretical basis for our animal experiments and clinical application in the future. *Methods*: Using chemical coprecipitation to synthesize superparamagnetic chitosan Fe_3O_4 nanospheres(spCFN), and then using complex emulsification(W/O/W) to prepare spSPM; put spSPM in simulated body fluid at 37℃, oscillating magnetic field interferes and use HPLC to detect the release of SM. *Results*: The entrapment rate of this spSPM is 47.56% ± 1.39%, it,s drug-loading rate is 25.20% ± 1.52%, the volume averaging particle size is 2.467 μm, the cycle of this drug delivery system is more than seven days. *Conclusion*: The spSPM prepared by this method has all characteristics of the stealh microspheres, and oscillating magnetic field can increase the dissolution of this system repeatability, thus it can be used in further studies.

【Key words】Streptomycin sulfate; HPLC; Superparamagnetic microspheres; Polylactide-Polyethylene glycol; Oscillating magnetic fields; Controlled release

硫酸链霉素(Streptomycin sulfate,SM)是目前临床上的一线抗骨关节结核药物,其主要副作用是显著的第 8 对颅神经损害及肝肾毒性[1],这极大地限制了其临床应用。如能通过磁性载药微球技术改变 SM 的剂型,在外磁场作用下使其在体内达到缓释和控释,则对减轻此药的副作用及增加其临床应用范围具有特别重要的意义。本实验通过制备 spSPM 和研究其在磁场下的释放规律以论证体内实验的可行性。

作者介绍:吴 灿(1984-),男,硕士,研究方向:骨关节感染。
通讯作者:刘传康,男,副教授,E-mail:liuchuankang@126.com。
基金项目:重庆市卫生局重点课题(渝卫科教[2007]1 号);重庆市教委课题(渝教科[2007]5 号)。

1 材料与方法

1.1 试验仪器和试剂

DENVER INSTRUMENT 电子天平:北京赛多利斯仪器系列有限公司;IKA RW20 Digital 数显电动搅拌器:德国 I-

KA；KUBOTA5 930 冷冻离心机：日本久保田公司；Hitachi-7500 透射电镜：日本日立公司；Altura855 DB 扫描电镜：FEI COMPANY；Mastersier2000 激光粒径分布仪：英国马尔文公司。硫酸链霉素：Sigma 公司；聚乳酸－聚 DL-乙二醇（PLA-PEG，90∶10），Mw 5.4×10^4 特性粘度 0.70~1.00，中科院成都化学研究所；壳聚糖（相对分子量 1.38×10^6 脱乙酰度 90%）浙江澳兴生物科技有限公司；硫酸铁铵 $NH4Fe(SO_4)_2\cdot12H_2O$ 分析纯，硫酸亚铁铵 $(NH4)_2Fe(SO_4)_2\cdot6H_2O$ 分析纯，重庆川东化学试剂厂；聚乙烯醇（PVA，MW=22 000，水解度 88%），日本进口分装；乙腈、三磷酸钠及 1-己烷磺酸钠：江苏汉邦科技有限公司，均为色谱纯。

1.2 spCFN 的制备

采用化学共沉淀法制备 spCFN[2]将硫酸亚铁铵与硫酸铁铵混合物适量，溶于含 2%壳聚糖（w∶v）的乙酸溶液中（pH5.5）配制成 A 液，移入带搅拌的三颈烧瓶中；配制 6 mol/L NaOH 成 B 液，移入恒压漏斗中；在氮气保护下，快速搅拌中加热 A 液至 55℃。滴入 B 液，维持反应 10 min；降低搅拌速度，升温至 85℃，维持反应 90 min；倾出反应产物，去离子水反复洗涤后得黑色胶状沉淀，真空干燥后室温密闭保存。

1.3 spSPM 的制备

采用双乳化（W/O/W）溶剂挥发法制备 spSPM[3,4]：取 10%硫酸链霉素溶液 1.5 ml 与 200 mg spCFN 混匀，加入一定量 PVA 溶液，超声分散，得液体 A（W_1）；称取 300 mg PELA 溶入 6 ml 二氯甲烷中成 B 溶液（O）。混合 A 与 B 超声乳化得 C，将 C 倾入含 PVA 的外水相（W_2）中，高速均质后倒入三蒸水中，再经电动搅拌器 300 r/min 搅拌 12 h 挥发二氯甲烷，得到的微球经反复洗涤、离心 5 次，经冻干得产品，-4℃ 保存；收集微球洗涤液，称为合并液，备用。

1.4 spSPM 各项表征检测

1.4.1 光镜下观察 spSPM 光镜下观察微球形态，并在离载玻片 5 cm 处外加 1 个 2 000 Gs 的永磁体，观察微球在磁场下的运动情况。

1.4.2 扫描电镜下观察 spSPM 用 Altura 855 DB 扫描电镜观察冻干 spSPM 的形态。

1.4.3 粒径与分布测定 同工艺新制一批微球洗涤离心后用激光粒径分布仪检测 spSPM 的粒径及其分布。

1.5 HPLC 检测 spSPM

1.5.1 标准溶液的配置 精密称取 SM1.00 g 置于 100 ml 容量瓶，加入去离子水超声 5 min 溶解，去离子水稀释至刻度，摇匀得 10.00 g/L 的 SM 标准溶液。再依次稀释成含 SM 分别为 250、100、50、10、5 mg/L 系列工作液。4℃保存备用。

1.5.2 色谱条件[5] 色谱柱：Agilent C 18 柱；流动相：乙腈∶水（含 1-己烷磺酸钠 15 mmol/L，Na_3PO_4 10 mmol/L）15∶85；流速：1.2 ml/min；柱温：25℃；检测波长：205 nm；进样量：20 μl。

1.5.3 标准曲线制备 取模拟体液、未加 SM 的空白微球和空白磁性微球洗涤合并液先用 0.22 μm 微孔滤膜过滤 3 次后精密量取 0.18 ml，分别精密加入 0.02 ml SM 标准工作液，配置成终浓度分别为 25、5、1、0.5 mg/L 的标样。吸取 20 μl 进样，记录 SM 色谱峰面积，以样品峰面积（A）对 SM 浓度（C）作加权线性回归。

1.5.4 方法回收率和精密度试验 取空白微球洗涤液 0.2 ml，精密加入 SM 标准工作液，配制终浓度为 0.5、5、25 mg/L 的标样，同上操作考查 SM 的回收率及日内、日间精密度。

1.5.5 提取回收率 取空白微球洗涤液和模拟体液 0.2 ml，精密加入 SM 标准工作液，配制终浓度为 0.5、5、25 mg/L 的标样，以提取后色谱峰面积与未经提取直接进样获得的峰面积比较，计算提取回收率。

1.5.6 包封率和载药量测定 新制 3 批微球，收集各组洗涤液，离心 5 000 r/min × 5 min，按“2.3”步骤处理进样，测定链霉素浓度，并分别称量微球重量。按下式计算微球的载药量和包封率：包封率＝[（投入药量－上清液中药量）/投入药量] × 100%，载药量[（投入药量－上清液中药量）/微球重量] × 100%。

1.6 体外溶出实验 采用转篮法，用 ZRS-6 型智能溶出试验仪行体外溶出度实验。分别观察以下药物溶出情况：A 组，spSPM+振荡磁场；B 组，spSPM 不加振荡磁场；C 组，SPM 不加磁场。每组观测 3 份样品，每份样品 300 mg，各置于 1 000 ml 模拟体液中。振荡磁场干预方法：振荡磁场由杭州仪表电机厂生产的 78-1 型磁力加热搅拌器改装，感应磁场强度为 2 000 Gs，转速约为 60 r/min。振荡磁场干扰时间点为：A 组，按每次取样前 2 h。溶出液采用设置温度 37℃ ± 0.5℃，转篮速度 100 r/min。第 1 次于溶出试验开始后 2 h；以后每隔 24 h 采样，至 8 d 结束。每次取样 1 ml，并立即加模拟体液，以维持溶出液体积不变。取样后同“2.3”处理进样。据标模拟体液的 SM 标准曲线计算不同时间微球释放链霉素的量，计算累计释放量，并绘制体累积体外释放曲线。

1.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计学软件分析，两组均数比较采用 q 检验，检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 spCFN 的检测

spCFN 的透射电镜结果和磁滞回归曲线分别见图 1、图 2，当磁性 Fe_3O_4 的晶体直径<30 nm 时，具有超顺磁性，即在磁场中有较强的磁性，没有磁场时，磁性很快消失，而不会被永久磁化[6]。在外加磁场的作用下，可具有靶向性，能够将携载的药物浓集于靶组织，完成局部靶向作用。由图 1 和图 2 说明样品具有超顺磁性。

2.2 spSPM 的表征

光镜下见 spSPM 大小均一，分散均匀；图 3 示 spSPM 在外加磁场下成串珠状排列，并产生定向运

动,说明微球具有良好的超顺磁性;扫描电镜下见微球表面光滑,形态圆整,粒径约 0.5~2.5 μm,粒径分布较均匀(图 4);spSPM 的粒径主要分布在 0.5~3.0 μm,其体积平均粒径为 2.467 μm(图 5)。

2.3 HPLC 检测 spSPM

2.3.1 各组溶液的色谱图 见图 6,本方法的最低检测浓度为 0.5 mg/L,在 0.5~25 mg/L 浓度范围内线性关系良好。回归方程见表 1。

2.3.2 方法回收率及精密度 本实验日内及日间 RSD 分别≤5.35% 和≤7.62%,准确度为 96.10%~104.26%。

2.3.3 提取回收率 由表 2 可知该方法提取回收率均>80%。

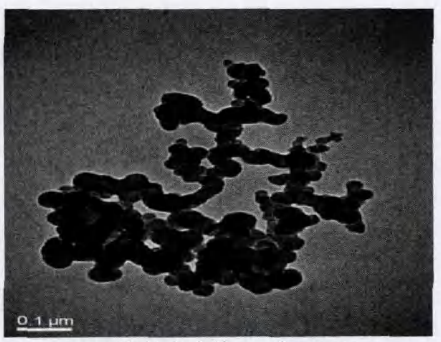
2.3.4 包封率和载药量 spSPM 组:包封率 47.56%±1.39%,载药量 25.20%±1.52%;链霉素 PLA-PEG 微球(Streptomycin sulfate PLA-PEG microspheres,SPM)组:包封率 50.89%±1.39%,载药量 33.42%±1.54%。认为 spSPM 载药量相对较低,主要是 Fe_3O_4 纳米粒增加了微球的重量,故单位载药量下降。

2.4 体外溶出实验

从图 7 可以看出,各组微球体外链霉素溶出时间均超过 7 d,均有明显缓释作用。A 组与 B、C 组之间,药物溶出量均有显著性差异,$P<0.001$;而 B 组释放量明显高于 C 组,$P<0.001$,并且差值随时间呈增加趋势,主要是 spSPM 表面镶嵌有一部分包封不太理想的 Fe_3O_4 纳米粒子,在加入到 37.5℃溶出介质后,由于 PLA-PEG 材料与 Fe_3O_4 的比热不同,造成部分微球上形成孔洞及裂隙,使药物顺浓度梯度释放增加,与 SPM 组相比有较大的释放度。

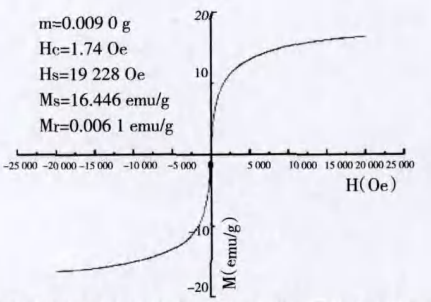
3 讨 论

目前硫酸链霉素较大的毒副作用使骨关节结核的药物治疗受到很大限制,如何增强其对结核病灶周围的靶向性,从而达到减毒增效的目的,一直是目前硫酸链霉素等一线抗结核药物在临床应用中亟需解决的问题之一。近年来飞速发展的磁性微球靶向给药系统在提高药物对病灶的靶向性、降低药物的毒副作用方面显示出巨大的发展前景[7]。由于普通磁性微球制剂进入血循环后易被单核吞噬系统(Mononuclear phagocyte system,MPS)细胞作为异物认别而吞噬,显著降低了其对病灶的靶向性。目前研究的策略就是对微球进行表面修饰,制备能逃避 MPS 细胞吞噬的隐形磁性微球系统(Stealh magnetic microsphere system)[8],本研究以能阻止MPS 细胞吞噬的亲水性长链聚乙二醇修饰可在体内生物降解的聚乳酸即聚乙二醇化的聚乳酸作为磁性微球载体,以链霉素为模型药物,探索了具有隐形微球功能的 spSPM 的制备。



spCFN 粒径大小均一,为 20~30 nm

图 1 spCFN 的透射电镜照片(×12 000)



该磁化曲线为通过原点的光滑曲线,无外加磁场时样品几乎没有剩磁和矫顽力

图 2 spCFN 的磁滞回归曲线

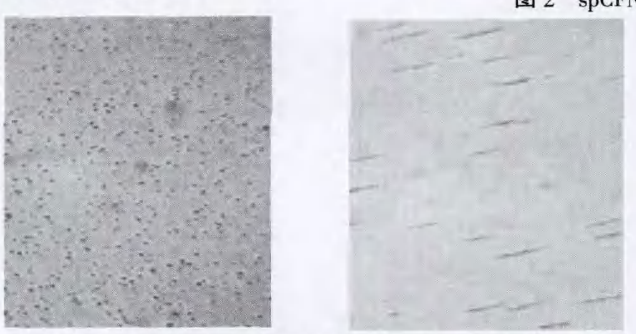


图 3 spSPM 在静磁场下的定向运动:右侧加磁场(×400)



图 4 扫描电镜下的 spSPM

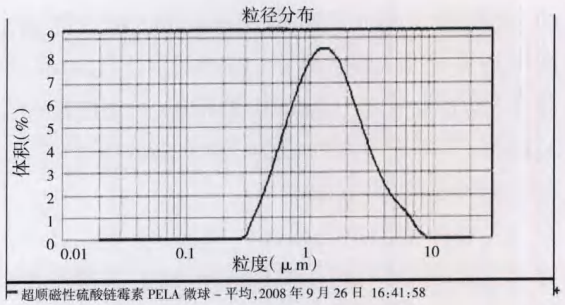
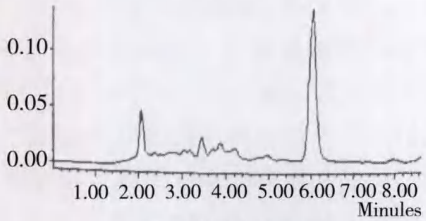
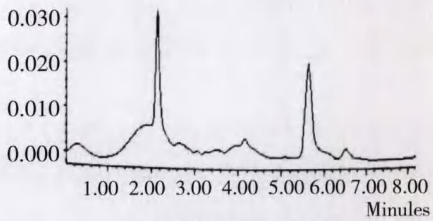


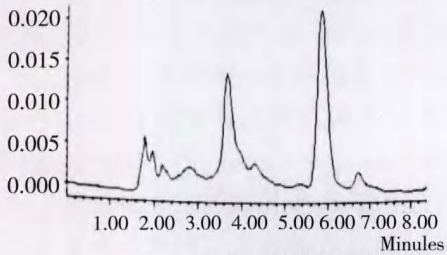
图 5 spSPM 的粒径分布图



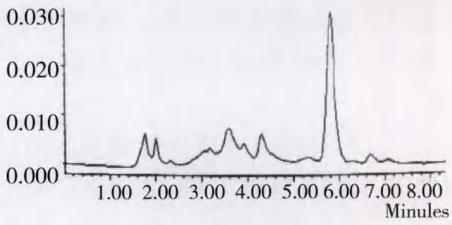
A. 对照组色谱图



B. 模拟体液组色谱图

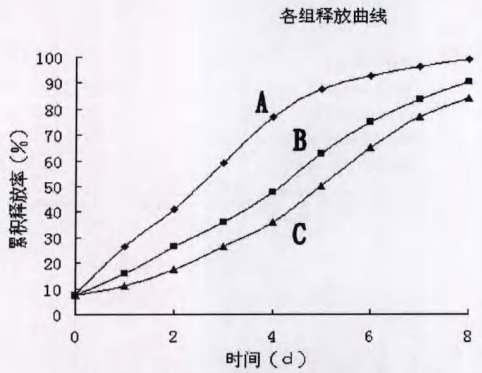


C. 空白微球洗涤液组色谱图



D. 磁性微球洗涤液组色谱图

图 6 SM 在各组溶液中的色谱图 SM 保留时间在 6 min 左右,均达到基线分离,无明显拖尾



A. spSPM+ 振荡磁场;B. spSPM 不加振荡磁场;

C. SPM 不加磁场

图 7 各组样品在体外实验中的累积释放曲线

本实验所制备的 spSPM 粒径约 2 μm,比人体内最小的毛细血管内径(4 μm)和红细胞直径(7 μm)小得多;聚乙二醇亲水性长链结构具有很好的柔韧性,可使微球的空间结构发生变化,故它可以通过微循环运动到达人体的各部位,这为 spSPM 作为隐形的磁性载药微球提供了基础。研究发现,MPS 细胞对纳米粒具有强大吞噬作用是通过血中亲脂性的调理蛋白介导的[9],本实验用 PLA-PEG 包裹硫酸链霉素和超顺磁性壳聚糖 Fe_3O_4 纳米粒制备 spSPM,因为亲水段 PEG 和疏水段 PEA 的溶解度有很大差别,在介质中呈现不同的构象形态,因而在 W/O/W 反应体系中能够自组装成具有核-壳结构的微球,疏水段 PLA 通过成核聚集形成包裹药物的核,亲水段 PEG 则包围核形成修饰在纳米表面的外壳,由于该微球系统表面的 PEG 具有亲水性,它可以降低微球对亲脂性调理蛋白的结合力,同时 PEG 亲水性长链结构的柔韧性使微球的空间结构发生变化而使 MPS 细胞难以对其产生有效的识别而难以吞噬。当 spSPM 通过静脉、动脉导管和注射等途径给药后,在体外足够强的外磁场作用下,其在体内病灶区域周围定位浓集并释放,此外还可以通过体外振荡磁场控制 spSPM 的释放速率,从而链霉素集中在病变部位发挥疗效,具有高效低毒的特点。本实验表明:(1)本方法所制备的超顺磁性微球大较小均一,表面光滑,有较高的包封率和载药量,具有良好的超顺磁性;(2)spSPM 具有药物缓释功能,

表 1 不同溶液中 SM 的回归方程(n =3)

样品	标准曲线	相关系数 r
模拟体液组	A=6 669.17°C−296.38	0.999 9
空白微球洗涤液组	A=6 710.45°C−213.46	0.999 8
磁性微球洗涤液组	A=6 574.36°C−184.65	0.999 8

表 2 不同溶液的提取回收率 (%,$\bar{x}$ ±s,n=5)

样品	提取回收率		
浓度	0.5 mg/L	5 mg/L	25 mg/L
模拟体液组	85.21 ± 4.06	84.32 ± 3.48	83.47 ± 2.65
空白微球洗涤液组	86.66 ± 5.14	84.32 ± 2.45	87.65 ± 3.54
磁性微球洗涤液组	85.89 ± 2.35	86.47 ± 2.30	85.14 ± 3.54

释药时间超过 1 周;(3)振荡磁场能使 spSPM 中 SM 释放速率提高 1 倍左右。因此,可根据需要,定时增加 SM 的释放。本次实验探索具备隐形微球功能的 spSPM 的制备方法和体外药物释放过程,建立了链霉素的 HPLC 检测方法,证明振荡磁场能提高 spSPM 中 SM 释放速率;在接下来的实验中我们将结合自行研制的大功率振荡磁场发生器进行动物实验[10,11],以进一步验证 spSPM 外磁场作用下的体内局部浓聚、控释及缓释特征。

参 考 文 献

[1] Peloquin C A, Shaun E B, Annette T N, et al. Aminoglycoside toxicity: daily versus thrice-weekly dosing for treatment of mycobacterial diseases [J]. Clinic Infectious Diseases, 2004, 11(38): 1538-1544.

[2] Diandra L. Advanced magnetic nanostructures[J]. Springer US, 2006, 15(4): 461-490.

[3] Gibaly E I, Safwat S M, Ahamed M O, et al. Microencapsulation of ketoprofen using w/o/w complex emulsion technique[J]. Journal of Microencapsulation, 1996, 1(13): 67-87.

[4] Peniche H, Osario A, Acosta N, et al. Preparation and characterization of superparamagnetic chitosan microspheres: Application as a support for the immobilization of tyrosinase[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2005, 2(98): 651-657.

[5] Omar G, Graciela M. A direct HPLC method to estimate streptomycin and its putative ototoxic derivative, streptidine, in blood serum: Application to streptomycin treated humans[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 43(2): 625-630.

[6] Tobias N, Bernhard S, Heinrich H, et al. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system[J]. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005, 293(1): 483-496.

[7] Theresa M A, Pieter R C. Drug delivery systems: entering the mainstream[J]. Science, 2004, 303(5665): 1818-1822.

[8] Ruxandra G, Patricia Q, Alejandro S, et al. Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid) - poly(ethylene glycol)PEG micro-and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000, 51(2): 111-118.

[9] Elizabeth C, Samir M. Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells: Mechanism and extended circulation[J]. Society for Experimental Biology and Medicine, 2007, 7(232): 958-966.

[10] Chen H T, Kaminski M, Pytel P, et al. Capture of magnetic carriers within large arteries using external magnetic fields[J]. Journal of Drug Targeting, 2008, 16(4): 262-268.

[11] Zhao D L, Zeng X W, Xia Q S, et al. Inductive heat property of Fe_3O_4 nanoparticles in AC magnetic field for local hyperthermia[J]. Rare Metals, 2006, 6(25): 621-625.

(责任编辑:冉明会)

读者·编者·作者

结构式摘要的写作要求

本刊一律采用结构式摘要,具体层次为:目的(Objective)、方法(Methods)、结果(Results)和结论(Conclusion)。具体要求:①目的:需与正文前言相一致,与结论相呼应。②方法:需包括文中所使作的主要方法的名称、病例(动物)数和必要的分组情况。③结果:与研究结论相关的主要结果及数据、统计学意义均应列出,并与文内核实无误。④结论:需与研究目的相呼应。中文摘要一般在 300 字左右,英文则与之相呼应。英文摘要请译出文题,作者姓名(姓的首字母大写,名字的首字母大写)、单位科室名称。

本刊编辑部

2009 年 10 月