技术方法

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000734

氟尿嘧啶中空微球的制备、表征及释药性能

黎 靖[1],魏郁梦[2],杨红茹[3],黄 玉[2],赵 领[2]

(西南医科大学 1. 附属医院肝胆外科,泸州 646000;2. 药学院药剂学教研室,泸州 646000;
3. 附属医院肿瘤科,泸州 646000)

【摘 要】**目的**:制备氟尿嘧啶(fluorouracil,FU)中空微球,并考察其体外释药行为。**方法**:在单因素考察基础上,选择主药 FU(A)、乙基纤维素(ethyl cellulose,EC)(B)和聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone,PVP)(C)为因素,各因素取 3 个水平进行 L9(3³)拉丁正交设计试验,以释放度为指标优化处方工艺。**结果**:基于正交试验释放度指标的综合评分,筛选最佳处方配比为 FU(0.6 g)、EC(1 g)、PVP(0.1 g);优化处方工艺制备的氟尿嘧啶中空微球在 0.5、1、2、4、8、12、24 h 的体外累积释放 3 批的平均百分率分别为(9.88 ± 0.38)%、(14.64 ± 0.09)%、(23.94 ± 0.67)%、(39.21 ± 0.36)%、(57.53 ± 0.83)%、(67.99 ± 0.58)%、(80.34 ± 0.39)%,P 值为 0.001;其体外释药模型为:0~8 h 按一级方程释药[Ln(1−Q)=−0.072 1t−0.563 7,r=0.998 6,P 值为 0.001],8~24 h 按 Higuchi 方程释药(Q=0.102 3$t_{1/2}$+0.398 7,r=0.999 9,P 值为 0.001)。**结论**:制备的 FU 中空微球体外缓释效果良好,有望为 FU 长效制剂的开发奠定基础。

【关键词】氟尿嘧啶;中空微球;释放度;正交实验

【中图分类法】R943 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-03-06

Preparation, characterization and drug release property of fluorouracil hollow microspheres

Li Jing[1], *Wei Yumeng*[2], *Yang Hongru*[3], *Huang Yu*[2], *Zhao Ling*[2]

(*1. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital; 2. Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy; 3. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Southwest Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To prepare fluorouracil(FU) hollow microspheres, and to evaluate its *in vitro* release behavior. ***Methods***: On the basis of single-factor test, three factors[FU, ethyl cellulose(EC) and polyvinylpyrrolidone(PVP)] three-leveled orthogonal experimental design L9(3³) was carried out with the *in vitro* release as marker for optimization. ***Results***: The optimization formulation composed of FU:EC:PVP(0.6:1.0:0.1, w/w)was obtained based on the orthogonal experiment with comprehensive score of the *in vitro* release. Mean cumulative *in vitro* release of three batches of FU hollow microspheres prepared using the optimization formulation at 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h was (9.88 ± 0.38)%, (14.64 ± 0.09)%, (23.94 ± 0.67)%, (39.21 ± 0.36)%, (57.53 ± 0.83)%, (67.99 ± 0.58)%, (80.34 ± 0.39)%, respectively(P=0.001). The *in vitro* release models at 0–8 h and 8–24 h were prescribed by the one-level equation[Ln(1−Q) =−0.072 1 t −0.563 7, r=0.997 3, P=0.001] and Higuchi equation(Q=0.102 3$t_{1/2}$+0.398 7, r=0.999 9, P=0.001), respectively. ***Conclusion***: Perfect sustained release effect is obtained for fluorouracil hollow microspheres in this study. This study would lay the foundation for the development of fluorouracil prolonged action preparation.

【Key words】fluorouracil; hollow microspheres; release rate; orthogonal experiment

氟尿嘧啶(fluorouracil,FU)为抗代谢类抗肿瘤药,临床上广泛用于胃癌肝癌、结直肠癌等消化道恶性肿瘤及其他实体瘤的治疗[1-4],但常产生胃肠道毒性及骨髓抑制等毒副作用,且对肝、肾功能均有损害。为提高药物治疗指数,降低毒副反应[5-6],国内外进行了一系列 FU 的传递系统研究,如微球[7-8],纳米粒[9-10],植入剂[11],丸剂[12],纳米球[13],脂质体等[14]。由于中空微球在胃液中能长时间漂浮,不仅能实现

作者介绍:黎 靖,Email:weilinli268@126.com,
研究方向:肝胆外科治疗的基础与临床研究。

通信作者:赵 领,Email:zhaoling-998@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81341124);四川省科技支撑计划资助项目(编号:2014SZ0071、2014FZ0105)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150805.1537.006.html (2015-08-05)

胃定位给药，还能缓慢释药，因此，中空微球作为多单元给药体系已受到制药界的极大关注[15-16]。

本课题拟以 FU 为模型药物，将其制成 FU 中空微球（FU-HM），以期达到口服生物利用度高，24 h 缓释效果，为 FU 口服定位长效制剂的开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

UV1700PC 紫外分光光度计（上海凤凰光学科仪有限公司）；ZRS-8G 智能溶出试验仪（天大天发溶出仪公司）；SHT 型数显恒温磁力搅拌电热套（北碚区深科玻璃教学仪器厂）；JJ-4 六联数显电动搅拌器（金坛市金城国胜实验仪器厂）；KQ 3200 B 型超声清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；CS1014 型电热鼓风恒温干燥箱（重庆试验设备厂）；FC104 分析天秤（上海精科仪器有限公司）；FU（重庆莱美药业股份有限公司）；乙基纤维素（ethyl cellulose，EC）（上海卡乐康技术有限公司）；聚乙烯吡咯烷酮（polyvinylpyrrolidone，PVP）（ISP TECHNOLOGIES.INC）；其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 FU-HM 的制备 参考课题组方法[10-12]，按处方配比，称取原辅料溶于乙醇和乙醚的混合溶剂，滴加到液体石蜡中，搅拌至有机溶剂挥干，收集微球，用正庚烷洗涤，放入烘箱中低温烘干，得 FU 中空微球成品，并置于阴凉干燥处保存。

1.2.2 紫外吸收波长的确定 精密称取 FU 及处方中各辅料，分别加入无水乙醇制成浓度为 10 μg/ml 的 FU 溶液和空白溶液，于 200~500 nm 波长范围内进行紫外扫描。结果表明 FU 在 204 nm 和 265 nm 处有最大吸收峰，但处方中的辅料只在 266 nm 处无干扰，故选择 265 nm 为本研究的紫外吸收波长。

1.2.3 标准曲线的绘制 精密称取 FU 0.010 g，置于 50 ml 容量瓶中，用无水乙醇溶解并稀释至刻度，得贮备液。精密吸取不同体积贮备液置 10 ml 容量瓶中，用无水乙醇或 0.25%十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS）溶液稀释至刻度，得浓度为 5、10、20、30、40 μg/ml 系列溶液，并以无水乙醇或 0.25% SDS 溶液为空白，于 265 nm 波长处进行紫外吸收度的测定，以吸光度（absorbance，A）值为纵坐标，药物浓度（C）为横坐标进行线性回归处理。

1.2.4 回收率试验 精密称取 0.050 g FU 及其处方配比的辅料，置 10 ml 容量瓶中，用无水乙醇溶解并稀释至刻度，摇匀，滤过，精密取续滤液 1 ml 置 50 ml 容量瓶中，无水乙醇稀释至刻度，从中分别精密取 1、2、3 ml 溶液置 10 ml 容量瓶中，无水乙醇稀释至刻度，制成浓度为 10、20、30 μg/ml FU 溶液，照载药量测定项的方法测定。

1.2.5 精密度试验 精密称取 FU 0.01 g，置 50 ml 容量瓶中，用无水乙醇溶解稀释至刻度，制成 0.200 mg/ml 的储备液；精密取储备液 2.5、5、7.5 ml，置 50 ml 容量瓶，无水乙醇稀释至刻度，制成 10、20、30 μg/ml 的溶液，室温放置于阴暗处，分别经 2、6、12、24、48、72、96 h，在 265 nm 波长处测定吸收值，计算出日内精密度和日间精密度。

1.2.6 载药量的测定 取本品，精密称定，研碎，精密称取适量（约相当于 FU 10.00 mg），用无水乙醇 5 ml 溶解，摇匀，滤过，取续滤液 1 ml 置 50 ml 容量瓶，无水乙醇稀释至刻度，摇匀，取 1 ml 液体置 10 ml 容量瓶中，无水乙醇稀释至刻度，摇匀，在 265 nm 波长处进行紫外吸光度的测定。根据标准曲线计算本品中 FU 的含量。

1.2.7 微球形态的观察 将微球用适量液体石蜡分散后，用光学显微镜观察其形态和分散性；取干燥微球适量均匀分散在样品台，用导电胶把试样粘结在样品座上，置于扫描电镜中观察其形态。

1.2.8 微球漂浮性考察 参考文献[10-11]方法，采用溶出度测试中的小杯法进行体外漂浮性能测试，取 200 个微球其分散在 250 ml 0.25% SDS 释放介质中，温度（37.0 ± 0.5）℃，转速 120 r/min，经 2、12、24 h 时，观察漂浮和沉底的微球个数，根据公式：漂浮率=（微球总数量-沉底的微球个数）/微球总数量 × 100%，计算漂浮率。

1.2.9 释放度检查 取本品，照中国药典（2010 版二部）释放度测定法（附录 XD，第一法），以 0.25%SDS 溶液为释放介质，温度（37.0 ± 0.5）℃，转速 100 r/min，依法操作，经 0.5、1、2、4、8、12、24 h 时，取 5 ml 溶液，用 0.8 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，照紫外分光光度法，在 265 nm 波长处测定 A 值，并计算累计释放度。

1.2.10 正交实验设计 在单因素试验基础上，确定处方中影响产品质量最显著的 3 个因素，即 FU（A）、EC（B）和 PVP（C），各因素均取 3 个水平进行 L9（3^3）拉丁正交设计试验。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件对释放度与时间的相关性以及批间差异性进行分析处理。

2 结 果

2.1 标准曲线及线性关系

结果显示 FU 在无水乙醇或 0.25% SDS 中，1~50 μg/ml 浓度范围内与吸光度呈良好的线性关系，相关系数 R^2 分别为 0.999 6 和 1，结果见图 1 和图 2。

2.2 回收率结果

结果显示该方法的平均回收率达（99.37 ± 0.46）%（n=9），相对标准差（relative standard derivation，RSD）<2.0%。由此可见，该回收率能满足本研究的分析方法测定要求，结果见表1。

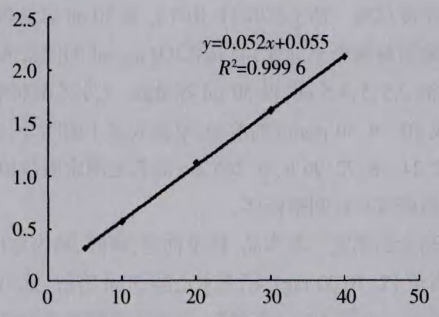


图 1 FU 标准曲线图（无水乙醇稀释）

Fig.1 Standard curve of FU diluted with anhydrous ethanol

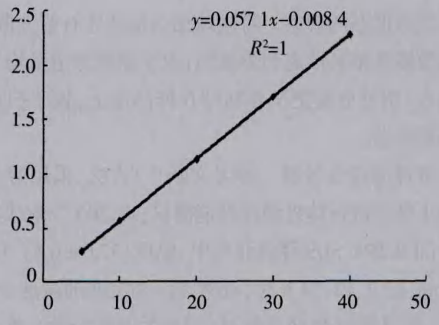


图 2 FU 标准曲线图（0.25%SDS 溶液稀释）

Fig.2 Standard curve ofFU diluted with 0.25%SDS

表 1 回收率试验结果

Tab.1 Results of recovery

次数	浓度 (μg/ml)	实测浓度 (μg/ml)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	1	9.97	99.70		
2	2	9.97	99.70		
3	3	9.95	99.50		
4	4	20.01	100.05		
5	5	20.02	100.10	99.07	1.13
6	6	20.01	100.05		
7	7	29.19	97.30		
8	8	29.29	97.63		
9	9	29.28	97.60		

2.3 精密度结果

结果显示该方法日内、日间低、中、高浓度的精密度 RSD 均<2.0%，由此可见，该方法精密度满足测定要求。

2.4 正交实验结果

以 3 个时间点的累计释放度为指标，优选处方工艺，在 2 h 累积释放率（$D_{2\,h}$）评分，L=|$D_{2\,h}$−35|，在 12 h 累积释放率（$D_{12\,h}$）评分，M=|$D_{12\,h}$−70|，在 24 h 累积释放率（$D_{24\,h}$）评分，N=|$D_{24\,h}$−85|，综合评分 X=L+M+N，其综合评分越低越好，理想值为 0。由表 2 的极差分析结果可见，影响释放度的三因素大小顺序依次为 A>C>B，即 A3B3C1 为最佳处方。

表 2 FU-HM 正交试验结果

Tab.2 Orthogonal experimental design and results of FU-HM

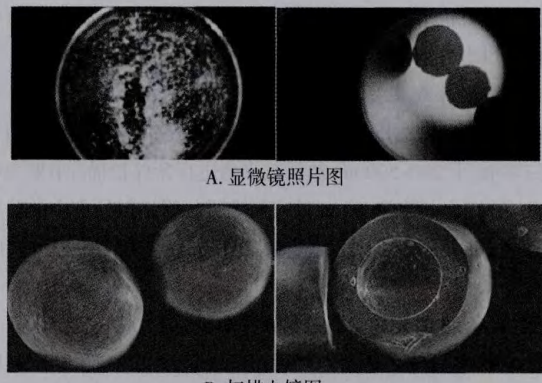
试验号	A	B	C	X[a]
1	1	1	1	4.470
2	1	2	2	45.270
3	1	3	3	−5.740
4	2	1	3	27.460
5	2	2	1	−6.045
6	2	3	2	1.345
7	3	1	2	−7.880
8	3	2	1	−14.805
9	3	3	3	−4.505
K1	44.00	24.05	−16.380	
K2	22.76	24.42	38.735	
K3	−27.19	−8.90	17.215	
R	71.19	33.32	55.115	

注：a，L=|$D_{2\,h}$−35|，M=|$D_{12\,h}$−70|，N=|$D_{24\,h}$−85|，综合评分 X=L+M+N，其综合评分越低越好，理想值为 0

2.5 优选处方的验证

采用 3.4 中所确定的处方工艺制备 3 批样品，并进行相关制剂学评价。

2.5.1 形态确定 取适量 FU-HM，在显微镜和扫描电子显微镜下确证其形态，由图 3 可见，FU-HM 外观呈球形，易于分散，球表面基本光滑，内有中空结构。



A. 显微镜照片图

B. 扫描电镜图

图 3 FU-HM 形态图

Fig.3 Morphology of FU-HM

2.5.2 载药量和漂浮性测定结果 结果显示 3 批 FU-HM 载药量及漂浮性的变异系数（coefficient of variation，CV）均小于 10%，P 值均大于 0.05，表明 3 批样品的载药量及漂浮性批间未见统计学差异，由此提示，该优化的最佳方案重现性良好，结果见表 3。

2.5.3 体外释放度考察 结果显示该中空微球存在快速释放和缓慢释药行为，3 批样品释放度重现性良好，且 0~8 h 的体外释药动力学符合一级方程（r=0.997 3，P=0.001），8~24 h 体外释药动力学符合 Higuchi 方程（r=0.999 9，P=0.001），结果见图 4 和表 4。

表 3 3 批样品载药量和漂浮性结果（n=3）

Tab.3 Results of drug loading and floating ratio of three batches of samples（n=3）

No	载药量(%)	漂浮性(2 h)(%)	漂浮性(12 h)(%)	漂浮性(24 h)(%)
20110101(1)[a]	31.53 ± 0.04	98.67 ± 0.47	98.33 ± 0.94	96.00 ± 0.86
20100102(2)[b]	31.50 ± 0.01	99.00 ± 0.00	98.33 ± 0.47	95.67 ± 1.25
20100103(3)[c]	31.52 ± 0.04	98.33 ± 0.47	98.00 ± 0.82	95.67 ± 1.67
(CV)(1) vs. (2)	0.06	0.33	0.00	0.17
(CV)(1) vs. (3)	0.55	0.17	0.17	0.17
(CV)(2) vs. (3)	0.62	0.51	0.17	0.00
$\bar{P}$	0.619	0.729	0.885	0.958

注：a,20110101；b,20110102；c,20110103

表 4 FU-HM 释放动力学模型结果

Tab.4 Results of in vitro release kinetic model of FU-HM

		方程	相关系数 r	P 值
零级方程	0~8 h	Q=6.468 7 t+9.195 0	0.990 3	0.001
	8~24 h	Q=1.826 6 t+39.503 0	0.990 4	0.127
一级方程	0~8 h	Ln(1-Q)=-6.468 7 t+90.805 0	0.997 3	0.001
	8~24 h	Ln(1-Q)=-0.072 1 t-0.563 7	0.998 6	0.001
Higuchi方程	0~8 h	$Q=12.937\ 0\ t_{1/2}+9.195\ 0$	0.993 3	0.001
	8~24 h	$Q=0.102\ 3\ t_{1/2}+0.398\ 7$	0.999 9	0.001

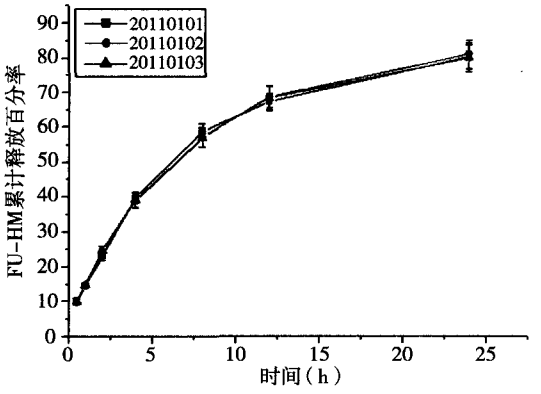


图 4 FU-HM 体外释放曲线图（$\bar{x} \pm s$,n=6）

Fig.4 *In vitro* release profile of FU-HM（$\bar{x} \pm s$,n=6）

3 讨 论

本文参考课题组前期研究工作基础上[17-18]，首先通过单因素试验考察，确定了影响 FU-HM 体外释放行为的 3 大因素，即主药 FU(A)、EC(B)和 PVP(C)，再采用进行 L9(3^3)拉丁正交设计试验，以体外释放度为指标，筛选确定了最佳处方配比为 FU(0.6 g)、EC(1 g)、PVP(0.1 g)。经 3 批次的优化处方的验证，结果表明该处方工艺确为最佳试验方案。本文主要对此给药系统进行体外研究，今后将进一步考察其稳定性和体内生物等效性。

基于 FU-HM 体外释放曲线为前段稍快，后端稍慢，为了更好理解其 24 h 内体外释放行为，本文将其进行分段拟合，FU-HM 0~8 h 的体外释药动力学符合一级方程(r=0.997 3)，8~24 h 体外释药动力学符合 Higuchi 方程(r=0.999 9)。总之，本文研制的 FU-HM 体外漂浮性良好，24 h 缓慢释药，将为 FU 长效缓释制剂的开发提供实验依据。

参 考 文 献

[1] Lee SJ,Sohn TS,Lee J,et al. Adjuvant chemoradiat-ion with 5-fluorouracil/leucovorin versu S-1 in gastriccancer patients following D2 lymphnode dissection surgery:a feasibility study[J]. Anticancer Res,2014,34 (11):6585-6591.

[2] Jiang JX,Gao S,Pan YZ,et al. Overexpression of microRNA-125b sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to 5-fluorouracil through inhibition of glycolysis by targeting hexokinase Ⅱ[J]. Mol Med Rep,2014,10(2):995-1002.

[3] Mhaidat NM,Bouklihacene M,Thorne RF. 5-Fluorouracil induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C-δ[J]. Oncol Lett,2014,8(2):699-704.

[4] Ge ZH,Wang ZX,Yu TL,et al. Morphine improved the antitumor effects on MCF-7 cells in combination with 5-Fluorouracil[J]. Biomed Pharmacother,2014,68 (3):299-305.

[5] Latchman J,Guastella A,Tofthagen C. 5-fluorouracil toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase enzyme:Implications for practice[J]. Clin J Oncol Nurs,2014,18(5):581-585.

[6] Pi C,Wei Y,Yang H,et al. Development of HPLC method of 5-flu-

技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000872

不可逆性电穿孔对山羊肝脏靶区内血管结构的影响

刘 颖[1],熊正爱[2],李成祥[3],姚陈果[3],姜 蓉[4]

(1. 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010;3. 重庆大学输配电装备及系统安全与新技术国家重点实验室,重庆 400030;4. 重庆医科大学干细胞与组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨不可逆性电穿孔(irreversible electroporation, IRE)对消融区域内血管结构的影响。**方法**:固定脉宽 100 μs,频率 1 Hz,电压 2 000 V,脉冲数 120 个,彩色超声探头引导电极针经皮选择血管区域消融山羊肝脏组织,处理后 24 h 复查超声了解消融区内血管二维超声及多普勒血流影像学变化。对消融区内血管以及周边肝脏组织取材,行 HE 及 Masson 染色,通过组织病理学方法评价组织损伤情况。**结果**:IRE 作用范围区域内肝脏组织被完全消融,而大体标本显示血管结构完好,超声影像提示消融区内直径为 2.47 mm 的血管连续性完整,走行清晰,彩色多普勒血流显像(color doppler flow imaging,CDFI)可以观察到血管内彩色多普勒血流频谱。血管组织学染色示内皮细胞连续性完好,血管周围胶原纤维、血管平滑肌结构完整。**结论**:IRE 消融后靶区内肝脏小动脉、小静脉及肝内胆管结构无损伤,从而为生长在大血管周围、手术进行有困难的肿瘤消融提供可能。

【关键词】脉冲电场;不可逆性电穿孔;肝脏;血管

【中图分类号】R575 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2015-12-15

作者介绍:刘 颖,Email:84642002@qq.com,
研究方向:肿瘤物理治疗;

通信作者:熊正爱,Email:docxza@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81201745),重庆市教委科学技术研究资助项目(编号:KJ1400223)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160224.1438.002.html (2016-02-24)

orouracil in plasma:application to pharmacokinetics and steady state concentration monitoring[J]. Int J Clin Pharmcol Ther,2014,52(12):1093-1101.

[7] Lin Y,Li Y,Ooi CP. 5-Fluorouracil encapsulated HA/PLGA composite microspheres for cancer therapy[J]. J Mater Sci Mater Med,2012,23(10):2453-2460.

[8] Shalin PT,Ajit PR,Shivayya SA. Inter-polymer complex microspheres of chitosan and cellulose acetate phthalate for oral delivery of 5-fluorouracil[J]. Poly Bull,2014,71(8):2113-2131.

[9] Cheng M,Liu Z,Wan T,et al. Preliminary pharmacology of galactosylated chitosan/5 -fluorouracil nanoparticles and its inhibition of hepatocellular carcinomaa in mice[J]. Cancer Biol Ther,2012,13(14):1407-1416.

[10] Shakeri-Zadeh A,Shiran MB,Khoee S,et al. A new magnetic nanocapsule containing 5-fluorouracil:In vivo drug release,antitumor, and proapoptotic effects on CT2- 6 cells allograft model[J]. J Biomater Appl,2014,29(4):548-556.

[11] Bai DS,Jin SJ,He R,et al. Granuloma induced by sustainned-release fluorouracil implants misdialgnosed as a hepatic tumor:A case Report[J]. Oncol Lett,2014,8(2):742-744.

[12] Kulthe SS,Bahekar JK,Godhani CC,et al. Modulated release of 5-fluorouracil from pH-sensitive and colon targeted pellets:an industrially Feasible app- roach[J]. Drug Dev Ind Pharm,2013,39(1):138-145.

[13] Cirillo G1,Iemma F,Puoci F,et al. Imprinted hydrophilic Nanospheres as drug delivery systems for 5-fluorouracil sustained release[J]. J Drug Target,2009,17(1):72-77.

[14] Hitzman CJ,Elmquist WF,Wattenberg LW,et al. Development of respirable,sustained release microcarrier for 5-fluorouracil I:In vitro assessment of l-iposomes,microspheres,and lipid coated nanoparticles [J]. J Pharm Sci,2006,95(5):1114-1126.

[15] Wu PC,Huang YB,Chang JS,et al. Design and evaluation of sustained release microspheres of potassium chloride prepared by Eudragit [J]. Eur J Pharm Sci,2003,19(2-3):115-122.

[16] Wei YM,Zhao L. In vitro and in vivo evaluation of Ranitidine Hydrochloride loaded hollow microspheres in rabbits[J]. Arch Pharm Res, 2008,31(10):1369-1377.

[17] Zhao L,Wei YM,Yu Y,et al. Polymer blends used to prepare nifedipine loaded hollow microspheres for a floating-type oral drug delivery system:in vitro evaluation[J]. Arch Pharm Res,2010,33(3):443-450.

[18] 魏郁梦,赵 领,索国清,等. 肠道用药物的中空微球载体的制备方法[P]. 发明专利号:ZL200610095105.5

(责任编辑:张辉洁)