DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.008
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2181-04

论著

卡铂-乳酸/羟基乙酸共聚物微囊制备的优化筛选

应 懿,周世文,汤建林,黄永平,徐 颖 (第三军医大学附属新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提 要:目的 优化卡铂-乳酸/羟基乙酸共聚物微囊的制备工艺。方法 采用乳化-溶剂挥发法制备载药微囊,单因素试验初选影响粒径和包封率的主要因素和范围,以155均匀设计表优选提高包封率和控制粒径分布的实验条件,并进行结果预测及验证。结果 卡铂/载体投料比、载体浓度、内/外相体积比对微囊包封率和粒径影响显著。优化条件所得微囊形态圆整、均匀,平均粒径(14.25±3.52)μm,平均载药量(6.81±0.04)%,平均包封率(74.13±0.56)%(n=3)。结论 本制备工艺优化合理,重现性良好。

关键词:卡铂;乳酸/羟基乙酸共聚物;微囊;均匀设计
中图法分类号:R943;R944.9;R979.1 文献标识码:A

Optimized screening method for preparation of carboplatin poly(D,L-lactide/glycolide) microcapsules

YING Yi, ZHOU Shi-wen, TANG Jian-lin, HUANG Yong-ping, XU Ying (Base for Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To optimize the technological procedure for preparation of carboplatin poly(D,L-lactide/glycolide) microcapsules. Methods Drug-loading microcapsules were prepared by emulsion-solvent evaporation technique. Various factors influencing the drug loading, incorporation efficiency and particle size were studied. The uniform experimental design was chosen to optimize the technology for preparation of microcapsules. Results Variables that influenced the microencapsulation and particle size were: ① the drug/polymer ratio; ② the polymer concentration; ③ the volume ratio of the dispersed and continuous phases. The average diameter of the optimized microcapsules was (14.25±3.52)μm, the drug loading and incorporation efficiency (6.81±0.04)% and (74.13±0.56)% (n=3), respectively. Conclusion The reproducibility of the optimized preparation procedure is good.

Key words: carboplatin; poly(D,L-lactide/glycolide); microcapsules; uniform experimental design

卡铂(Carboplatin,CBP)为非小细胞肺癌化疗首选药。临床观察:静脉多次化疗给药后,全身毒副作用多(如:骨髓抑制,肾毒性,耳毒性)。通过改变药物的剂型来增强药物靶向性,减轻对正常组织的毒副作用,是研究提高抗癌药物疗效的热点。文献[1]报道,正常和肿瘤组织毛细血管内皮细胞间的连接差异性和肺组织的生理特性为药物-载体共聚物被动靶向肿瘤组织提供了理论基础。本实验选用生物降解型高分子材料乳酸/羟基乙酸共聚物[Poly (D,L-lactide/glycolide),PLGA]为载体,采用乳化-溶剂挥发法[2~8]制备载药微囊(CBP-PLGA-MC),就其制备条件进行优化筛选。

作者简介:应 懿(1974—),女,浙江省绍兴市人,硕士研究生,医师,主要从事新药临床试验方面的研究。电话:(023)68774761
通信作者:周世文,电话:(023)68755311
收稿日期:2003-05-09;修回日期:2003-09-05

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

磁力搅拌器(北京),电热恒温真空干燥箱(上海),UV-2201分光光度仪(日本),Olympus-BH2光学显微镜(日本),AMRAY-1000B扫描电镜(美国)。

卡铂(云南省昆明贵金属研究所,含量99.5%),卡铂标准品(中国药品生物制品检定所,批号:10322-0101),PLGA(50∶50,η_{sp}=0.39,中国科学院成都分院有机化学研究所),其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 空白微囊筛选试验

光镜观察不同搅拌速度,乳化和挥发温度,挥发时间条件下,空白微囊的成球情况。

1.3 络合分光光度法[9]测定卡铂含量

1.3.1 确定检测波长 可见-紫外分光光度仪扫描观察卡铂的最大吸收波长,同时取空白微囊消化后扫描观察。

1.3.2 标准曲线 配制系列浓度卡铂标准对照品溶液,络

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

合反应后测定吸光度值。以浓度 C 对吸光度 *A* 回归。

1.3.3 空白微囊对回收率的影响 称取 10.00、20.00、30.00 mg 不同量空白微囊，分别加入 0.20 mg 卡铂标准品，平行 2 份。振摇溶解微囊，考察不同背景回收率。

1.3.4 振摇时间对卡铂溶出的影响 称取适量载药微囊，37 ℃、100 r/min 恒温振摇溶解 6～24 h，比较微囊的卡铂含量。

1.3.5 回收率试验 称取空白微囊(20.00±0.12) mg，分别加入不等量卡铂标准品溶液，考察 5.0、15.0、25.0 mg/L 不同浓度的卡铂回收率。

1.3.6 测定方法 称取适量载药微囊，加入 1 ml 氯仿，振摇 10 h，超纯水萃取，过滤，取续滤液并以蒸馏水稀释至 2 ml，加入含 1.2 mol/L 氯化亚锡的盐酸溶液 2 ml，混匀，25 ℃络合反应 50 min 后于波长 394 nm 处测定 *A* 值，按标准曲线方程和稀释倍数计算微囊的卡铂含量。包封率按照微囊的实际含药量占理论含药量的百分比计算。

1.4 单因素试验

采用显微计数法计数 500 个微囊，观察载药微囊的粒径及粒度分布。分别考察不同内相溶剂比(乙腈∶水 1∶0～0.84∶0.16)，PLGA 浓度(2.5%～20%)，内/外相体积比(1∶60～1∶5)，CBP/PLGA 投料比(1∶10～2∶10)，乳化剂浓度(1.0%～3.0%)，乳化时间(5～90 min)，挥发时间(6～24 h)对载药微囊粒径、含药量和包封率的影响。

1.5 均匀设计试验

据单因素试验结果，以 155 均匀设计表[10]优选提高药物包封率和控制粒径分布的实验条件。因素 A (PLGA 浓度)，C (CBP/PLGA 投料比)，D (乳化剂浓度)，E (乳化时间)各分 5 水平，B (内/外相体积比)分 4 水平，按拟水平原则安排试验。平行试验 3 次。观测 500 个微囊，按 6～20 μm 微囊所占比例评分。实验结果 Y=1+2(1=平均包封值/100，2=平均粒径评分/100)。选用医用统计软件 SPMR 分析试验数据。

1.6 优化预测及验证试验

根据多元逐步回归分析结果，确定制备载药微囊的优化条件，并进行目标量的 95%区间估计。按优化条件平行试验 3 次。扫描电子显微镜观察载药微囊表面形态。

1.7 统计学方法

选用医用统计程序包 SPMR 对均匀设计试验结果进行多元逐步回归分析。

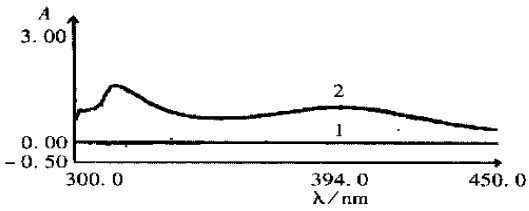
2 结果

2.1 空白微囊筛选试验

PLGA-乙腈溶液(内相)在(850±10) r/min 搅拌速度下，滴加入含有乳化剂的液体石蜡液(外相)，低温(4～5 ℃)乳化，然后将体系温度渐升至 35 ℃，挥发 6 h，*n*-已烷(20 ml/次)洗涤 3 次，收集，室温减压干燥 48 h，得白色疏松状粉末。光镜下，微囊粒径 70%以上的在 15～30 μm 之间，分散性较好，集结少。

2.2 微囊的含量测定

2.2.1 确定检测波长 采用络合分光光度法。卡铂与氯化亚锡络合，在 394 nm 处有最大吸收波长。溶剂和辅料对卡铂吸收峰无明显影响，见图 1。



1: PLGA-MC; 2: CBP-PLGA-MC

图 1 空白微囊和卡铂微囊的紫外扫描光谱图

Tab 1 Ultraviolet spectrogram of CBP-PLGA-MC and PLGA-MC

2.2.2 标准曲线 回归方程：$A=0.036\,3C+0.022\,4$ ($r=0.999\,2$，$n=6$)，卡铂在 2.5～25.0 mg/L 范围内线性关系好，最低检出限 4.1 mg/L。

2.2.3 空白微囊对回收率的影响 10.0～30.0 mg 空白微囊平均回收率 97.97±0.73%，背景对测定无干扰。在测定时取中间值 20.00 mg。

2.2.4 振摇时间对卡铂溶出的影响 振摇 10 h 药物已完全溶出。

2.2.5 回收率试验 低、中、高浓度回收率分别为 92.91%、97.33%和 98.71%，平均回收率为(96.32±3.14)%。

2.3 单因素试验

2.3.1 内相溶剂比 水的体积比增加，粒径增大至 25～45 μm (70%以上)，不规则囊形增多；含药量为 2.47%～2.64%，包封率为 51.92%～55.24%。故以无水乙腈为内相溶剂。

2.3.2 PLGA 浓度 2.5%增加到 12.5%时，粒径增大至 25～45 μm，含药量增加(2.13%～3.17%)，包封率增加(46.25%～66.08%)。≥15%时，微囊成球性差。因此，PLGA 浓度在 5%～12.5%为宜。

2.3.3 内/外相体积比 1∶5 时，不能分散成囊；1∶40～1∶10 时，粒径增大至 15～30 μm，含药量增加(2.58%～3.12%)，包封率增加(53.86%～65.45%)；≤1∶50 微囊产率低于 50%。因此，内/外相体积比在 1∶40～1∶10 为宜。

2.3.4 CBP/PLGA 投料比 0.4∶10 增加至 1∶10 时，含药量增加(2.25%～6.51%)，包封率下降(83.59%～73.11%)，粒径增大为 20～30 μm；1∶10～1.4∶10 时，含药量为 6.51%～6.63%，包封率下降至 55.64%；投料比为 1.6∶10 时，微囊包封率明显降低(47.14%)。因此，CBP/PLGA 投料比在 1∶10～1.4∶10 为宜。

2.3.5 乳化剂浓度 1.0%增加到 3.0%时，微囊粒径逐渐减小至 2～15 μm，含药量和包封率无明显影响。因此，乳化剂浓度在 1.5%～2.5%为宜。

2.3.6 乳化时间 5 min 时，粒径分布宽(5～40 μm)，不规则囊形多；15～60 min，粒径 10～20 μm，大小均匀，多数微囊呈圆形；60～90 min 时，粒径分布无明显变化。在 5～90 min 范围内，微囊含药量和包封率影响小。因此，乳化时间在 15～60 min 为宜。

2.3.7 挥发时间 6～24 h 对微囊粒径，含药量和包封率无明显影响。因此，挥发 6 h 为宜。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　均匀设计试验

指标预测值与实测值的最大相对百分误差小于 6%, 说明实验条件比较稳定, 误差较小, 见表 1。各因素间的相关系数绝对值均未超过临界值($r_{0.05,13}=0.514$), 提示试验数据可以进行多元逐步回归计算, 见表 2。

表 1　均心设计试验安排及结果

Tab 1　Results of uniform experiment

No.	Factor level					Target calculation		Relative errors(%)
	A	B	C	D	E	Y	Y0	
1	1(0.05)	4(0.025)	7(0.120)	11(2.2)	13(60)	0.6352	0.6305	0.74
2	2(0.05)	8(0.033)	14(0.140)	7(2.0)	11(50)	0.5547	0.5519	0.50
3	3(0.05)	12(0.050)	6(0.110)	3(1.6)	9(40)	0.6513	0.6869	−5.47
4	4(0.07)	1(0.025)	13(0.140)	14(2.4)	7(40)	0.5735	0.5633	1.78
5	5(0.07)	5(0.033)	5(0.110)	10(2.2)	5(30)	0.6761	0.6930	−2.50
6	6(0.07)	9(0.050)	12(0.130)	6(1.8)	3(20)	0.6112	0.6197	−1.39
7	7(0.09)	13(0.100)	4(0.110)	2(1.6)	1(20)	0.7769	0.7487	3.63
8	8(0.09)	2(0.025)	11(0.130)	13(2.4)	14(60)	0.6214	0.6211	0.05
9	9(0.09)	6(0.033)	3(0.100)	9(2.0)	12(50)	0.7752	0.7508	3.15
10	10(0.11)	10(0.050)	10(0.130)	5(1.8)	10(50)	0.6783	0.6520	3.88
11	11(0.11)	14(0.100)	2(0.100)	1(1.6)	8(40)	0.8142	0.8065	0.95
12	12(0.11)	3(0.025)	9(0.120)	12(2.2)	6(30)	0.6973	0.6789	2.64
13	13(0.13)	7(0.033)	1(0.100)	8(2.0)	4(30)	0.7626	0.7831	−2.69
14	14(0.13)	11(0.050)	8(0.120)	4(1.8)	2(20)	0.6908	0.7098	−2.75
15	15(0.13)	5(0.100)	15(0.140)	15(2.4)	15(20)	0.6334	0.6560	−3.57

表 2　均匀设计表相关系数矩阵

Tab 2　Matrix of correlation coefficients

Factor	A	B	C	D	E
A	1.000				
B	0.375	1.000			
C	−0.167	−0.128	1.000		
D	0.000	−0.462	0.500	1.000	
E	−0.441	−0.493	0.068	0.238	1.000

试验结果进行多元逐步回归计算得: $Y=1.0754+0.8063X_1+0.5904X_2-4.1663X_3$, $n=15$, $R=0.9664$, $F=51.8693$, $s=0.0224$

查 F 临界值表, $F_{0.05,3,11}=3.59$, 回归方程显著($P<0.05$)。

影响卡铂微囊粒径和包封率的主要因素依次是因素 C (CBP/PLGA 投料比), 因素 A(PLGA 浓度)和因素 B(内/外相体积比)。因素 C 对包封率影响显著, 回归系数为负, 因此在工艺优化时取低值有利; 因素 A, B 的系数为正, 表明在取值范围内取上限为好; 因素 D、E 在多元逐步回归计算时被剔除, 将其视为常量处理。

2.5　优化制备条件

最佳制备条件: PLGA 浓度 12%, 内/外相体积比为 1∶15, CBP/PLGA 投料比 1∶10, 乳化剂浓度 2%, 乳化时间 30 min, 搅拌速度(850±10)为 r/min, 挥发 6 h, 室温减压干燥 48 h。指标预测值 Y^0 的 95%估计区间为 0.7510～0.8388。平行试验 3 次, 实测值 Y 分别为 0.8259、0.8151 和 0.8229, 在理论预报范围内。微囊平均产率(71.45±2.14)%, 平均粒径(14.25±3.52)μm, 6～20 μm 范围内的微囊占总数的 78.53%, 含药量(6.81±0.04)%, 包封率(74.13±0.56)% ($n=3$)。光镜观察见图 2。扫描电镜观察可见多数微囊外观圆整、大小均匀、少数微囊表面有结晶, 见图 3。

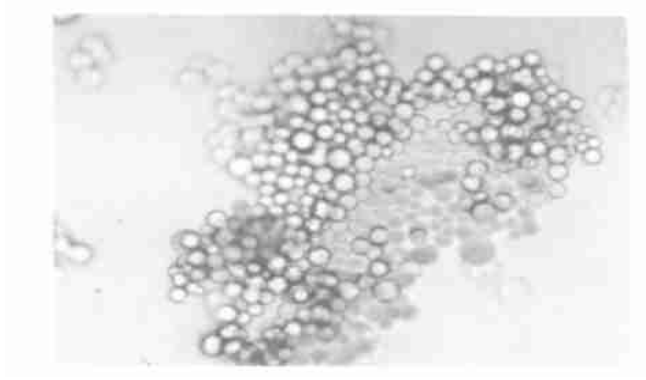


图 2　卡铂微囊光镜图(× 200)

Fig 2　Microphotograph of CBP-PLGA-MC(× 200)

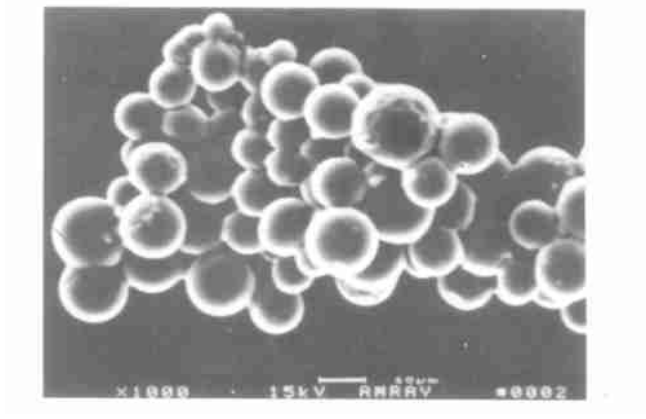


图 3　卡铂微囊的扫描电镜图(× 1 000)

Fig 3　Scanning electron micrograph of CBP-PLGA-MC(× 1 000)

3　讨论

制备水微溶性药物(卡铂)时, 采用传统的 o/w 法, 药物易从有机相转入水相, 导致微囊低载药量甚至不载药; 采用 w/o/w 复乳法, 因 w/o 初乳中内水相体积增加, 使油相 PLGA 层变薄, 药物扩散率增加, 导致微囊包封率降低[11]。我们选用 o/o 法制备卡铂微囊, 由于药物不溶于外油相, 显著降低了药物的扩散, 得到较高的载药量和包封率。为提高载药量, 内相按不同体积乙腈:水制备载药微囊, 以无水乙腈为内相溶剂所得微囊圆整、均匀, 粒径分布集中。

单因素试验筛选是整体优化设计的必要前提, 提示了影响微囊粒径、含药量和包封率的主要因素。随着 PLGA 浓度增加, 内相的粘度增加, 包封率增加, 微

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

囊粒径增大，但内相过于粘稠，不能分散成囊。CBP/PLGA 投料比也明显影响微囊的含药量和包封率，随着卡铂投量增加，微囊含药量增加，药物包封率较高；本实验结果说明当 CBP∶PLGA 在 1∶10～1.4∶10 之间，微囊含药量基本达到平稳，当比例等于和大于 1.6∶10 时，含药量变化不大，药物包封率明显降低，考虑是药物加入量超过了囊材所能包封的临界值。因此，选择适宜的投药比例不仅能实现预期目标，而且能避免药物的无效损耗。

选用 155 均匀设计法筛选优化条件，依据包封率和粒径分布两项指标综合考察，用较少的试验达到了定量描述制备过程的目的。多元逐步回归分析结果提示 PLGA 浓度，内/外相体积比，CBP/PLGA 投料比是影响微囊粒径分布和包封率的主要因素。根据定量方程所优化的实验条件制备微囊，实验结果在在理论预报范围内，高于均匀设计试验表中的最高值(0.8142)，优化设计成功。

参考文献：

[1] Seymour L W. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates[J]. Ther Drug Carrier Sys, 1992, 9(2): 135－187.
[2] Rajeev A. The manufacturing techniques of various drugs loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) devices[J]. Biomaterials, 2000, 21(23): 2475－2490.
[3] Lee J, Park T G, Choi H. Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method[J]. Int J Pharm, 2000, 196(1): 75－83.
[4] Mitsuko T, Yoko Y, Aki Y, *et al*. A novel sustained-release formulation of insulin with dramatic reduction in initial rapid release[J]. J Controlled Release, 2002, 79(1-3): 81－91.
[5] Patrick B O Donnell. James W. Influence of processing on the stability and release properties of biodegradable microspheres containing thioridazine hyrochloride[J]. Eur J Pharm, 1998, 45(1): 83－94.
[6] Arshady R. Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: polylactides and related polyesters[J]. J Controlled Release, 1991, 17(1): 1－22.
[7] Keating S, Mccarron P A, Woolfson A D. Preparation of nanoparticles with enhanced loading of 5-fluorouracil[J]. J Pharm Pharmcol, 2000, 52(Suppl): 4.
[8] Joachim H, Roland B. Biodegradable, somatostain acetate containing microspheres prepared by various aqueous and non-aqueous solvent evaporation methods[J]. Eur J Pharm, 1998, 45(1): 75－82.
[9] 主 皓，蒋雪涛，杨悦武，等. 白蛋白微球中卡铂的络合分光光度测定方法的研究[J]. 药物分析杂志，1995，15(1)：41－43.
[10] 李瑞雪. 均匀设计在药物研究开发中的应用[M]. 成都：四川科学出版社，2000. 7－179，240－285.
[11] Uchide T, Nganeya N, Sakakibara S, *et al*. Preparation and characterization of polylactide microspheres containing bovine insulin by w/o/w emulsion solvent evaporation method[J]. Chem Pharm Bull, 1997, 45(1): 15－39.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)24-2184-01

颈内静脉穿刺置管致心率呼吸减慢 1 例

A case report of sudden drop in heart rate and respiratory rate during internal jugular vein indwelling catheter

宋 爽[1]，石 彦[2]，陈显春[1]（第三军医大学附属西南医院：[1] 乳腺疾病中心；[2] 普通外科，重庆 400038）

患者，女性，43 岁，因患左乳癌拟手术。查胸片正常，心电图示：窦性心率，心率 70 次/min，正常心电图，否认心肺疾病史。手术前 1 天行颈内静脉穿刺置管术。取肩部稍垫高头后仰并偏左侧卧位，常规消毒铺无菌巾，0.75% 利多卡因局麻，选取中位颈内静脉穿刺点(即胸锁乳突肌胸骨头和锁骨头的交角处)，5 ml 空针试穿成功后，颈内静脉穿刺针按试穿方向及深度行颈内静脉穿刺置管，当置管 14 cm 准备固定时，患者突然发生眼球上翻，口唇青紫，呼吸减慢至 4～6 次/min，心率减慢至 30 次/min，呼之不应。立即予以胸外心脏按摩，口对口人工呼吸，同时迅速固定颈内静脉导管，并经该管道予肾上腺素 1 mg、尼克刹咪 0.375 g 静推。约 2 min 后患者心率恢复至 80 次/min，呼吸恢复至 16 次/min，面色转为红润，神志恢复正常。

继续观察 2 h 后患者病情平稳，未诉不适，自行走回病房。次日正常手术，术后痊愈出院。

讨论

颈内静脉穿刺置管术的穿刺位置有高位、中位、低位三种[1]，以中位穿刺技术最常用，原因是该位置容易确定，该种穿刺技术所引起气胸、动脉误伤、颈上神经节损伤等并发症的机会最少，较为安全。但选用此位置穿刺，在操作过程中，术者从

（下转 2188 页）

作者简介：宋 爽(1976－)，女，山东省烟台市人，护士。电话：(023)68754150
收稿日期：2003-07-13；修回日期：2003-10-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net