DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.021

文章编号:1000-5404(2000)03-0253-04

论著

阿昔洛韦-乙交酯-丙交酯共聚物毫微粒制备工艺的优化选择

徐 颖,周世文 (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:筛选制备阿昔洛韦-乙交酯-丙交酯共聚物毫微粒(ACV-PLGA-NP)的优化工艺。方法:单因素试验初选制备ACV-PLGA-NP的pH值范围、聚乙烯醇(Polyvinyl alcohol, PVA)浓度范围、PLGA分子量、药物及丙酮浓度范围。按均匀设计表设计实验,进行结果预测及验证。结果:优化工艺与PLGA分子量及丙酮浓度无关,pH值为1.5,PVA浓度为50 mg/ml, ACV浓度为0.8 mg/ml。按优化条件制备的ACV-PLGA-NP平均包封率为61.00%,载药量为6.79%。结论:按照均匀设计法优选的条件制备ACV-PLGA-NP,其目标量在预测值范围内。

关键词 阿昔洛韦;乙交酯-丙交酯共聚物;毫微粒;均匀设计
中图法分类号 R94 文献标识码 A

Optimization of the technological process to prepare acyclovir poly (DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles

XU Ying, ZHOU Shi-wen (Base of Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Objective: To optimize the technological process for the preparation of acyclovir poly (DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles (ACV-PLGA-NP). Methods: The range of pH value, the concentration were preliminarily determined with single factor test. ACV-PLGA-NP was prepared with spontaneous emulsification solvent diffusion and the 5 factors and 9 levels for the preparation of ACV-PLGA-NP were selected with uniform design $U_9(9^6)$ test. Results: The molecular weight of PLGA and the concentration of acetone were not related to the optimization of the technological process. The pH value was 1.5, the concentration of PVA was 50 mg/ml and the concentration of ACV was 0.8 mg/ml. Using these conditions, a white colloidal solution was obtained, in which the drug loading was 6.79% and drug embedding ratio was 61.00%. Conclusion: The target variables of ACV-PLGA-NP prepared with the optimized technological process are within the predicted limits.

Key words acyclovir; poly(DL-lactic-co-glycolic acid); nanoparticle; uniform design

研究证明,毫微粒具有明显的肝脏靶向性和体内延效作用[1,2]。核苷类抗病毒药阿昔洛韦(ACV)对乙型肝炎病毒有抑制作用[3]。但ACV水溶性较差,肝脏分布少。为了提高ACV在肝脏内的浓度,将其包封于高分子载体中,制成聚合物毫微粒(纳米级的颗粒,NP)。本研究选用可在体内生物降解的乙交酯-丙交酯共聚物(PLGA)[4,5]为药物载体制备ACV-PLGA-NP,就其制备工艺的优化选择进行研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

PLGA由中国科学院成都有机所合成,PVA购自Sigma公司,药用ACV购自上海第六制药厂,ACV对照品购自中国药品生物制品检定所,Sartorius电子天平,磁力加热搅拌器,Olympus光学显微镜,Hitachi超速冷冻离心机,Shimadzu紫外分光光度计,Millipore超纯水机,JEM透射电镜,AMRAY扫描电镜,电导率仪。

1.2 载药工艺的选择

根据下列公式计算ACV-PLGA-NP的包封率(AR)和载药量(DL):

作者简介:徐 颖(1971.8),女,江苏省江宁县人,硕士,药师,主要从事靶向制剂方面的研究。电话:(023)68755311

收稿日期:1999-07-01;修回日期:2000-01-06

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$AR=\frac{W-Ws}{W}\times 100\%$$

$$DL=\frac{W-Ws}{W_{PLGA}}\times 100\%$$

W: ACV 加入量; Ws: 上清液中 ACV 的量; W_{PLGA}: PLGA 加入量。

ACV 分别加入到有机相或者是水相中制备 ACV-PLGA-NP。选择适当溶剂溶解 ACV-PLGA-NP。

1.3 单因素试验初选制备工艺

1.3.1 载药毫微粒制备方法[6] PLGA 中加入二氯甲烷和丙酮,得混溶液; ACV 的水溶液用 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值,电磁搅拌下加入上述混溶液,继续搅拌 4 h, 0.1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,再搅拌 0.5 h。

1.3.2 分别选择不同的 pH 值, PVA 浓度, ACV 及 PLGA 浓度, PLGA 分子量和丙酮加入量制备 ACV-PLGA-NP, G3 玻砂漏斗抽滤,超速冷冻离心,测定上清液的紫外吸收值。

1.4 均匀设计法优选制备工艺

1.4.1 因素和水平的确定及实验表的安排 据文献及单因素试验结果,制备 ACV-PLGA-NP 时影响其粒径分布及载药性能的主要因素是: pH 值(X_1)1-6、PLGA 分子量(X_2)20 000 及 50 000、PVA 浓度(X_3)10 ~ 50 mg/ml、ACV 浓度(X_4)0.4 ~ 0.8 mg/ml、丙酮浓度(X_5)0.05 ~ 0.45 ml/ml,各取 9 水平, PLGA 分子量采用拟水平法,见表 1。按均匀设计表 $U_9(9^6)$设计试验,见表 2。

表 1 因素水平表

Tab 1 Factors and levels

Levels	X_1	X_2	X_3(mg/ml)	X_4(mg/ml)	X_5(ml/ml)
1	1.0	20 000	10	0.40	0.05
2	1.5	20 000	15	0.45	0.10
3	2.0	20 000	20	0.50	0.15
4	2.5	20 000	25	0.55	0.20
5	3.0	20 000	30	0.60	0.25
6	3.5	50 000	35	0.65	0.30
7	4.0	50 000	40	0.70	0.35
8	4.5	50 000	45	0.75	0.40
9	5.0	50 000	50	0.80	0.45

表 2 均匀设计 $U_9(9^6)$试验安排表

Tab 2 Uniform design $U_9(9^6)$ test

Test No.	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
1	1(1.0)	2(20 000)	4(25)	5(0.60)	7(0.35)
2	2(1.5)	4(20 000)	8(45)	1(0.40)	5(0.25)
3	3(2.0)	6(50 000)	3(20)	6(0.65)	3(0.15)
4	4(2.5)	8(50 000)	7(40)	2(0.45)	1(0.05)
5	5(3.0)	1(20 000)	2(15)	7(0.70)	8(0.40)
6	6(3.5)	3(20 000)	6(35)	3(0.50)	6(0.30)
7	7(4.0)	5(20 000)	1(10)	8(0.75)	4(0.10)
8	8(4.5)	7(50 000)	5(30)	4(0.55)	2(0.10)
9	9(5.0)	9(50 000)	9(50)	9(0.80)	9(0.45)

各种条件制备 6 份(其中有 1 份为未加 ACV 的空白)。

1.4.2 测定未包封 ACV 的量 超速冷冻离心(4℃, 156 200× g) 1 h 后的上清液各取 1.0 ml 于 10.0 ml 容量瓶中,蒸馏水定容,再取 5.0 ml 稀释到 10.0 ml 容量瓶中,以未加阿昔洛韦者为空白, 252 nm 处测吸收值。

1.4.3 测定胶体溶液中 ACV 的量 取胶体溶液 5.0 ml 于玻璃蒸发皿中,水浴挥干溶剂,加入甲醇溶解、过滤、洗涤,定容于 25.0 ml 容量瓶中,取 2.0 ml 于 10.0 ml 容量瓶中,测 252 nm 处吸收值。

1.4.4 测定胶体溶液的 Zeta 电位[7] 取胶体溶液适量于透析袋中,蒸馏水透析,多次换水至电导值低于 50 μΩ 后移入 U 型管中,以相同电导值的氯化钾溶液为辅助液,插入铂电极,接通稳压电源,调节电压至 30 V,电泳 30 min 后测量溶胶移动距离。根据溶胶移动方向判断胶体微粒电性,并按下式计算 Zeta 电位:

$$Zeta=\frac{4\pi v\eta}{\epsilon E}\times 300^2$$

其中, Zeta 为胶体动电位(mV), π 为圆周率, η 与 ε 分别是介质在测定温度下的粘度和绝对介电常数, E 是电位梯度(V/cm)= 外加电压/电压间距离, v 是电泳速度(cm/s)= 溶胶移动距离/时间。

1.5 统计学分析及结果验证

1.5.1 多元逐步回归分析[8] 选用医用统计程序包 SPMR 之 SRA-1 对均匀设计结果进行逐步回归分析。

1.5.2 结果预测及验证 根据多元逐步回归分析的结果确定制备 ACV-PLGA-NP 的优化条件并进行目标量的区间估计。按优化条件进行实验,平行试验 5 次。

1.5.3 电子显微镜观察制备的 ACV-PLGA-NP 按优选工艺制备 ACV-PLGA-NA, G3 玻砂漏斗抽滤得胶体溶液。滴少量于电镜专用铜网上, 10 min 后用 2%磷钨酸负染 10 min,透射电镜下观察;取少量胶体溶液涂布于载玻片上,室温下自然干燥 15 min, 吸去上清,乙醇脱水,包涂金粉,用扫描电镜观察。

2 结果

2.1 载药工艺的选择

ACV 加到有机相中,其包封率低于 ACV 加到水相中。二甲亚砜及四氢呋喃在紫外 252 nm 处吸收度极高,乙腈、甲醇在紫外 252 nm 处吸收度较低,阿昔洛韦在乙腈中溶解性较差,选用甲醇作为毫微粒的溶剂。

2.2 单因素试验筛选制备工艺水平

pH 值在 1.0~6.0 范围内较佳, ACV 的包封率较高; PVA 水溶液浓度宜为 10~ 50 mg/ml; PLGA 的分子量 Mw= 20 000 与 Mw= 50 000 成球性及包封率皆优;阿昔洛韦及 PLGA 浓度范围分别为 0.40~0.80 mg/ml 及 4.0~8.0 mg/ml;丙酮浓度范围大约在 0.05~0.50 ml/ml。

2.3 均匀设计表试验结果及数据处理

根据 ER、DL 及 Zeta 电位平均值计算均匀设计结果目标量 Y= 20%ER+ 40%DL- 40%Zeta,见表 3。

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

表 3　目标量的计算值

Tab 3　Caculating the target variable

No.	$\overline{ER}$(%)	$\overline{DL}$(%)	$\overline{Zeta}$(mV)	Y
1	49.06	5.02	-13.28	17.13
2	49.84	4.86	-9.71	15.80
3	48.57	5.00	-12.69	16.79
4	54.01	5.50	-14.86	18.94
5	38.27	3.89	-14.07	14.89
6	45.85	4.72	-13.69	16.53
7	19.01	1.94	-13.51	9.98
8	22.74	2.27	-10.41	9.62
9	33.66	3.71	-14.60	14.46

将表 2 及表 3 数据输入计算机, 利用医用统计程序包 SPM R 之多元逐步回归程序 SRA-1 回归, 得相关系数矩阵表, 见表 4。

表 4　相关系数矩阵表

Tab 4　Matrix of relative coefficient

	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	Y
X_1	1					
X_2	0.3464	1				
X_3	0.1	0.3464	1			
X_4	0.5	0.0866	-0.4	1		
X_5	0.1	-0.4330	0.1	0.5	1	
Y	-0.6506	0.0144	0.3501	-0.4076	0.0734	1

回归方程: $Y = 14.2 - 1.85X_1 + 0.118X_3 + 4.52X_4$

$n = 9, df_1 = 3, df_2 = 5, s = 1.48, r = 0.896, F = 5.89$

查 F 检验的 F 临界值表, $F_{0.05,3,5} = 5.31$, 回归方程显著 ($P < 0.05$)。

2.4　结果预测和验证

由回归方程与相关系数矩阵可见, X_1 的系数为负, 在条件优化时, 根据表 2 的数据, 宜取下限值, X_3 和 X_4 的系数为正, 表明其取值宜大, X_2 及 X_5 与 Y 间相关性差, 在逐步回归分析时被去除, 表明在所取值范围内, 对结果影响不大, 可选择一适中的值, X_2 可定为 20 000, X_5 可选为 0.1 ml/ml。经综合考虑, ACV-PLGA-NP 制备的优化条件为 $X_1 = 1.5$, $X_3 = 50$, $X_4 = 0.80$, 将各取值代入方程, 得 $Y = 20.941$。Y 的区间估计为 $Y = Y \pm U_2 \cdot S$, 查表得 $U_2(0.01) = 2.57$, 则 Y 的预测范围为 17.137 4 ~ 24.744 6。

按照优化条件制备的 ACV-PLGA-NP 平均包封率为 61.00%, 载药量为 6.79%, Zeta 电位 -15.27 mV, 目标量平均得分为 21.03, 在预测范围内。

ACV-PLGA-NP 的扫描电镜照片见图 1。

透射电镜下可见极有立体感的小圆球体, 粒径小于 1 μm; 扫描电镜下可见白色的小圆球体, 粒径小于 1μm。

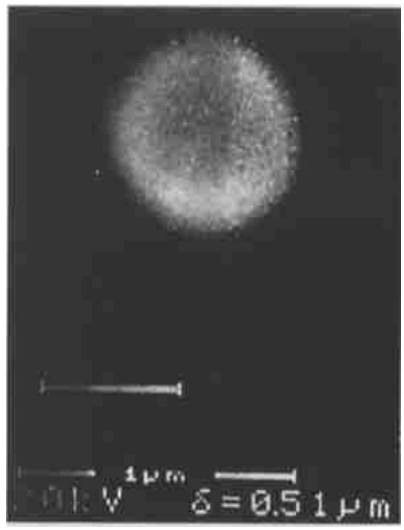


图 1　ACV-PLGA-NP 的扫描电镜照片

Fig 1　Scanning electron micrograph of ACV-PLGA-NP

3　讨论

采用广泛应用的水包二氯甲烷(或三氯甲烷)的乳化溶剂蒸发法[9] 不能用于制备小于 1 μm 的毫微粒, 尽管使用高速匀化机强力搅拌所制备的毫微粒其粒径最小也有 1.2 ~ 1.5 μm。我们采用改进的溶剂蒸发技术, 将丙酮加入到溶有多聚物的有机相中, 即使不用高速强力匀化, 所制备的球体粒径亦为亚微米级。丙酮从有机相到水相快速扩散引起两相间表面张力显著减少及自发性混合, 从而使亚微米型的 PLGA 载药毫微粒生成。

均匀设计是方开泰将数论用于试验设计所创立的一种多因素试验设计方法, 试验次数与各因素所取的水平数相等, 用均匀设计安排试验可大大减少试验次数。均匀设计一经问世, 大量应用于药学研究设计中[10]。我们选用均匀设计法减少试验次数, 按照均匀设计法优选的制备条件制备 ACV-PLGA-NP, 其目标量在预测值范围内。

毫微粒表面的 Zeta 电位将影响物理稳定性和载药性能。Zeta 电位值越高, 胶体粒子越不容易凝聚, 胶体溶液越稳定。PLGA-NP 及 ACV-PLGA-NP 粒子荷负电, 在碱性条件下, ACV 分子中的酚羟基, 醇羟基与 NaOH 成盐后, ACV 主要以阴离子形式存在, 游离分子只占极少数。PLGA-NP 及 ACV-PLGA-NP 粒子易于吸附少量的电中性游离 ACV 分子, 故吸附率低, 载药量小; 当 pH 值降低时, 游离 ACV 分子比例增大, 故吸附率增大, 载药量增大。按优化条件所制备的 ACV-PLGA-NP 平均包封率为 61.00%, 载药量为 6.79%, Zeta 电位 -15.27 mV。

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

参考文献

[1] Mbela T K M, Poupaert J H, Dumont P. Poly (diethylmethy-lidene malonate) nanoparticles as primaquine delivery system to liver[J]. Int J Pharm, 1992, 79(1): 29—38.

[2] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, *et al*. Biodegradable submicron carriers for peptide drugs: preparation of DL-lactide/glycolide copolymer(PLGA) nanospheres with nafarelin acetate by a novel emulsion-phase separation method in an oil system[J]. Int J Pharm, 1995, 121(1): 45—54.

[3] Weller I V D, Carreno V, Fowler M J F, *et al*. Acyclovir inhibits hepatitis B virus replication in man[J]. Lancet, 1982, 1(8266): 273.

[4] Brannon-Peppas L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery[J]. Int J Pharm, 1995, 116(1): 1—9.

[5] Thomasin C, Nam-Tran H, Merkle H P, *et al*. Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics[J]. J Pharm Sci, 1998, 87(3): 259—268.

[6] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, *et al*. In vitro drug release behavior of DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method[J]. J Pharm-Sci, 1994, 83(5): 727—732.

[7] 山东大学编. 物理化学与胶体化学实验[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1990. 124—128.

[8] 方开泰. 均匀设计-数论方法在试验设计的应用[J]. 应用数学学报, 1980, 3(4): 363—372.

[9] Niwa T, Takeuchi H, Hino T, *et al*. Preparations of biodegradable nanospheres of watersoluble and insoluble drugs with DL-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior[J]. J Controlled Release, 1993, 25(1): 89—98.

[10] 王鹏, 王玉珠, 沈建民. 均匀设计及其在药学中的应用[J]. 沈阳药学院学报, 1989, 6(4): 297—306.

(编辑 潘式文)

(上接252页)

2 结果

新鲜血小板4种主要磷脂的总量为71.4 μg/ml, 各自含量依次为PC＞PE＞PS＞PI。22℃水平振摇保存3 d、5 d, 4种磷脂的总量分别下降5.8%, 31.8%; 保存5 d PC, PE, PS, PI的下降具有统计学意义($P<0.01$)。

血小板－80℃保存1、3、6月, 4种磷脂总量比新鲜血小板分别减少了33.3%、34.6%、36.3%, $P<0.01$; 3者之间相比较, 磷脂改变差异不显著($P>0.05$)[3]。

血小板聚集功能改变: 22℃保存24 h, 血小板PAG下降约50%; 保存72 h, PAG降至10%以下; 保存96 h的血小板对ADP诱导无明显的聚集反应。与对照组相比较, －80℃保存的血小板融化后PAG显著下降($P<0.01$), 即使增加ADP浓度也不能提高PAG, 血小板在－80℃冰冻保存1、3、6月, PAG分别为9.2%、9.7%、10.9%, 3者之间差异不显著($P>0.05$)。

3 讨论

保存期间血小板膜脂质结构发生了变化, 血小板活化和细胞溶解使磷脂释放到血浆中。实验显示, 22℃保存血小板, 随保存时间延长, 磷脂丢失呈持续状态, 血小板聚集功能亦表现为持续下降。－80℃冰冻保存血小板, 冻融后磷脂减少约1/3, 但是随着保存时间延长, 磷脂的丧失却没有增加, 而是保持在一相对稳定的水平, 同时反映血小板功能的PAG的变化趋势与磷脂的改变极为相似。提示: ①血小板磷脂丧失与血小板功能下降有密切关系。②－80℃冰冻保存血小板, 其损伤主要来自冻-融过程, 与保存时间长短无明显关系。

贮存期间血小板磷脂丧失的机制目前还不完全明确, 有以下几种可能: ①提前消耗。某些非生理性刺激, 如采集技术、贮存容器、保存介质、保存温度等影响, 引起血小板活化, 释放颗粒, 进而聚集, 脂质被提前消耗。②酶的作用。如血小板释放磷脂酶、脂质酶或受白细胞污染等使血小板膜脂质消耗或丢失。③脂质过氧化作用。在贮存期间血小板内源性抗氧化物(如谷胱甘肽)逐渐耗尽, 使得氧分子能够对无保护功能的脂质进行过氧化反应, 最终导致脂链破碎。由于维持血小板生理功能的花生四烯酸前体缺乏, 以及能破坏生物膜的脂肪酰基醛生成, 使血小板膜脂质双层稳定性下降, 磷脂丧失[4], 最终导致血小板止血功能下降, 存活时间缩短。血小板的活化使磷脂PS、PE在脂质膜外侧暴露形成血小板第三因子(PF_3)。PF_3能大大加快凝血酶产生的速度, 引起血小板广泛聚集。

防止PSL发生已成为输血工作亟待解决的问题。据报道, 使用抗氧化剂如维生素E和硒蛋氨酸, 能抑制脂质过氧化作用, 延长血小板的保存时间[5]。在制备中减少白细胞污染有助于提高血小板贮存质量。

关键词 血小板贮存损伤; 磷脂; 高效液相色谱分析; 血小板聚集功能

中图法分类号 R318.52; R331.143 文献标识码 B

参考文献

[1] Kawasaki T, Kambayashi J, Mori T, *et al*. Analysis of platelet phospholipids by high performance liquid chromatography[J]. Thrombosis Research, 1984, 36(4): 335—338.

[2] 王凤君, 赵 云, 谢尔凡, 等. 高效液相色谱法测定生物样品中磷脂含量[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(1): 67—68.

[3] 成小玲, 林武存, 黎汝青, 等. 储存损伤对血小板超微结构和聚集功能的影响[J]. 重庆医学, 2000, 29(2): 106—110.

[4] Seghatchian J M J, Krailadsiri P. The platelet storage lesion[J]. Transfusion Medicine Reviews, 1997, 11(2): 130—134.

[5] Klinger M H F. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects[J]. Ann Hematol, 1996, 73(2): 103—106.

(编辑 王 红)

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