

多柔比星长效注射微球的体外释放研究

吴 诚, 吴 燕, 于月梅, 梅兴国* (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

[摘要] **目的:** 考察多柔比星(Dox)微球的体外释放特性及药物在制备工艺和体外释放过程中的稳定性。**方法:** 以乳酸-羟乙酸共聚物(PLGA)为载体材料, 用改进的复乳法(W/O/W)制备载 Dox 长效注射微球; 考察粒径大小、外观、包封率、载药量等理化性质; 用紫外分光光度法检测了体外释放溶液中的药物含量, 考察了微球的体外释药特性及影响因素; 用高效液相色谱法评价了微球制备工艺和体外释放过程对 Dox 稳定性的影响。**结果:** 微球球形圆整, 分散性好, 平均粒径为 85 μm , 包封率为 95.1%, 载药量为 14.8%。随着 PLGA 浓度的增加, W/O 体积比的减小, 微球释放速度减慢, 突释效应减小。制备工艺对 Dox 的稳定性无明显影响, 而 Dox 在体外释放过程中随着释放时间的延长逐渐有降解峰产生, 10 d 后降解峰面积占 2.46%。**结论:** 用复乳法制备载 Dox 微球, 通过对 PLGA 浓度和油水体积比的调节, 可以得到不同释放速度的微球。

[关键词] 多柔比星; 微球体; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; 复乳法; 药物稳定性

[中图分类号] R 978.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0246-04

In vitro release behavior of doxorubicin-loaded injectable microspheres

WU Cheng, WU Yan, YU Yue-mei, MEI Xing-guo* (Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To evaluate the *in vitro* release behavior of doxorubicin(Dox)-loaded microspheres and the stability of Dox during encapsulation process and *in vitro* release. **Methods:** Dox-loaded microspheres were prepared by double emulsion (W/O/W) method with poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) as the carrier material. The physical and chemical characteristics of microspheres, including the mean diameter, morphology, drug entrapment efficiency and loading rate, were evaluated. The *in vitro* release behavior and its influencing factors were determined by ultraviolet spectrophotometry. Dox stability was evaluated by HPLC method during the encapsulation process and *in vitro* release. **Results:** The prepared microspheres had a complete spheric shape and dispersive quality. The mean diameter of the microspheres was 85 μm ; the drug entrapment efficiency was 95.1%; and the loading rate was 14.8%. Releasing rate of the microspheres slowed down with the increase of PLGA concentration and the decrease of W/O value. The encapsulation process had no obvious effect on the stability of Dox, while Dox degraded during *in vitro* release as the prolongation of time. On day 10, the peak area of degraded material accounted for 2.46%. **Conclusion:** Dox can be encapsulated in the microspheres by double emulsion method and different release rates of Dox can be achieved by adjusting PLGA concentration and W/O volume ratio.

[KEY WORDS] doxorubicin; microspheres; poly(lactide-glycolide acid); double emulsion method; drug stability

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(3): 246-249]

多柔比星(doxorubicin, Dox)为蒽环类抗肿瘤抗生素, 因其抗癌谱广, 对乏氧细胞有效, 又为放射增敏剂, 故在肿瘤治疗中占有重要地位。Dox 口服吸收差, 临床上一般静脉注射给药或者动脉给药。其主要为骨髓抑制和心脏毒性。可导致严重的心肌损伤和心力衰竭, 心肌损伤程度和剂量有关, 总量在 500 mg/m² 以上者可多见。目前减少 Dox 心脏毒性的主要方法就是应用药物载体改变 Dox 的生物分布, 减少 Dox 在全身特别是心脏组织中的分布, 提高其在局部肿瘤中的含量^[1]。

本研究采用复乳法将 Dox 制备成 PLGA 微球, 用于局部注射或栓塞给药, 以期提高 Dox 的肿瘤局部的滞留时间和浓度, 减少其全身的不良反

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 超声波细胞粉碎机(SCIENTZ-II D, 宁波新芝生物科技股份有限公司); 恒温加热磁力搅拌器(CL-4 型, 巩义市英峪予华仪器厂); SHZ-22 水浴恒温振荡器(太仓市华美生化仪器厂); 低温冷冻离心机(SORVALL[®], 美国科峻仪器公司), 光学显微镜(COIC, XSZ-4G); 紫外-可见分光光度仪(Cintra 10e UV-Visible Spectrometer, Australia); 高效液相色谱仪(HITACHI, UV

[作者简介] 吴 诚, 博士生。

* Corresponding author. Tel: (010)66932654, Fax: 66932644

Detector L-2400, Autosampler L-2200, Pump L-2130);激光粒度分析仪(OMEC LS800)。

盐酸多柔比星(批号:CDXB 20759,效价98.89%,海正药业),PLGA($M_w=36\ 000$,LA:GA=75:25,山东省医疗器械研究所),吐温20(北京化学试剂公司,化学纯),聚乙烯醇(PVA-124,北京化学试剂公司,进口分装),其余试剂均为分析纯。

1.2 微球的制备 根据文献报道^[2],对复乳(W/O/W)溶剂挥发法进行了改进,制备工艺如下:将药物的水溶液加入PLGA的二氯甲烷溶液中,冰浴超声乳化(功率237.5 W,超声1 min)得初乳,将初乳缓慢滴加到聚乙烯醇(PVA)溶液中,磁力搅拌器搅拌得复乳,将复乳加到PVA溶液中,低速搅拌4 h,5 000 r/min离心10 min收集微球,用蒸馏水洗涤3次,冷冻干燥得微球干粉。

1.3 考察微球的形态、粒径大小和分布 取少量微球冻干粉置于载玻片上,滴加少量0.02%的吐温20溶液进行分散,然后在具刻度目镜的显微镜下观察、拍照。取微球少许,加0.02%吐温20溶液制成混悬液。用OMEC LS800激光粒径测定仪测定微球的粒径大小和分布。

1.4 微球载药量和包封率的测定 精密称取Dox微球冻干粉约5 mg,置于10 ml容量瓶中,加乙腈/水(9:1,V/V)溶解,定容至刻度,以3 000 r/min离心10 min,上清液于480 nm处测光密度,计算微球的载药量和包封率。

$$\text{载药量} = \frac{\text{含药量}}{\text{微球总量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{实际载药量}}{\text{理论载药量}} \times 100\%$$

1.5 微球的体外释放度的测定 精密称取Dox微球5 mg,置于3 ml释放介质中(生理盐水,0.05%吐温20,0.05%吐温80),放置到37℃、100 r/min转速振荡的恒温摇床中,分别于4 h、1 d、2 d、3 d、4 d、7 d、10 d、14 d将释放介质全部取出并更换新的释放介质。采用紫外可见分光光度法测定释放介质在480 nm的光密度,并计算浓度及微球的累积释放百分率。考察处方工艺对微球释放特性的影响。

1.6 球或体外释放溶液中药物降解产物的检查

1.6.1 样品处理 精密称取Dox微球或空白微球5 mg,置于5 ml容量瓶中,加乙腈/水(9:1,V/V)溶解,定容至刻度。精密量取上述溶液1 ml置于5

ml容量瓶中,加体外释放介质定容至刻度。混匀后10 000 r/min离心10 min,取上清进样。微球体外释放样品直接进样。

1.6.2 高效液相色谱条件^[3] 色谱柱:Lichrospher5-C₁₈(150 mm×4.6 mm);流动相:0.01 mol/L十二烷基硫酸钠溶液(每升含1.36 ml磷酸):乙腈:甲醇=500:500:60,进样量:20 μl,流速:1 ml/min,检测波长:254 nm。

2 结果

2.1 微球的理化性质 微球呈暗红色,形态圆整,大小均匀,分散性良好(图1)。优化处方微球平均粒径为85 μm,包封率为95.1%,载药量为14.8%,粒径分布见图2。

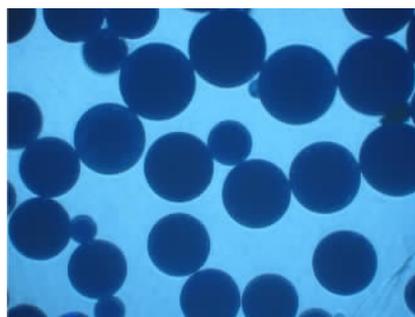


图1 载Dox微球的显微镜照片

Fig 1 Microscopic photograph of doxorubicin-loaded microspheres(×200)

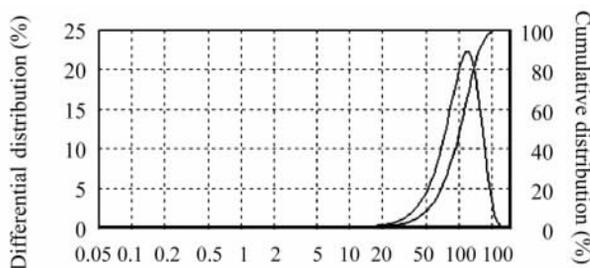


图2 Dox微球的粒径分布图

Fig 2 Diameter distribution of doxorubicin-loaded microspheres

2.2 处方工艺对微球释放特性的影响

2.2.1 PLGA浓度 结果表明随着PLGA浓度(200、250、300 mg/ml)的增加,微球的突释效应(前4 h的释放量)显著减小,累积释放率分别为35.4%、19.7%、4.7%,释放速度明显减慢。当PLGA浓度为200 mg/ml时,在释放的第2天微球的累积释放就达到了80%以上,因此在随后的释放中出现了平

台期(图3)。

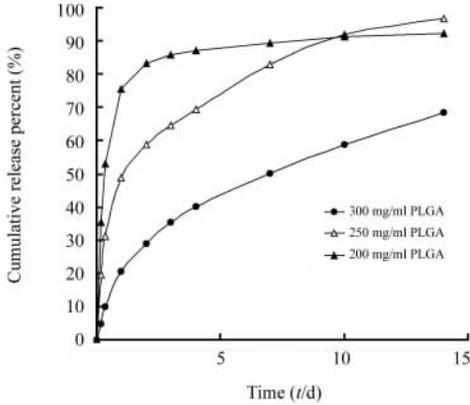


图3 PLGA浓度对微球体外释放行为的影响
 Fig 3 Effect of PLGA concentration on *in vitro* release behavior of microspheres

2.2.2 制备初乳时油/水体积比对微球释放特性的影响 实验发现随着油相比例的升高,微球的释放速度减小,特别是突释效应显著减小,从19.7%减小到4.4%,这也与文献^[2]报道一致。造成突释效应的主要原因是微球表面吸附的药物和外层分布的药物,当油相比例增大时,微球外层 PLGA 相对于药物的体积比增加,微球更加致密,导致突释减小。

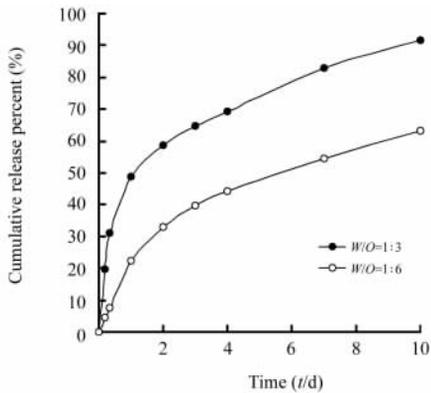


图4 油水体积比对微球体外释放行为的影响
 Fig 4 Effect of W/O volume ratio on *in vitro* release behavior of microspheres

2.3 微球和体外释放溶液中药物的稳定性 实验证明酸、碱、高温、氧化、光照等剧烈条件下产生的降解产物均可与主峰实现良好分离(数据未列出)。结果未发现杂质峰(色谱图见图5),表明制备工艺对药物稳定性影响较小。但是微球在体外过程中可产生少量降解产物(色谱峰在9.4 min左右),且降解产物随着释放时间的延长逐渐增多。体外释放2 h、1 d、3 d、7 d、10 d的样品按1.6.2中高效液相色谱

条件进行检测,降解峰所占的比例分别为0.11%、0.6%、1.15%、1.34%、2.46%。由于在每个取样点释放介质全部取出,并更换新的释放介质,因此释放后期药物降解较多说明不仅是微球中释放出的药物存在降解问题,而且包被在微球中的药物也有部分降解。

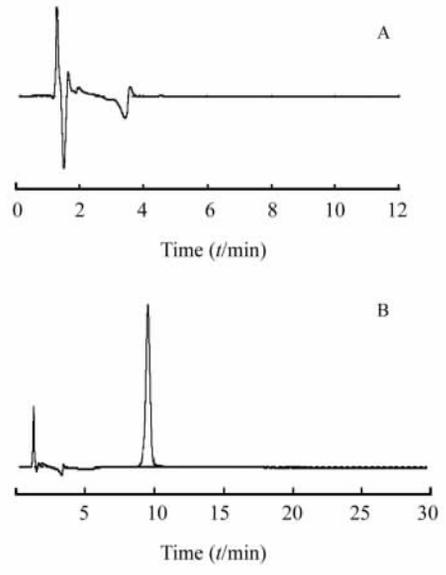


图5 微球经提取后进样的高效液相色谱图
 Fig 5 HPLC chromatogram of sample extracted from microspheres

A: Blank microspheres; B: Dox loaded microspheres

3 讨论

文献报道^[4-5]多采用 Dox 粉末混悬在 PLGA 溶液中直接乳化制备微球或喷雾干燥法^[6]制备微球,由于 Dox 为水溶性药物,用此类方法制备的微球往往包封率低,突释效应大,因此本实验采用复乳法制备微球,得到的微球包封率大大提高,且载药量也较文献报道有明显提高。但复乳法也有其缺点,主要是需要两步乳化,相关的影响因素较多,主要包括制备 PLGA 浓度、制备初乳时油相体积、内水相体积、油水两相体积比、超声的功率和时间、搅拌速度、载药量等。我们在预试验的基础上固定了其他因素,主要考察了 PLGA 浓度、油水体积比对于微球包封率的影响。在实验考察的处方范围内,上述两因素对微球的包封率影响较小,而对微球的体外释放特性影响较大。实验结果表明,通过对 PLGA 浓度和油水体积比的调节,可以得到不同释放速度的微球,这也为进一步的动物实验打下了基础。在体内什么

样的释放速度可以得到最佳的抑瘤效果,还需要进行体内药效学实验研究。

文献^[7]报道 Dox 的稳定性较差,对热、光、水分等因素均较敏感,因此实验中重点考察了制备工艺和体外释放过程中 Dox 的稳定性。实验结果表明制备工艺对 Dox 的稳定性无明显影响,而 Dox 在体外释放过程中随着释放时间的延长逐渐有降解峰产生,说明在 37℃ 的释放介质中 Dox 并不稳定。但其降解并不显著,体外释放 10 d 后降解峰面积仅占 2.46%。

[参考文献]

- [1] Abraham S A, Waterhouse D N, Mayer L D, et al. The liposomal formulation of doxorubicin [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 391:71-97.
- [2] Cleland J L. Solvent evaporation processes for the production

of controlled release biodegradable microsphere formulations for therapeutics and vaccines[J]. *Biotechnol Progr*, 1998, 14: 102.

- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 二部. 北京:化学工业出版社,2005:504.
- [4] Tan E C, Lin R, Wang C H. Fabrication of double-walled microspheres for the sustained release of doxorubicin [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 291:135-143.
- [5] 赵瑞玲,丁 红,谢 茵. 阿霉素聚乳酸微球的制备及体外释药特性研究[J]. *中国医院药学杂志*, 2004, 24:74-75.
- [6] Lin R, Ng L S, Wang C H. *In vitro* study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles[J]. *Biomaterials*, 2005, 26:4476-4485.
- [7] Pujol M, Munoz M, Prat J, et al. Stability study of epirubicin in NaCl 0.9% injection[J]. *Ann Pharmacother*, 1997, 31: 992-995.

[收稿日期] 2006-11-02

[修回日期] 2006-12-28

[本文编辑] 尹 茶

第二届全军军事应激医学学术研讨会(第一轮通知)

军事应激损伤是现代战争造成非战斗减员的重要因素,军事应激医学正在成为军事医学研究中广泛关注的新的研究领域。为深刻认识军事应激医学研究的科学趋势和前沿科学问题、深入探讨军事应激医学研究的新理论和新方法,共同谋划我军军事应激医学学科建设和科学研究战略规划,更好、更快地推动我军军事应激医学的发展,由军事医学科学院卫生学环境医学研究所、全军军事应激医学重点实验室主办、第二军医大学应激医学研究室协办的“第二届全军军事应激医学学术研讨会”,定于2007年8月在山东青岛举行。届时将邀请相关研究领域的知名专家到会作专题报告,并系统研讨军事应激医学的重要科学问题和我军军事应激医学损伤防护的重要措施。会议期间将成立“全军应激医学专业委员会筹备工作组”,就组建全军应激医学专业委员会有关事宜进行商榷。真挚相邀从事应激医学研究、关心应激医学发展的领导、专家、研究生和部队一线卫生工作者积极参加。现将会议具体安排通知如下:

一、会议研讨主题

1. 军事应激医学研究新进展;
2. 军事应激损伤的病理学基础;
3. 军事应激损伤的防护措施;
4. 我军军事应激医学发展的中长期规划

二、征文要求

1. 征文领域。有关应激损伤的基本特点和分子生物学基础、我军应激损伤防护的基本原则和救治要点、心理应激、医学心理学、心身医学、应激医学研究的新进展和发展的趋势分析、部队军事应激损伤防护的经验和体会、部队军事应激损伤现状调查、应激医学研究其他方面的论文,均欢迎参会交流。

2. 征文格式和提交方式。会议论文要求提交1000字详细摘要,A4纸4号宋体文本和电子文本各一份,于6月30日前提交。电子文本可以用E-mail方式提交。来稿一律不退,请自留底稿。

3. 本次会议录用的论文将优先推荐到《中国应用生理学杂志》、《解放军预防医学杂志》,本次会议学分6分。

三、会议筹备组联系方式

军事医学科学院卫生学环境医学研究所 王晓明,地址:天津市和平区大理道一号,邮编:300050。

电话:0251-55123 手机:13302002192 传真:军线 0251-55123,地方线 022-84655123

E-mail: sisuo55123@yahoo.com.cn