

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00833

可显影固体栓塞剂硫酸钡海藻酸钠微球的研制

龚纯贵¹, 王新霞¹, 唐洁³, 徐爱民^{2*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院放射介入科, 上海 200438
3. 第二军医大学药学院 2002 级, 上海 200433

[摘要] 目的: 研制可显影固体栓塞剂硫酸钡海藻酸钠微球。方法: 采用乳化-离子交联法制备微球, 正交设计优化工艺, 并考察微球的粒径、形态、分布、稳定性、悬浮性、包封率及 X 线显影性等理化特性。结果: 微球平均粒径为 $(53.08 \pm 32.72) \mu\text{m}$, 分散良好, 形态圆整; 微球 100°C 水浴加热 2 h, -4°C 冰冻 24 h, 37°C 振摇 24 h, 钴 ^{60}Co (10 kGy) 照射 0.5 h 各组的破损率分别为 $(2.0 \pm 1.1)\%$ 、 $(86.0 \pm 19.2)\%$ 、 $(39.0 \pm 14.7)\%$ 和 $(10.3 \pm 3.2)\%$; 0.25% 海藻酸钠微球混悬液的沉降体积比为 (0.92 ± 0.018) ; 硫酸钡投料量为 2.0 g 时包封率为 $(69.2 \pm 13.2)\%$, 且显影效果佳。结论: 海藻酸钠、壳聚糖可作为硫酸钡微球的包封材料, 乳化-离子交联法适用于此微球的制备。

[关键词] 硫酸钡; 海藻酸钠; 微球体

[中图分类号] R 943.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0833-04

Preparation of X-ray developable alginate-barium sulfate microspheres as material for embolic agent

GONG Chun-gui¹, WANG Xin-xia¹, TANG Jie³, XU Ai-min^{2*}

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Department of Radiologic Intervention, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438
3. Grade 2002, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare an X-ray developable alginate-barium sulfate microspheres as material for embolic agent. **Methods:** The emulsification-internal gelation technique was used to prepare alginate microspheres and the orthogonal design was adopted to optimize the technique. The diameter, shape, dispersibility, stability, suspension property, coating ratio and developability under X-ray of the microspheres were examined. **Results:** The average diameter of the microspheres was $(53.08 \pm 32.72) \mu\text{m}$; they were well distributed and had a round shape. The ratio of the destroyed microspheres was $(2.0 \pm 1.1)\%$ after heated at 100°C for 2 h, $(86.0 \pm 19.2)\%$ after frozen at -4°C for 24 h, $(39.0 \pm 14.7)\%$ after vibrated at 37°C for 24 h, and $(10.3 \pm 3.2)\%$ after irradiated with ^{60}Co (10kGy) for 0.5 h. The ratio of sedimentation volume in 0.25% suspension of sodium alginate microspheres was (0.92 ± 0.018) . The coating rate was $(69.2 \pm 13.2)\%$ when the feeding amount of barium sulfate was 2.0 g, and the result of X-ray development was good. **Conclusion:** Alginate-chitosan can be used for the preparation of barium sulfate microspheres; and the emulsification-internal gelation technique can prepare the microspheres with good dispersibility and shape.

[KEY WORDS] barium sulfate; sodium alginate; microspheres

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 833-836]

介入疗法是 20 世纪 70 年代发展起来的一种治疗方法, 在肝癌的综合治疗中具有举足轻重的作用^[1]。正常肝脏终末小动脉的内径约为 $20 \sim 50 \mu\text{m}$, 肝窦宽 $7 \sim 15 \mu\text{m}$, 毛细血管宽 $1 \sim 8 \mu\text{m}$, 肝癌组织中的微血管直径 $7 \sim 400 \mu\text{m}$, 肿瘤边缘新生动脉

血管直径在 $25 \sim 75 \mu\text{m}$, 理论上讲, 只有将直径小于 $20 \mu\text{m}$ 的细小动脉全部栓塞, 才能达到有效的栓塞效果, 并不至于进入肝窦和毛细血管造成异位栓塞^[2]。因此, 栓塞剂的选择和开发至关重要。固体栓塞剂是人们努力的一个方向, 目前临床应用的固体栓

[收稿日期] 2007-11-21 **[接受日期]** 2008-02-17

[基金项目] 上海市科委基础重点项目 (05JC14049). Supported by Grants of Basic Key Program of Shanghai Science and Technology Committee (05JC14049).

[作者简介] 龚纯贵, 硕士, 主管药师, E-mail: aquea514@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25074931, E-mail: xuarmy@163.com

塞剂主要有明胶颗粒,聚乙烯醇微球等,但其常需与造影剂混合使用来示踪,而造影剂的快速流失容易导致误栓塞^[3]。本研究拟以具有生物相容和生物降解特点的天然多糖海藻酸钠^[4-7]、壳聚糖^[8]为膜材,以硫酸钡为芯材,氯化钙为交联剂,采取乳化-离子交联法制备可以在X线下直接显影的颗粒型固体栓塞剂,使操作者能够准确追踪栓塞剂的栓塞部位。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 电动搅拌器(德国 IKA RW20 digital);显微镜(上海上光实业有限公司,XSP-2XC);超声仪(上海 Branson 公司,SB3200-T);旋转黏度计(上海天平仪器厂,NDJ-1型);LS 激光粒度分析仪(美国 Beckman Coulter 仪器公司)。海藻酸钠(青岛胶南明月海藻有限公司,药用级,批号:010509014);壳聚糖(冰岛普利美公司,医用级,批号:06042005);微粉化硫酸钡Ⅱ型(山东长清制药厂,药用级,批号:200620216);复方泛影葡胺注射液[先灵(广州)药业有限公司,批号:200607014];司盘-80、吐温-80(化学纯,上海化学试剂商店);玉米油(食品级,市售);氯化钙、冰醋酸、柠檬酸钠等均为分析纯。

1.2 工艺优选 考虑到诸多因素对微球成形的影响,参照有关文献报道^[9-16],在预试验的基础上,选取影响微球性状较显著的4个因素作为考察对象,即海藻酸钠浓度、CaCl₂浓度、司盘-80与吐温-80比例、壳聚糖浓度,通过L₉(3⁴)正交设计试验优选工艺条件。取粒径分布、微球形态、分散度和均匀度4个指标进行综合评分。评判标准:粒径大小占综合评分的40%,其余3项各占20%;以显微镜下观察所得来进行评分;粒径、形态、分散度及均匀度都为3个级别,各赋予一定的分值;综合评分以各子项目的分值之和计算。

1.3 微球的形态、粒径和分布 将微球配成混悬液,摇匀后取样制片,显微镜下观察微球的外观、形态、分散度,采用血细胞计数板显微计数法初步考察微球的粒径、分布,每次计数不少于500粒。用LS激光粒度分析仪测定粒径大小和分布状态。

1.4 微球的稳定性 分别取硫酸钡2.0g投料量制备的微球混悬液5ml,考察100℃水浴加热0.5、1、2h,-4℃冰冻24h,37℃振摇1.5、3、6、12、24h,钴60(10kGy)照射0.5h等条件对微球稳定性的影响。处理结束后,放置至室温,摇匀后取样制片,置显微镜下观察破损情况,用血细胞计数板计数,调整视野重复6次计算结果。破损率=(破损微球数量/观察微球总数)×100%。

1.5 微球混悬液的悬浮性 取硫酸钡2.0g投料量制备的微球,使用水和不同浓度的海藻酸钠溶液配制混悬液,按药典法^[17]测定沉降体积比和黏度。

1.6 硫酸钡用量与包封率 取各投料量下制备微球,调节最终体积为30ml,摇匀后取微球混悬液10ml,加入柠檬酸钠使终浓度0.055mol/L^[18],液化1h,冰浴超声30min,90×g离心5min,水洗3次,将粉末转移至干燥恒重的称量瓶中,105℃干燥至质量恒定,测其质量。包封率=(干燥硫酸钡粉末质量×3/实际硫酸钡投料量)×100%。

1.7 微球显影效果 取1.6中微球混悬液10ml,复方泛影葡胺注射液作为阳性对照,在X线机下显影,观察显影效果。

2 结果

2.1 工艺优选结果 设计的4个因素中,CaCl₂浓度对微球形态影响较小,其次是壳聚糖浓度,海藻酸钠浓度、司盘-80和吐温-80的用量和对比对微球粒径和形态的影响较大,详见表1~3。微球制备工艺为:称取硫酸钡2.0g置乳钵中研磨,用水10ml分3次转移至100ml小烧杯中,超声5min,加入1%海藻酸钠溶液10ml、吐温-800.5ml,继续超声5min,将混匀后的硫酸钡海藻酸钠溶液抽入20ml针筒,作为水相;量取玉米油40ml置250ml烧杯内,加入司盘-806g,置50~60℃水浴搅拌(90×g)10min,逐滴注入水相,乳化20min,水浴温度降至40℃,58×g条件下滴加3%氯化钙溶液10ml,固化15min;固化后的乳液移入分液漏斗,静置12h分层,取下层溶液,离心(90×g)分取下层微球,用水洗涤3次;水洗后的微球分散于20ml水中,加0.5%壳聚糖溶液5ml,3%氯化钙溶液5ml搅拌(23×g)15min,离心,水洗3次,分散于0.25%海藻酸钠溶液置冰箱4℃冷藏室保存。

2.2 微球的形态、粒径和分布 镜下可见,硫酸钡海藻酸钠微球大部分为球形单体,圆形,表面光滑,不粘连,分散性较好(图1A),所有微球均呈现均匀分散的黑色不透光状态(图1B),粒径为(53.08±32.72)μm。

2.3 稳定性考察 硫酸钡海藻酸钠微球热稳定性较好,100℃水浴加热2h破损率仅(2.0±1.1)%;-4℃冰冻24h后微球严重破损,破损率达(86.0±19.2)%;37℃振摇条件下,前6h破损率升高幅度明显比后18h大,振摇24h破损率达(39.0±14.7)%;钴60(10kGy)照射0.5h破损率达(10.3±3.2)%。结果提示,加热灭菌可能是制备微球注射用混悬液的有效方法。

表 1 正交试验设计的因素及水平表

Tab 1 The factors and levels of orthogonal design

Factor	A(Concentration of Na-alginate, W/V, %)	B(Concentration of CaCl ₂ , W/V, %)	C (Span : Tween)	D(Concentration of chitosan, W/V, %)
1	0.5	2.0	5 : 1	0.25
2	1.0	3.0	6 : 1	0.50
3	1.5	4.0	7 : 1	0.75

表 2 正交试验设计的结果及评分表

Tab 2 Result and score of orthogonal design

Item	A	B	C	D	Diameter	Shape	Degree of dispersion	Degree of uniformity	Total amount
1	1	1	1	1	36	18	12	6	72
2	1	2	2	2	36	18	18	18	90
3	1	3	3	3	36	12	12	12	72
4	2	1	2	3	36	18	12	6	72
5	2	2	3	1	36	12	18	6	72
6	2	3	1	2	24	6	6	12	48
7	3	1	3	2	36	6	12	6	60
8	3	2	1	3	24	6	6	6	42
9	3	3	2	1	36	12	6	12	66
I	78	68	54	70					
II	64	68	76	66					
III	56	62	68	62					
R	22	6	22	8					

A-D: Same as Tab 1

表 3 F 检验结果

Tab 3 The result of F-test

Item	A	B	C	D
S	255.21	31.21	524.21	39.21
f	2	2	2	2
S/f	127.605	15.605	262.105	19.605
F	8.177	1.000	16.796	1.256

 $F_{0.05(2,2)} = 19.0; F_{0.10(2,2)} = 9.0$. A-D: Same as Tab 1

表 4 4 种不同混悬条件下微球的沉降体积比和动力黏度

Tab 4 Volume ratio of sedimentation in suspended microspheres and dynamic viscosity under 4 different conditions

Concentration of Na-alginate% (W/V)	Sedimentation volume ratio of suspended microspheres	Dynamic viscosity $\eta/\text{Pa} \cdot \text{s}$, $\times 10^{-3} (20^\circ\text{C})$
0.000	0.14 ± 0.019	-
0.10	0.73 ± 0.024	12.3 ± 1.5
0.25	0.92 ± 0.018	34.7 ± 2.6
0.50	0.97 ± 0.015	69.4 ± 4.6

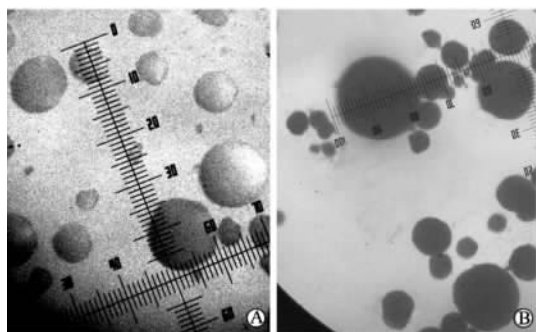
(n=6, $\bar{x} \pm s$)

图 1 显微镜下微球的形态

Fig 1 Morphology of microspheres under microscope

Original magnification: $\times 100$

2.4 悬浮性考察 表 4 结果显示, 0.25% 海藻酸钠作为助悬剂时, 其沉降体积比可以达到 (0.92 ± 0.018) , 符合药典标准, 而 0.50% 海藻酸钠微球混悬液黏度过大, 不利于今后的临床给药, 故选择 0.25% 海藻酸钠作为助悬剂。

2.5 包封率 硫酸钡用量为 1.0、1.5、2.0 g 时, 其包封率的变化不大 $[(70.1 \pm 12.4)\%、(67.3 \pm 10.9)\% \text{ 和 } (69.2 \pm 13.2)\%]$ 。结合定性显影结果, 选择硫酸钡的投料量为 2.0 g。

2.6 微球显影效果 图 2 显示, 同阳性对照相比, 投料量为 0.5 g、1 g 的硫酸钡海藻酸钠微球 X 线吸收效果不明显, 而投料量为 1.5 g、2 g 的硫酸钡海藻酸钠微球可见明显 X 线吸收, 由于仪器条件所限, 无法测定其具体吸收值, 只能做定性比较。

3 讨论

3.1 海藻酸钠浓度对微球的影响 由于芯材硫酸钡是不溶固体, 故在相同的条件下, 海藻酸钠的浓度增

大,整个水相的黏度也相应增大,乳化时就不如海藻酸钠低浓度情况下的分散度好,故成品的分散度、形态的圆整性都不如人意。实验中海藻酸钠浓度如果太低也不利于形成所需粒径大小的微球;海藻酸钠浓度较高条件下制得的微囊粒径较大,但形态较差。

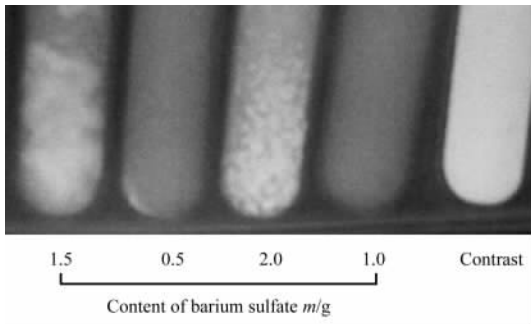


图2 不同硫酸钡用量的海藻酸钠微球的显影效果
Fig 2 Development result of microspheres coated with different amounts of barium sulfate

3.2 乳化剂用量对微球的影响 制备工艺包括形成W/O乳剂的乳化过程。液液两相乳化形成微球较容易,而固液两相乳化,要想得到的微球圆整,则要求较高。司盘-80和吐温-80的用量对微球圆整性及分散度的影响较大。理论上乳化剂HLB值应小于6。使用一定比例司盘-80和吐温-80混合液作为乳化剂,其HLB值为5.72,在要求HLB值范围内,保证了微球圆整性及分散度。

3.3 壳聚糖溶液的影响 pH较高或浓度较大滴加时微球存在粘连情况。壳聚糖溶液用2%醋酸调节pH值在5.0左右,再滴加到微球悬浮液中进行孵化,这样可改善微球粘连情况,但不影响孵化。微球外层膜的牢固度与壳聚糖浓度有一定关系,海藻酸钠与壳聚糖利用正负静电相互作用成膜,一旦壳聚糖的浓度降低就可能使其与海藻酸钠的交联不够充分,膜的强度会受到影响,但是壳聚糖浓度太高,会导致微球粘连,分散度下降,故可以考虑用低浓度壳聚糖分两次充分交联。

3.4 关于微球的粒径 实验发现转速与微球粒径呈负相关。在保证微球形态的情况下,降低转速能增大微球粒径。当乳化转速降为 $33 \times g$ 时,粒径大都在 $100 \mu m$ 左右;当RCF降至 $8 \times g$ 时,粒径大都在 $120 \mu m$ 左右,且形态非常不好。另外,此次实验所制得微球粒径差异较大 $[(53.08 \pm 32.72) \mu m]$,在下一步的栓塞应用时,对肝窦等有造成异位栓塞的可能。如何解决这一问题呢?一是进一步优化工艺,二是应用筛网来进行截留,去除粒径在 $30 \mu m$ 以下的微球,以降低异位栓塞的可能性。

3.5 稳定性 考察时发现微球冷冻后会变形,而且是不可逆的变形,这可能与芯材是硫酸钡固体有关系。

总之,我们的实验结果表明,应用海藻酸钠、壳聚糖为膜材,硫酸钡为芯材,能够制备出符合一定质量标准的硫酸钡海藻酸钠微球,这为下一步研究打下了基础。

[参考文献]

[1] 王 为. 栓塞剂在肝癌介入治疗中的应用[J]. 人民军医, 2001, 44: 268-270.
 [2] 孔晓龙, 刘滔滔, 黄文静. 化疗栓塞性微球治疗肝癌的概况[J]. 中国临床药学杂志, 1999, 8: 325-326.
 [3] 李维新, 高国栋, 梁秦川. 显影固体栓塞剂含钡明胶微球的研制[J]. 第四军医大学学报, 2001, 22: 1812-1814.
 [4] 李 沙, 侯新朴. 海藻酸钠-壳聚糖微囊成型机理及其对大分子药物的载药、释药研究[J]. 药学学报, 2003, 38: 380-383.
 [5] 聂淑芳, 吴学明, 刘宏飞, 姜华威, 潘卫三. 海藻酸钠骨架材料中药物释放的影响因素[J]. 药学学报, 2004, 39: 561-565.
 [6] Bajpai S K, Sharma S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions [J]. React Funct Polymers, 2004, 59: 129-140.
 [7] Haque T, Chen H, Ouyang W, Martoni C, Lawuyi B, Urbanska A M, et al. *In vitro* study of alginate-chitosan microcapsules: an alternative to liver cell transplants for the treatment of liver failure[J]. Biotechnol Lett, 2005, 27: 317-322.
 [8] Mansouri S, Cuie Y, Winnik F, Shi Q, Lavigne P, Bendorour M, et al. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy[J]. Biomaterials, 2006, 27: 2060-2065.
 [9] Vandenberg G W, Drolet C, Scott S L, de la Noüe J. Factors affecting protein release from alginate-chitosan coacervate microcapsules during production and gastric/intestinal simulation[J]. J Contr Rel, 2001, 77: 297-307.
 [10] 王 康, 何志敏. 海藻酸微胶囊的制备及在药物控释中的研究进展[J]. 化学工程, 2002, 30: 48-53.
 [11] 刘善奎, 高 申, 钟延强, 张洪英, 孙树汉. DNA疫苗海藻酸钠微球的制备及体外释药[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25: 58-60.
 [12] 孔 璐, 张阳德. 5-FU纳米微粒的制备及其释药特性研究[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32: 32-34.
 [13] 张彦青, 张明春, 解军波, 戚务勤, 韩淑珍. 阿司匹林壳聚糖-海藻酸钠微囊处方优选与释药机制研究[J]. 中国药房, 2007, 18: 278-280.
 [14] 石晓丽, 徐 军, 张雪梅, 程晓耕. 干扰素壳聚糖/海藻酸钠微囊控释剂载体的初步研究[J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20: 117-118.
 [15] 吕慧侠, 周建平, 戴影秋, 邓 瑾, 刘 馨. 海藻酸钙掩味微囊的制备[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38: 125-128.
 [16] 刘 伟, 王 莹, 王士斌, 吴文果, 蓝 琪, 王新刚. 乳化-凝胶化法制备药用载体海藻酸钙微球的研究[J]. 生物医学工程研究, 2007, 26: 155-158.
 [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 39.
 [18] 李朝霞, 朱建良. 制备海藻酸钠-壳聚糖生物微胶囊的技术研究[J]. 盐城工学院学报(自然科学版), 2005, 18: 58-62.

[本文编辑] 尹 茶