

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01100

· 论 著 ·

可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球的研制

王新霞¹, 张 丽², 周闰臣³, 张国庆¹, 鲁 莹³, 钟延强^{3*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438

2. 解放军 71352 部队医院药房, 安阳 455000

3. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 制备用于肝动脉栓塞的可显影碘化油-氟尿嘧啶(iodized oil-5-fluorouracil, iodized oil-5-Fu)聚乳酸(poly-lactide acid, PLA)微球。**方法** 选择具有良好生物相容性及生物可降解性的聚乳酸为载体, 加入阳性造影剂碘化油, 采用复乳法制备可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球。以外观、粒径、载药量、包封率为考察指标, 采用正交设计确定可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球的制备工艺。**结果** 显微镜下微球球形圆整, 粒径分布均匀, 扫描电镜下微球表面有孔, 平均粒径约 100 μm ; 载药量(10.78% \pm 0.14%), 包封率(63.34% \pm 0.545%), 微球显影效果好。**结论** 以可生物降解的 PLA 材料可制备显影效果好的氟尿嘧啶微球, 并且微球具有一定的缓释作用。

[关键词] 氟尿嘧啶; 聚乳酸; 碘化油; 微球体; 复乳法

[中图分类号] R 979.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2010)10-1100-04

Preparation of visualized iodized oil-5-fluorouracil loaded polylactic acid microspheres

WANG Xin-xia¹, ZHANG Li², ZHOU Gui-chen³, ZHANG Guo-qing¹, LU Ying³, ZHONG Yan-qiang^{3*}

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Department of Pharmacy, Hospital of No. 71325 Troop, Anyang 455000, Henan, China

3. Department of Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To prepare visualized iodized oil-5-fluorouracil loaded polylactic acid(PLA) microspheres for hepatic artery embolism treatment. **Methods** Biocompatible and biodegradable material PLA was used as vector and iodized oil was used as positive contrast agent to prepare 5-fluorouracil loaded microspheres using double emulsion method. The preparation technology of the microspheres was developed through optimization of appearance, size distribution, drug loading, and encapsulation efficiency by orthogonal-designing method. **Results** The prepared PLA microspheres were round in shape and had a homogenous diameter distribution. Scanning electron microscope (SEM) showed a pored surface, with an average diameter of 100 μm . The encapsulation efficiency and drug content of microspheres were (63.34% \pm 0.54%) and (10.78% \pm 0.14%), respectively. **Conclusion** We have successfully prepared the visualized iodized oil-5-fluorouracil PLA microspheres, which can release 5-fluorouracil in a controlled manner.

[Key words] fluorouracil; polylactic acid; iodized oil; microspheres; double emulsion method

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(10):1100-1103]

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 手术切除率低, 大多数患者只能采取非手术治疗, 对于不能手术切除的肝癌, 经导管肝动脉化疗栓塞术(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)俗称介入治疗, 是首选疗法。目前, 肝肿瘤介入治疗中常用的微球主要包括: 放射性核素微球、药物微球和空白单纯性微球等^[1]。为了便于跟踪后期的临床治疗效果, 仍缺乏具有显影和治疗双重效果微球。

氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)为临床常用抗癌药物, 具有抗癌谱广的特点, 是治疗实体肿瘤的首选药物。碘化油常用作肝动脉栓塞剂, 在临床应用中通常是两者直接混合用于栓塞, 但由于液体的流动性, 不能使其在栓塞部位长期驻留, 影响治疗效果。本实验采用有良好生物相容性及生物可降解性的聚乳酸(poly-lactide acid, PLA)为囊材, 它是经美国 FDA 批准的注射用微囊、微球、埋入剂等的制剂材

[收稿日期] 2010-03-12 **[接受日期]** 2010-09-03

[作者简介] 王新霞, 硕士, 主管药师. E-mail: wangxinxia@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871285, E-mail: yqzhong68@163.com

料,具有很好的生物相容性,降解性好,最终产物是水和 CO_2 ,中间产物也是体内的正常代谢产物,具有无毒、无刺激、体内无蓄积,可塑性强,易于成球^[2-6]。本研究采用复乳法制备了可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球。

1 材料和仪器

聚乳酸(山东医疗器械研究所,批号:07113002, $M_n=50\ 000$);氟尿嘧啶(南通精华制药有限公司,批号:FLV070601);碘化油注射液(法国 GUERBET 公司,批号:06LU011A);聚乙烯醇(PVA,北京有机化工厂);二氯甲烷(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司)。JY92-II DN 超声细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);电子蠕动泵(上海之信仪器有限公司);SK1200H 超声波清洗器(上海市科导超声仪器有限公司);RW 20 digital 实验室机械式搅拌机(广州仪科实验室技术有限公司);台式低速离心机(上海医疗器械有限公司手术器械厂);真空冷冻干燥机(美国 Virtis 公司);光学显微镜(Euromex, Holland);UV1102 型紫外可见分光光度计(上海天美科技有限公司);AL104 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);电热恒温水浴锅(上海贺德实验设备有限公司)。

2 方法和结果

2.1 微球的制备 将 PLA 和碘化油溶于二氯甲烷中作为油相,取一定浓度 5-FU 的 NaOH 溶液作为内水相加入其中,内水相与油相体积比为 1:4,冰浴超声乳化 2 min 制得初乳。室温,搅拌(600 转/min)下将初乳匀速缓慢注入到含一定体积 PVA 的 5-FU 的饱和溶液(外水相)中,后改用较低转速搅拌 4 h 以挥去二氯甲烷,离心($1\ 394\times g$)收集微球,纯水洗涤,冷冻干燥得可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球。

2.2 微球粒径及形态 取氟尿嘧啶微球适量,用显微镜观察,发现微球圆整,无粘连,平均粒径 $100\ \mu\text{m}$ (图 1)。

2.3 微球中氟尿嘧啶含量测定

2.3.1 紫外分光光度法测定条件 建立微球中氟尿嘧啶的含量测定方法,参考 2005 版药典^[7],取氟尿嘧啶的水溶液进行紫外-可见光扫描,波长扫描范围 200~400 nm。结果表明氟尿嘧啶在 265 nm 附近有最大吸收,最终确定 265 nm 作为氟尿嘧啶的测定波长。

2.3.2 标准曲线的绘制 精密称取 0.020 5 g 氟尿

嘧啶,蒸馏水溶解,置于 100 ml 容量瓶中定容得储备液,分别取 0.125、0.5、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 ml 储备液于 50 ml 容量瓶中,加蒸馏水定容至 50 ml,得到浓度分别为 0.485、1.95、7.80、15.60、23.40、31.20、39.00、46.80 $\mu\text{g/ml}$ 的系列溶液,进入紫外分光光度计于 265 nm 处测定光密度值 D 。以光密度值(D)对浓度(C)进行线性回归,得到标准曲线方程: $Y=0.053X+0.002\ 5$, $r=0.999\ 7$ 。结果表明,氟尿嘧啶在 0.485~46.80 $\mu\text{g/ml}$ 浓度范围内与光密度值呈良好的线性关系。取上述浓度为 1.95、15.60、39.00 $\mu\text{g/ml}$ 的氟尿嘧啶标准溶液,测得日内 RSD ($n=5$) 分别为 0.822%、0.517%、0.454%;日间 RSD ($n=5$) 分别为 1.631%、0.542%、0.474%。取上述浓度为 1.95、15.60、39.00 $\mu\text{g/ml}$ 的氟尿嘧啶标准溶液,测得回收率为 $(96.38\pm 0.78)\%$,符合方法学要求。

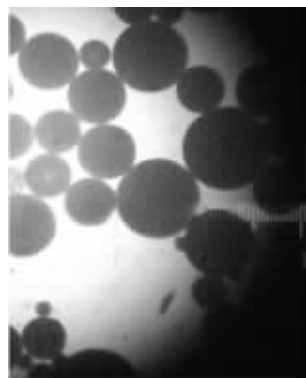


图 1 可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球的显微镜观察

Fig 1 Morphology of iodized oil-5-fluorouracil loaded poly(lactic acid) microspheres by optical microscope

Original magnification: $\times 100$

2.3.3 载药量和包封率的测定 精密称取可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球冻干粉约 5 mg,置于 10 ml 离心管中,加二氯甲烷 2 ml 水浴超声 15 min 溶解,加蒸馏水 3 ml 萃取,离心($869\times g$) 5 min,上层水溶液用滴管移至 50 ml 容量瓶中,萃取 5 次后定容。于 265 nm 处测紫外光密度值,计算微球的载药量和包封率。载药量 = 含药量/微球总量 $\times 100\%$;包封率 = 实际载药量/理论载药量 $\times 100\%$ 。精密称取空白微球 5 mg,分别加入 205、615、1 025 μg 的氟尿嘧啶,以上述提取方法处理后紫外分光光度计法测定,根据标准曲线计算微球中氟尿嘧啶含量,计算方法回收率($n=3$)。回收率为 $(96.32\pm 0.78)\%$,符合方法学要求。可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球中氟尿嘧啶($n=3$)的载药量和包封率分别为

(10.78±0.14)%、(63.34±0.54)%。

2.4 不同比例碘化油对微球显影效果的影响 取 PLA 浓度为 50 mg/ml,内水相氟尿嘧啶浓度为 50 g/L,制备复乳时转速为 600 转/min,油相和外水相之比为 2 : 50,外水相取含 2%PVA 的氟尿嘧啶饱和水溶液,基本工艺同上。考察不同比例碘化油对微球显影效果、载药量、包封率的影响(图 2)。

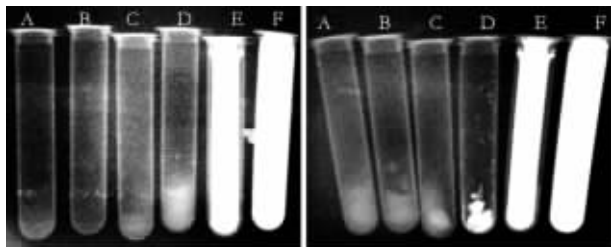


图 2 不同比例碘化油微球显影效果

Fig 2 Visualization effect of microspheres containing different ratios of iodized oil

PLA : iodized oil in left graph, A: 1 : 0.125, B: 1 : 0.25, C: 1 : 0.5, D: 1 : 1, E: Iodized oil, F: Iopamidol injection. PLA : iodized oil in right graph, A: 1 : 1, B: 1 : 1.25, C: 1 : 1.5, D: Chitosan microspheres, E: Iodized oil, F: Iopamidol injection

由图 2 可知 1 : 0.125 和 1 : 0.25 的微球基本无显影效果;1 : 0.5 的微球稍微有显影,但不佳;1 : 1 微球显影效果较好;1 : 1、1 : 1.25、1 : 1.5 三份微球都有显影效果,且较为接近。认为在微球制备中可选择 PLA 与碘化油比例为 1 : 1。结果表明,当 PLA 与碘化油比例为 1 : 1 时微球载药量和包封率最高且显影效果较好,故确定两者比例为 1 : 1 (表 1)。

表 1 不同比例碘化油微球各指标结果

Tab 1 Parameters of microspheres with different proportions of iodized oil

PLA : iodized oil	Drug loading	Encapsulation efficiency (%)
1 : 0.5	3.60	62.77
1 : 1.0	2.89	67.12
1 : 1.25	2.20	58.96
1 : 1.5	1.66	49.92

2.5 正交设计优化微球的处方和工艺 由单因素实验结果确定正交设计方案为四因素三水平,选用 L₉(3⁴)表安排实验,对微球处方中 PLA 浓度(20、30、40 mg/ml)、5-FU 浓度(35、50、65 g/L)、制备复乳时的转速(400、600、800 转/min)、油相和外水相体积比(2 : 40、2 : 60、2 : 80)等 4 个因素进行考察。

以外观、载药量和包封率 3 个考察指标来进行综合评分,以直观分析法、方差分析法进行判定。判定标准:外观占综合评分的 40%,载药量和包封率各占 30%。外观包括微球形态、圆整度和表面,分别赋予一定的分值。综合评分 = 外观 × 0.4 + 载药量 (%) × 10 × 0.3 + 包封率 (%) × 0.3。

从表 2 可以看出,第 6 号实验即 A₂B₃C₁D₂ 综合评分最高,结果较好。最终确定优选条件为 A₂B₃C₂D₃,即 PLA 浓度为 30 mg/ml,5-FU 浓度为 65 g/L,制备复乳时的转速为 600 转/min,油相和外水相体积比为 2 : 80。

按正交优化工艺制备的可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球形圆整,表面有孔,平均粒径约 100 μm,粒径在 50~150 μm 的占总数的 70%以上(图 3)。

表 2 正交设计实验安排及结果

Tab 2 The L₉(3⁴) result of orthogonal experiment

No.	A	B	C	D	Appearance	Drug loading(%)	Encapsulation efficiency (%)	Results
1	1	1	1	1	30	0.77	5.80	16.05
2	1	2	2	2	30	1.07	5.61	16.89
3	1	3	3	3	40	1.23	4.96	17.18
4	2	1	2	3	80	7.45	79.92	78.33
5	2	2	3	1	30	8.79	66.05	58.19
6	2	3	1	2	60	12.96	76.20	85.74
7	3	1	3	2	60	4.73	66.13	58.03
8	3	2	1	3	50	8.37	81.26	69.49
9	3	3	2	1	70	9.66	72.23	78.47
I	16.71	50.80	57.09	50.90				
II	74.09	48.19	57.90	53.55				
III	68.66	60.46	44.47	55.00				
R	57.38	12.27	13.43	4.10				

A: Concentration of PLA; B: Concentration of 5-Fu; C: Speed of stirring; D: Oil/Water

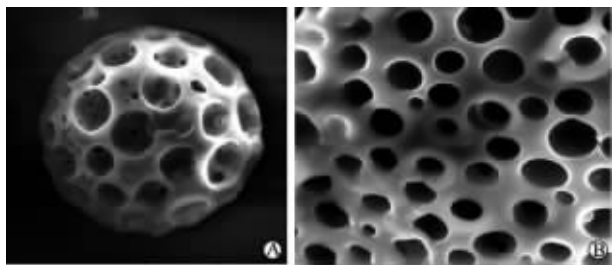


图 3 可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球的扫描电镜照片

Fig 3 Morphology of microspheres under scanning electron microscope

Original magnification : $\times 2\ 000$ (A), $\times 6\ 000$ (B)

2.6 微球优选处方的体外释放实验 参考文献^[8-9], 体外释放采用恒温震荡法测定释放速率, 精密称取微球适量, 置透析袋内, 紧密封口后投入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 50 ml 中, 再置温度 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 转速 100 转/min 的恒温振荡器中。定时取出 2 ml 释放液, 立即补加等量同温度的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液, 采用紫外分光光度法测定光密度值, 求得各时间点释放介质中的药物浓度, 再计算累积释药百分率, 以累积释药百分率对时间作图, 结果见图 4。结果表明, 可显影碘化油-氟尿嘧啶微球在体外可释药 30 d 以上, 具有明显的缓释作用。

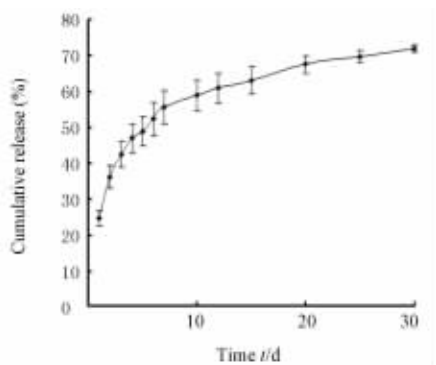


图 4 可显影碘化油-氟尿嘧啶微球体外释药曲线图

Fig 4 *In vitro* release curve of microspheres in pH 7.4 phosphate buffer

$n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

本研究采用复乳法制备可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球, 得到了粒径均匀、外观圆整的微球。同时对可显影碘化油-氟尿嘧啶聚乳酸微球的处方和工艺进行了研究, 通过正交实验选定了最佳处方和制备工艺。研究表明 PLA 浓度越高有机相的黏度越大, 微球粒径越大, 包封率也越高, 载药量则越小。内水相 5-FU 溶液浓度提高微球载药量上升, 但配制过程中发现当浓度在 75 g/L 以上时, 溶液不稳定, 易析晶, 影响制备工艺。制备复乳时转速

对微球粒径有显著影响, 对固定的 PLA 浓度和外水相体积而言, 复乳搅拌速度增加则微球粒径减小, 使得药物的包封减少。在考察油相与外水相体积比时, 发现外水相体积的增加可使微球粒径增大, 药物包封率增加, 但外水相体积过大时, 制备的微球外观、载药量和包封率都较差。外水相 PVA 溶液浓度升高, 溶液黏稠度增大, 微球粒径减小, 易形成透明水珠样空微球, 降低包封率和载药量。

介入治疗通常是将有确切疗效的抗癌药物和良好栓塞效果的栓塞剂结合。5-FU 在临床上是目前应用最广泛的抗癌药物, 在肿瘤治疗中占有重要地位。微球作为一种固体颗粒性栓塞剂, 本研究制备微球平均粒径约 100 μm , 可栓塞至肝窦前动脉水平, 使肝动脉血流减少 80%~100%, 阻断肿瘤细胞动脉供血, 使病灶组织缺血、缺氧坏死。并且, 该微球具有一定的缓释作用, 在栓塞的同时能缓慢释放 5-FU, 使化疗药物能够长期作用于病灶部位, 有利于治疗效果的提高。同时, 碘化油作为可视性栓塞剂, 便于 X 线跟踪观察后期疗效, 本课题的研究将为肝肿瘤药品开发及肿瘤治疗开辟新的思路与空间。

[参考文献]

- [1] 王新霞, 龚纯贵, 赵卫红, 钟延强. 微球在肝肿瘤介入治疗中的应用[J]. 药学实践杂志, 2008, 26: 245-248.
 - [2] Cui F, Cun D, Tao A, Yang M, Shi K, Zhao M, et al. Preparation and characterization of melittin-loaded poly(dl-lactic acid) or poly (dl-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method[J]. J Contr Rel, 2005, 107: 310-319.
 - [3] 尹静波, 陈红丹, 罗坤, 庄秀丽, 陈学思, 曹田. 生物可降解 5-氟尿嘧啶载药微球的制备及性能研究[J]. 高等学校化学学报, 2005, 26: 1174-1176.
 - [4] 陈国广, 周本谦, 李学明, 韦萍. 5-氟尿嘧啶 PLGA 纳米粒的制备及其体外内外释药研究[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37: 423-427.
 - [5] 朱艳, 鲁莹, 钟延强. 胸腺肽 $\alpha 1$ 缓释注射微球的研究[J]. 药理学, 2007, 42: 211-215.
 - [6] 王锡山, 汤庆超, 汤钧, 林航. PEG-PLGA 载 5-FU 纳米缓释微球的制备及体外释药研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2007, 41: 422-424.
 - [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 二部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 804.
 - [8] 杨帆, 陈一岳, 林茵, 赵耀明, 麦抗珍. 聚乳酸的降解性能及其微球剂的研究[J]. 中国药房, 2002, 13: 263-265.
 - [9] 王明娟, 张翻, 鲁莹, 邹豪, 张锋, 陈华江, 等. 重组人血管内皮抑制素的聚集稳定性及其 PLGA 微球的制备与体外释放[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30: 28-31.
- Wang M J, Zhang H, Lu Y, Zou H, Zhang F, Chen H J, et al. Stability of rh-endostatin and fabrication/release test of rh-endostatin loaded PLGA microspheres[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30: 28-31.

[本文编辑] 尹茶