

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00532

## 羟基乙酸乙基纤维素微球的研制

王新霞<sup>1</sup>, 林亚玲<sup>2</sup>, 张国庆<sup>1</sup>, 周闰臣<sup>1</sup>, 鲁莹<sup>2</sup>, 钟延强<sup>2</sup>, 徐爱民<sup>3\*</sup>

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材料科, 上海 200438
2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433
3. 第二军医大学东方肝胆外科医院微创二科, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 研究用于肝动脉栓塞治疗的羟基乙酸乙基纤维素微球的制备方法及其体外释药特征。**方法** 选用乙基纤维素为载体, 加入羟基乙酸, 采用复乳法制备羟基乙酸乙基纤维素微球, 以外观、粒径、载药量、包封率为考察指标, 从微球的圆整度、光滑度、大小均匀度、含药量对微球综合评价, 并采用恒温振荡透析法测定微球的体外药物释放特性。**结果和结论** 羟基乙酸乙基纤维素微球外观光滑, 球形圆整, 平均粒径 $(233.38 \pm 1.62) \mu\text{m}$ , 载药量  $114.32 \mu\text{g}/\text{mg}$ , 包封率 78.61%, 微球体外可释放药物 72 h。羟基乙酸乙基纤维素微球可满足进一步动物实验要求, 为化学腐蚀性药物用于肝动脉栓塞的研究提供重要的参考依据。

**[关键词]** 羟基乙酸; 乙基纤维素; 微球; 体外释药**[中图分类号]** R 943.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)05-0532-04

### Preparation of glycolic acid ethyl cellulose microspheres

WANG Xin-xia<sup>1</sup>, LIN Ya-ling<sup>2</sup>, ZHANG Guo-qing<sup>1</sup>, ZHOU Gui-chen<sup>1</sup>, LU Ying<sup>2</sup>, ZHONG Yan-qiang<sup>2</sup>, XU Ai-min<sup>3\*</sup>

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Minimally Invasive Therapy Dept II, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To prepare glycolic acid ethyl cellulose microspheres (GAECM) for hepatic artery embolization treatment and to investigate their *in vitro* release property. **Methods** GAECM was prepared using ethyl cellulose as a carrier, adding glycolic acid, by a double emulsion method. The appearance, particle size, drug loading, and encapsulation efficiency were used as indices to assess the roundness, smoothness, size uniformity, and drug contents of the microspheres. The *in vitro* release characteristics of the microspheres were determined by constant temperature oscillation dialysis. **Results and conclusion** The prepared GAECM has a smooth round appearance, with a mean diameter of  $(233.38 \pm 1.62) \mu\text{m}$ , a mean drug loading of  $114.32 \mu\text{g}/\text{mg}$ , an encapsulation efficiency of 78.61%, and a release period of 72 h. The microspheres can meet the requirements of further animal experiments, which provides important reference for using chemical corrosion in drugs used for hepatic arterial embolization studies.

**[Key words]** glycolic acid; ethyl cellulose; microspheres; *in vitro* release

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5): 532-535]

肝癌是病死率仅次于胃癌、食管癌的第3大常见恶性肿瘤, 对于不能行手术切除的肝癌, 临床上一般采用介入治疗, 通过插入动脉的微导管将栓塞剂输送到靶组织或靶器官, 阻断对靶区的血供和营养, 使靶区的肿瘤细胞缺血坏死; 将抗肿瘤药物作为栓塞剂时, 则具有栓塞和靶向治疗的双重作用<sup>[1]</sup>。目前, 临床常在B超或CT影像方法指导下, 经皮穿刺将无水乙醇、乙酸等药物注射于肝癌瘤体内, 这种化

学腐蚀性药物可使瘤体蛋白质凝固、变性, 抑制细胞周期的某一阶段从而致肿瘤细胞凋亡。化学腐蚀性药物与传统化疗药相比, 对肿瘤细胞有更强的破坏作用。国内外学者一致认为对于直径 $\leq 3 \text{ cm}$ 的肝癌, 经皮射频消融治疗效果可与手术相媲美<sup>[2]</sup>。本实验结合我院临床治疗需求, 首次将化学腐蚀性药物羟基乙酸通过制剂技术包裹于微球中, 运用于肝癌的介入疗法。该疗法既栓塞了肿瘤血管, 又能对

**[收稿日期]** 2011-11-14 **[接受日期]** 2012-04-16**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30973458). Supported by National Natural Science Foundation of China (30973458).**[作者简介]** 王新霞, 硕士, 主管药师. E-mail: wangxinxia@126.com

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81875182, E-mail: xuarmy@163.com

血管进行彻底腐蚀,阻止侧支循环的生成,阻断肿瘤供血,而且制成微球制剂还可增强化学腐蚀性药物的弥散及缓释作用。

本微球的制备选择了具有化学腐蚀性作用的药物羟基乙酸,将羟基乙酸水溶液作为内水相,含有羟基乙酸的1%聚乙烯醇(PVA)作为外水相,在溶有乙基纤维素的二氯甲烷中加入内水相,得初乳,再将初乳加入外水相制得复乳,固化,得羟基乙酸乙基纤维素微球,并考察微球的外观、粒径、载药量和包封率。

## 1 材料和仪器

甘醇酸(羟基乙酸,国药集团化学试剂有限公司,批号:F20110118);乙基纤维素(国药集团化学试剂有限公司,批号:20100301);聚乙烯醇1788型[PVA,醇解度:87.0%~89.0%(mol/mol),上海晶纯试剂有限公司,批号:10538];磷酸盐缓冲液(PBS,赛默飞世尔生物化学制品有限公司);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);SK1200H 超声波清洗器(上海市科导超声仪器有限公司);5605 型高速离心机(德国 Hettich 公司);超声乳化仪(美国 Branson 公司);V55C 型冷冻干燥机(美国 Virtis 公司);VTX-3000L 型 UZUSIO 涡旋混合器(日本 LMS 公司);VD53 真空干燥箱(德国 Binder 公司);安捷伦 1100 高效液相色谱仪;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);SHZ-88 台式水浴恒温振荡器;ZS 激光粒度分析仪(英国 Malvern 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)。

## 2 方法和结果

**2.1 微球的制备** 取乙基纤维素 0.18 g,溶于 2 ml 二氯甲烷中,涡旋 3 min 混合均匀,作为油相;配制质量浓度为 0.041 12 g/ml 的羟基乙酸水溶液作为内水相;取 400  $\mu$ l 内水相注入油相中,以 400 W 功率超声 3 min,形成 W/O 初乳;外水相为含有羟基乙酸的 1%PVA,浓度为 0.041 12 g/ml;在 900 r/min 下将初乳用注射器匀速注入 20 ml 外水相中,搅拌 10 min 制得 W/O/W 复乳;之后降低搅拌速度至 400 r/min 搅拌 4 h 挥发二氯甲烷;微球混悬液离心、洗涤、冻干后得干燥微球<sup>[3]</sup>。

**2.2 微球的粒径及形态** 取羟基乙酸乙基纤维素微球适量,于显微镜下观察,微球形态圆整,表面光滑,分散性好,无粘连,粒径均匀;用激光粒度分析仪

测量微球的粒度分布,平均粒径为  $(233.38 \pm 1.62)$   $\mu$ m(图 1、2)。

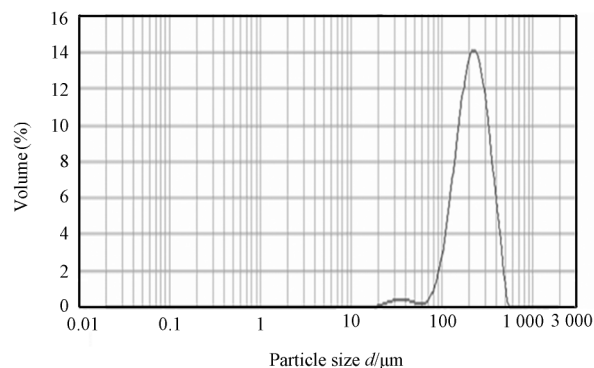


图 1 羟基乙酸乙基纤维素微球粒径分布  
Fig 1 Particle diameter distribution  
of glycolic acid ethyl cellulose microspheres

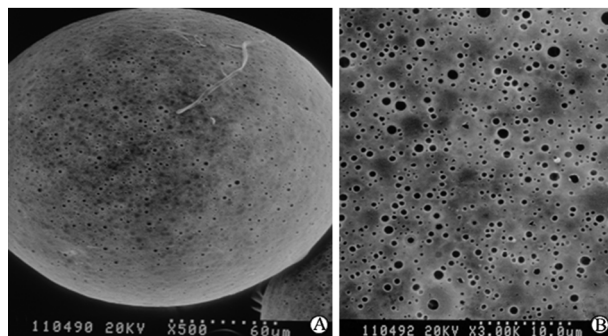


图 2 羟基乙酸乙基纤维素微球粒的扫描电镜照片  
Fig 2 Morphology of glycolic acid ethyl cellulose  
microspheres under scanning electron microscope  
Original magnification:  $\times 500$  (A),  $\times 3000$  (B)

### 2.3 微球中羟基乙酸含量测定

**2.3.1 标准曲线的绘制** 精密称取羟基乙酸 0.012 36 g 置于 5 ml 容量瓶中,加入蒸馏水定容得浓度为 2 472  $\mu$ g/ml 的储备液,将储备液倍比稀释为 5 份,浓度从高至低依次为 2 472、1 236、618、309、154.5  $\mu$ g/ml,于 220 nm 处测定光密度。以光密度(Y)对浓度(X)进行回归,得标准曲线方程:  $Y = 0.3564X - 332.22$ ,  $r^2 = 0.9999$ ,表明羟基乙酸在 154.5~2 472  $\mu$ g/ml 浓度范围内与光密度呈良好线性关系。测得的日内精密密度、日间精密密度符合方法学要求。回收率为  $(97.52 \pm 0.62)\%$ ,符合方法学要求。

**2.3.2 微球载药量和包封率的测定** 精密称取羟基乙酸乙基纤维素微球冻干粉末 100 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 2 ml 萃取,离心  $(869 \times g)$  5 min,上层水溶液用滴管移至 10 ml 容量瓶中,萃取 5 次后定容。利用标准曲线方程计算微球的载药量和包封

率。载药量(%) = 含药量/微球总量 × 100%; 包封率(%) = 实际载药量/理论载药量 × 100%。

2.4 处方和工艺研究

2.4.1 1% PVA 中不同浓度羟基乙酸对微球的载药量和包封率的影响 取乙基纤维素二氯甲烷溶液

作为油相,配制浓度为 0.041 12 g/ml 的羟基乙酸水溶液作为内水相,考察当 1% PVA 中羟基乙酸浓度分别为 1、0.5、0.041 12 g/ml 时对微球载药量和包封率的影响,结果见表 1。

表 1 1% PVA 中不同浓度羟基乙酸和对应的载药量、包封率

Tab 1 Drug content and encapsulation efficiency of microspheres containing different concentrations of glycolic acid in 1% PVA

Glycolic acid in 1% PVA $\rho_B/(g \cdot ml^{-1})$	Internal aqueous phase $\rho_B/(g \cdot ml^{-1})$	Ethyl cellulose $m/g$	Drug content $m_B/(\mu g \cdot mg^{-1})$	Encapsulation efficiency (%)
1	0.041 12	0.183 3	176.32	48.77
0.5	0.041 12	0.181 4	120.88	56.96
0.041 12	0.041 12	0.180 2	114.32	78.61

由表 1 可知,当 1% PVA 中羟基乙酸浓度为 0.041 12 g/ml 时,微球的载药量和包封率相对比较高。

2.4.2 乙基纤维素的量对微球外观的影响 考察乙基纤维素分别为 0.20、0.18、0.15 g 时对微球外观的影响,结果见表 2。

表 2 不同乙基纤维素用量对微球外观的影响

Tab 2 Effects of different ethyl cellulose contents on microsphere appearance

Ethyl cellulose $m/g$	Microspheres appearance
0.20	Adhesion, more white floc, uniform size microspheres
0.18	No adhesion and floc, uniform size microspheres
0.15	More hollow balls, mostly transparent

由表 2 可知,乙基纤维素的量对微球外观和成球性影响较大,当乙基纤维素为 0.18 g 而制备工艺的其他条件不变时,微球的外观和成球性较好。

2.5 羟基乙酸乙基纤维素微球体外释药实验

2.5.1 色谱条件的选择 色谱柱:  $C_{18}$  柱 (250 mm × 4.6 mm, 5  $\mu m$ ); 流动相: 甲醇-PBS (体积比为 5 : 95; PBS 为 13 mmol/L 的磷酸二氢钾、1 mmol/L 磷酸氢二钾, pH 6.0); 流速: 1 ml/min; 柱温: 室温; 进样量: 20  $\mu l$ ; 紫外检测波长: 220 nm。羟基乙酸保留时间为 2.8 min, 且峰型较好, 基本没有其他干扰(图 3)。

2.5.2 标准曲线制备 取羟基乙酸 0.133 0 g 置于 5 ml 容量瓶中, 加入 pH 7.4 的 PBS 5 ml 定容, 得浓度为 26 600  $\mu g/ml$  的储备液, 将储备液倍比稀释为 5 份, 浓度从高至低依次为 26 600、13 300、6 650、3 325、1 662.5  $\mu g/ml$ , 220 nm 处测定光密度。以光密度(Y)对浓度(X)进行回归, 绘制标准曲线。标准

曲线方程为:  $Y = 0.366X - 422.28 (r^2 = 1)$ , 表明 1 662.5 ~ 26 600  $\mu g/ml$  范围内, 羟基乙酸的浓度与其 220 nm 处光密度呈良好线性关系。

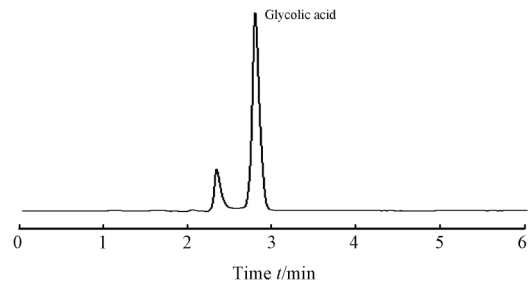


图 3 羟基乙酸高效液相色谱图  
Fig 3 HPLC of glycolic acid

2.5.3 羟基乙酸乙基纤维素微球的体外释放 称取微球适量, 置于离心管内, 加入 pH 7.4 的 PBS, 放入台式水浴恒温振荡器中, 设置温度 (37 ± 0.5) °C, 转速 100 r/min。在设定时间点 (30 min, 1、2、3、5、7、9、12、24、48、72 h) 离心取上清溶液, 用高效液相色谱仪于 220 nm 处测定光密度, 按 2.5.1 项下条件测定释药量, 计算累积释药百分率, 以累积释药百分率对时间作图<sup>[4-6]</sup>, 结果见图 4。

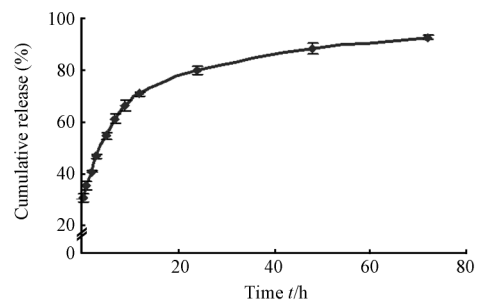


图 4 羟基乙酸乙基纤维素微球体外释药曲线图  
Fig 4 Curve of glycolic acid ethyl cellulose microspheres in vitro release

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

由图4可知:羟基乙酸乙基纤维素微球有突释现象,2 h处释放了40.75%,但后期缓释效果良好,可释药72 h以上。

### 3 讨论

本实验主要研究了羟基乙酸乙基纤维素微球的制备工艺,羟基乙酸腐蚀性强,包裹于微球中易外渗,当外水相采用1% PVA溶液时,所包出来的微球载药量和包封率较低,当1%PVA中羟基乙酸浓度为0.041 12 g/ml且外水相所含药物浓度与内水相药物浓度相同时,微球的包封率和载药量相对较高,微球外观和成球性也较好。所以,选用1%PVA中羟基乙酸浓度为0.041 12 g/ml。实验结果表明乙基纤维素用量越多形成的初乳就越黏稠,对微球的粒径大小、圆整性等外观影响较大;乙基纤维素用量过低,难以成球,所成微球在显微镜下为透明状,即未包进药物。乙基纤维素为0.18 g时,微球的载药量和包封率也较高。在体外释放实验中,羟基乙酸乙基纤维素微球体外释放有突释现象,2 h处释放了40.75%,可能与外水相中含有羟基乙酸有关,但后期缓释效果良好,可释药72 h以上。

本实验所制备的羟基乙酸乙基纤维素微球可满足进一步的动物实验要求,同时为化学腐蚀性药物用于临床介入治疗提供了重要的理论和实践参考。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] 杨劲松. 动脉栓塞微球的研究进展[J]. 中国现代医生, 2008, 46:71-73.
- [2] Huo T I, Huang Y H, Wu J C. Percutaneous ablation therapy for hepatocellular carcinoma: current practice and future perspectives[J]. J Chin Med Assoc, 2005, 68:155-159.
- [3] 王锡山, 汤庆超, 汤 钧. 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.
- [4] 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缓释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.
- [5] 符旭东, 高永良. 缓释微球的释放度试验及体内相关性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2003, 12:608-611.
- [6] 赵先英, 刘毅敏, 肖 湘, 粟永萍, 贺 建, 李明春, 等. 乳酸-羟基乙酸共聚物缓释纳米微球的制备及体外释药评价[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31:1155-1157.

[本文编辑] 尹 茶

## 《军医大学学报(英文版)》征稿、征订启事

《军医大学学报(英文版)》(*Journal of Medical Colleges of PLA*)是由第二、三、四军医大学及南方医科大学(原第一军医大学)共同主办、国内外公开发行(CN 31-1002/R, ISSN 1000-1948)的高级药理学综合性英文学术刊物,1986年6月创刊。本刊主要报道基础、临床、预防、军事医学、药学和中国医学等领域的最新科研成果、新理论、新技术和新方法。辟有专家论坛、基础研究、临床研究、经验交流、短篇报道、个案报告等栏目。

本刊为中国英文版科技论文统计源期刊,并被纳入中国期刊网、万方数据库和中文科技期刊数据库等国内所有重要检索系统,已被美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(VINITI Abstract Journal)、波兰《哥白尼索引》(IC)和荷兰《斯高帕斯》(Scopus)等国际知名检索系统收录,期刊全文已进入爱思唯尔(Elsevier)科技出版集团所属的ScienceDirect全文数据库(<http://www.elsevier.com/locate/jmcpla>)。

为了弘扬科研创新精神,推动医学事业发展,促进海内外学术交流,本刊面向全国和海外作者征稿。

来稿要求:来稿请附中文的文题、作者姓名、单位名称及较详细的中文摘要和3~8个关键词,参考文献放在文末。来稿务必写清个人通讯地址及联系电话,编辑部在接到稿件30日内通知作者稿件是否被采用。

刊发周期:由全国相关学科领域的知名专家和权威人士进行审稿,对审稿通过的论文2~6个月内安排刊出。国家、省部级基金资助和重点攻关项目稿件优先发表。

本刊为双月刊,A4开本,80 g铜版纸彩色印刷,每期定价15元,全年90元。可在当地邮局订阅(邮发代号4-725),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。

地 址:上海市翔殷路800号《军医大学学报(英文版)》编辑部,邮编:200433

联系人:徐 佳

电 话:021-81870788 转 818 分机

E-mail: jydxxb@yahoo.com.cn