

载表阿霉素聚乳酸微球的制备及性质研究

周志敏^{1,2}, 崔强¹, 陈欣¹, 叶社房¹, 翁建¹, 张其清^{1,3*}

(1. 厦门大学医学院生物医学工程研究中心, 2. 厦门大学化学化工学院化学系, 福建 厦门 361005;

3. 中国医学科学院, 中国协和医科大学生物医学工程研究所, 天津 300192)

摘要: 表阿霉素是广谱的抗肿瘤药物, 为了减少给药量, 降低药物的毒副作用, 并达到缓慢释放的目的, 本研究以 Span-80 和 Tween-80 复合乳化剂为初乳乳化剂, 以聚乙烯醇水溶液为复乳乳化剂, 采用复乳-溶剂挥发法制备了聚乳酸载药微球, 并分别用激光粒度分析仪, 光学显微镜, 透射电子显微镜, 扫描电子显微镜以及激光共聚焦显微镜对微球微观形态进行了表征. 通过优化实验, 所得载表阿霉素聚乳酸微球粒径 2~5 μm , 载药率最高可达到 4.39%, 包封率达 37.2%, 72 h 体外累积释放量为 34.9%, 具有明显的缓释效果. 本研究制备了表阿霉素缓释新剂型, 为进一步的动物实验、临床实验和临床应用提供了有价值的参考数据, 有很好的应用前景.

关键词: 聚乳酸微球; 表阿霉素; 药物释放系统

中图分类号: R 97

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)02-0209-04

近年来, 高分子包囊技术在医学领域得到了广泛的应用, 用高分子材料作为载体的微球不仅能控制药物以一定速度释放, 还可对生物体的生理指标做出反馈, 因而可以成为靶向药物释放体系. 在药物缓释体系中, 生物降解型聚酯是研究较多的材料, 其中引人注目的是聚乳酸、聚羟基乙酸及其共聚物, 它们均具有良好的生物降解性和生物相容性. 表阿霉素是广谱的抗肿瘤药物, 骨髓抑制和心脏毒性比阿霉素低 25%, 主要应用于肝癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌和白血病的化疗^[1-2]. 将表阿霉素制成微球剂型可达到缓释、靶向给药的目的, 降低给药量, 同时减少药物的毒副作用. 本文采用复乳-溶剂挥发法制备了聚乳酸载药微球, 并系统的考察了载药微球的形态、粒径、载药率、包封率和药物的体外释放行为.

1 实验部分

1.1 材料与仪器

聚乳酸(PLA)(DL型)(重均分子量为5万): 购自山东省医疗器械研究所; PVA(聚合度500): 由中国石化集团四川维尼纶厂提供; 表阿霉素: 购自浙江海正药业股份有限公司; Span-80: 由国药集团化学试剂有

限公司生产; Tween-80: 由广东省汕头市西陇化工厂生产.

Ultra Turrax T18 分散机, Beckman J-25 冷冻离心机, Labconco 冷冻干燥机, Leica Dmire2 荧光显微镜, H-600 透射电子显微镜(TEM), LEO-1530 扫描电子显微镜(SEM), Leica TCS SP2 激光共聚焦显微镜(CLSM), OMEC LS-POP() 激光粒度分析仪, Shimadzu UV-2550 紫外分光光度计.

1.2 复乳法制备载药微球

本实验采用复乳-溶剂挥发法制备载药微球^[3]. 初乳乳化剂采用 Span-80 和 Tween-80 复合乳化剂^[4], 固定体积比为 1:5, 用分散机分散体系, 10 000 r/min 搅拌形成初乳. 复乳乳化剂采用 1% 聚乙烯醇水溶液, 6 000 r/min 搅拌形成复乳. 室温挥发二氯甲烷至完全, 20 000 r/min 离心, 水洗 3 次后冷冻干燥成桔红色粉末, -4℃ 低温贮存.

用激光粒度分析仪分析粒径大小, 分别用荧光显微镜, 透射电子显微镜, 扫描电子显微镜和激光共聚焦显微镜分析粒径大小及微球形态, 紫外分光光度法在 232 nm 测定微球的载药率、包封率和药物释放.

1.3 载药微球的形态观察

分别用透射电子显微镜、扫描电子显微镜、荧光显微镜以及激光共聚焦显微镜对微球的形态进行考察. 将制备的 PLA 载药微球分散在去离子水中, 然后将分散液滴在干净的硅片上, 自然干燥后制成扫描电镜样品或者直接用粉末观察. 同样的方法将分散液滴在铜网上, 自然干燥后进行透射电镜观察. 将分散液滴加在

收稿日期: 2006-06-22

基金项目: 厦门市科技创新资金项目(3502720041029), 教育部回国留学人员启动基金(K13003), 厦门大学新世纪优秀人才(203117)和厦门大学引进人才科研启动基金(XK0001)资助

* 通讯作者: zhangqig@xmu.edu.cn

干净的载玻片上自然挥发后分别用荧光显微镜和激光共聚焦显微镜观察样品的形态以及确认表阿霉素在微球中的分布。

1.4 载药微球的粒径测定

取适量的微球粉末分散在去离子水中,用激光粒度分析仪测定粒径大小。

1.5 载药微球的载药率和包封率的测定

精确称取适量 PLA 载药微球粉末,溶于 10 mL 二氯甲烷中,用 20 mL 0.1 mol/L HCL 萃取,合并萃取液后离心取上清液,用紫外分光光度计在 232 nm 处测定吸光度,根据标准曲线得到表阿霉素的浓度,计算微球的载药率和包封率。载药率和包封率按以下公式计算:

$$\text{载药率} = \frac{\text{表阿霉素的含量}}{\text{微球的质量}} \times 100\%$$

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

1.6 载药微球的体外释放

精确称取 50 mg 载药微球,将其分散在 3 mL PBS 缓冲液中,置于透析袋中。将装有表阿霉素缓释微球 PBS 分散液的透析袋放入盛有适量 PBS 缓冲液的烧杯中,密封,在 37 °C, 100 r/min 条件下恒温振荡,定时取样,同时立即补加相同量的 PBS 缓冲液。样品在 232 nm 处测定吸光度,根据标准曲线得到表阿霉素的浓度,计算出累积释放量。

2 结果与讨论

2.1 载药微球的光学显微镜、透射电镜、扫描电镜和激光共聚焦显微镜观察

图 1 分别为载药微球的光学显微镜、透射电镜、扫描电镜和激光共聚焦显微镜照片,制备条件见表 1D。图 1(a) 是载药微球的光学显微镜照片,从中可以看到微球粒径分布均匀,分散良好,大小在 2~5 μm。为了进一步研究微球的形态和尺寸,在 TEM 上也看到了圆滑的聚乳酸载药微球,且为明显的基体式结构(图 1(b))。但在 TEM 上很难观察到密集分布的大小规整的 PLA 微球,原因可能为:PLA 微球粒径较大,在 5 μm 左右,制样的铜网网孔较小,难以容纳大量的微球;另外在制样过程中 PLA 微球本身不易大量附着在铜网表面,大部分滑落下去,只剩下残余的 PLA 微球依稀可见。

图 1(c)和(d)是载表阿霉素 PLA 微球的 SEM 照

表 1 表阿霉素浓度和 PLA 浓度对载药率和包封率的影响
Tab.1 Effect of the concentrations of PLA and epirubicin on the drug loading and encapsulation efficiency

	PLA 的量 / mg	表阿霉素浓度 / (mg · mL ⁻¹)	载药率 / %	包封率 / %
A	200	10	0.693	14.6
B	200	20	0.709	7.84
C	200	30	0.582	4.48
D	150	20	4.39	37.2
E	100	20	4.13	24.7

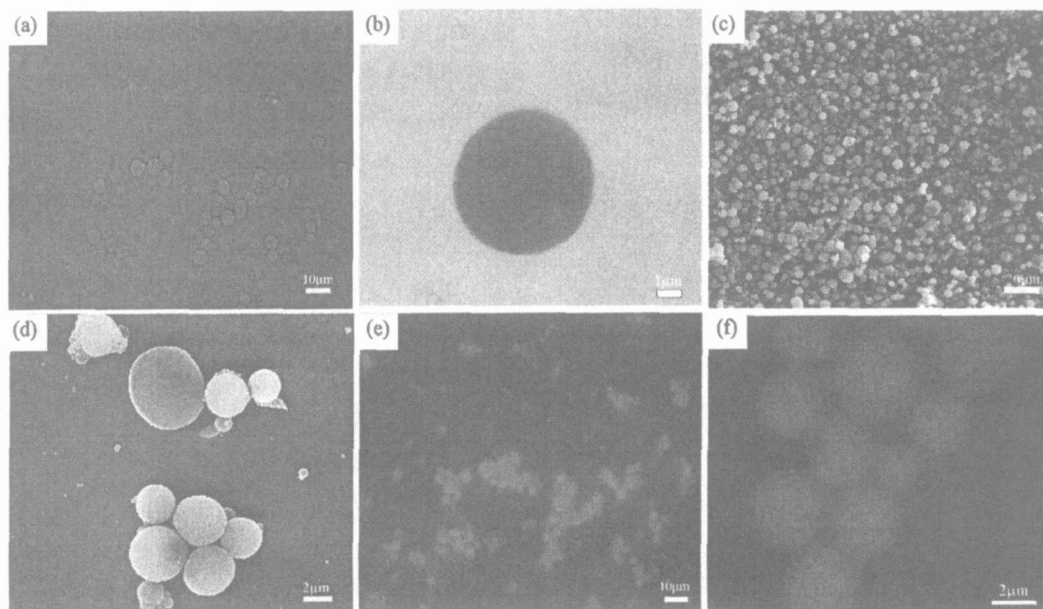


图 1 载表阿霉素 PLA 微球的 OM/ TEM/ SEM/ CLSM 照片

Fig.1 Images of microspheres containing epirubicin with different microscopes

(a)optical microscope(OM); (b)TEM;(c) and (d) SEM; (e)fluorescence microscope;(f)CLSM

片.从图 1(c)可以看出,载药微球大小均匀,粒径在 2~5 μm ,低倍下观察微球紧密排列,球形规则.在高倍下,观察到微球之间有粘连,并且微球表面粗糙,不光滑,有较小的凹凸现象,这可能是溶剂挥发过程所致,这也将成为内部药物与外相溶液自由“交换”的通道.并且由于 PLA 的玻璃态转变温度较低,熔点较低(170~180 $^{\circ}\text{C}$),微球在局部放大时,由于真空条件下电子束能量很高容易使微球变形^[5],所以对于 PLA 微球放大倍数一般不要超过 5 千倍,以防止聚合物的融化变形.在药物释放过程中,除了随着 PLA 的降解药物释放以外,这些小的凹凸也有助于药物分子从微球本体逃逸到体液中.

图 1(e)是载药微球的荧光显微镜照片,可以看到表阿霉素分布在微球表面.表面的这部分药物可能是在成球过程中,游离态的表阿霉素附着在 PLA 微球表面,这部分药物由于没有包裹在内部,只是物理吸附作用黏附在表层,极易在介质中首先脱离微球而释放出来,从而形成药物释放过程中很难控制的“突释”现象.为了进一步了解微球内部表阿霉素的分布情况,利用激光共聚焦显微镜对载药微球进行断层扫描.图 1(f)显示表阿霉素均匀分散在微球内部,同时也直观的证明了微球是基体式结构,而非壳-核结构.

另一方面,从图 1 各种表征手段中还可以确认微球的粒径在 2~5 μm ,粒径分布较窄.

2.2 载药微球粒径测定

用激光粒度分析仪测定载药粒子粒径为 5.81 μm ,由于显微镜观察的只是局部粒子,而激光粒度分析仪测定的是统计值,从实验结果来看与图 1 中的粒径参数一致.

2.3 微球载药率和包封率

精确称取 PLA 载药微球粉末,溶于二氯甲烷中,用 0.1 mol/L HCL 萃取,离心取上清液,用紫外分光光度计在 232 nm 处测定吸光度,对照标准曲线得到表阿霉素的浓度,计算微球的载药率和包封率.

由表 1 知道载药率和包封率并不随着投药量的增加而成线性规律,当固定 PLA 的量为 200 mg,表阿霉素的浓度由 10 mg/mL 增加到 30 mg/mL 时,可以看到表阿霉素的浓度为 20 mg/mL 时的载药率最高,但包封率居中,最大包封率是当浓度为 10 mg/mL 时.这说明投药量大是可以提高微球的载药率,但包封率却下降了,说明有更多的药品浪费.造成内水相表阿霉素浓度越大包封率越低的原因可能是:在微球的形成过程中,药物由于内水相和外水相的浓度差而不断向外扩散,由菲克定律 $J = -D \cdot C/L$ (J 为扩散量, D 为扩散系数, C 为不同介质间的浓度差, L 为扩散方向

上的距离)可知扩散速度与浓度差成正比.当内水相表阿霉素浓度较高时,表阿霉素在两相间较大的浓度差导致扩散速度加快,内水相中表阿霉素浓度的增加可能无法补偿因高速药物扩散带来的损失,便造成了包封率的明显降低.

当降低 PLA 的浓度,发现微球的载药率和包封率都有了质的变化,载药率增加了 6 倍,包封率也增加了近 5 倍. PLA 的量从 200 mg 减少到 100 mg,微球的理论载药率从 9.06% 增加到 16.7%,而包封率的增加说明了载药率增加的幅度. PLA 浓度的减小,可能有利于初乳的稳定,使之在初乳过程中包裹住了大部分表阿霉素,使载药率和包封率有了大幅度的提高.但如果 PLA 的浓度大幅度减小时,根据 Garti 的乳液形成模型^[6],在水-油-水界面的膜过于脆弱,导致部分药物的流失而进入外水相,从而导致包封率的相对减小.虽然 PLA 的质量为 150 mg 和 100 mg 时对载药率影响不大,但包封率却降低了很多,从载药率和包封率的公式可以看出,PLA 质量的减少,无疑使理论载药率得到了提高,当实际载药率相差不多时,包封率可以相差较大.

2.4 载药微球的体外释放

从图 2 释放曲线可以看出,载表阿霉素聚乳酸微球 72 h 释放了 34.9%,具有明显的缓释效果.但同时可以看到载药微球具有明显的突释行为,6 h 释放了 21.9%,24 h 后释放趋于平缓,缓释效果良好.载药微球先突释后缓释主要是因为以下原因:第一,载药微球表面吸附的表阿霉素在 PBS 液中首先释放出来,造成药物的突释.第二,当表面吸附的表阿霉素释放完后,微球内部的表阿霉素通过微球表面的微小孔洞向外扩散,并且随着时间的延长,聚乳酸表面出现溶蚀现象^[7],以及进一步的降解致使内部药物缓慢释放到介质中,从而达到理想的释放效果.

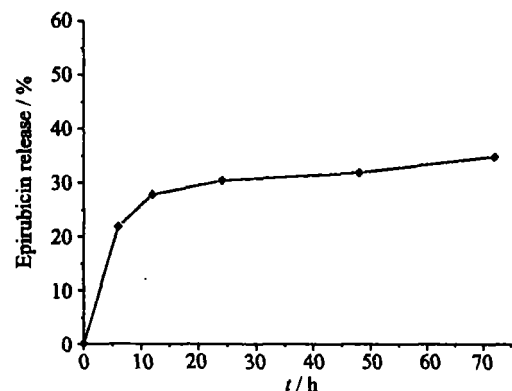


图 2 载药微球的释放曲线

Fig. 2 The release profile of epirubicin from PLA microspheres

3 结 论

表阿霉素是广谱抗癌药物,本研究制备了载表阿霉素的聚乳酸缓释微球,通过优化实验,确定了最佳实验方案,开发的缓释微球制剂的形态、粒径、载药率、封装率和体外释放行为等药剂学指标满足药物缓释的要求,为进一步的临床应用提供了有用的参考数据。

参考文献:

- [1] Birtle A J. Anthracyclines and cardiotoxicity[J]. Clin Oncol, 2000, 12:146 - 152.
- [2] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in anti-tumor activity and cardiotoxicity [J]. Pharmacol Rev, 2004, 56:185 - 229.
- [3] Yang Y Y, Chung T S, Ng N P. Morphology, drug distri-

bution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method [J]. Biomaterials, 2001, 22:231 - 241.

- [4] 刘海峰,常津,张爽男,等.明胶-聚乳酸载药纳米微球的制备及其体外释药研究[J].中国生物医学工程学报, 2003, 22(2):178 - 182.
- [5] Zhang Y W, Jiang M, Zhao J X, et al. Hollow spheres from shell cross-linked, noncovalently connected micelles of carboxyl-terminated polybutadiene and poly(vinyl alcohol) in water[J]. Macromolecules, 2004, 37:1537 - 1543.
- [6] Garti N, Aserin A. Double emulsions stabilized by macromolecular surfactants[J]. Adv Colloid Interfac, 1996, 65:37 - 69.
- [7] 赵刚,平其能,刘拥军.两种聚酯微球的体外降解机制研究[J].中国药科大学学报, 2004, 35(1):24 - 27.

Preparation and Characterization of Polylactide Microspheres Containing Epirubicin

ZHOU Zhi-min^{1,2}, CUI Qiang¹, CHEN Xin¹, YE She-fang¹,
WENG Jian¹, ZHANG Qi-qing^{1,3*}

(1. Research Center of Biomedical Engineering, Medical School, Xiamen University,

2. Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering,
Xiamen University, Xiamen 361005, China;

3. Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Science,
Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

Abstract: Epirubicin is an anthracycline antibiotic and antitumor epimer of doxorubicin that has been used to treat a wide range of cancers. Polylactic acid (PLA) microspheres containing epirubicin hydrochloride were prepared with double emulsion solvent evaporation technique in order to reduce the side effect and the dose of drug. The complex of sorbitan monooleate (Span-80) and sorbitan polyoxyethylene monooleate (Tween-80) (1:5 by vol.) was used as emulsifier of the primary emulsion. The second emulsion was emulsified with Poly(vinyl alcohol) (PVA) as surfactant. We investigated the properties of the microspheres about size, morphology, drug loading, encapsulation efficiency and drug release in vitro, by means of dynamic light scattering, optical microscope, transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscope (CLSM) and so on. The results of optimization showed that the microsphere size of about 2~5 μm was the optimal. The drug loading and encapsulation efficiency reached 4.39% and 37.2%, respectively. The epirubicin release from the PLA microspheres was sustainable and slow, cumulative release of epirubicin in 72 h was 34.9% in vitro. To some extent, this study about PLA microspheres containing epirubicin has a potential application in drug delivery system and valuable references for the relative experiments in vivo and in clinic.

Key words: polylactide microspheres; epirubicin; drug delivery system