

· 工业药学 ·

抗肿瘤靶向白蛋白微球的研究

浙江医学研究院药物研究所 陈国神 钟建平 胡富强*

提 要 本实验应用W/O乳化技术,经加热固化制备直径 $45 \pm 10 \mu\text{m}$ 的抗肿瘤靶向白蛋白微球。通过5因素,2水平的正交试验,确定对微球平均粒径、粒度分布影响最大的是搅拌速度与乳化温度的交互作用。C85白蛋白微球体外放7天的药量为27%。

载有抗肿瘤药物的白蛋白微球,经超选择动脉插管,可栓塞肿瘤部位的微小动脉,阻断肿瘤部位的供养,同时微球以被动形式长时间缓慢释放药物,以有效的杀伤肿瘤细胞和改善抗肿瘤药物的治疗指数^[1]。近年来,国外报道在临床上使用含丝裂霉素C等抗肿瘤药物的白蛋白微球,获得比较好的治疗效果^[2],指出这种给药系统与栓塞技术合用,能有效地改善药物在体内的吸收、分布,尤其适用于手术无法切除的肝癌病人。

本文针对白蛋白微球制备过程中,影响其平均粒径及粒度分布的因素,通过正交试验,对最佳工艺条件进行研究。并对白蛋白

微球的体外释放作了探索。

材料和方法

一、材 料

1. 牛血清白蛋白:电泳纯,上海化学试剂分装厂
2. 花生油和棉子油:杭州油脂公司提供
3. C85:抗肿瘤药物

二、方 法

1. 正交试验设计

经预试验,拟定表1五种对白蛋白微球平均粒径、粒度分布有影响的因素,每种因素选择二个水平。

表1 因素水平表

水 平	因 素	A	B	C	D	E
		白蛋白浓度 (%)	搅拌速度 (rpm)	乳化时间 (min)	乳化温度 (℃)	油 相
1		12.5	280	15	20 ± 2	花 生 油
2		25	380	30	40 ± 2	棉 子 油

考虑到各因素间的交互作用,将五种因素按正交试验 $L_{16}(2^{15})$ 的随机安排进行试验(见表2)。

2. 白蛋白微球的制备

在内置四块档板的平底烧杯(直径60mm、高110mm)中,加入100ml植物油(花

生油或棉子油)。将四叶式旋桨(直径42mm)置于烧杯中央,并浸没至油层三分之二深处(见图1)。在一定的搅拌速度下,将一定量的白蛋白水溶液经恒速加样器加到油相中。乳化后,于 130°C 加热固化30min,冷却后,离心分离微球,用乙醚洗去吸附在微球表面

的植物油^[3,4]。

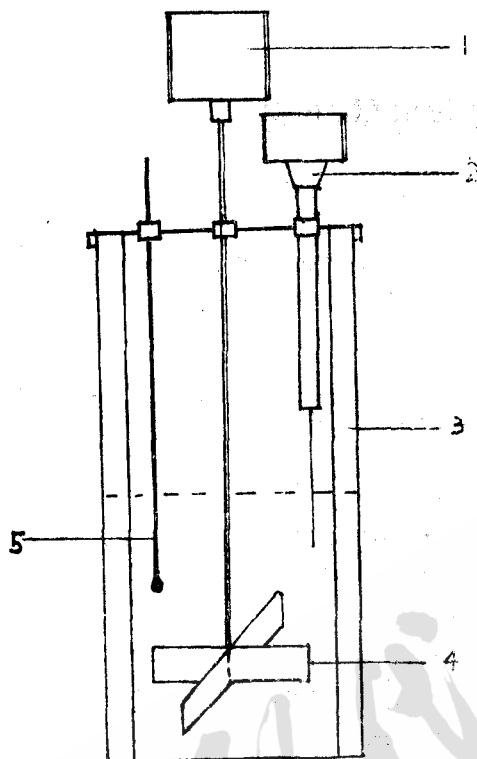


图1 实验装置

1. 搅拌马达 2. 恒速进样器 3. 挡板
4. 搅拌桨 5. 温度计

3. 微球粒度分布观察

将固化微球置于氯仿中,用超声波分散均匀,取一定量分散在含0.1% Tween-80的生理盐水中,用红细胞计数板,在标定过的光学显微镜下观察五个不同的视野,累计微球不得少于500个^[6]。

4. 含药微球与空白微球的粒度分布比较

C85药物经超声波(250W)粉碎至微粉后,加入白蛋白溶液,同上述方法制备微球。结果分别用光学显微镜和库尔特(Coulter)计数器观察比较。

5. C85白蛋白微球的含药量测定

精密称取C85白蛋白微球,加一定量的0.1N NaOH溶液消解,待消解液澄清后,加pH7.2的磷酸缓冲液定量稀释。以同样的

方法消解不含C85药物的白蛋白微球作为空白对照。于波长254nm处测定吸收值,从标准曲线回归方程计算其含药量。

6. C85白蛋白微球的体外释放试验

本微球的释放试验在动力学透析系统中进行。精密称取C85白蛋白微球50mg,置于释放池(直径1.6cm、高2.0cm的圆柱管,两端用SPECTRAPOR透析膜封口)中,同时加入pH7.2磷酸缓冲液3ml,使微球均匀分散后,将此释放池置于50ml、pH7.2的磷酸缓冲液中进行透析,整个释放过程在37℃、50cpm条件下进行。在规定间隔时间,取释放液50ml,同时补充pH7.2的磷酸缓冲液50ml;释放液于波长254nm处测定吸收值,从标准曲线回归方程计算C85药物的释放量。

结 果

一、白蛋白微球的最佳工艺条件

采用 $L_{16}(2^{15})$ 正交试验所得结果及直观方差分析处理见表2。

对表2 R值进行直观比较,各因素及交互作用对微球粒度分布的影响,按如下顺序递减: $B \times D$ $A \times B$ $A \times D$ D B A E C $A \times C$ $B \times C$ $C \times D$

其中影响最大的是 $B \times D$ 的交互作用。根据表2计算出B与D之间,四种搭配的平均值,见表3。

从表3可见 B_1 与 D_1 、 B_2 与 D_2 的搭配最好。再进一步考虑A与B的交互作用,结果见表4。

由表4可见 A_2 与 B_2 的搭配最好。再根据表2中的K值考虑C及E后,确定微球的最佳制备条件是: $A_2B_2C_1D_2E_1$ 。

二、含药微球与空白微球的粒度分布

在相同条件下,制得的含药微球和空白微球用光学显微镜计数,结果表明含药微球与空白微球的粒度分布具有一致性(见表5)。作者同时用库尔特计数器计数,获得的结果

表2 正交试验 $L_{16}(2^{15})$ 的安排和试验结果 ($N=3$)

表头设计		A	B	A×B	C	A×C	B×C	D	A×D	B×D	C×D	E				试验结果	
列	号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	V %*
试验号	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	75.2
	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	16.2
	3	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	55.3
	4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	27.7
	5	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	15.6
	6	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	66.7
	7	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	23.2
	8	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	63.2
	9	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	61.5
	10	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	19.6
	11	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	77.1
	12	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	6.9
	13	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	68.8
	14	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	77.8
	15	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2	55.9
	16	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1	60.6
K ₁	343.4	339.8	437.8	401.7	374.5	375.8		432.6	334.2	528.4		379.5	412.1				
K ₂	428.2	431.8	333.8	369.9	397.1	395.8		339	437.4	243.2		392.1	359.5				
R	84.8	92	104	31.8	22.6	20		93.6	103.2	285.2		12.6	52.6				

* 微球在 $45 \pm 10 \mu\text{m}$ 范围内的体积百分率

表3 B与D的交互作用

B	D	
	D_1	D_2
B_1	269.1	70.7
B_2	163.5	268.3

表4 A与B的交互作用

B	A	
	A_1	A_2
B_1	174.7	165.1
B_2	168.7	263.1

表5 含药微球与空白微球的粒度分布

微球直径 (μm)	含药微球		空白微球	
	n*	V %**	n	V %
20~27	132	2.3	131	2.5
28~34	113	4.5	144	6.3
35~41	364	27.4	247	20.7
42~48	272	33.3	183	25.0
49~55	88	16.3	164	33.9
56~67	53	16.2	34	11.6
$\bar{X}$	45.3 μm		45.9 μm	
SD	8.9		8.6	
$\bar{x}_{95\%}$ 可信限	45.3 $\pm$ 9.3 μm		45.9 $\pm$ 9.0 μm	

• 微球粒数

•• 微球的体积百分率

与光学显微镜获得的计数结果进行对照, 其95%可信限基本一致。

三、C85白蛋白微球的含药量及体外释放特性

本微球的含药量为10.23%。

C85微球与C85溶液剂在同样条件下进

行释放, 后者经6hr释药量为80%, 而C85微球在同一时间内仅释放3%, 7天的总释药量为27%。

讨 论

血清白蛋白作为药物载体具有生物可

降解、无抗原性、载药量高、理化性质稳定等特点^[1]。近年来,国外在研究靶向微球制剂中,广泛采用这种材料作为药物载体,并获得比较满意的结果^[7,8]。日本 Fujimoto^[9]等人利用人血清白蛋白研制成丝裂霉素C靶向微球,经临床试验^[2],15例肝癌病人在接受这种微球治疗后,有60%病人癌肿缩小50%以上,且药物的毒副反应很小。因此,这种微球制剂用于肿瘤化疗是十分有意义的。

本研究对国外报道的微球制剂工艺作了改进。通过五因素(同时考虑各因素间的交互作用)、二水平的正交试验,获得白蛋白微球的最佳制备工艺条件是:①白蛋白浓度:25%;②搅拌速度:380rpm;③乳化时间:15min;④乳化温度:40±2℃;⑤油相:花生油。其中影响最大的是乳化温度与搅拌速度的交互作用。采用此最佳工艺条件制备的白蛋白微球,其粒径在45±10μm范围内的有79.6%,平均粒径45.9μm,95%可信限为45.9±9.0μm。

为测定C85原料药在高温加热时的稳定性,将此原料药经180℃、2hr加热后,与标准品对照、其紫外吸收特性未发生改变。因此,用本实验温度加热固化微球,将不会导致C85药物的分解。

C85白蛋白微球与C85溶液相比,具有缓慢释放药物的特性,这有利于在肿瘤部位维持长久、恒定的血药浓度,并能减轻药物在全身的毒副反应。本微球体外释放7天后,其几何形状与释放前相比,未见有明显改变,这对长时间栓塞肿瘤部位的微小动脉是有利的。

参 考 文 献

- [1] Fujimoto S, et al: Cancer 55: 522, 1985
- [2] Fujimoto S, et al: J Jpn Soc Cancer Ther. 19:288, 1984
- [3] Burger J J, et al: Int J Pharm 23:333, 1985
- [4] William E, et al: J Pharm Sci 71:1323, 1982
- [5] Gailo J M, et al: Int J Pharm 22:63, 1984
- [6] 张中和等: 中国医院药学杂志 4:22, 1984
- [7] Sugibayashi K, et al: Chem Pharm Bull 27:204, 1979
- [8] Morimoto Y, et al: ibid 29:1433, 1981
- [9] Fujimoto S, et al: Cancer Drug Delivery 2:173, 1985