

氨甲喋呤铁磁性微球的制备及物理性质测定

朱希强 黄 铭 封 云 李 华(济南 250001 济南铁路中心医院药剂科; 济南 250012 山东医科大学药学院)

摘要 目的:制备氨甲喋呤(methotrexate, MTX)、铁磁性微球(ferromagnetic microspheres, FMS),探讨工艺条件对成球的影响,并测定微球的粒径,磁性物质和药物的含量以及药物释放度等主要物理性质。方法:以人血白蛋白(Human serum albumin, HSA)作载体,磁铁矿粉作磁响应物质,用加热固化法制备抗肿瘤药物 MTX 的磁性微球,显微镜下观察微球形态大小,计算粒径分布,重量法测定磁性物质的含量,紫外分光光度法测定 MTX 含量及体外释放度。结果:控制工艺条件可得粒径 $20 \sim 60\mu\text{m}$ 为主, Fe_3O_4 含量为 $61.90\% \sim 64.57\%$, MTX 含量 $8.30\% \sim 9.11\%$,且具有一定缓释性能的磁性微球(FMS)。控制固化时间可以改变微球的释放性能。结论:自制的 FMS 符合临床使用要求,有希望作为新型药物载体用于靶向给药系统。

关键词 铁磁性微球;氨甲喋呤;白蛋白;乳化;加热固化法

Preparation and measurement of physical properties of ferromagnetic methotrexate - bearing microspheres

Zhu Xiqiang(Zhu XQ), Huang Ming(Huang M), Feng Yun(Feng Y), et al (Department of Pharmacy, Jinan Railway centre Hospital, Jinan 250001)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To prepare ferromagnetic methotrexate - bearing microspheres (FMS), investigate the influence of technological factors on microspheres formation, and determine physical properties such as size, content of Fe_3O_4 and methotrexate (MTX) and dissolution rate of FMS in vitro. **METHODS:** FMS were prepared by heat denaturation using human serum albumin (HSA) as a matrix and powered Fe_3O_4 as magnetically responsive material. The shape and size of FMS were observed with microscope. Magnetic content was determined by gravimetric analysis after hydranating microspheres. The percentage incorporation of MTX and the dissolution rate were assessed by UV spectrophotometry. **RESULTS:** Under proper conditions, FMS distributing mainly in diameter of $20 \sim 60\mu\text{m}$, containing $61.90\% \sim 64.57\%$ Fe_3O_4 and $8.30\% \sim 9.11\%$ MTX, were prepared. The drug entrapped in FMS could be released sustainedly. It is available to alter microsphere's

releasing properties by controlling heat denaturation period. **CONCLUSION:** The microspheres prepared in our laboratory could be expected to apply to clinical targeting system as a carrier of antineoplastic drug.

KEY WORDS ferromagnetic microspheres, methotrexate, albumin, emulsify, heat denaturation

为提高抗肿瘤药物的靶向性,降低其全身分布引起的毒副作用,近年来各国学者广泛研究了一种新型制剂——磁性微球^[1,2],其粒径多为1~3 μm ,对定位磁场要求较高,且难以完全栓塞^[3]。我们以人血清白蛋白作载体^[4],磁铁粉作为磁响应物质,研制出粒径20~60 μm 的氨甲喋呤铁磁性微球^[5]。在外加磁场作用下,该粒径的FMS能停留栓塞于靶区并释放化疗药物^[6]。MTX是一种有效的抗癌药物,国内外学者尚未用于磁性微球的开发研究。本研究首次制备了MTX的FMS,并测定其粒径大小,分布和 Fe_3O_4 、MTX含量、MTX体外释放度等物理性质。

1 仪器材料

TG328B 电光分析天平(上海天平仪器厂);WFZ800-D₂型紫外-可见分光光度计(北京第二光学仪器厂);178X-2型片剂四用测定仪(上海黄海药检仪器厂);MTX(江苏连云港制药厂,批号:961009);人血清白蛋白(卫生部兰州生物制品研究所;批号:960407);磁铁粉(中国场南化工厂,批号:940402);花生油(药用);无水乙醚(分析纯);胃蛋白酶(自制)。

2 实验方法

2.1 MTX 铁磁性微球的制备

精密称取MTX适量加入到1ml人血清白蛋白中(200mg HSA/ml)中,充分搅拌至MTX溶解,加入磁性物质混匀作为水相。取花生油200ml加入到水相中以适宜速度搅拌,50℃乳化一定时间,逐渐升温至110℃,固化,然后在冰水浴中搅拌,冷却至室温。离心分离,用无水乙醚反复洗涤5~6次,干燥,分装。

2.2 MTX 含量测定的标准曲线制备

取MTX适量制成一定浓度溶液,在200~800nm波长范围内扫描,确定其最大吸收波长。精密称取适量样品制成不同浓度的标准溶液,测吸收度A值,做回归曲线,求回归方程,计算相关系数r。

2.3 FMS 物理性质的测定

2.3.1 FMS 形状、大小、粒径及分布的测定:光学显微镜下观察FMS形状、大小。测定600个微球的粒径,并计算粒径分布。粒径分布用各粒径范围内微球所占百分率(fr)表示: $\text{fr} = (\text{Nr} / \sum \text{Nr}) \times 100\%$, 其中Nr表示某大小范围内的微球数。

2.3.2 MTX 含量测定:精密称取FMS约10mg至25ml量瓶中,加水20ml后置37℃水浴中不断振摇,取样在

显微镜下观察微球存在时,将溶液经微孔滤膜滤至另一50ml量瓶中,加水至刻度摇匀,适当波长下测A,计算MTX含量。

2.3.3 Fe_3O_4 含量测定:精密称取3.5mg,置恒重试管中,加少量胃蛋白酶和适量水,调节pH为3.5,37℃恒温水浴中充分水解,以2000r/min离心,弃去上清液,蒸馏水反复洗涤,离心后干燥至恒重。计算 Fe_3O_4 百分含量。

2.3.4 FMS 药物体外释放度的测定:以15ml小玻璃瓶代替片剂四用仪的吊篮,并固定。精密称取FMS 10mg置小瓶中,加生理盐水10ml,匀速旋转(100r/min),定时取样至洁净小试管中,离心,取上清液3ml作为待测液。合并沉淀与补充的3ml生理盐水,加入原样品溶液中。紫外分光光度法测定样品浓度并计算累积释放率。为考察HSA固化时间对释放度的影响,在平行条件下,测定不同固化时间对FMS释放度的影响,绘制释放曲线。

3 实验结果

3.1 制备工艺对FMS 粒径的影响

采用HSA加热固化法制备FMS,乳化时间一定,搅拌速度增加则微球粒径减小;搅拌速度一定,乳化时间延长,则粒径小的微球所占比重增大。磁性物质含量影响FMS收率:其它条件相同,1ml HSA中加入磁铁粉,小于70mg,所制备微球中部分为空白微球,大于90mg,则有磁铁粉剩余。

3.2 MTX 紫外吸收A~C曲线及回归方程

经扫描MTX在371和308nm处有最大吸收,选择371nm作为待测波长,测定标准溶液,数据见表1。

表1 MTX 紫外吸收A值

样品号	c(mg/L)	A
1	100	0.031
2	200	0.102
3	300	0.173
4	400	0.251
5	530	0.352

由测得数据绘图,得回归方程: $A = -0.0468 + 0.00747c$, $r = 0.9997$ 。

3.3 FMS 物理性质

3.3.1 FMS 形态及粒径分布:显微镜下观察微球为圆

形,表面光滑,显灰黑色,无粘连,无空白微球及散在 Fe_3O_4 。图1表示本工艺条件下制备的FMS粒径分布情况,其粒径在20~40 μm 的微球占总数50%以上。

3.2.2 Fe_3O_4 及 MTX 含量:由紫外分光光度法测得A值代入回归方程得MTX的浓度,计算出MTX在微球中百分含量。恒重法测定 Fe_3O_4 含量,结果见表2。

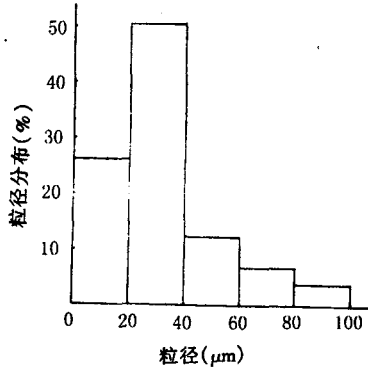


图1 FMS 粒径分布(搅拌速度 1000r/min, 乳化时间 5min)

3.4 FMS 药物释放性能

与未制成微球的单纯 MTX 相比有缓释作用,且固

表3 不同固化时间 MTX 微球累积释放率

样品号	固化时间 (min)	累积释放/%(h)									
		1	2	3	4	6	8	9	14	19	20
1	5	18.2	44.8	65.7	71.9	78.1	81.5	86.2	88.9	90.4	
2	10	17.0	42.0	62.9	65.9	75.0	78.9	82.4	84.8	86.9	87.9
3	15	14.5	37.7	49.9	56.0	60.4	64.4	66.7	67.5	70.5	

4.1 制备FMS所用磁物质微粒大小一般要求在2 μm 左右,文献报道中多采用超声波粉碎法制备符合要求的磁性物质。本实验采用 Fe_3O_4 试剂做磁性物质,结果表明,制得微球亦符合实验要求。

4.2 分离油相和微球时,离心时间和转速对FMS的形态有较大影响。转速太快(大于2000r/min),时间过长(大于10min),都将导致微球破损、粘连。

4.3 MTX含量测定中,由于 Fe_3O_4 的存在,不能加酸或碱,所以FMS中应加入酶溶液使HSA水解,释放MTX。

4.4 MTX在紫外波长范围内,有两个最大吸收峰,峰位371nm处峰强小于308nm处峰强,为避免白蛋白紫外吸收(280nm左右),对测量的干扰选择371nm作为待测波长。

4.5 以加热固化法制备FMS,固化时间不同导致MTX

表2 Fe_3O_4 及 MTX 的百分含量

样品	Fe_3O_4 含量(%)	MTX 含量(%)
1	63.37	8.30
2	61.90	9.11
3	64.57	8.60

化时间对药物释放度产生较大影响。当其它实验条件一致,固化时间分别为5,10和15min时测得累积释放率逐渐降低。结果见图2。

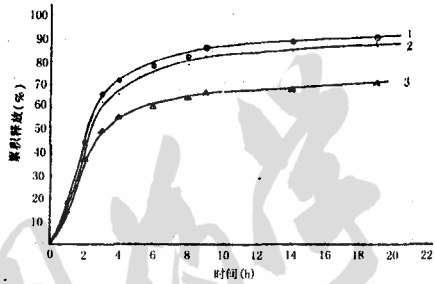


图2 不同固化时间 MTC 微球累积释放曲线

1,2,3 - 分别表示固化时间为5,10和15min FMS 药物累积释放曲线

4 讨论

累积释放率的不同。在保证FMS稳定的条件下,减少固化时间可以增加药物的释放。

参考文献

- 1 Driscoll CF, Marris RM, Senyei AE, et al. Magentic targeting of microspheres in blood flow. *Microvasc Res*, 1984, 27:353.
- 2 Gupta PK, Hung CT. Albumin microspheres I: physicochemical characteristics. *J Microencapsulation*, 1989, 6 (4):427.
- 3 张永恒, 吴玉波. 抗癌药物靶向制剂的研究进展. *中国药理学杂志*, 1992, 27(7):389.
- 4 吴传斌, 魏树礼. 磁性药物微球研究进展. *中国药理学杂志*, 1993, 28(6):330.
- 5 王皓. 白蛋白微球的制备方法. *中国医院药理学杂志*, 1995, 15(9):415.
- 6 焦玉彦, 林世寅, 国毅, 等. 丝裂霉素C铁磁性微球磁响应性能的研究. *中国肿瘤临床*, 1995, 22(3):161.

收稿日期:1998-05-25