

红霉素聚乳酸微球制备工艺的研究

杨帆 谭载友 林茵 赵耀明¹ 麦杭珍¹ (广州 510224 广东药学院药剂教研室 43[#]; ¹ 广州 510640 华南理工大学材料学院)

摘要 目的:通过正交设计筛选出制备红霉素聚乳酸微球的最佳工艺。方法:用正交实验设计优化红霉素聚乳酸微球制备工艺,用扫描电子显微镜观察微球表面形态,差示扫描热分析确证含药微球的形成,及所制备的红霉素聚乳酸微球的平均粒径、粒度分布、载药量、包封率、工艺重现性进行了研究。结果:红霉素聚乳酸微球的形态圆整,且药物确已被包裹在微球中,而非机械混合,微球的平均粒径为 $10.98 \pm 0.15 \text{ mm}$,粒径在 $5 \sim 20 \text{ mm}$ 占总数的 94% 以上,载药量为 $24.16\% \pm 0.51$,包封率为 $63.54\% \pm 0.58$,最佳工艺条件重现性良好。结论:本研究获得了制备红霉素聚乳酸微球较满意的工艺。

关键词 红霉素;聚乳酸;微球

STUDY ON THE ERYTHROMYCIN POLYLACTIC ACID MICROSPHERES

Yang Fan, Tan Zaiyou, Lin Yin, Zhao Yaoming¹, Mai Hangzhen¹ (Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou, 510224; ¹ College of Materials, South China University of Technology, Guangzhou, 510640)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To optimize the preparation conditions of erythromycin polylactic acid microspheres by orthogonal test. **METHOD:** The orthogonal test design was used to optimize the technology of preparation with good reproducibility. The surface morphology of the microspheres was observed by scanning electron microscope. The formation of the drug microspheres was confirmed with DSC. The mean diameter and the size distribution of microspheres, the drug loading, the incorporation efficiency, the reappearances of pharmaceutical technology were examined. **RESULTS:** The erythromycin polylactic acid microspheres was regular in its morphology. Drug was enveloped in microspheres but not physically mixed with PDLLA. The average particle size was $10.98 \pm 0.15 \text{ mm}$, and over 94% of the microspheres were in the range of $5 \sim 20 \text{ mm}$; the drug loading and the incorporation efficiency were $24.16\% \pm 0.51$ and $63.54\% \pm 0.58$, respectively. The reappearance of pharmaceutical technology was good. **CONCLUSION:** The optimized preparation conditions of erythromycin polylactic acid microspheres was obtained.

KEY WORDS Erythromycin, Polylactic acid, Microspheres

红霉素(Erythromycin)是临床上治疗支原体肺炎、军团菌肺炎的首选药物,但在体内分布广泛,有效治疗浓度维持时间短,容易诱发耐药性,且不良反应多^[1]。本研究以可生物降解聚乳酸为载体,通过正交设计优化制备工艺,研制一种肺靶向红霉素缓释微球(Erythromycin Poly(lactide) microspheres),通过控制其粒径大小,使其静脉注射后,可被肺毛细血管床机械性截留于肺部,提高肺部药物浓度^[2],又因聚乳酸的不断降解达到缓慢释放药物的作用,从而提高药物的疗效,减少毒副作用^[3]。

1 实验部分

1.1 仪器与药品

UV-1601 分光光度计(日本岛津),光学显微镜及显微摄影系统(日本 OLYMPUS),LXJ-II 型离心沉淀机(上海医用分析仪器厂),S-510 型扫描电子显微镜(日本 HITACHI),DSC 2910 Modulated DSC 热分析仪(美国 TA Instrument)

红霉素原料(利君集团镇江制药责任有限公司),外消旋

聚乳酸(PDLLA)(华南理工大学提供),甘油(浙江省兰溪市化工试剂厂),明胶(佛山市化工实验厂),二氯甲烷(广州市东红化工厂),其他试剂均为分析纯。

1.2 红霉素聚乳酸微球的制备

采用有机相分散-溶剂扩散法制备红霉素微球。将适量的红霉素和聚乳酸按一定比例共溶于有机溶剂中,在一定的搅拌速度下,缓慢加到分散介质中,分散均匀后,再倾入到扩散介质中,搅拌一定时间,离心收集微球,蒸馏水洗涤,过滤,常压干燥即得。

考虑到诸多因素对微球形成和质量的影响,本文在预试验的基础上,选取影响微球性质较显著的 4 个因素作为考察对象^[6],即有机相中聚乳酸浓度、投药比(红霉素与聚乳酸重量比)、扩散介质明胶的浓度和搅拌速度,以平均粒径、跨距、载药量、包封率为指标,根据正交实验结果优选出最佳生产工艺条件。

1.3 优选后制备工艺重现性的考察

按正交试验结果得出的最优生产工艺条件,重复实验 6 次,通过对各指标的测定,考察微球制备工艺的重现性。

1.4 微球载药量及包封率的测定

采用紫外分光光度法,精密称取红霉素标准品,加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释至 140ug/ml,取此溶液 5 ml,加 0.25 mol/L 氢氧化钠溶液稀释至 10 ml,在 60℃ 水浴放置 30 min,取出,放冷至室温,在 200 ~ 400nm 范围内扫描,发现在 236nm 波长处有最大吸收,而聚乳酸和 10 % 水的乙腈溶液如上述方法反应后,在此波长范围内无紫外吸收,因此确定最佳测定波长为 236nm。

1.4.1 标准曲线的建立:配制红霉素标准品系列浓度,如上述方法反应后,在 236nm 波长处测吸收度。将相应数据回归得标准曲线 $A = -0.00452 + 4.54464 C(\text{mg/mL})$,相关系数 $R = 0.99957$,红霉素溶液浓度在 70 ~ 190ug/mL 范围内与吸收度呈良好的线性关系。方法的回收率为 $(98.86 \pm 0.89) \%$ 。

1.4.2 微球中红霉素含量的测定:精密称取红霉素聚乳酸微球,加定量 10 % 水的乙腈溶液溶解微球中的聚乳酸,然后如上述方法反应后,在 236nm 波长处测吸收度,并利用标准曲线求出微球中红霉素含量。

载药量 = (微球中红霉素的含量 / 微球的总重量) × 100 %

包封率 = (微球中红霉素的含量 / 投药量) × 100 %

1.5 微球形态、粒径大小和分布的观察

用光学显微镜和电子扫描显微镜观察微球的外观形态。采用显微计数法考察微球的粒径、粒度分布和跨距,每次计数不少于 500 粒。

表 2 正交设计实验与结果

试验号	A	B	C	D	产率 / %	平均粒径 / μm	跨距	包封率 / %	载药量 / %	质量指标 S ₁ - S ₂ + S ₃ + S ₄
1 [#]	1	1	1	1	36.38	4.41	2.144	39.60	18.14	60.006
2 [#]	1	2	2	2	73.34	7.70	1.697	33.48	20.29	59.773
3 [#]	1	3	3	3	64.2	10.40	5.659	61.05	31.70	97.491
4 [#]	2	1	2	3	25.5	10.86	2.143	31.91	20.86	61.487
5 [#]	2	2	3	1	33.66	3.81	2.257	14.30	18.88	34.733
6 [#]	2	3	1	2	78.61	8.64	1.513	69.26	29.37	105.757
7 [#]	3	1	3	2	35.59	8.90	1.159	40.42	18.93	67.091
8 [#]	3	2	1	3	82.88	7.35	1.390	34.50	18.50	58.960
9 [#]	3	3	2	1	72.66	6.18	1.607	65.83	30.20	100.603

红霉素聚乳酸微球作为一种药物,首先考虑的应是其药物的质量,其次才是其产率。而质量一般可通过微球的平均粒径(S₁)、跨距(S₂)、包封率(S₃)、载药量(S₄)等指标的加权重和值来衡量,通常加权重和值 $S(S = S_1 - S_2 + S_3 + S_4)$ 越大,其质量越好,由表 2 的实验结果分析表明,影响红霉素聚乳酸微球质量的因素影响顺序为 B-D-C-A,最佳实验方案为 A₃B₃C₁D₂;影响红霉素聚乳酸微球产率的因素影响顺序为 B-C-A-D,最佳实验方案为 A₃B₃C₁D₂。虽然各因素对质量和产率的影响顺序不一样,但其最佳实验方案却正好相同,即有机相中聚乳酸浓度为 10 % (w/v),投药比(红霉素:聚乳酸)

1.6 差示扫描热分析(DSC)验证微球的形成

取空白微球、空白微球和红霉素的机械共混物、载药微球样品 5 ~ 15 毫克,在 0 ~ 80℃,以 10℃/min 的升温速率加热,氮气(100 ml/min),进行 DSC 分析,确定样品的玻璃化转变温度(T_g)。

2 结果

2.1 红霉素聚乳酸微球制备工艺的优选

有机溶媒的选择是微球形成的关键因素,通过比较二氯甲烷、氯仿和丙酮对聚乳酸成球的影响,结果表明选用二氯甲烷作有机溶媒可使聚乳酸微球形成最好。

分散介质的粘度对聚乳酸微球的粒径有较大影响,微球粒径取决于有机相在分散介质中的分散度。通过实验可知甘油作为分散介质时,有机相分散均匀,并且聚乳酸的成球率高,微球粒径易于控制。同时发现有机相与甘油的体积比最佳配比为 3:40 (ml/ml)。

扩散介质的选择对微球的聚集有较大的影响,若扩散介质不合适,易造成微球聚集现象。通过实验,发现以明胶水溶液作扩散介质,可制得较疏松分散的聚乳酸微球。

在有机溶媒、分散介质、扩散介质、有机溶媒与分散介质体积比固定的条件下,L₉(3⁴)正交实验的因素和水平设计如表 1 所示,试验结果如表 2 所示。

表 1 正交试验的因素与水平表

水 平	因 素			
	聚乳酸浓度 A(w/v)	投药比 B(w/w)	明胶浓度 C(w/v)	搅拌速度 D(r/min)
1	2	0.2:1	0.2	1200
2	5	0.8:1	0.5	900
3	10	0.5:1	1	300

为 0.5:1 (w/w),扩散介质明胶的浓度为 0.2 % (w/v),搅拌的转速为 900 (r/min),这也反映出本实验方案的可行及优越。

2.2 优选后的制备工艺及其重现性的考察

优选后的制备工艺为:将红霉素和聚乳酸按 0.5:1 的重量比共溶于有机溶媒二氯甲烷中,取 3 ml 缓慢加到 40 ml 分散介质甘油中,并以 900r/min 的搅拌速度搅拌 10 min,再将其倾入 200 ml 扩散介质 0.2 % 的明胶水溶液中,搅拌 30 min 后,以 1000r/min 离心收集微球,蒸馏水洗涤,过滤,常压干燥即得。

按最优生产工艺制备红霉素聚乳酸微球,并重复该工艺6次,结果得到微球的平均粒径为 $10.98 \pm 0.15 \mu\text{m}$,平均跨距为 1.365 ± 0.10 ,平均载药量为 $24.16\% \pm 0.51$,平均包封率为 $63.54\% \pm 0.58$,说明微球制备工艺的重现性良好。

2.3 微球形态、粒径大小和分布

在光学显微镜下观察,红霉素聚乳酸微球呈圆形,表面光滑,不粘连或极少粘连,流动性很好,分布均匀,大部分微球中有非均匀分散的黑色不透光区,可能是药物以微晶形式存在。在扫描电子显微摄影图中(图1),微球表面光滑、圆整,偶见表面粘附颗粒状物,可能是未洗除的药粉。

按最优实验方案的工艺制备的微球,平均粒径为 $10.98 \pm 0.15 \mu\text{m}$,粒径在 $5 \sim 20 \mu\text{m}$ 占总数的94%以上。

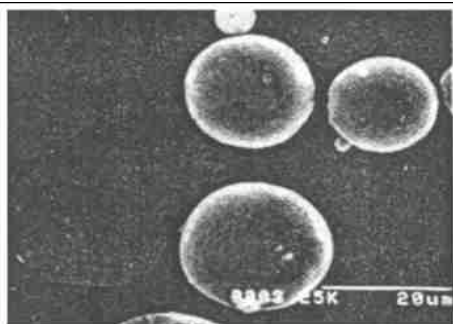


图1 红霉素微球的扫描电子显微摄影图

2.4 差示扫描热分析(DSC)

空白微球的玻璃化温度(T_g)是 48.17°C ,空白微球和红霉素的机械共混物 T_g 是 48.79°C ,载药微球 T_g 是 56.85°C 。可见空白微球和空白微球与红霉素的机械共混物的 T_g 相近,而载药微球的 T_g 较空白微球升高了 8°C 多,说明药物被包进微球中,而不是吸附在微球表面。空白微球、空白微球与红霉素机械混合物以及载药微球的热流-温度曲线如图2所示。

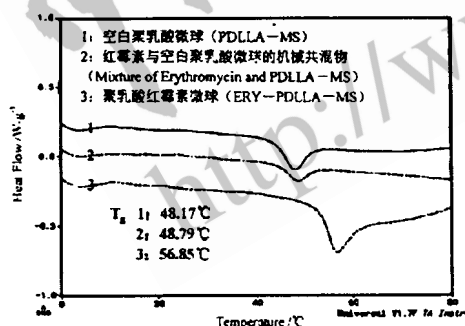


图2 差示扫描热分析图

3 讨论

采用有机相分散-溶媒扩散二步法制备红霉素聚乳酸微球,其中选择合适的有机溶媒、分散介质、扩散介质是微球形成的前提^[7],结果表明以二氯甲烷为有机溶媒、甘油作为分散介质、明胶水溶液作扩散介质、有机相:分散相:扩散相为3:40:200时,形成的微球疏松,成球率高,粒径均匀,不粘连,且载药量大。

通过 $L_9(3^4)$ 正交实验设计,得到最佳工艺条件为有机相

中聚乳酸浓度为10%(w/v),投药比(红霉素:聚乳酸)为0.5:1(w/w),扩散介质明胶的浓度为0.2%(w/v),搅拌的转速为900(r/min),且重现性好。

实验发现,微球的包封率和载药量并不随着投药比的增大而增加,可能是由于只有在红霉素与聚乳酸的比例适当时,绝大部分的红霉素才能被足够的聚乳酸包裹成球。而红霉素浓度过高时,析出的结晶较大,难以被聚乳酸包裹在微球内,结果形成许多的聚乳酸碎片和药物晶体。

有机相中聚乳酸的浓度对微球的包封率和载药量影响不明显,主要与投药比有关,因红霉素在有机相中的溶解度有限,所以不能任意增加有机相中聚乳酸的浓度。另外,聚乳酸浓度过高时,有机相在分散介质中分散时即析出大量聚乳酸,并粘结成团,造成实验失败。

扩散介质明胶水溶液的浓度和体积对微球的聚集和圆整度有较大的影响,当明胶水溶液的浓度高于1%或体积小于100 ml时,极易造成微球相互粘连聚集;而明胶水溶液浓度过低,乳化不理想,微球的圆整度将受到影响。另外,预先用红霉素饱和明胶水溶液,能阻止有机相中的红霉素向水相扩散,可以显著提高微球的包封率和载药量^[8]。

从实验结果可知搅拌速度与微球的平均粒径有明显的相关性,搅拌速度快,平均粒径小;搅拌速度慢,平均粒径大,跨距大。要控制微球粒径在 $7 \sim 12 \mu\text{m}$ 范围,搅拌速度为900r/min较合适。

红霉素的口服吸收不规则,且有肝毒性大等不良反应,本实验研制了肺靶向红霉素微球,以提高药物疗效,减少毒副作用。作为肺靶向药物,关键是控制微球粒径的大小,文献报道粒径在 $7 \sim 12 \mu\text{m}$ 的链霉素微球给予小鼠,81%以上分布于肺组织^[9]。本实验制备的微球平均粒径为 $10.98 \pm 0.15 \mu\text{m}$,满足肺靶向药物的要求,但动物体内的相应特性尚待进一步研究证实。

参考文献

- 1 陈新谦等主编.1997.新编药理学(第14版),78.
- 2 Prior S, Gamazo C, Irache JM, et al. Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating Brucella infections. Int J Pharm. 2000, 196(1): 115.
- 3 李孝红,袁明龙,熊成东等.聚乳酸及其共聚物的合成和在生物医药学上的应用.高分子通报,1999,1:24.
- 4 Yang Q, Owusu AG. Biodegradable progesterone microsphere delivery system for osteoporosis therapy. Drug Dev Ind Pharm. 2000, 26(1): 61-70.
- 5 陈建海,陈昆,Shagufila M等.新型可降解聚酯材料地西洋缓释微球的研制.药学报,2000,35(8):613.
- 6 吴伟,陆彬.氟尿嘧啶聚丙交酯微球的制备及体外特性.中国药师,2000,3(6):326.
- 7 王槐蒂,陈茂蓉.种抗菌药物新剂型药代动力学研究概况.医药导报,2000,12:25;19(6):541.

收稿日期:2001-07-26