

玻璃体内注射用地塞米松微球的制备

滕彦^{1,2}, 梁文权¹, 林季建², 郑晓玲¹ (1. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310005; 2. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009)

摘要:目的 为治疗增殖性玻璃体视网膜病变, 制备玻璃体内注射用地塞米松微球。方法 以生物可降解乙交酯和丙交酯的无规共聚物 (PLGA) 为载体材料, 采用 W/O 型乳化-溶剂挥发方法制备地塞米松微球。研究影响微球制备的工艺条件, 考察了微球的粒径大小与分布、载药量和包封率, 评价载药微球的体外释放行为。结果 微球形态完整, 表面光滑, 微球的粒径范围为 $4.70 \pm 1.6 \mu\text{m}$, 载药量为 $(15.5 \pm 0.32)\%$, 包封率为 $(78.8 \pm 1.3)\%$ 。体外释药 13 d 约 90%, 属扩散-溶蚀机制。结论 制备方法可行, 地塞米松 PLGA 微球具有药物缓释作用。可以作为玻璃体内注射用地塞米松的给药载体。

关键词: 地塞米松; 乳酸羟基乙酸聚合物; 微球; 溶剂挥发法; 释放度

中图分类号: R943.41 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)05-0393-03

Preparation of dexamethasone microspheres for intravitreally injection

TEN Yan^{1,2}, LIANG Wen-quan¹, LIN Ji-jian², ZHENG Xiao-ling¹ (1. College of Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The purpose of this research was to develop polylactic-co-glycolic acid (PLGA) microspheres for continuous delivery of dexamethasone which is used to suppress the proliferative vitreoretinopathy. **METHOD** The microspheres were prepared by an oil-in-water emulsion-solvent evaporation technique. Properties such as geometric mean diameter, drug loading, rate of entrapment and release characteristics were evaluated. **RESULTS** The average diameter was $4.70 \pm 1.6 \mu\text{m}$. The encapsulation efficiency was $(78.8 \pm 1.3)\%$, and the drug loading was $(15.5 \pm 0.32)\%$. Ninety percent of the dexamethasone was released in vitro from the microspheres after 13 days. The release mechanism was controlled with drug diffusion and polymeric erosion. **CONCLUSION** The technology of preparation is successful and the microspheres can provide continuous release of dexamethasone.

KEY WORDS: dexamethasone; PLGA; microspheres; O/W emulsion-solvent technique; continuous release

增殖性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, 以下简称 PVR) 是视网膜脱离手术失败的主要原因, 也是眼外伤常见的严重并发症之一^[1]。在 PVR 的形成过程中, 多种细胞增殖是关键环节。目前临床用类固醇激素, 如地塞米松局部滴用很难达到病变部位; 静脉给药或口服等给药方式进行治疗, 受到血-眼屏障、血浆蛋白结合等影响; 眼球旁注射给药方式固然能使病变部位达到高药物浓度, 但药效维持时间短, 需反复注射, 且易导致眼内感染、玻璃体出血和视网膜脱离等并发症, 其应用受到制约。将地塞米松制备成微球具有释放时间长、成本低、易于消毒等优势。

聚乳酸 (PLA) 和乳酸-羟乙酸共聚物 (PLGA) 是常用的生物降解材料, 作为微球骨架材料具有释药时间长, 患者耐受性较好等优点。聚乳酸 (PLA) 由 *D*-, *L*- 或 *D*-, *L*- 乳酸单体链式聚合而成, 乳酸-羟乙酸共聚物 (PLGA) 或丙交酯-乙交酯共聚物, 由乳酸和羟乙酸以不同比例嵌段共聚而成。两者均属聚酯类高分子化合物, 由于酯键不稳定, 可缓慢水解, 降解速度与聚合度及羟乙酸的含量有密切关系, PLGA 的降解速度较

快, 一般为一个月左右^[3], 而 PLA 降解则需要几个月甚至一年以上。因此本实验以 PLGA 为基质, 采用溶剂挥发法制备了地塞米松聚丙交酯微球 (DA-PL-MS), 并研究了其体外释药行为。

1 仪器与材料

1.1 仪器

FJ-200 高速分散匀质机 (上海标准模型厂), XW-80A 旋涡振荡器 (上海医科大学), 78-1 型磁力搅拌器 (杭州仪表电机厂), THZ-82 型一恒温振荡器 (上海跃进医疗器械四厂), 台式离心机-16G (上海安亭科学仪器厂), LGJ-5-II 冷冻干燥机 (军事医学科学院实验仪器厂), Agilent 1100 系列 HPLC, Hypersil C₁₈ 柱 (大连依利特 $4.6 \text{ cm} \times 15 \text{ cm}$)。

1.2 材料

地塞米松 (仙居制药厂), PLGA (相对分子质量 25 000 山东医疗器械研究所), 聚乙烯醇 (中国医药上海化学试剂公司 粘度 54-66 PVA), 二氯甲烷, *N*’, *N*’-二甲基甲酰胺均为分析纯, 乙腈为色谱醇。

作者简介: 滕彦, 女, 1987 年毕业于浙江医科大学药学专业

2 实验方法

2.1 正交设计法^[3]制备微球

根据预试验,选择外水相 PVA 浓度(%),有机相中 PLGA 的浓度(%),投药比 $[\text{投药量}/(\text{投药量} + \text{PLGA 投药量})]$ 因素分别取 3 水平作正交分析,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计安排试验。以包封率为主要考察指标,结合考虑微球粒径及表面特征,选择包封率高,粒径大小均匀的微球制备方法。称取地塞米松适量用 0.6 mL 二甲基甲酰胺溶解,加入 PLGA 0.18~0.56 g 和二氯甲烷 7.0 mL,旋涡振荡溶解为有机相;水相为 0.5%~4% 的 PVA 水溶液,5300 r/min 搅拌条件下将有机相注入液面下 1 cm 处,2 min 后改用 800 r/min 搅拌 3 h 以上以挥发除去二氯甲烷,离心沉淀,用去离子水洗涤数次后收集,冷冻干燥,即得地塞米松聚微球。

2.2 微球的粒径及形态

光学显微镜下观察 300 粒微球,观察微球的形态并测定微球的直径。

2.3 微球载药量和包封率的测定^[4]

采用 HPLC 测定地塞米松的载药量和包封率。色谱条件:色谱柱为 Hypersil C_{18} 柱(4.6 cm × 15 cm);以乙腈-25 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 3.0)(45:55)为流动相;流速 1.0 mL/min;检测波长 240 nm;柱温 30℃。

2.3.1 标准曲线 精密称取地塞米松对照品 25.0 mg,用乙腈配成 0.25 mg/mL 溶液。分别移取 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 和 7.0 mL,用流动相稀释,配置成一系列浓度的对照品溶液,取 20 μ L 注入液相色谱仪,记录峰面积。以峰面积 A 对药物浓度 C(μ g/mL)进行线性回归,得回归方程 $A = 41.6667C - 3.0375$ ($r = 0.9996$,线性范围为 5~30 μ g/mL)。

2.3.2 回收率 精密称取地塞米松适量和空白微球 60.0 mg,置 10 mL 量瓶中,加乙腈溶解并定容,过滤,移取续滤液 1.0 mL 置 50 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度^[5]。取 20 μ L 溶液注入液相色谱仪,记录色谱图,计算峰面积,由标准曲线计算药物浓度,得回收率。结果见表 1。

表 1 回收率测定结果

Tab 1 The results of recovery tests

dosage (mg)	recovery (%)				X (%) $\pm$ SD	RSD (%)
	1	2	3	4		
8	94.26	95.89	95.53	96.22	95.48 $\pm$ 0.86	0.90
10	98.23	99.29	100.30	98.41	99.06 $\pm$ 0.95	0.96
12	92.92	95.76	96.57	95.16	95.10 $\pm$ 1.57	1.65

2.3.3 样品测定 精密称取微球 60.0 mg,置 10 mL 量瓶中,同回收率实验项下处理。取 20 μ L 溶液注入液相色谱仪,记录色谱图,计算峰面积,计算载药量和包封率,微球的载药量 = (微球中药物含量/微球重量) × 100%,包封率 = (微球中药物含量/投入药量) × 100%。

2.4 地塞米松微球体外释放试验

采用动态透析法^[5],精密称取 DA-PL-MS 15.0 mg(含地塞米松 2.33 mg)2 份,分别置已处理的透析袋中,加入 5 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液,将透析袋置 100 mL 烧瓶中,烧瓶中加入

95 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液,将试样置恒温振荡器中,温度为 37℃,转速为 75 r/min,在 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、12.0 h、1.0、1.5、2.5、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、14.0、19.0 d,取样 5 mL,并加入 5.0 mL 新鲜释放介质,4 d 后隔天或每天更换释放介质,用上述高效液相色谱方法测定释放介质中地塞米松浓度,计算释放度。重复 3 批样品,取平均值。

3 结果

3.1 微球制备工艺的确定

从表 2 中可知,第五次试验的包封率最高,通过方差分析见表 3。3 因素的重要性次序为:外水相 PVA 浓度 α > 有机相 PLGA 浓度 β > 投药比 γ ,结合考虑微球的粒径较小,离心沉淀是否完全,得到地塞米松微球的优化处方为:2% PVA 水溶液,7.5% PLGA 有机相浓度,20% 的投药比。

表 2 正交实验设计

Tab 2 Orthogonal experiment design

No	α (%)	β (%)	γ (%)	loading efficiency (%)
1	0.5	2.5	10	21.71
2	0.5	5.0	20	76.20
3	0.5	7.5	35	79.20
4	4.0	2.5	20	87.25
5	4.0	5.0	35	99.90
6	4.0	7.5	10	90.73
7	2.0	2.5	35	78.60
8	2.0	5.0	10	66.13
9	2.0	7.5	20	78.84
k_1	59.04	62.52	66.82	
k_2	92.63	80.74	81.84	
k_3	74.52	85.98	77.42	
R	33.59	23.46	15.02	

表 3 正交试验方差分析

Tab 3 Variance analyse of orthogonal test

因素	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	1695.85	2	847.925	4.72	<0.1
B	2301.98	2	1150.99	6.41	<0.05
C	459.14	2	229.57	1.28	
误差 E	359.14	2	179.57		
总和	4816.11	8		$F_{1-0.05}(2,6) = 5.14$ $F_{1-0.10}(2,6) = 3.46$	

3.2 微球的粒径与形态

微球形态圆整,表面光滑。粒径范围较窄,88.30%,微球直径在 3.0~7.0 μ m 之间,微球平均粒径(4.7 $\pm$ 1.6) μ m。微球粒径分布见图 1。

3.3 微球的载药量与包封率

载药量为(15.5 $\pm$ 0.32)%,包封率为(78.8 $\pm$ 2.3)%。

3.4 微球的体外释药曲线

用累计释药百分数对时间绘图得微球的体外释药曲线见图 2。结果显示,在 1 d 内无明显的突释现象,药物可持续释放 20 d 左右,表明该微球具有缓释效果。

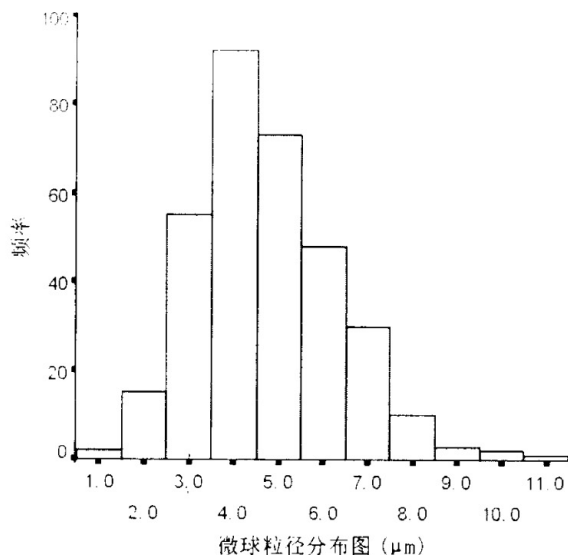


图 1 微球粒径分布直方图

Fig 1 Particle diameter distribution of MS

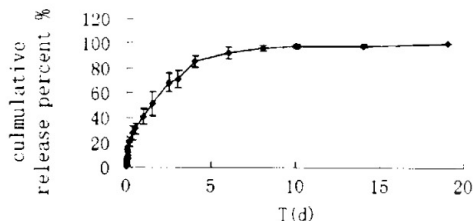


图 2 地塞米松微球释放曲线 ($n=3$)

Fig 2 Release profile of DA-PL-MS in pH 7.4 phosphate buffered saline ($n=3$)

4 讨论

本实验采用溶剂挥发法制备地塞米松微球。地塞米松为脂溶性药物,溶剂挥发法制备脂溶性药物的聚丙交酯微球,由于药物与骨架相容性较好,制备方便,载药量较高。在采用正交设计优化微球制备工艺的试验中就发现:当载药量过高时,药物易于外水相及微球表面形成较大结晶,水洗不易除去。在试验 5 中,光学显微镜下可见片状结晶,结晶难以用水洗除,又由于用该处方制备的微球粒径较小,释药较快,所以,虽然该处方的包封率较高,但未采用该处方制备

DA-PL-MS。由于地塞米松在二氯甲烷中溶解度不大,将其混悬于 PLGA 的二氯甲烷溶液中会互相粘连形成大块,无法分散均匀。所以在制备 DA-PL-MS 过程中加入二甲基甲酰胺作为潜溶剂溶解地塞米松,不仅增大了地塞米松的溶解度,而且增大了聚合物在界面的沉积速率,促进囊壁的形成,有利于提高载药量和抑制药物结晶形成。

在 3 因素考察中发现, PVA 浓度与微球的粒径呈负相关,用 4% PVA 溶液制备微球,粒径约 1.5 μm 左右,这可能是由于高浓度的 PVA 溶液可显著降低乳状液的界面压力,使制得的微球粒径较小。

生物降解型微球的释药过程与聚合物的降解方式以及药物在聚合物中的扩散行为有关,其释药机理应包含降解和扩散两种机理。对累积释放曲线分别进行零级 ($Q = kt$),一级 ($Q = 100 - 100e^{-kt}$), Higuchi ($Q = kt^{1/2}$), Ritger-Peppas ($Q = kt^n$), 扩散-松弛 ($Q = k_1 t^{1/2} + k_2 t$), Higson-Crowell ($Q = k_1 t + k_2 t^2 + k_3 t^3$) 及扩散-溶蚀 ($Q = k_1 t^{1/2} + k_2 t + k_3 t^2 + k_4 t^3$) 模型拟合, DA-MS 的拟合方程为 $Q = 43.9370t^{1/2} + 0.7817t - 0.36849t^2 + 0.0206t^3$, $R^2 = 0.99779$, 符合扩散-溶蚀释药模型。

参考文献

- [1] Berger AS, Zheng CK, Pearson PA, *et al*. Intravitreal sustained release corticosteroid-5-fluorouracil conjugate in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1996; 37(11): 2318
- [2] Beck LR, Cowasr DR, Lewis DH, *et al*. A new long-acting injectable microcapsule system for the administration of progesterone [J]. Fertil Steril 1979; 31(5): 545
- [3] 高景莘, 余涛. 正确运用均匀设计法和正交设计法 [J]. 基层中药杂志, 2002; 16(5): 25
- [4] 张润婕, 贺吉川, 等. RP-HPLC 法同时测定氯地滴眼液中氯霉素与地塞米松磷酸钠的含量 [J]. 解放军药学学报, 2002; 18(3): 160-190
- [5] 徐超群, 廖工铁, 张志荣. 米托蒽醌聚乳酸缓释微粒冻干针剂的体外释放特性研究 [J]. 华西药学杂志, 1998; 13(4): 229

收稿日期: 2004-07-19