

正交设计优化八氟丙烷白蛋白微球混悬液的制备工艺

金伟军(暨南大学附属第一医院,广州 510630)

摘要:目的 优化八氟丙烷白蛋白微球混悬液的制备工艺。方法 以微球的平均直径和浓度为考察指标,以八氟丙烷通气量、声振强度和终点温度作为工艺条件进行三因素三水平的正交试验。结果 最佳工艺条件为采用 1% 人血白蛋白溶液 20 mL,声振强度 90%,5 s 内通入八氟丙烷 2 mL,终点温度 77 ℃。结论 采用该最佳工艺制备的八氟丙烷白蛋白微球混悬液,微球浓度高而且稳定。

关键词:八氟丙烷白蛋白微球;超声;正交设计

中图分类号:R943.4

文献标识码:A

文章编号:1007-7693(2009)01-0043-03

Optimizing Preparation of Encapsulated Octafluoropropane Albumin Microspheres by Orthogonal Design

JIN Weijun(The First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To optimize preparation of encapsulated octafluoropropane albumin microspheres. **METHODS** The microspheres in suspension were produced by sonication of 20 mL of 1 % human serum albumin solution in the presence of octafluoropropane gas. Orthogonal design was used for studying the octafluoropropane gas flow rate, sonication intensity and process temperature of termination on the diameter and concentration of microspheres. **RESULTS** The best optimization process was obtained as follows: 90 % intensity as the sonication power, 2 mL per 5 s as the gas flow rate, 77 ℃ as the terminal process temperature.

CONCLUSION The microspheres prepared by this method are stable.

KEY WORDS: encapsulated octafluoropropane albumin microspheres; sonication; orthogonal design

一定浓度的白蛋白溶液经一定强度的超声波声振,可使空气、八氟丙烷等气体包裹于白蛋白微球内,制成一定浓度和直径的白蛋白微球混悬液^[1,2]。八氟丙烷白蛋白微球是超声造影剂的有效成分^[3],用于常规超声心动图显影不够清晰患者,增强左室腔内膜边界的识别。正交设计研究八氟丙烷白蛋白微球混悬液的制备工艺以及制备液稳定性研究未见报道。笔者以八氟丙烷通气量、声振强度和终点温度作为白蛋白微球混悬液制备工艺的考察因素,分设三个水平,以微球的平均直径和浓度为考察指标,得到最佳工艺条件后以此条件制备样品,并进行了初步稳定性考察。

1 材料

1.1 仪器

库尔特计数仪(MULTISIZER 3, COULTER COUNTER,美国贝克曼-库尔特公司);VCX750 型超声仪(美国 Sonics & Material 公司,超声功率 750

W,超声波发射频率 20 kHz);TES-1310 电子温度计(台湾泰仕);20 mL 一次性注射器(四川康宁医疗器械公司)。

1.2 药品和试剂

20% 人血白蛋白注射液(上海新兴医药股份有限公司);0.9% 氯化钠注射液(上海长征富民药业有限公司);八氟丙烷(C_3F_8)气体(天津大学石油化工技术开发中心)。1% 人血白蛋白溶液,由 20% 人血白蛋白注射液加 0.9% 氯化钠注射液稀释而得。

2 方法和结果

2.1 变性温度测定

移取 20 mL 1% 人血白蛋白溶液至连接三通的 20 mL 一次性注射器内,将超声仪探头置于液面下 2 cm 处,同时将电子温度计探头插入液体中,以 90% 超声强度声振,记录声振加热白蛋白溶液至溶液刚显浑浊时的温度,此温度即 1% 人血白蛋白溶液的变性温度^[2]。

2.2 微球制备方法

移取 20 mL 1% 人血白蛋白溶液至连接三通的 20 mL 一次性注射器内,将超声仪探头插入液面下 2 cm 处,以一定超声强度,声振 20 mL 1% 人血白蛋白溶液,预声振 10 s,再在声振的同时于 5 s 内通入一定量的 C₃F₈,继续声振,到终点温度后停止声振,得 C₃F₈ 白蛋白微球混悬液,混悬液立即转移至 50 mL 药瓶内,药瓶上端空气用 C₃F₈ 充分置换,药瓶用胶塞严封,于室温下静置 24 h。

2.3 正交设计

以微球的平均直径和浓度为指标,以 C₃F₈ 通气量、声振强度和终点温度三个因素,分别选择三个水平,因素水平见表 1。采用 L₉(3⁴) 正交表安排正交试验,进行制备工艺研究,同一条件制备样品两份。

表 1 正交设计因素水平表

水平	因素		
	C ₃ F ₈ 通气量/mL	声振强度	终点温度/℃
	A	B	C
1	2	80%	73
2	5	90%	75
3	10	100%	77

2.4 微球直径和浓度的测定^[4]

2.4.1 仪器条件 小孔管小孔直径 70 μm,小孔电流和增益由仪器自动设定,虹吸体积 500 μL。

2.4.2 校验 以贝克曼-库尔特公司提供的标准乳胶液(ø3.0 μm)对仪器进行校验,将新的校验系数 Kd 值存入仪器。以 0.9% 氯化钠注射液测定空白粒子,仪器设置自动扣除空白值。

2.4.3 测定 先将样品稀释倍数存入计算机程序。样品经充分混匀,快速精密移取一定体积,以 0.9% 氯化钠注射液稀释至 100 mL,迅速置于库尔特计数仪的样品台上,搅匀后立即测定,由计算机直接计算出微球平均直径和浓度。

2.5 微球稳定性试验

以 1% 人血白蛋白溶液 20 mL,声振强度 90%,通气量 2 mL,终点温度分别为 75 ℃ 和 77 ℃ 制备各 3 批样品(75 ℃ 制备的样品记作 S75,77 ℃ 制备的样品记作 S77),储存于 5 ℃,分别测定放置 0,1,3 和 6 月时样品的微球平均直径和浓度。

2.6 统计学处理

以 SPSS11.0 统计软件进行方差分析。

2.7 结果

2.7.1 变性温度 测得变性温度为 78 ℃。

2.7.2 正交试验 正交设计结果和方差分析见表 2,3,4,5,终点温度对微球直径和浓度的影响有显著意义,微球直径都在可以接受的范围内,以微球浓度为指标,最佳工艺条件为 A₂B₂C₃。

表 2 L₉(3⁴) 正交试验与结果

试验号	A	B	C	微球平均	微球浓度
				直径/μm	/×10 ⁸ 个·mL ⁻¹
1	1	1	1	4.61	3.52
2	1	2	2	4.37	4.15
3	1	3	3	3.98	5.78
4	2	1	2	4.55	3.93
5	2	2	3	4.21	7.09
6	2	3	1	4.58	3.96
7	3	1	3	4.17	6.45
8	3	2	1	4.77	3.81
9	3	3	2	4.26	4.65

表 3 与微球平均直径有关的方差分析

Tab 3 Analysis of variance on mean particle size					
方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	0.024 62	2	0.012 31	2.689	0.271
B	0.060 16	2	0.030 08	6.570	0.132
C	0.427	2	0.213	46.612	0.021
误差	0.009 156	2	0.004 578		

表 4 与微球浓度有关的方差分析

Tab 4 Analysis of variance on microsphere concentration					
方差来源	离均差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
A	0.497	2	0.249	0.974	0.507
B	0.222	2	0.111	0.434	0.697
C	12.220	2	6.110	23.913	0.040
误差	0.511	2	0.256		

2.7.3 微球初步稳定性 终点温度 77 ℃ 制备的八氟丙烷人血白蛋白微球混悬液,在 5 ℃ 条件下保存 6 个月,微球平均直径减小 2.6%,浓度下降 2.9%;终点温度 75 ℃ 制备的样品在 5 ℃ 条件下放置 1 个月,微球平均直径即减小 28.3%,浓度下降 29.2%,6 个月时肉眼可见微球层几乎消失,结果见表 6。

3 讨论

一定能量的超声波能对液体产生空化作用^[5],如果此时液体内混入气体,气体即进入空化部位,生成大量微泡,如果此时液体中含有成膜成分如白蛋

白,气体被白蛋白包裹成白蛋白微球。超声波在空化的同时,也将白蛋白微球击碎,产生更多更小的微球

表 5 各因素水平下两个指标的平均值

Tab 5 Means of mean particle size and microsphere concentration at different conditions

因素水平		微球平均直径/ μm	微球浓度/ $\times 10^8$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$
A/ mL	2	4.32	4.48
	5	4.45	4.99
	10	4.40	4.97
B/%	80	4.44	4.63
	90	4.45	5.02
	100	4.27	4.80
C/ $^{\circ}\text{C}$	73	4.65	3.76
	75	4.39	4.24
	77	4.12	6.44

表 6 不同终点温度制备的白蛋白微球的稳定性考察($n = 3$)

Tab 6 Stability of albumin microspheres after 6 months of storage at 5°C ($n = 3$)

样品	时间/月	微球直径/ μm	微球浓度/ $\times 10^8$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$
S75	0	4.35 ± 0.09	4.31 ± 0.10
	1	3.12 ± 0.08	3.05 ± 0.08
	3	2.66 ± 0.06	1.58 ± 0.04
	6	—	—
S77	0	4.22 ± 0.11	6.85 ± 0.16
	1	4.09 ± 0.10	6.93 ± 0.18
	3	4.15 ± 0.11	6.78 ± 0.17
	6	4.11 ± 0.09	6.65 ± 0.15

球。而且,超声波的空化作用对液体有加热作用,持续超声使液体温度不断上升。白蛋白在一定温度时会变性,在空化气-液界面的白蛋白比溶液中的白蛋白更易变性,在接近白蛋白变性温度前停止超声,使成球白蛋白局部变性^[1,6],而溶液中的白蛋白未变性。

本试验测得 1% 白蛋白溶液的变性温度为 78°C ,这是终点温度 77°C 制备的白蛋白微球较为稳定的原因。终点温度越高,所用的超声时间越长,得到的微球数量越多,因而浓度越高。通过考察样品的初步稳定性,结果发现,以接近 1% 人血白蛋白变性温度(78°C)的终点温度(77°C)制备的微球比较低

终点温度(75°C)制备的微球更加稳定,浓度也更高,说明在一定范围内终点温度越接近变性温度,制得的微球越稳定。

超声强度越高,单位时间内发生的超声能量越多,空化作用越强,生成的微球越多,但由于液体升温较快,达到同样温度所需要的时间较短,最终生成的微球数不一定多,这就是声振强度 100% 时微球浓度不是最高的原因。

八氟丙烷气体化学性质极为稳定,分子量较空气中氧分子和氮分子大,不溶于水,相对不易从微球中扩散出来。由于声振白蛋白包裹的八氟丙烷有限,通入较大量的八氟丙烷并不能增加微球的浓度,反而造成不必要的浪费。

综上所述,制备八氟丙烷人血白蛋白微球混悬液的最佳工艺条件是采用 1% 白蛋白溶液 20 mL,声振强度 90%,5 s 内通入八氟丙烷 2 mL,终点温度 77°C ,由此条件制备的白蛋白微球在 5°C 可以稳定 6 个月以上。

REFERENCES

[1] CERNY D, VISTA C, MILLS G J, et al. Continuous sonication method for preparing protein encapsulated microbubbles: USA, 4957656[P]. 1990-09-18.

[2] LAMBERT K J, PODELL S B, JABLONSKI E G, et al. Method for making encapsulated gas microspheres from heat denatured protein in the absence of oxygen gas: USA, 5855865[P]. 1999-01-05.

[3] PODELL S, BURRASCANO C, MARC G M, et al. Physical and biochemical stability of Optison, an injectable ultrasound contrast agent[J]. Biotechnol Appl Biochem, 1999, 30(12):213-223.

[4] JIN W J, CHEN S Y, CHEN Z L, et al. Particle analysis of air filled albumin microspheres of Shengweixian injection, an ultrasound contrast agent[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 1999, 34(2):120-122.

[5] GRINSTAFF M W, SUSTICK K S. Air-filled proteinaceous microbubbles: Synthesis of an echo-contrast agent[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 88(5):7708-7710.

[6] REISNER S A, SHAPIRO J R, SCHWARZ K Q, et al. Sonication of echo-contrast agent: A standardized and reproducible method[J]. J Cardiovasc Ultrasonography, 1988, 7(4):273-276.

收稿日期:2007-11-01