

用于被动肺靶向的异烟肼明胶微球的制备及表征

常江^{1,2}, 韩美华¹, 阎雪莹², 王向涛^{1*} (1.中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 2.黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

摘要: 目的 用生物可降解材料明胶制备肺靶向异烟肼明胶微球。方法 用乳化法制备异烟肼明胶微球, 正交试验优化其制备的因素; 用差示扫描量热法(DSC)和红外光谱法(IR)确证微球的形成; 用正置荧光显微镜观察微球的形态; 并对异烟肼明胶微球的粒径及其分布、载药量、包封率和稳定性等进行研究。结果 最佳工艺条件, 重现性好, 微球形态圆整, 药物确已存于微球中; 粒径在 5.0~25.0 μm 的微球占总数的 90%以上, 平均粒径为 15.63 μm , 达到肺靶向要求; 载药量和包封率分别为 14.93%和 73.30%。常温放置 6 个月, 其外观形态、大小及含量基本不变。结论 制备异烟肼明胶微球的工艺简单稳定, 可用于肺靶向注射剂的研究。

关键词: 异烟肼; 明胶微球; 乳化法; 肺靶向; 差示扫描量热法; 红外光谱法

中图分类号: R943.42

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)09-0809-05

Preparation and Characterization of Isoniazid Gelatin Microspheres for Passive Lung Targeting

CHANG Jiang^{1,2}, HAN Meihua¹, YAN Xueying², WANG Xiangtao^{1*} (1.Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100193, China; 2.Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Lung targeting gelatin microspheres of isoniazid (INH-GMS) were prepared using the biodegradable materials-gelatin. **METHODS** INH-GMS were prepared using the emulsifying method and the effect of some factors on the technology was analyzed with the orthogonal test design. The morphology of the microspheres was observed by upright fluorescence microscope. The formation of INH-GMS was confirmed by differential scanning calorimetry (DSC) and infrared spectrometry (IR). The mean diameter and the size distribution, drug-loading rate, entrapment efficiency and stability of INH-GMS were examined. **RESULTS** INH was developed in microspheres and INH-GMS were regular in morphology. The mean diameter of INH-GMS was 15.63 μm , more than 90% of the INH-GMS ranging from 5.0 μm to 25.0 μm . The drug-loading rate and entrapment efficiency were 14.93% and 73.30% respectively. The repeatability of the technology was good. The content, shape and size of the INH-GMS showed no remarkable change after storage at room temperature for 6 months. **CONCLUSION** The technology of preparation was successful and the INH-GMS can be used for study of passive lung target.

KEY WORDS: isoniazid(INH); gelatin microspheres; emulsifying method; passive lung targeting; differential scanning calorimetry (DSC); infrared spectrometry(IR)

明胶微球是近40年来应用于药物的新工艺、新技术。目前, 尽管微囊化的药物制剂还不多, 但药物微囊化技术的研究却是突飞猛进。将药物制成微球, 不仅能掩盖药物不良气味, 提高药物的稳定性, 而且能达到缓释、控释和靶向性作用^[1-4]。囊材明胶是一种高分子材料, 因其经济、稳定无毒和成膜性好而被广泛使用^[5]。

异烟肼(isoniazid, INH) 是目前抗结核药物中具有最强杀菌作用的合成抗菌药。但该药注射后在体内主要浓集于脑、肝和脾中, 并且它对周围神经系统、中枢神经系统和肝脏等有一定的损害

作用^[6]。若利用微球作药物载体, 将其粒径控制在 5.0~ 25.0 μm , 经静脉注射后能使药物浓集于肺, 起到被动肺靶向的作用, 达到降低不良反应的目的^[7-10]。为此本研究以可生物降解的明胶为载体, 用乳化法制备异烟肼明胶微球, 并采用正交实验对其制备工艺进行优化, 然后对其进行表征, 以达到肺靶向要求。

1 仪器与试剂

W220数控升降浴锅(上海振捷实验设备有限公司); JJ-1A精密定时数显电动搅拌机(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司); UV-2550紫外分光光度计

基金项目: “十一五”科技重大专项资助(2008ZX10003-016)

作者简介: 常江, 男, 硕士 Tel: (010) 62898798

E-mail: cjhj-219826@163.com

*通信作者: 王向涛, 男, 博士

Tel: 13683371703

E-mail: xtaowang@163.com

(日本岛津有限公司); FTIR-8400S傅立叶红外光谱仪(日本岛津有限公司); DSC Q200差示扫描量热仪(美国TA仪器有限公司); Mastersizer 2000激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司); DM 4000B型正置荧光显微镜(德国Leica仪器有限公司); S-3400N扫描电子显微镜(日本日立集团)

异烟肼(日本东京化成工业株式会社, 批号: B53910B, 纯度>98%); 明胶(sigma typ-B); 胃蛋白酶(sigma活性1:10000); 异丙醇、戊二醛等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 异烟肼明胶微球 (INH-GMS) 的制备

采用乳化法制备微球, 首先将药物明胶溶液与油相形成W/O型乳剂, 然后再经固化等处理制备成球。按表1比例将异烟肼和明胶溶解于蒸馏水中, 并加热至50℃左右, 搅拌下将其缓缓滴加到含有2% 司盘-80的液体石蜡中(50℃), 乳化15 min形成W/O型乳剂后, 立即转移至冰水浴中继续搅拌, 待乳剂温度降至4℃以下时, 加入8 mL的25%戊二醛交联固化50 min; 再以异丙醇30 mL脱水30 min, 抽滤; 以异丙醇、石油醚洗涤3次, 干燥即得黄色粉末状明胶微球。

2.2 异烟肼含量测定

2.2.1 波长的选择 将异烟肼、明胶和胃蛋白酶水溶液(浓度均为0.1 mg·mL⁻¹)在紫外200~400 nm波长内扫描, 异烟肼在263 nm处有最大吸收, 而明胶和胃蛋白酶的水溶液在此均无吸收峰, 不干扰测定, 故选择263 nm为检测波长。

2.2.2 标准曲线的制备 精密称取异烟肼 1.5 mg于10 mL量瓶中, 用乙酸胃蛋白酶溶液(0.025 g胃蛋白酶, 加入10 mL的0.5 mol·L⁻¹的乙酸溶液即得)溶解并定容。配制系列浓度溶液, 以相同浓度的胃蛋白酶乙酸溶液为空白, 在波长263 nm处测定吸光度, 以吸光度(A)-药物浓度(C)回归, 求出标准曲线方程为 $A=0.0243C+0.1078$ ($r=0.9999$, 线性范围为10~150 μg·mL⁻¹)。

2.2.3 回收率测定 制备空白明胶微球, 加入3种不同量的INH (分别为10, 15, 20 mg; $n=3$), 混合均匀后, 加入乙酸胃蛋白酶溶液, 在37℃水浴中, 振荡24 h进行消解, 冷至室温后过滤, 在263 nm处测定吸光度。根据标准曲线方程计算回收率。测得低、中、高不同加入量的平均回收率分别为(96.8±1.5)%, (99.2±1.3)%, (98.2±1.1)%。

2.2.4 载药量和包封率的测定 精密称取INH-GMS 10 mg于10 mL量瓶中, 按回收率方法消解后测定吸光度, 按标准曲线方程计算载药量和包封率。微球载药量=(微球中含药量/微球重量)×100%; 包封率=(微球中异烟肼的质量/所投异烟肼的质量)×100%。收率=所得微球质量/(投入辅料量+投药量)×100%。

2.3 正交设计法优化制备微球工艺

明胶微球制备工艺受多种因素影响, 主要有温度、搅拌速度、药物与明胶比例、辅料用量及配比、水相与油相体积比、乳化时间及乳化剂用量等。为保证实验精度, 对一些易确立的实验条件, 如水浴温度、搅拌速度、乳化时间、乳化剂用量等采用单因素法确定, 对于影响较大、取值范围较广的处方工艺条件如明胶浓度(A)、药物与明胶比例(B)以及油相与水相体积比(C)3个可变因素进行正交设计确定最佳条件, 以包封率和载药量为考察指标, 加权求和值来衡量, 通常加权求和值($S=\bar{X}+\bar{Y}$)越大, 质量越好。各因素取3水平, 见表1, 按L₉(3⁴)正交表进行筛选。按“2.2.3”项下方法测定药物含量, 计算包封率和载药量, 结果见表2。

表1 实验影响因素及水平($n=3$)

Tab 1 The orthogonal levels and factors of formulation ($n=3$)

水平	因素		
	A/%	B (w/w)	C (v/v)
1	15	1:3	7:1
2	20	1:4	8:1
3	25	1:5	9:1

综合评分结果表明, 3个因素中以因素B药物明胶配比影响最大, 其次是明胶浓度和油水体积比。制备工艺优化结果为A₁B₃C₃, 即明胶浓度15%, 异烟肼与明胶的质量之比1:5, 油水体积比9:1。

2.4 最优处方验证

按最优处方工艺平行制备3份INH-GMS, 按“2.2.3”项下方法测得其载药量与包封率。平均载药量为(14.93±1.65)%, 平均包封率为(73.30±1.78)%, 平均粒径为15.63 μm, 平均产率为(92.68±1.44)%, 说明优化后的制备工艺具有良好的重现性。

2.5 最佳工艺微球形态粒径大小及分布

2.5.1 正置荧光显微镜观察微球形态 按最优处方工艺制备的INH-GMS, 肉眼观察含药微球为淡

表 2 正交试验设计及结果分析(n=3)

Tab 2 The design and results of the orthogonal experiment(n=3)

试验	A	B	C	载药量%			包封率%			综合评分
				X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	$\bar{X} + \bar{Y}$
1	1	1	1	8.05	10.44	9.25	31.00	36.64	33.82	129.21
2	1	2	2	10.20	10.28	10.24	50.26	49.51	49.89	180.39
3	1	3	3	12.00	11.12	11.56	73.06	64.25	68.66	240.66
4	2	1	2	6.82	8.21	7.52	25.49	30.12	27.81	105.99
5	2	2	3	8.72	8.95	8.84	40.91	39.84	40.38	147.66
6	2	3	1	7.91	8.72	8.32	47.81	42.11	44.96	159.84
7	3	1	3	6.75	6.86	6.81	24.12	24.47	24.30	93.33
8	3	2	1	7.66	8.18	7.92	34.30	38.73	36.52	133.32
9	3	3	2	7.36	7.05	7.21	40.83	40.30	40.57	143.34
K ₁	183.42			109.51			140.79			
K ₂	137.83			153.79			143.24			
K ₃	123.33			181.28			160.55			
R	60.09			71.77			19.76			

黄色粉末。在正置荧光显微镜下观察，INH-GMS 呈圆形，表面光滑，不粘连或极少粘连，流动性很好，见图 1。

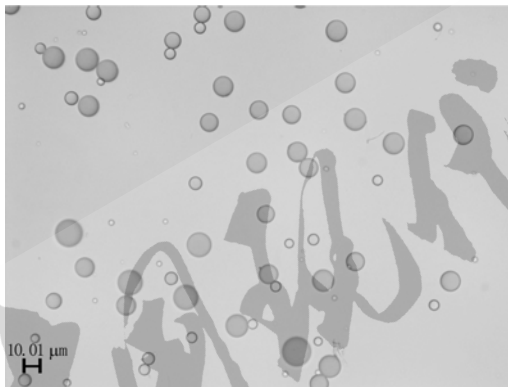


图 1 INH-GMS 显微镜照片(×400)

Fig 1 Optical microscope image of INH-GMS (×400)

2.5.2 扫描电子显微镜观察微球表面形态 在扫描电子显微镜下观察，INH-GMS 呈圆球形，粒径较均匀，表面光滑，极少粘连，见图 2。

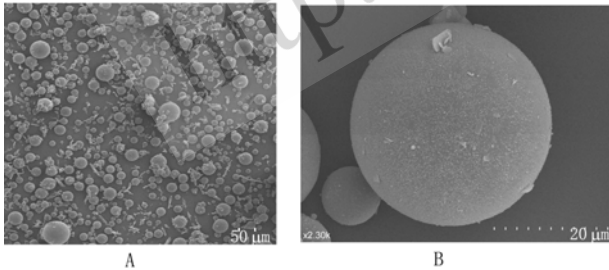


图 2 优选处方工艺制备的 INH 明胶微球的扫描电子显微镜照片

A-微球群体(×100); B-微球个体(×2300)

Fig 2 Scanning electron photomicrographs of INH-GMS

A-population of INH-GMS(×100); B-individual of INH-GMS(×2300)

2.5.3 激光粒度分析仪(LPA)测定微球粒径大小及分布 将适量 INH-GMS 置于 0.9%氯化钠溶液中，超声分散 5 min 左右，使微球完全分散均匀后，进行粒径大小和分布的分析，分析报告显示：微球的平均粒径为 15.63 μm。粒径分布图基本呈正态分布，90%以上微球的粒径在 7.0~28.0 μm，粒径分布见图 3。

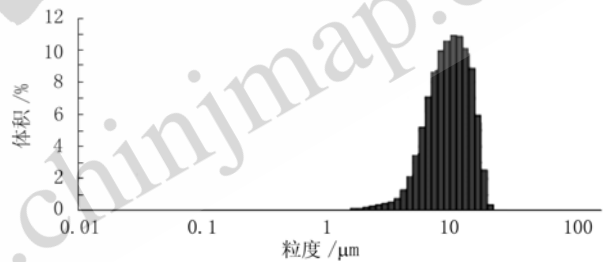


图 3 INH-GMS 粒径大小及分布图

Fig 3 Particle size and distribution of INH-GMS

2.6 载药微球的验证

2.6.1 差示扫描量热法(differential scanning calorimetry, DSC) 测试条件：取 INH、INH-GMS、空白 GMS 及 INH 与空白明胶微球的物理混合各约 10 mg。以空铝坩为参考池，升温速率 10 °C·min⁻¹，扫描温度范围 40~300 °C，样品扫描气氛：N₂，DSC 实验结果见图 4。

由图 4 可以看出，药物 INH 熔融峰在 172.6 °C；物理混合物在相应的位置上同样出现一个药物的吸热峰；而制备得的空白微球和载药微球中，药物峰完全消失。通过这 4 条曲线表明，药物不是与囊材的简单物理混合或者存在与微球表面，而是被很好地包裹在微球内部，说明载药微球已经形成。

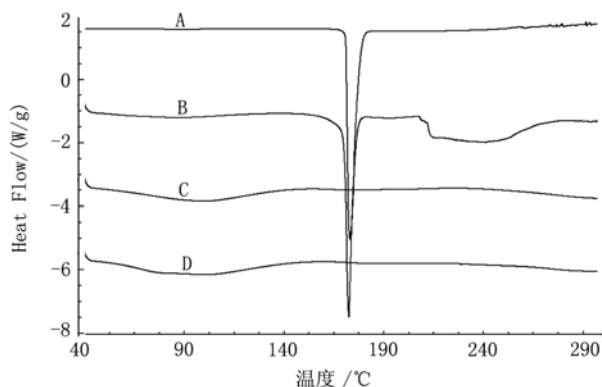


图4 DSC分析图

A-异烟肼; B-物理混合; C-空白(GMS); D-异烟肼明胶微球

Fig 4 DSC curves

A-INH; B-physical mixture; C-blank-GMS; D-INH-GMS

2.6.2 红外光谱测定法(Infrared spectroscopy, IR)

测定条件: 取 INH、INH-GMS 及 INH 与空白明胶微球的物理混合物各约 2 mg, 与 200 mg KBr 混匀, 压片。扫描范围为 $400\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$, 分辨率为 4 cm^{-1} 。FT-IR 结果见图 5。

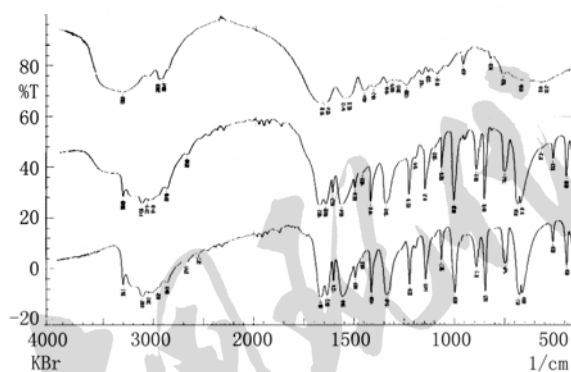


图5 FTIR分析图

A-异烟肼; B-物理混合; C-异烟肼明胶微球

Fig 5 FT-IR spectrum

A-INH; B-physical mixture; C-INH-GMS

由图 5 可以看出, 药物 INH 和 INH 与空白微球的物理混合物在 $3\,111\text{ cm}^{-1}$ 处均出现 -NH 官能团伸缩振动吸收峰, 和在 $1\,666\text{ cm}^{-1}$ 处均出现了 -C=O 官能团伸缩振动吸收峰。但在含药微球中, 这两处峰都出现减弱及宽化, 且在其他位置上, 和物理混合物具有显著性差异, 表明: INH-GMS 制备成功。

2.7 稳定性考察

2.7.1 INH-GMS对热压灭菌的耐受性考察 取500 mg的INH-GMS于玻璃离心管中, 在标准热压灭菌条件($115\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 min)下对INH-GMS进行灭菌, 考察灭菌对外观、形态、测定药物含量及包封率。结果表明均无明显的变化。

2.7.2 INH-GMS稳定性考察 INH-GMS于室温放置, 分别于1, 3, 6个月观察外观、形态, 测定药物含量及包封率。结果表明均无明显的变化。

3 讨论

3.1 INH-GMS的制备

明胶是常用的天然来源、可生物降解的载体材料, 制备载药明胶微球的常用方法有乳化法^[11-12]和凝聚法^[13]。本实验选择了乳化交联法, 此法简单易操作, 而且适用于水溶性药物微球的制备。用乳化交联法制备INH-GMS时, 选择合适的乳化剂、固化剂很关键, 以便得到稳定的W/O型乳剂。通过预实验, 发现以当乳化剂的HLB值在5左右时微球的外观、载药量和包封率均较好, 故选用司盘-80作为乳化剂。明胶微球常用的固化剂有甲醛和戊二醛^[14], 考虑到异烟肼的稳定pH为4~5, 而甲醛固化需要碱性条件, 戊二醛只需在中性条件下即可固化完全, 选用25%戊二醛为固化剂。实验对固化与脱水的先后顺序进行了考察。结果表明, 固化脱水的顺序对微球的外观和载药量有显著的影响。先脱水后固化, 微球中水溶性的异烟肼随水分被脱水剂迅速带走而流失, 所得微球载药量低且外观不圆整, 故选择先固化后脱水。实验还发现, 搅拌速度与微球的平均粒径有明显的相关性, 搅拌速度快, 所制得微球平均粒径小。这是由于搅拌速度快, 乳化时所形成的乳滴小, 因而固化后所得微球较小, 并且冰水浴时要保持一定的搅拌速度否则微囊容易粘连。要控制微球粒径在 $5\sim25\text{ }\mu\text{m}$ 范围, 搅拌速度为 $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 较合适。

3.2 INH-GMS含量测定方法的选择

含药明胶微球中药物含量测定一般有2种方法。一是酶解法, 即用酶溶液(如胰胃蛋白酶)将明胶的网状结构破坏后使药物完全释放出来, 再进行测定^[15]。二是溶媒提取法, 即把含药微球置于对药物溶解度大的溶剂中恒温振荡24 h或超声提取, 将药物直接提取出来。由于异烟肼是易溶于水, 微溶于乙醇, 不溶于乙醚等有机溶剂, 故选用酶解法来测定含量。

3.3 稳定性考察

注射剂的灭菌是关乎药品质量、保证用药安全的重要工艺步骤之一。灭菌工艺研究中应根据药物和制剂的具体情况, 选择适宜的灭菌方法, 做到既能杀灭微生物, 以保证用药的安全性, 又要避免药物降解, 以免影响药效和安全性。注射剂常用灭菌

方法包括过滤除菌法和湿热灭菌法。过滤除菌法系用滤过方法除去活的或死的微生物的方法,是一种机械除菌的方法。除菌过滤器采用孔径分布均匀的微孔滤膜作过滤材料,滤膜的孔径一般不超过0.22 μm 。本实验制备的INH-GMS平均粒径为15.63 μm ,因此选择湿热灭菌。由于热压灭菌的压力高,所需时间短,灭菌效果可靠,所以本实验最后选择湿压灭菌中的一种方法为热压灭菌。实验制备得的INH-GMS能耐受高压灭菌,且在室温条件下稳定性好,为下一阶段INH-GMS注射剂的研究提供了依据。

3.4 靶向性

异烟肼的口服吸收迅速且不规则,造成血药浓度起伏很大,而且半衰期短。本实验研制了肺靶向INH-GMS,以提高药物疗效,平缓释药。作为肺靶向药物关键是控制微球粒径的大小,本实验制备的微球平均粒径为15.67 μm ,满足肺靶向微球粒径7~30 μm 的范围^[16],有望达到浓集于肺部的靶向要求,有关动物体内的相应特性尚待进一步研究证实。

REFERENCES

- [1] CUI F D. Pharmaceutics(药剂学) [M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004: 363-380.
- [2] LU B, ZHANG J Q, YANG H. Lung-targeting microspheres of carboplatin [J]. Int J Pharm, 2003, 265(1/2):1-11.
- [3] WU H, WU D C. Pingyangmycin gelatin microspheres: preparation and drug release characteristics [J]. J Biomed Eng (生物医学工程学杂志), 2003, 20(4): 646-649.
- [4] WANG J, TABATA Y, MORIMOTO K. Aminated gelatin microspheres as a nasal delivery system for peptide drugs: Evaluation of *in vitro* release and *in vivo* insulin absorption in rats [J]. J Controlled Release, 2006, 113(1): 31-37.
- [5] ILLUM L, JORGENSEN H, BISGAARD H, et al. Bioadhesive micro-spheres as a potential drug delivery system [J]. Int J Pharm, 1987, 39(3): 189-199.
- [6] THWAITES G E, SCHOEMAN J F. Update on tuberculosis of the central nervous system: pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. Clin Chest Med, 2009, 30(4): 745-754
- [7] ZHAI G X, ZHAO Y, XIE N C, et al. Study on the lung targeting microspheres of low molecular weight heparin [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2001, 32 (2): 98-101.
- [8] KANKE M, SIMMONS G H, WEISS D L, et al. Clearance of 141Ce-labeled microspheres from blood and distribution in specific organs following intravenous and intra arterial administration in beagle dogs [J]. J Pharm Sci, 1980, 69(7): 755-762.
- [9] MUNIYANDY S, KESAVAN B, GOMATHINAYAGAM M, et al. Ultrasonically controlled release and targeted delivery of diclofenac sodium via gelatin magnetic microspheres [J]. Int J Pharm, 2004, 283(1/2):71-82.
- [10] LIU J, MEISNER D, KWONG E, et al. A novel trans-lymphatic drug delivery system: Implantable gelatine sponge impregnated with PLGA-paclitaxel microspheres [J]. Biomaterials, 2007, 28(21): 3236-3244.
- [11] RATELIFF J H, HUNNEYBALL I M, SMITH A, et al. Preparation and evaluation of biodegradable polymeric systems for the intra-articular delivery of drugs [J]. J Pharm Pharmacol, 1984, 36(7): 431-436.
- [12] WENG L H, IVANOVA N D, ZAKHALEVA J, et al. In vitro and in vivo suppression of cellular activity by guanidinoethyl disulfide released from hydrogel microspheres composed of partially oxidized hyaluronan and gelatin [J]. Biomaterials, 2008, 29(31): 4149-4156.
- [13] EI-SAMALIGY M, ROHDEWALD P. Triameinolone diacetate nanoparticles, a sustained release drug delivery system suitable for parenteral administration [J]. Pharm Acta Helv, 1982, 57(7): 201-204.
- [14] YANG Y X, LI Y, SUN D J. The effect of the cross-linking upon the qualitative properties of the gelatin microspheres [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2001, 16 (1): 40-41.
- [15] YASUHIKO T. Specific delivery of mitomycin to the liver, spleen and lung, nano and microspherical carriers of gelatin [J]. Int J Pharm, 1981, 81: 131-141.
- [16] ZHAN G P, HUANG K L, XIE E W. The preparation of streptomycin sulfate gelatin microspheres for lung targeting [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2005, 25(7): 625-629.