

W/O法制备盐酸土霉素 聚乳酸微球及其释药性能

李良¹, 李国明² (1. 南昌市疾病预防控制中心, 江西 南昌 330006, 2. 华南师范大学化学系, 广东 广州 510631)

摘要:目的 制备一种可作药用的长效缓释微球。方法 以盐酸土霉素为囊心物质用 W/O溶剂挥发法制备了盐酸土霉素/聚乳酸微球, 讨论了不同制备条件对聚乳酸载药微球的影响, 并且分析了药物含量、聚乳酸分子量、微球粒径等条件对载药聚乳酸微球释放性能的影响。结果 所制得的微球较为规则, 包封率较高, 释药时间能长达半个月以上。结论 聚乳酸能够作为一般的水溶性药物的长效释放基材。

关键词: W/O; 聚乳酸; 盐酸土霉素; 微球

中图分类号: TQ465.4; TQ460.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)01-0049-04

Preparation of oxytetracycline hydrochloride containing polylactic acid by water-in-oil and drug-releasing performance

LI Liang¹, LI Guo-ming² (1. Nanchang Municipal Center of Disease Control, Nanchang 330006, China; 2. Department of Chemistry, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Prepare a long releasing microsphere for the medicine. **METHOD** Lactic (PLA) microspheres (MS) containing oxytetracycline hydrochloride were prepared by a water-in-oil solvent evaporation method, the effects of different preparation conditions on the drug loading PLA microspheres were discussed, and effects of molecular weight of PLA, the drug content, microsphere size on the drug-releasing performance of the microspheres were analyzed. **RESULTS** The shape of microspheres was good, the encapsulation efficiency was high and the drug-releasing period can be longer than 15 days. **CONCLUSION** The PLA can be the period releasing material of the water soluble drug.

KEY WORDS: water-in-oil; polylactic acid; oxytetracycline hydrochloride; microsphere

近些年来,人们已经将常规药物的制备转为控释型药物的制备,即将高分子物质如聚乳酸(PLA)、聚乳酸乙醇酸共聚物(PLGA)、乙酸钠纤维素(CAP)等作为载体^[1-3],制成微球或微胶囊将药物包埋,制成口服或注射制剂,但如何取得高包封率、高产率、高载药率及理想的释放行为的微粒系统已引起人们的广泛关注。

传统的溶剂挥发法制备微球^[4]将药物和高分子溶解在挥发性溶剂中如二氯甲烷、三氯甲烷、丙酮等作为分散相,水相中加入乳化剂如明胶、聚山梨酯、PVA等作为连续相,将分散相缓慢加入到连续相中,一定条件下搅拌直到溶剂挥发完为止。然而有些药物如盐酸土霉素、林可霉素、胰岛素等可溶于水,但却难溶于有机溶剂,如果用O/W法制备,易在聚合物表面产生一些药物的微晶碎片,而且这种药物易溶于水,这样易导致制得的微球低包封率及产生较为严重的“暴释”现象,所以,我们采用反相悬浮溶剂挥发法即W/O法,以盐酸土霉素作为模型药物溶于一定量水中,与高分子物质PLA一起溶于乙腈中作为水相,加入到含乳化剂油酸山梨坦

(Span-80)的花生油的连续相中,制得较为理想的高分子微球。

1 仪器和试剂

UV-VIS 8500型紫外-可见分光光度计,上海TECHCOMP公司。PHS-3C型精密pH计,上海雷磁仪器厂。IR-480型红外光谱仪,日本岛津公司。IB-3镀膜仪,日本Eiko工程有限公司。Kyky1000-1000B型扫描电子显微镜,中科院科学仪器厂引进美国生产线生产。透析袋(聚碳酸酯-聚醚嵌段共聚物材料,截流分子量:14000±2000),上海源聚生物科技有限公司。

聚乳酸(M_r=5.9万,1万,0.5万),自制。Span-80,上海市企业标准,上海申宇医药化工有限公司。花生油,食用级,市售。盐酸土霉素,江西国药厂。二氯甲烷、乙腈、甲醇等试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 聚乳酸载药微球的制备

参考文献^[5,6]的方法用W/O溶剂挥发法制备。以聚乳

作者简介:李良,男(1975-),毕业于华南师范大学化学系,硕士,现在南昌市疾病预防控制中心从事理化检验工作, E-mail: liangli13@sina.com

通讯作者:李国明,男(1957-),副教授;主要研究方向:生物医学高分子, E-mail: gm1@scnu.edu.cn

酸(约 0.7g)的乙腈(约 15mL)溶液作为分散相,在其中加入盐酸土霉素,1mL蒸馏水使其完全溶解,油相为含一定量 Span-80 的花生油(约 200mL)为连续相,在一定转速下电动搅拌,室温下减压使溶剂挥发而固化,然后再保持抽真空条件下使溶剂挥发完,此过程约需 12h 左右,制得的聚乳酸微球先抽滤,然后用汽油反复洗涤 2~3 次,真空干燥 12h,过筛,即得聚乳酸载药微球样品。

2.2 形态观察和粒径测量

微球首先进行喷金制样处理后,在加速电压为 20kV 下,放大倍数从 128~1500 倍,以扫描电子显微镜观察微球的整体形态和每个微球的表面状况。

用光学显微镜以测微尺测量粒径并计数(每组样测 500 个微球),按公式^[7] $d_{av} = \frac{n_1 d_1 + n_2 d_2 + n_3 d_3 + \dots + n_n d_n}{n_1 + n_2 + \dots + n_n} = \frac{\sum (nd)}{\sum n}$ 计算平均粒径。($n_1, n_2, n_3 \dots n_n$ 是粒径为 $d_1, d_2, d_3 \dots d_n$ 的粒子数)

2.3 微球包封率及药物含量的测定

称取适量的盐酸土霉素,用甲醇进行溶解,配制好不同浓度的溶液 5 份,在 260nm 处测其吸光度,得标准曲线: $C = 38.30620A - 1.25037$ ($r = 0.9947$, C : mg/L),线性范围: 20.8~52.0mg/L,然后准确称取一定量的载药微球加入 1mL 二氯甲烷溶解后再加入 9mL 甲醇使其沉淀析出,在约 2500 r/min 离心 30min 后过滤,定容至 25mL,测其吸光度,根据标准曲线推算出其药物含量,按下式计算出包封率。

$$\text{包封率} = \frac{\text{药物含量}}{\text{投药分率}} \times 100\%$$

2.4 盐酸土霉素含量测定工作曲线的绘制

准确称量 7.9mg 的盐酸土霉素,以 0.9% 氯化钠水溶液 ($pH = 6.9$) 配制 79 μ g/mL 的溶液作为储备液,密封好在 37 $^{\circ}$ C 振荡 10d 左右,然后分别移取 1, 2, 3, 4, 5mL 标准溶液 5 份,用紫外分光光度计分别在 260nm 处测吸光度,线性回归得下列方程: $C = 0.51092 + 36.65376A$ ($r = 0.9910$, C : μ g/mL),线性范围: 3.2~16.0 μ g/mL

2.5 微球体外静态释放实验

准确称取聚乳酸载药微球适量,置于自制的释药袋中,紧密封口,然后置于 37 $^{\circ}$ C 500mL 的生理盐水中,以 100 r/min 恒温振荡,定时取 5mL 释放介质,同时补充等量的新鲜溶媒,测定其吸光度,根据工作曲线方程换算成浓度,并依下式计算出累积释药百分率。

3 结果与讨论

3.1 微球的扫描电镜观察

M_r 为 7000 的聚乳盐酸土霉素聚乳酸微球扫描电镜图见图 1。B, C, D 图分别为含药量为 8.08% 的 PLA 微球在 $pH = 6.9$ 的 NaCl 水溶液 0, 15 和 30d 的水解情况, A 为 B 图中单个微球电镜图,可以看出在微球表面有一些孔洞,由于盐酸土霉素为一种亲水性药物,而聚乳酸为亲油性高分子物质,在聚乳酸-乙腈水溶液与花生油的乳液分散体系中,随着乙腈溶剂的挥发,少量盐酸土霉素随着水而进入油相中,所

以在其表面出现一些孔道可能与其释药有一定关系。B 图在放大 130 倍可以见到微球较为光滑且球形较好,微球较为聚集但界面良好,可见到每个微球球形较为规则,但水解 15d 后可以看出表面较为粗糙,球形没有很大变化但有进一步聚集现象,水解 30d 后发现大部分微球形已破坏而且已聚成一团。聚乳酸由于降解时收缩的分子链逐渐伸展,所以球形会有所变化,而且伸展的分子链之间可能会相互缠绕,因而水解后期会有微球聚集和粘连的现象。

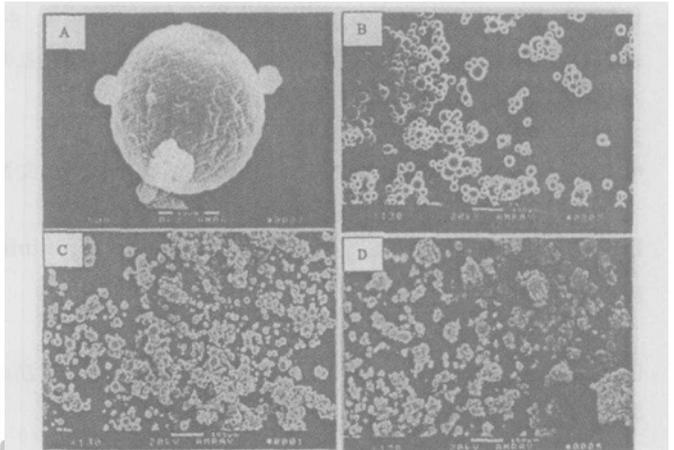


图 1 盐酸土霉素聚乳酸微球扫描电镜图

Fig 1 The oxytetracycline/PLA microsphere SEM photo

3.2 微球制备过程中各因素对微球性能的影响

在已有实验基础上固定 PLA 用量、W/O 比、温度和溶剂挥发时间,增加投药比制得的微球的粒径略有增大,包封率则有所减少。投药比增加,分散相中药物的浓度也增大,而水相的黏度增加,在相同条件下,形成的微球粒径会增大。同时,投药比增大,也增加了分散相中的药物向连续相中扩散的机率,当然也与聚乳酸自身的 M_r 有关, M_r 较小,分子链较短,则缠绕的空间较小,包裹的药物较少,而且 M_r 较小,分子链缠绕所形成的网络空间较大,在分子相的药物也较易透过这个空间向外扩散,包封率有所降低。相同条件下, M_r 越高的 PLA,分散相中 PLA 黏度则越大,在相同的剪切力作用下,则形成的微球的粒径较大。在相同条件下,提高转速,乳液受到的剪切力则相应增大,得到的微球粒径较小,试样 7 粒径分布较窄,见图 2。粒径在 20 μ m 以下的粒子分布在 70% 以上较试样 3 粒径分布均匀见图 3,但试样 8,粒径较大且分布较试样 7 和试样 3 分布不均匀,见图 4。但如果转速过高,如 1000 r/min,乳化剂易起泡且乳液易溅在瓶壁上,制得的微球粒径较大且质量不好,乳化剂对成球起了决定性作用,乳化剂用量的多少对微球的球形及粒径大小起了非常重要的作用,乳化剂用量过少,例如小于 1%,则制得的微球球形过大,可达 mm 级且易粘连,在实际应用中用途不大;乳化剂用量过多,例如 4% 则因乳化剂浓度过大而易产生聚集现象,使得乳液不能充分分散开来,制得的微球粒径过大,可达 43.3 μ m,一般乳化剂的浓度应控制在 1.5%~3% 之间,可制得球形较好的 PLA 载药微球,在这范围内乳化剂的浓度增大,则其制得的微球有逐步减小的趋势。各因素对微球的性

能影响见表 1。

表 1 微球制备过程中各因素对微球性能的影响

Tab 1 The different preparation conditions on the performance of microspheres

试样号	Span-80 (w%)	搅拌速率 (r/min)	PLA的 Mr ($\times 10^4$)	投药比	粒径 (μm)	包封率 (%)
1	2	300	0.7	1/10	26.85	87.28
2	2	300	0.7	1/5	30.20	61.22
3	2	300	0.7	1/7	28.63	63.03
4	2	300	0.5	1/10	20.97	86.43
5	2	300	5.9	1/10	38.12	83.45
6	1.5	300	0.7	1/10	30.01	79.77
7	3	300	0.7	1/10	22.04	91.85
8	4	300	0.7	1/10	43.30	93.57
9	2	500	0.7	1/10	25.09	80.44
10	2	600	0.7	1/10	17.84	82.30

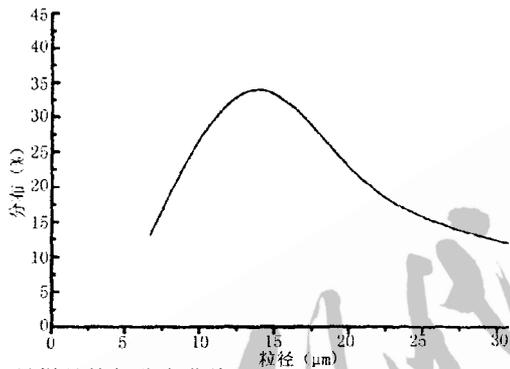


图 2 7号样品粒径分布曲线

Fig 2 Particle size distribution chart of No. 7 sample

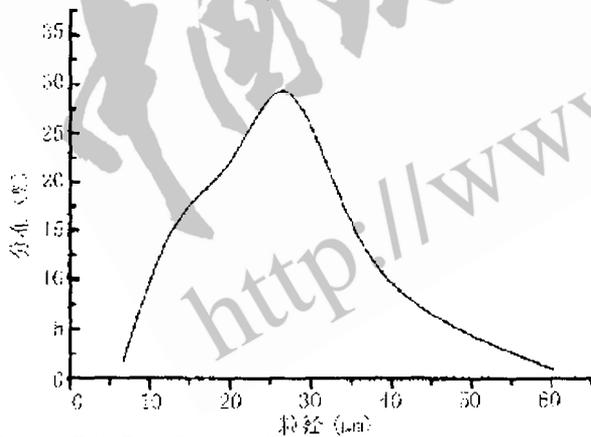


图 3 3号样品粒径分布曲线

Fig 3 Particle size distribution chart of No. 3 sample

3.3 各因素对载药微球释放性能的影响

3.3.1 药物含量对微球释放性能的影响 盐酸土霉素原料药和含药量不同的聚乳酸载药微球在 pH = 6.9 的生理盐水中的释药曲线见图 5。药物的释放是药物在聚合物中的渗透扩散和聚合物-液体界面间的质量传递过程^[8]，它的扩散和释放遵循 Fick 定律 (对于一维扩散体系)，载药量为 8.31% 和 10.38% 的载药微球，粒径相似其载药量越大，突释现象越显著，而载药量为 8.31% 和 8.08% 的聚乳酸载药微球，载药

量越高，药物释放略有增加，由于含药量为 8.31% 的微球粒径为 28.63 μm ，而含药量为 8.08% 的微球粒径为 30.20 μm ，粒径也对微球的释放产生了影响，从图中的结果可以看出药物在聚合物中的含量影响其体外释药速度，药含量越大，释药速度越快，结果与 Fick 定律较为一致。

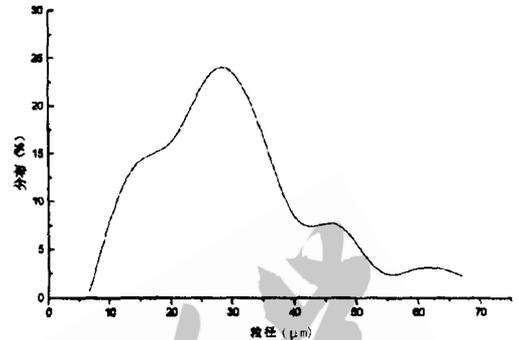


图 4 8号样品粒径分布曲线

Fig 4 Particle size distribution chart of No. 8 sample

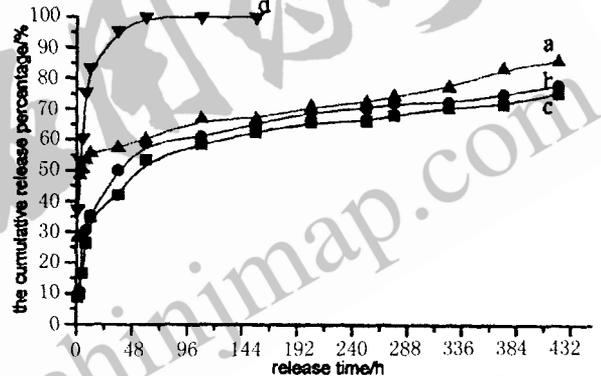


图 5 含药量不同的盐酸土霉素 /PLA 微球的体外释药曲线

Fig 5 Drug-releasing curves of PLA MS with different amounts of oxytetracycline hydrochloride

a. 含药量为 8.08% ; b. 含药量为 8.31% ; c. 含药量为 10.38% ; d. 原料药

a. drug-loading amount is 8.08 percent ; b. drug-loading amount is 8.31 percent ; c. drug-loading amount is 10.38 percent ; d. pure drug

3.3.2 Mr 对微球释放性能的影响

Mr 不同的聚乳酸载药微球 (药含量均接近于 8% 左右) 的体外释药曲线见图 6。根据 Fick 定律，药物释放受聚合物结构和性能的影响。聚乳酸是一种无定形聚合物，其分子链之间的相互缠结所形成的网孔空间的“筛分效应”是药物经聚合物扩散的主要机制，分子量较高，分子链较长，分子链之间相互缠绕的程度较大，所形成的网孔空间较小，导致药物经聚合物扩散越慢，当然 Mr 不同的聚乳酸载药微球中聚乳酸自身的降解也有一定的作用，PLA Mr 有 5000, 7000 和 5.9 $\times 10^4$ ，Mr 小的 PLA 在 15d 内存在部分的降解，所以它们的释药曲线存在显著的差异，图中的结果表明聚乳酸的 Mr 大小影响其体外释药速率，当然可根据不同要求选择不同 Mr 的 PLA，如希望药效长些，选择 Mr 较高的 PLA，但是 Mr 高的 PLA 降解融蚀与生物体的愈合

并不同步,而 M_r 较小的 PLA,药效可能短一些,但是可与生物体的愈合一致,因此在具体应用上可选择不同 M_r 的 PLA 作为药物释放基材。

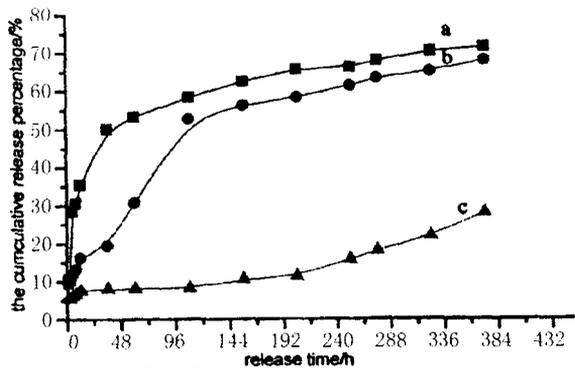


图 6 相对分子量不同的盐酸土霉素 /PLA 微球的体外释药曲线

Fig 6 Drug-releasing curves of PLA MS with different molecular weight M_r (PLA): a. 5000; b. 7000; c. 3×10^4

3.3.3 粒径对微球释药性能的影响

不同粒径的盐酸土霉素 /PLA 微球其释药曲线却有很大区别,见图 7。从图 7 中可看出,粒径较小的微球其释药较快,而较大者却较慢。将两条曲线分别对 $t_{1/2}$ 进行线性拟合得其释药动力学方程分别为 $Q_1 = 17.32777 + 4.78641 t_{1/2}$ ($r = 0.92443$) 和 $Q_2 = 1.51572 + 4.73463 t_{1/2}$ ($r = 0.97935$), 符合 Huguchi 方程。在 Huguchi 方程中,释药速率与微粒的总表面积成正比,因而释药速率也与微粒粒径成反比,所以呈现出上述变化规律,在约 13d 后才以较为平缓的速率释药,第一种微球每克微球每小时可释药 $21.29 \mu\text{g}$,而第二种微球每克微球每小时可释药 $59.21 \mu\text{g}$ 。

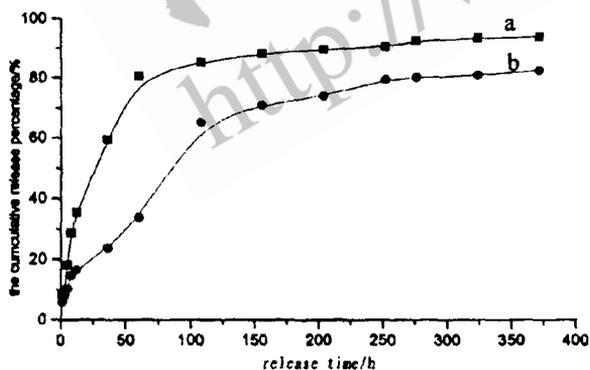


图 7 粒径不同的盐酸土霉素 /PLA 微球的体外释药曲线

Fig 7 Drug-releasing curves of PLA MS with different particle size

a. 药含量为 8.57%, 粒径为 $17.84 \mu\text{m}$ 微球; b. 药含量为 8.67%, 粒径为 $22.04 \mu\text{m}$ 微球

a. drug-loading amount was 8.57%, microsphere particle size is $17.84 \mu\text{m}$;

b. drug-loading amount was 8.67%, microsphere particle size is $22.04 \mu\text{m}$

4 结论

4.1 本实验有别于传统的 O/W 溶剂挥发法,而采用反相的 W/O 溶剂挥发法,所得的微球较为规则,包封率较高,基本能达 70% 以上,低分子量的 PLA 载药微球的释药也较为理想,能达半个月以上,能作为一般的水溶性药物长效控释基材。

4.2 结合适当的搅拌速率、乳化剂浓度、PLA 分子量等条件能得到粒径合适的载药微球,这作为皮下埋植制剂是有一定应用前景的。

4.3 本方法制得的微球与 O/W 法相比缺陷在于部分微球有聚集现象没有 O/W 法制得的微球分散,有待于寻求一种较好的乳化剂能改善其分散效果。

参考文献

- [1] Putney SD. Encapsulation of proteins for improved delivery [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 1998, 2(4): 548.
- [2] Putney SD, Burke PA. Improving protein therapeutics with sustained-release formations [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(2): 153.
- [3] Cleland JL. Protein delivery from biodegradable microspheres [J]. *Pharm Biotechnol*, 1997, 10: 1.
- [4] Beck LR, Cowsar DR, Lewis DH, et al. *Fertil Steril*, 1979, 31: 545.
- [5] Wada R, Hyon SH, Ikada Y. Lactic acid oligomer microspheres containing hydrophilic drugs [J]. *J Pharm Sci*, 1990, 79(10): 919.
- [6] 胡一桥, 郭建新, 郑梁元, 等. 胰岛素聚乳酸微球处方筛选 [J]. *中国药学杂志*, 1999, 34(12): 822.
- [7] 陆彬. 药物新剂型与新技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 524.
- [8] 王勤, 路岩, 张娟等. 以聚乳酸为载体的药物释放及动物疗效学的研究 [J]. *中国生物医学工程学报*, 1995, 14(1): 11.

收稿日期: 2003-03-06