

[文章编号 1000-1182(2005)01-0069-03]

平阳霉素白蛋白微球的制备及其体外释药的实验研究

高庆红¹, 郑根建², 王昶光³, 周 岚², 温玉明¹, 王昌美¹, 侯世祥³

(1. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2. 浙江省台州市中心医院 口腔科, 浙江 台州 318000; 3. 四川大学华西药学院 药剂研究室, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 制备平阳霉素白蛋白微球(PYM-AMS), 用于治疗动静脉血管畸形。方法 采用乳化热固化法, 在 140 制备出 PYM-AMS, 并考察其理化性质: 通过超声测定强度, 激光散射粒径分析仪测定粒径大小, 紫外分光光度法测定载药率、包封率和体外模拟累积释放度。把制备好的 PYM-AMS 分装后, 经⁶⁰Co 辐照灭菌。并通过放置于冰箱(3~5)、室温(15~25)和 37 , RH75 % 条件下放置 3 月, 考察其稳定性。结果 制备的 PYM-AMS 平均粒径为 139.422 μm, 56~251 μm 的微球约占总数的 80 %, 载药率为 26.47 %, 包封率为 84.3 %; 5 h 内药物快速释放, 之后进入缓慢过程, 24 h 累积释放率为 88.65 %, t_{50} 为 1.5 h; 分装后, 经⁶⁰Co 辐照灭菌; 性质稳定, 经 5 号、6 号药典筛筛分后, 可获得 125~180 μm 的微球。结论 制备的 PYM-AMS 载药量高, 具有缓释效果, 能够达到治疗动静脉畸形的要求。

[关键词] 平阳霉素; 白蛋白微球; 缓释

[中图分类号] R 739.8 [文献标识码] A

An Experimental Study on the Preparation and Drug Sustained Release Characteristics of Pingyangmycin Albumin Microspheres GAO Qing-hong¹, ZHENG Gen-jian², WANG Chang-guang³, ZHOU Lan², WEN Yu-ming¹, WANG Chang-mei¹, HOU Shi-xiang³. (1. Key. Laboratory. of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Stomatology, Taizhou Central Hospital, Taizhou 318000, China; 3. Dept. of Pharmacy, West China College of Pharmacology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** The aim of this study was to prepare Pingyangmycin Albumin Microspheres (PYM-AMS) for arterio-venous malformations treatment. **Methods** PYM-AMS was prepared at 140 by the method of emulsification-heat solidification and its characteristics were evaluated, such as morphosis, particle size, drug loading (DL %), encapsulation efficiency (EE %), stability and drug sustained-releasing *in vitro*. After being packaged, PYM-AMS were sterilized with 13.7 kGy of ⁶⁰Co. Small samples of PYM-AMS were packaged in small bottles and stored at 3~5 , 15~25 , 37 for 3 months, then checked the change of morphology, DL, EE and the release rate. **Results** The surface of particles was smooth and integrated. The average diameter of PYM-AMS particles was 139.422 μm and 80 % was in the range of 56~251 μm. The mean DL % and EE % were 26.47 % and 84.3 %, respectively. PYM released fast in 5 h, but then released slowly. 88.65 % drugs were released in 24 h, and t_{50} was 1.5 h. There was no obvious change of the morphology, DL, EE and the release rate of PYM-AMS stored at 3~5 , 15~25 , 37 for 3 months. **Conclusion** PYM-AMS prepared in this study had sustained-release effect, high drug loading and high stability. Albumin is a good carrier of PYM embolization agent.

[Key words] pingyangmycin; albumin microspheres; sustained-releasing

国内近年的文献报道, 使用平阳霉素(pingyangmycin, PYM)病变内注射治疗口腔颌面部血管瘤和血管畸形, 疗效满意。但目前 PYM 在血管瘤或血管畸形中停留时间短; 对范围较大的海绵状血管畸形, 则

需较长治疗周期; 对动静脉血管畸形效果欠佳。为了达到提高和延长 PYM 局部浓度和时间, 提高疗效, 缩短 PYM 的治疗周期, 减少用药剂量和全身毒副反应, 以及减轻患者负担的目的, 改变 PYM 的常用剂型, 研制平阳霉素白蛋白微球(pingyangmycin albumin microspheres, PYM-AMS) 用于动静脉血管畸形的治疗是急需的。目前, 白蛋白微球的制备常用的方法有 4 种: 乳化化学交联法, 交联剂为甲醛、戊二醛、丁二酮等; 乳化热固化法; 溶剂挥发法; 喷雾热固化

[收稿日期 2004-09-03; 修回日期 2004-10-19]

[基金项目] 四川省科技攻关资助项目(03SG022-101); 浙江省台州市科委立项基金资助项目(022219)

[作者简介] 高庆红(1967-), 男, 四川人, 副主任医师, 博士

[通讯作者] 温玉明, Tel: 028-85501440

法。本实验在复习文献的基础上,采用乳化热固化法制备 PYM-AMS,以期用于动静脉血管畸形的治疗。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

PYM原药(天津太河制药股份有限公司提供),牛血清白蛋白(上海伯奥生物科技有限公司),精制菜子油、精制大豆油(四川里嘉粮油有限公司)。UV-2201 紫外分光光度计(日本岛津),Startorius 1721 型电子天平(德国赛多利斯集团),Malvern-2000 型激光散射粒径分析仪(英国马尔文仪器有限公司),JB-3 型定时恒温磁力搅拌器和 D40-21 电动搅拌器(杭州仪表电机厂),SHZ 88-1 型台式水浴恒温振荡器(江苏太仓鹿河生化仪器厂),KQ 3200 超声清洗机(昆山超声仪器有限公司),5 号、6 号药典筛(浙江上虞市道墟张兴纱筛厂),YKH-1 型液体快速混合器(江西医疗器械厂)。

1.2 乳化热固化法制备 PYM-AMS

PYM-AMS 的制备在四川大学华西药学院药剂研究室完成。称取 PYM 原药 75 mg,溶解于 0.5 ml 25 % 白蛋白 PBS 溶液(pH 7.4 磷酸盐缓冲液)中,待充分溶解后,加入到 25 ml 搅拌状态下的菜油中,以机械搅拌电压(40 V)控速搅拌乳化 2.5 min,再加入定量预热至 140 °C 大豆油中,固化 30 min,停止加热,冷却至室温,分别用石油醚、乙醚洗涤 3 次,干燥,收集,即得。

1.3 PYM-AMS 的质量评价指标

用光学显微镜观察以上方法制得的微球形态,用超声测定微粒强度,并通过激光散射粒径分析仪对粒径大小进行测定。

1.4 PYM-AMS 的药物含量测定

经过测定发现 PYM 的 PBS 溶液在 290 nm 左右有较大吸收,而白蛋白消解液在 290 nm 以下有吸收,290 nm 以上基本无吸收,不会干扰 PYM 测定,最终选择了 293.5 nm 作为 PYM 含量测定的波长。称取微球适量于 25 ml 容量瓶中,加入 5 % 胃蛋白酶溶液 5 ml 于(37 ± 5) °C 水浴中振荡消解,待溶液澄清后,用双蒸水定容至刻度,后于 293.5 nm 测定吸收度。依照已建立的标准曲线方程: $A = 0.0102C - 0.0002$ (相关系数 $r^2 = 0.9999$),计算 PYM 的含量。

另取等重 PYM-AMS,用双蒸水洗去表面药物,余下步骤同前测定吸收度,算出包载在微球内部的药物含量。按下列公式计算载药率和包封率:载药率 = 微球含药量/(微球含药量 + 白蛋白载体的量) × 100 %;包封率 = (微球含药量 - 表面药物量)/药物总的投入量 × 100 %。

1.5 PYM-AMS 体外模拟累积释放度的测定

采用振荡透析法作微球体外释药实验。取 PYM-AMS 10 mg,用 PBS 溶液 1.5 ml 冲洗入透析袋内,两端扎紧,置于 50 ml PBS 溶液中,于(37 ± 5) °C 水浴中振荡,并分别于 1、2、4、6、8、12、24 h 取样 5 ml,在 293.5 nm 处测定紫外吸收值。

1.6 PYM-AMS 的分装和灭菌

将制备好的 PYM-AMS 经过 5 号和 6 号药典筛筛分,分装于小瓶中,密封。送四川省农业科学研究院辐照场,经⁶⁰Co 发射的 13.7 kGy 辐射剂量辐照灭菌。辐照后的 PYM-AMS 按《中华人民共和国药典》(2000 版)规定的无菌检查法进行检查。

1.7 PYM-AMS 的稳定性考察

将制备的 PYM-AMS 分装于小瓶内,密封后置于冰箱(3 ~ 5 °C)、室温(15 ~ 25 °C)和 37 °C, RH75 % 条件下放置 3 个月,定时对微球颜色、形态、疏松度、再分散性、粒径、含量及释放度重要考察项目进行检查。

2 结果

2.1 PYM-AMS 的形态学和强度

制备的 PYM-AMS 呈淡黄色粉末状,表面光滑,大小均匀,圆形不粘连(图 1)。经超声处理 5 min 后外观无变化、无破碎。微球粒径在 56 ~ 251 μm 的微球约占总数的 80 %,平均粒径 139.422 μm。



图 1 光镜下平阳霉素白蛋白微球的外观

Fig 1 Light micrograph of PYM-AMS morphosis

2.2 PYM-AMS 的药物含量与体外模拟累积释放度

微球平均载药率为 26.47 %,即 1 mg 微球中含 PYM 264.7 μg,药物包封率为 84.3 %。PYM-AMS 在 5 h 内快速释放约 80 % 的药物,之后进入缓慢的释药状态,24 h 时药物释放率为 88.65 %, $t_{50} = 1.5$ h,如图 2 所示。

2.3 PYM-AMS 的分装和细菌检测

经药典筛筛分获得 PYM-AMS 微粒为 125 ~ 180 μm,平均约为 150 μm。制备好的微球经检测无细菌生长。辐照后的 PYM-AMS 再次检查,达到了无菌

要求,其外观、形态及药物含量无改变。

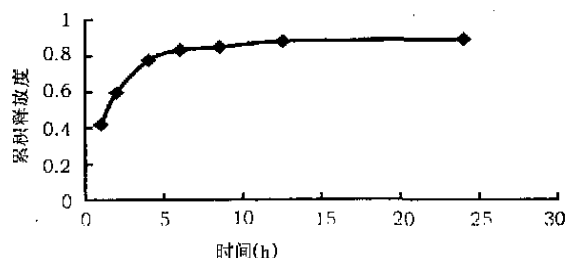


图 2 Pym-AMS 的体外释放度曲线

Fig 2 The releasing curve of Pym-AMS *in vitro*

2.4 Pym-AMS 的稳定性

不同温度下的 Pym-AMS 比较,微球颜色、形态、疏松度、再分散性、粒径、含量及释放度结果一致,无明显差异。表明该工艺制备的 Pym-AMS 对湿、热是稳定的。

3 讨论

针对当前临床应用平阳霉素病变内注射治疗血管畸形,对大面积的海绵状血管畸形,需较长治疗周期;对动静脉血管畸形效果欠佳的缺点,本研究制备 Pym-AMS,拟用直接注射或病变区动脉灌注的方式用于病变体,使微球在病变区停留,以期通过微球的栓塞和药物缓释作用,提高疗效,缩短疗程的目的。

目前,微球的制备工艺已日趋成熟,所用材料的种类很多,包括生物降解和非生物降解两大类。生物降解类有血清白蛋白、明胶、淀粉、聚乳酸、葡聚糖等,非生物降解类有乙基纤维素、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺等。

被采用制备微球的白蛋白有人血清白蛋白(human sera albumin, HSA)和牛血清白蛋白(bovine sera albumin, BSA)两种。对于两者结构性质、载药行为的比较未见文献报道,但是国外文献常报道以 HSA 作为载体,而少采用 BSA。由于价格的原因,国内较少采用 HSA,而选择性质差异不大、价格便宜的 BSA。白蛋白是一种简单蛋白质,其分子中氨基酸之间都以肽链相连,并且扭曲成蚯蚓状或蜂窝状,具有无数的网状空隙,为镶嵌携带药物创造了有利空间条件¹。而白蛋白微球在体内可通过相应的蛋白水解酶及其他综合因素的共同作用下产生崩裂、溶解而降解,如携带药物则可达到缓慢释放的效果。

微球粒径随着水相(白蛋白溶液)体积、浓度的增加而增加;随乳化搅拌速度、乳化聚甲基丙烯酸甲酯溶液粘度的增加而减小²。而乳化热固化的时间和温度直接影响白蛋白微球的溶胀、生物降解和释药性能。随着固化温度升高,固化时间延长,白蛋白微球的溶胀率降低,生物降解性能降低,释药速度因此减慢³。但本研究发现,搅拌速度是微球粒径大小的重要影响因素。在预实验中 发现 140 固化的平阳霉

素白蛋白微球比 160 固化的要好,释药慢。而化学交联法制备的微球释药更慢,由于应用平阳霉素白蛋白微球治疗口腔颌面部血管瘤或血管畸形,需要微球先有一个快速释药,然后再缓释,因此,选择了 140 作为固化 Pym-AMS 的温度。本研究制备的 AMS 具有疏水性,体积大,适合用油剂作为溶剂。有研究表明⁴,通过控制微球制备时的油相,可使制备的微球具有疏水性或亲水性。

本实验制备的 Pym-AMS 的载药率为 26.47%,远远高于文献报道的 Pym 磁性明胶微球和 Pym 明胶微球^{5~7}。其原因可能:本实验中制备的载药微球体积大;其他学者在制备过程的后期使用了水,而平阳霉素是一种较强的水溶性物质;其他学者未计算微球表面吸附的药物量;本研究中采用了厂家提供的原药。有学者认为⁶,采用加热固化法制备的白蛋白微球体内贮存的稳定性稍差,药物包裹量小,抗癌药物在加热固化中(100~140)易变性。但本研究通过对 Pym 水溶液稳定性的考察,没有发现 Pym 易受热变性,表明采用乳化热固化法制备的 Pym-AMS 的药效能够得到保证。

国内文献报道, Pym 明胶微球在 3 h 内释放 70% 以上药物, 6 h 时释放 90% 以上药物, t_{50} 为 1.5 h⁷;而 Pym 磁控缓释微球, 1 h 内药物释放较多,约占总包药量的 57%,以后 2 h 药物释放缓慢,约 3 h 时药物完全释放⁵。本实验中, Pym-AMS 5 h 内药物快速释放,之后进入缓慢过程, 24 h 累积释放率为 88.65%, t_{50} 为 1.5 h,缓释效果略优于文献报道^{5,7},可能与本研究制备的微球较大有关。

[参考文献]

- 1 程宇慧,廖工铁,侯世祥,等. 白蛋白微球的体内研究概况 J. 华西药理学杂志, 1991, 6(3): 150-154.
- 2 孙路路,魏树礼. 白蛋白微球的制备及影响粒径大小的因素 J. 中国医药工业杂志, 2000, 31(3): 110-113.
- 3 主皓. 白蛋白微球的制备方法 J. 中国医院药学杂志, 1995, 15(9): 415-416.
- 4 MacAdam AB, Shafi ZB, James SL, et al. Preparation of hydrophobic and hydrophilic albumin microspheres and determination of surface carboxylic acid and amino residues J. Int J Pharmaceutics, 1997, 151(1): 47-55.
- 5 郑根建,李德伦,周岗. 平阳霉素磁控缓释微球的特性检测 J. 华西口腔医学杂志, 1996, 14(3): 223-226.
- 6 郭军,吴汉江,张胜,等. 平阳霉素磁性缓释微球对兔耳静脉作用的实验研究 J. 江苏临床医学杂志, 1998, 2(6): 455-460.
- 7 吴红,吴道澄,于开涛,等. 平阳霉素明胶微球的制备及其释药特性 J. 生物医学工程杂志, 2003, 20(4): 646-649.

(本文编辑 汤亚玲)