

文章编号：(2008)03-0072-05

醋酸地塞米松聚乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球

药物含量和体外释放度测定

蔡翠芳, 唐 星, 邹梅娟, 李积军

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立醋酸地塞米松聚乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球中药物含量和释放度测定的方法, 为易降解药物的含量测定提供依据。方法 采用高效液相-紫外检测法测定聚合物缓释微球中醋酸地塞米松及降解产物的含量, 并建立降解产物峰面积与减少的原形药物峰面积之间的线性关系, 准确测定和计算微球中药物的释放度。结果 微球中醋酸地塞米松含量测定方法回收率为 $(101.8 \pm 1.2)\%$ ($n=6$), 日内日间精密度高, 线性回归降解产物峰面积与减少的原形药物峰面积得关系式 $A_{\text{degradation}} = 0.9087(A_0 - A_t) - 994.76$ ($R^2=0.9974$), $A_{\text{total}} = (A_{\text{degradation}} + 994.76) / 0.9087 + A_t$ 。此方法补偿了降解所引起的测定误差。结论 该测定方法对于易降解药物的测定具有一定的借鉴意义。

关键词: 药剂学; 微球; 高效液相-紫外检测法; 醋酸地塞米松; 乳酸-羟基乙酸共聚物; 含量测定

中图分类号: R 944

文献标志码: A

醋酸地塞米松是肾上腺皮质激素类药物, 是甾体皮质激素类中疗效最强、不良反应最小的药物之一, 主要用于抗炎和控制过敏。聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球控释系统适用于半衰期短或口服生物利用度低而又需要长期使用的药物, 其优点是在一定时间内以一定速率释放药物以维持有效血药浓度并减少给药次数。对于需要长时间持续给药的蛋白质和肽类物质(尤其是激素), PLGA微球控释系统是非常理想的载药系统^[1-2]。目前地塞米松长效制剂得到广泛开发, 如生物降解微球、靶向型生物降解微球等^[3-4]。作者采用适当提取分离方法及高效液相-紫外检测法测定了自制的醋酸地塞米松聚乳酸-羟基乙酸微球中醋酸地塞米松的含量, 方法回收率高, 操作简便。鉴于醋酸地塞米松在释放条件下不稳定的性质, 建立了降解产物峰面积与减少的原形药物峰面积之间的线性关系, 以便准确测定和计算药物释放量。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪: Jasco PU-2080 泵、Jasco UV-2075 检测器 (日本分光公司), Zirchrom C₁₈ 色谱柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国捷康公司), HZQ-C 空气浴振荡器(哈尔滨东明医疗仪器厂), LG10-2.4A 高速离心机(北京医疗仪器厂), DL-30 超声分散仪(宁波石浦海天电子仪器厂), 10 mL 塑料离心管(山东禹王分析仪器厂)。

醋酸地塞米松(天津天药药业股份有限公司), 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA, 质量比 75:25, $M_n=11\ 500$, 北京化学试剂厂), 聚乙烯醇(PVA17-88、04-86、04-85, 北京化学试剂厂)。

收稿日期: 2007-10-09

作者简介: 蔡翠芳(1974-), 女(汉族), 山东庆云人, 讲师, 主要从制剂新剂型研究, Tel. 024-23986345, E-mail caicuifang@163.com; 唐星(1963-), 男(汉族), 陕西商县人, 教授, 主要从事药物制剂的研究, Tel. 024-23986343, E-mail tangpharm@sina.com.cn.

2 方法与结果

2.1 醋酸地塞米松最大吸收波长的确定

适量醋酸地塞米松用 pH 4.5 醋酸钠缓冲液-乙腈(体积比 45:55)溶解,进行紫外最大吸收波长测定;加入适量 PLGA 和 PVA 等辅料,进行最大吸收波长测定。结果表明,醋酸地塞米松在波长 246 nm 处有最大吸收,而辅料在该波长处基本无吸收,因此确定醋酸地塞米松最大吸收波长为 246 nm。

2.2 微球中药物含量测定

采用高效液相-紫外检测法。色谱条件: Zirchrom C₁₈ 柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: pH 4.5 醋酸钠缓冲液-乙腈(体积比 45:55); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 室温; 检测波长: 246 nm; 进样量: 10 μL; 吸收量程 0.005 AU/FS。

2.2.1 标准曲线的绘制

取醋酸地塞米松标准品 10 mg,用流动相稀释至 100 mL。精密量取 0.5、1、2、4、6、8、10 mL 用流动相稀释至 100 mL(质量浓度分别为 0.5、1、2、4、6、8、10 mg·L⁻¹),每次进样 10 μL 测定,每个样品进样 3 次取平均值,作药物质量浓度(ρ)与峰面积(A)间的曲线。标准曲线方程为 $A=3.3344 \times 10^4 \rho + 7.1391 \times 10^3$ 。醋酸地塞米松质量浓度在 0.5 ~ 10 mg·L⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系 ($r=0.9999, n=3$)。

2.2.2 含量测定

PLGA 不溶于流动相,经过实验确定微球中药物的分离方法为:精确称取一定量微球,先用一定体积二氯甲烷彻底溶解且溶液呈澄清状,再用 7 倍体积甲醇使析出沉淀,混悬液在 6 000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min,取上清液用微孔滤膜过滤,取续滤液稀释进样 10 μL 测定药物质量浓度,含量测定图谱见图 1。

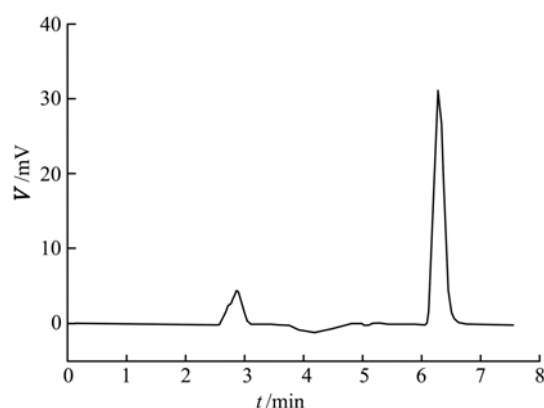


Fig. 1 HPLC chromatograph of dexamethasone acetate for drug content determination in PLGA microspheres

2.2.3 回收率试验

按处方比例模拟醋酸地塞米松 PLGA 微球,精密称定醋酸地塞米松对照品、空白微球,按含量测定方法测定。取 10 μL 注入液相色谱仪测定,记录色谱图,按标准曲线法计算含量,平均回收率为 101.8%, RSD = 1.2% ($n=6$)。

2.2.4 精密度试验

取醋酸地塞米松对照品,按含量测定方法测定,连续进样6次,记录峰面积,计算日内精密度 $RSD = 1.76\%$, 日间精密度 $RSD = 2.81\%$ ($n = 6$)。

2.3 体外释药方法学研究

将微球置于释放介质中^[5-6],在一定时间间隔内定量取样,通过过滤或离心方法使微球或载体颗粒与释放介质分离,进而测定释放介质中药物的质量浓度。体外释药方法的确立需要考虑以下几个方面:

药物稳定性。几周甚至几个月的长时间释放使得药物的稳定性成为一个首先需要考虑和监测的问题,为防止微生物对药物的降解,在释放介质中加入质量分数0.05%的 NaN_3 。

释放介质的选择。目前大部分体外释放介质采用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液。

微球分散性。微球在体内释放是以混悬液分散体系释放,微球的分散状态会影响药物的释放,因此一般在释放介质中加入质量分数0.01%的 Tween[®] 20 使微球分散于介质中。

2.3.1 药物稳定性考察

在释放过程中发现药物有降解现象,出现药物降解峰,因此考察了微生物、温度等对药物稳定性的影响。由于本释放过程每日取样,且更换全部介质,所以 pH 影响忽略。

2.3.1.1 微生物的影响

考察了醋酸地塞米松在加入质量分数0.05%的 NaN_3 与未加 NaN_3 的 pH 7.4 磷酸缓冲液中的稳定性,每天测定两种条件下药物的含量,发现二者无显著差异,因此可推定微生物降解不是醋酸地塞米松降解的主要原因。

2.3.1.2 温度的影响

考察了醋酸地塞米松在 pH 7.4 磷酸缓冲液(含质量分数0.05%的 NaN_3 和质量分数0.01%的 Tween[®]20)中温度对稳定性的影响。一组置于恒温37 的空气振荡器中,另一组室温(25)避光放置,每天测定两种条件下药物的含量。在不同条件下药物峰面积的变化如图2所示:原形药物在零时平均峰面积为82873($n = 3$),在常温(A)阴凉放置7d后峰面积降为67999($n = 3$),而37 (B)时7d后峰面积降为17881($n = 3$)。

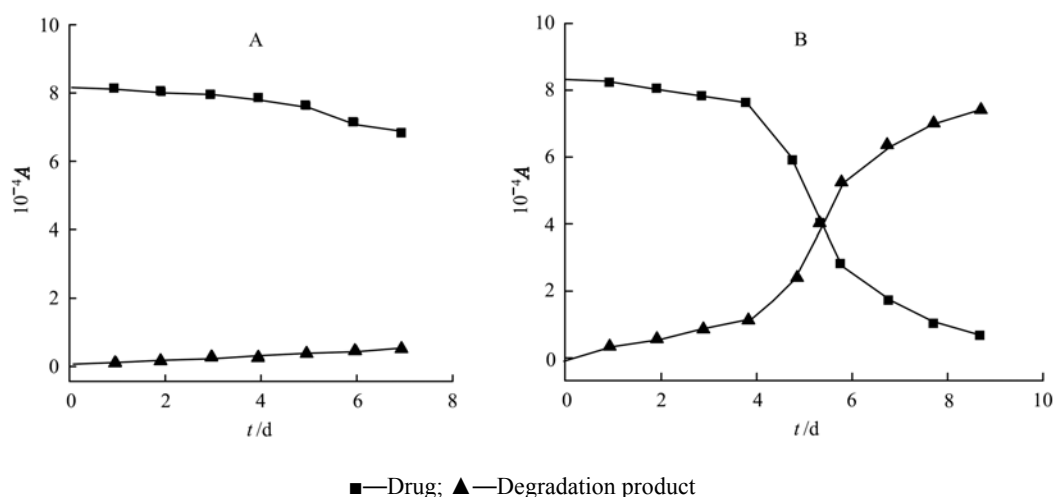


Fig. 2 Stability of dexamethasone acetate at room temperature (A) and 37 °C (B) in PBS buffer (pH 7.4)

图2结果表明,在两种条件下,药物在前4 d的降解速度较缓慢,但在第5天时降解速度突然加快。阴凉放置时,7 d后原形药物的峰面积降为0时的82.05%;降解产物峰面积随时间缓慢增加。而在释放条件下,7 d后原形药物峰面积为0时的21.58%,其原形药物峰面积呈现下降的S型曲线,而降解产物峰呈现上升的S型曲线。实验结果说明,温度是醋酸地塞米松降解的主要原因。

2.3.2 降解物峰面积与减少的原形药物峰面积之间的关系

在建立体外释放度测定方法时,如何准确测定微球中释放的药物总量是需要解决的问题。从图3可以看出,减少的原形药物峰面积与降解物峰面积之间有良好的线性关系,对减少的原形药物峰面积与降解物峰面积进行了线性回归,得出其关系式 $A_{\text{degradation}} = 0.9087(A_0 - A_t) - 9.9476 \times 10^2$ ($R^2 = 0.9974$),其中 A_0 和 A_t 分别为原形药物在0时和 t 时间的峰面积, $A_{\text{degradation}}$ 为药物降解产物的峰面积。因此可以通过所测的降解产物的峰面积计算降解的原型药物的峰面积,进而计算释放的总原形药物的峰面积,即 $A_{\text{total}} = (A_{\text{degradation}} + 994.76) / 0.9087 + A_t$ (A_{total} 为从微球中释放的总的原形药物峰面积)。

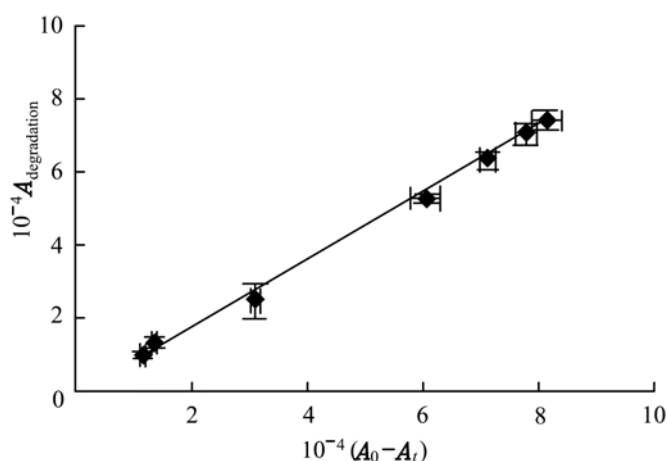


Fig. 3 Liner regression between reduction peak area of dexamethasone acetate and peak area of degradation product

2.3.3 体外释放度考察

醋酸地塞米松缓释微球 10 mg 混悬于 5 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 mL 中,置恒温 37 的空气振荡器中($125 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)。每日定时离心取样,测定上清液药物浓度,并更换全部介质。药物的真正释放量应该是药物未降解部分与降解部分之和,降解部分可以用曲线 $A_{\text{degradation}} = 0.9087(A_0 - A_t) - 9.9476 \times 10^2$ ($R^2 = 0.9974$)求出,所以每次释放实际药物量应为 $A_{\text{total}} = (A_{\text{degradation}} + 9.9476 \times 10^2) / 0.9087 + A_t$,然后将所得峰面积根据药物标准曲线计算药物含量。微球在第1天和第20天的释放图谱见图4,可见药物的降解峰在第20天比较显著。

3 结论

本实验中建立了高效液相-紫外检测微球中药物含量的方法,该方法回收率高、操作简便、可靠,方法重复性好。通过药物体外稳定性考察发现,药物在所选择的释放条件下降解较快,温度是药物降解的主要原因。本实验中所建立的降解药物和原形药物间的关系式能够较准确的测定药物体外释放度,补偿了由于药物降解所带来的测定误差,对于易降解药物的测定具有一定的借鉴意义。

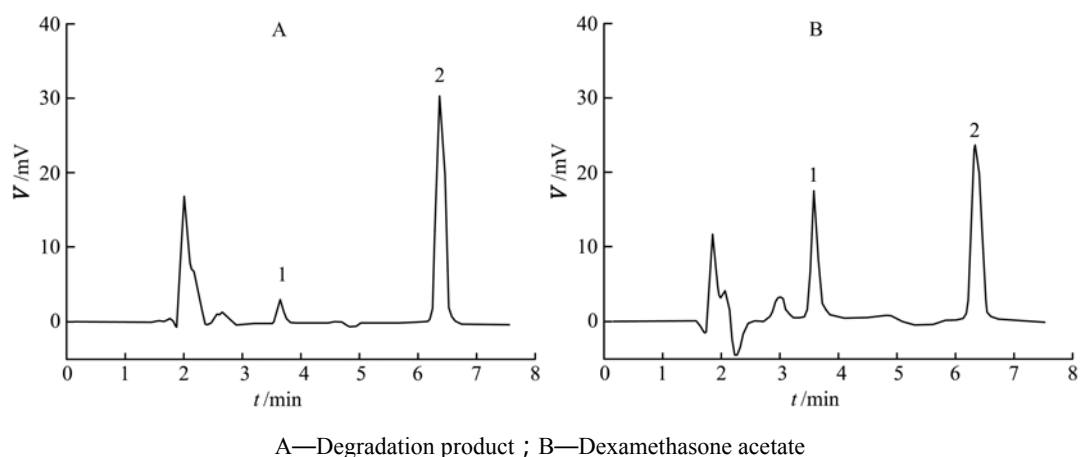


Fig. 4 HPLC chromatograph of released dexamethasone acetate from PLGA microspheres at day 1 (A) and day 20 (B)

参考文献:

- [1] 钱军民, 张兴, 吕飞, 等. 聚合物微球制备及在药物缓释/控释中的应用[J]. 精细石油化工进展, 2002, 3(2): 22-25.
- [2] 潘卫三, 张汝华, 周新腾. 局部麻醉药生物可降解缓释微球的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(9): 658-661.
- [3] 陆彬, 吴伟. 中心多点等距设计法优化醋酸地塞米松聚丙交酯微球的制备工艺[J]. 药学学报, 1999, 34(5): 87-391.
- [4] 吴伟, 陆彬. 一阶导数光谱法测定聚丙交酯微球中 5-氟尿嘧啶或醋酸地塞米松的含量[J]. 中国药师, 1999, 2(2): 57-59.
- [5] 毕殿洲, 李岩. 聚乳酸-聚乳酸乙醇酸共聚物微球的制备及体外释放影响因素研究进展[J]. 中国现代应用药学杂志, 2002, 19(4): 281-284.
- [6] 弈立标, 汤钥. 聚乳酸酮洛芬微球的制备及其体外释放度研究[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(2): 99-101.

Drug assay and *in vitro* release determination for dexamethasone acetate loaded PLGA microspheres

CAI Cui-fang, TANG Xing, ZOU Mei-juan, LI Ji-jun

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To establish methods of drug assay and *in vitro* release determination of dexamethasone acetate loaded PLGA microspheres. **Methods** HPLC-UV was adopted. Linear relationship between the area of dexamethasone acetate degradation product and the reduction in dexamethasone acetate area was established. **Results** The recovery of this method was $(101.8 \pm 1.2)\%$ ($n=6$). Linear regression equation between the degradation product and the reduction in drug area was $A_{\text{degradation}} = 0.9087(A_0 - A_t) - 9.9476 \times 10^2$, $R^2 = 0.9974$, the concentration of drug was calculated as $A_{\text{total}} = (A_{\text{degradation}} + 9.9476 \times 10^2) / 0.9087 + A_t$. **Conclusions** This is a promising method to determine the concentration of unstable drug during release process.

Key words: pharmaceuticals; microspheres; HPLC-UV; dexamethasone acetate; polylactic-co-glycolic acid (PLGA); content determination

(责任编辑 高明)