

文章编号(2006)06-0259-06

异烟肼肺靶向微球的制备及性质研究

刘淑平, 王东凯, 邱志斌, 孔俐文

(沈阳药科大学 药学院 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 筛选制备异烟肼微球的最佳处方及工艺,并初步研究其粒径、外观形态及体外释放等性质。方法 采用复乳化溶剂挥发法制备异烟肼聚乳酸微球,通过正交实验设计优化异烟肼聚乳酸微球制备工艺。用电子显微镜观察微球表面形态,对所制备微球的平均粒径、载药量、包封率、体外释放进行研究。结果 异烟肼微球的最佳处方为:异烟肼的质量浓度为 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLGA的质量浓度 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,内水相与油相的体积比为1:5,PVA的质量浓度为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。异烟肼微球的形态圆整,平均粒径为 $10.24\text{ }\mu\text{m}$,粒径在 $5\sim 15\text{ }\mu\text{m}$ 内的微球约占总数的85%,载药量为10.49%,包封率分别为61.56%。结论 筛选出了异烟肼微球较满意的制备工艺,有望达到肺靶向。

关键词:药剂学;微球;复乳溶剂挥发法;异烟肼;肺靶向

中图分类号: R94 **文献标识码:** A

异烟肼(isoniazid, IN)是临床治疗肺结核的一线药物,但是它对周围神经系统、中枢神经系统和肝肾等有一定的损害作用^[1]。为解决此问题,尝试将IN制成微球,通过控制微球的粒径使其静脉注射给药后浓集于肺部,在靶组织释放,以期提高IN在肺中的浓度,提高疗效并降低其毒性及不良反应。作者以乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体材料,采用超声W/O/W复乳溶剂挥发法制备IN微球,对制备微球的工艺进行了优化,并初步研究了其粒径、外观形态及体外释放等性质。

1 仪器与试剂

JY92- 超声波细胞粉碎机(上海新芝生物技术有限研究所), LC-10A型高效液相色谱仪、LC-10A泵和SPD-0A型紫外检器(日本岛津公司), ANASTAR 色谱工作站(天津奥特赛斯仪器有限公司), UV-9100型紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器有限公司), 扫描电子显微镜(日本岛津公司), 恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂), MZS小型实验均质机(无锡市永如轻化设备厂)。

异烟肼(IN, 浙江江北制药有限公司), 乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA, 山东医疗器械研究院), 聚乙烯醇(PVA, 相对分子质量为31 000~50 000, 北京化学试剂厂), 二氯甲烷(分析纯, 天津博迪化工有限公司), 乙腈(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 微球的制备

参考文献[2~4], 采用W/O/W溶剂挥发法制备微球。将一定量的IN溶解在0.2 mL水中, 再加

收稿日期: 2006-04-20

作者简介: 刘淑平(1979-), 女(汉族), 吉林蛟河人, 硕士研究生, Tel. 024-23986310, E-mail liushuping0228@163.com; 王东凯(1962-), 男(汉族), 辽宁沈阳人, 副教授, 主要从事药物新剂型新技术的研究, Tel. 024-23986310, Fax. 024-23904171, E-mail wangdksy@163.com。

入到 PLGA 的二氯甲烷溶液中,在超声波条件下乳化成白色乳状液,制得 W/O 乳剂,立即倒入 20 mL PVA 溶液中,用均质机分散均匀制得 W/O/W 乳剂。然后将此复乳倒入大量的相同浓度的 PVA 溶液中,磁力搅拌 4 h,使二氯甲烷完全挥发后,过滤,所得微球用蒸馏水洗涤 3 次,常温真空干燥 24 h,贮存备用。

为优化制备工艺,实验采用正交设计方法,根据之前所做的单因素实验结果,采用 4 因素 3 水平设计,以粒径 (d)、载药量 (w_1) 和包封率 (w_2) 为评价指标,对结果进行综合评分 $S=d+w_1+w_2$,结果见表 1、2。

Table 1 Levels and factors of orthogonal design

| Levels | Factors | | | |
|--------|--|--|---------------------------------|---|
| | A | B | C | D |
| | $\rho(\text{IN})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | $\rho(\text{PLGA})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | $V(\text{water}):V(\text{oil})$ | $\rho(\text{PVA})/(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ |
| 1 | 100 | 50 | 1 5 | 10 |
| 2 | 200 | 100 | 1 7.5 | 20 |
| 3 | 250 | 200 | 1 10 | 40 |

Table 2 The design and results of the orthogonal experiment

| No. | A | B | C | D | $d/\mu\text{m}$ | $w_1/\%$ | $w_2/\%$ | S |
|-------|--------|--------|--------|--------|-----------------|----------|----------|-------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 8.15 | 9.46 | 33.11 | 50.72 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 9.46 | 6.12 | 52.04 | 67.62 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 11.21 | 3.01 | 63.24 | 77.46 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 9.14 | 14.24 | 40.94 | 64.32 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 14.56 | 7.56 | 45.35 | 67.47 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 10.56 | 10.16 | 60.95 | 81.67 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 7.45 | 12.96 | 38.88 | 59.29 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 6.21 | 13.12 | 39.34 | 58.67 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 12.35 | 7.31 | 51.19 | 70.85 |
| k_1 | 65.267 | 58.110 | 64.217 | 63.013 | | | | |
| k_2 | 71.683 | 64.587 | 67.597 | 70.057 | | | | |
| k_3 | 62.937 | 77.190 | 68.073 | 66.817 | | | | |
| R | 8.746 | 19.080 | 3.856 | 7.044 | | | | |

极差 R 的大小反映了各因素对所测定指标的影响程度,从表 2 可以看出,各因素对 IN 微球质量的影响大小顺序为 $B>A>D>C$,故最优处方为: $A_2B_3C_3D_2$,即 IN 的质量浓度为 $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLGA 的质量浓度 $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,内水相与油相的体积比为 1 10, PVA 的质量浓度为 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按照最佳处方制备微球,测得平均粒径为 $8.56 \mu\text{m}$,载药量的质量分数为 7.82%,包封率的质量分数为 65.53%。与

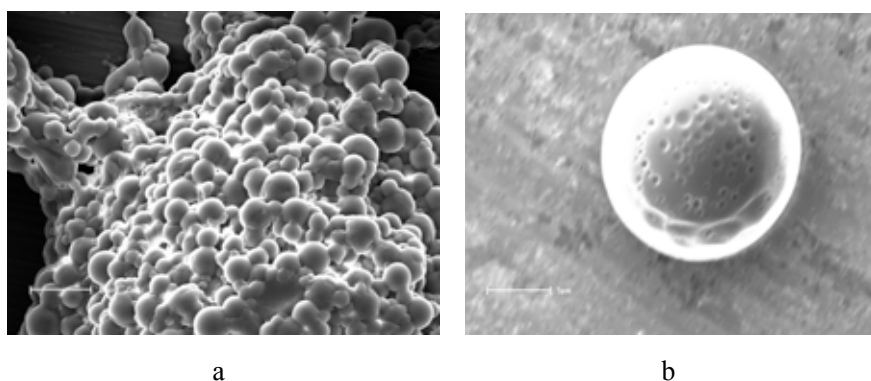
处方 6 相比, 最优处方制备的微球虽然包封率稍高, 但载药量较低, 不利于临床应用, 因此最后确定处方 6 为最优处方即 IN 的质量浓度为 $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, PLGA 的质量浓度 $200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 内水相与油相的体积比为 1 : 5, PVA 的质量浓度为 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 微球的形态、粒径大小及分布

用扫描电子显微镜和光学显微镜观察微球的外观形态, 采用显微计数法考察微球的粒径、粒度分布, 每批计数不少于 300 个。如果直径为 d_1, d_2, d_3, \dots 的粒子数分别为 n_1, n_2, n_3, \dots , 则按下式求算算术平均径 d_a 。

$$d_a = \frac{n_1 d_1 + n_2 d_2 + \dots + n_n d_n}{n_1 + n_2 + \dots + n_n} = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i}$$

在扫描电镜下可见形态呈圆球形, 粒径较均匀, 表面分布有许多小孔和凹陷(图1), 这些小孔和凹陷推测是水分从内水相向外水相中扩散和在干燥过程中内水相水分蒸发造成的。平均粒径为 $10.24 \mu\text{m}$ 。粒径在 $5 \sim 15 \mu\text{m}$ 的微球约占微球总数的85%以上。



a—Opulation of microspheres ($\times 1000$); b—Individual of a microsphere ($\times 6000$)

Fig.1 Scanning electron photomicrographs of IN-MS

2.3 微球的载药量及包封率的测定

2.3.1 标准曲线的制备

精密称取 IN 20.0 mg , 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度; 精密量取 1、2、3、4、5、6 mL 分别置于 50 mL 量瓶中, 加水定容至刻度, 配制成含 IN 4.0 、 8.0 、 12.0 、 16.0 、 20.0 、 $24.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液, 在 263 nm 处用紫外-可见分光光度法测定并记录吸光度值。以吸光度值为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 绘制标准曲线, 得回归方程 $A = 0.03\rho - 0.0084$, $r = 0.9997$, 表明 IN 质量浓度在 $4.0 \sim 24.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内与吸光度值有良好的线性关系。

2.3.2 微球中 IN 含量的测定

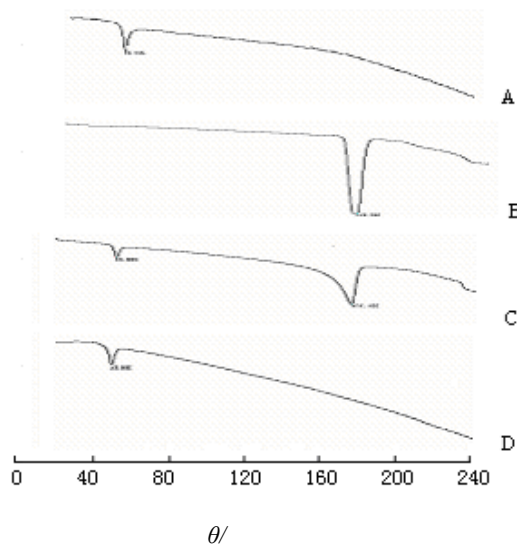
精密称取适量 IN 微球用二氯甲烷溶解, 加入水, 旋涡混合提取 3 次, 离心收集此溶液, 合并此溶液并定量稀释至适宜质量浓度, 以紫外分光光度法于 263 nm 处测定吸光度, 代入标准曲线, 计算溶液中的药物量。根据测得的一定质量微球中的药物量按照以下公式计算载药量 (drug loaded) 和包封率 (entrapment efficiency): 载药量 = 微球中药物量/微球总质量 $\times 100\%$; 包封率 = 微球载药

量/理论载药量 $\times 100\%$ 。

2.4 差示扫描量热法 (DSC 法)

取 IN 原料、空白微球、IN 和空白微球的物理混合物、IN 微球适量, 在加热速率为 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, 加热范围为 $30\sim 250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下, 分别测得 DSC 曲线, 以确定微球中药物的分散状态。

由 DSC 曲线可见, IN 微球的结晶峰消失, 故 IN 可能以无定形存在于微球中。



A—IN; B—Blank microspheres; C—The mixture of IN and blank microspheres; D—IN microspheres

Fig.2 DSC thermotograms of IN and IN microspheres

2.5 微球的体外释放实验

参考文献[5]方法, 精密称取 IN 微球约 30 mg , 装入预先处理好的透析袋中, 加入 3 mL pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液, 两端扎紧, 置入转篮中, 以 pH 值为 7.4 磷酸盐缓冲溶液 100 mL 为释放介质, 在 $(37\pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下进行体外释药试验。第 1 天于 $0.5、1、2、4、8、12\text{ h}$ 取样, 补加等量释放介质, 之后每 24 h 取样测定 1 次。每次取样完全倾出透析袋外的释放介质, 并准确补加等量新鲜释放介质。采用 HPLC 法测定释放介质中 IN 的质量浓度, 计算累积释药百分数。

按照优化处方工艺制备的 IN 微球的体外释放性能, 结果见图 3。在 15 min 内释放量达 18.56% , 9 d 微球累积释药百分率为 82.16% 。其释药动力学方程为 $Q=4.5958t^{1/2}+11.767$ ($r=0.9901$)。

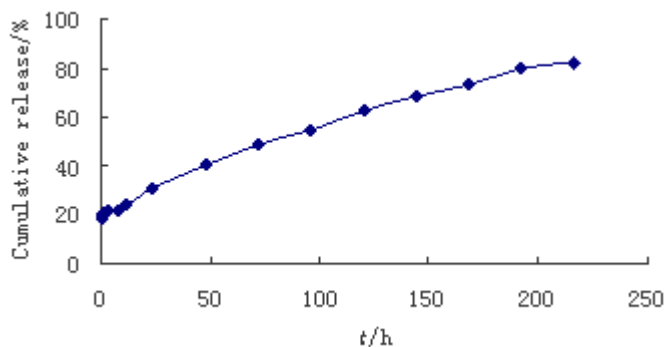


Fig.3 The drug release from IN-MS *in vitro*

3 讨论

a. 文献[6]报导,以由异烟肼饱和的质量分数为0.1%吐温-80、0.9%氯化钠及0.05%枸橼酸所组成的水溶液为水相,采用乳化溶剂挥发法制备得到了包封率及载药量较高的异烟肼微球,但缓释时间较短,粒径分布较宽。以PLGA为包裹材料用复乳化溶剂挥发法是制备水溶性药物微球的较好方法^[7]。作者尝试用此方法进行了IN微球的制备研究,在预试验的基础上,通过L(3⁴)正交设计实验,考察了对微球质量影响较大的4个因素。结果表明,影响微球质量的因素顺序为PLGA的质量浓度、IN的质量浓度、PVA的质量浓度和内水相与油相的比例,按照实际需要,对优化处方工艺加以修正,得到了载药量高、包封率较高且粒度分布较窄的微球。

b. 实验证明,制备出的IN微球载药量较高,在体外释放实验中突释量较大,以后释放较稳定,9 d 微球累积释药百分率达82.16%,具有明显的缓释效果。开始突释主要是由于药物从聚合物基质孔道扩散释放的,以后释放较平稳,主要是通过聚合物的降解来实现的。

c. 作为肺靶向药物,关键是控制微球的大小,将其静脉注射后,可机械截留于肺部,提高肺部药物浓度,文献[8]报道粒径在7~12 μm内的微球有良好的肺部靶向性,本实验制备的粒度在5~15 μm 内的微球约占微球总数的85%,有望达到肺靶向。

参考文献:

- [1] 刘国卿. 药理学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000, 406-407.
- [2] Yang Fan, Pan Yu-fang, Deng Zhao-zhi, *et al.* Preparation of OANO-1 polylactic acid microspheres[J]. Chin JMA P (中国现代应用药学杂志), 2005, 22(6): 214-217.
- [3] Chen Shan, Li Ping, Tao Sheng-yuan, *et al.* Preparation and characteristics of anti-SARS-CoV immunoglobulin poly(lactide-co-glycolide acid) microspheres[J]. China Pharm J (中国药学杂志), 2005, 40(14): 2117-2119.
- [4] Cui Fu-de, Cun Dong-mei, Tao An-jin, *et al.* Preparation and characterization of melittin-loaded poly (*dl*-lactic acid) or poly (*dl*-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method[J]. Journal of Controlled Release, 2005, 107(2): 310-319.
- [5] Cheng Guo-hua, Luo Jia-bo. Study on pharmacokinetics of lung targeted tetrandrine polylactic acid microspheres in rabbits[J]. China Pharmacy (中国药房), 2005, 16(10): 736-738.
- [6] Kong Xiao-long. Preparation of isoniazid microspheres for lung targeting and distribution in mice[J]. China Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 1999, 19(9): 515-516.
- [7] Zhang Jian-jun, Gao Yuan, Ping Qi-neng. Study on dynamic process and related physical characteristics of PLGA microsphere prepared by double-emulsification method[J]. China Pharm J(中国药学杂志), 2005, 40(6): 441-444.
- [8] Yang Fan, Lin Yin, Tan Zai-you, *et al.* Study on the erythromycin polyactic acid microsphere for lung targeting [J]. Journal of China Pharmaceutical University(中国药科大学学报), 2002, 33(3): 211-215.

Preparation and characterization of isoniazid microspheres for lung targeting

LIU Shu-ping, WANG Dong-kai¹, QIU Zhi-bin¹, KONG Li-wen

(1.School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, shenyang, 110016, China)

Abstract : Objective To screen the formulation and preparation conditions of isoniazid microspheres and study the particle size, surface morphology and the release characteristic *in vitro*. **Methods** Isoniazid microspheres were made by double emulsion solvent evaporation technique. The orthogonal test design was used to optimize conditions of preparation. The surface morphology of the microspheres was observed by SEM. The mean diameter and the size distribution of the microspheres, the drug loading, the entrapment efficiency and the release characteristics *in vitro* were examined. **Results** The isoniazid microspheres were regular in their morphology. The average particle size was 10.24 μm with about 85% of the microspheres being in the range of 5-15 μm . The drug loading and the entrapment efficiency were 10.49% and 61.56%, respectively. **Conclusions** The optimized preparation conditions of isoniazid microspheres is obtained. There is hope to make the microsphere targeting at lung.

Key words: pharmaceutics; microspheres; double emulsion solvent evaporation technique; isoniazid; lung targeting

(本篇责任编辑: 赵桂芝)