

文章编号: (2006)04-0136-05

复乳化-溶剂挥发法制备小肽类药物的乳酸-羟基乙酸共聚物微球

姬雅菊, 唐 星, 徐 晖, 肖若兰, 尚德为, 张海斯

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 以小肽类药物(ALPA)为模型药,制备其乳酸-羟基乙酸共聚物(poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA)微球,考察处方因素对微球粒径和包封率的影响。方法 采用 W/O/W 复乳化-溶剂挥发法制备微球。用光学显微镜观察微球的形态、测定平均粒径,HPLC法测定药物包封率。结果 braintide-PLGA微球的平均粒径在 20~30 μm 之间。降低油相 PLGA 的质量浓度或增加外水相 PVA 和 NaCl 的质量浓度,微球的平均粒径减小。增加内水相中 BSA 的质量浓度、油相 PLGA 的质量浓度及外水相中 PVA 和 NaCl 的质量浓度均可使药物的包封率升高。结论 采用 W/O/W 乳化-溶剂挥发法可制备出粒径适宜,包封率较高的 braintide-PLGA 微球。

关键词: 药剂学;微球;肽类药物;乳酸-羟基乙酸共聚物;包封率

中图分类号: R94

文献标识码: A

生物可降解微球可以注射至皮下或肌肉持续释放药物,发挥疗效;同时,它可在体内环境下降解为乳酸等内源性物质排出体外,而无需手术给药和取出,从而减少了给药次数,更易于患者所接受。聚乳酸(poly-lactic acid, PLA)、乳酸-羟基乙酸共聚物(poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA)为制备生物可降解微球的常用材料,已通过 FDA 批准可用于注射给药植入系统。

作者选择小分子肽类药物(braintide)为模型药制备 PLGA 微球。braintide 是一种四肽类药物,可通过促进内源性生长因子的合成,增强和巩固大脑记忆神经通路、增加释放神经递质乙酰胆碱,达到治疗记忆障碍疾病的作用。braintide 的体内半衰期较短、稳定性较差,目前已经研制开发了普通注射液和喷鼻剂,但都需频繁给药,这对老年性痴呆症患者来说非常不便。作者采用 W/O/W 乳化-溶剂挥发法制备 braintide-PLGA 微球,并考察处方因素对微球粒径及包封率的影响。

1 仪器与材料

KYC-100C 空气恒温摇床(上海福玛实验设备有限公司),80-1 离心机(上海手术仪器厂),AR-1530 电子天平(美国 Ohaus, NJ 公司),SCQ-50 超声波清洗机(上海申波超声公司),DMBA450 生物数码显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司),SJ20A 型 Magic Mixer(海门其林医用仪器厂),JJ-1 型电动搅拌器(常州国华电器有限公司),高效液相色谱仪(日本日立公司)。

模型药物(braintide)及对照品(上海中科英泰生物技术有限公司),乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA, 5050DL2A, 美国 Alkermes 公司),牛血清白蛋白(BSA, 美国 Amresco 公司),聚乙烯醇(PVA-1788, 美国 Acros Organics 公司),其他所用试剂均为分析纯。

收稿日期: 2006-01-09

作者简介: 姬雅菊(1981-),女(汉族),天津人,硕士研究生, E-mail jyj_0510@yahoo.com.cn; 徐晖(1972-),男(汉族),辽宁法库人,博士,副教授,主要从事缓释制剂和药用功能聚合物的研究, Tel. 024-23986356, E-mail xuhui@mail@21cn.com。

2 方法

2.1 含量测定方法

采用高效液相色谱法测定 braintide 的含量。色谱柱为十八烷基键合硅胶柱(Diamonsil™ C₁₈ 柱, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为水-乙腈-三氟乙酸(体积比为 90.0 10.0 0.1), 检测波长为 214 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温为室温, 进样量 20 μL。

2.2 溶解度的测定

分别取二氯甲烷(DCM)、乙酸乙酯(EA)和二氯甲烷-乙酸乙酯混合溶剂(体积比为 3 2)各 1 mL 于 2 mL 安瓿中,加入过量的 braintide, 熔封,置空气浴恒温摇床中恒温(25 ℃), 55 r·min⁻¹, 振荡 24 h, 取出后置 1.5 mL 塑料离心管中, 2000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 精密移取上清液 0.5 mL, 置尖嘴试管中, 挥干有机溶剂, 精密加入 100 μL 重蒸馏水复溶, 用 HPLC 测定药物的质量浓度, 计算溶解度。

2.3 分配系数的测定

分别精密移取 9 mL 用水饱和的 DCM、EA 及 DCM-EA (体积比为 3 2) 于 10 mL 具塞试管中, 分别精密加入 1 mL 1mg·L⁻¹ 的 braintide 水溶液[分别用 DCM、EA 及 DCM-EA (体积比为 3 2) 饱和处理], 密封, 置空气浴恒温摇床中, 25 ℃ 恒温振荡 30 min, 以 2000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 分离水相, 用 HPLC 测定药物的质量浓度, 计算油水分配系数 (*P*)。

2.4 微球的制备

用 W/O/W 乳化-溶剂挥发法制备 braintide-PLGA 微球, 处方组成见表 1。

Table1 Preparation parameters, average size and entrapment efficiency of microspheres

No.	$\rho / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$				$\bar{d} \pm \text{SD} / \mu\text{m}$	Entrapment efficiency / %
	BSA in W ₁	PLGA in O	PVA in W ₂	NaCl in W ₂		
A-01	0	167	0.005	0.01	23.21±6.81	81.8
A-02	0.005	167	0.005	0.01	23.27±6.37	93.9
A-03	0.010	167	0.005	0.01	23.21±7.41	93.5
B-01	0.005	80	0.005	0.01	19.19±5.61	74.5
B-02	0.005	167	0.005	0.01	23.27±6.37	93.9
B-03	0.005	333	0.005	0.01	29.17±7.56	94.0
C-01	0.005	167	0.001	0.01	24.57±7.61	79.1
C-02	0.005	167	0.005	0.01	23.27±6.37	93.9
C-03	0.005	167	0.010	0.01	21.96±7.87	98.3
D-01	0.005	167	0.005	0	25.90±7.56	88.8
D-02	0.005	167	0.005	0.01	23.27±6.37	93.9
D-03	0.005	167	0.005	0.02	24.50±7.20	91.0

以 100 g·L⁻¹braintide 醋酸溶液 (pH 5, 内含不同质量浓度的 BSA) 为内水相 (W₁), PLGA 的 DCM-EA (体积比为 3 2) 为油相 (O), 内水相与油相的体积比为 1 15。超声乳化形成稳定的

W₁/O 初乳, 将初乳加入含 PVA (和 NaCl) 的外水相 (W₂) 中, 初乳与外水相的体积比为 1 : 100, 机械分散形成复乳。缓慢机械搅拌下挥干有机溶剂。过滤收集微球, 水洗, 减压干燥。取少量干燥微球置载玻片上, 用显微镜观察微球形态, 测定粒径。

2.5 包封率的测定

收集全部外水相溶液至容量瓶中, 用蒸馏水定容。过滤, 取续滤液, 用 HPLC 法分别测定 braintide 质量浓度, 根据公式 $E = (m_t - m_w) / m_t$ 计算包封率, 其中: E 为包封率, m_t 为最初加入的药物总质量, m_w 为外水相中药物的质量。

3 结果与讨论

3.1 溶解度和分配系数

W/O/W 复乳化-溶剂挥发法是制备水溶性药物 PLGA 微球的经典方法, 微球形成的过程中, 生物可降解材料的有机溶剂可作为内、外水相间的疏水性屏蔽, 避免或减少药物因扩散而泄漏至外水相, 使包封率降低。为了获得理想的包封率, 选择一种适宜的溶剂保证药物在油相溶液中的溶解度很小是十分必要的^[1,2]。DCM、EA 均为制备 PLGA 微球的常用溶剂, braintide 在 DCM、EA 和 DCM-EA 中的表观溶解度, 及其在上述有机溶剂中的分配系数, 见表 2。braintide 在 DCM、EA 和 DCM-EA 中的表观溶解度均较小, 分配系数较低, 有利于药物的包封。

Table 2 Apparent solubility and partition coefficients(P) of braintide (25)

Solvent	ρ (apparent solubility) / (mg·L ⁻¹)	$P(\times 10^2)$
DCM	1.04	2.79
EA	5.31	1.15
DCM:EA /3:2	2.21	0.78

3.2 处方因素对微球粒径及包封率的影响

braintide 在 pH 值为 4.0 ~ 6.5 的水溶液中相对稳定, 实验以醋酸调节内水相的 pH 值为 5.0, 分别考察了内水相中 BSA 质量浓度、PLGA 质量浓度、外水相中 PVA 的质量浓度及外水相中 NaCl 质量浓度对微球粒径及包封率的影响, 结果见表 1, 微球的形态及粒径分布如图 1。

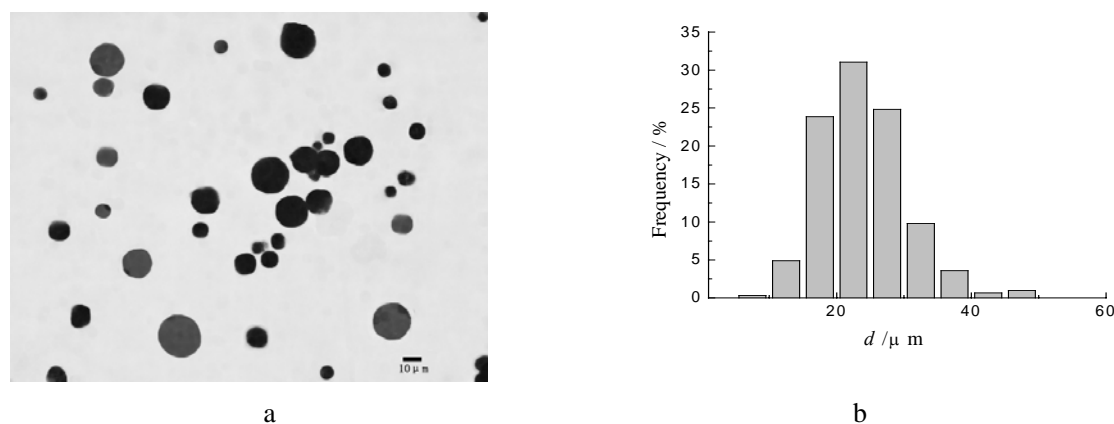


Fig.1 The typical photomicrograph ($\times 400$) (a) and the size distribution of the braintide-PLGA microspheres

(b).

实验制备的 braintide-PLGA 微球圆整、表面光滑,平均粒径在 20~30 μm 之间,基本呈正态分布。实验结果表明,增加内水相中 BSA 的质量浓度,微球的平均粒径无明显变化,但 braintide 的包封率明显增加,从 81.8% 增加到 93.9%。但 BSA 质量浓度由 0.005 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 0.01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,包封率无明显变化。这是因为水溶性药物在微球的制备过程中将自发的由内水相扩散至外水相,包封率多较低。在内水相中添加一定量的 BSA 等大分子物质,可以增加内水相的黏度,降低药物向外水相的扩散速率,从而提高包封率。但当 BSA 的质量浓度升高到一定程度时,在增加 BSA 的质量浓度,内水相的黏度几乎不变,因而包封率亦无明显变化。

疏水性的 PLGA 有机溶液可以在内、外水相间形成疏水性屏蔽层,从而防止或减缓药物扩散进入外水相。增加 PLGA 的质量浓度,油相的粘度增大,在一定的机械力分散作用下,形成的乳滴变大,疏水性屏蔽变厚,药物扩散进入外水相的阻力加大,最终微球的粒径变大,包封率升高。另一方面,PLGA 的质量浓度增加,聚合物更易于沉积,微球的固化更迅速,药物的包封率升高^[3,4]。

PVA 为高分子表面活性剂,它的加入可以增加连续相的粘度,在一定的机械力作用下,实际作用在油相上的剪切力变大,易形成较小的乳滴。同时,PVA 具有一定的表面活性,可以增加油相与外水相的润湿性,降低乳滴的表面自由能,这类表面活性剂可以在形成的液滴表面形成一层保护膜,防止已形成的小液滴聚结成大大液滴,从而有利于形成稳定、细小、均匀的液滴。因此,随着 PVA 的质量浓度增加,微球的粒径减小。另外,由于 PVA 可以提高 W/O/W 型复乳的稳定性,因而有利于成球率增加和包封率提高^[5]。

向外水相中加入质量浓度为 0~0.02 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl,可以增加外水相的渗透压,从而阻止内水相中的药物扩散进入外水相,包封率升高(88.8%~93.9%)。但过多的 NaCl 将导致 PVA 在水中的溶解性变差,降低其稳定 W/O/W 型复乳的作用,使微球的平均粒径变大,出现破裂或不圆整的现象,药物的包封率也有所下降。

研究表明,内水相的组成、PLGA 的浓度及外水相中表面活性剂和盐的质量浓度均对 braintide 微球的形态、粒径和包封率有所影响。采用内水相中加入质量浓度为 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BSA,PLGA 的质量浓度为 167 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,外水相为含质量浓度为 0.01 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 0.005 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PVA 水溶液,可以制得形态圆整的,平均粒径为 (23.27 \pm 6.37) μm ,包封率为 93.9% 的 braintide-PLGA 微球。

参考文献:

- [1] Herrmann J, Bodmerier R. Somatostatin containing biodegradable microspheres prepared by a modified solvent evaporation method based on W/O/W-multiple emulsions [J]. Int J Pharm, 1995, 126: 129-138.
- [2] Bodmeier R, McGinity J W. Polylactic acid microspheres containing quinidine base and quinidine surfate prepared by the solvent evaporation technique. . Some process parameters influencing the preparation and properties of microspheres[J]. J Microencaps, 1987, 4: 289-297.
- [3] Badri Viswanathan N, Thomas P A, Pandit J K, *et al.* Preparation of non-porous microspheres with high entrapment efficiency of proteins by a (water-in-oil)in-oil emulsi-on technique [J]. J Control Release, 1999, 58: 9-20

- [4] Okada H. One-and three-month release injectable microspheres of LH-RH superagonist leuprorelin acetate [J]. *Adv Drug Delivery Rev* 1997, 28: 43–70
- [5] Jeffery H, Davis S S, O'Hagan D T. The preparation and characterization of poly(lactide-*co*-glycolide) microparticles: . The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in water emulsion solvent evaporation technique[J]. *Pharm Res*, 1993, 10: 362–368.

Preparation of PLGA microspheres containing small peptide as model drug by double emulsion-solvent evaporation method

JI Ya-ju, TANG Xing, XU Hui, XIAO Ruo-lan, SHANG De-wei, ZHANG Hai-si

(*School of Pharmacy, Shenyang pharmaceutical University, Shenyang, 110016*)

Abstract: Objective To prepare polylactic-*co*-glycolic acid (PLGA) microspheres containing small peptide (braintide) as model drug, and investigate the effect of formulation variables on the size and entrapment efficiency of the microspheres. **Method** The braintide-PLGA microspheres were prepared by W/O/W double emulsion-solvent evaporation method. The morphology and size distribution of the microspheres were observed by the optical microscope, and the entrapment efficiency was determined by HPLC. **Results** The average diameter of braintide-PLGA microspheres obtained was from 20 μm to 30 μm . The size of microspheres decreased with increasing PVA concentration and NaCl concentration in the external aqueous phase or decreasing PLGA concentration in the oil phase. The entrapment efficiency of microspheres increased with the increasing of the concentrations of BSA, PLGA, PVA and NaCl. **Conclusions** The braintide-PLGA microspheres can be prepared by double emulsion-solvent evaporation method with suitable particle size and high entrapment efficiency.

Key words: pharmaceuticals; microspheres; peptide; PLGA; entrapment efficiency

(责任编辑 吕向一)