

左炔诺孕酮-聚 3-羟基丁酸酯缓释微球的研究

王正容*, 陆彬**, 杨红

(华西医科大学药学院, 成都 610041)

摘要 目的: 优化制备工艺, 用可生物降解的成球材料制备缓释并有优良抗生育效果的左炔诺孕酮-聚 3-羟基丁酸酯微球。方法: 以均匀设计优化微球的液中干燥法制备工艺, 用 DTA 确证含药微球的形成, 对微球的外观、粒径、载药量、体外释药、稳定性及小鼠体内抗生育等进行了研究。结果: 微球平均粒径为 $64 \mu\text{m}$, ($28.7 \sim 85.8$) μm 的微球占总数 90% 以上, 微球中氯仿残留量低于 0.001%, 体外释药符合 Higuchi 方程, 释药 $T_{1/2}$ 比原药延长约 1.8 倍, 4, 25 及 40°C (RH 75%) 放置 3 个月稳定。对小鼠具有抗生育效果。结论: 微球的制备工艺满意, 与原药相比, 微球对小鼠有明显的缓释、延长抗生育时间和降低毒性的作用。

关键词 左炔诺孕酮-聚 3-羟基丁酸酯; 缓释给药系统; 微球; 抗生育

随着缓释给药系统研究的深入发展, 可生物降解新材料不断出现, 给缓释微球作为控制药物释放载体的研究开辟了更广阔的前景。聚 3-羟基丁酸酯 [poly(3-hydroxybutyrate), PHB] 是生物降解材料, 广泛存在于微生物细胞中, 是作为其营养和能量贮存物质参与细胞代谢的天然产物, 对人体无毒, 可为人体吸收, 且与人体血液和组织相容, 其降解产物均属人体的天然成分。与目前已有的其它可生物降解材料(乳酸、乙交酯共聚物、蛋白质等)相比, 它有易纯化、无残留催化剂等优点^[1], 国外用于整形外科手术的缝合线^[2]与前体药物 PHB 微球^[3], 作避孕药缓释微球的载体材料国内外未见报道。

实 验 部 分

1 仪器、药品与动物

UV-2201 型紫外分光光度计(日本岛津); Olympus 型光学显微镜及显微摄影仪(日本); 1000-B 型扫描电子显微镜(美国); SHZ-82 型水浴恒温振荡器($70 \pm 2 \text{ min}^{-1}$, 江苏太仓); PHB(平均相对分子质量 2.3×10^5 , 不溶于水, 可溶于 CHCl_3 和 CH_2Cl_2 等有机溶剂), 由中科院成都生物所馈赠; PVA 15 000 [醇解度(86~89)%, Fluka Chemic AG]; 左炔诺孕酮(LNG, 北京第三制药厂产品, 批号 891003); LNG-PHB 微球混悬注射液(LNG-PHB-MS, 自制,

除防腐剂、助悬剂、等渗调节剂外, 内含 LNG $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, 无溶血现象与刺激性); PHB 微球混悬注射液(PHB-MS, 自制, 不含 LNG, 无溶血现象与刺激性); 日本大耳白兔及昆明种小鼠均由华西医科大学实验动物中心提供。

2 左炔诺孕酮缓释微球的制备工艺

用液中干燥法(亦称溶剂挥发法), 即从乳状液中除去分散相的挥发性溶剂以制备微球的方法^[4]。以 PHB 为材料, 制备左炔诺孕酮-PHB 微球(LNG-PHB-MS)。用均匀设计考察影响成球的 4 个因素, 进行 4 因素、10 水平试验, 按 $U_{10}(11^{10})$ 表安排实验, 综合考虑收率、载药量、包封率 3 个指标。结果得最佳制备工艺条件为: 乳化剂 PVA 浓度 4%, 乳化时间 4 min, PHB/LNG 为 4/1, 有机相 CHCl_3 中 PHB 浓度为 $3.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

称取适量 PHB 和 LNG, 溶于 CHCl_3 , 在(50~55)°C 电磁搅拌 30 min, 然后以一定速率注入至 PVA 水溶液的液面下, 高速搅拌 4 min, 形成 O/W 型乳状液后倾入定量水进行萃取, 慢速搅拌固化 2 h, 除去 CHCl_3 , 微球沉降, 倾去上清液, 过滤。微球用水洗去 PVA, 40°C 烘干称重即得。制得的 4 批, 微球收率为 $(91.25 \pm 1.50)\%$, 载药量 $(18.82 \pm 0.30)\%$, 包封率 $(85.86 \pm 0.64)\%$, 说明工艺的重现性好。

3 LNG-PHB-MS 微粉学性质考察

外观为白色或类白色粉末状微球, 在扫描电镜下可看到有许多微孔, 见图 1。用气相色谱测定微球中 CHCl_3 的残留量^[5], 4 批结果均低于 0.001%。在光镜下用测微尺测定 4 批微球(每批 500 个), 平均粒径为 $64 \mu\text{m}$, 其粒径分布为(用微球总数的百分

收稿日期: 1998-02-26

基金项目: 国家计划生育委员会资助项目

* 1997 届硕士研究生

** 联系人 Tel: (028)5501392(O)或(028)5502664(H), Fax: (028)5583252 转药学院 陆彬, E-mail: xcyang@pridns.wcums.edu.cn

率表示): $< 14.3 \mu\text{m}$ 占 0%, $14.3 \sim 28.6 \mu\text{m}$ 占 6.8%, $28.7 \sim 42.9 \mu\text{m}$ 占 10.6%, $43.0 \sim 85.8 \mu\text{m}$ 占 80.4%, $85.9 \sim 100 \mu\text{m}$ 占 1.8%, $> 100 \mu\text{m}$ 占

0.24%。休止角为 23.5° , 流动性好; 堆密度为 $0.612 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, 不易润湿, 为疏水性微球; 当相对湿度为 84.3% 时吸湿性明显增加。

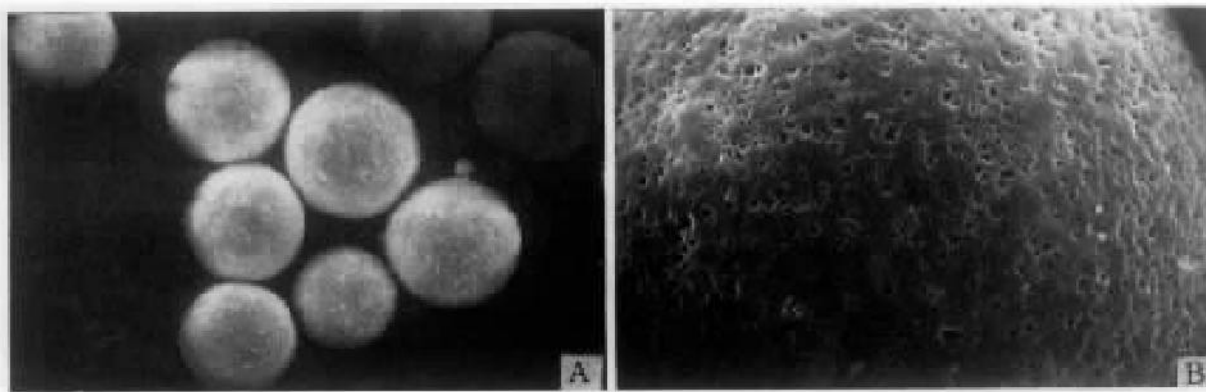


Fig 1 Scanning electron photomicrograph of LNG-PHB-MS. A. $\times 400$; B. $\times 2\ 000$.

4 LNG-PHB-MS 释放速率的测定

考虑到 LNG 几乎不溶于水的性质, 采用含 10% 乙醇、pH 7.4 的磷酸盐缓冲液作释放介质。将原药 (LNG) 和 LNG-PHB-MS 分别置透析袋中, 37°C 恒温水浴水平振荡仪振荡, 定时取样时更换全部释放介质。释放液于 λ_{max} 248 nm 测定吸光度。空球在此波长无吸收、不干扰测定, 见图 2。按标准曲线方程 $A = 0.05543C + 0.0013$ ($\gamma = 0.9999$, $C = \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, $n = 3$), 分别计算原药与 LNG-PHB-MS 的释药量, 见表 1。两者均以 Higuchi 方程的回归系数最大, 即其释放规律均符合 Higuchi 方程:

LNG-PHB-MS $Q = 0.1104T^{1/2} - 0.08600$ $\gamma = 0.994$

原药 $Q = 0.1389T^{1/2} + 0.05367$ $\gamma = 0.974$

释药 $T_{1/2}$ 前者为 28.15 d, 后者为 10.33 d, 即 LNG-PHB-MS 的释放 $T_{1/2}$ 比原药延长 1.8 倍。

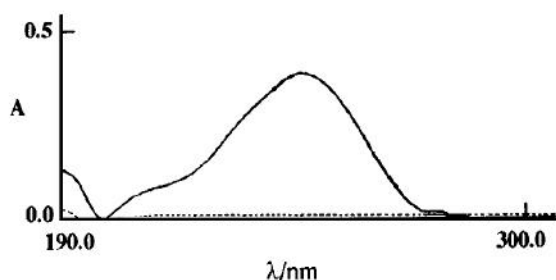


Fig 2 Absorption spectra of LNG (—) and vacant PHB-MS (---) in phosphate buffer-10% ethanol.

5 LNG-PHB-MS 形成的验证

工作条件: 扫描温度为室温 $\sim 500^\circ\text{C}$, 量程 $5 \mu\text{V}$, 升温速率 $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, 纸速 $100 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$, $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 为参比物, 空气为气氛。分别测得 LNG, PHB-MS, LNG-PHB-MS, LNG + PHB-MS (LNG 与 PHB-MS 的 1:1 物理混合物) 的差示热分析

Tab 1 Data of drug release *in vitro* of LNG-PHB-MS and LNG

T / d	Quantity of drug release / %	
	LNG-PHB-MS	LNG
2	9.1	14.5
4	14.4	25.3
6	18.0	36.8
8		47.6
10	23.8	55.1
12		61.6
14	28.4	
16		69.1
20	34.3	
22		75.5
28	52.7	
30		83.1
34	59.6	
36		91.4
40	64.0	
42		94.8
46	70.2	
48		98.8
54	75.4	
57		100.1
62	78.6	
68	84.2	
76	87.7	
85	90.0	
95	95.3	

(differential thermal analysis) 曲线, 见图 3。从曲线图可看出, LNG 在 238.4°C 有特征吸热峰, PHB-MS 在 180.2°C 和 317.9°C 有 2 个特征吸热峰, LNG + PHB-MS 在 180.2°C , 238.4°C 和 317.9°C 有 3 个特征吸热峰, 即分别有 LNG 与 PHB-MS 特征吸热峰, 而 LNG-PHB-MS 在 179.7°C , 312.3°C 只有 PHB-MS 的 2 个特征吸热峰, 而无 LNG 在 238.4°C 的特征吸热峰, 说明不是物理机械混合物, LNG 已被包入 PHB-MS 内。

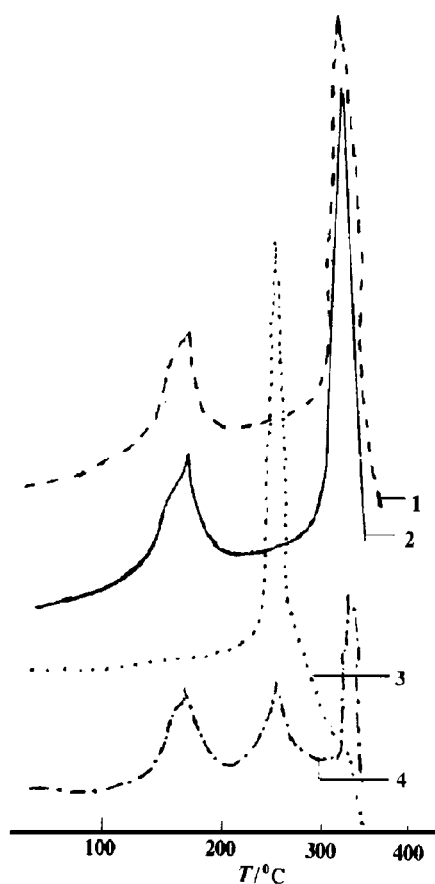


Fig 3 Differential thermal analysis curves. 1. PHB-MS; 2. LNG-PHB-MS; 3. LNG; 4. LNG + PHB-MS (1:1 physical mixture).

6 LNG-PHB-MS 稳定性考查

将 LNG-PHB-MS 密封于西林瓶中, 分别在 4, 25, 40°C /RH 75% 放置 3 个月, 其外观形态与粒径无明显变化, 微球中药物含量也无明显变化 (4°C 变为标示量的 104.5%, 25°C 为 99.0%, 40°C RH 75% 为 102.8%)。以含 10% 乙醇的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液为释放介质, 测得体外累积释放曲线见图 4。可见放置前后变化不大, 且释药规律仍符合 Higuchi 方程。

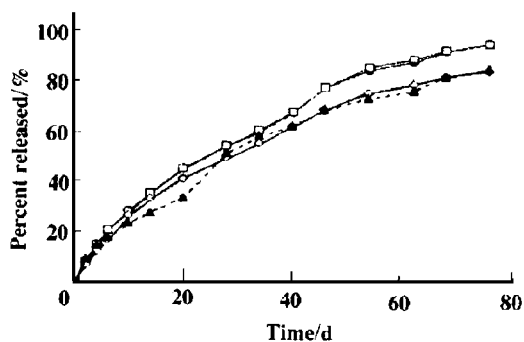


Fig 4 Drug release curves of LNG-PHB-MS in pH 7.4 phosphate buffer with 10% ethanol before and after storage for three months. \triangle - \triangle Before storage; \diamond - \diamond 4°C; \square - \square 25°C; \bullet - \bullet 40°C, RH 75%.

7 LNG-PHB-MS 混悬注射剂的小鼠抗生育试验

取体重 28~32 g 的健康 ♀ ♂ 鼠若干, 观察饲养 1 周, 剔除病鼠与孕鼠后, 将 ♀ 鼠随机分为 11 组^[6], 原药每组 10 只, 微球每组 20 只, 按不同剂量共分 8 组, 另 3 组作对照组, 每组 10 只, 分别为空白 PHB-MS、空白混悬介质、生理盐水。每组 im 给药 3 d 后, ♀ ♂ 合笼, 每笼 3 只 (♀ 2, ♂ 1)。从合笼第 2 天起, 每天检查阴栓 (用阴栓检出率和检出日期衡量小鼠的交配能力) 并作记录, 观察至小鼠产仔鼠为止, 记录产仔鼠日期和仔鼠情况, 并解剖 ♀ 鼠观察脏器及子宫有无病变。以试样组与对照组相差的生育时间为抗生育时间, 小鼠的抗生育结果见表 2。从表 2 可看出, LNG-PHB-MS 混悬注射剂能显著延长避孕时间和降低毒副作用: 当剂量均为每只小鼠 0.32 和 0.96 mg 时, LNG-PHB-MS 组比原药组避孕时间延长 15 d 以上; 当剂量增大时, LNG-PHB-MS 组避孕时间更长, 并可克服 LNG 原药组导致大量死亡的毒副作用。空白微球、空白混悬介质与生理盐水组之间的抗生育时间无显著性差异, 对小鼠均无避孕作用。

Tab 2 Results of average anticonceptive effects in mice (n = 10)

Group No.	Sample	Dosage /mg•mouse ¹	Birth time /d	Anticonception duration/d	No. of kid mice born	Birth rate /%	Death rate /%
1	LNG	0.32	36.5	11.9	9.75	100	0
2	LNG	0.96	59.0	34.4	8.88	38.5	43.9
3	LNG	1.92					71.4
4	LNG	3.84					80.0
5	LNG-PHB-MS*	0.32	51.8	27.2	10.5	80.0	0
6	LNG-PHB-MS*	0.96	75.0	50.4	10.8	77.8	22.0
7	LNG-PHB-MS*	1.92	93.9	69.3	8.7	86.7	10.0
8	LNG-PHB-MS*	3.84	120.6	96.0	10.6	90.0	10.0
9	PHB-MS	16.4**	27.6	3.0	8.5	83.7	14.3
10	Suspension medium	0.4 ml	28.2	3.6	8.0	91.0	0
11	Saline	0.4 ml	24.6	0	8.7	90.0	10.0

* n = 20; ** Amount of blank microspheres.

讨 论

用液中干燥法制备微球时,在优化过程中我们采用不同阶段变温固化,再加水萃取,在合适的油水比例时控制了氯仿挥发的速率,避免了过快挥发使微球未成形而破裂,也避免过慢挥发可引起的粘连或不成形而致 LNG 微晶析出等缺点,并获得氯仿残留量远低于药典标准(0.005%)的满意结果。实验发现,LNG 与 PHB 的比例由 1:2,1:3,……,1:7 逐渐减小时,LNG 微晶析出的量并不减少,只是投入的 LNG 量愈多,微球愈不圆整,包封率愈低,载药量愈高;随着 PHB 与 CHCl_3 比例增大,在相同搅拌速率下粒径也增大。优化的工艺可以得到微球外无析出的 LNG 微晶,载药量与包封率均大幅度提高。

小鼠抗生育试验中,药物的缓释性能主要通过抗生育时间的长短来衡量,小鼠合笼后至产仔鼠时的时间扣除妊娠期即为抗生育时间。发现原药的剂量过大时,会导致小鼠生殖系统受损、交配困难等,致使抗生育时间出现假象,并导致大量死亡。而相同大剂量的 LNG-PHB-MS 组延长抗生育效果更显著,生育时间可达到 96 d,未引起大量死亡,且♀鼠

产仔鼠后,解剖注射部位未见红肿发黑等症状,未发现有心、肝、脾、肺、肾等脏器的病变现象,也未发现了子宫有损伤。仔鼠喂养 20 d 后,一切生长正常。故可认为本试验抗生育时间未因其它干扰而出现假象。

参 考 文 献

- 1 许开天,赵树杰.PHB 在生物医学中的应用研究进展.应用与环境生物学报,1995,1:85
- 2 Knowles JC, Hastings GW, Ohta H, *et al.* Development of a degradable composite for orthopaedic use: *in vivo* biochemical and histological evaluation of two bioactive degradable composite based on the polyhydroxy-butylate polymer. *Biomaterials*, 1992, 13:491
- 3 Kawaguchi T, Tsugane A, Higashide K. Control of drug release with a combination of prodrug and polymer matrix: antitumor activity and release profiles of 3',5'-diacyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine from poly(3-hydroxybutyrate) microspheres. *J Pharm Sci*, 1992, 81:508
- 4 Thies C. Formation of degradable drug-loaded microparticles by in-liquid drying process. In: Donbrow M, ed. *Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy*. USA: CRC Press, 1992. 48~71
- 5 中国药典.1995 年版.二部.北京:化工出版社,1995.附录 59
- 6 徐叔云主编.药理实验方法学.北京:人民卫生出版社,1982.1022~1033

STUDIES ON SUSTAINED RELEASE MICROSPHERES OF LEVONORGESTROL-POLY 3-HYDROXYBUTYRATE

Wang Zhengrong(Wang ZR), Lu Bin(Lu B)* and Yang Hong(Yang H)

(School of Pharmacy, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041)

ABSTRACT AIM: To optimize the preparation with in-liquid drying method of sustained release microspheres of levonorgestrol-poly 3-hydroxybutyrate (LNG-PHB) with good contraceptive effect using PHB as the biodegradable material. **METHODS:** Uniformed design was used to optimize the technology of preparation with good reproducibility. The appearance, particle size, CHCl_3 residue, drug content, drug release *in vitro*, stability and contraceptive effect on mice of the obtained microspheres were examined. The formation of the drug microspheres was confirmed with differential thermal analysis. **RESULTS:** The average particle size was 64 μm with over 90% of the microspheres being in the range of 28.7~85.8 μm . The CHCl_3 residue was lower than 0.001%, and the drug release behaviour *in vitro* could be described by Higuchi equation. The drug release $T_{1/2}$ was prolonged 1.8 times compared with the original drug LNG. The microspheres were stable in 3 months and showed significant sustained release and contraceptive effect in mice and much lower toxicity compared with the original drug. **CONCLUSION:** The technology of preparation was successful and the contraceptive effect in mice was satisfactory with much lower toxicity as desired.

KEY WORDS levonorgestrol-poly 3-hydroxybutyrate; sustained release drug delivery systems; microspheres; contraception

* Author of correspondence