

多柔比星壳聚糖微球的制备及其特性研究*

王增寿,胡 伟,张 华,朱光辉,陈 怡
(温州医学院附属第二医院药剂科,325027)

[摘要] 目的 以壳聚糖为载体材料,多柔比星为模型药物,制备脑内局部给药缓释微球。方法 以液体石蜡为油相,L-抗坏血酸棕榈酸酯为交联剂,司盘-80为乳化剂,采用乳化化学交联技术制备多柔比星脑用微球。用动态透析法检测微球的体外释放特性。结果 多柔比星/壳聚糖的质量比为1:9的载药微球形态良好,粒径分布较为均匀,平均粒径为(9.41±2.43) μm,载药量为(8.49±0.37)%,包封率为(70.56±4.23)%。体外释放具有良好的缓释效果。结论 所优化的制备工艺稳定,适用于多柔比星壳聚糖脑用微球的制备。

[关键词] 多柔比星;壳聚糖;微球;缓释

[中图分类号] R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2007)07-0720-04

Study on Preparation and Properties of Doxorubicin-loaded Chitosan Microspheres

WANG Zeng-shou, HU Wei, ZHANG Hua, ZHU Guang-hui, CHEN Yi (Department of Pharmacy, the Affiliated Second Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

ABSTRACT Objective To study the preparation technique and release characteristic of doxorubicin -loaded chitosan microspheres for the intracerebral local administration. **Methods** Using the liquid paraffin as the oil phase, L-ascorbic acid palmitate as the cross linking agent, and span-80 as the emulsifier. Doxorubicin -loaded chitosan microspheres were prepared by emulsion-chemical cross link technique. Dynamic dialysis method was used to determine the releasing characteristic of microspheres *in vitro*. **Results** Microspheres (doxorubicin /chitosan = 1 : 9) with a good shape and even particle size distribution were prepared. The average particle diameter was (9.41 ± 2.43) μm with a quantity of drug loading (8.49 ± 0.37)%. The proportion of entrapment was (70.56 ± 4.23)%. The drug release *in vitro* had a satisfied effect of delayed release. **Conclusion** The optimized preparation technique is stable and has a high entrapment efficiency, suitable for the preparation of doxorubicin -loaded chitosan microspheres for cerebral administration.

KEY WORDS Doxorubicin; Chitosan ; Microspheres ;Delayed release

壳聚糖(chitosan, CH)是自然界存在的唯一带正电荷碱性多糖,具有良好的生物相容性和生物可降解性,而且有抗菌抗炎、促进伤口愈合和直接抑制肿瘤细胞的作用。壳聚糖作为药物载体可以控制药物释放、延长药物疗效、降低药物毒副作用^[1,2]。

多柔比星(doxorubicin)是一种蒽环类抗生素,单一用药对多种肿瘤有广谱的抑制作用;但其不能穿过血-脑脊液屏障而进入大脑及中枢神经系统,限制其治疗颅内恶性肿瘤的应用。本实验以壳聚糖作为药物载体制备多柔比星脑内局部给药缓释微球并研究其体外释药特点,以期实现多柔比星用于治疗颅内恶性肿瘤,避开血-脑脊液屏障,提高颅内肿瘤局部的药物浓度,延长作用时间,减少药物的全身不良反应^[3,4]。

1 材料

1.1 药品与试剂 盐酸多柔比星(浙江海正药业股

份有限公司);壳聚糖(脱乙酰度85%、黏度100,山东阿波罗集团有限公司);轻质液状石蜡(药用,江西德成制药有限公司);L-抗坏血酸棕榈酸酯(符合FAO/WHO质量标准,北京国人逸康科技有限公司);司盘-80(化学纯,中国医药公司北京采购供应站);正丁醇(分析纯,上海试剂总厂);无水乙醚(分析纯,宜兴市第二化学试剂厂)。

1.2 仪器 光学显微镜(BAUSCH&LOMB);S-3000n扫描电镜(日本HITACH公司),TU-1901双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);DF-101S集热式磁力加热搅拌器(常州国立实验设备研究所)。

2 方法与结果

2.1 壳聚糖微球的制备

2.1.1 空白微球的制备 用0.7%(V/V)的醋酸配制3%(g/V)的壳聚糖溶液20 mL作为水相。取100 mL液体石蜡,加3 mL乳化剂司盘-80置烧杯中搅匀,作为油相。在1 000 r·min⁻¹搅拌下,缓缓将水相滴入油相中,制成W/O型乳剂,搅拌乳化1 h后,缓慢加入L-抗坏血酸棕榈酸酯粉末200 mg交联固化,搅拌固化1 h升温至60℃继续搅拌5 h;冷却后,3 500 r·min⁻¹

[收稿日期] 2006-07-18 **[修回日期]** 2006-10-21

[基金项目] *浙江省温州市科技计划项目(基金编号:Y2003A036)

[作者简介] 王增寿(1967-),男,浙江温州人,主任药师,硕士,从事医院药学工作。电话:0577-88816257, E-mail: wangzs@mail.wz.zj.cn。

离心 15 min, 倾去上清液, 沉淀加正丁醇-乙醚(1:1)液 20 mL 溶解剩余的交联剂, 抽滤, 用正丁醇、乙醚冲洗微球各 3 次, 抽干, 50 °C 干燥 12 h, 得空白微球。

2.1.2 含药微球的制备 将盐酸多柔比星溶解于 3% (g/V) 的壳聚糖醋酸溶液中, 作为水相, 随后制备方法同空白微球。

2.2 微球的粒径及形态 取微球少许, 用液体石蜡分散, 在带标尺的光学显微镜下观察干态微球的球形及分散性, 选择具有代表性的区域, 测定 400 个粒子, 计算平均粒径。将干燥的微球均匀散在样品平台上, 用导电胶固定后喷金, 电压加至 15 kV, 用扫描电镜 (SEM) 观察微球表面形态。

2.3 光谱扫描 取盐酸多柔比星、含药微球和空白微球适量分别溶于 5% 醋酸溶液中, 以醋酸液作空白对照, 将 3 种供试液于 400 ~ 600 nm 波长内光谱扫描。光谱扫描图谱表明, 在 478 nm 处多柔比星、含药微球均有最大吸收, 而空白微球无吸收, 对测定无干扰, 故可用分光光度法测定微球中多柔比星的含量, 选择 478 nm 为测定波长。

2.4 标准曲线的绘制 精密称取盐酸多柔比星原粉 21.34 mg, 用 5% 醋酸溶液溶解并定容成含多柔比星 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 30.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准液, 用紫外分光光度计在选定波长处测定吸光度 (A) 值。以 A 值对浓度 (C, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归, 结果 $C = 40.1099A - 1.1430$, $r = 0.99991$ ($n = 5$), 结果表明多柔比星浓度在 2.5 ~ 30.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内, 浓度与吸光度线性关系良好。

2.5 回收率测定 精密称取适量盐酸多柔比星原粉 1 份, 加入 9 份空白微球, 充分混合均匀, 照“2.4”项下操作, 分别配成含多柔比星 2.5, 15, 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 三种样品, 测定其含量, 计算回收率。结果平均回收率为 98.62%, $RSD = 1.056\%$ ($n = 3$)。

2.6 载药量及包封率的测定 精密称取含药微球 100 mg, 用 5% 醋酸溶液使其完全溶解并定容至 100 mL, 精取该液 1 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 在波长 478 nm 处测定 A 值, 用标准曲线方程求出浓度, 按下式计算药物载药量及包封率: 载药量 = 微球中多柔比星含量/微球重量 $\times 100\%$; 包封率 = 微球中药物重量/投入的总药量 $\times 100\%$ 。多柔比星/壳聚糖的质量比是影响微球的载药量和包封率主要因素。本实验在保持壳聚糖浓度不变, 多柔比星/壳聚糖的质量比分别为 1:3, 1:6, 1:9 的条件下制备壳聚糖微球, 所得微球的载药量和包封率见表 1。从表 1 中可看出: 随着多柔比星/壳聚糖的质量比的增大, 载药量逐渐增

大, 但包封率却呈下降之势。因此合适的多柔比星/壳聚糖的质量比确定需综合考虑微球的载药量和包封率, 在使微球载药量尽可能高的同时, 也要保证其较大的包封率以减少多柔比星的损失。

表 1 多柔比星与壳聚糖的质量比对微球载药量和包封率影响

多柔比星/壳聚糖	载药量	包封率
1:3	14.98 \pm 0.57	55.65 \pm 2.55
1:6	10.53 \pm 0.29	59.59 \pm 3.48
1:9	8.49 \pm 0.37	70.56 \pm 4.23

2.7 体外释放实验 精密称取已知含量的多柔比星壳聚糖微球 10 mg 共计 50 份, 分别装于用 pH 值 = 7.2 的磷酸缓冲液浸泡过的透析袋中, 袋的两端用无色细尼龙绳扎紧。将此 50 份样品同时置于装有 pH 值 = 7.2 的磷酸缓冲液 500 mL 的带盖锥形瓶中, 塞紧瓶盖, 于 (37 \pm 1) °C 水浴中, 50 r \cdot min⁻¹ 磁力搅拌。分别于投药后 0.25, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 14 d 从锥形瓶中每个时间点随机取出 5 只透析袋。每次取样后用 500 mL 新鲜的 pH 值 = 7.2 磷酸缓冲液替换锥形瓶中的缓冲液。将取出的样品袋用磷酸缓冲液冲洗掉吸附在透析袋外表面的多柔比星, 剪开透析袋, 用适量的 5% 醋酸将袋中微球完全溶解并定容至 25 mL, 于 478 nm 处测定 A 值, 用标准曲线方程求出浓度, 求出每个取样点 5 只透析袋中多柔比星的平均含量。每个取样点多柔比星的溶出量即等于微球中多柔比星总的含量减去每个取样点透析袋中多柔比星的平均含量, 从而可得到多柔比星的累计释放百分率。多柔比星/壳聚糖的质量比分别为 1:3, 1:6, 1:9 的载药微球的体外释药实验结果见图 1。三种不同质量比载药微球体外释药曲线均可分为两部分, 前部分曲线陡直释药迅速, 0.25 d 时累计释药量分别达到 36.71%, 31.42% 和 25.26%, 突释效应显著; 后部分曲线平缓, 并且随着时间的延长释放速度逐渐减慢, 到 14 d 后分别仍有 5.43%, 15.53% 和 23.72% 未释放, 表现出多柔比星壳聚糖微球良好的缓释性能。

2.8 多柔比星壳聚糖微球的制备工艺选择

2.8.1 分散递质的选择 有机分散递质对反相乳化交联产物微粒的成球性影响很大。笔者实验了不同的有机分散递质, 结果表明: 液体石蜡是比较理想的分散递质, 具体实验果见表 2。

2.8.2 交联剂的选择 文献报道甲醛、戊二醛、L-抗坏血酸棕榈酸酯均可作为壳聚糖微球制备的交联剂。本实验单因素实验结果表明: 甲醛的交联能力较弱, 制备的微球缓释效果不理想; 戊二醛的交联能力强, 但制

备的微球不溶于酸性溶液,导致无法测定微球中多柔比星的含量;以 L-抗坏血酸棕榈酸酯为交联剂,当 L-抗坏血酸棕榈酸酯:壳聚糖为 1:3(g/g)时,所制备的微球在 pH 值 = 7.2 的磷酸缓冲液中不仅具有良好的缓释效果,而且在 5% 醋酸溶液中具有很好的溶解性能。因此本实验选用 L-抗坏血酸棕榈酸酯为交联剂。

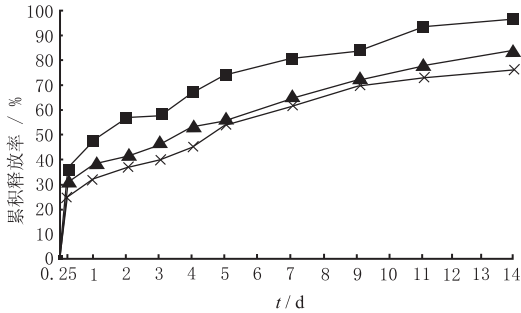


图 1 载药微球的体外释放曲线

—■—多柔比星/壳聚糖(1:3)微球;—▲—多柔比星/壳聚糖(1:6)微球;—×—多柔比星/壳聚糖(1:9)微球

表 2 有机分散递质对壳聚糖微球的影响

分散递质	空白微球色泽及形态
液体石蜡	浅黄色,光滑球体,数量多
正己烷	土黄色,有大小不均的少量球体存在
苯甲酸乙酯	黄色,无定型固体

2.8.3 壳聚糖浓度的选择 壳聚糖浓度主要是影响反相乳化交联产物的成球性,同时也影响微球的粒径分布百分比、微球载药量和包封率。本实验比较不同的壳聚糖浓度,结果表明:3%的壳聚糖是制备微球较理想的浓度,具体实验结果见表 3。

表 3 壳聚糖浓度对微球制备的影响

浓度(g/V)/%	微球外观质量
1	产物呈不定形
2	球形不佳,成球率低
3	球形好,表面较光滑,成球率高
4	球形较好,表面较光滑,成球率高,溶液黏度大

2.8.4 乳化时间与搅拌速度的选择 乳化时间与搅拌速度对反相乳化交联产物的粒径及分布均匀性影响很大。本实验比较不同的乳化时间与搅拌速度,实验结果显示:乳化时间一定时,速度增加则粒径减小,粘连情况减轻;速度一定时,乳化时间延长,则粒径小的微球所占比重增加,分散性较好,球形较好。综合考虑微球粒径过小将影响载药量及包封率,而乳化时间增长则影响产率,故选择条件为转速 1 000 r · min⁻¹,乳化时间 60 min。

2.8.5 交联时间的选择 从加入交联剂 L-抗坏血酸

棕榈酸酯开始计时,先于室温反应 1 h,再升温至 60 ℃继续反应,定时取样一小滴反应液用光学显微镜观察,结果见表 4。由表 4 可知,加入 L-抗坏血酸棕榈酸酯后,在升温之前交联反应进行得较慢,升温后反应开始加速;1 h 后乳液已开始出现破乳,3 h 后颗粒物基本成球形,到 5 h 时反应基本完成,此时微球表面光滑平整,大小较均匀。这说明升温至 60 ℃后再反应 5 h 即可。

表 4 交联时间对壳聚糖微球制备的影响

加热交联时间/h	反应现象和微球形态
0	红色乳液,乳滴大小均匀
1	红色乳液,多数乳滴颜色变深,有少量沉淀
3	反应体系上层呈红色澄清溶液,深红色微球基本成型
5	反应体系呈红色澄清溶液,深红色微球结构清晰,壁厚
7	反应体系呈红色澄清溶液,深红色微球结构清晰,壁厚

2.9 微球的大小与形态 由光学显微镜观察可见多柔比星/壳聚糖的质量比分别为 1:3,1:6,1:9 的载药微球形圆整、深红色、分散性良好、粒径大小均匀呈偏正态分布。载药微球粒径分布情况见图 2 和表 5。微球的扫描电镜图片显示微球形圆整,表面较粗糙,较少有药物的微晶体存在,表明药物已被包裹。表面细微结构显示微球表面有分布不规则的微小孔洞存在。

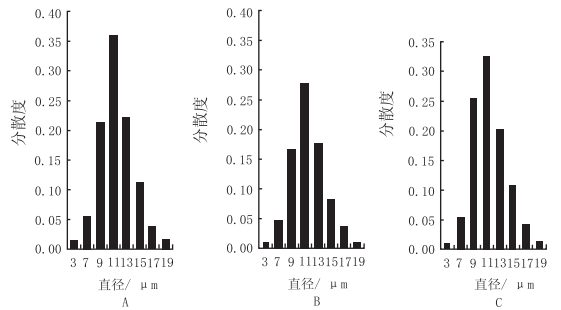


图 2 载药微球的粒径分布直方图

A. 多柔比星/壳聚糖/(1:3); B. 多柔比星/壳聚糖/(1:6); C. 多柔比星/壳聚糖/(1:9)

表 5 载药微球粒径大小及分布

多柔比星/壳聚糖	微球平均粒径/ μm	直径 6 ~ 14 μm 的微球占总数的百分数/%	$\bar{x} \pm s$
1:3	9.37 \pm 2.62	89.00	
1:6	9.29 \pm 2.56	90.00	
1:9	9.41 \pm 2.43	91.50	

2.10 多柔比星/壳聚糖的理想值 由载药微球体外释药实验结果可知,随着微球中壳聚糖比例的升高,其缓释效果越来越明显,综合载药微球的粒度、粒度分

布、载药率、包封率等各方面的因素,多柔比星/壳聚糖的质量比理想值为 1:9。

3 讨论

L-抗坏血酸棕榈酸酯在本实验条件下被空气中的氧气氧化生成脱氢抗坏血酸棕榈酸酯,然后进一步与壳聚糖或多柔比星中的氨基葡萄糖的氨基缩合交联,生成壳聚糖-脱氢抗坏血酸棕榈酸酯、壳聚糖-脱氢抗坏血酸棕榈酸酯-多柔比星、多柔比星-脱氢抗坏血酸棕榈酸酯等缩合物,使载药微球固化成形,进一步提高了微球缓释效果^[5]。温度升高,可使上述反应加快;当水浴温度为 60 ℃,反应 5 h 即可得到大小较均匀、表面光滑平整深红色脑用多柔比星壳聚糖缓释微球。

由于微球表面存在微孔,在多柔比星壳聚糖缓释微球体外释药实验初期水分子迅速进入微孔溶解多柔比星-脱氢抗坏血酸棕榈酸酯缩合物,使其迅速释放,故微球在释药初期具有比较明显的突释效应。随着壳聚糖吸水溶胀,在微球表面形成了亲水凝胶层,关闭了药物分子迅速释放通道,药物释放只能通过骨架慢慢扩散或通过壳聚糖的降解慢慢释放;随着释药时间的延长,微球表面亲水凝胶层逐渐增厚,微球释药面积逐渐缩小,导致微球释药速度越来越小^[6]。因此,本实验制

备的载药微球体外释药曲线表现为先陡后平的特征。

本研究采用乳化化学交联技术制备多柔比星脑用微球,简单易行,具有较高的使用价值。本研究的微球脑内局部给药,其突释效应可使给药后短时间内获得较高的药物浓度;而随后的缓释又可以延长药物在脑内的治疗时间,提高药物疗效,减少药物的不良反应。

[参考文献]

- [1] FRANCESCA B, MARIA A R, ISABELLA O, *et al.* Controlled insulin release from chitosan microparticles[J]. *Arch Pharm Pharm Med Chem*, 1998, 331:133-138.
- [2] 方华丰,周宜开.壳聚糖微球的研究进展[J].*中国医院药学杂志*,1999,19(12):744-745.
- [3] 梁桂媛,方华丰,刘志伟.5-氟尿嘧啶壳聚糖微球的制备[J].*广东药学院学报*,2000,16(1):7-10.
- [4] 郑爱萍,于少云,赵莹,等.鼻用氟尿嘧啶壳聚糖微球的制备及其特性研究[J].*北京大学学报(医学版)*,2004,36(3):300-304.
- [5] 石可瑜,李朝兴,何炳林.磁导向多柔比星-羧甲基葡聚糖磁性毫微粒的研究[J].*生物医学工程学杂志*,2000,17(1):21-24.
- [6] 蒋新宇,周春山,邓晔.壳聚糖载药微球的研制[J].*常德师范学院学报(自然科学版)*,2003,15(1):36-39.

卡维地洛与庚醇减少低氧再供氧心肌细胞凋亡及坏死的研究

曾玉杰¹,冯义柏²,于世龙²,柯元南¹,王勇¹,李宪伦¹,朱丹丹¹,李志远¹

(1.北京中日友好医院心内科,100029;2.华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科,武汉 430022)

[摘要] 目的 研究卡维地洛(carvedilol,CVD)、庚醇(heptanol,HT)对不同时间低氧再供氧心肌细胞坏死、凋亡的影响。方法 利用锥虫蓝染色技术和流式细胞仪分别观察低氧后不同时间再供氧细胞坏死、凋亡情况,观察CVD、HT对其的影响。结果 对照组(未给药)正常和低氧30 min时凋亡指数差异无显著性($P>0.05$),再供氧1 h凋亡指数为27.4%,与正常时比较差异有极显著性($P<0.01$)。坏死的心肌细胞在再供氧2 h后差异有极显著性($P<0.01$)。运用CVD、HT后凋亡指数在再灌注1 h时分别较对照组减少了55.11%和21.53%。结论 HT和CVD通过不同的作用可以减少低氧再供氧心肌细胞的死亡和凋亡。

[关键词] 卡维地洛;庚醇;心肌细胞凋亡

[中图分类号] R971.94;R965

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2007)07-0723-03

Effects of Carvedilol and Heptanol On Myocardial Cells Apoptosis and Necrosis in Ischemic Reperfusion

ZENG Yu-jie¹, FENG Yi-bai², YU Shi-long², KE Yuan-nan¹, WANG Yong¹, LI Xian-lun¹, ZHU Dan-dan¹, LI Zhi-yuan¹ (1. Department of Cardiology, China Japan Friendship Hospital, Beijing 100039, China; 2. Department of Cardiology, Union Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT Objective To investigate the effects of carvedilol(CVD) and heptanol(HT) on myocytes necrosis and