

以 PHBV/PLA 为载体的地西洋缓释微球 体外释放度的研究*

陈建海 陈志良 侯连兵 胡育筑¹

(第一军医大学南方医院药学部 广州 510515; ¹中国药科大学基础部 南京 210038)

摘要 用溶剂蒸发法制备了以新型生物可降解材料聚羟基丁酸酯-羟基戊酸酯共聚物(PHBV)与 L-, DL 聚乳酸(PLA)共混物为载体的, 以地西洋为模药的缓释微球, 微球的平均粒径为 18~25 μm。电镜观察表明, 微球表面形态结构随载体成分改变而变化。文章还阐述了四种微球实际载药量与包封率随载体成分变化而改变的规律。阐明了载体中加入 D, L-PLA 材料, 改善了以 PHBV 单一材料为载体的微球释药性能, 体外释药方程为 $Q = 2.1811t + 13.50$ ($r = 0.9527$)。

关键词 聚羟基丁酸酯-羟基戊酸酯共聚物; 聚乳酸; 地西洋; 缓释微球

近几年来, 由微生物细胞内提取的聚 3-羟基丁酸酯(PHB)生物材料引起药学界广泛兴趣^[1], 其原因之一是在制备过程中, 不存在单体与引发剂等有害物质, 因此, 它比其他人工合成可降解聚酯类材料, 如: 聚乳酸(PLA)、聚乙醇酸(PGA)、聚己内酯(PCL)等具有更好的临床使用价值; 原因之二是降解周期适中。我们曾分别用 PHB 及其共聚物 PHBV^[2] 为载体制备了以地西洋(diazepam, DZP, 一种疏水性精神类药物)为模药的微球(MS), 其实际载药量分别在 19.5% 与 18.6% 左右, 包封率约在 80% 左右, 但体外释放曲线呈“三相”特征。本文用不同比例的聚羟基丁酸酯-羟基戊酸酯共聚物(PHBV)与 L-, D, L-PLA 共混物为载体, 做成微球, 探讨载体的组成对释药性能的影响。此项研究未见报道。

1 材料与方法

1.1 仪器与药品

超声振荡器(Ultrasonizer DECON 公司); Beckman 公司分光光度计(Spectrophotometers DU Series 600/7000), Mastersizer 颗粒度分析仪(英国 Malvern 仪器公司); RCD-6 型药物溶出度仪(上海黄海药检仪器厂), 荷兰 2040 型冷冻干燥机; 扫描电镜 Philips505。PHBV ($M_w = 454$ kD, $M_w = 153$ kD 14% molHV) (Sigma Company

UK), L-PLA ($M_n = 2000$) 与 D, L-PLA ($M_w = 345000$) 来自德国 Gelheim 公司, 原料 DZP 来自 Aldrich Co. UK; PVA 88% 水解 $M_w = 77 \sim 79$ kD; 其它试剂均为分析纯。

1.2 DZP-PH BV/PLA-MS 制备

用溶剂蒸发法制备技术。称取一定重量比的 PHBV 与 PLA 在 CH_2Cl_2 溶剂中共混并与 DZP 一起溶于有机溶剂中[基材总浓度为 3.0% (w/v)], 并在搅拌情况下, 将有机相逐滴加入含有乳化剂的水相中用三叶搅拌器, 转速为 800 r/min, 搅拌 8 h, 去除有机溶剂后将微球混悬液以转速 1000 r/min 离心 5 min, 分离, 用双蒸馏水洗涤 5 次, 最后, 微球在液氮下冷冻干燥 24 h, 储存于干燥器备用。

1.3 微球粒径与粒度分布测量

MS 的平均粒径(VMD)与粒度分布(SPAN)用 Mastersizer MALVERN 2600 直接测定, 结果由相连的计算机给出数据。

1.4 微球载药量与包封率测定

采用 UV-分光光度法。用连接有计算机的 Beckman D4 系列 UV-分光光度计; 在 243 nm 波长处测定样品吸收度, 工作曲线与分析结果由计算机自动给出。分析样品制备: 称取微球 10 mg 用 0.05 mol/L 硫酸甲醇溶液(methanolic sulphuric acid, MSA)萃取 3 次, 每次时间 24 h, 直至

萃取液在 243 nm 波长处无吸收峰、合并所有萃取液, 用 MSA 稀释至一定体积。方法回收率为 $(101.58 \pm 0.87)\% (n=3)$; 微球包封率 = (微球中药物含量/投药量) $\times 100\%$ 。

1.5 微球体外释药性能考察

以浆板法^[3]测定 MS 体外释药性能, 称取适量 MS 置于溶出杯内, 加磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) [pH = 7.4, 含 0.04% 叠氮化钠 (sodium azide)] 500 ml, 于 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 恒温振荡 30 d。以 100 r/min 速度搅拌分散, 定时吸取滤液 5 ml, 随即补加缓冲液 5 ml。将滤液 5 ml 蒸干, 冷冻干燥后加 0.05 mol/L MSA 溶液 5.00 ml 溶解。在 243 nm 波长处用 UV-分光光度计测定, 标准曲线方程为 $A = 0.002850 + 0.09013C (\mu\text{g}/\text{ml}) (r = 0.9996)$, 方法回收率 $(99.10 \pm 0.75)\% (n=3)$ 。

2 结果

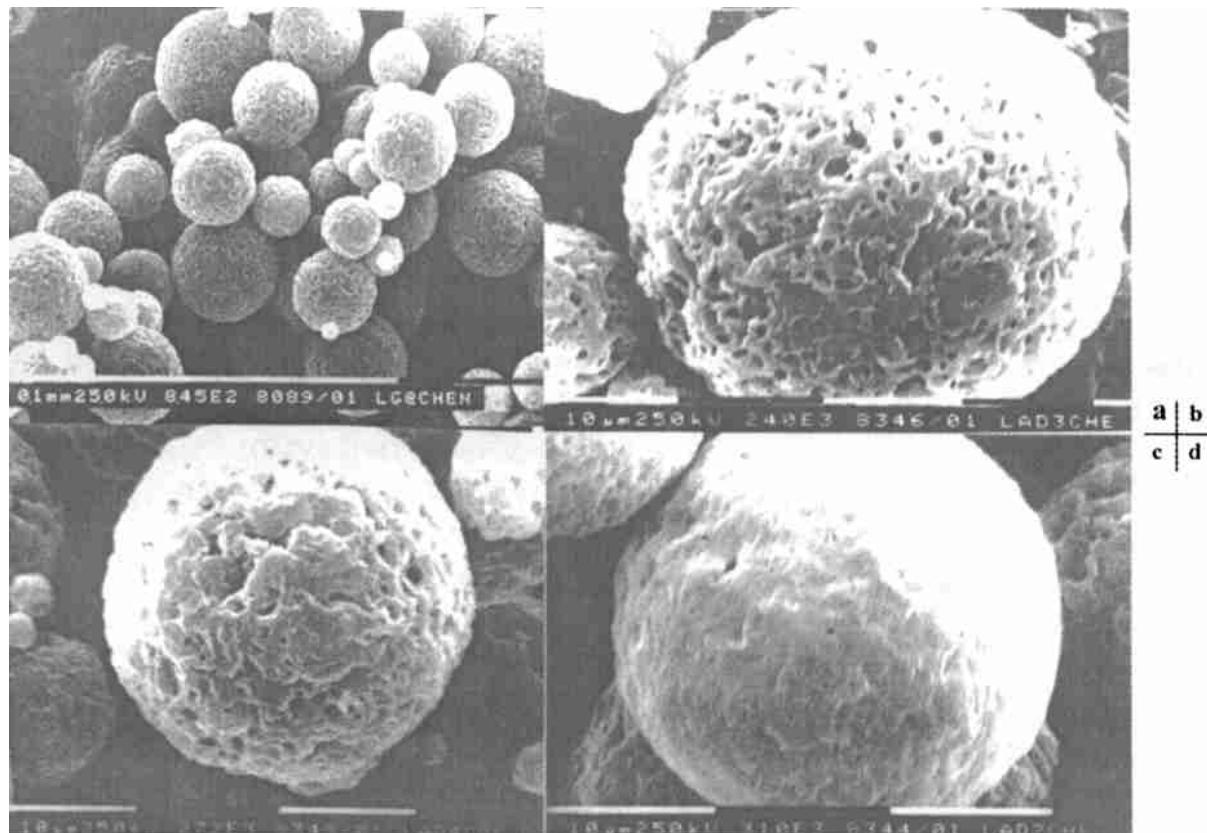
2.1 微球的表面形态

制备的微球呈白色、完整、无粘连, 收率为

$(87.5 \pm 3.8)\% (n=3)$, 微球平均粒径见表 1, 粒径分布呈正态分布; 电镜下观察, 以 L-PLA/PHBV (w/w = 30/70) 共混物为载体制备微球过程中得到两类表现形态不同的微球, 一种是形态类似 PHBV 微球, 表面多孔呈皱缩结构; 另一种形态类似 L-PLA 微球, 表面较平整, 无孔洞, 有棱角。L-PLA 为结晶度很高的高分子材料, 经理论分析^[4], 为两种材料不相容所致; D, L-PLA/PHBV 为载体的微球, 电镜观察, 随着载体中 D, L-PLA 成分的加大, 微球表面形态从多孔皱缩形态逐步趋向少孔, 小孔与皱缩形态减小的稍平整形态。由于 D, L-PLA 为无定型态结构, 高分子链柔韧性大, 填补了 PHBV 微球中的孔隙(图 1)。

2.2 PLA/PHBV-DZP 微球的大小, 载药量与包封率

表 1 列出载体中 PLA 与 PHBV 不同重量比例时的载药量与包封率, 在其他条件都相同的情况下, 随着载体中 PHBV 成分的加大, 包封率呈上升趋势。



a. L-PLA/PHBV (30/70) b. D, L-PLA/PHBV (10/90) c. D, L-PLA/PHBV (30/70) d. D, L-PLA/PHBV (50/50)

Fig 1. SEM photograph of the surface morphology of MS

Tab 1. Effect of different compositions of carriers on the drug loading and the incorporation efficiency of MS

| Sample | Composition | PLA/PHBV (w/w) | $\bar{D}(\mu\text{m})$ | Feed drug(%) | Drug loading(%) | Incorporation efficiency (%) |
|--------|---------------|-------------------|------------------------|--------------|-----------------|---------------------------------|
| S1 | L-PLA/PHBV | 30/70 | 18 | 25.0 | 18.61 | 74.46 |
| S2 | D, L-PLA/PHBV | 50/50 | 20 | 25.0 | 14.95 | 59.68 |
| S3 | D, L-PLA/PHBV | 30/70 | 25 | 25.0 | 17.92 | 71.63 |
| S4 | D, L-PLA/PHBV | 10/90 | 20 | 25.0 | 18.90 | 75.66 |

2.3 微球的体外药物释放

用累积释药百分数对时间绘图, 制得四条 PLA/PHBV 共混物为载体的体外释药曲线(图 2)。图 2 中原药 DZP 第 5 天溶出度约为 100%, 四个样品第一天都存在不同程度的“突释效应”。“突释效应”最大的是样品 S1, 第 1 天释药达 33.56%; 在含有 DL-PLA 材料的三种样品中, 随着载体中 D, L-PLA 成分的加大, “突释效应”明显减少, 样品 S2 第 1 天释药约 8.55%; 除 S2 样品接近于零级释药曲线外, 其余 3 个样品释药曲线可大致分为三个阶段: 第一阶段为“突释效应”; 第二阶段从第 2~12 天释药速度较快; 第三阶段即 12 d 后释药速度较慢; 将二、三阶段曲线各点分别用线性加以拟合, 得到的拟合方程见表 2, 可见样品 S1 的第二阶段直线斜率最大。第三阶段斜率最小。随着 D, L-PLA 成分加大, “第二阶段”直线斜率减小, 而第三阶段直线的斜率增大。对于样品 S2, 这三阶段的直线斜率非常接近, 用线性回归拟合, 得线性方程 $Q = 2.1811t + 13.50$ ($r = 0.9527$)。30 d 累积释药量基本上是随着载药量的增加而增加。

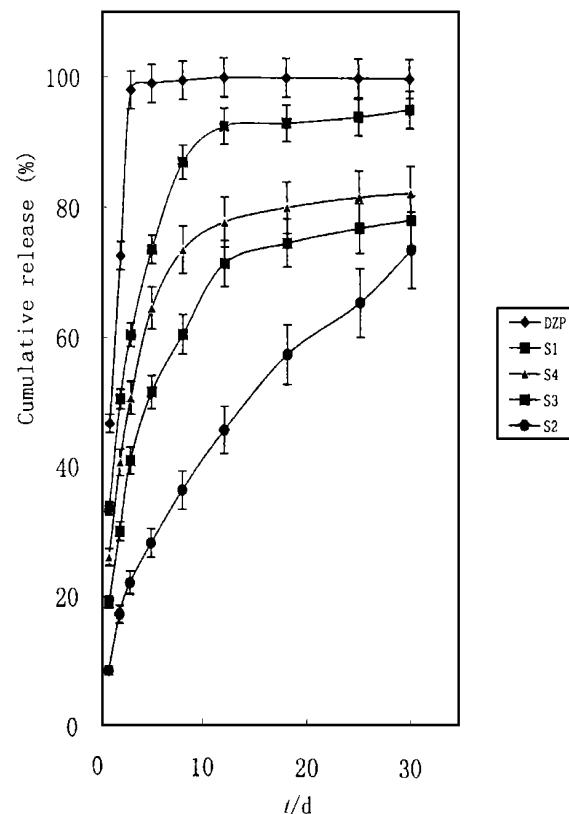


Fig 2. Cumulative release curve of PHBV/PLA MS

Tab 2. The “burst effect” and “three stages” linear characteristic of the release curve

| Sample | Burst effect(%) | Second stage | Third stage | 30 d release(%) |
|--------|-----------------|--|--|-----------------|
| S1 | 33.56 | $Q_1 = 5.0566t + 40.01$ ($r = 0.8667$) | $Q^1 = 0.1686t + 90.05$ ($r = 0.9372$) | 95.21 |
| S2 | 8.55 | $Q_2 = 3.1915t + 9.801$ ($r = 0.9549$) | $Q^2 = 1.8369t + 20.85$ ($r = 0.9339$) | 73.68 |
| S3 | 19.12 | $Q_3 = 4.4923t + 22.30$ ($r = 0.9737$) | $Q^3 = 0.3693t + 67.50$ ($r = 0.9769$) | 78.25 |
| S4 | 25.89 | $Q_4 = 4.8709t + 29.02$ ($r = 0.8193$) | $Q^4 = 0.2185t + 76.01$ ($r = 0.9375$) | 82.54 |

3 讨论

通过改变载体的成分, 借以实现改变微球的体外释药性能, 曾用 PHB 与 PHBV 为载体制得微球从表面到内部(横断面观察)都存在微孔通道, 以致体外释放曲线“突释效应”与“三相”特征明显。用 L-PLA/PHBV 制得微球, 由于 L-PLA 结晶度高^[4]与 PHBV 材料相容性差, 得到是两种表

观形态不同微球; D, L-PLA 是无定型态结构材料, 它与其他材料^[5], 包括 PHBV, 有较好的相容性, 因此随着载体中 D, L-PLA 含量的增加, 微球孔洞减少, 释药曲线的突释效应减少, 改变了原有 PHBV 微球释放曲线的特征, 得到接近于零级释放曲线。D, L-PLA 成分阻止 DZP 溶出的倾向, 使最终溶出率呈下降趋势(见图 2)。因此, 采用多种材料共混物作为控释、缓释药物载体, 改善药物的

释放率, 不愧为一种解决目前国内材料短缺问题的新途径。

致 谢 Prof. S. S. Davis 为本室提供材料与实验设备。

参 考 文 献

- 1 Koosha, Uller RH, Davis SS. Polyhydroxybutyrate as a drug carriers. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1989, **6**(2): 117
- 2 陈建海, 陈志良. 地西泮-聚-3-羟基丁酸酯为载体的缓释微球研制. 第六届全国生物材料学术研讨会论文集, 1999, 57(广州)
- 3 Jun HW, Lai JW. Preparation and *in vitro* dissolution tests of egg albumin microcapsules of nitrofuranoin. *Int J Pharm*, 1983, **16**: 65
- 4 Leenslag JW, Pennings AJ, Bos RRM, et al. Resorbable materials of poly(L-lactide). *Biomaterials*, 1987, **8**: 70
- 5 陈建海. DL-PLA, L-PLA 与 PCL 的酯交换. 功能高分子学报, 1990, **13**(4) : 58

Study on the Drug Release of Diazepam-Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate)/Poly(lactic acid) Sustained-Release Microspheres

CHEN Jian-Hai, CHEN Zhi-Liang, HOU Lian-Bing, HU Yu-Zhu¹

Department of Pharmaceutical Science, Nanfang Hospital, First Medical University of PLA, Guangzhou 510515; ¹Basic Department, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038

Abstract The sustained-release microspheres have been prepared by the solvent-evaporation methods, using poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)/polylactide blend as carrier and diazepam as modal drug. The mean diameter of microspheres is in a range of 18~25 μm. The change of surface morphology with the composition of carrier was observed by scanning electron microscope. In this paper, drug loading and incorporation efficiency vary with the composition of carrier for four kinds of microspheres, which was also discussed. The release properties could be expressed by the following equation: $Q = 2.1811t + 13.50$ ($r = 0.9527$). These materials have good prospect as a controlled or sustained-release carrier.

Key words Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate); Diazepam; Sustained-release; Microspheres

文摘 004 胰岛素聚乳酸微球处方筛选 胡一桥, 郭建新, 郑梁元, 谭仁祥. 中国药学杂志, 1999, **34**(12): 822

目的: 选择胰岛素作为蛋白质模型药物, 以聚乳酸为载药聚合物, 采用溶剂挥发法, 对蛋白质的微球处方及制备条件进行优化。方法: 以微球的成球情况、粒径、包封率、产率、含量为指标, 首先应用正交设计分析筛选油相、乳化剂、乳化温度和溶剂挥发温度, 然后应用均匀设计逐步回归法优化空白微球制备工艺; 再根据空白微球的筛选结果, 对聚乳酸相对分子质量和浓度两个重要因素进行正交试验, 应用理想函数优选产率、包封率和载药量较高的胰岛素聚乳酸微球。应用电子显微镜扫描观察微球水解前后的表面形态。应用显微计数法测定微球粒径及

分布。结果: 空白微球筛选结果表明以液体石蜡为油相, 山梨醇脂肪酸酯-80 为乳化剂, 在室温条件下进行乳化和溶剂挥发有利于微球的制备。均匀设计及逐步回归法筛选空白微球的制备工艺结果表明, 聚乳酸的浓度和相对分子质量是决定粒径大小和微球产率的主要因素。载药微球筛选结果表明相对分子质量为 10 kD 的聚乳酸当其浓度为 $200300 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时制备得到的微球包封率(达 75%以上)、含量、产量都较高。胰岛素聚乳酸微球平均粒径为 $19.39 \mu\text{m}$, 表面光滑, 呈球状。在水解 15 d 后表面出现孔隙, 但球形骨架仍然完整。结论: 采用一系列优选方法所得优化处方及制备条件具有可重复性, 且与预测值基本吻合, 优选方法正确、可行。