

# 肺靶向红霉素聚乳酸微球的研究

杨帆<sup>\*</sup>, 林茵, 谭载友, 赵耀明<sup>1</sup>, 麦杭珍<sup>1</sup>

(广东药学院药剂教研室, 广州 510224; 华南理工大学材料学院, 广州 510640)

**摘要** 目的 用生物可降解材料聚乳酸(PDLA)制备肺靶向红霉素缓释微球(ERY-PDLA-MS)。方法 用正交设计优化微球制备工艺,用扫描电子显微镜观察微球表面形态,差示扫描热分析确证含药微球的形成。并对所制备的红霉素微球的粒径及其分布、载药量、包封率、工艺重现性、体外释药、稳定性及在体内各组织的分布进行了研究。**结果** 微球形态圆整,且药物确已被包裹在微球中,而非机械混合。微球的平均粒径为 11.18  $\mu\text{m}$ ,粒径在 5~20  $\mu\text{m}$  占总数的 94% 以上,载药量为 24.16%,包封率为 63.54%,最佳工艺条件重现性良好,微球在 4℃ 及 25℃ 放置三个月各方面性质稳定,体外释药符合 Higuchi 方程  $Q=28.067+3.8515t^{1/2}$  ( $r=0.9834$ ),动物体内实验表明,红霉素微球混悬剂较普通注射剂更聚集在肺组织。**结论** 微球制备工艺稳定,具有明显的缓释作用和肺靶向性。

**关键词** 红霉素; 聚乳酸; 微球; 肺靶向

中图分类号: R944.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)03-0211-05

红霉素(Erythromycin)为大环内酯类抗生素,是临床上治疗支原体肺炎、军团菌肺炎的首选药物,但在体内分布广泛,有效治疗浓度维持时间短,容易诱发耐药性,且有口服吸收不规则、肝毒性等不良反应<sup>[1]</sup>。本研究以可生物降解聚乳酸为载体,研制一种肺靶向红霉素缓释微球(Erythromycin Polylactic acid microspheres),通过控制其粒径大小,使其静脉注射后,可被肺毛细血管床机械性截留于肺部,提高肺部药物浓度,又利用聚乳酸在体内不断降解的特性,延长药物作用的时间,从而达到提高药物疗效并减少毒副作用的效果<sup>[2,3]</sup>。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

光学显微镜及显微摄影系统(日本 Olympus), S-510 型扫描电子显微镜(日本 Hitachi), DSC 2910 Modulated DSC 热分析仪(美国 TA Instrument), UV-1601 分光光度计(日本岛津), 85-2 恒温磁力加热搅拌器(广州市富城仪器厂), IXJ-II 型离心沉淀机(上海医用分析仪器厂), 净化工作台(蚌埠净化设备厂), 隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械

厂)。

红霉素原料(利君集团镇江制药责任有限公司), 红霉素注射剂(大连美罗大药厂), 外消旋聚乳酸[PDLA](华南理工大学提供), 短小芽孢杆菌[CMCC(B)63202](广东省药检所), 注射用 5% 葡萄糖(中国华源集团上海华源股份公司), 其它试剂均为分析纯。

### 1.2 红霉素聚乳酸微球的制备

采用有机相分散-溶媒扩散法制备红霉素微球,即将适量的红霉素和聚乳酸按一定比例共溶于有机溶媒中,在一定的搅拌速度下,缓慢加到分散介质中,分散均匀后,再倾入到扩散介质中,搅拌一定时间,离心收集微球,蒸馏水洗涤,过滤,常压干燥即得。

经单因素考察得到有机溶媒为二氯甲烷、分散介质为甘油、扩散介质为明胶水溶液、有机溶媒:分散介质为 3:40 时,微球形态好、成球率高、粒径大小适宜、不粘连。固定以上条件,我们通过 L9(3<sup>4</sup>) 正交实验设计,考察了影响微球性质较显著的 4 个因素<sup>[4]</sup>,即有机相中聚乳酸浓度、投药比(红霉素与聚乳酸比)、扩散介质明胶的浓度和搅拌速度对成

球的产率和质量的影响,根据微球的粒径、跨距、包封率、载药量为指标的加权求和值优选出最佳生产工艺条件。

### 1.3 优选工艺重现性的考察

按照正交试验结果得出的最优生产工艺条件,重复实验6次,通过对各指标的测定,考察微球制备工艺的重现性。

### 1.4 微球载药量及包封率的测定

1.4.1 含量测定方法 采用紫外分光光度法,精密称取红霉素标准品,加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液稀释至 140  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,取此溶液 5 ml,加 0.25 mol/L 氢氧化钠溶液稀释至 10 ml,在 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴放置 30 min,取出,放冷至室温,在 200~400 nm 范围内扫描,发现在 236 nm 波长处有最大吸收,而空白微球在此波长范围内无紫外吸收,因此确定最佳测定波长为 236 nm。

1.4.2 标准曲线的建立 配制红霉素标准品系列浓度,按含量测定方法测定吸收度,将相应数据回归得标准曲线  $A = -0.00452 + 4.54464 C$  ( $\text{mg}/\text{ml}$ ),相关系数  $r = 0.99957$ ,红霉素溶液浓度在 70~190  $\mu\text{g}/\text{ml}$  范围内与吸收度呈良好的线性关系,方法回收率为  $98.86\% \pm 0.89\%$ 。

1.4.3 微球中红霉素含量的测定 精密称取红霉素微球,加定量 10% 水的乙腈溶液溶解微球中的聚乳酸,然后按含量测定方法测定吸收度,并利用标准曲线求出微球中红霉素含量。

载药量 = (微球中红霉素的含量/微球的总重量)  $\times 100\%$

包封率 = (微球中红霉素的含量/投药量)  $\times 100\%$

### 1.5 微球形态、粒径大小和分布的观察

用光学显微镜和电子扫描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、粒度分布和跨距,每次计数不少于 500 粒。

### 1.6 差示扫描热分析(DSC)验证微球的形成

取空白微球、空白微球和红霉素的机械共混物、载药微球样品 5~15 mg,在 0~80  $^{\circ}\text{C}$ ,以 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的升温速率加热,氮气氛围(100 ml/min),进行 DSC 分析,确定样品的玻璃化转变温度( $T_g$ )。

### 1.7 微球稳定性的考察

将红霉素微球密封于西林瓶中,分别置入冰箱 4  $^{\circ}\text{C}$  和室温(2025  $^{\circ}\text{C}$ ) 条件下贮藏三个月后,检查微球外观形态与药物的含量。

### 1.8 微球体外释药性能的考察

采用动态渗析法:精密称取红霉素微球 100 mg 置于透析袋内,加释放介质 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 3 ml 封口,置于装有 50 ml 释放介质的带塞锥形瓶中,于  $37 \pm 0.5$   $^{\circ}\text{C}$  条件下恒温搅拌(100 r/min),定时更换全部释放介质,释放介质按含量测定方法测定吸收度,并计算累计释放百分率。红霉素在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液中的标准曲线为  $A = -0.01182 + 4.396 C$  ( $\text{mg}/\text{ml}$ ),相关系数  $r = 0.9998$ ,回收率为  $100.12\% \pm 0.76\%$ 。

### 1.9 微球体内分布的考察

取健康新西兰兔 12 只,雌雄各半,体重为 2~2.5 kg,随机分为两组:微球组和溶液组,按 30 mg/kg 剂量耳静脉注射给药,微球组注射 5% 葡萄糖红霉素微球混悬液,溶液组注射红霉素注射剂,给药后 3 h 处死兔子,分别取出肺、肝、脾、心、肾各器官,滤纸吸干其水分和血迹,精密称重,加 pH 6.8 磷酸盐缓冲液制成 50% 匀浆液,精密量取 2 ml 匀浆液,加入  $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ -6 mol/L HCl (3.8:1.9:0.3) 混合液 6 ml,旋涡混合 2 min,15 000 r/min 离心 10 min,精密吸取上清液 5 ml,减压挥干,残渣用 pH 6.8 磷酸盐缓冲液定容至 10 ml,照中国药典中“抗菌素微生物检定法”<sup>[5]</sup> 测定各组织中药物的浓度。

## 2 结果

### 2.1 红霉素微球制备工艺的优选

$L9(3^4)$  正交实验的因素和水平设计如表 1 所示,实验结果表明最佳实验方案为  $A_3B_3C_1D_2$ ,即有机相中聚乳酸浓度为 10% (w/v),投药比(红霉素:聚乳酸)为 0.5:1 (w/w),扩散介质明胶的浓度为 0.2% (w/v),搅拌的转速为 900 (r/min)。

优选工艺为:将红霉素和聚乳酸按 0.5:1 的重量比共溶于有机溶媒二氯甲烷中,取 3 ml 缓慢加到 40 ml 分散介质甘油中,并以 900 r/min 的搅拌速度搅拌 10 min,再将其倾入 200 ml 扩散介质 0.2% 的明胶水溶液中,搅拌 30 min 后,以 1000 r/min 离心收集微球,蒸馏水洗涤,过滤,常压干燥即得。

按优化工艺制备红霉素微球,并重复 6 次,结果得到微球的平均粒径为  $10.98 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ,平均跨距为  $1.365 \pm 0.10 \mu\text{m}$ ,平均载药量为  $24.16\% \pm 0.51\%$ ,平均包封率为  $63.54\% \pm 0.58\%$ ,说明微球制备工艺的重现性良好。

Tab 1. The orthogonal test design

Lever	Factor			
	A(w/v)	B(w/w)	C(w/v)	D(r/min)
1	2	0.2:1	0.2	1200
2	5	0.8:1	0.5	900
3	10	0.5:1	1	300

A. polylactic acid concentration; B. drug proportion;  
C. gel concentration; D. stirring speed

2.2 微球形态、粒径大小和分布

红霉素微球呈白色粉末状,流动性好,在光学显微镜和电子扫描显微镜下观察(图 1),微球外观圆整,分散性好,大小均匀。大部分微球中有非均匀分散的黑色不透光区,可能是载药量较高,药物以微晶形式存在聚乳酸骨架中。平均粒径为  $10.98 \pm 0.15 \mu\text{m}$ ,粒径在  $5 \sim 20 \mu\text{m}$  的占总数的 94% 以上。

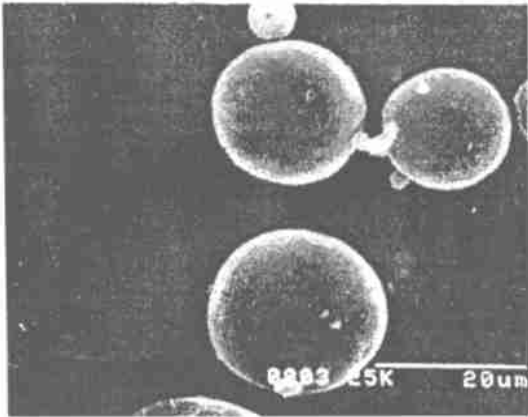


Fig 1. The SEM of erythromycin microspheres

2.3 差示扫描热分析(DSC)

空白微球的玻璃化温度 ( $T_g$ ) 是  $48.17^\circ\text{C}$ ,空白微球与红霉素的机械共混物  $T_g$  是  $48.79^\circ\text{C}$ ,载药微球  $T_g$  是  $56.85^\circ\text{C}$ 。可见空白微球和空白微球与红霉素的机械共混物的  $T_g$  相近,而载药微球的  $T_g$  较空白升高了  $8^\circ\text{C}$  多,说明药物被包进微球中,而不是吸附在微球表面。空白微球、空白微球与红霉素机械共混物以及载药微球的热流-温度曲线如图 2 所示。

2.4 微球的稳定性

红霉素微球于冰箱  $4^\circ\text{C}$  和室温 ( $2025^\circ\text{C}$ ) 条件下贮藏三个月后,含药量和外观形态几乎均无变化,因此红霉素微球具有良好的稳定性。

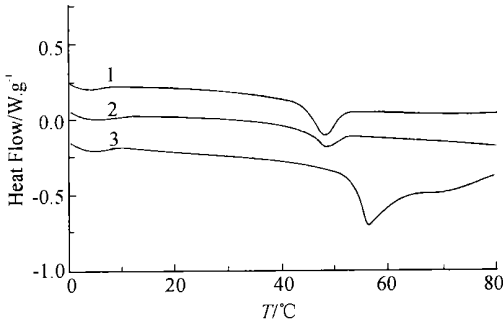


Fig 2. Heat flow-temperature curve of the microspheres  
1 PDLA-MS, 2 Mixture of Erythromycin and PDLA-MS, 3 RY-PDLA-MS

2.5 微球体外释药性能

红霉素微球的体外释药情况见图 3,8 d 累积释药量约为 80%, $T_{1/2}$  为 27.9 h,说明红霉素制成微球具有明显的缓释作用。微球在最初的 6 h 释药量达 26.56%,说明有一定的突释作用,之后逐渐转化为缓释过程。按 Higuchi 方程以累计释药量百分率  $Q$  对时间  $t^{1/2}$  图,经回归处理得直线方程:  $Q=28.067+3.8515t^{1/2}$ ,  $r=0.9834$ ,因此微球释药符合长效制剂特征。

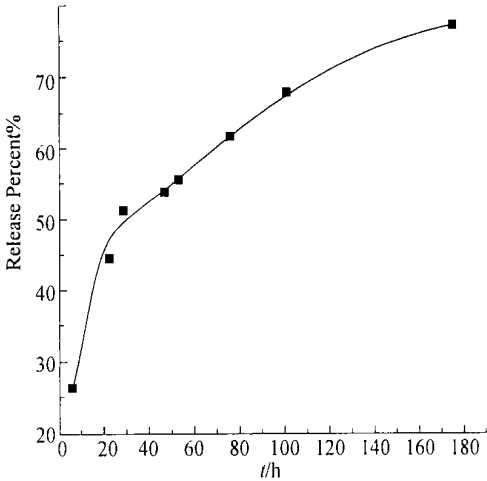


Fig 3. In vitro erythromycin microspheres release

2.6 红霉素在兔各组织中分布的考察

兔耳静脉注射 5%葡萄糖红霉素微球混悬液和红霉素注射液后,药物在兔各组织中的分布见图 4,结果显示,微球组药物在肺中的浓度最高,是溶液组组织浓度的 2.2 倍,而在其它器官中的浓度却较低。溶液组药物在肝脏中的浓度最高,心、肝、肾

中药物的浓度均大大地高于微球组各器官。可见红霉素制成聚微球后,增加了药物在肺中的分布,减少药物对其它器官的毒性。

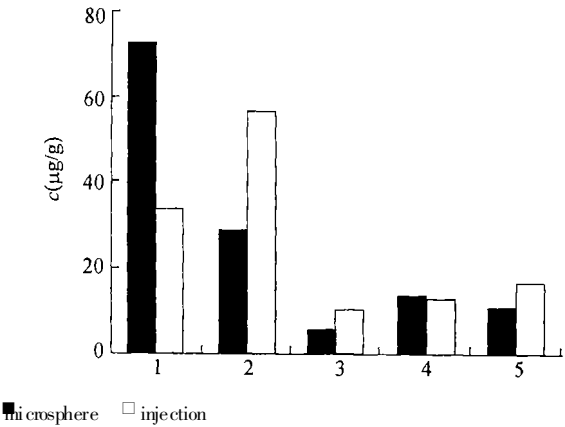


Fig 4. The concentration in different tissues of rabbits after injecting 3 hour.

1. Lung; 2. Liver; 3. Heart; 4. Spleen; 5. Kidney

3 讨 论

作为肺靶向药物,关键是控制微球的大小,使其静脉注射后,可机械截留于肺部,提高肺部药物浓度,文献报道粒径在 7~12 μm 的微球有良好的肺靶向性<sup>[4]</sup>。

采用有机相分散-溶媒扩散二步法制备红霉素聚乳酸微球,选择合适的有机溶媒、分散介质、扩散介质是微球形成的前提<sup>[7]</sup>。

我们采用有机相分散-溶媒扩散二步法制备红霉素微球,实验结果表明以二氯甲烷为有机溶媒、甘油作为分散介质、明胶水溶液作扩散介质、有机相-分散相-扩散相为 3:40:200 时,形成的微球疏松、产率较高、粒径均匀、不粘连,且载药量大。通过 L9(3<sup>4</sup>) 正交实验设计,进一步确定了最佳工艺条件为有机相中聚乳酸浓度为 10% (w/v),投药比(红霉素:聚乳酸)为 0.5:1 (w/w),扩散介质明胶的浓度为 0.2% (w/v),搅拌的转速为 900 (r/min)。此优化工艺重现性好,制备出的红霉素微球形态圆整,流动性好,性质稳定,载药量、包封率分别为 24.16%±0.51% 和 63.54%±0.58%,平均粒径为 10.98±0.15 μm,其中 520 μm 的微球占 94% 以上,

满足肺靶向的要求。

红霉素微球的体外释药性能为 8 d 累积释药量约为 80%,  $T^{1/2}$  为 27.9 h, Higuchi 方程为  $Q=28.067+3.8515t^{1/2}$ ,  $r=0.9834$ ,说明释药符合长效制剂特征。

对于靶向药物制剂,不能如普通制剂一样用血药浓度,而应用靶区药物浓度来衡量药物的治疗效果和生物利用度<sup>[8]</sup>,所以本试验通过考察药物在各组织中的分布,来评价红霉素微球的肺靶向性。兔耳静脉注射 5% 葡萄糖红霉素微球 3 h 后,药物在肺组织中浓度最高,而心、肝、肾中的浓度较低,而静脉注射红霉素注射液后,心、肝、肾中的药物浓度较微球组高很多,但肺组织中的浓度却只是微球组的 1/2.2,说明红霉素微球的肺靶向性很好,有利于提高药物的疗效和降低毒副作用。

本研究以生物可降解材料聚乳酸 (PDLLA) 为载体,制备了肺靶向红霉素聚乳酸缓释微球,其制备工艺稳定,各项质量指标良好,且具有明显的缓释作用和肺靶向性。

参 考 文 献

[1] 陈新谦等主编. 新编药理学[M] (第 14 版). 北京: 人民卫生出版社, 1997: 78-79.

[2] Prior S, Gamazo C, Irache JM, et al. Gentamicin encapsulation in PLA/ PLGA microspheres in view of treating Brucella infections. *Int J Pharm*, 2000, **196**(1): 115-25

[3] 陆 彬主编. 药物新剂型和新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 229-230

[4] Yang Q, Owusu AG. Biodegradable progesterone microsphere delivery system for osteoporosis therapy. *Drug Dev Ind Pharm*, 2000, **26** (1): 61-70.

[5] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000 版, 附录 80 页.

[6] 王槐芾 (Wang SF), 陈茂蓉 (Chen MR). 几种抗菌药物新剂型药代动力学研究概况[J]. 医药导报 (*Acta Pharm Sin*), 2000, **19** (6): 541-543

[7] 陈建海 (Chen JH), 陈 昆 (Chen K), Shagufu M 等. 新型可降解聚酯材料地西洋缓释微球的研制[J]. 药学报 (*Acta Pharm Sci*), 2000, **35**(8): 613-616.

[8] 徐超群 (Xu CQ), 张志荣 (Zhang ZR), 何 勤 (He Q) 等. 米托蒽醌聚乳酸缓释微球冻干针剂动物体内靶向性研究[J]. 华西药学报 (*West China J Pharm Sci*), 2000, **15**(3): 164-169

# Study on the Erythromycin Polylactic Acid Microspheres for Lung Targeting

YANG Fan, LIN Yin, TAN Zai-You, ZHAO Yao-Ming<sup>\*</sup>, MAI Hang-Zhen<sup>\*</sup>

Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510224; College of Materials, South China University of Technology, Guangzhou 510640

**ABSTRACT** **AIM** The purpose is to optimize the preparation of sustained release microspheres of erythromycin using the biodegradable materials-poly(lactic acid) (PDLLA) for lung targeting. **METHODS** The orthogonal test design was used to optimize the technology of preparation with good reproducibility. The surface morphology of the microspheres was observed by scanning electron microscope. The formation of the drug microspheres was confirmed with DSC. The mean diameter and the size distribution of microspheres, the drug loading, the incorporation efficiency, the reappearances of pharmaceutical technology, drug release *in vitro*, stability and tissue distribution after intravenous administration were examined. **RESULTS** Erythromycin poly(lactic acid) microspheres were regular in their morphology. Drug was enveloped in microspheres but not physically mixed with PDLLA. The average particle size was 11.65  $\mu\text{m}$  with over 94% of the microspheres being in the range of 520  $\mu\text{m}$ ; the drug loading and the encapsulated ratio were 18% and 60% respectively. The reappearance of pharmaceutical technology was good. The microspheres were stable for three months at 4  $^{\circ}\text{C}$  and room temperature. The *in vitro* release properties could be expressed by the Higuchi's equation:  $y = 28.067 + 3.8515t^{1/2}$  ( $r = 0.9834$ ). Compared with injective solution, the drug in microspheres was more concentrated in lung tissue. **CONCLUSION** The technology of preparation was successful and erythromycin poly(lactic acid) microspheres showed significant sustained release and lung targeting.

**KEY WORDS** Erythromycin; Poly(lactic acid); Microspheres; Lung targeting

## 中国化学制药工业的发展重点

据中国化学制药工业协会信息,今后我国化学制药工业发展重点与重点工作是:

### 生物技术药物

现代生物技术产业是全球重点发展的产业,目前生物技术应用首先在农业和医药领域。我国生物技术从 863 计划开始,药品生产已有一定基础,已有 15 种产品投产。许多科研单位、大专院校参与生物技术药品的研究工作,除国有企业外,也涌现出一批有实力的民营企业。不少省市把生物技术药品作为发展重点,因而此过程中要加强协调,提倡分工合作,防止重复科研和重复生产。

### 绿色药品

世界崇尚自然,崇尚天然药物。中药历史悠久,我国拥有使用天然药物的久远历史,有丰富的药用植物资源,有发展植物药的优势。

据资料报道,全世界药物市场上,由天然物质制成的药品已占 30%,国际植物药市场份额已达 270 亿美元。

国家提出中药现代化战略,同时大力开发植物新药,不仅供应国内需要,还可走向世界。加入 WTO,是中药和植物药走向世界的良好机遇。

### 蓝色药品

海洋资源利用已为世界所重视。海洋物种已鉴定为 20278 种,其中有的可利用或开发成海洋药物,中药中就有 100 多种海洋药物。

我国有 300 多万平方公里领海,有丰富的海洋药物资源。国内许多大专院校都从事海洋药物研究工作,已取得一些成果。从海洋湖泽资源开发药品、滋补营养品有良好的前景。

(下转第 244 页)