

依托泊苷明胶微球的制备

姚瑶,陶昱斐,丁燕飞,杨芳 (中南大学药学院, 湖南 长沙 410078)

摘要:目的 制备难溶性药物依托泊苷 (VP-16)明胶微球,并对其形态学性质和载药特性进行研究。方法 以 PVP为分散介质,采用加液研磨法制得难溶性药物依托泊苷固体分散体,通过正交试验设计,筛选乳化缩聚法制备肺靶向依托泊苷明胶微球的最佳制备工艺。结果 微球平均粒径为 $17.21\mu\text{m}$,其中 $10\sim30\mu\text{m}$ 的占 89.58%,载药量为 $(20.94\pm0.13)\%$,药物包封率为 $(86.27\pm0.65)\%$ 。结论 以 PVP为载体将药物制成固体分散体后再用乳化缩聚法制得的依托泊苷明胶微球外观均匀圆整,分散性良好,粒径分布符合肺靶向要求,载药量较高。

关键词: 依托泊苷; PVP; 明胶微球; 正交试验

中图分类号: R943.4; R979.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)03-0219-03

Preparation of etoposide-loaded gelatin microsphere

YAO Yao, TAO Yu-fei, DING Yan-fei, YANG Fang (School of Pharmaceutical Science of Central South University, Changsha 410078, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To select an efficient procedure to prepare the etoposide-loaded gelatin microsphere (VP-GMS) and to study the properties of its morphology and drug loading. **METHODS** Use PVP as dispersion base milled with liquid to make the unsoluble etoposide microcrystalline. Carry out experiments following orthogonal design, use all balanced datas of the distribution of the diameter, drug loading and the degree of nonadhesion to find the optimum procedure of emulsion polycondensation techniques. **RESULTS** The VP-GMS produced by the selected procedure had a mean diameter of $17.21\mu\text{m}$, including 89.58% of them ranging from $10\mu\text{m}$ to $30\mu\text{m}$. The drug loading was about 20.94% and the embedding ratio was 86.27%. **CONCLUSION** The VP-GMS prepared by emulsion polycondensation techniques is regular in its morphology with a high drug loading. The diameter distribution conforms to the requires.

KEY WORDS: etoposide; PVP; gelatin microsphere; orthogonal test

微球作为抗肿瘤药物靶向制剂研究已有广泛报道。通过控制微球粒径大小,可以使药物浓集靶区,达到提高疗效,降低不良反应的目的^[1,2]。药物尤其是难溶性药物的粒径控制将直接影响微球粒径及其靶向性。本实验以难溶性抗肿瘤药物依托泊苷^[3] (etoposide)为肺靶向模型药物,采用价廉易得、天然可生物降解的明胶为载体材料,以亲水性材料 PVP为固体分散介质^[4,5],通过加液研磨使药物与载体充分结合并分散,能有效控制药物粒径,再用乳化缩聚法获得含 89.58%较理想粒径范围 $10\sim30\mu\text{m}$ 的依托泊苷肺靶向微球。

1 仪器与材料

752-紫外光栅分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司);依托泊苷 (自制,纯度 $>98\%$); PVP_{K30} (上海化学试剂站进口分装);蓖麻油 (广州医药化学试剂公司经销,化学纯);明胶 (上海明胶厂,药用);异丙醇、戊二醛等试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 依托泊苷明胶微球的制备

2.1.1 制备方法 将依托泊苷与亲水性高分子材料 PVP以 1:0.5 比例混匀,加蒸馏水适量充分研磨,使药物与载体以氢键等作用力结合形成固体分散体,显微镜下观察药物由粗柱

状结晶转变成絮状无定形微晶,控制粒径在 $5\mu\text{m}$ 以下。加入温热的 10%明胶水溶液进一步研磨制成均匀的药物明胶混悬液。然后缓缓滴入一定搅拌速度的含 2%表面活性剂的油相中 (50°C 恒温),制成稳定的 W/O 型乳剂。系统冰浴降温,乳剂内相胶凝,加入 2%戊二醛-异丙醇溶液适量,交联固化 3h,离心沉降得载药微球。所得微球用异丙醇离心洗涤两次,乙醚洗涤 3 次,自然风干,即得。

2.1.2 正交设计工艺优化 通过单因素考察,以微球球形、粒径及粒径分布为指标,确定药物与 PVP 的比例为 2:1,搅拌速度为 250 r/min。经总结文献资料和预试验的结果,筛选药物与明胶的比例、明胶浓度、水与蓖麻油的比例及乳化时间四个主要影响因素,每个因素 3 个水平,见表 1,进行正交试验。

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素及水平设计表

水平	因素			
	明胶浓度 (%) (A)	水:蓖麻油 (B)	药物:明胶 (C)	乳化时间 (min) (D)
1	5	1:15	1:1	10
2	10	1:30	2:1	20
3	15	1:40	1:2	30

以 10 ~ 30 μ m 微球粒径分布的百分数、微球载药量、微球的不粘连数为考察指标,每批考察 500 个微球,参考文献统计方法^[6],进行综合评分。综合评分处理公式为:

$$d_i = \frac{Y_i - Y_{min}}{Y_{max} - Y_{min}} \quad DF = (d_1 \cdot d_2 \cdot d_3)^{1/3}$$

公式中 Y_i 为三项指标的实验测得值; Y_{max} , Y_{min} 为可接受的 Y_i 的最大值、最小值,可根据文献资料和实验经验设定,三项指标可接受的最大、最小值见表 2; d_i 为单个指标的优化指数; DF 为三项指标的总优化指数。由每次实验测得的 Y_i 及设定的 Y_{max} , Y_{min} 可计算出 d_i , 进而求得 DF。结果见表 3。

表 3 正交实验结果

Tab 3 The results of the orthogonal test

试验号	列号				结果 (Y_i)			
	1	2	3	4	粒径分布	载药量	不粘连数	综合评分
	A	B	C	D	(40% ~ 90%)	(5% ~ 25%)	(60% ~ 90%)	(DF)
1	1	1	1	1	83	10.3	63	27.5
2	1	2	2	2	59	6.6	80	27.5
3	1	3	3	3	46	15.5	73	30.0
4	2	1	2	3	68	7.4	68	40.0
5	2	2	3	1	70	18.4	63	35.0
6	2	3	1	2	87	6.2	87	37.5
7	3	1	3	2	54	13.7	63	22.5
8	3	2	1	3	60	10.1	70	32.5
9	3	3	2	1	67	10.5	69	40.0
I	85.00	90.00	97.50	102.50				
II	112.50	85.00	87.50	102.50				
III	95.00	107.50	107.50	87.50				
I	28.35	30.00	31.50	34.15				
II	37.50	31.65	29.15	34.15				
III	31.65	35.85	35.85	29.15				
Rj	9.15	5.85	6.75	5.00				

后,在光学显微镜下观察,微球外观圆整,大小较均匀,分散性良好,较少粘连。

2.2.2 微球粒径及分布 在光学显微镜下用测微尺目测三批微球直径,每批不少于 500 个微球,以每隔 5 μ m 球径为一组分为 7 组,按公式: $D_{av} = \frac{n_1 d_1 + n_2 d_2 + \dots + n_n d_n}{n_1 + n_2 + \dots + n_n} = \frac{\sum (nd)}{\sum n}$ (式中 n 为每组微球数, d 为每组微球直径的中间值),计算微球的平均粒径为 17.21 μ m,粒径范围在 10 ~ 30 μ m 的数目占 89.58%。粒径分布结果见表 4。

表 4 依托泊苷明胶微球粒径分布情况

Tab 4 Particle diameter distribution of VP-GMS

粒径范围 / μ m	微球个数	百分率 %
<5	14	2.76
5 ~ 10	30	5.92
10 ~ 15	133	26.23
15 ~ 20	201	39.64
20 ~ 25	68	13.41
25 ~ 30	54	10.65
>30	9	1.80
合计	509	100.00

表 2 三项指标可接受的最大、最小值

Tab 2 The maximum and the minimum value of the three items

指 标	Y_{min}	Y_{max}
10 ~ 30 μ m 微球粒径分布的百分数 (%)	40	90
微球载药量 (%)	5	25
微球的不粘连数 (%)	60	90

综合评分结果表明,四因素中以因素 A 明胶浓度影响最大,其次为药物明胶配比,水油比值,及乳化时间。制备工艺优化结果为 $A_2 B_3 C_3 D_1$ 。

2.2 依托泊苷明胶微球的形态学性质

2.2.1 微球的外观形态 按最佳工艺制得微球用水分散

2.3 依托泊苷明胶微球的载药特性

2.3.1 标准曲线的制备 将依托泊苷氯仿溶液在波长 200 ~ 400nm 范围内扫描,在 285nm 处有最大吸收。而 PVP 氯仿溶液在此无吸收,不干扰测定,故以 (285 $\pm$ 1) nm 为检测波长。精密称取依托泊苷 25mg 于 100mL 量瓶中,氯仿定容。配制系列浓度溶液,以氯仿为空白,在波长 285nm 处测定吸光度,以 A-C 回归,求出标准曲线方程为 $A = 0.0063C + 0.0154$ ($r = 0.9999$,线性范围为 20 ~ 120 μ g/mL)。

2.3.2 回收率测定 精密称取依托泊苷、空白微球及 PVP 适量于 50mL 量瓶中,加 10% HCl 10mL,60 ~ 70 $^{\circ}$ C 水浴超声 1h。精密加入氯仿 20mL 萃取,离心,精密吸取氯仿层 1mL 于 10mL 量瓶中定容,以氯仿作空白,在 285nm 处测吸光度,按标准曲线方程计算回收率。测得低、中、高不同加入量的平均回收率为 (100.54 $\pm$ 1.32)%。

2.3.3 依托泊苷明胶微球载药量的测定 精密称取依托泊苷明胶微球 50mg 于 50mL 量瓶中,按回收率方法降解后测定吸光度,按标准曲线方程计算微球载药量。另取微球直接用氯仿萃取,过滤,取滤液测得微球表面吸附量,计算得到球内含药量。再以微球球内含药量与微球总的载药量之比计

算药物包封率^[1]。根据微球实测药物百分含量与理论药物百分含量的百分比计算微球的包封产率^[7],结果见表5。

表5 依托泊苷明胶微球载药量和包封率

Tab 5 The drug-loading and the embedding ratio

批号	载药量 (%)	表面吸附量 (%)	包封率 (%)	包封产率 (%)
20020618	20.95	2.73	86.97	62.79
20020619	20.80	2.87	86.20	62.85
20020620	21.06	3.02	85.66	62.70
$\bar{x} \pm s$	20.94 ± 0.13	2.87 ± 0.15	86.27 ± 0.65	62.78 ± 0.07

3 讨论与结论

采用乳化缩聚法制备难溶性药物肺靶向明胶微球(粒径7~30μm),控制药物粒径是制备微球的关键。作者借助亲水性载体PVP的作用,将依托泊苷与不同比例PVP充分研磨,使药物与载体以氢键、络合及静电等作用力结合形成固体分散体,使依托泊苷药物晶形由粗柱状结晶转变成絮状微晶,有效地控制药物粒径在1~5μm左右。药物与PVP比例在1:0.2~0.5均可达到理想效果,PVP比例太小,药物结晶转形不完全,比例太大则导致微球粘连。微粉化后的药物微晶由于载体的分散作用,不产生聚集。另外,由于PVP的亲水性,改善了依托泊苷与明胶的亲合力,使药物在明胶水溶液中得到很好的分散。而且,固体分散体的形成,较大程度增加了依托泊苷的溶出度^[8],有利于提高药物生物利用度。实验表明,所制得的微球外观球形及粒径分布较为理想。为难溶性药物明胶微球的制备提供了一种有效的粒径控制方法。

明胶固化通常采用甲醛或戊二醛^[9],由于依托泊苷在碱性条件下不稳定,故采用戊二醛在中性介质交联固化。以2%戊二醛-异丙醇溶液作为固化剂,控制W/O型乳剂冷却速度及固化剂加入速度,5~10℃搅拌固化3h,能得到分散性

好、粘连度低的微球。

依托泊苷为难溶性药物,作者以水溶性高分子材料PVP为分散介质,将药物与PVP制成固体分散体微粉化后再混悬于明胶溶液中,通过正交试验筛选,用乳化缩聚法制得依托泊苷明胶微球。该微球载药量较高,外观圆整,粒径分布在肺靶向微球要求范围内。

参考文献

[1] 曾凡彬,杨红,陆彬,等. 盐酸川芎嗪肺靶向微球的研究[J]. 药学报, 1996, 31(2): 132.

[2] Illum L, Davis SS. The targeting of drugs parenterally by use of microspheres. [J]. J Parenter Sci Technol, 1986, 36(1): 242.

[3] Aisner J, Lee E. Etoposide: Current and future status [J]. Cancer, 1991, 67(Suppl1): 215.

[4] Morita T, Sakamura Y, Horikiri Y, et al. Applicability of various amphiphilic polymers to the modification of protein release kinetics from biodegradable reservoir-type microspheres [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2001, 51(1): 45.

[5] Morita T, Horikiri Y, Suzuki T, et al. Preparation of gelatin micro-particles by co-lyophilization with poly(ethylene glycol): characterization and application to entrapment into biodegradable microspheres [J]. Int J Pharm, 2001, (1): 127.

[6] 徐希明,张钧寿. 微球给药系统的工艺优化研究 [J]. 中国现代应用药学, 1999, 16(3): 1.

[7] 李凤前,胡晋红. 喷雾干燥环丙沙星白蛋白微球的载药量和包封产率 [J]. 中国抗生素杂志, 2001, 26(4): 256.

[8] Shah J, Chen J. Increased solubility and dissolution rate by etoposide solid dispersions [J]. Int J Pharm, 1995, 113(1): 103.

[9] 杨永新,李岩,孙殿甲,等. 交联固化对明胶微球质量的影响 [J]. 西北药学杂志, 2001, 16(1): 40.