

硫酸庆大霉素聚乳酸微球的制备 及其体外缓释度的测定

程青^{1,2}, 卢文庆^{1,2}, 聂素云³

(1. 南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏 南京 210097)

(2. 江苏省生物医药功能材料工程研究中心, 江苏 南京 210097)

(3. 南京大学固体微结构物理国家重点实验室, 江苏 南京 210093)

[摘要] 以硫酸庆大霉素为囊心物质, 采用复乳法制备了硫酸庆大霉素-聚乳酸微球(gentamycin sulfate-poly(lactic acid)-microspheres, GTMS-PLA-MS), 比较了不同制备条件下所得微球的差异. 扫描电镜(SEM)测试表明微球外观呈球形并且多孔, 两种条件下制备的微球平均粒径分别为 6.67 μm 和 11.70 μm , 药物包封率分别为 37.52% 和 49.19%. 用差热分析法(DTA)分析微球得知, 硫酸庆大霉素与聚乳酸两种物质相互融为一体. 以 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲溶液为释药介质, 用紫外分光光度法(UV)对载药微球的体外释药过程进行了试验. 结果表明, 微球在最初 20 min 有突释效应, 此后是缓慢释药, 最终累积释药量达 95% 以上.

[关键词] 硫酸庆大霉素-聚乳酸微球, 水包油包水型复乳, 体外缓释度

[中图分类号] O632 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)02-0055-04

Preparation of Gentamycin Sulfate-Polylactic Acid-Microspheres and the Determination of Its Release Rate in Vitro

Cheng Qing^{1,2}, Lu Wenqing^{1,2}, Nie Suyun³

(1. School of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2. Jiangsu Engineering Research Center for Bio-Medical Function Materials, Nanjing 210097, China)

(3. National Key Laboratory of Solid State Microstructure, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Polylactic acid-microspheres containing gentamycin sulfate (GTMS-PLA-MS) were prepared by an in-water drying method using a w/o/w emulsion. The comparisons between the two different microspheres were also made. It showed that the two kinds of GTMS-PLA-MS were both spherical in shape and porous in nature through Scanning electron micrograph. The particle sizes of GTMS-PLA-MS were analyzed and the average sizes of the two different microspheres were 6.67 μm and 11.70 μm respectively. The encapsulation efficiencies were 37.52% and 49.19%. The thermal behavior by differential thermal analysis indicated that gentamycin sulfate and PLA mingled each other. The determination of its release rate in vitro revealed it was in sustained release except an abrupt release in the initial 20 minutes. Its release rate in vitro was over 95%.

Key words: gentamycin sulfate-poly(lactic acid)-microspheres, w/o/w emulsion, release rate in vitro

0 引言

硫酸庆大霉素是一种抗菌素, 广泛用于敏感菌引起的系统感染或局部感染, 解除了无数患者的病痛. 但在临床应用中 also 带来一系列的毒副作用, 可出现耳中毒、肾中毒、血尿, 甚至过敏性休克后导致死亡, 降低了临床治疗效果. 本文以生物可降解的药用高分子缓释材料聚乳酸(PLA)为载体, 采用复乳法制备硫酸庆大霉素-聚乳酸多孔微球, 通过控制其粒径大小, 使此载药微球具有缓慢释放硫酸庆大霉素的功能, 从

收稿日期: 2005-09-16.

基金项目: 南京大学固体微结构物理国家重点实验室资助项目(M031810).

作者简介: 程青, 女, 1980—, 硕士研究生, 主要从事生物医药功能材料的学习与研究. E-mail: cqing51@126.com

通讯联系人: 卢文庆, 1953—, 教授, 主要从事材料化学的教学与研究. E-mail: luwenqing@njnu.edu.cn

而避免频繁给药,且在较长时间内维持体内有效的血药浓度,提高药效并降低毒副作用.其制备原理^[1-2]是选择一个与水不相混溶的沸点低、蒸气压比水高的溶媒,将聚乳酸溶于其中,将硫酸庆大霉素的水溶液分散在此溶液中,形成油包水型(w/o)乳剂.另外配制一个含保护胶的水溶液作为包裹溶液,在快速搅拌下,将此溶液加到上述乳剂中,形成水包油包水型(w/o/w)复乳.然后将此体系加热除去与水不相混溶的溶媒,再经分离、真空干燥等过程,聚乳酸溶液干燥成硬膜,包裹药物水溶液而成微球.硫酸庆大霉素的体外释药过程在 pH=7.4 的磷酸盐缓冲剂中进行.

1 实验部分

1.1 实验仪器和试剂

DC-2600 低温恒温槽, S-212 恒速搅拌器, 800 型离心机, DZF-3 型真空干燥箱, HITACHI U-3400 型紫外光谱仪, JEOL JSM-5610LV 型扫描电子显微镜, WCT-2A 型微机差热天平.

硫酸庆大霉素(产地 Amresco, 购自赛吉公司)、聚乳酸(PLA, 混旋, 相对分子质量 25 000, 购自山东医疗器械研究所)、二氯甲烷、明胶、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾(均为分析纯试剂, 购自晚晴公司)、实验用水为二次蒸馏水(自制).

1.2 实验步骤

1.2.1 GTMS-PLA-MS 的制备

内水相为硫酸庆大霉素的水溶液, 油相为溶解了 PLA 的 CH₂Cl₂ 溶液. 将油相慢慢注入激烈搅拌着的内水相, 并高速搅拌 100 min, 使其成为一个超细、均匀的 w/o 乳液. 待均匀乳液形成后, 将得到的乳液迅速冷却到 15℃, 以增加内水相和 w/o 乳液本身的粘度. 然后再将 100 mL 浓度为 5% 的明胶溶液用注射器注入搅拌着的乳液中, 以 500 r/min 的速度、恒温 15℃ 条件下继续搅拌一定时间后, 将该 w/o/w 乳液置于 45℃ 的恒温水浴中, 蒸去其中的 CH₂Cl₂. 1 h 后停止加热. 待乳液冷却后进行离心分离. 离心得到的固体用二次蒸馏水洗涤 2-3 次, 再离心分离. 最后将离心得到的固体置于表面皿上, 放进真空干燥箱中室温干燥若干天, 至固体粉末恒重为止. 制备时原料用量、搅拌时间及结果见表 1.

表 1 两种 w/o/w 型复乳的微球得率及包封率

内水相	油相	外水相	搅拌时间/	得率/	包封率/
硫酸庆大霉素水溶液/ (g/mL)	PLA 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液/ (g/mL)	5% 明胶溶液/ (mL)	h	%	%
0.096 6	0.199 4	100	3.0	41.74	37.52
0.099 6	0.200 4	100	1.0	10.53	49.19

1.2.2 形态观察和粒径测量

用 SEM 观察微球, 放大倍数分别为 400、500、1 000、2 000. 在不同的倍数下观察微球的形貌和表面状况, 根据 SEM 照片测量粒径并计数(每组样测微球不少于 100 个)^[3]. 根据公式(1)

$$d_{av} = \frac{n_1 d_1 + n_2 d_2 + n_3 d_3 + \cdots + n_n d_n}{n_1 + n_2 + \cdots + n_n} = \frac{\sum (nd)}{\sum n} \tag{1}$$

计算平均粒径($n_1, n_2, n_3, \cdots, n_n$ 是粒径为 $d_1, d_2, d_3, \cdots, d_n$ 的粒子数).

1.2.3 硫酸庆大霉素紫外吸收波长的选择

采用紫外分光光度法, 在 200-800 nm 范围内, 用 HITACHI U-3400 型紫外光谱仪分别对聚乳酸(5 mg/20 mL)、硫酸庆大霉素(5 mg/10 mL)及两者的混合磷酸盐水溶液进行紫外扫描, 以选择实验所需的测定波长. 扫描发现, 在 200-800 nm 波长范围内, 聚乳酸无紫外吸收, 其吸收曲线与基线基本重合, 硫酸庆大霉素和聚乳酸混合溶液的吸收曲线与硫酸庆大霉素的吸收曲线重合, 表明聚乳酸对硫酸庆大霉素的吸收无干扰. 最终选择 257 nm^[4] 为测定波长.

1.2.4 微球包封率及药物含量的测定

在 HITACHI U-3400 型紫外光谱仪上测得不同浓度的硫酸庆大霉素溶液在 257 nm 处的吸光度, 得到线性回归方程为 $A = -0.003\,18 + 0.018\,17c$ (mg/mL), 相关系数 $R = 0.993\,2$. 再称取适量载药微球, 置于 10 mL 配好的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ (pH=7.4) 溶液中, 搅拌并超声 30 min, 使所载药物充分释放溶解后, 离

心分离,取下层清液,在同样条件下测定其吸光度.并根据公式(2)计算其包封率:

$$\text{微球包封率} = \frac{\text{微球中药物总量}}{\text{投药量}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5 微球的 DTA 分析

取硫酸庆大霉素、聚乳酸、硫酸庆大霉素与聚乳酸的物理混合物,以及实验制得的 GTMS-PLA-MS 各 5 mg. 将上述四个样品分别进行 DTA 分析,每个样品重复 2 次. 实验条件为:DTA 量程 50 μA ,升温速率 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,气氛为静态空气,参比物为 Al_2O_3 .

1.2.6 微球的体外释药实验

硫酸庆大霉素的体外释药情况也是用 HITACHI U-3400 型紫外光谱仪测定的. 称取适量的 GTMS-PLA-MS,倒进透析袋,再移取 3 mL 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH} = 7.4$) 溶液于透析袋内,使 MS 悬浮于溶液中. 将透析袋系紧后放入盛有 100 mL 该缓冲溶液的锥形瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温磁力搅拌. 每隔一定时间,从锥形瓶中取出 3 mL 溶液,在检测波长为 257 nm 下测定其吸光度. 同时再补充 3 mL 新鲜的缓冲溶液于释药介质中.

2 结果与讨论

2.1 CH_2Cl_2 含量的检测

将合成的 GTMS-PLA-MS 样品委托南京师范大学分析测试中心检测 CH_2Cl_2 含量是否超标. 气相色谱检测结果为:样品中 CH_2Cl_2 含量为 0.04%,满足《中华人民共和国药典》^[5] (2005 年版) 药品中常见的残留溶剂 CH_2Cl_2 不超过 0.06% 的要求.

2.2 微球的形态观察

经过成球且干燥后,载药微球呈白色粉末状,在光学显微镜下观察,能看到微球呈较为完整的球形且分散性好,没有明显的聚集现象. 在扫描电镜下观察,球形良好,表面有一些微孔和凹陷,可能是溶剂 CH_2Cl_2 或水挥发所致,这也为微球内部的药物向球外溶液释放提供了通道(如图 1).

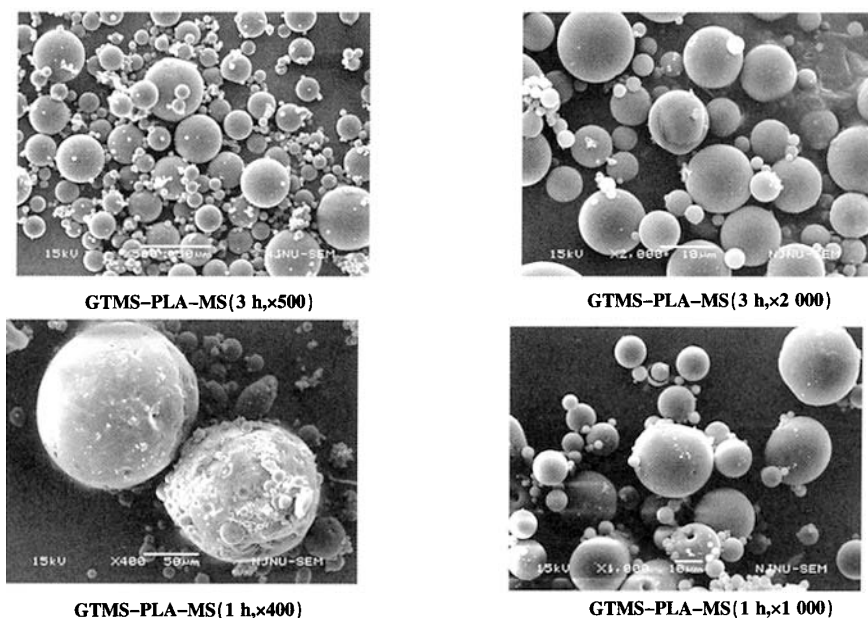


图 1 GTMS-PLA-MS 的 SEM 图

由图可知,搅拌 3 h 的样品 1 成球率高于搅拌 1 h 的样品 2. 样品 1 的粒径分布较样品 2 集中. 根据公式(1)计算可得:样品 1 的平均粒径 $d_{av1} = 6.67 \mu\text{m}$;样品 2 的平均粒径 $d_{av2} = 11.7 \mu\text{m}$. 可见,搅拌时间延长,粒径减小、成球率高、粒径分布集中、得率高(结果见表 1). 得率根据公式:得率 = $\frac{\text{得到的固体质量}}{\text{加入的固体总量}} \times$

100% 计算. 从表中可知, 粒径大的包封率大. 这是因为: 在粒径小的微球中, 由于其比表面大, 使得外水相和内水相的接触增加, 导致内水相中的药物易于扩散到外水相中, 减小了硫酸庆大霉素的包封率.

2.3 微球的 DTA 分析

由图2可以看出, 硫酸庆大霉素与 PLA 的物理混合物有明显的两个峰. 而在制备的 GTMS-PLA-MS 中, 两种产物都只有一个明显的峰. 这就说明制得的微球并不是两种物质的简单物理混合, 而是相互间融合在一起.

2.4 载药微球的体外释药分析

分别称取 26.5 mg 样品 1 GTMS-PLA-MS(3 h)、12.0 mg 样品 2 GTMS-PLA-MS(1 h), 按 1.2.6 所述的方法测定其体外释药情况. 结果见图3和图4.

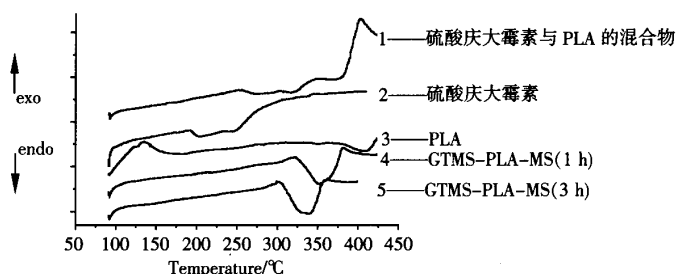


图2 差热分析比较图

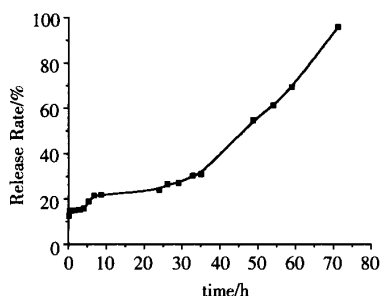


图3 GTMS-PLA-MS(3h)释放情况

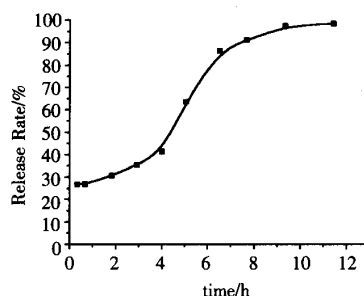


图4 GTMS-PLA-MS(1h)释放情况

由图3、4可以看出, 样品1的释放速度较样品2慢, 释药持续时间长. 样品1持续释药72 h, 样品2持续释药12 h, 而且样品1的释放较为平缓, 说明样品1更好地将硫酸庆大霉素包裹在 PLA 内部. 前20 min, 样品1的累积释药量为14.81%, 而样品2的累积释药量为26.88%, 说明样品2的突释作用较样品1明显. 72 h后样品1的累积释药量为95.88%, 12 h后样品2的累积释药量为98.33%, 两种微球中的药物基本释放完全.

3 结论

本研究采用复乳法制备了 GTMS-PLA-MS. 经 SEM 表征, 微球外观呈球形并且多孔, 两种条件下制得的微球平均粒径分别为 6.67 μm 和 11.70 μm , 药物包封率则为 37.52% 和 49.19%; 由样品的 DTA 分析知, 硫酸庆大霉素与 PLA 两种物质融为一体; 用 UV 法进行载药微球体外释药研究, 结果表明, 微球在最初阶段有突释效应, 此后是缓慢释药过程. 72 h 后, 最终累积释药量可达 95% 以上. 研究表明, 以复乳法制备的硫酸庆大霉素聚乳酸微球给药系统有很好的缓释作用.

[参考文献]

- [1] Yasuaki Ogawa, Masaki Yamamoto, Hiroaki Okada, et al. A new technique to efficient entrap leuprolide acetate into microspheres of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid[J]. Chem Pharm Bull, 1988, 36(3): 1095-1103.
- [2] 郭健新, 王荣. 以聚乳酸为聚合物材料制备微粒给药系统[J]. 药学进展, 1996, 20(3): 135-138.
- [3] 刘幽若, 范国强, 陆洪轩, 等. GB/T 19590-2004 超微细碳酸钙[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [4] Sivakumar M, Panduranga Rao K. Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite-gelation composite microspheres[J]. Biomaterials, 2002, 23(3): 3175-3181.
- [5] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[责任编辑: 丁蓉]