

感染的一大类皮肤病的简称。该病属常见病、多发病,在湿热地区人群患病率可高达 20% 以上。引起皮肤真菌感染的病原菌有许多种,针对异性抗原,机体常对侵入皮肤的病原真菌产生较明显的变态反应。临床上可表现为湿疹皮炎样外观、瘙痒、癣菌疹,严重的可继发细菌感染。复方硝酸益康唑乳膏,既有广谱高效的抗病原真菌和革兰阳性细菌的活性,又有明显的抗炎抗过敏作用,将会受到医患双方

的欢迎,有着较大的市场应用潜力。

参考文献:

- [1] Heel R C, Brogden R N, Speight T M, et al. Econazole: A review of its antifungal activity and therapeutic efficacy [J]. *Drugs*, 1978, 16 (3): 177-201.
- [2] 刘伟. 皮康霜中醋酸曲安奈德和硝酸咪康唑的 HPLC 测定 [J]. *中国医药工业杂志*, 1995, 26(3): 130-133.

低分子肝素聚乳酸-羟基乙酸缓释微球的研制

周采菊, 李立方

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457)

摘要:目的 制备低分子肝素聚乳酸-羟基乙酸(LWMH-PLGA)缓释微球,观察微球表面形态,检测微球物理性能和体外释药行为。方法 采用 $W_1/O/W_2$ 复乳溶剂挥发法制作微球;通过扫描电镜观察微球的表面形态结构;利用天青 A 比色法测试微球中药物的载药量和包封率,并对微球中药物的体外释放行为进行研究。结果 微球表面显现较多的孔隙,平均粒径为 $(2.55 \pm 0.94) \mu\text{m}$,载药量为 $(14.79 \pm 1.03) \%$,包封率为 $(55.7 \pm 2.21) \%$;48 h 的体外释放试验表明,LWMH 累积释放率达到 40%。结论 LWMH-PLGA 微球能够稳定地释放药物 LWMH,验证了 PLGA 微球作为 LWMH 控制释放载体的可行性。

关键词: 低分子肝素;聚乳酸-羟基乙酸微球;缓释

中图分类号:R944.9 文献标识码:A 文章编号:1005-1678(2012)05-0600-03

Research and development of LWMH-PLGA controlled-release microspheres

ZHOU Cai-ju, LI Li-fang

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Purpose To prepare LWMH-PLGA microspheres and to investigate the characteristics. **Methods** The LWMH-PLGA microspheres were prepared by $W_1/O/W_2$ multiple emulsion volatilizing method, the morphology was investigated using scanning electron microscope (SEM) and the UV-Vis method was used to establish the regression equation and to detect the drug loading amount and encapsulation efficiency as well as sustained-release profile *in vitro*. **Results** The microsphere surfaces seemed to be with sporadic pores and uniform with mean particle size of $(2.55 \pm 0.94) \mu\text{m}$. The drug loading amount and encapsulation efficiency were $(14.79 \pm 1.03) \%$ and $(55.7 \pm 2.21) \%$, respectively. The accumulative release ratio was up to 40% in the continuous period of two days. **Conclusion** The LWMH-PLGA microspheres have better pharmaceutical properties and sustained release effect *in vitro*.

Key words: LWMH; PLGA microspheres; sustained release

收稿日期: 2011-07-19

作者简介: 周采菊,女,副教授,硕士,从事药物分析研究, Tel: 022-60601268, E-mail: zhoucj@tust.edu.cn.

低分子肝素(LMWH)因其具有分子小、易吸收、抗血栓作用强、出血副作用小、生物利用度高、半衰期长、与血浆蛋白及血小板结合率低等特点^[1],引起了人们的极大兴趣。但由于其表面带有负电荷

以及在体内不稳定等,需要频繁的注射给药。聚乳酸-羟基乙酸 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 微球控释系统适用于半衰期短或口服生物利用度低而又需要长期使用的药物。对于需要长时间内持续给药的肝素,PLGA 微球控释系统是相当理想的载药系统^[2]。

由于 LMWH 表面带负电荷以及药物本身易溶于水,致使其制剂包封率较低和不稳定。如果将带负电荷的药物与阳离子聚合物或表面活性剂包合,其包封率可能得到提高。为此,本文在内水相中加入阳离子表面活性剂聚乙烯亚胺(PEI)以增加 LMWH 的包封率。

1 材 料

LMWH(钠盐),河北常山生化药业股份有限公司;天青 A,沈阳市试剂三厂;西黄耆胶,郑州诺永信商贸有限公司;PLGA(50:50)(平均分子量 25 000),济南岱罡生物科技有限公司;PVA,天津市元立化工有限公司;PEI,国药集团化学试剂有限公司;其他试剂均为分析纯。

A200-42G 高速匀浆机,上海光学仪器六厂;TU-1810 紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;TDL-5Z 台式离心机,河南圣科科学有限公司;CR22G III 冷冻离心机,Hitachi Koki Co., Ltd.;SU1500 扫描电子显微镜,日本日立公司;90Plus 激光粒度仪,美国 BROOKHAVEN 公司

2 方 法

2.1 LMWH-PLGA 微球的制备

采用 $W_1/O/W_2$ 乳化蒸发法制备包埋 LMWH 的 PLGA 微球^[3-4]。将 LMWH 50 mg 溶解于水 1 mL,作为内水相,同时加入 2% PEI 到内水相中;PLGA 250 mg 溶于二氯甲烷 5 mL 中作为有机相;将内水相逐滴注入有机相中,高速搅拌 3 min 形成初乳(W_1/O)。然后将该初乳加到 0.5% PVA 溶液(外水相) 25 mL 中,乳化形成复乳($W_1/O/W_2$)。然后将制得的复乳倒入烧杯中磁力搅拌 12 h,使二氯甲烷挥发完全,离心、洗涤 3 次,直至将多余的 PVA 清除。-20 °C 冷冻保存至少 48 h;冷冻干燥 24 h,即得 LMWH-PLGA 微球。同法制备空白微球。

2.2 正交试验设计

通过预试验,选取内水相体积,有机相 PLGA 浓度,外水相 PVA 浓度,表面活性剂 PEI 浓度 4 个因素,设计了 4 因素 3 水平正交实验,以包封率为指标进行评价。通过 $L_9(3)^4$ 正交试验设计优选微球最佳制备工艺条件,因素水平表见表 1。

表 1 正交实验因素水平表

Tab. 1 Factor level in orthogonal designing experiments

因素	水平 1	水平 2	水平 3
A: 水体积/mL	0.25	0.5	1
B: PLGA 浓度/%	4	5	6
C: PVA 浓度/%	0.5	1	2
D: PEI 浓度/%	0.5	1	2

2.3 LMWH-PLGA 的形态、粒径及其分布

2.3.1 微球表面形貌观察 微球的表面形态用扫描电子显微镜(SEM)来观测。将新制微球的悬浮液涂于玻璃片上,常温真空干燥,然后用双面胶粘于铝台上,经喷金处理后进行 SEM 分析。

2.3.2 微球粒度测定 微球的粒度分布用激光粒度仪进行测定。将微球冻干粉溶解于 1% PVA 溶液中进行测量。

2.4 天青 A 比色法测定 LMWH

2.4.1 标准曲线的绘制 参考文献[5],对天青 A 比色法的实验条件进行了优化,即分别取 LMWH 标准溶液(浓度为 3.1×10^{-2} mg/mL)各 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 和 3.5 mL,各以水补足至 5 mL,各加入 pH 8.6 的巴比妥缓冲液 1.0 mL,0.2% 西黄耆胶溶液 1.0 mL,摇匀后再各加入 0.072% 天青 A 染料 1.0 mL,摇匀放置 50 min 后于 498 nm 波长处测定吸光度(A)值。分别以标准 LMWH 的质量为横坐标、A 值为纵坐标,绘制标准曲线。

2.4.2 LMWH 微球药物含量与包封率的测定 LMWH 微球药物含量为 LMWH 的投料量减去离心并洗涤微球得到的外水相中未包封的 LMWH 量。即在 2.1 制备微球过程中,将二氯甲烷挥发完全后所得的溶液,在 10 000 r/min 离心 15 min,将上清液与 3 次洗涤微球所得液合并。按 2.4.1 项下的方法测定,同法处理空白微球,其滤液作为空白对照。药物含量(μ /mg) = 微球中 LMWH 量/微球的量;包封率 = (微球中 LMWH 量/LMWH 投料量) \times 100%。

2.5 微球中 LMWH 的体外释放行为研究

称取 LMWH 微球 50 mg,以含 0.1% 吐温 80 的磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.4) 10 mL 为溶出介质,于 37 °C、100 r/min 的恒温水浴振荡器中,分别在 1, 2, 4, 8, 12, 24 和 48 h 取出 0.5 mL,并补充 0.5 mL 介质。12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,按 2.4.1 项下的方法测定。由标准曲线计算出微球中 LMWH 的释放量,并计算累积释放率,得到微球中 LMWH 的体外释放曲线。

3 结 果

3.1 微球制备工艺的优化

正交试验结果见表 2。从正交结果分析可得, 影响因素 $A > C > D > B$, 所得最佳工艺条件为: $A_3B_2C_1D_3$ 。

表 2 正交实验结果及其统计学处理

Tab. 2 Results and analysis of orthogonal-designing experiments

No.	A	B	C	D	包封率/%
1	1	1	1	1	40.51
2	1	2	2	2	39.76
3	1	3	3	3	44.07
4	2	1	2	3	43.92
5	2	2	3	1	48.81
6	2	3	1	2	48.33
7	3	1	3	2	50.50
8	3	2	1	3	53.80
9	3	3	2	1	51.50
k_1	25.20	28.83	30.12	29.10	
k_2	29.13	29.07	27.09	27.90	
k_3	32.21	28.64	29.32	29.53	
R	7.007	0.430	3.024	1.630	

3.2 微球的形态与粒径

经 SEM 观察, LMWH-PLGA 微球表面分布着众多孔隙, 球形好, 形态及粒径大小较均匀, 如图 1。微球平均粒径为 $(2.55 \pm 0.94) \mu\text{m}$ 。

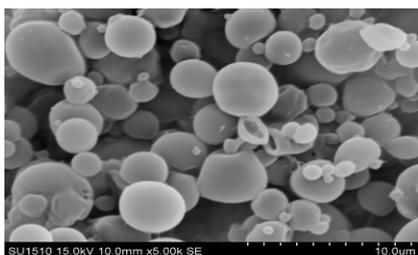


图 1 LMWH-PLGA 微球表面观形貌 SEM 图

Fig. 1 SEM image of LMWH-PLGA microspheres

3.3 标准曲线的建立

进行线性回归得标准曲线方程: $A = 1.5629C + 0.0527$, $r = 0.9965$ 。

3.4 微球载药量、包封率及体外释药行为

测定了制备的 4 批 LMWH 缓释微球的载药量和包封率, 结果见表 2。平均载药量为 $(14.79 \pm 1.03)\%$, 平均包封率为 $(55.7 \pm 2.2)\%$ 。LMWH 微球的体外释药曲线也显示, 微球在 48 h 内, 能够持续释放 LMWH, 且释放浓度比较稳定, 具有明显的缓释作用(图 2), LMWH 的累积释放率达 40% 较未加表面活性剂制得的缓释微球的释放率大大提高。

4 讨论

表 2 LMWH-PLGA 缓释微球载药量和包封率

Tab. 2 Drug loading amount and encapsulation efficiency of LMWH-PLGA microspheres

批号	药物含量/%	包封率/%
1	13.52	54.4
2	16.01	58.8
3	14.65	55.8
4	14.90	53.8

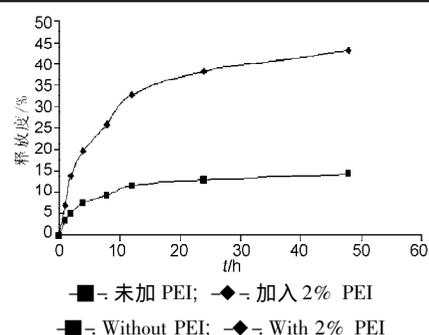


图 2 LMWH-PLGA 微球的体外释药曲线 ($n = 3$)

Fig. 2 Release profile of LMWH-PLGA microsphere *in vitro* ($n = 3$)

与在内水相中未添加 PEI 制得的微球相比, 添加 PEI 制得的 LMWH-PLGA 微球的含药量和包封率均有所增加; 48 h 体外释放试验表明, 释放率从 14.3% 提高到 43.4%。带有 PEI 微球的高包封率归因于带正电荷的 PEI 与带负电荷 LMWH 形成了静电复合物。实际上, 促使药物高包封率的关键因素是水相在有机相中乳化的均匀分散^[6]。

通过正交试验优化了 LMWH-PLGA 微球的制备工艺, 得到的最佳工艺条件: 内水相体积为 1 mL, 有机相 PLGA 用量为 5%, 外水相 PVA 浓度为 0.5%, 内水相中 PEI 浓度为 2%。在此条件下制备的 LMWH-PLGA 微球包封率在 40% 以上; 微球的表面显现较多的孔隙, 分布均匀; 体外释放试验结果表明, 该微球缓释效果良好。

参考文献:

- [1] 邹立家, 张天民, 王凤山, 等. 低分子肝素透皮吸收制剂及其吸收机理的研究[J]. 中国生化药物杂志, 1998, 19(5): 268-269.
- [2] 叶美娣, 郑彩虹. 乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)微球控释系统的突释[J]. 中国现代应用药学, 2005, 22(5): 371-374.
- [3] Amit R, Quamrul H M, Fakhru A. Inhalable large porous microspheres of low molecular weight heparin: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. J Controlled Release, 2008, 128(3): 224-232.
- [4] 武继民, 汪鹏飞, 李志宏, 等. bFGF-PLGA 缓释微球及其体外释药性能研究[J]. 中国生化药物杂志, 2010, 31(1): 32-34.
- [5] 路伟, 王量明, 李朝今. 肝素明胶微球的制备工艺研究[J]. 中国生化药物杂志, 1998, 19(3): 136-138.
- [6] Nihant N, Schugens C, Grandfils C, et al. Polylactide microparticles prepared by double emulsion/evaporation technique. I. Effect of primary emulsion stability [J]. Pharm Res, 1994, 11: 1479-1484.