

聚乳酸利福喷丁微球的制备及其小鼠体内肺靶向性研究

范 颖, 郭梅红, 梁 凯, 孔晓龙, 陈 方

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学药学院(范 颖, 郭梅红, 梁 凯, 孔晓龙); 100850 北京, 军事医学科学院放射与辐射医学研究所(陈 方)

作者简介: 范 颖(1981-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 新药研究与开发。E-mail: 45159419@qq.com

通讯作者: 孔晓龙(1966-), 男, 研究生学历, 硕士学位, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 药物传递系统构建与评价。E-mail: KXL192@163.com

[摘要] 目的 制备聚乳酸利福喷丁微球, 评价其体外释药特性及其在小鼠体内的肺靶向性。方法 采用溶剂挥发法制备聚乳酸利福喷丁微球, 动态透析法考察其体外释药性能。实验动物静脉注射后, 测定其各组织的药物浓度, 研究其体内相对分布百分率及其肺靶向性。结果 制得的聚乳酸利福喷丁微球在 $7 \sim 30 \mu\text{m}$ 粒径范围的占聚乳酸利福喷丁微球总数的 81.6%, 平均粒径为 $(14.2 \pm 3.1) \mu\text{m}$, 包封率为 78.39%, 载药量为 $(39.6 \pm 3.6)\%$ ($n=5$), 体外释药 T_{50} 为 68 min, 较对照组延长了 4.5 倍。小鼠实验表明, 制得聚乳酸利福喷丁微球后, 药物在肺组织中的相对分布百分率明显高于其他组织与血液, 并较对照组提高了 3.3 倍。结论 该法制得的聚乳酸利福喷丁微球具有明显的缓释性及肺靶向性。

[关键词] 利福喷丁; 聚乳酸微球; 肺靶向性; 缓释性

[中图分类号] R 943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)08-0714-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.08.09

Preparation of PLA-Rifapentinum microspheres and the effect of lung targeting in mice FAN Ying, GUO Mei-hong, LIANG Kai, et al. School of Pharmaceutical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To prepare PLA-Rifapentinum microspheres (RifapM) for lung targeting and evaluate it's rule of rifapentinum release and lung targeting in mice. **Methods** Solvent volatilization was used to prepare lung targeting RifapM, and dynamic dialysis method was adopted to observe the rule of rifapentinum release. In vivo distribution was studied. **Results** The diameters of 81.6% microspheres were between $7 \sim 30 \mu\text{m}$, the average diameter was $(14.2 \pm 3.1) \mu\text{m}$. Entrapment efficiency was 78.39%. The drug supporter in microspheres was $(39.6 \pm 3.6)\%$ ($n=5$). The invitro release T_{50} was 68 min, and was 4.5 times more than that of the control group. The relative distribution percentage of RifapM in lung after iv administration to mice was significantly higher than those in other tissues and blood, and was 3.3 times more than control group. **Conclusion** RifapM have evident sustained-release and lung targeting.

[Key words] Rifapentinum; PLA-microspheres; Lung targeting; Sustained-release

利福喷丁 (Rifapentinum, Rifap) 临床用于抗结核病, 给药途径主要为口服。长期服用易引起肝脏损害^[1]。为提高疗效, 降低给药量, 并同时减少药物不良反应的发生, 从制剂学角度选择适宜的给药系统, 通过微球载体使其能在给药后浓集于靶部位, 缓慢释放, 达到治疗疾病的目的。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 HP1100 液相色谱仪, Agilent E-

clipse XDB-C₈ 柱 ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$), 恒温振荡器 (上海医疗器械五厂), 超声波清洗机 (上海医疗器械五厂), 生物光学显微镜 (南京光学仪器厂)。利福喷丁 (浙江永宁制药厂, 批号 20050618, 含量 99.6%), 利福喷丁对照品 (中国药品生物制品检定所化学室提供), 聚乳酸平均相对分子质量 28600 (天津大学高分子化学教研室提供), 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。清洁级 (SPF) 昆明种小

鼠,由广西医科大学实验动物中心提供,雌雄各半,体重(20 ± 2)g,实验动物生产许可证:SCXK 桂 2013-0002,实验动物使用许可证:SYXK 桂 2013-0026。

1.2 方法

1.2.1 聚乳酸利福喷丁微球(Rifapentinum microspheres, RifapM)的制备 采用溶剂挥发法^[2],将 Rifap 原料粉加至 5% (w/v) 聚乳酸二氯甲烷溶液中,超声分散,然后将该液以细流加入搅拌中的由 Rifap 饱和的 0.1% 吐温-80 (w/v)、0.9% 氯化钠 (w/v) 及 0.05% 枸橼酸 (w/v) 所组成的水溶液中,乳化 5 min,继续搅拌至二氯甲烷挥尽,抽滤收集 RifapM,用冷蒸馏水洗涤,35℃真空干燥 40 h,即得。

1.2.2 RifapM 体外释药 采用动态透析法^[3],精密称取 Rifap 及 RifapM,分别装入 Visking 透析膜内,置 100 ml 锥形瓶中,加入 pH=7 的磷酸盐缓冲液 50 ml 为释放介质,于 37℃恒温水平振荡,频率为 100 次/min,振幅 10 cm,定时取样,同时补加等量同温释放介质,测定并计算累积释药百分率。

1.2.3 RifapM 的粒径及分布 将制备的 5 批 RifapM 于光学显微镜下进行形态观察,每批计数 600 个微球,按容积-数目平均径算法^[4]计算均径。

1.2.4 RifapM 的包封率及载药量的测定^[5]

1.2.4.1 色谱条件与系统适用性 十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以甲醇-乙腈-0.075 mol/L 磷酸二氢钾溶液-1.0 mol/L 枸橼酸溶液-水 (30:30:26:4:5) 为流动相,检测波长为 254 nm。

1.2.4.2 标准曲线的制备 精密称取 Rifap 对照品适量,加甲醇制成每 1 ml 中含 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mg 的溶液。在上述色谱条件下,进样 10 μ l,回归方程: $A = -226.89 + 12035C$,相关系数 $r = 0.996$ 。对照品溶液浓度在 0.1~0.7 mg/L 范围内,线性关系良好。

1.2.4.3 回收率试验 精密称取 Rifap 对照品,加甲醇制成每 1 ml 中含 0.1、0.2、0.3、0.4 mg 的溶液。按“1.2.4.2”项方法测定,计算平均回收率。

1.2.4.4 RifapM 中利福喷丁含量的测定 按“1.2.4.2”项方法,精密称取 Rifap 适量,加入蒸馏水,于 50℃超声处理 1 h,冷却至室温,过滤,定容,测定其含量,计算微球的包封率及载药量。(1)载药量:单位重量 RifapM 中药物含量 $\times 100\%$ 。(2)包封率:载药量 $\times$ RifapM 重量/投药量 $\times 100\%$ 。

1.2.5 Rifap 小鼠体内的分布 小鼠随机分为两组,每组 6 只。采用文献报道的方法^[6,7]用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)生理盐水配制 RifapM 混悬液,

按 25 mg/kg 给小鼠尾静脉注射作为试验组。30 min 后取血,处死,剖取心、脑、肝、脾、肺及肾等组织,经处理得血浆及组织匀浆,3 000 r/min 离心 15 min,取上层液待测。同样将 Rifap 以 10 mg/kg 给小鼠尾静脉注射作为对照组,依上述方法操作后,分别测定 Rifap 的浓度。

1.3 统计学方法 应用 SPSS16.0 统计软件进行数据处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rifap 及 RifapM 体外释药特性 Rifap T_{50} 为 15 min,而 RifapM T_{50} 为 68 min,其释药曲线符合一级动力学过程,说明 RifapM 具有明显的缓释作用。见图 1。

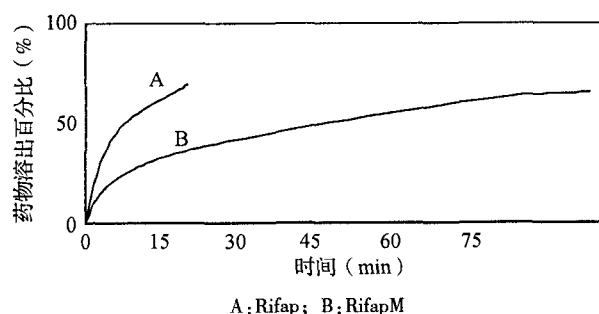


图 1 Rifap 及 RifapM 体外释放曲线

2.1 RifapM 的粒径及分布 测定 5 批 RifapM 平均容积径,其平均粒径为(14.2 ± 3.1) μ m,符合肺靶向的粒径要求。见表 1。

表 1 RifapM 的粒径及分布

微球直径(μ m)	数目(个)	百分比(%)	平均粒径(μ m)
3.5	11	1.83	14.2 ± 3.1
4.0	36	6.00	
6.5	56	9.33	
7.0	95	15.8	
10.5	126	21.0	
15.5	191	31.8	
20.0	53	8.83	
25.5	16	2.67	
32.0	9	1.50	
40.0	5	0.83	
50.0	2	0.33	

2.2 RifapM 含量检测方法回收率试验结果 其平均回收率为 99.9%,相对标准偏差(RSD) $< 3\%$,说明检测方法准确可靠。见表 2。

表2 RifapM 含量检测方法回收率试验结果($n=5$)

序 号	理论值(mg/ml)	测得值(mg/ml)	回收率(%)	RSD
1	0.1	0.0998	99.8	1.2
2	0.2	0.1994	99.7	1.6
3	0.3	0.3005	100.2	2.4
4	0.4	0.3998	100	1.9

表3 静脉注射 Rifap 及 RifapM 小鼠体内分布结果 [$\mu\text{g/ml}$, ($\bar{x} \pm s$), $n=6$]

组 别	例数	血浆	心	脑	肝	脾	肺	肾
Rifap	6	13.52 $\pm$ 2.58	2.24 $\pm$ 1.21	7.89 $\pm$ 3.25	10.25 $\pm$ 3.05	5.62 $\pm$ 2.07	9.36 $\pm$ 1.26	4.68 $\pm$ 2.54
RifapM	6	5.34 $\pm$ 2.31	2.25 $\pm$ 1.56	4.32 $\pm$ 2.36	6.21 $\pm$ 2.54	2.56 $\pm$ 1.56	32.2 $\pm$ 2.48	2.53 $\pm$ 1.02
<i>t</i>	—	5.786	0.012	2.177	2.493	2.892	20.112	1.924
<i>P</i>	—	0.002	0.990	0.055	0.032	0.016	0.000	0.083

3 讨论

3.1 利福喷丁为临床上治疗肺结核病的首选药物之一,但其普通剂型在应用时,靶器官的药物浓度较低。为克服这个缺点,临床上会采用大剂量冲击疗法,但这势必会增加药物的毒副作用。本文通过将利福喷丁制成具有肺靶向作用的微球制剂,使其浓集于靶器官,同时可降低其他组织器官的药物浓度,从而减少毒副反应的发生,提高药物的利用率。

3.2 本文研究结果表明,将利福喷丁制成微球制剂后,具有一定的缓释作用,这也将减少患者的用药次数,有利于提高患者的用药依从性。微球制剂的载体,采用中等分子量的聚乳酸为材料,药物随着其降解缓慢释放。用本法制得的 RifapM 具有明显肺靶向的缓释作用, T_{50} 延长了 4.5 倍,肺中相对分布百分率提高了 3.3 倍。同时由于聚乳酸可在体内生物降解,因此具有良好的组织相容性和人体耐受性。

3.3 搅拌速度及药物与聚乳酸的投料比对 RifapM 的形态、包封率及载药量有影响。实验发现搅拌速度为 900 r/min 左右,药物与聚乳酸的投料比为 1.3:1 时,其形态、包封率及载药量很理想。搅拌速度过快, RifapM 由于离心力作用而呈椭圆形,造成包封层厚度不一,进而影响其释药速度;过慢 RifapM 粒径较大,不易形成符合要求的微球。

3.4 乳化剂的用量也决定微球的大小与形态^[8],当搅拌速度一定时,增加乳化剂的用量,则微球粒径减小并表面光滑。乳化剂过量时,由于过小的粒子会大幅增加体系的自由能,造成在溶剂挥发过程中微球粘连并形成簇状,反而会增大微球的粒径。因此,适当调整乳化剂的用量,可制出符合肺靶向要求的粒径。

2.3 包封率测定结果 按“1.2.4.4”项方法测定其包封率为 78.39%,载药量为 $(39.6 \pm 3.6)\%$ ($n=5$)。

2.4 静脉注射 Rifap 及 RifapM 小鼠体内的分布结果 在 RifapM 组中,肺内的药物浓度显著高于血浆及其他组织,并且显著高于 Rifap 组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

3.5 目前聚乳酸微球作为药物的载体已广泛应用于免疫学、基因治疗、肿瘤治疗、糖尿病治疗等诸多医学领域。其中聚乳酸微球作为靶向药物和缓释控释药物载体的功能业已显现。聚乳酸属于降解聚合物,水解最终产物是水和二氧化碳,中间产物乳酸也是体内的正常代谢产物,无生理活性,刺激性小,易于从体内排出而不蓄积,未降解的可以随粪便排出。组织学研究证明,聚乳酸无毒,与组织无反应,生物可降解,降解产物不滞留于活体组织。

3.6 作为靶向药物的微球载体,其粒径大小不同靶向作用的部位也不同。例如为了达到肺靶向目的,需将载药微球粒径控制在 10 ~ 20 μm ,经静脉注射后,达到截留于肺部,提高肺部药物浓度,减少不良反应的目的。

参考文献

- 1 陈新谦,金有豫.新编药理学[M].北京:人民卫生出版社,2003:117.
- 2 Benlta S, Benoit JP, Puisieux F, et al. Characterization of drug-loaded poly(D, L-lactide) microspheres[J]. J Pharm Sci, 1984, 73(1):1721.
- 3 张志荣,廖工铁,钱文璟.米托蒽醌毫微粒体外释药规律考察[J].华西医科大学学报,1994,25(4):384-387.
- 4 刘国杰,屠锡得,毛凤斐.药剂学[M].北京:人民卫生出版社,1985:137.
- 5 柴健,张洁,张立. RT-HPLC 法同时测定血清中利福平和利福喷丁的血药浓度[J]. 天津药学,2012,24(1):20.
- 6 蒋芝荣,郭海平,郑传文. HPLC 法测定利福喷丁血药浓度的改进[J]. 药物分析杂志,1994,14(1):21.
- 7 梅康康,胡容峰,马凤余,等.非诺贝特缓释微球片体内相关性评价[J]. 中国医院药学杂志,2008,12(28):975.
- 8 潘峰,陈庆华,包泳初,等.石杉碱甲注射用缓释微球制备方法的比较及其体内评价[J]. 中国医药工业杂志,2009,40(6):421.

[收稿日期 2013-12-23][本文编辑 黄晓红 韦颖]