

喷雾干燥工艺对包载卡莫司汀聚乳酸缓释微球性质及药物释放行为的影响

王虹¹, 孙爱萍², 林立生¹, 林洁¹, 原续波², 康春生³ (1. 天津金耀氨基酸有限公司, 天津 300171; 2. 天津大学材料科学与工程学院, 天津 300072; 3. 天津医科大学总医院神经外科, 天津 300052)

摘要: 目的 以喷雾干燥法制备卡莫司汀 (camustine, BCNU) 聚乳酸缓释微球, 研究工艺条件对微球形态及药物释放的影响。方法 将 BCNU、聚乳酸溶解于丙酮、氯仿或乙酸乙酯溶液中, 控制不同溶液浓度、进口温度, 以扫描电子显微镜观察微球形貌, 以 ¹H-NMR 分析了不同温度条件对 BCNU 稳定性的影响, 以分光光度法测定微球载药率, 并研究 BCNU 的缓释特性。结果 以丙酮为溶剂难以得到球形颗粒, 不规则形态使其药物释速率较快, 突释明显。以氯仿或乙酸乙酯为溶剂则可得较好的球形颗粒, BCNU 释放突释较小, 释放较平缓。在操作条件下 BCNU 均具有较好的稳定性, 包载率可达 14% ~ 42%。结论 喷雾干燥法可以得到高 BCNU 包载率的聚乳酸缓释微球, 以乙酸乙酯为溶剂时效果最佳。

关键词: 卡莫司汀; 聚乳酸; 喷雾干燥; 微球; 药物释放

中图分类号: R944 文献标识码: A 文章编号: 1001 - 2494 (2008) 21 - 1638 - 05

Influence of Spray Drying Condition on the Properties and Drug Release Behavior of Camustine-Loaded Polyactic Acid Microspheres

WANG Hong¹, SUN Ai-ping², LIN Li-sheng¹, LIN Jie¹, YUAN Xu-bo², KANG Chun-sheng³ (1. Tianjin Jingyao Amino Acid Corporation, Tianjin 300171, China; 2. School of Materials Science & Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 3. General Hospital Neurosurgery, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare camustine (BCNU)-loaded polyactic acid microspheres by spray dry method, and to study the effect of the process technologic on the morphology and drug release behavior. **METHODS** BCNU and polyactic acid were co-dissolved in acetone, chloroform or ethyl acetate, and then submitted to spray dry. The morphologies of microsphere obtained under different process condition, such as polymer concentration and inlet temperature of spray drier, were observed by TEM. The stability of BCNU after the spray drying was studied using ¹H-NMR analysis, and the drug release behavior was investigated through spectrophotometer. **RESULTS** BCNU-loaded polyactic acid microspheres were prepared using chloroform or ethyl acetate as solvent, while the particles with irregular shape were obtained with acetone as solvent, resulting in the fast release rate of the BCNU from these microspheres. The drug-loading was ranged from 14% - 42%. **CONCLUSION** BCNU-loaded polyactic acid microspheres can be prepared using spray dry technique with ethyl acetate as solvent.

KEY WORDS: BCNU; polyactic acid; spray dry; microsphere; drug release

卡莫司汀 (camustine, BCNU) 是治疗脑肿瘤最常用、最有效的化疗剂, 全身应用虽然可延长患者的生存期, 但因其具有骨髓抑制、肝毒性、肺纤维化等不良反应, 在体内的 $t_{1/2}$ 较短 ($t_{1/2}$ 14 min), 药物的生物利用度低, 应用受到限制。

近年来间质内缓释化疗引起人们的高度重视^[1-2], 被认为是治疗恶性脑胶质瘤的有效方法。以可生物降解聚合物包载化疗药物, 瘤灶定位注射, 可以提高药物的稳定性, 最大限度地降低药物

的毒副作用, 提高药物的生物利用度。国内外较多的研究机构在进行可定位注射化疗制剂的研究与开发, 已有一种商品投放市场^[3]。

常规制备可注射载药聚合物微球的方法有溶剂非溶剂法、O/O型和O/W型乳化溶剂挥发法^[4-7], 这些方法制备工艺复杂, 药物包封率较低, 难以适应大规模工业化生产。而喷雾干燥法制备工艺简单, 产品重复性好, 是实现可注射微球产业化的重要方法^[8]。本实验以喷雾干燥法制备包载

基金项目: 天津市科技攻关项目 (06YFGZSH00800)

作者简介: 王虹, 女, 总工程师 Tel/Fax: (022) 66250225 E-mail: hongw2086@vip.163.com

BCNU的聚乳酸微球, 研究工艺条件对微球形态及药物释放行为的影响。

1 材料与仪器

聚乳酸 (PLA, DL型, 相对分子质量为30 000, 山东医疗器械研究所)。卡莫司汀 (BCNU, 天津金耀药业集团氨基酸公司)。N-1盐酸萘乙二胺 (分析纯), 磺胺 (分析纯)。丙酮、三氯甲烷和乙酸乙酯均为分析纯。L-117型喷雾干燥机 (北京来亨科贸有限公司), XL-30型扫描电子显微镜 (荷兰 Philips公司), 500 MHz液体核磁共振谱仪 (NMR, Varian公司), UV-9100型紫外-可见光分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司), 恒温水浴摇床 (哈尔滨东联仪器公司), MR1822冷冻离心机 (法国 Jouan公司)。

2 实验方法

2.1 载药微球制备

精确称取一定量聚乳酸和 BCNU, 分别共溶于丙酮、三氯甲烷和乙酸乙酯中, 使聚乳酸浓度为10%, BCNU与聚乳酸的重量比为1:9。将溶液避光封装于锥形瓶中, 电磁搅拌3 min后以喷雾干燥机制备载药微球, 喷雾干燥机进口温度控制为20~70℃, 出口温度为30℃, 液体流率为5 mL·min⁻¹, 取接收器中的粉粒进行 SEM形貌观察、载药率测定和药物释放行为研究。

2.2 药物稳定性分析

取“2.1”项下不同温度条件下制备微球, 溶于氘代氯仿中, 以¹H-NMR分析喷雾干燥前后BCNU的核磁谱图, 研究喷雾干燥对BCNU稳定性的影响。

2.3 载药率与药物释放测试

2.3.1 BCNU分析方法的建立 BCNU测定方法选择: BCNU是对光和热极不稳定的药物, BCNU对热极不稳定, 熔点为30~32℃, 熔融时同时分解, 在pH>7以上的溶液中也会快速分解, 在血液中的半衰期约为20 min。由于BCNU这种特性, 常规操作过程中会有BCNU的分解, 因此常规的测定方法不适用于BCNU缓释剂型载药量测定和药物释放的测量。本实验按照 Bratton-Marshall比色法测定BCNU的含量^[9]。具体方法为: 取2 mg BCNU, 先加入1 mL无水乙醇使之溶解, 然后在50 mL量瓶中去离子水定容, 用移液管移取2 mL溶液加入到20 mL试管中, 加入1 mL 0.5%磺

胺溶液 (溶剂为2 mol·L⁻¹ HCl), 轻微振荡后放入50℃水浴中加热45 min, 取出后迅速放入冰水浴中并加入0.2 mL N-1盐酸萘乙二胺水溶液 (3 g·L⁻¹), 溶液逐渐变为粉红色, 静置显色10 min, 用可见光紫外分光光度计测溶液在540 nm处的吸光度。

2.3.2 标准曲线 准确称取2.24 mg BCNU, 先加入1 mL无水乙醇使之溶解, 然后在50 mL量瓶中去离子水至刻度, 分别配制0.448, 0.224, 0.112, 0.056, 0.028, 0.014, 0.007, 0.003 5, 0.001 75和0.000 875 g·L⁻¹的标准溶液。分别取各浓度的标准溶液2 mL, 依“2.3.1”方法显色后, 在波长540 nm处分别测定吸光度, 以吸光度对质量浓度回归得标准曲线方程为: $Y=0.125 2+0.912 8 X$, 线性相关系数 $r=0.999 8$ 。

2.4 载药率测定

10 mg载药微粒溶于0.5 mL二氯甲烷中, 加入9.5 mL乙醇使聚乳酸沉淀, 在4℃下, 13 000 r·min⁻¹离心20 min后取0.2 mL上清液加入到1 mL 0.5%磺胺试剂中, 加入1.8 mL去离子水, 振荡摇匀后于50℃水浴中加热45 min, 取出后迅速在冰水浴中冷却, 加入0.2 mL N-1盐酸萘乙二胺, 显色10 min后, 用分光光度计测试样品在540 nm处的吸光度, 与浓度吸光度标准曲线对照, 得BCNU浓度。载药率以下式计算:

$$\text{载药率} = \frac{\text{微粒内药物含量 (mg)}}{\text{载药微球重量 (mg)}} \times 100\% \quad (1)$$

2.5 药物释放分析

将50 mg微球加入到盛有100 mL磷酸缓冲溶液的锥形瓶中 (PBS, pH 7.4), 在水浴振荡器中72 r·min⁻¹, 37℃条件下使微球释放药物, 于固定时间间隔将溶液混匀, 取出5 mL溶液, 离心后取纯化水超声清洗2次, 将样品冻干称重, 以“1.4”中所述方法测定微球中的残余药量, 并推算出微球的药物释放量。

3 结果与讨论

3.1 溶剂对微球形貌的影响

不同溶剂条件下制备的载药微球见图1。由图1可见, 以丙酮为溶剂制备的微球呈现不规则的微粒, 表面多孔; 以氯仿与乙酸乙酯制备的粒子则具有较好的球形形态, 粒径为0.5~4 μm, 而以氯仿为溶剂制备的微球形态最佳, 具有较好的粒度分布。虽然如此, 因为氯仿属于一类药物溶剂, 而乙

酸乙酯为三类药物溶剂，即使有微量残留也不具有明显的毒副作用，因此我们选择乙酸乙酯为溶剂进行下面载药微球制备与释放研究。

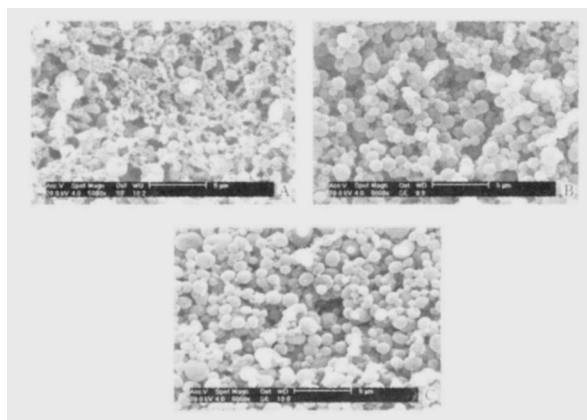


图 1 不同溶剂对 BCNU 载药微球形貌的影响

A - 丙酮; B - 氯仿; C - 乙酸乙酯

Fig. 1 Influence of solvent on the morphologies of BCNU-loaded PLA microspheres

A - acetone; B - chloroform; C - ethyl acetate

3.2 聚合物浓度对成球性及产率的影响

控制聚合物的浓度为 1% ~ 20%，实验结果见表 1。由表 1 可见，随着聚乳酸浓度提高，微球的平均粒径逐渐增大，产率提高。当聚乳酸浓度超过 12% 时，由于聚合物黏度过高，产物呈丝状，难以得到球形产品。

表 1 聚合物浓度对产物形态与产率的影响

Tab. 1 Influence of PLA concentration on the morphologies and yield of microspheres

C (wt%)	Morphology	Yield/%
1	sphere	18.2
3	Sphere	31.6
5	Sphere	52.3
7	Sphere	58.4
9	Particle	60.6
12	Fiber	-
15	Fiber	-
20	Fiber	-

3.3 喷雾进口温度对微球形貌与药物稳定性的影响

不同进口温度条件下制备微球的 SEM 照片见图 2。在实验温度范围内均可得到微球，但 20 条件下制备的微球由于溶剂难以有效去除而粘连严重。70 条件下制备的呈现椭圆形态，这是因为聚乳酸载药材料的玻璃化转变温度 (T_g) 为 50 ~ 60，高于此温度使聚乳酸容易变形，产物形态变差。以 50 条件下制备的微球为最佳。

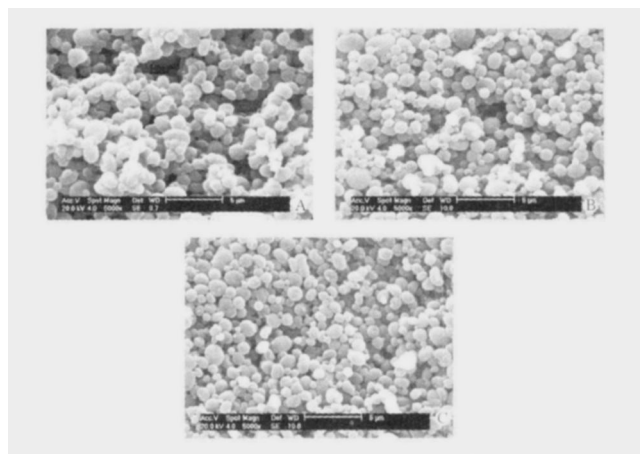


图 2 不同进口温度条件下喷雾干燥法制备微球的 SEM 照片

A - 20 ; B - 50 ; C - 70

Fig. 2 Influence of inlet temperature on the morphologies of BCNU-loaded PLA microspheres

A - 20 ; B - 50 ; C - 70

BCNU 是一种不稳定药物，其熔融温度为 30 ~ 32，熔融同时分解，因此需要考察喷雾干燥温度对 BCNU 稳定性的影响。将不同温度条件下所得样品溶于氘代氯仿，以 $^1\text{H-NMR}$ 分析产物的样品结构，结果见图 3。图 3A 为纯 BCNU 的核磁共振氢谱，图 3B 和 C 分别是进口温度为 50 和 70 条件下载药微球的核磁共振谱图。图中 $\delta = 1.56, 5.32$ 分别属于聚乳酸载体分子结构单元中甲基和次亚基的质子吸收峰，而 $3.4 \sim 4.4$ 之间的共振峰为 BCNU 结构中质子的振动吸收峰。由 $^1\text{H-NMR}$ 图谱可知，在各种实验温度条件下没有发现明显的其他峰的出现，说明 BCNU 保持了良好的稳定性，这一方面是由于喷雾干燥过程中药物在高温区驻留时间极短，另一方面是由于聚合物对药物的包载同样提高了药物的热稳定性。

3.4 药物与溶剂对载药率的影响

控制不同的 BCNU 与聚乳酸的重量比，使用不同的溶剂，以分光光度法测定微球的载药率，结果见表 2。由表 2 可知，溶剂的变化对微球的载药率影响较小，微球的载药率主要取决于药物与聚乳酸的重量比，各种条件下所得粒子的载药率均接近理论值。这种高载药率是喷雾干燥法制备载药微球的优点之一。

3.5 载药微球的药物释放行为

由于 BCNU 在 PBS 溶液中不稳定，在 pH 7.4 条件下其半衰期不超过 1 h，因此难以用常规测定释放溶液中药物浓度方法准确测定 BCNU 的药物释

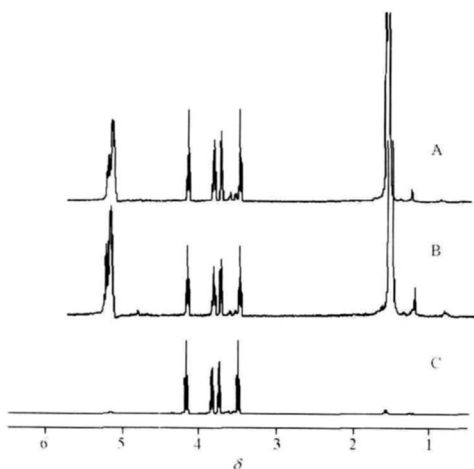


图3 BCNU原药 (A), 载BCNU微球 (进口温度为 50) (B), 载BCNU微球 (进口温度为 70) (C) 核磁共振谱图

Fig. 3 ¹H-NMR Spectra of BCNU (A) and BCNU-loaded PLA microspheres prepared at inlet temperature of 50 (B) and 70 (C)

表2 溶剂与药物 聚合物配比对微球载药率的影响

Tab.2 Influence of solvent and ratio of BCNU to PLA on the drug-loading efficiency

BCNU/PLA (w/w)	Theoretic value		Tested value		
	/%	Acetone/%	Chloroform/%	Ethyl acetate/%	
0.2	16.7	13.1	14.2	14.0	
0.5	33.3	30.7	30.1	29.5	
0.8	44.4	35.3	39.2	37.9	
1.0	50.0	40.3	43.7	41.5	

放行为。本实验将微球离心分离后冻干, 再测定微球中 BCNU 的含量, 使药物的释放准确可靠。

不同条件下制备的微粒其累积药物释放曲线见图 4A 和 B。由图 4 可以看出, 微球的药物释放周期可持续 30 d 以上。释放明显可分为 2 个阶段, 即开始的突释阶段和随后的稳定释放阶段。一般认为初始的突释是由表面或亚表面药物的释放引起, 随后的稳定释放受扩散和聚乳酸降解双重控制, 表现与聚乳酸降解的相关性。

可生物降解聚合物微球的药物释放行为除与聚合物的降解速率有关外, 还与微球的粒径、形态和表面特性及载药量等因素有关。图 4a 为不同溶剂制备的载药聚乳酸微球的药物释放曲线, 由图 4A 可以看出, 以丙酮为溶剂制备的微球释放速率最快, 而以乙酸乙酯制备的微球药物释放速率最低, 对照图 1 可知, 以丙酮为溶剂制备的产物为不规则, 表面多孔, 这使得粒子释药表面积增大, 同时

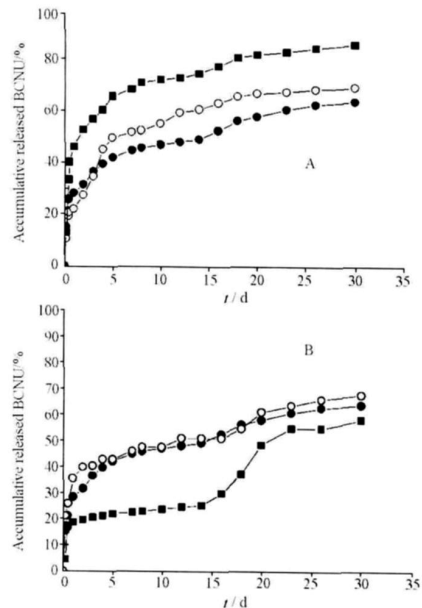


图4 不同条件下制备微球的药物释放行为

A - 不同溶剂; - - - 乙酸乙酯; - - - 氯仿; - - - 丙酮; B - 不同载药率; - - - 14.0%; - - - 37.9%; - - - 41.5%

Fig. 4 Profiles of drug release from different microspheres

A - Influence of solvent on the BCNU release profiles; - - - ethyl acetate; - - - chloroform; - - - acetone; B - Influence of drug content on the BCNU release profiles; - - - 14.0%; - - - 37.9%; - - - 41.5%

也使聚合物降解速率加快, 因此释药速率较快。以氯仿为溶剂制备的微球, 其药物释放速率快于乙酸乙酯条件下制备的微球, 其原因在于前者的微球粒径较小, 相对表面积增大, 使释药速率加快。

图 4B 为以乙酸乙酯为溶剂制备的不同载药率微球的药物释放曲线, 一般而言, 载药率越高, 微球与释放介质的药物浓度梯度越大, 使释放速率加快。图 4 中载药率分别为 37.9% 和 41.5% 的微球药物释放速率快于含药量 14.0% 的微球, 即由此因素所致, 而前两者释放规律基本接近, 没有显著差异。

综合溶剂毒性、成球性、突释量大小和流动性各因素, 得较优处方为溶剂乙酸乙酯、聚乳酸浓度 9%, BCNU 与聚乳酸重量比 0.5, 载药率为 29.5%。

3.6 优化处方制备微球和性质考察

以上述优化处方工艺制备 5 批微球, 测定微球的系列性质, 结果见表 3。

优化微球体外释药特征见图 5, 其中 1 d 的释放量约 25%, 具有突释效应, 这是喷雾干燥法制备微球药物释放的特征之一。由曲线可知该微球具有显著的缓释特性, 在体外释放条件下于不同时间点用显微镜观察微球的形态变化: 微球开始数天可保持完整球形, 10 d 后球表面出现孔洞, 随时间

表 3 预测值与实验室比较

Tab. 3 Comparison of the observed and predicted values of microspheres character

Response variable	Predicted response	Observed response	Bias ¹⁾
Drug content/%	29.5	28.1	4.74
Encapsulation efficiency/%	88.6	84.4	4.74
Mean diameter/ μm	1.5	1.28	14.7
Diameter span	0.8	0.9	-12.5

注: ¹⁾偏差 (Bias/%) = (预测值 - 实测值) / 预测值 $\times 100\%$

Note: ¹⁾ Bias/% = (Predicted Response - Observed Response) / Observed Response $\times 100\%$

延长, 微球形态越来越不规则, 18 d后出现较明显的溶蚀, 电子显微镜下微球开始出现严重的粘连, 微球与界面的边缘越来越模糊, 42 d微球出现破裂, 释放出现第二次爆释, 至 46 d后释放基本完全, 但累积释放量并没有达到 100%, 这可能与 BCNU 在微球内的分解有关^[10]。

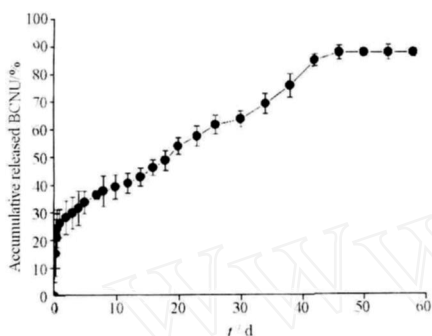


图 5 优化工艺后微球的体外释药曲线. $n=5$, 珣 \pm s

Fig. 5 *In vitro* drug release profile of BCNU from microspheres

4 结论

以喷雾干燥法可以得到包载 BCNU 的聚乳酸微球, 微球的形态与溶剂和喷雾干燥进口温度有关, 以氯仿和乙酸乙酯在较高温度条件下可以得到分散

性好、分布均匀的载药微球。微球的产率与聚乳酸浓度相关, 为 18% ~ 60%。微球载药率受药物/聚乳酸配比的影响, 载药率为 14% ~ 42%。药物从微球中的释放周期可持续 40 d 以上, 药物释放速率与微球粒径和载药率相关。由于乙酸乙酯毒性小, 因此以乙酸乙酯为溶剂, 喷雾干燥法制备聚乳酸载药微球是实现工业化的可行路线。

REFERENCES

- [1] ZHOU Z B, HUANG K X, CHEN Z X, *et al.* The advances of polyanhydrides for controlled-release preparations [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36(2): 76-80.
- [2] WESTPHAL M, HLT D C, BORTEY E A, *et al.* Phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable camustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma [J]. *J Neurooncol*, 2003, 5: 79-88.
- [3] SEN DR J. *Sustained-Release Injectable Products* (可注射缓释制剂) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [4] SHEN Z R, ZHU J H, WU L T, *et al.* Preparation of poly (lactic acid) microspheres containing 5-fluorouracil and tests of drug release *in vitro/in vivo* [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 1995, 26(7): 306-309.
- [5] HAGWARA A, TAKAHASHI T, SAWA I K, *et al.* Pharmacological effect of 5-fluorouracil microspheres on peritoneal carcinomatosis in animals [J]. *Br J Cancer*, 1996, 74(9): 1392-1396.
- [6] WU W, LU B. Fluorouracil PLA microspheres and characteristics of *in vitro* [J]. *China Pharm* (中国药师), 2000, 3(6): 326-327.
- [7] CILTECI K, KASH S, H NCALAA, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of PLA-GA (50/50) microspheres containing 5-fluorouracil prepared by a solvent evaporation method [J]. *Int J Pharm*, 1996, 131(1): 73-82.
- [8] MARA-NEÉS R É. Formulating drug delivery systems by spray drying [J]. *Drying Technology*, 2006, 24(4): 433-446.
- [9] LOO T L, D D N R L. Colorimetric method for the determination of 1, 3-bis (2-chloroethyl) -1-nitrosourea [J]. *J Pharm Sci*, 1965, 54(5): 809-810.
- [10] P A N B E N I T, V E N I E R - J U L I E N N E M C, B E N O I T J P. Internal morphology of poly (d, l-lactide-co-glycolide) BCNU-loaded microspheres. Influence on drug stability [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 1998, 45(1): 31-39.

(收稿日期: 2007-11-09)

《中国药学杂志》2009年征订

《中国药学杂志》是我国药学界创刊最早、发行量较大、反映我国药理学各学科进展和动态的最具权威性和影响的综合性学术核心期刊之一。读者为高、中级药理学工作者以及其他医药卫生人员。内容包括药理学各学科、辟有专家笔谈、综述、论著(内容包括中药及天然药物、药理、药剂、临床药理学、药品质量及检验、药物化学、生物技术)、药物与临床、新药述评、药学史、药事人物、药事管理、学术讨论、科研简报等栏目。创刊 55 年来在医药卫生界享有很高声誉。连续三次荣获国家期刊奖, 三次荣获中国科协优秀科技期刊一等奖, 2006 年, 2007 年连续两年“中国科协精品期刊工程项目资助期刊(B类)”。本刊被美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)、《国际药理学文摘》(IPA)收录, 还拥有中国学术期刊光盘版、国家科委万方数据库版 ChinaInfo 网, “全国中文核心期刊”。

国内刊号: CN11-2162/R; 国际刊号: ISSN1001-2494; 地址: 北京市朝阳区建外大街四号建外 SOHO 九号楼 1803 室 (100022); 电话: 010-58699295; 传真: 010-58699295; 刊期: 半月刊; 开本: 大 16 开; 每期 12.00 元, 全年 288 元; E-mail: zgyxzz@cpa.org.cn; http://www.cpa.org.cn

[本刊讯]