

· 药学 ·

苯丝肼微球的体外释放行为 *

蔡云鹏 马柳青 张文君 王兆敏 张袁魁 朱云婷 袁伟恩[△]

(上海交通大学 上海 200240)

摘要 采用 S/O/W 和 W/O/W 法,和不同的苯丝肼载药量制作缓释微球,用 HPLC 考察其释放曲线、突释情况和包封率,实验表明 S/O/W 法制作的苯丝肼微球缓释效果更好,达到了 6d,包封率能达到 70%以上,突释情况可以接受,苯丝肼载药量低的微球能达到更高的包封率。

关键词 苯丝肼 微球 缓释 包封率

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273 (2012) 11-2158-02

Release of Benserazide-loaded Microspheres in Vitro*

CAI Yun-peng, MA Liu-qing, ZHANG Wen-jun, WANG Zhao-min, ZHANG Yuan-kui, ZHU Yun-ting, YUAN Wei-en[△]

(Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

ABSTRACT: To prepare benserazide-loaded sustained release microsphere using W/O/W and S/O/W method, and with different amount of drug loading. The release was detected by HPLC, and analyzed the drug release, initial burst and the encapsulation efficiency. The results suggest that the microspheres made by S/O/W method work better in sustained release, which reaches 6 days, the encapsulation efficiency can be more than 70%, the initial burst is acceptable, and the lower the drug loading is, the higher the encapsulation efficiency can be.

Key words: Benserazide; Microspheres; Sustained release; Encapsulation efficiency

Chinese Library Classification: R944.2, R742.5 **Document code:** A

Artical ID: 1673-6273(2012)11-2158-02

前言

苯丝肼(benserazide)作为外周多巴脱羧酶的抑制剂,可以防止左旋多巴甲酯在未通过血脑屏障之前被脱羧,可减少左旋多巴的用量,使之进入脑内的量增多,并可减少外周多巴胺浓度过高引起的不良反应。是帕金森病治疗药物左旋多巴甲酯的重要辅助药物^[1]。

乳化-液中干燥法(Emulsion In-liquid Drying process)是指先将含有微球骨架材料与药物的有机溶剂分散在与之互不相溶的另外一相液体中形成乳剂,再除去乳剂分散相中的挥发性溶媒,使骨架材料固化成微球(囊)的方法,是制备微球常用的方法^[2],PLA 与 PLGA 是微球常用的骨架材料,其体内的安全性得到 FDA 认证。上述方法中有机溶媒的挥发是连续进行的,通常也称为连续干燥法。在 O/W 法中,如有机溶媒与水不互溶,连续相水中应加入表面活性剂,后者应为水溶性,本实验中采用的为 2%聚乙烯醇(PVA)的水溶液^[3-6]。本实验分别通过 S/O/W 法和 W/O/W 法制备了苯丝肼微球,通过检测包封率、释放曲线和突释情况来优化处方,以便于后续的研究工作。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高速搅拌机(Microtec Niton 有限公司) 超声机(SMT 公司) 高速离心机(上海安亭科学仪器厂) 旋涡混合器(上海琪特分析仪器有限公司) 恒温空气浴摇床(太仓市科教器材厂); 冷冻干燥机(德国 CHRIST) 光学显微镜(奥林巴斯公司) 18 反向色谱柱(Agilent 公司) 液相溶剂输送泵(日本岛津公司); 液相紫外检测器(日本岛津公司)。

PLGA7505 (Wako Pure 化学工艺公司,日本);超纯水(Millipore 纯水系统自制) 聚合度 500,皂化度 86-90%的 PVA (Wako 化学工艺公司,日本) 二氯甲烷、乙醇、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠等其它试剂采购至国药集团,分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 S/O/W 法与 W/O/W 法制备微球 取 PLA (120mg), PLGA (2.5A 5050, 80mg), 配成 12.5%的二氯甲烷溶液,加入左旋多巴甲酯(粉末, 20 mg) 和苯丝肼(粉末, 20 mg), 涡旋均匀,将所得溶液滴加至 PVA (2%, 8 ml) 液面下,即刻磁力搅拌产生微球。此为 S/O/W 法。

将左旋多巴甲酯和苯丝肼先溶于 0.2 ml 去离子水中,再加入 PLA 和 PLGA 所制得的二氯甲烷溶液中,其余同上,此为

* 基金项目 国家重大专项—"重大新药创制"制剂平台(2009ZX09310-007) 国家自然科学基金(81171203);

上海科委纳米专项(1052nm03900);上海交通大学大学生创新项目(IPP2090)

作者简介 蔡云鹏(1989-),男,本科,研究方向 缓释制剂。

[△]通讯作者 袁伟恩, E-mail: yuanweien@126.com

(收稿日期 2011-09-23 接受日期 2011-10-20)

W/O/W 法。

将生成的含微球的 PVA 溶液转移到 1L 左右的低温盐水

中固化 2-3h, 搅拌离心法收集微球, 用纯水洗涤微球三次, 除去盐分。得到微球直径约为 100 μ m。

表 1 微球的处方

Table 1 Formulation of benserazide-loaded microspheres

微球	制备方法	骨架材料	苄丝肼 (mg)
A	S/O/W	PLA:PLGA=3:2	20
B	S/O/W	PLA:PLGA=3:2	10
C	W/O/W	PLA:PLGA=3:2	20
D	W/O/W	PLA:PLGA=3:2	10

1.2.2 微球的体外释放及检测 每 100ml 水称取 Na_2HPO_4 0.5835g, 柠檬酸 1.5264g, 溶解后过滤除去杂质, 用作释放液, pH=3^[3]。将冻干后的微球称取 20mg, 置入释放液 1ml 中, 在摇床 (37 $^{\circ}\text{C}$, 50r/min) 中做体外释放。定时取出释放液测定苄丝肼的含量, 并同时补充新鲜的释放液。检测方法采用 HPLC, C18 反向色谱柱, 检测波长 220nm, 流动相为三氟醋酸: 甲醇: 水 = 1: 20: 100, 流速 0.8ml/min。

标准曲线方程为 $y=29138x-20275$ ($R^2=0.9994$), 线性范围 0.625 μ g/ml-160 μ g/ml。

1.2.3 包封率的测定 将释放完成的微球用二氯甲烷彻底涡旋溶解, 用释放液萃取 3 次, 得到的释放液用 HPLC 检测, 求出剩余药量, 与之前释放药量累积相加, 得到微球的实际载药量。

$$\text{包封率} = \frac{\text{实际含药量}}{\text{理论含药量}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 制备方法和高分子材料对微球体外释放的影响

可以看出, S/O/W 法制备的微球 A 和微球 B 达到了 6d 左右的缓释效果。而 W/O/W 法制备的微球突释情况比较严重, 微

球 C 和微球 D 在 5 小时内释放 40% 以上, 几乎没有缓释效果, 可能原因是因为把苄丝肼先溶于水, 加上采用的高分子中短期降解的高分子占很大比例, 可以考虑采用分子量更大的 PLA 和粘度更高的 PLGA, 以达到更长的缓释效果。

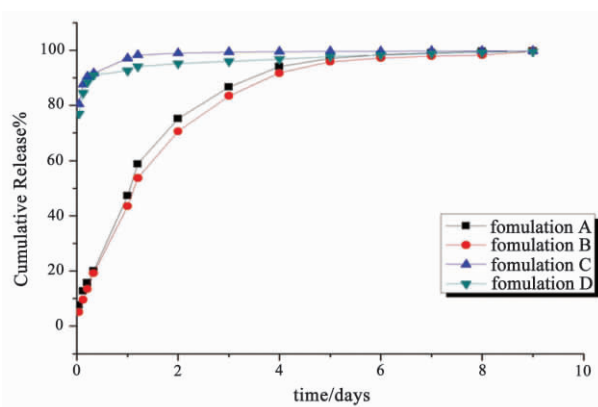


图 1 微球的体外释放

Fig.1 Release of microsphere in vitro

2.3 制备方法和高分子材料对微球包封率的影响

表 2 微球的包封率

Table 2 The encapsulation efficiency of microsphere

微球	制备方法	苄丝肼理论含药量(mg)	前 1d 释放率 (%)	包封率(%)
A	S/O/W	20	64.4	62.9
B	S/O/W	10	65.1	79.8
C	W/O/W	20	94.7	68.0
D	W/O/W	10	95.0	86.8

W/O/W 法制备的微球包封率高于对应的 S/O/W 法制备的微球, 对于 S/O/W 法包封率较低的原因, 可能是固体药物微粒过大, 不能充分被高分子骨架材料包裹, 预计粒径充分小的药物微粒, S/O/W 也能达到较高的包封率。同时, 苄丝肼的含量越低, 包封率越高, 可以考虑在之后的实验中采用 5mg-10mg 之间的载药量, 以求更高的包封率。

3 讨论

现在市场上的苄丝肼制剂多为片剂, 药效短, 每天需多次给药。本研究考察了分别采用 S/O/W 法与 W/O/W 法制作, 及

苄丝肼不同载药量的微球, 通过考察释放曲线、包封率和突释情况, 评价微球的优劣。结果表明, S/O/W 法得到的微球缓释时间可达 6d 左右, 包封率能达到 70% 以上, S/O/W 法的包封率相信可以通过药物粉末的粒径减小得到进一步提高。W/O/W 法制作的微球虽然包封率略高于 S/O/W 法制作的微球, 但是其突释情况严重, 缓释效果差, 原因可能是因为把苄丝肼先溶于水, 内层的油水界面不够稳定, 使形成的微球表面孔径增多的缘故, 加上采用的高分子中短期降解的高分子占很大比例, 可以考虑选择分子量更大的 PLA 和粘性更高的 PLGA。

(下转第 2172 页)

示 hESC 在体外长期培养均能维持正常的二倍体核型和带型 46,XY 或 46,XX,其中 FY-hES-11, FY-hES-12 已传到 60 代,仍保持正常的核型特征和干细胞的多能性特征,证明我们建立的培养、消化、传代体系能很好地满足 hESC 的生长需要,使其在减数分裂过程中严格选择正常的整倍体细胞。

综上所述,本实验室通过优化各种影响 ICM 生长、贴壁、增殖的条件,从而提高 hESC 建系效率,并建立一套稳定的人胚胎干细胞传代、复苏的培养体系,建立人胚胎干细胞库,为细胞治疗、胚胎发育、药物筛选、基因治疗以及遗传、表观遗传机制研究提供更多的模型,以满足生物医学发展的需要。

参考文献 (References)

- [1] Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro M. A., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. (Science), 1998,282(5391):1145-1147
- [2] Lim, U. M., K. S. Sidhu, and B. E. Tuch. Derivation of Motor Neurons from three Clonal Human Embryonic Stem Cell Lines [J]. (Curr Neurovasc Res), 2006, 3(4):281-288
- [3] Rao, M. S. and J. M. Auerbach. Estimating human embryonic stem-cell numbers[J]. (Lancet), 2006,367(9511):650
- [4] Civin, C. I. and M. S. Rao. How many human embryonic stem cell lines are sufficient A U.S. perspective[J]. (Stem Cells), 2006, 24(4): 800-803
- [5] Chen, H., K. Qian, J. Hu, D. Liu et al. The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores [J]. (Hum Reprod), 2005. 20(8):2201-2206
- [6] Genbacev, O., A. Krtolica, T. Zdravkovic, E, et al. Serum-free deriva-

tion of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders[J]. (Fertil Steril), 2005, 83(5):1517-1529

- [7] Lerou, P. H., A. Yabuuchi, H. Huo, A. Takeuchi, et al. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos[J]. (Nat Biotechnol), 2008, 26(2):212-214
- [8] Dunlison, G. F., D. H. Barlow, and I. L. Sargent. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium[J]. (Hum Reprod), 1996,11 (1):191-196
- [9] Hovatta, O., M. Mikkola, K. Gertow, A. M. Stromberg, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells [J]. (Hum Reprod),2003,18 (7):1404-1409
- [10] Steer, C. V., C. L. Mills, S. L. Tan, et al. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme[J]. (Hum Reprod),1992,7(1):117-119
- [11] Plaia, T. W., R. Josephson, Y. Liu, X. Zeng, et al. Characterization of a new NIH-registered variant human embryonic stem cell line, BG01V: a tool for human embryonic stem cell research [J]. (Stem Cells),2006, 24(3):531-546
- [12] Magli, M. C., L. Gianaroli, A. P. Ferraretti, et al. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement[J]. (Fertil Steril), 2007,87(3):534-541
- [13] Munne, S., S. Chen, P. Colls, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos[J]. (Reprod Biomed Online),2007,14(5):628-634

(上接第 2159 页)

参考文献 (References)

- [1] Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT. Pathogenesis of Parkinson's disease[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2001,2(5):657-662
- [2] 陈庆华, 张强. 药物微囊化新技术及应用. 人民卫生出版社, 2008, 1
- [3] Huang M, Jiang W, Huang X, Huang Z, Wang J. Study on Stability of L-dopaMethyl Ester Hydrochloride Solution [J]. China Pharmaceuticals, 2008, 17(8):29-30
- [4] Brime B., Ballesteros MP, Frutos P. Preparation and in vitro characterization of gelatin microspheres containing Levodopa for nasal administration [J]. J. Microencapsul., 2000, 17(6): 777-784
- [5] ArVcaa B., KaYa HS., Moghdamb A., Akalanb N., HVncala A.A. Carbidopa/levodopa-loaded biodegradable microspheres: in vivo evaluation on experimental Parkinsonism in rats [J]. 2005.102(3):689-697
- [6] Patrick B.O'Donnell, James W.Mcginity. Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique [J]. Adv. Drug Deliv. Rev., 1997, 28(1):25-42