

高压静电抗溶剂法制备甲氨蝶呤-聚乳酸复合微球的研究*

陈爱政^{1,2} 杨月梅¹ 王士斌^{1,2} 刘源岗^{1,2} 党婷婷¹

(1. 华侨大学 化工学院 福建 厦门 361021; 2. 华侨大学 生物材料与组织工程研究所 福建 厦门 361021)

摘要: 基于超临界 CO₂ 技术制备的甲氨蝶呤纳米粒为小分子模型药物, 采用高压静电抗溶剂法制备甲氨蝶呤-聚乳酸复合微球。用扫描电镜(SEM)、傅立叶红外光谱仪(FT-IR)对该载药复合微球进行表征, 并研究其载药量、包封率和药物释放曲线。实验结果表明, 甲氨蝶呤-聚乳酸复合微球表面光滑, 粒径分布范围在 10~50 μm 之间; FT-IR 表明, 在高压静电抗溶剂过程中聚乳酸化学结构无变化, 有利于其作为药物载体; 随着理论载药量增加(2.5%、5%和10%), 包封率减少(18.0%、7.1%和2.3%); 甲氨蝶呤从聚乳酸微球中释放具有长效缓释的性能, 无突释效应。

关键词: 高压静电抗溶剂; 甲氨蝶呤; 聚乳酸; 长效缓释

中图分类号: R318

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1001-9731.2013.10.009

1 引言

小分子药物在给药过程中较难控制释放, 造成血液中药物浓度呈波形变化, 初期浓度高易引起过敏、急性中毒等副作用; 一段时间后浓度迅速降低, 影响疗效。因此近年来, 将药物和高分子材料制成复合微球, 借助高分子微球的缓释性能, 控制药物释放速度, 使血药浓度保持在安全有效的范围之内, 引起了越来越多研究者的兴趣^[1-3]。

甲氨蝶呤(methotrexate, MTX), 分子式为 C₂₀H₂₂N₈O₅, 为抗叶酸类抗肿瘤药, 主要通过抑制二氢叶酸还原酶的抑制达到阻碍肿瘤细胞 DNA 的合成, 从而抑制肿瘤细胞的生长与繁殖^[4,5], 是目前临床上的一线抗肿瘤化疗药物。其传统制剂为片剂和注射液(钠盐), 存在着溶解性能差、口服效果差和生物利用度低等缺点, 需要长期多次注射给药, 提高了治疗成本。同时, MTX 在水、乙醇、三氯甲烷或乙醚中几乎不溶, 阻碍了 MTX 新剂型的研发。药物颗粒超(微)细化是一种快速有效地改善药物溶出度、提高生物利用度的技术^[6,7]。本文采用超临界 CO₂ 流体强制分散法(SEDs)制备 MTX 纳米粒^[8], 使其尺寸大大减小, 比表面积增加, 溶解速率明显提高, 从而促进药物吸收, 提高生物利用度和疗效。

静电液滴法制备微球技术^[9-11], 是在锐孔和接收液之间施加高压静电场, 产生的静电作用力拉伸聚合物溶液, 使之不连续成丝而成一个个液滴, 克服自身表面张力滴入接收液, 固化成球, 具有简便高效、条件温和等特点。本文不同之处在于, 选用与聚乳酸不溶的有机溶剂作为接收液, 以起到抗溶剂的作用。其原理是聚合物溶液泵入抗溶剂中, 快速接触, 提高了聚合物溶液的饱和度, 其迅速沉析, 固化形成聚合物微球^[12]。鉴于多方面考虑, 本文选用乙醇作为抗溶剂。

在前期研究^[13-15]的基础上, 本文借助高压微胶囊成型装置, 引进抗溶剂概念, 采用高压静电抗溶剂法制备聚乳酸微球。并以微细化的 MTX 纳米粒为小分子模型药物, 制备载 MTX 的聚乳酸微球, 并对其形貌、粒度、化学结构、载药性能和体外释放性能进行考察, 以期在抗肿瘤药物新剂型的研究和开发方面做初步的探索。

2 实验

2.1 试剂与仪器

L-聚乳酸(PLLA, M_w 分别为 50、76 和 100kDa, 济南岱罡生物工程有限公司); 甲氨蝶呤(AR, 苏州苏瑞医药有限公司); 乙醇、二氯甲烷、二甲亚砜和丙酮均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

高压微胶囊成型装置(自制); AJ5805 微量注射泵(上海安吉电子设备有限公司); BS210S 电子分析天平(德国 Sartorius); FDU-2100 冷冻干燥仪(日本东京理化器械株式会社); TGL-48M 台式高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司); S-4800 扫描电子显微镜(日本 Hitachi); FT-IR8400S 傅立叶变换红外光谱仪(日本 Shimadzu); 紫外-可见分光光度计 UV-2401PC(日本岛津)。

2.2 甲氨蝶呤的微细化

甲氨蝶呤的微细化方法详见文献[16]。简要过程如下: 配制质量浓度 0.3% (V(丙酮)/V(二甲亚砜) = 6:1) 的甲氨蝶呤溶液, 经 SEDs 过程, 即压缩 CO₂ 经冷却液化、高压柱塞泵加压、水浴预热后通过结晶釜顶部的同轴喷嘴外侧通道, 甲氨蝶呤溶液以 1.0 mL/min 的流速通过喷嘴内侧通道, 同时泵入结晶釜; 利用

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(51103049, 81171471, 31170939)

收到初稿日期: 2012-09-23

收到修改稿日期: 2012-12-05

通讯作者: 王士斌

作者简介: 陈爱政 (1978-) 男, 福建漳州人, 博士, 副教授, 主要从事药物缓控释体系与组织工程研究。

超临界 CO₂ 流体的化学性质和机械特性达到“增强喷雾”的效果,使甲氨蝶呤溶液液滴被超临界 CO₂ 流体抗溶剂析出形成甲氨蝶呤纳米粒。

2.3 载药复合微球的制备

配制质量浓度 3.0% 的聚乳酸二氯甲烷溶液,加入 MTX 纳米粒,细胞破碎仪冰浴超声混匀。通过高压微胶囊成型装置,将 MTX 聚乳酸混悬液滴入非溶剂无水乙醇中,聚乳酸沉析固化形成载 MTX 聚乳酸复合微球。实验条件为输出电压 10kV,接收距离 40mm,注射泵推进速度 50mm/h,26G 平针头(内径 0.24mm)。离心收集微球,无水乙醇洗剂 2 次,冷冻干燥保存。

2.4 微球的性能

2.4.1 形态表征及结构测定

通过扫描电镜对制备的甲氨蝶呤纳米粒及甲氨蝶呤-聚乳酸微球的表面形貌特征进行观察及表征。并用傅立叶变换红外仪检测甲氨蝶呤是否成功包埋到微球中。

2.4.2 载药量和包封率

载药量指微球中所含药物的量,包封率指微球中所含药物的量在总药量中的比例,即:

$$\text{载药量} = \frac{\text{微囊(球)中的含药量}}{\text{微囊(球)中的总质量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{实际载药量}}{\text{理论载药量}} \times 100\%$$

称取一定量冻干微球,加入 5mL 二氯甲烷,搅拌至 PLLA 完全溶解,再加入 PBS 溶液 30mL,搅拌同时缓慢升温,待二氯甲烷挥发完全,经 0.22μm 水膜过滤后,用分光光度法检测 MTX 含量,每组数据取 3 个平行样的平均值,计算微球的载药量和包封率。

2.4.3 微球的体外释放

精密称取 30mg 载药微球于透析袋中,放入含 10mL pH 值为 7.4 的 PBS 溶液的离心管中,并置于转速为 60r/min 的摇床中,37℃ 恒温处理,分别于设定的时间点(0.5、1、2、3h...) 取 3mL 释放药液,测其在 302.8nm 的吸光度值,并用等体积的新鲜 PBS 溶液补充。释放结束后,以 8000r/min 低温离心 5min,去除上清液,加入 20mL 破囊液,在漩涡振荡仪上充分振荡以帮助破囊,再以 8000r/min 低温离心 5min,测上清液的吸光度值计算未溶出药量。通过标准曲线方程求出药物浓度,计算累积释放率,绘制时间-累积释放率的释药曲线图。

3 结果与讨论

3.1 形态特征和粒径分布

图 1(a) 所示,微细化的 MTX 呈纳米粒,粒径分布范围为 40~180nm,平均粒径为 99.1nm,颗粒表面光滑,球形度好,因小尺寸而团聚。而 MTX 原料药颗粒比较大,粒度分布不均一,粒径分布在 1~10μm 之间,形状不规则,颗粒大多呈杆状。课题组前期研究表

明^[16] 经 SEDS 法微细化水溶性差的小分子抗癌药 MTX 能够提高其溶解度和溶出速率,但不改变药物活性。高压静电抗溶剂法制备的载 MTX 聚乳酸($M_w = 100\text{kDa}$) 复合微球,表面光滑,粒径分布在 10~50μm 之间,平均粒径 34μm(图 1(b))。

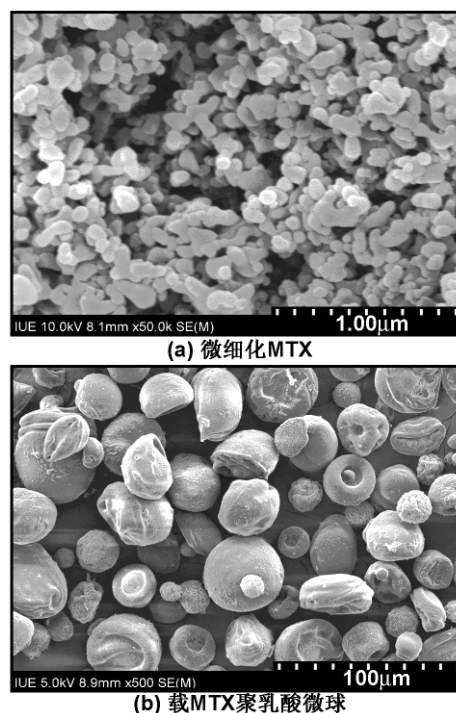


图 1 微细化 MTX 和载 MTX 聚乳酸微球的扫描电镜图

Fig 1 SEM photographs of micronized MTX and MTX-PLLA microspheres

3.2 载药微球的红外光谱分析

图 2(a)~(c) 分别为 MTX 药物、空白聚乳酸微球和载药复合微球的红外光谱图。

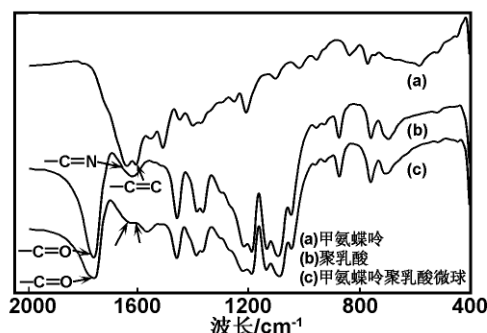


图 2 MTX-聚乳酸复合微球的红外光谱

Fig 2 FT-IR spectra of MTX-PLLA microspheres

MTX 的特征官能团如苯环、酰胺、 $\text{C}=\text{N}$ 等均在制备的 MTX 聚乳酸微球中有特征吸收峰,且均未发生明显改变,其中 1760cm^{-1} 附近 $\text{C}=\text{O}$ 是 PLLA 聚乳酸的特征吸收峰。该结果表明经高压静电抗溶剂过程,MTX 被成功包埋到聚乳酸微球中,并且药物和材料均未发生明显变化,有利于药物剂型的稳定。

3.3 载药复合微球的载药量和包封率

载药复合微球的成球原理:通过高压静电微胶囊

成型装置,含 MTX 纳米粒的聚乳酸二氯甲烷溶液以液滴的形式泵入到抗溶剂无水乙醇中。由于二氯甲烷和乙醇相互扩散,使液滴中的溶剂急速膨胀,从而使聚乳酸过饱和并以 MTX 纳米粒为核在其表面析出,将其包覆,形成包埋 MTX 纳米粒的聚乳酸复合微球。

理论载药量是甲氨蝶呤的投入量占总投入材料量的百分比。图 3(a) 为不同理论载药量下 MTX-聚乳酸复合微球的载药量和包封率。选取 50kDa 的聚乳酸为成球材料,当投入 MTX 理论载药量分别为 2.5%、5.0% 和 10.0% 时,对应的包封率分别为 18.0%、7.1% 和 2.3%。随着 MTX 起始浓度的增大,微球的载药量、包封率相应减少。分析认为,投入 MTX 的量越多,超声混匀需要时间越长,形成的悬液更粘稠。在相同电压下,形成的液滴较大,使得聚乳酸不易在接收液中移动,传质效果减弱,且可能会降低电场强度,以致液滴无法被打碎形成更小的液滴,聚合物以纤维形式沉积出来的速率较颗粒形成速率快^[17],最终导致无法获得颗粒,损失大量药物。Xie 等^[18] 研究结论也表明,浓度高的溶液所得颗粒易出现团聚现象。至于包封率,聚乳酸沉析速度较 MTX 快,即 MTX 或与聚乳酸共沉淀或包埋到聚乳酸中,当 MTX 沉析较慢时,可能大量沉析在聚乳酸的外表面,此时,投入量越多,包封率越低。因此,沉析方式决定着聚乳酸与 MTX 的结合,也会影响药物的释放。

图 3(b) 为不同聚乳酸分子量下 MTX-聚乳酸复合微球的载药量和包封率。确定 MTX 的理论载药量为 2.5%,聚乳酸分子质量分别为 50、76 和 100kDa 条件下,载药复合微球的载药量分别为 0.4%、0.3% 和 0.5%,包封率分别为 18.0%、12.8% 和 20.4%。3 种分子量的聚乳酸都能形成球形度较好、粒度较均匀的载药微球,其平均粒径依次为 29、17 和 34 μm 。结果表明,76kDa 聚乳酸载药微球的粒径最小,其载药量和包封率也最低。分析认为,相同浓度,分子量,粘度大,饱和度大,抗溶剂过程结晶速度快,有利于形成小颗粒;同时,较大的粘度容易形成较大的液滴,从而结晶时间延长而形成较大颗粒。因此,微球尺寸主要由结晶速度和结晶时间共同控制。另外,粒径较小的微球,比表面积较大,其与乙醇的接触面较大,造成药物在乙醇的流失较多,导致载药量和包封率降低,这与学者李像^[19] 的研究结果一致。在本文中,由于甲氨蝶呤在乙醇可溶,聚合物被抗溶剂析出微球的同时,部分药物溶解在乙醇中,导致载药量和包封率较低。后续的研究可考虑在乙醇中预饱和甲氨蝶呤或选择负载在乙醇中不溶解的药物,以期提高载药量和包封率。

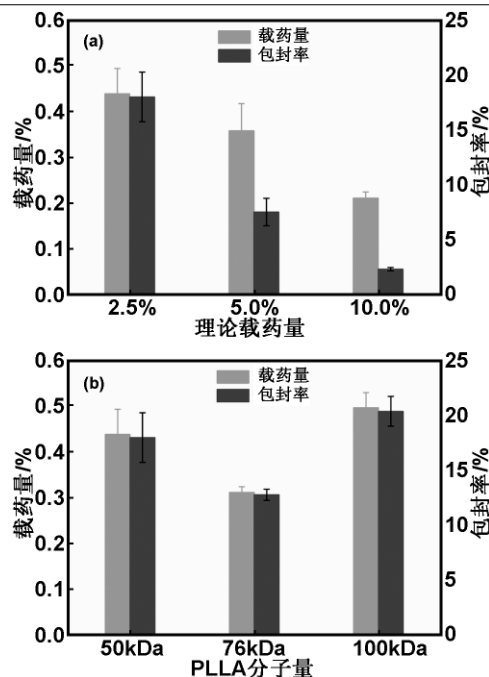


图 3 不同理论载药量和不同聚乳酸分子量下制备的 MTX-聚乳酸复合微球的载药量和包封率

Fig 3 Drug loads and encapsulation efficiencies of MTX-PLLA microspheres in different theoretical drug loads and PLLA molecular weights (bar indicates S. D., $n = 3$)

3.4 体外释放性能

图 4 为 MTX-聚乳酸复合微球在 pH 值为 7.4 PBS 中的药物释放曲线。

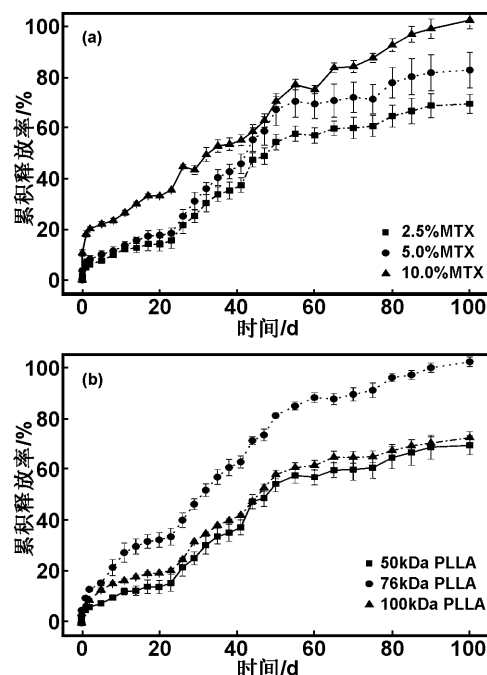


图 4 不同理论载药量和不同聚乳酸分子量下制备的 MTX-聚乳酸复合微球的药物释放曲线

Fig 4 Cumulative drug release curves of MTX-PLLA microspheres in different theoretical drug loads and PLLA molecular weights (bar indicates S. D., $n = 3$)

不同理论载药量 MTX 对复合微球的累积释放影响,见图4(a)。MTX 理论载药量为 2.5%、5.0% 和 10.0% 时,复合微球在前 0.5h 的释放量均低于 10%、5.0% 和 10.0% 投药量的 MTX-聚乳酸复合微球在 100d 内的累积释放量均 >80%,这两项特征值都符合《药典》的相关规定。从全程释放规律来看,前期缓释效果比较明显,24h 后释放缓慢增加,MTX 的投药量对复合微球的释放影响较大,投药量越大,释放越快。分析认为投药量越大,微球的包封率越低,所以释放较快。MTX-聚乳酸复合微球的释放类似于 Yamaguchi 等^[20]报道的以乙醇为添加剂的 PLGA 微球的“S”型释放曲线,具有很好的缓释效果。

不同聚乳酸分子量对 MTX-聚乳酸复合微球的累积释放影响,见图4(b)。50kDa 聚乳酸分子量的复合微球的释放最慢,在前 0.5h 时释药为载药量的 1.4%,在 100d 内的累积释放量达到 69.6%,100kDa 分子量聚乳酸的复合微球,在前 0.5h 时释药为载药量的 3.6%,100d 释药达 72.6%,而 76kDa 分子量聚乳酸的复合微球 100d 时基本释放完全,呈现“S”型释放曲线。分析认为,聚乳酸微球的粒径越小,药物溶解、扩散到溶剂中的路径就越短,同时复合微球的粒径越小,其比表面积就越大,溶剂越容易向微球内部扩散,从而加速药物的溶解和扩散。另外,聚合物分子量大,疏水性强,不利于水向微球内渗透;同时分子量大,溶蚀较慢。因此,药物释放主要由药物扩散和聚合物溶蚀共同控制^[21-22],关键取决于两者谁占主导地位。76kDa 聚乳酸载药微球粒径明显小于 50、100kDa 聚乳酸载药微球粒径,再加聚乳酸是疏水性高分子,药物往外扩散占主导,所以释放最快。综合分析,甲氨蝶呤从聚乳酸微球的释放非常缓慢,无明显突释效应。

4 结 论

(1) 微细化的 MTX 呈纳米粒(约 100nm),颗粒表面光滑,球形度好,因小尺寸而团聚。借助高压微胶囊成型装置,引入抗溶剂作为接收溶液,采用高压静电抗溶剂法成功制备球形度好、表面光洁、分散性好的载 MTX 聚乳酸微球。

(2) 红外光谱表明经高压静电抗溶剂过程,MTX 被成功包埋到聚乳酸微球中,并且药物和材料均未发生明显变化,有利于药物剂型的稳定。

(3) 投入 MTX 量越大,载药复合微球的包封率越低;粒径越小,载药量、包封率越低。

(4) 制备的载 MTX 聚乳酸复合微球在前 0.5h 内,MTX 的累积释放量均低于 10%,远低于药典的规定,不存在突释现象;MTX 的投药量对复合微球的释放影响较大,投药量越大,释放越快;MTX 从聚乳酸微球中释放缓慢,长达 100d。

致谢:感谢福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划资助项目。

参考文献:

- [1] Kumari A, Yadav S K, Yadav S C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010, 75(1): 1-18.
- [2] Sershen S, West J. Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54(9): 1225-1235.
- [3] 罗培培,左奕,孙斌等. 载异烟肼聚己内酯微球的制备及其性质研究[J]. *功能材料* 2011, 42(8): 1410-1414.
- [4] Foulmann K, Guastalla J P, Caminet N, et al. What is the best protocol of single-agent methotrexate chemotherapy in nonmetastatic or low-risk metastatic gestational trophoblastic tumors? a review of the evidence [J]. *Gynecologic Oncology*, 2006, 102(1): 103-110.
- [5] Annet N M, VanBeek M J, Arpey C J, et al. Intralesional methotrexate treatment for keratoacanthoma tumors: a retrospective study and review of the literature [J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2007, 56(6): 989-993.
- [6] Eugene R C. Nanoparticles: a personal experience for formulating poorly water soluble drugs [J]. *Journal of Controlled Release*, 2010, 141(1): 300-302.
- [7] Itoh K, Pongpeerapat A, Tozuka Y, et al. Nanoparticle formation of poorly water-soluble drugs from ternary ground mixtures with PVP and SDS [J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2003, 51(2): 171-174.
- [8] 李莉. 超临界流体技术制备甲氨蝶呤纳米颗粒及其磁性缓释剂型[D]. 厦门: 华侨大学, 2011.
- [9] Poncelet D, Babak V G, Goosen M F A, et al. Theory of electrostatic dispersion of polymer solutions in the production of microgel beads containing biocatalyst [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 1999, 79(2-3): 213-228.
- [10] Wang Shibin, Xu Feihai, He Hongshan, et al. Novel alginate-poly(L-histidine) microcapsules as drug carriers: In vitro protein release and short term stability [J]. *Journal of Macromolecular Bioscience*, 2005, 5(5): 408-414.
- [11] Ma X J, Vaccic I, Sun A. Generation of alginate-poly-L-lysine (APA) biomicrocapsules: the relationship between the membrane strength and the reaction conditions [J]. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 1994, 22(1), 43-69.
- [12] York P. Strategies for particle design using supercritical fluid technologies [J]. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1999, 2(11): 430-440.
- [13] 刘源岗,王士斌,王莹. 海藻酸钙-聚精氨酸聚电解质微胶囊强度性能研究[J]. *功能材料*, 2009, 40(1): 119-122.
- [14] 孙学战,刘源岗,王士斌,等. 栓塞型载卡培他滨微胶囊性能研究[J]. *复合材料学报*, 2011, 28(5): 106-111.
- [15] Liu Yuangang, Sun Xuezhuan, Wang Shibin, et al. Preparation of nanoparticles embedded microcapsules (NEMs) and their application in drug release [J]. *Materials Letters*,

- 2012, 75(1): 48-50.
- [16] Chen Aizheng, Li Li, Wang Shibin, et al. Nanonization of methotrexate by solution-enhanced dispersion by supercritical CO₂ [J]. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2012, 67: 7-13.
- [17] Meng Fanzheng, Jiang Yi, Sun Zihui, et al. Electrohydrodynamic liquid atomization of biodegradable polymer microparticles: effect of electrohydrodynamic liquid atomization variables on microparticles [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2009, 113(1): 526-534.
- [18] Xie Jingwei, Wang Chihwa. Encapsulation of proteins in biodegradable polymeric microparticles using electrospray in the Taylor cone-jet mode [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(5): 1278-1290.
- [19] 李 像. 载抗肿瘤药物 PLGA 微球的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- [20] Yamaguchi Y, Takenaga M, Kitagawa A, et al. Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: initial burst release controlled by hydrophilic additives [J]. *Journal of Controlled Release*, 2002, 81(3): 235-249.
- [21] Wang Shibin, Chen Aizheng, Weng Lianjin, et al. Effect of drug-loading methods on drug load, encapsulation efficiency and release properties of alginate/poly-L-arginine/chitosan ternary complex microcapsules [J]. *Macromolecular Bioscience*, 2004, 4(1): 27-30.
- [22] 王明波, 冯庆玲, 余振定 等. PLGA 微球包埋药物的稳定性及释放研究的新进展 [J]. *功能材料*, 2011, 42(4): 591-595.

Preparation of methotrexate-loaded PLLA microspheres by a high-voltage electrostatic antisolvent process

CHEN Ai-zheng^{1,2}, YANG Yue-mei¹, WANG Shi-bin^{1,2}, LIU Yuan-gang^{1,2}, DANG Ting-ting¹

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Institute of Biomaterials and Tissue Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Using the supercritical CO₂ technology-based methotrexate (MTX) nanoparticles as small molecular drug model, the MTX-loaded poly (L-lactide) (PLLA) microspheres were prepared by a high-voltage electrostatic antisolvent process. The resulting MTX-loaded PLLA microspheres were characterized by scanning electronic microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectrophotometry (FT-IR), and their drug load, encapsulation efficiency and drug release profiles were also investigated. The results show that the MTX-loaded PLLA microspheres have a smooth surface with a mean size range from 10 μm to 50 μm; Fourier transform-infrared (FT-IR) spectra revealed that no alteration of chemical structure occurred during the high-voltage electrostatic antisolvent process, which is favorable for drug carries; with an increase in theoretical drug load (2.5%, 5.0%, and 10.0%), the encapsulation efficiency decreased (18.0%, 7.1%, and 2.3%, respectively); the MTX-loaded PLLA microspheres released the drug with a long sustained-release effect without a burst release.

Key words: high-voltage electrostatic antisolvent; methotrexate; poly (L-lactide) microspheres; long sustained-release