

复乳法及其改良法制备的干扰素 PLGA 微球载药释药特性的对比*

罗宇燕¹, 麦海燕¹, 黎 呐², 金启星¹, 黄小舟¹, 张永明¹

(1. 中山大学附属第三医院, 广东 广州 510630;

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006)

摘要: 改良法在复乳法基础上结合了海藻酸钠与 Ca^{2+} 螯合形成缓释凝胶的原理。分别用上述两法制备蛋白药物干扰素 $\alpha-1b$ 的聚乳酸聚乙醇酸 (PLGA) 微球, 以包封率、载药量等为指标, 评价其理化性质; 扫描电镜观察微球内外形态, 软件计算其结构参数; 用表面蛋白染色、激光共聚焦显微镜观察蛋白在微球表面及骨架内的分布情况; 考察微球体外释药行为。与复乳法相比, 改良法所得微球有较高的包封率和载药量 (61.85%, 0.7243%), 表面孔洞少、孔隙率低; 内部孔洞大而少, 孔隙率无显著差异; 蛋白更多地分布在微球内部孔洞壁上而非表面; 突释显著降低, 缓释时间延长至 20 d 以上, 30 d 累积释药约 70%。表明改良法所得微球载药释药性能较好, 释药符合缓释制剂标准。

关键词: 缓释微球; 聚乳酸聚乙醇酸; 干扰素; 改良复乳法; 激光共聚焦

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2014) 03-0110-05

To Compare the Drug-Loading Characteristics and Release Behavior of Interferon PLGA Microspheres Prepared by Normal and Modified Double-Emulsion Methods

LUO Yuyan¹, MAI Haiyan¹, LI Na², JIN Qixing¹, HUANG Xiaozhou¹, ZHANG Yongming¹

(1. The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Guangzhou 510630, China;

2. School of pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangdong Guangzhou 510006, China)

Abstract: The modified method integrated the principal that sodium alginate produces ionic interaction with calcium ion to form a kind of sustained-release gel into the double-emulsion method. Interferon $\alpha-1b$ (IFN $\alpha-1b$) poly (lactic-co-glycolic) (PLGA) microspheres were prepared by the above two methods. Encapsulation efficiency, drug loading, yield and average size were used to evaluate the physicochemical properties of microspheres; Scanning electron microscope was taken to observe the outlook and internal morphology of microspheres, while the structure parameters were analyzed by the image analysis software Image J; Staining surface protein method and confocal laser scanning microscope were utilized respectively to observe protein distribution on the surface and inside the microsphere skeletons; Finally, the microspheres *in vitro* release pattern was studied. Compared with microspheres made by the double-emulsion method, the ones made by modified method were of the following characteristics: high encapsulation efficiency and drug loading (61.85%, 0.7243%); less pores on the surface with lower surface porosity; less but bigger pores inside the micorspheres, with cross-sectioned porosity equal to the double-emulsion

* 收稿日期: 2013-10-31

基金项目: 广东省重大科技专项资助项目 (2011A08054003)

作者简介: 罗宇燕 (1985 年生), 女; 研究方向: 生物制剂与药代动力学; 通讯作者: 张永明;

E-mail: zhangym@tom.com

method; less proteins distributed on the surface, while more in the inner hole wall of the microspheres; The cumulated release percent was about 70 % in 30 d, with apparently less burst-release and sustained-release period over 20 d. The result shows that IFN-PLGA microspheres produced by modified method were of better drug-loading and release properties.

Key words: sustained-release microspheres; poly (lactic-co-glycolic) (PLGA); interferon (IFN); modified double-emulsion method; confocal laser scanning

干扰素 (interferon, IFN) 是一种广谱抗病毒剂, 目前主要用于治疗慢性乙肝、丙肝等疾病。作为一种蛋白药物, 其分子量大, 半衰期短, 体内外稳定性差, 临床上主要的剂型是溶液型注射剂和冻干粉针。注射给药后, 药物很快就被清除或降解, 为了达到疗效常常需要频繁、大剂量及长时间给药, 导致毒副作用及耐受性的产生^[1-2]。

使用高分子材料包载蛋白药物制成微球制剂, 可达到延长药物作用时间、提高药效的目的。其中, 聚乳酸聚乙醇酸 (PLGA) 由于具有良好的生物相容性和生物可降解性等特点, 成为常用的微球载体^[3]。目前最常用的制备蛋白微球的方法是复乳法^[4]。而改良法是在复乳法研究的基础上提出的新工艺^[5-7], 在微球制备的复乳和固化阶段, 内水相的海藻酸钠 (Sodium alginate, Sa) 与外水相中的 Ca^{2+} 相互渗透螯合成海藻酸钙凝胶, 并与微球骨架同步形成, 无需二次包封, 操作简单。本实验以 PLGA 为载体, 分别采用复乳法及其改良法制备 IFN α -1b 缓释微球, 对比了两种方法所得微球的理化性质、内外形态、表面和及骨架内的蛋白分布情况, 以及体外释放特性。

1 试剂与仪器

1.1 试剂

重组人干扰素 α -1b (批号: 110301, IFN: 1.70 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 深圳科兴有限公司); 海藻酸钠 Protanal LF 200DL (美国 FMC 公司); 聚乳酸聚乙醇酸 (PLGA, LA/GA 摩尔比为 50:50, 黏度为 0.85 $\text{dL}\cdot\text{g}^{-1}$, 美国伯明翰聚合物公司); micro BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Pierce 公司); FITC-BSA (美国 Sigma 公司); 考马斯亮蓝染色液 G-250 (碧云天生物研究所); 二氯甲烷 (天津市富宇精细化学有限公司); 其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

FA25 匀浆器 (上海弗鲁克液体机械制造有限公司); L-550 台式低速大容量离心机; GZ 强力电动搅拌器 (金坛市医疗仪器厂); ALPHA 1-4 LSC 冷冻干燥机 (德国 CHRIST 公司); BIO-TEK

ELX-800 全自动酶标仪 (美国宝特公司); SHA-B 水浴恒温振荡器 (江苏省金坛市宏华制造厂); JSM26700F 冷场发射扫描电镜 (日本电子公司); EG1160 石蜡切片机 (德国徕卡); Leica CM1850 冷冻切片机 (德国徕卡); LSM710 激光共聚焦显微镜 (德国 Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 干扰素微球的制备

采用复乳法制备 IFN-PLGA 微球, 即将适量的重组 IFN α -1b 粉末 (理论载药量为 1%) 溶解于泊洛沙姆 188 (F68) 溶液中, 形成均一的内水相, 再与一定浓度的 PLGA 二氯甲烷溶液混合, 在冰浴条件下高速匀浆 1 min 制成初乳 (W/O); 将初乳迅速转移至聚乙烯醇 (PVA) 水溶液 (外水相 1) 中, 搅拌形成 W/O/W 型复乳; 最后将复乳转移至大体积的 PVA 水溶液 (外水相 2) 中, 低速搅拌 3 h 使有机溶剂挥发、微球固化。用蒸馏水洗涤 3 次, 离心收集微球, 冻干得微球粉末。

使用改良法制备微球时, 在 F68 溶液中加入 Sa 粉末, 使 Sa 在内水相中的质量浓度为 12 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 外水相 1、2 中分别加入氯化钙, 使其对应质量浓度分别为 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 其余操作与复乳法一致。

2.2 微球包封率、载药量和产率的测定

精密称定载药微球 10 mg, 并加入到 5.0 mL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH / 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS 溶液中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下振荡 48 h, 使微球完全溶解。离心后取上清液, 用 BCA 法测定蛋白含量。背景吸收值用空白微球裂解后的上清液作校正。

$$\text{包封率} = \frac{\text{微球中 IFN 的含量}}{\text{投药量}} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = \frac{\text{微球中 IFN 的含量}}{\text{微球的质量}} \times 100\%$$

$$\text{产率} = \frac{\text{微球产量}}{\text{微球理论量}} \times 100\%$$

2.3 微球的表面及内部形态

2.3.1 微球粒径的测定 取适量冷冻干燥后的

微球, 用蒸馏水分散, 在光学显微镜下观察微球的外观形态, 同时选择有代表性的区域, 测定 300 个粒子, 计算平均粒径。

2.3.2 微球形态的测定 将冷冻干燥后的微球或经石蜡切片后的微球切片固定在导电胶上, 置于真空条件下, 喷上金粉。然后用扫描电子显微镜在电子束强度为 10 kV 的条件下观察微球的表面形态。

2.3.3 微球表面及截面孔隙率 从每种处方的微球及其切片的扫描电镜图片中选取至少 6 张, 使用 Image J 软件分析微球及其截面的孔洞数目、孔洞总面积及微球面积, 计算微球表面及截面孔隙率^[8]。

$$\text{表面孔隙率} = \frac{\text{微球表面孔隙的总面积}}{\text{微球的平面面积}} \times 100\%$$

$$\text{截面孔隙率} = \frac{\text{微球截面孔隙的总面积}}{\text{微球的平面面积}} \times 100\%$$

2.4 蛋白在微球中的分布情况

2.4.1 微球表面的蛋白染色 分别称取复乳法和改良法制备的 IFN 微球适量于离心管中, 各加入适量考马斯亮蓝 G-250 染色液浸泡 5 min, 涡旋使微球粉末分散均匀。离心弃上清液后, 加入适量蒸馏水洗涤微球 4 次, 冷冻干燥后拍照。

2.4.2 蛋白在微球内的分布情况 将两种方法制备的载荧光蛋白 FITC-BSA 的微球进行冷冻切片 (厚度约 8 μm), 在激光共聚焦显微镜下观察微球截面中蛋白的分布情况。固定吸收波长/激发波长为 488 / 525 nm, 放大倍数为 400 倍。

2.5 微球的体外释放测定

精密称取约 50 mg 微球置于 5 mL 离心管中, 加入 1.5 mL PBS 液 (pH 值为 7.4, 含有 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 F68), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡器中以 100 r/min 的振荡, 分别于不同时间点定时离心过滤, 取出上清液, 同时补加新鲜的 PBS。采用 micro BCA 微孔板法测定所取样品中的蛋白含量, 计算累积释药量, 绘制体外释药曲线。分别采用零级、一级方程、Higuchi 模型和 Korsmeyer-Peppas 方程对释药行为进行拟合。其中, Q 代表累积释放百分比, t 代表时间, r 代表相关系数。

3 结果

3.1 两种制备方法所得微球的理化性质研究

经过前期实验的筛选^[5-6], 得到较优的微球制备工艺, 分别以复乳法和改良法制备 IFN-PLGA 微球, 所得微球均为流动性良好的白色疏松粉末。其包封率分别为 54.37%, 61.85% ($P < 0.05$), 载

药量为 0.650 7%, 0.724 3% ($P < 0.05$), 产率为 85.27%, 85.03% ($P > 0.05$), 平均粒径为 73.69 μm , 71.04 μm ($P > 0.05$)。可见使用改良法制备的微球具有较高的包封率和载药量, 制备工艺对产率及平均粒径的影响不显著。

3.2 两种制备方法所得微球的内外形态

对于包载亲水性大分子药物的微球, 药物的初期释放主要是通过孔洞扩散, 此时微球的表面孔隙率和内部形态特征起着重要的作用^[8]。使用扫描电镜对微球表面及截面进行观察 (见图 1), 并运用软件分析微球的表面及截面参数。复乳法与改良法的表面孔隙率分别为 7.9%, 0.48% ($P < 0.05$), 表面孔隙个数分别为 221, 35 ($P < 0.05$), 截面孔隙率分别为 48.9%, 48.1% ($P > 0.05$), 截面孔隙个数分别为 320, 146 ($P < 0.05$)。从外观而言, 复乳法制备的微球表面孔洞较大且多, 而改良法所得微球光滑圆整, 表面孔洞较少且孔径小。截面形态方面, 改良法所得微球内部孔洞较大但数目较少, 截面孔隙率与复乳法相当。

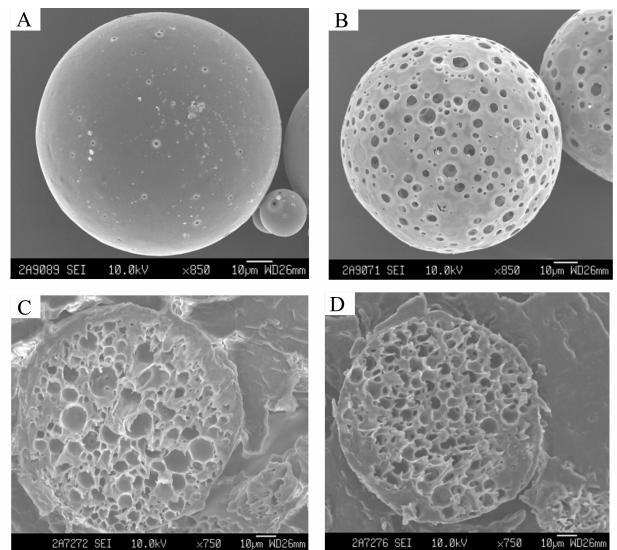


图 1 微球的扫描电镜图

Fig. 1 Scanning electron micrographs of microsphere (A, C: 改良法所得微球外部、内部形态; B, D: 复乳法所得微球外部、内部形态)

3.3 两种制备方法所得微球的表面蛋白分布量

众所周知, 在体内外释放过程中, 靠近微球表面的药物最先扩散出来, 其中浅表蛋白分布量较多的微球, 容易产生突释^[9], 有可能导致血药浓度接近或超过中毒水平, 产生明显的不良反应。考马斯亮蓝 G-250 染色液可以专属性地对蛋白染色, 游离的 G-250 与蛋白结合形成蓝色复合物, 其颜

色的深浅与蛋白质含量成正比。从染色微球的表面颜色深浅可得知浅表的蛋白分布量^[10]，预测微球的突释效应。分别对两种方法制得的 IFN 微球进行染色，从图 2 可得改良法所得微球的外观以浅蓝色为主，带有少量深蓝色微粒；而复乳法组微球则均一地呈现深蓝色。说明改良法所得微球的表面蛋白分布量较少。

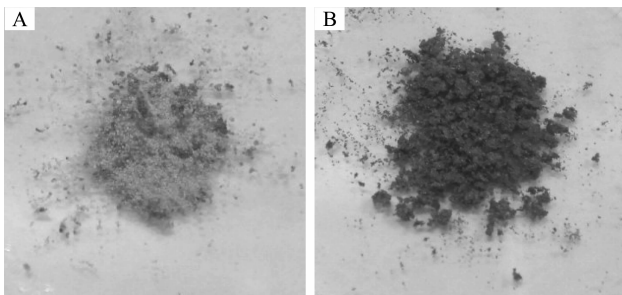


图 2 IFN-PLGA 微球染色图

Fig. 2 Dyeing of IFN-PLGA microspheres

(A: 改良法所得微球; B: 复乳法所得微球)

3.4 蛋白在微球内部的分布情况

使用激光共聚焦显微镜可观察到样品中的荧光物质，从而直观地得到药物在制剂中的分布情况^[11-12]。以荧光蛋白 FITC-BSA（激发波长：495 nm；绿色荧光）代替 IFN 作为模型蛋白制备微球，通过激光共聚焦显微镜对载药微球的切片进行扫描，观察荧光蛋白在不同制备工艺所得微球中的分布情况（图 3）。图中发亮物质为 FITC-BSA，亮度越高的地方代表蛋白量越多。可见改良法所得微球的内部分布着大小不均一的孔洞，孔洞之间相对独立，蛋白较多地分布在微球中部和内部；而复乳法所得微球内部孔洞多，且孔隙连通性高，蛋白几乎均匀分布于微球孔壁上。

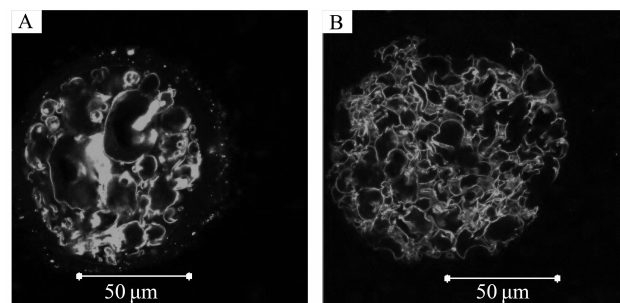


图 3 FITC-BSA 微球切片的激光共聚焦显微镜图

Fig. 3 Laser scanning confocal microscopy pictures of FITC-BSA microspheres slices

(A: 改良法所得微球; B: 复乳法所得微球)

3.5 两种制备方法所得微球的体外释放性能的研究

考察两种制备方法所得微球的体外释药行为，分别测定不同时间的释药量，以横坐标为释药时间，纵坐标为累计释药百分比绘制曲线（图 4），并对体外释放曲线进行拟合。结果可得，复乳法 1 d 的突释百分比（37%）大于改良法（30%）。前者 7 d 内累积释放达到 72%，但此后阶段的释药量少，30 d 仅释放 79%。而改良法所得微球在 2~20 d 的范围内以均匀速度释放药物，缓释时间较长，30 d 的累积释放接近 70%。两法所得微球的释药曲线均符合 Korsmeyer-Peppas 方程（ $r > 0.97$ ），分别为 $Q = 40.397 t^{0.230}$ ， $Q = 30.147 t^{0.256}$ 。方程指数均小于 0.43，提示药物主要以扩散形式释放。

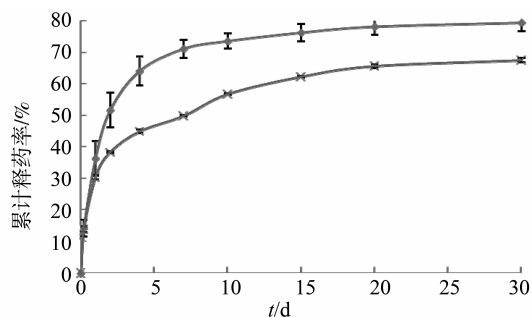


图 4 微球的体外释放图

Fig. 4 Effect of microsphere preparation method on the drug release

(×: 改良法; ◆: 复乳法)

4 讨论

本实验在同等条件下对比了改良法与复乳法制备的 IFN-PLGA 微球的载药特性，包括微球的理化性质、内外形态、微球表面及骨架内的蛋白分布情况，以及体外释放行为。

改良法是在复乳法的工艺基础上，于内水相添加了 Sa，外水相添加了氯化钙。该法制备的微球具有较高的包封率和载药量，其表面的蛋白量少、孔洞较少且孔径小。主要原因是由于在微球制备的复乳及固化过程中内外水相相互渗透：外水相中的 Ca^{2+} 与分散于油相中含 Sa 的内水相液滴相互螯合，或者 Sa 液滴往外水相扩散过程中与 Ca^{2+} 螯合形成海藻酸钙凝胶，一定程度地填充因溶剂挥发在微球内形成的孔隙，使微球表面更为紧密。此外，海藻酸钙凝胶的形成，可减缓内水相液滴中的蛋白药物往外水相扩散，减少微球表面的药物分布量，使更多的蛋白包封于微球中。

从微球截面的扫描电镜图可得,改良法所得微球内部孔洞较大而数目较少,孔径分布不均,总体的截面孔隙率与复乳法相当。这是由于 Sa 的添加大大增加了内水相的黏度^[13],从而使微球制备过程中内水相液滴大小均匀性下降、液滴更容易破裂融合成更大的液滴,致使干燥后的微球内部呈现大小不一的孔洞,孔洞数目显著少于复乳法制备的微球。

与复乳法相比,改良法可增加微球表面结构致密性,降低浅表蛋白分布量,使微球突释率显著降低,缓释天数由 7 d 提高到 20 d 以上。释放过程中溶出介质逐渐渗入微球内部,分布于骨架中的海藻酸钙凝胶慢慢吸水膨胀,一定程度地减慢药物扩散,延长药物释放时间,提高后期药物释放浓度;但 30 d 内累积释药率稍低于复乳法。除了微球结构紧密、海藻酸钙延缓释药的原因外,可能存在小部分药物与凝胶或载体结合紧密,以至释放缓慢。

参考文献:

- [1] LIANG T J, REHERMANN B, SEEFF L B, et al. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C[J]. *Ann Intern Med*, 2000, 132(4):296-305.
- [2] DIWAN M, PARK T G. Stabilization of recombinant interferon-by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2003, 252(1/2):111-122.
- [3] ESTEY T, KANG J, SCHWENDEMAN S P, et al. BSA degradation under acidic conditions: a model for protein instability during release from PLGA delivery systems[J]. *J Pharm Sci*, 2006, 95(7):1626-1639.
- [4] KARAL-YILMAZ O, SERHATLI M, BAYSAL K, et al. Preparation and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres using a double emulsion/solvent evaporation technique[J]. *J Microencapsul*, 2011, 28(1):46-54.
- [5] 罗宇燕,张永明,吴传斌.一种聚乳酸聚乙醇酸缓释微球的制备工艺[J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(11):875-878.
- [6] 罗宇燕,李姝瑾,张永明.聚乳酸聚乙醇酸微球体外突释的影响因素的研究[J]. *今日药学*, 2011, 21(4):207-210.
- [7] YANG Fan, SONG Fenglan, PAN Yufang, et al. Preparation and characteristics of interferon alpha poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres[J]. *J Microencapsul*, 2010, 27(2):133-141.
- [8] MAO Shirui, XU Jing, CAI Cuifang, et al. Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2007, 334(1/2):137-148.
- [9] MAO Shirui, SHI Yi, LI Luk, et al. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68(2):214-223.
- [10] YAMAGUCHI Y, TAKENAGA M, KITAGAWA A, et al. Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: initial burst release controlled by hydrophilic additives[J]. *J Control Release*, 2002, 81(3):235-249.
- [11] LAMPRECHT A, SCHÄFER U, LEHR C M. Structural Analysis of Microparticles by Confocal Laser Scanning Microscopy[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2000, 1(3):E17.
- [12] XU Qingxing, CHIN Shien, WANG Chihwa, et al. Mechanism of drug release from double-walled PDLLA(PLGA) microspheres[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(15):3902-3911.
- [13] 郑俊民. *药用高分子材料学*[M]. 3 版. 北京:中国医药科技出版社, 2009:157.