

氟尿嘧啶 3 种原位形成植入体的体外释放度研究

符旭东 陈晓 匡长春 廖晓琴 (广州军区武汉总医院 武汉 430070)

摘要 目的: 考察处方和制备工艺对氟尿嘧啶(5-FU)3 种原位形成植入体释药速度的影响。**方法:** 以单甲基聚乙二醇-羟基乙酸共聚物(mPEG-PLGA)为材料制备温敏性凝胶,以聚乙二醇/乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA-PEG-PLGA)为材料制备原位形成凝胶剂,原位形成微球分别以 PLGA-PEG-PLGA、聚乳酸(PLA)、端羧基聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA-COOH)为材料制备。采用 UV 法通过透析袋法测定体外释放度。**结果:** 聚合物的浓度是影响原位植入体体外释放度的主要因素。除此外对于原位微球剂来说,N-甲基吡咯烷酮(NMP)和油相的比例也是影响体外释放度的重要因素之一。3 种原位形成植入体主要通过扩散机制释药,其中温敏性凝胶的释药速度最快,原位微球剂与原位形成凝胶剂相比,突释减小,释药速度降低。**结论:** 原位微球剂的控释效果最理想,值得进一步研究。

关键词 氟尿嘧啶;原位微球;温敏性凝胶;原位形成

中图分类号:R944.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-049X(2011)05-0602-04

Studies on *in vitro* Release of Three In-situ Forming Implants Containing 5-Fluorouracil

Fu Xudong, Chen Xiao, Kuang Changchun, Liao Xiaoqin (Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT Objective: To examine the effects of formulation factors on *in vitro* release rate of three in-situ forming implants containing 5-fluorouracil (5-FU). **Method:** Thermosensitive hydrogel was prepared with mPEG-PLGA and in-situ forming hydrogel was prepared with PLGA-PEG-PLGA. Three kinds of polymers, namely PLGA-PEG-PLGA, PLA and PLGA-COOH were used to prepare in-situ forming microspheres. *In vitro* release rate was determined by UV through dialysis bag method. **Result:** The polymer concentration was the main factor to influence *in vitro* release of in-situ forming implants containing 5-FU. The volume ratio of NMP and oil phase was also the important factor to affect drug release rate of in-situ forming microspheres. Drug release from the three in-situ forming implants was accorded with diffusion mechanism. *In vitro* release rate of thermosensitive hydrogel was the quickest and in-situ forming microspheres had less burst-effect and more stable release rate compared with in-situ forming hydrogel. **Conclusion:** In-situ forming microspheres have more desirable controlled effects and are deserved to be investigated further.

KEY WORDS 5-fluorouracil; In-situ microspheres; Thermosensitive hydrogels; In-situ forming

增生性玻璃体视网膜病变(proliferative vitreoretinopathy, PVR)是孔源性视网膜脱离的最常见并发症,也是导致手术失败及术后视网膜脱离复发最主要的原因,因此药物抑制 PVR 的发生十分必要。氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)具有明显的抗增殖作用,是临床常用的抑制 PVR 的药物。传统给药方式如全身给药、玻璃体腔内注射、球后注射给药等,由于血-眼屏障和药物半衰期短以及需要频繁给药等因素,影响了治疗效果。玻璃体内可注射长效微球制剂能提高玻璃体腔内的药物浓度,并延长给药间隔,成为 5-FU 制剂研发的热点。但是由于 5-FU 的给药剂量较大,微球剂的载药能力以及玻璃体腔注射的容量有限,会影响微球注射时的通针性,此外玻璃体内注射微球制剂还可能影响玻璃体的通透性^[1],这是由于局部沉积的微球量多而且不均匀所导致的。由此可见 5-FU 微球制剂要实现玻璃体腔内注射有明显缺陷。

原位(*in situ*)形成植入体是一种可以通过注射方式给药、并能发挥长效作用的给药系统,该系统在体内环境下由于温度、pH 的改变以及系统中溶剂向体液扩散,聚合物溶解度降低,可在注射部位沉积而发挥控制药物释放的作用^[2,3]。原位形成植入体由于操作简单、载药量较高、可避免微球制剂注射时易造成针头堵塞等问题,具有良好的开发前景,目前已有注射用亮丙瑞林原位凝胶剂上市。

笔者以具有良好生物可降解性以及组织相容性的聚酯类聚合物为载体材料,分别制备了 3 种原位形成植入体(温敏性凝胶剂、原位形成凝胶剂以及原位形成微粒制剂)。本文制备的聚乙二醇单甲醚/聚乳酸-乙醇酸共聚物(mPEG-PLGA)凝胶,属于高温收缩型凝胶,在低温时凝胶在水中溶胀,当升至一定温度时,溶液发生胶凝化。原位形成凝胶剂是将聚合物溶解在与水互溶的极性溶剂而得到的高分子溶液,当与释放介质接触时,随着溶剂向水相扩

基金项目:全军十一五青年基金(编号:06Q033)

通讯作者:符旭东 Tel:(027)87649309 E-mail:fuxudong2005@yahoo.com.cn

散,聚合物溶解度降低而发生半固化。原位微球剂是将溶有聚合物的极性溶液分散在含有表面活性剂的油相中而得到的乳状液,该乳状液在与释放介质接触时,内相溶剂可通过油水界面向水相不断扩散,聚合物因此逐渐固化。本文比较了3种原位植入体体外释药行为,并重点研究了处方和制备工艺对5-FU原位微球剂体外释放度的影响,为5-FU原位形成植入体的后续研究奠定基础。

1 仪器与试剂

5-FU(济南健宝开元生物材料有限公司,批号:20090201);聚乙二醇单甲醚/聚乳酸-羟基乙酸共聚物(mPEG-PLGA, LA:GA:EO的比例是8:2:1.5,分子量4000~5000,PEG分子量1500,济南岱罡生物技术有限公司,批号:20081012);聚乳酸(PLA,分子量为7000,济南岱罡生物技术有限公司,批号:20080702),端羧基乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA-COOH,LA:GA的比例是1:1,分子量10000,济南岱罡生物技术有限公司,批号:20080401);聚乙二醇/乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA-PEG-PLGA,LA:GA的比例是75:25,分子量17000,PEG分子量15000,批号:20080402);N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP,分析纯,20080302);大豆油(江西金海棠药用油有限公司,批号:20080109);司盘80(天津市广成化学试剂有限公司,批号:20071210);其他试剂为分析纯。

UV-2660型紫外分光光度计(惠普公司);80-1离心沉淀仪(上海手术器械厂);快速混匀器(金坛市科兴仪器厂);SHZ-82恒温振荡器(国华企业);显微镜BX51(日本OLYMPUS);AB204-N电子分析天平(德国梅特勒-托利多)。

2 方法与结果

2.1 原位形成植入体的制备

2.1.1 5-FU温敏性凝胶剂 称取mPEG-PLGA 4 g置于20 ml水中,搅拌后静置于4℃冰箱中,并时时振荡,待mPEG-PLGA充分溶胀后,按处方比例加入5-FU,充分振摇,即得。

2.1.2 原位形成凝胶剂 称取适量聚合物和NMP,室温下混合至完全溶解,然后加入适量5-FU,振荡,混合均匀,即得。

2.1.3 5-FU原位形成微球的制备 按照一定比例称取5-FU和聚合物,溶解于0.5 ml NMP中,振摇使其充分溶解,在搅拌状态下,滴入含司盘80的大豆油中,磁力搅拌10 min即得。

2.2 mPEG-PLGA水溶液相转变温度的测定^[4,5]

采用文献报道的试管倒转法测定mPEG-PLGA

水溶液发生相转变的温度。取1 ml置于玻璃试管中,置于水浴中,温度从15℃逐渐升温至50℃,当溶液变成近乳白色,将试管取出记录温度,倒转观察试管中液体的形态,如果30 s中没有液体滑落,就认为溶液已经胶凝。同一样品平行测定3次。

2.3 5-FU原位形成植入体体外释放度的测定^[6]

称取约含有相当于2 mg 5-FU的原位形成植入体,置于透析袋中加入5 ml释放介质,两端扎紧后,放入盛有45 ml的pH7.4的磷酸盐缓冲液(含0.02%叠氮化钠)三角烧瓶中,于(37±0.5)℃的恒温振荡器中水平振荡,频率为72次/min,定时取样1 ml,同时补充介质1 ml。释放液稀释5倍后在266 nm测定吸光度A值,计算原位植入体的累积释放度。相同处方平行测定3次。

2.4 载药量对5-FU温敏性凝胶剂初始胶凝化温度

20% mPEG-PLGA凝胶的初始胶凝温度为28℃,当凝胶中5-FU的含量为1%、2%和4%时,凝胶的初始胶凝温度几乎没有改变。如图1所示,三种不同载药量的5-FU凝胶在1 h的释放均超过70%,24 h几乎完全释放。凝胶的突释是由于mPEG-PLGA在高温条件(37℃)快速脱水合作用导致的。

载药量为2%和4%的5-FU凝胶在1 h的释放度明显低于载药量为1%凝胶,这是因为5-FU略溶于水,在20℃水中的溶解度为1.22 g·ml⁻¹,当凝胶载药量为2%和4%时,5-FU混悬在胶体溶液中,由于需要溶解后才能通过扩散作用从凝胶中释放出来,因此载药量为2%和4%的5-FU凝胶释放速度低于载药量为1%的凝胶。

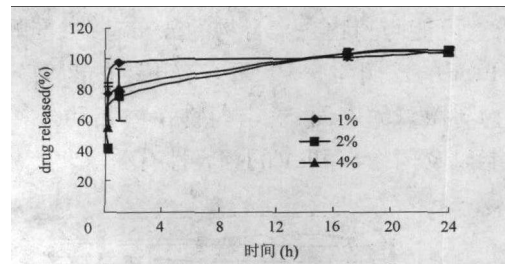


图1 载药量对5-FU温敏性凝胶剂体外释放度的影响(n=3)

2.5 处方对5-FU原位形成凝胶剂体外释放度的影响

如图2示,PLA在NMP中的浓度对原位凝胶的体外释放度有非常大的影响,当PLA在NMP中的浓度接近饱和浓度时,形成的原位凝胶突释明显降低。药物与聚合物的比例对原位凝胶初始阶段(前4 h)的释放影响较大,但是对24 h以后的释药行为几乎没有影响。当PLA在NMP中的浓度为40%时,原位凝胶剂24 h的释放度为60%左右,1周内

几乎全部释放。

从图2中还可以看出相同处方的不同样品在相同时间点释药百分率存在较大的差异,这可能与PLA溶液在释放介质中沉积时所形成的半固体形态有关,当形成较大的块状物时释药速度会因为与释放介质接触的面积减小而减慢,反之如果形成分散的粒状物时,释药速度会加快。

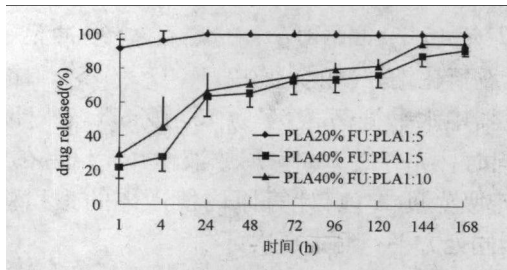


图2 聚合物浓度和药物与聚合物的比例对原位凝胶释放度的影响($n=3$)

2.6 处方和制备工艺对5-FU原位形成微粒剂体外

2.6.1 药物与PLA的比例对释药速度的影响

将PLA在NMP中的浓度固定在20%,司盘的浓度固定在2%,NMP和油的体积比控制在1:4,考察药物与聚合物的比例对原位微球释放度的影响,药物与PLA的比例分别为1:5,3:10,2:5,1:2。

从图3中可以看出随着药物与PLA比例的增加,微球的释药速度有增加的趋势,这是因为随着药物比例的增加,单位面积内与释放介质所接触的药物量增加,释药因此加快。但是当药物与PLA的比例为3:10时,原位微球在第1d的释药速度却明显加快,这可能与药物在聚合物的分布有关,推测当药物与PLA的比例为3:10,可能有更多的药物分布在聚合物与微球的表面,这与药物在内相和外相的溶解性能以及药物与PLA的相容性有关。

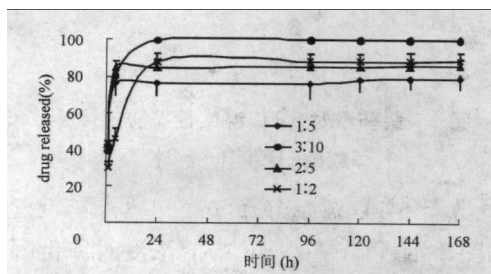


图3 药物与PLA的比例对释药速度的影响($n=3$)

2.6.2 司盘对原位微球释放度的影响

将PLA在NMP中的浓度固定在20%,药物与PLA的比例分别为1:5,NMP和油相的体积比固定在1:10,考察司盘(2%、5%和10%)对原位微球释放度的影响。

从图4中,可见司盘对微球的释药速度几乎没有影响。

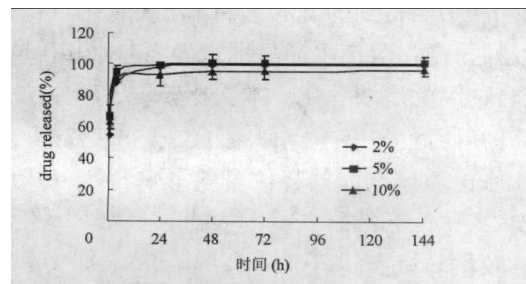


图4 司盘对原位微球释放度的影响($n=3$)

2.6.3 聚合物种类对原位微球释放速度的影响

将聚合物在NMP中的浓度固定在20%,药物与聚合物的比例设定为1:5,司盘浓度设为2%,NMP和油相的体积比固定在1:4,考察聚合物种类对原位微球释放度的影响。

从图5中可以看出聚合物的种类对微球的释药速度几乎没有影响。这是因为微球主要是通过扩散机制释药的,三种类型的微球在1h的释药速度均超过90%。

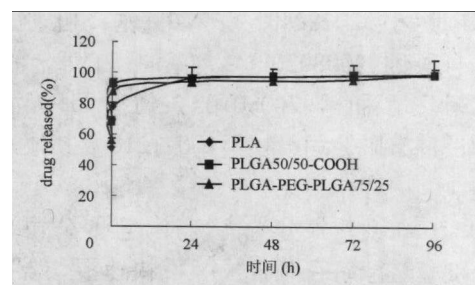


图5 聚合物种类对原位微球释放速度的影响($n=3$)

2.6.4 聚合物浓度对原位微球释放速度的影响

将药物与PLA的比例设定为1:5,司盘的浓度固定在2%,NMP和油相的体积比固定在1:4,考察聚合物在NMP中的浓度对原位微球释药速度的影响。

从图6中可见,随着聚合物在NMP中浓度的增加,微球的释药速度明显加快。这是因为随着聚合物浓度的增加,聚合物在外水相的沉积速度加快,阻止了药物向外相的快速扩散。

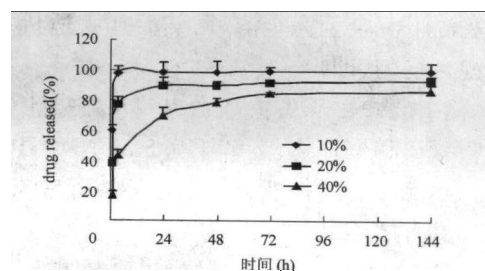


图6 聚合物浓度对原位微球释放速度的影响($n=3$)

2.6.5 NMP和油的体积比对原位微球释放速度的影响 将药物与PLA的比例设定为1:5,司盘的浓度固定在2%,PLA的浓度固定在40%,考察NMP和油的体积比对原位微球释放速度的影响。

从图7中可见,随着NMP与油相的体积比减小,原位微球的体外释放度明显减慢。可能的原因是随着油相比的增加,原位微球的粒径明显减小。如图8所示,当NMP和油的体积比为1:2,1:4和1:8时,采用光学显微镜测定微球的算术平均粒径分别为30.8,7.8和4.6 μm(n=200)。与其他两种处方相比,当NMP与油相的比例为1:2时,与释放介质接触面积减小,形成的微球粒径增大,释放速度减慢。

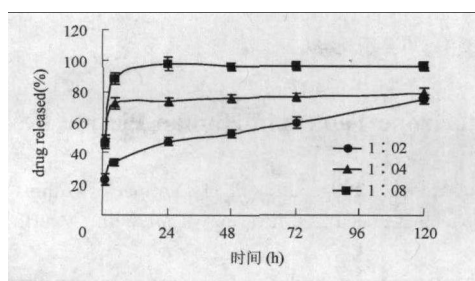
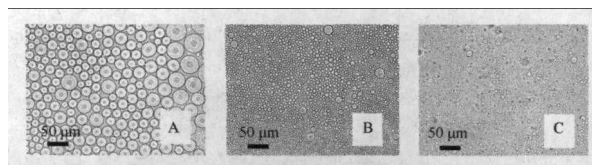


图7 NMP和油的体积比对原位微球释放速度的影响(n=3)



(NMP和油的体积比 A. 1:2 B. 1:4 C. 1:8 ×200倍)
图8 NMP和油的体积比对原位微球粒径的影响

2.7 3种原位形成植入剂体外释放度的比较

通过单因素考察,确定了影响3种原位植入体释放度的主要因素,确定了制备3种植入体的较优的工艺参数,即温敏性凝胶以20% mPEG-PLGA为载体,理论载药量为2%;原位形成凝胶剂以40% PLA的NMP为载体,5-FU与PLA的比例为1:10;原位微球剂以40% PLA的NMP为内相,以2%的司盘大豆油为外相,5-FU与PLA的比例为1:5,内相和油相的体积比固定在1:4。

比较上述3种植入体的释药曲线(见图9),并对3种植入体24h释放度的实测数据进行t检验,结果可以发现温敏性凝胶的控释能力最弱,24h药物基本上完全释放,药物主要是通过凝胶网状结构的孔道中扩散出来的,温敏凝胶在本文的体外释放条件下7d后完全溶解。原位微球剂与原位形成凝

胶剂相比,前者的24h释放度明显低于后者(P<0.05),说明原位微球的控释效果更好。这与原位微球中聚合物分散的均匀性以及油相阻止药物扩散有关。

从释药曲线来看,原位凝胶剂和原位微球在释放70%左右的药物后,释药速度明显降低,这是因为在释放初期,凝胶和微球主要是通过扩散机制释药的,到释药后期主要是通过聚合物的降解来控制药物释放的^[7]。原位微球剂在0~120h的释药曲线符合Higuchi方程,R²=0.97。

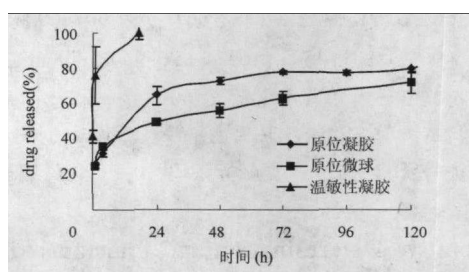


图9 3种原位形成植入剂体外释放度的比较(n=3)

3 结论

聚合物的浓度是影响原位植入体体外释放度的主要因素,此外对于原位微球剂来说,NMP和油相的比例也是影响体外释放度的重要因素。3种原位植入体主要是通过扩散机制释药,其中温敏性凝胶的控释能力最弱,原位微球剂的控释效果最理想。

参 考 文 献

- Guidetti B, Azéma J, Malet-Martino M, et al. Delivery systems for the treatment of proliferative vitreoretinopathy: materials, devices and colloidal carriers[J]. *Curr Drug Deliv*, 2008, 5(1): 7-19
- Kranz H, Bodmeier R. Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: in situ implants versus in situ microparticles[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2008, 34(2-3): 164-172
- Kranz H, Bodmeier R. A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery[J]. *Int J Pharm*, 2007, 332(1-2): 107-114
- Duwuri S, Janoria KG, Mitra AK. Development of a novel formulation containing poly (d, l-lactide-co-glycolide) microspheres dispersed in PLGA-PEG-PLGA gel for sustained delivery of ganciclovir[J]. *J Control Release*, 2005, 108(2-3): 282-293
- Jeong B, Bae YH, Kim SW. Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions[J]. *Macromolecules*, 1999, 32(21): 7064-7069
- 蒋智清, 林友文, 陈兰妹. 氟尿嘧啶微球体外释药的影响因素[J]. *福建医科大学学报*, 2006, 40(4): 365-366
- 平其能. 现代药剂学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998. 784 (2010-12-20 收稿 2011-02-20 修回)