

# 肺靶向利福平聚乳酸微球的研究

张万国\* 蒋雪涛 朱才娟 胡晋红\*

(第二军医大学药学院; \*第二军医大学长海医院药剂科, 上海 200433)

**摘要** 在单因素考察的基础上进行正交试验设计, 筛选出肺靶向利福平聚乳酸微球的最佳制备工艺条件; 利用桨板法研究了微球的体外释药规律; 考察了微球在不同温度下的稳定性; 用新西兰兔为实验对象, 研究了利福平聚乳酸微球的体内药动学及组织药物分布。结果制得的微球形态圆整, 粒径在 5~15  $\mu\text{m}$  范围内的占总体积的 86.54%, 微球平均粒径为  $9.00 \pm 4.08 \mu\text{m}$ ; 包封率为 31.9%; 载药量为 16.0%; 体外释药方程为  $Q = 20.77 + 10.12T^{1/2}$  ( $\gamma = 0.9892$ ); 微球在冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$  和室温 (20~25 $^{\circ}\text{C}$ ) 条件下性质稳定; 体内实验表明微球具有长效和肺靶向双重作用。

**关键词** 利福平; 聚乳酸; 微球; 肺靶向

利福平(rifampicin, 简称 RFP)是临床常用的一种抗结核药物, 在体内分布广泛, po 剂量大, 不良反应多<sup>[1]</sup>, 且有效治疗浓度维持时间短, 容易诱发结核杆菌的耐药性, 降低临床治疗效果。本文以聚乳酸(PLA)为载体研制一种利福平聚乳酸微球(rifampicin-poly-lactic acid-microspheres, RFP-PLA-MS), 通过控制其粒径大小, 使其 iv 后能浓集于肺组织, 缓慢释放利福平, 有效杀伤结核杆菌, 提高利福平的疗效, 而全身药物浓度降低, 减少其毒副作用。此项研究国内外均未见报道。

## 材 料 和 方 法

**仪器与药品** GS12-2 型电子恒速搅拌机; 800 型台式离心机; 日本 S-450 型电子扫描显微镜; 7530 型分光光度仪; 751G 型分光光度仪; RCD-6 型药物溶出仪; 810 高效液相色谱仪(Waters)。利福平, 上海五洲制药厂生产, 批号 930710, 质量符合中华人民共和国 1990 版药典; 聚乳酸, 分子量 25000, 山东医疗器械研究所生产, 化学纯; 甘油, 上海制皂厂生产, 药用规

格; 明胶、十二烷基硫酸钠, 购自上海化学试剂商店, 化学纯; 其他试剂为分析纯。

**RFP-PLA-MS 的制备** PLA-MS 的制备有溶媒挥散法<sup>[2]</sup>、溶媒萃取法<sup>[3]</sup>、熔融法<sup>[4]</sup>等。溶媒挥散法制备的 PLA-MS 表面光滑圆整, 本文在此基础上加以改进, 采用有机相分散、溶媒扩散二步法完成聚乳酸微球的制备。方法: 称取利福平和聚乳酸溶解于一定量的有机溶媒中, 在搅拌下缓缓加入分散介质中, 分散均匀, 再倾入扩散介质中, 搅拌至微球固化, 离心收集微球, 蒸馏水洗涤, 常压干燥即得。考虑到诸多因素对微球形成和质量的影响, 本文在单因素考察的基础上, 应用正交试验设计, 优选最佳制备工艺条件。

**微球形态及粒度分布观察** 用电子扫描显微镜和光学显微镜观察微球的外观形态。采用显微计数法<sup>[5]</sup>考察微球的粒度分布, 每次计数不少于 500 粒。

**微球包封率及载药量的测定** 采用紫外分光光度法<sup>[6]</sup>, 称取适量干燥微球, 加入二甲基甲酰胺定量溶解, 在 340 nm 波长处测定吸光度, 按标准曲线方程  $A = 0.00893 + 0.03899C$  ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ( $\gamma = 0.9999$ ) 计算微球含药量, 方法回收率为  $100.12\% \pm 1.37\%$ 。微球包封率

= (微球中药物总量/投药量) × 100%。

**微球体外释药性能考察** 采用桨板法<sup>[7]</sup>测定微球的体外释药性能。称取适量微球置于溶出杯内, 加生理盐水 900 ml, 恒温于 37 ± 0.5℃, 100 r·min<sup>-1</sup> 搅拌分散, 定时吸取滤液 5 ml, 按上述方法测定, 随即补加生理盐水 5 ml。根据利福平水溶液紫外吸收波长扫描图, 选择最大吸收峰波长 333 nm 测定吸收度, 按标准曲线法计算微球的累积释药量, 标准曲线方程为  $A = 0.00373 + 0.03809C(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$  ( $\gamma = 0.9999$ ), 方法回收率为 100.04% ± 0.46%。

**微球稳定性考察** 将干燥的 RFP-PLA-MS 分别密闭封装于玻璃小瓶中, 于冰箱 4℃、室温(20~25℃)和烘箱 37℃ 条件下贮存 3 个月, 检查微球的形态、药物含量及体外释药等。

**微球的体内药动学试验** 取健康新西兰兔 12 只, ♂, 体重 2~2.5 kg, 随机分为两组, 每组 6 只。经耳缘静脉注射给药, 剂量 5 mg·kg<sup>-1</sup> (按 RFP 计), 给药前禁食 12 h。第 1 组注射利福平的丙二醇—水溶液, 第 2 组注射 RFP-PLA-MS 的生理盐水混悬液。定时于耳缘静脉取血, 分离血浆, 用高效液相色谱法测定血药浓度<sup>[8]</sup>。

**组织药物浓度测定及微球组织分布观察** 取健康新西兰兔 60 只, ♂, 体重 2~2.5 kg, 随机分为两组, 每组 30 只, 按药动学方法分别注射利福平溶液和微球混悬液。在给药后 0.5, 2, 24, 72 和 168 h 分别每组处死 6 只, 取肝、肺、心、脾、肾组织各 1 g, 加 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 4 ml, 制备匀浆, 离心取上清液 2 ml, 加内标液(1.0 mg·ml<sup>-1</sup> 卡马西平甲醇溶液) 40 μl, 摇匀, 用乙醚—二氯甲烷(3:2) 混合液提取两次(5 ml × 2), 合并提取液, 于 40℃ 水浴氮气流下挥干, 残留物用甲醇 200 μl 溶解, 参照血药浓度测定方法, 取 25 μl 进样测定。方法标准曲线方程为  $Y = -0.001694 + 0.1695C(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$ , Y 值为利福平与内标物的峰面积比。方法回收率为 95.33% ± 2.38%, 最低检测限为 0.2 μg·g<sup>-1</sup>。另外分别将肺、肝和脾组织制成病理石蜡切片, 观察微球在各组织内分布状况。

## 结 果

### 1 各因素对聚乳酸成球的影响

有机溶媒是微球形成的关键, 比较二氯甲烷、氯仿和乙酸乙酯对聚乳酸成球的影响, 结果表明用二氯甲烷作有机溶媒, 聚乳酸成球最佳。

分散介质粘度对 PLA-MS 粒径的影响很大, 本文以有机相分散、溶媒扩散两步法制备 PLA-MS, 微球粒径取决于有机相在分散介质中的分散度。分别用 1.5% 海藻酸钠水溶液、2.0% 甲基纤维素水溶液和甘油试验, 均可制得微球。其中以甘油为最优, 有机相分散均匀, 聚乳酸成球率高, 且易于控制粒径。

有机相与甘油的体积比为 2:40 时, 有机相分散良好; 比例为 1:40 时, 有机相液滴间有明显的粘连现象; 比例为 4:40 时, 聚乳酸成球效果差, 呈大量碎片状。

二氯甲烷/甘油分散体系在 0.5% 的聚乙烯醇(PVA)或十二烷基硫酸钠水溶液中稀释扩散, 微球聚集现象严重。以 0.5% 明胶水溶液作扩散介质, 可制得疏松分散的 PLA-MS。

在有机溶媒、分散介质、扩散介质、有机溶媒与分散介质体积比固定的条件下, 试验了搅拌速度对微球粒径的影响: 搅拌速度为 400, 500 及 600 r·min<sup>-1</sup> 时, 微球粒径分别为 10.55 ± 5.27, 9.00 ± 4.08 及 7.96 ± 3.96 μm,  $n = 3$ 。结果显示加快有机相在分散介质中的搅拌速度, 微球的粒径减小。

根据以上考察结果, 选定利福平: 聚乳酸、搅拌速度、有机相在甘油中分散时间、分散体系在 0.5% 明胶水溶液中扩散时间, 作 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交试验设计, 以微球粒径分布、包封率和载药量作指标对试验结果进行评价分析, 得到最佳实验条件为利福平(g): 聚乳酸(g) 为 1:1, 搅拌速度为 500 r·min<sup>-1</sup>, 分散时间为 10 min, 扩散时间为 10 min。在此条件下制得的微球, 形态圆整, 表面光滑(图 1), 微球平均粒径为 9.00 ± 4.08 μm, 在 5~15 μm 范围内的微球占总体积的 86.54%。微球包封率为

31.9%，载药量为 16.0%。

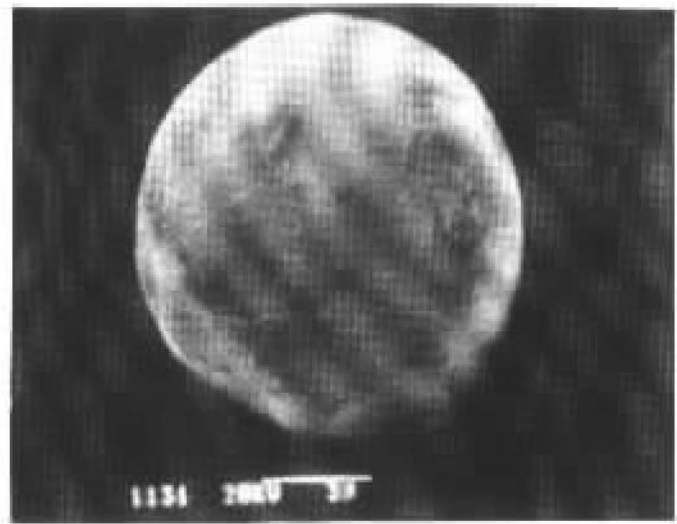


Fig 1 Microphotograph of RFP-PLA-MS by scanning electron microscope ( $\times 4000$ ).

## 2 微球体外释药性能

以桨板法测定微球体外释药性能,结果见图 2,在最初 10 min 释药量达 20.37%,48 h 微球累积释药百分率为 85.14%,其释药动力学方程为  $Q = 20.77 + 10.12t^{1/2} (\gamma = 0.9892)$ 。

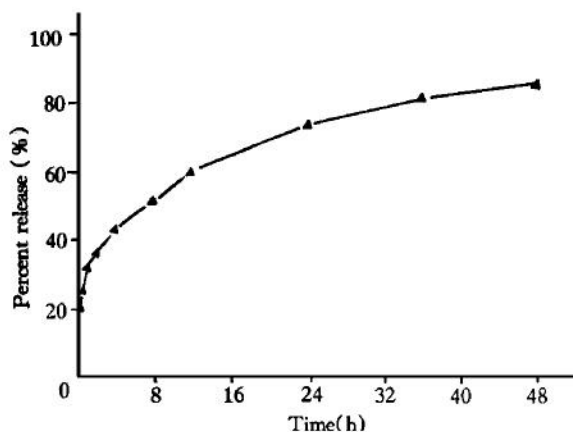


Fig 2 *In vitro* release of RFP from RFP-PLA-MS.

## 3 微球的稳定性

在冰箱 4℃ 和室温条件下放置 3 个月,微球的形态、含药量和体外释药未见明显变化(表 1)。37℃ 条件下,聚乳酸软化,微球彼此粘连成团,含药量也有下降。

Tab 1 Stability of RFP-PLA-MS at different temperatures ( $n = 3$ )

Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	Drug content (%)	
	0 month	3 months
4	15.96 $\pm$ 0.80	15.52 $\pm$ 0.27
20~25	15.98 $\pm$ 0.71	15.40 $\pm$ 0.50
37	15.91 $\pm$ 0.57	14.38 $\pm$ 0.92

## 4 微球体内药动学

血药数据经计算机 MCPKP 程序处理,药动学参数见表 2,血药浓度曲线见图 3。RFP-PLA-MS 组血药浓度相对平稳,血药浓度下降缓慢。给药后 24 h 血药浓度为 0.72  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,72 h 血药浓度为 0.27  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,仍然维持在利福平有效抑菌浓度范围内 (0.02 ~ 0.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )<sup>[9]</sup>。利福平溶液组血药浓度快速下降,24 h 血药浓度为 0.70  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,48 h 血药浓度已低于方法最低检测限 0.2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

Tab 2 Pharmacokinetic parameters of RFP in rabbits after intravenous administration of RFP solution and RFP-PLA-MS at the dose containing RFP 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $n = 6$ )

Parameter	RFP solution	RFP-PLA-MS
$C_0$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	9.50	1.90
A ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	5.19	0.84
B ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	4.32	1.06
$\alpha$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.38	0.15
$\beta$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.08	0.02
$T_{1/2\alpha}$ (h)	1.83	4.63
$T_{1/2\beta}$ (h)	9.07	35.27
AUC ( $\text{mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ )	0.70	0.60

## 5 组织药物浓度分布

结果见图 4,溶液组药物在肝脏中分布最多,微球组药物主要集中在肺部,这与组织切片的观察结果相吻合,微球被机械截留于肺部毛细血管,而在肝组织切片和脾组织切片中未发现有滞留的微球。

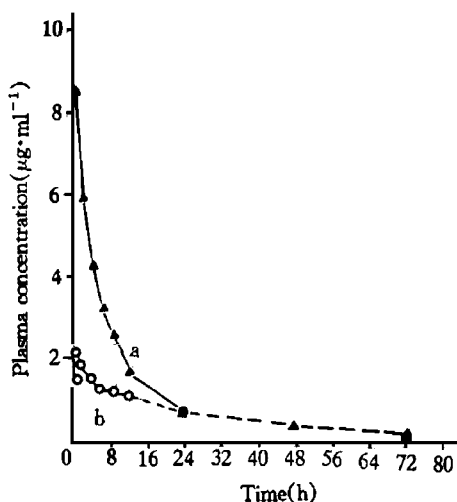


Fig 3 Plasma concentration of RFP in rabbits after iv RFP solution (a) and RFP-PLA-MS (b) at the dose of RFP 5 mg•kg<sup>-1</sup>.

动物试验证实微球主要蓄积在肺部。

使用本文方法制备 RFP-PLA-MS, 微球粒径较小, 药物扩散路径短, 随着二氯甲烷向水相扩散, 大大提高了药物在水中的溶解度, 药物迅速向水相扩散, 微球包封率仅达到 31.9%。

有机相中利福平浓度对其粘度影响显著, 利福平浓度越高, 微球粒径分布范围越广, 集中趋势减弱。当利福平浓度达 20% 时, 有机相过于粘稠, 难以在甘油中分散成球。

比较 iv 利福平溶液和微球混悬液后体内血药浓度及组织浓度变化, 结果表明 RFP-PLA-MS 具有明显的长效作用, 其分布相和消除相半衰期分别是微球组的 2.53 倍和 3.89 倍, 且药物主要集中在肺组织, 鼓励我们将对 RFP-PLA-MS 的治疗效果作进一步研究。

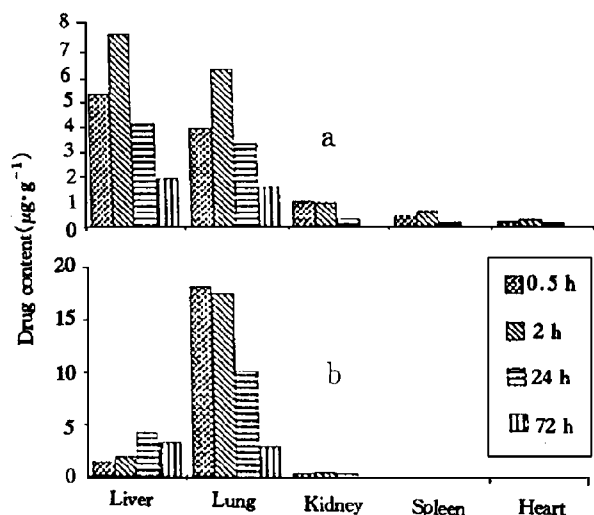


Fig 4 Tissue distribution of RFP in rabbits after iv RFP solution (a) and RFP-PLA-MS (b) at the dose of RFP 5 mg•kg<sup>-1</sup>.

### 讨 论

静脉注射 RFP-PLA-MS 靶向肺组织的关键是控制微球的大小。文献报道<sup>[10]</sup>粒径在 7~12 µm 的微球有明显的肺靶向效果。Pande 等<sup>[11]</sup>发现粒径 4~6 µm 的微球有 62% 可滞留于肺部。王剑红等<sup>[12]</sup>的研究结果表明, 粒径在 5.1~25.0 µm 的微球有良好的肺靶向性。我们制备的 RFP-PLA-MS 粒径在 5~15 µm, 经

### 参 考 文 献

- 徐叔云. 临床用药指南. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1987: 163
- Juni K, Ogata J, Matsui N, *et al.* Control of release rate of bleomycin from polyactic acid microspheres by additives. *Chem Pharm Bull*, 1985, **33**: 1609
- Leelarasamee N, Howard SA, Malanga CJ, *et al.* A method for the preparation of polyactic acid microcapsules of controlled particle size and drug loading. *J Microencapsul*, 1988, **5**: 147
- Wichert B, Rohdewald P. A new method for the preparation of drug containing polyactic acid microparticles without using organic solvents. *J Controlled Release*, 1990, **14**: 269
- Gallo JM, Hung CT, Perrier DG. Analysis of albumin microsphere preparation. *Int J Pharm*, 1984, **22**: 63
- 张万国, 蒋学涛. 利福平聚乳酸微球的制备. 第二军医大学学报, 1996, **17**: 395
- Jun HW, Lai JW. Preparation and *in vitro* dissolution tests of egg albumin microcapsules of nitrofurantoin. *Int J Pharm*, 1983, **16**: 65
- 张万国, 蒋学涛, 朱才娟. 高效液相色谱法测定兔血浆中利福平浓度及药物动力学研究. 中国抗生素杂志, 1996, **21**: 273
- 王爱平, 蒋福林, 郑德良, 等. 利福平尿排出量的测定——两种服法的比较观察. 吉林医学, 1986, **7**: 128
- Kanke M, Simmous GH, Weiss DL, *et al.*

Clearance of  $^{141}\text{Ce}$  labeled microspheres from blood and distribution in specific organs following intravenous and intraarterial administration in Beagle dogs. *J Pharm Sci*, 1980, **69**:755

- 11 Pande S, Vyas SP, Dixit VK. Localized rifampicin albumin microspheres. *J Microencapsul*, 1991, **8**:87
- 12 王剑红, 陆彬, 胥佩菱, 等. 肺靶向米托蒽醌明胶微球的研究. 药 学 学 报, 1995, **30**:549

## STUDY ON THE RIFAMPICIN POLYLACTIC ACID MICROSPHERES FOR LUNG TARGETING

Zhang Wanguo(Zhang WG)\*, Jiang Xuetao(Jiang XT), Zhu Caijuan(Zhu CJ) and Hu Jinhong(Hu JH)\*

(*School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433; \* Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433*)

**ABSTRACT** In this paper, the effects of different variables on the preparation of polylactic acid microspheres (PLA-MS) were studied. The optimized preparation conditions of rifampicin polylactic acid microspheres (RFP-PLA-MS) were acquired through orthogonal test. The paddle method was used to study the drug release properties of RFP-PLA-MS. Stability of RFP-PLA-MS at different temperatures was also studied. Pharmacokinetic and tissue distribution of RFP-PLA-MS after intravenous administration were carried out in rabbits. The experiments revealed that the RFP-PLA-MS was regular in its morphology with a mean diameter of  $9.00 \pm 4.08 \mu\text{m}$ . The drug loading was 16.0% and encapsulation efficiency was 31.9%. The release properties could be expressed by the following equation:  $Q = 20.77 + 10.12T^{1/2}(\gamma = 0.9892)$ . The RFP-PLA-MS was stable after stored at 4°C and room temperature under desiccated condition for three months. RFP-PLA-MS showed a combination of lung targeting and sustained drug release in experiments on rabbits.

**KEY WORDS** Rifampicin; Polylactic acid; Microspheres; Lung targeting