

甲硝唑羧甲基壳聚糖缓释微球的制备及体外释放

康现武¹,王 强¹,王 毅¹,顾其胜²,蒋丽霞² (1. 第二军医大学长征医院普通外科,上海 200003; 2. 其胜生物材料技术研究所,上海 201106)

摘要 目的:探讨乳化交联法制备甲硝唑羧甲基壳聚糖微球的最佳工艺,并了解微球体外释药规律。方法:按正交设计,考察不同羧甲基壳聚糖浓度、投药比、交联度、乳化转速等条件对质量指标的影响,选出最佳方案,并进一步检测微球的体外释放特性。结果:各因素对所制微球综合评分指标的影响大小依次为:乳化转速 > 投药比 > 交联度 > 羧甲基壳聚糖浓度,用优化的工艺制得微球 50 ~ 200 μm 粒径分布百分数为 48.86%,载药量为 48.19%,包封率为 37.46%,在 pH1.2、6.8和 7.6,3种缓冲液中的释放时间为 6 ~ 8h。结论:本法所制微球工艺稳定,在体外具有缓释作用。

关键词 甲硝唑;羧甲基壳聚糖;微球;体外释放

中图分类号:R943,R944.9 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2008)03-0182-03

Preparation technology and *in-vitro* release characteristics of metronidazole-loaded carboxymethyl chitosan sustained-release microspheres

KANG Xian-wu¹, WANG Qiang¹, WANG Yi¹, GU Qi-sheng², JIANGLi-xia² (1. Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Qisheng Biomaterial Technological Institute, Shanghai 201106, China)

ABSTRACT Objective: To study the optimum technology for preparing metronidazole-loaded carboxymethyl chitosan (MZ-CMC) microspheres by emulsification and cross-linking process and to investigate the *in-vitro* release characteristics of MZ-CMC microspheres. **Methods:** An orthogonal test, based on 4 factors including CMC concentration, MZ/CMC (W/W), glutaraldehyde/CMC (W/W) and agitation speed, was employed to determine the optimum preparation technology of microspheres. The *in vitro* release behavior was recorded and evaluated. **Results:** For this 4 factors, the degree of influence on the quality of microspheres were gradually lower in the sequence of "agitation speed", "MZ/CMC (W/W)", "glutaraldehyde/CMC (W/W)", and "CMC concentration". Prepared with optimized method in this test, the proportion of microspheres with diameter from 50 ~ 200 μm was 48.86%. The drug content was 48.19%, and the enveloping rate was 37.46%. The *in vitro* release time was from 6 ~ 8 h in 3 types of buffer solution of pH1.2, 6.8 and 7.6. **Conclusion:** The preparing technology for MZ-CMC microspheres used in this test is dependable, and the *in vitro* release of MZ from the microspheres is sustained.

KEY WORDS metronidazole; carboxymethyl chitosan; microsphere; *in vitro* release

甲硝唑 (metronidazole, MZ) 是硝基咪唑类抗生素,具有良好的抗厌氧菌、抗阿米巴作用,是溃疡型结肠炎、Crohn病、肠阿米巴病等疾病及结肠术前肠道准备的常用药物。甲硝唑口服后很快吸收,主要通过血液循环到达病变部位,但存在局部药物浓度较低、全身副作用较重等缺点。将甲硝唑制成缓释制剂,可增加局部的药物浓度,延长药物的作用时间,同时可减少药物的吸收,降低血药浓度,减轻全身副作用,增加患者的耐受性。羧甲基壳聚糖 (carboxymethyl chitosan, CMC) 是壳聚糖羧甲基化的产物,乳化交联后具有较好的缓释性能。本实验以

MZ为药物模型,以 CMC为药物辅料,乳化交联法制备甲硝唑羧甲基壳聚糖 (MZ-CMC) 微球,并考察微球体在不同缓冲溶液中的缓释情况。

1 材料与方法

1.1 药品与仪器

1.1.1 药品与试剂 羧甲基壳聚糖 (CMC,批号:20070602,动力粘度:2 000 mPa·s,羧甲基取代度:90%),上海其胜生物制剂有限公司赠送;甲硝唑 (MZ,批号:07022801,药用级),购于上海邦成化工有限公司;液体石蜡、石油醚、丙酮、司盘-80、25%戊二醛 (GD) 等为分析纯或化学纯,购于上海化学试剂商店。

1.1.2 仪器 电动搅拌机 (上海申生科技有限公司), AL204电子天平 (Mettler-Toledo Group), UV-2102 PC型

紫外可见分光光度计 (尤尼柯上海仪器有限公司), XSZ-107F光学显微镜 (浙江宁波光学仪器厂), DZF-1B型真空干燥箱 (上海跃进医疗器械厂)。

1.2 甲硝唑羧甲基壳聚糖微球的制备

1.2.1 乳化交联法制备甲硝唑羧甲基壳聚糖微球

在 25 ℃ 下将甲硝唑均匀分散在羧甲基壳聚糖生理盐水溶液中,加入含 1%司盘-80的液体石蜡中,以一定速度搅拌 30 min,使之成为稳定的乳化体系,降温到 5~7 ℃ 后,加入戊二醛交联固化 3 h,静置,倾弃油层,砂芯漏斗真空抽滤,分别用石油醚洗涤、丙酮脱水 3次,真空干燥箱干燥 48 h,即得载药微球,称重记录。

1.2.2 正交实验优化制备工艺 选定 CMC 浓度

(A)、投药比 (B)、交联度 (C)、乳化转速 (D)等 4个因素,各分 3个水平,以微球的 50~200 μm 粒径分布百分数 (%) (E)、载药量 (%) (F)、包封率 (%) (G)为评价指标,按 $L_9(3^4)$ 正交设计,优选出最佳工艺条件。实验因素及水平见表 1。

表 1 正交因素及水平

因素	A: C _{CMC} (%, w/v)	B: MZ / CMC (w/w)	C: GD / CMC (w/w)	D: 乳化转速 (r/min)
1	2	2	1	300
2	2.5	3	2	400
3	3	4	3	500

1.3 微球有关指标的测定

1.3.1 标准曲线 精密称取干燥恒重的 MZ 对照品

10 mg,置于 100 mL 容量瓶中,加生理盐水溶解并定容,成为 0.1 g/L 的标准储备液。取储备液加生理盐水配成 12 μg/mL 的溶液,在紫外分光光度计 320 nm 处有最大吸收。同法配制 2、4、8、16、24、32、48 μg/mL 系列溶液,以生理盐水为空白,在 320 nm 处测定光密度 Y 。得标准曲线为: $Y = 0.0537X + 0.0264$ (X : μg/mL), $r = 0.9998$

1.3.2 载药量 取微球少许充分研磨,称量 50 mg 加入

1 mol/L HCl 溶液 20 mL 中,沸水浴 15 min,微球完全消解后用 NaOH 滴定至中性,用生理盐水稀释定容于 100 mL 容量瓶中,取其上清液 3 mL 过滤后用生理盐水定容于 25 mL 容量瓶中,在紫外分光光度计 320 nm 处测定光密度 Y 值,根据标准曲线计算出药物浓度 X (μg/mL),得微球载药量为: $\text{载药量} = (X \times 25 \times 100) / (3 \times 50 \times 1000) \times 100\% = X / 60 \times 100\%$ 。

1.3.3 包封率 根据微球的重量及微球的载药量,

可计算出包封率: $\text{包封率} = \text{载药量} \times \text{微球的重量} / \text{投入的总药量} \times 100\%$ 。

1.3.4 粒径分布 用带测微尺的光学显微镜观察

干态微球的形态及分散性,选择有代表性的区域,测定 500 个粒子,计算 50~200 μm 粒径分布百分数。

1.3.5 体外释放 根据中国药典 2005 年版 (二部)附录 C 第二法进行,温度: (37.0 ± 0.5) ℃,

转速 50 r/min。甲硝唑原料药 0.2 g,放入释放介质 pH1.2 HCl 溶液中 2 h; MZ-CMC 微球 (0.2 载药量) g,分别放入释放介质 pH1.2 HCl 溶液、pH6.8 磷酸盐缓冲液、pH7.6 磷酸盐缓冲液各 12 h。间歇收集释放液 5 mL,并补充等量释放介质。过滤后滴定至中性,生理盐水定容,在波长 320 nm 处测定光密度值,由标准曲线方程计算出药物浓度,并计算药物累计释放量及累积释放百分率。

2 结果

2.1 Z 分综合评价法对多指标综合评价^[1] 对于

载药微球,粒径分布百分数、载药量、包封率越高越好,但直接相加缺乏理论依据,参考相关文献,本实验采用 Z 分综合评价法对多指标归一化处理,计算公式如下: $Z_i = (X_i - \bar{X}_i) / S_i$, X_i 为指标值, \bar{X} 为指标的平均值, S_i 为指标的标准差, $Z_i = Z_i$ 高优 - Z_i 低劣。

正交实验结果及多项指标归一化结果见表 2。该表显示各因素对所制微球综合指标的影响大小依次为: $D > B > C > A$; 通过直观分析,最佳工艺组合为: $A_2B_3C_2D_2$, 即: CMC 浓度 2.5%、投药比 (MZ / CMC) 4、交联度 (GD / CMC) 2、乳化转速 400 r/min。

2.2 验证实验 根据最佳工艺,制备 6 批微球,肉眼观微球呈小颗粒状,颜色微黄;光学显微镜下,见微球粘连少,外观较圆整。微球 50~200 μm 粒径分布百分数为 (48.86 ± 2.07)%,载药量为 (48.19 ± 1.48)%,包封率为 (37.46 ± 1.93)%,综合评分为 1.61,为正交实验的最优结果。微球光学显微镜照片见图 1,微球粒径分布见图 2。

2.3 体外释放 累积释放度与时间关系如图 3 所示。MZ 原料药在 45 min 内释放完毕,而 MZ-CMC 微球在 pH1.2 HCl 溶液中 6 h 后累积释放度 100%,在 pH6.8 和 pH7.6 磷酸盐缓冲液中 8 h 后累积释放度 100%。

3 讨论

微球是近些年药物新剂型研究的一个热点,是以大分子材料为基质,通过物理或化学方法,形成的球型实体。微球体中药物的释放速率与药物在释放介质中的溶解度、药物在微球体中所处的物理状态、药物与微球的亲和力等因素有关。

表 2 正交设计及结果

NO.	A	B	C	D	E	F	G	Z-score
1	1	1	1	1	78.20	26.12	20.90	-1.19
2	1	2	2	2	80.14	45.06	26.29	1.25
3	1	3	3	3	93.10	31.42	12.80	-1.06
4	2	1	2	3	75.00	22.52	23.42	-1.36
5	2	2	3	1	23.40	48.70	36.75	0.76
6	2	3	1	2	45.36	48.45	34.11	1.22
7	3	1	3	2	28.67	39.23	42.76	0.71
8	3	2	1	3	27.20	39.22	26.58	-1.11
9	3	3	2	1	22.45	52.60	33.75	0.77
K1	-1.00	-1.84	-1.08	0.34				
K2	0.62	0.90	0.66	3.18				
K3	0.37	0.93	0.41	-3.53				
Kmax-Kmin	1.62	2.77	1.74	6.71				

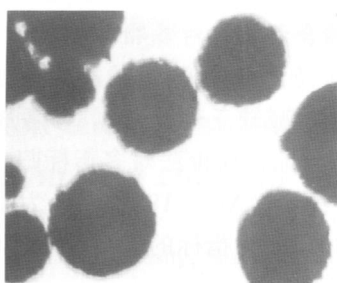
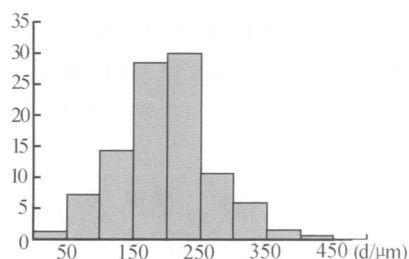
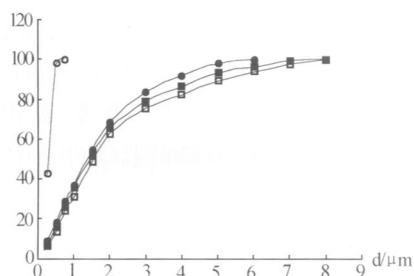
图 1 MZ-CMC 微球光学显微镜照片 ($\times 40$)

图 2 MZ-CMC 微球的粒径分布百分数

图 3 MZ-CMC 微球在不同递质中的释放 ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$)

—○—MZ; —●—pH1.2; —□—pH6.8; —■—pH7.6

用醛交联的壳聚糖微球,可减缓药物的释放^[2,3],增加对胃酸的耐受性^[4],表现为结肠靶向性。本实验制备的微球,在 pH1.2 HCl 溶液有较多释放,不具有

结肠靶向性,分析原因为:微球表面及靠近微球表面的药物晶体和分子扩散到介质中,形成突释; MZ 主要以晶体的形式分散在微球中,相对于分子形式,晶体颗粒较大,降低了 CMC 交联的致密性;戊二醛交联是一个瞬间反应,有报道用戊二醛饱和的甲苯溶液可降低反应速度,得到坚硬结实的球体^[5],本实验降低了反应温度,以期降低反应速度,但仍可能交联过快,致使微球的密度较低。

用 EXCEL 软件对溶出数据进行曲线拟合^[6],微球在三种缓释液中的前 2 h,符合线性关系 ($R^2 > 0.99$),为零级方程释药;对所有数据分析,用线性、对数、指数、乘幂、Weibull 分布等拟合,Weibull 分布的拟合效果最佳 ($R^2 > 0.99$)。同 MZ 原料药比较, MZ-CMC 微球在 pH1.2、6.8 和 7.6, 3 种缓冲液中,均有明显的缓释作用。

参考文献:

- [1] 赵应征,鲁翠涛,梅兴国.常用多指标综合评价法在优选实验中的应用[J].医学研究生学报,2004,17(7):624.
- [2] 沈宏亮,王强,钱方,等.左氧氟沙星羧甲基壳聚糖缓释微球的制备及其体外释放研究[J].第二军医大学学报,2004,25(5):482.
- [3] Jameela SR, Jayakrishnan A. Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the *in vitro* release of mitoxantone and *in vivo* degradation of microspheres in rat muscle [J]. Biomaterials, 1995, 16(10):769.
- [4] Berthold A, Cremer K, Kreuter J. Influence of crosslinking on the acid stability and physicochemical properties of chitosan microspheres[J]. STP Pharm Sci, 1996, 6:358.
- [5] 张艳华,魏玉辉,刘志红,等.苦参碱壳聚糖微球的制备及体外释药[J].中国医院药学杂志,2006;26(3):307.
- [6] 王志强,吴继禹,张秀华.用 Excel 软件对溶出数据进行多种曲线拟合和处理[J].海峡药学,2006,18(1):47.