

载透明质酸-甲基胶原-三元共聚物/多柔比星复合膜的钽支架的制备及处方优化

李飞*, 梁嘉碧, 祁真, 郭新铭*(中山大学附属第五医院, 广东珠海 519000)

中图分类号 R432 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4424-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.34

摘要 目的:制备载透明质酸-甲基胶原-三元共聚物(甲基丙烯酸羟乙酯-甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸)/多柔比星复合膜的钽支架,并优化处方。方法:以金属钽支架为载体,透明质酸、甲基胶原、三元共聚物为辅料,利用静电自组装反应制备复合膜。以1、30 d的累积释放度为指标,采用正交设计优化透明质酸、甲基胶原、三元共聚物的质量浓度并验证;考察其体外释药行为。结果:最优处方为透明质酸1 mg/ml、甲基胶原4.5 mg/ml、三元共聚物100 mg/ml;所制钽支架1、30 d的累积释放度分别为7.57%、84.14%,RSD分别为2.3%、2.1%($n=3$),20 d后近似呈零级速率释药。结论:成功制得具有缓释功能的载透明质酸-甲基胶原-三元共聚物/多柔比星复合膜的钽支架。

关键词 多柔比星;金属钽支架;药物缓释系统;静电自组装反应;正交设计

Preparation and Formulation Optimization of Hyaluronic Acid-methyl Collagen-terpolymer/Adriamycin Compound Membranes-loaded Tantalum Stent

LI Fei, LIANG Jia-bi, QI Zhen, GUO Xin-ming(The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangdong Zhuhai 519000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Hyaluronic acid-methyl collagen-terpolymer (HEMA-MMA-MAA)/Doxorubicin compound membranes-loaded tantalum stent, and to optimize the formulation. METHODS: Electrostatic self-assembly reaction was adopted to prepare compound membranes using metal tantalum stent as carrier, hyaluronic acid, methyl collagen and terpolymer as excipients. With 1 and 30 d accumulative release rate as index, orthogonal test was used to optimize mass concentrations of hyaluronic acid, methyl collagen and terpolymer, and validated. The drug release behavior *in vitro* were investigated. RESULTS: The optimal formulation was as hyaluronic acid 1 mg/ml, methyl collagen 4.5 mg/ml and terpolymer 100 mg/ml. 1 and 30 d accumulative release rates of prepared tantalum stent were 7.57% (RSD=2.3%, $n=3$) and 84.14% (RSD=2.1%, $n=3$), respectively. 20 d later, dissolution rate approximated to zero level rate of drug release. CONCLUSIONS: Hyaluronic acid-methyl collagen-terpolymer/Doxorubicin compound membranes-loaded tantalum stent with sustained-release property is prepared successfully.

KEYWORDS Doxorubicin; Metal tantalum stent; Drug sustained-release system; Electrostatic self-assembly reaction; Orthogonal design

植入式缓控释给药系统是缓控释制剂的一个重要组成部分,因其具有使药物生物活性增强及生物利用度提高等特点,应用范围也越来越广,例如用在肿瘤、心血管等方面的治疗^[1]。多柔比星(Doxorubicin, Dox)是临床常用的抗肿瘤药物,但因其心脏、肾脏毒性大,限制了其临床应用。现急于寻找一种更有效的制剂,以最大限度提高肿瘤组织内Dox的浓度,最大限度降低心脏和肾脏内Dox的浓度^[2]。鉴于上述需求,本研究将Dox做成植入式缓控释系统,在金属钽支架材料表面利用静电自组装反应制备出载透明质酸-甲基胶原-三元共聚物/Dox复合膜的钽支架,并采用正交设计优化处方,为下一步该缓释系统用于临床植入治疗骨肿瘤奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

紫外分光光度计(美国Thermo Scientific公司);JB-3定时恒温磁力搅拌器(上海电磁新径仪器公司);LGJ-25C冷冻干燥机(长沙湘仪仪器公司);SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵(巩义市予华仪器公司);NOVA系列NANNOSEM600共聚焦扫描电

镜(德国FEI公司);SHC-C水浴恒温振荡器(江苏环宇仪器公司)。

1.2 药品与试剂

Dox原料药(深圳万乐药业公司,批号:1203A3,纯度:>98%);I型胶原(华南理工大学材料学院提供);透明质酸(美国Lifecore生物公司);多孔金属钽支架材料(美国Zimmer公司);甲基丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸单体(广州永屹化工有限公司,批号:1104B8、1204A4、1009A1,纯度:均>98%)。

1.3 其他

透析袋(北京鼎国科技公司)。

2 方法与结果

2.1 成膜材料的制备

2.1.1 甲基胶原的制备 称取适量I型胶原加入到20 ml的0.1 mol/L的盐酸溶液中,溶解制成透明胶原溶液,将胶原溶液加入到400 ml丙酮中,搅拌,产生沉淀。静置一段时间,将产生的沉淀胶原置于200 ml含0.1 mol/L盐酸的甲醇溶液中,在4℃无菌条件下搅拌。然后将甲基化后的200 ml混合溶液装入透析袋中,置于盛有蒸馏水的烧杯中,透析直到蒸馏水的pH为6.3。整个过程温度保持在4℃。移除透析袋里的溶液,对甲基胶原溶液冷冻干燥。

* 药师。研究方向:医院药学、药物制剂。电话:0756-2144508。E-mail:623346973@qq.com

通信作者:主管药师,硕士。研究方向:医院药学、药物制剂。电话:0756-2528073。E-mail:155093860@qq.com

2.1.2 三元共聚物的制备 在78℃、双偶氮异丁腈的启动下,加入0.1 mol/L 甲基丙烯酸羟乙酯、甲基丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸单体在异丙醇中,减压蒸馏,各单体的摩尔比为25:25:50,单体与溶剂比例为1:6(m/V)。在油浴中磁性搅拌,合成甲基丙烯酸羟乙酯-甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸的三元共聚物。反应24 h后降至室温,加入过量的石油醚,聚合物即沉淀析出。过滤沉淀,加入少量乙醇溶解,置于蒸馏水中再次沉淀,回收沉淀物,即得三元共聚物。

2.2 载透明质酸-甲基胶原-三元共聚物/Dox 复合膜的钽支架的制备

将金属钽支架材料放入透明质酸溶液中,放入真空干燥器中负压抽吸。将吸附有透明质酸的钽支架材料进行冷冻干燥。取适量甲基胶原溶液和Dox溶液,混合均匀,然后用加样枪定量吸取混合溶液滴加在钽材料上,真空干燥;再用加样枪吸取适量三元共聚物溶液滴加在钽材料上,充分反应1 h后真空干燥,制得载透明质酸-甲基胶原-三元共聚物/Dox复合膜的钽支架。用共聚焦扫描电镜观察所制备复合膜的钽支架材料内部,以空白钽支架材料内部为对照,可观察到所制复合膜内部有明显的膜(图1黑框处)形成,证明了透明质酸、甲基胶原、三元共聚物通过静电自组装反应形成了均匀分布的复合膜^[9]。共聚焦扫描电镜图见图1。

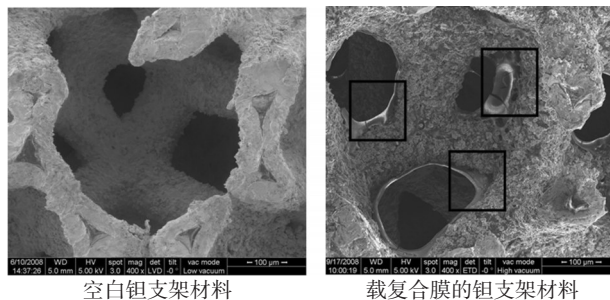


图1 共聚焦扫描电镜图

Fig 1 Confocal scanning electron microgram

2.3 Dox 含量测定方法考察^[1]

精密称取Dox原料药,加pH 7.2磷酸盐缓冲液(PBS)溶解并定量稀释制成0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 μg/ml的标准溶液,以pH 7.2 PBS为空白,采用紫外分光光度法测定234 nm波长处的吸光度。以吸光度(y)为纵坐标、质量浓度(x)为横坐标进行回归分析,得回归方程为 $y=0.001 2x+0.022 5$ ($r=0.999 8$);日内RSD小于1.83%($n=5$),日间RSD小于2.01%($n=5$)。

2.4 体外释药度方法考察^[1]

将制备的载复合膜的钽支架材料置于装有2 ml PBS的深色离心管中,于37℃下水浴摇床中振摇(80 r/min),考察30 d内的体外累积释药度。样品溶液经滤过后用pH 7.2的PBS稀释,摇匀,作为供试品溶液,按照“2.3”项下方法测定吸光度,并代入回归方程计算含量,再计算累积释药度。

2.5 正交设计优化处方工艺及验证

根据预试验结果,以对影响累积释药度的3个主要因素:透明质酸(A)、甲基胶原(B)、三元共聚物的质量浓度(C)。以A、B、C为因素,以1、30 d的累积释药度为指标,按正交表设计试验,优化处方^[9]。因素与水平见表1,正交试验结果与极差分析见表2,方差分析结果见表3。

由表2可知,根据1 d累积释药度结果显示,因素对处方的影响程度为A>B>C;根据30 d累积释药度结果显示,因素对处方的影响程度为B>A>C。由表3可知,就1 d累积释药度而言,A对处方有显著影响($P<0.05$),其余因素对处方无显著

表1 因素与水平(mg/ml)

Tab 1 Factors and levels(mg/ml)

水平	因素		
	A	B	C
1	1	1.5	30
2	2	3	50
3	4	4.5	100

表2 正交试验结果与极差分析

Tab 2 Result of orthogonal experiments and range analysis

试验号	A	B	C	累积释药度,%	
				1 d	30 d
1	1	1	1	6.79	63.75
2	1	2	2	10.73	75.61
3	1	3	3	7.54	84.33
4	2	1	2	23.00	65.90
5	2	2	3	29.01	67.89
6	2	3	1	40.03	67.32
7	3	1	3	25.76	65.35
8	3	2	1	30.05	61.25
9	3	3	2	39.72	71.76
K_1 (1 d)	8.35	18.52	25.62		
K_2 (1 d)	30.68	23.26	24.48		
K_3 (1 d)	31.84	29.10	20.77		
R (1 d)	23.49	10.58	4.85		
K_1 (30 d)	74.56	65.00	64.12		
K_2 (30 d)	67.04	68.25	71.09		
K_3 (30 d)	66.12	74.47	72.52		
R (30 d)	8.44	9.47	8.40		

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis of variance

评价指标	方差来源	离差平方和	自由度	均方	F	P
1 d累积释药度	A	1 051.61	2	525.81	19.81	<0.05
	B	168.50	2	84.25	3.18	
	C	38.64	2	19.32	0.728	
30 d累积释药度	A	128.78	2	64.39	11.67	
	B	138.93	2	69.47	12.59	
	C	121.66	2	60.83	11.02	

注: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

Note: $F_{0.05}(2,2)=19.00$

影响。综合考虑,最优处方为A₁B₃C₃,即透明质酸1 mg/ml、甲基胶原4.5 mg/ml、三元共聚物100 mg/ml。

按最优处方制备3批样品,按“2.4”项下方法考察1、30 d的累积释药度,结果分别为(7.57±2.3)%、(84.14±2.1)%。

2.6 释放机制分析

在“2.5”项下验证试验过程中,分别于1、2、3、5、10、14、18、22、26、30 d取样,测定并计算累积释药度。以累积释药度对时间作图,绘制体外释药曲线,结果见图2。

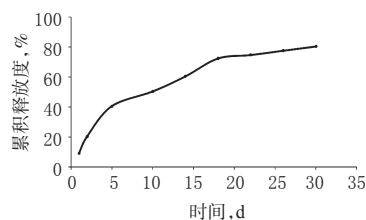


图2 复合膜中Dox的体外释药曲线

Fig 2 Release curve of Dox in compound membranes in vitro

由图2可知,Dox在初始时快速释放,有释药冲击量;随着

超声波辅助提取蓝莓总黄酮的工艺优化

曹建华*,李光辉,张敏(青岛市第三人民医院,山东青岛 266041)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4426-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.35

摘要 目的:优化超声波辅助提取蓝莓总黄酮的工艺。方法:基于单因素试验,以总黄酮得率为指标,以乙醇体积分数、料液比和超声功率为考察因素设计正交试验,对超声波辅助提取蓝莓总黄酮的工艺参数进行优化并进行验证试验;同时与传统的醇回流法(回流提取2次,每次2h)比较。结果:最优提取工艺为在料液比1:25时用70%乙醇提取,超声功率250W(超声40min)。验证试验中蓝莓总黄酮得率为3.98%(RSD=0.41%,n=3),而醇回流法提取总黄酮得率为2.25%。结论:超声波辅助提取蓝莓总黄酮在提取时间和效果上明显优于醇回流法,且更适用于大规模工业化生产。

关键词 蓝莓;总黄酮;得率;提取工艺;优化;超声波辅助提取;正交试验

Optimization of Ultrasonic-assisted Extraction Technology of Total Flavonoids from *Vaccinium uliginosum*
CAO Jian-hua, LI Guang-hui, ZHANG Min (Qingdao Third People's Hospital, Shandong Qingdao 266041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize ultrasonic-assisted extraction technology of total flavonoids from *Vaccinium uliginosum*. METHODS: Based on single factor test, the ultrasonic-assisted extraction technology of total flavonoids from *V. uliginosum* was optimized by orthogonal test, using the yield of total flavonoids as index, with ethanol volume fraction, solid-liquid ratio and ultrasonic power as factors. The optimized technology was validated and compared with traditional ethanol reflux method (reflux extracting for 2 times, 2 h each time). RESULTS: The optimal extraction technology was as follows as the solid-liquid ration of 1:25, 70% ethanol, ultrasonic power of 250 W (40 min for ultrasonic time). In validation test, the yield of total flavonoids from *V. uliginosum* was 3.98% (RSD=0.41%, n=3), and the yield of total flavonoids was 2.25% by ethanol reflux method. CONCLUSIONS: The ultrasonic-assisted extraction is obviously superior to ethanol reflux method on extraction time and effects, and it is suitable for industrialized production.

KEYWORDS *Vaccinium uliginosum*; Total flavonoids; Yield; Extraction technology; Optimization; Ultrasonic-assisted extraction; Orthogonal test

时间的延长,每日释放量减少;且在20d后,体系的每日释放量随着时间的增长而缓慢减小,溶出速率趋于稳定,近似为零级速率释药。由此可见,该缓释系统在体外模拟环境下可维持缓释时间达30d。

3 讨论

本试验中所采用的植入材料为多孔金属钽支架材料,其生物相容性好、弹性模量接近松质骨,具有非降解特性,物理化学性能稳定。这种材料是通过化学蒸汽沉积法在均匀的网状碳骨架表面喷涂了一层惰性金属钽制作而成的,其平均孔径为430 μm,孔隙率为75%~80%,孔隙间相互连通,是一个比较新颖的金属材料。

由验证试验结果可见,所制Dox植入式缓控释系统30d平均累积释放度为84.14%,低于缓控释制剂要求的药物完全累积释放度90%。究其原因,笔者认为多孔金属钽支架材料的自身问题。

在本试验中,影响制备Dox植入式缓控释系统的因素除了成膜材料的浓度外,笔者认为还包括自组装反应的时间与温度。本次研究中统一反应时间为1h、反应温度为室温,后续试验中笔者将对其作进一步优化。

本试验研制的Dox植入式缓控释系统体外释放符合拟订

* 副主任药师。研究方向:药事管理、临床药学。电话:0532-89076588。E-mail:qdsyyjk@126.com

的释药速度要求。由正交设计可见,透明质酸作为大分子黏弹性物质^[7],其对释药速度影响最大。由释放度结果可见,制备的Dox缓控释系统具有缓释作用,释放度重现性良好,但该系统在动物体内释放、吸收等情况还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王明,杨小平,苏宇雄,等.定量缓释基因重组碱性成纤维细胞生长因子/聚乳酸-聚羟基乙酸植入片的制备及体外释药研究[J].中华口腔医学研究杂志,2008,2(2):19.
- [2] 李勃,肖引,刘凯,等.阿霉素磁靶向药物制剂研究进展[J].中国药业,2014,23(10):96.
- [3] 屠锡德.药剂学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:949-951.
- [4] 樊秋平,梁嘉碧,杨海云,等.热疗用阿霉素温敏纳米粒的制备及工艺优化[J].中国药房,2011,22(17):1580.
- [5] 祝侠丽,贾永艳,黄海英,等.正交设计法优化布洛芬缓释骨架片的处方工艺[J].中国药房,2014,25(9):830.
- [6] 鲍玉成,张文龙,王勇,等.长效缓释双药物人工骨的制备及释放特性[J].中国组织工程研究,2012,16(38):7126.
- [7] 陈建澎,王婧茜,易喻,等.透明质酸及其衍生物研究进展[J].中国生物工程杂志,2015,35(2):111.

(收稿日期:2015-04-09 修回日期:2015-08-10)

(编辑:邹丽娟)