

文章编号: 1001-8689 (2010) 02-0123-05

PLA/ CoFe₂O₄载药微球的制备、表征及释药性能

甄卫军 袁龙飞 李先进 刘月娥 庞桂林
(新疆大学化学化工学院, 乌鲁木齐830046)

摘要: 采用乳化-溶剂挥发法制备了聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 载硫酸庆大霉素复合微球。通过正交设计实验优选 PLA载药微球的最佳实验条件。在此基础上利用微乳法制备的铁酸钴(CoFe₂O₄)制备了PLA/ CoFe₂O₄载硫酸庆大霉素复合微球。通过透射电子显微镜 (TEM)、X-射线衍射 (XRD)、振动样品磁强计 (VSM) 对铁酸钴进行微观结构表征和性能分析。采用傅立叶变换红外光谱 (FT-IR) , 扫描电子显微镜 (SEM) 、生物数码显微镜对聚乳酸载药微球和PLA/ CoFe₂O₄载药微球进行了微观结构的表征和分析。结果表明两种载药微球呈规则球形, 表面光滑, 分布较均匀, 平均粒径约为20μm。通过体外模拟释药试验考查了PLA载药微球和PLA/ CoFe₂O₄载药微球的释药性能。结果表明聚乳酸作为药物载体具有明显的药缓控释作用, PLA/ CoFe₂O₄载药微球药物释放持续的时间最长。

关键词: 聚乳酸; 铁酸钴; 载药微球; 释药性能

中图分类号: TB383 文献标识码: A

Preparation, characterization and drug release property for PLA/ CoFe₂O₄ drug-loaded microsphere

Zhen Wei-jun, Yuan Long-fei, Li Xian-jin, Liu Yue-e and Pang Gui-lin
(College of Chemistry and Chemical Engineering of Xinjiang University, Urumqi 830046)

Abstract Polylactic acid microspheres containing gentamycin sulfate were prepared by emulsification-solvent evaporation method. The optimum experimental conditions of PLA drug-loaded microspheres were screened by orthogonal experiment. Magnetic cobalt ferrite (CoFe₂O₄) was prepared by water-in-oil microemulsion processing and characterized by TEM, XRD, VSM. The microstructure of PLA drug-loaded microspheres and PLA/ CoFe₂O₄ drug-loaded microspheres was characterized and analyzed by FT-IR, SEM and digital bio-microscope. It was shown that two kinds of drug-loaded microspheres were of regular sphere and smoothly surface. Their distribution were even and the average diameter was 20μm. The drug release of two kinds of drug-loaded microspheres was studied by in-vitro release method. It was shown that there was clear controlled release property for PLA and PLA/ CoFe₂O₄ drug-loaded microspheres had the longest release time.

Key words PLA(poly-lactic acid); CoFe₂O₄; Drug-loaded microspheres; Drug release

聚乳酸具有良好的生物降解性能, 由于其降解后不会遗留任何环保问题, 且经美国食品和药品管理局 (FDA) 批准可用作医用手术缝合线和注射用

微胶囊、微球及埋植剂等制剂的材料^[1]。因此在医用领域聚乳酸已被认为是最有前途的可降解高分子材料, 国内外对它的研究开发也极为活跃^[2~6]。硫酸

收稿日期: 2009-02-26

基金项目: 2004年新疆大学青年启动基金项目 (QN040113), 2005年度新疆维吾尔自治区高校科研计划(课题编号:XJEDU2005E01)。

作者简介: 甄卫军, 男, 生于1969年, 硕士, 副教授, Email: zhenweijun6900@163.com。

庆大霉素，是一种氨基糖甙类广谱抗生素，对多种革兰阴性菌及阳性菌都具有抑菌和杀菌作用，但在临床应用中也带来一系列的毒副反应，可出现耳中毒、肾中毒、血尿，甚至过敏性休克后导致死亡，降低了临床治疗效果^[7]。本文以生物可降解的高分子材料聚乳酸（PLA）为载体，采用磁性纳米铁酸钴制备PLA/CoFe₂O₄载硫酸庆大霉素复合微球，使其具有缓慢释放硫酸庆大霉素的功能，从而避免频繁给药，且在较长时间内维持体内有效的血药浓度，提高药效并降低毒副作用。论文的研究将为探索具有靶向释药功能的长效缓释剂奠定研究基础。

1 实验部分

1.1 主要试剂及原料

聚乳酸，注塑级，深圳市光华伟业实业有限公司；硫酸庆大霉素(GTMS)注射液，处方药物，规格：8万单位，湖北天药药业股份有限公司；明胶，生化试剂，天津基准化学试剂有限公司；二氯甲烷，分析纯，≥99.5%，天津百世化工有限公司；吐温-80，化学纯，天津市化学试剂三厂；透析袋，截留重均分子量(8000-14000g/mol)，北京索莱宝生物科技有限公司；硝酸铁(Fe(NO₃)₃·9H₂O)，分析纯，南汇彭镇营房化工厂；六水合硝酸钴(Co(NO₃)₂·6H₂O)，分析纯，上海化学试剂有限公司；十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)，分析纯，天津市光复精细化工研究所。

1.2 仪器与表征

红外分析：取适量聚乳酸及实验制得的GTMS-PLA-MS样品分别用VERTEX70型红外光谱仪对样品进行红外扫描，KBr压片。

TEM分析：将适量铁酸钴分散到适当体积的无水乙醇中，超声波分散30min，用透射电子显微镜(TEM)观察产品粒径及形貌。

XRD分析：用M18XHF22-SRAX型X射线衍射仪连续扫描记谱，管压40KV，管电流100mA，Cu靶辐射，石墨单色器滤波。

SEM分析：将微球均匀分布在样品台上，样品镀银，在扫描电镜(SEM)下观察微球的表观形态及测量平均粒径。

生物数码显微镜观察：将微球分散到适当体积的无水乙醇中，超声波分散30min，均匀涂覆在载玻片上，于生物数码显微镜下观察微球的外观形状、粒径大小及分布。

磁性分析：用Lake Shore 7407型振动样品磁强

计测定纳米铁酸钴的磁性能。

紫外-可见分光光度计，WFZ800-D3B，北京瑞利分析仪器公司制造有限公司，用于分析GTMS含量。

1.3 实验方法

1.3.1 纳米铁酸钴的制备^[8] 采用微乳液法制备纳米铁酸钴。选择CTAB作为表面活性剂，正丁醇为助表面活性剂，正辛烷为油相，水溶液作为水相的微乳液体系。根据水相组成不同，微乳液分为两部分：微乳液Ⅰ中的水相是0.01mol/L硝酸钴和0.02mol/L硝酸铁的混合溶液；微乳液Ⅱ中的水相是氨水，浓度高于完全沉淀的化学计量点的10%。剧烈搅拌条件下将两种微乳液混合，继续搅拌一定时间，在7000r/min转速下超速离心10min。沉淀物用V(甲醇)/V(氯仿)=1:1混合物洗涤，然后用甲醇洗涤。100℃干燥得前驱体，不同温度下灼烧5h以便产物完全晶化。

1.3.2 聚乳酸载药微球及PLA/CoFe₂O₄载药微球的制备方法 称取一定量的PLA置于小烧杯中，量取适量二氯甲烷溶解PLA。取100ml一定浓度的明胶水溶液注入500ml加有一定量吐温80的三颈瓶中混匀。待PLA溶解，准确量取一定量硫酸庆大霉素液加入PLA的二氯甲烷液中，搅拌并超声乳化10min。迅速将乳液逐滴加入到高速搅拌着的明胶水溶液中，继续搅拌并超声10min。后降至低速继续室温搅拌3h，挥发二氯甲烷。3000r/min离心、过滤、蒸馏水洗2~3次，真空干燥、过筛、称重、收集微球。PLA/CoFe₂O₄载药微球的制备除在溶解的PLA中加入一定量CoFe₂O₄外，其余步骤同上。

1.3.3 透析袋的处理方法 商品透析袋先用50%乙醇煮沸1h，再依次用50%乙醇、0.01mol/L碳酸氢钠和0.001mol/L EDTA溶液洗涤，最后用蒸馏水冲洗即可使用。

1.3.4 载药微球载药量的测定 准确称取10 mg载药微球于混匀管中，加入0.5 ml二氯甲烷和1.0ml磷酸缓冲液，用快速混匀器充分震荡30min溶解。待微球溶解完全，溶液移至5ml离心管，4000r/min离心，吸取上层清液，并重复加缓冲液萃取2次，将吸取消液合并并定容至10ml，摇匀，即得待测样品溶液。将上述待测样液移至比色皿，以磷酸缓冲液为参比液，于波长234nm处测其吸光值，将测得吸光值代入线性回归方程计算其平均载药量，其公式如下：
平均载药量=(微球中药物含量/微球质量)×100%

$$(mg\text{药物}/mg\text{微球})$$

1.3.5 载药微球体外释药性的研究 准确称取适量载药微球，置于经处理过的透析袋中，并加入5mL新配制的磷酸缓冲液，使微球悬浮于透析袋中。密封透析袋，置于有50ml磷酸缓冲液的锥形瓶中，盖紧瓶口。将锥形瓶置于37℃的恒温水浴中，定时吸取5ml溶液3000r/min离心取上清液测其吸光值，同时补充5ml新鲜的磷酸缓冲液于锥形瓶中。

2 结果与讨论

2.1 药物标准曲线绘制

2.1.1 注射用硫酸庆大霉素紫外吸收波长的确定 取注射用硫酸庆大霉素液作为测定液，以磷酸缓冲液(pH7.4)作参比液，用氘灯，在200~350nm范围内在紫外-可见分光光度计上进行紫外扫描。确定检测波长为234nm。准确移取5ml硫酸庆大霉素注射液于200ml容量瓶中，用磷酸缓冲液稀释至刻度，浓度为1.0 mg/ml。以浓度硫酸庆大霉素的磷酸缓冲液浓度C对吸收度A进行线性回归(图1)。结果表明：在0.004-1.000 mg/ml浓度范围内，硫酸庆大霉素的浓度与吸光度之间呈良好的线性关系。线性回归方程： $A=0.2221C+0.0429$, $R^2=0.9968$ 。

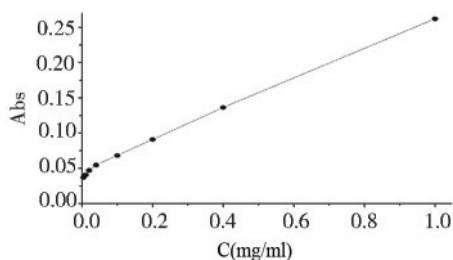


图1 硫酸庆大霉素溶液浓度标准曲线

2.2 载药微球的制备

2.2.1 影响载药微球制备的因素 本研究采用W/O/W型乳化-溶剂挥发法^[9]制备聚乳酸载药微球。将对微球制备工艺影响较为显著的因素作为考察对象，即硫酸庆大霉素的用量(A)、PLA的CH₂Cl₂液的浓度(B)、明胶的水溶液的浓度(C)、吐温-80用量(D)，进行正交设计实验，以平均载药量为目标函数进行评价，按照正交实验结果进行极差分析，得出各因素对载药微球的影响程度大小及最佳的制备工艺条件。按最佳制备工艺条件制备聚乳酸载药微球并进行后续的表征及释药性实验。L9(34)正交实验设计表见表1，正交水平因素直观效果见图2。

由图2可知，以载药量作为评价指标，正交水平因素效果分析如下： $C_3B_3D_1A_3$ 为制备聚乳酸载药微球最优因素水平。即硫酸庆大霉素用量为40mg(药液体积1ml)，聚乳酸浓度为0.06mg/ml CH₂Cl₂，明胶水溶液浓度为6%，吐温用量为0.2g。最佳条件下的平均载药量为0.0635mg药物微球。

2.2.2 铁酸钴加入量对药物包覆的影响 由表2可知，铁酸钴加入量为PLA的1/4时其制得的PLA/CoFe₂O₄载药微球与无铁酸钴的聚乳酸载药微球相比，其平均载药量远高于0.0635mg药物/mg微球。表明该磁性载药微球在加入磁性铁酸钴后具有明显的吸附药物的作用。

2.3 结构表征与性能分析

2.3.1 纳米铁酸钴的表征

(1) TEM分析 观察铁酸钴产品粒径及形貌见图3。由图可知，铁酸钴粒径较小，分布较为均匀，平均粒径约为20nm，还有很多分散较好的粒径小于20nm的颗粒。

(2) XRD分析 CoFe₂O₄的XRD如图4所示。可以

表1 正交实验表

因素	A/mg	B/(g/ml)	C/%	D/g
水平1	20	0.04	4	0.2
水平2	30	0.05	5	0.3
水平3	40	0.06	6	0.4

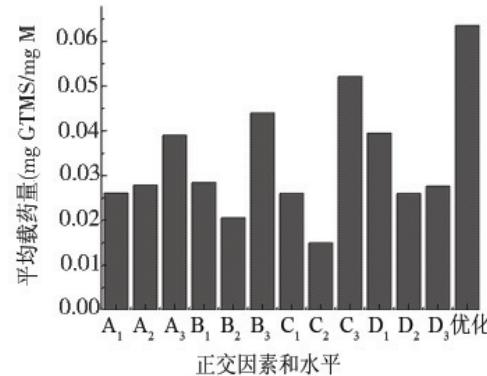
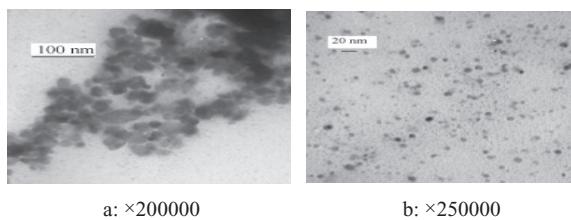


图2 正交实验结果直观图

表2 CoFe₂O₄量对PLA/CoFe₂O₄载药微球载药量的影响

CoFe ₂ O ₄ /mg	CoFe ₂ O ₄ /PLA(W/W)	平均载药量/(mg GTMS/mg MS)
150	1: 4	0.1774
200	1: 3	0.1355

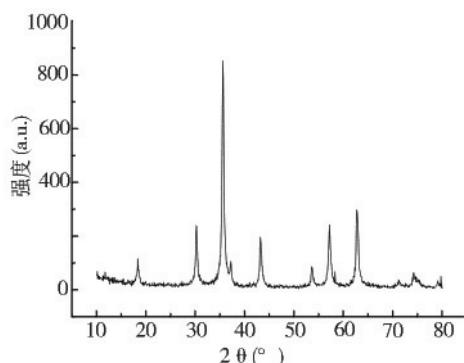
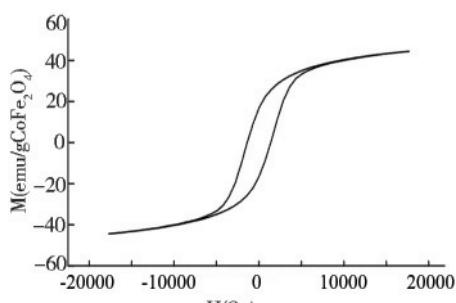
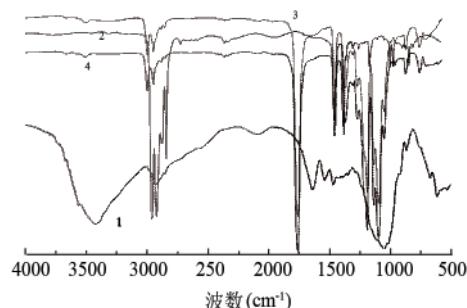
图3 CoFe₂O₄的透射电镜照片

看出，样品具有d值为2.97、2.53、1.97、1.48的较强衍射峰，与XRD的JCPDS卡片数据对照，为尖晶石结构的铁酸盐特征衍射峰。

(3) 磁性能分析 由图5可以看出CoFe₂O₄的饱和磁化强度达到44.407 emu/g，剩余磁化强度为16.782 emu/g，矫顽力为1375.6G，表明纳米CoFe₂O₄具有较好的磁性。

2.3.2 载药微球的结构表征

(1) 红外光谱分析 聚乳酸、硫酸庆大霉素、PLA载药微球及PLA/CoFe₂O₄载药微球的红外光谱见图6。由图6可知，药物与聚乳酸复合成为载药微球前后，两者的红外光谱图发生了很大的变化：对照谱线2、3、4，在1450cm⁻¹和1380cm⁻¹左右为聚乳酸

图4 CoFe₂O₄的XRD 谱图图5 CoFe₂O₄磁滞回线图6 GTMS, PLA, PLA-MS, PLA/CoFe₂O₄-MS的红外谱图

的-CH₃弯曲振动区，成微球前后未发生变化；在小于3000cm⁻¹为其饱和C-H的伸缩振动区，而成为载药微球后，该峰被削弱。对照谱线1、3、4，硫酸庆大霉素在3424cm⁻¹左右有明显-OH峰，表明药物为水溶性；1638cm⁻¹为胺类化合物特征峰，表明药物中含有-NH₂；在1049cm⁻¹左右有较强吸收峰，而在载药微球中该峰被打碎。对照谱线3、4可知，两者谱图非常相似。CoFe₂O₄的加入不影响载药微球的微观结构。

(2) 载药微球微观形貌分析 由图7可知：a, b分别为PLA载药微球和PLA/CoFe₂O₄载药微球的生物数码照片。从微球SEM照片c和d可知，两种微球呈圆润的球形，表面光滑。微球的总体分布较均匀，平均粒径约为20μm。

2.4 载药微球的体外释药性

载药微球及对照的释药性见图8。结果表明，在测试周期内相对于PLA载药微球，PLA/CoFe₂O₄载药微球释药较慢，其46h的累计释药百分比为62.40%，而PLA载药微球在24h时已达74.02%。这主要是由于加入铁酸钴的载药微球对药物的包覆效果增加，颗粒均匀分散在微球内部，与聚乳酸很好的结合，释药时不易形成释药孔道，故释放较为缓慢。由此说明，聚乳酸作为药物载体具有明显的药缓控释作用。从药物释放持续时间上看，PLA/CoFe2O4载药微球药物释放持续的时间最长。

3 结论

本文采用乳化-溶剂挥发法制备了聚乳酸载药微球，通过正交设计实验优选出聚乳酸载药微球的最佳实验条件。利用微乳法制备了磁性铁酸钴(CoFe₂O₄)，采用磁性铁酸钴(CoFe₂O₄)研究了聚乳酸磁性复合微球包覆及药缓控释性能。通过XRD、TEM、SEM、FT-IR等手段对铁酸钴及聚乳酸载药微球进行了微观结构的表征。得到的主要结论如下：

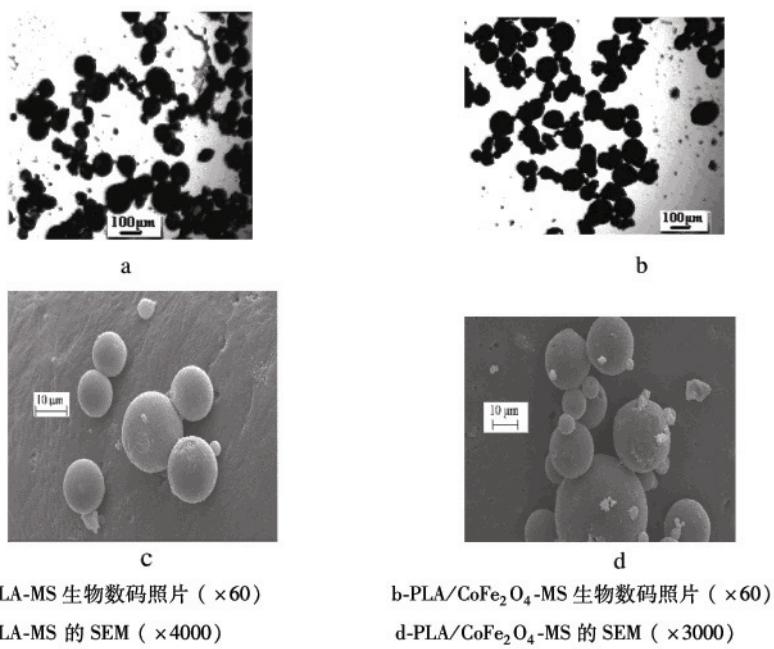
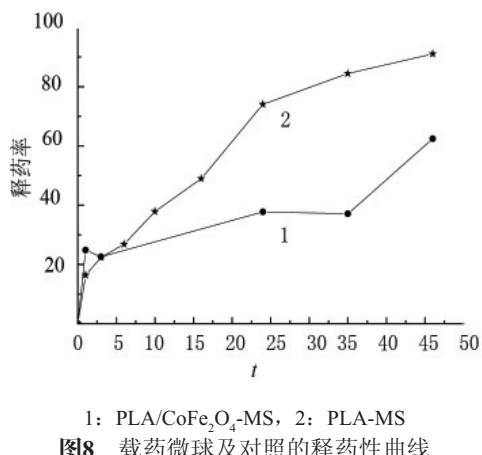
图7 PLA-MS 和 PLA/CoFe₂O₄-MS 的形貌观察

图8 载药微球及对照的释药性曲线

(1)采用微乳法制备的铁酸钴粒径小，分布均匀，具有较强磁性。通过微球形态分析可知，聚乳酸作载体的微球表面光滑，成球性较好，分散性较好，粒径分布较均匀，平均粒径约为 $20\mu\text{m}$ 。载药微球在加入磁性铁酸钴后具有明显的吸附药物的作用，平均载药量大幅度增加。

(2)通过PLA载药微球、PLA/CoFe₂O₄载药微球体外释药性的初步结果可知：聚乳酸作为药物载体具有明显的药缓控释作用；从药物释放持续时间上看，PLA/CoFe₂O₄载药微球药物释放持续的时间最长。

参 考 文 献

[1] 李孝红,袁明龙,熊成东,邓先模,黄志镗.聚乳酸及其共聚物

的合成和在生物医学上的应用[J].高分子通报,1999,3(1): 24~32.

- [2] Simon L, Mcguck, Giles H W. A high resolution atomic force microscopy study of poly(lactic acid - co - ethylene glycol) [J]. *Polymer Journal*, 2000, 32 (5): 444~448.
- [3] 张万国,蒋雪涛,朱才娟.肺靶向利福平聚乳酸微球的研究。药学学报, 1998, 33 (1): 57
- [4] Yoo H S, Lee K H, Oh J E, et al. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates[J]. *J control Release*, 2000, 68(3): 419.
- [5] Torres E C, Rodrigues J M, Horeira D L, et al. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2',6' - dihydroxy-4' -methoxychalcone by entrapment in poly (D,L-lactide) nanoparticle[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(7): 1776.
- [6] 曹婷颖, 顾月清, 高向东.聚乳酸载药微球的制备和给药方法[J].药学进展, 2006, 30(10): 448-452
- [7] 程青,卢文庆,聂素云.硫酸庆大霉素聚乳酸微球的制备及其体外缓释度的测定[J].南京师大学报(自然科学版), 2006, 29(2): 55~58.
- [8] PILLAI V, SHAH D O. Synthesis of high-coercivity cobalt ferrite particles using water-in-oil microemulsions[J]. *J Magnetism Magnetic Mater*, 1996, 163: 243~248.
- [9] 王哲, 倪宏哲, 张明耀, 等.聚乳酸微球制备工艺的研究 [J].高分子材料科学与工程, 2007, 23 (6) : 207~210.