

人血清白蛋白注射用凝胶的处方工艺研究

孟 慧,许 勇 (中国人民解放军第 85 医院药剂科,上海 200052)

摘要 目的:制备人血清白蛋白(HSA)可注射用凝胶,使用星点设计-效应面优化法对处方工艺进行优化筛选。方法:以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体材料,N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)和苯甲酸苄酯(BB)为共溶剂制备载 HSA 可注射用凝胶;以 PLGA 的用量及共溶剂的组成为考察因素,体外释放在评价指标,用线性方程和二次及三次多项式描述体外释放和两个影响因素之间的数学关系,根据最佳数学模型描绘效应面,选择最佳处方,并进行预测分析。结果:各指标的三项式拟合方程均优于多元线性回归方程,建立的数学模型的预测值与实际值符合较好。结论:用星点设计-效应面法优化处方工艺预测性良好。

关键词 人血清白蛋白;注射用凝胶;聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA);星点设计;效应面

中图分类号:R977.8,R943 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)04-0254-04

Optimized formulation of human serum albumin injectable gel

MENG Hui, XU Yong (Department of pharmacy, 85th Hospital of PLA, Shanghai 200052, China)

ABSTRACT Objective: To prepare human serum albumin (HSA) injectable gel. To optimize the formulations of injectable gel by a central composite design/response surface methodology. **Methods:** Injectable gel loaded HSA were prepared with poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) as carrier material and N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and benzyl benzoate (BB) as co-solvent. Independent variables were PLGA content and the content of co-solvent, and in vitro release was dependent variable. Linear or nonlinear mathematic models were used to estimate the relationship between independent and dependent variables. Response surfaces were delineated according to best-fit mathematic models, and optimum formulations were selected therefrom. Prediction was carried out through comparing the observed and predicted values. **Results:** The trinomial fitting equations of indexes were all superior to their multi-linear regression equations, and the predictive values in the established mathematical model were in good conformity with the experimental values. **Conclusion:** Central composite design/response surface method shows a good predictability in optimizing the formula technology of BDNF-loaded PLGA nanoparticles.

KEY WORDS human serum albumin; injectable gel; PLGA; central composite design; response surface

随着生物技术的高速发展,多肽、蛋白类药物不断涌现,在临床上应用前景广阔并已取得了良好的效果。此类药物生物活性强、剂量小,但口服生物利用度低,稳定性差,所以生物大分子药物的剂型基本是冻干粉针,因半衰期短需频繁给药,这就增加了患者的肉体痛苦和经济负担。目前多肽、蛋白类药物缓释给药系统成为研究的热点,主要集中在埋植剂和注射用微球,特别是有多种多肽注射用微球上市^[1,2]。埋植剂需经手术途径植入体内,非生物降解型的骨架材料释药完毕后还需手术取出。然而注射用微球的技术工艺复杂,难于大规模的生产,储存和注射时也存在一些问题,用于人体后一旦发生不良反应难以从体内清除。蛋白质微球由于稳定性和释

放等原因尚未有成熟的产品上市。

本课题拟研究一种可注射的生物降解型皮下植入剂,该剂型的特点是将水不溶性可降解聚合物溶于水溶性的生物相容性有机溶剂中,体外呈凝胶状,注入体内后,有机溶剂向周围水环境扩散,水扩散进入聚合物基质而使聚合物沉淀,从而在注射部位形成药物贮库,达到缓释作用^[3]。具有易植入,释药时间长,成本低,制备工艺相对简单,机体组织伤害小,副作用少等许多优点,此类制剂近年来取得了许多重要的成果,其中最成功的例子是 2002 年 Atrix Laboratories 推出的治疗前列腺癌的 Eligard 系列产品,它可使醋酸亮丙瑞林缓释达 1、3、4、6 个月不等,该剂型很好的解决了埋植剂和注射用微球存在的问题,应用前景广阔,载药量易控制,药物包封完全。为多肽、蛋白类药物提供了一种制剂技术平台。

实验选用人血清白蛋白为模型蛋白药物,聚乳

酸 羟基乙酸共聚物 (PLGA)为载体材料制备了缓释注射用凝胶,使用星点设计 效应面优化法对处方工艺进行优化筛选。

1 仪器与材料

1.1 仪器 超声仪 (上海科导公司); GS12-2 电子恒速搅拌器 (上海医械专机厂); SHZ-88 台式水浴恒温摇床 (江苏太仓市实验设备厂); 紫外分光光度计 (上海天美公司)。

1.2 材料 人血清白蛋白冻干粉 (HSA, 上海乔源生物制药有限公司, 批号 20070315); PLGA (LA: GA = 50: 50, 商品名 Resomer RG503H, 特性粘度为 0.4 dL/g, 德国 Boehringer Ingelheim 公司); N-甲基-2-吡咯烷酮 (国际特品公司, 批号 05500140714); 苯甲酸苄酯 (上海化学试剂公司, 20060715) BCA 含量测定试剂盒 (美国 Pierce 公司); 叠氮钠 (纯度 > 99.9%, AMERSON 分装); 磷酸氢二钾、磷酸二氢钠等试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 制备 HSA 可注射用凝胶 根据文献报道^[4], 制备工艺如下: 取 HSA 冻干粉 (40 mg), 加入 600 mg 不同比例的 N-甲基-2-吡咯烷酮和苯甲酸苄酯中溶解, 再加入一定量的 PLGA, 水浴超声混匀, 将其密封在 2.0 mL 的注射器中, 实验前制备。空白植入剂不加入药物。

2.2 药物含量测定 测定前将 BCA 试剂盒中的试剂 A、试剂 B、试剂 C, 按 25: 24: 1 的比例混匀, 得工作试剂备用。使用释放介质分别配制 1、2.5、5、7.5、10、15、20 $\mu\text{g/mL}$ 的 HSA 标准溶液, 取上述溶液各 0.5 mL 与工作溶液 0.5 mL 置 1.5 mL 离心管中混匀, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h, 562 nm 测吸光度, 样品平行测定两次。进行线性回归时扣除空白的背景吸收。

取 HSA 冻干粉, 分别用释放介质稀释配成高、中、低 3 个浓度的溶液各 3 份, 按 BCA 试剂盒的方法与 BCA 工作试剂反应后测定 562 nm 处吸光度, 根据回归方程计算 HSA 的浓度, 并与标准浓度比较求得回收率。低、中、高 3 种不同浓度的样品各取一份进行日内和日间精密度测定同法操作。日内、日间重复测定 5 次。

2.3 体外释放试验 将密封在注射器中的凝胶注入两端扎口的透析带中, 再将透析带迅速加入到含 10.0 mL 10 mM pH 7.4 缓冲液 (含 0.02% 叠氮钠作为抑菌剂, 0.02% F-68 作为润湿剂) 的玻璃试管中, 置于恒温水浴摇床中, 在 100 r/min 振荡速度、(37 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 温度条件下进行体外释放度测定。分别

在 2 h、1 d、2 d 取出试管, 将全部释放介质取出并更换新的释放介质, 以后每隔 3~4 d, 同以上操作方法取样一次, 并测定释放液中 HSA 的含量。

2.4 制备工艺的优化^[5] 采用单因素考察法对制备工艺中各影响因素的作用进行了初步考察, 其中 PLGA 的用量及共溶剂的组成是影响制剂体外释放的最主要因素。根据初步考察结果 PLGA 的用量 (X_1) 及共溶剂的组成 (X_2) 作为主要考察因素, 其范围分别为: X_1 : 200~800 mg; X_2 : 10%~30% (BB/NMP \times 100%)。根据星点设计的原理, 每因素设五水平, 可用代码值 -、-1、0、1、来分别表示。对于二因素的星点设计 $n = 1.414$ 。代码值之间与实际操作物理量之间为等比关系 (表 1)。根据实验设计的方案进行实验。

表 1 二个因素的代码水平及对应物理量

因素	-1.414	-1	0	1	1.414
X_1 / (mg)	200	287.83	500	712.16	800
X_2 / (%)	10	12.93	20	27.07	30

3 结果

3.1 药物含量测定 以浓度 C ($\mu\text{g/mL}$) 为纵坐标和扣除空白背景后的吸光度 A 为横坐标进行线性回归, 回归方程为 $C = 24.733A - 0.0635$ ($r = 0.9994$)。

结果表明, 在 1~20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 浓度 C 与扣除空白背景后的吸光度 A 线性关系良好。

精密称取一定量的 HSA 冻干粉, 分别配制成高、中、低 3 个浓度 (3.0、9.0、18.0 g/mL) 的溶液各 3 份分别进行含量测定, 根据上述回归方程计算溶液的浓度, 并与原始浓度比较求得回收率。结果, 平均回收率为 100.49%, $RSD = 0.77\%$ 。

取上述配制的高、中、低 3 个浓度的样品进行日内和日间精密度测定, 日内、日间重复测定 5 次。日内平均 $RSD = 0.18\%$, 日间平均 $RSD = 0.24\%$ 。

3.2 制备工艺优化 实验设计见表 2, 每个试验重复 3 次。根据实验设计的处方, 制备可注射用凝胶, 并对制备过程及可注射用凝胶的相关质量进行考察。结果表明 9 个处方制得的可注射用凝胶在体外释放时均可以迅速固化。将其体外释放行为作为优化考察指标。在凝胶固化的过程中, 由于亲水性溶剂的扩散可能造成较大的突释。同时实验希望在 30 d 内的累积释放达到 100%。所以考虑制剂的体外释放行为必须兼顾两者, 为了综合考虑我们将第 1 天的突释作为 Y_1 (%), 累积释放为 Y_2 (%)。

选择 3 种数学模型分别以第 1 d 的突释 Y_1 和突释后的累积释放 Y_2 对 X_1 与 X_2 进行曲线拟合, 模

型如下:

表 2 实验设计及结果

No	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂
1	1	1	12.8	80.6
2	1	-1	18.6	76.2
3	-1	1	16.2	76.0
4	-1	-1	16.3	66.1
5	1.414	0	21.4	94.0
6	-1.414	0	8.8	60.2
7	0	1.414	17.8	67.6
8	0	-1.414	10.5	65.7
9	0	0	24.8	80.2

多元线性方程: $Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2$

二次多项式: $Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_1^2 + b_4 X_2^2 + b_5 X_1 X_2$

三次多项式: $Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_1^2 + b_4 X_2^2 + b_5 X_1 X_2 + b_6 X_1^2 X_2 + b_7 X_1 X_2^2$

采用 Statistica 6.0 统计软件中的多元线性回归 (multiple regression) 及非线性估计 (nonlinear estimation) 进行。结果如下:

多元线性拟合结果:

$$Y_1 = 9.865 + 0.010 X_1 + 0.078 X_2 \quad (r=0.424, F=0.658, P>0.05)$$

$$Y_2 = 49.649 + 0.037 X_1 + 0.300 X_2 \quad (r=0.784, F=4.778, P>0.05)$$

二次多项式拟合结果:

$$Y_1 = -56.157 + 0.129 X_1 + 4.543 X_2 - 0.0001 X_1^2 - 0.099 X_2^2 - 0.0009 X_1 X_2 \quad (r=0.780)$$

$$Y_2 = -6.540 + 0.074 X_1 + 5.609 X_2 - 0.00002 X_1^2 - 0.121 X_2^2 - 0.0009 X_1 X_2 \quad (r=0.8948)$$

三次多项式拟合结果:

$$Y_1 = 85.462 - 0.293 X_1 - 7.277 X_2 + 0.0002 X_1^2 + 0.123 X_2^2 + 0.030 X_1 X_2 - 0.000013 X_1^2 X_2 - 0.00045 X_1 X_2^2 \quad (r=0.9912)$$

$$Y_2 = 98.292 - 0.0364 X_1 - 7.925 X_2 - 0.0002 X_1^2 + 0.269 X_2^2 + 0.021 X_1 X_2 + 0.000009 X_1^2 X_2 - 0.0008 X_1 X_2^2 \quad (r=0.9904)$$

根据 r 值三次多项式拟合度较优, 考察指标与自变量之间呈显著相关性。根据该数学模型分别描绘突释和累积释放对 X_1 及 X_2 的三维效应面图见图 1 和图 2。

根据三维效应面图, 选择突释小且累积释放多的 X_1 及 X_2 值, 综合考虑我们选定最佳工艺条件为: X_1 (PLGA) = 200 mg, X_2 (BB: NMP%) = 30, 带入上

述预测方程, 得到:

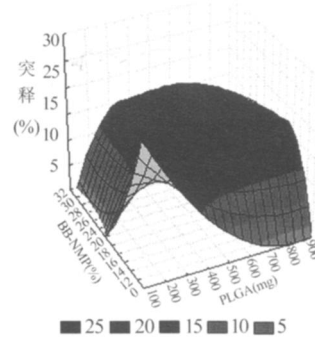


图 1 突释与 PLGA 和 BB/NMP 的三维效应面

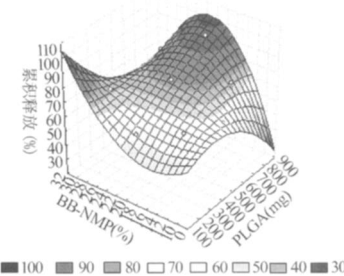


图 2 累积释放与 PLGA 和 BB/NMP 的三维效应面

$$Y_1 = 85.462 - 0.293 X_1 - 7.277 X_2 + 0.0002 X_1^2 + 0.123 X_2^2 + 0.030 X_1 X_2 - 0.000013 X_1^2 X_2 - 0.00045 X_1 X_2^2 = 10.65$$

$$Y_2 = 98.292 - 0.0364 X_1 - 7.925 X_2 - 0.0002 X_1^2 + 0.269 X_2^2 + 0.021 X_1 X_2 + 0.000009 X_1^2 X_2 - 0.0008 X_1 X_2^2 = 84.96$$

即第一天的突释为 10.65%, 突释后的累积释放为 84.96%。

根据优化条件制备 3 批可注射用凝胶, 测定体外释放, 数据如下:

表 3 三批最佳处方制备的可注射用凝胶的突释和累积释放

批次	突释 (%)	累积释放 (%)
1	9.8	88.6
2	12.7	87.3
3	11.3	85.4

$$\text{偏差率 } 1 = (Y_1 \text{ 实测} - Y_1 \text{ 预测}) / Y_1 \text{ 预测} \times 100\% = (11.26 - 10.65) / 10.65 \times 100\% = 5.7\%$$

$$\begin{aligned} \text{偏差率 } 2 &= (Y_2 \text{ 实测} - Y_2 \text{ 预测}) / Y_2 \text{ 预测} \times \\ &100\% = (87.1 - 84.96) / 84.96 \times \\ &100\% = 2.5\% \end{aligned}$$

结果表明所建立的数学模型具有良好的预测性,所选的条件重现性良好。

4 讨论

可注射用凝胶剂虽然具有很多显著的优点,但也存在一些问题,其中最为突出的是药物的突释,大多会造成组织疼痛,甚至全身毒性,这限制了治疗窗窄的药物的使用。该剂型注入皮下或肌肉后,在开始的几个小时内出现突释效应,这可能是因为注射后该制剂由液体形式转化为凝胶状态需要一定的时间。文献报道苯甲酸苄酯的加入可以起到控制突释和调节药物释放的作用^[6,7]。本研究采用星点设计优化处方,通过单因素实验固定了投药量和共溶剂的量,重点考察了共溶剂的组成和 PLGA 量对可注射用凝胶体外释放(突释和累积释放)的影响。三维效应图中可以看到共溶剂的组成和 PLGA 量对累积释放影响较大,对突释影响较小,实验对突释的控制还不理想,只能达到 10%左右。

星点设计是在二水平因子分析的基础上再加上星点及中心点构成,适用于结果与因素之间的非线性关系考察,且实验次数少^[8]。通常所用的正交设计及均匀设计,一般只适用于考察线性关系。但往往在最佳条件的范围内,因素的影响最显著,结果的变化最迅速,它们之间的关系大多数为非线性的,因此再使用只能考察线性关系的实验设计就不合适了。

我们所建立的突释和累积释放与 PLGA 和共溶

剂(NMP和 BB)的组成之间的三次多项式数学关系式,相关系数均较高。模型具有较高的可信度,且预测性良好;同时也表明取影响因素的任意值代入已建立的数学模型,均能准确地预知注射用凝胶的体外释放行为,其体内释放行为及其体内外释放相关性还有待研究。

参考文献:

- [1] Singh M, Shidey B, Bajwa K, *et al* Controlled release of recombinant insulin-like growth factor from a novel formulation of poly(lactide-co-glycolide) microparticles [J]. *J Control Release*, 2001, 70: 21.
- [2] Sanchez A, Tobo M, Gonzalez L, *et al* Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon- α [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2003, 18: 221.
- [3] Chiellini E, Solaro R, Leonardi G, *et al* New polymeric hydrogel formulations for the controlled release of α -interferon [J]. *J Control Res*, 1992, 22: 273.
- [4] Eliaz RE, Kost J. Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins [J]. *J Biomed Mater Res*, 2000, 50(3): 388.
- [5] 吴伟,阙俐,陈健,等.星点设计效应面法优化苯甲酸利扎曲普坦片的处方. *复旦学报(医学版)*, 2003, 30(4): 381
- [6] Chen S, Singh J. Controlled delivery of testosterone from smart polymer solution based systems: *in vitro* evaluation [J]. *Int J Pharm*. 2005, 295(1-2): 183.
- [7] Singh S, Singh J. Controlled release of a model protein lysozyme from phase sensitive smart polymer systems [J]. *Int J Pharm*. 2004, 271(1-2): 189.
- [8] 吴伟,崔光华.星点设计效应面优化法及其在药学中的应用. *国外医学·药学分册* 2000, 27(5): 292.

收稿日期: 2008-08-28

(上接第 247 后页)

- [17] 邢春秀,谢宁,杨念云,等.杏香兔耳风的化学成分[J]. *江苏药学与临床研究*, 2006, 14(2): 39.
- [18] 刘波,谢亮亮,王英峰.杏香兔耳风化学成分研究[J]. *首都师范大学学报(自然科学版)*, 2007, 28(6): 36.
- [18] 张锐,曾宪仪,张正行.杏香兔耳风的化学成分研究() [J]. *中草药*, 2006, 37(3): 347.
- [20] 葛菲,吴爱梅,郝秀斌,等.杏香兔耳风挥发油成分研究[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2007, 31(5): 467.
- [21] 王欣月,王英峰,刘波.药用植物杏香兔耳风挥发性成分分析[J]. *首都师范大学学报(自然科学版)*, 2006, 27(4): 48.
- [22] 普建新,羊晓东,赵静峰,等.藏药心叶兔耳风挥发油成分分析[J]. *云南大学(自然科学版)*, 2004, 26(4): 345.
- [23] 李翔,邓赞,张新申,等.叶下花挥发油化学成分的 GC/MS 分析[J]. *化学研究与应用*, 2006, 18(9): 1132.
- [24] 成都中医学院止血药研究小组.披针叶兔耳风对内出血疾患的初步临床观察[J]. *四川中草药通讯*, 1973, (1): 19.
- [25] 易剑锋.杏香兔耳风对宫颈炎大鼠宫颈粘膜 PGE2 及外周血 T 淋巴细胞亚群表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2007, 22(11): 806.
- [26] Shin SG, Kang JK, Lee KR, *et al* Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages by sesquiterpene lactones [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health (Part A)*, 2005, 68(23-24): 2119.
- [27] 江苏新医学院. *中药大辞典(上册)* [M]. 上海:上海科技出版社. 1977: 1323.
- [28] 蔡宝昌.国外天然药物抗病毒研究简况 [J]. *国外医学·中医中药分册*, 1997, 19(3): 48.
- [29] Moon HI, Zee OP, Shin MS. Effects of compounds isolated from *Ainsliaea acerifolia* on the hepatic alcohol dehydrogenase activity [J]. *Han'guk Nonghwa Hakhoechi*, 1999, 42(2): 162.

收稿日期: 2008-12-24