

• 实验研究 •

长春西汀 s-PLGA 长效缓释微球的体内外评价

王璐¹, 王东凯¹, 邱立朋¹, 杨磊¹, 李琳¹, 张晓岭¹, 沈丽敏²

(1 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2 辽宁电力中心医院妇产科, 沈阳 110016)

[摘要] **目的:** 本研究以星状聚乳酸羟基乙酸共聚物(star poly D, L-lactide-co-glycolide, s-PLGA)为载体制备长春西汀长效缓释微球, 对其体内外性质进行评价。**方法:** 采用开环聚合法制备 s-PLGA, 以此作为载体材料, 采用乳化-溶剂挥发法制备长春西汀 s-PLGA 长效缓释微球(VIN-MS), 并对其包封率、粒径和体内外性质进行了考察。**结果:** 本研究制备的 VIN-MS 的平均粒径为 $(18 \pm 2) \mu\text{m}$, 包封率为 62.20%, 载药量为 37.43%。扫描电镜观察结果表明, 微球外观圆整、均匀, 流动性好, 分散性好。体外释放结果表明, VIN-MS 具有明显的缓释特性, 其突释率为 6.96%。体内结果表明, VIN-MS 制剂体内周期能维持 15 d, 与长春西汀普通注射剂相比, VIN-MS 的曲线下面积(AUC)和平均滞留时间(MRT)分别是普通注射剂的 40 倍和 38 倍。**结论:** 长春西汀 s-PLGA 长效缓释微球的成功制备将有利于脑血管病的治疗。

[关键词] 星状聚乳酸-羟基乙酸共聚物(s-PLGA); 微球; 溶剂挥发法; 长春西汀; 体内释药

[中图分类号] R943.41; R971.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2012)13-1545-06

In vitro and in vivo evaluation of vinpocetine-loaded sustained-release microspheres with s-PLGA as carrier

WANG Lu¹, WANG Dong-kai¹, QIU Li-peng¹, YANG Lei¹, LI Lin¹, ZHANG Xiao-ling¹, SHEN Li-min²

(1 School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2 Department of Gynaecology and Obstetrics, Liaoning Electric Central Hospital, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the star poly D, L-lactide-co-glycolic acid (s-PLGA), as the carriers of vinpocetine-loaded microspheres. **Methods:** The star polylactic-co-glycolic acid (s-PLGA) was synthesized through ring-opening polymerization reaction. Vinpocetine-loaded sustained-release microspheres with s-PLGA as carriers (VIN-MS) were prepared by solvent evaporation method. The encapsulation efficiency, drug loading, particle size, *in vitro* and *in vivo* release were performed. **Results:** The encapsulation efficiency of the VIN-MS was 62.20%, drug loading was 37.43%, and burst effect was 6.96%. The average size of VIN-MS was $(18 \pm 2) \mu\text{m}$. *In vivo* study showed that AUC and MRT of VIN-MS were 40 times and 38 times compared to ordinary VIN injections. **Conclusion:** Vinpocetine-loaded s-PLGA sustained-release microspheres may be a potential formulation for treating cerebrovascular diseases.

[Key words] star polylactic-co-glycolic acid (s-PLGA); microspheres; solvent evaporation method; vinpocetine; *in vivo* drug release

目前治疗脑血管病的药物其作用机制主要有两种^[1]: 一种是以改善脑循环为主, 如扩张缺血区的

脑血管, 改善血液流变性及微循环; 另一种是以改善脑代谢为主, 如激活脑代谢、营养脑组织。改善脑循环的药物中首选长春西汀(vinpocetine, VIN), 该药自 1978 年上市以来治疗脑梗死、脑出血后遗症及动脉硬化症等多种类型的循环障碍性脑血管疾病效果显著, 长期应用安全性和耐受性极高, 毒性低, 不

[作者简介] 王璐, 女, 硕士研究生。联系电话: 18204098989, E-mail: wanglu_8575@126.com。

[通讯作者] 王东凯, 男, 博士, 副教授, 主要从事药物新剂型研究。联系电话: (024) 23986310, E-mail: wangdksy@126.com。



不良反应少,很受国内外学者的重视^[2]。

作为脑循环改善剂, VIN 治疗剂量为 5 mg, tid, 需连续长期给药。文献数据表明^[3-6], 人体内肝脏细胞对 VIN 具有极强的代谢作用, 存在严重的肝脏首过效应, 主要被代谢成阿朴长春胺酸, 口服吸收绝对生物利用度极低。目前, 在我国仅有普通片剂和注射剂上市。但由于其半衰期短, 口服需要频繁给药 (tid), 因而迫切需要开发一种 VIN 缓控释制剂, 以平稳血药浓度及提高患者依从性。由前期肠道吸收实验结果可知, VIN 在全肠段都有较好吸收, 药物吸收速率常数不依赖于药物浓度大小, 因此适宜制成缓释、控释制剂。

微球 (microspheres, MS) 是指药物溶解或者分散在高分子材料基质中形成的微小球状实体, 常见粒径在 1 ~ 40 μm 之间, 属于基质型骨架微粒^[7]。聚乳酸-羟基乙酸 (poly D, L-lactide-co-glycolide, PLGA) 是一种生物可降解性合成高分子材料。因其易于合成、质量稳定、生物可降解性、降解速度可调节性和良好的可塑性, 近 10 多年来被大量用作微球控释系统的骨架材料, 特别在埋植用微球领域得到了广泛应用。但目前临床上使用的 PLGA 微球制剂并不多, 造成这种现状的主要技术问题是: 制剂在进入体内的 d 1 前后会迅速大量地释放药物, 这种现象被称为“突释”, 一般用 24 h 的药物累积释放量 (%) 来衡量其程度。由于给药初期的突释有可能导致血药浓度接近或超过中毒水平, 产生明显的不良反应, 因此, 突释现象已成为 PLGA 微球控释系统研究者面临的一个急待解决的问题^[8-10]。PLGA 是一种直链结构, 本实验依据欧洲专利 GB2145422, 合成星状聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [s-PLGA (75/25)], 以期改善常用的直链 PLGA 载体包裹微球出现的突释效应。

仪器与试剂

PF-101T 集热式恒温磁力搅拌器 (巩义市英峪予华仪器厂); BS110S 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); IFS-55 型红外光谱仪 (瑞士 Bruker 公司); BRUKER-ARX-300 核磁共振仪 (瑞士 Bruker 公司); TA-60 差热分析仪 (日本岛津公司); 岛津高效液相色谱仪 (日本岛津公司); RCZ-6B 型药物溶出仪 (上海黄海药检仪器厂); YKH-II 型涡旋混合器 (江西医疗器械厂); TGL-16G 台式高速离心机 (上海医用分析仪器厂)。

D, L-丙交酯 (济南岱罡公司, 纯度 $\geq 99\%$); 乙交酯 (济南岱罡公司, 纯度 $\geq 99\%$); 葡萄糖 (天津市博迪化工有限公司); 辛酸锌 (国药集团化学试剂有限公司); 二氯甲烷 (天津市博迪化工有限公司); 甲醇 (天津市康科德化学有限公司); 乙醚 (沈阳市苏家屯区辽河化工厂); 盐酸 (沈阳市东兴试剂厂); s-PLGA (自制); 碳酸铵 (北京凤礼精求商贸有限责任公司)。

方 法

1 星状聚乳酸-羟基乙酸共聚物的合成

称取处方量的 D, L-丙交酯、乙交酯、葡萄糖, 加入三颈瓶中, 氮气保护下升温, 熔融状态加入适量辛酸锌催化剂, 然后 3 次抽真空通氮保护, 逐渐升温至 140 ~ 160 $^{\circ}\text{C}$, 反应 14 ~ 16 h, 产物用适量二氯甲烷溶解, 甲醇沉淀, 将白色沉淀干燥, 即得。

2 长春西汀 s-PLGA 长效缓释微球的制备

采用单乳溶剂挥发法制备长春西汀微球。适量长春西汀和 s-PLGA 溶解于 DCM 中, 此溶液保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 以防止 DCM 的挥发。将此溶液逐滴加入至 20 mL 2% (w/v) 的 PVA 溶液中, 持续高速机械搅拌 3 min, 于室温以 300 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度持续搅拌 4 h, 挥发掉 DCM。然后将该溶液离心 10 min, 弃去上清液, 甲醇溶液清洗 1 次, 离心, 弃去上清液。纯化水反复洗涤沉淀, 最后真空干燥 24 h 即得。

3 微球的体外性质评价

3.1 微球的外部形态 目测法: 观察微球粉末外观性状、颜色及流动性。光学显微镜法: 取少量微球置于离心管中, 加纯化水适量, 摇匀, 取微球混悬液滴加于载玻片上, 100 倍条件下观察微球性状及圆整度。

3.2 微球粒径及跨距测定 按 2010 年版《中华人民共和国药典》测定微球粒度及粒度分布, 在光学显微镜下观察微球并用测微尺目测微球的直径, 计数不少于 200 个, 经统计学处理得平均粒径。粒径分布用跨距 (span) 表示, 计算公式为: 跨距 = $(D_{90} - D_{10}) / D_{50}$, 其中 D_{10} , D_{50} , D_{90} 分别指 10%, 50%, 90% 的粒子的粒径低于此值所示的粒径。

3.3 微球的包封率和载药量的测定 精密称取 VIN 微球 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 CH_2Cl_2 2 mL 振摇使溶解, 甲醇稀释到刻度混匀, 微孔滤膜过滤后在波长 273 nm 测定溶液峰面积 (A) 并代入标准曲线方程, 计算载药量和包封率。



s-PLGA 中有共价键结合的葡萄糖。本实验最终成功合成新型药用辅料 s-PLGA(75/25) 共聚物。

1.1 红外吸收光谱 采用涂膜法测定 s-PLGA 的红外光谱,分辨率为 2 cm^{-1} , $4\,000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 全谱扫描。

结果解析: ① $3\,435\text{ cm}^{-1}$ 处为共聚酯末端羟基(OH)。② $2\,999, 2\,958, 1\,454, 1\,424, 1\,399\text{ cm}^{-1}$ 为共聚酯中的饱和碳氢键($\text{CH}_3, \text{CH}_2, \text{CH}$)的伸缩振动和弯曲振动。③ $1\,758\text{ cm}^{-1}$ 为共聚酯的酯羰基($\text{C}=\text{O}$)基伸缩振动。④ $1\,275, 1\,186, 1\,099\text{ cm}^{-1}$ 为碳氧单键($\text{C}-\text{O}-\text{C}$)伸缩振动,证明了酯基的存在。

红外光谱说明结构中存在甲基、亚甲基和酯等。产物与文献一致。

1.2 核磁共振氢谱 以 CHCl_3 为溶剂, TMS 作内标,测定结果见图 2。

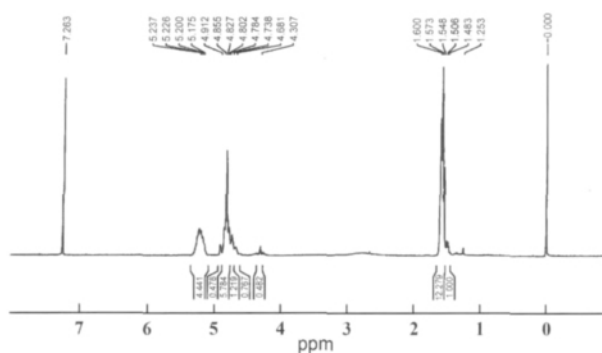


图 2 s-PLGA 的核磁共振氢谱

该化合物结构中存在甲基、亚甲基和次甲基, $\delta = 1.55\text{ ppm}$ 处为 LA 链段中 CH_3 的质子峰, $\delta = 4.83\text{ ppm}$ 处为 GA 链段中 CH_2 的质子峰。 $\delta = 5.18\text{ ppm}$ 可以归属为次甲基。由上述分析可知,共聚物链上同时存在 LA 链段和 GA 链段,链段中 GA 和 LA 两嵌段的物质的量比约为 2:1,这是因为乙交酯的竞聚率大于丙交酯的竞聚率的缘故($r_{\text{GA}} = 2.8, r_{\text{LA}} = 0.2$)以及丙交酯活性较低的原因^[33]。从合成产物的红外及核磁分析可以基本确定产物是 s-PLGA(75:25)。

1.3 凝胶渗透色谱 采用 Waters 聚苯乙烯凝胶 HT₃ 和 HT₄ 柱,以氯仿为溶剂,聚苯乙烯为标准品, $25\text{ }^\circ\text{C}$,流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进行凝胶渗透色谱分析,见图 3。测定聚合温度为 $160\text{ }^\circ\text{C}$,聚合时间为 14 h 的 s-PLGA,其重均相对分子质量(M_w)为 13 122,数均相对分子质量(M_n)为 9 077,相对分子质量分布较窄

(1.45),符合聚合物的要求,可以作为微球载体使用。

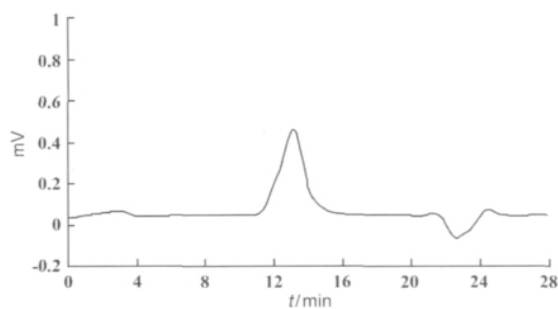


图 3 s-PLGA 的凝胶渗透色谱图

1.4 差示扫描量热法 在氮气保护下测定 DSC,升温速率为 $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 。s-PLGA 的 DSC 谱图见图 4。由图可以看出 D,L-丙交酯、乙交酯及葡萄糖都有确定的熔点(T_m),而合成的产物没有明显的吸热峰,因为目标产物 s-PLGA 是非结晶态,没有固定的熔点。

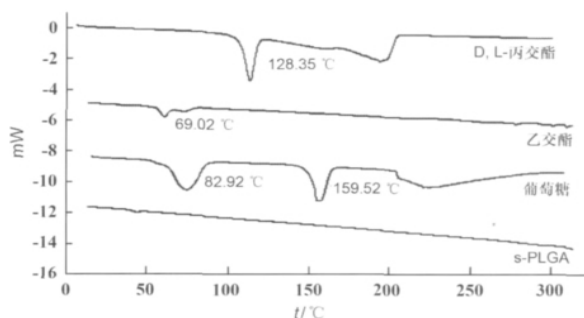


图 4 D,L-丙交酯、乙交酯、葡萄糖和 s-PLGA 的 DSC 图谱

2 体外性质评价

2.1 微球的粒径和外部形态 采用激光粒径测定仪(LS230 BECKMAN COULTER)测得的平均粒径为 $(18 \pm 2)\text{ }\mu\text{m}$,分布较均匀。

2.2 外观形态 电镜照片见图 5,可以看出,长春西汀长效缓释注射微球为光滑圆整、致密的球体。

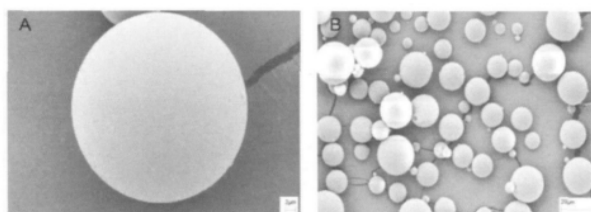


图 5 VIN-MS 的扫描电镜结果 (A: $\times 1\,000$; B: $\times 200$)

2.4 包封率和载药量 以优选处方与工艺制备3批VIN微球,所制得微球的相关质量指标见表1。

表1 3批VIN-MS的质量评价指标 $n=3$

批号	载药量/%	包封率/%
1	37.33	62.20
2	37.17	60.49
3	36.96	60.44

2.5 微球体外释放结果研究 按照优化处方工艺和释放条件进行的研究, VIN-MS的体外释放性能结果见图6。体外释放试验表明, VIN-MS具有明显的缓释特性,其突释百分率为6.96%,表明合成辅料s-PLGA可降低长春西汀的突释量; VIN-MS 15 d累积释药百分率在90%左右,具有一定的缓释性。

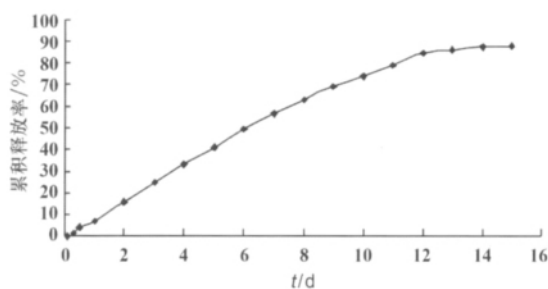


图6 VIN-MS体外释放曲线

2.6 影响因素试验 将长春西汀微球分别置于高温(60℃)、高湿(RH 92.5%)条件下放置,于d 0, 5, 10取样,考察微球外观形态和分散性,结果见表2。

表2 影响因素试验结果

条件	时间/d	外观
高温(60℃)	0	白色粉末,流动性好,分散性好
	5	白色粉末,稍有黏连
	10	微黄色粉末,稍有黏连,分散性差
高湿(RH 92.5%)	5	白色粉末,稍有黏连
	10	白色粉末,稍有黏连,分散性差
强光照射	5	微黄色粉末,稍有黏连
	10	微黄色粉末,稍有黏连,分散性差

由表2可见,长春西汀微球在高温、高湿、光照条件下放置10 d后,外观均有变化。

2.7 长期试验 取长春西汀微球适量,室温条件下储存,于第1和2个月取样,考察微球的载药量、突释量、外观形态和分散性,结果见表3。

表3 长期试验结果

时间/月	外观	载药量/%	突释率/%
0	白色粉末,流动性好,分散性好	37.43	6.96
1	白色粉末,流动性好,分散性好	37.18	6.25
2	白色粉末,流动性好,分散性好	36.95	6.25

由表3可见,长期试验2个月,微球的外观形态、流动性、分散性、载药量和突释量均无明显变化,质量稳定。

3 体内试验结果考察

采用统计矩的非隔室动力学理论对大鼠血药浓度数据进行处理, k 为消除速率常数,可根据血药浓度-时间曲线消除相中末端直线部分的数个实验点的 $\log C$ 对时间 t 进行线性回归求出,进而也能求出消除半衰期 $t_{1/2}$; AUC_{0-t} 采用梯形法计算,再运用统计矩原理,算出一阶矩曲线下面积(AUMC)和平均滞留时间(MRT)。见图7和表4。

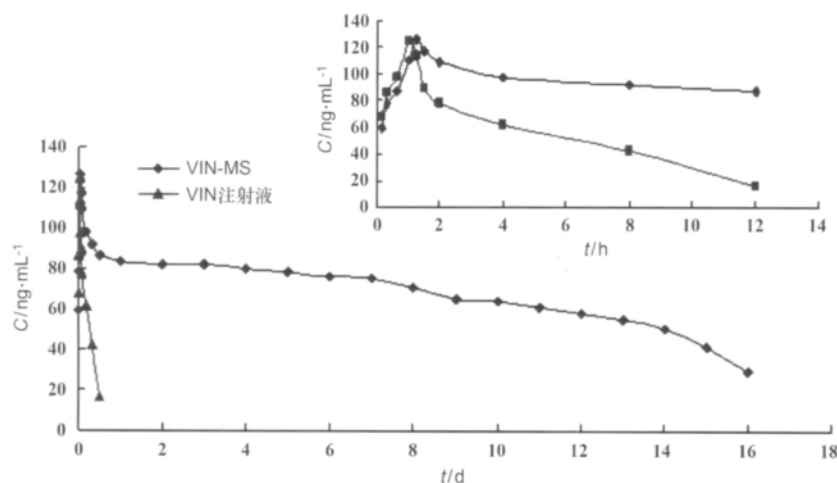


图7 肌内注射后参比组和给药组的药-时曲线

表4 肌内注射后参比组和给药组的统计矩参数

参数	参比组	给药组
$AUC_{0-t} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	649.243	26 010.88
$AUC_{0-\infty} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	814.052	28 646.92
MRT_{0-t} / h	4.382	168.54
$MRT_{0-\infty} / \text{h}$	7.472	196.51

由表4可以看出,VIN微球注射液的 $AUC_{0-\infty}$ 为28 646.92, MRT 为196.51 h,约为8.2 d,均大于对照组,说明VIN微球注射液有一定的缓释效果。

4 体内外释药相关性

长期体外直接释放-体内相关性: AUC对透析法(长期体外释放试验)相应时间的体外累积释放百分率(Q)见表5。采用最小二乘法拟合,作线性回归,回归方程为: $AUC = 260.5 \times Q - 439.45, r^2 = 0.9945$,体内外相关性良好,见图8。

表5 VIN-MS的体内外参数

t/d	体内-AUC	体外-Q/%
0.5	1 094.73	6.38
1	2 087.33	7.30
3	5 984.27	24.65
5	9 722.11	41.15
10	17 973.13	73.96
15	23 955.20	90.14

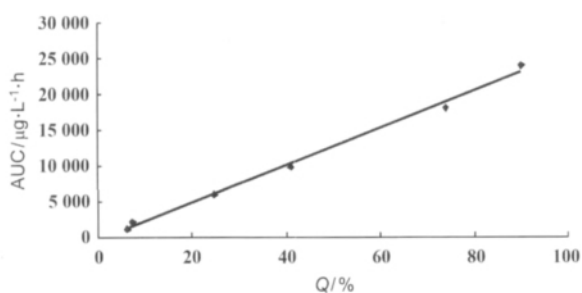


图8 体内外释药相关性拟合曲线图

讨 论

交酯的开环一般发生在酰基上,乙交酯(GA)与丙交酯(LA)的开环均如此。当乙交酯单体与丙交酯单体发生共聚反应时,丙交酯环上含有的 $-\text{CH}_3$ 导致位阻增大,因此开环聚合的机制为引发剂主要插

入在位阻较小的乙交酯单体上。由于GA的竞聚率远大于LA的竞聚率,反应初期首先是GA与GA反应生成较长的-gg-序列,随着反应的进行,体系中GA的浓度不断下降,LA与LA以及LA与-gg-单元之间的反应速率加快,当增长的-l-活性链与-gg-单元反应时,会导致单元的断裂而形成-lgl-序列。尽管GA的竞聚率远远大于LA的竞聚率,单体转化较为彻底,但由于聚合时间较长,并且在反应后期形成的-l-活性增长链与-gg-单元发生了二级酯交换反应,因此LA的转化率也较高,所以共聚物中-g-单元的含量与根据GA摩尔投料比计算的结果相差不大。

总之,本研究以s-PLGA为载体,将VIN与注射微球给药系统相结合,制备开发了VIN的微球制剂,并对其体内外释放行为进行了考察,为脑血管的治疗提供了新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] 杨学义. 治疗脑血管疾病常用药物的基础与临床[J]. 中国药理学通报,1996,12(6):498-502.
- [2] 聂淑芳. 长春西汀包合物及其缓释制剂的设计与评价[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2004.6.
- [3] SZAKACS T, VERESZ, VERECZKEY L. *In vitro-in vivo* correlation of the pharmacokinetics of vinpocetine [J]. *Pol J Pharmacol*,2001,53(6):623-628.
- [4] PUDLEINER P, VEREEZKEY L. Study on the absorption of vinpocetine and apovincaminic acid [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*,1993,18(4):317-321.
- [5] MISKOLEZI P, KOZMA K, POLGAR M, et al. Pharmacokinetics of vinpocetine and its main metabolite apovineaminic acid before and after the chronic oral administration of vinpocetine to humans [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*,1990,15(1):1-5.
- [6] VEREEZKEY L, PUDLEINER P. Pharmacokinetics of apovineaminic acid in dogs [J]. *Pol J Pharmacol Pharm*,1987,39(2):161-165.
- [7] FOSH BG, FINCH JG, LEA M, et al. Use of electrolysis as an adjunct to liver resection [J]. *Br J Surg*,2002,89(8):999-2002.
- [8] 高萍,丁平田,陈大为. 注射用长效微球体外释放特性的研究进展[J]. 中南药学,2005,3(2):105-108.
- [9] LEE ES, PARK KH, PARK IS, et al. Glycol chitosan as a stabilizer for protein encapsulated into poly(lactide-co-glycolide) microparticle [J]. *Int J Pharm*,2007,338(1-2):310-316.
- [10] BUDHIANA A, SIEGELB SJ, WINEY KI. Controlling the *in vitro* release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles [J]. *Int J Pharm*,2008,346(1-2):151-159.

编辑:周卓/接受日期:2012-02-20

