

长春西汀聚乳酸-聚乙醇酸缓释微球的研制

刘国磊*,王 帅,王 静,曹雅培,黄敬洪,申 磊,曹德英*(河北医科大学药学院药剂教研室,石家庄 050017)

中图分类号 R943;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2012)13-1203-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2012.13.19

摘要 目的:制备长春西汀聚乳酸-聚乙醇酸(PLGA)缓释微球,并研究其药剂学性质。方法:采用改良O/W乳化-溶剂挥发法制备微球,以PLGA浓度、理论载药量、有机相与分散介质的比例和分散介质中明胶的浓度为4因素,每个因素选定3个水平,按 $L_9(3^4)$ 的正交设计方案,以载药量、包封率和粒径分布为指标,优化处方。用扫描电镜观察微球的形态,用光学显微镜观察并计算微球的粒径分布,用差示扫描量热(DSC)法研究药物在载体中的分散状态,用紫外分光光度法检测微球中长春西汀含量并计算载药量和包封率,用动态透析释药法进行微球的体外释放研究。结果:最佳处方为PLGA浓度16%,理论载药量20%,有机相与分散介质的比例1:10,分散介质中明胶的浓度1%;制备的长春西汀PLGA缓释微球的形态圆整、光滑,粒径分布均匀,平均粒径为 $(10.0 \pm 0.18) \mu\text{m}$ ($n=500$),DSC法分析药物确已被包裹于微球中,载药量为 $(18.46 \pm 0.26)\%$,包封率为 $(91.30 \pm 0.98)\%$ ($n=3$),24 h累积释药率约为18%。结论:长春西汀PLGA缓释微球制备工艺稳定,质量符合药剂学要求,缓释性好。

关键词 长春西汀;聚乳酸-聚乙醇酸;微球;制备;处方优化;体外释放

Preparation of Poly(lactic-glycolic Acid) Sustained-release Microspheres Loaded with Vinpocetine

LIU Guo-lei, WANG Shuai, WANG Jing, CAO Ya-pei, HUANG Jing-hong, SHEN Lei, CAO De-ying (Pharmaceutics Teaching and Research Section, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Poly(lactic-glycolic acid) sustained-release microspheres loaded with vinpocetine, and to study pharmaceutical property of it. METHODS: Modified O/W emulsified solvent evaporation method was used to prepare the microspheres. Preparation technology was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal design with 3 levels each for 4 factors. PLGA concentration, theoretical drug-loading amount, the ratio of organic phase to disperse medium and gelatin concentration of disperse medium as factors using drug loading amount, entrapment rate and particle size distribution as index. The surface morphology of microspheres was observed under scanning electron microscope, and the distribution of particle size was observed and calculated by optical microscope. The dispersion of vinpocetine was studied using DSC, and the content of vinpocetine in microspheres was detected by UV spectrophotometry. Dialysis method was used to examine the in vitro drug release. RESULTS: The optimal formulation was as follows: PLGA concentration 16%, theoretical drug loading 20%, the volume ratio of organic phase to disperse phase 1:10 and gelatin concentration of disperse medium 1%. PLGA sustained-release microspheres loaded with vinpocetine were round, complete and smooth, and particle size was well-distributed with average particle size of $(10.0 \pm 0.18) \mu\text{m}$ ($n=500$). DSC analysis showed drug were coated in microspheres. Drug-loading amount was $(18.46 \pm 0.26)\%$ and the entrapment rate was $(91.30 \pm 0.98)\%$ ($n=3$). Accumulative drug release rate was 18% in 24 h. CONCLUSION: The preparation technology of PLGA sustained-release microspheres loaded with vinpocetine is stable; the microsphere exhibits good sustained-release property, and it is up to the requirements of pharmacy.

KEY WORDS Vinpocetine; Poly(lactic-glycolic acid); Microspheres; Preparation; Formulation optimization; Drug release in vitro

要求检查均合格;同时建立了主药和有关物质的含量测定方法,测定结果也符合要求。表明所确定的制剂处方和制备工艺合理,所得产品质量可控、稳定性好,适于大生产制备。

参考文献

- [1] Dreyling M. Bendamustine is a hybrid antimetabolite and alkylating agent offering new therapeutic options for the treatment of non-Hodgkin lymphomas[J]. *Hematology Meeting Reports*, 2008, 2(5): 123.
- [2] Tajeja N, Nagi J. Bendamustine: something old, something

new[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 66(3): 413.

- [3] 陈 栋, 宫 平. 盐酸苯达莫司汀[J]. *中国药物化学杂志*, 2009, 19(2): 159.
- [4] Gust G, Krauser R. Investigations on the stability of bendamustine, a cytostatic agent of the nitrogen mustard type, I. synthesis, isolation, and characterization of reference substances[J]. *Monatshefte für Chemie Chemical Monthly*, 1997, 128(3): 291.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录29, 44, 60, 68, 71, 78, 99, 103.

(收稿日期:2011-04-25 修回日期:2011-06-03)

* 硕士研究生。研究方向:药物新剂型与新技术。E-mail: lgl1986@126.com

通讯作者:教授,博士。研究方向:药物新剂型与新技术。电话:0311-86265633。E-mail: caody3@163.com

长春西汀(Vinpocetine, VP)是吡啶类生物碱长春胺的衍生物,脂溶性强,能通过血脑屏障,具有增加脑血流、改善脑代谢和神经功能等作用,临床上广泛用于缺血性脑血管疾病的预防和治疗^[1,2],且证明其长期应用不良反应少、程度轻、耐受性好,具有广阔的应用前景。但该药半衰期短, pKa 为 3.56,水中溶解度极低,绝对生物利用度仅 7%,口服有严重的肝脏首关效应^[3]。为了提高该药的生物利用度和患者的顺应性,笔者以聚乳酸-聚乙醇酸(PLGA)为骨架材料,将长春西汀制成微球注射剂,以达到在体内缓释、长效的目的。本试验采用改良的乳化-溶剂挥发法制备长春西汀 PLGA 缓释微球,通过正交试验确定了最佳制备工艺和最佳处方,并对其药剂学性质进行了研究。

1 仪器与试剂

光学显微镜(广州光学仪器厂);LDZ4-0.8 低速自动平衡微型离心机(北京医用离心机厂);S-3500N 扫描电子显微镜(日本 Hitachi 公司);KYC-100B 型空气恒温摇床(上海福玛实验设备有限公司);透析袋(北京索莱宝科技有限公司,直径:22 mm,截留分子量:3 500)。

长春西汀原料药(辽宁海德制药有限公司,批号:20081001,纯度:99.4%);PLGA(山东岱罡生物科技有限公司,批号:2009090212,质量比:50:50,分子量:10 000);长春西汀 PLGA 缓释微球(自制);其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 处方

长春西汀 80 mg, PLGA 320 mg, 二氯甲烷(油相介质) 2 mL, 分散介质(甘油-1%明胶=6:1) 20 mL, 扩散介质(含 0.4%明胶与 0.27%聚乙烯醇)30 mL。

2.2 微球的制备^[4,5]

在 O/W 乳化-溶剂挥发法的基础上经过改良制备长春西汀 PLGA 缓释微球。即精密称取适量长春西汀和 PLGA 共溶于二氯甲烷中,超声 60 s 使溶解,将此溶液缓缓注入分散介质中,搅拌乳化 15 min,然后以细流状注入扩散介质(约为分散介质体积 1.5 倍)中,继续搅拌 2 h 挥发掉二氯甲烷至微球固化,离心收集微球,用冰水洗涤数次,离心,冷冻干燥即得白色粉末状固体微球。

2.3 正交试验优化处方

为了优化制备工艺,根据预试验考察结果,选取对微球质量影响较显著的 4 个因素作为考察对象,即 PLGA 浓度(A)、理论载药量(B)、有机相(二氯甲烷)与分散介质的比例(C)和分散介质中明胶的浓度(W/V,D),每个因素选定 3 个水平,按 4 因素 3 水平 $L_9(3^4)$ 进行正交设计。以微球的载药量(S_1)、封装率(S_2)、跨距(S_3)作为考察指标,计算综合指数(S), $S = S_1 + S_2 - S_3$,对微球的制备工艺进行综合考察,优化处方。因素水平见表 1、正交试验设计及结果见表 2。

表 1 因素水平表

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(% , W/V)	B(% , W/W)	C(V/V)	D(% , W/V)
1	8	14	1:5	1
2	16	20	1:40	2
3	32	33	1:45	3

表 2 正交试验设计与结果

Tab 2 Design and result of orthogonal experiment

试验号	因素				S_1 /%	S_2 /%	S_3	综合评分 S
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	10.02	80.16	1.22	88.96
2	1	2	2	2	19.06	95.30	1.51	112.85
3	1	3	3	3	9.37	37.48	2.92	43.93
4	2	1	2	3	9.43	75.44	1.75	83.12
5	2	2	3	1	19.52	97.60	1.72	115.4
6	2	3	1	2	18.23	72.92	1.82	89.33
7	3	1	3	2	7.24	57.92	1.89	63.27
8	3	2	1	3	18.51	92.55	1.54	109.51
9	3	3	2	1	18.82	75.28	1.76	92.34
K_1	81.92	78.45	95.93	98.90				
K_2	95.95	112.59	96.10	88.48				
K_3	88.00	75.20	74.20	78.85				
R	14.03	37.39	21.90	20.05				

由表 2 可知,4 种因素对微球制备工艺的影响顺序是: B > C > D > A。各因素取最佳水平,确定微球的最佳处方为 $A_2B_2C_2D_1$,即 PLGA 浓度为 16%,理论载药量为 20%,有机相与分散介质体积比为 1:10,扩散介质中明胶的浓度为 1%。按此制备 3 批微球,观察其形态,并分别测定载药量、封装率、粒径跨距,考察工艺是否稳定,结果见表 3。

表 3 3 批微球的载药量、封装率与粒径跨距结果

Tab 3 Drug-loading amount, encapsulation coefficient and particle size span of 3 batches of microspheres

批号	载药量/%	封装率/%	粒径跨距	综合评分 S
010924	18.41	90.22	1.38	107.25
010925	18.75	91.56	1.36	108.95
010926	18.23	92.13	1.40	108.96
$\bar{x} \pm s$	18.46 ± 0.26	91.30 ± 0.98	1.38 ± 0.02	108.39 ± 0.98

由表 3 可见,优化的制备工艺稳定,重现性良好。

2.4 微球形态和粒径分布测定

取适量冻干的微球,置于载玻片上,滴加蒸馏水 1 滴,用玻璃棒轻轻搅拌,使微球粉末分散均匀,盖上盖玻片,在光学显微镜下观察微球的大小,记录 500 个微球的大小,计算出平均粒径(d_w)、粒径分布和粒径的分散度(Span)。 $d_w = \frac{\sum(nd)}{\sum n} = \frac{(n_1d_1 + n_2d_2 + \dots + n_nd_n)}{(n_1 + n_2 + \dots + n_n)}$,式中, d_1, d_2, \dots, d_n 为微球的粒径, n_1, n_2, \dots, n_n 为具有粒径 d_1, d_2, \dots, d_n 的粒子数。 $Span = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}}$,式中 D_{90}, D_{10}, D_{50} 分别指粒径累积分布图中 10%、50%、90% 处对应的粒径。然后用扫描电子显微镜观察微球的形态及圆整度。

在光学显微镜下可见微球外观圆整,分散性良好,粒径在 10 ~ 15 μm 的微球占总数的 85.6%,平均粒径为 $(10.0 \pm 0.18) \mu\text{m}$,粒径分布图见图 1(n 为在某粒径范围的微球数目)。由电镜可见微球表面圆整、光滑、无粘连,见图 2。

2.5 微球中长春西汀含量的测定

2.5.1 检测波长的选择。取适量长春西汀置于 10 mL 量瓶中,加二氯甲烷-二甲基亚砜(DMSO)-无水乙醇 = 5:57:38 的混合溶剂适量使溶解,然后定容,制成浓度为 $24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,照分光光度法在 200 ~ 400 nm 范围内扫描;同法制备浓度为 $1 000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PLGA 也在此范围内扫描。结果,主药在 276、315 nm 波长处均有最大吸收,而此处辅料没有吸收;但主药在混合

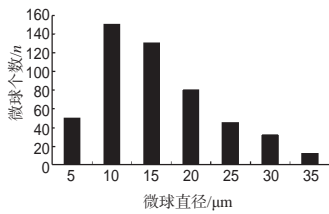


图1 微球的粒径分布图

Fig 1 Histogram for particle size distribution of microspheres

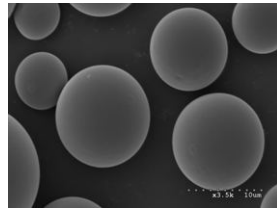


图2 微球的电镜扫描图

Fig 2 Scanning electron micrograph of microspheres

溶剂中时,在271~276 nm波长处吸收有变动,而在次最大吸收峰315 nm波长处很稳定,所以选择315 nm为测定药物含量的波长。扫描结果见图3。

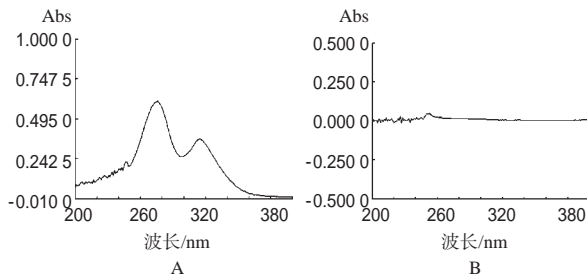


图3 紫外扫描光谱图

A.长春西汀;B.空白微球

Fig 3 UV scanning spectrum

A. vinpocetine; B. blank microspheres

2.5.2 标准曲线的绘制。精密称取在105℃干燥至恒重的长春西汀原料药30.0 mg,置于50 mL量瓶中,用混合溶剂溶解后定容至刻度,摇匀,得600 mg·L⁻¹的标准储备溶液。

分别精密吸取该溶液0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mL置于10 mL量瓶中,用混合溶剂稀释至刻度得系列标准溶液,在315 nm波长处以混合溶剂为空白,测定吸光度(A),与浓度(c, mg·L⁻¹)进行回归。结果,长春西汀检测浓度线性范围为6.0~36.0 mg·L⁻¹,回归方程:A=0.020 4c-0.015 2(r=0.999 9, n=6)。

2.5.3 微球包封率和载药量的测定。精密称取微球10 mg置于10 mL量瓶中,用混合溶剂适量使溶解,然后定容,以混合溶剂为空白,在315 nm波长处测定吸光度,根据标准曲线计算长春西汀的含量。根据下式计算包封率和载药量:载药量=(微球中长春西汀的含量/微球的质量)×100%,包封率=(微球中长春西汀的含量/所投长春西汀的总量)×100%。

2.6 差示扫描量热(DSC)分析

分别称取相同量长春西汀原料药、空白微球、空白微球与长春西汀的物理混合物及载药微球样品适量,依次进行DSC分析,以验证药物是否已包裹于微球中以及药物的分散状态。分析条件如下:30℃保持1 min,扫描范围40~300℃,升温速度10℃·min⁻¹,气氛为高纯氮气。DSC分析结果见图4。

由图4可见,长春西汀原料药在150℃有1个吸热峰,而空白微球在扫描范围内没有吸收峰,物理混合物中可以看到长春西汀的吸收峰,而在载药微球中无长春西汀的特征吸收峰。说明药物是以非结晶形式分散于载体骨架中的,而没有吸附在载体材料表面,即微球已经形成。

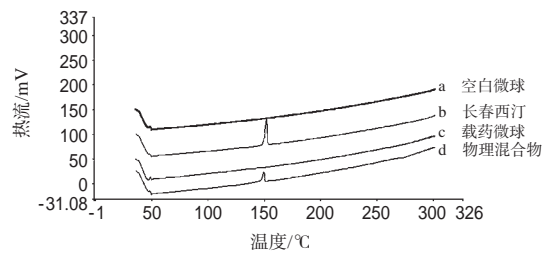


图4 DSC谱图

Fig 4 DSC thermograms

2.7 体外释放

释放介质:(1)含0.02%吐温-20和0.02%吐温-80的pH4.5的醋酸盐缓冲液;(2)含0.02%吐温-20和0.02%吐温-80的30%聚乙二醇(PEG)400生理盐水;(3)含0.02%吐温-20和0.02%吐温-80的0.5%十二烷基硫酸钠(SDS)的pH6.8磷酸盐缓冲液(PBS);(4)含0.02%吐温-20和0.02%吐温-80的pH 4.0的醋酸盐缓冲液。

采用动态透析法测定微球的体外释放特性。精密称取长春西汀原料药20 mg,置于10 mL量瓶中,加甲醇适量溶解后,用甲醇稀释到刻度,取1 mL此溶液(约含长春西汀2 mg)置于透析袋中,再加入4 mL的释放介质封口;再分别称取3份微球10 mg(约含长春西汀2 mg)加入释放介质5 mL,置于透析袋中;将上述装有样品的透析袋置于含有60 mL溶出介质的具塞磨口三角瓶中,在(37±0.5)℃空气恒温摇床中以100 r·min⁻¹速度振荡,分别于0.25、0.5、1、2、4、6、9、12、24、48、96、168、240、360、480、600、720 h定时从袋外释放介质中取样,每次取3 mL,立即补加等量同质同温释放介质。测定所取样品的吸光度,按照标准曲线方程计算释放的药量和累积释药率。长春西汀PLGA缓释微球在37℃不同释放介质中的累积释药曲线见图5。

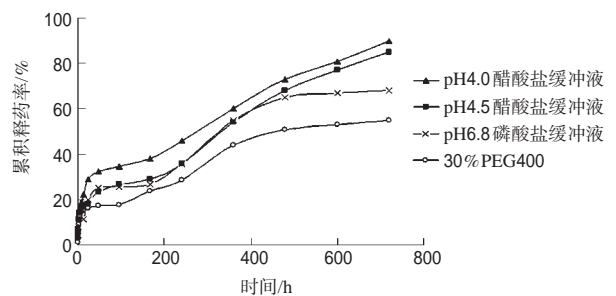


图5 微球在不同释放介质中的释药曲线

Fig 5 Drug release curves of microspheres in different mediums

由图5发现,在30%PEG生理盐水中,微球中的药物释放缓慢,在30 d只释放了55%,释放不完全,这是因为有机溶剂对药物的增溶是有限的。在pH6.8PBS中,微球中的药物释放初期与pH4.5的醋酸盐缓冲液中微球的释放相似,但是在后来的释放中严重迟缓,30 d释放67%,这是因为微球在释放后期,不但药物的溶解度受pH的影响,而且PLGA的降解在酸性条件下较碱性条件下快,高pH环境的释放介质不能很好地使药物从微球中释放出来,从而导致释放不完全。在pH 4.0的醋酸盐缓冲液中,24 h释放29%,这是因为长春西汀的溶解度

在低pH条件下高,从而导致药物的突释增加。在pH4.5的醋酸盐缓冲液中,微球在24 h的累积释药率为18.22%,此后缓慢释放药物,在30 d时微球累积释药率达83.09%以上,说明释药完全,由此选其为释放介质。突释是由吸附在微球表面和包埋较浅的药物分子快速溶解和扩散所导致的,适当的突释可以使药物很快达到血药浓度,然后随着PLGA的缓慢降解和溶胀导致药物缓慢地释放出来,可以使药物在较长的时间内维持有效的血药浓度,达到长时间治疗疾病的目的;而太高的突释,会使人的血药浓度快速增加从而导致中毒的发生。

3批最优处方所制长春西汀PLGA缓释微球在pH4.5的醋酸盐缓冲液中的体外释药曲线见图6。

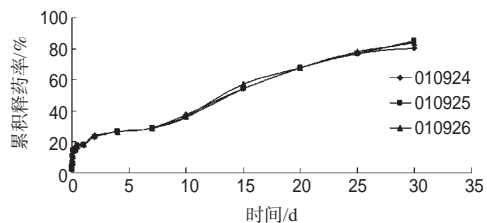


图6 3批长春西汀PLGA缓释微球的体外释药曲线

Fig 6 Drug release curves of 3 batches of Vinpocetine PLGA sustained-release microspheres in vitro

由图6可见,微球在选定的释放介质条件下释放稳定,重复性好。

长春西汀原料药和长春西汀PLGA缓释微球在pH4.5的醋酸盐缓冲液中相同时间的累积释药曲线见图7。

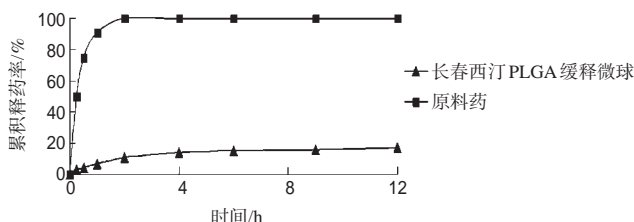


图7 长春西汀原料与PLGA缓释微球的释药曲线比较

Fig 7 Comparison of drug release curves of vinpocetine raw material and PLGA sustained-release microspheres

由图7可见,长春西汀原料药在2 h内累积释药率达99%,可见透析袋对原料的阻滞作用影响较小,在缓释微球的释放过程中可以忽略不计。

3 讨论

O/W乳化-溶剂挥发法是将溶解长春西汀和PLGA的有机溶剂(二氯甲烷),直接缓慢分散到含有乳化剂的水溶液中,形成O/W型微乳,搅拌挥发掉有机溶剂,使微球固化,离心收集微球即得。此种方法制备的微球大小不均匀且粘连严重,这是因为含有主药和辅料的有机溶剂直接分散到含有乳化剂的水溶液中,需要很大的机械外力才能形成均匀的乳剂;并且由于辅料PLGA的分子量低,因此玻璃转化温度低,在挥发掉二氯甲烷的过程中会发生粘连现象。本试验改进技术,采用改良O/W乳化-溶剂挥发法,即将溶解长春西汀和PLGA的有机溶剂(二氯甲烷),先均匀分散到分散介质中形成O/W型微乳,其中1%明胶有乳化剂的作用,使含有药物和辅料的有机溶剂

分散到此分散介质中形成O/W型微乳,而甘油起助悬剂和分散剂的作用,不但可以使形成的微乳分散均匀,而且可以很好地防止微乳聚集粘连;将此分散液再扩散到含有乳化剂的水溶液中,进一步挥发掉有机溶剂,形成微球。本试验方法成功地解决了微球制备过程中的粘连问题,所以此方法为制备低分子量的PLGA缓释微球提供了很好的参考。

在对微球主药进行含量测定时发现主药和PLGA都能很快溶于二氯甲烷中,但二氯甲烷熔点低、挥发性强,易影响测定结果,且毒性大,而PLGA溶解在DMSO中时溶解速度很慢,所以本试验先将载药微球溶解于少量二氯甲烷中再溶解在其他溶剂中。但试验中发现PLGA溶解在二氯甲烷中后,加无水乙醇会有析出,溶液成乳状液,不利于紫外分析;溶解在DMSO中虽然没有PLGA析出,但是DMSO有大蒜臭味,非常浓烈,且DMSO的凝固点为18℃,室温低时很容易凝固成固体,不利于测定。因此进行紫外分析时,选用不同比例的无水乙醇和DMSO的溶液可达到很好的溶解药物和PLGA的目的,又避免了DMSO的浓烈的臭味和低的凝固点。通过一系列筛选最终确定DMSO与无水乙醇的最佳比例,从而为脂溶性药物微球的测定提供了很好的方法,可以推广使用。

由于长春西汀的溶解度具有pH依赖性,随着水相pH的降低其溶解度增加,前期试验发现其在pH1.0的介质中溶解度是水中溶解度的300倍。而注射剂的pH要求与血液相等或接近,血液pH7.4,注射剂pH值一般控制在4~9的范围内,所以选择含0.02%吐温-20和0.02%吐温-80的pH4.5的醋酸盐缓冲液为释放介质,其中吐温-20为润湿剂,吐温-80为微球聚集抑制剂。在整个试验过程中所采用的方法和剂量均满足漏槽条件。

由释放结果可见,本试验所制长春西汀PLGA缓释微球可达到缓释长效的目的。但为了能够应用于临床,还需对微球作进一步的药动学研究。

参考文献

- [1] 蒋金富.长春西汀临床应用研究进展[J].甘肃科技,2010,26(1):173.
- [2] Feher G, Koltai K, Kesmarky G, et al. Effect of parenteral or oral vinpocetine on the hemorheological parameters of patients with chronic cerebrovascular diseases[J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(2-3):111.
- [3] Szakacs T, Veres Z, Vereczkey L. In vitro-in vivo correlation of the pharmacokinetics of vinpocetine[J]. *Pharmacol*, 2001, 53(6):623.
- [4] Wischke C, Schwendeman SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles[J]. *Int J Pharm*, 2008, 364(2):298.
- [5] 肖莉,张韵慧,崔颖,等.尼莫地平聚乳酸缓释微球的制备及药剂学性质[J].中国医院药学杂志,2008,28(3):194.

(收稿日期:2011-04-06 修回日期:2011-05-05)