技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)12-1696-03

硫酸长春新碱 PLGA 微囊的制备及体外释放性质研究

凌 旭[1],张良珂[1],李 攀[2],王海鸥[1],冉海涛[2]

(1.重庆医科大学生命科学研究院,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第二医院超声影像学研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:制备硫酸长春新碱乳酸 - 乙醇酸共聚物[Poly(lactide-co-glycolide),PLGA]微囊并考察其体外释放。方法:采用 W/O/W 复乳 - 溶剂挥干法制备硫酸长春新碱 PLGA 微囊,考察了内、外水相 pH 值,PLGA,Span 80,NaCl 浓度和 CH_2Cl_2 挥干方法对微囊包封率的影响,并对其形态、粒径分布和体外释放性质进行了研究。结果:制得的硫酸长春新碱 PLGA 微囊为球形,表面光滑,平均粒径约为 643.1 nm,平均包封率为 39.5%。结论:采用复乳 - 溶剂挥干法成功制备硫酸长春新碱 PLGA 微囊,体外释放表明具有其缓释作用。

【关键词】长春新碱;PLGA;微囊;缓释

【中国图书分类法分类号】R943 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-25

Preparation and in vitro release characteristics of vincristine sulfate-loaded PLGA microcapsules

LING Xu, et al

(*Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To prepare VCR-loaded PLGA microcapsules and study its release characteristics in vitro. *Methods*: A water-in-oil-in-water double-emulsion/solvent evaporation method was used to prepare VCR-loaded PLGA microcapsules. Some factors affecting entrapment rate of microcapsules, such as pH value of internal and external aqueous phase, PLGA concentration, Span 80 content, NaCl concentration and evaporating way of CH_2Cl_2, were investigated. In addition, its shape, size distribution and in vitro release properties were studied. *Results*: Acquired VCR-loaded PLGA microcapsules were spherical and its surface was smooth, the average size of microcapsules were 643.1 nm, and the average entrapment rate was about 39.5%. *Conclusion*: VCR-loaded PLGA microcapsules were successfully produced according to double-emulsion/solvent evaporation method, and prepared PLGA microcapsules are provided with the role of sustained-release.

【Key words】Vincristine; PLGA; Microcapsules; Sustained-release.

长春新碱(Vincristine,VCR)提取自夹竹桃科植物长春花的生物碱,是细胞毒类抗肿瘤药物。其作用机制为结合微管蛋白,抑制微管蛋白的聚合,影响微管的装配及纺锤丝的形成,广泛用于神经细胞瘤、脑瘤、肺癌等实体瘤的治疗。由于其具有明显的剂量限制性神经毒性,全身给药常引起不可接受的毒副反应,大大限制了其临床应用[1]。本实验制备了硫酸长春新碱 PLGA 微囊(Vincristine-loaded PLGA microcapsules,VCR-PLGA-MC),有望实现肿瘤组织局部的高浓度持续给药,为进一步临床研究奠定基础。

作者介绍:凌 旭(1983-),男,硕士,研究方向:药物新型给药系统研究。

通讯作者:张良珂,男,副教授,E-mail:zlkdyx@126.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30770565);重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:CSTC,2008BB5397);重庆医科大学校级课题(编号:NSFYY200728;XBYB2007098)。

1 材料与方法

1.1 仪器

分析天平(Sartorius A 200 s,德国),超声波细胞破碎仪(CV 33,Sonics,USA),扫描电子显微镜(S-3 000 N,日本日立公司),台式恒温水浴振荡器(SHZ-88,江苏太仓市试验设备厂),旋转蒸发器(RE-52 AA,上海亚荣生化仪器厂),恒温磁力搅拌器(85-2 型,上海青浦沪西仪器厂),激光粒径分析仪(Zetasizer Nano ZS 90,英国马尔文公司)。

1.2 试剂

PLGA(LA/GA = 50:50,MW = 40 kD,山东医疗器械研究所),VCR(纯度 98.9%,批号 021001,广州环叶制药有限公司),聚乙烯醇(Poly vinylalcohol,PVA,日本可乐丽公司),司盘 80(Span 80,上海申宇医药化工有限公司),透析袋(MW-CO 6 ~ 8 kDa,Fluca,瑞士),其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 VCR-PLGA-MC 的制备

采用复乳 - 溶剂挥干法制备微囊[2]。精密称取 1.0 mg VCR,取适量的 PBS(0.1 mol/L,pH 4.0)溶解后作为内水相,将适量 PLGA 和 Span 80 溶于 1.0 ml 二氯甲烷中形成油相,然后把油相加入内水相中,探头超声(1 000 J)乳化 10 s,得初乳;再将初乳加入 PVA 水溶液中,超声乳化 10 s 形成复乳。挥干二氯甲烷,离心 10 min(3 000 r/min),弃去上清液,蒸馏水洗涤,重复 3 次,得 VCR-PLGA-MC。

2.2 VCR-PLGA-MC 包封率的测定

2.2.1 测定 VCR-PLGA-MC 包封率的方法考察 采用紫外分光光度法测定包封率。使用二氯甲烷和甲醇混合溶剂(3:1,v/v)溶解微囊,测定 VCR-PLGA-MC 中包裹的 VCR 含量。经紫外扫描,确定 VCR 的最大吸收波长为 296 nm,相关辅料和溶剂在此波长处基本无吸收。

2.2.2 VCR 标准曲线 采用二氯甲烷和甲醇混合溶剂(3:1,v/v)配制 40 μg/ml VCR,分别取 1.0,2.0,3.0,5.0,10.0 ml 于容量瓶中,混和溶剂定容,于 296 nm 下测定吸光度 A 值。以浓度 C 对吸光度 A 进行线性回归,得标准曲线方程Ⅰ:A = 0.012 1 C-0.002 5,r = 0.999 8。

2.2.3 VCR-PLGA-MC 包封率的测定 将 VCR-PLGA-MC 离心 30 min,弃去上清液,沉降下来的微囊用蒸馏水洗涤,离心,重复 3 次。加入混和溶剂溶解,于 296 nm 测定 A 值,代入标准曲线方程Ⅰ,按下述公式计算包封率。

包封率=PLGA 载带的 VCR 重量/微囊中总药物量×100%

2.4 VCR-PLGA-MC 包封率的优化

2.4.1 Span80 用量的考察 分别采用不同 Span80 用量:0.5%、1%、2%、5%制备 VCR-PLGA-MC。由图 1 可见,包封率随 Span 80 的用量增加而增加。当 Span 80 用量增加到 1% 后,再增加其用量,包封率增加不明显,故选择 Span 80 的用量为 1%。

2.4.2 PLGA 浓度的考察 PLGA 浓度直接影响 VCR-PLGA-MC 包封率,本实验采用 4 种不同 PLGA 浓度,分别为 4%、5%、6%、7%,制备 VCR-PLGA-MC。由图 2 可见,包封率随 PLGA 的浓度增加而增加。当 PLGA 浓度增加到 5%后,再增加其用量,包封率变化不明显,故选择 PLGA 的用量为 5%。

2.4.3 内水相 pH 值的考察 分别配制 pH 3.0、pH 4.0、pH 5.0、pH 6.0 的 PBS 缓冲液作为内水相制备微囊。由图 3 可见,内水相 pH 值对包封率的影响明显,当内水相 pH 为 4.0 时,包封率最大,故选择内水相 pH 值为 4.0。

2.4.4 外水相 pH 值的考察 外水相 pH 值对 VCR-PLGA-MC 包封率有一定影响,本实验分别以外水相 pH 7.0、pH 8.0、pH 9.0、pH 10.0、pH 11.0 制备微囊。由图 4 可见,pH 8.0 时包封率最高,可能是 pH 8.0 时 VCR 主要以分子型存在,在外水相中的溶解度较低,更多地被包封在微囊内。

2.4.5 NaCl 浓度的考察 外水相 NaCl 浓度直接影响 VCR-PLGA-MC 包封率,本实验分别采用 5 种 NaCl 浓度 0、100、200、300、600 mmol/L 制备微囊。由图 5 可见,随着外水相 NaCl 浓度增加,包封率呈上升趋势,但当 NaCl 浓度从 300 mmol/L 增加到 600 mmol/L 时,其包封率增加不明显。原因可能是随着 NaCl 浓度增加,外水相溶液渗透压增加,复乳形成微囊时 VCR 向外水相扩散减少所致,故选择外水相 NaCl 浓度为 300 mmol/L。

2.4.6 CH_2Cl_2 挥干方法的考察 在制备 VCR-PLGA-MC 过程中,CH_2Cl_2 的挥干速度对包封率有一定的影响。本实验考察了 3 种在不同温度和条件下挥干 CH_2Cl_2 的方法,分别是:25 ℃室温磁力搅拌(强度:第二档)、25 ℃和 37 ℃旋转蒸发(真空度:0.09 MPa,转速:25 ~ 35 r/min)挥干 CH_2Cl_2。由表 1 可见,旋转蒸发挥干 CH_2Cl_2 能明显提高包封率,故选 37 ℃下旋转蒸发挥干 CH_2Cl_2。

2.4.7 确定的最佳优化工艺 通过单因素考察,优化 Span 80 的用量,PLGA 浓度,内、外水相 pH 值,NaCl 浓度和 CH_2Cl_2 挥干方式,获得制备微囊的最佳工艺,分别是:1% Span 80,5% PLGA,pH 4.0 内水相,pH 8.0 外水相,300 mmol/L NaCl 和 37 ℃减压旋转蒸发挥干 CH_2Cl_2。

2.5 VCR-PLGA-MC 的形态和粒径分析

取 VCR-PLGA-MC,在 3 000 × 扫描电子显微镜下观察形态,并采用激光粒径分析仪进行粒径分析。由图 6 可见,VCR-PLGA-MC 形态为球形或类球形,表面光滑,无明显黏连,粒径分布均匀。由图 7 可见,所得 VCR-PLGA-MC 的平均粒径为 643.1 nm,粒度分布基本呈正态分布。

2.6 VCR-PLGA-MC 体外释放实验

2.6.1 VCR 在 PBS (pH 7.4) 下的标准曲线 配制 20 μg/ml VCR PBS(pH 7.4)溶液,分别取 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 ml 于容量瓶中,PBS 定容,于 296 nm 处测吸光度 A 值。以浓度对吸光度 A 进行线性回归,得标准曲线方程Ⅱ:A = 0.015 7 C—0.000 7,r = 0.999 7 。

2.6.2 体外释放实验 取适量微囊放置透析袋中,将其放入装有 10.0 ml PBS(pH 7.4)的具塞瓶中。恒温 37℃ ± 0.5℃水浴振荡(70 ± 5) r/min,在预定的时间里取样 5.0 ml,过滤后测定吸光度 A 值,代入标准曲线方程Ⅱ计算累积释放率,同时补充等量 PBS。

由图 8 可以看出,VCR-PLGA-MC 释放无明显突释现象,随着时间的增加,累积释放率缓慢增加,能达到持续缓慢释药的目的。

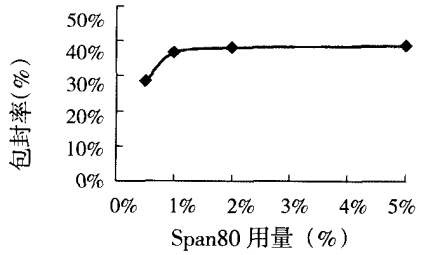


图 1 Span 80 用量对包封率的影响

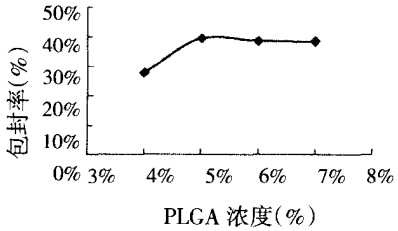


图 2 PLGA 用量对包封率的影响

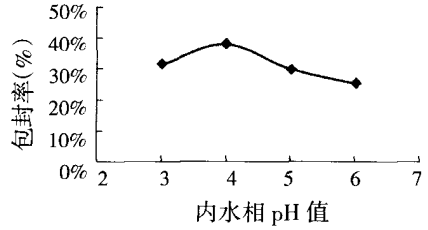


图 3 内水相 pH 值对包封率的影响

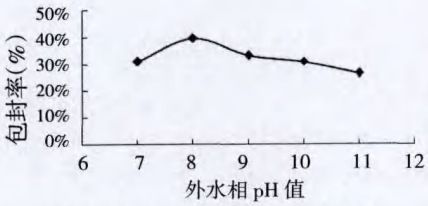


图 4 外水相 pH 值对包封率的影响

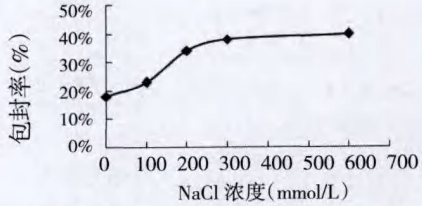


图 5 外水相氯化钠浓度对包封率的影响

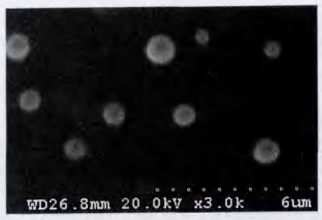


图 6 VCR-PLGA-MC 3 000×扫描电子显微镜照片

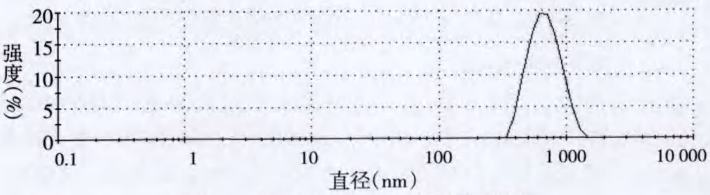


图 7 VCR-PLGA-MC 粒径分布图

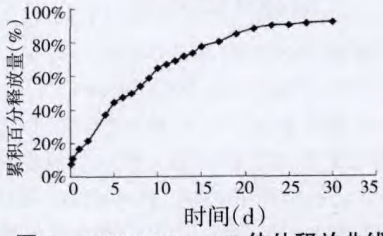


图 8 VCR-PLGA-MC 体外释放曲线

表 1 不同条件下挥干 CH_2Cl_2 对包封率的影响

CH_2Cl_2 挥干方法	温度(℃)	包封率(%)
磁力搅拌	25	16.3
减压旋转蒸发	25	26.5
减压旋转蒸发	37	36.7

3 讨 论

采用生物可降解材料载带抗肿瘤药物的缓控释微囊制剂已有许多研究，其中使用较广泛、研究较多的是聚酯材料如 PLGA，这类材料的优点在于降解产物无毒，生物相容性较好，分子结构中无肽链，无免疫原性。目前包裹过的化疗药物包括 5-氟尿嘧啶、布洛芬等[3,4]，本实验采用复乳-溶剂挥干法制备了 VCR-PLGA-MC。

本实验测定了 VCR 在油相(CH_2Cl_2)和不同 pH 值水相中的油/水分配系数，结果表明 pH 值较高时，VCR 主要以分子形式存在，在水相中溶解度较小；而 pH 值较小时，VCR 主要以离子形式存在，可较多地分配在水相中，故本实验在制备初乳时，为了提高包封率，使 VCR 更多地分布在内水相，内水相 pH 值应选较小为宜。Vendrig D[5]的研究结果表明，80 ℃时，VCR 在 pH 4~5 内最稳定。综合本实验对不同 pH 值内水相考察结果，内水相 pH 为 4.0 较合适。

为了提高包封率，曾尝试采用液体石蜡作为外水相，制备成 W/O/O 型微球，但结果表明采用液体石蜡作为外水相，复乳形成比较困难，且微囊数量少、粒径大，有明显油水分层，黏连现象比较多。故本实验未采取液体石蜡作为外水相。

本实验在制备 VCR-PLGA-MC 时，CH_2Cl_2 挥干速率对包封率影响较大，旋转蒸发下快速挥干 CH_2Cl_2 能获得较高的包封率，原因可能是 CH_2Cl_2 快速转移，VCR 向外水相扩散的趋势减小，从而更多地被包埋在 PLGA 微囊中。

综上所述，本研究采用 W/O/W 复乳溶剂挥干法成功制备了 VCR-PLGA-MC，通过优化 Span 80 的用量，PLGA 浓度，内、外水相 pH 值，NaCl 浓度和 CH_2Cl_2 挥干方式，获得了包封率为 39.5%的 VCR-PLGA-MC，并考察了 VCR-PLGA-MC 体外释放实验，结果显示无明显突释现象，能达到持续释药的目的，为其临床应用奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Gidding C, Kellie S, Kamps W, et al. Vincristine revisited[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1999, 29 (3): 267-287.

[2] Dillen K, Vandervoort J, Mooter G V, et al. Evaluation of ciprofloxacin-loaded eudragit RS100 or RL100/PLGA nanoparticles[J]. Intern J Pharm, 2006, 314(1): 72-82.

[3] Asuman B, Ongun M S. Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorical design-based studies[J]. Ⅱ Farmaco, 2005, 60(10): 840-860.

[4] Fernandez-Carballido A, Herrero-Vanrell R, Molina-Martinez I T, et al. Biodegradable ibuprofen-loaded PLGA microspheres for intraarti cular administration effect of labrafil addition on release in vitro [J]. Intern J Pharm, 2004, 279(1-2): 33-41.

[5] Vendrig D, Beijnen J H, Van D H O, et al. Degradation kinetics of vincristine sulphate and vindesine sulphate in aqueous solutions [J]. Intern J Pharm, 1989, 50(2): 189-196.

(责任编辑：关蕴良)