

硫酸长春新碱 PLGA 微球的制备及其性质

陈红丽, 陈 汉, 李学敏, 袁 平, 张其清

中国医学科学院 北京协和医学院 生物医学工程研究所天津市生物医学材料重点实验室, 天津 300192

通信作者: 张其清 电话: 022-87890868, 电子邮件: zhangqiq@xmu.edu.cn

摘要:目的 采用 W/O/O 溶剂挥发法制备硫酸长春新碱 PLGA 微球, 评估添加剂碳酸锌对微球形态及药物释放速率的影响。方法 测定硫酸长春新碱在 4 种不同 pH 条件下的降解规律, 选定适合药物体外释放最适宜介质条件。在微球制备过程中添加 2 种不同量 (w/w 5%、10%) 的碳酸锌, 对其和不添加碳酸锌的硫酸长春新碱 PLGA 微球进行表征及体外释放测定。结果 碳酸锌可明显增加微球中药物的稳定性, 36 d 的体外释放测定结果显示, 添加碳酸锌的微球累积释药量都达到 70% 以上, 而未添加碳酸锌的微球释药量仅为 (54.2 ± 1.1)%。添加 10% 碳酸锌对提高微球药物稳定性的作用优于 5% 碳酸锌。结论 添加碳酸锌对于制备硫酸长春新碱 PLGA 微球是必要的, 能改善药物在 PLGA 微球内部酸性微环境中的稳定性, 明显减少其药物降解量。

关键词: 硫酸长春新碱; 微球; 碳酸锌; 稳定性

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2007)03-0342-05

Preparation and Characterization of Vincristine Sulfate-loaded PLGA Microspheres

CHEN Hong-li, CHEN Han, LI Xue-min, YUAN Ping, ZHANG Qi-qing

Tianjin Biomedical Material Key Laboratory, Institute of Biomedical Engineering, CAMS and PUMC, Tianjin 300192, China

Corresponding author: ZHANG Qi-qing Tel: 022-87890868, E-mail: zhangqiq@xmu.edu.cn

ABSTRACT: Objective To prepare the vincristine sulfate (VCR) microspheres by W/O/O solvent evaporation method and evaluate the effect of zinc carbonate ($ZnCO_3$) on the morphology and release kinetics of the microspheres. **Methods** Degradation kinetic of VCR was tested in PBS of four different pH values at 37°C to select the optimal incubation medium for *in vitro* release. Microspheres were made with or without $ZnCO_3$ (w/w 5% and 10%) in the polymeric phase. The properties and *in vitro* release profiles of the microspheres were examined. **Results** $ZnCO_3$ increased the stability of VCR in the PLGA microspheres. During the 36 days of *in vitro* release, the accumulative release of VCR from the microspheres reached >70% when added with $ZnCO_3$, and was (54.2 ± 1.1)% when no $ZnCO_3$ was added. 10% $ZnCO_3$ showed superior effect than 5% $ZnCO_3$ in the stabilization of microspheres. **Conclusions** Adding $ZnCO_3$ is essential during the preparation of PLGA microspheres. It can remarkably improve the stability of drugs in the acid microenvironment inside PLGA microspheres and decrease the VCR degradation during incubation.

Key words: vincristine sulfate; microspheres; zinc carbonate; stability

Acta Acad Med Sin, 2007, 29(3): 342-346

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目 (863 项目) (2002AA326040) 和国家杰出青年科学基金 (59625306) Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2002AA326040) and National Nature Science Funds for Distinguished Young Scholar (59625306)

近年来,以可降解生物材料为囊材制备载药微球的研究和应用越来越广泛,其中又以合成高分子材料具有质量稳定、降解速度可调节等突出优点而受到重视。目前被大量用于微球控释系统的合成高分子材料主要有乳酸-羟基乙醇酸共聚物(PLGA)和聚乳酸(PLA)等,且已有一些采用 PLGA 的控缓释微球制剂,如 Lupron Depot 上市。但是 PLGA 微球中存在着低 pH 的酸性微环境^[1,2],因此以 PLGA 为囊材包载一些酸性条件不稳定的药物就成为难点。

长春新碱是提取自夹竹桃科植物长春花的生物碱,常用其硫酸盐——硫酸长春新碱(vincristine sulfate, VCR),是应用广泛的一种细胞毒类抗肿瘤药物,曾用于包括神经细胞瘤、脑瘤、肺癌、恶性黑色素瘤和艾滋病相关 Kaposi 肉瘤等在内的实体瘤和血液肿瘤的治疗。有研究证实,增加 VCR 在肿瘤组织的浓度和延长给药时间可明显改善药物的抗肿瘤效果^[3]。由于其具有明显的剂量限制性神经毒性,全身给药常在癌症患者引起不可接受的毒性副反应,大大限制了其在临床上的应用^[4]。VCR 是一种化学性质不稳定的药物,其在水溶液和有机溶剂中都易降解,这也是冻干粉针剂是其目前唯一剂型的重要原因之一,尤以其降解动力学受 pH 变化影响最大^[5]。一些弱碱盐,如碳酸锌、氢氧化镁、碳酸镁和碳酸钙等可以不同程度的克服 PLGA 微球内酸性微环境的影响,提高对 pH 值敏感药物的稳定性。其中以碳酸锌碱性适中,能起平缓改善 PLGA 微球内酸性的作用,因此应用较多^[6]。本研究试图通过把 VCR 制备成缓释微球制剂,实现肿瘤组织局部的高浓度持续给药,从而达到提高抗肿瘤效果的目的。同时探索通过添加弱碱盐碳酸锌克服微球微环境的不利影响,以期提高 PLGA 微球中 VCR 的稳定性。

材料和方法

试剂 VCR(纯度>98%,上海康爱生物制品有限公司), PLGA(MW50,000-80,000,50:50,中国科学院成都有机化学研究所),碱式碳酸锌(Fluka),乙腈、二氯甲烷、石油醚、甲醇等试剂均为分析纯或色谱纯级。

仪器 F6/10 乳匀机(Fluka),搅拌机(IKA,德国),十万分之一天平(Precisa 瑞士),高效液相色谱仪(Gilson,法国),空气浴振荡器(HZQ-C,哈尔滨东联电子厂),扫描电镜(PHILIPS XL-30

ESEM,荷兰),激光粒度分析仪(Malvern S long bed,英国)。

微球制备 将 200 mg PLGA 溶于 4 ml 乙腈:二氯甲烷(1:1)混合溶剂中,同时加入一定比例的碱式碳酸锌,振荡分散,然后加入 500 μ l VCR 水溶液,高速乳匀形成 W/O 型初乳,迅速将初乳转入搅拌的含司班 80 的液体石蜡中,200 r/min 持续搅拌 4 h,固化微球,加入石油醚和少量无水乙醚继续搅拌 15 min 萃取残留有机溶剂,然后抽滤收集微球,真空干燥器中干燥 48 h 后待检。

原料药在不同 pH 条件下的降解试验 为了选定用作体外释放的最佳介质,把相同浓度的药物置于 4 种不同 pH 的磷酸盐缓冲液中(pH 2.0、4.8、6.8 和 7.4),于空气浴振荡器中(37 \pm 1) $^{\circ}$ C、(75 \pm 1) r/min 振荡,每种 pH 值条件分别做 4 组平行,在一定时间间隔取样并用高效液相法测定药物含量,共取样 6 次。计算出不同 pH 条件下药物降解半衰期。

微球表面形态及其粒径分析 将干燥后的微球置于金属片上,真空喷金处理后,用扫描电镜考察微球形态及表面特征。微球分散在纯水中经超声处理后激光粒度分析仪检测微球平均粒径及粒径分布。

包封率和载药量的测定 精密称取 15 mg 微球,加入 1 ml 二氯甲烷,待 PLGA 充分溶解后,用高效液相流动相萃取药物,萃取过程中通入 N_2 ,使二氯甲烷完全挥发,定容后过滤处理,萃取液经 HPLC 分析。包封率 = (微球药物含量/投药量) \times 100%; 载药量 = (微球药物含量/微球质量) \times 100%。

体外释放实验 精密称取 15 mg 微球包于透析袋后投入小三角瓶中,释放介质为 8 ml 磷酸盐缓冲液溶液(pH 4.8,含 0.02% 叠氮钠),于空气浴振荡器中(37 \pm 1) $^{\circ}$ C、(75 \pm 1) r/min 振荡,每种微球释放同时做 4 组平行样。于固定时间间隔取 0.5 ml 样并补加等量新鲜 PBS。

高效液相定量分析药物 采用高效液相色谱法测定药物,LabAlliance 紫外检测器,YMC 反相色谱柱(C18,4.6 \times 150 mm,0.5 μ m),流动相(甲醇:磷酸盐溶液 v/v = 60:40,pH 7.0),1 ml/min,柱温 40 $^{\circ}$ C,紫外检测波长 296 nm,样品均经 0.22 μ m 滤膜过滤。

统计学处理 实验数据以均数 \pm 标准差表示,样本均数间比较采用 *t* 检验,3 种微球的释放采用方差分析,以 *P* < 0.05 表示差异有显著性。

结 果

不同 pH 值对 VCR 降解的影响 VCR 在不同 pH 值 PBS 中的降解速度及其降解产物有明显差异。第 6 天取样的 HPLC 检测结果显示, 在 pH 4.8、2.0 和 7.4 的 PBS 中 VCR 已分别减少到 $(98.2 \pm 0.7)\%$ 、 $(7.4 \pm 1.3)\%$ 和 $(69.1 \pm 1.1)\%$, 每个色谱图上 VCR 峰面积

都不同程度减小, 而且出现了降解产物的峰。在 pH 7.4 的溶液中, VCR 峰之前出现 2 个小的降解产物峰 (峰 3 和峰 4); 在 pH 2.0 溶液中, 谱图上其 VCR 降解产物峰 (峰 2) 面积大于 VCR 峰, 也即大部分药物已降解 (图 1)。每一组样品的药物降解速率按准一级反应拟合得出 VCR 在 pH 2.0、4.8、6.8 和 7.4 条件下降解 50% 分别需要 2.1、83.0、25.6 和 7.7 d (图 2)。4 种 pH 介质的降解速率间差异有显著性 ($P=0.0189$)。

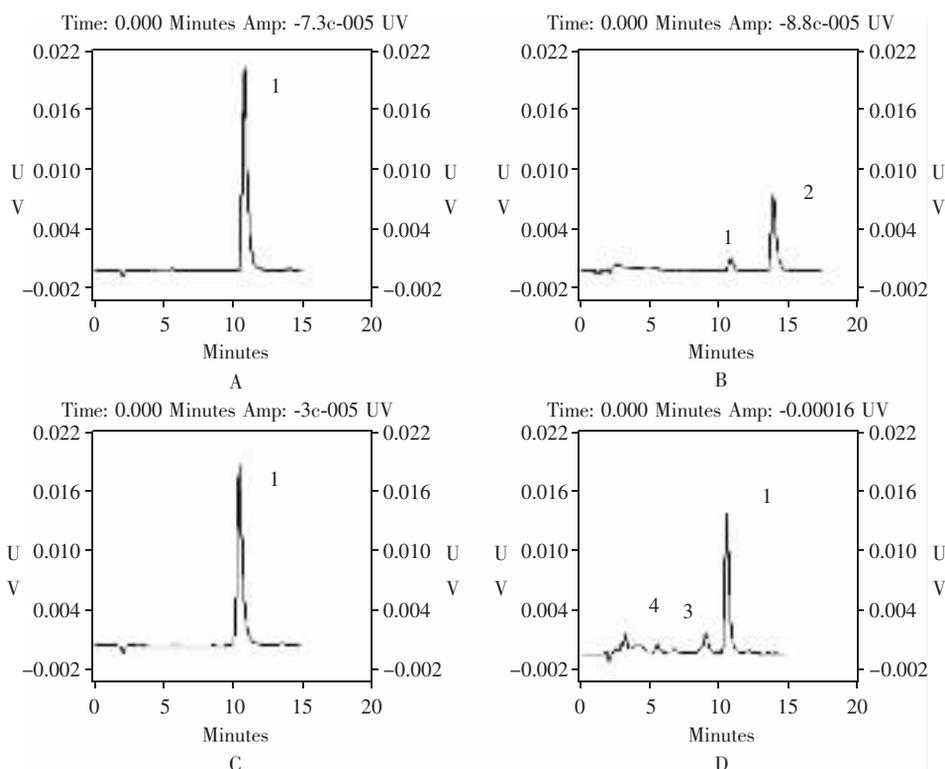


图 1 VCR 及其降解产物的高效液相色谱

Fig 1 HPLC chromatograms of VCR and its degradation products

A. pH 4.8, $t=0d$; B. pH 2.0, $t=6d$; C. pH 4.8, $t=6d$; D. pH 7.4, $t=6d$

峰 1 为 VCR, 峰 2、3、4 为 VCR 的降解产物

Peak 1 is VCR, peak 2, 3, and 4 are the degradation products

微球形态学及粒径分析 扫描电镜下可见微球呈圆整球形, 表面光滑, 无黏连; 添加碳酸锌的微球表面附着少量颗粒 (图 3)。粒径分析结果显示, 未添加碳酸锌、添加 5% 和 10% 碳酸锌微球的平均粒径分别为 (28.39 ± 0.81) 、 (28.12 ± 0.66) 和 (27.97 ± 0.90) μm , 3 组间差异无显著性 ($P>0.05$); 其粒径分布也较均匀, 90% 粒径范围分别为 $(15.78 \pm 2.69) \sim (64.73 \pm 4.24)$ μm 、 $(11.21 \pm 1.47) \sim (58.04 \pm 2.75)$ μm 和 $(5.12 \pm 2.07) \sim (51.46 \pm 3.23)$ μm 。

微球载药量及包封率 未添加碳酸锌、添加 5% 和 10% 碳酸锌微球的包封率分别为 $(79.0 \pm 1.0)\%$ 、

$(74.4 \pm 1.4)\%$ 和 $(76.6 \pm 1.0)\%$; 载药量分别为 $(3.4 \pm 0.2)\%$ 、 $(3.1 \pm 0.2)\%$ 和 $(3.0 \pm 0.1)\%$; 3 组间的包封率和载药量差异均无显著性 ($P>0.05$)。

微球的体外释放 添加不同量碳酸锌的微球释放曲线表现为 3 相释放, 起始为突释, 最初 24 h 内添加 5% 和 10% 碳酸锌的两种微球释放量分别为 $(26.2 \pm 1.0)\%$ 和 $(28.2 \pm 0.8)\%$, 随后释药速率变慢, 到第 3 周时总释药量分别达 $(58.7 \pm 1.3)\%$ 和 $(60.8 \pm 1.2)\%$, 第 36 天总释药量分别为 $(76.1 \pm 1.0)\%$ 和 $(83.8 \pm 1.0)\%$; 不添加碳酸锌的微球体外释放曲线则表现为两相释放, 起始为突释, 最初

24 h 释放量为 $(24.3 \pm 1.7)\%$ ，此后释放速率逐渐减慢，第 21 天释放量为 $(47.6 \pm 1.0)\%$ ，第 36 天释放量为 $(54.2 \pm 1.1)\%$ ；3 种微球的释放量差异有显著性 ($P=0.0214$) (图 4)。

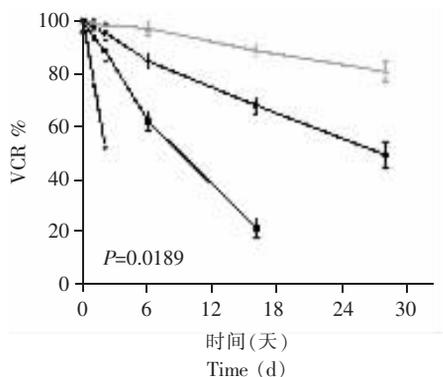


图 2 硫酸长春新碱在不同 pH 值环境中降解曲线 ($n=3$)

Fig 2 Degradation profile of vincristine sulfate in different phosphate buffer of pH value

▲—▲ : pH 4.8 PBS ; ●—● : pH 6.8 PBS ;
■—■ : pH 7.4 PBS ; ▼—▼ : pH 2.0 PBS

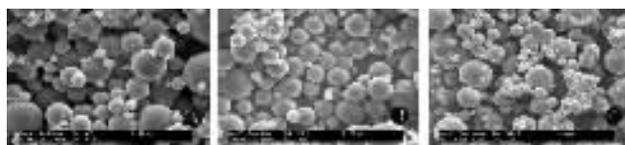


图 3 硫酸长春新碱的扫描电镜图 ($\times 1000$)

Fig 3 SEM images of PLGA microspheres ($\times 1000$)

A. VCR 微球 ; B. 含 5% $ZnCO_3$ 的 VCR 微球 ; C. 含 10% $ZnCO_3$ 的 VCR 微球

A. VCR microspheres ; B. VCR microspheres co-encapsulated with 5% $ZnCO_3$; C. VCR microspheres co-encapsulated with 10% $ZnCO_3$

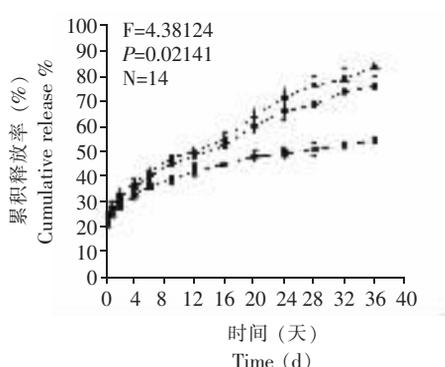


图 4 VCR 微球的体外释放曲线

Fig 4 *In vitro* release curves of VCR microspheres

■—■ : VCR 微球 ; ●—● : 含 5% $ZnCO_3$ 的 VCR 微球 ;
▲—▲ : 含 10% $ZnCO_3$ 的 VCR 微球
■—■ : VCR microspheres ; ●—● : VCR microspheres co-encapsulated with 5% $ZnCO_3$; ▲—▲ : VCR microspheres co-encapsulated with 10% $ZnCO_3$

讨 论

采用可降解生物材料制备抗癌药物的控缓释微球制剂已有许多研究，其中使用较广泛、研究较多的是聚酯材料如 PLA 和 PLGA，目前包裹过的化疗药物包括氟尿嘧啶、顺铂、多柔比星和丝裂霉素喜树碱等^[7~10]。本研究制备的 VCR 长效缓释微球主要用于治疗肾母细胞瘤、脑胶质瘤及艾滋病相关 Kaposi's 肉瘤等。

本研究采用 W/O/O 乳化溶剂蒸发法制备了水溶性药物 VCR 的 PLGA 微球，选用混合溶剂乙腈和二氯甲烷 (1:1) 作为分散相。由于 VCR 是易溶于水的药物，为了获得较高的包封率，所以采用 W/O/O 法及液体石蜡作为连续相。而选用石蜡作为连续相，则必需选择与其不混溶的有机溶剂作为分散相，单独使用乙腈不能确保在微球形成过程中获得稳定的乳滴，同时加入二氯甲烷则有助于形成稳定的乳滴^[11]。

VCR 在水溶液和有机溶剂中都容易降解，尤其以 pH 对其降解动力学的影响最大^[3]。Vendrig 等^[5]研究发现，VCR 在 80℃ 条件下 pH 4.8 左右最稳定，而且 VCR 在不同 pH 条件下的色谱行为具有较为明显的特征。为了研究 VCR 在 37℃ 条件下的体外稳定性以及选定最适于测定 VCR 微球的体外释放介质，本研究测定了 VCR 在 4 个不同 pH 值，即 2.0、4.8、6.8 和 7.4 PBS 条件下 VCR 的降解规律，结果发现 VCR 在 pH 4.8 的 PBS 中最稳定，半衰期长达 83 d，与 Vendrig 等^[5]的结论一致。因此，在本研究中选择 pH 4.8 的 PBS 作为微球的体外释放介质。

本研究制备的 3 种微球从表面形态来看，不添加碳酸锌的微球表面光滑规则，而添加碳酸锌的微球表面可见一些颗粒状附着物，并且随着加入量的增加，表面附着物也相应增多，推测为碳酸锌。因为碳酸锌不溶于有机溶剂，所以在微球中是以一种小颗粒状散布于微球内部和表面。粒径分析结果显示，3 种微球的平均粒径和粒径分布接近，差异无显著性。

有证据表明，PLGA 微球中存在着酸性微环境，pH 值可低至 3 以下^[12]，这无疑对于包裹其中的 VCR 原料药的稳定性产生影响。微球中酸性微环境的主要形成机理是 PLGA 水解过程中酸性产物的聚集，因此微球中药物的降解主要是发生在释放过程

中。喜树碱在 $\text{pH} < 5$ 的酸性条件下稳定, 包囊在 PLGA 微球中检测其体外释放量, 酸性微环境的喜树碱聚集失活量明显少于添加了碱式盐的微球, 提示 PLGA 的酸性微环境使其稳定性大大提高, 可以达到稳定持续释放药物的目的^[2]。与此相反, VCR 在 $\text{pH} < 4.8$ 的环境中降解很快, 为了减少这种不利影响, 在微球制备过程中, 在囊材的溶液中加入弱碱盐碳酸锌, 可提高微球内部 pH 值以增加 VCR 稳定性, 减少药物降解。从微球药物释放结果来看, 添加碳酸锌的微球在 36 d 的检测中, 总释放量显著高于未添加碳酸锌的微球, 且 HPLC 色谱图上未见明显的 VCR 降解产物峰。这说明添加碳酸锌提高了微球内环境的 pH 值, 增加了药物的稳定性。此外, 从添加了碳酸锌的微球总释药量来看, 仍然有少部分药物发生了降解, 这一现象的原因可能在于碳酸锌的添加量没有达到最优, 需要选用多个不同量的碳酸锌作添加剂以筛选出最优添加量; 且碳酸锌在微球中的分布是不均一的, 微球内部碳酸锌分布较少或局部位置仍因 PLGA 降解产物而使药物降解。

综上所述, 本研究采用 W/O/O 溶剂挥发法成功制备了载 VCR 的 PLGA 微球, 并通过添加碳酸锌提高了微球内部酸性微环境的 pH 值, 减少了药物降解, 增加了药物释放量, 这一制备方法简单实用。此外, 添加 10% (w/w) 碳酸锌优于添加 5% (w/w) 碳酸锌的效果。

参 考 文 献

- [1] Lei L , Schwendeman SP. Mapping neutral microclimate pH in PLGA microspheres [J]. *J Controlled Release* , 2005 , 101(2) :163-173.
- [2] Anna S , Thomas GB , Steven PS. The acidic microclimate in poly(lactide-co-glycolide) microspheres stabilizes camptothecins. [J] *Pharm Res* , 1999 , 16(2) 241-248.
- [3] Mayer LD , Masin D , Nayar R , *et al.* Pharmacology of liposomal vincristine in mice bearing L1210 ascitic and B16/BL6 solid tumours [J]. *Br J Cancer* , 1995 , 71(3) :482-488.
- [4] Gidding C , Kellie S , Kamps W , *et al.* Vincristine revisited [J]. *Crit Rev Oncol Hemafol* , 1999 , 29(3) 267-287.
- [5] Vendrig D , Beijnen JH , Van Der Howwen O , *et al.* Degradation kinetics of vincristine sulphate and vindesine sulphate in aqueous solutions [J]. *Int J Pharm* , 1989 , 50(2) :189-196.
- [6] Zhu G , Mallery SR , Schwendeman SP. Stabilisation of proteins encapsulated in injectable poly (lactide-co-glycolide) [J]. *Nat Biotechnol* , 2000 , 18(1) 52-57.
- [7] Gupte A , Ciftci K. Formulation and characterization of Paclitaxel , 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres [J]. *Int J Pharm* , 2004 , 276(1) 93-106.
- [8] Huo DJ , Deng SH , Li LB , *et al.* Studies on the poly (lactide-co-glycolic) acid microspheres of cisplatin for lung-targeting [J]. *Int J Pharm* , 2005 , 289(1) 63-67.
- [9] Qian F , Stowe N , Erin H , *et al.* Quantification of *in vivo* doxorubicin transport from PLGA millirods in thermoablated rat livers [J]. *J Control Release* , 2003 , 91(1-2) :157-166.
- [10] Kumar Naraharisetti P , Yung Sheng Ong B , Wei Xie J , *et al.* *In vivo* performance of implantable biodegradable preparations delivering Paclitaxel and Etanidazole for the treatment of glioma [J]. *Biomaterials* , 2007 , 28(5) 886-894.
- [11] Song KC , Lee HS , Choung Y , *et al.* The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly (d , l-lactide-co-glycolide) nanoparticles [J]. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* , 2006 , 276(1-3) :162-167.

(2006-09-14 收稿)