

载长春新碱微泡的体外释药性质研究

凌旭^{1,2} 张良珂^{1,2*} 袁佩¹ 李攀³ 冉海涛³

(1. 重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学药学院, 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016;

3. 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 考察载长春新碱的聚乳酸-乙醇酸-聚乙二醇共聚物(PLGA-PEG)微泡的体外释药性质。方法 采用 W/O/W 复乳-溶剂挥发法制备微泡,测定微泡的包封率、粒径和 Zeta 电位,考察不同分子量 PLGA、PLGA-PEG 加入比例,以及施加超声对微泡的体外释药的影响。结果 所制备微泡平均粒径约为 1.27 μm ,包封率为(37.63 \pm 0.61)%, Zeta 电位为 -24.88 mV,低分子量 PLGA 微泡释药速率较快,添加 PLGA-PEG 的微泡释药速率增加,体外施加超声可加速药物释放。结论 考察了不同条件对微泡体外释放的影响,为载药微泡的应用奠定了基础。

关键词: 长春新碱; 微泡; 体外释放

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.06.023

中图分类号: R284.2 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2011)06-1339-02

In Vitro Release Characteristics of Vincristine Sulfate Microbubbles

LING Xu^{1,2} ZHANG Liang-ke^{1,2*} YUAN Pei¹ LI Pan³ RAN Hai-tao³

(1. Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. School of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Institute of Ultrasound Imaging, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To study *in vitro* release characteristics of vincristine sulfate microbubbles. **Methods** A water-in-oil-in-water double-emulsion/solvent evaporation method was used to prepare microbubbles. Ultraviolet spectrophotometry was applied to determine the entrapment efficiency of microbubbles, and particle size, zeta potential were measured by malvern laser particle size measuring instrument. The effect of different molecular weight of PLGA, different ratio of PLGA: PEG and ultrasound on the *in vitro* release characteristics of microbubbles were studied. **Results** The mean diameter of acquired microbubbles was 1.27 μm . The drug entrapment efficiency was (37.63 \pm 0.61) % and zeta potential was -24.88 mV. With the use of low weight PLGA, increased ratio of PLGA-PEG and the use of utrosonic, the drug release of microbubbles increased. **Conclusion** The effect of different conditions on the release of microbubbles *in vitro* was studied and the foundation for the application of drug-loaded microbubbles was laid.

Key words: Vincristine; Microbubble; *In vitro* release

长春新碱(Vincristine, VCR)是提取自夹竹桃科植物长春花的一种生物碱,临床用于治疗神经细胞瘤等。由于具有明显的剂量限制性神经毒性,全身给药常引起毒副反应,大大限制其临床应用^[1]。微泡通常是指直径为 100 μm 以下的有壳微气泡,微泡壳厚 1~500 nm,壳体材料多为白蛋白、聚合物等,泡内气体通常是 CO₂、氟碳气等^[2]。

本文以乳酸-乙醇酸共聚物 [Poly(lactide-co-glycolide), PLGA] 和聚乳酸-乙醇酸-聚乙二醇共聚物 (PLGA-PEG) 为膜材,采用复乳-溶剂挥发法制备载 VCR 聚乳酸-乙醇酸-聚乙二醇共聚物微泡 (Vincristine-loaded PLGA-PEG Microbubbles, VCR-PLGA-PEG-MB),并考察了不同 PLGA 分子量、PLGA-PEG 加入比例、外加超声等因素对其体外释药的影响,为载药聚

合物微泡的应用奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 试剂与动物 PLGA [LA/GA = 50:50, Mw = 20 kDa (或 40 kDa, 山东医疗器械研究所)] PLGA-PEG (PEG: Mw = 2000, PLGA: Mw = 20 kDa, 山东岱罡化学试剂厂), VCR (批号 021001, 纯度 98.9%, 广州环叶制药有限公司), 聚乙烯醇 (Polyvinyl Alcohol, PVA, 日本可乐丽公司), Span 80 (上海申宇医药化工有限公司), D-葡萄糖 (AR, 上海楷洋生物技术有限公司), 氟碳气 (重庆医科大学附属二院超研所提供), 速眠新 II (吉兽药 [2004] 005013, 军事医学科学院军事兽医研究所), 其余试剂均为分析纯。新西兰大白兔 (雄性, 体质量为 2.0~3.0 kg, 重庆医科大学实验动物中心)。

1.2 仪器 Sartorius A200s 分析天平, Sonics VCX750 超声波细胞破碎仪, Olympus TH-200 光学显微镜, 旋转蒸发器 (RE-52 AA, 上海亚荣生化仪器厂), Malvern Zetasizer Nano ZS90 激光粒径分析仪, Christ Alpha 1-2 LD 冷冻干燥机, JGT1025 超声转染仪 (重庆医科大学附属二院超研所自制)。

2 方法与结果

2.1 VCR-PLGA-PEG-MB 的制备及相关性质

2.1.1 VCR-PLGA-PEG-MB 的制备 采用复乳-溶剂挥发

收稿日期: 2010-08-22; 修订日期: 2010-12-08

基金项目: 重庆市科委自然科学基金 (No. CSTC 2008BB5397);

重庆医科大学校办课题项目 (No. NSFYY200728, XBYB2007098)

作者简介: 凌旭 (1983-) 男 (汉族) 湖南株州人 现为重庆医科大学药学院在读硕士研究生 学士学位 主要从事中西药物新型给药系统研究工作。

* 通讯作者简介: 张良珂 (1974-) 男 (汉族) 河北保定人 现任重庆医科大学副教授 硕士研究生导师 博士学位 主要从事中西药物新型给药系统研究工作。

法制备微泡。精密称取 2.0 mg VCR ,PBS 溶解作内水相 (W1) ,适量 PLGA 或 PLGA - PEG、Span 80 溶于 2.0 ml 二氯甲烷作油相 (O) ,混合 W1 和 O ,冰浴探头超声 10 s 得初乳 (W/O) ;配制 1% PVA 水溶液作外水相 (W2) ,将 W2 加入初乳中 ,超声 10 s 形成复乳 (W/O/W) 。旋转蒸发干二氯甲烷 ,离心 10 min (3 000 r/min) ,沉积物用蒸馏水洗涤两次。冷冻干燥 ,真空下充入氟碳气体 ,得 VCR - PLGA - PEG - MB。

2.1.2 VCR - PLGA - PEG - MB 的粒径分析 采用 Malvern 激光粒径测量仪测定其粒径分布及 Zeta 电位 ,VCR - PLGA - PEG - MB 平均粒径为 1.27 μm ,Zeta 电位为 -24.88 mV。

2.1.3 VCR - PLGA - PEG - MB 包封率的测定 采用紫外分光光度法测定包封率。经紫外扫描 ,确定 VCR 的最大吸收波长为 296 nm ,相关辅料在此波长处不干扰测定。以二氯甲烷和甲醇混合溶剂 (3:1 V/V) 溶解微泡 ,测定微泡中包裹的 VCR 含量。按下述公式计算包封率。包封率 (%) = 微泡载带的 VCR 重量 / 投药量 × 100%。制备三批 VCR - PLGA - PEG - MB ,测定其包封率为 (37.63 ± 0.61) %。

2.2 体外释放实验

2.2.1 体外释放实验 精密称取适量 VCR - PLGA - PEG - MB ,装入透析袋中 ,置于装有 20.0 ml PBS 的具塞瓶中。恒温 (37 ± 0.5) °C 水浴振荡 (70 ± 5) r/min ,在预定的时间里取样 5.0 ml ,微孔滤膜过滤 ,测定吸光度 A 值 ,代入标准曲线方程计算累积释放率 ,同时补充等量 PBS。

2.2.2 标准曲线绘制 精密称取 VCR 10.0 mg ,PBS 配制成 40.0 μg · ml⁻¹ 的 VCR 母液。分别配制成 2.0 4.0 8.0 10.0 20.0 μg · ml⁻¹ 系列工作溶液 ,在 296 nm 测定吸光度 A ,以吸光度 (A) 对浓度 (C) 进行线性回归 ,得回归方程: A = 0.015 7C - 0.000 7 r = 0.999 7。VCR 在 2.00 ~ 20.00 μg · ml⁻¹ 浓度范围内 ,吸光度与药物浓度呈良好的线性关系 ,辅料不干扰 VCR 的测定。

2.2.3 不同分子量聚合物体外释药行为比较 采用 2 万和 4 万分子量 PLGA 各制备 3 批样品 ,进行体外释放实验。由图 1 可知 ,VCR 在 2 h 内基本释放完全 ,以 20 kDa PLGA 为膜材制备微泡的累积百分释放在 20 d 基本释放完全 ,而以 40 kDa PLGA 为膜材制备微泡的累积百分释放在 30 d 基本释放完全 ,原因可能是 20 kDa PLGA 分子量较小 ,其在体外溶蚀速度较快 ,从而释药的速率较快。

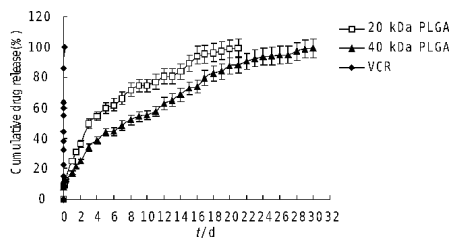


图 1 不同分子量 PLGA 对微泡药物释放影响

2.2.4 PLGA - PEG 加入比例对 VCR - PLGA - PEG - MB 体外释药行为影响 分别制备 PLGA: PLGA - PEG 为 1: 2 2: 1 ,1: 1 的 VCR - PLGA - PEG - MB 进行体外释药研究。由图 2 可知 ,不同 PLGA: PEG 比例对药物累积释放有一定影响 ,其中 PLGA: PEG 为 1: 2 时释放速度最快 ,释放 16 天后能达到 90% 左右 ,而 PLGA: PEG 为 2: 1 时释放速度最慢 ,释放 16 d 后能达到 80% 左右。PLGA - PEG 在微泡中的含量增加会增加微泡的亲水性 ,从而增加药物的释放速度。

2.2.5 体外施加超声对 VCR - PLGA - PEG - MB 释药行为影响 精密称取适量 VCR - PLGA - PEG - MB ,分散于透析袋中 ,将超声基因转染治疗仪探头紧贴透析袋 (设置功率为 2.0 W/cm² ,频

率 300 kHz) 。开启仪器 ,在预定的时间里取样 5.0 ml ,补充 37°C 相同体积的释放介质 ,微孔滤膜过滤 ,测定吸光度 A 值 ,代入标准曲线方程计算累积释放率 ,同时补充等量 PBS。

由图 3 可知 ,施加超声的 VCR - PLGA - PEG - MB 在 60 min 累积药物释放能达到 80% 以上 ,而未加超声组累积药物释放在 30% 左右 ,VCR - PLGA - PEG - MB 在超声作用下释药速率明显加快。

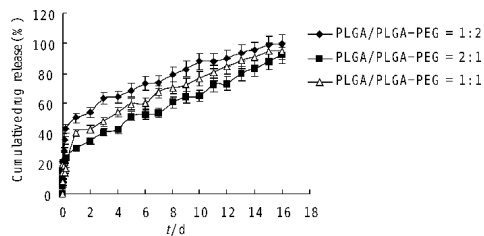


图 2 不同 PLGA: PEG 比例对微泡药物释放影响

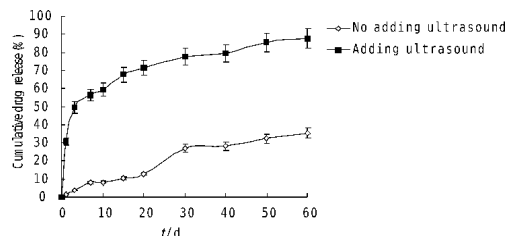


图 3 超声下 VCR - PLGA - PEG - MB 的药物释放

3 讨论

超声造影是近年随着超声造影剂制备技术和图像显影技术的不断完善逐步发展起来的新技术。超声微泡造影剂多为内含气体的微气泡 ,填充气体可为 CO₂、空气或大分子惰性气体 (如氟碳气体) 等 ;其成膜材料有磷脂类化合物、白蛋白、糖类、非离子表面活性剂、可生物降解的高分子聚合物等。氟碳气体分子量较大、溶解度和弥散度较低 ,是较优良的填充气体。天然或合成的高分子聚合物制备的超声微泡抗压性和稳定性高 ,其中使用较广泛、研究较多的是高分子聚合物 PLGA ,PLGA 生物相容性好 ,降解产物无毒 ,分子结构中无肽链 ,无免疫原性 [3-7]。

近年来的研究表明超声微泡在携带药物与基因进行靶向给药方面具有重要的临床应用价值。其作用机制是超声微泡内含的微小气泡 (空化核) 在超声波作用下产生振荡、扩大、收缩至内爆等一系列动力学效应 ,即空化效应 ,增加超声照射下的空化效应 ,对细胞产生短暂可逆的“声孔作用” ,使细胞膜通透性短暂的增加 ,从而药物或治疗基因能够进入到细胞内 [8-9]。

本文实验结果表明添加了 PLGA - PEG 的微泡释放速度增加 ,可能是微泡表面被柔顺而亲水的 PEG 链部分覆盖 ,极性基 PEG 增强了 VCR - PLGA - PEG - MB 的亲水性 ,在释放过程中聚合物更易溶蚀 ,从而加快释放。添加了 PLGA - PEG 的微泡有明显的突释现象 [10] ,且随 PLGA - PEG 的添加量增加 ,突释量增加 ,可能是部分药物包裹于 VCR - PLGA - PEG - MB 的 PEG 亲水层或 VCR - PLGA - PEG - MB 的外部近表面部分。突释之后的缓慢释放主要是由于膜材的缓慢降解速率造成的。VCR - PLGA - PEG - MB 的药物突释可弥补 PLGA 膜微泡释药速率过于缓慢的不足 ,在较短时间内达到有效药物浓度。

对微泡施加超声影响后 ,药物释放速度加快 ,可能是在超声波作用下 ,释放介质很快地渗透到微泡中 ,药物释放加快 ,另一方面可能是由于超声空化和声孔作用使部分微泡破裂 ,基质的溶蚀加快 ,包裹的药物较快释放。

本文采用聚乳酸 - 乙醇酸 - 聚乙二醇共聚物 (PLGA - PEG)

制备的微泡,其表面被柔顺而亲水的 PEG 链部分覆盖,极性 PEG 增强微泡的亲水性,减少血浆蛋白与微泡膜的相互作用,降低被巨噬细胞吞噬的可能,延长在循环系统的滞留时间。

参考文献:

- [1] Gidding C, Kellie S, Kamps W, et al. Vincristine revisited [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1999, 29 (3): 267.
- [2] Unger ET, Matsunaga O, Schumann PA, et al. Microbubbles in molecular imaging and therapy [J]. Medicamundi, 2003, 47(4): 58.
- [3] Margaret AW, Flemming F, Kelleny O, et al. Comparison of in vitro and in vivo acoustic response of a novel 50:50 PLGA contrast agent [J]. Ultrasound, 2006, 44(4): 360.
- [4] Eisenbrey JR, Huang P, Hsu J, et al. Ultrasound triggered cell death in vitro with doxorubicin loaded poly lactic - acid contrast agents [J]. Ultrasound, 2009, 49(8): 360.
- [5] Eisenbrey JR, Hsu J, Wheatley MA. Plasma sterilization of poly lactic acid ultrasound contrast agents: surface modification and implications for drug delivery [J]. Ultrasound in Med & Biol, 2009, 35(11): 1854.
- [6] 冉海涛,任红,王志刚,等.包裹阿霉素的高分子材料微泡声学造影剂制备及显影效果实验研究[J].临床超声医学杂志,2005,7(4):217.
- [7] 敖梦,王志刚,冉海涛,等.包裹 Gd-DTPA 的高分子材料超声造影剂的制备与体外显影实验[J].中国超声医学杂志,2009,25(4):337.
- [8] Esmaili F, Ghahremani MH, Esmaili B, et al. PLGA nanoparticles of different surface properties: Preparation and evaluation of their body distribution [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 349(1): 249.
- [9] Liu R, Ma GH, Wan YH, et al. Influence of process parameters on the size distribution of PLA microcapsules prepared by combining membrane emulsification technique and double emulsion - solvent evaporation method [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 45(3): 144.
- [10] Cheng J, Teply BA, Sherifi I, et al. Formulation of functionalized PLGA - PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery [J]. Biomaterials, 2007, 28(5): 869.

木紫珠化学成分研究

王玉梅^{1,2}, 王飞², 肖怀^{1*}

(1. 大理学院药学院, 云南大理 671000; 2. 昆明西力生物技术有限公司, 云南昆明 650204)

摘要: 从木紫珠 *Callicarpa arborea* Roxb. 乙醇提取物中分离鉴定了 12 个化合物: antiarol rutinoside (1)、kelampayosides A (2)、地黄苷(3)、异地黄苷(4)、lirioresinol B (5)、丁香酸(6)、antiairol (7)、梓木醇(8)、乌苏酸(9)、叶黄素(10)、谷甾醇(11)、胡萝卜苷(12)。以上化合物均为首次从该植物中分离得到。

关键词: 紫珠属; 木紫珠; 酚苷; 苯丙素苷; 木脂素

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.06.024

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2011)06-1341-02

Chemical Constituents of *Callicarpa arborea* Roxb.

WANG Yu-mei^{1,2}, WANG Fei², XIAO Huai^{1*}

(1. College of Pharmacology, Dali University, Dali 671000, China; 2. Kunming Xili Bio-tech Co., Ltd, Kunming 650204, China)

Abstract: Twelve known compounds were obtained from the EtOH extract of the twigs and leaves of *Callicarpa arborea* Roxb. Based on extensive spectroscopic analysis, their structures were identified as: antiarol rutinoside (1), kelampayosides A (2), martynoside (3), isomartynoside (4), lirioresinol B (5), syringic acid (6), antiairol (7), betulin (8), ursolic acid (9), lutein (10), sitosterol (11) and daucosterol (12). All compounds were obtained from this plant for the first time.

Key words: *Callicarpa* L.; *Callicarpa arborea* Roxb.; Phenolic glycosides; Phenylpropanoid glycosides; Lignans

木紫珠 *Callicarpa arborea* Roxb. 为马鞭草科紫珠属植物, 主要分布在我国广西、云南北部和西藏东南部, 尼泊尔、印度、孟加拉、缅甸等国也有分布。该植物根、叶具有清热解毒、散瘀止血、消肿止痛等功效, 用于治疗衄血、咯血、胃肠道出血、妇女崩漏、外伤出血、咽喉肿痛、跌打肿痛、风湿骨痛、烧伤等^[1]。经相关数据库检索发现, 国内外对木紫珠化学成分研究的报道较少。为了更

深入地了解木紫珠中的化学成分, 我们对其地上部分进行了化学成分研究, 运用各种化学分离手段从木紫珠 95% 醇提取物中共分离得 12 个化合物, 分别为: antiarol rutinoside (1)、kelampayosides A (2)、地黄苷(3)、异地黄苷(4)、lirioresinol B (5)、丁香酸(6)、antiairol (7)、梓木醇(8)、乌苏酸(9)、叶黄素(10)、谷甾醇(11)、胡萝卜苷(12)。以上化合物均为首次从该植物中分离得到。

1 仪器和材料

UV210A 型紫外可见分光光度计; Bruker AV-400 和 DRX-500 核磁共振光谱仪。柱色谱硅胶(200~300目)和薄层色谱硅胶 GF254(青岛美高集团有限公司); 反相填充材料 Rp-18 (40~75 μm, 日本 Fuji 公司); 凝胶为 Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Sweden); 显色剂为 10% 的 H₂SO₄/EtOH 溶液。木紫珠采集于云南河口, 由中国科学院昆明植物研究所陈愈老师鉴定。

2 方法与结果

2.1 提取与分离 干燥木紫珠根茎部分 6.5 kg, 粉碎后用工业乙

收稿日期: 2010-08-05; 修订日期: 2010-11-01

基金项目: 云南省自然科学基金(No. 2009ZC122M)

作者简介: 王玉梅(1985-), 女(汉族), 湖南涟源人, 现为大理学院药学院在读硕士研究生, 主要从事天然药物成分研究工作。

* 通讯作者简介: 肖怀(1973-), 女(汉族), 云南凤庆人, 现任大理学院药学院副教授, 硕士研究生导师, 硕士学位, 主要从事天然药物化学研究工作。