

· 论 著 ·

局部麻醉用缓释盐酸布比卡因 PLGA 微球的制备及特性研究

钟延强¹, 周永刚², 张国庆³, 傅强⁴, 王彬³, 龚纯贵³, 鲁莹¹, 高申¹

(1. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433; 2. 解放军第 81 医院, 南京 210002; 3. 东方肝胆外科医院药学部, 上海 200438; 4. 长征医院麻醉科, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 制备盐酸布比卡因聚乳酸聚乙交酯嵌段共聚物(PLGA)微球, 并对其皮下给药和蛛网膜下腔给药后体内药动学、药效学进行评价。**方法:** 微球制备采用乳化溶剂挥发法, 用反相 HPLC 法测定其体内血药浓度, 分别以针刺疼痛反应和四肢反应综合评分法评价盐酸布比卡因 PLGA 微球的麻醉效果, 以盐酸布比卡因注射液作为对照。**结果:** 微球的包封率为 86.78%, 载药量为 28.92%, 微球平均粒径为 85.32 μm 。相同剂量微球组皮下给药和蛛网膜下腔给药后血药浓度均产生 2 个峰浓度, 两峰浓度值显著低于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 微球组不同给药的平均滞留时间(MRT)明显长于对照组 ($P < 0.01$)。微球组皮下给药最大麻醉圈直径(4.3 cm)显著小于注射剂对照组(8.3 cm, $P < 0.01$), 而微球组局麻持续时间(72 h)较对照组(4 h)明显延长 ($P < 0.01$)。微球组蛛网膜下腔给药后不同麻醉阶段的麻醉时间 t_1 (460 min)、 t_2 (307.5 min)、 t_3 (242.5 min)以及麻醉有效总时间 t (1 010 min)和综合评分 S (1 860)值均显著大于注射剂对照组的 t_1 (45 min)、 t_2 (83.8 min)、 t_3 (53 min)以及 t (181.8 min)和 S (328)值 ($P < 0.01$)。**结论:** 盐酸布比卡因 PLGA 微球能显著延长皮下给药和蛛网膜下腔给药的体内滞留时间和局部麻醉时间, 降低最大血药浓度, 提高用药安全性。

[关键词] 盐酸布比卡因; PLGA 微球; 局部麻醉; 药代动力学

[中图分类号] R 971.2

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2004)03-0865-04

Preparation and property of bupivacaine hydrochloride PLGA microspheres for local anesthesia

ZHONG Yan-Qiang¹, ZHOU Yong-Gang², ZHANG Guo-Qing³, FU Qiang⁴, WANG Bin³, GONG Chun-Gui³, LU Ying¹, GAO Shen¹(1. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. No. 81 Hospital of PLA, Nanjing 210002; 3. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438; 4. Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Shanghai 200003)

[ABSTRACT] **Objective:** To design the optimum prescription for bupivacaine hydrochloride PLGA microspheres (Bupi-PLGA-MS) and to evaluate its pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Methods:** Bupi-PLGA-MS was prepared with emulsifying solvent evaporating method. The plasma concentration of bupivacaine was determined by HPLC and the anesthetic outcomes of bupi-PLGA-MS after subcutaneous and spinal administration were evaluated by needling and hindlimb reaction. Bupivacaine injection was taken as control. **Results:** The drug entrapment was 86.78%, drug content was 28.92%, and the mean diameter was 85.32 μm . Two peaks of bupivacaine plasma concentration were found *in vivo* with bupi-PLGA-MS by subcutaneous and spinal administration respectively, which were significantly lower than that of injection group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The mean reaction time(MRT) of bupi-PLGA-MS was higher than that of injection group ($P < 0.01$). The biggest anaesthetic circle diameters of bupi-PLGA-MS(4.3 cm) was smaller than that of injection group(8.3 cm, $P < 0.01$) and anaesthetic time of bupi-PLGA-MS was evidently prolonged compared to injection group ($P < 0.01$). The anaesthetic time of different stages by spinal administration with Bupi-PLGA-MS was prolonged ($P < 0.01$). **Conclusion:** Bupi-PLGA-MS can prolong MRT and the regional anesthetic time, decrease the maximum drug concentration and increase the safety of administration.

[KEY WORDS] bupivacaine hydrochloride; PLGA microspheres; local anesthesia; pharmacokinetics

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 865-868]

局部麻醉药是一类能在用药局部可逆性地阻断感觉神经的冲动与传导, 并能在意识清醒条件下引起局部组织暂时痛觉消失, 以便顺利实施手术的药物, 占临床手术麻醉药物的 70% 以上。由于该类药物体内生物半衰期短, 加之其扩张外周血管作用, 使得一次性给药局部麻醉持续时间短, 且局部组织的高浓度极易造成药物经血管吸收入血产生中枢神

经和心血管毒性。近年来, 国内外学者对局麻药缓释给药系统进行了一系列研究^[1~5], 如用于硬膜外麻醉、腰麻和外周神经丛麻醉的脂质体、微球、植入剂以及用于起局部止痛作用的透皮给药制剂等。其中

[作者简介] 钟延强(1965-), 男(汉族), 博士, 副教授, 硕士生导师。
E-mail: yqzhong@guomai.sh.cn

以聚乳酸聚乙醇酸嵌段共聚物(PLGA)为载体的微球制剂的研究倍受重视。本研究采用乳化溶媒蒸发法制备了盐酸布比卡因 PLGA 微球,并对体外释放、体内药动学、药效学进行了研究。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂、动物 高效液相色谱仪(Waters公司,包括515泵,996二级管阵列检测器,Millennium32工作站);EUROMEX光学显微镜(荷兰);ZRD6-B型药物溶出度仪(上海黄海药检仪器厂);GS12-2电子恒速搅拌器(上海医疗器械专机厂);95-1磁力搅拌器(上海志威电器有限公司);TGL-16B台式离心机(上海安亭科学仪器厂);D2F-6020型真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);XW-80型旋涡混合器(上海第一医学院仪器厂)。PLGA(乙交酯LA:丙交酯GA=7:3,平均相对分子质量25000,均由浙江医学院提供,批号:010312);盐酸布比卡因原料(上海三维药业公司批号:000405);甲醇(色谱纯);海藻酸钠(分析纯,上海试剂采购供应站),甘油(药用规格,上海制皂厂);透析袋(Φ 15 mm,透过相对分子质量分别为10000和15000,上海化学试剂商店进口分装);盐酸布比卡因注射剂(上海海普药业有限公司,批号:020110);注射用泊罗沙姆(德国罗姆公司提供);实验动物为新西兰兔16只(第二军医大学实验动物中心提供),体质量(2.86 ± 0.12) kg。

1.2 盐酸布比卡因 PLGA 微球的制备 参照文献[6]并改良后的制备工艺如下:称取 PLGA 200 mg 溶解于 1 ml 二氯甲烷中,另取盐酸布比卡因微粉 100 mg 分散于上述溶液中,滴加至盛有 1% 海藻酸钠溶液 + 0.2% 吐温 20(m/m) 500 r/min 搅拌的 100 ml 烧杯中,同速搅拌 15 min,不断搅拌下将该烧杯移至水浴中,45℃ 搅拌 4 h 挥发去二氯甲烷,用 0.02 mol/L 的氢氧化钠稀释至 100 ml,布氏漏斗抽滤分离微球,20 ml 0.02 mol/L 的氢氧化钠液洗涤,30℃ 真空干燥,得白色流动性粉末状微球(Bupi-PLGA-MS)。

1.3 微球大小与形态评价 将适量微球均匀分散于载玻片上,光学显微镜下计数不少于 500 个并测量微球直径,计算微球的算术平均粒径和累积体积百分数。将 Bupi-PLGA-MS 用扫描电镜进行外观、形态观察。

1.4 微球中药物的含量测定及体外释放

1.4.1 含量测定 配制一系列浓度的盐酸布比卡因磷酸盐缓冲溶液,在 263 nm 处测定光密度,以浓

度(C)和光密度(D)进行线性回归,浓度在 0.1~0.6 mg/ml 范围内线性良好,回归方程为 $D = 1.024C - 0.0191$ ($r = 0.9999, n = 6$)。精密称取含药微球适量(约相当于盐酸布比卡因 20 mg)加入 pH 7.4 PBS 研磨转入 10 ml 离心管中,加缓冲液至 7 ml 超声提取,离心取上清液,重复提取 3 次,合并上清液于 100 ml 容量瓶中,用 pH 7.4 PBS 作空白在 263 nm 处测定光密度,代入微球含量标准曲线方程计算含量,测得药物包封率 = 药物量/投入药物量 $\times 100\%$ 。

1.4.2 体外释放 称取盐酸布比卡因 9.8 mg 及 34 mg Bupi-PLGA-MS,分别装入截留相对分子质量为 15000 的透析袋中,用 pH 7.4 的 PBS 溶散,两端扎紧,放入 500 ml 溶出杯中,加入 200 ml 释放介质为 pH 7.4 的 PBS,在 37℃ 恒温水浴中加热搅拌,搅拌速度为 50 r/min,定时取样,同时补充等量释放介质。用毛细管电泳法测定药物含量,色谱条件:分离柱为熔融石英毛细管柱($75 \mu\text{m} \times 40 \text{cm}$);运行缓冲液为 10 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 2.5;检测波长为 200 nm;利多卡因为内标。计算累积释药百分率。

1.5 盐酸布比卡因 PLGA 微球的药动学

1.5.1 色谱条件 色谱柱:Dikma Diamonsil™(钻石) C_{18} 柱($150 \text{mm} \times 4.6 \text{mm}$,粒径 $5 \mu\text{m}$);预柱:Easy Guard C_{18} Kit;流动相:甲醇-水-冰醋酸-二乙胺(70:30:0.075:0.13, $V:V:V:V$);流速:1.2 ml/min;检测波长:215 nm;柱温:室温;进样量:10 μl 。样品和内标(盐酸利多卡因)的保留时间分别为 7.290 min 和 4.646 min。

1.5.2 皮下给药 新西兰兔 8 只随机分成 2 组,每组 4 只。给药前禁食 12 h,自由饮水,背部中线一侧剃毛 $4 \text{cm} \times 4 \text{cm}$ 。实验组在动物清醒状态下在剃毛区皮下注射盐酸布比卡因 PLGA 微球混悬型注射剂,折算成盐酸布比卡因剂量为 15 mg/kg。对照组皮下注射盐酸布比卡因注射液,剂量为 15 mg/kg。

1.5.3 蛛网膜下腔给药 另取新西兰兔 8 只随机分成 2 组,每组 4 只。给药前禁食 12 h,自由饮水,背部以 L_{1-2} 腰椎为中心剃毛 $4 \text{cm} \times 4 \text{cm}$ 。在动物清醒状态下,于剃毛区消毒后用 5 号注射针头与脊柱成约 30° 角向尾端进针,穿过棘上、棘间及黄韧带后有明显的突破感,固定针头后接注射器。对照组注射盐酸布比卡因注射液,实验组注射盐酸布比卡因 PLGA 微球混悬型注射剂,折算成盐酸布比卡因剂量皆为 10 mg/kg。

参照文献[7],在不同时间点分别取兔耳缘静脉血 1 ml,肝素抗凝,3500 r/min 离心 8 min 分离血

浆。取血浆 0.5 ml,置于-20℃冰箱保存备用。0.5 ml 血浆加 5 μ l 盐酸利多卡因标准液,加 1 mol/L 的 NaOH 0.25 ml,再加入 3 ml 乙醚-氯仿(10:1, V/V)混合液,旋涡混合 5 min,3 500 r/min 离心 8 min,取有机层于另一试管中,置 60℃水浴中,用 N₂ 吹干,用 100 μ l 甲醇溶解,旋涡混合,HPLC 测定。两组血药浓度实验数据采用 3P87 药代动力学软件自动拟合,求算其药物动力学参数,并对实验组与对照组 C_{max}、平均滞留时间(MRT)进行统计学处理。

1.6 盐酸布比卡因 PLGA 微球的药效学 皮下给药后,用十字线标记皮丘的中心位置并在给药后 5、10、20、30 min,1、2、4、8、12、24、48、72 h 通过针刺反应记录其麻醉圈的直径大小。蛛网膜下腔给药后麻醉效果采用分类记分法评价^[8]:给药后兔后肢能自由活动,无运动失衡且对痛觉有反应评定为 0 分;运动受限制或支撑身体和行走时有运动失衡现象,对痛觉无反应评定为 1 分;后肢无力支撑身体,对痛觉无反应评定为 2 分;两后肢彻底麻痹无任何痛觉反应评为 3 分。将每只动物在每一阶段持续时间与评分值乘积后加和(S 值)作为麻醉效果的评定指标。

1.7 统计学处理 组间比较采用 *t* 检验及相关分析。

2 结果

2.1 微球的形态和大小 微球呈圆球体,大小均匀,表面吸附有药物结晶,微球粒径呈正态分布,在 55~135 μ m 粒径范围的微球占 83.3%(图 1)。

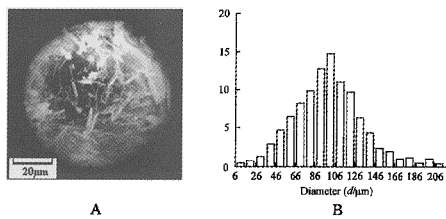


图 1 Bupi-PLGA-MS 的电镜照片(A)与粒径分布图(B)
Fig 1 Bupi-PLGA-MS under scanning electron microscope (A) and its particle size distribution estimated by optical microscope (B)

2.2 微球的体外释放 盐酸布比卡因微球的载药量为 28.92%,包封率为 86.78%。毛细管电泳法测定方法学考察结果表明,布比卡因在 2.0~64.0 μ g/ml 浓度范围内线性关系良好($r=0.9999$),峰面积与浓度的回归方程为: $Y=0.090-72X-2.936\times 10^{-3}$ 。以信噪比 3:1 计,最低检测浓度为 0.5 μ g/ml,平均回收率为(102.24 \pm 3.16)%,日内

和日间精密度分别为(1.45 \pm 0.43)%和(1.06 \pm 0.29)%($n=3$)。体外释放结果见图 2。经计算原料药布比卡因的 $t_{1/2}=20.85$ min。将释放数据中 10 min 至 12 h 段经一级动力学方程拟合,Bupi-PLGA-MS 的溶出一级动力学方程为: $\ln(100-Q)=4.3345-2.4975t$ ($r=0.9908$), $t_{1/2}=169.16$ min。说明 Bupi-PLGA-MS 具有明显的缓释作用。

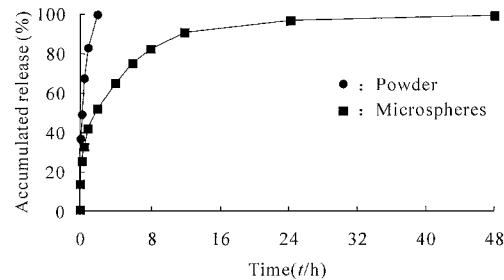


图 2 布比卡因原料药与布比卡因微球的体外释放曲线
Fig 2 Release curves of Bupi-powder and Bupi-PLGA-MS in vivo

2.3 盐酸布比卡因 PLGA 微球的药动学 在皮下给药实验中,对照组和微球组给药后,兔血药浓度数据见图 3A。血药浓度数据显示,对照组血药浓度迅速达到峰值, $t_{max}=0.313$ h,且浓度值较高($C_{max}=2.374$ μ g/ml),随后浓度快速下降。微球组血药浓度出现双峰现象,微球组的第一峰浓度为 0.831 μ g/ml,显著低于注射剂对照组($P<0.05$);在 8 h 出现第 2 个峰值后血药浓度呈缓慢下降趋势,并长时间维持较低水平,微球组 $t_{1/2}$ 和 MRT 较对照组明显延长($P<0.01$)。

在蛛网膜下腔给药后,兔血药浓度数据见图 3B。血药浓度数据显示,注射剂对照组血药浓度在给药后 0.5 h 达到峰值, C_{max} 为 0.576 μ g/ml,随后浓度快速下降,至 12 h 后已检测不到药物浓度。微球组血药浓度在 0.5 和 2 h 产生 2 个峰值,峰浓度分别为 0.332 和 0.290 μ g/ml,分别是由微球的突释作用和微球内药物释放产生,随后血药浓度下降缓慢并一直维持较低水平至 48 h,微球组两峰浓度(0.332, 0.290 μ g/ml)值显著低于对照组($P<0.05$, $P<0.01$),微球组 MRT 明显长于对照组($P<0.01$)。

2.4 盐酸布比卡因 PLGA 微球的药效学 相同剂量的注射剂和微球混悬剂皮下注射后,注射剂对照组从注射部位扩散较快,20 min 达 8.3 cm,并伴有心跳加快、呼吸急促等局麻药中毒症状,约 1 h 中度症状消失,2 h 麻醉圈直径缩小为 2 cm,4 h 局麻作

用消失;微球实验组在10~20 min 麻醉圈直径无明显增大,在20 min 和2 h 直径最大,随后逐渐减小,72 h 后仍在局部注射点2 cm 范围对针刺无痛觉反应,经统计学处理,微球组最大麻醉圈直径显著小于对照组($P < 0.01$),微球组局麻持续时间较对照组明显延长($P < 0.01$)。

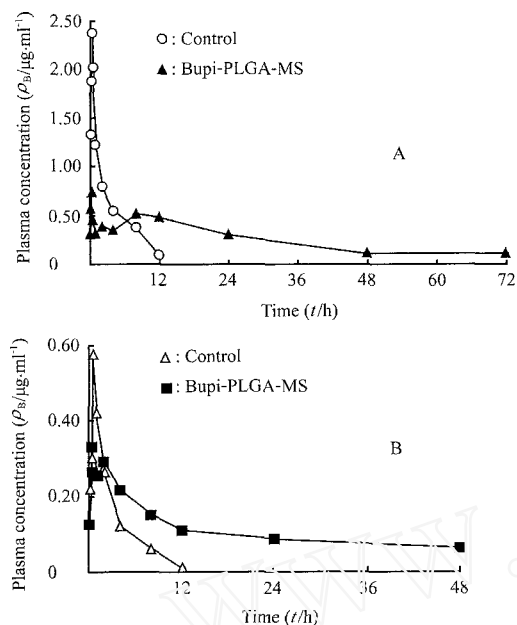


图3 皮下给药(A)和蛛网膜下腔给药(B)后兔血药浓度
Fig 3 Plasma concentration of bupivacaine in rabbits after a single dose of 15 mg/kg by subcutaneous administration(A) and 10 mg/kg by spinal administration(B)

注射剂对照组与微球实验组蛛网膜下腔给药后,微球组不同麻醉阶段的麻醉时间 t_1 (460 min)、 t_2 (307.5 min)、 t_3 (242.5 min)以及麻醉有效总时间 t (1 010 min)和综合评分 S (1 860)值均显著大于注射剂对照组的不同麻醉阶段的麻醉时间 t_1 (45 min)、 t_2 (83.8 min)、 t_3 (53 min)以及麻醉有效总时间 t (181.8 min)和综合评分 S (328)值($P < 0.01$), t 值延长4.5倍,且微球实验组评分值为1的麻醉持续时间显著长于评分值为2和3的麻醉持续时间($P < 0.01$),而注射剂对照组评分值为1的麻醉持续时间显著小于评分值为2和3的麻醉持续时间($P < 0.01$),说明微球混悬剂兔蛛网膜下腔给药后对运动神经和感觉神经的阻断作用显著长于常规注射剂,且对感觉神经阻断作用的延长更为显著。

3 讨论

用于制备 PLGA 微球的方法很多,根据不同性

质的药物可选择不同的制备方法,如相分离凝聚法、乳化蒸发法、复乳液中干燥法、低温喷雾提取法、喷雾干燥法以及超临界萃取法等。本研究采用的乳化蒸发法工艺简单,药物载药量大,制备成本低,微球回收率高。文献报道^[5]在采用乳化溶媒蒸发法制备微球时,用0.3%的PVA溶液为分散介质,但试验中发现制得微球的大小悬殊,后改用50%药用甘油和1%的海藻酸钠溶液为分散介质,效果较好,由于50%药用甘油成本较高,故采用1%海藻酸钠溶液为分散介质。为提高包封率另加0.02 mol/L的氢氧化钠调节分散介质pH。

微球组血药浓度出现双峰现象,是由于吸附于微球表面的药物突释后产生第一峰,由于微球中药物的中期释放被机体吸收后形成第二峰,而随后的后期缓慢释放使血药浓度长时间维持较低水平。在本研究中,吸附于微球表面的药物的突释作用很快被吸收产生麻醉作用,而随后的缓慢释放可部分补充药物的代谢量,产生持久的麻醉止痛作用,这是临床应用中期望的,因此在微球制备过程中应尽量保持吸附于微球表面的药物不被洗掉,以维持一定的突释量。

[参考文献]

[1] Gorner T, Gref R, Michenot D, et al. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix[J]. *J Control Rel*, 1999, 57(3):259-268.
[2] Polakovic M, Gorner T, Gref R, et al. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres. II. Modelling of drug release[J]. *J Control Rel*, 1999, 60(2-3):169-177.
[3] Le Corre P, Estebe JP, Chevane F, et al. Spinal controlled delivery of bupivacaine from D, L-lactic acid oligomer microspheres[J]. *J Pharm Sci*, 1995, 84(2):75-78.
[4] Malinovsky JM, Le Corre P, Meunier JF, et al. A dose-response study of epidural liposomal bupivacaine in rabbits[J]. *J Control Rel*, 1999, 60(1):111-119.
[5] Huang YY, Chung TW, Tzeng TW. A method using biodegradable polylactides/polyethylene glycol for drug release with reduced initial burst[J]. *Int J Pharm*, 1999, 182(1):93-100.
[6] 俞媛,高申,钟延强,等.反相高效液相色谱法测定布比卡因血药浓度[J]. *中国医院药学杂志*, 2002, 22(5):281-283.
Yu Y, Gao S, Zhong YQ, et al. Determination of bupivacaine in plasma by RP-HPLC[J]. *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi (Chin Hosp Pharm J)*, 2002, 22(5):281-283.
[7] Lev L, Gershon C, Eliyahu G, et al. A rabbit model for evaluation of spinal anesthesia: chronic cannulation of the subarachnoid space[J]. *Anesth Analg*, 1990, 71(5):529-535.

[收稿日期] 2003-12-07

[修回日期] 2004-04-23

[本文编辑] 尹茶