

左旋多巴甲酯缓释微球的研究 *

任甜甜 郑瑞媛 胡振华 蔡云鹏 陈晓静 朱涵蕾 袁伟恩[△]

(上海交通大学 上海 200240)

摘要 目的: 由于长期服用左旋多巴治疗帕金森病, 其药物浓度波动刺激易引起异动症, 本实验旨在制备突释小、药物释放浓度稳定的左旋多巴甲酯微球制剂。方法: 将左旋多巴甲酯用复乳法包裹于 PLGA 微球内, 采用 C18 反相色谱研究药物包封率和体外释放行为。结果: 通过调节药物浓度和不同高分子组合筛选出突释小、包封率高且缓慢释放的处方。结论: 左旋多巴甲酯包裹于 PLGA 能够实现理想的缓释效果, 降低药物浓度波动, 为后期药效学实验提供基础。

关键词 左旋多巴甲酯; PLGA 微球; 缓释; 帕金森氏病; 异动症

中图分类号 R944.2 R742.5 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)11-2034-03

Research of Levodopa Methyl Ester-loaded Microspheres Delivery System*

REN Tian-tian, ZHENG Rui-yuan, HU Zhen-hua, CAI Yun-peng, CHEN Xiao-jing, ZHU Han-lei, YUAN Wei-en[△]

(Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

ABSTRACT Objective: Chronic administration of levodopa in the treatment of PD leads to debilitated involuntary movements, we aimed to prepare levodopa methyl ester-loaded sustained release microspheres without initial burst. **Methods:** Levodopa methyl ester (LDME) were microencapsulated into PLGA microspheres by multiple emulsion technique. The encapsulation efficiency and vitro release of microspheres were detected using HPLC system equipped with a C18 reverse column. **Results:** By adjusting LDME concentration and different polymer combinations, we achieved microspheres with high encapsulation efficiency, low initial burst and sustained release. **Conclusions:** LDME would achieve sustained release while encapsulated into PLGA microspheres, which provided a basis for later pharmacodynamic study.

Key words: LDME; PLGA microspheres; Sustained release; Parkinson's disease; Levodopa-induced dyskinesia

Chinese Library Classification: R944.2, R742.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)11-2034-03

前言

帕金森氏病(Parkinson disease, PD)是一种中老年人常见的神经退行性疾病^[1]。临床表现为静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态异常等^[2]。帕金森病症状的出现与中脑黑质内多巴胺能神经元变性导致纹状体内多巴胺神经递质水平降低有关,且只有纹状体内多巴胺神经递质水平降到很低时才出现帕金森病的临床症状^[3]。至今,左旋多巴仍是治疗 PD 的主要手段^[4],然而左旋多巴治疗 PD 的“蜜月期”一般是 2-5 年,长期浓度波动刺激将导致运动并发症,包括异动症、症状波动及开关现象等^[5-9]。持续多巴胺能刺激(CDS)的治疗策略是近年来帕金森病治疗理念的最新进展,有望解决运动波动等困扰帕金森病患者的难题^[10]。

由于左旋多巴可溶性差、吸收困难,只 1%进入中枢转化为多巴胺起效。左旋多巴甲酯(Levodopa methyl ester, LDME)是左旋多巴重要的衍生物,克服了左旋多巴的缺点,具有易溶于水、易进入血脑屏障、易进入眼球组织细胞、吸收快的特点,疗效明显优于左旋多巴^[11,12]。因此本研究旨在筛选出合适的左旋多巴甲酯缓释微球制剂,达到持续释放药物,减少药物浓度波动的

目的,为后期药效学验证异动症发生率打下基础。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Sartorius-BS110S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);XW-80A 涡旋混合器(上海其特分析仪器有限公司);JJ-1 增力电动搅拌机(金坛市新航仪器厂);冻干机(Anker TGL-16C);SPD-20A 液相紫外检测器(日本岛津公司);LC-20AT 液相溶剂输送泵(日本岛津公司);C18 反相色谱柱(Agilent 公司)。

左旋多巴甲酯(Sigma 公司);柠檬酸(台山市新宁制药有限公司);PLGA (Lakeshore Biomaterials 公司);PVA、二氯甲烷、磷酸、磷酸二氢钾和氯化钠由国药集团化学试剂有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 左旋多巴甲酯微球的制备 称取适量 PLGA 溶于二氯甲烷,加入适量左旋多巴甲酯粉末或不同浓度甲酯水溶液,磁力涡旋使之分散均匀,之后迅速转移至 4g 1%PVA+5%NaCl 的混合溶液中,磁力搅拌形成半固化的微球,再转移至 1L5%NaCl

* 基金项目:国家重大专项—“重大新药创制”科技重大专项—创新药物研究开发技术平台(2009ZX09310-007)

上海科委项目(No.0952nm03700 和 No.1052nm03900)和上海交通大学大学生创新项目(IPP2090)

作者简介:任甜甜(1984-),女,硕士,研究方向:缓释制剂,13774250585,E-mail: tiantian5097@163.com

[△]通讯作者:袁伟恩,E-mail: yuanweien@126.com

(收稿日期:2011-01-05 接受日期:2011-01-28)

水溶液中固化 2 小时,沉降法收集微球,用超纯水洗涤十次,冷冻干燥后密封保存于冰箱中^[13]。

1.2.2 左旋多巴甲酯体外释放方法 称取 10mg 微球放入释放瓶中,加入 1mLpH3.5 的缓冲液,置于 37℃ 气浴摇床,转速为 100rpm,每日定时取样,将所有液体取出 4℃ 冰箱保存待测,并补充新鲜释放液 1mL 于释放瓶中。

1.2.3 左旋多巴甲酯体外释放检测方法 仪器:岛津液相系统;色谱柱:Agilent TC-C18 色谱柱(4.6× 250mm);流动相 pH3.5 的柠檬酸缓冲液;流速:0.8mL/min;检测波长 280nm;柱温:室温;进样量 20μL。

2 结果

2.1 左旋多巴甲酯水溶液浓度对释放的影响

从表 1 我们看到左旋多巴甲酯浓度越低,包封率就越低,并且第一天突释也越大。从图 1 我们知道左旋多巴甲酯水溶液浓度越低释放越快,处方 3 和处方 4 突释较严重,在第一天释放超过 70%。处方 1 和处方 2 释放曲线较好,其中处方 1 释放 3 周以上,基本没有突释,释放曲线接近零级释放,适合长效制剂。处方 2 释放约 7 天,基本没有突释,接近零级释放。

表 1 左旋多巴甲酯微球处方

Table 1 Formulation of LDME-loaded microspheres

Formulation	1	2	3	4
LDME(mg/mL)	Powder	250	200	150
Polymer	PLA:PLGA3A=3:2			
First day release(%)	8.56	16.79	73.01	73.31
Encapsulation efficiency(%)	96.77	76.3	78.49	59.85

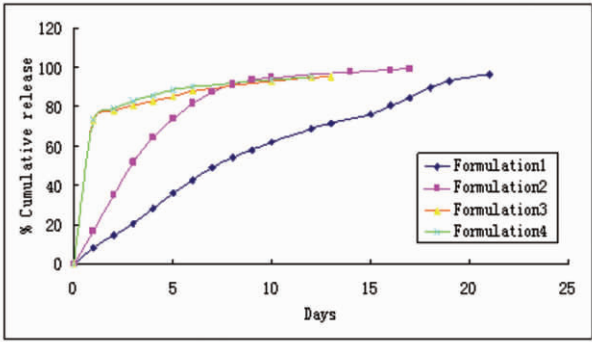


图 1 PLGA 微球的体外释放曲线
Fig. 1 Release profile of PLGA microspheres

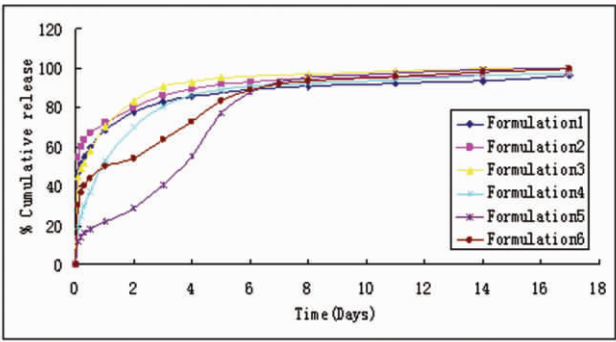


图 2 微球各处方体外释放曲线
Fig. 2 Release profile of microspheres

2.2 高分子材料对左旋多巴甲酯释放的影响

如表 2 所示,本组一共制备 6 个处方的微球,考察加入 PEG8000、PLGA1A 或 2A 这 3 种降解时间相对较短的高分子对释放行为的影响。从图 2 我们得知加入 PEG、PLGA1A 或 2A

后释放加快,在一周内基本释放完全。加入 PEG 或 PLGA1A 的 4 组微球突释明显,但加入 PLGA2A 的 2 组曲线较好,在总体上缩短了释放周期,但曲线突释不明显,尤其处方 5 释放曲线较好。

表 2 左旋多巴甲酯微球处方

Table 2 Formulation of LDME-loaded microspheres

Formulation	1	2	3	4	5	6
LDME	250mg/mL					
Polymer(mg)	PLA:PLGA3A=60:40					
	PEG=20	PEG=15	PLGA1A=20	PLGA1A=15	PLGA2A=20	PLGA2A=15
First 2h release(%)	46.63	54.49	45.12	19.13	11.99	30.29
Encapsulation efficiency(%)	27.87	74.83	54.37	50.21	77.78	57.54

3 讨论

左旋多巴是目前治疗帕金森病最有效的药物,然而治疗

5-10 年后易引发异动症,其发生机理至今仍不明确。研究表明异动症的发生与左旋多巴浓度不断波动刺激有关^[14,15]。因此有学者认为维持左旋多巴药物浓度对降低异动症发生有帮

助^[16,17]。

现有的左旋多巴制剂多为片剂或胶囊,药效短,每天需多次给药,药物浓度波动明显。本实验制备的左旋多巴甲酯微球包封率高,突释小,能实现药物持续缓慢释放。通过调节左旋多巴甲酯浓度可以改变药物释放周期,制备微球时甲酯浓度越稀释放越快。其中直接包裹左旋多巴甲酯药物粉末的微球释放时间最长,可能药物颗粒本身有一定大小,包裹于微球内后需先溶于水才能释放,药物在微球内的分布与将药物溶于水制备成的微球不同。通过改变不同降解周期的高分子组合也可以控制药物释放速率,得到不同释放周期的微球。从实验结果我们可以看出本实验方法能按要求制备不同释放周期的微球,并且确保释放行为良好。其中加入药物粉末和高浓度药物水溶液(250mg/mL)制备的微球能分别达到3周和1周的释放周期,且突释小,释放行为接近零级释放。

本实验主要尝试制备左旋多巴甲酯缓释微球制剂,筛选出释放行为良好的处方,为后期验证缓释制剂能否降低异动症发生率提供实验基础。

参考文献(References)

- [1] Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT. Pathogenesis of Parkinson's disease[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2001, 2(5):657-662
- [2] Zhou Q, Zhang SZ, Xu RX. Actuality and prospect of treatment about Parkinson's disease [J]. Zhongguo Linchuang Kangfu, 2004, 8(16): 3102-3106
- [3] Andres M, Iozano, Suneil K, Kalia. New Movement in Parkinson's [J]. Science, 2005, 6:58-65
- [4] Eskow KL, Dupre KB, Barnum CJ, et al. The role of the dorsal raphe nucleus in the development, expression, and treatment of L-dopa-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats [J]. Synapse, 2009, 63(7): 610-620
- [5] Aubert I, Guigoni C, Li Q, et al. Enhanced preproenkephalin-B-derived opioid transmission in striatum and subthalamic nucleus converges upon globus pallidus internalis in L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia[J]. Biol Psychiatry, 2007, 61(7):836-844
- [6] Bishop C, Taylor JL, Kuhn DM, et al. MDMA and fenfluramine reduce L-DOPA-induced dyskinesia via indirect 5-HT1A receptor stimulation[J]. Eur J Neurosci, 2006, 23(10):2669-2676
- [7] Jaunarajs KL, Dupre KB, Steiniger A, et al. Serotonin 1B receptor

stimulation reduces D1 receptor agonist-induced dyskinesia [J]. Neuroreport, 2009, 20(14):1265-1269

- [8] Carta M, Carlsson T, Kirik D, et al. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats[J]. Brain, 2007, 130(Pt 7):1819-1833
- [9] Meissner W, Ravenscroft P, Reese R, et al. Increased slow oscillatory activity in substantia nigra pars reticulata triggers abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat in the presence of excessive extracellular striatal dopamine [J]. Neurobiol Dis, 2006, 22(3): 586-598
- [10] Morissette M, Dridi M, Calon F, et al. Prevention of levodopa-induced dyskinesias by a selective NR1A/2B N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in parkinsonian monkeys: implication of preproenkephalin[J]. Mov Disord, 2006, 21(1):9-17
- [11] 蒋伟哲. 左旋多巴甲酯盐酸盐的合成及纯化方法[C]. 中华人民共和国, 200610125071.X[P]. 2007-04-25
- [12] Huang Min, Jiang Weizhe, Huang Xingzhen, et al. Study on stability of L-dopa methyl ester hydrochloride solution[C]. China Pharmaceuticals, 2008, 17(8): 29-30
- [13] Geng Yan, Yuan Weien, Wu Fei, et al. Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation[J]. J. Control. Release, 2008, 130: 259-265
- [14] Hemmings H.C. Jr, Greengard P, Tung H.Y, et al. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1[J]. Nature, 1984, 310 (5977): 503-505
- [15] Santini E, Valjent E, Uziel A, et al. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia [J]. J. Neurosci. 2007, 27: 6995-7005
- [16] Kim D.S, Palmiter R.D, Cummins A, et al. Reversal of supersensitive striatal dopamine D1 receptor signaling and extracellular signal-regulated kinase activity in dopamine-deficient mice [J]. Neuroscience, 2006, 137(4): 1381-1388
- [17] Smith L.A, Jackson M.J, Al-Barghouty G, et al. Multiple small doses of levodopa plus entacapone produce continuous dopaminergic stimulation and reduce dyskinesia induction in MPTP-treated drug-naive primates[J]. Mov. Disord, 2005, 20 (3):306-314