

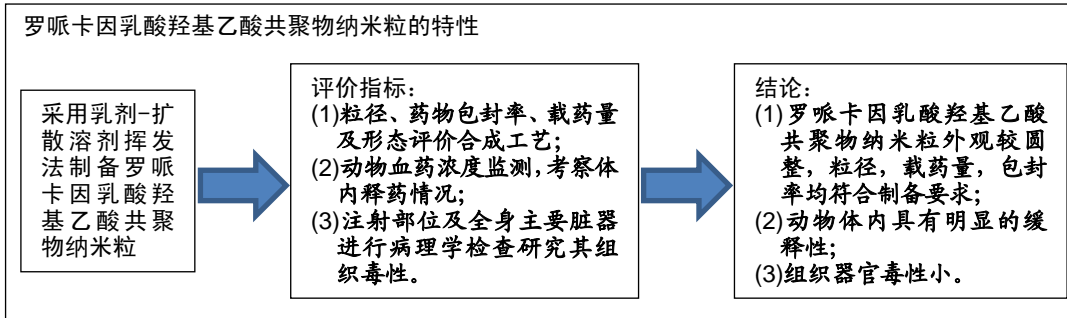
罗哌卡因乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒制备及动物体内的缓释

田洪居^{1,2}, 陈仲清² (¹厦门市海沧医院重症医学科, 福建省厦门市 361026; ²南方医科大学附属南方医院重症医学科, 广东省广州市 510515)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1535

ORCID: 0000-0002-4167-7988(田洪居)

文章快速阅读:



田洪居, 男, 1976年生, 福建省诏安县人, 汉族, 南方医科大学在读博士, 副主任医师, 主要从事局麻药缓释系统研究。

通讯作者: 田洪居, 副主任医师, 厦门市海沧医院重症医学科, 福建省厦门市 361026; 南方医科大学附属南方医院重症医学科, 广东省广州市 510515

文献标识码:A

稿件接受: 2018-09-06



文题释义:

乳酸羟基乙酸共聚物: 是一种生物可降解的分子材料, 易于合成, 便于存放, 质量稳定, 可以在 1 个月内完全降解, 最终产物是无毒性的 CO₂ 和水。作为缓释系统骨架是一理想的载体材料, 被广泛应用于各种药物的缓释。

罗哌卡因: 是一种新型长效酰胺类局部麻醉药, 相对于其他局部麻醉药, 具有较好的感觉-运动阻滞分离, 毒性低的特点, 是目前最常用于镇痛的局部麻醉药。

摘要

背景: 课题组前期进行了罗哌卡因乳酸羟基乙酸共聚物微球合成工艺及其药物动力学的研究, 并证实其有效性, 但因颗粒较大, 限制其在注射方面的应用, 且存在对组织的刺激等不良反应。

目的: 采用乳剂-扩散溶剂挥发法制备罗哌卡因乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒, 研究其粉粒学特征、体内释药特性及组织毒性。

方法: 以乳酸羟基乙酸共聚物为载体, 采用乳剂-扩散溶剂挥发法制备罗哌卡因乳酸羟基乙酸共聚物微球并加以研磨过滤, 计算纳米粒的粒径、药物包封率、载药量及形态等参数。选取 100 只昆明小鼠(南方医科大学动物实验中心提供), 随机分为实验组和对照, 将罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒悬浮液注射入实验组小鼠颈部皮下, 对照组小鼠给予等剂量 0.5% 盐酸罗哌卡因。分别于药物注射后 30 min 及 1, 2, 3, 6, 10, 18, 24, 36, 48 h 进行血药浓度监测, 观察体内释药情况, 对注射部位及全身主要脏器进行病理学检查以检测其组织学毒性。

结果与结论: ①制备的罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒, 粒径为(73.5±16.7) nm, 载药量为(6.07±0.22)%, 包封率为(62.73±4.83)%; ②动物体内实验结果显示: 实验组小鼠与对照组相比, 血药浓度明显降低(P=0.00)。对照组药物留置时间约 6 h, 实验组药物留置时间约 48 h, 药物持续缓释; ③实验组小鼠药物注射局部组织仅见轻微炎症反应, 每组小鼠均未见组织细胞坏死及全身主要脏器的病理学改变; ④结果提示, 罗哌卡因乳酸羟基乙酸纳米粒可以成功制备, 动物体内具有明显的缓释性, 组织器官毒性小。

关键词:

罗哌卡因; 乳酸羟基乙酸共聚物; 纳米粒; 乳化溶剂挥发法; 缓释性; 镇痛; 组织相容性; 载药量; 包封率

主题词:

酰胺类; 药物释放系统; 组织相容性; 组织工程

中图分类号: R453; R318

基金资助:

福建省卫生厅青年课题基金(2010-2-104), 项目负责人: 田洪居

Poly(lactid-co-glycolide) nanoparticles loaded with ropivacaine: preparation and *in vivo* release in animals

Tian Hongju^{1,2}, Chen Zhongqing² (¹Department of Intensive Care Unit, Xiamen Haicang Hospital, Xiamen 361026, Fujian Province, China; ²Department of Intensive Care Unit, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Synthesis of ropivacaine-loaded poly(lactid-co-glycolide) copolymer microsphere and its pharmacokinetics have been studied preliminarily, and we have confirmed its effectiveness. However, its large

Tian Hongju, Doctorate candidate, Associate chief physician, Department of Intensive Care Unit, Xiamen Haicang Hospital, Xiamen 361026, Fujian Province, China; Department of Intensive Care Unit, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Corresponding author: Tian Hongju, Department of Intensive Care Unit, Xiamen Haicang Hospital, Xiamen 361026, Fujian Province, China; Department of Intensive Care Unit, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

size and tissue simulation limit its application.

OBJECTIVE: To prepare poly(lactid-co-glycolide) nanoparticles loaded with ropivacaine and to study their particle characteristics, *in vivo* release characteristics and toxicity.

METHODS: Poly(lactid-co-glycolide) nanoparticles loaded with ropivacaine were prepared with poly(lactid-co-glycolide) as carriers by the water-in-oil-in-water emulsion solvent evaporation method. The micromeritic characteristics of the nanoparticles, such as the particle size, loading and entrapment efficiency were taken as parameters for evaluating. One hundred Kunming mice provided by the Laboratory Animal Centre of Southern Medical University in China were randomized into experimental and control groups, and then were subcutaneously injected with poly(lactid-co-glycolide) nanoparticles loaded with ropivacaine and 0.5% ropivacaine, respectively. Blood concentration monitoring was performed at 30 minutes, 1, 2, 3, 6, 10, 18, 24, 36 and 48 hours after administration. Drug release was observed *in vivo*, and pathological examinations were performed on the injection site and main body organs to study its tissue toxicity.

RESULTS AND CONCLUSION: The poly(lactid-co-glycolide) nanoparticles loaded with ropivacaine were prepared. The average particle size was (73.5 ± 16.7) nm, the drug loading efficiency was $(6.07 \pm 0.22)\%$, and the encapsulation efficiency was $(62.73 \pm 4.83)\%$. The blood drug concentration in the experimental group was significantly lower than that in the control group ($P=0.00$). The drug retention time in the control and experimental groups was 6 and 48 hours, respectively, indicating the drug release sustained. The mice in the experimental group appeared with mild inflammation in the injection site, and no obvious pathological changes in major organs or necrotic cells occurred. To conclude, poly(lactid-co-glycolide) nanoparticles loaded with ropivacaine can be successfully prepared, and can achieve sustained-release in animals, and have low toxicity.

Subject headings: Amides; Drug Delivery Systems; Histocompatibility; Tissue Engineering

Funding: the Youth Foundation of Health Department of Fujian Province, No. 2010-2-104 (to THJ)

0 引言 Introduction

术后急性疼痛是临床上常见且具有挑战性的问题，常常发生在术后48 h内，镇痛不全会影响术后患者的生活质量以及各器官功能的恢复，而导致各种并发症的发生，延长住院时间，增加住院费用，另外术后镇痛不充分往往会转变为慢性疼痛，严重影响患者后期的生活质量及生活健康^[1-3]。临床上常采用水杨酸类药物如对乙酰氨基酚，或者阿片类药物如吗啡等进行全身用药镇痛，但这些药物不良反应大，尤其是阿片类药物会引起恶心、呕吐、呼吸抑制甚至药物成瘾等。目前局部应用局麻药进行神经阻滞镇痛是一种直接有效的方法，使镇痛不良反应及并发症显著减少，得到临床一致青睐^[4-5]。但现有的局部麻醉药作用时间短，单次给药只能维持几个小时，不能满足临床上的镇痛要求^[6]。为达到有效的镇痛，临床医生常采用间断注射局麻药或体内导管植入持续给药方式进行镇痛，但需要比较昂贵的设备及连续监护，多次注射导致神经损伤，长时间留置导管易引起感染及导管移位等问题^[7-10]。因此需要合成一种长效的局部麻醉药制剂，便于单次给药就能满足术后的镇痛需要^[11]。

当前研究以乳酸羟基乙酸为载体，优化前期研究，将新型局部麻醉药-罗哌卡因制备成缓释制剂罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒，配成悬浮液并在动物身上考察其体内释放情况及局部组织和全身主要脏器的毒性，目的在于制备符合单次给药满足术后镇痛的局部麻醉药制剂。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 工艺研究。

1.2 时间及地点 于2016年4月至2017年2月在南方医科大学附属南方医院药学部完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 清洁级健康2月龄昆明小鼠100只，雌雄随机，体质量20-22 g，由南方医科大学动物实验中心提供，

许可证号：scxk(粤)2016-00152006B128。对动物的处理均符合伦理学准则^[12]。

1.3.2 实验仪器及试剂 Coulter multisizer—II型粒子计数器(库尔特电子仪器公司，美国)；TGL-16B、TDL-5型台式离心机(上海安亭科学仪器厂，中国)；FJ-200型高-速分散均质机(上海标本模型厂，中国)；CL-2型恒温磁力搅拌器(河南巩义市英峪予华仪器厂，中国)，S-3000N扫描电子显微镜(日立公司，日本)，罗哌卡因(恒瑞制药股份有限公司，批号：20160147，纯度：99%，中国)；乳酸羟基乙酸(75/25，山东省医疗器械研究所，批号：15062305，中国)；聚乙烯醇(北京百灵威化学技术有限公司，批号：19002-89-5，纯度：88%，中国)。

1.4 方法

1.4.1 罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒的制备

制备流程：①有机相的制备：精确称量50 mg乳酸羟基乙酸共聚物，将其溶于10 mL二氯甲烷，即得有机相；②内水相的制备：准确称取罗哌卡因10 mg，溶于5 mL的蒸馏水中，以超声促溶即得所需的内水相；③外水相的制备：称取聚乙烯醇10 mg，在磁力搅拌的条件下缓慢加入40 mL蒸馏水中，并逐渐加热，直至聚乙烯醇彻底溶解，液体呈透亮液体，冷却至常温，即得所需外水相；④初乳的制备：将制备好的药物溶液(内水相)5 mL加入10 mL的药物溶液(内水相)中，以薄膜封口，防止二氯甲烷挥发，在高速分散均质机下快速均质90 s，形成乳白色乳液即初乳；⑤复乳的制备：初乳制备成后以5 mL注射器装载缓慢滴加入事先备好的的外水相中，并以恒温磁力搅拌器以较快转速持续搅拌30 min，形成乳白色乳液即复乳；⑥纳米粒的固化及收集 复乳液继续以恒温磁力搅拌器持续搅拌4 h，搅拌速度减慢，200 r/min，保持复乳中形成的微球颗粒处于分散状态，搅拌过程中，随着有机溶剂二氯甲烷的逐渐挥发，微球固化，干燥后进行研磨过滤，用双蒸水洗涤3次，收集微粒，真空冷冻干燥48 h后，储存在温度为4 ℃

的干燥器中, 待用。

处方优化: 微粒质量的影响因素较多, 前期研究的基础上, 固定其他因素, 对罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒的制备和性质影响显著的4个因素: ①内水相体积分数(A), ②内水相罗哌卡因质量浓度(B), ③有机相乳酸羟基乙酸质量浓度(C), ④外水相聚乙烯醇质量浓度(D)。按L9(34)正交表设计进行实验, 以纳米粒径、包封率、载药量为指标, 选最佳工艺条件, 按正交试验结果得出的最优制备工艺条件, 重复3次, 考察制备工艺的重现性见表1。采用SPSS 20.0统计分析软件对数据结果进行多元线性回归分析, 所得方程为: $Y_1=89.870-8.737X_1-8.825X_2+4.462X_3-0.956X_4(r=0.896)$; $Y_2=0.375+1.697X_1+1.719X_2-1.290X_3-0.420X_4(r=0.957)$; $Y_3=1.896+0.03X_1-0.026X_2+1.405X_3-0.411X_4(r=0.995)$ 。其中 Y_1 , Y_2 , Y_3 分别表示微球包封率、载药量和粒径; X_1 , X_2 , X_3 分别表示A、B、C、D 4个影响因素。

表1 因素水平表
Table 1 Factor-level table

水平	因素			
	A(% , V)	B(% , g/L)	C(% , g/L)	D(% , g/L)
1	0.08	1.5	5	0.5
2	0.16	3	10	1
3	0.24	4.5	15	1.5

表注: A 为内水相体积分数, B 为内水相罗哌卡因质量浓度, C 为有机相乳酸羟基乙酸质量浓度, D 为外水相聚乙烯醇质量浓度。

1.4.2 罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒载药量及包封率的测定 ①采用反相高效液相色谱法测定罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒中的罗哌卡因含量。色谱条件: 色谱柱C(4.6 mm×150 mm, 5 μL); 流动相为乙腈: 甲醇: NaH₂PO₄, 调pH值=4.6(体积分数26: 18: 56), 流速1 mL/min, 进样量20 μL, 布比卡因为测量罗哌卡因的内标物, 罗哌卡因在0.5-10 mg/L范围内线性关系好, 最低检测限为50 μg/L; ②精密称取经真空冷冻干燥的微粒10 mg, 置于10 mL容量瓶中, 取布比卡因液(100 g/mL)1 mL, 用乙腈溶解并定容至刻度, 使其充分溶解, 高速离心后取上清液过滤, 取滤液0.1 mL, 再取流动相0.9 mL与之混合, 充分混匀后离心, 此时内标液浓度为1 mg/L, 取上清液20 μL进样, 用反相高效液相色谱法测定, 记录色谱图, 用标准曲线计算罗哌卡因含量。

按上述优化后处方及制备方法, 制备3批次样品, 试验号分别为01, 02, 03, 并对制备的3批样品的主要参数进行测定, 取均值。包封率(%)=微粒中实际含药量/理论投药量×100%, 载药量(%)=微粒中实际含药量/微粒总质量×100%。

1.4.3 罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒的粒径测定 将制备好的罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒以蒸馏水复溶, 吸取

0.1 mL的罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒溶液滴于铜网上, 干燥、体积分数0.2%磷钨酸负染, 置电镜下观察。吸取0.1 mL相应样品, 用去离子水稀释至测量杯中, 以粒子计数器测定纳米粒的粒径, 测定同时分别给出平均粒径和粒径分布情况。

1.4.4 体内释放研究

实验动物分组: 将小鼠随机分为实验组和对照组, 每组各50只。根据预实验及前期研究, 将已制备的罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒称取70 mg 50份, 每1份都经过超声乳化配成悬浮液2 mL, 分别对实验组小鼠进行皮下注射; 0.5%盐酸罗哌卡因0.1 mL稀释成2 mL, 分别对对照组小鼠进行皮下注射, 注射部位均为颈部松弛皮肤。每组按药物注射后30 min、1, 2, 3, 6, 10, 18, 24, 36及48 h进一步分为10个亚组(n=5)。

样品的处理与血浆药物浓度测定: 每组小鼠的各亚组均在相应时间点进行眼眶取血0.5 mL, 肝素抗凝, 3 500 r/min离心8 min, 取分离的血浆0.3 mL, 于-20 °C冰箱储存。测定时, 室温下溶解, 取血浆标本200 μL加入内标液(1.0 mg/L)400 μL均匀混合, 加入甲醇100 μL, 漩涡2 min(10 000 b/min), 离心10 min, 提取适量上清液, 20 μL自动进样。

色谱条件: 色谱柱: Shim-pack VP-ODS 250 L* 4.6 mm, 柱温: 室温; 流动相: 甲醇: 己腈: 水(20 mm NaH₂PO₄ 调pH至4.6)= 体积比27: 13: 60, 流速1.0 mL/min; 检测波长为210 nm; 以布比卡因为内标; 峰面积法为定量方法; 自动进样量: 20 μL。

标准工作曲线溶液的配制及曲线制备: 精密称取罗哌卡因标准溶液, 用小鼠血浆依次稀释成0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0和4.0 mg/L的含药血浆。以罗哌卡因峰面积与内标峰面积比对罗哌卡因的质量浓度(mg/L)进行线性回归, 得线性方程为 $Y=0.2987X-0.0037$, 相关系数 $r=0.99998$ 。在罗哌卡因的质量浓度为0.05-4.0 mg/L范围内线性关系良好, 最低检测限为0.05 mg/L。根据标准曲线, 计算出血浆的药物浓度。

1.4.5 组织器官毒性观察 2周后处死实验小鼠, 进行解剖, 留取小鼠的局部组织及全身主要脏器(心脏, 肝, 脾, 肺, 肾, 脑), 用体积分数4%甲醛固定, 石蜡包埋, 切片为6 μm, 使用标准的苏木精-伊红染色方法, 随后在200倍光学显微镜下观察其病理学改变。

1.5 统计学分析 实验数据及图表均用SPSS 20.0及GraphPad Prism 5统计软件处理, 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用配对t 检验。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用小鼠100只, 进行上述实验分组, 实验开始后, 各组小鼠饮食活动正常, 实验14 d后, 小鼠均无意外死亡。

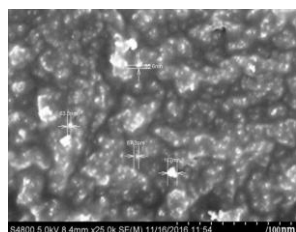
2.2 制备样品的主要参数结果 采用反相高效液相色谱法, 根据公式测得平均载药量和包封率分别为(7.24±0.69)%和(62.73±4.83)%。用粒子计数器测定的平均纳米粒径为(73.5±16.7) nm, 见表2。

表2 微球的平均粒径、载药量与包封率

Table 2 Mean particle diameter, drug loading and encapsulation efficiency of poly(lactid-co-glycolide) nanoparticles loaded with ropivacaine

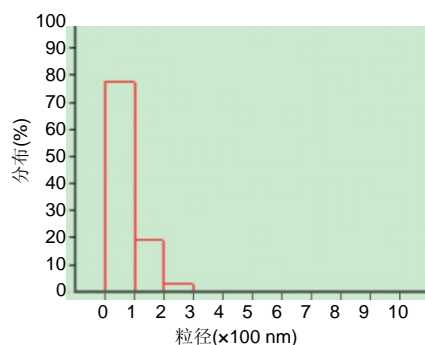
样品号	粒径(nm)	包封率(%)	载药量(%)
01	78.5	60.24	6.88
02	68.9	62.78	7.34
03	74.5	63.21	7.54
均值($\bar{x}\pm s$)	73.5±16.7	62.73±4.83	7.24±0.69

2.3 罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒的透射电镜观察 罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒为颗粒状, 粒径小, 分布均匀, 外观为近似球形, 无粘连, 见图1, 粒子计数器测定的平均粒径为(73.5±16.7) nm, 80%分布于65-80 nm之间, 见图2。



图注: 罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒为颗粒状, 粒径小, 分布均匀, 外观为近似球形。

图1 罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒电镜扫描图片(x200)
Figure 1 Scanning electron microscope observation of poly(lactid-co-glycolide) nanoparticles loaded with ropivacaine (x200)

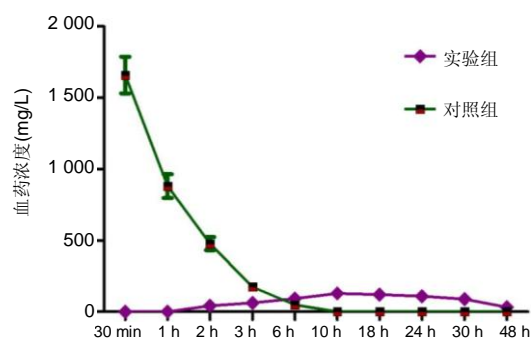


图注: 80%罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒的粒径分布于 65-80 nm 之间。

图2 罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒粒径分布图
Figure 2 Particle size distribution of poly(lactid-co-glycolide) nanoparticles loaded with ropivacaine

2.4 罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒小鼠体内释放结果 对照组小鼠在给药后30 min时药物浓度均快速达到(1 659.11±128.39) mg/L, 3 h迅速降至(174.40±23.78) mg/L,

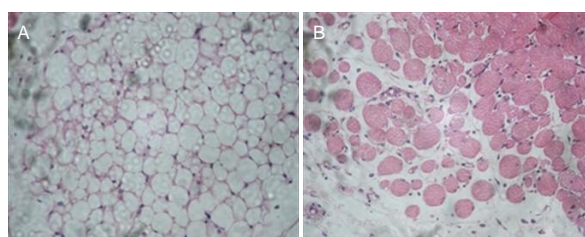
6 h时(49.20±31.92) mg/L, 药物留置时间约6 h。实验组小鼠2 h时后血浆方能测及罗哌卡因浓度为(42.80±18.77) mg/L, 10 h达(129.80±25.70) mg/L, 30 h后下降至(89.20±31.92) mg/L, 48 h测及(32.77±28.99) mg/L, 药物留置时间约48 h。实验组小鼠与对照组相比, 血药浓度明显降低($P=0.00$), 药物持续缓释, 见图3。



图注: 与对照组相比, 实验组小鼠血药浓度明显降低, 药物持续缓释。

图3 两组小鼠在给药后相应时间点的罗哌卡因血浆浓度($n=5$)
Figure 3 Plasma concentration of ropivacaine in each group at different time points

2.5 小鼠局部组织及全身主要脏器的病理学改变 病理切片所见, 实验组小鼠罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒注射部位的周围肌肉结缔组织见轻微炎症反应, 无感染、组织细胞坏死及组织纤维化等反应, 组织结构完整, 周围可见少许巨噬细胞吞噬, 并可降解罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒, 形状保持尚完整, 见图4; 对照组小鼠单纯罗哌卡因注射部位的周围肌肉结缔组织未见任何病理学改变。每组小鼠的主要脏器如心脏、脑、肺、肝脏、肾、脾均未见明显组织结构异常及各种病理学改变。



图注: 图中A为结缔组织, B为肌肉组织。可见轻微炎症反应, 组织结构完整, 周围可见少许巨噬细胞吞噬。

图4 小鼠罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒注射部位局部病理变化(苏木精-伊红染色, x200)

Figure 4 Pathological changes of the injected site after injection of poly(lactid-co-glycolide) nanoparticles loaded with ropivacaine under light microscope (hematoxylin-eosin staining, x200)

3 讨论 Discussion

随着药物缓释技术的发展, 药物缓释制剂能优化药动学, 降低药物本身的毒性, 尽可能延长药物的作用时间, 避免给药后即刻出现的局部组织或血药浓度过高和潜在的毒性^[12-14]。为满足单次给药进行临床镇痛, 国内外学者对

局麻药缓释制剂做了大量的研究工作, 其中出现了局部麻醉药脂质体、微球及以微凝胶等降解缓释系统的研究, 但由于载体毒性大等原因限制其研究^[15-17]。

乳酸羟基乙酸共聚物是一种生物可降解的分子材料, 易于合成, 便于存放, 质量稳定, 可以在1个月内完全降解, 最终产物是无毒性的CO₂和水^[18-19]。因而以乳酸羟基乙酸共聚物为骨架制备药物的纳米粒是近年来药物剂型改变的新工艺及新技术, 该缓释纳米粒具有释放稳定, 生物利用度高等优点, 目前作为缓释系统骨架是一理想的载体材料^[20-22]。乳酸羟基乙酸共聚物在利多卡因, 布比卡因等局部麻醉药的缓释研究已经取得一定的研究成果^[23-24]。国内外大量研究表明局麻药乳酸羟基乙酸共聚物缓释微球的有效性及其可行性^[25]。

罗哌卡因是一种新型长效酰胺类局部麻醉药, 相对于其他局部麻醉药具有较好的感觉-运动阻滞分离, 毒性低的特点, 是目前最常用于镇痛的局部麻醉药, 但国内外对其缓释系统的研究很少, 且在对于局麻药缓释系统研究分析中, 比较少有在动物体内进行药物释放及毒性的研究^[20]。

课题组前期就罗哌卡因乳酸羟基乙酸共聚物微球的制备及可行性做了一定的研究工作, 但因颗粒较大, 限制其在注射方面的应用, 且存在对组织的刺激等不良反应^[26-27]。载药纳米粒是10-500 nm的固态胶体粒子, 药物通过溶解包裹或者表面吸附, 耦合于粒子表面, 因其粒径小, 能改善它的穿透能力提高药物的生物利用度及降低毒性的作用^[28]。前期在罗哌卡因乳酸羟基乙酸共聚物微球的缓释系统研究中发现, 罗哌卡因乳酸羟基乙酸共聚物微球可以成功合成, 在体内外释放研究中均证实能很好的延长罗哌卡因的时效, 缓释效果好, 但由于其粒径较大, 只能进行手术包埋, 局部刺激也较大, 在实用上有缺陷^[24]。因此该研究是在前期研究工作的基础上, 进一步优化制备工艺, 通过研磨过滤、洗涤筛选等程序制备罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒^[26-27], 对其粒径、药物包封率、载药量及形态等重要粉粒学特征进行考察。由于体内环境及体外环境有一定差别, 大多研究都是根据体外释药的情况来估计体内释放情况, 而药物是通过体内起作用的, 因而体内释药研究才是最可靠的释药研究指标^[29-30]。因而当前研究直接通过小鼠皮下注射, 分时间段进行血药浓度监测, 考察罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒的体内释放情况, 顺便可以考察其组织器官的毒性。

研究表明制备的罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒, 粒径80%分布于65-80 nm之间, 符合载药纳米粒的参数要求, 平均载药量(7.24±0.69)%, 因而存在制备程序繁琐及产量低及载药量低等缺陷, 需要进一步优化制备工艺。

通过跟相等罗哌卡因含量的盐酸罗哌卡因体内释药的对照研究, 发现罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒明显具有缓释作用, 血药存在时间约48 h, 增加了罗哌卡因的生物利用度; 血药浓度基本在一个极低的水平, 表明其稳定而持

久的释药特性, 成功避免了大量给药后所带来的局部麻醉药毒性, 很好地发挥其在镇痛中的优点, 摒除毒性, 达到了研究的目的。由于针对小鼠皮肤进行疼痛评估存在困难, 故没进行药效的评估, 在未来的研究中可以通过阻滞坐骨神经的效能来评价其镇痛效果。

在局部组织及全身主要脏器的毒性初步考察表明, 局部组织刺激反应轻微, 2周后已经大多降解, 留下微小的脂滴, 全身主要脏器在病理学研究中基本没改变。说明罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒毒性小, 组织相容性好。

总之, 罗哌卡因-乳酸羟基乙酸纳米粒可以成功合成, 而且在小鼠体内具有缓慢而稳定地释放且毒性小, 药物缓释时间能满足术后镇痛要求。

作者贡献: 田洪居进行实验设计, 实验实施, 结果分析及成文, 陈仲清审核。

经费支持: 该文章接受了“福建省卫生厅青年课题基金(2010-2-104)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经南方医科大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合本刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经南方医科大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Foley PL, Ulery BD, Kan HM, et al. A chitosan thermogel for delivery of ropivacaine in regional musculoskeletal anesthesia. *Biomaterials*. 2013;34(10):2539-2546.
- [2] Zhang W, Ning C, Xu W, et al. Precision-guided long-acting analgesia by Gel-immobilized bupivacaine-loaded microsphere. *Theranostics*. 2018;8(12):3331-3347.
- [3] Chou R, Gordon DB, de Leon-Casasola OA, et al. Management of postoperative pain: A clinical practice guideline From the American Pain Society, the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists' Committee on Regional Anesthesia, Executive Committee, and Administrative Council. *J Pain*. 2016;17(2):131-157.
- [4] Grant GJ, Piskoun B, Bansinath M. Analgesic duration and kinetics of liposomal bupivacaine after subcutaneous injection in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(12):966-968.

- [5] Joshi G, Gandhi K, Shah N, et al. Peripheral nerve blocks in the management of postoperative pain: Challenges and opportunities. *J Clin Anesth*. 2016;35(12):524-529.
- [6] Zorzetto L, Brambilla P, Marcello E, et al. From micro- to nanostructured implantable device for local anesthetic delivery. *Int J Nanomed*. 2016;11:2695-709.
- [7] Masters DB, Berde CB, Dutta S, et al. Sustained local anesthetic release from bioerodible polymer matrices: a potential method for prolonged regional anesthesia. *Pharm. Res*. 1993;10(10):1527-1532.
- [8] Masters DB, Berde CB, Dutta SK, et al. Prolonged regional nerve blockade by controlled-release of local anesthetics from a biodegradable polymer matrix. *Anesthesiology*. 1993; 79(2): 340-346.
- [9] Morgalla M, Fortunato M, Azam A, et al. High-resolution three-dimensional computed tomography for assessing complications related to intrathecal drug delivery. *Pain Physician*. 2016;19(5):E775-780.
- [10] Masters DB, Domb AJ. Liposphere local anesthetic timed-release for perineural site application. *Pharm. Res*. 1998;15(7):1038-1045.
- [11] Santamaria CM, Woodruff A, Yang R, et al. Drug delivery systems for prolonged duration local anesthesia. *Mater Today*. 2017;20(1):22-31.
- [12] Burbridge M, Jaffe RA. Exparel (R): A new local anesthetic with special safety concerns. *Anesth Analg*. 2015;121(4): 1113-1114.
- [13] de Paula E, Cereda CM, Fraceto LF, et al. Micro and nanosystems for delivering local anesthetics. *Expert Opin. Drug Deliv*. 2012;9 (12):1505-1524.
- [14] Mulroy MF, Larkin KL, Batra MS, et al. Femoral nerve block with 0. 25% or 0. 5% bupivacaine improves postoperative analgesia following outpatient arthroscopic anterior cruciate ligament repair. *Reg. Anesth. Pain Med*. 2001;26 (1):24-29.
- [15] Davidson EM, Barenholz Y, Cohen R, et al. High-dose bupivacaine remotely loaded into multivesicular liposomes demonstrates slow drug release without systemic toxic plasma concentrations after subcutaneous administration in humans. *Anesth Analg*. 2010;110 (4):1018-1023.
- [16] Ni Q, Chen W, Tong L, et al. Preparation of novel biodegradable ropivacaine microspheres and evaluation of their efficacy in sciatic nerve block in mice. *Drug Des Dev Ther*. 2016;10:2499.
- [17] Sivakumaran D, Maitland D, Oszustowicz T, et al. Tuning drug release from smart microgel-Gel composites via cross-linking. *J Colloid Interface Sci*. 2013;392:422-430.
- [18] Andhariya JV, Shen J, Choi S, et al. Development of in vitro-in vivo correlation of parenteral naltrexone loaded polymeric microspheres. *J Controlled Release*. 2017;255:27-35.
- [19] Belz JE, Kumar R, Baldwin P, et al. Sustained release talazoparib implants for localized treatment of BRCA1-deficient breast cancer. *Theranostics*. 2017;7(17): 4340-4349.
- [20] Hu Y, Hoerle R, Ehrich M, et al. Engineering the lipid layer of lipid-PLGA hybrid nanoparticles for enhanced in vitro cellular uptake and improved stability. *Acta Biomater*. 2015;85(30): 30125-30132.
- [21] Mandal B, Bhattacharjee H, Mittal N, et al. Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine*. 2013;9(4):474-491.
- [22] Wang T, Hurwitz O, Shimada SG, et al. Anti-nociceptive effects of bupivacaine-encapsulated PLGA nanoparticles applied to the compressed dorsal root ganglion in mice. *Neurosci Lett*. 2018;6 (68):154-158
- [23] Liu J, Lv X. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of lidocaine-loaded biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):17469-17477.
- [24] Ohri R, Blaskovich P, Wang JCF, et al. Prolonged nerve block by microencapsulated bupivacaine prevents acute postoperative pain in rats. *Reg Anesth Pain Med*. 2012;37(6): 607-615.
- [25] Cheow WS, Hadinoto K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;85 (2):214-220.
- [26] 毕小宝,陈仲清,黄乐松,等.罗哌卡因乳酸羟基乙酸共聚物微球的制备及体外释药研究[J].中国药房,2008,19(13):0430-438.
- [27] 田洪居,陈仲清,王照飞,等.罗哌卡因乳酸羟基乙酸共聚物微球在小鼠的坐骨神经阻滞时效及生物相容性[J].临床麻醉学杂志, 2010,26(2):148-150。
- [28] 方天,田迎,王建东,等.溶液中稳定分散的介孔二氧化硅纳米球的制备及其生物毒性研究[J].医学研究生学报, 2013,26(10): 1014-1019.
- [29] Ma P, Li T, Xing H, et al. Local anesthetic effects of bupivacaine loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *Biomed Pharmacother*. 2017;8(9): 689-695
- [30] Kopacz DJ, Bernards CM, Allen HW, et al. A model to evaluate the pharmacokinetic and pharmacodynamic variables of extended-release products using in vivo tissue microdialysis in humans: bupivacaine-loaded microcapsules. *Anesth Analg*. 2003;97(1):124-131.