

美金刚长效注射剂的制备及其评价

林霞,李其彬,石晓宇,杨子毅*

(江南大学药学院,无锡 214122)

摘要 为了降低盐酸美金刚给药频率,提高阿尔茨海默病患者治疗顺应性和连续性,采用难溶性盐技术制备了一系列美金刚难溶性盐纳米混悬型长效注射剂,包括美金刚油酸盐(Mem-Ole)、美金刚硬脂酸盐(Mem-Pal)、美金刚棕榈酸盐(Mem-Pal)和美金刚双羟萘酸盐(Mem-Pam),并对其结构、溶解特性和缓释性能进行了表征。结果表明,与美金刚相比,4种盐在模拟体液中溶解度分别降低了95.1%、96.2%、96.7%和99.6%,其中Mem-Pam在pH 5~8的模拟体液中溶解度均低于0.07 mg/mL。与美金刚纳米混悬剂相比,4种难溶性盐纳米混悬剂释药速度显著降低,释药速度由大到小依次为:Mem-Ste、Mem-Pal \approx Mem-Ole、Mem-Pam,其中Mem-Pam可缓释7 d,并呈现近零级释药特征($y=0.5499x+7.5942, r=0.9883$)。实验结果表明,Mem-Pam具有优良的缓释性能,有望在体内缓释7 d并获得平稳的血药浓度。

关键词 美金刚;长效注射剂;难溶性盐;纳米混悬液;阿尔茨海默病

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)05-0587-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180511

引用本文 林霞,李其彬,石晓宇,等.美金刚长效注射剂的制备及其评价[J].中国药科大学学报,2018,49(5):587-595.

Cite this article as: LIN Xia, LI Qibin, SHI Xiaoyu, et al. Preparation and evaluation of long-acting injectable formulations of memantine[J]. *J China Pharm Univ*, 2018, 49(5): 587-595.

Preparation and evaluation of long-acting injectable formulations of memantine

LIN Xia, LI Qibin, SHI Xiaoyu, YANG Ziyi*

School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract In order to improve the compliance of patients with Alzheimer's disease and maintain the continuity of treatment by reducing administration frequency of memantine hydrochloride, a series of memantine long-acting nanosuspension-based injectable formulations were prepared using a hydrophobic salt formation method. Four hydrophobic salt forms of memantine were prepared, including memantine oleate (Mem-Ole), memantine stearate (Mem-Ste), memantine palmitate (Mem-Pal) and memantine pamoate (Mem-Pam). The salt forms of memantine were characterized using fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy and powder X-ray diffraction (PXRD) analysis. The equilibrium solubilities of different salt forms of memantine and the *in vitro* drug release of long-acting injectable formulations were investigated. In comparison with memantine alone, the equilibrium solubilities of Mem-Ole, Mem-Ste, Mem-Pal and Mem-Pam in simulated body fluid were decreased by 95.1%, 96.2%, 96.7% and 99.6%, respectively. Meanwhile, the equilibrium solubilities of Mem-Pam in simulated body fluid with pH ranging from 5 to 8 were all lower than 0.07 mg/mL. The order of the *in vitro* drug release rate of the four long-acting injectable formulations with nanosuspensions of memantine was Mem-Ste > Mem-Pal \approx Mem-Ole > Mem-Pam > Memantine. The Mem-Pam nanosuspensions could sustain drug release for seven days and exhibited a zero-order drug release profile ($y=0.5499x+7.5942, r=0.9883$). In conclusion, injectable Mem-Pam nanosuspensions showed desired drug release behavior and might potentially be applied *in vivo* for a week with a steady plasma drug concentration-time profile.

收稿日期 2018-07-22 ***通信作者** Tel:0510-85197769 E-mail:ziggyang@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81603060);江苏高校品牌专业建设工程资助项目(No. PPZY2015B146)

Key words memantine; long-acting injectable formulations; hydrophobic salt; nanosuspensions; Alzheimer's disease

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81603060) and Top-notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions (No. PPZY2015B146)

阿尔茨海默病是一种进行性发展的神经功能退行性变性疾病。迄今为止,已上市的阿尔茨海默病治疗药物仅有他克林、多奈哌齐、利斯的明、加兰他敏、石杉碱甲和盐酸美金刚。其中,盐酸美金刚是唯一一个被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于治疗中度至重度阿尔茨海默病的药物。盐酸美金刚是一种低中度亲和力的非竞争性的 *N*-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂,具有双向调节作用^[1]。

目前国内外上市的盐酸美金刚制剂包括普通片剂、口服溶液剂和缓释胶囊。尽管口服制剂安全性高、服用方便、患者易于接受,但是盐酸美金刚口服制剂需每日用药 1~2 次,对于阿尔茨海默病患者而言,往往难以自主用药,易出现错服、漏服甚至拒服,最终导致治疗中止,病情进一步恶化。因此,亟需开发一种可长期释药的美金刚长效注射剂,以改善阿尔茨海默病患者用药依从性。

现有长效注射剂技术主要包括前体药物、微球、微囊、注射植入剂、凝胶、原位贮库、难溶性盐等技术^[2-3]。其中,难溶性盐技术是将药物与疏水性的酸或碱成盐,通过降低药物溶解度,延长药物释放时间^[4]。如将卷曲霉素-油酸盐制备成缓释微球,与硫酸卷曲霉素相比,体内缓释时间可长达 10 d^[5]。将奥氮平制备成一水合奥氮平双羟萘酸盐注射剂,其给药频率可由每日 1 次降低至每 2 周或每 4 周给药 1 次,血浆半衰期由 30 h 延长至近 30 天^[6]。此外,目前已上市的难溶性盐长效注射剂还包括曲普瑞林双羟萘酸盐长效注射剂(每 4 周或 12 周或 24 周给药 1 次)和帕瑞肽双羟萘酸盐长效注射剂(每 4 周给药 1 次)^[7-8]。由此可见,难溶性盐技术作为长效注射剂技术中的一种简易途径,有望在长期释药领域得到更广泛的应用。

本研究采用难溶性盐技术,制备了美金刚的一系列难溶性盐,对其结构表征和溶解性能进行了系统评价;将 4 种难溶性盐进一步制备成纳米混悬型长效注射剂,并对不同难溶性盐纳米混悬剂的缓释性能进行评价。

1 材料

1.1 药品与试剂

盐酸美金刚(武汉远成共创科技有限公司);羧甲基纤维素钠(Aqualon™,美国亚仕兰集团公司);蛋黄卵磷脂(S45,德国 Lipoid 公司); α -生育酚聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS,南京爱里凯德化工有限公司);棕榈酸钠、油酸钠、硬脂酸钠和双羟萘酸(武汉远成共创科技有限公司);纤维素透析袋(截留相对分子质量 50 kD,上海源叶生物科技有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,美国天地有限公司),其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);PSS380 粒度测定仪(美国 PSS 公司);高压均质机(ATS 工业系统有限公司);T18 高速剪切机(德国 IKA 公司);TENSOR II 红外光谱仪、D2-Advance 型 X 射线衍射仪、核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司);BSA 124S 分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司);FE20 pH 计(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

2 方法

2.1 美金刚难溶性盐的制备

采用沉淀法制备美金刚难溶性盐,包括美金刚-油酸盐(Mem-Ole)、美金刚-硬脂酸盐(Mem-Ste)、美金刚-棕榈酸盐(Mem-Pal)和美金刚-双羟萘酸盐(Mem-Pam)。

2.1.1 美金刚-油酸盐、美金刚-硬脂酸盐和美金刚-棕榈酸盐的制备 称取适量油酸钠,分散至 75 ℃ 蒸馏水 100 mL 中,搅拌溶解,配制浓度为 0.1 mol/L 的油酸钠水溶液;称取适量盐酸美金刚,溶解至 75 ℃ 蒸馏水 100 mL 中,得浓度为 0.1 mol/L 的盐酸美金刚水溶液。于 75 ℃,在搅拌下,将上述盐酸美金刚水溶液滴加至油酸钠水溶液中,10 000 r/min 离心 10 min,收集上层油状黏稠液体,热水洗涤 3 次,将所得油状黏稠液体 40 ℃ 真空

干燥24 h,即得 Mem-Ole。

采用相同方法,分别制备 Mem-Ste 和 Mem-Pal。

2.1.2 美金刚-双羟萘酸盐的制备 称取适量双羟萘酸,分散于75℃蒸馏水100 mL中,配制成浓度为0.1 mol/L的双羟萘酸混悬液;于75℃,在搅拌下,向上述混悬液中滴加2.5 mol/L氢氧化钠水溶液(双羟萘酸与氢氧化钠物质的量比为1:2)8 mL,搅拌至双羟萘酸全部溶解,得双羟萘酸二钠水溶液。于75℃,在搅拌下,将0.2 mol/L盐酸美金刚水溶液100 mL滴加至上述双羟萘酸二钠水溶液中。抽滤收集滤饼,将滤饼水洗3次,40℃真空干燥24 h,即得 Mem-Pam。

2.1.3 美金刚的制备 配制浓度为0.1 mol/L的盐酸美金刚水溶液100 mL,在10℃冰水浴条件下,加入2 mol/L氢氧化钠水溶液5 mL,搅拌5 min,抽滤收集滤饼,将滤饼水洗3次,25℃真空干燥24 h,即得美金刚游离碱(Mem)。

2.2 美金刚难溶性盐的表征

2.2.1 红外光谱(FT-IR) 分别取盐酸美金刚、Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam 置于样品台上,波数扫描范围为500~4 000 cm^{-1} ,分辨率为4 cm^{-1} ,进行FT-IR分析。

2.2.2 核磁共振氢谱(^1H NMR) 取适量盐酸美金刚、Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 溶于氘代氯仿,称取适量 Mem-Pam 溶于氘代二甲基亚砜,400 MHz 频率照射,核磁共振波谱仪记录图谱。

2.2.3 X射线衍射(PXRD) 取适量盐酸美金刚、棕榈酸、双羟萘酸、Mem-Pal 和 Mem-Pam,采用布鲁克公司 D2-Advance 型 X 射线衍射仪进行分析, CuK_{α} 辐射(30 kV, 10 mA), 2θ 角扫描范围: $10^\circ \sim 80^\circ$ 。

2.3 美金刚含量测定

2.3.1 美金刚含量测定方法 参照文献[9],采用柱前衍生化高效液相色谱法测定美金刚难溶性盐中美金刚含量。

色谱条件:Agilent Extend C_{18} 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水,梯度洗脱:0 min (71% 乙腈)→12 min (71% 乙腈)→16 min (100% 乙腈)→26 min (100% 乙腈)→30 min (71% 乙腈)→36 min (71% 乙腈);检测波长 225 nm;柱温 40℃;进样量 10 μL ;流速 1.0 mL/min。

样品溶液配制:取美金刚难溶性盐适量,以体

积分数为6%的三乙胺乙腈溶液为溶剂,配制质量浓度约200 $\mu\text{g/mL}$ (以美金刚计)的美金刚难溶性盐溶液,作为供试品溶液。精密移取供试品溶液2 mL至10 mL量瓶中,依次加入体积分数为4%的苯甲酰氯乙腈溶液2 mL、体积分数为6%的三乙胺乙腈溶液4 mL,于40℃水浴孵育10 min,冷却至室温,用水稀释至刻度,0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。另取盐酸美金刚对照品适量,同法测定。按外标法以峰面积计算,即得美金刚含量。

2.3.2 美金刚含量测定方法学验证 参照《中华人民共和国药典》(2015版)《9101 药品质量标准分析方法验证指导原则》对盐酸美金刚及美金刚难溶性盐中美金刚含量测定分析方法进行方法学验证。

专属性:配制质量浓度为0.2 mg/mL(以美金刚计)的盐酸美金刚水溶液、Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam 的三乙胺-乙腈溶液,以纯水作空白溶液。分别精密移取上述溶液及空白溶液2.0 mL,按“2.3.1”项下操作处理,注入液相色谱仪,记录色谱图。

线性范围:配制质量浓度为0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 和 0.35 mg/mL 的盐酸美金刚水溶液(以美金刚计),分别精密移取2.0 mL,按“2.3.1”项下操作处理,注入液相色谱仪,记录色谱图。

精密度:分别配制6份质量浓度为0.20 mg/mL(以美金刚计)的 Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam 的三乙胺-乙腈溶液,以盐酸美金刚水溶液为对照品,分别精密移取2.0 mL,按“2.3.1”项下操作处理,注入液相色谱仪,记录峰面积,计算相对标准偏差(RSD)。

准确度:分别配制质量浓度为0.16、0.20 和 0.24 mg/mL(以美金刚计)的 Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam 的三乙胺-乙腈溶液,每个浓度平行配制3份。以盐酸美金刚水溶液为对照品,分别精密移取2.0 mL,按“2.3.1”项下操作处理,注入液相色谱仪,记录峰面积,计算准确度。

2.4 美金刚难溶性盐的平衡溶解度

分别配制 pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0、pH 7.4 和 pH 8.0 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS),和蒸馏水。取适量以上溶剂分别置具塞锥形瓶中,分别加入过量 Mem、Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-

Pam, 于 37 ℃ 恒温水浴振荡器中, 100 r/min 往复振荡, 72 h 后, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 按“2.3.1”项下操作处理, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算美金刚难溶性盐在不同溶剂中的平衡溶解度。

2.5 美金刚难溶盐纳米混悬型长效注射剂的制备

采用反溶剂-高压均质法制备美金刚难溶盐的纳米混悬型长效注射剂。称取处方量美金刚-油酸盐(约含美金刚 2.5 g), 溶解于二甲基亚砜 10 mL, 作为有机相; 称取蛋黄卵磷脂(EPC) 1.0 g 和 TPGS 0.5 g 分散至 0.01 g/mL 羧甲基纤维素钠水溶液 100 mL 中, 并加热至 70 ℃ 作为水相。在 3 000 r/min 高速搅拌条件下, 将有机相加至水相中, 搅拌 3 min, 得粗混悬液。将所制备粗混悬液迅速转移至高压均质机中, 80 MPa 压力下循环 10 次, 得终混悬液。将所得终混悬液转移至透析袋(截留相对分子质量 3 kD)中, 以蒸馏水 3 000 mL 为透析介质, 透析 2 次, 每 3 h 更换一次透析介质, 即得 Mem-Ole 纳米混悬型长效注射剂。同法制备 Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam 的纳米混悬型长效注射剂, 以及 Mem 纳米混悬液。

2.6 美金刚难溶盐纳米混悬型长效注射剂的表征

2.6.1 粒径及粒度分布 分别取美金刚难溶性盐纳米混悬型长效注射剂 20 μL, 加入相应美金刚难溶性盐的饱和水溶液 3 mL, 采用 NicompTM PSS380 粒度测定仪, 进行粒度分析。

2.6.2 初步物理稳定性考察 将美金刚难溶性盐纳米混悬型长效注射剂, 密封于西林瓶中, 充氮气轧盖, 分别置于 4 ℃ 和 37 ℃ 条件下。4 ℃ 样品分别于 1、15 和 30 d 取样, 进行粒度分析; 37 ℃ 样品分别于 1、5 和 10 d 取样, 进行粒度分析。

2.6.3 体外药物释放 采用透析法测定美金刚难溶性盐纳米混悬型长效注射剂及美金刚纳米混悬液的体外药物释放行为。精密移取纳米混悬液(约含主药 25 mg, 以美金刚计) 1 mL 至装有模拟体液(10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH = 7.4) 1 mL 的透析袋(截留相对分子质量 50 kD)中, 两端扎紧。将透析袋置于装有模拟体液(10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, pH = 7.4) 100 mL 的具塞锥形瓶中, 于 37 ℃ 恒温水浴振荡器中, 100 r/min 往复振荡。分别于 1、2、4、6、8、12、24、36、48、72、96、120、144

和 168 h, 取出全部释放介质, 同时补充释放介质 100 mL。按“2.3.1”项下测定释放介质中美金刚浓度, 并计算药物累积释放百分比, 绘制体外药物释放曲线。

3 结果和讨论

3.1 美金刚难溶性盐的制备及表征

3.1.1 美金刚难溶性盐的制备 本研究选用油酸、硬脂酸、棕榈酸和双羟萘酸四种脂溶性酸为酸根, 采用沉淀法制备了美金刚的四种难溶性盐, 包括 Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam, 其中 Mem-Ole 为黄色黏稠油状物, 收率为 71.2%; Mem-Ste 为类白色黏稠油状物, 产率为 75.6%; Mem-Pal 为类白色黏稠膏状物, 产率为 76.8%; Mem-Pam 为黄色固体粉末, 产率为 85.4%。

3.1.2 美金刚含量测定方法学验证 专属性: 空白水溶液、盐酸美金刚、Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam 经衍生化处理后的色谱图如图 1 所示。图 1 显示, 盐酸美金刚及美金刚难溶性盐经衍生化反应后美金刚保留时间为 10.2 ~ 10.9 min, 空白溶液经衍生化反应后在相同保留时间位置未见色谱峰。表明衍生化试剂对美金刚的测定无干扰, 方法专属性良好。

线性范围: 在 0.1 ~ 0.35 mg/mL(以美金刚计)浓度范围内, 以美金刚衍生物峰面积对盐酸美金刚浓度进行线性回归, 回归方程为 $y = 6\,217.4x - 13.371$, 相关系数 $r = 0.999\,5$, 表明盐酸美金刚在 0.1 ~ 0.35 mg/mL(以美金刚计)浓度范围内线性关系良好。

精密度(重复性): 以盐酸美金刚水溶液为对照, 计算得 Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam 中美金刚平均含量分别为 38.99%、38.78%、41.01% 和 47.98%, 精密度(RSD, %)分别为 0.94、0.71、0.52、1.0 和 0.86($n = 6$), 表明方法精密度良好。

准确度: Mem-Ole 高、中、低 3 个浓度回收率(%)分别为 99.1、100.2 和 99.5; Mem-Ste 高、中、低 3 个浓度回收率(%)分别为 98.9、99.4 和 100.4; Mem-Pal 高、中、低 3 个浓度回收率(%)分别为 100.9、100.2 和 99.7; Mem-Pam 高、中、低 3 个浓度回收率(%)分别为 101.0、99.3 和 99.6。

最低定量下限: 盐酸美金刚最低定量下限为

0.01 mg/mL,信噪比约为 18。

上述结果表明,采用柱前衍生化高效液相色谱

法测定美金刚难溶性盐中美金刚含量,专属性、线性范围、精密度和准确度均符合药物分析方法学要求。

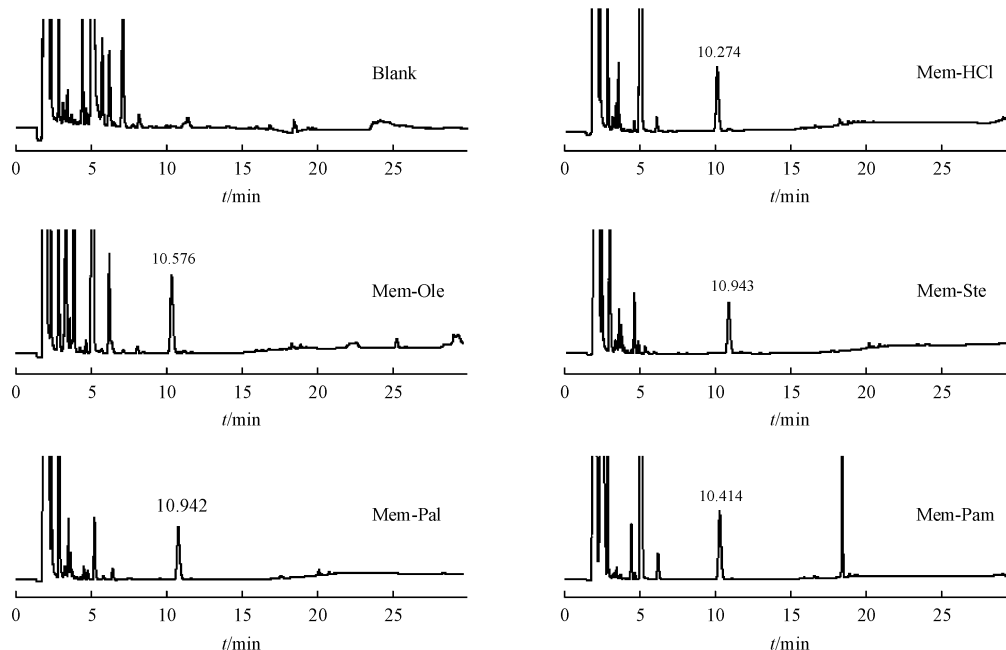


Figure 1 HPLC chromatograms of purified water (Blank), memantine hydrochloride (Mem-HCl), memantine oleate (Mem-Ole), memantine stearate (Mem-Ste), memantine palmitate (Mem-Pal), and memantine pamoate (Mem-Pam)

3.1.3 美金刚难溶性盐中美金刚的含量 采用柱前衍生化高效液相色谱法测定所制备的 4 种美金刚难溶性盐中美金刚含量, Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam 中美金刚含量分别为 38.99%、38.78%、41.01% 和 47.98%, 即 4 种难溶性盐中美金刚与油酸、硬脂酸、棕榈酸和双羟萘酸的摩尔比分别约为 1:1、1:1、1:1 和 2:1。

3.1.4 美金刚难溶性盐的红外图谱 采用 FT-IR 对盐酸美金刚、美金刚难溶性盐进行表征, 结果如图 2 所示。其中盐酸美金刚红外图谱中 $1\,637\text{ cm}^{-1}$ 处为胺离子(伯胺盐)的不对称弯曲振动峰; 油酸钠、硬脂酸钠、棕榈酸钠和双羟萘酸红外图谱中, 分别可在 $1\,558$ 、 $1\,554$ 、 $1\,557$ 和 $1\,653\text{ cm}^{-1}$ 处观察到油酸钠、硬脂酸钠和棕榈酸钠中羧酸盐 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰和双羟萘酸中游离羧酸 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰; 所制备的 4 种美金刚难溶性盐, 美金刚-油酸盐、美金刚-硬脂酸盐、美金刚-棕榈酸盐和美金刚-双羟萘酸盐的红外图谱中均可观察到胺离子(伯胺盐)的不对称弯曲振动峰(分别为 $1\,632$ 、 $1\,634$ 、 $1\,639$ 和 $1\,638\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰)和羧酸盐 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动峰(分别为 $1\,558$ 、 $1\,552$ 、 $1\,557$ 和 $1\,546\text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰), 均未在 $1\,725 \sim 1\,650\text{ cm}^{-1}$ 范围内观察到游离

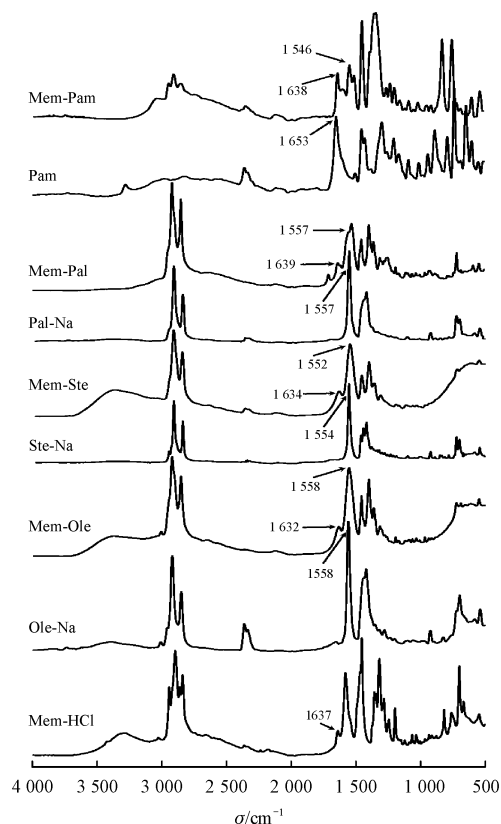


Figure 2 Fourier transform infrared spectra of Mem-HCl, sodium oleate (Ole-Na), Mem-Ole, sodium stearate (Ste-Na), Mem-Ste, sodium palmitate (Pal-Na), Mem-Pal, pamoic acid (Pam) and Mem-Pam

羧酸 $C=O$ 的红外特征吸收峰。上述结果表明,美金刚中的 $-NH_3$ 与油酸、硬脂酸、棕榈酸和双羟萘酸中的 $-COOH$ 通过离子键作用,形成了新的美金刚盐,即美金刚-油酸盐、美金刚-硬脂酸盐、美金刚-棕榈酸盐和美金刚-双羟萘酸盐。

3.1.5 美金刚难溶性盐的 1H NMR 图谱 采用 1H NMR 对盐酸美金刚、美金刚难溶性盐进行表征,其 1H NMR 图谱及特征质子峰如图3所示。其中盐酸美金刚 $\delta_a = 0.86$ 处为甲基质子峰, $\delta_b = 1.89$ 处为六元环亚甲基质子峰, $\delta_c = 8.34$ 处为伯胺盐质子峰。Mem-Ole 的 1H NMR 图谱中,既可观察到上述的美金刚特征质子峰,也可观察到油酸的特征质子峰,其中 $\delta_{ae} = 0.86$ 处为油酸和美金刚的甲基质子峰, $\delta_d = 2.16$ 处为油酸的亚甲基质子峰, $\delta_e = 4.75$ 处为伯胺盐质子峰。Mem-Ste 的 1H NMR 图谱中,同样可观察到美金刚和硬脂酸的特征质子峰,其中 $\delta_{ah} = 0.86$ 处为硬脂酸和美金刚的甲基质子峰, $\delta_g = 2.16$ 处为硬脂酸的亚甲基质子峰, $\delta_c = 4.67$ 处为伯胺盐质子峰。Mem-Ste 的 1H NMR 图谱中,可观察到美金刚和棕榈酸的特征质子峰,其中 $\delta_{aj} = 0.86$ 处为棕榈酸和美金刚的甲基质子峰, $\delta_i = 2.20$ 处为棕榈酸的亚甲基质子峰, $\delta_c = 7.98$ 处为伯胺盐质子峰。Mem-Pam 的 1H NMR 图谱中,可观察到美金刚和棕榈酸的特征质子峰,其中 $\delta_a = 0.86$ 处为美金刚的甲基质子峰, $\delta_k = 4.66$ 处为双羟萘酸的亚甲基质子峰, $\delta_c = 7.89$ 处为伯胺盐质子峰。此外,在四种难溶性盐的 1H NMR 图谱中均未观察到游离羧基质子峰和游离伯氨基质子峰的化学位移。上述结果表明,本研究成功制备了新的美金刚盐,即美金刚-油酸盐、美金刚-硬脂酸盐、美金刚-棕榈酸盐和美金刚-双羟萘酸盐。

3.1.6 美金刚难溶性盐的X射线衍射图谱 X射线衍射可用于固态药物晶型的快速确证^[10],由于Mem-Ole 和 Mem-Ste 为黏稠油状物,因此,本研究仅对盐酸美金刚、棕榈酸、双羟萘酸、Mem-Pal 和 Mem-Pam 进行了X射线衍射分析,结果如图4所示。其中盐酸美金刚(Mem HCl)特征衍射峰位于 $2\theta = 10.84^\circ$ 、 12.51° 、 14.11° 、 16.57° 、 18.80° 处;棕榈酸(Pal)特征衍射峰位于 $2\theta = 12.61^\circ$ 、 21.63° 、 24.35° 处;Mem-Pal 特征衍射峰位于 $2\theta = 14.71^\circ$ 、 15.70° 、 17.63° 处,同时可观察到无定型区域,未观察到盐酸美金刚和棕榈酸的特征衍射峰,表明

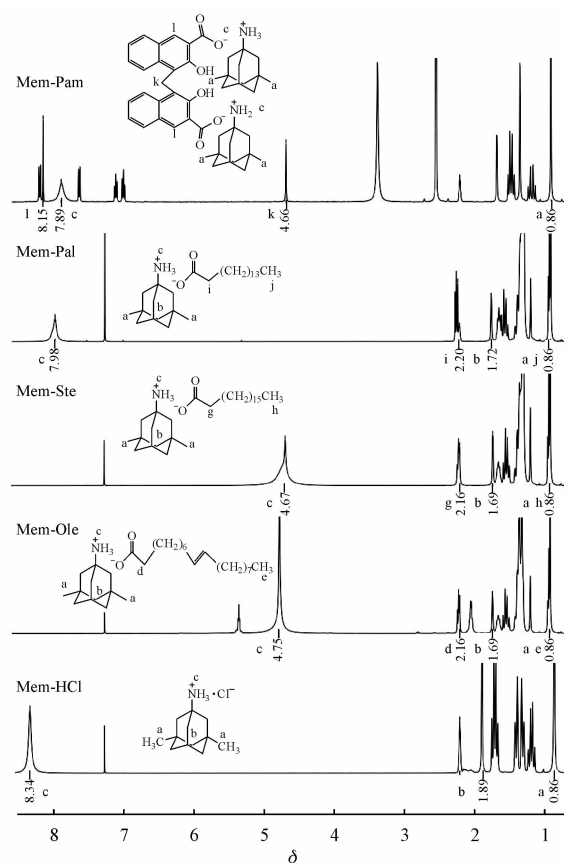


Figure 3 1H NMR spectra of Mem-HCl, Mem-Ole, Mem-Ste, Mem-Pal and Mem-Pam

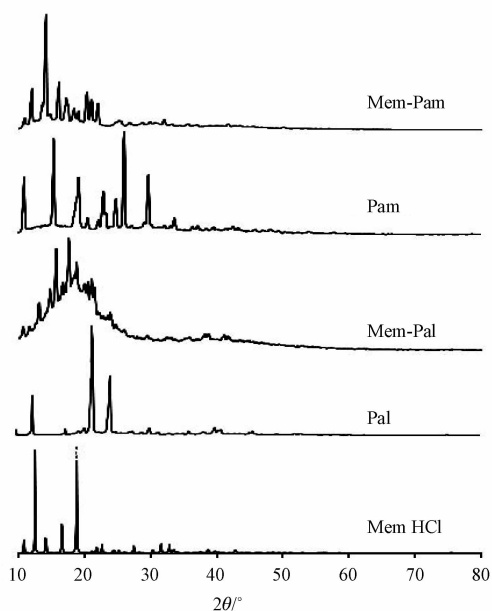


Figure 4 Powder X-ray diffraction (XRD) patterns of Mem-HCl, Pal, Mem-Pal, Pam and Mem-Pam

Mem-Pal 是以晶体和无定型混合形式存在的美金刚棕榈酸盐。双羟萘酸(Pam)特征衍射峰位于

$2\theta = 11.01^\circ$ 、 15.51° 、 19.24° 、 23.03° 、 24.36° 、 26.16° 、 29.80° 、 33.71° 处;Mem-Pam 特征衍射峰位于 $2\theta = 10.95^\circ$ 、 12.02° 、 14.14° 、 16.11° 、 17.27° 、 20.35° 、 21.07° 、 22.06° 处,未观察到盐酸美金刚和双羟萘酸的特征衍射峰,表明 Mem-Pam 是以晶体形式存在的美金刚双羟萘酸盐。

3.2 美金刚难溶性盐的平衡溶解度

药物溶解度是影响药物溶出速率或释放速度的重要因素之一,通常药物溶解度越小,药物释放速度越慢。难溶性盐技术是通过成盐技术降低药物溶解度,延长药物释放时间。因此,本研究系统研究了所制备美金刚难溶性盐在不同介质中的平衡溶解度,以初步评价其延缓药物释放性能。

3.2.1 不同酸根对美金刚难溶性盐平衡溶解度的影响 本研究考察了 4 种美金刚难溶性盐及美金刚在水及模拟体液(10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液, $\text{pH} = 7.4$)中的平衡溶解度,结果如表 1 所示。

结果显示,与美金刚游离碱相比,将美金刚制备成难溶性盐可显著降低药物在水及模拟体液中的平衡溶解度。与 Mem 相比,Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam 在水中溶解度分别降低了 97.1%、95.6%、99.4% 和 99.6%,在模拟体液中溶解度分别降低了 95.1%、96.2%、96.7% 和 99.6%。其中,Mem-Pam 在水及模拟体液中平衡溶解度最低,均低于 0.07 mg/mL,有望在给药部位获得优良的缓释作用。

Table 1 Equilibrium solubility of different salt forms of memantine in water and 10 mmol/L phosphate buffer solution (PBS, $\text{pH} 7.4$)

Salt form	Equilibrium solubility in water/(mg/mL)	Equilibrium solubility in 10 mmol/L $\text{pH} 7.4$ PBS/(mg/mL)
Mem	15.94	18.40
Mem-Ole	0.454 6	0.908 9
Mem-Ste	0.700 8	0.701 7
Mem-Pal	0.087 8	0.607 2
Mem-Pam	0.057 6	0.065 6

3.2.2 pH 对不同美金刚难溶性盐平衡溶解度的影响 肌肉注射通常会引起机体炎症反应,产生大量炎性细胞如巨噬细胞,导致注射部位 pH 降低^[11]。因此,本研究考察了 pH 对美金刚难溶性盐平衡溶解度的影响,结果如图 5 所示。

结果显示,Mem-Ole 和 Mem-Pal 在磷酸盐缓冲液中的平衡溶解度随 pH 降低而显著增加, pH 为 5.0 时,平衡溶解度分别高达 1.877 和

1.118 mg/mL。Mem-Ste 平衡溶解度也具有较强烈的 pH 依赖性,当 $\text{pH} > 7$ 时,其平衡溶解度随 pH 增加而增加;当 $\text{pH} < 7$ 时,其平衡溶解度随 pH 降低而增加; pH 为 5.0 时,Mem-Ste 平衡溶解度高达 1.017 mg/mL。在 $\text{pH} 5 \sim 8$ 范围内,Mem-Pam 平衡溶解度几乎无 pH 依赖性,且均低于 0.07 mg/mL。这可能是由于油酸、硬脂酸和棕榈酸的 pK_a 较高分别为 4.99、4.95 和 4.95,当 pH 为 5.0 时,美金刚与上述 3 种脂肪酸之间的离子键减弱,导致溶解度显著增加;而双羟萘酸的 pK_a 较低,约为 2.67,在 $\text{pH} 5 \sim 8$ 范围内,与美金刚之间的离子键结合牢固,溶解度几乎无显著变化。

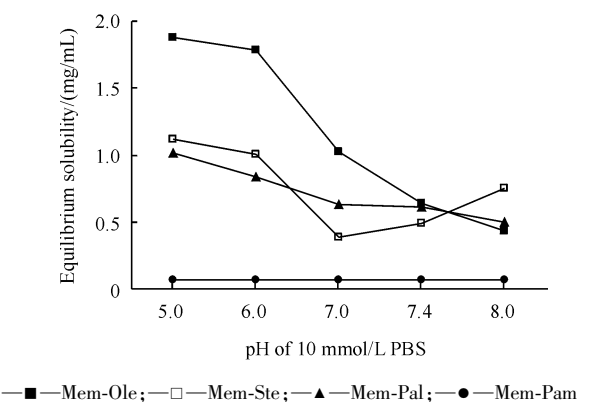


Figure 5 Equilibrium solubility of different salt forms of memantine in 10 mmol/L phosphate buffer solution (PBS) with different pH values

上述结果表明,4 种难溶性盐中,Mem-Pam 在模拟体液环境中溶解度最低,低于 0.07 mg/mL,并且其平衡溶解度在 $\text{pH} 5 \sim 8$ 范围内几乎无明显变化,无 pH 依赖性,有望在给药部位获得优良的缓释作用。

3.3 美金刚难溶性盐长效注射剂的制备

参照文献[12],以蛋黄卵磷脂和 TPGS(2:1)为稳定剂,采用反溶剂-高压均质法制备美金刚难溶盐的纳米混悬型长效注射剂。以粒径及粒度分布为评价指标,对稳定剂与药物的比例进行了考察,结果如表 2 所示。

结果显示,随着稳定剂与药物(以美金刚计)比例的增加,所制备的 4 种美金刚难溶性盐及美金刚纳米混悬剂的粒径均逐渐减小。由于粒径是影响固体药物溶解速率(即药物释放速度)的重要因素,最终以稳定剂与药物比例为 3:5,制备美金刚纳米混悬型长效注射剂,以使粒径对药物释放行为的影响最小化。

Table 2 Particle size (nm) of memantine long-acting injectable nanosuspensions prepared using different ratios of stabilizer to memantine ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Salt form	1:5		3:5		5:5	
	Size/nm	PDI ^a	Size/nm	PDI	Size/nm	PDI
Mem	760.5 ± 215.1	0.399	341.1 ± 192.1	0.317	203.9 ± 120.9	0.352
Mem-Ole	240.6 ± 127.3	0.280	203.9 ± 86.2	0.179	199.4 ± 122.8	0.379
Mem-Ste	237.0 ± 141.5	0.356	185.6 ± 96.0	0.267	154.4 ± 76.4	0.245
Mem-Pal	538.0 ± 592.3	1.212	195.9 ± 127.9	0.426	176.9 ± 77.7	0.193
Mem-Pam	755.5 ± 268.2	0.126	599.1 ± 215.1	0.129	620.0 ± 116.0	0.035

^a Polymey disperse index of memantine long-acting injectable nanosuspensions

3.4 美金刚难溶性盐长效注射剂的物理稳定性

纳米混悬剂属于热力学不稳定体系,在贮存过程中极易发生沉降、聚集等物理稳定性问题。因此,本研究以粒径为评价指标,初步考察了美金刚难溶性盐纳米混悬液在4℃条件下的物理稳定性,以初步确定美金刚难溶性盐长效注射剂的贮存形式。同时,本文还考察了纳米混悬液在37℃条件下的物理稳定性,以预测美金刚难溶性盐长效注射剂在体外释放及经肌肉注射后的稳定性,结果如表3所示。

由表3可知,在4℃贮存30d时,Mem、Mem-Ole、Mem-Ste和Mem-Pal纳米混悬液的粒径均明显增加,而Mem-Pam纳米混悬液粒径略有增加。上述结果表明,Mem-Pam纳米混悬液物理稳定性显著优于其他难溶性盐,但在4℃贮存30d后粒径仍略有增加,后续研究中可通过冻干来改善制剂

的物理稳定性。

37℃条件下贮存1d时,Mem、Mem-Ole和Mem-Pal纳米混悬液的粒径已显著增加,物理稳定性较差,5d时粒径已增加至400nm以上,10d时,Mem和Mem-Ole纳米混悬液可分别观察到分层和絮凝现象;Mem-Ste纳米混悬液的粒径也随着时间延长而增加,但仍为均一混悬液;Mem-Pam纳米混悬液37℃贮存10d时,与0时相比,平均粒径约增加了100nm,物理稳定性显著优于其他难溶性盐。上述结果提示,在体外释放过程中,由于Mem、Mem-Ole、Mem-Ste和Mem-Pal纳米混悬液的物理稳定性较差,释药前期粒径较小,药物释放速度快,但随着时间的延长,粒子不断聚集,粒径增加,可能会导致后期药物释放度过慢。Mem-Pam纳米混悬液的物理稳定性较好,粒径略有增加,有望获得更平稳的药物释放速度。

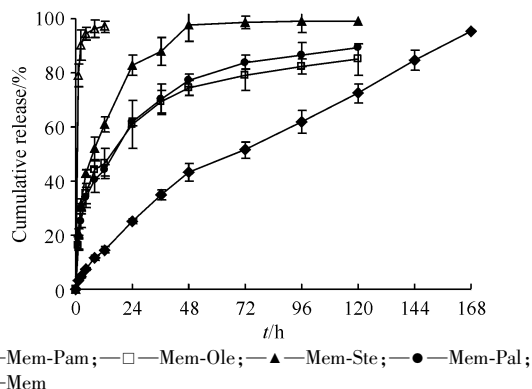
Table 3 Particle size (nm) of memantine long-acting injectable nanosuspensions stored under different conditions ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Salt form	0	4℃			37℃		
		1	15	30 d	1	5	10 d
Mem	341.1 ± 192.1	331.2 ± 181.9	362.1 ± 179.2	371.2 ± 199.2	431.2 ± 296.4	769.3 ± 456.2	Delamination
Mem-Ole	203.9 ± 86.2	203.6 ± 142.6	226.3 ± 167.7	269.3 ± 189.2	278.9 ± 169.3	637.3 ± 421.3	Flocculation
Mem-Ste	185.6 ± 96.0	189.3 ± 101.2	201.3 ± 76.1	221.4 ± 91.2	201.3 ± 73.4	234.4 ± 134.4	456.4 ± 163.1
Mem-Pal	195.9 ± 127.9	214.3 ± 145.1	227.4 ± 103.1	273.2 ± 154.3	303.1 ± 193.1	404.2 ± 201.3	576.7 ± 321.3
Mem-Pam	599.1 ± 215.1	590.5 ± 204.3	604.2 ± 241.1	621.9 ± 215.4	590.5 ± 206.1	634.0 ± 232.1	701.0 ± 208.3

3.5 体外药物释放

本研究采用透析法测定了Mem、Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal和Mem-Pam纳米混悬剂在pH7.4 10 mmol/L磷酸盐缓冲液(模拟体液)中的体外药物释放行为,结果如图6所示。

结果显示,美金刚游离碱所制备的纳米混悬剂在模拟体液环境中2h时,累积药物释放量已达到90%以上,无明显缓释作用。将美金刚制备成其硬脂酸盐,缓释时间可延长至2d。将美金刚制备成其棕榈酸盐和油酸盐,即Mem-Pal和Mem-Ole,缓释时间可延长至5d,但前期药物释放

**Figure 6** *In vitro* drug release profiles of memantine long-acting injectable nanosuspensions in 10 mmol/L phosphate buffer solution (pH = 7.4) at 37 °C ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

速度较快,1 d时累积药物释放量均约为60%,1 d后缓慢释放药物。而将美金刚制备成其双羟萘酸盐,缓释时间延长至7 d,且药物释放速度较为平稳,2 h药物释放量不足5%,1 d时累积药物释放量约为25%。采用零级释放方程对 Mem-Pam 纳米混悬剂体外药物释放曲线进行拟合,拟合方程为 $y = 0.549 9x + 7.594 2$ ($r = 0.988 3$),表明 Mem-Pam 纳米混悬剂呈现近零级药物释放特点。

上述结果显示,与美金刚游离碱相比,4种美金刚难溶性盐均具有一定的缓释作用,药物释放速度由大到小依次为:Mem-Ste、Mem-Pal \approx Mem-Ole、Mem-Pam。药物释放速度与4种美金刚难溶性盐在模拟体液中的平衡溶解度成正比,其中 Mem-Ole 在模拟体液中平衡溶解度高于 Mem-Ste 和 Mem-Pal,但其药物释放速度却低于 Mem-Ste 和 Mem-Pal,可能是由于 Mem-Ole 纳米混悬剂稳定性较差,在释放过程中粒子发生聚集,并有少量油滴黏附于透析袋壁,导致其药物释放速度略小,且后期释放不完全。Mem-Pam 由于在模拟体液中平衡溶解度仅为 0.065 6 mg/mL,与美金刚游离碱相比,约降低了99.6%,并且其在37℃条件下粒径几乎无明显变化,在模拟体液中呈现近零级药物释放特点,可缓慢释药7 d,有望在体内获得平稳的血药浓度。

4 结 论

本研究采用难溶性盐技术,制备了一系列美金刚难溶性盐纳米混悬型长效注射剂,包括美金刚油酸盐(Mem-Ole)、美金刚硬脂酸盐(Mem-Ste)、美金刚棕榈酸盐(Mem-Pal)和美金刚双羟萘酸盐(Mem-Pam)纳米混悬型长效注射剂。采用 FT-IR、 ^1H NMR 和 PXRD 对4种难溶性盐进行结构表征,表明其均以美金刚盐形式存在;与美金刚游离碱相比,Mem-Ole、Mem-Ste、Mem-Pal 和 Mem-Pam 在模拟体液中的平衡溶解度分别降低了95.1%、96.2%、96.7%和99.6%,其中,Mem-Pam 在 pH 5~8 范围内的模拟体液中平衡溶解度均低于 0.07 mg/mL。体外药物释放实验表明,与美金刚纳米混悬剂相比,4种美金刚难溶性盐纳米混悬剂均具有一定的缓释作用,药物释放速度由大到小依次为:Mem-Ste、Mem-Pal \approx Mem-Ole、Mem-Pam。其中 Mem-Pam 纳米混悬型长效注射剂在模拟体液

中可缓释7 d,药物释放曲线符合零级药物释放方程($y = 0.549 9x + 7.594 2$, $r = 0.988 3$),有望在体内获得平稳的血药浓度,后续将通过药代动力学试验进一步确证。

参 考 文 献

- [1] Sun YX, Wu Y, Song H, *et al.* Synthesis and biological evaluation of H₂S donor memantine derivatives[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2016, **47**(5): 543–547.
- [2] Ramazani F, Chen W, Nostrum CF, *et al.* Strategies for encapsulation of small hydrophilic and amphiphilic drugs in PLGA microspheres: state-of-the-art and challenges[J]. *Int J Pharm*, 2016, **499**(1/2): 358–367.
- [3] Tong XY, Li LM. Preparation of levobupivacaine hydrochloride sustained-release *in-situ* gel injection and its pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in animals[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46**(2): 209–213.
- [4] Zhang F, Yang ZQ, Wang XL. Progress of drug delivery technologies for long-acting injections[J]. *Chin J New Drug* (中国新药杂志), 2013, **22**(5): 547–555.
- [5] Adrián CR, Pablo TV, Ricardo G, *et al.* Capreomycin oleate microparticles for intramuscular administration: preparation, *in vitro* release and preliminary *in vivo* evaluation[J]. *J Control Release*, 2015, **209**: 229–237.
- [6] Citrome L. Olanzapine pamoate: a stick in time? A review of the efficacy and safety profile of a new depot formulation of a second-generation antipsychotic[J]. *Int J Clin Pract*, 2009, **63**(1): 140–150.
- [7] Zenaty D, Blumberg J, Liyanage N, *et al.* A 6-month trial of the efficacy and safety of triptorelin pamoate (11.25 mg) every 3 months in children with precocious puberty: a retrospective comparison with triptorelin acetate[J]. *Horm Res Paediatr*, 2016, **86**(3): 188–195.
- [8] Nedelman J, Fisch R, Hu K, *et al.* Population pharmacokinetics of subcutaneous pasireotide in healthy volunteers and cushing's disease patients[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2018, **57**(7): 855–866.
- [9] Lou SH, Dong W, Gu XT, *et al.* Determination of memantine hydrochloride with pre-column derivatization hplc[J]. *Chin J New Drug* (中国新药杂志), 2016, **25**(19): 2268–2271.
- [10] Tang B, Hei DW, Ma G, *et al.* Flash X-ray diffraction imaging system and study on experiment approach[J]. *Acta Photo Sin* (光子学报), 2017, **46**(12): 1211004.
- [11] Tracy MA, Ward KL, Firouzabadian L, *et al.* Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres *in vivo* and *in vitro*[J]. *Biomaterials*, 1999, **20**(11): 1057–1062.
- [12] Hu X, Lin X, Gu Y, *et al.* Biocompatible riboflavin laurate long-acting injectable nanosuspensions allowing sterile filtration[J]. *Drug Deliv*, 2014, **21**(5): 351–361.