

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00874

注射型植入剂体外释放方法的考察

刘青锋, 鲁莹, 周闰臣, 宣吉明, 谢绍波, 钟延强*

第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 考察注射型植入剂体外释放方法的可行性。**方法** 建立模型药物诺氟沙星的反相高效液相色谱测定方法,以直接注射法、单向圆筒法、透析袋法及自制圆筒法考察注射型植入剂的体外释药特性,并与大鼠皮下注射的释放结果作比较。**结果** 注射型植入剂体内释药速率明显快于体外,体内持续释药阶段(1~20 d)接近零级释药($r=0.9935$),而体外持续释药阶段以15 d为界分为缓慢释药、快速释药两个阶段。4种体外释放方法中,自制圆筒法的突释阶段较为接近体内释药。**结论** 注射型植入剂的4种体外释放方法均有一定的缺陷,不能完全模拟药物在体内的释放情况,注射型植入剂的体外释放方法有待于进一步探索。

[关键词] 注射型植入剂;体内研究;体外研究;释放模型

[中图分类号] R 944.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)08-0874-04

Investigation of *in vitro* release model of injectable implants

LIU Qing-feng, LU Ying, ZHOU Gui-chen, XUAN Ji-ming, XIE Shao-bo, ZHONG Yan-qiang*

Department of Pharmaceutical Science, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the feasibility of *in vitro* release models of injectable implants. **Methods** An RP-HPLC method was established for determination of norfloxacin (NF). The *in vitro* release profiles of injectable implants in four release models, including direct injection model, one-way cylinder, dialysis tube and home-made cylinder, were studied and compared with the *in vivo* release profiles. **Results** The *in vivo* release of NF from injectable implants was much faster than the *in vitro* release of NF. The *in vivo* release was close to the zero-order release kinetics in the sustained release phase (1-20 d, $r=0.9935$), while the *in vitro* release could be divided into slow phase and fast phase with 15 d as the turning point. Of the four *in vitro* release models, home-made cylinder showed the closest initial release to the initial release of NF *in vivo*. **Conclusion**

All the above four release models have limitations; they can not well reflect the *in vivo* release profiles of injectable implants; and further studies are needed for the *in vitro* release model of injectable implants.

[Key words] injectable implant; *in vivo*; *in vitro*; release model

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(8):874-877]

注射型植入剂是指以液体形式注射于人体、在生理条件下转变为固体或半固体药物贮库的植入剂形式。该剂型具有制备工艺简单、使用方便、机体损伤小、患者顺应性好等突出的优点,因而近年来得到了较快发展^[1]。然而,与其他药物剂型相比,该剂型在给药过程中存在特殊的固化成形过程,现有的体外释放方法,如直接注射法^[2-4]、单向圆筒法^[5-6]、透析袋法^[7]等,能否有效地反映制剂的体内释药过程尚不可知,给该剂型的研究带来了一定的困扰。为此,本研究设计了一种由微孔滤膜制成的圆筒形体外释放装置,用以模拟注射型植入剂的体内释药过程,然后以诺氟沙星(NF)为模型药物,探讨注射型

植入剂体内外释放的机制及产生体内外释药差异的原因,为注射型植入剂的质量评价提供参考。

1 材料

1.1 仪器 L-2000 高效液相色谱仪(日本 Hitachi 公司),V55C 型冷冻干燥机(美国 Virtis 公司),Centrifuge 5424 小型高速离心机(德国 Eppendorf 公司),VTX-3000L 型涡旋混合器(日本 LMS 实验室)。

1.2 原料和试剂 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA 50:50, RG 504H, 德国 Boehringer Ingelheim 公司),诺氟沙星(河南康泰制药集团公司,批号:

[收稿日期] 2010-01-31 [接受日期] 2010-06-09

[作者简介] 刘青锋,硕士. E-mail: 155135562@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871285, E-mail: yqzhong@smmu.edu.cn

050303), N-甲基吡咯烷酮(NMP, 美国国际特品公司), 醋酸甘油酯(北京化学试剂公司), PVDF 微孔滤膜(0.45 μm , 上海兴亚净化材料厂), 透析袋($M_w=25\ 000$, 扁宽 16 mm, 上海生工生物工程技术服务有限公司), 其他试剂为分析纯或色谱纯。

1.3 实验动物 健康雄性 SD 大鼠, 体质量 200~220 g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。

2 方法和结果

2.1 诺氟沙星含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 参考文献[8]建立。Welch Materials C_{18} 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.025 mol/L 磷酸溶液(体积比为 20:80, 用三乙胺调节 pH 值至 3.0), 检测波长为 271 nm, 流速为 1 ml \cdot min $^{-1}$, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 20 μl 。理论塔板数大于 5 000。

2.1.2 标准曲线绘制 精密称取诺氟沙星粉末适量, 用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)溶解并稀释成浓度为 16 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的贮备液。贮备液以 PBS 倍比稀释成浓度为 8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的系列标准液, 进样, 记录峰面积。对浓度 C 和峰面积 A 作线

性回归, 得回归方程为: $A=131\ 111C+1\ 046$, $r>0.999\ 9$, 线性范围为 0.125~8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

2.1.3 精密度实验 制备含高、中、低剂量诺氟沙星的注射型植入剂溶液, 各取 3 份, 分别溶于 4~5 ml 乙腈, 将该溶液缓慢滴加到 PBS(pH 7.4)中, 边加边振摇, 得到乳白色液体, 定容至 100 ml。取该液体 1 ml, 13 500 $\times g$ 离心 5 min, 取上清液进样, 记录峰面积, 根据标准曲线计算诺氟沙星的含量。连续测定 3 d。各样品的日内 RSD 和日间 RSD $<2\%$, 说明测定方法的精密度良好。

2.1.4 回收率实验 制备含高、中、低剂量诺氟沙星的注射型植入剂溶液, 各取 3 份, 以乙腈溶解, 按照“2.1.3”项下方法测定诺氟沙星含量, 计算诺氟沙星的平均回收率为 98.78%, RSD=1.6%, 说明测定方法的提取回收率符合要求。

2.1.5 专属性实验 制备注射型植入剂溶液, 注于 PBS 及大鼠背部皮下, 取出体内固化的植入剂, 以乙腈溶解, 按照“2.1.3”项下方法处理, 取 PBS 释放液及体内样品提取液进样, 样品图谱见图 1。由图 1 可见, 体内、外样品中的杂质不干扰诺氟沙星的测定, 方法专属性良好。

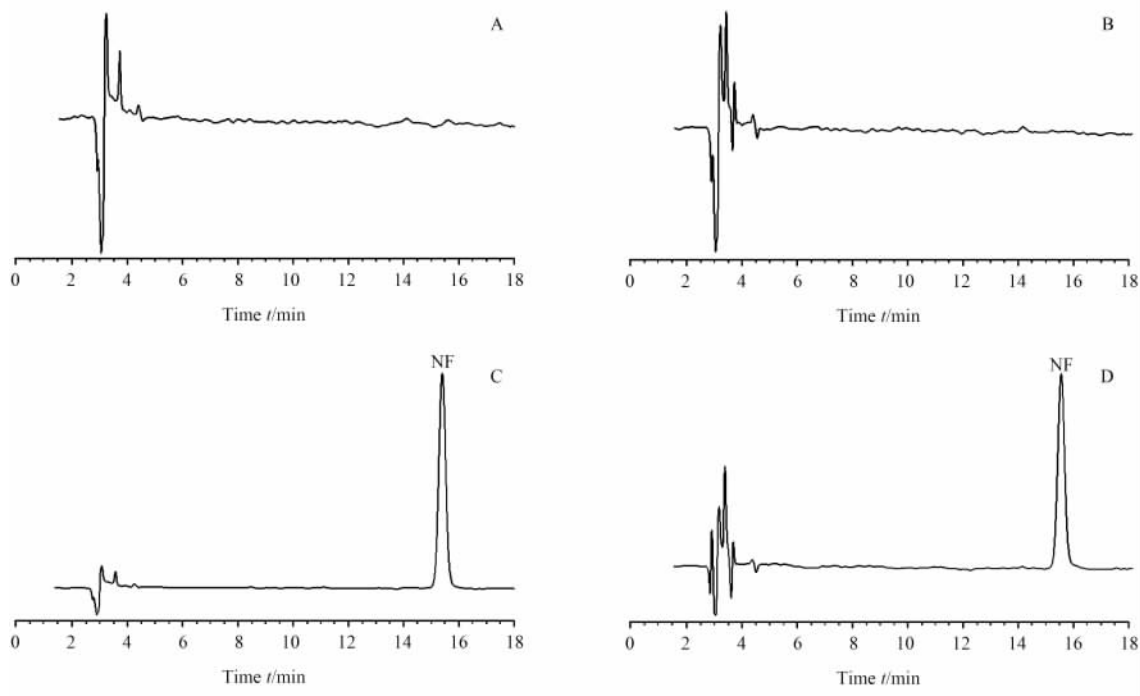


图 1 空白植入剂及 NF 植入剂的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC chromatograms of blank implants and NF implants

A: *In vitro* blank implant; B: *In vivo* blank implant; C: *In vitro* NF implant (2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$); D: *In vivo* NF implant (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). NF: Norfloxacin

2.2 注射型植入剂的制备方法 精密称取诺氟沙星粉末 1.0 mg, 加入到 0.1 ml NMP 中, 超声溶解; 称取 PLGA (RG 504H) 0.07 g, 加入到 0.1 ml 醋

酸甘油酯中, 振摇, 使 PLGA 与醋酸甘油酯充分接触, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热至 PLGA 完全溶解。将两种溶液混合, 涡旋混匀。将该溶液吸入一次性注射器中, 静

置排出气泡,备用。

2.3 注射型植入剂的体内释放 取雄性SD大鼠,将约0.2 ml注射型植入剂溶液注于大鼠背部皮下。在0.25、1、3、5、7、10、15、20、25、30 d各处死3只大鼠,取出植入剂,剥除植入剂表面的组织,冷冻干燥。冻干后的植入剂以4~5 ml乙腈溶解,按照“2.1.3”项下方法测定诺氟沙星含量,计算累积释放率,计算公式为:累积释放率(%)=(1-诺氟沙星测得量/植入剂投药量)×100%。结果见图2。诺氟沙星的体内首日突释为31.7%,持续释药阶段(1~20 d)的释药曲线近似呈线性($r=0.9935$)。

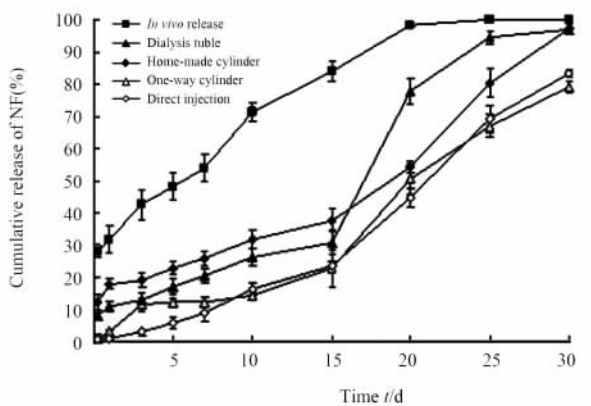


图2 诺氟沙星注射型植入剂的体内、体外释放结果

Fig 2 *In vivo* and *in vitro* release of norfloxacin(NF) from injectable implants

$n=3, \bar{x} \pm s$

2.4 注射型植入剂的体外释放

2.4.1 直接注入法 将注射型植入剂溶液经18 G针头直接注入含有10 ml PBS(pH 7.4,含0.02% NaN_3)的10 ml螺口玻璃试管中,37℃恒温振荡水浴(100转/min)中孵育,在预定时间点取样,并更换新的释放介质。释放液经微孔滤膜过滤后高效液相色谱仪进样,记录峰面积,计算诺氟沙星累积释放率。结果见图2。诺氟沙星的体内首日突释为1.2%,持续释药阶段(1~30 d)以15 d为界分为明显的两个阶段。

2.4.2 透析袋法 将注射型植入剂溶液注入扁宽为16 mm、长度约为10 mm的透析袋中,两端以透析袋夹子封口,使植入剂呈扁平状,浸于10 ml PBS(pH 7.4,含0.02% NaN_3)中,其他处理同上。结果见图2。诺氟沙星的体内首日突释为11.0%,持续释药阶段(1~25 d)以15 d为界分为明显的两个阶段。

2.4.3 单向圆筒法 以聚丙烯材料制作底端封口的圆筒装置,底面直径为8 mm,高约6 mm,将注射

型植入剂溶液注入圆筒装置底部,浸于10 ml PBS中,其他处理同上。结果见图2。诺氟沙星的体内首日突释为3.0%,持续释药阶段(1~30 d)以15 d为界分为明显的两个阶段。

2.4.4 自制圆筒法 将0.45 μm 的PVDF微孔滤膜叠成底面直径为8 mm、高约6 mm的圆筒(示意图见图3),将注射型植入剂溶液注入圆筒装置底部,浸于10 ml PBS中,其他处理同上。结果见图2。诺氟沙星的体内首日突释为17.9%,持续释药阶段(1~30 d)以15 d为界分为明显的两个阶段。

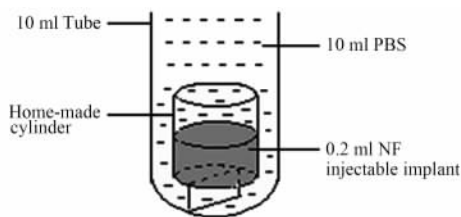


图3 自制圆筒法体外释放装置结构示意图

Fig 3 Schematic presentation of home-made *in vitro* release device for injectable implants

3 讨论

诺氟沙星在大鼠体内的首日突释明显高于各种体外释放方法,这主要是由植入剂周围环境不同引起的。植入剂溶液注入大鼠皮下后,有机溶剂(NMP、醋酸甘油酯)迅速向外扩散,而皮下组织含水较少,不能使植入剂在短时间内固化成形,因而植入剂基质中容易形成多孔性通道结构,便于水分的渗入和植入剂内部有机溶剂的进一步向外扩散,药物随着溶剂的相互扩散而释放出来。在体外实验中,无论是采用何种实验方法,植入剂溶液都能迅速地被充足的释放介质所包围,因而植入剂表面固化迅速,阻碍了水分的渗入和有机溶剂的向外扩散,使药物释放速率明显降低。

从释放趋势上看,体内的持续释药阶段(1~20 d)近似呈线性;而体外的持续释药特性分为明显的两个阶段,变化最明显的是透析袋法,所得结果与文献^[9]报道类似。这可能反映了植入剂在体内外降解速率上的差别:PLGA在大鼠体内形成的多孔性结构使其降解速率较快,在15 d时固化的植入剂骨架已经开始松散破碎,药物容易从内部扩散出来,随着降解的进一步发生,包埋在PLGA骨架中的药物全部扩散出来,到第20天时仅有很少量的药物残留在植入剂中;而PLGA骨架在体外释放的整个过程中

始终保持完整,未见破碎,只是植入剂的厚度逐渐减小直至消失,并且直接注射法和单向圆筒法在30 d的累积释放率尚未达到85%,仍有进一步释放的可能性。结合药物释放和植入剂降解的情况可知,在PLGA分子链中酯键开始断裂之前(约15 d内),药物释放以植入剂骨架中的通道扩散为主,酯键开始断裂后,药物释放转为以骨架溶蚀为主,辅以通道中的扩散,因此此时的药物释放速率会有所增加。

对比4种体外释放方法,透析袋法和自制圆筒法的首日突释较大,持续释药时间也相对较短(30 d内),而直接注射法和单向圆筒法基本无首日突释,持续释药时间均超过30 d。产生这种差异的原因在于:前两种方法中植入剂的各个方向都能与释放介质充分接触,形成的含水通道较多,这加速了药物的释放及PLGA的降解,同时,由于透析袋法所得植入剂的表面积较大(约300 mm²)其释放速率应该更快于自制圆筒法(表面积约200 mm²),但是它又受到透析袋截留分子量的限制,只有当植入剂表面的PLGA降解至能够通过透析袋时(实验中观察到这个时间为15~20 d)才能表现出较快的释放速率;后两种方法中植入剂只有单侧接触释放介质,与植入剂注入皮下后表面全部接触体液的现象不符,当然药物的释放也明显慢于体内。

综上所述,注射型植入剂的体内、外释放存在较大的差别,4种体外释放方法的药物释放速率均小于体内释放,不能完全反映注射型植入剂在体内的真实过程。虽然注射型植入剂的体内外释药相关性可能还与药物特性、处方组成、剂量等因素有关,但也可以看出:药物的体内释放实验不可或缺,大部分文献仅报道了制剂的体外释放结果,尚不能作为评价处方设计的决定性依据。与常用的透析袋法相比,本实验设计的体外释放模型使药物的首日突释较为接近体内情况,而且固化后植入剂的直径、厚度均一,实验重现性好,可较好地用于比较不同处方的

体外释放特性,但该法的后续释放较慢,与体内释放结果仍有较大的差距。体内、外释放环境中含水量可能是造成植入剂体内、外释放特性差异较大的一个重要原因,如何模拟皮下组织含水量较少的环境值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Chitkara D, Shikanov A, Kumar N, Domb A J. Biodegradable injectable *in situ* depot-forming drug delivery systems[J]. *Macromol Biosci*, 2006, 6: 977-990.
- [2] Kang F, Singh J. *In vitro* release of insulin and biocompatibility of *in situ* forming gel systems[J]. *Int J Pharm*, 2005, 304: 83-90.
- [3] Shikanov A, Domb A J, Weiniger C F. Long acting local anesthetic polymer formulation to prolong the effect of analgesia [J]. *J Contr Rel*, 2007, 117: 97-103.
- [4] Kempe S, Metz H, Mäder K. Do *in situ* forming PLG/NMP implants behave similar *in vitro* and *in vivo*? A non-invasive and quantitative EPR investigation on the mechanisms of the implant formation process[J]. *J Contr Rel*, 2008, 130: 220-225.
- [5] Kranz H, Bodmeier R. A novel *in situ* forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery[J]. *Int J Pharm*, 2006, 332: 107-114.
- [6] Sharma G, Italia J L, Sonaje K, Tikoo K, Ravi Kumar M N. Biodegradable *in situ* gelling system for subcutaneous administration of ellagic acid and ellagic acid loaded nanoparticles: Evaluation of their antioxidant potential against cyclosporine induced nephrotoxicity in rats[J]. *J Contr Rel*, 2007, 118: 27-37.
- [7] Van Tomme S R, De Geest B G, Braeckmans K, De Smedt S C, Siepman F, Siepman J, et al. Mobility of model proteins in hydrogels composed of oppositely charged dextran microspheres studied by protein release and fluorescence recovery after photobleaching[J]. *J Controlled Release*, 2005, 110: 67-78.
- [8] 郑芳,刘菁,朱雪松,林洁. RP-HPLC法同时测定复方诺氟沙星滴耳液中两组分的含量[J]. *鄯阳医学院学报*, 2009, 28: 36-38.
- [9] Astaneh R, Moghimi H R, Erfan M, Mobedi H. Formulation of an injectable implant for peptide delivery and mechanistic study of the effect of polymer molecular weight on its release behavior[J]. *Daru*, 2006, 14: 65-70.

[本文编辑] 尹茶