

机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001780

聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的体外释放机制研究

王昌绚¹, 胡运玖², 李明¹, 罗聪¹, 瞿向阳¹, 谢丽娜¹, 邬均¹, 蒋电明³

(1. 重庆医科大学附属儿童医院骨科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、重庆市干细胞治疗工程技术研究中心, 重庆 400014; 2. 重庆市梁平区人民医院骨科, 重庆 405200; 3. 重庆医科大学附属第三医院骨与创伤中心, 重庆 401120)

【摘要】目的:探讨聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球体外释放机制。**方法:**采用乳化-溶剂挥发法制备不同载药量的聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球, 于 PBS 缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH7.4) 中测定微球体外释放量, 对释放曲线进行零级方程拟合、一级方程拟合和 Higuchi 方程拟合。**结果:**聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的载药量分别为 $(8.04 \pm 0.29)\%$ 、 $(17.16 \pm 0.40)\%$ 和 $(23.93 \pm 0.48)\%$, 差异有统计学意义 ($F=1\ 195.325, P=0.000$)。微球呈球形, 分散性良好, 药物均匀地分布于载体基质中。载药微球在前 2 d 释放药物较快, 累计释放药量分别为 $(9.07 \pm 0.11)\%$ 、 $(13.33 \pm 0.04)\%$ 和 $(15.5 \pm 0.09)\%$, 差异有统计学意义 ($F=4\ 414.474, P=0.000$)。从第 3 天开始, 释放药物速率减缓, 总累计释放量分别为 $(72.10 \pm 0.26)\%$ 、 $(80.22 \pm 0.56)\%$ 和 $(78.60 \pm 0.63)\%$, 差异有统计学意义 ($F=212.916, P=0.000$)。在 3 种拟合方程中, 均以 Higuchi 方程的相关系数更接近于 1。**结论:**聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球体外释放呈突释和缓释两相释放, 释放曲线更符合 Higuchi 方程释放规律。

【关键词】利福喷丁; 聚乳酸-羟基乙酸; 微球; 体外释放; Higuchi 方程

【中图分类号】R529.23

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-01-10

In vitro release of rifapentine from poly(lactic acid-co-glycolic acid) microspheres

Wang Changxuan¹, Hu Yunjiu², Li Ming¹, Luo Cong¹, Qu Xiangyang¹, Xie Lina¹, Wu Jun¹, Jiang Dianming³

(1. Department of Orthopedics, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy;
2. Department of Orthopedics, People's Hospital of Liangping;
3. Center of Bone and Trauma, the Third Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the *in vitro* release mechanism of rifapentine-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. **Methods:** Rifapentine-loaded PLGA microspheres were prepared by the emulsification-solvent evaporation method. The *in vitro* release tests were carried out in phosphate buffer solution (0.2 mol/L, pH7.4), and the *in vitro* release profiles were prescribed by the zero-level equation, one-level equation and Higuchi equation, respectively. **Results:** Rifapentine-loaded PLGA microspheres were successfully prepared with drug loading of $(8.04 \pm 0.29)\%$, $(17.16 \pm 0.40)\%$ and $(23.93 \pm 0.48)\%$ ($F=1\ 195.325, P=0.000$). The microspheres were spherical particles with good dispersion. Rifapentine was evenly distributed in the PLGA matrix. The drug release was faster during the first two days and the cumulative drug releases of the three rifapentine-loaded PLGA microspheres were $(9.07 \pm 0.11)\%$, $(13.33 \pm 0.04)\%$ and $(15.5 \pm 0.09)\%$ ($F=4\ 414.474, P=0.000$), which slowed down from the third day. The total cumulative drug releases were $(72.10 \pm 0.26)\%$, $(80.22 \pm 0.56)\%$ and $(78.60 \pm 0.63)\%$ ($F=212.916, P=0.000$). The correlation coefficients of the Higuchi equation were closer to 1 among that of the three fitting equations. **Conclusion:** Rifapentine-loaded PLGA microspheres

exhibit an initial burst followed by a period of slow release *in vitro*, and the release profiles is more consistent with the Higuchi equation.

【Key words】 rifapentine; poly(lactic acid-co-glycolic acid); microspheres; *in vitro* release; Higuchi equation

作者介绍: 王昌绚, Email: 664024847@qq.com,

研究方向: 载药(基因)材料研究。

通信作者: 邬均, Email: cyex-wujun@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81171685); 重庆市教委科学技术研究资助项目(编号: KJ1600218)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180606.1309.004.html>

(2018-06-07)

结核治疗应严格遵循“早期、联合、适量、规律和足疗程”的基本原则^[1]。目前,抗结核药物疗程为 6~12 个月,较传统标准 18~24 个月的疗程缩短。但由于抗结核药物存在明显的肝脏及消化道毒副作用,许多患者难以耐受,依从性较差^[2-3]。不规则服药是结核耐药的重要原因^[4]。

抗结核药缓释剂型是目前研究的热点。缓释剂型可较长时间地维持药物浓度,减少用药频率,提高依从性,减少患者因用药不规律引起的药物耐受^[5]。聚乳酸-羟基乙酸[poly(lactic acid-co-glycolic acid), PLGA]具有良好的生物相容性和理化性能等优点,被广泛用作载体材料研究,多种 PLGA 缓释制剂被 FDA 批准用于临床^[6-7]。Doan 等^[8]制备了聚乳酸-羟基乙酸载利福平微球,研究表明该制剂具有良好的缓释性能。利福喷丁与利福平同属利福霉素家族,具有类似的抗菌谱,但利福喷丁体外抗菌活性较利福平高 2~10 倍,且不良反应较少^[9]。利福喷丁临床科研协作组推荐将利福喷丁用于抗结核治疗^[10]。本研究以聚乳酸-羟基乙酸为载体,制备载利福喷丁微球,并对其体外释放特性进行研究。

1 材料与方法

1.1 原料及仪器

利福喷丁原药,德国 Ruibio 公司;聚乳酸-羟基乙酸(50:50,Mw 45 000),济南岱罡生物科技有限公司;聚乙烯醇 1799,中国石化四川维尼纶厂;二氯甲烷及甲醇均为分析纯级,四川成都科隆化工试剂厂。

BT25S 电子天平,北京赛多利斯科学仪器有限公司;SB-3200D 型超声波清洗机,宁波新艺超声设备有限公司;HH-S 恒温水浴锅,江苏正基仪器有限公司;JJ-1 型电动搅拌器,常州国华电器有限公司;LD4-2A 低速离心机,北京雷勃尔离心机有限公司;FD-1A-50 冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司。

1.2 载利福喷丁/聚乳酸-羟基乙酸微球的制备

采用 O/W 乳化溶剂挥发法制备聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球^[11-12]。将 200 mg PLGA 溶解于二氯甲烷,并加入不同质量的利福喷丁原药,超声混匀之后形成油相。将油相缓慢均匀地加入 100 mL 含有 2%(质量比)聚乙烯醇(polyvinyl alcohol,PVA)1799 的水溶液。快速(700 r/min)搅拌 30 min 后,继续低速(约 250 r/min)搅拌至二氯甲烷挥发完全。三蒸水反复洗涤,离心收集微球,冷冻干燥,-20 ℃保存备检。

1.3 载利福喷丁微球的形貌观察

彻底干燥样品,采用倒置相差显微镜观察微球形貌。取适

量样品平铺于导电胶上,真空喷金后于扫描电镜(JEOL-6500LV,日本电子公司)下观察微球的形貌。扫描电压为 15 kV。

1.4 载利福喷丁微球的粒径分析

采用干湿法两用激光粒度仪(JL-6000,成都精新粉体测试设备有限公司)测定分析微球的粒径分布情况。取适量样品加入样品池,滴入分散剂,待样品分散均匀后进行检查。将 D_{50} 认为是样品平均粒径,采用公式(1)计算样品粒径跨度。

$$\text{span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (1)$$

公式(1)中,span 为微球 d 的粒径跨距, D_{90} 、 D_{50} 及 D_{10} 分别代表第 90、第 50 及第 10 百分位数处样品的粒径。

1.5 载利福喷丁微球的载药量及包封率

称取适量样品加入甲醇溶液,于 37 ℃恒温振荡箱中避光孵化,至样品完全变成白色。取适量上层清液稀释至可检测范围,采用紫外分光光度计(754 型,上海光谱仪器有限公司)测量吸光度值,计算利福喷丁浓度。分别采用公式(2)和公式(3)计算样品的载药量及包封率。

载药量(%)=样品中所含利福喷丁质量/样品质量×100% (2)

包封率(%)=样品中所含利福喷丁质量/利福喷丁投药量×100% (3)

1.6 载利福喷丁微球的红外光分析

取适量彻底干燥的样品分别加入溴化钾颗粒中,研磨均匀呈细粉,将混合后的细粉压成透明薄片,采用红外光谱分析仪(NICOLET-6700,美国 Thermo Fisher Scientific Inc)对样品进行检测,检测的波长范围为 500~4 000 cm^{-1} 。

1.7 载利福喷丁微球的体外释放

准确称取 10 mg 干燥样品,加入 10 mL PBS 缓冲溶液(0.2 mol/L,pH7.4)于恒温水浴振荡箱中避光孵化(37 ℃,100 r/min)。于预设时间点取出 PBS 溶液,并加入等容积的新鲜 PBS 缓冲溶液继续孵化。采用紫外分光光度计测定取出的 PBS 溶液吸光度值。计算利福喷丁含量,每个样品进行 3 组平行试验。绘制时间-释放曲线和时间-累计释放曲线。

采用零级方程[式(4)]、一级方程[式(5)]和 Higuchi 方程[式(6)]分别对不同载药量的聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的体外释放机制进行模拟。

$$Mt/M\infty = k_z \times t \quad (4)$$

$$\ln(1 - Mt/M\infty) = -k_f \times t \quad (5)$$

$$Mt/M\infty = k_h \times t^{1/2} \quad (6)$$

以上公式中, Mt 为 t 时间的药物累积释放量; $M\infty$ 为最大药物累积释放量; $Mt/M\infty$ 为 t 时药物累积释放百分率; k_z 、 k_f 及 k_h 分别为零级拟合方程、一级拟合方程和 Higuchi 拟合方程系数。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料的数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 形貌观察

采用不同利福喷丁投药量(0、20、50 和 100 mg)制备聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球,分别表示为 R0PLGA Ms、R20PLGA Ms、R50PLGA Ms 和 R100PLGA Ms。聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球呈球形,分散性好,药物均匀地分散于微球中(图 1)。扫描电镜(scanning electron microscope,SEM)显示,未载药微球表面光滑(图 2A),载药微球表面粗糙,随着利福喷丁投药量增加,表面粗糙程度增加(图 2B、C、D)。

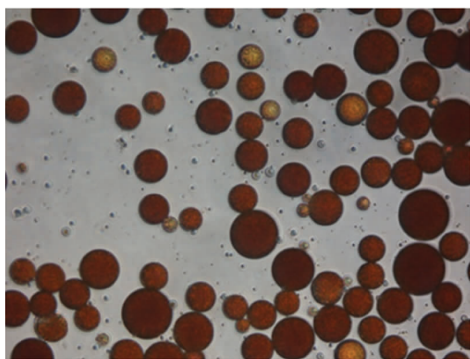


图 1 聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球倒置相差显微镜观察 (400×)

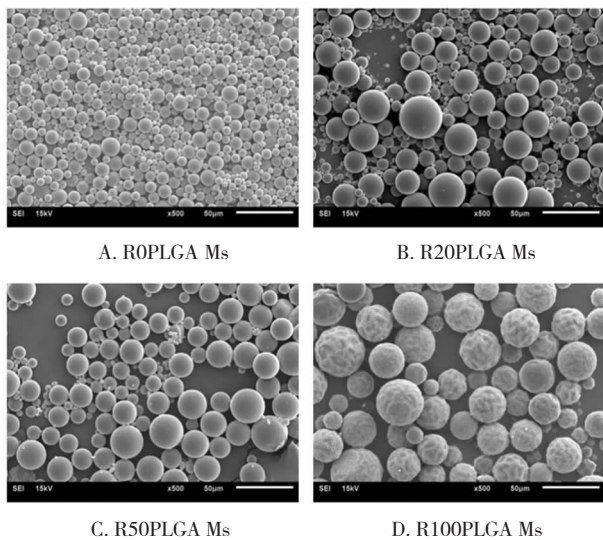


图 2 聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的 SEM 观察 (500×)

2.2 粒径分布

聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的粒径分布如图 3 所示。载利福喷丁微球的平均粒径(D_{50})分别为 12.42 μm (R0PLGA Ms)、16.74 μm (R20PLGA Ms)、25.27 μm (R50PLGA Ms) 和 27.83 μm (R100PLGA), 粒径分布宽度(span)分别为 2.08(R0PLGA Ms)、1.84(R20PLGA Ms)、1.70(R50PLGA Ms) 和 1.60(R100PLGA)。实验结果表明,随利福喷丁投药量增加,

载药微球平均粒径增大,粒径分布宽度减小。

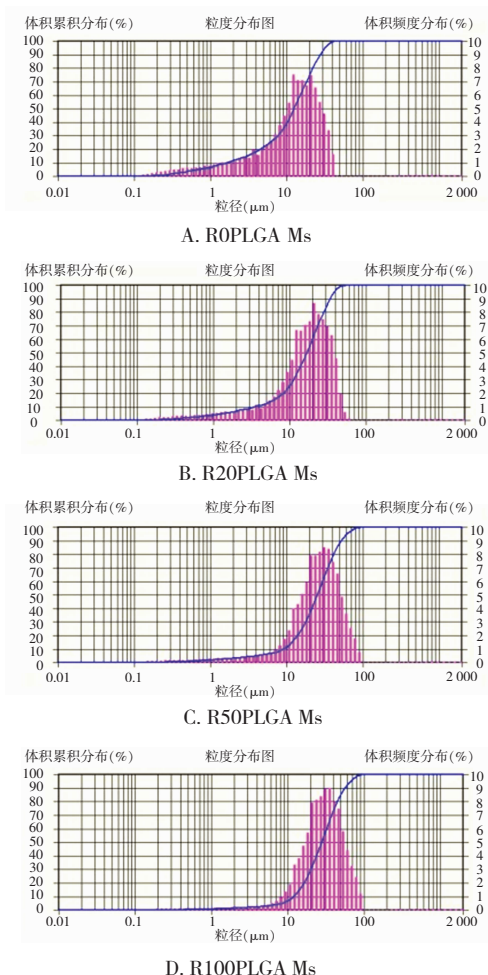


图 3 聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的粒径分布

2.3 载药量及包封率

聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的载药量和包封率见表 1。实验结果表明,聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的载药量为 8.04%~23.93%,包封率为 71.80%~88.49%,随着利福喷丁投药量的增加,微球的载药量增加,差异有统计学意义($F=1\ 195.325$, $P=0.000$),包封率降低,差异有统计学意义($F=43.885$, $P=0.000$)。

表 1 聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的载药量和包封率
($n=3$, %, $\bar{x} \pm s$)

组别	载药量	包封率
R20-PLGAMs	8.04 ± 0.29	88.49 ± 3.23
R50-PLGAMs	17.16 ± 0.40^a	85.78 ± 2.00^d
R100-PLGAMs	23.93 ± 0.48^{bc}	71.80 ± 1.45^{ef}
F 值	1 195.325	43.885
P 值	0.000	0.000

注:a,与 R20-PLGAMs 组相比, $P=0.000$;b,与 R20-PLGAMs 组相比, $P=0.000$;c,与 R50-PLGAMs 组相比, $P=0.000$;d,与 R20-PLGAMs 组相比, $P=0.041$;e,与 R20-PLGAMs 组相比, $P=0.000$;f,与 R50-PLGAMs 组相比, $P=0.000$

2.4 红外光谱性质

图 4 为聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的傅里叶变换红外(fourier transform infrared, FT-IR)光谱。图 4A、E 分别符合利福喷丁和聚乳酸-羟基乙酸的红外光谱特性^[13-14]。与聚乳酸-羟基乙酸的红外光谱(图 4A)相比,聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球(图 4B、C、D)的特征性吸收峰没有明显变形和移位,在 2 192 cm⁻¹ 处出现利福喷丁的羧基伸缩振动峰,没有形成新的特征性吸收峰。实验结果表明,通过乳化-溶剂挥发法将利福喷丁药物成功包裹于聚乳酸-羟基乙酸基质,目标药物与载体材料之间未发生化学键合反应。

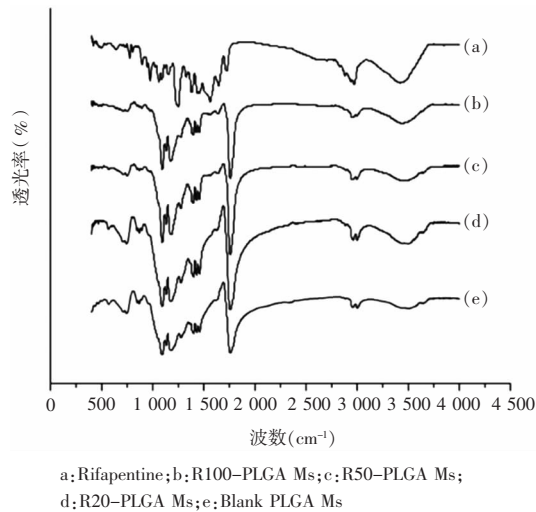
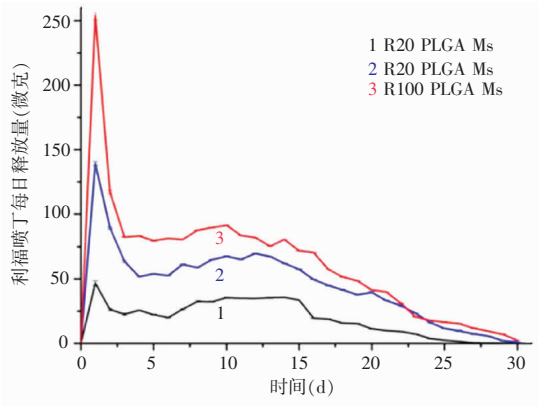


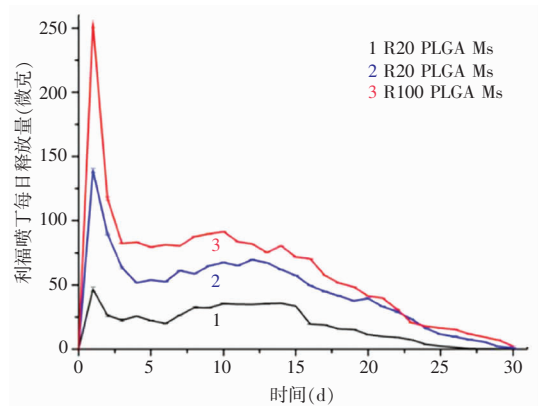
图 4 载利福喷丁/聚乳酸-羟基乙酸微球的 FT-IR 光谱

2.5 体外释放研究

聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的体外释放曲线如图 5 所示。实验结果表明,聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的体外释放呈突释相和缓释相两相释放。载药微球前 2 d 释放药物较快,R20-PLGAMs 前 2 d 累计释放药物(9.07 ± 0.11)%, R50-PLGAMs 前 2 d 累计释放药物(13.33 ± 0.04)%(与 R20-PLGAMs 相比, $t=63.010, P=0.000$),R100-PLGAMs 前 2 d 累计释放药物(15.5 ± 0.09)%(与 R20-PLGAMs 相比, $t=77.800, P=0.000$;与 R50-PLGAMs 相比, $t=39.04, P=0.000$),三者差异有统计学意义($F=4\ 414.474, P=0.000$)。从第 3 天开始,释放药物速率逐渐减缓,R20-PLGAMs 的累计释放量为(72.10 ± 0.26)%;R50-PLGAMs 的累计释放量为(80.22 ± 0.56)%(与 R20-PLGAMs 相比, $t=22.680, P=0.000$);R100-PLGAMs 的累计释放量为(78.60 ± 0.63)%(与 R20-PLGAMs 相比, $t=16.490, P=0.000$;与 R50-PLGAMs 相比, $t=3.330, P=0.029$),三者差异有统计学意义($F=212.916, P=0.000$)。



A. 时间-释放量曲线



B. 时间-累计释放百分数曲线

图 5 聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球体外释放研究

进一步对释放曲线采用零级释放方程、一级释放方程和 Higuchi 方程进行拟合(表 2)。在 3 种拟合方程中,均以 Higuchi 方程的相关系数更接近于 1。实验结果表明,3 种聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球体外释放更符合 Higuchi 方程释放规律。

3 讨论

药物释放动力学研究是评价药物缓释系统质量的重要指标,是控制药物缓释系统质量的重要方法,对指导用药具有重要意义。本文旨在研究聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的体外释放特性。载药微球释放曲线分析主要包括曲线形貌及数学方程模拟两方面^[15]。

表 2 聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的体外释放曲线拟合参数

样本	零级动力学参数		一级动力学参数		Higuchi 参数	
	k_z	r^2	k_f	r^2	k_h	r^2
R20-PLGAMs	2.533 1	0.915 0	0.031 2	0.791 0	18.085	0.959 7
R50-PLGAMs	2.637 9	0.9466	0.027 6	0.819 6	18.715	0.959 7
R100-PLGAMs	2.437 6	0.937 2	0.024 6	0.819 0	17.386	0.981 1

在释放曲线形貌方面,本研究制备的 3 种载药微球均呈突释相和缓释相的两相释放。与叶向阳等^[16]采用乳化-溶剂挥发法制备利福平/聚乳酸-羟基乙酸微球的体外释放特性相一致。Fredenberg 等认为,突释主要是微球表面及其附近区域所吸附或者包裹不牢固的药物进入释放介质中所形成。随载药量增加,微球表面凹陷增多,与释放介质接触的微球表面积增大,更多药物进入释放介质,突释量增加^[12]。在缓释相内,由药物释放及 PLGA 基质降解溶蚀形成的含水通道是药物释放重要途径。载药量提高将增大微球内外的药物浓度差,药物释放量增多,促进更多含水通道形成,进而“自催化”地释放更多药物^[17]。

进一步采用数学方程对释放曲线进行模拟,分析载药微球的释放机制。本研究结果表明,聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的体外释放曲线更符合 Higuchi 方程释放规律。Higuchi 方程又称多孔道骨架释放,即药物释放与时间的平方根呈正相关,是一种经验性药物释放模型^[18-20]。聚乳酸-羟基乙酸形成微球骨架,利福喷丁药物均匀地分布于微球中,并形成多孔结构,药物通过溶出、扩散和溶蚀等多种方式进入释放介质中。

尽管本研究采用曲线形貌观察及数学方程模拟两方面对聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球的体外释放特性进行研究,但仍存在不足。聚乳酸-羟基乙酸微球释放是一个非常复杂的过程。载药微球的释放不仅受到微球自身理化特性影响,包括载体的分子量和结构,药物性质和载药量,微球的孔隙率、形状等;还受释放环境如温度、湿度、释放介质组成及酸碱度等影响。这些影响因素需进一步系统研究,以综合评估微球释放特性。

4 结 论

本研究采用乳化-溶剂挥发法制备了 3 种不同载药量的聚乳酸-羟基乙酸载利福喷丁微球,其体外释放呈突释和缓释两相释放,释放曲线更符合 Higuchi 方程释放规律,药物释放与时间的平方根呈正相关。

参 考 文 献

[1] 赫玲华. 肺结核治疗原则与方案的实施[J]. 中国中医药现代远程教育,2010,8(9):205-206.

- [2] Dobbs TE, Webb RM. Chemotherapy of tuberculosis[J]. Microbiol Spectr, 2017, 5(2):TNM17-0040-2017.
- [3] 陈 玮,雷世光,李 杨,等. 提高肺结核患者治疗依从性的干预研究[J]. 第三军医大学学报,2015,37(23):2382-2385.
- [4] Nasiri MJ, Haeili M, Ghazi M, et al. New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria[J]. Front Microbiol, 2017, 8:681.
- [5] da Silva PB, de Freitas ES, Bernegossi J, et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for treatment of tuberculosis—a review[J]. J Biomed Nanotechnol, 2016, 12(2):241-260.
- [6] Jiang Y, Wang F, Xu H, et al. Development of andrographolide loaded PLGA microspheres; optimization, characterization and *in vitro*–*in vivo* correlation[J]. Int J Pharm, 2014, 475(1-2):475-484.
- [7] Mir M, Ahmed N, Rehman AU. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2017, 159:217-231.
- [8] Doan TV, Couet W, Olivier JC. Formulation and *in vitro* characterization of inhalable rifampicin-loaded PLGA microspheres for sustained lung delivery[J]. Int J Pharm, 2011, 414(1-2):112-117.
- [9] Alfarsi O, Alghamdi WA, Al-Shaer MH, et al. Rifampin vs. rifapentine; what is the preferred rifamycin for tuberculosis?[J]. Expert Rev Clin Pharmacol, 2017, 10(10):1027-1036.
- [10] 利福喷丁临床科研协作组. 国产利福喷丁治疗肺结核的临床对照研究(附三年随访结果)[J]. 中国抗生素杂志, 1992, 17(5):313-322.
- [11] 裴 迪,朱 宏. 载紫杉醇聚乳酸-羟基乙酸纳米粒的体外释药研究[J]. 材料导报, 2009, 23(S1):169-170.
- [12] Wu J, Zuo Y, Hu Y, et al. Development and *in vitro* characterization of drug delivery system of rifapentine for osteoarticular tuberculosis[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9:1359-1366.
- [13] 胡运玖,左 奕,邹 均,等. 聚己内酯载药微球的制备及释药性能研究[J]. 材料导报, 2015, 29(2):29-32.
- [14] 罗培培,左 奕,孙 斌,等. 载异烟肼聚己内酯微球的制备及其性质研究[J]. 功能材料, 2011, 42(8):1410-1414.
- [15] Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, et al. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—a review[J]. Int J Pharm, 2011, 415(1-2):34-52.
- [16] 叶向阳,孙 湘,贾会文,等. 利福平/聚乳酸-聚羟基乙酸缓释微球的制备及特性[J]. 中国组织工程研究, 2011, 15(51):9608-9612.
- [17] Perugini P, Genta I, Conti B, et al. Long-term release of clodronate from biodegradable microspheres[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2001, 2(3):E10.
- [18] Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication. theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices[J]. J Pharm Sci, 1963, 52:1145-1149.
- [19] Lee PI. Modeling of drug release from matrix systems involving moving boundaries; approximate analytical solutions[J]. Int J Pharm, 2011, 418(1):18-27.
- [20] Ford Versypt AN, Pack DW, Braatz RD. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres—a review[J]. J Control Release, 2013, 165(1):29-37.

(责任编辑:冉明会)