

替硝唑原位固化缓释注射剂的制备与体内外性质考察

居敏俐¹, 吴仁荣², 苏丹¹, 沈雁¹, 罗艳³, 涂家生^{1*}

(1. 中国药科大学药剂学教研室, 江苏 南京 210009; 2. 南京威尔化工有限公司, 江苏 南京 210009;
3. 南京海辰药业有限公司, 江苏 南京 210046)

摘要: 制备了一种原位固化缓释注射剂, 在牙周病变部位缓释药物达 7 d, 并对其体外性质及体内药理学进行考察。制备原位固化缓释注射剂, 考察该注射剂的固化时间; 利用扫描电镜对该注射剂固化后的表面形态进行了表征; 测定 0 °C、25 °C、37 °C 下凝胶剪切力随剪切率变化的曲线, 绘制流变学曲线, 并考察温度对黏度的影响; 考察体外释放行为, 并对其进行拟合; 建立家兔牙周炎模型, 考察其体内药理学。该注射剂稳定性良好, 不易分层、分解, 遇水后在 6 s 左右固化, 可以黏附于牙周袋内, 不易脱落; 固化后, 表面形成较多小孔, 为药物扩散通道; 在 25 °C、37 °C 下均为典型的牛顿流体, 室温下通针性良好, 使用方便; 体外释放行为符合 Korsmeyer-Peppas 释放动力学方程, 释放平缓, 突释小, 可持续 7 d, 能达到良好的缓释作用; 药理学实验结果与各项参数的拟合结果表明了替硝唑原位固化缓释注射剂在体内缓释性能良好, 制剂组可用一室模型进行很好的拟合, 可维持牙龈沟液 (GCF) 内有效治疗浓度长达 168 h, 满足牙周炎临床治疗需要, 该替硝唑原位注射缓释注射剂具有较好的应用前景。

关键词: 替硝唑; 原位固化; 流变学; 体外释放; 药理学

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 07-0852-07

Preparation and *in vitro* and *in vivo* study on tinidazole *in situ* forming sustained-release injection

JU Min-li¹, WU Ren-rong², SU Dan¹, SHEN Yan¹, LUO Yan³, TU Jia-sheng^{1*}

(1. Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
2. Nanjing Well Chemical Co., Ltd., Nanjing 210009, China; 3. Nanjing Hicin Pharmaceutical Co., Ltd, Nanjing, 210046, China)

Abstract: This study is to prepare the *in situ* forming sustained-release injection which can perform sustained release behavior at the periodontal site for 7 days and to evaluate its *in vitro* and *in vivo* properties. After preparation of *in situ* forming sustained-release injection the *in situ* time was studied. And the surface of the solid injection was characterized by SEM. The rheological curve at 0 °C, 25 °C, 37 °C was determined and the impact of the temperature on the viscosity was examined. The *in vitro* release behavior was investigated. At last, rabbit periodontitis model was established to study its pharmacokinetics. The injection was stable, hard to stratify and decompose. The *in situ* forming time was about 6 seconds. It can easily adhere into periodontal pockets. There were lots of holes on the surface of the solid injection for the drug to diffuse. The drug releasing curves could be fit by Korsmeyer-Peppas equation. The drug smoothly released for 7 days at pH 7.4 PBS buffer with a very slight burst release and maintained a certain concentration. *In vivo* pharmacokinetics results indicated that after administration with the *in situ* forming injection, achievement of tinidazole (TNZ) concentration in gingival crevicular fluid (GCF) was more comparable and long-lasting than usual solution of

收稿日期: 2011-02-06.

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项新制剂与新释药系统技术平台 (2009ZX09310-004); 国家科技支撑计划资助项目 (2008BAI55B03).

*通讯作者 Tel: 86-25-83271305, E-mail: jiashengtu@yahoo.com.cn

TNZ management and relatively constant TNZ levels were attained until 168 h. All these results supported the prospect of tinidazole *in situ* forming sustained-release injection in clinical applications.

Key words: tinidazole; *in situ* forming; rheology; release *in vitro*; pharmacokinetics

牙周病是发生在牙龈、牙周韧带、牙骨质和牙床部位的慢性破坏性疾病, 是口腔内科的常见病、多发病。牙周病是一种多因素疾病, 细菌及其代谢产物是引发牙周病的始动因子, 始动因子和宿主相互作用导致牙周支持组织的破坏, 牙周可疑致病菌的种类较多^[1]。而替硝唑是 5-硝基咪唑类衍生物, 是继甲硝唑之后疗效更高的抗厌氧菌、抗原生动物药物, 对口腔内厌氧菌具有很高的抗菌活性, 例如 β -内酰胺酶阳性菌和阴性菌^[2]。

本研究所选用的载体为两亲性嵌段共聚物单甲氧基聚乙二醇-聚乳酸 (mPEG-PDLLA), 可用于注射给药的辅料, 可生物降解, 具有良好的生物相容性。mPEG-PLA 增溶的紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 制剂 Genexol-PM, 于 2002 年在美国获得了 IND (investigational new drug) 批准, 2007 年 2 月在韩国上市^[3]。涂家生等^[4]以不同比例的 mPEG-PDLLA 为载体, 考察了其对盐酸哌仑西平眼部给药的促吸收作用以及安全性评价, 结果发现 mPEG-PDLLA 具有良好的生物相容性和安全性。

本研究选取的嵌段共聚物中 mPEG 与 PDLLA 的质量比为 10:90, 具有水不溶性, 可溶解于 *N*-甲基吡咯烷酮 (NMP)、乙腈和四氢呋喃等有机溶剂。采用的原位凝固技术是指将水不溶性或溶胀性聚合物溶于亲水性有机溶剂, 在常温常压条件下形成具有良好流变学特征的溶液。当注入用药部位后, 溶剂扩散到周围环境中发生水合作用析出, 与聚合物分离, 而水进入聚合物骨架中, 引起聚合物原位沉淀形成固体, 药物则通过骨架的溶蚀与扩散作用释放至给药部位, 达到缓释目的^[5]。

原位固化缓释注射剂是一种局部给药的原位制剂, 克服了普通乳剂、脂质体、微球和胶束的缺点, 具

有可直接用于病变部位、延长释药周期、降低给药剂量和药物不良反应、避免植入剂开刀时的痛苦、工艺相对简单等优点^[6]。

本实验选择对牙周炎治疗效果确切的替硝唑, 采用 mPEG-PDLLA 为载体和 NMP 为溶剂制备替硝唑原位固化缓释凝胶, 并全面考察了该注射剂的体外性质及体内药动学。

材料与方法

仪器 Brookfield DV-III 流变仪 (德国 Brookfield 公司); Hitachi E-1010 离子溅射仪 (日本日立公司); Quanta 200 环境扫描电镜 (荷兰 FEI 公司); Shimadzu LC-20AT HPLC pump, Shimadzu SPD-20A UV/VIS Detector (日本岛津公司)。

试剂 嵌段共聚物 mPEG-PDLLA (mPEG-PDLLA 10/90, w/w, $M_n = 20\ 000$, 本实验室自制); *N*-甲基吡咯烷酮 (NMP, 美国国际特品公司); 替硝唑原料药 (浙江苏泊尔制药有限公司, 纯度 99.0%); 甘油 (上海凌峰化学试剂有限公司), 其他试剂均为分析纯。

动物 家兔 (2.5~3.0 kg), 由南京市青龙山动物厂提供, 合格证号: SCXK (苏) 2007-0008。

聚乙二醇单甲醚-聚乳酸嵌段共聚物 (mPEG-PDLLA) 的合成 采用开环聚合^[7, 8]完成 mPEG-PDLLA 聚合物的合成, 反应方程见图 1。分别称取一定比例的 *D, L*-lactide 和 mPEG2000, 加入到经氮气饱和的三颈瓶中, 密封, 浸入 140 °C 油浴, 待内容物全部熔融, 加入 0.5 wt% 的辛酸亚锡, 于磁力搅拌条件下, 160 °C 反应 12 h 停止。产物用二氯甲烷完全溶解, 用冰冷无水乙醚沉淀过滤, 反复 3 次后, 产物真空干燥 24 h, 即得。

原位缓释注射剂的制备 精密称取 5% (w/w) 替

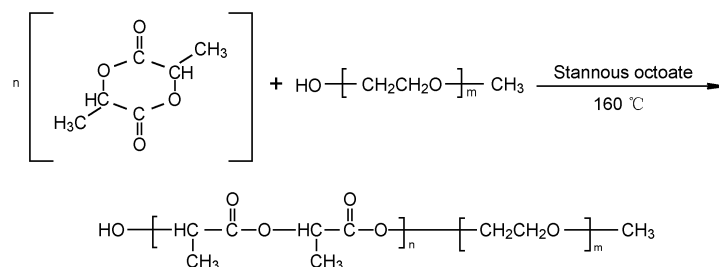


Figure 1 The equation of the preparation of mPEG-PDLLA

硝唑粉末, 加入 NMP 5 mL, 混合, 得到透明的药物溶液。加入 35% (w/w) 的聚合物, 室温下由微型漩涡混合仪混合至完全溶解, 再加入 0.4% (w/w) 甘油, 室温下由微型漩涡混合仪充分混合, 即得到替硝唑原位固化缓释注射剂, 置于 4 °C 冰箱保存, 用于体内外性质考察。

体外性质考察

替硝唑原位固化缓释注射剂原位固化时间的测定 称取新制备的替硝唑原位固化缓释注射剂 30 mg 于 DSC 坩埚中, 取一滴清水滴于样品上, 用秒表记录其完全固化时间 (s)。

形貌分析 注射剂完全固化后, 冷冻干燥 4 h, 喷金, 通过扫描电子显微镜 (SEM) 观察粒子的形貌。

流变学性质的考察 应用 Brookfield DV-III 流变仪, 选择 25 号转子, 分别测定 0 °C、25 °C、37 °C 下凝胶剪切力随剪切率变化的曲线, 绘制流变学曲线, 并考察温度对黏度的影响。

含量测定 采用 HPLC 法测定替硝唑的含量。色谱柱: XTerra® MS C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调节 pH 值至 3.5) - 甲醇 (80 : 20), 检测波长 310 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 30 °C。

取本品适量, 加纯水适量使其固化, 研细, 置 10 mL 量瓶中, 用纯水稀释成约含替硝唑 1 mg 的溶液, 16 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。再精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶, 用纯水稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1 mL 中约含替硝唑 100 μg 的溶液, 精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。另取替硝唑对照品适量, 精密称定, 加纯水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 100 μg 的溶液, 同法测定, 按外标法以峰面积计算, 即得。

替硝唑原位固化缓释注射剂的体外释放考察 为了尽可能模拟体内牙周袋, 精密称定该注射剂于 DSC 坩埚中, 遇释放液后可迅速固化为直径约为 5 mm、厚度 1 mm 的样品, 保证各批次释放面积相同, 同时也可保证单面释放, 平行性良好。

按处方制备原位固化缓释注射剂, 精密称取 30 mg 至 DSC 坩埚中, 浸没于 37 °C 的 0.01 mol·L⁻¹ PBS 缓冲溶液 (pH 7.4) 5 mL 中, 使其原位固化。以 100 r·min⁻¹ 振荡, 温度保持在 37 °C, 于原位固化后 2、4、8、12 h 取释放液 3 mL, 并迅速补充空白 PBS 缓冲溶液 3 mL, 以后每隔 24 h 取样 1 次, 取

样至释放完全。精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 色谱条件同含量测定, 记录色谱图, 计算累积释放百分数 (n=3), 并绘制累积释放曲线。

$$E_r = \frac{V_e \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_{\text{drug}}} \quad [9]$$

其中, E_r 为替硝唑的累积释放百分数 (%), V_e 表示取样的体积 (mL), V_0 为释放介质 PBS 溶液的总体积 (mL), C_i 表示第 i 次取样时替硝唑的质量浓度 (mg·mL⁻¹), m_{drug} 表示注射剂中替硝唑的总质量 (mg), n 为取样次数。

家兔牙周袋内的药理学研究

建模手术 以 20% 乌拉坦溶液经耳缘静脉对家兔进行全身麻醉并将其固定后, 在家兔左下前牙采用丝线结扎其牙颈部并打结固定于牙龈边缘, 然后用微量注射器注射牙龈卟啉单胞菌内毒素 10 μL 于结扎牙齿的牙根附近, 加以高糖 (10% 的蔗糖水) 代替饮水喂食, 1~2 周后观察其牙周袋形成情况、牙龈红肿程度。

给药及采样 将动物随机分成两组: 制剂组与对照组, 每组 5 只家兔。制剂组给药剂量为自制替硝唑原位固化缓释注射剂 (含替硝唑 2.95 mg) 50 μL, 对照组给药剂量为自制替硝唑的 NMP 溶液 (含替硝唑 2.95 mg) 50 μL。给药前受试家兔禁食过夜, 于次日 9 : 00 给药。给药时, 将家兔头部固定, 采用带平头针的微量注射器将制剂注入家兔牙周袋内, 并用棉球滴入一滴清水使其固化后, 将注射器移出牙周袋。分别于给药后 3、6、12、24、48、72、96、120、144 和 168 h 用定量试纸条 (3 mm × 20 mm, 一端剪成梯形) 袋内法取牙龈沟液 (GCF), 将已称重的定量试纸条插入牙周袋内停留 30 s 后取出, 存于干净的 Eppendorf 管中, 称重后在氮气流下吹干, 于 -20 °C 保存, 用于牙龈沟液药物浓度检测。

牙龈沟液样品的处理 取氮气吹干处理后的牙龈沟液样品, 加入流动相 300 μL, 涡旋 2 min, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液用 HPLC 法测定, 以其平均值作为该时间点替硝唑在牙龈沟液中的浓度。色谱柱: Lichrospher C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 其他色谱条件同含量测定。

药理学数据处理 采用药理学软件 WinNonlin 对实验结果进行药理学参数统计, 用统计学软件 SPSS 12.0 对制剂组和对照组数据进行统计学检验。

结果

1 mPEG-PDLLA 的结构表征

制得的 mPEG-PDLLA 为白色固体, 通过 $^1\text{H NMR}$ 图谱, 能计算共聚物中 PDLLA/mPEG 的重量比。具体方法如下: δ 5.2 处为 PDLLA 中 CH 的峰, δ 3.6 处为 mPEG 中 CH_2 的峰, 峰面积 (A) 与氢的数目存在以下关系: $A_{5.2}/A_{3.6} = 2n/4m$, 已知 $m = 2\ 000/44 = 45.5$, 则可求出 n , PDLLA/mPEG 的重量比 = $144 \times n/2\ 000$ 。图 2 中 mPEG 与 PDLLA 的重量比为 10.3 : 89.7, 与 10 : 90 非常接近, 相对分子质量为 19 389。

2 替硝唑原位固化缓释注射剂原位固化时间的测定及形貌分析

该注射剂为黄色澄明凝胶, 物理性质稳定, 不易分层, 遇水约 6 s 后, 表面黄色褪去, 显白色, DSC 坍塌倒置, 凝胶不流动。空白制剂的扫描电镜图片 (图 3A) 可见表面有较多褶皱。在溶剂交换时, 聚合物在

水中会有一定程度的溶胀, 从而形成较多褶皱。替硝唑原位固化缓释注射剂的扫描电镜照片 (图 3B) 有较多分布均匀的黑色小孔, 为药物释放后留下的。同时水分通过这些小孔渗透进入固化物内部, 包裹的药物也可通过这些小孔缓慢释放出来, 达到缓释目的。小孔分布的均匀性, 可见该注射剂中替硝唑分布较均匀, 但图中仍然可见少量褶皱。

3 流变学性质的考察

替硝唑原位固化缓释注射剂在 $0\ ^\circ\text{C}$ 、 $25\ ^\circ\text{C}$ 、 $37\ ^\circ\text{C}$ 下剪切力随剪切率的变化曲线见图 4。在 $25\ ^\circ\text{C}$ 、 $37\ ^\circ\text{C}$ 下黏度不随剪切速率改变, 而只与温度有关, 呈现出典型的牛顿流体 (Newtonian) 特征, 其流变学曲线符合方程 $\sigma = \eta v^{[10]}$ 。

从图 4、5 可以看出, 液体的黏度具有温度依赖性, 对于牛顿流体其黏度近似符合 Arrhenius 方程, 即 $k = Ae^{-Ea/RT}$ 。E 为使液体分子开始流动所需的能量

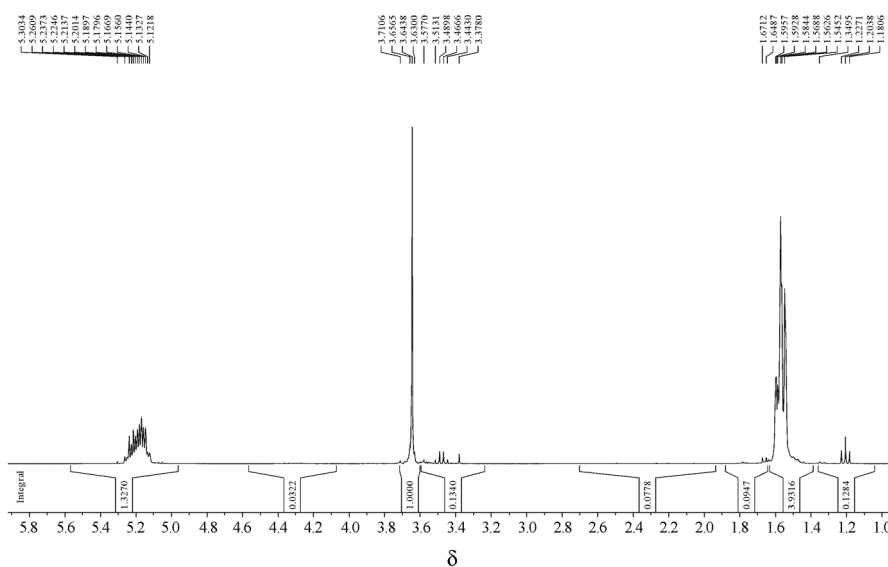


Figure 2 The $^1\text{H NMR}$ spectra of mPEG-PDLLA

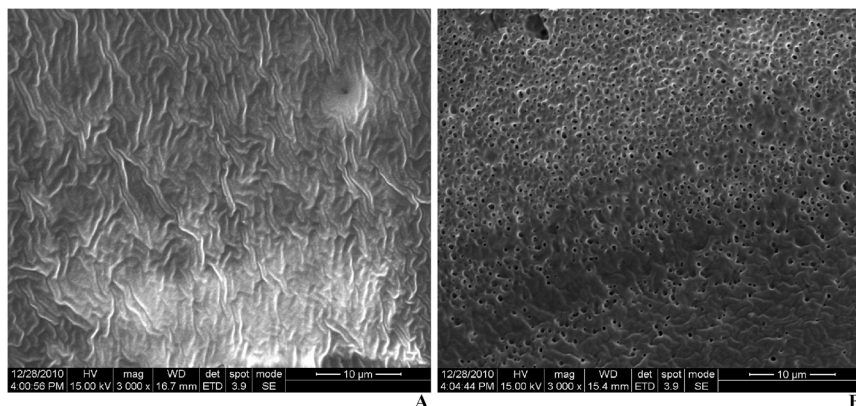


Figure 3 SEM photograph of *in situ* forming sustained-release injection without tinidazole (A) and tinidazole *in situ* forming sustained-release injection (B) ($\times 3\ 000$)

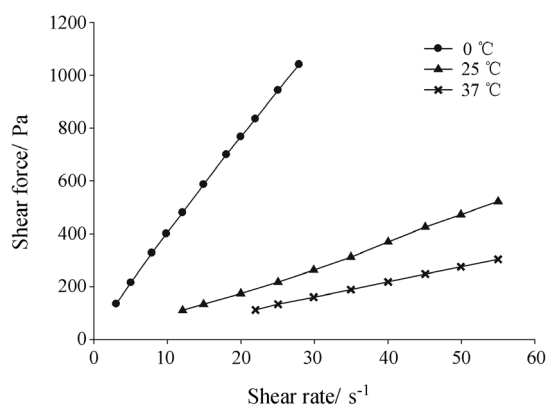


Figure 4 Flow curves of tinidazole *in situ* forming sustained-release injection

称流动活化能^[11]。在 0 °C 时注射剂黏度在 4 Pa·s 左右, 且转子转速加快, 黏度略有减小, 说明转子在快速转动时产生热量, 而低温时, 温度对注射剂的黏度影响较大, 温度升高, 注射剂黏度减小; 在 25 °C 时注射剂黏度约为 0.9 Pa·s, 完全达到通针性的要求, 因此要注意该注射剂的使用温度, 尽量在室温时使用, 以保证该注射剂良好的通针性; 在 37 °C 时注射剂黏度约为 0.55 Pa·s, 仍有较好的黏滞性, 可防止注射后药物从牙周袋中漏出。

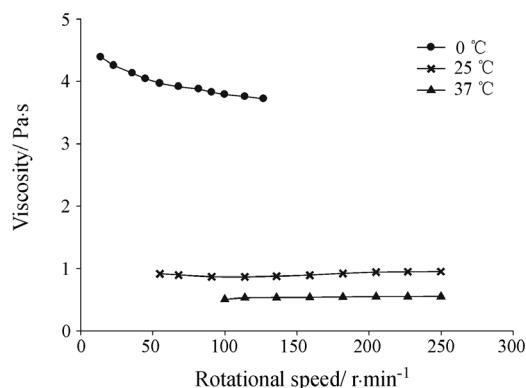


Figure 5 Viscosity curves of tinidazole *in situ* forming sustained-release injection

4 替硝唑原位固化缓释注射剂的体外释放行为考察

以替硝唑峰面积 (A) 对替硝唑的浓度 (C , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行线性回归分析, 得标准曲线方程为: $A = 0.2429C + 0.0344$, $r = 1$, 在 $5.0 \sim 500.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 峰面积对浓度呈良好的线性关系, 方法回收率与日内、日间精密度均符合要求。

在进行体外药物释放实验前, 对替硝唑在释放介质中的溶解度进行测定。结果表明, 替硝唑在 pH 7.4 的 PBS 溶液中的溶解度为 $5.88 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 能满足本实验所要求的漏槽条件。

替硝唑原位固化缓释注射剂的体外释放曲线如

图 6 所示。在 pH 7.4 的释放介质中, 注射剂释药平稳, 亲水嵌段 mPEG 的存在提高了聚合物与药物的结合能力, 减少了突释现象。8 h 累积释放约 15%, 药物可迅速起效; 48 h 累积释放 50%, 96 h 累积释放 70%, 释放较为平稳; 168 h 累积释放达 90%, 依然维持药物在一定的浓度, 有较好的缓释作用。

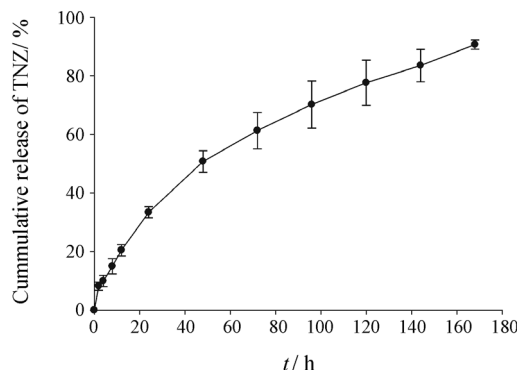


Figure 6 *In vitro* release profile of tinidazole *in situ* forming sustained-release injection in PBS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

根据 Korsmeyer-Peppas、零级释放、一级释放和 Higuchi 方程将注射剂的累积释放曲线进行拟合 (modeling and comparison of dissolution profiles)^[12, 13], 体外释放行为符合 Korsmeyer-Peppas 释放动力学方程, 回归方程有良好的相关性, Korsmeyer-Peppas 释药拟合方程 $K_k = 5.930$, $n = 0.536$, $R^2 = 0.9959$, 其中 $0.45 < n < 0.89$, 药物释放机制为 Non-Fickian 转运, 是扩散和溶蚀综合作用的结果, 为不规则转运^[14]。

5 家兔牙周袋内的药动学研究

5.1 家兔牙周炎模型的建立 由南京医科大学口腔专业医师对 12 只家兔下前牙进行了结扎与内毒素注射手术, 在术后第 14 天所有家兔手术部位的牙龈都出现溃疡面, 部分边缘肿大, 有炎性分泌物溢出, 均形成大小不等的牙周袋。

5.2 替硝唑原位固化缓释注射剂在家兔牙周袋内的药动学研究 按外标法以峰面积计算, 将替硝唑峰面积 (A) 对替硝唑的浓度 (C , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行线性回归分析, 得标准曲线方程为: $C = 1 \times 10^{-4}A + 0.5071$, $r = 0.9999$ 。在 $5.0 \sim 50.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 峰面积对浓度呈良好的线性关系, 日内精密度、日间精密度均小于 5%, 方法学回收率均大于 90%, RSD 均小于 5%, 绝对回收率均大于 90%, RSD 均小于 5%, 符合实验要求。

给药后使用 HPLC 法对不同时间点制剂组与对照组 GCF 中替硝唑含量进行了测定。以时间 (t) 为横坐标, 以 GCF 中替硝唑浓度均值 (C) 为纵坐标,

绘制 GCF 中的药时曲线, 结果见图 7。

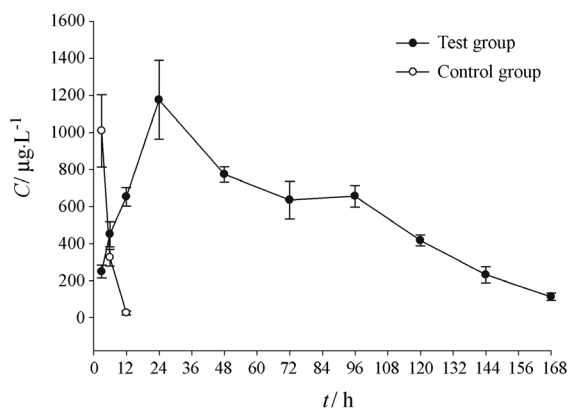


Figure 7 Tinidazole concentration-time profiles in GCF after administration of test and control solution ($n = 5$)

对照组的结果表明, 给药后替硝唑在 GCF 中的浓度迅速上升, 在 3 h 达到最大值 $1.01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 随后迅速降低, 在 12 h 时质量浓度仅为 $0.03 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。造成这一现象的原因可能是当溶液注入牙周袋后, 由于无黏附力, 大部分溶液随着家兔咀嚼运动的挤压流出牙周袋被家兔吞咽, 只有小部分溶液留在口腔与牙周袋, 因此 GCF 内的药物浓度在达峰后很快降低。制剂组的结果表明, 替硝唑在 GCF 中的浓度在给药后缓慢上升, 在 24 h 达到最大值 $1.17 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 144 h 内药物浓度缓慢下降。在 168 h 的质量浓度为 $0.11 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而这个浓度远大于它的有效治疗浓度 ($\text{MIC}_{90} = 8 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[15]。制剂组体内结果说明它的缓释性能良好, 一旦替硝唑原位固化缓释注射剂被注入牙周袋, 接触体液后原位固化形成一个药物储库, 在口腔唾液冲蚀与咀嚼运动的双重作用下, 储库内的药物持续又缓慢的被释放入牙周袋, 随后再被牙周袋内组织吸收与消除, 使 GCF 中药物浓度长期维持在有效治疗浓度以上。

使用 WinNonlin 软件对制剂组的药动学数据进行了拟合与分析, 发现一室模型可以很好的拟合制剂组的结果 (表 1), 其中 K_{01} 为药物从制剂中释放的速率常数, K_{10} 为药物释放到牙周袋内后被牙龈组织消除的速率常数。结果表明, 替硝唑在体内的 K_{01} 和 K_{10} 分别为 0.065 与 0.014, 与体外释放实验得到的释放速率常数相比 ($K = 0.014$), 体内实验的释放速率常数明显增加, 其主要原因有: ① 体内外释放条件仍存在差异, 牙周袋的体积与形态的特殊性使制剂在体内释放面积大于体外条件中的释放面积; ② 家兔的咀嚼运动间接对制剂的释放产生了影响, 而体外释放条件中没有此作用。对于对照组药动学参数的

研究, 由于其属于溶液, 不存在释放过程 (表 1)。

Table 1 PK parameters of test and control group analyzed by WinNonlin ($\bar{x} \pm s$)

Parameter	Estimate	
	Test group	Control group
VF / $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.98 ± 0.20	0.50 ± 0.04
K_{01} / h^{-1}	0.065 ± 0.022	
K_{10} / h^{-1}	0.014 ± 0.004	0.381 ± 0.021

用 WinNonlin 的非房室模型对两组数据进行了拟合, 比较制剂组与对照组的药动学参数。在表 2 中, 制剂组的药动学参数如 $T_{1/2}$ 、 T_{max} 和 AUC 远大于对照组, 统计学双侧 t 检验表明两组存在显著性差异 ($P < 0.05$), 说明制剂组具有良好的缓释性能。制剂组在 GCF 内的平均滞留时间 (MRT) 长达 72 h, 这对于牙周炎临床治疗研究具有很重要的意义。

Table 2 Pharmacokinetics parameters of test and control groups by WinNonlin using none-compartmental model ($\bar{x} \pm s$). * $P < 0.05$ vs control group

Parameter	Test group	Control group
$T_{1/2}$ / h^{-1}	$28 \pm 7^*$	1.66 ± 0.17
T_{max} / h^{-1}	$24.0 \pm 0.0^*$	3.0 ± 0.0
C_{max} / $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.17 ± 0.21	1.01 ± 0.19
AUC ₀₋₁₆₈ / $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	$96 \pm 3^*$	4.6 ± 0.7
AUC _{0-∞} / $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	$101 \pm 8^*$	4.6 ± 0.7
V / $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.75 ± 0.13	1.00 ± 0.14
CL / $\text{mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.0189 ± 0.0015	0.42 ± 0.06
MRT / h^{-1}	72 ± 3	4.25 ± 0.11

讨论

原位凝胶植入剂是近年来缓控型注射剂领域的研究热点。本研究以生物可降解的两亲性嵌段聚合物单甲基聚乙二醇- β -聚 D, L-丙交酯共聚物 (mPEG-PDLLA) 为载体, 以替硝唑为模型药物, 制备了一种在牙周病变部位缓释药物达 7 d 的原位固化缓释注射剂, 并对其体内外性质进行了考察。

该嵌段共聚物与聚乳酸 PLA、聚乳酸-羟基乙酸共聚物 PLGA 相比, PLA、PLGA 的合成技术难以保证其批次间的一致性, 该技术的研究和使用在我国仍存在瓶颈; 而 mPEG-PDLLA 采用开环聚合反应制备, 合成条件简单、易于控制, mPEG 既是聚合反应的引发剂又是终止剂, 所得聚合物的分子量分布较窄, 有利于药物释放的均一性。突释现象仍然是已经上市的可降解原位固化注射剂的主要问题。Gad 等^[16]分别以 PLA 和 PLGA 为载体, 制备了含盐酸多西环

素的原位植入剂, 并与 Atridox[®] 进行比较。结果发现, 25% PLGA、25% PLA、35% PLGA、35% PLA 和 Atridox[®] 在 8 h 时释放药物均超过 18%, 最高甚至达到 80%, 突释作用很大, 而在本实验中 8 h 释放只有 15%, 突释作用较小。同时, 该嵌段聚合物的亲水性以及与各种极性药物的亲和性提高, 有助于给药部位水分迅速渗入, 缩短制剂固化时间, 使药物在制剂固化形成的骨架中均匀分布, 从而使药物释放更均匀, 降低突释。另外, 还可以通过改变聚合物中两嵌段单甲氧基聚乙二醇 mPEG 和聚乳酸 PLA 的比例来调整聚合物的亲水性、分子量和降解速率等, 使聚合物能够充分满足不同药物的释放要求。因此, 该凝胶系统可以负载一种或多种药物, 包括各种疏水性药物和亲水性药物。

该注射剂澄清透明, 药物分布均匀, 稳定性良好, 不易分层、分解, 遇水后在 6 s 左右固化, 可以黏附于牙周袋内, 不易脱落。固化后, 表面均匀分布较多小孔, 形成水分渗透通道及药物扩散通道。该注射剂在 25 °C、37 °C 下均为典型的牛顿流体 (Newtonian), 在 25 °C 时注射剂黏度约为 0.9 Pa·s, 完全达到通针性的要求; 在 37 °C 时注射剂黏度约为 0.55 Pa·s, 仍有较好的黏滞性, 可防止注射后药物从牙周袋中漏出。在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中释放平缓, 体外释放行为符合 Korsmeyer-Peppas 释放动力学方程, 回归方程有良好的相关性, 突释小, 能持续 7 d 释药, 保持一定的药物浓度, 提高药物疗效。

采用结扎法与细菌内毒素注射法建立家兔牙周炎模型, 使家兔形成了牙周袋便于进行制剂的药理学研究。药理学实验结果与各项参数的拟合结果充分表明了替硝唑原位固化缓释注射剂在体内缓释性能良好, 制剂组可用一室模型进行很好的拟合, 可维持 GCF 内有效治疗浓度长达 168 h, 满足牙周炎临床治疗需要, 具有较好的应用前景。

References

- [1] Ding F, Feng XH, Meng HX, et al. Relationship between herpesviruses and periodontal pathogenic bacteria in subgingival plaque [J]. J Peking Univ (Health Sci) (北京大学学报医学版), 2008, 40: 318-322.
- [2] Alou L, Giménez MJ, Manso F, et al. Tinidazole inhibitory and cidal activity against anaerobic periodontal pathogens [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33: 449-452.
- [3] Shao CY, Li JP, Tu JS, et al. *In vitro* stability of paclitaxel and docetaxel binary-drug loaded micelles [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2010, 41: 428-434.
- [4] Tu JS, Pang H, Yan Z, et al. Ocular permeability of pirenzepine hydrochloride enhanced by methoxy poly (ethylene glycol)-poly (D, L-lactide) block copolymer [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2007, 33: 1142-1150.
- [5] Cohn D, Sosnik A, Garty S. Smart hydrogels for *in situ* generated implants [J]. Biomacromolecules, 2005, 6: 1168-1175.
- [6] Dong J, Jiang SG, Ping QN. Development of injectable biodegradable *in-situ* forming Gel implants [J]. Prog Pharm Sci (药学进展), 2007, 31: 109-113
- [7] Zhu Z, Xiong C, Zhang L, et al. Preparation of biodegradable polylactide-co-poly (ethylene glycol) copolymer by lactide reacted poly (ethylene glycol) [J]. Eur Polym J, 1999, 35: 1821-1828.
- [8] Zhang X, Jackson JK, Burt HM. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol [J]. Int J Pharm, 1996, 132: 195-206.
- [9] Yao DG, Sun KX, Mu HJ, et al. Preparation of cyclosporine A loaded mPEG-PLGA copolymer micelles and study its pharmacokinetics in rats [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 1410-1415.
- [10] Zhu J, Jian F, Yan H, et al. Preparation and evaluation of pilocarpine nitrate *in situ* gel for ophthalmic use [J]. China Tradit Herb Drugs (中草药), 2010, 44: 720-724.
- [11] Lu YX, He HB, Cui Y, et al. Rheological properties of sucrose acetate isobutyrate *in situ* gel [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 445-449.
- [12] Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles [J]. Eur J Pharm Sci, 2001, 13: 123-133.
- [13] Zhang Y, Huo M, Zhou J, et al. DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles [J]. AAPS J, 2010, 12: 1-9.
- [14] Zhou X, Fu CM, He Y, et al. *In vitro* balanced sustained-release of Panax notoginseng saponins controlled with various matrix materials [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 505-509.
- [15] Wust J. Susceptibility of anaerobic bacteria to metronidazole, ornidazole, and tinidazole and routine susceptibility testing by standardized methods [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1977, 11: 631-637.
- [16] Gad HA, El-Nabarawi MA, Abd El-Hady SS. Formulation and evaluation of PLA and PLGA *in situ* implants containing secnidazole and/or doxycycline for treatment of periodontitis [J]. AAPS PharmSciTech, 2008, 9: 878-884.