

复方红霉素延迟起释型缓释片的研制及其体外释放

陈海霞¹, 陈志鹏², 王启荣^{2*}, 刘泽坤³, 马全龙⁴

(1. 山东大学齐鲁医院药学部, 山东 济南 250012; 2. 山东大学附属千佛山医院, 山东 济南 250014;
3. 山东大学威海分校海洋学院, 山东 威海 264209; 4. 济南新方医药科技有限公司, 山东 济南 250100)

摘要: 以重均分子量 50 000 聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 为载体, 与一定比例的红霉素 (erythromycin, EM) 和醋酸泼尼松 (prednisone acetate, PNA) 混合制备复方红霉素延迟起释型缓释片。利用紫外分光光度法检测 EM 和高效液相法检测 PNA 在体外介质中的释药量。缓释片持续释放时间约为 21 天, EM 平均含量为 99.7 mg/片, RSD 为 0.82%; PNA 平均含量为 10.03 mg/片, RSD 为 0.93%。缓释片从第 5 天开始缓慢而平稳地释放, 在初期的突释现象尤为显著。在 21 天内 EM 累积释放量为 86.1%, PNA 累积释放量为 78.3%。结果表明: 缓释片制备方法可行, 释药性能良好, 临床疗效显著。

关键词: 聚乳酸; 复方红霉素; 延迟起释; 缓释片

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 11-1385-05

Compound erythromycin sustained release preparation and its *in vitro* release

CHEN Hai-xia¹, CHEN Zhi-peng², WANG Qi-rong^{2*}, LIU Ze-kun³, MA Quan-long⁴

(1. Department of Pharmacy of the Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China;
2. Qianfo Mountain Hospital of Shandong University, Jinan 250014, China; 3. Marine College of Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China; 4. Xinfang Medicine Science Technology Limited Company of Jinan, Jinan 250100, China)

Abstract: Using the weight-average molecular weight 50 000 polylactic acid (PLA) as a carrier, and a certain proportion of erythromycin (EM) and prednisone acetate (PNA) to mixed prepare the compound erythromycin sustained release preparation (sustained-release tablets). Using ultraviolet spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC) to detect separately the release amount of EM and PNA *in vitro* medium. The sustained-release tablets release for about 21 days, the average content of EM is 99.7 mg/tablet, RSD = 0.82%; and the average content of PNA is 10.03 mg/tablet, RSD = 0.93%. Within 21 days, the cumulative releases of EM and PNA are 86.1% and 78.3%, respectively. The drug release is steady and slow after 5 days, the burst release phenomenon in early stage is more significant. The results showed that the sustained-release tablet preparation method is feasible, the release performance is good and the clinical efficacy is significant.

Key words: polylactic acid; compound erythromycin; sustained-release; sustained release preparation

聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 具有优异的生物相容性和生物可降解性, 根据其相对分子质量的大小和制剂方式的不同可控制所载药物释放速度, 成

为目前研究最多的药物控释基质材料之一^[1]。红霉素 (erythromycin, EM) 对大多数革兰阳性菌及阴性菌均有较强的抑菌作用; 醋酸泼尼松 (prednisone acetate, PNA) 具有抗炎、抗过敏等作用。慢性鼻-鼻窦炎是常见病多发病, 临床上多采取药物治疗、物理疗法和手术治疗等, 但治疗效果不甚明显^[2, 3]。本实验将 EM 和 PNA 按照一定比例混合, 采用溶解法与

收稿日期: 2011-04-04.

基金项目: 山东省卫生科技发展计划资助项目 (2007-HW 118).

*通讯作者 Tel: 13791120656, Fax: 86-531-82963647,

E-mail: lwj65@126.com

PLA 制备成缓释片;通过体外释药实验,选择符合治疗慢性鼻-鼻窦炎释药剂量的缓释片;将缓释片由下鼻道开窗植入上颌窦内,对减轻或消除鼻腔黏膜和黏膜下层的慢性炎症疗效显著,为更好地治疗慢性鼻-鼻窦炎寻找一种新的治疗方法。

材料与方法

仪器 TUV-1800PC 型紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);SSI 型高效液相色谱仪, Lab Alliance 泵(天津市兰博实验仪器设备有限公司);Hypersil ODS2 (250 mm × 4.6 mm × 5 μm) 色谱柱(大连依利特科学仪器有限公司);TDP 单冲压机(上海天祥健台制药机械有限公司)。

药品与试剂 PLA(山东医疗器械研究所);EM(西安利君制药有限责任公司);PNA(浙江仙琚制药股份有限公司);EM 标准品(中国药品生物制品检定所);PNA 对照品(中国药品生物制品检定所);乙腈为色谱纯,水为纯化水;其余所用试剂均为分析纯。

缓释片的制备 参照文献中缓释片制备方法^[4, 5], 在无菌条件下,将 PLA 溶于丙酮,分别加入占缓释片总量 10% (R₁)、20% (R₂)、30% (R₃) 的 EM-PNA (10:1) 混合物,常温下密闭 48 h,置 50 °C 水浴中加热溶解、搅匀,待溶剂逐渐挥发使体系变成黏稠状后,50 °C 真空干燥,粉碎得到混合均匀的白色 PLA-EM-PNA 粉末,压成异型片 (1.7 cm × 0.8 cm × 0.4 cm),每片重 0.5 g。

缓释片中 EM 体外释放性能测定 采用紫外分光光度法进行测定^[6-9]。取本品 2 片,以 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) 溶液 100 mL 为溶出介质,转速为 50 r·min⁻¹,取样时间点为 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 和 21 天,吸出介质溶液并补充 PBS 溶液,取此溶液适量,用 pH 7.0 的 PBS 溶液稀释成每毫升中含红霉素 55 μg 的溶液;另取本品 10 片,研细,精密称取适量(相当于平均片重),加乙醇适量溶解后,按标示量用 pH 7.0 的 PBS 溶液稀释成每毫升中含红霉素 55 μg 的溶液。分别量取上述两种溶液各 5 mL,加硫酸溶液 (75 → 100 mL) 5 mL,混匀,放置约 30~40 min,按照分光光度法在 482 nm 的波长处分别测定吸收度,计算每片的释放量。

标准曲线制备:精密称取干燥至恒重的 EM 标准品 12.5 mg,置于 50 mL 量瓶中,用 pH 7.0 的 PBS 溶解并稀释至刻度,再分别精密移取 2.0、4.0、6.0、8.0

和 10.0 mL 置 25 mL 量瓶中,用 pH 7.0 的 PBS 稀释至刻度,量取上述溶液各 5 mL,加硫酸溶液 (75 → 100 mL) 5 mL 混匀,放置约 30~40 min,按照紫外分光光度法,于 482 nm 波长处测定吸收度值。

阴性空白实验:按照“缓释片的制备”方法制备不含 EM 的样品,按照“标准曲线制备”方法配制溶液,在 482 nm 波长处测定吸收度值,结果表明 PNA 及辅料在 482 nm 波长处无吸收,对 EM 测定无干扰。

回收率实验:精密称取样品(含量 99.5%)适量(约相当于 EM 12.5 mg),置 50 mL 量瓶中,共 9 份,分别精密加入 EM 标准品适量,用 pH 7.0 的 PBS 溶解,按“缓释片中 EM 体外释放性能测定”方法操作,平均回收率为 98.1%,RSD 为 1.5%。

缓释片中 PNA 体外释放性能测定 参照《中国药典》2010 年版二部 PNA 片项下方法^[10],采用高效液相色谱法进行测定。色谱条件:用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以乙腈-水 (33:67) 为流动相;检测波长为 240 nm。PNA 与相邻杂质峰的分离度应符合要求,理论板数按 PNA 峰计算不低于 3 000。

测试液的制备:精密称取 PNA 对照品适量,加甲醇溶解并定量稀释制成 0.5 mg·mL⁻¹ 的对照品贮备液。精密量取对照品贮备液 5.0 mL 置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度、摇匀,制成对照品溶液。取本品 10 片,研细混合均匀,精密称取适量(约相当于 PNA 5 mg)置 50 mL 量瓶中,加甲醇适量使 PNA 溶解,用甲醇稀释至刻度、摇匀过滤,制成供试品溶液。准确称取不含 PNA 的阴性样品约 0.25 g 置 50 mL 量瓶中,同法制备阴性样品溶液。

系统适用性实验及专属性考察:在上述色谱条件下,分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,结果发现 EM 及辅料不干扰 PNA 测定。

线性关系考察:精密量取 PNA 对照品贮备液 0.5、1.0、2.5、4.0、5.0、7.5 和 10.0 mL 置 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀。精密量取 20 μL 注入液相色谱仪,记录峰面积。

精密度实验:取质量浓度为 20、100 和 150 μg·mL⁻¹ 的 PNA 对照品溶液,分别于同日内重复进样 5 次和每天取样连续测定 5 天。PNA 低、中、高 3 个浓度日内 RSD 分别为 0.96%、1.14%、1.19%,日间 RSD 分别为 1.28%、1.35%、1.62%。结果表明此方法的精密度良好。

重复性实验:取同批号样品 6 份,按供试品溶液

制备得到溶液, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, RSD 为 0.95%。

回收率实验: 精密称取样品 (含量 99.3%) 适量 (约相当于 PNA 5 mg), 置 50 mL 量瓶中, 共 9 份, 分别精密加入 PNA 对照品适量, 加甲醇适量, 充分振摇使 PNA 溶解, 按供试品溶液制备, 得到平均回收率为 99.3%, RSD 为 1.26%。

缓释片体外溶解性测定 在体外建立类似人体的上颌窦 4 cm $\times$ 2 cm $\times$ 2 cm 玻璃立方体模型, 于中央上方开口, 将此模型置于温度为 33~35 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 60%~90% 的恒温水浴箱中, 取 R_1 、 R_2 、 R_3 缓释片各 3 片置于模型中, 分别于 3、6、9、12、15、18、21 和 24 天测其剩余药片干重, 观察其溶解速度。

R_2 缓释片药物含量的测定 EM 含量测定: 取本品 4 片研细, 加乙醇适量, 分次研磨使 EM 溶解, 并用水稀释成每毫升约含 1 000 单位的溶液, 摇匀静置, 精密量取悬浮液适量, 对照抗生素微生物检定法测定其含量。EM 1 000 单位相当于 1 mg。

PNA 含量测定: 取本品 20 片精密称重研细, 取适量 (约相当于 PNA 5 mg) 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇 30 mL 充分振摇使 PNA 溶解, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀过滤。精密量取续滤液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图; 另取 PNA 对照品, 同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中 PNA 的含量。

R_2 缓释片的临床疗效观察 选取 71 例住院患者, 均为经保守治疗无效或经 2 次上颌窦穿刺无效者, 符合慢性鼻-鼻窦炎鼻息肉临床分型分期及内窥镜下鼻窦手术疗效评定标准要求^[11]。按就诊顺序随机分成两组, 实验组 (33 例) 和对照组 (38 例)。告知患者本次研究目的及方法, 并签署知情同意书。对照组采用钩突切除并开放上颌窦口; 实验组在 0 $^{\circ}$ 和 30 $^{\circ}$ 鼻内镜下行下鼻道开窗术, 窗口大小为 1 cm $\times$ 2 cm, 单侧植入 R_2 缓释片 2 片, 观察其临床症状的变化, 疗效标准参照《慢性鼻-鼻窦炎鼻息肉临床分型分期及内窥镜下鼻窦手术疗效评定标准》。

统计学分析 等级资料采用 Ridit 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 EM 标准曲线

将 EM 浓度对吸收度值进行线性回归。以 EM 吸收度 (A) 对浓度 (C , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作线性回归, EM 标准曲线方程为: $A = 0.0344 + 0.0071C$, $r = 0.9958$ 。

结果表明, EM 在 0~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内吸收度与浓度线性关系良好。

2 PNA 线性关系

以 PNA 峰面积 (A) 为横坐标, 样品浓度 (C) 为纵坐标绘制标准曲线。PNA 线性回归方程为: $C = 1.8025 \times 10^{-5}A - 0.0531$, 相关系数 $r = 0.9991$ 。结果表明, PNA 在 10.08~201.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内峰面积呈良好的线性关系。

3 不同含药量缓释片的体外累积释放曲线

由缓释片体外释放累积曲线图 (图 1) 可见, EM 与 PNA 均能从缓释片向 PBS 液扩散, 释放量逐渐增加, 均可分为初释和缓释两个阶段。初释阶段药物快速释放, 维持时间大约为 5 天, 缓释阶段从第 6 天到实验终止, 至 21 天释放量达最大, 两种药物的释放, 从开始达到最高值, EM 的释放度均大于 PNA, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见表 1。

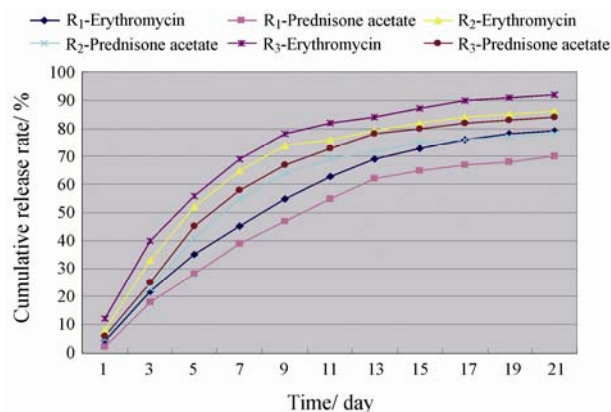


Figure 1 Cumulative release *in vitro* of the compound erythromycin sustained release preparation. R_1 , R_2 , R_3 : Drug content of 10%, 20%, 30% in sustained-release tablets, respectively

Table 1 Accumulation *in vitro* release percentage of erythromycin (EM) and prednisone acetate (PNA) in sustained release implant with different drug contents within 21 days

Content/%		Time/day		
		6	7-21	21
10%	EM	32.9	42.9	79.8
	PNA	25.8	44.2	70.0
20%	EM	52.6	32.5	85.1
	PNA	41.2	35.1	76.3
30%	EM	56.8	35.5	92.3
	PNA	45.2	47.1	80.5

4 不同含药量缓释片的体外释药模型拟合

R_1 缓释片体外释药模型拟合: EM: $Q = 27.054 \ln t - 2.5055$, $R^2 = 0.9676$ 。PNA: $Q = 25.012 \ln t - 7.4439$, $R^2 = 0.9426$ 。

R_2 缓释片体外释药模型拟合: EM: $Q = 27.013 \ln t + 8.4909$, $R^2 = 0.9807$ 。PNA: $Q = 25.858 \ln t + 2.2158$, $R^2 = 0.9749$ 。

R_3 缓释片的体外释药模型拟合: EM: $Q = 28.193 \ln t + 9.1685$, $R^2 = 0.9628$ 。PNA: $Q = 26.546 \ln t + 3.8468$, $R^2 = 0.9726$ 。

从相关系数可以看出, 缓释片体外释放性能较好地符合 Higuchi 模型。不同载药量的缓释片药物释放情况不同。 R_1 缓释片释放速率慢, R_3 缓释片释放速率快, 根据慢性鼻-鼻窦炎的治疗需要, R_2 缓释片最适合临床治疗要求。

5 缓释片体外溶解性

在类似上颌窦环境中, R_1 、 R_2 、 R_3 缓释片分别从第 5 天、第 3 天和第 2 天开始逐步溶解, 至 12、19、25 天溶解约 90%。结果见图 2。

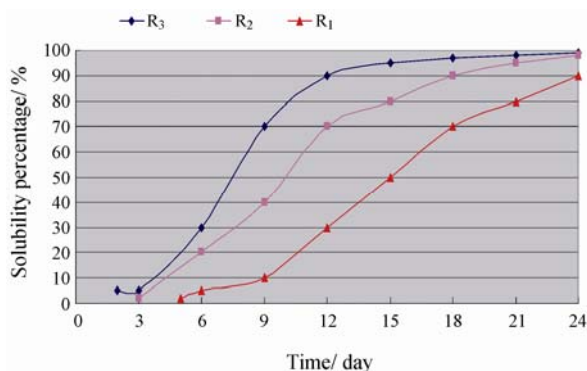


Figure 2 Percentage of dissolved erythromycin delayed-release tablets after release

6 R_2 缓释片药物含量

经过对 3 批 R_2 缓释片的药物含量测定, EM 平均含量为 99.7 mg/片, RSD 为 0.82%; PNA 平均含量为 10.03 mg/片, RSD 为 0.93%, 均符合要求。结果见表 2。

Table 2 Sample assay results ($n = 3$)

Batch number	Erythromycin (mg/tablet)	Prednisone acetate (mg/tablet)
81001	99.5	9.93
81002	100.6	10.11
81003	99.0	10.06
Average	99.7	10.03
RSD/%	0.82	0.93

7 R_2 缓释片临床疗效观察

R_2 缓释片在植入上颌窦 20 天内, 其释放的药物能明显改善患者头痛、鼻塞、鼻腔异味和流脓涕等症状, 因此一次使用 R_2 缓释片可达到消除慢性鼻-鼻窦

炎炎症发作期的各种症状。比较实验组和对照组在炎症发作期各种症状改善方面无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明此方法与传统鼻内窥镜鼻窦手术治疗方法的疗效相似, 但在术后痛苦、并发症、换药次数及住院费用等方面明显优于传统方法。结果见表 3、4。

Table 3 Two groups of chronic nasal - comparison of improvement of ENT of symptoms in patients with sinusitis

Group	n	Cure	Effective	Ineffective	Effective rate/%
Experiment	33	25	6	2	93.94
Control	38	26	9	3	92.10
Total	71	51	15	5	92.96

Table 4 The postoperative follow-up survey results

Group	n	Pain	Cost (RMB)	Adhesion	Relapse	Number of changeover
Experiment	33	3	4 000-5 000	1	1	1-2
Control	38	18	4 000-10 000	7	2	4-5

讨论

PLA 分子量越小、含药量越高, 其释药速度越快^[12]。在制备缓释片时, 将 PLA 加入丙酮中溶解后, 再加入 EM 和 PNA, 更易混合均匀, 干燥后粉碎成大小适宜的颗粒, 普通压片方法即可压制成异型缓释片。

在干燥过程中, 曾做过常压干燥和减压干燥的对比, 常压干燥时丙酮不易挥发, 且温度高于 70 °C 时, PLA 与药物的混合物变色, 随时间的延长, 颜色越来越深, 最后变成棕黑色, 干燥物较硬且易黏结, 干燥效果不佳。而减压干燥时易于干燥, 效果较好。

《中国药典》2010 版二部红霉素肠溶片的溶出度释放度测定方法中, EM 在 PBS 溶液中溶解度为 277.78 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 而本品在 PBS 溶液中最大质量浓度为 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 最终确定了本实验中 PBS 溶液用量为 100 mL, 分 8 次进行, 可确保漏槽条件合格。

按照缓释片体外释放性能测定和溶解性测定结果, R_1 、 R_3 缓释片不符合临床治疗时间需要。由体外释放累积曲线图可见, R_2 缓释片中 EM 和 PNA 的释放在初期较快, 维持时间大约为 5 天, 药物释放量可占 EM 总量的 52.6%, 占 PNA 总量的 41.2%。此阶段释放的药物主要是由于缓释片表面积大, 在缓释剂表面的药物向介质迅速扩散。从第 6 天开始, 药物减缓释放, 至 21 天 EM 可释放总量的 86.1%、PNA 释放了 78.3%, 两种药物的释放特性基本一致, 释放速率比较缓慢且比较均匀, 符合临床治疗时间需要。

通过临床观察, 使用此缓释剂治疗慢性鼻-鼻窦

炎, 手术创伤小, 无明显毒副作用, 临床疗效显著, 值得推广。

References

- [1] Zhang ZY, Run YH. Polylactic acid in the biomedical field of application [J]. Fine Special Chem (精细与专用化学品), 2005, 13: 7-9.
- [2] Wang DH. Endoscopic nasal surgery for chronic nasal structure more-sinusitis study [J]. Chin Med Mod Dist Edu China (中国中医药现代远程教育), 2010, 18: 234.
- [3] Ma SM. Endoscopic nasal surgery for chronic nasal structure more-sinusitis study [J]. Clin Misdiagn Misther (临床误诊误治), 2009, 22: 24.
- [4] Zhang N, Zhu JB. The preparation of diltiazem hydrochloride delayed release tablets [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2002, 37: 724-727.
- [5] Chen JB, Hu QJ, Xie Xl, et al. Preparation and *in vitro* releasing performance of intraocular polylactide-levofloxacin sustained [J]. Chin Hosp Pharm (中国医院药学杂志), 2007, 27: 1194-1197.
- [6] Li CJ, Yu YL, Yang QM, et al. Optimizaion of the formulation of ranolazine hydrochloride sustained-release tabalet and its pharmacokinetics in dogs [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 1170-1176.
- [7] Pharmacopoeia Committee of Ministry of Health. Chinese Pharmacopoeia (中国药典) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 223, 846.
- [8] Chen SJ, Zhu JB. The release behavior of combined system of diltiazem hydrochloride delayed-onset sustained-release pellets and modeling by mathematics method [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2005, 40: 606-610.
- [9] Chu CD, Guo ZY, Liu F, et al. Methotrexate *in vitro* sustained-release implant of release method [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2005, 14: 438-440.
- [10] Wang M, Yang XP, Su YX, et al. Quantitative release of recombinant basic fibroblast growth factor/polylactic acid-polyglycolic acid implants and *in vitro* release of the preparation [J]. Chin J Dental Med (中华口腔医学研究杂志), 2008, 2: 130-134.
- [11] Huang ZX, Wang JB, Kong WJ. Practical Head and Neck Surgery (实用耳鼻咽喉头颈外科学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2009: 181.
- [12] Fan JQ, Tu YS, Ding Y, et al. Doxorubicin-polylactic acid ophthalmic preparation of sustained-release implants and quality control [J]. China Pharm (中国药房), 2004, 15: 662-663.