

盐酸噻吩诺啡缓释微球的体外释放度及其体内外相关性研究

杨 阳, 高永良 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

[摘要] 目的 建立体内外相关性良好的盐酸噻吩诺啡缓释微球的体外释放度测定方法。方法 采用直接释药法和透析释药法测定盐酸噻吩诺啡缓释微球的体外释放度; 采用高效液相色谱法测定盐酸噻吩诺啡缓释微球在大鼠注射部位的残留量, 计算微球在体内的释药速度。通过相关性评价确定最佳的体外释放度测定方法。结果 透析释药法和直接释药法均可获得良好的体内外相关性。结论 直接释药法和透析释药法均可用于测定盐酸噻吩诺啡微球的体外释放度。

[关键词] 盐酸噻吩诺啡; 缓释微球; 体外释放度; 体内外相关性

[中图分类号] R944.9 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2010)05-0369-04

Study on *in vitro* release and correlation between *in vivo* and *in vitro* of thienorphine hydrochloride microspheres

YANG Yang GAO Yongliang (Institute of Pharmacology and Toxicology, The Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for the determination of *in vitro* release of thienorphine hydrochloride microspheres with a good correlation between *in vivo* and *in vitro*. **Methods** Immediate release and dialysis release methods were used to determine the *in vitro* release rate of thienorphine hydrochloride microspheres. The residue thienorphine hydrochloride microspheres in the injection site was determined by HPLC, and *in vivo* release rate of thienorphine hydrochloride microspheres was calculated. The optimal release solution was chosen based on the correlation evaluation between the *in vivo* and *in vitro* results. **Results** Immediate release and dialysis release methods had a good *in vitro* and *in vivo* correlation. **Conclusion** Immediate release and dialysis release method could be used to determine the *in vitro* release of thienorphine hydrochloride microspheres.

[Key words] thienorphine hydrochloride microspheres; *in vitro* release rate; correlation between *in vivo* and *in vitro*

盐酸噻吩诺啡为军事医学科学院毒物药物研究所自主研发的, 具有知识产权的国家一类新药。该药结构新颖, 为阿片受体的部分激动剂, 能对抗吗啡依赖, 有望开发成为新型的防复吸药^[1]。为了减少给药次数, 提高患者用药的依从性, 以乳酸羟醋酸共聚物 PLGA (75/25) 15000 为载体, 采用 O/W 型乳化溶剂挥发法制备了在体外可缓释 21 d 的盐酸噻吩诺啡微球, 对影响盐酸噻吩诺啡缓释微球体外释放度的因素进行了考察, 并测定了盐酸噻吩诺啡微球在大鼠注射部位的释放速度。

1 实验材料

1.1 仪器 LC-10AT VP 型泵, SPD-10AVP 型紫外检测器 (日本岛津); N2000 色谱数据工作站 (浙江大学智能信息工程研究所); 透析袋 (截留分子量 10000 北京鼎国); SHK-02-1 台式恒温震荡培养箱 (北方同正)。

1.2 试剂 盐酸噻吩诺啡 (军事医学科学院毒物药物研究所, 批号 03021302); 乳酸羟醋酸共聚物 (二单体比例 75:25, 相对分子质量 15000 四川大学, 批号 060925); 盐酸噻吩诺啡 PLGA 微球 (自制, 载药量 5.09%); 甲醇, 乙腈为色谱纯; 水为纯化水; 其他试剂均为分析纯。

1.3 实验动物 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 (250 ± 20) g 军事医学科学院动物中心提供。

2 实验方法

2.1 HPLC 测定释放介质中盐酸噻吩诺啡的含量
色谱柱: Phenex prodigy C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-甲醇-0.02 mol/L 盐酸缓冲液 (pH=3, 含 0.2% 的三乙胺) (40:15:45) 为流动相; 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 25 °C; 检测波长: 220 nm, 进样量: 20 μl。定时量取盐酸噻吩诺啡微球的释放液 1 ml 用 0.22 μm 滤膜过滤, 取续滤液 20 μl 进样; 配制 10 μg/ml 的盐酸噻吩诺啡对照溶液, 在相同色谱条件下进样, 通过对照品计算释放介质中药物的含量。在上述色谱条件下, 盐酸噻吩诺啡溶

[作者简介] 杨 阳 (1980-), 男, 博士研究生. Tel (010) 66931694 E-mail: jianusil0@126.com.cn.

液在 $1 \sim 80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内峰面积 (Y) 和浓度 (X) 的线性关系良好, $Y = 27.847X + 8.7037$, $R^2 = 0.9999$ ($n = 3$)。高、中、低 3 种浓度的回收率分别为 101.38%, 99.24%, 99.93%, RSD 分别为 0.17%, 0.40%, 0.45% ($n = 5$), 其日内精密性分别为 0.61%, 0.13% 和 0.79% ($n = 5$); 日间精密性分别为 0.91%, 0.50% 和 0.63% ($n = 5$)。

2.2 HPLC 测定大鼠体内残留盐酸噻吩诺啡的含量 色谱条件同 2.1。盐酸噻吩诺啡溶液在 $1 \sim 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内峰面积 (Y) 和浓度 (X) 的线性关系良好, $Y = 30.485X + 10.311$, $R^2 = 0.9999$ ($n = 3$)。高、中、低 3 种浓度的回收率分别为 98.0%, 98.7% 和 101.6%。 RSD 分别为 0.87%, 0.91%, 0.43% ($n = 5$), 其日内精密性分别为 0.89%, 0.63% 和 0.59% ($n = 5$); 日间精密性分别为 1.08%, 0.94% 和 0.73% ($n = 5$)。

2.3 盐酸噻吩诺啡缓释微球体外释放度的测定

2.3.1 直接释药法 精密称取盐酸噻吩诺啡微球 10 mg 置于盛有一定体积的浓度为 0.05 mol/L、 $\text{pH} 7.4$ 的磷酸盐缓冲液 (含 0.02% 叠氮化钠) 的三角瓶中, 置于温度为 $(37.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$, 速度为 120 r/min 的恒温振荡仪中振荡, 定时取样 1 mL 同时补充介质 1 mL。HPLC 法测定介质中药物的含量, 计算累积释放度。

2.3.2 透析释药法

2.3.2.1 不同浓度盐酸噻吩诺啡溶液扩散常数的测定 分别精密移取 3 mL 三种不同浓度盐酸噻吩诺啡磷酸盐缓冲液溶液 ($\text{pH} 7.4$), 置于透析袋中, 两端扎紧后, 放入盛有 27 mL 释放介质的三角烧瓶中, 于 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的恒温振荡器中水平振荡, 频率为 120 r/min, 于 0.5, 1, 2, 3, 5, 6, 8, 10 h 取样 1 mL 同时补充介质 1 mL。HPLC 法测定介质中药物的含量, 计算盐酸噻吩诺啡溶液扩散速度常数和累积扩散百分率。

2.3.2.2 透析释药法测定盐酸噻吩诺啡微球的释药速度 精密称取盐酸噻吩诺啡微球 10 mg 置于透析袋中, 加入 3 mL $\text{pH} 7.4$ 的磷酸盐缓冲液 (含 0.02% 叠氮化钠), 两端扎紧后, 放入盛有 27 mL 释放介质的三角烧瓶中, 于 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的恒温振荡器中水平振荡, 频率为 120 r/min, 定时取样 1 mL 同时补充介质 1 mL。HPLC 法测定介质中药物的含量, 计算累积释放度。

2.4 大鼠皮下注射盐酸噻吩诺啡微球后药物残留量的测定 取 Wistar 大鼠 18 只, 雄性, 体重为 (250 ± 20) g 按每只 40 mg 盐酸噻吩诺啡缓释微球的剂量 (约相当于盐酸噻吩诺啡 2 mg) 给药, 将盐酸噻吩

诺啡缓释微球以 1 mL 注射溶媒 (含 0.5% 羧甲基纤维素钠和 0.1% 的吐温-80 纯化水溶液) 混悬后沿大鼠皮下注射。分别于给药后 1, 3, 5, 7, 14, 21 d 每次取大鼠 3 只断头取血, 小心剪取注射部位的皮下组织, 以确保残留微球全部取出。将取下的皮下组织置于小烧杯中, 用眼科剪剪成小块, 加入乙腈/水 (9:1) 2 mL 用组织匀浆机匀浆 2 min, 加入甲醇 1 mL 以沉淀 PLGA, 混匀后 10 000 rpm 离心 10 min, 取上清液转移至 10 mL 容量瓶中, 流动相定容, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 取续滤液 20 μL 进样。由于注射时会有少量微球残留在注射器内, 故每次注射后需小心收集注射器内残留微球, 定量测定残留的药物量, 计算出实际注射的微球在大鼠体内的释药率, 释药率 = $1 - (\text{注射部位残留微球中药物的含量} / \text{实际注射的药物量}) \times 100\%$ 。

3 结果

3.1 直接释药法 当释放介质的体积分别为 10 mL 和 30 mL 时, 微球的体外释药曲线见图 1。从图中可见, 体积为 10 mL 的体外释药速度比 30 mL 略快, 但两者释药曲线相似因子 f_1 为 61.86 没有显著性差异, 最终选定释放介质体积为 30 mL。测定释放介质在 21 d 的 pH 值, 结果表明, 两种释放条件下, 介质的 pH 一直保持在 7.4 左右, 与第 0 d 相比无明显变化。

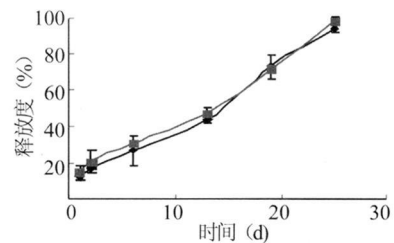


图 1 直接释药法不同释放介质体积下微球释药曲线图 ($n = 3$)

—◆— 10 mL —■— 30 mL

3.2 透析释药法 结果见表 1, 透析袋内溶液的浓度对扩散速率无明显影响。在约 4 h 时, 大部分药物都已经扩散出来。由此可见, 游离药物在透析袋内中的扩散速率常数 K 值几乎不受初始盐酸噻吩诺啡溶液浓度的影响, 透析袋中药物在 10 h 的累积扩散量 98% 以上, 说明透析袋对盐酸噻吩诺啡没有吸附。

3.3 透析释药法和直接释药法比较 结果见图 3。直接释药法所获得的体外释放度数据略低于透析袋法, 这是因为采用直接释药法时, 微球被容器的吸附及取样过程中会造成微球的损失。但两者的相似因子 f_1 为 70.92, 表明两种方法测得的释药曲线没有显著性差异。

表 1 不同浓度盐酸噻吩诺啡溶液扩散常数 K (37 °C)

C_2^0 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Q_s^0 (μg)	K ($\text{h}^{-1}, n=3$)	r	\bar{K} (h^{-1})
12.49	37.47	0.3067 ± 0.016	0.9775	
124.88	374.64	0.3005 ± 0.013	0.9357	0.3083
624.38	1873.14	0.3169 ± 0.011	0.9103	

注: C_2^0 为溶液初始浓度

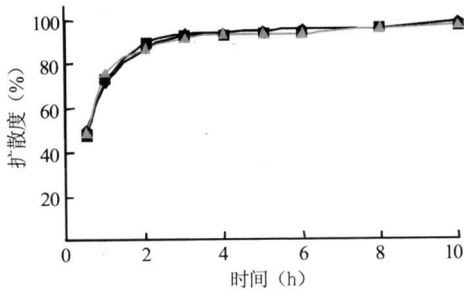


图 2 不同浓度盐酸噻吩诺啡溶液扩散曲线图 (n=3)

—◆— 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; —■— 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; —▲— 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

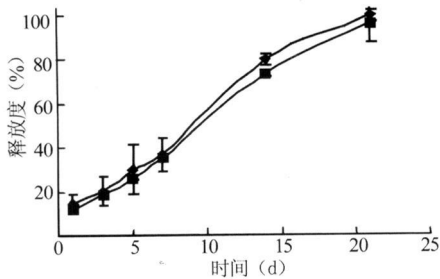


图 3 两种释药方法的微球释药曲线图 (n=3)

—◆— 透析法; —■— 直接法

3.4 盐酸噻吩诺啡缓释微球在大鼠注射部位的释药速度 盐酸噻吩诺啡缓释微球在大鼠体内的释药速度符合 Higuchi 方程 $Q = 20.49t_{1/2} - 5.87$, $R^2 = 0.989$ 。结果见图 4。

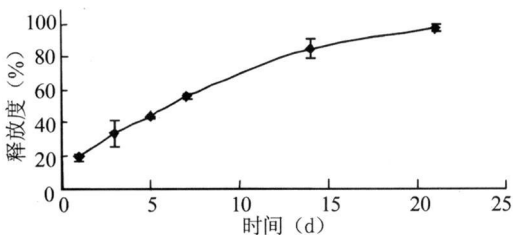


图 4 盐酸噻吩诺啡缓释微球在大鼠注射部位的释放速度曲线 (n=3)

3.5 体内相关性评价 以体外释药百分率 (X) 对应体内释药百分率 (Y) 用最小二乘法进行线性回归, 得到如下回归方程: 直接释药法: $Y = 0.8796X + 17.838$, $R^2 = 0.9602$; 透析释药法: $Y = 0.8516X +$

16.03 , $R^2 = 0.9581$ 。可见, 采用直接释药法和透析释药法测定盐酸噻吩诺微球所获得的体内相关性均较好 ($R^2 > 0.95$), 结果见图 5~6。

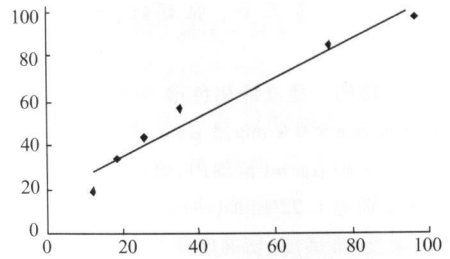


图 5 盐酸噻吩诺啡缓释微球体内释药度与直接释药法的相关性

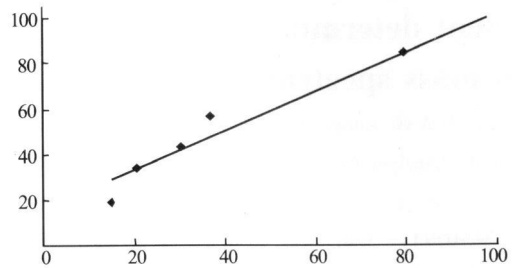


图 6 盐酸噻吩诺啡缓释微球体内释药度与透析释药法的相关性

4 讨论

目前药典上还没有收载专用于微球体外释放度测定的方法, 研究者一般采用自行设计的方法, 使体外释放条件尽可能地模拟体内。测定温度一般为 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 测定介质的体积通常远小于常规的溶出度测定法, 可以只有几十毫升, 或几毫升^[2]。目前常用的微球体外释放度试验方法有直接法、透析法和溶出度测定法。

笔者在本实验中对影响盐酸噻吩诺啡缓释微球体外释放度的因素进行了考察, 得出最能反映体内释放速度的体外实验方法。无论是采用透析法还是直接释药法, 都可以获得较好的体内相关性。两种方法在相同时间内体内释药百分数都明显高于体外释药百分数, 尤其是在释药初期。这可能是由于体内的脂质或其他生理活性物质作用, 有利于水分被摄取于聚合物中而导致聚合物的降解速度加快^[3]。此外, 体内的快速降解还可能与外源性抗体反应有关^[4]。外源抗体周围的巨噬细胞聚集在微球注射部位, 形成屏障。外源性抗体反应过程中产生的自由基、酸性物质或者由这些细胞产生的酶可以加速 PLGA 降解^[5]。
(下转第 382 页)

2 通过临床合理用药监测系统 (PASS)寻找药品不良反应信息

美康公司开发研制的临床合理用药监测系统 (Prescription Automatic Screening System, PASS)是一套能够对医嘱进行实时监测,向医护人员提供药物信息查询的数据库软件系统^[5]。PASS挂接在医院信息系统之上,通过对医院处方(或医嘱)进行实时和历史性的监测审查,提供不同级别的警告性提示(黑、红、黄、绿)告知用户结果信息,并提供病人用药指南、用药教育、药物不良反应、药物相互作用和药物检验值信息等查询,以供医务人员咨询参考,从而达到减少不合理用药,防止不良事件发生的目的^[6]。PASS在临床的应用大大降低了ADR的发生率,使临床用药趋于合理化和规范化。

而笔者在这里介绍的主要是利用PASS来主动发现已经发生但临床漏报、未报的ADR。这种方法主要是利用PASS中的筛选功能。因为患者用药是有一定规律性的,可通过患者的用药情况反推出患者疾病的发展情况^[7]。如果患者所用药品中出现某些异常用药,例如骨折患者在住院期间一直在用一两种抗菌药物,某一天发现医生下达了抗过敏的用药医嘱,即可推断其出现了过敏反应,对病例进行跟踪调查,分析过敏反应产生的原因,就可能发现未上报的ADR。因此可以将某些疾病的治疗用药作为关键词进行条件筛选,分析用药原因,从而来发现ADR。举例来说,如在PASS的筛选条件中选择“医嘱内容”“包含”“甘利欣”,系统就会自动把已经用过甘利欣的患者信息罗列出来,然后根据患者的住院号再到医信通系统中查阅病历,查看生化指标,分析医生保肝治疗的原因,判断肝功能变化与用药情况的关联性,再与医生沟通,完成ADR的上报程序。工作流程如上图。

以上两种查找手段提高了ADR的发现率,弥补了自发呈报方式的随意性大、漏报率高的不足。

2005年本院开展ADR监测工作初期,主要是医护人员自发呈报,一共上报了116例;2006年安装PASS后,临床药师逐渐摸索出上述方法,ADR报告的数量取得了明显的增加,全年上报ADR报表201份,其中有63例是临床药师通过这两种手段发现的,占了31.34%。2007年上报ADR报表232份,其中有90例是临床药师通过这两种手段发现的,占了38.79%。2008年上报ADR报表243份,其中有112例是临床药师通过这两种手段发现的,占了46.1%。在ADR报表数量增加的同时,质量也有了很大提高,以前只能发现恶心、呕吐、皮肤过敏等常见的ADR,现在能发现肝肾功能异常、血糖异常、骨髓抑制等难于发现的ADR。通过这种手段,早在国家局通报加替沙星引起的血糖异常之前本院已有上报,另外新的、严重的不良反应也时有发现。实践证明,这种方法发现的ADR质量更高、价值更大。

【参考文献】

- [1] 杨锐,尹成,董丽.美国药品不良反应监测体系介绍[J].中国工业杂志,2003,16(5):305.
- [2] 杨樟卫.美国卫生系统药师协会药物不良反应监测和报告指南[J].药学服务与研究,2002,2(3):189
- [3] 张青山,刘淑芳,金仲品.辛伐他汀致横纹肌溶解症[J].药物不良反应杂志,2004,6(2):122
- [4] 熊金辉,雷招宝,肖涛.辛伐他汀的不良反应及其防治[J].药物不良反应杂志,2006,8(2):113.
- [5] 王书杰,张新春,王丽萍,等.PASS系统医嘱处置对临床合理用药的影响[J].中国药师,2006,9(2):166.
- [6] 杨樟卫,胡晋红.计算机在药品不良反应监测中的应用和展望[J].中国药事,2005,19(7):435.
- [7] Xu F, Xu G, Hu JCH, et al. Computer assisted monitoring of adverse drug reaction [J]. Chin J Pharmacoepidemiol 2004, 13 (5): 268

[收稿日期] 2009-12-20

[修回日期] 2010-03-04

(上接第371页)

【参考文献】

- [1] 李妍妍,高永良,王东援,等.HPLC法测定盐酸噻诺啡片的含量及其溶出度[J].中国新药杂志,2005,14(5):587.
- [2] Anderson J, Shiver MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 28 (13): 5.
- [3] Menei P, Daniel V, Monteno M C, et al. Biodegradation and brain tissue reaction to poly (D, L-lactic co-glycolic acid) microspheres

[J]. Biomaterials 1993, 14: 470.

- [4] Ali S Doherty P, Williams DE. Molecular biointeractions of biomedical polymers with extracellular exudate and inflammatory cells and their effects on the biocompatibility in vivo [J]. Biomaterials 1994, 15: 779.
- [5] 符旭东,高永良,平其能,等.石杉碱甲缓释微球的体外释放度及其体内相关性研究[J].医药导报,2005,24(11):994.

[收稿日期] 2010-03-16

[修回日期] 2010-05-10