

文章编号: 1005-8982(2011)23-2851-04

·论著·

氟伐他汀钠 - PLGA 微球复合膜的制备及体外缓释药的研究*

高志达 杨茂伟 梁 栋 杨 蕾

(中国医科大学附属第一医院 骨科 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 制备氟伐他汀钠 - PLGA 微球复合薄膜,并对其体外释药性能进行相关评价。方法 用复乳法制备 3 种不同含药量的氟伐他汀钠 - PLGA 微球,压膜后在 PBS 缓冲液中进行体外缓释药实验,使用高效液相色谱法(HPLC)绘制累积释药曲线。结果 分别用 50、75 和 125 mg 氟伐他汀钠制作不同含药量的微球复合膜。其 28 d 内累积释放量分别为 95.49%、96.40% 和 98.45%,在 5~28 d 释药后期药物释放平稳而缓慢。结论 制备得到了缓释时间为 28 d 的氟伐他汀钠 - PLGA 微球复合膜,其缓释时间及缓释特性能够满足下一步的动物体内实验,具有潜在的临床应用需要。

关键词: 氟伐他汀;微球复合膜;体外释药;缓释

中图分类号: R 944.9 R 972.6 文献标识码: A

Preparation and property of sustained release in vitro of Fluvastatin-PLGA microspheres compound membrane*

GAO Zhi-da, YANG Mao-wei, LIANG Dong, YANG Lei

(Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, P.R. China)

Abstract: **[Objective]** To prepare a Fluvastatin carried system by PLGA microspheres compound membrane and study the delivery of Fluvastatin from PLGA compound membrane in vitro so as to choose better carrier. **[Methods]** Three different Fluvastatin sodium-loaded microspheres were made using a triple emulsion process. After membrane in PBS buffer a drug delivering experiments carried out in vitro, draw the curve of accumulative release rate on time by high performance liquid chromatography (HPLC). **[Results]** With 75 mg, 50 mg, and 125 mg Fluvastatin sodium make different doses of containing microspheres composite film. Accumulation release percent contents of Fluvastatin in microspheres compound membrane 28 days range from 95.49%~98.45%, and in the later stage (5~28 d), all the implants exhibit stable and slow release behavior. **[Conclusion]** Fluvastatin-PLGA microspheres compound membrane were formulated successfully. Moreover, the release time could meet the requirement for the next step in animal experiment and have potential clinical application needs.

Key words: Fluvastatin; microspheres compound membrane; in vitro release; sustained release

氟伐他汀(fluvastatin)^[1-2]是第 1 个全化学合成的降胆固醇药物,为羟甲戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,是一种优良的降血脂药,几年来的实验研究^[3]和临床流行病学调查^[4]结果显示,他汀类药物

具有刺激骨形成、恢复骨骼细微结构、增加骨强度及降低骨折风险等^[5]作用,是一类新兴的极有潜力的促进骨形成药物^[6]。临床中常用的氟伐他汀钠为胶囊、片剂等,由于其半衰期只有 0.5~1.2 h,骨折患者

收稿日期 2010-04-09

* 基金项目 辽宁省博士启动基金资助项目(No 20071044) 辽宁省科学技术计划项目(No 2009225025) 沈阳市科学技术计划项目(No: 1091136-9-03)

[通信作者] 杨茂伟 E-mail: mwyang@mail.cmu.edu.cn; Tel: 13504078611

• 2851 •

需每日多次口服 血药浓度波动大。生物可降解高分子材料聚乳酸-乙醇酸共聚物(PLGA)是一种常用的控制释放的药物载体^[7],具有良好的可降解性能以及生物相容性^[8-9]。笔者制备氟伐他汀钠-PLGA 微球复合薄膜,并对其体外释药性能进行相关评价,旨在为促骨折愈合复合膜的制备开展前期探索性研究。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

氟伐他汀钠,浙江霍姆顿化工有限公司提供;PLGA(PLA/PGA=50:50),山东济南岱罡生物科技公司提供,分子量 60 000;二氯甲烷(分析纯)由沈阳市第一试剂厂提供;乙腈(色谱纯)由天津化工厂提供。

1.2 仪器与设备

Model500 series 高效液相色谱仪(美国 SSI);色谱柱(迪马科技公司);DZF-6050 型真空干燥箱(上海博迅实业有限公司);超声乳化仪(上海博迅实业有限公司);微量过滤器(有机系,0.45 μ m);微量进液器(上海安亭微量进样器厂);THZ-C 恒温振荡器(江苏太仓实验仪器厂);透析袋(截留分子质量为 3000,上海绿鸟科技发展有限公司);HJ-5 多功能搅拌机(江苏金坛市环宇科学仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 氟伐他汀钠-PLGA 微球复合薄膜^[10-11]的制备 ①用电子天平精密称取 3 份不同剂量的氟伐他汀钠(50、75 和 125 mg)溶于 2.5 mL 的去离子水中完全溶解,再精密称取 0.3% PEG 溶于上述溶液中作为内水相备用;②用电子天平精密称取 250 mg PLGA 溶于 5 mL 二氯甲烷,充分溶解作为油相备用;③将 PVA200 mg 充分溶解于 80 $^{\circ}$ C 40 mL 的水中作为外水相备用;④将上述内水相缓慢倒入超声下的油相中乳化 3 min 得到乳白色液体;⑤将上述乳白色液体缓慢倒入超声下的外水相中乳化 3 min 后快速搅拌(1 800 r/min)6 h,二氯甲烷充分挥发,用去离子水萃取 3 次后冷冻干燥,得到不同载药量的氟伐他汀钠-PLGA 微球,经计算 3 种微球大小约 5~15 μ m,载药量分别为 1.93%、2.33%和 3.14%。分别标记为 50、75 和 125。⑥用压膜器压膜后紫外线消毒备用。

1.3.2 载药膜片体外释药实验方法 高效液相色谱^[12]条件:色谱柱:diamondsil C18 (200 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相:乙腈-1%磷酸(50:50);流速:1 mL/min;柱温:25 $^{\circ}$ C;检测波长:234 nm;进样体积:

20 μ L。

载药膜片药物体外释放效能的测定根据薄膜的载药量主要分 3 个实验组,在观察其释放规律的同时为以后的体内实验做准备,将同等大小(30 mg)标记为 50、75、125 及 PLGA 的微球复合膜放入分子量为 3 500 的透析袋中,并在其中放入一些释放介质,将膜片放入其中并用夹子夹住透析袋分别加入 250 mL PBS 缓冲液(pH=7.4),该体系置于(37 \pm 0.5) $^{\circ}$ C 的水浴振荡器中避光放置,在药膜边缓释边震荡的过程中使 PBS 缓冲液含药量均匀一致,于 0、0.5、1.0、3.0、5.0、8.0、15.0、26.0、50.0、74.0、134.0、206.0、360.0 和 480.0 h 不同时间间隔点定时用取样器取样(透析袋外液)0.1 mL,并且每次取样后向原缓冲液中及时补加 0.1 mL PBS 液,用微量过滤器过滤液体,用微量进样器抽取 0.02 mL 过滤后溶液样品。样品分别在 234 nm 下测定 A,计算得出相应浓度。

2 结果

2.1 专属性检测

对照品氟伐他汀钠和样品氟伐他汀钠-PLGA 微球复合膜缓释溶液(标记为 125 在 168 h 时)的合并对比图(图 1)以及色谱对比图(图 2),在氟伐他汀钠出峰位置(12.843 min)或接近出峰位置未发现任何明显有效杂质峰干扰,说明该系统的专属性比较好。

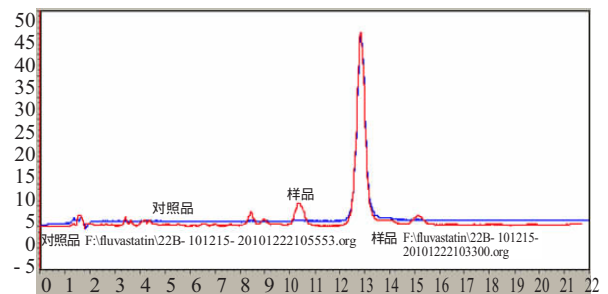


图 1 氟伐他汀钠-PLGA 微球复合膜缓释溶液 68 h 和氟伐他汀钠对照品的合并色谱对比图

2.2 线性关系

精确称取 6 mg 氟伐他汀钠到 20 mL 量瓶中,用去离子水溶解并稀释至刻度,混匀,作为储备液。分别精取储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用去离子水溶解并稀释到刻度,混匀,即得到浓度分别为 30、60、90、120、150、180、210、240 和 270 μ g/mL 的溶液。照上述色谱条件进样,记录色谱图,量取主峰峰面积,以峰面积(A)和浓度(C)作线性回归,以最小二乘法得回归方程为 $A=50.241C-11.1$, $r=0.9998$ 。表明氟伐他汀钠

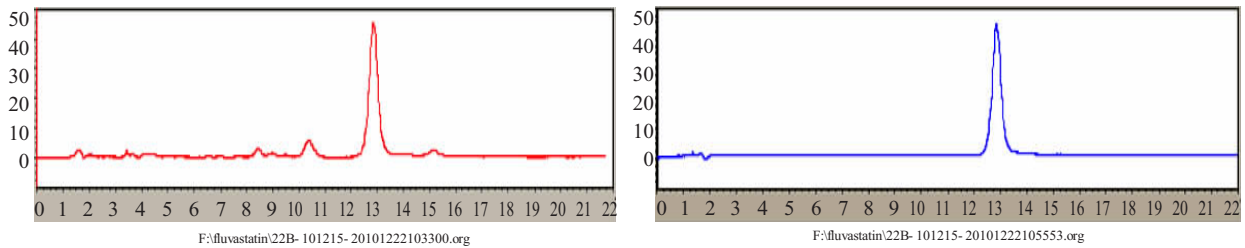


图 2 氟伐他汀钠-PLGA 微球复合膜缓释溶液(左图)168 h 和氟伐他汀钠对照品(右图)1 的色谱对比图

在 30~270 μg/mL 浓度范围内具有良好的线性。

2.3 氟伐他汀药膜在 37℃时的长期释放结果

结果表明 3 种不同剂量的药膜在 360 h 内释放分别达到 94.10%、97.78%和 99.57%，缓释效果较

好。不同时间点氟伐他汀钠药膜的累积释药百分率(附表)。

2.4 3 种 PLGA 制备药膜的突释效应

3 种 PLGA 制备的药膜都有比较明显的突释效

附表 28 d 内不同载药量药膜内氟伐他汀钠体外累积释药百分量

载药量	时间/h													
	0.5	1.0	3.0	5.0	10.0	25.0	50.0	72.0	150.0	200.0	350.0	550.0	672.0	
0.58 mg	0.95	2.32	4.42	7.90	22.59	34.43	42.10	52.52	68.13	83.81	90.34	94.10	95.49	
0.69 mg	1.43	2.78	5.05	10.54	27.02	36.98	44.35	54.45	73.59	84.69	92.23	97.78	96.40	
0.94 mg	2.32	5.43	7.90	15.74	28.93	42.02	48.65	61.85	75.55	87.92	93.45	99.57	98.45	

应,而且 3 种药膜突释效果基本相同,见图 3。在释放初期,聚乳酸尚未降解或降解很少,药物的释放主要是由药物在膜表面及内外的浓度差引起的,即水性介质渗透进入药膜,药物扩散释放。当聚乳酸分子量较大时,扩散层较厚,导致药物扩散困难,释放速率降低。笔者实验制备的药膜用于局部给药,适当的突释可以在治疗部位短时间内达到有效浓度,但若突释过大,会造成药物局部浓度过大,产生不良反应,不利于治疗,因此该实验为以后的动物体内实验提供依据。

3 讨论

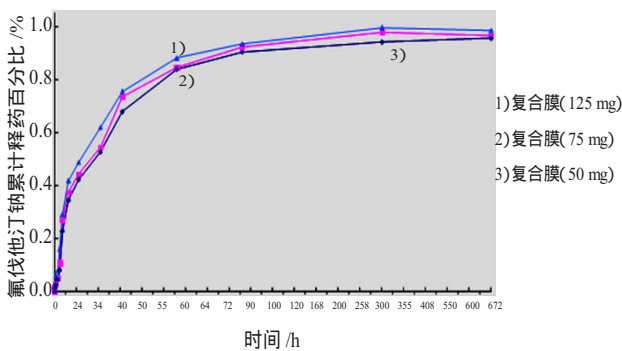


图 3 不同载药量复合膜的体外累积释药曲线

随着中国人口老龄化的加剧,骨折的性质与以前发生了明显的变化,骨质疏松骨折逐年上升^[13-15],

而临床上针对骨质疏松骨折的相关药物治疗均为全身给药,剂量较大且副作用明显,因此临床急需一种能够在局部形成比较大的药物浓度,不良反应又少的替代疗法,而笔者所研究的氟伐他汀复合膜有明显的优势。

氟伐他汀钠促进骨折愈合的机制主要是通过增强骨形成蛋白(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)的表达,增加 BMP-2 mRNA 及蛋白水平^[16],细胞增殖成熟及新骨形成实现,除了刺激骨形成以外还可能以与二磷酸盐类似的途径抑制破骨细胞^[16],抑制骨吸收,具有明确的促进骨折愈合作用。他汀类药物口服途径在骨折断端浓度尚不了解,但毫无疑问成骨细胞及破骨细胞将暴露于较低浓度的药物之中,且药物半衰期过短。

对于某一种药物,PLGA 缓释系统的总释药时间主要取决于合成 PLGA 的 PLA 与 PGA 的比例,笔者在预实验中考察了多种合成比例的 PLGA,最后选择缓释时间与突释现象相对比较理想的 PLGA (50/50)为缓释载体。

体外释放曲线表明,复合膜缓释时间可覆盖骨折愈合的前期。该体系的释放时间比较适合于临床应用,即在骨折清创缝合时将该复合膜植入骨折断端,即可在 28 d 内持续释放氟伐他汀,同时减少药物的给药次数。实验考察了 3 种不同载药浓度的复合膜,结果显示 3 种复合膜的时间释药百分比

基本相同,复合膜的释药行为与载药浓度没有直接关系,但释放量随着浓度增长而逐渐加大,如何在安全药物浓度范围内提升载药量有待在后续实验中进行研究。

综上所述,笔者实验制备得到了可在 20 d 内较稳定释放氟伐他汀的 PLGA 复合膜,基于这种复合膜的潜在优势,将对促进骨折愈合提供新的治疗方法。

参 考 文 献:

- [1] HANAYAMA R, SHIMIZU H, NAKAGAMI H, et al. Fluvastatin improves osteoporosis in fructose-fed insulin resistant model rats through blockade of the classical mevalonate pathway and antioxidant action[J]. *Int J Mol Med*, 2009, 23(5): 581-588.
- [2] LAWRENCE JM, RECKLESS JP. Fluvastatin [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2002, 3(11): 1631-1641.
- [3] JMUNDY G, GARRETT R, HARRIS S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins [J]. *Science*, 1999, 286: 1946-1949.
- [4] REJNMARK L, OLSEN ML, JOHNSEN SP, et al. Hip fracture risk in statin users- a population-based Danish case-control study [J]. *Osteoporos Int*, 2004, 15: 452-458.
- [5] RYSZARD GALUS, PAWELWLODARSKI, KRZYSZTOF H. Influence of fluvastatin on bone formation induced by demineralized bone matrix in mice[J]. *Pharmacol Rep*, 2006, 58(3): 443-447.
- [6] GALUS R, W?ODARSKI P, W?ODARSKI K. Influence of fluvastatin on bone formation induced by demineralized bone matrix in mice[J]. *Pharmacol Rep*, 2006, 58(3): 443-447.
- [7] WU C, RAMASWAMY Y, ZHU Y, et al. The effect of mesoporous bioactive glass on the physiochemical, biological and drug-release properties of ploy (DL-lactide-co-glycolide) films [J]. *Biomaterials*, 2009, 30(12): 2199-2208.
- [8] ZILBERMAN M, EBERHART RC, SCHWADE ND. In vitro study of drug-loaded bioresorbable films and support structures [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2002, 13(11): 1221-1240.
- [9] ZILBERMAN M, SCHWADE ND, MEIDELL RS, et al. Structured drug-loaded bioresorbable films for support structures [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2001, 12(8): 875-892.
- [10] XI T, GAO R, XU B, et al. In vitro and in vivo changes to PLGA/sirolimus coating on drug eluting stents [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(19): 5151-5158.
- [11] LOO SC, TAN ZY, CHOW YJ, et al. Drug release from irradiated PLGA and PLLA multi-layered films [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99(7): 3060-3071.
- [12] AL-RAWITHI S, HUSSEIN RF, ALZAHIRANI A. Sensitive assay for the determination of fluvastatin in plasma utilizing high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Ther Drug Monit*, 2003, 25(1): 88-92.
- [13] 徐栋梁,李佛保,陈维清,等.广州地区老年人群骨质疏松性骨折和骨关节病流行病学调查和分析[J].*中国骨质疏松杂志*,2000,6(3): 73-75.
- [13] XU DL, LI FB, CHEN WQ. et al. Epidemiological investigation and analysis of senile osteoporotic fracture and osteoarthritis in Guangzhou area[J]. *Chin J Osteoporos*, 2000, 6(3): 73-75. Chinese
- [14] 赵刚,胡侦明,劳汉昌,等.昆明地区部分老年人群骨质疏松性骨折发病率初步调查和分析 [J]. *中国骨质疏松杂志*,2007,13(4): 257-259.
- [14] ZHAO G, HU ZM, LAO HC. et al. Prevalence rate of senile osteoporotic fracture in kunming area [J]. *Chin J Osteoporos*, 2007, 13(4): 257-259. Chinese
- [15] GUGGENBUHL P, MEADEB J, CHALES G. Osteoporotic fractures of the proximal humerus, pelvis, and ankle: epidemiology and diagnosis[J]. *Joint Bone Spine*, 2005, 72(5): 372-375.
- [16] MONTAGNANI A, GONNELLI S, CEPOLLARO C, et al. Effect of simvastatin treatment on bone mineral density and bone turnover in hypercholesterolemic postmenopausal women: a 1-year longitudinal study[J]. *Bone*, 2003, 32(4): 427-433.
- (申海菊 编辑)
- (上接第 2850 页)
- 154-157. Chinese
- [6] 朱剑萍,姚红伊,谢诒诚,等.艾蒿花粉诱导豚鼠过敏反应[J].*中国病理生理杂志*,2009,25(1):7-12.
- [6] ZHU JP, YAO HY, XIE YC, et al. Mugwort pollen induces allergy in guinea pig [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2009, 25(1): 7-12. Chinese
- [7] 张玉生,史艳秋,王建华,等.中药注射剂过敏反应非临床评价方法 [J].*中草药*,2009,40(2):313-315.
- [7] ZHANG YS, SHI YQ, WANG JH, et al. Non-clinical evaluation on hypersensitivity induced by Chinese material medica injections [J]. *Chinese Traditional and Herb Drugs*, 2009, 40(2): 313-315. Chinese
- [8] KIMBER I, DEARMAN RJ, PENNINKS AH, et al. Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: animal models[J]. *Environ Health Perspect*, 2003, 111(8): 1125-1130.
- (申海菊 编辑)