

# 不同比例三联抗结核药物复合缓释材料的释药性能观察

杨宗强<sup>1</sup>, 吴龙云<sup>2</sup>, 施建党<sup>1</sup>, 何胤<sup>3</sup>, 牛宁奎<sup>1</sup>, 唐静<sup>4</sup>, 王自立<sup>1</sup>

(1 宁夏医科大学总医院脊柱骨科 750004 银川市; 2 宁夏医科大学 750004 银川市; 3 四川省广元市中心医院骨二科 628000; 4 宁夏医科大学总医院肿瘤医院放疗科 750004 银川市)

**【摘要】目的:**观察不同比例三联抗结核药物复合缓释材料在模拟体液中的药物释药性能。**方法:**以聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)作为载体,采用双乳、喷涂、冷冻干燥溶剂挥发法制备不同比例抗结核药物的复合缓释材料:A组,异烟肼(INH,H):利福平(RFP,R):吡嗪酰胺(PZA,Z)=15:15:30;B组,H:R:Z=20:30:50;C组,H:R:Z=30:30:120;D组,H:R:Z=80:120:250。药物总质量与PLGA之比为1:5。扫描电子显微镜(SEM)观察HRZ/PLGA复合缓释材料的表面形态,高效液相色谱法(HPLC)检测其在模拟体液中H、R、Z三种药物的释放浓度,计算药物累计释放量及释放率,分析其体外缓释性能。**结果:**A组和B组缓释材料表面分散均匀,空隙规则、分布均匀,直径分别为 $23.07\pm 0.38\mu\text{m}$ 和 $25.67\pm 1.26\mu\text{m}$ ;C组和D组缓释材料分散欠均匀,空隙不规则、分布欠均匀,直径分别为 $31.25\pm 1.98\mu\text{m}$ 和 $45.67\pm 3.26\mu\text{m}$ 。A组H、R、Z分别于42d、56d、42d的累计缓释度超过50%,于70d时的阶段释药量分别为 $157.43\pm 0.57\mu\text{g}$ 、 $129.29\pm 0.14\mu\text{g}$ 、 $196.43\pm 0.28\mu\text{g}$ ,浓度分别为 $28.486\mu\text{g/ml}$ 、 $23.525\mu\text{g/ml}$ 、 $39.265\mu\text{g/ml}$ 。B组H、R、Z分别于35d、42d、35d的累计缓释度超过50%,于70d时阶段释药量分别为 $9.89\pm 0.96\mu\text{g}$ 、 $21.71\pm 0.42\mu\text{g}$ 、 $51.12\pm 0.87\mu\text{g}$ ,浓度分别为 $1.789\mu\text{g/ml}$ 、 $1.618\mu\text{g/ml}$ 、 $10.242\mu\text{g/ml}$ 。C组H、R、Z分别于21d、35d、42d的累计缓释度均超过50%,于70d时阶段释药量分别为 $1.76\pm 0.49\mu\text{g}$ 、 $8.43\pm 0.31\mu\text{g}$ 、 $81.14\pm 0.58\mu\text{g}$ ,浓度分别为 $0.352\mu\text{g/ml}$ 、 $1.618\mu\text{g/ml}$ 、 $10.242\mu\text{g/ml}$ 。D组H、R、Z分别于28d、42d、35d的累计缓释度均超过50%,于70d时阶段释药量分别为 $1.71\pm 0.21\mu\text{g}$ 、 $14.01\pm 0.42\mu\text{g}$ 、 $65.57\pm 0.26\mu\text{g}$ ,浓度分别为 $0.312\mu\text{g/ml}$ 、 $2.128\mu\text{g/ml}$ 、 $13.516\mu\text{g/ml}$ 。70d时A组三种药物浓度均大于各自的10倍最低抑菌浓度(MIC),且A组分散均匀,空隙规则、分布均匀,直径约为 $23.07\pm 0.38\mu\text{m}$ ,三种药物在不同的时间段释放行为不相同,前14d药物缓释规律按Higuchi方程拟合最好,即前14d三种药物按照扩散的形式进行缓释,14d后三种药物按照零级动力学缓释曲线释放,即等量缓释。其余3组均有药物未达到10倍MIC。**结论:**复合HRZ/PLGA缓释材料具有优良的载药及药物缓释效果,是一种理想的复合药物缓释系统,其中H:R:Z=15:15:30的HRZ/PLGA缓释材料为较佳配方。

**【关键词】**脊柱结核;抗结核药;聚乳酸-羟基乙酸;缓释材料;配方

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2017.12.07

中图分类号:R978.3,R529.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2017)-12-1099-08

**Sustained-release composite of triple anti-tuberculosis drugs: release property in different drug proportion/YANG Zongqiang, WU Longyun, SHI Jiandong, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2017, 27(12): 1099-1106**

**【Abstract】Objectives:** To observe the drug release property of sustained-release composite prepared by different proportion of triple anti-tuberculosis drugs in simulated body fluid, and to determine the optimum drug proportion of the sustained-release composite. **Methods:** The anti-tuberculosis drug sustained-release composite was prepared by multiple emulsion technique, vacuum-dried and spray-dried with poly lactic-co-glycolic acid(PLGA) as carrier: group A, isoniazid(H):rifampicin(R):pyrazinamide(Z)=15:15:30; group B, H:R:Z=20:30:50;

**基金项目:**国家自然科学基金项目(81360275);宁夏自然科学基金项目(NZ13131);宁夏医科大学基金项目(XT20)

**第一作者简介:**男(1988-),住院医师,硕士研究生,研究方向:脊柱结核及骨肿瘤

电话:(0951)6743242 E-mail:13995201043@163.com

并列第一作者:吴龙云 E-mail:wulongyun163@163.com

通讯作者:施建党 E-mail:shi\_jiandong@163.com

group C, H:R:Z=30:30:120; group D, H:R:Z=80:120:250. The quality ratio of total drug and PLGA was 1:5. The morphological characteristics of HRZ/PLGA were observed by scanning electron microscopy (SEM). Drug concentration and cumulative release of H, R, Z in HRZ/PLGA sustained-release composite were detected by HPLC in simulated body, the cumulative release amount and release rate were calculated, and the sustained-releases property was analyzed in vitro. **Results:** In group A, at the 42nd, 56th and 42nd day, cumulative release of H, R and Z were all higher than 50%. At the 70th day, stage release amount of H, R and Z was  $157.43 \pm 0.57 \mu\text{g}$ ,  $129.29 \pm 0.14 \mu\text{g}$ ,  $196.43 \pm 0.28 \mu\text{g}$ . And released concentration of H, R and Z was  $28.486 \mu\text{g/ml}$ ,  $23.525 \mu\text{g/ml}$ ,  $39.265 \mu\text{g/ml}$ . In group B, at the 35th, 42nd and 35th day, cumulative releases of H, R and Z were all higher than 50%. At the 70th day, stage release amount of H, R and Z was  $9.89 \pm 0.96 \mu\text{g}$ ,  $21.71 \pm 0.42 \mu\text{g}$ ,  $51.12 \pm 0.87 \mu\text{g}$ . And released concentration of H, R and Z was  $21.789 \mu\text{g/ml}$ ,  $1.618 \mu\text{g/ml}$ ,  $10.242 \mu\text{g/ml}$ . In group C, at the 21st, 35th and 42nd day, cumulative releases of H, R and Z were all higher than 50%. At the 70th day, stage release amount of H, R and Z was  $1.76 \pm 0.49 \mu\text{g}$ ,  $8.43 \pm 0.31 \mu\text{g}$ ,  $81.14 \pm 0.58 \mu\text{g}$ . And released concentration of H, R and Z was  $0.352 \mu\text{g/ml}$ ,  $1.618 \mu\text{g/ml}$ ,  $10.242 \mu\text{g/ml}$ . In group D, at the 28th, 42nd and 35th day, cumulative releases of H, R and Z were all higher than 50%. At the 70th day, stage release amount of H, R and Z was  $1.71 \pm 0.21 \mu\text{g}$ ,  $14.01 \pm 0.42 \mu\text{g}$ ,  $65.57 \pm 0.26 \mu\text{g}$ . And released concentration of H, R and Z was  $0.312 \mu\text{g/ml}$ ,  $2.128 \mu\text{g/ml}$ ,  $13.516 \mu\text{g/ml}$ . According to the HRZ/PLGA sustained-release composite achieving the longest sustained time, the drug concentration of H, R, Z was greater than the 10MIC respectively. In group A, at the 70th day, the concentrations of three anti-uberculosis drugs were all higher than 10 times of MIC at the same time, showing the best drugs proportion(H:R:Z=15:15:30) of the sustained-release composite in this study. Group A had satisfactory dispersion, regular pores and even distribution, with the pore diameter of  $23.07 \pm 0.38 \mu\text{m}$ . Within the first 14 days, the drug release best fitted in the Higuchi equation, suggesting HRZ sustained release in form of diffusion. After the first 14 days, HRZ release displayed zero order release kinetics, suggesting isometric sustained release. **Conclusions:** HRZ/PLGA sustained-release composite as an ideal drug delivery system, has excellent effect of drug loading and drug release. H:R:Z=15:15:30 is the best formula of the HRZ/PLGA sustained-release composite.

**[Key words]** Spinal tuberculosis; Anti-uberculosis drugs; Poly lactic-co-glycolic acid; Release material; Best formula

**[Author's address]** Department of Orthopedics, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, 750004, China

抗结核药物化疗贯穿结核病治疗的始终<sup>[1-3]</sup>,目前普遍采用口服或静脉滴注一线抗结核药利福平(RFP,R)、异烟肼(INH,H)和吡嗪酰胺(PZA,Z),疗程必须达4~6个月以上<sup>[4]</sup>。对于脊柱结核的药物治疗,传统的给药方式(口服或静脉滴注)存在着很多缺点:第一,给药时间长,对于存在肝、肾功能不全或者患有严重系统性疾病的患者不能够耐受<sup>[5]</sup>;第二,长期用药,患者依从性差,监督困难,而且长期联合用药容易导致毒副作用,增加组织和器官损害的发生率;第三,药理学相关研究已经证明,药物的临床效果主要是由靶组织的浓度来评价,抗结核药物在病变椎体组织中的分布是脊柱结核疗效的关键<sup>[1]</sup>。研究发现,硬化骨会阻碍药物渗透到病灶,建议在手术过程中切除硬化骨,便于抗结核药物达到病灶部位<sup>[6]</sup>。提高病灶局部药物浓度、减少毒副作用是治疗脊柱结核的重要

内容。本研究制备复合H、R、Z的聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)缓释材料,观察其在体外模拟体液中的药物缓释性能,筛选出合适的HRZ/PLGA缓释材料配方。

## 1 材料与试剂

### 1.1 主要试剂

PLGA90/10(分子量9.7万,济南岱罡生物工程有限公司);二氯甲烷(分析纯)、甲醇(分析纯)、氯化钠(分析纯)、氯化钾(分析纯)、磷酸氢二钠(分析纯)、磷酸二氢钾(分析纯)均购于化学试剂厂;R、H、Z原药均购买于美国Sigma公司;R、H、Z标准对照品均购买于中国药品技术监督检验所;庚烷磺酸钠(中国药品技术监督检验所),乙腈(色谱纯,美国Fisher公司)。

### 1.2 实验仪器

高效液相色谱仪(HPLC)D-2000(日本日立公司);CN(5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6mm)色谱柱(美国 Waters 公司);精密电子天平(北京赛多利思科学仪器有限公司);79HW-1 型恒温磁力搅拌器(浙江乐成电器厂);涡旋仪(上海青浦沪西仪器厂);超声波清洗器(深圳市诺赛德精密科技有限公司);冷冻干燥机(美国);S-3400N 扫描电镜(日本)。

### 1.3 复合 HRZ/PLGA 缓释材料的制备

避光准确称取 R 原药和 PLGA 溶于 10ml 二氯甲烷中,在常温下超声振荡使其完全溶解;再准确称取 H 原药溶于一定量的超纯水,在 37 $^{\circ}$ C 超声振荡使其完全溶解;将上述两种溶液混合在涡旋仪上使其完全混合均匀;将预先称好的 Z 溶于上述混合液中,涡旋仪上使其完全分散均匀;将最终溶有 H、R、Z 三种药物的混合溶液均匀喷涂于预先制备好的模具,冷冻干燥待其有机溶剂挥发后继续喷涂材料。按上述方法制备药物比例分别为: H:R:Z=15:15:30(A 组);H:R:Z=20:30:50(B 组);H:R:Z=30:30:120(C 组);H:R:Z=80:120:250(D 组),药物总质量与 PLGA 之比为 1:5(图 1)。

### 1.4 复合 HRZ/PLGA 缓释材料色谱分析

**1.4.1 HPLC 色谱条件及标准曲线建立** 采用 Waters CN 色谱柱(5 $\mu$ m, 250 $\times$ 4.6mm);预柱 SB-C18(5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 12.5mm);流动相 0.01mol/L 庚烷磺酸钠(纯磷酸滴定 pH 值至 2.40):乙腈=45:55;检测波长 270nm;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样体积 20 $\mu$ l;流速 1ml/min。利用 H、R、Z 标准品分别配置梯度浓度为 146、73、29.2、14.6、7.3、2.92、1.46、0.73、0.292、0.146 $\mu$ g/ml;105、52.5、21.0、10.5、5.25、2.10、1.05、0.525、0.210、0.105 $\mu$ g/ml;143、71.5、28.6、14.3、7.15、2.86、1.43、0.715、0.286、0.143 $\mu$ g/ml 的溶液,按上述色谱条件进行测定,记录峰面积。以浓度为

横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),前六个点和后六个点分别作图,得出标准曲线方程<sup>[7]</sup>。

**1.4.2 空白 PLGA 缓释材料干扰性检测** 按 1.3 中的方法制备不含 H、R、Z 的缓释材料,称取一定量空白 PLGA 缓释材料置于 PBS(pH 值 7.4)溶液一定时间,取浸提液,按上述色谱条件进样,记录色谱图。

### 1.5 复合 HRZ/PLGA 缓释材料的表面形态

分别将制备的四组复合 HRZ/PLGA 缓释材料冷冻干燥后,取 0.5 $\times$ 10mm 大小置于铝片表面,烘干,喷金后置于扫描电子显微镜(SEM)下观察材料表面的形态特征。

### 1.6 复合 HRZ/PLGA 缓释材料药物缓释性能的观察及参数测定

分别准确称取四组 300mg 复合 HRZ/PLGA 缓释材料置于透析袋中,加入 1ml PBS 缓冲液(pH 值 7.4),将透析袋两端封口后置入盛有 5ml PBS 的 PE 管中,于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴振荡器中振荡孵育,严格于 0.5d、1d、2d 之后每天取样,每次取液 5ml 于-20 $^{\circ}$ C 密封、冻存待检。同时加入 5ml 新鲜 PBS 于 PE 管内。将所取样品经 0.22 $\mu$ m 微孔滤膜过滤,取滤液 20 $\mu$ l,采用上述液相色谱条件进行检测并记录峰面积,将峰面积值代入按面积对应的标准曲线方程中,计算出药物浓度,求其均值。观察各药物浓度是否大于其 10 倍最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MIC),计算每阶段释药量和累计释药度。以缓释时间为 X 轴,累计释放度为 Y 轴,拟合零级动力学缓释曲线;以释放时间为 X 轴,累积释放度的常用对数与 1 的差值为 Y 轴,拟合一级动力学缓释曲线;以释放时间的 1/2 次方为 X 轴,累积释放度为 Y 轴,拟合 Higuchi 释放曲线,比较其  $R^2$  值,得出三种药物在体外模拟体液中的缓释规律。

### 1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件,以  $\bar{x} \pm s$  表示计量数据;变量间的相关性分析采用直线回归相关分析,以  $\alpha=0.05$  为检验水准。

## 2 结果

### 2.1 标准曲线的建立及空白 PLGA 的干扰性

按照上述配置浓度及色谱条件,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,拟合 H、R、Z 三药标准曲线回归方程见表 1。此色谱条件下空白 PLGA 缓

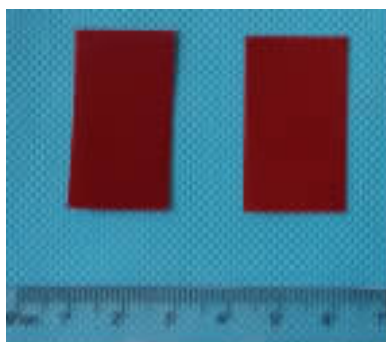


图 1 复合 HRZ/PLGA 缓释材料

Figure 1 Composite HRZ/PLGA slow-released materials



释材料浸提液在 H、R、Z 的色谱峰处未出现峰。再取实验样品浸提液按上述色谱条件进 20 $\mu$ l, 样品主峰保留时间与标准品溶液主峰的保留时间一致, 空白辅料在此色谱条件下对主峰无干扰<sup>[7]</sup>。

2.2 复合 HRZ/PLGA 缓释材料的形态学观察

4 组复合 HRZ/PLGA 缓释材料表面形态见图 2, A 组和 B 组缓释材料表面分散均匀, 空隙规则、分布均匀, 直径分别约为 23.07 $\pm$ 0.38 $\mu$ m,

25.67 $\pm$ 1.26 $\mu$ m(2a, 2b); C 组和 D 组缓释材料分散欠均匀, 空隙不规则、分布欠均匀, 直径分别约为 31.25 $\pm$ 1.98 $\mu$ m, 45.67 $\pm$ 3.26 $\mu$ m(2c, 2d)。

2.3 体外释药缓释性能检测及药物代谢动力学分析

复合 HRZ/PLGA 缓释材料中 H、R、Z 三种药物在不同时间点的阶段释药量和累计释药度见表 2 和表 3。A 组 H、R、Z 分别于 42d、56d、42d 时的累计缓释度超过 50%, 于 70d 时阶段释药量分别为 157.43 $\pm$ 0.57 $\mu$ g、129.29 $\pm$ 0.14 $\mu$ g、196.43 $\pm$ 0.28 $\mu$ g, 浓度分别为 28.486 $\mu$ g/ml、23.525 $\mu$ g/ml、39.265 $\mu$ g/ml。B 组 H、R、Z 分别于 35d、42d、35d 时累计缓释度超过 50%, 于 70d 时阶段释药量分别为 9.89 $\pm$ 0.96 $\mu$ g、21.71 $\pm$ 0.42 $\mu$ g、51.12 $\pm$ 0.87 $\mu$ g, 浓度分别为 1.789 $\mu$ g/ml、1.618 $\mu$ g/ml、10.242 $\mu$ g/ml。C 组 H、R、Z 分别于 21d、35d、42d 时累计缓释度超过 50%, 于 70d 时阶段释药量分别为 1.76 $\pm$

表 1 HRZ 标准曲线方程<sup>[7]</sup>

Table 1 Standard curve equation of HRZ

| 浓度范围<br>Range of concentration | 回归方程<br>Regression equation | R <sup>2</sup> |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------|
| INH前                           | y=19520x-14089              | 0.9998         |
| INH后                           | y=17471x-1418.4             | 0.9998         |
| RFP前                           | y=13853x-18162              | 0.9991         |
| RFP后                           | y=8425.5x-1265.4            | 0.9990         |
| PZA前                           | y=33092x+17598              | 0.9997         |
| PZA后                           | y=37813x-2904.4             | 0.9977         |

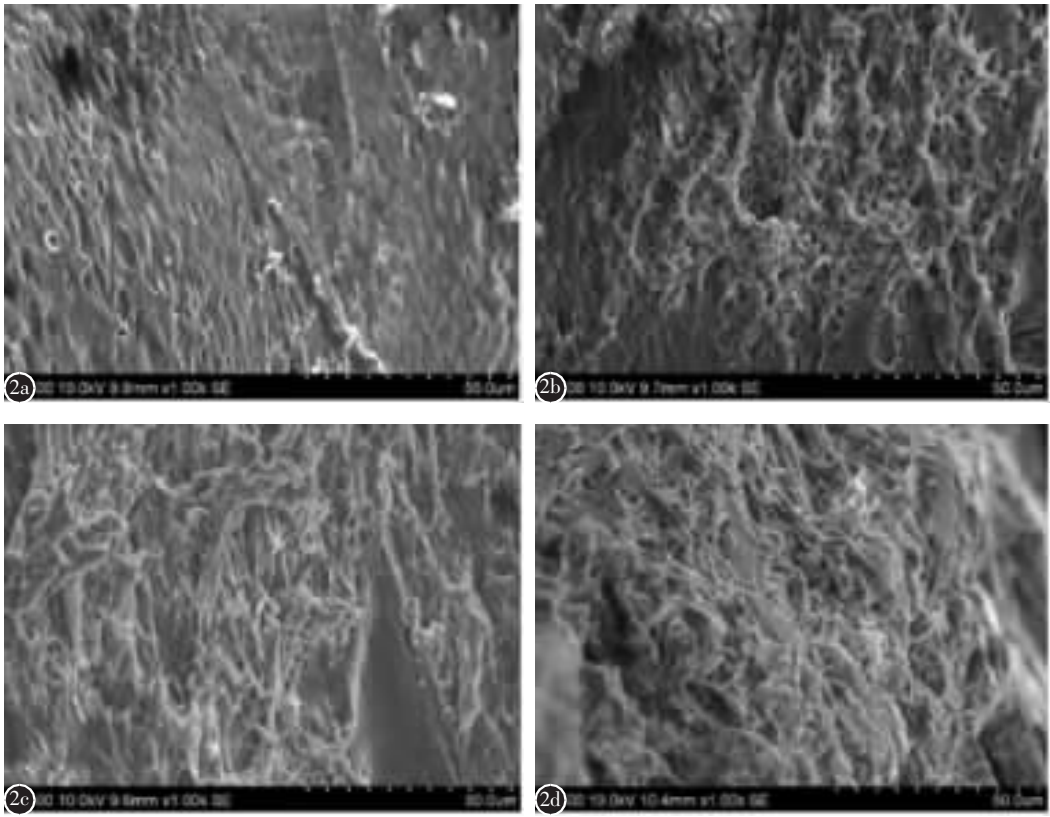


图 2 复合 HRZ/PLGA 缓释材料的电镜图( $\times$ 1000) a、b A 组和 B 组缓释材料表面分散均匀, 空隙规则、分布均匀 c、d C 组和 D 组缓释材料分散欠均匀, 空隙不规则、分布欠均匀

Figure 2 SEM of complex a HRZ/PLGA sustained-release materials ( $\times$ 1000) a, b The sustained-release materials in group A and group B were well-dispersed on the surface of the sustained-release material with regular and uniform voids c, d The sustained-release materials in group C and group D were less uniform and distributed irregularly with uneven distribution

表 2 不同时间点各组 HRZ/PLGA 缓释材料在体外模拟体液中各种药物阶段释放量

| Table 2 Stage release amount of drugs from HRZ/PLGA at different time points by group |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 时间<br>Time(d)                                                                         | A组 Group A  |             |             | B组 Group B  |             |             | C组 Group C  |             |             | D组 Group D  |             |             |
|                                                                                       | H           | R           | Z           | H           | R           | Z           | H           | R           | Z           | H           | R           | Z           |
| 0.5                                                                                   | 249.37±1.30 | 195.02±0.05 | 351.92±1.01 | 239.92±1.04 | 234.01±0.99 | 539.01±1.05 | 264.23±0.45 | 175.45±0.53 | 628.34±1.47 | 212.12±0.29 | 182.45±0.47 | 552.75±1.37 |
| 1                                                                                     | 183.34±0.67 | 139.90±0.95 | 273.05±0.42 | 178.02±0.75 | 203.92±1.08 | 498.50±0.89 | 204.34±0.23 | 132.01±1.43 | 536.87±2.01 | 197.01±0.72 | 135.23±0.72 | 497.74±0.28 |
| 2                                                                                     | 180.01±0.11 | 136.98±0.23 | 268.85±0.15 | 159.68±0.24 | 179.86±0.39 | 452.56±1.45 | 186.01±0.43 | 126.78±0.82 | 456.02±0.76 | 166.82±0.49 | 122.76±0.36 | 435.23±1.32 |
| 3                                                                                     | 169.03±0.79 | 128.15±0.06 | 256.21±0.06 | 150.06±0.56 | 165.01±1.34 | 423.00±1.85 | 135.85±0.75 | 117.98±0.23 | 405.67±0.45 | 155.08±0.96 | 108.09±0.91 | 432.02±0.96 |
| 4                                                                                     | 172.98±1.20 | 131.09±0.12 | 260.98±0.12 | 163.56±0.43 | 142.04±0.85 | 409.78±0.79 | 128.65±0.38 | 105.12±0.72 | 398.57±0.21 | 145.12±0.38 | 127.32±0.47 | 397.78±0.72 |
| 5                                                                                     | 172.12±0.45 | 129.85±1.03 | 259.11±0.45 | 152.28±1.06 | 174.68±2.23 | 414.08±0.67 | 136.21±1.43 | 126.65±0.52 | 486.67±0.46 | 164.98±0.19 | 127.08±0.82 | 423.94±1.78 |
| 6                                                                                     | 166.98±0.89 | 126.54±0.25 | 252.87±0.67 | 144.27±1.34 | 146.53±0.34 | 412.57±0.37 | 144.87±0.65 | 118.12±1.35 | 488.67±0.43 | 153.09±1.30 | 117.89±0.74 | 456.60±0.47 |
| 7                                                                                     | 156.01±0.11 | 116.93±0.67 | 240.00±0.19 | 132.04±0.73 | 254.12±0.09 | 424.08±0.31 | 120.23±0.71 | 116.78±0.93 | 435.71±0.98 | 155.76±0.57 | 123.19±0.82 | 467.91±0.72 |
| 14                                                                                    | 171.29±0.12 | 140.86±0.37 | 213.14±0.57 | 166.71±0.86 | 155.14±0.87 | 407.57±0.28 | 212.71±0.21 | 123.85±0.43 | 289.71±0.34 | 149.23±0.65 | 147.85±0.13 | 456.86±0.31 |
| 21                                                                                    | 183.43±0.07 | 151.00±0.71 | 227.71±0.86 | 195.28±0.14 | 193.71±0.46 | 363.29±0.74 | 225.43±0.57 | 142.57±0.29 | 411.14±0.68 | 162.14±0.25 | 179.43±0.21 | 432.57±0.19 |
| 28                                                                                    | 195.86±1.34 | 161.43±0.29 | 242.57±0.29 | 208.00±1.23 | 210.86±0.43 | 335.09±1.72 | 177.01±0.53 | 129.14±1.24 | 569.57±0.29 | 165.14±0.17 | 196.86±1.03 | 426.71±0.46 |
| 35                                                                                    | 180.00±0.45 | 148.14±1.57 | 223.57±0.29 | 176.43±0.71 | 227.01±0.61 | 319.14±0.87 | 82.57±1.02  | 86.54±0.23  | 524.57±0.19 | 150.85±0.43 | 211.14±0.57 | 408.23±0.34 |
| 42                                                                                    | 194.67±1.21 | 160.29±0.14 | 241.01±0.41 | 111.14±0.57 | 196.86±0.43 | 301.29±2.09 | 42.57±0.18  | 58.29±0.34  | 477.85±0.14 | 132.15±0.36 | 146.14±0.85 | 368.29±0.48 |
| 49                                                                                    | 179.86±0.78 | 148.00±0.25 | 223.43±0.71 | 76.29±0.42  | 98.43±0.14  | 236.29±0.21 | 15.14±0.27  | 28.57±0.12  | 425.42±0.71 | 56.85±0.72  | 64.71±0.14  | 282.57±0.97 |
| 56                                                                                    | 182.57±0.12 | 150.28±0.51 | 226.71±0.46 | 32.14±0.71  | 80.43±0.57  | 164.71±0.86 | 7.98±0.08   | 20.71±0.58  | 293.71±0.17 | 9.57±0.06   | 27.23±1.45  | 239.71±0.64 |
| 63                                                                                    | 184.14±0.56 | 151.57±0.29 | 228.57±0.29 | 18.29±0.43  | 29.85±0.29  | 71.57±0.42  | 2.47±0.57   | 17.57±0.48  | 163.57±0.92 | 2.14±0.14   | 19.29±0.79  | 125.04±0.06 |
| 70                                                                                    | 157.43±0.57 | 129.29±0.14 | 196.43±0.28 | 9.89±0.96   | 21.71±0.42  | 51.12±0.87  | 1.76±0.49   | 8.43±0.31   | 81.14±0.58  | 1.71±0.21   | 14.01±0.42  | 65.57±0.26  |

注: H, 异烟肼; R, 利福平; Z, 吡嗪酰胺

Note: H, isoniazid; R, rifampicin; Z, pyrazinamide

表 3 不同时间点各组 HRZ/PLGA 缓释材料在体外模拟体液中各种药物累积释放率  
Table 3 Cumulative release rate of HRZ/PLGA at different time points by group

( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 时间<br>Time(d) | A组 Group A |            |            | B组 Group B |            |            | C组 Group C |            |            | D组 Group D |            |            |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|               | H          | R          | Z          | H          | R          | Z          | H          | R          | Z          | H          | R          | Z          |
| 0.5           | 1.66±0.11  | 1.31±0.12  | 1.76±0.56  | 2.41±0.45  | 1.56±0.12  | 2.26±0.38  | 3.18±0.74  | 2.10±0.83  | 2.05±0.45  | 2.38±0.78  | 1.39±0.79  | 1.97±0.62  |
| 1             | 2.88±0.08  | 2.23±0.33  | 3.13±0.23  | 4.18±0.23  | 2.92±1.05  | 4.34±0.66  | 5.63±0.59  | 3.68±0.10  | 3.68±0.48  | 4.61±0.58  | 2.41±0.90  | 3.76±1.04  |
| 2             | 4.08±0.34  | 3.15±0.66  | 4.47±0.76  | 5.78±0.56  | 4.12±0.76  | 6.22±0.92  | 7.86±0.74  | 5.20±0.38  | 5.06±0.57  | 6.48±0.64  | 3.34±0.29  | 5.32±0.26  |
| 3             | 5.21±0.56  | 4.11±1.02  | 5.75±0.17  | 7.28±0.67  | 5.22±0.56  | 7.99±0.34  | 9.50±0.64  | 6.62±1.87  | 6.29±0.69  | 8.24±0.32  | 4.16±0.91  | 6.87±0.76  |
| 4             | 6.36±0.19  | 4.87±0.92  | 7.056±0.82 | 8.92±0.97  | 6.17±0.60  | 9.69±0.75  | 11.04±1.31 | 7.88±0.17  | 7.50±0.30  | 9.87±0.61  | 5.13±0.78  | 8.29±0.71  |
| 5             | 7.51±0.09  | 5.73±0.98  | 8.35±0.57  | 10.44±0.89 | 7.33±0.43  | 11.42±1.72 | 12.67±0.38 | 9.40±0.05  | 8.97±0.88  | 11.73±0.42 | 6.09±0.48  | 9.81±0.20  |
| 6             | 8.62±1.02  | 6.58±1.09  | 9.62±0.15  | 11.89±1.02 | 8.31±0.76  | 13.14±0.95 | 14.41±1.24 | 10.81±1.53 | 10.46±0.06 | 13.45±0.72 | 6.98±0.48  | 11.45±0.28 |
| 7             | 9.66±0.89  | 7.35±0.27  | 10.82±0.34 | 13.21±0.86 | 10.07±0.79 | 14.91±0.41 | 15.85±0.13 | 12.22±0.82 | 11.77±0.79 | 15.21±0.39 | 7.92±0.67  | 13.12±0.54 |
| 14            | 17.65±0.57 | 13.93±0.06 | 18.28±0.73 | 24.88±0.73 | 17.24±0.08 | 26.81±1.66 | 33.70±0.50 | 22.61±0.39 | 17.90±1.90 | 26.95±0.94 | 15.76±0.75 | 24.58±0.70 |
| 21            | 26.21±0.93 | 20.98±1.56 | 26.25±0.10 | 38.55±0.39 | 26.28±0.33 | 37.41±0.62 | 52.62±0.58 | 34.58±1.09 | 26.63±1.21 | 39.72±0.97 | 25.27±0.72 | 35.44±0.52 |
| 28            | 35.35±1.27 | 28.51±0.75 | 34.74±0.71 | 53.11±0.43 | 36.12±0.45 | 47.18±0.83 | 67.48±0.20 | 45.42±0.96 | 38.71±0.22 | 52.74±0.77 | 35.71±0.82 | 46.15±0.59 |
| 35            | 43.75±0.05 | 35.43±0.67 | 42.56±1.05 | 65.46±0.79 | 46.71±0.48 | 56.48±0.98 | 74.41±0.24 | 52.63±0.78 | 49.83±0.93 | 64.63±0.96 | 46.90±0.99 | 56.38±1.25 |
| 42            | 52.83±0.37 | 42.91±0.48 | 51.00±0.99 | 73.24±1.34 | 55.90±0.72 | 65.27±1.67 | 77.98±0.56 | 57.52±0.99 | 59.97±0.77 | 75.04±0.50 | 54.65±1.56 | 65.62±1.03 |
| 49            | 61.22±0.34 | 49.81±2.01 | 58.82±0.68 | 78.58±0.81 | 60.49±0.57 | 72.16±0.76 | 79.25±0.65 | 59.92±1.80 | 69.12±0.81 | 79.52±0.70 | 58.09±0.78 | 72.71±0.16 |
| 56            | 69.75±0.56 | 56.83±0.19 | 66.75±0.53 | 80.83±2.01 | 64.25±2.01 | 76.96±0.75 | 79.92±0.81 | 61.67±0.66 | 75.23±1.03 | 80.28±0.15 | 59.52±0.51 | 78.72±0.82 |
| 63            | 78.34±0.02 | 63.90±0.83 | 74.75±0.92 | 82.11±0.95 | 65.64±1.45 | 79.06±0.25 | 80.13±1.54 | 63.14±0.14 | 78.70±0.48 | 80.45±0.45 | 60.55±0.76 | 81.79±0.41 |
| 70            | 85.69±0.84 | 69.93±1.54 | 81.63±0.87 | 83.09±0.27 | 66.65±0.95 | 80.55±0.79 | 80.28±0.53 | 63.84±0.89 | 80.42±0.86 | 80.58±0.56 | 61.29±0.95 | 83.44±0.94 |

注: H, 异烟肼; R, 利福平; Z, 吡嗪酰胺

Note: H, isoniazid; R, rifampicin; Z, pyrazinamide

0.49 $\mu$ g、8.43 $\pm$ 0.31 $\mu$ g、81.14 $\pm$ 0.58 $\mu$ g, 浓度分别为 0.352 $\mu$ g/ml、1.618 $\mu$ g/ml、10.242 $\mu$ g/ml。D 组 H、R、Z 分别于 28d、42d、35d 时累计缓释度超过 50%, 于 70d 时阶段释药量分别为 1.71 $\pm$ 0.21 $\mu$ g、14.01 $\pm$ 0.42 $\mu$ g、65.57 $\pm$ 0.26 $\mu$ g, 浓度分别为 0.312 $\mu$ g/ml、2.128 $\mu$ g/ml、13.516 $\mu$ g/ml。H、R 及 Z 的体外最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentrations, MIC)分别为 0.05 $\mu$ g/ml、0.22 $\mu$ g/ml 和 2 $\mu$ g/ml, 体外有效的杀菌浓度值为 10MIC。A 组 70d 时 H、R、Z 的浓度均大于各自 10 倍 MIC, 其他各组均有药物未达到。

对 A 组 H、R、Z 三种药物拟合三种数学方程(表 4), 三种药物在不同时间段释放行为不相同, 前 14d 的释放行为采用零级曲线和一级曲线进行拟合时  $R^2$  均较 Higuchi 曲线低, 故前 14d 药物缓释规律按 Higuchi 方程拟合较好, 可认为前 14d 三种药物按照扩散的形式进行缓释; 14d 后三种药物按零级曲线拟合后  $R^2$  值最接近 1, 可认为 14d 后三种药物按照零级动力学缓释曲线释放, 亦即等量缓释。

### 3 讨论

随着外科技术发展和生物材料的应用, 脊柱的稳定重建以及骨缺损修复在脊柱结核手术治疗中起到关键性作用。研究表明<sup>[8,9]</sup>, 外科手术治疗是脊柱结核治疗的重要策略, 但抗结核药物化疗贯穿脊柱结核治疗的始终<sup>[10]</sup>。目前, 对于结核病的治疗虽然有了明显的改善, 但随着耐药结核菌株的出现以及获得性免疫缺陷性疾病的流行, 结核病死而复燃, 尤其是发展中国家<sup>[11]</sup>。脊柱结核是

一种慢性破坏性疾病, 其发病率和复发率呈日益增长趋势。其主要原因有以下几点: 多耐药结核杆菌的出现、病灶局部药物浓度不足、术前术后未正规抗结核药物化疗、未早期诊断、营养不良、结核病灶清除不彻底、术后脊柱稳定性差等<sup>[12,13]</sup>, 但最主要的原因是脊柱结核病灶局药物浓度难以达到杀菌浓度, 这对脊柱结核的治愈是一个严峻的挑战。脊柱结核病灶清除术后单纯局部包埋抗结核药物存在药物代谢快, 无法保证局部药物长时间持续达到杀菌浓度。

PLGA 具有良好的生物相容性、生物降解性、载药性及定向性等特征, 以 PLGA 为载体的载药缓释材料具有靶向释放、延长药物释放时间、降低药物毒性、减少药物刺激性等优点<sup>[14-16]</sup>。目前, 对于 PLGA 缓释微球研究较普遍, 载单一抗结核药物 PLGA 微球的研究较多<sup>[17]</sup>, 但对载二联或三联的 PLGA 微球的缓释微球的研究较少, 我们制备的 HRZ/PLGA 缓释微球体三药缓释到 50d 时均大于 10 倍 MIC, 虽然此微球制备方法成熟、具有良好的缓释性能, 但对于脊柱结核, 其缓释时间有可能达不到脊柱结核术后治愈目的。

本研究采用双乳、喷涂、冷冻干燥溶剂挥发法制备载 H、R、Z 三联的 PLGA 缓释材料, 体外缓释实验结果显示, A 组为最佳配比, H、R、Z 于 70d 时释药浓度均大于 10MIC, 且 H、R、Z 三药在前 14d 左右按 Higuchi 方程释放, 即药物由高浓度向低浓度方向扩散, 14d 后三药按零级曲线规律释放, 即释放过程平稳。存在上述药物缓释规律可能与载药 PLGA 缓释材料形态结构有直接关系, 电镜下 A 组和 B 组缓释材料表面分散均匀,

表 4 A 组不同时间段 H、R、Z 三种药物释药行为拟合数学方程

Table 4 Equation fitting for HRZ of group A

| 时间<br>Time<br>(d) | 药物<br>Drug | 拟合方程<br>Equation fitting                    |                                                     |                                                    |
|-------------------|------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                   |            | 零级曲线<br>Zero order                          | 一级曲线<br>First order                                 | Higuchi 曲线<br>Higuchi                              |
| 0~14              | H          | $Mt/M\infty=1.1544t+1.6181$<br>$R^2=0.9478$ | $\ln(1-Mt/M\infty)=-0.0056t-0.0061$<br>$R^2=0.9986$ | $Mt/M\infty=3.9602t^{1/2}-2.425$<br>$R^2=0.9989$   |
|                   | R          | $Mt/M\infty=0.9093t+1.169$<br>$R^2=0.8427$  | $\ln(1-Mt/M\infty)=-0.0043t-0.0045$<br>$R^2=0.9978$ | $Mt/M\infty=1.7627t^{1/2}+17.688$<br>$R^2=0.9982$  |
|                   | Z          | $Mt/M\infty=1.1992t+2.0276$<br>$R^2=0.9722$ | $\ln(1-Mt/M\infty)=-0.0058t-0.0079$<br>$R^2=0.9965$ | $R^2=-Mt/M\infty-0.0058t-0.0079$<br>$R^2=0.9965$   |
| 14~70             | H          | $Mt/M\infty=1.2204t+1.114$<br>$R^2=0.9995$  | $\ln(1-Mt/M\infty)=-0.014t+0.2215$<br>$R^2=0.9577$  | $Mt/M\infty=15.881 t^{1/2}-48.686$<br>$R^2=0.9955$ |
|                   | R          | $Mt/M\infty=1.0046t+0.3275$<br>$R^2=0.9995$ | $\ln(1-Mt/M\infty)=-0.0085t+0.0983$<br>$R^2=0.9866$ | $Mt/M\infty=13.073 t^{1/2}-40.668$<br>$R^2=0.9956$ |
|                   | Z          | $Mt/M\infty=1.1363t+2.8592$<br>$R^2=0.9995$ | $\ln(1-Mt/M\infty)=-0.012t+0.1643$<br>$R^2=0.9699$  | $Mt/M\infty=14.785 t^{1/2}-43.5$<br>$R^2=0.9955$   |

空隙规则、分布均匀, C 组和 D 组缓释材料表面分散欠均匀, 空隙不规则、分布欠均匀。A 组空隙直径最小, 为  $23.07 \pm 0.38 \mu\text{m}$ , HRZ/PLGA 缓释材料表面或接近表面粘附的药物在缓释的早期迅速扩散到 PBS 液中, 形成了 H、R、Z 的突释现象, 此阶段时间较短, 释放速率较快, 此过程是 H、R、Z 的速释过程, 即扩散; 随着时间的进展, 表面 PLGA 不断降解, 其均匀的空隙不断暴露, 药物均释放, 而这对 PLGA 缓释材料内部抗结核药的缓释无影响, 故 14d 后三药按零级曲线规律释放, 即释放过程平稳。其余三组空隙直径大、分布不均匀, 随着 PLGA 涂层不断降解, PLGA 支架崩解, 药物无规律释放, 缓释时间较短。另外, R 为极性分子, 脂溶性较强, 且其见光易分解, 在进行液相检测时存在一定的系统误差。由于 H 和 Z 理化性质不同, 在药物整个缓释过程中 H 阶段释药量均大于 Z。

综上, 复合抗结核 HRZ/PLGA 缓释材料具有较好的载药缓释效果, 实现了多种药物联合、局部规律给药及达到有效杀菌浓度的目的。本研究结果显示 A 组(H:R:Z=15:15:30)HRZ/PLGA 缓释材料药物配比为较佳配比, 且 70d 时三种药物的有效浓度亦达到 10MIC, 理论上达到杀死结核杆菌的药物浓度, 为脊柱结核术后局部用药提供了理论基础。

#### 4 参考文献

1. Wang Z, Shi J, Geng G, et al. Ultra-short-course chemotherapy for spinal tuberculosis: five years of observation [J]. Eur Spine J, 2013, 22(2): 274-281.
2. Yagui M, Perales MT, Asencios L, et al. Timely diagnosis of MDR-TB under program conditions: is rapid drug susceptibility testing sufficient[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10(8): 838-843.
3. Garg RK, Somvanshi DS. Spinal tuberculosis: a review[J]. J Spinal Cord Med, 2011, 34(5): 440-454.
4. Eurosurveillance Editorial Team. WHO Publishes Global Tuberculosis Report 2013[J]. Eur Surveill, 2013, 18(43): pii: 20615.
5. Fan P, Chen S, Xiong Z, et al. A case report of disseminated tuberculosis involving the lung, liver, spleen, bone and spine [J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2014, 22(7): 551.
6. Liu P, Zhu Q, Jiang J. Distribution of three antituberculous drugs and their metabolites in different parts of pathological vertebrae with spinal tuberculosis [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(20): E1290-E1295.
7. 何胤, 杨宗强, 王骞, 等. 复合三联抗结核药聚乳酸-羟基乙酸缓释微球的制备及体外释药特性 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2015, 25(5): 456-461.
8. Martin NS. Pott's paraplegia: a report on 120 cases[J]. J Bone Joint Surg Br, 1971, 53(4): 596-608.
9. Guirguis AR. Pott's paraplegia[J]. J Bone Joint Surg Br, 1967, 49(4): 658-667.
10. Shi JD, Wang ZL, Geng GQ, et al. Intervertebral focal surgery for the treatment of non-contiguous multifocal spinal tuberculosis[J]. Int Orthop, 2012, 36(7): 1423-1427.
11. Lesic AR, Pesut DP, Markovic-Denic L, et al. The challenge of osteo-articular tuberculosis in the twenty-first century: a 15-year population-based study [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(9): 1181-1186.
12. Yang L, Liu Z. Analysis and therapeutic schedule of the postoperative recurrence of bone tuberculosis [J]. J Orthop Surg Res, 2013, 8: 47.
13. Lan X, Xu J Z, Luo F, et al. Analysis of postoperative recurrence reason and observation of reoperation outcome for spinal tuberculosis[J]. Zhongguo Gu Shang, 2013, 26(7): 536-542.
14. Hong SJ, Yu HS, Kim HW. Tissue engineering polymeric microcarriers with macroporous morphology and bone-bioactive surface[J]. Macromol Biosci, 2009, 9(7): 639-645.
15. Alcantar NA, Aydil ES, Israelachvili JN. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces [J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51(3): 343-351.
16. Khoee S, Rahmatolahzadeh R. Synthesis and characterization of pH-responsive and folated nanoparticles based on self-assembled brush-like PLGA/PEG/AEMA copolymer with targeted cancer therapy properties: a comprehensive kinetic study[J]. Eur J Med Chem, 2012, 50: 416-427.
17. 杨宗强, 何胤, 施建党, 等. 聚乙二醇对利福平-聚乳酸-羟基乙酸聚合物缓释微球性能的影响[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(3): 421-426.

(收稿日期: 2017-04-15 末次修回日期: 2017-10-10)

(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)