

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01015

丙氨瑞林微球的体外释放

张敏¹, 高静², 朱全刚¹, 张玮³, 武鑫¹, 王晓宇¹, 叶丽华¹, 高申^{1*}

1. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433
2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433
3. 解放军 522 医院药械科, 洛阳 471000

[摘要] **目的** 研究不同内水相明胶浓度、不同微球挥发固化方法和不同 pH 值释放介质等对丙氨瑞林微球的体外释放趋势的影响。**方法** 由溶剂挥发法-复乳法(W/O/W)制备丙氨瑞林微球,内水相分别采用 0%、8%、16%明胶水溶液,使用室温常压挥发和低温真空挥发法固化微球。体外释放实验中,采用 pH=4.5、pH=7.0、pH=10.0 三种释放介质,于第 1、7、14、21、28、35 天取样,残余法测定体外释放微球突释量及释放度,使用电子扫描电镜记录微球释放期间各取样点的微球降解程度。**结果** 有机溶剂挥发固化方法会影响微球的体外释放模式,含不同明胶浓度内水相的微球有不同的体外释放模式,微球中的丙氨瑞林在释放介质 pH=10.0 中释放速率最快,而在 pH=4.5 中不能完全释放,最适宜的释放介质是 pH=7.0 缓冲液。**结论** 不同挥发固化方法制备会影响微球的突释量,但对微球的整体体外释放趋势没有影响,内水相浓度对体外释放的趋势有影响,释放介质的 pH 值对丙氨瑞林微球药物的释放有影响。

[关键词] 丙氨瑞林;微球体;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;体外释放

[中图分类号] R 977.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2012)09-1015-04

In vitro release of alarelin-loaded microspheres

ZHANG Min¹, GAO Jing², ZHU Quan-gang¹, ZHANG Wei³, WU Xin¹, WANG Xiao-yu¹, YE Li-hua¹, GAO Shen^{1*}

1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
3. Department of Pharmaceutics and Equipment, No. 522 Hospital of PLA, Luoyang 471000, He'nan, China

[Abstract] **Objective** To study the influence of different evaporation hardening methods, gelatin concentrations in inter aqueous phase and pH values of PBS on *in vitro* release modulus of alarelin-loaded microspheres (AR-MS). **Methods** The AR-MS was prepared by double emulsion solvent evaporation method (W/O/W); concentrations of internal aqueous phase with gelatin were 0%, 8% and 16% (W/V); and the volatilized hardening was done with room temperature magnetic stirring and low-temperature vacuum evaporation. Residual method assay was used to determine the accumulated release and burst release of AR-MS in PBS (pH = 4.5, pH = 7.0, pH = 10.0) on day 1, 7, 14, 21, 28, and 35. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the degradation degrees of AR-MS at each time point. **Results** The method of volatized organic solvents could affect the release pattern of AR-MS, and the release pattern was also influenced by different concentrations of internal aqueous phase of gelatin. The fastest release rate of AR-MS was seen in medium with pH value being 10.0, complete release was not found in medium with pH being 4.5, and the most appropriate medium for AR-MS release was when pH value being 7.0. **Conclusion** Different evaporation hardening methods can influence the burst release of AR-MS, but has no influence on the overall *in vitro* release pattern. Different concentrations of internal aqueous gelatin phase can influence the *in vitro* release pattern, and the medium pH value can also influence the release of AR-MS.

[Key words] alarelin; microspheres; poly (lactic-co-glycolic acid); *in vitro* release

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(9):1015-1018]

丙氨瑞林(alarelin, AR)为人工合成的促性腺激素释放激素(GnRH)的九肽类似物,用药初期可刺

[收稿日期] 2012-05-02 **[接受日期]** 2012-08-27

[基金项目] 国家自然科学基金(81000689, 81172514, 30873178), 上海市自然科学基金(10ZR1437300). Supported by National Natural Science Foundation of China (81000689, 81172514, 30873178) and Natural Science Foundation of Shanghai(10ZR1437300).

[作者简介] 张敏, 硕士生. E-mail: marylandie@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162310, E-mail: liullk@126.com

激垂体释放促黄体生成素(LH)和促卵泡素(FSH),引起卵巢源性甾类激素短暂升高;重复用药可抑制垂体释放LH和FSH,使血中的雌二醇水平下降,这种抑制作用可用于促排卵及治疗子宫内膜异位症等激素依赖性疾[1-2]。丙氨瑞林的半衰期短,目前市售的丙氨瑞林粉针剂的给药方式是每天1次,3~6个月为1个疗程,这会大大降低患者的顺应性,减弱疗效,如将其改制成长效缓释的制剂,就可以增加患者的顺应性。微球是长效缓释制剂中常用的一种剂型,它具有载药量高、制备工艺简单稳定、长效缓释等特点。

近年来,人工合成的生物可降解高分子材料聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)应用十分广泛。它具有好的生物降解性及组织相容性,已用于临床。我们以PLGA为载体,采用复乳化溶剂挥发法制备丙氨瑞林缓释微球。由于微球的体外释放趋势会影响到微球的给药方式,其中突释量、平均释药量、释放度都对缓释给药系统有很大影响,且不同的缓释系统会由于载体材料、制备方法等的不同而形成不同的释放模式[3],我们进一步考察了在复乳法制备微球过程中,不同有机溶剂挥发的方法及不同内水相浓度对药物体外释放模式的影响。

1 材料和方法

1.1 仪器 F-10型均质机(上海弗鲁克仪器公司)、JY92-II N型超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)、R30型机械搅拌机(上海弗鲁克仪器公司)、MS-H-Pro型磁力搅拌器(美国Dragon公司)、BS110S型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)、高效液相色谱仪(Hitachi,日本);日立L-2130高压泵,日立L-2455紫外检测器,日立L-2200自动进样器;马尔文粒度测定仪(Mastersizer 2000, Malvern);SX240电子扫描电镜(日本明石公司)、真空冷冻干燥机(美国SIM公司)、SHZ-88台式水浴恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂)。

1.2 试剂 PLGA(美国伯明翰生物科技公司、75/25)、明胶(青海明胶股份有限公司)、二氯甲烷(上海凌峰化学试剂有限公司,分析纯)、聚乙烯醇(PVA,上海晶纯试剂公司);乙腈、甲醇(美国TEDIA公司);氯化钠、磷酸、三乙胺(上海凌峰化学试剂有限公司,分析纯)。丙氨瑞林原料药(安徽丰原药业有限公司)。

1.3 丙氨瑞林微球制备 采用复乳-溶剂挥发法制备丙氨瑞林微球[4]。将40 mg丙氨瑞林溶解于400 μ l的不同浓度(0%、8%、16%)明胶溶液作为内水相,PLGA溶解于二氯甲烷作为油相,将油水相超声

乳化30 s制得 W_1/O 初乳,在机械搅拌机搅拌条件下将初乳倒入50 ml 4%的PVA水溶液中,经高速搅拌2 min得到 $W_1/O/W_2$ 复乳,将复乳转移至100 ml 0.1%PVA溶液中,分别采用室温常压挥发方法和低温真空挥发方法固化微球。低温真空挥发方法(方法1)是在4 $^{\circ}$ C水浴旋转蒸发仪抽真空挥发溶剂4 h;室温常压挥发方法(方法2)是在25 $^{\circ}$ C常压条件下,磁力搅拌4 h,离心、水洗后加入10 ml 5%的甘露醇溶液将微球分散,冷冻干燥48 h得到丙氨瑞林微球。

1.4 高效液相色谱法(HPLC)测定微球中药物含量 色谱条件:色谱柱(美国迪马公司Diamonsil, C_{18} 柱250 mm \times 4.6 mm,5 μ m);流动相:0.1 mol/L磷酸(三乙胺调节pH=3.0):乙腈=80:20;检测波长220 nm;流速1 ml/min;进样量20 μ l。精密称取适量丙氨瑞林,配制成浓度为1、5、10、20、50、100、200 μ g/ml的0.184 mol/L KH_2PO_4 溶液,在220 nm处测定吸收峰面积并与相应浓度回归。精密称取丙氨瑞林微球适量(约相当于丙氨瑞林10.5 mg),加入乙腈:蒸馏水=9:1的混合溶剂5 ml,涡旋溶解1 min至微球完全溶解,将混合溶剂转移至25 ml的容量瓶,用0.184 mol/L KH_2PO_4 (含有0.02%吐温-20)定容至25 ml。经0.45 μ m微孔滤膜过滤后进样,根据标准曲线回归方程计算含量。

1.5 微球的体外释放 由于丙氨瑞林在释放介质中不稳定,因此通过测定释放过程中微球内残余药量来考察体外释放情况。具体方法[5]如下:分别取不同批次的丙氨瑞林缓释微球适量(相当于丙氨瑞林4.2 mg)于10 ml具塞刻度试管中,加入0.184 mol/L KH_2PO_4 缓冲盐溶液10 ml(含0.02%吐温-20)作为释放介质,于37 $^{\circ}$ C恒温摇床上进行释放实验,转速为100转/min,依法操作,在第1、7、14、21、28、35天取出试管($n=3$),350 \times g离心5 min,吸去上清液,加入含0.02%吐温-20的0.184 mol/L KH_2PO_4 溶液10 ml,振荡,350 \times g离心5 min,吸去上清液,再加入上述溶液洗涤1次,用10 ml乙腈-水(9:1)转移至50 ml量瓶中,加0.184 mol/L KH_2PO_4 缓冲盐溶液定容,同1.4项下的液相色谱条件测定。

在丙氨瑞林微球的体外释放实验期间,每隔3.5 d更换1次新鲜的相对应的缓冲盐溶液,在pH=7.0组[6],设置一组长期没有更换缓冲溶液组作为对照组。每次更换新鲜缓冲溶液时测定旧缓冲溶液的pH值。

1.6 微球载体降解过程分析 在体外释放实验期间,将在pH=7.0的释放介质的微球(16%明胶、方

法2固化、定期更换释放介质)在各个取样点收集冷冻干燥后,拍摄电子扫描电镜图,分析微球载体的降解过程。

2 结果

2.1 不同内水相明胶浓度对微球体外释放的影响 采用不同内水相浓度、方法2固化的微球在pH=7.0释放介质的体外释放曲线如图1所示,其中内水相浓度为0%明胶和8%明胶的微球的释放趋势接近。突释是由吸附在微球表面的药物在释放介质中的扩散形成的,所以1~7 d 16%明胶的微球与0%明胶、8%明胶的微球的突释量接近,但7 d后的释放曲线差别较大。1~7 d的释放主要是以微球中的通道扩散为主,所以3种微球的释放速率差别较小。第7天之后,药物释放是由于PLGA载体的不断溶蚀造成的,而16%明胶微球的释放速率低于0%明胶和8%明胶微球,这是由于16%明胶的黏度高于后两者,微球溶蚀后药物自内水相的溶出速度较低。至第35天时,微球总的释放度相当,这是因为载体完全降解从而使药物完全释放。从图1中曲线可知,微球内水相的黏度对药物的释放有影响。

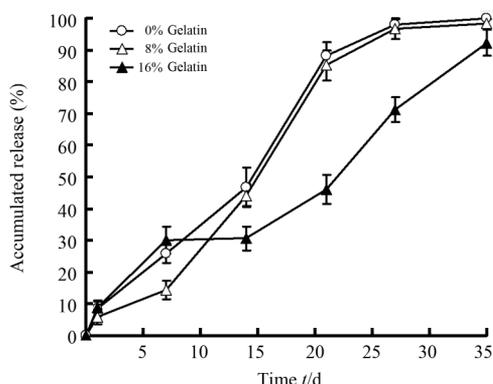


图1 不同明胶内水相浓度、方法2条件下挥发制备的微球的体外释放曲线

Fig 1 *In vitro* release (pH = 7.0) curve of microspheres with different concentrations interaqueous phase of gelatin using method 2

$n=3, \bar{x} \pm s$

2.2 不同有机溶剂挥发固化方法对微球体外释放的影响 由图2可见,低温真空挥发制得的微球表面的孔洞较常温搅拌挥发微球的数量多且大,这是因为真空挥发有机溶剂时,抽真空形成负压,有机溶剂挥发速率快所致。由图3可见,在第7天到第28天期间,随着PLGA的不断溶蚀,真空制备的微球的内水相可能不仅存在于微球核心,还有可能随着负压更多分散于载体骨架中,所以低温真空挥发制备

的微球的释放度会偏大于室温挥发的微球。

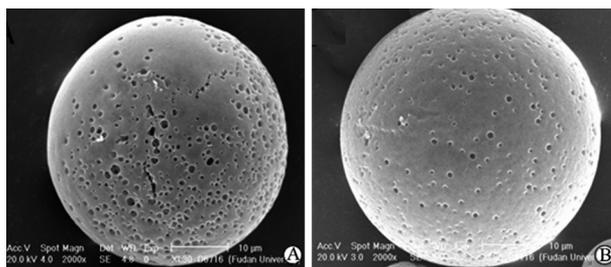


图2 不同挥发固化方法制备微球的电镜扫描图

Fig 2 Scanning electron microscope images of microspheres prepared by different volatilized hardening methods A: Method 1, vacuum low-temperature; B: Method 2, room temperature magnetic stirring. Original magnification: $\times 2000$

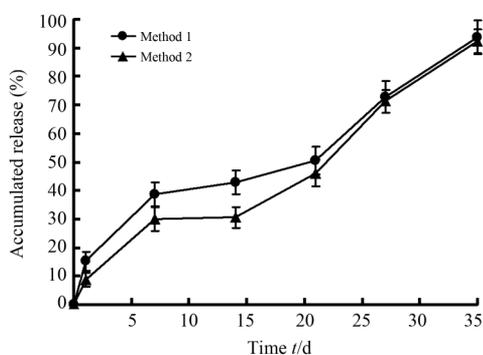


图3 不同有机相挥发固化方法制备的16%明胶内水相微球在pH=7.0的释放介质中的体外释放曲线

Fig 3 *In vitro* release curve of the microspheres with different volatilized hardening methods in medium with pH = 7.0

Method 1: Vacuum low-temperature; Method 2: Room temperature magnetic stirring. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 不同pH值释放介质对微球体外释放的影响 从图4中可知,方法2固化制备的内水相为8%明胶的微球在pH=4.5的释放介质中,在第35天时,微球的释放度为43.4%,这是因为酸性条件会抑制微球载体PLGA中的酯键水解,从而影响PLGA的降解,导致微球中的药物不能完全释放;在pH=7.0的释放介质中,微球的释放趋势符合零级释放模式;在pH=10.0的释放介质中,由于碱性环境会加速微球载体PLGA中酯键的水解,从而加速PLGA的降解,所以在21 d时,微球中的药物就完全释放。

2.4 更换体外释放介质对微球体外释放的影响 由表1可知,在使用pH=7.0的PBS作为释放介质时,定期更换释放介质可以使释放介质的pH值保持在7.0左右,为微球的释放提供稳定的环境;而没有定期更换释放介质的微球,由于PLGA中酯键的水解,形成越来越多的羧基,从而增加了释放介

质的酸性,当酸性条件到达一定值时,会抑制 PLGA 中酯键的水解,从而导致微球中药物的不完全释放。图 4 也验证了这一结论。

2.5 微球载体降解过程分析 图 5 显示的是在 pH=7.0 释放介质中微球(16%明胶内水相、方法 2 固化、定期更换释放介质)在各取样点得到的微球冻干粉未的扫描电镜图。在第 1 天(图 5A)至第 14 天(图 5D)期间,微球载体的溶蚀只是发生在微球表面,这和微球的体外释放数据是相符合的,这期间药物的释放是以扩散为主;在第 14 天之后,微球的骨架载体开始溶蚀降解,使得包裹在微球内的药物得以释放;到第 35 天时,PLGA 载体已经完全降解,药物也达到了完全释放(图 5G),说明药物的释放与载体的降解密切相关。

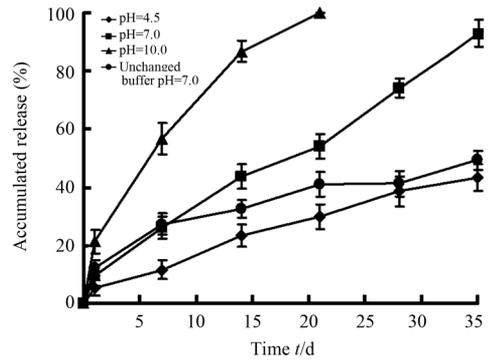


图 4 丙氨瑞林微球在不同 pH 值的释放介质中和在未定期更换释放介质 (pH=7.0) 中的体外释放曲线
Fig 4 Effects of media with different pH values (pH=4.5, pH=7.0, pH=10.0) and unchanged pH values (pH=7.0) on AR release from PLGA-based microspheres
n=3, $\bar{x} \pm s$

表 1 未换液与定期换液的的释放介质 (pH=7.0) 在定期换液点测定的释放介质的 pH 值

Tab 1 pH values of the phosphate media with changed and unchanged media on AR release from PLGA-based microspheres

Medium	Day 0	Day 3.5	Day 7	Day 10.5	Day 14	Day 17.5	Day 21	Day 24.5	Day 28	Day 31.5	Day 35
Unchanged	7.00	6.97	6.90	6.80	6.62	6.53	6.43	6.41	6.40	6.40	6.40
Changed	7.00	6.99	6.81	6.80	6.78	6.79	6.97	6.97	7.01	6.95	-

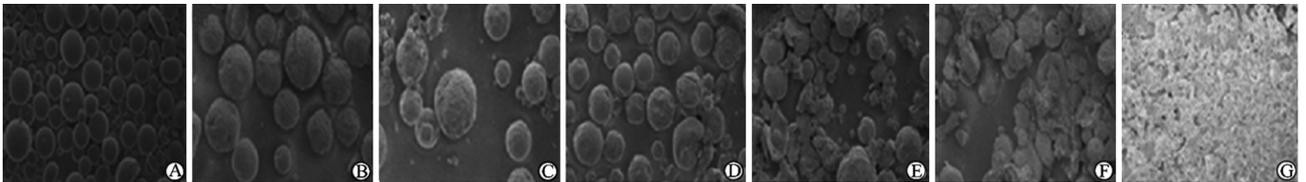


图 5 在丙氨瑞林微球体外释放期间不同取样点样品冷冻干燥后的微球载体的扫描电镜图

Fig 5 Scanning electron microscope images of microsphere matrix at different time points

A: Day 0; B: Day 1; C: Day 7s; D: Days 14; E: Day 21; F: Day 28; G: Day 35. Original magnification: $\times 400$

3 讨论

本研究结果表明影响微球体外释放的因素有制备微球的不同明胶浓度的内水相、微球固化挥发的方法、释放介质的 pH 值和释放介质的更换等,不同明胶浓度内水相制备的微球会改变微球的体外释放模式;而不同的微球的挥发固化方法改变的是微球的突释量,对微球的释放趋势没有影响;释放介质的 pH 值对微球的体外释放影响最大,其中 pH=7.0 的释放介质中微球的释放趋势最符合缓释给药的释放要求,在体外释放实验中,对释放介质 pH 有要求的话,需定期更换释放介质以保证释放环境的稳定。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 段金良,蒋元华,刘英,曾琼芳,黄雅丹.丙氨瑞林与曲普瑞林在长方案促排卵中的降调节效果比较[J].中华男科学杂志,2010,16:611-614.
- [2] 林建华,严隽鸿,陈德甫.丙氨瑞林治疗子宫内膜异位症[J].上海第二医科大学学报,1998,18:144-146.
- [3] Ghassemi A H, van Steenberg M J, Barendregt A, Talsma H, Kok R J, van Nostrum C F, et al. Controlled release of octreotide and assessment of peptide acylation from poly(D,L-lactide-co-hydroxymethyl glycolide) compared to PLGA microspheres[J]. Pharm Res, 2011, 29: 110-120.
- [4] Zhang H, Gao Y, Lv W, Jiao C, Duan M, Liu H, et al. Preparation of bleomycin A2-PLGA microspheres and related *in vitro* and *in vivo* studies[J]. J Pharmaceut Sci, 2011, 100: 2790-2800.
- [5] Klose D, Siepmann F, Willart J F, Descamps M, Siepmann J. Drug release from PLGA-based microspheres; effects of the "microparticle: bulk fluid" ratio[J]. Int J Pharm, 2010, 383(1-2): 123-131.
- [6] Vay K, Scheler S, Friess W. New insights into the pore structure of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres[J]. Int J Pharm, 2010, 402(1-2): 20-26.

[本文编辑] 尹茶