

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00772

· 论 著 ·

艾塞那肽缓释微球的制备和体外释放的研究

宣吉明, 高 静, 黄景彬, 林亚玲, 鲁 莹, 钟延强*

第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 制备载艾塞那肽的聚乳酸-羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]微球, 并对其体外释药特性进行考察。**方法** 以聚乳酸-羟基乙酸共聚物为载体, 采用凝聚法(W/O/O)制备载艾塞那肽缓释注射微球, 建立了高效液相色谱测定艾塞那肽含量的方法和微球中药物提取方法, 考察微球粒径大小、外观、包封率、载药量等理化性质, 并对微球体外释放特性进行了考察。**结果** 微球球形较圆整, 平均粒径为 $(51.2 \pm 1.97) \mu\text{m}$, 实际载药量为 $(4.50 \pm 0.13)\%$, 包封率在 $(96.5 \pm 2.68)\%$, 首日突释率为 $(13.19 \pm 1.39)\%$, 28 d的体外累积释放率可达 $(88.6 \pm 0.73)\%$ 。**结论** 以生物可降解的PLGA为载体, 用W/O/O法制备的艾塞那肽微球工艺稳定可控, 重现性好, 可在体外缓释一个月, 在糖尿病治疗中具有良好的应用前景。

[关键词] 艾塞那肽; 微球体; 聚乳酸-羟基乙酸共聚物; 高压液相色谱法; 体外释放; 迟效制剂

[中图分类号] R 943.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)07-0768-04

Preparation of sustained-release microspheres containing exenatide and their *in vitro* release

XUAN Ji-ming, GAO Jing, HUANG Jing-bin, LIN Ya-ling, LU Ying, ZHONG Yan-qiang*

Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To prepare exenatide-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres and to evaluate their release behavior *in vitro*. **Methods** Exenatide-loaded PLGA microspheres were prepared by W/O/O method using PLGA as vectors. An HPLC approach was established to determine the content and *in vitro* cumulative release. The physicochemical characteristics of microspheres, including the mean diameter, morphology, drug entrapment efficiency and loading efficiency, were evaluated. **Results** The prepared microspheres were well-shaped, with a mean diameter of $(51.2 \pm 1.97) \mu\text{m}$. The drug loading was $(4.50 \pm 0.13)\%$ and the encapsulation efficiency was $(96.5 \pm 2.68)\%$. The first day burst release was $(13.19 \pm 1.39)\%$ and the *in vitro* 28-day-cumulative-release was $(88.6 \pm 0.73)\%$. **Conclusion** The W/O/O method is stable, controllable, and repeatable for preparing exenatide-loaded microspheres using biodegradable polymers PLGA as the vector; the microspheres yield a one-month continuous release and have a bright future in treatment of diabetes mellitus.

[Key words] exenatide; microspheres; poly(D, L-lactide-co-glycolide); high pressure liquid chromatography; *in vitro* release; delayed-action preparations

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(7): 772-775]

艾塞那肽(exenatide, 代号 AC-2993)是人工合成的 exendin-4^[1]。艾塞那肽为肠促胰岛素类似物^[2], 是胰高血糖素-1(GLP-1)受体激动剂, 由 39 个氨基酸残基组成。艾塞那肽具有促进胰腺 β 细胞增殖、改善其功能, 以及促进胰岛素分泌、增加机体对胰岛素的敏感性和延缓胃排空等作用^[3], 有着传统治疗糖尿病药物不可比拟的优点。美国食品药品监督管理局(FDA)于 2005 年 4 月批准了艾塞那肽在美国上市, 由于半衰期短, 其上市产品为每日 2 次注射剂。这制约了其作为药品的开发和利用, 为了提高患者用药的顺应性, 有必要对艾塞那肽的缓释制

剂进行研究, 以达到长效缓释的目的。

利用生物可降解、无毒副作用的聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)将艾塞那肽制备成微球, 不仅能达到延长药物在体内的作用时间, 降低给药频率, 而且还可以维持有效的血药浓度, 提高治疗效果。本课题采用 W/O/O 法制备载艾塞那肽的 PLGA 缓释微球, 对其理化性质和体外释药特性进行了考察。

1 材料和试剂

1.1 仪器 L-2000 高效液相色谱仪(日本 Hitachi 公司); AL104 万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪

[收稿日期] 2011-03-21 **[接受日期]** 2011-05-20

[作者简介] 宣吉明, 硕士生. E-mail: xuanjiming@yahoo.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871258, E-mail: yqzhong@smmu.edu.cn

器上海有限公司);VTX-3000L型涡旋混合器(日本LMS实验室);POLYTRON®PT-MR3100均质匀化机(瑞士KINEMATICA公司);RZR2021搅拌机(德国Heidolph集团);Centrifuge 5424小型高速离心机(德国Eppendorf公司);TS15136MM扫描电子显微镜(捷克TESCAN公司);VD53真空干燥箱(德国Binder公司);mastersizer2000激光粒度测定仪(Malvern公司);SHZ-88台式恒温水浴摇床(江苏太仓市实验设备厂);

1.2 药品和试剂 艾塞那肽原料药(海南双成药业有限公司);聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA 50:50, RG504H, 德国Boehringer Ingelheim公司);350cs二甲基硅油(美国,上海浩航贸易有限公司代理);HEPES(4-羟乙基哌嗪乙磺酸,纯度>99%,美国Amresco公司);乙腈(色谱纯,上海百灵威化学技术有限公司);叠氮钠(纯度>99.9%,AMERSON分装);磷酸二氢钾、二氯甲烷、丙酮等(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法和结果

2.1 艾塞那肽含量测定方法的建立

2.1.1 色谱条件 Welch Materials Ultimate XB-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相:0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS,取磷酸二氢钾6.8 g,溶于1 000 ml去离子水,用磷酸调pH至4.0)为A相,乙腈为B相,梯度:B相在0~20 min内由27%升至43%,再在0.1 min内下降到27%,平衡8 min。检测波长为220 nm,柱温为25℃,流速为1.0 ml/min,进样量为20 μl。理论塔板数大于8 000。HPLC图谱见图1。

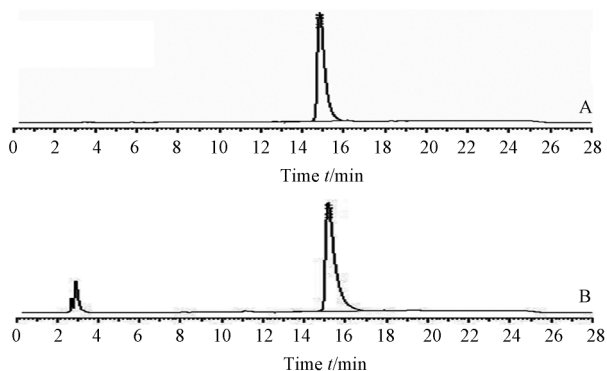


图1 艾塞那肽原料药(A)及样品(B)HPLC图谱

Fig 1 Chromatogram of exenatide standard solution (A) and sample solution (B)

2.1.2 标准曲线绘制 精密称取艾塞那肽原料药适量,用PBS(pH 7.4)溶解并稀释成浓度为1 005

μg/ml的贮备液。贮备液以PBS倍比稀释,得浓度为502.50、251.25、125.63、62.81、31.41 μg/ml的系列标准溶液,过滤进样,记录峰面积A。以A对浓度C进行线性回归,得回归方程: $A = 13\ 565C - 41\ 471$, $r = 1.000\ 0$,表明艾塞那肽浓度在31.41~1 005 μg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系。

取浓度为125.0、62.5和15.6 μg/ml艾塞那肽标准溶液,各以上述色谱条件进样,测得日内RSD(n=3)分别为0.21%、0.27%、0.70%;日间RSD(n=3)分别为0.36%、0.32%、0.92%;回收率分别为(99.10±1.22)%、(100.38±2.21)%、(102.07±2.65)%,符合方法学要求。

2.2 微球的制备 根据文献^[4-6]报道,对W/O/O法进行了改进,制备工艺如下:取处方量的艾塞那肽和蔗糖溶于120 μl水中,PLGA溶于2 ml二氯甲烷,油相和内水相混合后,以20 000转/分均质匀化1 min,然后滴加4 ml二甲基硅油,混合物加到3℃正庚烷和乙醇的混合溶剂中,1 h后倾倒入上层溶剂,加新鲜3℃正庚烷,静置1 h,收集微球,于真空干燥箱中干燥24 h,再冷冻干燥24 h得干燥的艾塞那肽微球。

2.3 微球的形态、粒径大小和分布 取艾塞那肽微球适量,用扫描电子显微镜观察,发现微球圆整,表面光滑并有微量孔隙,微球分布较均匀,但有轻微黏连(图2)。用激光粒度测定仪测得艾塞那肽微球平均粒径为(51.2±1.97) μm。粒径分布见图3。

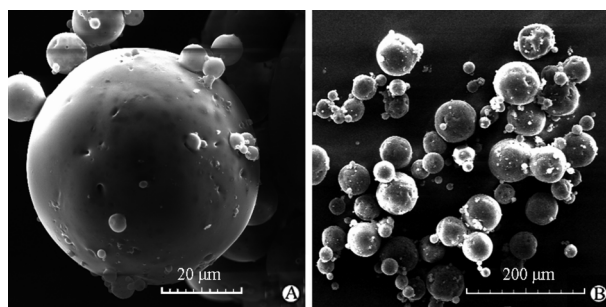


图2 载艾塞那肽微球的扫描电镜照片
(正庚烷和乙醇的混合溶剂为固化溶剂)

Fig 2 Morphology of exenatide-loaded microspheres under scanning electron microscope (using heptanes and DCM as hardening solvent)

2.4 微球载药量和包封率的测定 根据文献^[7],精密称取含药微球10 mg,加1 ml二氯甲烷:丙酮=3:7(V/V)的混合溶剂涡旋,离心(17 600×g,5 min),弃上清液,再用二氯甲烷:丙酮=3:1(V/V)的混合溶剂重复上述操作3次后真空干燥箱挥干溶剂,残余物加PBS(pH 7.4)溶解,过滤,进样,以上

述色谱条件测定峰面积,根据标准曲线计算 PLGA 微球中艾塞那肽的含量。实际载药量(%)=微球中艾塞那肽含量/微球总质量×100%,包封率(%)=实际载药量/理论载药量×100%。

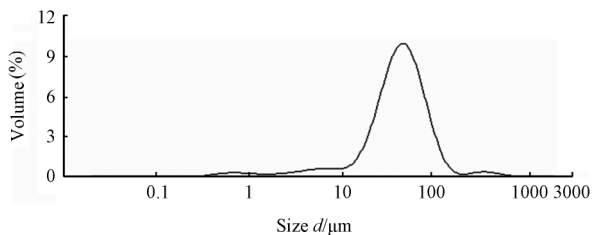


图3 艾塞那肽微球的粒径分布图

Fig 3 Diameter distribution of exenatide-loaded microspheres

称取 10 mg 空白微球,分别加入 275.5、143.5、62.8 μg 质量的艾塞那肽原料药 (n=3), 以上述 HPLC 法测含量, 计算提取回收率。结果表明 3 种质量 275.5、143.5、62.8 μg 的提取回收率分别为 (100.30±3.23)%、(101.52±1.49)%、(98.76±3.75)%。艾塞那肽微球的载药量和包封率分别为 (4.50±0.13)% 和 (96.5±2.68)%。

2.5 艾塞那肽缓释微球的稳定性考察 精密称取本品 0.5 mg, 用 30 ml pH 7.4 PBS 溶解, 取 1 ml 溶液于离心管, 17 600×g 离心 5 min, 取上清液进 HPLC 测定, 记录峰面积, 代入标准曲线得母液浓度。所剩溶液平均分装于 3 个 10 ml 的玻璃离心管, 分别置于 4℃、25℃、37℃ 保温, 考察溶液在不同温度中不同放置时间下的稳定性。分别于第 2、4、8、24 h, 2、3、5、6、7 d, 定时取样以上述色谱条件测定含量。结果见图 4。

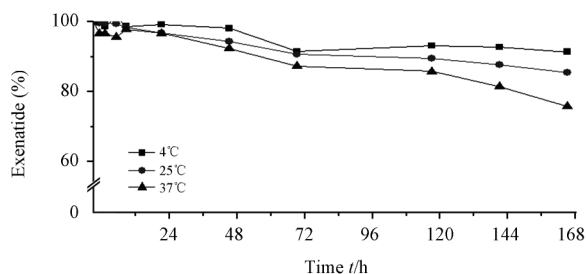


图4 艾塞那肽在 4℃、25℃、37℃ 时的稳定性变化

Fig 4 Stability of exenatide standard at 4°C, 25°C, and 37°C

由图 4 可见, 艾塞那肽的 PBS 在 4℃ 条件下比较稳定, 在 25℃ 和 37℃ 条件下放置 2 d 后浓度下降较明显。说明样品在此条件下不稳定, 因此体外释

放实验采用间接测定微球中残余艾塞那肽的量来计算体外释放百分率。

2.6 艾塞那肽载药微球的体外释放实验 精密称定艾塞那肽载药微球 10 mg (n=3), 置于 2 ml EP 管, 加入 1 ml HEPES (pH 7.4, 含 0.02% 叠氮钠作为抑菌剂) 缓冲液, 涡旋使微球充分浸润在释放介质中, 置于恒温水浴摇床中, 在 (37±0.5)℃、100 次/min 振荡速度 (振幅 20 mm) 条件下进行微球的体外释放度测定。分别在 1、4、7、14、21、28 d 取出离心管 (n=3), 离心 (17 600×g, 5 min), 弃去全部释放介质, 剩余物冷冻干燥后按 2.4 项下方法测残留含量, 计算累积释放率, 以累积释放率对时间 t 作图, 获得药物释放曲线, 结果见图 5。

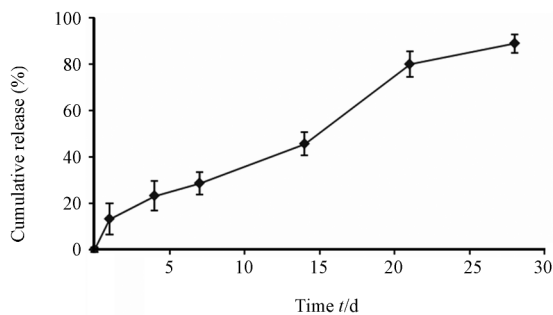


图5 艾塞那肽微球在 pH 7.4 HEPES 溶液中的体外释放曲线

Fig 5 In vitro release curve of exenatide-loaded microspheres in pH 7.4 HEPES buffer n=3, $\bar{x}\pm s$

结果表明艾塞那肽微球在 37℃ 的 HEPES 缓冲液 (pH=7.4) 中具有一定的缓释效果, 1 d 的突释率为 (13.19±1.39)%, 28 d 累积释放率达到 (88.6±0.73)%。

3 讨论

本实验采用 W/O/O 法, 即凝聚法。其一般步骤是先将初乳加到非 PLGA 溶剂中, 常用的有石油醚、聚二甲基硅氧烷又叫硅油^[8]。在搅拌条件下, 高分子聚合物经过相分离形成凝聚相。随着凝聚相中溶剂的逐渐萃取, 高分子聚合物形成稳定的凝聚粒子。然后再将上述物质加到大量体积的固化剂中。常用的固化剂有己烷和八甲基环四硅氧烷。根据文献^[9]报道, 该法制备的微球包封率较高 (>75%), 但在释放动力学中, 微球中的蛋白类药物只能释放 35%~75%。这是由于制备过程中蛋白质变性引起的结果。所以本实验在内水相中加入一定量的蔗糖作为保护剂, 能防止艾塞那肽变性, 使 28 d 累积释放率达到 (88.6±0.73)%。

从图2可见,微球表面有一定孔隙,而且球与球之间存在黏连,粒径分布不呈正态分布。孔隙形成的原因可能是快速萃取过程所致。根据文献^[7]报道,固化剂的滴加速度对孔隙大小有影响,而孔隙大小又影响突释。所以要想达到较小的突释,有待进一步研究固化剂的滴加速度。图2中 $<20\ \mu\text{m}$ 的微球和碎片较多,从微球形成过程考虑,大多数微球是由几个粒子组成,极个别粒子单独形成一个微球^[7],这就解释了小微球较多,粒径分布不呈正态分布的原因。本实验均质所用的转速为20 000转/分,如此高的转速难免在凝聚过程中打碎大粒子形成碎片,这也是粒径分布不呈正态分布的另一个原因。粘连可能是硅油萃取不完全的缘故。因为萃取溶剂乙醇与二甲基硅油互溶性较差,含乙醇的庚烷无法完全萃取二甲基硅油。而二甲基硅油的密度比乙醇和庚烷大,正如我们在实验中所观察到的二甲基硅油和固化剂分层,微球沉积在下层溶剂,微球间彼此粘连甚至成团。在我们后来的实验中采用纯正庚烷作固化溶剂,得到的微球(图6)形态圆整,表面光滑,粘连不严重,分布更均匀,实验中我们观察到二甲基硅油和二氯甲烷被正庚烷完全萃取,未见溶剂分层的现象,而且微球在溶剂中分散性很好。这也验证了我们对微球粘连的解释。

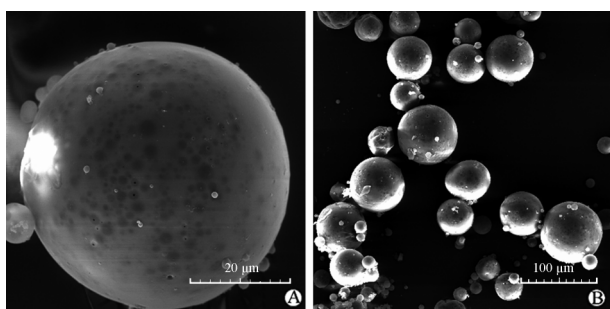


图6 载艾塞那肽微球的扫描电镜照片
(纯正庚烷为固化溶剂)

Fig 6 Morphology of exenatide-loaded microspheres under scanning electron microscope (using only heptanes as hardening solvent)

艾塞那肽 37°C 时在 $\text{pH}\ 7.4$ 的释放介质中稳定性较差,故无法按常规方法测定释放介质中药物浓度。我们采用残余法测定微球中未被释放的艾塞那肽含量,虽然操作复杂,但能保证测量的准确性。

在艾塞那肽缓释微球的体外释放实验中,艾塞那肽的体外首日突释率为 $(13.19\pm 1.39)\%$,持续释药阶段(1~21 d)的释药曲线呈近似线性($r=0.971$),以14 d为界分为明显的两个阶段。0~14 d

内释放缓慢,随后释放加快,28 d累积释放率达到 $(88.6\pm 0.73)\%$ 。结合药物释放和PLGA降解的情况可知,在PLGA分子链中酯键开始断裂(约15 d内)之前,药物释放以微球中的通道扩散为主;随着酯键断裂程度加大,速度加快,艾塞那肽释放以材料降解和扩散共同作用完成,因此此时的药物释放速率会有所增加^[4,10]。

对于艾塞那肽微球的生物学活性和动物体内药代动力学有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Hiles R, Slone T, Serota D. Parotid gland basophilic foci in mice administered the peptide AC2993(synthetic exendin-4) by subcutaneous injection for periods of 13 to 26 weeks[J]. *Toxicol Sci*, 2003, 72:384.
- [2] Christel C M, DeNardo D F. Release of exendin-4 is controlled by mechanical action in Gila Monsters, *Heloderma suspectum* [J]. *Comparat Biochem Physiol Mol Integr Physiol*, 2006, 143: 85-88.
- [3] Nielsen L L, Young A A, Parkes D G. Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutic for improved control of type 2 diabetes[J]. *Regulatory Peptides*, 2004, 117: 77-88.
- [4] Wu J H, Wu L, Xu X Q, Xu X Y, Yin X J, Chen Y J, et al. Microspheres made by W/O/O emulsion method with reduced initial burst for long-term delivery of endostatin, a novel recombinant human endostatin[J]. *J Pharm Sci*, 2009, 98: 2051-2058.
- [5] Ciombor D M, Jaklenc A, Liu A Z, Thanos C, Rahman N, Weston P, et al. Encapsulation of BSA using a modified W/O/O emulsion solvent removal method[J]. *J Microencapsul*, 2006, 23: 183-194.
- [6] Kwak H H, Shim W S, Son M K. Pharmacokinetics and efficacy of a biweekly dosage formulation of exenatide in Zucker diabetic fatty (ZDF) Rats[J]. *Pharm Res*, 2009, 26: 2504-2512.
- [7] Meinel L, Illi O E, Zapf J, Malfanti M, Peter Merkle H, Gander B. Stabilizing insulin-like growth factor- I in poly(D, L-lactide-co-glycolide) microspheres[J]. *J Contr Res*, 2001, 70(1-2): 193-202.
- [8] Sandor M, Riechel A, Kaplan I, Mathiowitz E. Effect of lecithin and MgCO_3 as additives on the enzymatic activity of carbonic anhydrase encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1570: 63-74.
- [9] Ye M, Kim S, Park K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles[J]. *J Contr Res*, 2010, 146: 241-260.
- [10] 刘青锋, 鲁莹, 周闰臣, 宣吉明, 谢绍波, 钟延强. 注射型植入剂体外释放方法的考察[J]. *第二军医大学学报*, 2010, 31: 874-877.

Liu Q F, Lu Y, Zhou G C, Xuan J M, Xie S B, Zhong Y Q. Investigation of *in vitro* release model of injectable implants[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2010, 31: 874-877.

[本文编辑] 尹茶