

恩替卡韦微球的制备与质量评价

李艳敏 周梦莹 魏开芳 张春燕

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘要 **目的** 制备恩替卡韦微球,并进行质量评价。**方法** 采用喷雾干燥法制备恩替卡韦微球,利用扫描电镜观察形态,Masterzizer 3000 粒度仪测试粒径分布,高效液相色谱法测定包封率、载药量、体外释药曲线。**结果** 所得微球呈圆球形,平均粒径 9.58 μm ,载药量为 11.5%,包封率为 92.0%,体外释药可达 24d。喷雾干燥器进口温度、PLGA 浓度、PLGA 黏度对微球形态具有一定影响,PLGA 浓度和乳酸/羟基乙酸(LA/GA)比例影响微球体外释药过程。**结论** 本实验制备得到的恩替卡韦微球体外具有良好的缓释作用,有望为抗乙肝病毒药物新剂型的开发提供依据和参考。

关键词 恩替卡韦;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;微球

中图分类号:R969.1 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2024)12-461-05

Preparation and quality evaluation of entecavir microspheres

LI Yanmin, ZHOU Mengying, WEI Kaifang, ZHANG Chunyan

(School of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To prepare entecavir microspheres and evaluate the quality. **Methods** The entecavir microspheres were prepared by spray drying method. The morphology and particle size distribution were observed by scanning electron microscope and a Masterzizer 3000 Particle Size Analyzer respectively. The entrapment efficiency, drug loading rate and *in vitro* release rate were determined by HPLC. **Results** The microspheres were spherical, with an average particle size of 9.58 μm , drug loading rate of 11.5%, entrapment efficiency of 92.0%, and it could release for 24 days *in vitro*. The morphology of microspheres was influenced by the inlet temperature, PLGA concentration, and PLGA viscosity. The *in vitro* drug release process was affected by the concentration of PLGA and the ratio of LA/GA. **Conclusion** The entecavir microspheres showed good sustained release effect *in vitro*, and it is expected to provide reference for the development of anti HBV drugs.

Keywords: Entecavir; PLGA; Microspheres

随着疫苗的广泛应用、血液制品的筛选以及抗病毒治疗,肝炎的感染率已呈下降趋势。但是,乙肝病毒感染仍是全球性的公共卫生问题^[1-2]。由于目前正在使用的抗病毒治疗方法很难将病毒完全从体内清除,因此,乙肝是一种需要长期用药治疗的疾病^[3]。恩替卡韦是一种耐药率低,抗病毒作

用强的一线抗乙肝病毒口服药物,但有报道^[4]称口服抗病毒药物,63%的患者存在自行停药行为,导致病毒反跳,出现乙型肝炎严重急性发作。此外,食物摄入对恩替卡韦的吸收有明显影响,因此,需每天空腹服用,长期服用会加重胃肠道不良反应^[5]。

微球是药物分散或吸附在高分子聚合物基质中形成的微小球状实体,具有长效缓释作用^[6]。本研究将恩替卡韦开发成为缓释微球注射剂,可以避免每日口服用药不便及空腹服药引起的副作用,避免因患者自行停药引起的病毒反跳,延长给药间隔,提高患者的用药依从性。

[基金项目]山东省 2019-2020 年度中医药科技发展计划项目(2019-0452);2022 年济宁医学院大学生创新训练计划项目(cx2022169)

[通信作者]张春燕, E-mail: zhangchunyan203@126.com

1 材料与方法

1.1 仪器

B-191 喷雾干燥机(瑞士 BUCHI 公司); T25 均质机(德国 IKA 公司); Mastersizer 3000 粒度仪(英国马尔文公司); EM-30PLUS 扫描电子显微镜(韩国 COXEM 公司); XHF-D 高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司); B11-3 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); SHY-3 水浴恒温振荡器(金坛普林仪器制造有限公司)。

1.2 药品与试剂

恩替卡韦(山东铂源药业有限公司, 批号: 190104); 聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA, 美国 Lakeshore Biomaterials 公司, 批号: LP733); 二甲基亚砜(DMSO, 西安天茂化工有限公司, 批号: 20220301); 二氯甲烷(北京高纯科技有限公司, 批号: 20220712); Tween-80(南京威尔化工有限公司, 批号: 20190901); 甲醇(烟台远东精细化工有限公司, 批号: 20210531)。甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 恩替卡韦微球的制备 采用喷雾干燥法^[7]制备恩替卡韦微球: 将 PLGA 0.4g 溶于二氯甲烷, 向 PLGA 溶液中加入恩替卡韦, 涡旋振荡超声, 使恩替卡韦在 PLGA 二氯甲烷溶液中均匀分散, 形成均一的混悬液, 在磁力搅拌下将混悬液通过蠕动泵, 泵入喷雾干燥器中, 进行喷雾干燥, 样品通过旋风分离器后, 在收集器中收集微球。

1.3.2 微球表面形态观察 取恩替卡韦微球适量, 用导电胶固定于平板上, 在真空条件下进行喷金, 然后采用扫描电子显微镜(以下简称扫描电镜)观察微球外观形态。

1.3.3 微球粒径测定 采用 Mastersizer 3000 粒度仪测定微球粒径与粒径分布。将 800mL 0.1% 聚山梨酯 20 溶液置于粒度仪的样品分散装置中, 转速 2200rpm 搅拌。取微球样品约 100mg, 倒入样品池中, 待样品分散均匀后, 测其粒径。每个样品平行测定 3 次, 结果取平均值。

1.3.4 载药量和包封率的测定 高效液相色谱法(HPLC)测定恩替卡韦微球的载药量和包封率。色谱条件: 色谱柱为 C18 柱(250mm × 4.6mm, 25 μ m), 流动相为甲醇-水(20 : 80, V/V), 流速为

1.0mL · min⁻¹, 检测波长为 253nm, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样量 100 μ L。

精密称取恩替卡韦微球 0.0100g, 溶解到 5mL DMSO 中, 用流动相稀释定容后, 进 HPLC 测定峰面积, 并按以下公式计算载药量和包封率:

载药量(%) = 微球中药物重量/微球总重量 × 100%

包封率(%) = 微球实际载药量/理论投药量 × 100%

1.3.5 体外释放度测定 精密称取微球适量置于 50mL 具塞离心管中, 以含有 0.2% Tween-80 的磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4, 0.1M)作为释放介质^[8], 涡旋分散后放入 37 $^{\circ}$ C、50rpm 恒温水浴振荡器中, 分别于给定时间点取出离心管, 室温下 5000rpm 离心 3min, 取 10mL 上清液作为供试液, 并向原溶液中补充 10mL 释放介质, 将微球分散均匀后放入振荡器中振荡。将取出的供试液进行 HPLC 测定, 计算累积释药。

2 结果

2.1 微球表面形态

以 PLGA 为成球材料, 采用喷雾干燥法可制备得到外观圆整、粒径相对均一的恩替卡韦微球。本研究所得微球呈圆球形, 平均粒径 9.58 μ m, 载药量为 11.5%, 包封率 92.0%, 本外释药可达 24d。喷雾干燥器的进口温度、PLGA 的黏度、PLGA 的浓度都对微球成球过程和形态有一定影响。

2.1.1 进口温度对微球形态的影响 固定制剂处方及其他工艺因素, 将喷雾干燥器进口温度分别设置为 40 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C 和 50 $^{\circ}$ C, 观察不同进口温度条件下微球的形态, 结果见图 1。

进口温度越高, 微球分散性越差。这是因为 PLGA 的玻璃化转变温度在 40 $^{\circ}$ C ~ 60 $^{\circ}$ C, 高于玻璃化转变温度使 PLGA 容易变形, 产物形态变差, 且进口温度升高, 导致喷雾筒中温度较高, 使微球不能得以充分分散, 以黏连状态进入收集器中, 温度越高, 黏结越严重。因此, 本研究最终确定进口温度为 40 $^{\circ}$ C。

2.1.2 PLGA 浓度对微球形态的影响 固定处方及其他工艺因素, 将 PLGA 在二氯甲烷中的浓度分别设置为 2%、5% 和 10%, 观察不同浓度 PLGA 制备得到的恩替卡韦微球的形态, 结果见图 2。

由图 2 可知, 随着 PLGA 浓度增大, 微球越来越圆整。当 PLGA 浓度为 2% 时, 由于高分子材料浓度较低, 所得微球固化慢, 导致微球较软, 在微球

碰撞作用下,呈不规则的球形。当 PLGA 浓度为 5% 和 10% 时,所得微球外观较为圆整。

分别为 0.2dl/g 和 0.8dl/g 的 PLGA5050 2A 和 5050 4A 制备恩替卡韦微球,观察 PLGA 黏度对微球形态的影响,结果见图 3。

2.1.3 PLGA 黏度对微球形态的影响 采用黏度

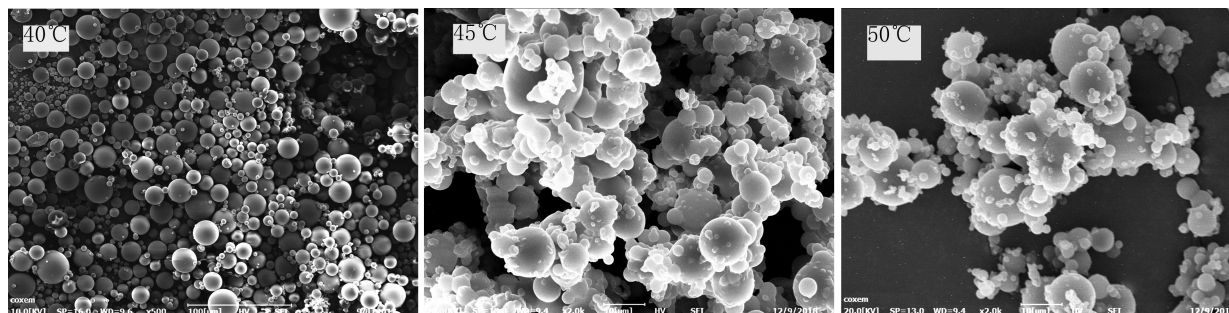


图 1 不同进口温度制备得到的微球电镜扫描照片(×2000)

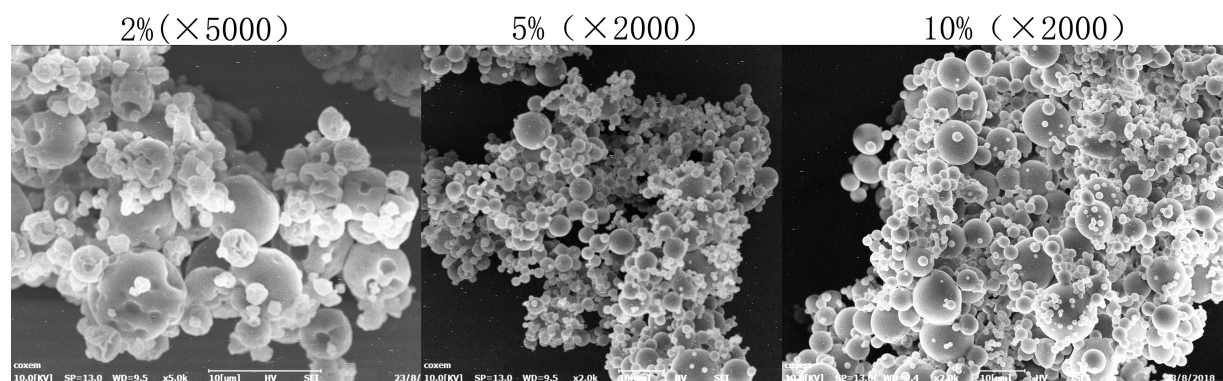
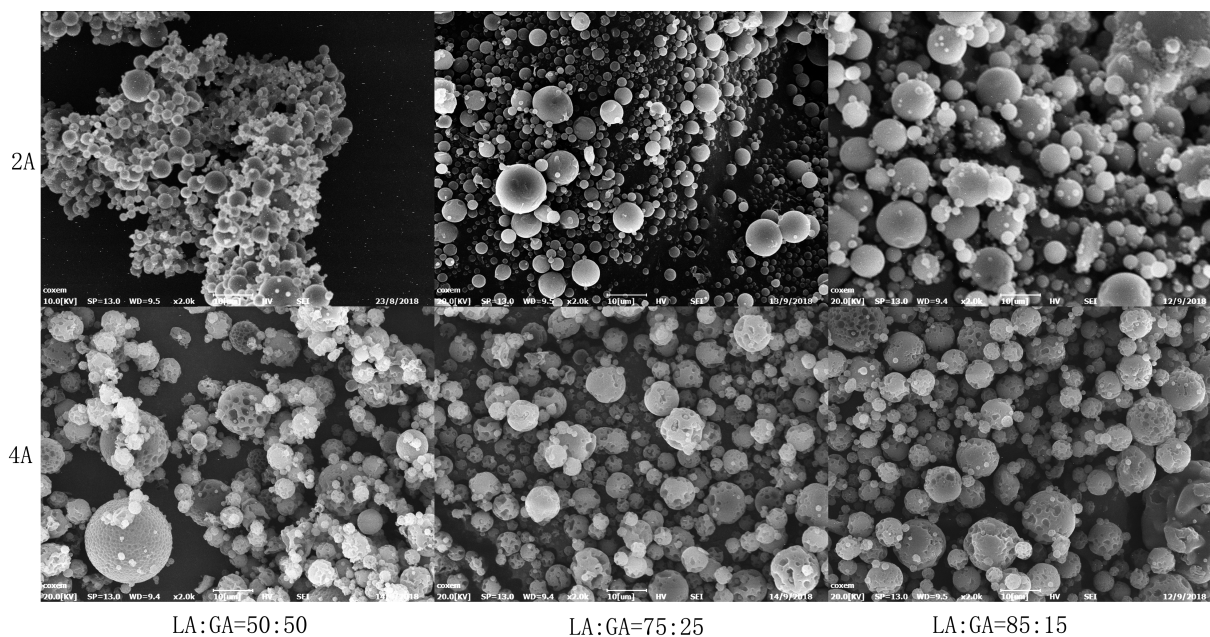


图 2 不同浓度的 PLGA 制备得到的微球电镜扫描照片



注:A,酸封端;2、4,黏度代码;LA,乳酸;GA,羟基乙酸。

图 3 不同黏度 PLGA 制备得到的微球电镜扫描照片

由图 3 可知,在较低黏度下,得到微球外观较圆整,随着 PLGA 黏度增大,微球表面呈多孔形态。这是因为黏度越大,微球固化时间越长,在微球固化过程中,挥发的二氯甲烷在微球内部形成气道,导致微球表面呈多孔分布。

2.2 原料药与 PLGA 比例对微球载药量和包封率的影响

固定恩替卡韦:PLGA 比例为 1:4、1:7 和 1:10,考察原料药与高分子材料比例对微球载药量和包封率的影响,结果见表 1。

表 1 不同 PLGA 与恩替卡韦比例所得恩替卡韦微球的载药量和包封率

PLGA:恩替卡韦	理论载药量/%	实际载药量/%	包封率/%
4:1	20.0	11.0	55.0
7:1	12.5	11.5	92.0
10:1	9.1	0.9	9.9

由表 1 可知,微球的实际载药量不会随理论载药量的增大而增大。本研究采用 PLGA 和恩替卡韦比例为 7:1,微球载药量和包封率分别达到 11.5% 和 92.0%。

2.3 PLGA 浓度对微球体外释药的影响

考察 PLGA5050 2A 在二氯甲烷中的浓度为 2%、5% 和 10% (w/v) 时,所得微球的释药曲线见图 4。

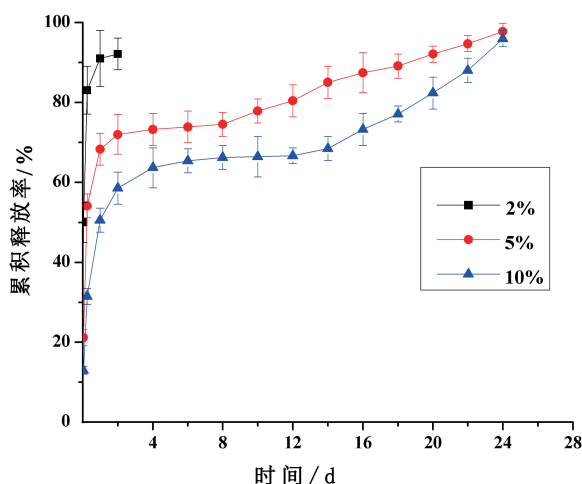


图 4 不同浓度 PLGA 所得恩替卡韦微球的体外释药曲线

当 PLGA 浓度为 2% 时,微球在 24h 释药即在 85% 以上,突释非常大。PLGA 浓度为 5% 和 10% 时,微球释药在经历较大突释后变得较为平稳。在

22d 之前,10% 浓度 PLGA 所得微球较 5% PLGA 微球释药更为缓慢。

结合 PLGA 浓度对微球形貌的影响分析可知,当 PLGA 浓度为 2% 时,由于高分子材料浓度较低,微球固化慢,随着微球在成型过程中不断碰撞,形成了凹凸不平的表面形态。而 5% 和 10% 两种浓度的 PLGA 所得微球表面圆整。这种凹凸不平的表面形态和圆整的球形相比,释药面积大大增大,因此微球与释放介质的接触面积增大。并且,喷雾干燥法所得微球的粒径较小,对于小粒径的微球来说,药物扩散和溶出速率较大,导致微球释药较快。而当 PLGA 浓度为 5% 和 10% 时,所得微球内部结构更加坚固、致密,释药也更为平稳、缓慢。

2.4 PLGA 中不同乳酸/羟基乙酸 (LA/GA) 比例对微球体外释药的影响

固定恩替卡韦:PLGA 比例为 1:7,PLGA 在二氯甲烷中的浓度为 10% (w/v),蠕动泵流速为 5mL · min⁻¹,进口温度为 40℃,分别以 PLGA 5050 2A、7525 2A、8515 2A 为高分子材料,喷雾干燥法制备恩替卡韦微球,考察 PLGA 中不同 LA/GA 比例所得微球体外释药曲线,结果见图 5。

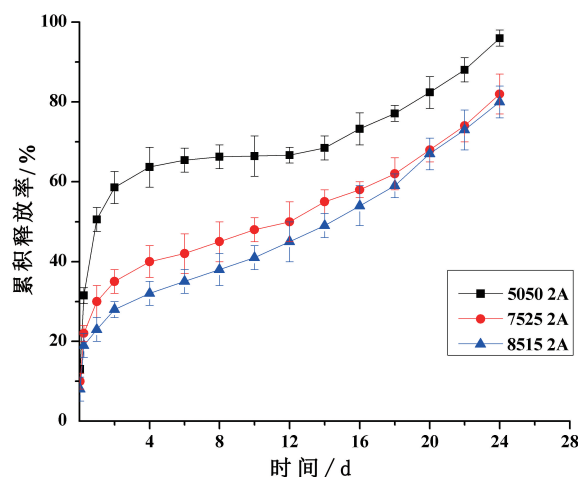


图 5 不同 PLGA 材料所得恩替卡韦微球的体外释药曲线

不同 PLGA 型号所得恩替卡韦微球的释药周期随着 PLGA 中 LA 比例的改变而不同。当 LA/GA 比例为 50:50 时,所得微球突释最大,释药较快。当 LA/GA 比例为 75:25 和 85:15 时,所得微球突释较小,释药较平稳。在 21d 之后,PLGA 7525 2A 和 8515 2A 所得微球累计释药百分率比较接近,且二者均在第 24d 累计释药达 80% 以上。

对比以 PLGA 5050 2A、7525 2A、8515 2A 为高

分子材料得到的微球释药曲线可知,在微球释药初期,药物释放以微球表面的药物扩散为主,所以 3 种微球均表现出较快的释药速率;在微球释药中期,药物释放与水分渗透进入微球内部的速率有关。由于 GA 亲水性较强,所以 3 种微球的释药速率为 5050 2A 微球快于 7525 2A 微球,7525 2A 微球快于 8515 2A 微球;在微球释药后期,随着微球骨架材料的蚀解,药物释放再次以扩散为主导,所以,3 种微球的释药速率均比较快。

3 讨论

微球具有显著延长药物作用时间,减少用药次数,改善患者依从性等特点,目前在精神疾病治疗、止痛剂给药、激素给药、干扰素给药、降糖、降压等多个领域均具有强烈的临床需求^[9-10]。微球常见的制备方法有乳化-溶剂挥发法、喷雾干燥法、相分离法等^[11-12]。本研究采用喷雾干燥法制备得到具有较高载药量(11.5%)和包封率(92.0%)、体外具有较长释药周期(24d)的恩替卡韦缓释微球。本文探讨了喷雾进口温度、PLGA 浓度和黏度对微球成型的影响,分析了 PLGA 的浓度和 LA/GA 比例对体外释药的影响,以期能为抗乙肝病毒药物新剂型的开发提供依据和参考。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] 李卓轩, 郝梓健. 乙肝病毒的治疗现状及其未来展望[J]. 实用医学研究, 2021, 3(6): 35-38. DOI: 10. 12346/pmr. v3i6. 4887.
- [2] Mokaya J, McNaughton AL, Hadley MJ, et al. A systematic review of hepatitis B virus (HBV) drug and vaccine escape mutations in Africa: a call for urgent action[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2018, 12(8): e0006629. DOI: 10. 1371/journal. pntd. 0006629.
- [3] 易永祥. 乙型肝炎病毒分子流行病学研究进展[J]. 新发传染病电子杂志, 2020, 5(1): 1-7. DOI: 10. 3877/j. issn. 2096-2738. 2020. 01. 002.
- [4] 王芳芳. 连续健康教育对慢性乙肝患者心理状态的影响[J]. 基础医学理论研究, 2021, 3(2): 19-21. DOI: 10. 12238/bmtr. v3i2. 4181.
- [5] Jung HJ, Ho MJ, Ahn S, et al. Synthesis and physicochemical evaluation of entecavir-fatty acid conjugates in reducing food effect on intestinal absorption[J]. Molecules, 2018, 23(4): 731-736. DOI: 10. 3390/molecules23040731
- [6] Vakalova TV, Revva IB. Highly porous building ceramics based on clay-ash microspheres and zeolite-ash microspheres mixtures[J]. Constr Build Mater, 2022, 317: 125922. DOI: 10. 1016/j. conbuildmat. 2021. 125922.
- [7] Fawaz W, Othman M. Formulation and in vitro evaluation of nystatin-loaded albumin micro-particles for the treatment of leishmaniasis[J]. Micro Nanosystems, 2021(3): 13-20. DOI: 10. 2174/1876402912999200905135312.
- [8] Zhang C, Wang A, Wang H, et al. Entecavir-loaded poly (lactico-glycolic acid) microspheres for long-term therapy of chronic hepatitis-B: preparation and in vitro and in vivo evaluation[J]. Int J Pharmaceut, 2019, 560(8): 27-34. DOI: 10. 1016/j. ijp-harm. 2019. 01. 052.
- [9] Li W, Tang J, Lee D, et al. Clinical translation of long-acting drug delivery formulations[J]. Nat Rev Mater, 2022(5): 7. DOI: 10. 1038/s41578-021-00405-w.
- [10] Calegari F, Silva B, Tedim J, et al. Benzotriazole encapsulation in spray-dried carboxymethylcellulose microspheres for active corrosion protection of carbon steel[J]. Prog Org Coat, 2020(138): 138. DOI: 10. 1016/j. porgcoat. 2020. 105329.
- [11] Lu Z, Chen W, Cui X, et al. Fluorine-free superhydrophobic meshes decorated with porous microspheres for highly efficient oil-water separation[J]. J Appl Polym Sci, 2022, 139(26): 52428. DOI: 10. 1002/app. 52428.
- [12] Al-Hatmi MM, Purnama A. On the motion of two microspheres in a stokes flow driven by an external oscillator field[J]. Int J Math Math Sci, 2021, 138: 55-60. DOI: 10. 1155/2021/9211272.

(收稿日期 2023-05-24)

(本文编辑:石俊强)