

响应面分析法优化利培酮微球体外加速释放条件

陈国广, 陈锋, 陆高圣, 李学明, 韦萍 (南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009)

摘要:目的 建立微球体外释放快速分析方法, 考察其与体内相关性。方法 制备生物可降解的利培酮微球, 利用 Box-Behnken 中心组合实验和响应面分析法, 优化利培酮微球体外加速实验条件。结果 体外加速释放最佳条件: 温度 48.4 °C, 磷酸盐缓冲液的 pH 4.62, 有机溶剂浓度为 24%。验证实验表明优选工艺参数较为理想。结论 优选的体外加速释放与长期释放及体内相关性良好。

关键词: 响应面分析法; 利培酮; 微球; 加速释放

中图分类号: R944 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2009)02-0134-06

Studies on the Optimizing Condition of Risperidone Microsphere *in Vitro* Release by RSM

CHEN Guoguang, CHEN Feng, LU Gaosheng, LI Xueming, WEI Ping (College of Life and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the conditions of the microsphere release *in vitro* rapidly. **METHODS** To prepare biodegradable risperidone microsphere, the method of Box-Behnken design and the Response Surface Analysis were used to optimize the experiment conditions of risperidone microsphere accelerating release *in vitro*. **RESULTS** The conditions of accelerating release *in vitro* were optimized: temperature 48 °C, phosphate buffered saline pH 4.62, concentration of solvent is 24%. The experiment indicated that the optimum parameters were satisfactory. **CONCLUSION** The optimized accelerating release *in vitro* and long-term release were well correlated.

KEY WORDS: response surface analysis; risperidone; microspheres; accelerating release

生物可降解聚合物缓释制剂能够缓慢释放药物达数天、数周甚至数月, 这取决于聚合物类型和浓度、药物载量和骨架的多孔性等。在生理条件下体外药物释放的真实时间(long-term)对于评价这些系统很重要。但是由于释药时间过长, 给处方优化筛选带来很大的困难。因此希望能够找到一种合理体外加速释药法(short term or accelerated release approach)来快速分析处方和工艺的变化。

响应面分析法(Response Surface Methodology, RSM)^[1]可以用于确定各因素及其交互作用在加工过程中对非独立变量的影响, 精确地表述因素和响应值之间的关系, 它以最经济的方式, 以较少的实验次数和较短的时间对所选的实验参数进行全面研究, 是一种优化条件的有效方法, 目前已广泛应用于各个领域, 但用于优化缓释药物体外释放条件的研究国内外报道较少。

利培酮(risperidone)是为苯并异噁唑衍生物, 是新一代的抗精神病药物, 对精神分裂症等精神疾病有良好的治疗作用^[2]。本实验参考文献^[3]的方

法考察影响自制利培酮 PLGA 微球的加速因素, 利用响应面分析法优化得到体外释放的最优体外加速释放条件, 并考察其与动物体内相关性等情况。

1 仪器与试剂

数显电动磁力搅拌器 85-2(常州国华电器有限公司); DY15K 型电子天平(METTLER TOLEDO 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司); PLGA(50/50, 黏均分子量 3×10^4 , 韩国); PVA 利培酮(江苏恩华药业集团); 透析袋(截流分子量: 1×10^4); 甲醇为色谱纯; 水为重蒸水; 其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 微球的制备

采用乳化-溶剂挥发法制备。将利培酮及 PLGA 溶于挥发性复合溶剂中形成油相(O), 缓慢滴加至高速搅拌的水相(W), 一定浓度的 PVA 做乳化剂, 乳化均匀后冰浴搅拌 4 h, 过滤得微球, 水洗涤数次后真空干燥 24 h, 备用。

2.2 利培酮测定方法的建立

作者简介: 陈国广, 男, 副教授 Tel: (025) 83285204 E-mail: guoguangcheng@163.com

采用高效液相色谱法测定介质中的利培酮浓度。色谱条件:色谱柱:依利特 C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水-三乙胺((80:20:0.5, 冰醋酸调节 pH=7.2);流速:1.0 mL · min⁻¹;检测波长:278 nm;进样量:20 μL;柱温:40 ℃。

精密称取利培酮 25 mg 置 50 mL 量瓶中,以 0.1 mol · L⁻¹ HCl 溶解并稀释至刻度,摇匀,取 1 mL 于 10 mL 量瓶中,0.1 mol · L⁻¹ HCl 稀释到刻度摇匀,得储备液(50.0 μg · mL⁻¹)。精密量取储备液 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4 mL 置 10 mL 量瓶中,以 0.1 释放介质稀释至刻度,摇匀。0.45 μm 滤膜过滤后 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,计算峰面积,以连续 5 次进样测定的峰面积平均值对利培酮的浓度作线性回归,得标准曲线。

2.3 利培酮微球体外长期释药实验

精密称取 5 mg 自制微球置于事先处理好的透析袋中,加入 pH 7.4 PBS 2 mL,扎紧袋口,放入 18 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS),于磁力搅拌器上释放。搅拌器的温度设置为 37 ℃,转速为 110 r · min⁻¹,在 3,6,12,24 h 分别取出全部释放介质,之后每 24 h 更换一次新介质,取出的介质经 0.45 μm 滤膜过滤,采用 HPLC 测定利培酮的含量。计算累积释放量,绘制体外释放曲线。

2.4 利培酮微球加速实验条件的优化实验

根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,选取温度(A),PBS 的 pH 值(B)和有机溶剂的浓度(C)这三个对利培酮微球体外释药效果影响显著的因素,采用三因素三水平的响应面分析方法,实验因素水平见表 1。

表 1 响应面设计因素与水平

Tab 1 Factors and levels of Response Surface Methodology

水平	A/℃	B	C/%
1	30	4.0	5
2	40	5.0	10
3	50	6.0	20

采用上述中心组合实验设计进行释放实验。分别于 2,4,8,12,18,24,30 h 取出全部释放介质,更换新介质。取出的释放介质经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,HPLC 测定介质中的药物浓度,并计算累积释放量。

参照 USP 27 中描述的 A 级点相关方法,将加速实验与长期直接释药法在相同的释放量所对应

的时间进行配对拟合,考察两者在释放过程中的相关性情况。

2.5 利培酮微球的体内释药实验

取家兔 6 只,♀ ♂ 兼用,平均体重 2.98 kg,按 2.5 mg · mL⁻¹ 的剂量,以 1 mL 自制溶媒(含 0.54% 羧甲基纤维素钠,0.1% 聚山梨酯-80)混悬后肌肉注射给药。注射前耳缘静脉取空白血样,注射后 3,6,12 h 取血 2 mL,1 d 后每隔 1 天取 1 次,3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上层血浆 1 mL 于 -18 ℃ 保存备用。以氯氮平为内标,乙醚提取,HPLC 内标法测定计算血浆中活性成分利培酮含量,并利用 3P87 软件分析药动学参数。

2.6 结果

2.6.1 微球性质 该方法制备的微球形圆整,表面光滑见图 1。粒径分布较窄见图 2,绝大部分在 50 ~ 70 μm 之间,Span = 0.45,载药量为 18%,收率为 70%,包封率为 75%。

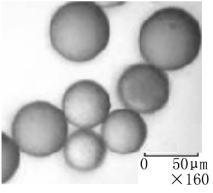


图 1 利培酮微球照片
Fig 1 Photograph of risperidone microsphere

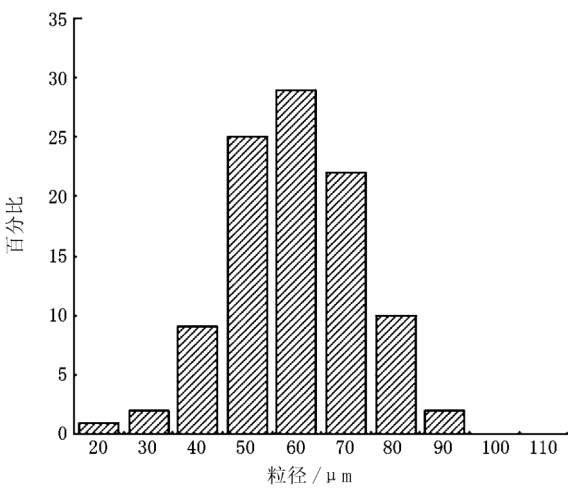


图 2 微球粒径分布图
Fig 2 Size distribution of microspheres

2.6.2 色谱方法学考察 在本实验所选的色谱条件下,对照空白微球和含药微球样品色谱图中,在利培酮出峰位置处无杂峰干扰,分离度符合要求。

按外标法以峰面积计算,将峰面积(A)对浓度(C, μg · mL⁻¹)进行线性回归,得到该条件下的标准曲线方程为: A = 30 229.3 C + 971.773 (r = 0.999 8); 线性范围 0.5 ~ 12 μg · mL⁻¹。低、中、高浓度日内

RSD≤2.35%, 日间 RSD≤2.93%。低、中、高浓度平均回收率为 99.37%, RSD 为 2.35% ($n=5$)。

2.6.3 体外长期释药实验结果 根据微球在介质为 pH 7.4 PBS 长期体外实验的释放结果, 利用扩散-溶蚀模型拟合的累积释放曲线见图 3, 微球略有突释, 在 2 d 到 11 d 之间, 微球持续恒速释放药物。

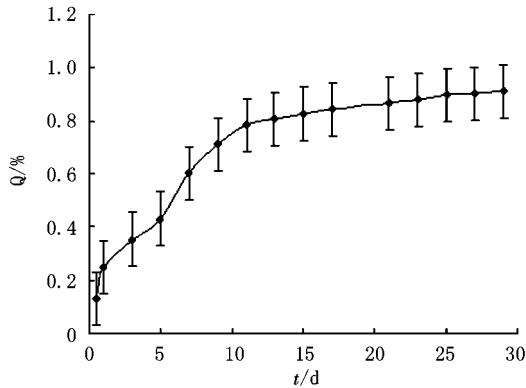


图 3 利培酮微球在 pH 7.4 PBS 中的释放

Fig 3 Release profiles of risperidone microspheres in pH 7.4 PBS

2.6.4 微球加速实验结果及分析 将微球释放量为 0.05, 0.15, 0.48, 0.67, 0.76 所需的长期释药实验和 15 次加速释药实验的时间进行配对, 采用最小二乘法做线性回归, 得 r 值; 以 r 值为响应值, 实验设计与实验结果见表 2, 其中 1~12 是析因实验, 13~15 是中心实验, 用来估计实验误差。

表 2 中心组合实验设计及响应值表

Tab 2 Central composite design and response value

实验号	A/℃	B	C/%	r
1	1	1	2	0.960 5
2	1	3	2	0.959 4
3	1	2	1	0.950 3
4	1	2	3	0.965 5
5	2	1	1	0.965 4
6	2	1	3	0.980 1
7	2	3	1	0.960 5
8	2	3	3	0.975 2
9	3	1	2	0.978 1
10	3	3	2	0.973 1
11	3	2	1	0.969 9
12	3	2	3	0.982 1
13	2	2	2	0.966 4
14	2	2	2	0.966 1
15	2	2	2	0.966 9

注: 每组实验重复两次, 结果取平均值

Note: Each experiment was repeated twice, the result take the average value

2.6.5 统计分析 采用 Statistica 6.0 统计软件中 Statistics/Industrial Statistics&Six Sigma 下的 Experimental Design 模块的 3^{**} (k-p) and Box-Behnken designs 对实验结果进行统计分析。选择温度 pH 值 有机溶剂的浓度作为自变量, 回归得到的 r

值作为因变量进行统计分析并考虑因素的交互作用。因素的正态概率图见图 4。由因素的正态概率图可以看到除了温度, pH 值, 有机溶剂的浓度为主要因素以外 (因为它们明显偏离零点), pH 值的二次作用影响也加以考虑, 对于其他因素二次作用及因素间的交互作用的影响可以不考虑, 因为从图中可以看到所有其他作用的影响都集中在一起并随机分布在零的两边, 数据点几乎成一直线。

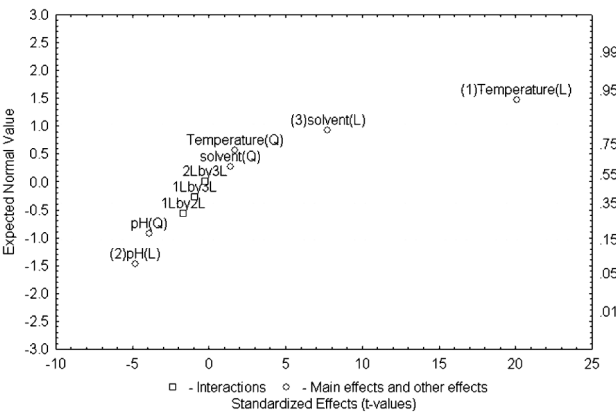


图 4 因素的正态概率图

Fig 4 Normal probability plot of factors

因素的 Pareto 图见图 5。从图中同样可以清楚地看到温度、溶剂的浓度、pH 值及其二次作用为主要影响因素, 因为温度、溶剂的浓度、pH 值的线形关系及 pH 值的平方关系的 P 参数检验参数的大小小于 0.05。

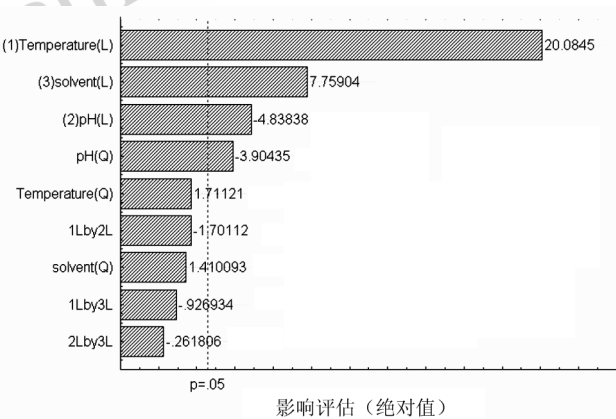


图 5 因素的 pareto 图

Fig 5 Pareto chart of factors

2.6.6 回归方程的建立与显著性分析 借助软件 Statistic 6.0 分析得到拟合全变量二次回归方程, 各变量的偏回归系数估计值及方差分析结果见表 3。得到拟合方程为:

$$Y = 0.925\ 522 + 0.002\ 43X_1 - 0.020\ 185X_2 + 0.182\ 002X_3 - 0.000\ 01X_1^2 + 0.002\ 329X_2^2 - 0.172\ 5X_3^2 - 0.000\ 097\ X_1X_2 - 0.000\ 689X_1X_3 - 0.001\ 947X_2X_3$$

表 3 回归方程偏回归系数的估计值及方差分析表

Tab 3 Estimate value of regression equation partial regression coefficient and analysis of variance

因素	Regressn	t(5)	p	SS	MS	F
(1) 温度(L)	0.002 430	3.635 46	0.0149 75	0.000 530	0.000 530	403.387 3
温度(Q)	-0.000 010	-1.711 21	0.147 727	0.000 004	0.000 004	2.928 3
(2) pH (L)	-0.020 185	-3.020 28	0.029 407	0.000 031	0.000 031	23.409 9
pH (Q)	0.002 329	3.904 35	0.0113 59	0.000 020	0.000 020	15.244 0
(3) 浓度(L)	0.182 002	2.950 96	0.031 850	0.000 079	0.000 079	60.202 7
温度(Q)	-0.172 500	-1.410 09	0.217 580	0.000 003	0.000 003	1.988 4
1L by 2L	-0.000 097	-1.701 12	0.149 661	0.000 004	0.000 004	2.893 8
1L by 3L	-0.000 689	-0.926 93	0.396 501	0.000 001	0.000 001	0.859 2
2L by 3L	-0.001 947	-0.261 81	0.803 914	0.000 000	0.000 000	0.068 5
Mean/Inter.	0.925 522	34.560 84	0.000 922			
R - sqr				0.993 74		
Adj(R - sqr)				0.982 46		

回归各项的方程分析结果同样表明,温度,pH 值,有机溶剂浓度以及 pH 值的二次作用的影响都是显著的,而各因素的交互作用的影响则不显著,决定系数 R-sqr 为 0.993 74,修正系数 Adj(R-sqr)为 0.982 46,说明这三个因素及二次项能解释 Y 变化的 99.374%,模型拟合程度很好,因此可以用二次回归方程代替真实实验点对体外加速释放进行分析 and 预测。

2.6.7 响应面分析及最优水平确定 响应面图形是响应值对各实验因子所构成的三维空间的曲面图,从响应面分析图上形象的看出最佳参数及各参数之间的相互作用。根据回归方程作出不同因子的响应分析图,借助软件 Statistic 绘出的响应面分析立体图见图 6,7,8。

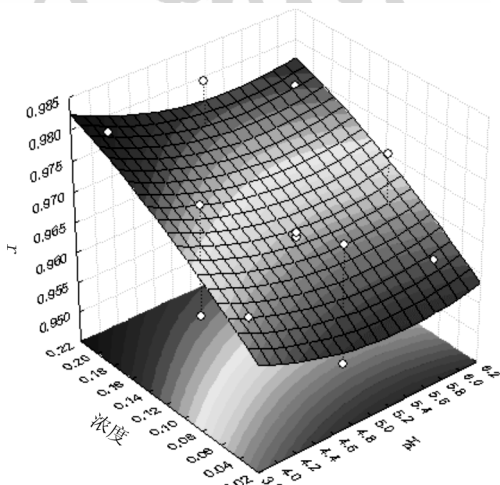


图 7 有机溶剂浓度及 pH 值交互作用对 r 的影响

Fig 7 Effect of interaction of the solvent and pH on r

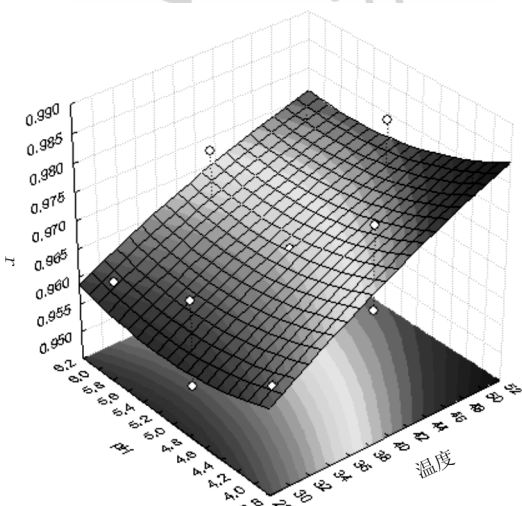


图 6 温度及 pH 值交互作用对 r 的影响

Fig 6 Effect of interaction of the temperature and pH on r

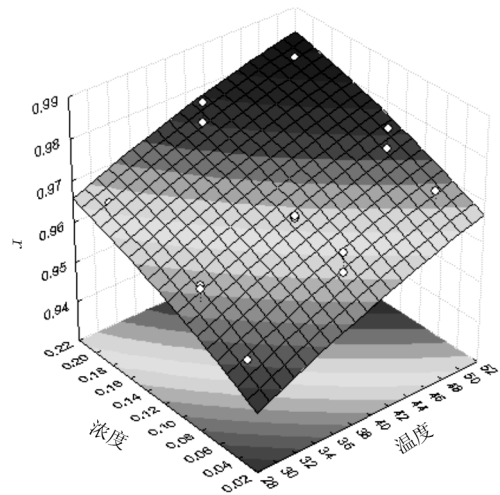


图 8 有机溶剂浓度及温度交互作用对 r 的影响

Fig 8 Effect of interaction of the solvent and temperature on r

由这三个响应曲面图可以看出,温度都是在 45 到 50 之间获得最大的响应值,通过快速“登高法”对 3 个显著因素进行寻优,并对回归方程求一阶偏导,得到优化结果如表 4。

表 4 3 个显著因素的寻优结果

Tab 4 Best result of three significant factors

因素	实测最小值	理论预测值	实测最大值
温度	30	48.4	50
pH	4	4.62	6
浓度	0.05	0.24	0.2

2.6.8 验证性实验 在最优水平下模型的预测值为 0.989 6,为验证模型预测的准确性,用最佳体外释放条件(有机溶剂浓度为 24% 的 pH 4.62 PBS 为释放介质,磁力搅拌器的温度设置为 48.4 ℃)进行体外加速释放实验。

精密称取利培酮微球 5 mg,采用优化的加速实验条件,转速为 110 r · min⁻¹,进行加速实验。分别于 2,4,8,12,18,24,30 h 取出全部释放介质,更换新介质。取出的释放介质经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,HPLC 测定介质中的药物浓度,并计算累计释放量。

采用扩散-溶蚀模型^[4] $Q = k_1 t^{1/2} + k_2 t + k_3 t^2 + k_4 t^3$ 对结果进行拟合($r = 0.998\ 7$),见图 9;并将加速释药与体外长期释药得到的释药曲线进行点点相关性拟合,其回归方程为: $Y = 0.769\ 1\ X + 0.585\ 4$ ($r = 0.989\ 4$),相关性良好,见图 10。

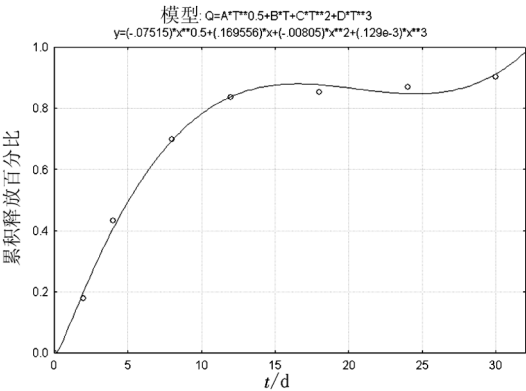


图 9 双指数扩散模型拟合优化后体外加速释放结果

Fig 9 Profile calculated using Diffusion-erosion Model

2.6.9 微球的体内释放 利培酮微球在家兔体内的血药浓度经时变化曲线如图 11,在注射的初期略有突释,突释量不大;在第 5 天到第 20 天内,血药浓度维持在 16 ng · mL⁻¹ 左右,波动范围小,具有缓释的效果。体内药动学计算结果为: $AUC = 379.836\ 8$ (ng · d · mL⁻¹), $AUMC = 4\ 881.956$ (ng · d · mL⁻²), $MRT = 12.85$ (d)。

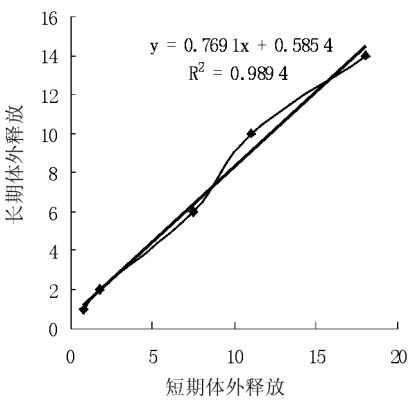


图 10 优化后体外加速释药与真实释药的相关性

Fig 10 Correlation between short-term and long-term release

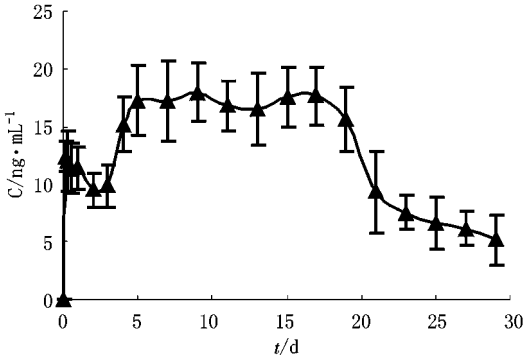


图 11 注射利培酮微球后利培酮血药浓度-时间曲线 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Fig 11 Mean active risperidone plasma concentration-time profile after administration of risperidone MS ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

2.6.10 体内外相关性

以利培酮微球在优化得到的最佳体外加速释放条件下的累积释放量和体内相应的时间点的 AUC 值进行配对如表 5,线性回归得图 12。回归方程为 $AUC = 2.800\ 2\ Q + 20.785$ ($r = 0.993\ 8$)。

表 5 体外加速释放与体内释放配对

Tab 5 Relationship between Q and AUC

体外释放(加速释放)		体内释放	
T/d	Q	T/d	AUC
0	0	0	0
0.5	0.060 6	1	46.908 8
1	0.147 6	3	66.271 1
3	0.303 8	7	115.857 7
5	0.430 6	11	150.588 0
7	0.602 8	15	184.699 0
9	0.710 8	19	217.967
11	0.785 4	23	234.800
13	0.806 6	27	247.560

3 讨论

通过响应面实验及回归分析,可以看出温度,

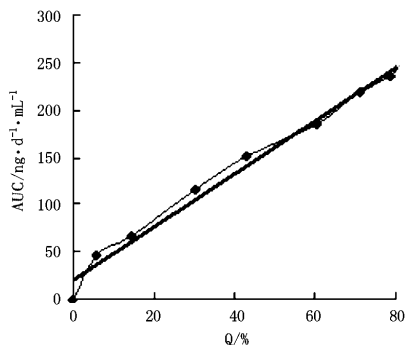


图 12 利培酮微球体外加速释放与体内释放的相关性

Fig 12 Correlation between accelerating release and *in vivo* release

pH 值和有机溶剂浓度的影响都是显著的,但是各个因素之间的交互影响不显著;利培酮微球的体外加速释放条件的优化,结果证明了 Box-Behnken 中心组合实验和响应面分析法相结合的实验统计方法能快速、有效地实现条件优化,其优化后的条件效果较好,且与体外长期释放及体内释药有良好的相关性,对于微球处方及制备条件的筛选具有指导意义。

由于影响微球释药的多因素性以及微球的多项

性,微球中药物的释放特征很难在加速释药中得到细致的表现。在处方工艺的探索过程中能否用加速释药法筛选处方是研究者所关心的问题,在其应用时需要考虑加速释药与真实释药之间的相关性以及这种相关性的释药范围;国外有报道认为可以将加速释药法作为一项质量标准用于控制微球产品质量。但目前国内外有关这方面的研究还寥寥无几,仍然需要进行大量的工作以便进行全面合理的评价和应用。

REFERENCES

- [1] LI Q H, FU C L. Application of response surface methodology for extraction optimization of gemint pumpkin seeds protein[J]. Food Chem, 2005(92):701-706.
- [2] FDA approves long-acting newer-generation antipsychotic [J]. Biotech Week-November, 2003, 19(2):273-284.
- [3] SHAMEEN M, LEE H, DELUCA P P. A short term (accelerated release) approach to evaluate peptide release from PLGA depot-formulations[J]. AAPS Pharm Sci, 1999, 1(3):146-163.
- [4] YOSHIKI M, HIRAKU O, AKINOBU K. Pharmacokinetics of prolonged-release CPT-11-loaded microspheres in rats [J]. J Controlled Release, 2000, 66(2): 159-175.

收稿日期:2007-06-29