

到几十微米范围内调节微粒大小并且保持微粒分布的高均一性,重复性良好。另外,本方法设备简单,自动化控制程度高,有利于微球粒径分布、无菌控制等关键工艺控制,是一种很有工业应用前景的技术。

REFERENCES

- [1] HOLFER P, JEAN C B, HELMUT S, et al. Pharmacokinetic and technical comparison of Sandostatin® LAR® and other formulations of long-acting octreotide [J]. BMC Research Notes, 2011, 4: 344
- [2] YUN S R, MIN J S, BYUNG H W, et al. Sustained-release

delivery of octreotide from biodegradable polymeric microspheres [J]. AAPS PharmSciTech, 2011, 12(4): 1293-1301.

- [3] GUO H L, YAN Z F, DING H, et al. Preparation of the enteric microspheres of indapamide and investigation of the influencing factors [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(11): 993-997.
- [4] TSENG F G, HUANG H M, CHEN Y F, et al. Simultaneous immobilization protein microarrays by a micro stamper with back-filling reservoir [J]. Sens Actuators B: Chem, 2004, 99(1): 174-185.
- [5] WALLE CF, SHARMA G, RAVI K M. Current approaches to stabilising and analysing proteins during micro-encapsulation in PLGA [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2009, 6(2): 177-186.

收稿日期: 2012-12-18

星点设计-效应面优化单凝聚法制备氟苯尼考微球

林卫瑞, 王洪光, 吕海婴(青岛科技大学药学院, 山东 青岛 266042)

摘要:目的 优化单凝聚法制备氟苯尼考缓释微球工艺。方法 以单凝聚法制备微球,以粒径、包封率的总评“归一值”为评价指标,采用星点设计考察芯材比、成囊 pH、搅拌速度 3 因素对微球制备的影响,对结果进行二项式拟合,效应面法选取最佳工艺条件,优化工艺后制得的微球在人工体液中体外释放。结果 最佳工艺条件为药/囊材 0.375、成囊 pH 4.8、搅拌速度 615 r·min⁻¹;制得的微球圆整均一,粒径 40~50 μm,包封率 57.45%,载药量 17.52%,制得的微球在 Hank's 人工模拟体液中有良好的缓释特征。结论 优化制备工艺条件下制得的微球外形良好,载药量较大,缓释效果好。
关键词:星点设计-效应面优化法;单凝聚法;微球;氟苯尼考

中图分类号: R943

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)09-0992-05

Optimization of the Preparation Technology of Florfenicol Microsphere by Simple Coacervation Based on Central Composite Design and Response Surface Methodology

LIN Weirui, WANG Hongguang, LÜ Haiying(Department of Pharmacy, Qingdao University of Science & Technology, Qingdao 266042, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the preparation technology of florfenicol sustained release microspheres by simple coacervation method. **METHODS** Microspheres were prepared by simple coacervation method. The effects of influences factors such as the ratio of core to material, encysted pH and stirring speed, on overall desirability (OD) of diameter and entrapment efficiency were investigated by central composite design and response surface method. The data were imitated using second-order polynomial. Microspheres prepared by optimal condition were releasing *in vitro* in artificial body fluid. **RESULTS** The optimal conditions were as follow: the ratio of core to material as 0.375, encysted pH as 4.8, and stirring speed as 615 r·min⁻¹. The microspheres prepared by optimal condition were round and uniform with particle size of 40~50 μm. The entrapment efficiency was 57.45% and the drug loading reached 17.52%. The microspheres had good slow-release characteristics in Hank's artificial body fluid. **CONCLUSION** Microspheres prepared by optimal method load more drug with good shape, and the slow-release characteristics are good.

KEY WORDS: central composite design and response surface methodology; simple coacervation; microspheres; florfenicol

氟苯尼考又称氟甲砒霉素,是一种专门用于动物的新型抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及甲砒霉素耐药性细菌的广谱抗菌药物^[1]。目前我国市

场上所用的氟苯尼考剂型有混悬剂、可溶性粉、注射剂等,均为常规剂型,其半衰期较短,需要多次给药,操作繁多,动物的应激性较大。研制

其长效缓释制剂可以有效的解决上述问题,减少用药次数、提高疗效^[2]。

星点设计和效应面优化法是近几年来药学者常用的实验设计和优化法^[3-5]。该法采用非线性数学模型拟合,复相关系数较高,在中心点进行重复性试验以提高实验精度,预测值更接近真实值。

1 仪器与试剂

IT-09A5 恒温磁力搅拌器(上海一恒);TG328A 型分析天平(上海精科天平厂);XSP-2CA 型显微镜(上海谦科仪器设备有限公司);UV1000 型紫外分光光度计(北京莱伯泰科有限公司);RM-22 纯水仪(北京艾科浦);恒温水平振荡仪(金坛市春兰实验仪器厂 SHZ-C)。

氟苯尼考(湖北中牧安达药业有限公司,批号:110004,含量为 98%);明胶(国药集团化学试剂有限公司);脂肪醇聚氧乙烯醚(AEO9,莱阳市双双化工有限公司);谷氨酰胺转氨酶 TG-B(一鸣生物制品有限公司)。

2 方法与结果

2.1 制备方法

将处方量的明胶溶于纯化水中,制备成溶液;氟苯尼考过 200 目筛混悬于明胶溶液中并加入处方量的润湿剂 AEO9;加热并搅拌,温度保持在 45~50 ℃;滴加 10%醋酸调体系 pH;缓慢滴加 25% Na₂SO₄ 50 mL 搅拌,形成微球;缓慢加入 13% Na₂SO₄ 200 mL,冰浴;加入处方量谷氨酰胺转氨酶,使微球固化,继续搅拌 30 min;缓慢滴加 2% NaOH 调节体系的 pH 至 6.0,继续搅拌 1 h;停止搅拌后静置 24 h,制得氟苯尼考微球。

2.2 评价指标的制定

2.2.1 检测波长的选择 取适量氟苯尼考甲醇溶液及空白辅料的甲醇溶液进行紫外波长扫描,氟苯尼考在 266 nm 处有最大吸收且其他辅料在此处无干扰。

2.2.2 标准曲线的制备 精密称取氟苯尼考(过 200 目筛)0.200 3 g,于 100 mL 量瓶中,加甲醇充分溶解,溶解后继续加甲醇至刻度。精密移取 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mL 于 10 mL 量瓶中,加入 1 mL 水后加甲醇至刻度;于 266 nm 处测定吸光度,以吸光度 *A* 对浓度进行回归,求得回归方程为 $A=0.002\ 1C+0.017\ 9(r=0.999\ 5)$ 。结果表明氟苯尼考在 50~400 μg·mL⁻¹ 内与吸光度线性关系良好。

2.2.3 氟苯尼考微球形粒径测定 按中国药典 2010 年版二部附录 XIX E,显微镜下目测微囊 500 个,得平均粒径^[6]。

2.2.4 回收率试验 精密称取 0.300 0 mg 氟苯尼考,用甲醇溶解,与空白微球制备低、中、高 3 种不同浓度的样品溶液,测定吸光度,并由标准曲线计算质量。低、中、高浓度的回收率分别为 99.7%, 100.5%, 101.3%。

2.2.5 精密度试验 分别配制 100, 200, 300 μg·mL⁻¹ 低、中、高 3 个浓度的溶液,测定日内及 5 d 的日间精密度。低、中、高 3 个浓度的日内 RSD 为 0.38%, 0.57%, 0.23%。日间 RSD 为 0.57%, 0.96%, 0.75%。

2.2.6 氟苯尼考微球包封率测定 微球固化后,体系搅拌均匀,用移液管精密移取 1 mL 混悬液至 10 mL 量瓶中,加分析纯甲醇至刻度;超声振荡后,用有机微孔滤膜过滤,测滤液在 266 nm 处吸光度值,代入回归方程并计算可得出游离药量。包封率的计算公式为:包封率=微球球内药量/微球质量×100%。

2.2.7 氟苯尼考微球载药量测定 按以下公式计算载药量:载药量=投药量×包封率/(投药量×包封率+囊材量)。

2.3 星点设计-效应面优化

2.3.1 因素、水平及指标的确定 芯为原料药(氟苯尼考);材为囊材明胶。星点设计因素水平表见表 1。

表 1 星点设计因素水平

Tab 1 Factor and levels for central composition design test

因素	芯材比	pH	转速/r·min ⁻¹
-1.732	1 : 4	4.5	500
-1	3 : 10	4.7	542
0	3 : 8	5.0	600
1	9 : 20	5.3	658
1.732	1 : 2	5.5	700

2.3.2 实验安排与指标测定 按“2.1”项下方法制备微球;按“2.2.3”项下方法测得粒径;按“2.2.4”项下方法测定包封率。

当指标较多时,根据每个指标优选的条件可能相互矛盾,对某一效应有利的条件可能对其他效应不利,各效应间需达成妥协,使所有指标综合为一个值,该值可反映总体效应结果。各指标“归一值”求算几何平均数的总评“归一值”OD。

$OD=(d_1d_2\cdots d_n)^{1/n}$, n 为指标数。对取值越小越好的因素和取值越大越好的因素采用 Hassan^[7]方法分别进行数学转换求“归一值” $d_{\min}(d_2)$ 和 $d_{\max}(d_1)$ 。 d_1 和 d_2 的计算公式见表 2。

表 2 指标最大值与最小值

Tab 2 Index of the maximum value and the minimum value

指标	$Y_{\min}$	$Y_{\max}$	OD
包封率/%	30	60	$d_1 = \frac{Y_i - Y_{\min}}{Y_{\max} - Y_{\min}}$
粒径/ μm	25	75	$d_2 = \frac{Y_{\max} - Y_i}{Y_{\max} - Y_{\min}}$

2.3.3 数据处理 以平均粒径、包封率、 OD 值为指标(因变量), 分别对各因素(自变量)用 Statistica 6.0 统计软件进行二项式拟合, 结果如下:

$Y1=-9.417\ 9+5.070\ 1X1+2.864\ 2X2+0.005\ 5X3-12.269\ 3X1*X1-0.380\ 4X2*X2+1.105\ 6X1*X2+0.001\ 0X2*X3-0.001\ 7X1*X3(r=0.934\ 5)$

$Y2=-9.417\ 9+5.070\ 1X1+2.864\ 2X2+0.005\ 5X3-12.269\ 3X1*X1-0.380\ 4X2*X2+1.105\ 6X1*X2+0.001\ 0X2*X3-0.001\ 7X1*X3(r=0.934\ 5)$

$OD=-12.864\ 8+11.098\ 7X1+4.109\ 7X2+0.004\ 8X3-33.348\ 8X1*X1-0.587X2*X2+1.567\ 0X1*X2+0.001\ 8X2*X3+0.009\ 9X1*X3(r=0.945\ 8)$

表 3 星点设计表及结果

Tab 3 Results of experiment designed by CCD

NO.	芯材比 (X1)	成囊 pH (X2)	搅拌速度 (X3)	包封率 (Y1)/%	粒径(Y2)/ μm	OD
1	1	-1	-1	0.420 9	40 $\pm$ 10	0.531 131
2	-1	-1	-1	0.415 8	60 $\pm$ 10	0.340 294
3	1	1	-1	0.394 5	50	0.396 863
3	-1	1	-1	0.478 2	70	0.243 721
5	1	-1	1	0.390 1	30 $\pm$ 5	0.519 904
6	-1	-1	1	0.346 5	30 $\pm$ 5	0.373 497
7	1	1	1	0.422 6	55 $\pm$ 5	0.404 310
8	-1	1	1	0.489 2	55 $\pm$ 10	0.502 262
9	-A	0	0	0.324 2	65 $\pm$ 15	0.127 017
10	A	0	0	0.495 8	65 $\pm$ 15	0.361 294
11	0	-A	0	0.488 6	30	0.752 197
12	0	A	0	0.543 4	55	0.569 678
13	0	0	-A	0.523 7	50	0.610 601
14	0	0	A	0.527 7	40	0.728 903
15	0	0	0	0.574 3	45 $\pm$ 5	0.740 675
16	0	0	0	0.573 5	45 $\pm$ 5	0.739 594
17	0	0	0	0.574 5	45 $\pm$ 5	0.740 945
18	0	0	0	0.572 8	45 $\pm$ 5	0.738 647
19	0	0	0	0.574 2	45 $\pm$ 5	0.740 540
20	0	0	0	0.573 5	45 $\pm$ 5	0.739 594

2.3.4 效应面法优化 根据方程描绘 OD 值随因素变化的三维效应面和二维等高图, 选取较佳的条件。

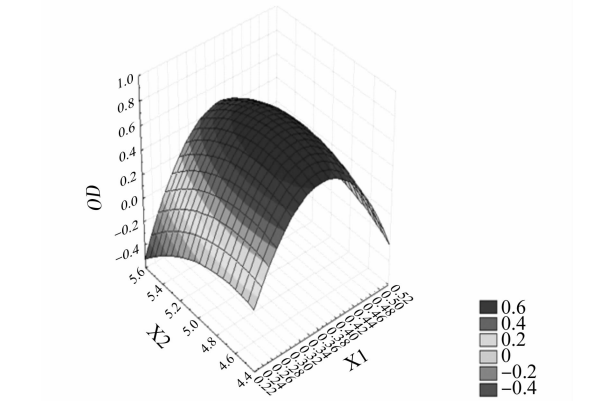


图 1 综合评分值(OD)对芯材比($X1$)和成囊 pH($X2$)的三维效应面

Fig 1 Three-dimensional response surface of OD with two factors of the ratio of core to material($X1$) and pH($X2$)

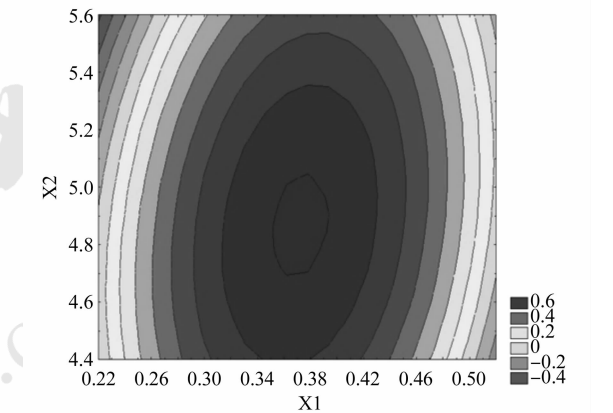


图 2 综合评分值(OD)对芯材比($X1$)和成囊 pH($X2$)的二维等高图

Fig 2 Contour plot of OD with two factors of the ratio of core to material ($X1$) and pH($X2$)

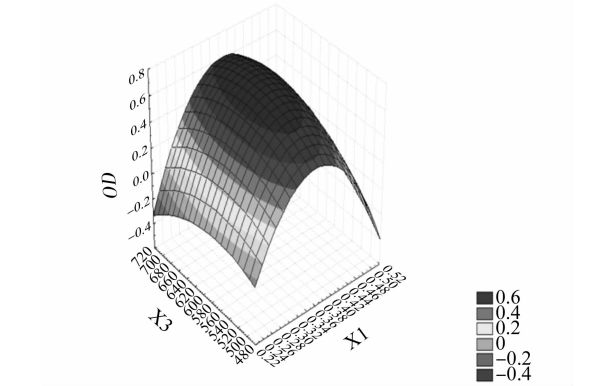


图 3 综合评分值(OD)对芯材比($X1$)和搅拌速度($X3$)的三维效应面

Fig 3 Three-dimensional response surface of OD with two factors of the ratio of core to material ($X1$) and stirring speed($X2$)

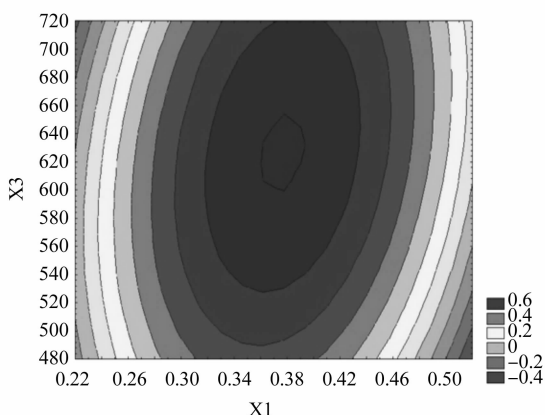


图 4 综合评分值(OD)对芯材比(X1)和搅拌速度(X3)的二维等高线图

Fig 4 Contour plot of OD with two factors of the ratio of core to material(X1) and stirring speed(X3)

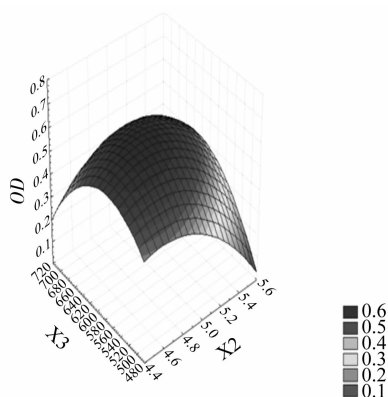


图 5 综合效应值(OD)对成囊 pH(X2)和搅拌速度(X3)的三维效应面

Fig 5 Three-dimensional response surface of OD with two factors of pH(X2) and stirring speed(X3)

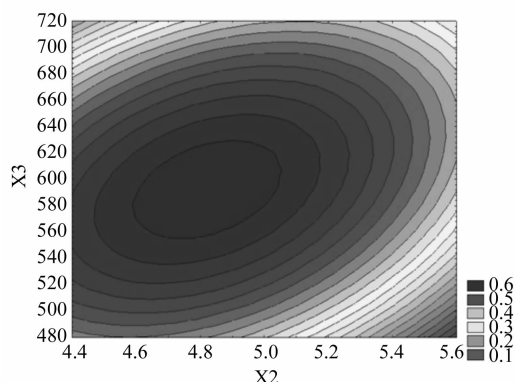


图 6 综合效应值(OD)对成囊 pH(X2)和搅拌速度(X3)的二维等高线图

Fig 6 Contour plot of OD with two factors of concentration of pH(X2) and stirring speed(X3)

由图可知氟苯尼考单凝聚最佳条件: 药/囊材 0.37, 成囊 pH 4.8, 搅拌速度 $615 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.3.5 最优条件验证 按最佳条件进行氟苯尼考单凝聚微球的制备, 得到圆整均一, $40 \sim 50 \mu\text{m}$ 载药明显的微球, 结果见图 7。包封率为 57.45%, 载药量为 17.52%。

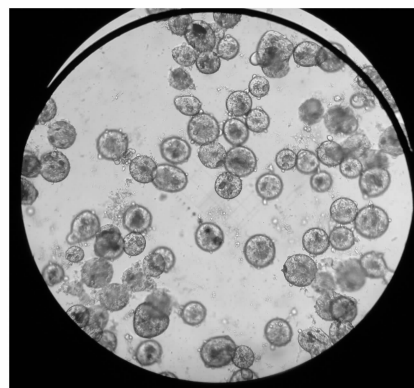


图 7 优化后制得的微球显微镜照(400X)

Fig 7 Micrograph of optimized microspheres(400X)

2.4 体外释放度测定

2.4.1 释放介质的选择^[8] 氟苯尼考缓释微球的制备, 是为能够进一步制备兽用肌肉注射剂。因此使药物在体外释放条件尽可能模拟体内常用透析法, 测定介质的体积通常小于常规溶出度测定法, 但是必须满足漏槽条件。实验溶液选 Hank's 人工模拟体液, 其组成为: NaCl 8.0 g+KCl 0.4 g+CaCl₂ 0.14 g+NaHCO₃ 0.35 g+C₆H₁₂O₆(葡萄糖) 1.0 g+MgCl₂·6H₂O 0.1 g+MgSO₄·7H₂O 0.06 g+KH₂PO₄ 0.06 g+Na₂HPO₄·12H₂O 0.06 g+1 L H₂O。用 HCl 和 NaOH 溶液调节 pH=7.5, 温度控制在 $(37.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 。另加入 1% N,N-二甲基甲酰胺。

2.4.2 线性实验 精密称取氟苯尼考 0.2 g, 置于 100 mL 量瓶中, 先滴加 1 mL N, N-二甲基甲酰胺溶解, 然后加人工体液至刻度, 得氟苯尼考标准储备液。分别精密移取 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 mL 储备液至 10 mL 量瓶中, 加人工体液至刻度。以空白人工体液做参比液, 用紫外分光光度法于 266 nm 测定吸光度 A 值。以浓度 C 对 A 进行线性回归, 回归方程为 $Y=0.0024X+0.0414$, $r=0.9993$ 。

2.4.3 氟苯尼考原料药体外释放 将 0.035 0 g 氟苯尼考原料药混悬于 10 mL 纯化水中, 置于透析袋中, 将透析袋置于 100 mL 具塞锥形烧瓶中, 释放介质为 90 mL 含 1%N, N-二甲基甲酰胺的人工体液的。在 37°C , $72 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温水浴中振荡。每隔 30 min 取样 1 mL, 取样后补充 1 mL 人工体液。取得的样品用微量比色皿在 266 nm 处测紫外

吸收, 在 2.5 h 时, 原料药的释放达到 90%以上。

2.4.4 氟苯尼考微球体外释放度测定 采用透析法进行微球体外释药试验。精密称取一定量的氟苯尼考微球(最优条件验证试验中制得), 装入透析袋中, 加入一定量人工体液使微球混悬后将袋口扎紧, 置于盛有 100 mL 人工体液的溶出瓶中, 于 $(37.0 \pm 1.0)^{\circ}\text{C}$ 恒温, $72 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的频率下持续振动, 定时取释放液 1 mL, 立即补加等量的人工体液。将取出的释放液经过 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜, 用人工体液稀释至刻度, 于 266 nm 处测定吸收度, 代入标准曲线方程计算释药量, 计算微球中药物的累积释放百分率 $Q(\%)$ 。释放曲线见图 8。

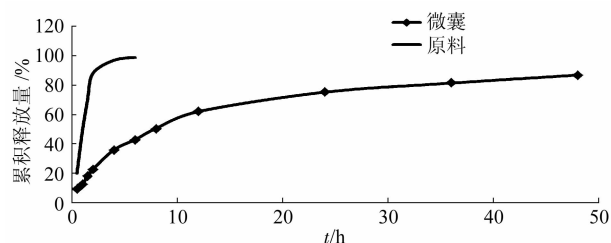


图 8 氟苯尼考微球人工体液中释放曲线

Fig 8 Release curve of florfenicol microspheres in artificial body fluid

3 讨论

氟苯尼考在多种溶剂中的溶解度都较差, 在 N, N-二甲基甲酰胺中易溶。在体外释放实验中, 储备液中加入 1% 的 N, N-二甲基甲酰胺一方面有利于氟苯尼考原料药的溶解(氟苯尼考溶解性极差而密度又很小), 另一方面可以排除药物本身就释放缓慢的性质(原料药易溶于释放介质), 可以确定是制成微球使得氟苯尼考缓慢释放。

由于氟苯尼考水溶性极差, 因此在微球制备过程中需加入一定量的润湿剂, 利于囊材包覆难

溶性药物。单凝聚法采用生物相容的明胶作为囊材, 在加入润湿剂后, 氟苯尼考粉末在囊材中分散效果较好, 利于在成囊过程中对药物的包裹。优化后的工艺制得的微球载药量可达 17.52%, 且缓释效果较好, 可减少给药次数, 从而减少应激性。

本实验优化了氟苯尼考微球的制备工艺, 可制得粒径较小、载药量较大、有缓释性质的微球。为进一步研制高质量的兽用肌肉注射剂提供了可能。

REFERENCES

- [1] CHEN X H, LIU M C, JIAO Y. Advance in the research and application of florfenicol [J]. China Poultry(中国家禽), 2006, 28(14): 50-54.
- [2] YUAN L G, LI C M, et al. Research advance in sustained-and-controlled release preparations of veterinary drugs [J]. Veterinary Science in China(中国兽医科学), 2007, 37(8): 731-735.
- [3] XIAO H L, HE C Q, CHEN J, et al. Study on the optimal formulation and preparation conditions of propranolol-loaded transfersomes by central composite design and response surface method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(12): 1107-1112.
- [4] DU C Y, WANG H G. Optimization preparation of propranolol hydrochloride microcapsules with fluidized bed by central composite design and response surface method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(12): 1112-1116.
- [5] GUO J H, DU G. Optimization preparation of Zu'ning granules by central composite design and response surface method [J]. Her Med(医药导报), 2012, 31(2): 216-219.
- [6] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 版. 二部) [S]. 2010: 204.
- [7] HASSAN E E, PARISH R C, GALLO J M. Optimized formulation of magnetic chitosan microspheres containing the anticancer agent, oxantrazole [J]. Pharm Res, 1992, 9(3): 390-397.
- [8] MOU Z Q, LIANG C H. Effect of different artificial body fluids and their pH on corrosion of biomedical metallic materials [J]. J Chin Society for Corrosion and Protection(中国腐蚀与防护学报), 1998, 18(2): 126-130.

收稿日期: 2012-09-11

星点设计-效应面法优选鬼针草总黄酮滴丸成型工艺

洪清¹, 何丹鸿¹, 袁曦^{1*}, 陆旭亮², 陈宜娜³ (1.福建医科大学附属第一医院, 福州 350005; 2.福建医科大学, 福州 350004; 3.河南中医学院, 郑州 450001)

摘要: 目的 探讨鬼针草总黄酮滴丸的最佳成型工艺。方法 以药物与基质比、滴距、Tween-80 质量分数为考察因素, 丸重差异、圆整度、溶散时限及总评归一值为考察指标, 运用星点设计—效应面法优选鬼针草总黄酮滴丸的成型工艺, 结果经多元线性回归和二项式拟合, 建立指标与因素之间的数学模型, 经效应面法预测最佳成型工艺条件, 并进行模型

作者简介: 洪清, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (0591)87982115
(0591)87982078 E-mail: xiuyan767@sina.com

E-mail: h7g12002@163.com *通信作者: 袁曦, 男, 主任药师 Tel: