

REFERENCES

- [1] XIAO B, MERLIN D. Oral colon-specific therapeutic approaches toward treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(11): 1393-1407.
- [2] KRISHNAIAH Y S, KHAN M A. Strategies of targeting oral drug delivery systems to the colon and their potential use for the treatment of colorectal cancer [J]. *Pharm Dev Technol*, 2012, 17(5): 521-540.
- [3] ZIMOVÁ L, VETCHÝ D, MUŠELÍK J, et al. The development and *in vivo* evaluation of a colon drug delivery system using human volunteers [J]. *Drug Deliv*, 2012, 19(2): 81-89.
- [4] WU F, ZHANG Z R, HE W L, et al. Preparation and *in vitro* release of tetramethylpyrazine phosphate pulsincap capsule controlled by an erodible plug [J]. *Acta Pharm Sin(药学报)*, 2002, 37(9): 733-738.
- [5] WANG Y J, ZHANG G Y, XIAO Z Q, et al. Preliminary proteomic analysis of indomethacin's effect on tumor transplanted with colorectal cancer cell in nude mice [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39(2): 171-177.
- [6] LEE Y, KIM H, KIM W, et al. Colon-specific delivery of celecoxib is a potential strategy to improve toxicological and pharmacological properties of the selective COX-2 inhibitor: implication in treatment of familial adenomatous polyposis [J]. *J Drug Target*, 2012, 20(6): 524-534.
- [7] ZHANG F Z, FU H X, CHEN M T, et al. Preparation of insoluble porosity membrane sustained-release capsules containing verapamil hydrochloride and investigation on their *in vitro* drug release [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2011, 28(6): 537-541.
- [8] FU H X, LI H, ZHANG F Z, et al. Experiment on formulation and drug release behavior of porosity asymmetric membrane capsules *in vitro* [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2012, 38(6): 670-678.
- [9] FU H X, CAO G Z, HU M C, et al. An osmotic pump controlled-release capsule shell and its preparation: China, 101301281 [P]. 2008-11-12.
- [10] ZHANG F, FU H, CHEN M, et al. RP-HPLC determination of indomethacin in simulated colon juice [J]. *J China Pharm(中国药房)*, 2011, 22(20): 1901-1903.
- [11] RUBINSTEIN A, RADAI R, EZRA M, et al. *In vitro* evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier [J]. *Pharm Res*, 1993, 10(2): 258-263.
- [12] CAO J, LU J. Study on indomethacin compression-coated tablet for colon-specific drug deliver [J]. *Chin Pharm J(中国药杂志)*, 2005, 40(5): 367-370.

收稿日期: 2012-12-16

基于微量喷射技术的奥曲肽长效生物可降解微球制备工艺研究

包璇, 刘哲鹏*, 董堃华(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要: 目的 将溶剂挥发法中的复乳法与微量喷射技术相结合, 对奥曲肽长效生物可降解微球制备中微量喷射技术的应用进行了探索。方法 利用单因素法研究了驱动电压、喷射频率和搅拌器转速等因素对微球平均粒径和粒径分布的影响。结果 在实验中药物处方条件一定的情况下, 驱动电压与粒径大小成正比, 喷射频率和搅拌器转速与粒径大小反比。当驱动电压为 60~100 V, 喷射频率为 3 000~7 000 Hz, 搅拌器转速为 150~450 r·min⁻¹ 时, 粒径分布处于较为理想状态。结论 使用微量喷射技术制得微球外观圆整, 形态良好, 较传统复乳法制得的微球, 其均一性及外观形态得到显著改善, 提高了包封率(>30%)。

关键词: 微球; 奥曲肽; 复乳法; 微量喷射技术

中图分类号: TQ464.7; TQ469

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)09-0988-05

Study on Preparation and Quality of Sustained Release Biodegradable Octreotide Microsphere Based on Micro-injection

BAO Xuan, LIU Zhepeng*, DONG Kunhua(School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To combine the method of W/O/W with micro-injection and study the application of micro-injection on preparing sustained release biodegradable octreotide microspheres. **METHODS** It was studied by using a single factor analysis method on spray frequency, agitation speed and driving voltage as the factors. **RESULTS** In the constant prescription conditions, the driving voltage was proportional to the particle size, the spray frequency and mixer speed were inverse ratio to the particle size. When the driving voltage was 60–100 V, spray frequency was 3 000–7 000 Hz and agitation

作者简介: 包璇, 女, 硕士生 Tel: (021)55271286
(021)55271286 E-mail: zhepengliu@yahoo.com.cn

E-mail: baoxuanshlgl@163.com

*通信作者: 刘哲鹏, 男, 高级工程师, 硕士 Tel:

speed was $150\text{--}450\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, the particle size distribution was in more ideal state. **CONCLUSION** The microsphere prepared by micro-injection are in rounded appearance and well formed. This method significantly improves uniformity and appearance compared with microsphere prepared simply by W/O/W, and there is a certain increase in encapsulation efficiency($>30\%$).

KEY WORDS: microsphere; octreotide; W/O/W; micro-injection

奥曲肽作为生长抑素类似物,能够治疗多种消化系统疾病、肿瘤及肢端肥大症,在临床上有着广泛的应用^[1]。其中醋酸奥曲肽微球是治疗肢端肥大最主要的长效药物,能够在体内持续释放 1 个月,相较于短效制剂的频繁给药,显著提高了患者的依从性和耐受性^[2]。国际上针对生物可降解微球的研究方兴未艾,如吡达帕胺肠溶微球的制备及影响因素的考察^[3],而国产同类产品却寥寥无几,仅有仿制亮丙瑞林注射缓释微球等少数品种成功上市。目前在生物可降解微球研制中存在着系列问题,包括微球粒径分布大,载药量、包封率低,制备过程不能做到完全系统控制,无菌保证存在重大风险。采用微量喷射技术,复乳法制备奥曲肽长效生物可降解微球,有效地改善了微球形态和粒径的均一性,提高药物的载药量和包封率,并且整个操作过程自动控制,为生物可降解微球产业化奠定一定基础。

1 微量喷射技术

微量喷射制备微球系统结构见图 1,主要由微量喷射控制单元,磁力搅拌器,CCD 成像设备、气压控制器、气压泵和计算机组成。微量喷射控制单元是系统的核心部件,其主要由微量喷头组件,喷头安装机构和电控制器组成。喷嘴内置 $20\text{--}80\text{ }\mu\text{m}$ 内径玻璃喷头,其工作原理是利用逆压电效应,由喷头内部的压电换能器产生体积变化,导致在腔体内液体产生压力波,带动管内流体一起运动,压力波传到喷嘴孔处转变为流体速度,使微滴从喷嘴喷出^[4]。电控制器则是采用 CT-M3-02 型控制器,其可提供多种复杂的波形信号给喷头。

2 仪器与材料

微量喷射制备微球系统(自制),RW20 电动搅拌机(德国 IKA 公司),78-1 磁力加热搅拌器(常州澳华仪器有限公司),XSP-3C 光学显微镜(上海豫光仪器厂),SHA-B 水浴恒温振荡器(江苏金坛恒丰仪器厂),LC20-AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司),SK5200lh 超声仪(上海科导超声仪器有限公司)。

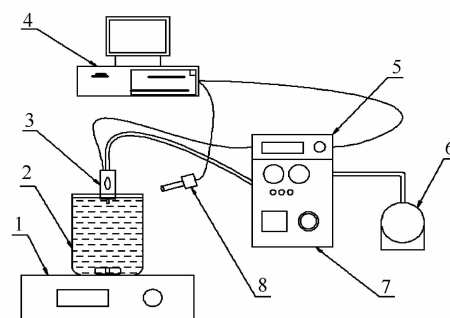


图 1 微量喷射制备微球系统结构示意图

1-磁力搅拌器;2-烧杯;3-微量喷头组件;4-计算机;5-电控制器;6-气压泵;7-气压控制器;8-CCD 成像设备

Fig 1 System structure diagram of micro-injection for preparation of microspheres

1-magnetic stirrers; 2-beaker; 3-micro nozzle components; 4-computer; 5-electric controller; 6-pneumatic pump; 7-pressure controller; 8-CCD Camera

醋酸奥曲肽(批号: 090501, 纯度: 99.5%, 上海苏豪逸明制药有限公司), 聚乳酸-聚羟基乙酸共聚物(PLGA, 体积 50:50, 相对分子质量 38 000, 特性黏度 $0.61\text{ dL}\cdot\text{g}^{-1}$, Durect), 二氯甲烷、甲醇、乙腈、PVA 均为分析纯。

3 方法

3.1 微球的制备

3.1.1 采用微量喷射-复乳(W/O/W)法制备微球 将醋酸奥曲肽溶解于甲醇(浓度为 6%)中, 加入到含 PLGA 的二氯甲烷溶液(浓度为 10%)中, 快速震荡乳化形成 W/O 初乳, 注入微量喷射系统储液管内, 将喷头插入 PVA 水溶液(浓度为 1%)中。通过压电控制器进行微量喷射, 与此同时磁力搅拌器搅拌以一定转速进行搅拌。当喷射完成之后, 磁力搅拌器持续搅拌 4~5 h 挥发去除二氯甲烷溶剂, 用 $3\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤收集微球, 冷冻干燥, 封装保存。

3.1.2 采用复乳-溶剂挥发法制备微球 将醋酸奥曲肽溶解于甲醇(浓度为 6%)中, 加入到含 PLGA 的二氯甲烷溶液(浓度为 10%)中, 快速震荡乳化形成 W/O 初乳, 注入至电动搅拌机搅拌下的 PVA 水溶液(浓度为 1%)中, $2000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌 5~10 min 后, 迅速转移至一定体积缓冲液中, 磁力搅拌持续搅拌 4~5 h 挥发去除二氯甲烷溶剂, 用 $3\text{ }\mu\text{m}$ 微

孔滤膜过滤收集微球, 冷冻干燥, 封装保存。

3.2 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸溶液(4 mL 磷酸溶解于 2 L 去离子水, 用三乙胺调节 pH 至 5.4)-乙腈=78:22; 检测波长: 214 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱压为 14.3 MPa; 进样量为 20 μL。

3.3 包封率、载药量测定

称取奥曲肽微球 200 mg, 在 10 mL 二氯甲烷中充分溶解。使用注射用水 10 mL 进行 10 次萃取, 合并萃取液。用外标法测定药物含量, 通过公式计算得出包封率。

$$\text{包封率} = \frac{\text{实际载药量}}{\text{理论载药量}} \times 100\% \text{ (其中, 理论载药量为实际投药量)}$$

量为实际投药量)

3.4 微球形态

采用扫描电子显微镜观察微球形态。

3.5 粒径及其分布

依中国药典 2010 年版二部附录 IX E 粒度和粒度分布测定法中的光散射法, 用激光粒度仪进行测定, 并记录微球的平均粒径及其分布。

3.6 体外释放曲线

精密称取奥曲肽微球 35 mg 20 份, 分别置于 20 支 10 mL 玻璃离心管中, 每管中均加入 5 mL pH 7.4 的磷酸盐缓冲液(含 0.02% 聚山梨酯-80 作为润湿剂), 置于恒温水浴摇床中, 在 100 r·min⁻¹ 振荡速度、(37±0.5)°C 条件下进行微球的体外释放度测定。分别在 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 30 d 取出离心管, 于 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸出上清液后将残余微球在常温下真空干燥 24 h, 按“3.3”项下方法测定微球中奥曲肽的残余药量。

4 结果与讨论

采用单因素法研究驱动电压、喷射频率、搅拌器转速 3 个因素对微球平均粒径和粒径分布的影响, 并考察制得微球的包封率。

4.1 驱动电压对微球的影响

随驱动电压增大, PLGA 微球粒径随之增大, 粒径均一性随之变差。在驱动电压为 60, 80, 100 V 的情况下, 所得微球的平均粒径分别为 35.783, 53.969, 78.602 μm, 其粒径分布系数 CV(coefficient of variation)分别为 3.2%, 4.8%, 16.5%。这是因为驱动电压是影响粒径的重要因

素, 随着驱动电压的增大, 产生的压力波也相应增大, 使得喷出的微滴增大, 微球粒径也随之增大。结果见图 2。

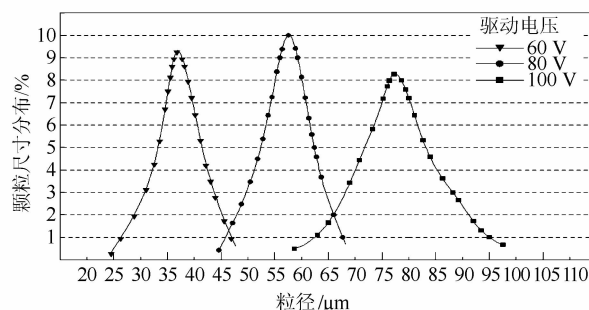


图 2 不同驱动电压下制备微球的粒径分布

Fig 2 A particle size distributions of the microspheres prepared under different driving voltages

4.2 喷射频率对微球的影响

随喷射频率的增大, PLGA 微球粒径随之减小, 粒径均一性随之变差。在喷射频率为 3 000, 5 000 和 7 000 Hz 的情况下, 所得微球的平均粒径分别为 73.786, 55.564, 35.561 μm, 其 CV 分别为 2.4%, 4.1%, 27.1%。在驱动电压一定的情况下, 当喷射频率加快, 对微滴所产生的剪切力也随之加大, 使其喷射出的液滴大小随之减小。结果见图 3。

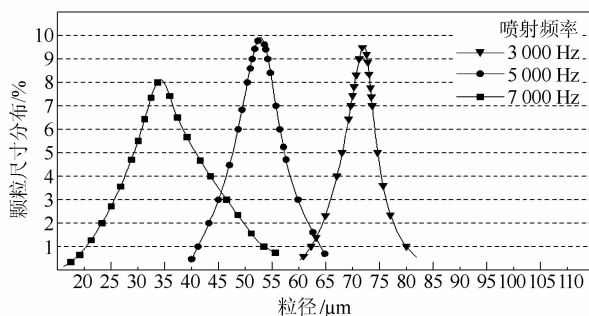


图 3 不同喷射频率下制备微球的粒径分布

Fig 3 A particle size distributions of the microspheres prepared under different ejection frequency

4.3 搅拌器转速对微球的影响

随磁力搅拌器转速的增大, PLGA 微球粒径随之减小, 粒径均一性随之变差。在搅拌器转速为 150, 300 和 450 r·min⁻¹ 的情况下, 所得微球的平均粒径分别为 72.145, 51.784, 30.892 μm, 其 CV 分别为 2.6%, 3.9%, 20.5%。结果见图 4。

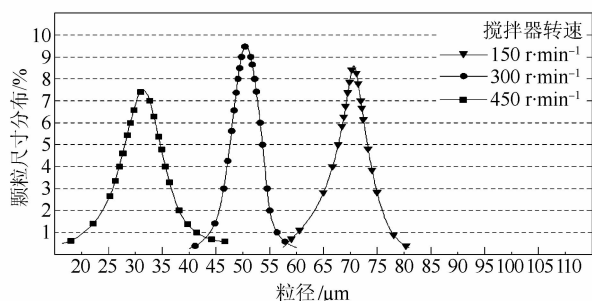


图4 不同搅拌速度下制备微球的粒径分布

Fig 4 A particle size distributions of the microspheres prepared under different agitation speed

4.4 微量喷射技术对包封率的影响

随着驱动电压、喷射频率的改变,药物包封率无明显变化趋势,说明包封率与驱动电压和喷射频率无明显关系。随着磁力搅拌器转速的增大,包封率明显提高,这与传统复乳法制备微球得出复乳搅拌强度与包封率成正相关的结论相符合,原因是在磁力搅拌过程中,复乳在不断固化,在一定范围内,搅拌速度越快,微球固化过程越快速,得到的包封率越高^[4]。结果见表1。

表1 不同微量喷射条件下制备微球的包封率

Tab 1 Encapsulation efficiency of the microspheres prepared under the different conditions of micro-injection

参 数	包封率/%	
	微量喷射-复乳法 (n=10)	传统复乳法
驱动电压/V ¹⁾	60	40.8±5.1
	80	41.1±4.8
	100	40.6±4.9
	100	40.6±4.9
喷射频率/Hz ¹⁾	3 000	39.9±4.9
	5 000	40.2±5.0
	7 000	40.5±5.1
搅拌速度/r·min ⁻¹	150	32.7±5.2
	300	36.3±5.1
	450	41.2±4.9

注: ¹⁾搅拌速度为 450 r·min⁻¹

Note: ¹⁾The agitation speed is 450 r·min⁻¹

4.5 微量喷射技术-复乳法与传统复乳法制得微球形态比较

微量喷射技术-复乳法制得微球(A)粒径差别不大,粒径分布为 $D_{10}=38.688\ \mu\text{m}$, $D_{50}=57.529\ \mu\text{m}$, $D_{90}=71.351\ \mu\text{m}$, 跨距 Span 为 0.57; 传统复乳法制得微球(B)粒径差别显著,粒径分布为 $D_{10}=20.203\ \mu\text{m}$, $D_{50}=48.244\ \mu\text{m}$, $D_{90}=105.776\ \mu\text{m}$, 跨距 Span 为 1.77。结果见图5。

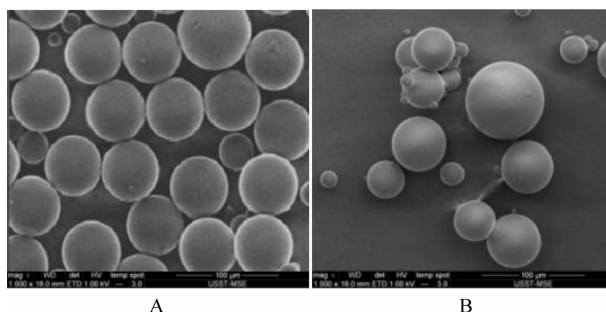


图5 微球形态

A-微量喷射技术-复乳法制得微球(60 V, 3 000 Hz, 450 r·min⁻¹); B-传统复乳法制得微球

Fig 5 Microsphere morphology

A-the microspheres prepared by micro-injection technology-double emulsion method(60 V, 3 000 Hz, 450 r·min⁻¹); B-the microspheres prepared by the traditional double emulsion method

4.6 微量喷射技术-复乳法制得微球体外释放曲线结果见图6。

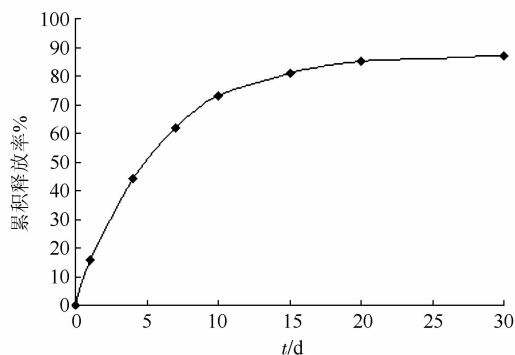


图6 微量喷射技术-复乳法制得微球体外释放曲线(60 V, 3 000 Hz, 450 r·min⁻¹)

Fig 6 In vitro release profile of the microspheres prepared by micro-injection technology-double emulsion method (60 V, 3 000 Hz, 450 r·min⁻¹)

5 结论

通过单因素法,得到驱动电压、喷射频率和搅拌器转速等工艺参数与微球平均粒径和粒径分布系数CV之间的关系。驱动电压与微球粒径及CV成正比,当驱动电压增大时,微球粒径和CV均随之增大。喷射频率和搅拌器转速与微球粒径成反比,而与CV成正比,当喷射频率和搅拌器转速增大时,粒径随之减小, CV随之增大。使用微量喷射技术能够有效提高复乳法制备微球的包封率(>30%);其体外释药性能符合长效制剂特征,24 h内药物释放百分率<20%, 30 d累积释放达到80%以上。

本实验使用复乳法与微量喷射技术相结合方法制备的微球,能够用于某些缓释药物的制备,为其他药物微球的制备提供了一种新方法。而且可以通过改变相应的控制参数,根据需要在十几

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

氟苯尼考又称氟甲砜霉素,是一种专门用于动物的新型抗革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及甲砜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