

Box-Behnken 效应面法优化塞来昔布微粉化工艺

谢向阳¹, 李旸¹, 李银科¹, 邢传峰², 陈鹰^{1*} (1. 广州军区武汉总医院药剂科, 武汉 430070; 2. 江苏奥赛康药业股份有限公司, 南京 211112)

摘要: 目的 采用气流粉碎技术进行塞来昔布微粉化试验研究, 并对其体外溶出度进行考察。方法 通过对微粉化工艺参数优化, 以粉碎压力(X_1 , psi)、进料压力(X_2 , psi)为考察对象, 以 $D_{50}(Y_1, \mu\text{m})$ 、 $D_{90}(Y_2, \mu\text{m})$ 为评价指标, 利用 Box-Behnken 效应面法优化微粉化工艺参数, 采用 Malvern 粒度仪测定微粉化塞来昔布的粒径分布, 扫描电镜考察其形态; 并比较微粉化塞来昔布、参比制剂(西乐葆)和原料药的溶出速率和溶出量。结果 微粉化塞来昔布粒径 D_{50} 为 $1.07 \mu\text{m}$, D_{90} 为 $3.71 \mu\text{m}$, 扫描电镜显示微乳粒径均一, 制备的微粉化塞来昔布的体外累积溶出度明显高于原料药。结论 塞来昔布微粉化工艺采用 Box-Behnken 实验设计法优化简单、可行。

关键词: 气流粉碎; 塞来昔布; 粉碎压力; 进料压力; Box-Behnken 效应面法

中图分类号: R943 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)07-0836-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.016

Box-Behnken Experimental Design to Optimize Micromization Process of Celecoxib by Air Jet Mill

XIE Xiangyang¹, LI Yang¹, LI Yinke¹, XING Chuanfeng², CHEN Ying^{1*} (1. Department of Pharmacy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China; 2. Jiangsu Aosaikang Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 211112, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study on the micromization process of celecoxib which was carried on with an air jet mill, and to investigate its *in vitro* drug dissolution behavior. **METHODS** The micromization process parameters were optimized by Box-Behnken Design of response surface methodology (RSM) of grinding pressure(X_1 , psi), pushing pressure (X_2 , psi) as independent variables and particle size $D_{50}(Y_1, \mu\text{m})$, $D_{90}(Y_2, \mu\text{m})$ as dependent variables. The optimized micromization celecoxib was characterized for particle size and morphology. The dissolution rate and the dissolution amount of micromization celecoxib, reference formulation, and API were determined and compared. **RESULTS** Particle size of micromization celecoxib was found to be $D_{50} 1.07 \mu\text{m}$, $D_{90} 3.71 \mu\text{m}$. And the micromization celecoxib was found to be small and homogeneous as seen in scan electron microscopy. The *in vitro* accumulated dissolution of micromization celecoxib was higher than that of the API. **CONCLUSION** The Box-Behnken experimental design used to optimize micromization process of celecoxib by air jet mill was simple and practical.

KEY WORDS: air jet mill; celecoxib; grinding pressure; pushing pressure; Box-Behnken experimental design

塞来昔布(celecoxib, CXB)是一种非甾体抗炎药, 能特异性地抑制环氧化酶-2(COX-2)的产生, 临床主要用于急慢性骨关节炎和类风湿性关节炎。CXB 在 BCS 分类上属于 Class II 类药物, 溶出度是其体内吸收的限速步骤。该药水溶性差(溶解度 $3\sim 7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 溶出速度慢, 其制剂生物利用度低且个体间吸收差异大^[1-2]。因此, 改善 CXB 的水溶性, 提高 CXB 在胃肠道内的溶出度, 进而提高 CXB 的体内生物利用度, 对 CXB 的临床应用具有重要意义。

微粉化技术是近年来新兴的一项粉碎技术, 它是利用流体动力的方法, 将物料颗粒粉碎至微米级甚至纳米级超细粉体微粉的过程。经过微粉化的物料具有更大的比表面、空隙率和表面能,

因此在溶出性、分散性、吸附性、流动性和化学活性等方面都可以得到有效改善, 从而具有独特的物理和化学性质^[3-6]。

Box-Behnken 效应面法是近些年来使用较多的一种实验设计方法, 适用于多因素多水平试验设计, 使用方便, 预测性好。本研究采用 Box-Behnken 效应面法对塞来昔布微粉化工艺进行优化, 达到提高 CXB 的溶出度, 进而提高其体内生物利用度的目的。

1 仪器与材料

J-20 型气流粉碎机(德国阿肯图粉体工程设备有限公司); RC-806 溶出试验仪(天津天大天发科技有限公司); UV-2000 紫外分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司); Mastersizer 2000 型粒度分析仪(英

作者简介: 谢向阳, 男, 博士, 主管药师 Tel: (027)68879031, 15321779705
博士, 副主任药师 Tel: (027)87649309 E-mail: cy9262005@yahoo.com.cn

E-mail: xxy5727035@163.com *通信作者: 陈鹰, 女,

国马尔文仪器公司); JCM-6000 扫描电镜(日本电子公司)

塞来昔布(江苏正大清江制药有限公司, 批号: 1200346, 纯度: 99.8%); 塞来昔布对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100006-201104, 纯度: 99.9%); 塞来昔布胶囊(西乐葆, 美国辉瑞制药有限公司, 规格: 200 mg, 批号: 213278); 十二烷基硫酸钠(安徽山河药用辅料股份有限公司, 批号: 20120522)。

2 方法与结果

2.1 CXB 微粉化工艺

将 CXB 经 100 目筛处理后加入到气流粉碎机加料嘴中, 依次开启粉碎阀门、加料阀门对原料药进行微粉化处理。通过调节粉碎压力(psi)、进料压力(psi)2 个工艺参数, 最终可以得到粒度分布符合要求的 CXB 微粉化颗粒。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系 采用紫外分光光度法测定溶出介质中 CXB 的含量。

精密称取 10.0 mg CXB 对照品, 置于 100 mL 量瓶中, 加入少量乙醇超声溶解, 放冷至室温, 用溶出介质(0.5% SDS pH6.8 的磷酸盐缓冲液)稀释至刻度作为储备液。分别精密吸取储备液 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用溶出介质稀释至刻度, 配制浓度分别为 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列标准液, 在波长 253 nm 处进行紫外测定, 记录吸光度。以 CXB 吸光度对其浓度做线性回归, 得回归方程为: $A=0.0517C+0.0012$, $r=0.9999$, 结果表明, CXB 的浓度在 2.0~50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内, 吸光度与浓度呈良好线性关系。日内、间精密度及回收率考察符合要求。

2.2.2 稳定性实验 取 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 供试品溶液, 在室温条件下分别放置 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 重复测定, 结果 RSD 为 1.25%, 表明 CXB 溶液 24 h 内稳定性良好。

2.3 Box-Behnken 效应面法优化 CXB 微粉化工艺参数

2.3.1 实验设计 通过对 CXB 微粉化工艺参数单因素考察, 选取对微粉化工艺参数影响较显著的 4 个因素: 粉碎压力(X_1 , psi)、进料压力(X_2 , psi)2 个工艺参数为考察对象, 分别以粒径分布 D_{50} 、 D_{90} (Y , μm)为评价指标, 利用 Box-Behnken 效应面法优 CXB 微粉化工艺参数。因素水平见表 1, 制备工艺优化试验安排及结果见表 2。

表 1 实验设计水平表

Tab. 1 Variables in the design of experiment

自变量	水平		
	低(-1)	中(0)	高(+1)
粉碎压力(X_1)/psi	60	90	120
进料压力(X_2)/psi	20	70	120

表 2 实验设计表与效应值

Tab. 2 The design of experiment independent (X) and dependent variables (Y)

No.	X_1	X_2	$Y_1(D_{50})/\mu\text{m}$	$Y_2(D_{90})/\mu\text{m}$
1	60	120	3.14	6.82
2	60	70	5.38	9.04
3	90	70	2.58	7.37
4	90	20	3.57	8.36
5	120	20	2.09	5.26
6	90	70	2.25	6.92
7	120	70	1.07	3.71
8	120	120	1.04	3.51
9	90	120	0.92	3.87
10	90	70	1.57	6.36
11	60	20	7.15	20.27

2.3.2 数据处理及模型拟合 采用 Design expert 7.0 实验设计软件, 对表 2 中实验结果进行处理, 以评价指标(因变量)分别对各因素(自变量)进行方程回归拟合及方差分析, 多元二次回归方程可表示为: $Y=\beta_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\beta_{12}X_1X_2+\beta_{11}X_1^2+\beta_{22}X_2^2$, 其中: β_i 代表不同的回归系数。

对多元二次回归方程中的各项系数进行 F 检验, 结果如表 3、4 所示, 由表 3 可见, X_1 、 X_2 对 Y_1 均具有显著性影响; 由表 4 可见, X_1 、 X_2 对 Y_2 具有显著性影响。为简化方程求解, 在保证拟合度的前提下, 进行了相应的方程简化, 在 $P>0.1$ 水平上拒绝无显著相关的项后, 多元二次回归方程见表 5。

表 3 ANOVA 分析 Box-Behnken 设计实验结果

Tab. 3 The Box-Behnken experiment results of ANOVA

方差来源	平方和	自由度	均差	F 值	P 值
X_1	21.93	1	21.93	153.75	<0.000 1
X_2	9.91	1	9.91	69.47	0.000 4
X_1X_2	2.19	1	2.19	15.36	0.011 2
X_1^2	3.07	1	3.07	21.54	0.005 6
X_2^2	0.037	1	0.037	0.26	0.630 9
残差	0.71	5	0.14		
失拟项	0.18	3	0.061	0.23	0.870 4
纯误差	0.53	20.27			
总离差	38.28	10			

表 4 ANOVA 分析 Box-Behnken 设计实验结果

Tab. 4 The Box-Behnken experiment results of ANOVA

方差来源	平方和	自由度	均差	F 值	P 值
X_1	93.22	1	93.22	29.60	0.002 8
X_2	64.62	1	64.62	20.51	0.006 2
X_1X_2	34.22	1	34.22	10.87	0.021 6
X_1^2	4.02	1	4.02	1.28	0.310 0
X_2^2	2.53	1	2.53	0.80	0.411 3
残差	15.75	5	3.15		
失拟项	15.24	3	5.08	19.84	0.527 1
纯误差	0.51	2	0.26		
总离差	216.69	10			

表 5 Box-Behnken 设计中方差分析得到的响应模型和统计参数

Tab. 5 Response models and statistical parameters obtained from ANOVA for Box-Behnken design

回归方程	P 值	R^2
$Y_1=2.13-1.91X_1-1.29X_2+0.74X_1X_2+1.10X_1^2$	0.000 3	0.981 4
$Y_2=6.18-3.94X_1-3.28X_2+2.93 X_1X_2$	0.007 1	0.927 3

绘制自变量(X)与因变量(Y)效应面图以便直观分析各自变量及其相互作用对因变量的影响,结果见图 1,效应面图中曲线的弯曲程度反映模型的非线性程度。

2.3.3 优化处方验证 用 Derringer 渴求函数(desirability function) 评价各自变量的综合作用,其公式如下: $D=[d_1^{p_1} \times d_2^{p_2} \times \dots \times d_n^{p_n}]^{1/n}$, 其中, p_i 为自变量的权重, 本实验权重取 1, n 为自变量的数目, d_i 为单个自变量的渴求函数。 D 值在 0~1 之间; D 值越接近 1, 则说明所确定的最优条件越接近全局最优条件。本研究设定因变量目标为: D_{50} 、 D_{90} 都取最小值。根据 Design expert 7.0 实验设计软件得到 CXB 微粉化最优工艺参数: 粉碎压力为 114 psi、进料压力 100 psi。按照微粉化最优工艺参数制备 3 批 CXB, 测定 D_{50} 、 D_{90} , 结果见表 6。实验观察值和模型预测值比较接近, 说明模型预测性良好。

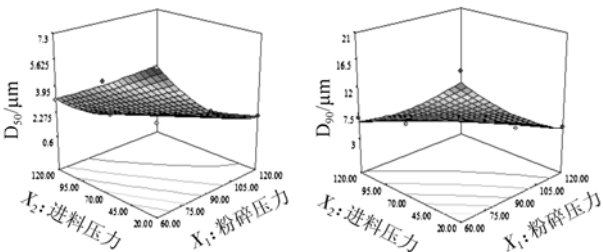


图 1 自变量 X_1 、 X_2 对因变量 Y_1 、 Y_2 的 3D 效应面图

Fig. 1 Response surface plot (3D) showing the effect of the X_1 and X_2 on the response Y_1 and Y_2

表 6 CXB 微粉化各指标预测值和观察值($n=3$)

Tab. 6 The observed and predicted response values for the optimized formulation($n=3$)

优化指标	预测值	观测值	偏差/%
$D_{50}/\mu\text{m}$	0.92	1.16 ± 0.27	20.6
$D_{90}/\mu\text{m}$	3.63	3.84 ± 0.38	5.8

2.4 CXB 粒径分布测定

取 CXB 微粉化颗粒约 50 mg 于 10 mL 量瓶中, 加入含有 0.05% 的 Tween80 溶液, 振摇, 充分分散, 样品溶液采用 Mastersizer 2000 粒度分析仪测定 CXB 颗粒的粒度分布, 结果见图 2。

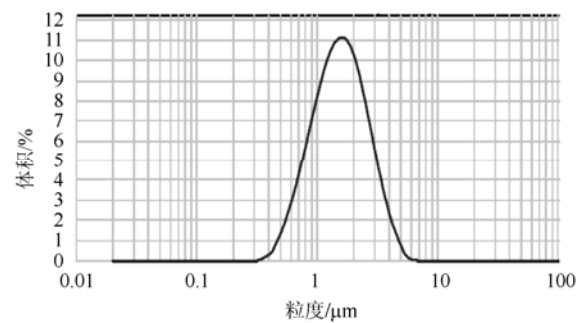


图 2 CXB 颗粒的粒度分布

Fig. 2 Particle size distribution of micronization CXB

由实验结果可知, CXB 粒度分布 D_{50} 为 $1.07 \mu\text{m}$, D_{90} 为 $3.71 \mu\text{m}$, 说明 CXB 粒径分布比较均匀。

2.5 扫描电镜观察

将少量 CXB 原料药通过超声分散在水中, 形成粗分散体系, 用毛细管在玻璃板上少量液体; 将 CXB 微粉化颗粒同法点在玻璃板上, 待水自然挥发干燥后, 喷金, 在 15 kV 电压下电子显微镜扫描。结果见图 3。

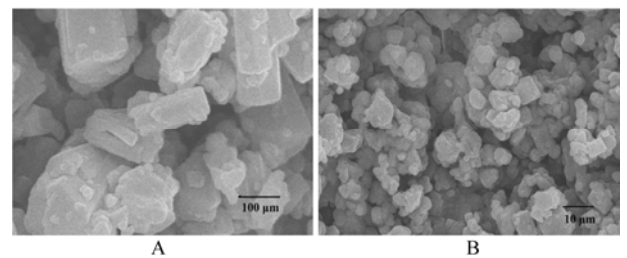


图 3 CXB 原料药(A)和微粉化(B)扫描电镜照片

Fig. 3 TEM of bulk CXB (A) and micronization CXB (B)

扫描电镜照片显示, CXB 原料药粒径较大, 经微粉化后粒径显著降低, 粒径大小与 Mastersizer 2000 粒度分析仪测定基本一致。

2.6 溶出度测定

采用中国药典 2010 年版附录 XC 溶出度测定法第二法的装置。分别测定 CXB 原料药、西乐葆、微粉化 CXB 3 组样品溶出度, 溶出介质为 0.5% SDS pH 6.8 的磷酸盐缓冲液, 体积为 900 mL, 转速为 $(100 \pm 1) \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。分别于 10, 20, 30, 45, 60 min 取样 5 mL, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 同时补加等温释放介质 5 mL, 按“2.2”项下紫外分光光度法测定溶出介质中 CXB 的浓度, 并计算 CXB 的累积溶出度, 绘制溶出曲线, 结果见图 4。

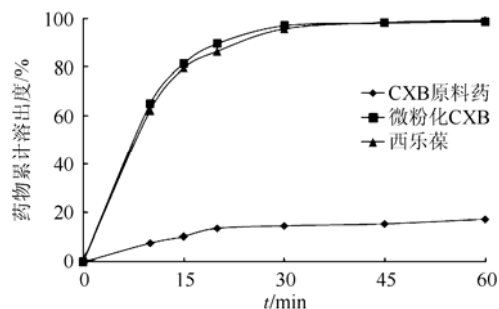


图 4 CXB 体外溶出度实验

Fig. 4 Release profile *in vitro* of CXB

实验结果表明, CXB 经微粉化后可显著提高溶出速率, 在 30 min 内 CXB 基本溶出完全, 与市售制剂塞来昔布胶囊溶出行为形似; 而 CXB 原料药溶出非常缓慢, 在 60 min 溶出率仅为 15% 左右。说明将 CXB 经微粉化处理能够显著提高药物溶出度。

3 讨论

通过前期预实验, 药物平均粒径控制在 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ 时, 药物溶出较好。考虑到药物放置后期粒径可能有增大, 故本试验将粒径控制到 $1 \mu\text{m}$,

为后期稳定性试验留下空间。

气流粉碎的关键在于高压气流产生的高度湍流和能量转换流可以使物料之间发生相互剧烈的冲击、碰撞和摩擦。压缩空气喷气流的动能与其质量流的一次方成正比, 与其速度的平方成正比, 因此, 喷气流的速度是影响物料破碎程度的一个重要因素。通常, 喷气流的速度与气流入口的压强成正比, 压缩空气的压强越大, 其喷气动能越大。从图 1 的试验结果可以看出: 压缩空气的压力越大, 粉碎效果越好, CXB 微粉的粒度越小, 粒度分布范围也越窄。

REFERENCES

- [1] REDDY M N, REHANA T, RAMAKRISHNA S, et al. β -cyclodextrin complexes of celecoxib: molecular-modeling, characterization, and dissolution studies [J]. AAPS PharmSci, 2004, 6(1): 1-9.
- [2] PAULSON S K, VAUGHN M B, JESSEN S M, et al. Pharmacokinetics of celecoxib after oral administration in dogs and humans: Effect of food and site of absorption [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 297(2): 638-645.
- [3] KAYE B H, CLARK G G, LEBLANCE J E. Image analysis procedures for characterizing the fractal dimension [J]. Particle Characteristic, 1987, 4(1): 63-66.
- [4] YOUNG B D, BRYSON A W, VANVLIET B M. An evaluation of the technique of polygonal harmonies for the characterization of particle shape [J]. Powder Technol, 1990, 63(1): 157-159.
- [5] YANG L W, ZHAO X W. Ultrafine grinding and its effects on traditional Chinese medicine [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med(世界科学技术: 中医药现代化), 2008, 10(6): 77-81.
- [6] JU A H, ZHOU K, ZHANG J, et al. Study on dissolution rate of general flavonoides in *Xanthoceras sorbifolia* Bung by technique of superfine grinding [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(7): 745-747.

收稿日期: 2013-09-21