论著

文章编号:1000-5404(2014)03-0274-04

伊潘立酮长效缓释微球的制备及体外释药特性研究

林 丽[1],黄 华[1],张 涛[2,3],张雁翎[4],钟晓东[2,3] (400016 重庆,重庆医科大学药学院药剂学教研室[1];400061 重庆,重庆医药工业研究院有限责任公司[2];400061 重庆,重庆市化学制药工程技术研究中心[3];610041 成都,四川大学华西药学院[4])

[摘要] **目的** 以聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体材料,制备伊潘立酮长效缓释微球,并考察微球的体外释放度。**方法** 采用O/W型乳化-溶剂挥发法制备伊潘立酮PLGA微球,运用正交实验设计优化处方组成和制备工艺,并对微球的外观形态、粒径、包封率、载药量和体外释放等理化性质进行了考察。**结果** 优化得到的最佳处方工艺为油相PLGA的浓度为80 g/L,油相-水相体积比为1∶30,聚乙烯醇(PVA)浓度为1%,乳化剪切速度为10 000 r/min。以优化处方制备的伊潘立酮PLGA微球为圆球形,粒径为(24.56±0.46)μm,包封率为(81.94±1.48)%,载药量为(7.50±0.13)%。药物体外释放30 d累计释放度达86.33%。**结论** 采用O/W型乳化-溶剂挥发法制备的伊潘立酮PLGA微球的包封率和载药量高,具有较好的缓释效果。

[关键词] 伊潘立酮;微球;聚乳酸-羟基乙酸共聚物;乳化-溶剂挥发法;正交设计
[中图法分类号] R944.9; R965; R971.41 [文献标志码] A

Preparation of iloperidone sustained-release microspheres and studies of their *in vitro* release characteristics

Lin Li[1], Huang Hua[1], Zhang Tao[2,3], Zhang Yanling[4], Zhong Xiaodong[2,3] ([1]Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Chongqing Research Institute of Pharmaceutical Industry, Chongqing, 400061; [3]Chongqing Chemical Pharmacy & Engineering Research Center, Chongqing, 400061; [4]College of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[**Abstract**] Objective To prepare iloperidone sustained-release microspheres using polylactic-co-glycolic acid (PLGA) as sustained-release carrier and to study their release *in vitro*. Methods Iloperidone-containing PLGA microspheres were prepared by O/W emulsion-solvent evaporation method. The formulation and the preparation conditions were optimized by orthogonal tests. The morphology was evaluated by light microscopy. The particle size distribution was measured by Mastersizer 2000 (Malvern). The encapsulation efficiency and the drug load were assessed. The *in vitro* release characteristics of the microspheres were also assayed. Results The optimized preparation conditions were as follows: PLGA concentration 80 g/L, the volume ratio of oil to water 1∶30, polyvinyl alcohol concentration 1%, and speed of mechanical stirring 10 000 r/min. The results showed that iloperidone-containing PLGA microspheres were spherical in shape, with mean diameter of (24.56±0.46) μm, average encapsulation efficiency of (81.94±1.48)%, drug load of (7.50±0.13)%, and cumulative release of iloperidone from microspheres of 86.33% for 30 d. Conclusion Iloperidone-containing PLGA microspheres are prepared successfully by O/W emulsion-solvent evaporation method with high encapsulation efficiency, high drug load and good sustained release characteristics.

[**Key words**] iloperidone; microspheres; PLGA; emulsion-solvent evaporation method; orthogonal experiments

Corresponding author: Huang Hua, E-mail: huangh6001@163.com

新型的非典型抗精神病药伊潘立酮(iloperidone)是一种哌啶基苯唑衍生物,不仅在有效治疗精神分裂症阳性症状的同时减少锥体外系综合征的发生,而且能改善精神分裂症的阴性症状,其因疗效显著、副作用少而受到临床重视[1]。目前伊潘立酮上市剂型为普通口服制剂,患者需要长期服药和特殊护理。注射用长效缓释微球可以减少患者的用药次数,具有给药方便、生物利用度较好、血药浓度平稳、无肝脏首过效应和患者依从性高等特点。采用具有生物降解性的聚乳

[通信作者] 黄 华,E-mail:huangh6001@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131220.1112.009.html(2013-12-20)

酸-羟基乙酸共聚物(polylactic-co-glycolic acid,PLGA)作为微球载体材料,具有生物相容性好、在体内易降解吸收、载药量大等特点,引起越来越多学者们的广泛关注[2]。因此,将伊潘立酮制成注射用长效缓释微球制剂,既可以减少给药次数,维持稳态血药浓度,又可以提高患者的依从性,对精神病的治疗具有十分重要的临床意义。本实验采用乳化-溶剂挥发法制备伊潘立酮 PLGA 缓释微球,正交实验设计优化微球处方组成和制备工艺,并考察体外释放度。

1 材料与方法

1.1 仪器

FISCO 均质乳化机(上海弗鲁克液体机械制造有限公司),85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司),GLZF-50B 真空冷冻干燥机(上海浦东冷冻干燥设备有限公司),TU-1900 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),S-3400N Hitachi 扫描电子显微镜(日本),Mastersizer2000 激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

伊潘立酮(重庆医药工业研究院有限责任公司,批号:20120510,纯度 > 99.5%);PLGA(Resomer® 5050DLG3A,LA:GA = 50:50,特性黏度 0.25 ~ 0.35 dL/g,德国 Evonik Degussa 公司);聚乙烯醇[PVA(1750 ± 50),国药集团化学试剂有限公司];二氯甲烷[分析纯,重庆川东化工(集团)有限公司];其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 伊潘立酮微球的制备 采用乳化溶剂挥发法制备载药微球,具体步骤如下:将伊潘立酮和 PLGA 溶于适量的二氯甲烷中,形成油相(O),将油相滴加到含有 PVA 的水相(W)中,高速搅拌充分乳化,形成 O/W 型乳液,用纯化水将水相稀释 1 倍[3-4],继续低速搅拌 4 h 挥发有机溶剂固化微球,离心收集微球,并用纯化水洗涤 3 次后加入 3% 甘露醇进行真空冷冻干燥,即得伊潘立酮微球。

1.3.2 单因素考察 影响微球制备的因素很多,本研究分别考察油相 PLGA 浓度、药脂比(药物与 PLGA 的质量比)、PVA 浓度、油相-水相体积比、乳化剪切速度、剪切时间等因素对微球包封率的影响,以确定对微球包封率影响较大的因素。

1.3.3 正交实验设计优化处方与工艺 在单因素考察的基础上,选择对微球包封率影响较大的 4 个因素作为考察对象:油相 PLGA 浓度(A)、PVA 浓度(B)、乳化剪切速度(C)和油相-水相体积比(D)4 个因素,每个因素选择 3 个水平,按 $L_9(3^4)$ 正交表设计安排实验,见表 1,以微球载药量、包封率、突释程度作为评价指标,采用综合评分法[5]进行正交优化。综合得分 = 载药量(%) ×0.4 + 包封率(%) ×0.4 + 突释(%) ×0.2。

表 1 正交设计的因素水平

水平	A(g/L)	B(%)	C(r/min)	D(体积比)
1	20	0.5	10 000	1:20
2	40	1	13 000	1:30
3	80	2	16 000	1:40

1.3.4 微球的粒径及形态观察 取微球冻干粉适量,加蒸馏水使微球分散均匀,采用激光粒度分析仪测定微球的粒径。取微球冻干粉适量,置双面胶带上,涂布均匀,喷金后用扫描电子显微镜观察微球的形状和表面形态。

1.3.5 含量测定方法的建立

1.3.5.1 测定波长的选择 精密称取伊潘立酮和空白微球适量,分别用乙腈 10 mL 溶解,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行紫外扫描。结果表明,伊潘立酮在 275 nm 处有最大吸收,空白微球在 275 nm 处无吸收,故确定检测波长为 275 nm。

1.3.5.2 标准曲线的建立 精密称取伊潘立酮 20 mg 置 100 mL 量瓶中,以乙腈溶解并定容,再稀释制成 4 ~ 16 μg/mL 系列标准溶液,于 275 nm 处测定光密度(A),以 A 对浓度(C)进行线性回归,得标准曲线方程:$A = 0.036\ 9C + 0.002\ 2$,$R^2 = 0.999\ 9$。表明伊潘立酮在 4 ~ 16 μg/mL 浓度范围内与光密度呈良好的线性关系。

1.3.5.3 精密度实验 分别配制 3 个不同浓度的伊潘立酮溶液,浓度分别为 6.0、10.0 μg/mL 和 14.0 μg/mL,1 d 内连续测定 3 次,计算日内精密度,结果其相对标准偏差(relative standard deviation,RSD)为 0.11%、1.00% 和 0.53%($n = 3$);每天测定 1 次,连续测定 3 d;计算日间精密度,结果其 RSD 为 0.71%、0.72% 和 1.08%($n = 3$)。

1.3.5.4 回收率实验 精密称取空白微球 9 份,每份 20 mg,置 10 mL 量瓶中,分别精密加入 0.1 mg/mL 的伊潘立酮溶液 0.6、1.0、1.2 mL,每个浓度 3 份,然后加入乙腈 2.0 mL,超声至微球完全溶解后,加水稀释至刻度,摇匀,过滤,于 275 nm 处测定光密度,由标准曲线方程计算伊潘立酮含量。回收率分别为 99.3%、100.1%、98.6%,RSD 分别为 0.5%、0.2%、0.7%($n = 3$)。

1.3.6 微球包封率和载药量的测定 精密称取微球适量,置 10 mL 量瓶中,加乙腈 2.0 mL,超声至微球完全溶解后,加水稀释至刻度,摇匀,过滤,于 275 nm 处测定光密度,按以下公式计算载药量和包封率。载药量 = (微球中药物的含量/微球质量) ×100%;包封率 = (微球中药物的含量/投药量) ×100%。

1.3.7 伊潘立酮微球体外释放度实验

1.3.7.1 释放介质的考察 伊潘立酮为难溶性药物,为了有效改善微球在体外释放过程中的聚集、粘连、释放速率慢等问题,可在释放介质中加入少量的表面活性剂以增加药物的释放[6-7]。本研究分别以含 1% 十二烷基硫酸钠(SDS)、1% 吐温-80和 0.05% SDS + 0.05%(吐温-80)的 pH7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)为释放介质,照 1.3.7.2 方法考察微球的体外释放情况。

1.3.7.2 微球体外释放度的测定 参考动态膜透析法进行微球体外释放实验。精密称取 3 批按最优处方制备的伊潘立酮微球适量,分别装入预处理过的透析袋(截留相对分子质量 8 000 ~ 14 000)中,加释放介质 2 mL 混悬,扎紧透析袋两端,然后放入盛有 28 mL 释放介质的具塞锥形瓶中,将试样置恒温振荡器,控制温度(37 ± 1)℃,转速为 100 r/min,分别于 4 h、1、2、3、6、10、14、18、24、30 d 吸取透析液 5.0 mL 并及时补充等量新鲜释放介质,过滤,稀释后测定药物浓度,并计算累计释放百分率。采用相似因子(f_2)判断不同批次微球释放的相似性。

2 结果

2.1 单因素考察结果

从实验结果可知,油相PLGA浓度、PVA浓度、油相-水相体积比和乳化剪切速度4个因素对微球的包封率影响较大。而药脂比、剪切时间等因素对微球的包封率影响较小。见表2。

表2 单因素考察结果

因素	水平	包封率(%)
油相PLGA浓度(g/L)	20	42.01
	40	65.32
	80	69.93
	160	77.83
药脂比	1∶5	58.35
	1∶10	69.13
	1∶20	74.83
	1∶40	70.21
PVA浓度(%)	0.5	53.19
	1	74.32
	2	62.43
	3	50.11
油相-水相体积比	1∶20	60.21
	1∶30	78.39
	1∶40	61.15
	1∶50	40.31
乳化剪切速度(r/min)	10 000	83.78
	13 000	75.36
	16 000	60.09
	19 000	49.18
剪切时间(s)	60	76.45
	90	84.19
	120	80.23
	180	75.56

2.2 正交实验设计优化处方

按$L_9(3^4)$正交实验设计表设计9个处方,以载药量、包封率和突释为综合评价指标对各个处方进行综合评定,正交实验结果见表3。结果显示,各因素对微球质量影响的顺序为A>D>B>C,最佳工艺为$A_3B_2C_1D_2$,即油相PLGA的浓度为80 g/L、PVA浓度为1%、乳化剪切速度为10 000 r/min、油相-水相体积比为1∶30。

表3 正交实验结果

实验号	因素				载药量(%)	包封率(%)	突释(%)	综合得分
	A	B	C	D				
1	1	1	1	1	5.96	65.21	6.25	29.718
2	1	2	2	2	6.48	75.83	8.29	34.582
3	1	3	3	3	5.21	55.38	9.25	26.086
4	2	1	2	3	6.57	70.29	5.47	31.838
5	2	2	3	1	7.05	76.25	6.33	34.586
6	2	3	1	2	7.43	79.31	4.02	35.500
7	3	1	3	2	7.35	80.11	7.52	36.488
8	3	2	1	3	7.55	82.19	3.21	36.538
9	3	3	2	1	6.91	75.49	5.28	34.016
K_1	30.13	32.68	33.92	32.77				
K_2	33.97	35.24	33.48	35.52				
K_3	35.68	31.87	32.39	31.49				
R	5.55	3.37	1.53	4.03				

K_1、K_2、K_3:分别为3个水平的均值;R:极差

2.3 优化工艺的验证

按最佳工艺处方制备的3批微球,显微镜下外形圆整,粒径、包封率、载药量和突释符合设计要求,检测结果见表4。表明处方与工艺的重现性良好。

表4 重复性实验结果

批次	平均粒径(μm)	载药量(%)	包封率(%)
1	24.16	7.61	83.18
2	25.06	7.36	80.29
3	24.47	7.54	82.35
均值	24.56±0.46	7.50±0.13	81.94±1.48

2.4 微球的粒径及形态

干燥的伊潘立酮微球外观呈疏松白色粉末,在扫描电子显微镜下观察的微球呈圆整球形,表面光滑(图1)。扫描电镜图上的块状结晶是微球冷冻干燥时加入的保护剂甘露醇。微球的平均粒径为24.16 μm,D_{90}为47.75 μm,D_{50}为22.14 μm。

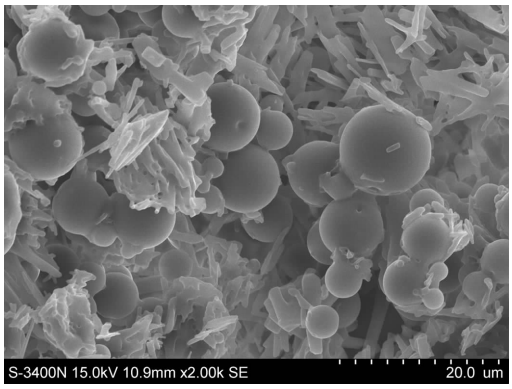


图1 伊潘立酮微球的扫描电镜观察 (×2 000)

2.5 伊潘立酮微球体外释放度实验结果

微球在不同介质中的体外释放情况见图2。结果显示,自制微球在含1%吐温-80的pH 7.4 PBS中的整体释放趋势较好,且平台区溶出量较高,约为86%,因此选用含1%吐温-80的pH 7.4 PBS作为释放介质。

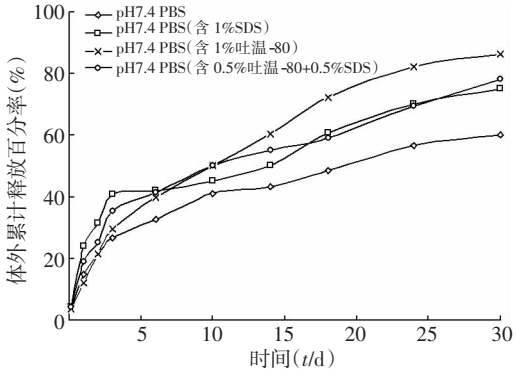


图2 释放介质对微球体外释放度的影响($n=3$)

不同批次微球体外释放度测定结果见图3,不同批次微球释放的相似因子(f_2)分别为75.5、66.3和66.0。最优处方制备的伊潘立酮微球(2)在1%吐温-80的pH 7.4 PBS释放介质中4 h内药物释放百分率为3.89%,30 d累计释放达到86.33%。结果表明,制备的伊潘立酮微球有较好的缓释效果,

满足了长效缓释微球的要求,且实验条件下 3 批样品的释放曲线相似,批次间药物释放重现性良好。

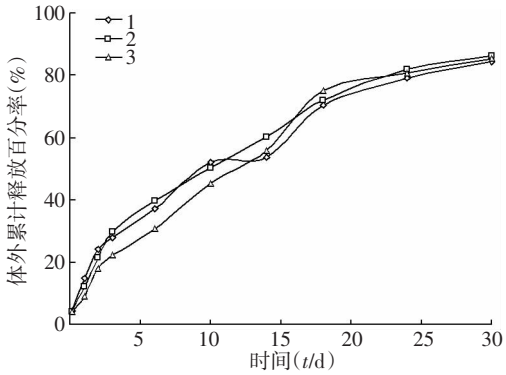


图 3 不同批次微球的体外累计释放曲线($n=3$)

3 讨论

制备微球的常用方法包括:乳化-溶剂挥发法、相分离法、喷雾干燥法等[8]。由于伊潘立酮为脂溶性药物,在水中几乎不溶,所以本实验采用 O/W 型乳化-溶剂挥发法制备微球。

影响 O/W 型乳化-溶剂挥发法制备微球的因素很多,其中最重要的是 PLGA 的浓度选择、油相-水相体积比的选择和 PVA 浓度的选择。本研究表明,随着 PLGA 浓度的增加,微球包封率明显提高。这是因为 PLGA 浓度增加的同时提高了油相的黏度,随着油相黏度的增大,微球内药物向水相泄漏的程度明显降低,从而提高微球的包封率。油相-水相体积比是制备微球的关键因素之一[9]。本研究结果显示,微球包封率随着水相体积的增加而显著降低。这是因为随着水相体积的增加,会有更多的药物溶解在外水相中。前期研究也表明,当油相与水相的体积比较小时,形成的微球孔隙率高,不利于控制药物的释放速度[10]。所以综合考虑,选择油相与水相的体积比为 1∶30。本研究选择聚乙烯醇作为乳化剂,其不但亲水性较强,还有增加生物黏合性的性质,能够在形成微球的过程中与 PLGA 分子互相渗透,且其疏水片段可渗透至有机溶剂中,有利于乳滴的稳定和粒径均一。本实验选用 1% 聚乙烯醇所制得的微球包封率最高,可能是因为聚乙烯醇的浓度越高,水相黏度越大,微球形成过程越稳定,但黏度过大不利于微球的洗涤;聚乙烯醇的浓度太小,微球在形成过程中会出现聚集,从而破裂,所以适宜浓度为 1% 的聚乙烯醇所制得的微球的包封率最高。

微球的体外释药是评价微球制剂的一个重要指标,微球的体外释药受很多因素的影响。介质的 pH 值、离子强度以及加入的表面活性剂会影响药物的溶解性、稳定性及聚合物的降解速度,从而影响微球的释药行为。本制剂采用肌肉注射,而组织环境的 pH 为 7 左右,所以选用释放介质为 pH7.4 的 PBS。释放介质中加入少量表面活性剂的目的在于减少微球的聚集和释放器皿表面对微球的吸附。本研究表明,表面活性剂吐温-80 的加入能有效改善微球在释药过程中的聚集、粘连从而改善微球的释药行为。体外释放试验表明自制伊潘立酮 PLGA 微球具有明显的缓释效果,且批次间药物释放重现性良好。

本实验按最佳工艺处方制得包封率高、突释较小、粒径适宜的伊潘立酮微球,且经过重复性实验验证后,证明该批微球具有形态良好,可重复性好等优点。后续实验中,将进一步探索提高微球载药量、包封率,探索药物体内外相关性、优化剂量,从而为抗精神病用长效药物注射微球的设计奠定基础。

志谢 感谢重庆医药工业研究院有限责任公司和重庆市化学制药工程技术研究中心提供科研经费资助和指导,感谢第三军医大学中心实验室路菊老师在扫描电镜检测中给予的帮助

参考文献:

[1] 王志宏, 郑宇静. 伊潘立酮的药理作用与临床评价[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(15): 1293 – 1295, 1328.

[2] Makadia H K, Siegel S J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier[J]. Polymers (Basel), 2011, 3(3): 1377 – 1397.

[3] 中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所. 含利培酮的缓释微球及其制备方法: 中国, CN101292960[P], 2008 – 10 – 29.

[4] 杨蕾, 彭博, 王明新, 等. 阿立哌唑缓释微球的工艺优化及体内药动学研究[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(2): 188 – 194, 201.

[5] 颜虹. 医学统计学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 278 – 281.

[6] Rawat A, Burgess D J. USP apparatus 4 method for *in vitro* release testing of protein loaded microspheres[J]. Int J Pharm, 2011, 409(1/2): 178 – 184.

[7] Sun Y, Wang J, Zhang X, *et al*. Synchronic release of two hormonal contraceptives for about one month from the PLGA microspheres: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. J Control Release, 2008, 129(3): 192 – 199.

[8] Wischke C, Schwendeman S P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles [J]. Int J Pharm, 2008, 364(2): 298 – 327.

[9] Mao S, Shi Y, Li L, *et al*. Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D, l-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 68(2): 214 – 223.

[10] 王彦君, 毛世瑞, 孙伟, 等. 白藜芦醇 PLGA 长效注射微球的制备及工艺考察[J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(4): 265 – 272.

(**收稿**:2013-11-05;**修回**:2013-11-26)

(编辑 张 维)