硬脂酸加兰他敏缓释微球的体外释放度检测方法的优化

杜丽平[1]，张　丽[1]，郝贵周[1]，刘善奎[2]，张贵民[3*]

（1. 山东新时代药业有限公司，山东省复杂注射剂工程技术研究中心，山东临沂 273400；
2. 济南大学生物科学与技术学院，山东济南 250000；3. 鲁南制药集团股份有限公司，山东临沂 276000）

摘要：本试验旨在开发一种新型注射用加兰他敏缓释微球制剂的体外释放试验方法。首先合成了硬脂酸加兰他敏，然后以丙交酯乙交酯共聚物为载体，采用 o/w 型乳化 - 溶剂挥发法制备其缓释微球。分别表征了所得微球的形貌、粒径、载药量与包封率，以 SD 大鼠为动物模型考察该微球的体内药物释放行为，绘制体内累积释放曲线。为得到具有良好体内外相关性的体外释放度试验参数，本试验通过 Plackett-Burman 设计筛选了流通池法中影响微球体外释放的显著因素，再用星点设计 - 响应面法考察各因素及其交互作用的影响。结果显示，流通池活塞泵流速、释放介质温度、释放介质中牛血清白蛋白（BSA）浓度是影响流通池法测得的微球体外释药数据的显著因素。基于 Design-Expert 8.06 软件的拟合结果，确定体外释放试验的参数为：活塞泵流速 10.55 ml/min、释放介质温度 42.54 ℃、BSA 浓度为 1.25%，此时测得的微球体外释放数据与其在大鼠体内的释药行为具有较好的相关性。

关键词：硬脂酸加兰他敏；缓释微球；Plackett-Burman 设计；星点设计 - 响应面法；释放度；体内外相关性

中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2022)01-0086-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.01.009

Optimization of an *in vitro* Release Test Method for Galantamine Stearate Sustained-release Microspheres

DU Liping[1], ZHANG Li[1], HAO Guizhou[1], LIU Shankui[2], ZHANG Guimin[3*]

(*1. Shandong Engineering Research Center of Complex Injectables, Shandong New Time Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400;
2. College of Life Science and Technology, Jinan University, Jinan 250000; 3. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000*)

ABSTRACT: The aim of this study is to establish an *in vitro* release test method for the novel galantamine sustained-release microspheres for injection. Galantamine stearate was synthesized, then its microspheres with poly(lactide-*co*-glycolide) as carriers were prepared by oil-in-water emulsion solvent evaporation method. The prepared microspheres were characterized in terms of morphology, particle size, drug loading and encapsulation efficiency. The SD rats were used as the animal models to study the *in vivo* drug release behaviors of the microspheres, and the cumulative release curve *in vivo* was drawn. In order to obtain the parameters of *in vitro* release test method for the microspheres with good *in vivo* relevance, Plackett-Burman design was used to screen out the significant factors affecting the release data of microspheres by flow-through cell method. Then, the central composite design-response surface methodology was used to investigate the influences of the selected factors and their interactions on the release behaviors. The results showed that the flow rate of piston pump, the release medium temperature, and the concentration of bovine serum albumin(BSA) in release medium were significant factors affecting the *in vitro* release data of the microspheres measured by flow-through cell method. Based on the fitting results by Design-Expert 8.06 software, the optimized parameters were as follows: the flow rate of piston pump, the medium temperature and BSA concentration in release medium were 10.55 ml/min, 42.54 ℃ and 1.25%, respectively. The *in vitro* release data of the microspheres measured under this condition had a good correlation with the *in vivo* release behavior in rats.

Key Words: galantamine stearate; sustained-release microsphere; Plackett-Burman design; central composite design-response surface methodology; release; *in vitro-in vivo* correlation

随着人口老龄化进程加剧，近年来阿尔茨海默病（AD）发病率日益升高，用药需求也随之增加。乙酰胆碱酯酶抑制剂是目前临床上应用最广泛的一类通过改善乙酰胆碱含量来达到缓解 AD 患者症状的治疗药物，代表药为他克林、多奈哌齐、加兰他敏（galantamine，**1**）。**1** 是治疗 AD 的首选药物[1]，但在空气中不稳定，易氧化降解而变质；因此现有剂型开发时采用氢溴酸加兰他敏（galantamine hydrobromide，**2**）作为活性药物成分（active pharmaceutical ingredient，API）[2]。该系列产品在临床使用过程中均遇到了由于半衰期短而导致的体内药物浓度出现严重“峰谷”现象的问题，对机体伤害较大。为保证药物疗效，需频繁用药，而 AD 患者的自主意识差，易漏服、多服，达不到理想疗效。缓释微球（sustained-release microspheres）作为一种局部注射给药的药物传递系统，通过控制药物缓慢释放，将体内的药物浓度持续、稳定地控制在治疗窗内，可显著降低给药频率，避免“峰谷”现象[3]。鉴于 AD 患者的用药现状，本试验拟制备 **1** 的注射用缓释微球，但 **1** 的稳定性较差，不宜直接作为缓释微球制剂中的 API；同时 **1** 在水中的溶解度仅 5.17 mg/ml（37 ℃），限制了微球的载药量，难以满足临床给药剂量的需求。基于上述两方面原因，本试验首先制备了硬脂酸加兰他敏（galantamine stearate，**3**），再以丙交酯乙交酯共聚物（PLGA）为载体，采用 o/w 型乳化 - 溶剂挥发法制备 **3** 的缓释微球，并进行基本性能表征。

体外释放度是微球重要的质量控制指标，用以监测批间差异、评价生产过程中的可能变化及处方优化等[4]。基于微球制剂本身可能会发生突释的特点，临床对其质量控制尤其是释放性质（突释量）提出了较高的要求[5]。目前关于药物体外释放度的检查方法，美国药典 42 版 711 项下收载了 7 种，包含篮法、桨法、流通池法、桨碟法、转筒法和往复筒法。其中，流通池法是一种区别于传统方法的新型溶出度测定法[6]。试验过程中，研究者易观察药剂的形态，可通过改变活塞泵的流速大小来减慢或加快试验进程，使试验时间达到几天甚至几个月（密封性好、溶媒蒸发量极少）。根据考察目的，可针对性地选用开放式或闭合循环式系统进行释药行为的研究。其中，闭合循环式系统能自动取样，可用于考察释放周期较长的样品，如微丸、植入剂及微球等特殊剂型。

本试验通过改变流通池活塞泵流速、释放介质温度、体外释放溶媒中的添加剂等，对流通池法的试验条件进行摸索，分别考察了各试验因素对 **3** 微球体外释放度的影响，采用 Plackett-Burman 设计对影响微球体外释药行为的流通池活塞泵流速、释放介质温度、释放介质中牛血清白蛋白（BSA）浓度、微球装量、玻璃珠装量、释放介质体积、释放介质中聚山梨酯 80 浓度进行初步筛选，确定影响显著的因素。然后，通过星点设计 - 响应面法对筛选结果进行二次多项式回归及模型验证，再筛选出最优的释放参数组合。结合以上 2 种方法，通过模型预测能获得体内外相关程度较高的体外释放参数，可望为后续缓释微球的体外释放度方法研究提供一定的数据支撑与试验参考。

1 仪器与试药

XS105DU 型电子分析天平（瑞士梅特勒 - 托利多集团）；L5M 型高剪切乳化机（英国 Silverson 机器制造公司）；Ultimate 3000 型高效液相色谱仪（赛默飞世尔科技有限公司）；AB Sciex QTrap 6500$^+$ 型三重四极杆串联质谱仪（配备电喷雾电离源，美国 AB Sciex 公司）；Nikon E100 型光学显微镜（日本 Nikon 公司）；EM-30Plus$^+$ 型扫描电镜（北京欧波同光学技术有限公司）；LD85S2 型冷冻干燥机（美国 Mill Rock 公司）；Mastersizer 3000 型激光粒度分析仪（英国马尔文仪器有限公司）；SOTAX CE7s-smart 型自动溶出仪（瑞士 Sotax 公司）。

2 原料药（苏州麦轮生物科技有限公司，含量 99.8%，

收稿日期：2020-12-10；**修回日期**：2021-11-13
基金项目：山东省重大科技创新工程项目（2018CXGC1409）
作者简介：杜丽平（1987—），女，博士，从事新型药物传递系统的研究。
Tel：0539-5030526
E-mail：15094709610@139.com
通信作者：张贵民（1969—），男，研究员，从事新药的研究与开发。
E-mail：lunanzhangguimin@163.com

批号 MLP-GT-20190110）；**2** 对照品（美国药典标准品，含量 99.7%，批号 R03680）；PLGA（山东省医疗器械研究所，50/50，羧基封端，M_r 40 000，批号 19110101）；硬脂酸（西陇科学股份有限公司）；硬脂酸对照品（中国食品药品检定研究院，批号 201202）；聚乙烯醇（PVA，17-88 型）、二氯甲烷、二噁烷、二甲基亚砜（德国默克公司）；BSA（美国 Sigma 公司）；聚山梨酯 -80（湖北葛店人福药用辅料有限责任公司）；注射用水（山东新时代药业有限公司）；其他试剂均为分析纯，水为试验室自制纯化水。

SD 大鼠［SPF 级，雌雄各半，200 ～ 210 g，济南朋悦实验动物繁育有限公司，生产许可证编号 SCXK（鲁）20190003］。

2　方法与结果

2.1　**3** 的制备

称取 **2**（2.5 g，6.8 mmol）置 1 L 烧杯中，加入甲醇 600 ml，加热至 45 ℃，搅拌至完全溶解，用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调至 pH 8.0，使 **2** 脱氢溴酸得 **1** 和溴化钠，过滤。取滤液于 45 ℃减压浓缩至干，加入乙酸乙酯 100 ml 搅拌 30 min 后，过滤。取滤液再于 45 ℃减压浓缩至干，去除体系中的溴化钠，得固体 **1**。向得到的固体 **1** 中加入甲醇 200 ml，继续搅拌，得 **1** 的甲醇溶液。称取硬脂酸（2.8 g，9.7 mmol）溶于 50 ℃甲醇 600 ml 中，完全溶解后过滤，取滤液，得硬脂酸的甲醇溶液。将上述 2 种甲醇溶液混合，搅拌反应 2 h。反应结束后，加入纯化水 200 ml，静置析晶，过滤，所得滤饼用甲醇水溶液洗涤 3 次（硬脂酸和 **1** 在甲醇水溶液中具有一定的溶解度，因此此步骤可除去未反应的 **1** 和硬脂酸），然后于 45 ℃减压干燥 12 h，得白色粉末状 **3** 成品（3.0 g，收率 75%）。

采用 HPLC 法测定化合物 **3**、硬脂酸与 **1**[7]。因为 **3** 为复盐，硬脂酸与 **1** 在流动相中呈游离态，分别出峰。HPLC 色谱条件为：色谱柱 Welch Ultimate AQ-C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相　甲醇：三乙胺磷酸缓冲液（将三乙胺 7 ml 加至水 900 ml 中，用 0.5 mol/L 磷酸调至 pH 6.0，加水至 1 000 ml）（25 ∶ 75）；检测波长 228 nm；流速 1.0 ml/min；柱温 25 ℃；进样量 20 μl。采用 **2** 对照品标定，计算得化合物 **3** 中 **1** 的含量为 49.33%。更换流动相为 pH 3.0 乙酸水溶液∶乙腈（10 ∶ 90）、检测波长为 200 nm，进行 HPLC 测定。采用硬脂酸对照品标定，计算得化合物 **3** 中硬脂酸的含量为 48.35%。依据硬脂酸与 **1** 的摩尔分子量，计算得化合物 **3** 中硬脂酸与 **1** 的摩尔比例为 1 ∶ 1，化合物 **3** 的纯度为 97.68%。另以 ^{1}H NMR 确证了化合物 **3** 的结构（数据存编辑部）。

2.2　**3** 微球的制备

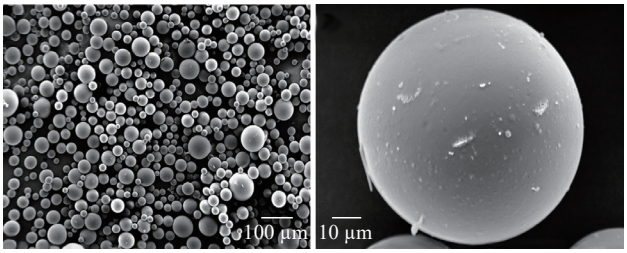
精密称取上述所得化合物 **3** 900.0 mg 和 PLGA 1 350.0 mg，加入至二氯甲烷与二噁烷（70 ∶ 30）的混合体系 9 ml 中，超声至完全溶解，配制成有机相溶液。称取 PVA 18.0 g，加至注射用水 1 500 ml 中，80 ℃搅拌至完全溶解，待冷却至室温，补加注射用水至 1 800 ml，配成 1.0% PVA 溶液，即为水相。将油相缓慢加至水相中，在 2 000 r/min 的剪切速率下均质乳化 1 min；乳化结束后，以 450 r/min 的速度搅拌进行固化处理，3 h 后停止搅拌；将微球悬液过 23 μm 的筛网，所得微球用纯化水洗涤 3 次后转移至培养皿中，冻干；冻干后过 23 μm 的筛网，收集样品。

2.3　**3** 微球的表征

2.3.1　电镜下微球的外观形态

用扫描电镜（SEM）观察所得微球产品的微观形貌。首先，将导电胶带粘在样品台上，再均匀铺上待测样品，用洗耳球吹去未粘住的样品粉末；然后，在样品表面镀上一层导电膜（喷涂金粉 80 s，电流 10 mA）；最后，将样品置检测器中，在 10 kV 的加速电压下观察，结果如图 1 所示。

图 1a 显示，微球表面光滑，形态圆整。将单个微球放大 1 900 倍后可见，微球表面无孔洞。这是由于：①二氯甲烷沸点（40 ℃）较低，在微球固化过程中易挥发，在球体内残留较少；②二噁烷易导致微球表面产生孔道，但其与水的互溶性较好，且在固化过程中易向外水相扩散，在微球内部基本无滞留，因而所得微球表面光滑；③在冻干阶段，微球表面并没有因为干燥升华过程中的快速抽压而留下微量残留溶剂的挥发通道，所以表面仍光滑。



a b

图 1 微球的 SEM 照片（a：×200；b：×1 900）

Fig.1 SEM Images of the Microspheres (a: ×200; b: ×1 900)

因此，采用该样品进行体外加速释放试验时，可以忽略微球由于自身孔道导致的释放过快[8]。

2.3.2 微球的载药量和包封率

精密称取 **2** 对照品 25 mg 置 25 ml 量瓶中，加入 0.01 mol/L 盐酸溶解并定容，作为贮备液。精密量取贮备液 2.5 ml 置 50 ml 量瓶中，加入 0.01 mol/L 盐酸定容，摇匀；精密量取上述溶液 1、1.25、2.5 和 5 ml，分别置 10 ml 量瓶中，加入 0.01 mol/L 盐酸定容。采用紫外分光光度计在 289 nm 处测定吸光度 D，以质量浓度 c 为横坐标、D 为纵坐标进行线性回归，所得标准曲线方程为 D=0.010 7c－0.004（R^2=0.999 8）；线性范围 5 ～ 50 μg/ml。

分别称取微球粉末 10 mg，置 50 ml 量瓶中，加入二甲基亚砜 1 ml，超声至完全溶解，再加入 0.01 mol/L 盐酸定容，超声 10 min。采用 0.22 μm 聚醚砜滤膜过滤后测定 D，计算药物含量，由下式计算微球的载药量和包封率，结果（按 **1** 计，n=3）分别为（19.97±0.35）%和（84.13±0.41）%。

$$\text{载药量}=\frac{\text{微球中所含药物质量}}{\text{微球总质量}}\times 100\%$$

$$\text{包封率}=\frac{\text{实际载药量}}{\text{理论载药量}}\times 100\%$$

$$\text{理论载药量}=\frac{\text{微球处方中原料药质量}}{\text{微球处方总质量}}\times 100\%$$

2.3.3 微球粒径的测定

用激光粒度分析仪测定微球产品的粒度分布。称取微球粉末（约 200 mg），均匀分散于含 0.1% 聚山梨酯 -80 的水溶液 10 ml 中，超声 10 min 后取出，采用湿法模块测试，结果 d(0.5) 为（56.68±1.13）μm（n=3），跨距（span）为 1.34。

所得微球粒径约 60 μm，主要受溶剂、剪切速率、PLGA 浓度及相对分子质量等因素的影响。本试验中二氯甲烷在油相中所占比例大，其挥发速率影响微球的形态，亦影响微球粒径的大小。当微球的理论载药量为 24%时，所得实际载药量接近 20%、包封率在 85%左右，说明采用该法制备的微球，药物损失较少。这主要受以下 2 种因素影响：①少量水溶性溶剂（二噁烷）的加入增加了药物在混合溶剂中的溶解度，虽然二噁烷的强水溶性可使溶剂快速扩散到水相中，但 DCM 的挥发可使 PLGA 快速沉积，进而阻碍药物向外水相的扩散，使微球实际载药量增加；②改变药物盐型后可增加药物的脂溶性，继而增加 o/w 法制备微球的载药量和包封率。

2.4 微球体内释药行为的考察方法

2.4.1 体内试验设计

6 只健康 SD 大鼠，试验前禁食 12 h，单剂量后肢肌内注射给药（20 mg/kg，给药剂量根据人和大鼠按体表面积折算的等效剂量比值换算得到）。分别于给药前（0 h），以及给药后 1、3、6、12 h 和 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 d 时自大鼠眼眶取血约 400 μl，置肝素抗凝的离心管中。血样应在 30 min 内离心（2 236×g，10 min），分离血清至 EP 管中，存储于－80 ℃冰箱中，待测。

2.4.2 生物样品处理与分析

取大鼠血清样品 100 μl 于 3 ml 离心管中，加入乙腈 300 μl，涡旋 1 min，离心 10 min（15 294×g），取上清液 100 μl，加水 100 μl，涡旋混合 10 s，置进样小瓶中，待测。

2.4.3 色谱分析条件

色谱柱 Waters BEH C_8 柱（2.1 mm×50 mm，1.7 μm）；流动相 1 mmol/L 乙酸铵的乙腈溶液∶甲醇（4 ∶ 1）；柱温 40 ℃；样品室温度 4 ℃；进样体积 2 μl。

2.4.4 质谱分析条件

离子源 电喷雾离子源，正离子方式检测；离子喷射电压 5 500 V；离子源温度 450 ℃；源内气

体 1(GS1，N_2) 和气体 2(GS2，N_2) 压力 344.74 kPa；气帘气体（N_2）压力（CUR）241.32 kPa；碰撞气（CAD）中等；扫描方式 多反应监测（MRM）。**1** 的去簇电压（DP）为 91 V、碰撞能量（CE）电压为 30 eV、入口电压（EP）为 10 V、碰撞室出口电压（CXP）为 11 V，用于定量分析的离子对为 *m/z* 288.2→*m/z* 213.1。

2.4.5 方法学验证

图 2 为大鼠血清中 **1** 的 MRM 色谱图，可见空白血清中的内源性物质不干扰药物成分的测定，方法具有较强的专属性。以 MRM 色谱图中 **1** 的峰面积 *A* 为纵坐标、**1** 质量浓度 *c* 为横坐标线性回归，所得标准曲线方程为 $A=5.949\times10^4c+4\ 495.308$（$r=0.997\ 2$），线性范围为 0.2 ～ 200 ng/ml。各浓度标准曲线样本的反算浓度与理论浓度之间的偏差均不大于 15%［定量下限（LLOQ）应不大于 20%］。

残留试验结果表明，取定量上限（ULOQ，200 ng/ml）样品进样检测后，再连续 3 次进空白样品，所得空白样品中 **1** 的残留不高于 LLOQ 的 20%。

2.4.6 数据处理及体内外相关性考察

应用 WinNonlin 64 药动药代分析模拟软件处理试验数据，得到 **3** 微球在 SD 大鼠体内的血药浓度 - 时间曲线。

2.5 微球体外释放度的考察

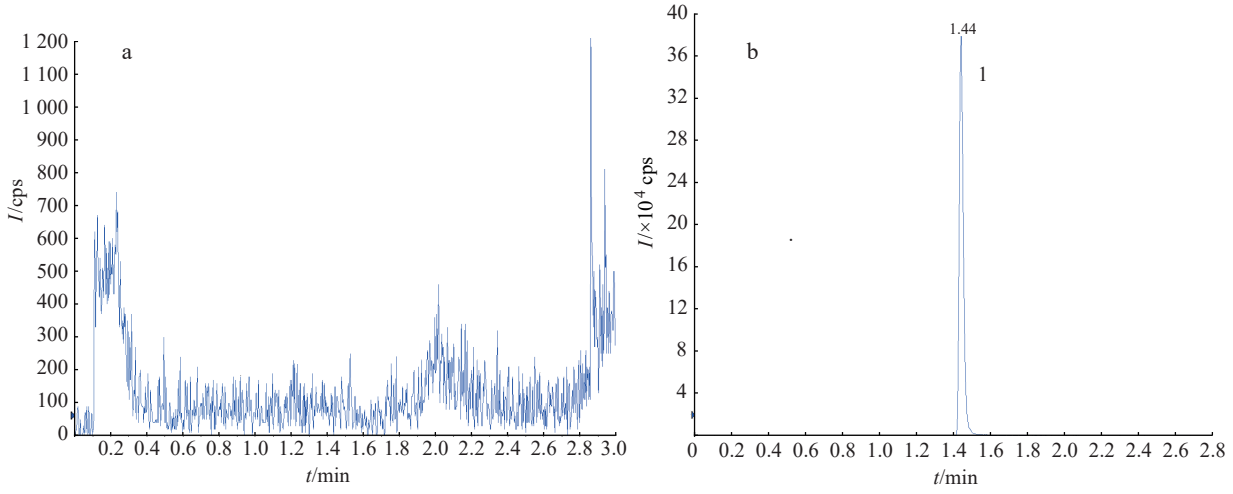
本试验采用美国药典 42 版 711 项下 4 法（USP 4）收录的自动溶出仪闭环环境模式测定，该方法具有试验样品量少、自动取样、不需等待、随时试验的特点。平行称取 3 份微球，置直径 22.6 mm、底部装有红宝石、上部装 1 mm 玻璃珠的流通池内，使释放介质在流通池内以层流方式流动。释放介质为经脱气处理的含聚山梨酯 -80 及叠氮化钠（0.05%，抑菌剂）的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液（含磷酸二氢钾 0.05 mol/L 和氢氧化钠 0.04 mol/L）。设置活塞泵流速和温度后启动活塞泵，根据 USP 4 法采用流通池闭环系统对释放介质进行循环，自释放介质浸过样品时开始计时，于设定的时间点取样 1 ml（同时补充同温等量释放介质），采用 HPLC 法测定释放液中的药物浓度并计算微球累积释放率[7,9—10]。

2.5.1 Plackett-Burman 设计

本试验目的在于筛选出对 **3** 微球体外释放试验结果有显著影响的因素，为下一步的星点设计 - 响应面分析提供指导[11]。

2.5.1.1 试验因素范围及水平的确定

选用 Plackett-Burman 设计对微球体外释放度影响因素的重要性进行考察，包括流通池活塞泵流



a：空白血清，b：空白血清中加入 **2** 对照品

1－**1**

图 2　大鼠血清中 1 的 MRM 色谱图

Fig.2　MRM Chromatograms of **1** in Rat Serum

速、释放介质温度、释放介质中 BSA 浓度、微球装量、玻璃珠装量、释放介质体积和释放介质中增溶剂聚山梨酯 -80 用量，每个因素取 2 个水平，按 Plackett-Burman 设计表进行 12 组试验，每组平行试验 3 次。具体试验因素及水平值见表 1。

表 1 Plackett-Burman 设计的因素与水平

Tab.1 Factors and Levels for Plackett-Burman Design

因素	水平	
	－1（低水平）	+1（高水平）
流通池活塞泵的流速（X_1）/ml·min^{-1}	4	16
释放介质温度（X_2）/℃	37	45
释放介质中BSA的浓度（X_3）/%	0.5	2
微球的装量（X_4）/mg	50	200
玻璃珠的装量（X_5）/g	9	18
释放介质的体积（X_6）/ml	100	200
释放介质中增溶剂的含量（X_7）/%	0.05	0.2

2.5.1.2 试验结果及分析

《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 9013 中要求释放全过程的累积释放率要达到 90% 以上。基于该指导原则，以微球 20 d 累积释放率的 3 次测定均值（Y）作为考察指标。Plackett-Burman 试验设计及响应值结果见表 2，7 个因素对考察指标的影响见图 3（图中 2.132 为评价影响因素的标准化效应指数，高于 2.132 表示该影响因素为影响显著项，反之则为影响不显著项）。

由图 3 可知，释放介质温度、释放介质中 BSA 浓度、流通池活塞泵流速对 **3** 微球释放度的影响显著，可作为进一步优化的因素；其他 4 个影响因素对微球释放度的影响不显著，后续不再作为主要考察对象。

2.5.2 星点设计试验

由于人和大鼠体温均为 37 ℃，**3** 微球的玻璃化转变温度（T_g）为 45 ℃，考虑将释放介质温度优化水平的下限定为 37 ℃，上限定为 45 ℃。释放介质中加入适量的 BSA 有利于模拟微球在体内释药的状态，基于前期 Plackett-Burman 设计得到的数据，观察到 BSA 浓度 1%～ 2%为正常阈值，因此将其考察下限定为 1%，上限定为 2%。同时，观察到活塞泵的流速低于 8 ml/min 时，所得试验数据与预期差异太大，不满足释放试验要求，故将 8 ml/min 定为考察下限，将前期试验中的最大流速 16 ml/min 定为考察上限。综上所述，各因素的优化水平为：释放介质温度为 37 ～ 45 ℃，释放介质中 BSA 浓度为 1%～ 2%，活塞泵流速为 8 ～ 16 ml/min。

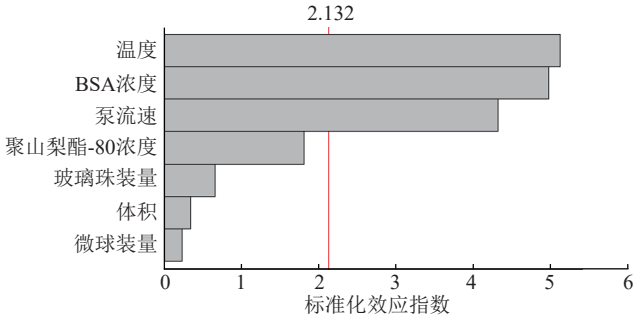


图 3 影响因素的标准化 Pareto 图

Fig.3 Standardized Pareto Graph of Influencing Factors

表 2 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Tab.2 Plackett-Burman Design and the Observed Responses

X_1/ml·min^{-1}	X_2/℃	X_3/%	X_4/mg	X_5/g	X_6/ml	X_7/%	Y/%
4	45	0.5	50	9	200	0.2	83.1
4	37	0.5	50	9	100	0.05	66.3
16	37	0.5	50	18	200	0.2	81.3
16	37	2	200	9	200	0.05	86.3
4	45	2	50	18	100	0.05	87.5
16	45	0.5	200	9	100	0.05	85.8
16	45	0.5	200	18	100	0.2	87.1
16	37	2.0	50	9	100	0.2	85.5
4	37	0.5	200	18	200	0.05	66.7
16	45	2	50	18	200	0.05	95.0
4	45	2	200	9	200	0.2	86.9
4	37	2	200	18	100	0.2	83.4

2.5.2.1 模型拟合

在上述试验结果的基础上进行星点设计 - 响应面法优化。本试验以释放介质温度、释放介质中 BSA 浓度、活塞泵流速为考察因素（设计因素水平见表 3），每因素设五水平，用代码值 －α、－1、0、1、+α 来分别表示，其中 0 为各因素水平范围的中值，α 为极值；为使试验设计具有“均一精密”和“可旋转”的性质，取 $\alpha=(F)^{1/4}=1.682$。简单拟合 **3** 微球的释放度与大鼠体内释放度的相关性：先找出相同时间点的体内释放量与体外释放量，得到 2 组数据，再将这 2 组数据进行线性回归，得到直线方程及相关系数 R^2（即实际拟合值）。将 R^2 作为评价指

表 3　星点设计因素水平表

Tab.3　Factors and Levels for Central Composite Design

因素	水平				
	－1.682	－1	0	1	1.682
X_1/ml·min^{-1}	8.00	9.69	12.00	14.31	16.00
X_2/℃	37.00	38.69	41.00	43.31	45.00
X_3/%	1.00	1.21	1.50	1.79	2.00

标进行优化，并运用 Design-Expert 8.06 软件对试验结果（表 4）用二项式进行拟合分析[12]。表 4 中第 15 ～ 20 次试验为 6 次重复的中心点试验，用于考察模型的误差[13]。

表 4　星点设计试验及结果

Tab.4　Application and Results of Central Composite Design

NO	因素			相关系数R^2	
	X_1	X_2	X_3	实际拟合值	预测值
1	－1	－1	－1	0.640	0.630
2	－1	1	－1	0.730	0.730
3	－1	－1	1	0.690	0.700
4	－1	1	1	0.820	0.820
5	1	－1	－1	0.800	0.800
6	1	1	－1	0.840	0.830
7	1	－1	1	0.740	0.740
8	1	1	1	0.800	0.810
9	0	－1.682	0	0.700	0.700
10	0	1.682	0	0.830	0.830
11	0	0	－1.682	0.750	0.760
12	0	0	1.682	0.810	0.800
13	－1.682	0	0	0.710	0.710
14	1.682	0	0	0.820	0.820
15	0	0	0	0.977	0.980
16	0	0	0	0.979	0.980
17	0	0	0	0.983	0.980
18	0	0	0	0.971	0.980
19	0	0	0	0.988	0.980
20	0	0	0	0.984	0.980

所得二项式模型的拟合方程为 R^2=－29.370 79+0.539 97X_1+1.203 09X_2+2.638 58X_3－2.811 04×10^{-3}X_2X_1－0.044 783X_3X_1+0.011 196X_2X_3－0.014 257X_1^2－0.014 257X_2^2－0.841 54X_3^2（r=0.996 6）。方差分析结果表明，拟合方程的 P=0.000 1<0.05，表明模型具有统计学意义；失拟项（P=0.085 2>0.05），说明精密度良好，误差可忽略，所得拟合方程可较好地预测试验结果。并且，释放介质温度与活塞泵流速对微球体内外相关系数的影响具有显著性，而 BSA 的浓度影响不大。

2.5.2.2　响应面法优化与预测

根据上述方程绘制自变量 X_1、X_2、X_3 对评价指标 R^2 的响应面和等高线图，见图 4。

由图 4 可见，每个响应面都具有其较优区域；从因素交互作用来看，释放介质温度、活塞泵流速及 BSA 浓度的交互影响在统计学上具有显著性意义[14]。利用 Design-Expert 8.06 软件将各响应面的较优区域进行重叠，得到较优的参数范围为：释放介质温度为 38.69 ～ 43.31 ℃、BSA 浓度为 1.21%～1.79%、活塞泵流速为 9.69 ～ 14.31 ml/min。结合表 3 中的考察范围，最终确定微球流通池体外释放度试验的条件为：释放介质温度 42.54 ℃，BSA 浓度 1.25%，活塞泵流速 10.55 ml/min。

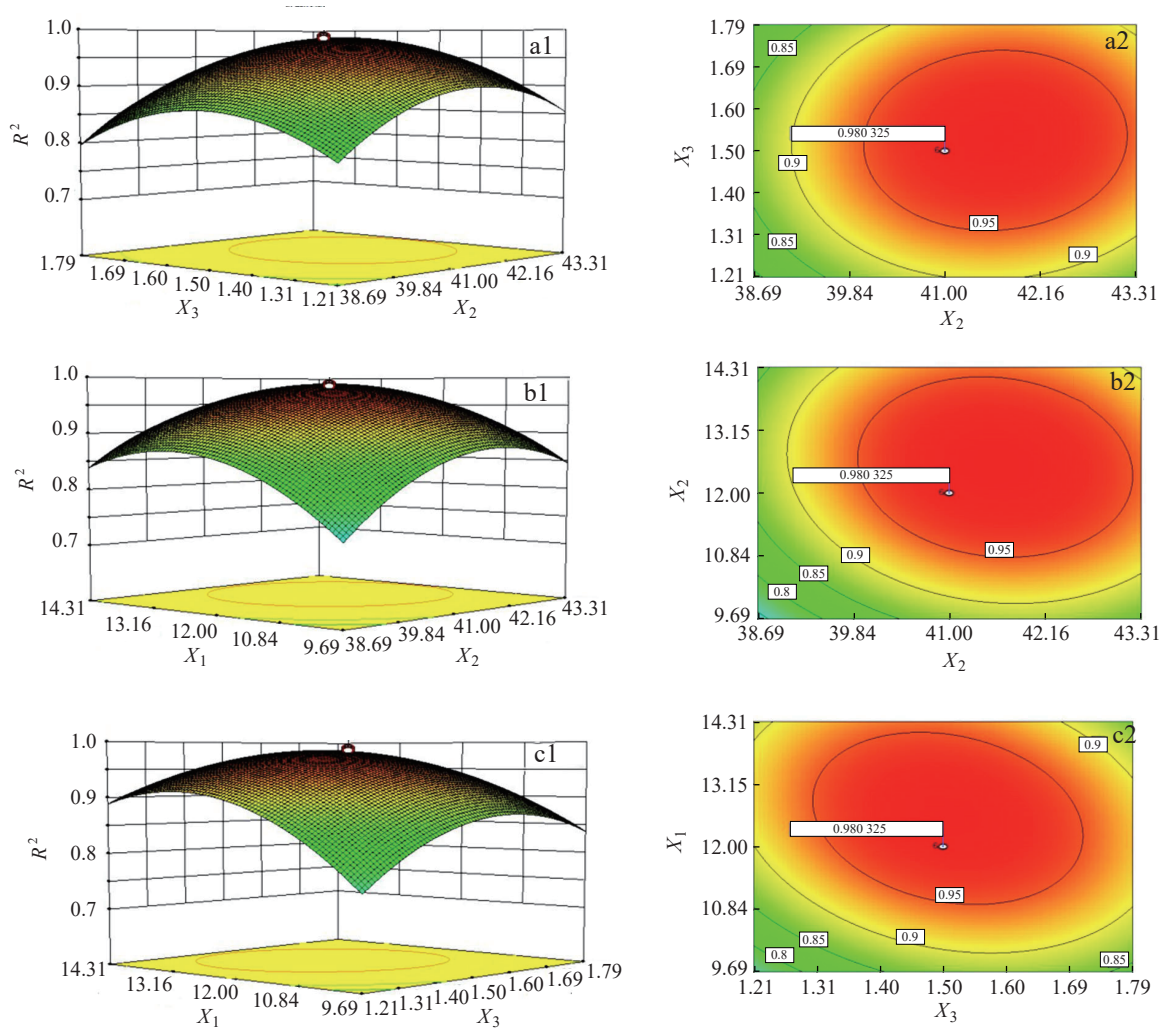
2.6　验证试验

称取“**2.2**”项下所得微球 100 mg，按“**2.5.2.2**”项下所得优化条件进行流通池体外释放试验，绘制释放曲线，结果见图 5a。将该曲线与 SD 大鼠体内药物释放曲线进行相关性拟合[15]，结果见图 5b。

由图 5 可见，微球的体内外释放均为 20 d，且微球在大鼠体内的释放较快。将微球在“**2.5.2.2**”项下的优化体外释药试验参数条件下所得的体外累积释放率（$Q_{体外}$）与对应时间的 SD 大鼠体内累积释药率（$Q_{体内}$）进行拟合，得到如下方程：$Q_{体外}$=0.770 0$Q_{体内}$+3.233 1（R^2=0.961 5）。由此可见，微球在该条件下所得的体外释放数据与体内数据相关性较好。值得注意的是，优选的体外释放试验温度高于大鼠的实际体温，原因有以下两方面。一方面，主要是微球在注射部位受生理性因素的影响，PLGA 在体内的降解速率快于体外，导致微球的体内释放快于体外释放。如果体外释放介质的温度模拟生物给药位置的环境温度，那么体外释放行为整体上会呈现滞后现象，与体内释放结果的相关性较差。另一方面，由于体外释放介质的温度与释放速率呈正相关，通过升高温度，可使微球中药物的体内外释放结果更接近，更好地表征微球的释药特性。

3　讨论

由于 **1** 原料药不稳定、**2** 原料药水溶性较好，二者均较难制成高载药量的微球。本试验首先对 **2** 进行经改盐处理后制得 **3**，提高了药物的脂溶性，



a1 和 a2：X_3 与 X_2 交互作用对 R^2 的影响，b1 和 b2：X_1 与 X_2 交互作用对 R^2 的影响，c1 和 c2：X_1 与 X_3 交互作用对 R^2 的影响

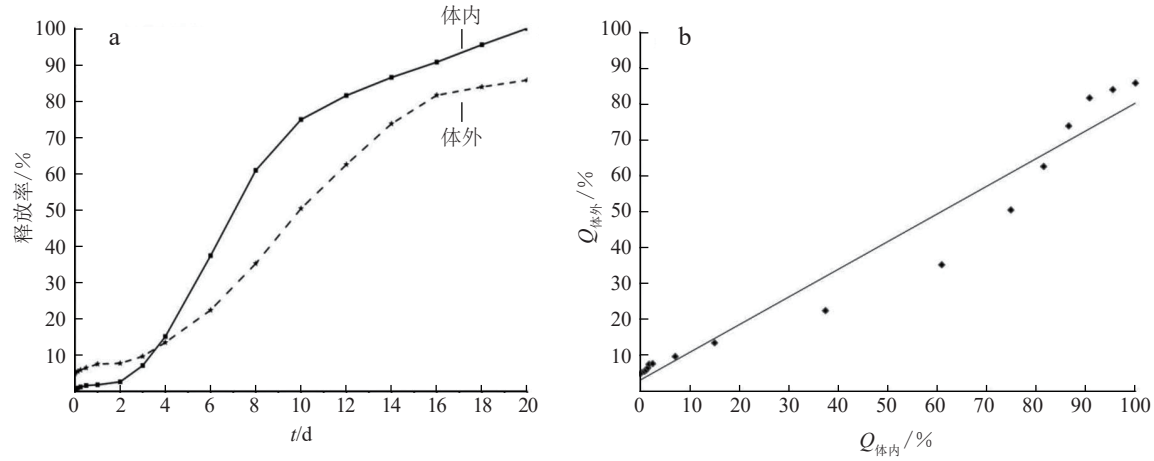
图 4　三维响应面和等高线图

Fig.4　Three-dimensional Response Surface Plots and Contour Maps

进而提高药物在微球中的载药量。再采用 Plackett-Burman 设计对流通池活塞泵流速、释放介质温度、释放介质中 BSA 浓度、微球装量、玻璃珠装量、释放介质体积与释放介质中聚山梨酯 -80 浓度进行初步筛选，观察到流通池活塞泵流速、释放介质温度、释放介质中 BSA 浓度为影响微球释放的显著影响因素；然后通过星点设计 - 响应面法继续优化，构建了体外释放试验参数的预测模型。设置星点设计中 3 个因素的试验水平时，要在保证各水平下物理量为正值的情况下尽可能使用较宽的区间范围，以确保所得响应面为理想的曲面。模型拟合结果中二项式（非线性模型拟合）得到了较理想的响应面[16]。

综上所述，选用 Plackett-Burman 设计与星点设计 - 响应面法相结合的方法可得到体内外相关性良好的体外释放度测定条件，达到通过体外试验预测微球在 SD 大鼠体内释放行为的目的。本试验可进一步为其他缓释微球制剂的体内外释放研究提供有效的试验数据及基础。

致谢：山东省抗体制药协同创新中心开放题（CIC-AD1807）给予资助。



a：释放曲线，b：相关性拟合结果

图 5　微球体内外释放曲线及相关性拟合结果

Fig.5　*In vivo* and *in vitro* Release Curves of Microspheres and Fitting Result of Correlation

参考文献：

[1] BASSIL N, GROSSBERG G T. Novel regimens and delivery systems in the pharmacological treatment of Alzheimer's disease [J]. *CNS Drugs*, 2009, **23**(4): 293-307.

[2] SCOTT L J, GOA K L. Galantamine: a review of its use in Alzheimer's disease [J]. *Drugs*, 2000, **60**(5): 1095-1122.

[3] 黄桂华. 关节腔注射用川芎嗪缓释PLGA微球的制备、体内外评价及药效学研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2010.

[4] 赵希青, 孙晓雷, 肖若蕾. PLGA微球的影响因素及控制技术[J]. 湖北科技学院学报: 医学版, 2015, **29**(5): 451-453.

[5] 李　勋, 韦　祎, 马光辉, 等. 缓释微球制剂的研究进展[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2017, **44**(6): 1-11.

[6] BHARDWAJ U, BURGESS D J. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems [J]. *Int J Pharm*, 2010, **388**(1/2): 287-294.

[7] 郝贵周, 杜丽平, 周苗苗, 等. 不同盐型对加兰他敏缓释微球性能影响的初步考察[J]. 中国医药工业杂志, 2020, **51**(8): 1017-1023.

[8] ARAGÓN D M, ROSAS J E, MARTÍNEZ F. Relationship between the solution thermodynamic properties of naproxen in organic solvents and its release profiles from PLGA microspheres [J]. *J Microencapsul*, 2013, **30**(3): 218-224.

[9] DU L, LIU S, HAO G, *et al*. Preparation and release profiles *in vitro/vivo* of galantamine pamoate loaded poly (lactideco-glycolide) (PLGA) microspheres [J]. *Front Pharmacol*, 2021, (11): 619327.

[10] 左朋礼, 王爱萍, 刘万卉. 罗替戈汀微球体外释放度的检查方法[J]. 光谱实验室, 2011, **28**(4): 2025-2027.

[11] 史亚军, 吴品江, 魏　萍. Plackett-Burman设计与星点设计-效应面法优化山楂总黄酮磷脂复合物制备工艺[J]. 中药材, 2010, **33**(3): 437-441.

[12] 王优杰, 谢亚林, 冯　怡, 等. 基于星点设计-效应面优化法的玄麦甘桔方提取液喷雾干燥工艺参数优化[J]. 中国新药杂志, 2013, **22**(12): 1385-1389.

[13] 彭　芳, 周凤梅, 刘万卉. 注射用缓释微球的体外释放度研究[J]. 齐鲁药事, 2011, **30**(5): 285-289.

[14] 于盼盼, 杨秋霞, 侯　琳, 等. 星点设计-效应面法优化盐酸鲁拉西酮片的处方[J]. 中国医药工业杂志, 2019, **50**(8): 890-897.

[15] 梅康康, 胡容峰, 马凤余, 等. 非诺贝特缓释微球片体内外相关性评价[J]. 中国医院药学杂志, 2008, **28**(12): 975-978.

[16] KENARI H S, ALINEJAD Z, IMANI M, *et al*. Effective parameters in determining cross-linked dextran microsphere characteristics: screening by Plackett-Burman design-of-experiments [J]. *J Microencapsul*, 2013, **30**(6): 599-611.