

· 实验研究 ·

超微粒制备系统制备利培酮长效注射微球

付寒^{1,2} 温新国¹ 王周华¹ 潘昕¹ 吴传斌^{1,2}

(1 中山大学药学院, 广州 510006; 2 广东省创新药物制剂工程技术研究中心, 广州 510006)

[摘要] 目的:制备利培酮长效注射微球并进行体外释药动力学考察。方法:选用聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(*D,L*-lactic-co-glycolic acid), PLGA] 为载体,采用新型超微粒制备系统制备利培酮 PLGA 微球。以转碟上聚合物析出量、丝状物的形成和微粒表面形态为考察指标单因素实验优化制备工艺参数及处方;观察微球表面形态,测定其粒径、包封率、考察其体外释药动力学。结果:20%和30%载药量的微球表面均光滑圆整,分散性好;其包封率分别为94.7%和93.94%,中值粒径分别为31.65和28.13 μm;持续释药时间均可达16 d,释放数据用释放动力学方程拟合符合一级和 Higuchi 方程。20%载药量微球1 h 释药率仅为4.2%,突释率低,且其释放速率和释放时间与市售利培酮微球(恒德[®])快速释放期基本一致而无延滞期。结论:超微粒制备系统(UPPS)可单步骤制备长效微球,工艺稳定,简单可行,有望成为一种适合工业微球制备技术。UPPS 制备的20%载药量微球可开发为释放2周的制剂,由于无释放延滞期,将比市售品更具临床优势。

[关键词] 超微粒制备系统;微球;利培酮;长效;聚乳酸-羟基乙酸共聚物

[中图分类号] R943.41; R971.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2012)07-0795-05

Risperidone-loaded long-acting injectable microspheres prepared by ultra-fine particle processing system

FU Han^{1,2}, WEN Xin-guo¹, WANG Zhou-hua¹, PAN Xin¹, WU Chuan-bin^{1,2}

(1 School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2 Guangdong Research and Development Center of Pharmaceutical Engineer, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare risperidone-loaded long-acting injectable PLGA microspheres and study its drug release dynamics *in vitro*. **Methods:** The microspheres were prepared by a novel ultra-fine particle processing system with poly(*D,L*-lactic-co-glycolic acid) as drug carrier. The process parameters and formulations were optimized by using single factor test with the amount of polymer deposited on the disk, formation of silk-shaped materials and appearances of microparticles as the indexes. The characteristics of the microspheres were evaluated by appearances, particle size, encapsulation efficiency and *in vitro* release. **Results:** The encapsulation efficiency of 20% and 30% drug-loaded microspheres, which were well dispersed and spherical with smooth surfaces, were 94.7% and 93.94% with mean diameter of 31.65 μm and 28.13 μm, respectively. The drug release profiles *in vitro* demonstrated a sustained release for 16 days and were fitted by first-order and Higuchi kinetics model. The drug release of 20% drug-loaded microspheres was only 4.2% at 1 h due to low initial burst release. The release rate and time were comparable with the marketed risperidone microspheres (Risperdal CONSTA[®]) but without lag phase. **Conclusion:** The preparation of drug-loaded microspheres by UPPS is single-step, highly reproducible, simple and feasible, which may be suitable for large-scale manufacture. 20% drug-loaded microspheres prepared by UPPS can be developed as a formulation which can release drug constantly for two weeks without lag phase. It has more clinical advantages over commercially available microspheres.

[作者简介] 付寒,女,硕士研究生。联系电话:(020)39943343, E-mail: fhsunny126@163.com。

[通讯作者] 吴传斌,男,博士生导师,主要从事缓控释制剂研究。联系电话:(020)39943117, E-mail: cbwu2000@yahoo.com。



[Key words] ultra-fine particle processing system; microspheres; risperidone; long-acting; poly(*D, L*-lactic-co-glycolic acid)

非典型抗精神分裂症药物利培酮(risperidone , RIS) 是一种具有独特平衡功能的选择性单胺拮抗剂, 对精神分裂症阳性和阴性症状均有良好疗效。锥体外系不良反应发生率低, 是 FDA 批准治疗精神分裂症的一线药物^[1]。精神分裂症易复发, 需频繁给药以维持治疗, 因而开发 RIS 的长效微球制剂具有重要意义。

目前制备技术是药物微球研究的重点, 其中乳剂溶剂挥发法的研究较为普遍^[2]。该技术多用表面活性剂制成乳剂, 再溶剂挥发固化成球; 药物易在不同溶剂相中扩散, 导致包封率较低, 或吸附在微球表面导致药物突释; 采用清洗步骤除去可能吸附的药物和残留溶剂, 工艺较难控制, 工业化制备较少应用。目前上市的药物微球产品多采用低温冷冻喷雾干燥法制备^[3], 一般先将药物和聚合物制成乳剂, 然后喷雾到液氮冷冻的冰乙醇中, 逐渐升温溶剂扩散, 聚合物析出固化成微球。其他制备方法如电喷雾法、微流控法、声激发法、喷墨打印法等^[4]大多需要特殊设备, 操作条件较为严苛, 应用局限性较大。

本实验组研制了一种新型的超微粒制备系统(ultra-fine particles preparing system ,UPPS) ^[5], 可应用于制备药物微球。UPPS 主要由转碟系统、绝热容器腔、气流控制系统和样品收集器等组成。UPPS 制备药物微球的工作原理为: 将溶液供应到转碟表面, 在转碟离心力作用下形成薄膜^[6-8], 液膜在转碟边沿受剪切力作用被雾化成微滴, 微滴被抛射进入容器腔内, 逐渐挥发溶剂固化成微球, 见图 1^[9]。本研究以 PLGA 为载体, 采用 UPPS 制备缓释药物约 2 周的利培酮长效微球, 考察了微球的外貌、粒径和包封率, 并研究了药物含量对体外释放速度的影响。目前, 作者尚未见国内用此种技术制备药物微球的报道。

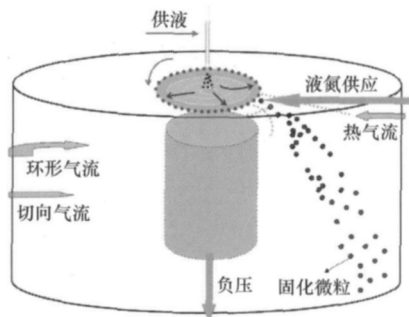


图 1 UPPS 工作原理示意图

仪器与试药

LC-10AT 岛津高效液相色谱仪(日本岛津公司); Anke TGL-16C 飞鸽牌系列离心机(上海安亭科学仪器厂); Quanta 200 型场发射环境扫描电子显微镜(美国 FEI 公司); Zetasizer Nano ZS90 激光粒度分析仪(英国马尔文公司); AB1352S 精密电子天平(梅特勒-托利多公司); HZS-H 水浴振荡器(哈尔滨市东明医疗仪器厂); DV-III+ 可编程控制式流变仪(美国 Brookfield 公司)。

RIS(山东齐鲁制药有限公司研究院赠, 纯度 99%); PLGA(50:50, $M_w = 40\ 000$, 山东岱罡生物技术有限公司); 二氯甲烷(dichloromethane ,DCM)、碳酸二甲酯(diethyl carbonate ,DMC)、乙酸乙酯(ethyl acetate ,Et-Ac) 等试剂均为国产分析纯。

方 法

1 微球的制备

采用 UPPS 制备微球。取处方量 PLGA 溶于 DCM、DMC、Et-Ac 或其中二者按一定比例的混合溶剂中, 完全溶解后得 PLGA 空白溶液。固定溶液浓度为 4.5% (*w/w*), 分别制备 PLGA: RIS 不同比例的含药聚合物溶液。将空白溶液或含药溶液用 UPPS 单步制备成固体微球。

2 微球表面形态观察

将适量干燥微球粉末固定在导电胶上, 真空条件下喷上金粉。用环境扫描电子显微镜 Quanta 200 观察微球的表面形态。

3 微球粒径分布的测定

将适量微球混悬于 0.5% CMC-Na 溶液(含 0.01% 聚山梨酯 80)中, 激光粒度分析仪测定微球的粒径大小和分布。微球粒径大小以中值粒径 $D_{0.5}$ 表示。

4 RIS 含量测定

4.1 HPLC 色谱条件 采用 HPLC 测定利培酮微球含量。选用菲罗门 Luna C_{18} 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-2% 三乙胺溶液(冰醋酸调节 pH 为 7.2 ± 0.1) (75:25) 为流动相; 设定柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$; 紫外检测波长为 277 nm; 流速为 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量为 20 μL 。以 RIS 的浓度为横坐标、峰面积为纵坐标线性回归, 得回归方程: $Y = 31\ 495X - 9\ 753.5$

($r=0.9999$) 表明 RIS 浓度在 $2 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

4.2 微球载药量和包封率的测定 平行精密称取微球约 5 mg 于 1 mL 二氯甲烷中, 超声 5 min 溶解, 充分破坏微球骨架结构。加入 10 mL 甲醇稀释, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 定容至 25 mL。适量液体经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液按 HPLC 法测定药物含量。按下式计算载药量 (drug loading, DL) 和包封率 (encapsulation efficiency, EE): $\text{DL}/\% = \text{微球中实际含药量} / \text{微球总重量} \times 100$, $\text{EE}/\% = \text{微球中药物含量} / \text{理论投药量} \times 100$ 。

5 微球体外释放动力学研究

精密称取微球约 5 mg 置 5 mL 离心管中, 加 pH 7.4 PBS 4 mL, 置 37°C 、 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温水浴振荡器中^[10], 在预设时间点取出离心管, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取尽释放液, 补充等量新鲜介质并涡旋使微球重新分散后置于恒温水浴振荡器中继续释放度试

验。取出液经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 续滤液同上述 HPLC 法检测药物释放量。实验中以 1 h 释放量作为微球突释的考察指标, 用 Q_{1h} 表示。

结 果

1 单因素实验优化 UPPS 制备条件

预实验结果表明 UPPS 法制备微球时转碟速度、供液速度; 溶液的溶剂、聚合物浓度、药物浓度都将影响药物微球的质量。通过单因素实验(见表 1)筛选出优化制备处方工艺为: 溶剂 DMC/DCM = 1/1 (w/w), 转碟转速 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 供液速度 $6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 溶液固含量 4.5% (w/w)。在此优化工艺条件下, 固定溶液固含量, 分别制备载药量为 10%、20% 和 30% 的利培酮微球。除载药量 10% 的利培酮微球呈球形聚集现象外(图未显示), 20% 和 30% 载药量的微球表面均光滑圆整, 分散性好, 见图 2 所示, 30% 载药量微球的圆整度和分散性更佳。

表 1 单因素实验结果

溶 剂	PLGA/%	RIS/%	转碟转速/ $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	供液速度/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	转碟上析出物	丝状物	微粒形貌
DCM	1.00	—	6000	6	无	无	轻微凹陷
DCM	3.00	—	6000	6	少量	无	球形
DCM	5.00	—	6000	6	较多	有	球形
DCM	7.00	—	6000	6	多	长丝	无粒子
Et-Ac	4.50	—	6000	6	少量	无	凹陷聚集
DMC	4.50	—	6000	6	无	无	凹陷聚集
DCM-DMCa	4.50	—	6000	6	无	无	球形聚集
DCM-DMC	4.50	—	3000	6	无	无	凹陷聚集
DCM-DMC	4.50	—	9000	6	有	有	球形聚集
DCM-DMC	4.50	—	6000	2	有	无	凹陷聚集
DCM-DMC	4.50	—	6000	12	无	无	凹陷聚集
DMC-DCM	4.05	0.45	6000	6	有	无	球形聚集
DCM-DMC	3.60	0.90	6000	6	有	无	球形
DCM-DMC	3.15	1.35	6000	6	无	无	球形

a: DCM-DMC(1:1 w/w)

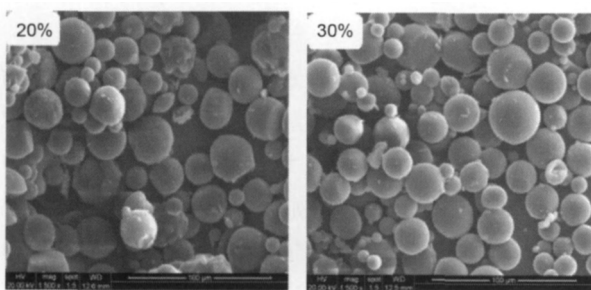


图 2 不同载药量微球的扫描电镜图

2 包封率和粒径分析

载药量 20% 和 30% 的利培酮 PLGA 微球, 测得其包封率分别为 $(94.7 \pm 1.07)\%$ 和 $(93.94 \pm 0.81)\%$ 表明微球包封率均较高, 药物基本被 PLGA 包裹; 中值粒径 $D_{0.5}$ 分别为 (31.65 ± 1.13) 和 $(28.13 \pm 0.41) \mu\text{m}$, 粒径分布窄, 一致性分别为 0.346 和 0.342, 见图 3, 显示载药量为 30% 较 20% 得到的微球粒径更小。

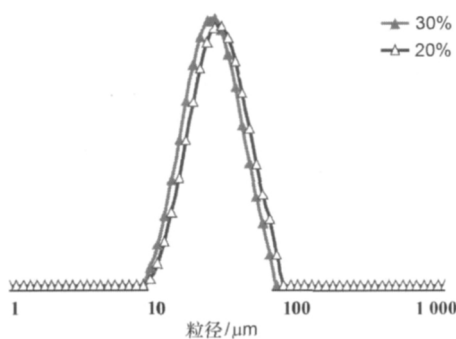


图3 利培酮微球粒度分布图

3 RIS-PLGA 微球体外释放动力学

分别考察载药量 20% 和 30% 微球的体外释放行为,并将其与上市利培酮微球(Risperdal Consta[®],中文商品名为恒德[®])进行比较。其释放曲线表明,恒德[®]中药物快速释放期发生在第 4~6 周共约 14 d,而前 3 周有一药物释放的停滞期。UPPS 制备

的微球释放无停滞期,且 20% 和 30% 载药量微球均可持续释药时间达 16 d 左右,30% 释放速度比 20% 稍快,20% 微球 1 h 释药率仅为 4.2%,突释率低,且其释放速率和维持释放时间基本与恒德[®]快速释放期一致,见图 4。2 种载药量微球释放动力学拟合结果显示较符合 Higuchi 方程和一级方程,表明药物在微球骨架中以扩散为主要释药模式,见表 2。

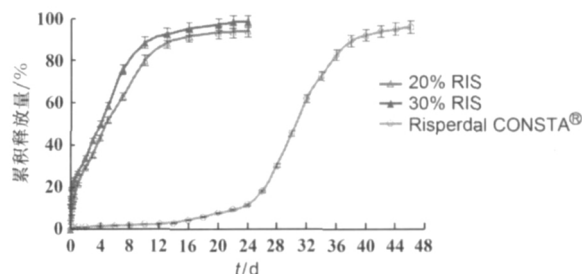


图4 利培酮 PLGA 微球的体外释放曲线

表2 利培酮微球体外释放动力学拟合结果

载药量	一级方程	Higuchi 方程
20%	$\ln(1-Q) = -0.0664t - 0.0181$ $r^2 = 0.9932$	$Q = 0.2396t^{1/2} - 0.0132$ $r^2 = 0.9926$
30%	$\ln(1-Q) = -0.0806t - 0.042$ $r^2 = 0.9894$	$Q = 0.2391t^{1/2} + 0.0535$ $r^2 = 0.9804$

4 工艺稳定性考察

按载药量为 30% 的微球处方同工艺制备 3 批微球,考察工艺的稳定性。结果见表 3。3 批微球的载药量、包封率、粒径和 1 h 药物突释量无显著性差异,表明处方和工艺重现性良好。

表3 3 批 30% 载药利培酮微球性质

批次	DL/%	EE/%	$D_{0.5}/\mu\text{m}$	$Q_{1h}/\%$
1	31.23	91.2	28.96	12.8
2	29.91	93.1	30.61	10.5
3	30.02	92.6	29.63	11.4
$\bar{x} \pm s$	30.39 ± 0.7	92.30 ± 0.98	29.73 ± 0.83	11.57 ± 1.16

讨论

微球制剂能降低患者用药频率,显著提高患者顺应性,同时维持血药浓度的稳定,因此备受关注。各种制备技术一直是开发微球制剂的研究重点,目前可适合工业化生产的方法非常有限,产业化是我

国发展注射用微球的难点。

UPPS 是一种简单物理机械化生产设备。通过转碟高速旋转产生的离心力将液体溶液雾化形成单分散微滴,飞旋入主体腔内挥干溶剂固化得到干燥微球。整个过程常温常压下制备,条件温和,方便操作,且单步完成,程序简单,工艺稳定,重现性好,可连续制备载药微球,有望成为一种适合工业化生产的微球制备技术。本研究以 PLGA 为载体材料,脂溶性药物利培酮为药物模型时,不用加入表面活性剂,无需复杂的后处理过程,药物极少损失,包封率较高,成功制备了利培酮 PLGA 微球。实验结果表明溶液固含量不变,小分子药物比例越大,制得微球形貌越光滑、圆整,分散性越好;可能是小分子药物相对比例增大,微粒密度增大,骨架刚性更强,微球体内部和表面固化速度达到一致,形成光滑密实的表面;同时聚合物相对比例下降,聚合物溶液的黏度随着含药量的增加逐渐降低,见图 5,旋转雾化过程中更易形成较小的液滴,溶剂挥发固化后得到的微球粒径较小。小粒径微球比表面积大,聚合物层相

对较薄,药物扩散阻碍降低,导致药物从微球中释放速度加快。

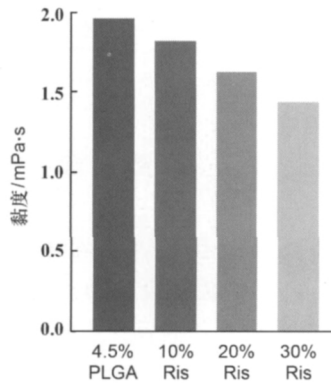


图5 溶液黏度与药物含量的关系

溶剂也极大地影响产物的形貌。PLGA 易成膜,以二氯甲烷为溶剂时,因挥发速度过快,PLGA 极易在转碟上析出成膜,影响产率。为降低溶剂的挥发速度,通过自增压液氮泵供应液氮至转碟底部可控制碟面温度在 20℃ 以下;同时在二氯甲烷中加入等量的碳酸二甲酯后,其挥发速度降低,析出现象明显降低,而微球形貌更加圆整。

目前已上市的利培酮微球恒德[®],临床使用时每 2 周肌内注射 1 次,减少了给药次数,显著提高了患者顺应性,为精神分裂症患者提供了一个先进可行的治疗选择^[11]。然而该制剂采用静态混合结合溶剂抽提法制得^[12],制备程序繁琐,导致其成本和市售价格均较高。且该制剂选用相对分子质量为 150 000 的 PLGA 为载体制备而成,降解速度缓慢,导致前 3 周有一个药物释放的停滞期,有效治疗浓度在给药后第 4 周才能达到,且仅维持 2 周。因此在给药的前 3 周,必须对患者给予合并使用足够量的口服抗精神分裂症药物,而在剂量调整后将无法预测治疗效果,给临床应用带来不便。本研究采用 UPPS 这种简单机械化生产方式,可连续制备出无延滞释放但可维持释放药物长达 2 周的微球,且突释率低。在以后的研究中通过进一步调整 UPPS 工作参数,筛选合适的 PLGA 型号和相对分子质量,并结合体内药代动力学研究,制备出可稳定释药 2 周或

2 周以上无延滞释放的新型利培酮注射微球,将在临床使用和提高患者顺应性上比恒德[®]更具优势,且可大大降低生产成本,应用前景广阔。

[参 考 文 献]

- [1] MUTHU MS, SINGH S. Studies on biodegradable polymeric nanoparticles of risperidone: *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Nanomedicine (Lond)* 2008 3(3): 305-319.
- [2] FREIBERG S, ZHU XX. Polymer microspheres for controlled drug release [J]. *Int J Pharm* 2004 282(1-2): 1-18.
- [3] GOMBOTZ W, HEALY M, BROWN L. Very low temperature casting of controlled release microspheres: US 5,019,400 [P]. 1991-05-28.
- [4] HUNG LH, TEH SY, JESTER J *et al.* PLGA micro/nanosphere synthesis by droplet microfluidic solvent evaporation and extraction approaches [J]. *Lab Chip* 2010 10(14): 1820-1825.
- [5] 吴传斌,温新国. 一种微球制造方法及制造设备: 中国, 101816913 A [P]. 2010-09-01.
- [6] LEACH J. Comparison of Faxen's correction for a microsphere translating or rotating near a surface [J]. *Phys Rev E* 2009 79(2): 1539-3755.
- [7] BRECHTELSBAUER C, LEWIS N, OXLEY P *et al.* Evaluation of a spinning disc reactor for continuous processing [J]. *Org Process Res Dev* 2001 5(1): 65-68.
- [8] BOODHOO KVK, JACHUCK RJ. Process intensification: spinning disk reactor for styrene polymerisation [J]. *Appl Therm Eng* 2000 20(12): 1127-1146.
- [9] WEN XG, PENG XS, FU HAN, *et al.* Preparation and *in vitro* evaluation of silk fibroin microspheres produced by a novel ultra-fine particle processing system [J]. *Int J Pharm* 2011 416: 195-201.
- [10] SU Z, SUN F, SHI Y *et al.* Effects of formulation parameters on encapsulation efficiency and release behavior of risperidone poly(D, L-lactide-co-glycolide) microsphere [J]. *Chem Pharm Bull* 2009 57(11): 1251-1256.
- [11] 王丽莉. 第一个长效非典型抗精神病药-注射用利培酮微球 [J]. *中国新药杂志* 2010 19(22): 2066-2069.
- [12] MESENS J, MICHAEL ER, THOMAS JA. Microencapsulated 3-piperidinyl-substituted 1,2-benzisoxazoles and 1,2-benzisothiazoles: US 6,368,632 B1 [P]. 2002-04-09.

编辑:周卓/接受日期:2011-11-21