

松萝酸自微乳的处方优化及质量评价^Δ

赵颖^{1*}, 宋婷¹, 屈梦华¹, 宋丹^{2#}, 胥秀英¹(1.重庆理工大学药学与生物工程学院, 重庆 400054; 2.重庆市药品技术审评认证中心, 重庆 400014)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0312-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.06

摘要 目的:制备松萝酸自微乳,优化其处方,评价其质量。方法:采用乳化法,以中链甘油三酯-单亚油酸甘油酯(1:1, *m/m*)为油相,聚氧乙烯化蓖麻油为乳化剂,二乙二醇单乙醚为助乳化剂,制备松萝酸自微乳。在溶解度试验和伪三元相图的基础上,以自乳化时间(*t*)、透光率(*T*)、药物平衡溶解度(*S*)、5 min和60 min时药物的累积溶出度($Q_{5\text{ min}}$ 、 $Q_{60\text{ min}}$)作为评价指标,采用星点设计-响应面法优化微乳处方中油相占比和乳化剂-助乳化剂质量比(K_m)。同时对最优处方进行验证试验,并对其形态、粒径、载药量、溶出度等进行考察。结果:最优处方中油相占比为25%、 K_m 为2.0,即处方中混合油相、乳化剂、助乳化剂的质量比分别为25%、50%、25%;最优处方所制松萝酸自微乳的*t*、*T*、*S*、 $Q_{5\text{ min}}$ 、 $Q_{60\text{ min}}$ 分别为1.96 min、87.67%、5.67 mg/g、66.58%、76.73%(RSD均小于3%, *n*=3),与预测值的相对误差均小于4%(*n*=3)。松萝酸自微乳经水稀释后为球形乳滴,乳化后平均粒径为39.4 nm,平均载药量为4.55 mg/g,在pH 6.8磷酸盐缓冲液中 $Q_{90\text{ min}}$ 为99.58%(*n*=3)。结论:所制松萝酸自微乳的质量符合相关要求。

关键词 松萝酸;自微乳;伪三元相图;星点设计-响应面法;质量评价

Formulation Optimization and Quality Evaluation of Usnic Acid Self-microemulsion

ZHAO Ying¹, SONG Ting¹, QU Menghua¹, SONG Dan², XU Xiuying¹(1.School of Pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China; 2.Chongqing Technical Center for Drug Evaluation & Certification, Chongqing 400014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Usnic acid self-microemulsion, prescription optimization and evaluate its quality. METHODS: Usnic acid self-microemulsion was prepared by emulsification method using medium chain triglycerides-single linoleic acid glyceride (1:1, *m/m*) as oil phase, polyoxyethylene hydrogenated castor oil as emulsifier, diethylene glycol monoethyl ether as co-emulsifier. Based on the solubility test and pseudoternary phase diagram, using self-emulsifying time (*t*), light transmittance (*T*), drug equilibrium solubility (*S*), accumulative dissolution rate at 5 min and 60 min ($Q_{5\text{ min}}$, $Q_{60\text{ min}}$) as evaluation indexes, central composite design-response surface methodology was utilized to optimize oil phase ratio and ratio of emulsifier to co-emulsifier (K_m) in microemulsion formulation. At the same time, the optimal formulation was verified, the morphology, particle size, drug-loading amount and dissolution of Usnic acid self-microemulsion were investigated. RESULTS: The optimal formulation was as follows as oil phase ratio of 25%, K_m of 2.0; ratio of mixed oil phase, emulsifier, co-emulsifier in the formulation was 25%, 50%, 25%; *t*, *T*, *S*, $Q_{5\text{ min}}$ and $Q_{60\text{ min}}$ of Usnic acid self-microemulsion prepared by optimal formulation were 1.96 min, 87.67%, 5.67 mg/g, 66.58%, 76.73% (all RSD < 3%, *n*=3), respectively. The relative errors of them to predicted values were all less than 4% (*n*=3). Usnic acid self-microemulsion was spherical droplet in shape after diluted with water. The average particle size was 39.4 nm, average drug-loading amount was 4.55 mg/g. $Q_{90\text{ min}}$ of Usnic acid self-microemulsion reached 99.58% in pH 6.8 phosphate buffer (*n*=3). CONCLUSIONS: Prepared Usnic acid self-microemulsion is in line with quality requirements.

KEYWORDS Usnic acid; Self-microemulsion; Pseudoternary phase diagram; Central composite design-response surface methodology; Quality evaluation

松萝酸(Usnic acid, UA)来源于地衣植物,具有抗菌^[1]、抗肿瘤^[2-3]、新生血管抑制^[4]、促进皮肤创伤愈合等^[5]药理活性,尤其在抗菌和抗肿瘤方面具有较好的应用前景。UA对临床分离的万古霉素抗性肠球菌和耐甲氧西

林金黄色葡萄球菌等耐药菌株显示出较强的抗耐药菌株活性^[6];在抗肿瘤方面,UA为一种非基因毒抗癌药,在杀灭癌细胞的同时兼具新生血管抑制作用^[7],有望成为新的癌症化疗候选先导化合物。UA为难溶性药物^[8],本课题组前期对UA理化性质的研究表明其溶解度和溶出度较低,限制了UA的进一步开发,近年来国内外也尚未见UA相关制剂上市。

自微乳释药系统的处方组成包含药物、油相、乳化剂和助乳化剂,能被水无限稀释形成粒径介于10~100 nm之间的微乳,由于其处方组成特殊,可作为难溶性、

^Δ 基金项目:重庆市科学技术委员会基础与前沿研究计划项目(No.CSTC2014JCYJA10037)

* 副教授,博士。研究方向:中药新药研究。电话:023-62563622。E-mail:zhy@cqut.edu.cn

通信作者:副主任药师,博士。研究方向:中药新药研究和药品注册审评。电话:023-60353873。E-mail:songdan1995@163.com

难吸收性药物的理想载体^[9]。药物制成自微乳后既可增加药物的溶解度^[10]和溶出度^[11],又可进一步与亲水性骨架型储库制备成微乳经皮给药系统^[12],提高药物稳定性,增加药物经皮渗透量^[13]等。本研究通过乳化法制备UA自微乳,并采用星点设计-响应面法^[14]优化其处方,以期改善UA的溶解度和溶出度。

1 材料

1.1 仪器

Waters 2695-2996 高效液相色谱(HPLC)仪(美国Waters公司);AUW-220D 电子天平(日本岛津公司);XW-80A 漩涡混合器(上海医科大学仪器厂);SB2200 超声清洗机[必能信超声(上海)有限公司];RC-6 溶出试验仪(天津大学无线电厂);RISE-2008 激光粒度分析仪(济南润之科技有限公司);H-7000 透射电镜(日本日立公司)。

1.2 药品与试剂

UA 对照品(陕西森弗生物技术有限公司,批号:150607,纯度:≥98%);UA 原料药(由重庆理工大学药学与生物工程学院实验室从药用地衣植物雪地茶中分离纯化得到,批号:141220,经 HPLC 法测定纯度:98%);肉豆蔻酸异丙酯(IPM)、聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯氢化蓖麻油(德国巴斯夫公司);单亚油酸甘油酯、单油酸甘油酯、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯、二乙二醇单乙基醚、中链甘油三酯、聚甘油-3 双硬脂酸酯(法国嘉法狮公司);大豆卵磷脂、油酸、油酸丁酯、蓖麻油、聚山梨酯 80、烷基酚聚氧乙烯醚 OP 乳化剂、丙二醇、丙三醇、乙二醇、聚乙二醇 400 等均为药用级,甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 UA 的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Sepax Sapphire C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-[50 mmol KH₂PO₄-三乙胺(500:1)](70:30, V/V);流速:1 mL/min;紫外检测波长:285 nm;柱温:40 ℃;进样量:10 μL。

2.1.2 溶液的制备 对照品溶液:精密称取 UA 对照品适量,加少量氯仿溶解后用甲醇稀释制成质量浓度为 126.00 μg/mL 的溶液,即得。供试品溶液:精密称取 UA 自微乳 50 mg,置于 10 mL 量瓶中,加流动相超声(功率:500 W,频率:40 kHz,下同)10 min,溶解后稀释至刻度,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。空白辅料样品溶液:精密称取不含 UA 的空白自微乳,按供试品溶液制备方法制备成空白辅料样品溶液。

2.1.3 专属性试验 将对照品溶液、供试品溶液和空白辅料样品溶液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果显示,供试品溶液和对照品溶液在 285 nm 波长处均有较好吸收,吸光度稳定,而空白辅料样品溶液在 285 nm 波长处无明显吸收,表明辅料对 UA 的测定无干扰。理论板数按 UA 计

不低于 3 000。

2.1.4 线性关系考察 精密吸取 UA 对照品溶液适量,分别制成质量浓度为 1.97、3.94、7.88、15.75、31.50、63.00、126.00 μg/mL 的系列标准溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以对照品的质量浓度为横坐标(x)、峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,得回归方程 $y=6.50 \times 10^7 x - 11\ 667$ ($r=0.999\ 9$),结果表明,UA 在 1.97~126.00 μg/mL 质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.5 精密度的试验 分别取“2.1.4”项下低、中、高质量浓度(1.97、31.50、126.00 μg/mL)的 UA 对照品溶液,于同日内重复进样 5 次,考察日内精密度的;连续进样 5 d,考察日间精密度的。结果,低、中、高质量浓度的 UA 对照品溶液的日内 RSD 分别为 1.25%、0.93%、0.65% ($n=5$),日间 RSD 分别为 0.86%、0.34%、0.78% ($n=5$),表明本方法精密度的良好。

2.1.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液,分别于室温放置 1、2、4、8、16、24 h 进样测定,记录峰面积。结果,峰面积的 RSD 为 0.90% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 稳定。

2.1.7 重复性试验 称取 UA 自微乳 6 份,每份 50 mg,精密称定,分别置于 10 mL 量瓶中,加流动相超声 10 min,溶解后稀释至刻度,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,进样测定,记录峰面积。按外标法以峰面积计算 UA 的含量。结果,UA 含量的 RSD 为 0.54% ($n=6$),表明本方法重复性的良好。

2.1.8 准确度试验 精密称取 UA 对照品及相应处方量的辅料 9 份,每份 25 mg,置于 10 mL 量瓶中,分别按照 80%、100%、120% 的目标浓度精密加入相应量的 UA 对照品溶液,用流动相稀释定容,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,进样测定,记录峰面积,计算回收率。结果,80%、100%、120% 目标浓度溶液的回收率分别为 100.34%、100.37%、99.77%,RSD 分别为 0.97%、0.60%、0.19% ($n=3$),表明本方法准确度符合方法学相关要求。

2.2 UA 在各辅料中的溶解度测定

将过量 UA 原料药分别加入到装有 1 mL 油相(分别为中链甘油三酯、蓖麻油、单油酸甘油酯、油酸丁酯、单亚油酸甘油酯、肉豆蔻酸异丙酯、油酸)、不同乳化剂(分别为 OP 乳化剂、聚山梨酯 80、聚氧乙烯氢化蓖麻油、大豆卵磷脂、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯、聚氧乙烯蓖麻油、聚甘油-3 双硬脂酸酯)、不同助乳化剂(分别为丙三醇、二乙二醇单乙基醚、聚乙二醇 400、丙二醇、乙二醇)的 EP 管中,涡旋分散后,在 37 ℃ 水浴中振荡平衡 72 h,10 000 r/min(离心半径为 6 cm)离心 15 min,取上清液用甲醇稀释至适当质量浓度,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取滤液按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,计算 UA 在各辅料中的溶解度,结果见图 1。

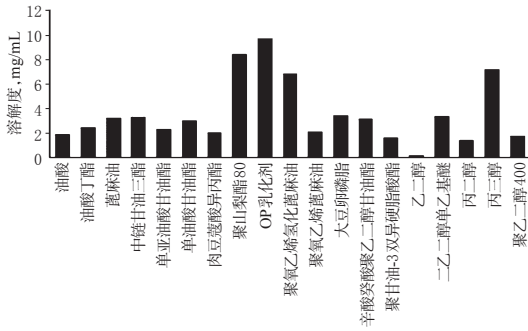


图1 UA在不同辅料中的溶解度(n=3)

Fig 1 Solubility of usnic acid in various excipients (n=3)

由图1结果显示,油相中UA的溶解度大小依次为:中链甘油三酯>蓖麻油>单油酸甘油酯>油酸丁酯>单亚油酸甘油酯>肉豆蔻酸异丙酯>油酸;乳化剂中UA的溶解度大小依次为:OP乳化剂>聚山梨酯80>聚氧乙烯化蓖麻油>大豆卵磷脂>辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯>聚氧乙烯蓖麻油>聚甘油-3双硬脂酸酯;助乳化剂中UA的溶解度大小依次为:丙三醇>二乙二醇单乙基醚>聚乙二醇400>丙二醇>乙二醇。

2.3 油相、乳化剂和助乳化剂的初步筛选

根据“2.2”项下溶解度结果,以蓖麻油、中链甘油三酯、单亚油酸甘油酯、单油酸甘油酯等油相,分别与“2.2”项下乳化剂以2:3的质量比进行配伍,绘制伪三元相图,以透光率大于90%、外观澄清透明以及自乳化时间越短为评价标准。结果,以中链甘油三酯、单亚油酸甘油酯、单油酸甘油酯为油相时,分别与聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯化蓖麻油为乳化剂时配伍形成微乳的能力较强。

2.4 乳化剂和助乳化剂的筛选

固定中链甘油三酯为油相,将OP乳化剂、聚山梨酯80、聚氧乙烯化蓖麻油、聚氧乙烯蓖麻油、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯分别与助乳化剂丙三醇、二乙二醇单乙基醚以2:1的质量比混合形成混合乳化剂,再向上述混合乳化剂中分别加入20%的中链甘油三酯,混匀后加超纯水涡旋混匀直到形成水包油(O/W)型微乳。以“2.3”项下评价标准考察各体系形成微乳的能力,初步筛选乳化剂和助乳化剂的种类。结果表明,聚氧乙烯化蓖麻油与二乙二醇单乙基醚配伍能形成较理想的微乳,因此确定聚氧乙烯化蓖麻油为乳化剂,二乙二醇单乙基醚为助乳化剂。

2.5 伪三元相图筛选油相

固定乳化剂为聚氧乙烯化蓖麻油,助乳化剂为二乙二醇单乙基醚,乳化剂-助乳化剂质量比(K_m)为2,选择油相对UA溶解能力较大的中链甘油三酯、单油酸甘油酯、蓖麻油、单亚油酸甘油酯为油相。采用滴定法,精密称取不同量的油相、乳化剂和助乳化剂混合配制成一定比例的混合溶液,在搅拌状态下逐渐滴加超纯水,以外观“澄清透明”为指标,记录临界加水量,按油相、水

相、混合乳化剂在临界点的各自质量百分数绘制伪三元相图。以微乳区(伪三元相图中曲线的右边为微乳液区域)面积最大为标准筛选油相。结果显示,分别单独以蓖麻油、中链甘油三酯、蓖麻油、单亚油酸甘油酯为油相时,形成的微乳区较小,当油相比比例小于10%时,才能被无限稀释,保持微乳状态。但将中链甘油三酯和单亚油酸甘油酯两种油相以1:1的质量比混合使用时,能显著增加无限稀释的微乳区,油相比比例可达到50%。根据相图结果确定油相为中链甘油三酯-单亚油酸甘油酯(1:1, m/m),油相比比例为10%~50%。

2.6 伪三元相图结合溶解量筛选 K_m

以中链甘油三酯-单亚油酸甘油酯(1:1, m/m)为混合油相,聚氧乙烯化蓖麻油为乳化剂,二乙二醇单乙基醚为助乳化剂,按“2.5”项下方法绘制伪三元相图,考察不同 K_m (0.5、1、2、2.5、3、3.5、4) 对微乳形成的影响。结果,当 K_m 为0.5和1时,能形成微乳区,但微乳面积较小;当 K_m 为2~4时,随着 K_m 值的增加,形成微乳区面积相应增加,但增加到一定程度后,微乳区内会出现高黏度的液晶凝胶相,再结合溶解量的结果,最终选择 K_m 为1~2.5。

2.7 星点设计-响应面法优化载油量和 K_m

2.7.1 星点设计 选择对微乳形成有显著影响的油相比比例[混合油相中链甘油三酯-单亚油酸甘油酯(1:1, m/m)的质量百分数](X_1)与 K_m (X_2) 为考察因素,以自乳化时间(t)、透光率(T)、药物平衡溶解度(S)、5 min和60 min时药物的累积溶出度($Q_{5\text{min}}$ 、 $Q_{60\text{min}}$)为评价指标,采用星点设计筛选处方。因素与水平见表1。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

| 变量 | 水平 | | | | |
|-----------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | -1.414 | -1 | 0 | 1 | 1.414 |
| $X_1, \%$ | 10.00 | 15.86 | 30.00 | 44.14 | 50.00 |
| X_2 | 1.00 | 1.22 | 1.75 | 2.28 | 2.50 |

各因素的极大和极小水平根据有效自微乳化区域确定,星点设计与结果见表2。

表2 星点设计与结果

Tab 2 Design and results of central composite test

| 序号 | 因素 | | t, min | T, % | S, mg/g | $Q_{5\text{min}}, \%$ | $Q_{60\text{min}}, \%$ |
|----|-----------|-------|-----------------|-------|---------|-----------------------|------------------------|
| | $X_1, \%$ | X_2 | | | | | |
| 1 | 44.14 | 2.28 | 5 | 60.00 | 4.337 | 74.37 | 92.15 |
| 2 | 44.14 | 1.22 | 3 | 64.83 | 4.202 | 80.31 | 87.18 |
| 3 | 15.86 | 2.28 | 1 | 99.08 | 5.510 | 76.68 | 90.91 |
| 4 | 15.86 | 1.22 | 3 | 90.61 | 5.067 | 80.21 | 89.82 |
| 5 | 50.00 | 1.75 | 10 | 48.75 | 3.940 | 60.98 | 69.04 |
| 6 | 10.00 | 1.75 | 3 | 99.31 | 5.322 | 74.64 | 91.58 |
| 7 | 30.00 | 2.50 | 15 | 93.54 | 4.935 | 68.71 | 99.32 |
| 8 | 30.00 | 1.00 | 8 | 76.89 | 4.533 | 68.15 | 74.05 |
| 9 | 30.00 | 1.75 | 2 | 95.72 | 4.970 | 83.31 | 96.18 |
| 10 | 30.00 | 1.75 | 2 | 92.95 | 4.833 | 80.37 | 95.00 |
| 11 | 30.00 | 1.75 | 2 | 95.92 | 4.721 | 81.46 | 97.28 |
| 12 | 30.00 | 1.75 | 2 | 93.33 | 4.738 | 78.98 | 97.72 |
| 13 | 30.00 | 1.75 | 2 | 94.84 | 4.747 | 84.47 | 98.67 |

2.7.2 模型拟合 以 t 、 T 、 S 、 $Q_{5\text{min}}$ 、 $Q_{60\text{min}}$ 为因变量(Y), X_1 和 X_2 为自变量, 使用Statistic 7.0软件, 分别对各因素的各水平进行多元线性回归和二项式方程拟合。结果表明, t 、 T 、 S 、 $Q_{5\text{min}}$ 、 $Q_{60\text{min}}$ 的多元线性方程中相关系数(R)分别为0.424、0.845、0.975、0.346、0.585, 普遍水平偏低, 而各因变量与各自变量的各水平进行非线性拟合效果较好, 其中二项式方程为: $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_1X_2+b_4X_1^2+b_5X_2^2$, 二项式方程中各参数的数值和方程的相关系数见表3。

表3 二项式方程中各参数的数值和方程的相关系数

Tab 3 Coefficients of regression equations for the responses

| Y | 参数 | | | | | R | P | |
|--------------------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|---------|-------|
| | b_0 | b_1 | b_2 | b_3 | b_4 | | | b_5 |
| t | 40.040 | -0.336 | -42.154 | 0.133 | 0.004 | 11.567 | 0.751 4 | <0.01 |
| T | -4.659 | 2.724 | 80.931 | -0.444 | -0.053 | -17.488 | 0.990 4 | <0.01 |
| S | 4.465 | 0.001 | 0.701 | -0.010 | -0.001 | -0.035 | 0.986 2 | <0.01 |
| $Q_{5\text{min}}$ | 20.677 | 1.305 | 52.710 | -0.080 | -0.023 | -14.955 | 0.733 6 | <0.01 |
| $Q_{60\text{min}}$ | 26.881 | 1.490 | 49.743 | 0.129 | -0.034 | -12.505 | 0.832 9 | <0.01 |

2.7.3 响应面优化 采用Origin 8.0软件, 描绘不同自变量与因变量的响应面图, 结果见图2。

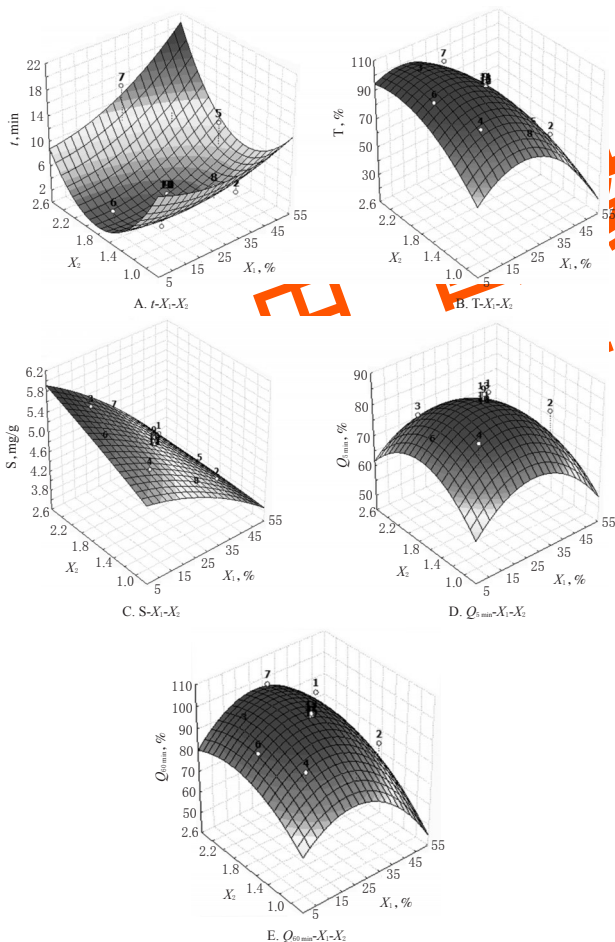


图2 自变量与因变量的响应面图

Fig 2 Response surface diagram of independent variables and dependent variables

由图2显示, 固定 X_2 时, 随着 X_1 的增加, 自乳化速度呈现变慢的趋势, 所需 t 延长。固定 X_2 时, 随着 X_1 的增

加, 乳剂的 T 先增加后下降, 当 X_1 超过45%时, 乳剂 T 小于60%, 此时乳剂不再呈现透明或半透明, 粒径也超出了微乳所限定范围; X_1 在10%~45%范围时, 随着 X_2 的增加 T 呈上升趋势。在 X_1 固定时, 随着 X_2 的增加 S 呈增加趋势, 但是当 X_1 大于30%时, S 的增加幅度大大下降; 固定 X_2 时, 增加 X_1 则会导致体系载药量下降。由“2.2”项下结果表明, UA在聚氧乙烯氢化蓖麻油中的溶解度最大, 所以微乳对UA的增溶能力主要依赖于体系中乳化剂用量。当 X_1 固定时, UA自微乳的 $Q_{5\text{min}}$ 随 X_2 的增加先增加后减小, $Q_{60\text{min}}$ 随 X_2 的增加而增加; 当 X_2 固定时, UA自微乳的 $Q_{5\text{min}}$ 随 X_1 的增加先增加后减小, $Q_{60\text{min}}$ 随 X_1 的增加先增加后减小。在 X_2 较小而 X_1 较大时, 表面活性剂促进微乳形成的能力降低, 粒径偏大, 并且对药物增溶能力也随之降低, 药物可能会在稀释过程中析出, 因此降低了药物的累积溶出度。根据上述结果, 综合考察指标, 确定空白自微乳处方中 X_1 为25%、 X_2 为2, 即处方中油相、乳化剂、助乳化剂的占比分别为25%、50%、25%。

2.7.4 验证试验 按“2.7.3”项下确定的处方量制备UA自微乳, 考察其 t 、 T 、 S 、 $Q_{5\text{min}}$ 、 $Q_{60\text{min}}$, 并以实测值与预测值的相对误差[%, (预测值-真实值)/预测值×100%]大小来考察所建数学模型的预测性。结果显示, t 、 T 、 S 、 $Q_{5\text{min}}$ 、 $Q_{60\text{min}}$ 实测值与预测值的相对误差均小于4% (RSD均小于3%, $n=3$), 表明所建立的数学模型预测性良好, 详见表4。

表4 验证试验结果($n=3$)

Tab 4 Results of validation test ($n=3$)

| 指标 | 预测值 | 实测值 | RSD, % | 相对误差, % |
|------------------------|-------|-------|--------|---------|
| t , min | 1.98 | 1.96 | 2.34 | 1.61 |
| T, % | 87.71 | 87.67 | 0.87 | 2.59 |
| S, mg/g | 5.72 | 5.67 | 2.06 | 3.69 |
| $Q_{5\text{min}}$, % | 66.56 | 66.58 | 2.63 | 1.29 |
| $Q_{60\text{min}}$, % | 76.78 | 76.73 | 2.42 | 3.67 |

2.8 自微乳中UA加入量的确定

向优化的1g空白自微乳中分别加入4、5、6mg的UA原料药, 考察其溶解时间和乳化后的粒径。结果表明, UA加入量分别为4、5mg时, UA在空白自微乳中的溶解时间分别为37、45min, 乳化后粒径分别约为39.2、40.7nm。UA加入量为6mg时, 3h内UA无法完全溶解, 乳化后粒径跨距较大, 不利于载药自微乳的制备, 药物在空白自微乳处方中溶解达到过饱和, 易析出。在溶解时间和乳化后粒径差异不大的情况下, 以最大的载药量为宜, 因此确定自微乳的投药量为5mg/g。

2.9 UA自微乳的制备

称取处方量的混合油相中链甘油三酯和单亚油酸甘油酯(1:1, m/m)、聚氧乙烯氢化蓖麻油、乙二醇单乙基醚置于具塞三角锥形瓶中, 在50℃水浴中混合均匀后, 加入UA, 置于37℃水浴中缓慢振荡直至形成透明、均一溶液, 即得UA自微乳。

2.10 UA自微乳的含量测定

精密称取UA自微乳50mg, 平行3份, 分别置于10

mL量瓶中,加甲醇超声10 min溶解后稀释至刻度,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,按“2.1.1”项下方法测定UA峰面积,按外标法计算UA含量。结果显示,UA自微乳中UA含量分别为4.58、4.52、4.55 mg/g,平均含量为4.55 mg/g(RSD=0.66%,n=3)。

2.11 UA自微乳的形态观察

将UA自微乳用水稀释100倍后,经0.22 μm微孔滤膜滤过,点样于铜网,1%磷钨酸负染,滤纸吸干染液,采用透射电镜观察其形态。结果显示,UA自微乳经水稀释后形成较为均一的球形乳滴。透射电镜图见图3。

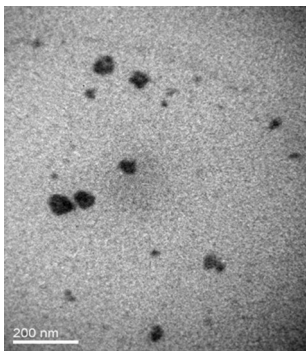


图3 UA自微乳的透射电镜图

Fig 3 TEM of Usnic acid microemulsion

2.12 UA自微乳的粒径测定

将3批次的UA自微乳分别用超纯水稀释100倍形成微乳,使用激光粒度分析仪测定其粒径。结果显示,3批次的UA自微乳的粒径分别为38.0、40.0、40.2 nm(n=3),平均粒径为39.4 nm(RSD=3.09%,n=3)。粒径分布图见图4。

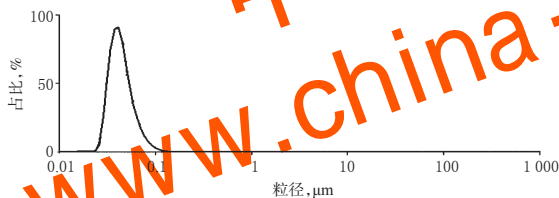


图4 UA自微乳的粒径分布图

Fig 4 Particle size distribution of Usnic acid microemulsion

2.13 UA自微乳的体外溶出度测定

采用智能溶出仪,将UA自微乳(相当于4.55 mg/g UA)填装到胶囊中,每份0.5 g。分别以250 mL超纯水、0.1 mol/L的盐酸和pH 6.8磷酸盐缓冲液(PBS)为溶出介质,转速50 r/min,温度(37±0.5)℃,分别于5、10、20、30、45、60、90、120、180 min时取样5 mL,并同时补足等温等量的溶出介质,取样液经0.45 μm微孔滤膜滤过,进样测定UA含量,绘制体外溶出曲线。不同介质中UA自微乳的体外溶出曲线见图5。

由图5显示,在pH 6.8 PBS中90 min时,UA的溶出度 $Q_{90\text{ min}}$ 达到99.58%(n=3),在180 min内UA释放完全。UA自微乳的体外溶出研究应选择pH 6.8 PBS为溶出介质较为适宜。

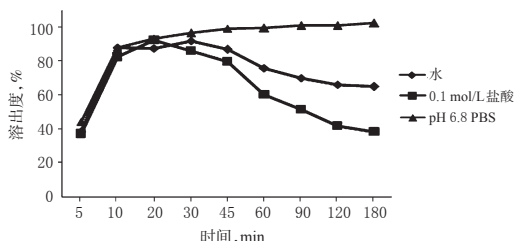


图5 不同介质中UA自微乳的体外溶出曲线(n=3)

Fig 5 Dissolution curves of Usnic acid microemulsion in different media(n=3)

3 讨论

UA自微乳的体外释放研究,测定的UA含量是体系中各种存在形式的药物含量的总和,包括游离药物、胶束中的药物和微乳乳滴中的药物,而不是单纯的游离药物^[15]。因此,药物的自微乳化给药系统的溶出度试验不是传统意义上的药物分子从制剂体系中的溶出。从UA自微乳在不同溶出介质的体外溶出度数据可知,以水和0.1 mol/L的盐酸为溶出介质时,45 min后UA的含量明显下降,表明该系统经溶出介质稀释后,胶束和微乳乳滴在水和0.1 mol/L盐酸中不稳定,药物不断从胶束中和微乳乳滴中释放累积,而体系不具有较高的增溶能力,导致药物最终析出;而以pH 6.8 PBS为溶出介质时,自微乳中各种药物存在形式均较稳定,不易受到破坏而导致药物析出,因此UA自微乳的体外溶出度研究应选择pH 6.8 PBS为溶出介质较为适宜。

优良的自微乳不仅要求有很强的自乳化能力,同时也需要系统有较高的载药量,UA为典型的难溶性药物,在水中的溶解度小于0.01 g/100 mL,在前期试验研究中测得UA的油水分配系数为2.936,符合制备自微乳的条件。本文成功制得符合质量相关要求的UA自微乳,可为后续UA新型经皮给药系统的进一步研究开发提供一定参考。

参考文献

- [1] MACIAG-DORSZYNSKA M, WEGRZYN G, GUZOW-KRZEMINSKA B. Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 353(1):57-62.
- [2] 郝凯华,韩涛,胡鹏斌.松萝酸抑制小鼠H₂₂肿瘤生长及作用机制研究[J]. *中国药师*, 2016, 19(1):29-32.
- [3] 唐燕霞,包海鹰,王新斌,等.硬枝树花中抑制H₂₂荷瘤小鼠肿瘤的活性成分研究[J]. *菌物学报*, 2015, 34(2):278-286.
- [4] SONG Y, DAI F, ZHAI D, et al. Usnic acid inhibits breast tumor angiogenesis and growth by suppressing VEGFR2-mediated AKT and ERK1/2 signaling pathways[J]. *Angiogenesis*, 2012, 15(3):421-432.
- [5] 邹慧蛟,高利.松萝酸合成物对大鼠伤口愈合的影响[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2017(5):20-21.
- [6] ELO H, MATIKAINEN J, PELTTARI E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical iso-

盐霉素纳米结构脂质载体的制备及处方优化^Δ

韩翠艳^{1*}, 金珊珊^{1,2}, 王晓丽¹, 简白羽¹, 隋小宇¹, 曹立新³(1.齐齐哈尔医学院药学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2.北京万全德众医药科技股份有限公司制剂部, 北京 100000; 3.齐齐哈尔医学院第一附属医院骨科, 黑龙江齐齐哈尔 161041)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)03-0317-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.03.07

摘要 目的:制备盐霉素纳米结构脂质载体(Sal-NLCs)并优化处方。方法:采用熔融乳化-低温固化法制备Sal-NLCs。采用星点设计-响应面法,以粒径、Zeta电位、包封率、载药量为评价指标,优化处方中Sal用量、油相中固态脂质双硬脂酸甘油酯与液态脂质辛酸甘油酯的质量比、表面活性剂聚氧乙烯35蓖麻油(EL)与聚乙二醇-15-羟基硬脂酸酯(HS15)的质量比及聚氧乙烯(40)硬脂酸酯(P40)的用量。考察所制Sal-NLCs的外观形态、粒径、多分散指数(PDI)、Zeta电位、包封率、载药量和体外释药机制。结果:最优处方为Sal 0.86 mg、双硬脂酸甘油酯40.70 mg、辛酸甘油酯11.30 mg、EL 44.05 mg、HS15 7.95 mg、P40 3.8 mg;所制Sal-NLCs呈类圆形、分布均匀,粒径为(81.81±2.60)nm、PDI为0.183±0.042、Zeta电位为(-24.9±3.4) mV、包封率为(94.35±1.50)%、载药量为(1.47±0.04)%(n=5),24 h内累积释放度达到(99.81±3.90)%(n=3),释放行为符合Higuchi模型,其中粒径、Zeta电位、包封率、载药量与模型预测值的相对误差均小于4%。结论:按优化处方成功制得具有缓释效果的Sal-NLCs,且质量达到预期标准。

关键词 盐霉素;纳米结构脂质载体;熔融乳化-低温固化法;星点设计-响应面法;处方优化

Preparation of Salinomycin Nanostructured Lipid Carriers and Formulation Optimization

HAN Cuiyan¹, JIN Shanshan^{1,2}, WANG Xiaoli¹, JIAN Baiyu¹, SUI Xiaoyu¹, CAO Lixin³(1.School of Pharmacy, Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161006, China; 2.Dept. of Preparation, Beijing Wanguan Dezhong Biological Technology Co., Ltd., Beijing 100000, China; 3.Dept. of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Heilongjiang Qiqihar 161041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Salinomycin nanostructured lipid carriers (Sal-NLCs) and optimize its formulation. METHODS: Sal-NLCs were prepared by emulsion evaporation-low temperature solidification method. Using particle size, Zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading as evaluation indexes, central composite design-response surface methodology was used to optimize the amount of Sal, the ratio of solid lipid glyceryl bisstearate to liquid lipid glyceryl octanoate in oil phase, ratio of surface active agent polyoxyethylene 35 castor oil (EL) to polyethylene glycol-15-hydroxy stearate (HS 15), the amount of polyoxyethylene (40) stearate (P40). The morphology, particle size, polydispersity index (PDI), Zeta potential, encapsulation efficiency, drug loading and in vitro release mechanism of Sal-NLCs were investigated. RESULTS: The optimal prescription was as follows as Sal 0.86 mg, glyceryl bisstearate 40.70 mg, glyceryl octanoate 11.30 mg, EL 44.05 mg, HS15 7.95 mg, P40 3.8 mg.

- lates of vancomycin-resistan tentarococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Naturwissenschaften*, 2007, 94(6): 465-468.
- [7] 郝凯华, 韩涛, 胡鹏斌. 松萝酸抗肿瘤作用的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(23): 3535-3537.
- [8] 赵颖, 陶建生, 张彤. 松萝酸的研究进展[J]. *中成药*, 2010, 32(2): 270-272.
- [9] KYATANWAR A, JADHAV K, KADAM VJ. Self micro-emulsifying drug delivery system (SMEDDS): review[J]. *J Pharm Res*, 2010, 3(1): 75-83.
- [10] 杨文莲, 牛涛, 傅春升, 等. 葛根素自微乳制剂的制备工艺研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(15): 1375-1377.
- [11] 何琳, 廖巍, 卢秀霞, 等. 叫咪美辛自微乳肠溶胶囊的处方设计及体外溶出度评价[J]. *广东药学院学报*, 2013, 29(4): 351-356.
- [12] 刘彩云, 王卓娅, 罗欣茹, 等. 防脱复合中药单体自微乳及微乳凝胶剂的研究[J]. *中国美容医学*, 2016, 25(12): 49-53.
- [13] 冯艾灵, 王英姿, 张胜海, 等. 苦参总碱纳米乳的理化性质及其体外透皮实验研究[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(16): 2628-2632.
- [14] 陈笑, 富志军. 星点设计-效应面法优化莲心总碱自微乳处方[J]. *中成药*, 2016, 38(7): 1490-1495.
- [15] 郑晓清, 王晶翼, 杨清敏, 等. 星点设计-效应面法优化依西美坦自微乳给药系统[J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(7): 532-536.

Δ 基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(No.H2015070)

* 教授, 博士。研究方向:药物新剂型新技术研究。电话:0452-2663382。E-mail: hycjy2013@163.com

(收稿日期:2017-05-17 修回日期:2017-08-28)

(编辑:邹丽娟)