

星点设计效应面法优化非洛地平自微乳给药系统

袁惠卿¹, 蒋曙光^{2*} (1.江苏联合职业技术学院连云港中医药分院, 江苏 连云港 222007; 2.中国药科大学, 南京 210000)

摘要: 目的 设计非洛地平自微乳给药系统, 并进行体外评价。方法 测定非洛地平的溶解度, 考察油相与乳化剂的相容性, 绘制伪三元相图, 初步设计自微乳处方; 运用星点设计效应面法优化自微乳处方; 评价自乳化性能和体外溶出行为。结果 非洛地平自微乳处方: 油相 LABRAFIL M 1944CS 为 4.4 g, 乳化剂 Cremophor EL35 为 5.5 g, 助乳化剂 PEG400 为 1.1 g, 非洛地平 1.0 g; 自乳化效率高, 乳液澄明稳定, 平均粒径为 30.4 nm, PDI 为 0.16; 水中溶出很快, 5 min 内平均溶出度>85%, 30 min 达 99%, 24 h 后乳滴依然稳定。结论 星点设计-效应面法优化的非洛地平自微乳, 自乳化性能高, 乳液稳定, 显著提高非洛地平的体外溶出度。

关键词: 非洛地平; 自微乳; 星点设计; 伪三元相图

中图分类号: R944.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)06-0710-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.06.013

引用本文: 袁惠卿, 蒋曙光. 星点设计效应面法优化非洛地平自微乳给药系统[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 710-714.

Optimization of Felodipine Self-microemulsifying Drug Delivery System by Central Composite Design-response Surface Methodology

YUAN Huiqing¹, JIANG Shuguang^{2*} (1.Lianyungang TCM Branch of Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang 222007, China; 2.China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize and assess the formulation of self-microemulsifying drug delivery system mixture for felodipine. **METHODS** By the means of solubility, compatibility, ternary phase diagram and central composite design-response surface methodology, the preliminary formulation was settled. The self-microemulsifying efficiency, stability and dissolution were studied. **RESULTS** The optimized formulation was composed of LABRAFIL M 1944CS 4.4 g, Cremophor EL35 as a emulsifier 5.5 g, PEG400 1.1 g, and felodipine 1.0 g. The average particle size after the emulsification was 30.4 nm, and PDI was 0.16. The self-emulsifying efficiency and stability was excellent, and accumulative dissolution reached 85% in 5 min, and 99% in 30 min. After 24 h, the felodipine self-microemulsifying particles was still stable. **CONCLUSION** By the means of central composite design-response surface methodology, a felodipine self-microemulsifying mixture was obtained, which showed a high self-emulsifying efficiency, stability and a good *in vitro* dissolution performance.

KEYWORDS: felodipine; self-microemulsifying; central composite design; ternary phase diagram

非洛地平为二氢吡啶类钙离子拮抗剂, 主要用于抗心绞痛和高血压。由于水溶性差、首过效应大, 该药口服生物利用度仅约 15%^[1]。

自微乳化给药系统(self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS)是由油相、表面活性剂及助表面活性剂组成的各向同性液态混合物, 口服后遇到体液在胃肠道蠕动下即可自发形成 O/W 型的亚微乳或纳米乳。该系统能提高难溶性药物的溶出性能, 提高生物利用度, 已成为难溶性药物制剂研究的一个热点。星点设计-效应面法集数学和统计学方法为一体, 具有试验次数少、精确度高、预测性好和使用方便等特点。本研究以星点设计-效应面法优化自微乳处方, 期望获得自乳化效率高, 体外溶出快且稳定的非洛地平自微乳液。

1 仪器与试剂

ALC-110.4 型电子分析天平(赛多利斯 Acculab 公司); Zetasizer 3000 HS 型激光粒度仪(英国马尔文公司); GL-88B 型漩涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); DF-1 型集热式恒温磁力搅拌器(金坛市中大仪器厂); DZF-6050 型真空干燥箱(上海特成机械设备有限公司); ZRS-8G 型智能溶出试验仪(天津大学无线电厂); 80-2 型离心机(金华仪器厂)。

非洛地平(合肥立方制药股份有限公司, 批号: 14111001; 纯度: 99.56%); 聚氧乙烯 35 蓖麻油(Cremophor EL35)、聚氧乙烯氢化蓖麻油(Cremophor RH40)均来自巴斯夫; 聚山梨酯 80(Tween 80, 南京威尔化工有限公司); 中链甘油三酯(LABRAFAC CC)、油酸聚乙二醇甘油酯

作者简介: 袁惠卿, 女, 硕士, 讲师 Tel: 18168158030 E-mail: rainyhoo@yeah.net
(025)86185303 E-mail: tjx@163.com

*通信作者: 蒋曙光, 男, 博士, 副教授 Tel:

(LABRAFIL M 1944CS)、单亚油酸甘油酯(Maisine 35-1)、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol)、二乙二醇单乙基醚(Transcutol P)和单油酸甘油酯(Peceol)均来自法国嘉法狮; PEG400(南京化学试剂有限公司, 化学纯)。

2 方法与结果

2.1 溶解度测定

采用 UV 单点比较法^[2]测定非洛地平在 10 种自乳化辅料中的溶解度(25 °C)。试验方法: 取 1 g 自乳化辅料, 置于刻度离心管中, 加入过量药物, 涡旋使药物充分分散, 40 °C 水浴下超声 30 min, 置 25 °C 气浴摇床平衡 48 h, 确保有药物沉淀, 4 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 得含药饱和的上清液。结果见表 1。为增大载药量, 选用溶解度大的辅料为宜, 故除 Peceol 外, 均备下一步使用。

表 1 非洛地平在不同辅料中的溶解度(25 °C)

mg·g ⁻¹			
辅料	溶解度	辅料	溶解度
Peceol	30.5	EL35	132.9
LABRAFIL M 1944CS	41.6	Tween80	146.7
LABRAFAC CC	44.9	RH40	148.5
Maisine 35-1	39.2	PEG400	198.1
Labrasol	216.2	Transcutol P	389.1

2.2 初筛油相和乳化剂(相容性)

设计不同比例的油相与乳化剂组合, 观察乳化情况, 初步筛选油相与乳化剂。固定油相和乳化剂混合液的总质量为 0.5 g, 配制油相和乳化剂比例分别为 3 : 7, 4 : 6, 5 : 5 的混合液, 混匀, 用 37 °C 蒸馏水按 1 : 100(g·mL⁻¹) 稀释至 50 mL, 磁力温和搅拌。目测外观判断等级并记录。判断标准分为 5 个等级^[3]: A, 迅速分散乳化, 形成澄清或微微泛蓝的微乳(<50 nm); B, 迅速分散乳化, 形成蓝白色微乳(50~100 nm); C, 分散乳化稍慢, 形成亮白色奶状乳剂(>100 nm); D, 分散乳化较慢, 液体呈暗灰白色, 外观略带油状; E, 分散乳化困难, 无法形成均一体系, 一直都有油滴存在。

油相 LABRAFAC CC、LABRAFIL M 1944CS 与乳化剂 Cremophor EL 35、Cremophor RH40 乳化情况良好。含 Cremophor RH40 的混合液乳化最慢, 其遇水先形成黏度较大的透明凝胶。而乳化缓慢易致乳化不稳定、受体内条件影响大、重现性差, 故确定油相为 LABRAFIL M 1944CS, 乳化剂为 Cremophor EL 35。结果见表 2。

表 2 油相与乳化剂在不同比例下的乳化情况

Tab. 2 Emulsification result of emulsifier and oil in different ratios

组成	3 : 7	4 : 6	5 : 5	评价
LABRAFAC CC : Cremophor EL 35	A	B-C	C	OK
LABRAFAC CC : Cremophor RH40	A	A	B	OK
LABRAFAC CC : Tween80	B	C	C	-
MAISINE35-1 : Cremophor EL 35	A	D	D	-
MAISINE35-1 : Cremophor RH40	A	D	D	-
MAISINE35-1 : Tween80	B	D	D	-
LABRAFIL M 1944CS : Cremophor EL 35	A	A	A	OK
LABRAFIL M 1944CS : Cremophor RH40	A	A	A-B	OK
LABRAFIL M 1944CS : Tween80	C	C	C	-

2.3 绘制伪三元相图筛选助乳化剂

以 LABRAFIL M 1944CS 为油相, Cremophor EL35 为乳化剂, 分别与助乳化剂 Labrasol、Transcutol P、PEG400 组成三元系统绘制伪三元相图。以 1 : 9 至 9 : 1 的比例, 配制不同质量比例的表面活性剂和助表面活性剂的混合物。取定比例下的混合物加入不同质量分数的油相, 充分混匀后水滴法稀释(1 : 100)。记录稀释后溶液的相态等级, 注意水滴过程中是否有液晶或者凝胶相。用 Origin 8.5 绘图, 并把目测等级为 A、B 的点连接起来。结果见图 1。

由图 1 可知, 含 Transcutol P 的纳米乳面积最小; 含 Labrasol 的纳米乳面积最大; 含 PEG400 的相图中, 纳米乳区域可以增溶更多的油相。为提高自乳化液的载药量, 选择 PEG400 作为助乳化剂, 并且实验中发现 PEG400 形成的纳米乳更加澄清明亮, 经过一段时间放置稳定性最好。

药物在一定程度上会影响自乳化过程, 因此有必要考察载药伪三元相图。将非洛地平原料药加入 LABRAFIL M 1944CS-Cremophor EL35-PEG400 系统, 使用含药饱和的油相, 其余步骤同上, 结果见图 1。由图可知, 药物的加入对 LABRAFIL M 1944CS-Cremophor EL35-PEG400 系统无明显影响。

2.4 星点设计

选取对自微乳粒径有显著影响的 2 个因素[油相质量分数 X_1 和 SA/CoSA 的比值(乳化剂与助乳化剂的质量比) X_2]作为自变量, 以乳滴粒径为效应(因变量 Y), 采用两因素五水平的星点设计优化处方(表 3)。该设计是由二水平析因设计加极值和中心点组成, 其代码分别为 0, ± 1 , $\pm \lambda$, $\lambda=(2^k)^{1/4}$ 或 $\lambda=2^{k \times 1/2}$ (或 1/4)(k 表示因素数, $k \geq 5$ 时, 采用后者公式)^[4]。根据有效自微乳区域确定因素的极大值和极小值水平, 各因素水平代码值和实际操作物理量值见表 3。按照星点设计原理安排 13 次试验, 试验结果见表 4。

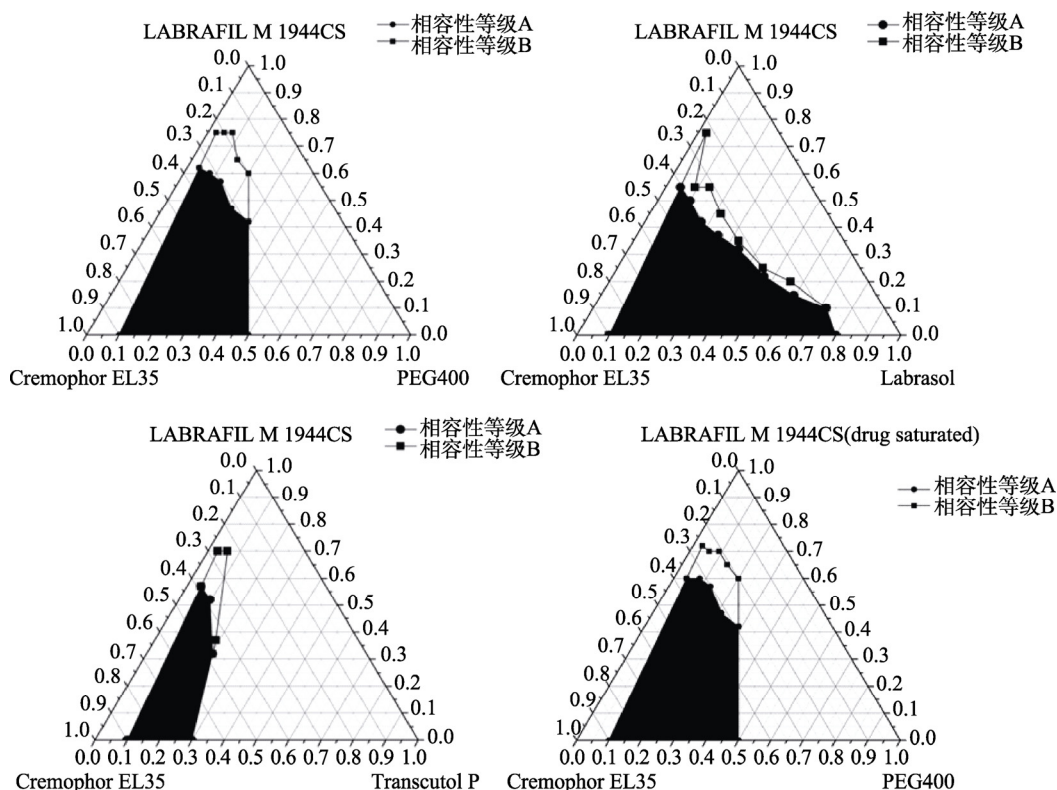


图1 伪三元相图

Fig. 1 Pseudo ternary phase diagram

对试验数据进行多元线性回归和二次多项式拟合, 多元线性方程 $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2$; 二次多项式方程 $Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_1^2+b_4X_2^2+b_5X_1X_2$ 。

表3 两因素五水平星点设计

Tab. 3 Five levels of two independent variables

水平	X_1	X_2
-1.414	20	1
-1	25.86	2.17
0	40	5
+1	54.14	7.83
+1.414	60	9

表4 星点设计试验结果

Tab. 4 Results of central composite experimental design

水平	X_1	X_2	粒径/nm	PDI
1	+1	+1	35.5	0.21
2	+1	-1	48.4	0.18
3	-1	+1	20.1	0.10
4	-1	-1	21.3	0.07
5	+1.414	0	49.5	0.21
6	-1.414	0	18.3	0.10
7	0	+1.414	24.2	0.14
8	0	-1.414	40.5	0.31
9	0	0	25.0	0.13
10	0	0	28.4	0.16
11	0	0	25.6	0.12
12	0	0	28.2	0.12
13	0	0	26.3	0.15

以回归方程的校正相关系数 R^2 最大且 F 检验合格为原则, 确定拟合函数, 结果如下: 粒径的多元线性方程 $Y=7.68+0.77X_1-1.64X_2$, $R^2=0.851\ 53$, $P<0.05$; 粒径的二次多项式方程 $Y=22.275\ 53-0.128\ 68X_1-1.685\ 03X_2+0.015\ 75X_1^2+0.296\ 75X_2^2-0.073\ 1X_1X_2$, $R^2=0.964\ 48$, $P<0.05$ 。

因此, 选择二次多项式方程作为模拟函数。

2.5 效应面优化、估测和处方验证

用 Origin 8.5 软件绘制三维效应面图, 结果见图 2。

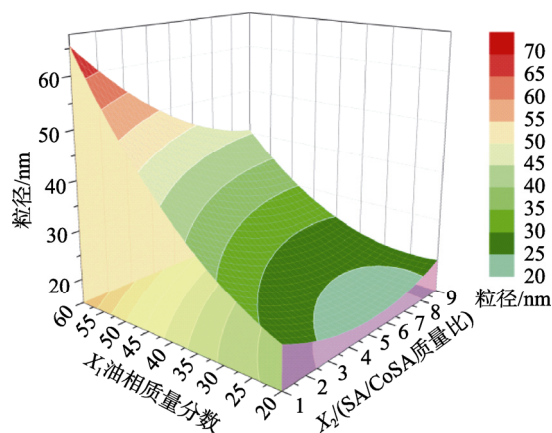


图2 3D 效应面图

Fig. 2 3D response surface graph

由图 2 可知,一般情况下,当油相质量分数 X_1 增加时,粒径快速增大;当 X_1 恒定时,粒径随 X_2 增加而减小(图中粒径 $<20\text{ nm}$ 区域不符合此规律)。以粒径 $<50\text{ nm}$ 、油相质量分数多、分散后稳定性、粒径重现性好为原则读图,优选以下区域: X_1 为 30%~50%; X_2 为 3~7。从优选区域中选择 3 个处方(X_1, X_2)进行粒径验证,结果见表 5,结果显示该数学模型预测性良好。

表 5 模型方程验证结果

Tab. 5 Verification of model equation

处方(X_1, X_2)	预测粒径/nm	实测粒径/nm	偏差/%
(30, 3)	23.63	22.76	-3.68
(40, 5)	26.70	28.40	6.37
(50, 7)	32.37	34.51	6.61

2.6 乳化方式的影响与处方选定

体内的乳化方式并非水滴法,因此探索了水滴法和非水滴法对乳滴粒径和分布的影响。分别采用水滴法和非水滴法(即采用一次性倒入蒸馏水,磁力温和搅拌),稀释倍数为 100(1 g : 100 mL),对 5 个自微乳处方进行乳化测定,每个样品做 3 次,结果见表 6。

表 6 水滴法与非水滴法乳滴粒径对比结果

Tab. 6 Comparison of particle size of aqueous titration and non-aqueous titration

处方 (X_1, X_2)	预测粒 径/nm	水滴法			非水滴法		
		实测粒 径/nm	PDI	粒径范 围/nm	实测粒 径/nm	PDI	粒径范 围/nm
(40, 4)	28.64	26.3	0.14	<60	28.7	0.16	<100
(40, 5)	26.70	28.4	0.12	<50	26.4	0.14	<60
(40, 6)	25.36	24.1	0.13	<50	29.1	0.25	<100
(35, 4)	24.84	24.0	0.13	<50	24.7	0.14	<50
(35, 5)	23.27	23.6	0.13	<50	24.3	0.13	<50

由表 6 初步推断:非水滴乳化的方式容易造成更大粒径分布,这种影响,随着自乳化体系中油相含量 X_1 的增大而更加明显。

综合考虑乳滴粒径、乳化重现性和油相分数,选择处方(40, 5),即 LABRAFIL M 1944CS(质量分数 40%),Cremophor EL35(50%),PEG400(10%)。

表 7 载药自微乳的稳定性

Tab. 7 Stability of drug-loaded nanoemulsion

载药量/%	1 : 100 稀释(0 h)			离心处理			24 h 静置			48 h 静置		
	平均粒径/nm	PDI	外观	平均粒径/nm	PDI	外观	平均粒径/nm	PDI	外观	平均粒径/nm	PDI	外观
10	32.0	0.19	澄清透明	双峰	—	—	28.1	0.19	结晶	27.8	0.18	结晶
9	30.4	0.16	澄清透明	30.3	0.13	澄清透明	30.4	0.13	澄清透明	31.9	0.24	澄清透明
8	29.0	0.12	澄清透明	28.6	0.11	澄清透明	28.5	0.12	澄清透明	28.9	0.12	澄清透明
0	26.4	0.15	澄清透明	26.2	0.13	澄清透明	26.1	0.12	澄清透明	26.8	0.11	澄清透明

2.7 载药量的确定

对自乳化液处方(40, 5),采用简单加和法估算非洛地平的饱和溶解度,加和结果为 $103.8\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

据文献^[5-6],药物既增溶在乳滴的油相区域,也能增溶在乳化膜中;按自乳化液的饱和溶解度载药,乳化后药物易析出,故需考察自乳化液稀释后的经时稳定性。而纳米乳为各向同性的透明或半透明液体,属热力学稳定系统,经热压灭菌或离心也不能使之分层^[7]。故设计如下实验:分别配制载药量为 10%(1 g 处方自乳化液载药物 100 mg,此载药量接近饱和溶解度),9%,8%的自乳化液,按照 1 : 100($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)稀释,于 0 h 测粒径,离心($4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min)后再测粒径;未经离心直接静置 24 h,48 h 后测粒径(每个样品平行做 3 次,取平均值),结果见表 7。由表 7 可知,若按 10%载药,乳液离心后即出现双峰,不离心直接静置 24 h 后即能目测到大量晶体析出;按 9%载药,离心或静置后,乳液外观均澄清,粒径几乎不发生变化;按 8%载药则更加稳定。故确定载药量在 8%~9%。

载药自微乳的制备:称取 LABRAFIL M 1944CS 4.4 g, Cremophor EL35 5.5 g, PEG400 1.1 g, felodipine 1.0 g, 涡旋混匀后放入 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱,1 h 后即可,若尚有不溶可超声助溶,静置 24 h 以达平衡。

2.8 载药自微乳的体外溶出评价

据文献^[8],稀释倍数越大纳米乳趋于不稳定。故考察载药自微乳的体外溶出行为。

避光操作。取非洛地平原原料药置于硬胶囊中,取非洛地平自微乳置于方形玻璃片上(投药量均为 5 mg),照溶出度与释放度测定法(中国药典 2015 年版第四部通则 0931 第二法),以水 500 mL 为溶出介质,转速 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,水浴温度(37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,依法操作,经 5, 20, 30 min 和 1, 2, 4, 12, 24 h, 分别取样 5 mL, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过并即时补充相同温度相同体积的溶出介质,取续滤液在 362 nm 处测定吸光度,计算溶出度,结果见图 3。

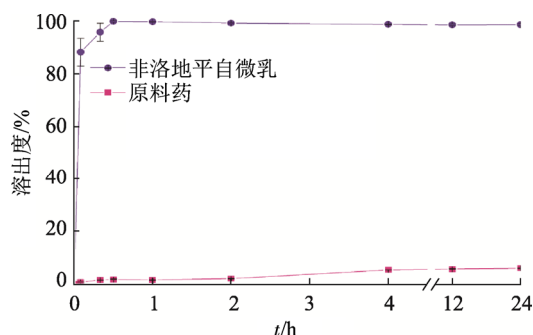


图3 非洛地平自微乳及其原料药的溶出结果

Fig. 3 Dissolution result of felodipine L-SMEDDS and the bulk drug

由图3可见,原料药在水中溶出甚少。非洛地平自微乳则溶出很快,5 min内平均溶出度>85%,30 min达99%,此后到24 h的时间内,累积溶出度都>95%。从24 h后的溶出介质外观来看,溶出液澄清透明,无浮油无沉淀。这说明乳滴没有发生破乳,药物没有析出。综上非洛地平自微乳系统在上述溶出条件下是稳定的;而水作为非洛地平自微乳的溶出介质有其合理性,也利于区分制剂特性。

3 讨论

与某些文献^[9-10]的研究方法相比,本实验没有考察乳化时间及油相-乳化剂二元体系互溶性。据文献^[3],A级要求乳化时间<1 min,而乳化时间常和转速、温度等因素相关,如果乳化过程中存在凝胶或者液晶的中间态,则乳化时间将延长,因此所谓的1 min没有具体意义。而对于二元系统的相容性,大多数研究方法都要求油相与表面活性剂的相容性要好,其实只要三元系统(油相、乳化剂与助乳化剂)能够形成均一的各向同性的混合液即可,助乳化剂的加入很可能会改变二元系统的相容性。因此本实验的做法能使潜在的油相乳化剂组合得到发现。

实验中发现,无论哪一种助乳化剂,当 X_2 较大时,稀释过程中均会出现黏度大的凝胶相,而 X_2 较小时则无;且 X_2 越大,中间凝胶相黏度越大,能增溶的油相越多,乳化越慢;而 X_2 越小则混合物黏度越小,中间凝胶相黏度越小或不形成,乳化时间缩短。当 X_2 一定时,油相分数 X_1 越大,乳滴粒径越大, X_1 过大则难以形成纳米乳, X_2 太小也难以形成纳米乳; X_2 太大则自乳化液黏度大且

中间凝胶相黏度也大。

均匀设计和正交设计是目前使用较多的试验设计优化法,用的是线性数学模型进行拟合,虽然实验次数较少,但精度不够,预测性较差,也不能灵敏地考察因素间的作用。近年国内外常用集数学和统计学方法为一体的星点设计-效应面优化法进行优化,其试验次数少,试验精度高,预测性好,应用于药学研究中成效显著^[11]。

本研究通过星点设计效应面法优化自微乳处方,获得的非洛地平自微乳载药量高(83 mg·g⁻¹)、自乳化性好、经时放置稳定;并以水为非洛地平自微乳的溶出介质以区分制剂特性,体外溶出条件下,30 min达99%,24 h后乳滴仍然稳定。其体内行为有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] ALI J, ZGAIR A, HAMEED G S, et al. Application of biorelevant saliva-based dissolution for optimisation of orally disintegrating formulations of felodipine[J]. Int J Pharm, 2019 (555): 228-236.
- [2] 中国药典. 四部[S]. 2015: 74-76.
- [3] PANDEY V, KOHLI S. SMEDDS of pioglitazone: formulation, *in vitro* evaluation and stability studies[J]. Futur J Pharm Sci, 2017, 3(1): 53-59.
- [4] LIU Y J, XIANG R W. Application of central composite design/response surface methodology in pharmacy experiment design[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2007, 24(6): 455-457.
- [5] DAI J, KIM S M, SHIN I S, et al. Preparation and stability of fucoxanthin-loaded microemulsions[J]. J Ind Eng Chem, 2014, 20(4): 2103-2110.
- [6] LAWRENCE M J, REES G D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2012 (64): 175-193.
- [7] SHAH P, BHALODIA D, SHELAT P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review[J]. Syst Rev Pharm, 2010, 1(1): 24-32.
- [8] DIAO Y H, TONG X Y, ZHOU J P. Study on the influence factors for stability of nisoidipine self-microemulsifying drug delivery system[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2007, 27(2): 215-218.
- [9] 孙明辉. 西罗莫司自微乳释药系统的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [10] CUI S X, NIE S F, ZHANG S Z, et al. Preparation of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of vinpocetine and *in vitro* evaluation[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2009, 18(19): 1897-1901.
- [11] 邱颖, 朱玲, 孙晓英. 星点设计-效应面优化法与正交设计和均匀设计的比较及其在药剂研究中的应用[J]. 海峡药学, 2011, 23(2): 18-20.

收稿日期: 2020-07-14

(本文责编: 蔡珊珊)