

星点设计-效应面法优化熊果酸自微乳给药系统

孙丹丹¹, 徐新刚², 生立嵩², 于蓓蓓², 闫雪生^{2*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014)

[摘要] 目的:采用星点设计-效应面法优化熊果酸自微乳化给药系统。方法:以乳化剂与助乳化剂的比例和含油量为考察因素,微乳粒径、饱和载药量为效应值,采用 SAS 9.1.3 软件筛选最优处方,并进行验证。结果:熊果酸自微乳的优化处方为油相(MCT)-乳化剂(HS15)-助乳化剂(alcohol)12.5:62.5:25。结论:应用星点设计-效应面法能方便准确地得到熊果酸自微乳化给药系统的较优处方,所建立的模型预测性良好。

[关键词] 熊果酸; 自微乳; 星点设计-效应面法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0046-05

[doi] 10.11653/syfj2013080046

Optimization of Self-microemulsion Drug Delivery System of Ursolic Acid by Central Composite Design/Response Surface Methodology

SUN Dan-dan¹, XU Xin-gang², SHENG Li-song², YU Bei-bei², YAN Xue-sheng^{2*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

[收稿日期] 20121113(017)

[第一作者] 孙丹丹,在读硕士,从事中药学研究, Tel:13793164073, E-mail:sundandan1005@163.com

[通讯作者] * 闫雪生,研究员,从事中药制剂及新药研发, Tel:0531-82949815, E-mail:temyxs@126.com

留,与中药材中 SO₂ 残留量检测限度征求意见稿规定的限量进行比较,超过半数样品中二氧化硫残留量不符合要求,说明目前中药硫熏的现象仍普遍存在,应加强其市场监管力度,对中药材二氧化硫残留进行科学准确的监测,同时应对中药材硫熏的替代加工技术进行深入研究,以保证用药安全。

3 讨论

在一定条件下,亚硫酸钠与邻苯二甲醛、乙酸铵溶液反应生成带有紫色颜色的物质,且随着加入的亚硫酸钠量的增加,颜色逐步加深,推测亚硫酸钠的量与溶液颜色色度存在一定线性关系。因人体肉眼对色彩的敏感程度有限,主观性较强,本研究采用柯尼卡美能达 CM-5 型分光测色计对不同亚硫酸钠加入量的溶液颜色进行测定,该法简便、快速,灵敏度较高,可为中药材二氧化硫的快速检测提供参考。

因提取过程中,提取液自身颜色可能干扰测色,本实验对二氧化硫残留半定量时,以试剂及提取液自身为空白进行对比,二者测定结果的相对误差 < 5%,故研究过程中选择以相应试剂为空白对药材中

二氧化硫残留进行半定量。同时对未硫熏的党参、银耳提取,经衍生化反应后,结果提取液无变化,未生成带有紫色颜色的物质。

[参考文献]

- [1] 刘东奇,陈华成,杨雪丽. 二氧化硫对机体各组织器官毒性作用的研究进展[J]. 畜牧兽医学杂志, 2008, 27(1):37.
- [2] 朱涛,张云,丛晓东,等. 硫熏对中药饮片质量的影响及应对思考[C]. 北京:中华中医药学会, 2009:46.
- [3] 中国国家标准管理委员会. 食品卫生检验方法理化部分(一)[S]. GB/T5009.34-2003:267.
- [4] 车镇涛,宗玉英. 离子色谱法测定常用药食两用中药材中的二氧化硫含量[J]. 中药材, 2006, 29(5):444.
- [5] 孙艳平,李涛. 顶空气相色谱火焰光度检测器检测山药中的二氧化硫[J]. 山西医学杂志, 2010, 39(8):1024.
- [6] 郝延军,徐秋阳,桑育黎,等. 硫熏中药材的快速检测方法研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3):335.

[责任编辑 仝燕]

2. Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize formulation of ursolic acid self-microemulsion drug delivery system using central composite design/response surface methodology. **Method:** With ratio of surfactants and cosurfactants and oil content as independent variables, particle size and saturated drug loading were taken as dependent variables, optimum formulation was screened by SAS9.1.3 software, and verified. **Result:** Optimized formulation of ursolic acid self-microemulsion was oil phase (MCT) -emulsifier (HS15) -cosurfactants (alcohol) 12.5:62.5:25. **Conclusion:** This optimized formulation of ursolic acid self-microemulsion drug delivery system could be obtained exactly and conveniently by central composite design response surface methodology, and established model had a reliable predictability.

[Key words] ursolic acid; self-microemulsion; central composite design response surface methodology

熊果酸是一种存在于许多植物中的天然 α -香树脂醇型五环三萜类化合物,具有广泛的生物活性,尤其在抗肿瘤、抗菌、抗病毒等方面的作用显著^[1-2]。熊果酸能迅速有效地降低谷丙转氨酶,消除黄疸,增进食欲和恢复肝功能,具有见效快、效果稳定等优点。但由于熊果酸水溶性差,口服吸收不好,生物利用度低^[3],限制了其临床应用。自微乳给药系统可显著提高难溶性药物的溶解度,常作为难吸收和难溶性药物的优良载体^[4-5]。本研究拟将熊果酸制成自微乳制剂,提高熊果酸的生物利用度,通过星点设计-效应面法优选熊果酸自微乳处方。

1 材料

600型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), DelsaNano C型 ZETA 电位及纳米粒分析仪(美国贝克曼库尔特公司),85-2型恒温磁力搅拌器(郑州长城科工贸有限公司)。

油酸乙酯(江西阿尔法高科药业有限公司),中链甘油三酸酯(MCT,铁岭北亚药用油有限公司),油酸(天津市大茂化学试剂厂),聚乙二醇 15 羟硬脂酸酯(HS15,德国 BASF 公司),纯化的聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor ELP,德国 BASF 公司),聚氧乙烯氢化蓖麻油(Cremophor RH40,德国 BASF 公司),聚山梨酯 80(Tween 80,天津市广成化学试剂有限公司),聚乙二醇 400(PEG400,江西益普生药业有限公司),甘油(江西益普生药业有限公司),熊果酸(实验室自制,纯度 99%),试剂均为分析纯。

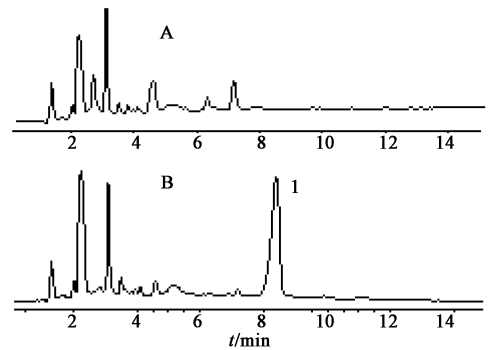
2 方法与结果

2.1 基本辅料考察 自微乳注射剂易于引起毒性反应,需要高效低毒的注射级辅料。本实验选择对药物包载能力较强、自微乳化效果较好的油酸乙酯、油酸及 MCT 为油相;HS15, Cremophor ELP, Cremophor RH40, Tween 80 为乳化剂;PEG400, 乙醇

及甘油为助乳化剂进行处方筛选。取适量熊果酸于 5 mL 离心管中,分别加各辅料 1 g,超声 30 min,于 37 °C 恒温振荡($100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$)平衡 48 h 后, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,计算熊果酸含量。结果熊果酸在各辅料中的溶解度依次为 0.763, 8.411, 1.209, 3.419, 5.738, 0.946, 1.803, 5.062, 7.366, $0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2 熊果酸含量测定

2.2.1 色谱条件 Lichrospher C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 200 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(90:10),流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 210 nm,柱温 35 °C,进样量 10 μL 。见图 1。



1. 空白自微乳;B. 样品;1. 熊果酸

图 1 熊果酸自微乳 HPLC

2.2.2 线性关系考察 精密称取干燥至恒重的熊果酸 27.39 mg,置于 25 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得贮备液。精密量取贮备液适量,用甲醇稀释成 4.38, 10.96, 21.91, 32.87, 43.82, 54.78, 65.74, 76.69, 87.65, 98.60, 109.56, 120.52 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列质量浓度溶液,进样测定,以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得回归方程 $Y = 8\,056X - 3\,213.7$ ($r = 0.9995$),线性范围 4.382 4 ~ 120.516 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 加样回收率试验 按处方配比制备熊果酸

空白自微乳,每克空白自微乳分别加入约 4.8,6,7.2 mg 熊果酸,超声使其溶解,用甲醇稀释适宜倍数,依照色谱条件测定,按标准曲线计算低、中、高 3 个质量浓度的回收率及 RSD,见表 1。

表 1 熊果酸加样回收率试验

加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
4.92	5.02	102.03	101.65	0.37
4.84	4.92	101.65		
4.89	4.95	101.27		
6.03	6.12	101.49	101.49	1.37
6.04	6.21	102.88		
6.02	6.08	100.10		
7.22	7.32	101.33	100.77	0.53
7.20	7.22	100.28		
7.24	7.29	100.69		

2.2.4 精密性试验 精密量取熊果酸贮备液适量,配制成低、中、高(43.824,65.736,109.56 mg·L⁻¹)3 种质量浓度的溶液,于 1 d 内分别测定 5 次,结果 3 种质量浓度溶液的 RSD 分别为 0.90%,1.70%,0.16%,表明仪器精密性良好。

2.2.5 稳定性试验 取处方量熊果酸自微乳,用甲

醇稀释至适宜倍数,分别于制备后 0,2,4,6,8,10,12,24 h 进样测定,结果 RSD 2.08%,表明该溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3 伪三元相图的绘制 以油酸乙酯、油酸及 MCT 为油相;HS15, Cremophor ELP, Cremophor RH40, Tween 80 为乳化剂;PEG400,无水乙醇及甘油为助乳化剂,在磁力搅拌器搅拌状态下逐渐滴加蒸馏水,记录形成自微乳时的临界加入量,按油、乳化剂、助乳化剂、水在临界点的各自质量分数绘制伪三元相图,确定形成的自微乳区域。

固定无水乙醇为助乳化剂考察油相和乳化剂对自微乳的影响,见图 2(A,B,C)。固定 MCT 为油相,HS15 为乳化剂,筛选助乳化剂;由于甘油对熊果酸的溶解度很小,故只考察 PEG400 和无水乙醇,见图 2(C,D)。

由图 2(A,B,C)可知,油酸与各乳化剂成乳情况均不及油酸乙酯和 MCT;油酸乙酯与 HS15, Cremophor ELP 形成的自微乳区域较大, MCT 与 HS15 形成的自微乳区域比较大;考虑到油酸乙酯与 Cremophor ELP 形成自微乳时凝胶区较大,且 3 个图中自微乳区域面积相差不多,结合生产实际及安全性考虑,确定油相为 MCT,乳化剂为 HS15。图 2(C,D)表明宜选用无水乙醇为助乳化剂。

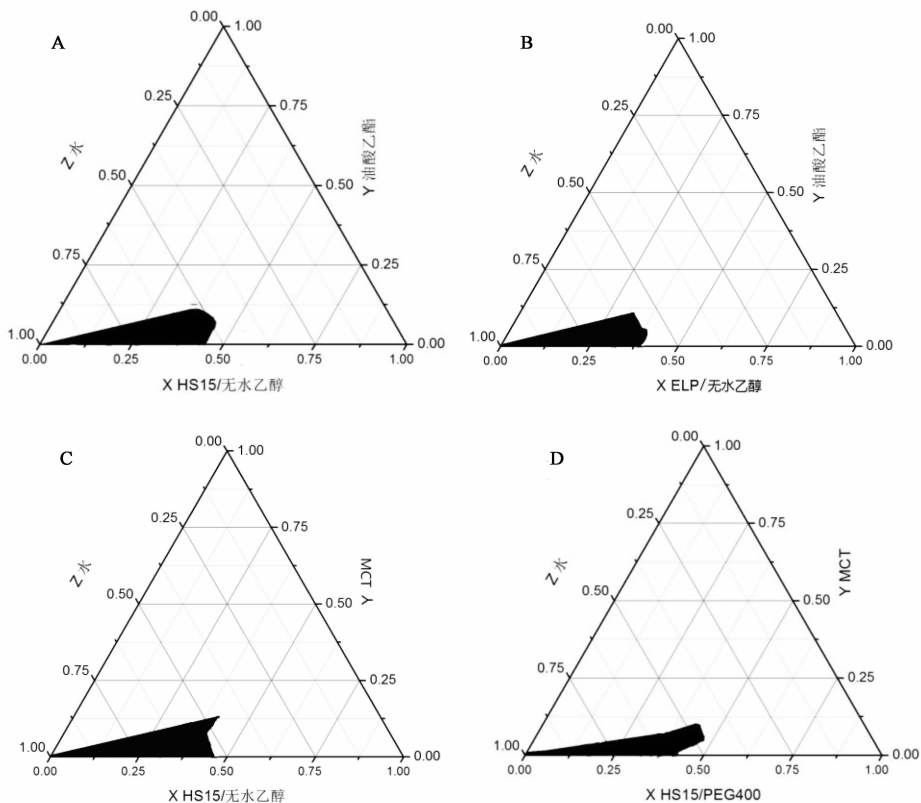


图 2 熊果酸自微乳伪三元相

2.4 考察指标

2.4.1 自微乳粒径的测定 取熊果酸自微乳适量,加水稀释 50 倍,用 ZETA 电位及纳米粒分析仪测定自微乳乳滴的粒径。

2.4.2 饱和载药量的测定 将过量熊果酸加至 3 g 空白自微乳中,超声,密闭状态下于 37 ℃ 恒温振荡器中震荡 48 h,达平衡后,吸取上清液,10 000 r·min⁻¹ 高速离心 10 min,精密称定一定量样品,用甲醇稀释适宜倍数,采用 HPLC 测定熊果酸含量,计算饱和载药量。

2.5 星点试验设计 在预试验和伪三元相图考察基础上,选择对自微乳形成有显著性影响的油相质量分数、乳化剂和助乳化剂的比值为考察因素,采用两因素五水平星点设计试验,因素水平见表 2,在相同条件下制备熊果酸自微乳,测定熊果酸自微乳的饱和载药量和粒径。试验安排及结果见表 3。

表 2 熊果酸自微乳处方工艺星点试验因素水平

水平编码	X ₁ 油相 质量分数/%	X ₂ 乳化剂- 助乳化剂
-1.414	7.9	0.59
-1	10	1
0	15	2
1	20	3
1.414	22.1	3.4

表 3 熊果酸自微乳处方工艺星点试验安排

No.	X ₁	X ₂	Y ₁ 载药量 /mg·g ⁻¹	Y ₂ 粒径 /nm
1	10	1	8.351	132.4
2	10	3	6.421	20.9
3	20	1	8.538	116.2
4	20	3	6.861	64.7
5	7.9	2	7.660	80.7
6	22.1	2	7.824	52.8
7	15	0.6	9.986	127
8	15	3.4	8.344	24.9
9	15	2	7.340	32.3
10	15	2	7.961	37.3
11	15	2	7.800	33.4
12	15	2	7.346	38.1
13	15	2	8.061	36.2

以粒径和载药量作为因变量,采用 SAS 9.1.3 软件,分别对各因素各水平进行非线性回归(二项式公式拟合)。结果二项式方程为 $Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_1X_2 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2$ 。载药量 (Y₁) 和粒径 (Y₂) 的二项式方程分别为 $Y_1 = 7.702 + 0.107X_1 - 0.741X_2 + 0.063X_1X_2 - 0.207X_1^2 + 0.504X_2^2$; $Y_2 = 35.46 - 1.482X_1 - 38.424X_2 + 15X_1X_2 + 18.695X_1^2 + 23.295X_2^2$ 。根据拟合方程描绘等高线和三维效应面,见图 3~4。利用 SAS 9.1.3 软件,将 Y₂ 和 Y₁ 的等高线重合叠加,选取较优的组合,见图 5。

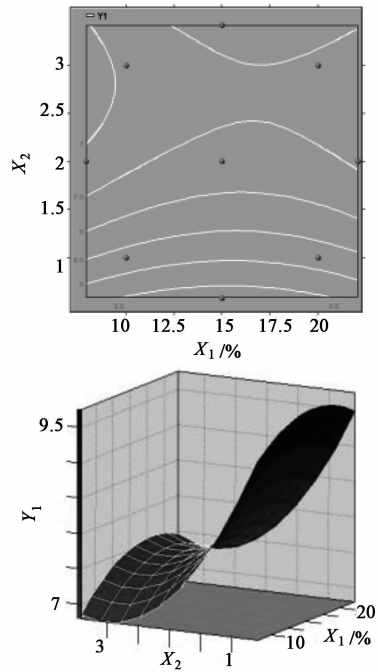


图 3 载药量等高线和效应面曲线

由图 3 可知,当 S/CoS > 2 时,随油相质量分数的增大,载药量先增大后变小;当 S/CoS < 2 时,油相质量分数对载药量无明显影响,随 S/CoS 减小,载药量增大。图 4 表明,当 S/CoS 一定时,随油相质量分数增加,粒径呈现先变小后变大的趋势,油相质量分数固定时,S/CoS 越大粒径越小。由图 5 可知,在重叠区域内得到熊果酸自微乳化给药系统的优化处方为 X₁ = 12.5%, X₂ = 2.5。

2.6 验证试验 精密称量 MCT 0.125 g, HS15 0.625 g,无水乙醇 0.25 g 制备 3 批熊果酸自微乳样品,结果测得载药量 (7.363 ± 0.12) mg·g⁻¹,粒径 (26 ± 0.1) nm,与预测值 (7.321 mg·g⁻¹, 24.61 nm) 非常接近。说明星点设计-效应面法所建立的模型预测性良好,方法可行,结果可靠,可较好地应

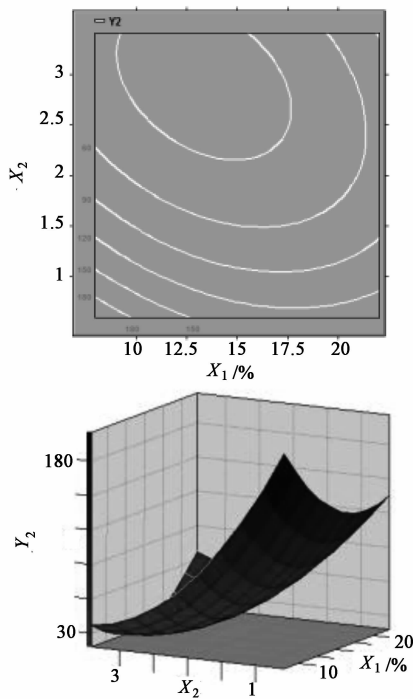


图 4 粒径等高线和效应面曲线

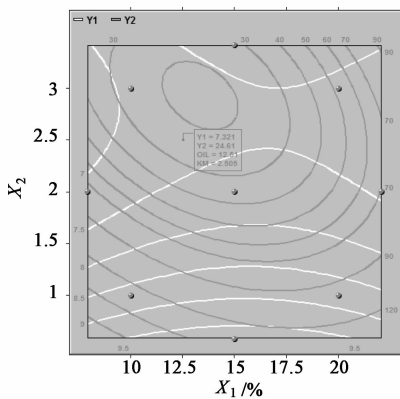


图 5 熊果酸自微乳各效应面等高线叠加

用于熊果酸自微乳的处方优化。

3 讨论

目前普遍采用正交设计和均匀设计优化工艺、筛选处方,即用线性数学模型进行拟合,虽可减少试验次数,但预测性较差,不适用于多因素、多水平考

察。星点设计^[6]是在析因设计基础上,加上星点及中心点而形成的非线性拟合的试验设计方法,可提高优化效果。星点设计已广泛应用于筛选乳剂处方,如长春瑞滨静脉注射乳剂^[7]、青蒿素自乳化制剂^[8]的处方优选。本课题将熊果酸自微乳的粒径和饱和载药量的等高线进行重叠,直接得到了较佳区域,直观、方便地确定了较优处方。熊果酸具有良好的抗肿瘤作用,但其口服生物利用度很低。本课题利用自微乳化给药系统在提高难溶性药物生物利用度的独特优势,开发熊果酸自微乳化给药系统,并采用星点设计-效应面优化法确定了较优处方,为临床提供了一种方便、高效的新剂型。

[参考文献]

- [1] 张新华,朱萱.熊果酸药理学的最新研究进展[J].中国中西医结合杂志,2011,31(9):1285.
- [2] 杨新河,吕帮玉,毛清黎.熊果酸的药理研究进展[J].贵阳中医学院学报,2006,28(6):52.
- [3] 赖玲,杨光,杨昕.熊果酸固体分散体的制备与体外溶出度测定[J].医药导报,2005,24(6):517.
- [4] Pouton C W. Formulation of self-emulsifying drug delivery system[J]. Adv Drug Deliv Rev,1997,25(1):47.
- [5] Bogman K, Ernebrand F, Alsenz J, et al. The role of surfactants in the reversal of active transport mediated by multidrug resistance proteins[J]. J Pharm Sci, 2003, 92(2):1250.
- [6] WU W, CUI G H. Application of central composite design response surface methodology in pharmacy experiment design[J]. Foreign Med Sci: Sect Pharm, 2000, 27(5):292.
- [7] 谷丽艳,李学涛,唐凌.星点设计优化长春瑞滨静脉注射乳剂的处方[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(13):21.
- [8] 张小梅,王云红,杨荣平,等.青蒿素自乳化制剂的设计、优化及质量评价[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(9):59.

[责任编辑 全燕]