论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1414-04

星点设计-效应面法优化葛根素自微乳化释药系统

江兴龙[1],贾运涛[2],张良珂[1],田 睿[3],滕永真[3] (400016 重庆,重庆医科大学药学院药剂学教研室[1];400010 重庆,重庆医科大学附属儿童医院药剂科[2];400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院[3])

[摘要] **目的** 葛根素自微乳化释药系统的制备优化及评价。**方法** 通过测定葛根素在各辅料中的溶解度,处方配伍实验,绘制伪三元相图筛选自微乳化释药系统组分;以葛根素在不同自微乳处方中的平衡溶解度和粒径为指标,采用星点设计-效应面优化法,确定较优处方;并用透析袋扩散法对葛根素自微乳的体外释药性质进行考察研究。**结果** 葛根素自微乳较优处方选择 ODO 为油相,Cremophor RH40 为表面活性剂,Transcutol P 为助表面活性剂,比例为 17.5∶55.0∶27.5,葛根素在最优处方中的溶解度为 51.27 mg/g,是其蒸馏水中溶解度的 9.22 倍,用蒸馏水稀释后平均粒径为 21.51 nm;葛根素自微乳化释药系统的体外释放速度较其混悬液更快。**结论** 成功制备了葛根素自微乳,可显著提高葛根素的溶解度;应用星点设计-效应面优化法能够快速方便的得到葛根素自微乳化释药系统的较优处方。

[关键词] 葛根素;自微乳化释药系统;星点设计-效应面法

[中图法分类号] R282.71;R942;R943 [文献标志码] A

Optimization of self-microemulsifying drug delivery system for puerarin by central composite design-response surface methodology

Jiang Xinglong[1], Jia Yuntao[2], Zhang Liangke[1], Tian Rui[3], Teng Yongzhen[3] ([1]School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Pharmacy, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [3]Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To optimize and assess the preparation of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for puerarin. **Methods** Compatibility of prescriptions was tested by measuring the solubility of puerarin in different secondary solvents. Components of puerarin SMEDDS were screened by plotting pseudo-ternary phase diagram. According to the balanced solubility and particle size of puerarin in different self-microemulsifying drug prescriptions, the optimal prescription was determined using the central composite design-response surface methodology. The nature of puerarin in SMEDDS was studied by diffusing the dialysis bag. **Results** The optimal prescription of puerarin in SMEDDS was composed of ODO (oil), Cremophor RH40 (surfactant), and Transcutol P (co-surfactant), with a weight ratio of 17.5∶55.0∶27.5. The solubility of puerarin in the optimal prescription was 51.27 mg/g, which was 9.22 times of that in distilled water. The average particle size was 21.51 nm. The release of puerarin was faster from SMEDDS than from puerarin suspension. **Conclusion** The successfully prepared puerarin SMEDDS can significantly increase the solubility of puerarin. An optimal prescription for puerarin in SMEDDS can be quickly and conveniently achieved using the central composite design-response surface methodology.

[**Key words**] puerarin; self-microemulsifying drug delivery system; central composite design-response surface methodology

Supported by the Foundation for Sci & Tech Research Project of Yuzhong District, Chongqing(20100203), the Project of Science and Technology Research Chongqing Municipal Education Committee (KJ110323) and the Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2010-2-202). Corresponding author: Zhang Liangke, E-mail: zlkdyx@126.com

葛根素(puerarin)是从豆科葛属植物野葛及甘葛藤根中提取的一种有效成分,为异黄酮类化合物。常用于治疗高血压、冠心病、心肌梗死、脑缺血、脑梗死等疾病;因其毒性低,安全范围广,疗效好而成为临床上应用较多的药物[1];但葛根素水中溶解度较低,仅为 1.1×10^{-2} mol/L,口服吸收差,生物利用度低,从而限制了其临床应用。

自微乳化释药系统(self-microemulsifying drug delivery system,SMEDDS)是由油相、表面活性剂和助表面活性剂形成的各向同性,并包含药物的均一透明液体[2-4]。在环境温度(通常为 37 ℃)和温和搅拌的情

[基金项目] 重庆市渝中区科委科技三费资助项目(20100203);重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJ110323);重庆市卫生局课题(2010-2-202)

[通信作者] 张良珂,E-mail:zlkdyx@126.com

况下,自发乳化成粒径小于 100 nm 的微乳。自微乳释药系统能提高难溶性药物的溶解度,改善其口服吸收,从而提高药物的口服生物利用度[5-9]。本实验采用 SMEDDS 技术制备葛根素自微乳化释药系统,以期提高葛根素的溶解度和生物利用度。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

分析天平(Sartorius A200s,德国);HZ-881S 台式水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂);UV-3150 紫外分光光度计(日本岛津公司);DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州市长城科工贸有限公司);台式离心机(上海安亭科学仪器厂);Zetasizer 激光粒度仪(英国马尔文公司);葛根素(西安小草植物科技有限公司);辛酸癸酸甘油酯(ODO,浙江省建德市千岛精细化工实业有限公司);肉豆蔻酸异丙酯(IPM,国药集团化学试剂有限公司);聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor EL,德国 BASF);聚氧乙烯氢化蓖麻油(Cremophor RH40,德国 BASF);辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol,法国佳法赛);吐温 80(Tween 80,上海申宇医药化工有限公司);二乙二醇单乙基醚(Transcutol P,法国佳法赛);聚乙二醇 400(PEG 400,天津天泰精细化学品有限公司);1,2-丙二醇(1,2-propylene glycol,重庆川东化工集团有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 溶解度的测定 将过量的葛根素分别置于离心管中,分别加入油相,表面活性剂,助表面活性剂 2 ml,涡旋分散后,于 37 ℃、50 r/min 振荡 48 h,离心取上清液,乙醇稀释后,在 305.60 nm 处测光密度,计算葛根素在各辅料中的平衡溶解度。

1.2.2 伪三元相图研究 在 37 ℃条件下,按一定的质量比精密称取表面活性剂和助表面活性剂,混合均匀即为混合表面活性剂,表面活性剂与助表面活性剂质量之比为 Km。固定 Km 值,精密称取质量比为 1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3、8∶2、9∶1的油与混合表面活性剂,在 37 ℃条件下,边搅拌边滴加水,直至澄清透明的微乳形成。同时以澄清浑浊为指标,记录临界加入水量,滴加过程中会出现粘度较大的区域即为凝胶区[10]。

1.2.3 星点设计效应面法优化处方 根据葛根素在各辅料中的平衡溶解度和伪三元相图结果,选择对自微乳性质影响较显著的 2 个因数为考察对象,实验采用两个因素,五水平的星点设计[11]。以葛根素在不同空白自微乳中的平衡溶解度(即最大载药量)以及粒径为指标,确定最优处方。

1.2.4 葛根素 SMEDDS 的制备 精密称取处方量的油相、表面活性剂和助表面活性剂,搅拌均匀,加入葛根素原料药,搅拌至药物全部溶解,即得澄清透明的葛根素 SMEDDS。

1.2.5 体外释放实验 称取适量葛根素 SMEDDS,用释放介质稀释适当倍数后,移取适量于透析袋中,分别以 0.1 mol/L 的盐酸溶液 100 ml 为释放介质,37 ℃恒温水浴振荡,转速为 100 r/min,于不同时间点取样 5.0 ml,同时补充等体积释放介质,采用紫外分光光度法测光密度值,并计算释药百分率。同时以相同量的葛根素混悬液作为对照绘制释药曲线。

1.2.6 统计学分析 所有数据采用 SPSS 11.5 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 溶解度的测定

葛根素在各辅料中的溶解度见表 1。由结果可得,葛根素在表面活性剂中的溶解度大小依次为:Cremophor RH40 > Tween 80 > Cremophor EL;助表面活性剂中,Transcutol P 对葛根素的溶解度比较大,约为蒸馏水中溶解度的 34 倍,明显大于 1,2-丙二醇、PEG 400 和 Labrasol;油相选择 ODO、IPM、橄榄油和蓖麻油,但葛根素在油相中的溶解度均较低,小于 5 μg/g。

表 1 葛根素在各辅料中的溶解度 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

类型	名称	溶解度(mg/g)
表面活性剂	吐温 80	50.76 ± 0.79
	Cremphor EL	24.62 ± 0.64
	Cremphor RH40	55.75 ± 1.39
助表面活性剂	1,2-丙二醇	88.25 ± 2.63
	PEG 400	69.14 ± 0.26
	Transcutol P	190.65 ± 0.79
	Labrasol	47.25 ± 1.68
其他	蒸馏水	5.56 ± 0.07
	pH6.8 磷酸盐缓冲液	7.05 ± 0.19
	0.1 mol/L 盐酸溶液	5.16 ± 0.23

2.2 伪三元相图筛选处方

为满足载药量的要求,选择 Transcutol P 为助表面活性剂;同时,油相选择 IPM 和 ODO,表面活性剂选择 Tween 80 和 Cremphoe RH40,确定 Km = 2(表面活性剂与助表面活性剂的质量比),作伪三元相图进行处方筛选研究。

由图 1 可知,油相 IPM 形成自微乳的区域较小,且易形成凝胶区;表面活性剂 Cremophor RH40 形成自微乳区域较大,说明 Cremophor RH40 的乳化能力较 Tween 80 更好。结合葛根素在各辅料中的溶解度大小和伪三元相图,最终的处方选择为:ODO 作为油相,Cremophor RH40 作为表面活性剂,Transcutol P 作为助表面活性剂。

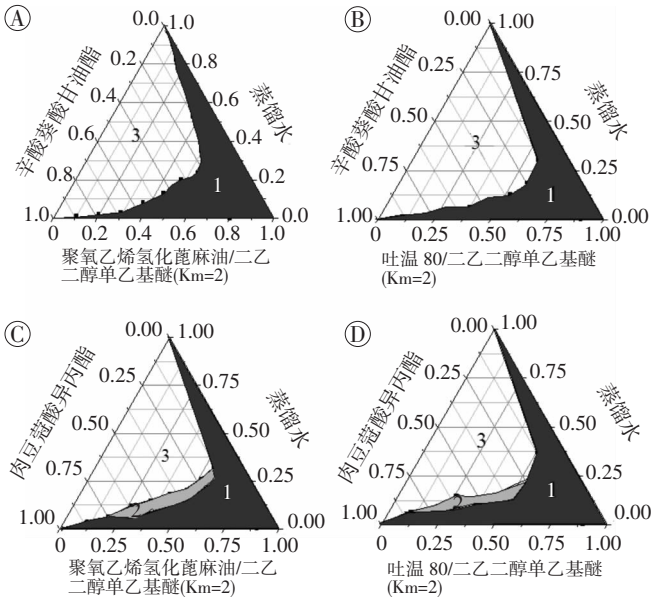
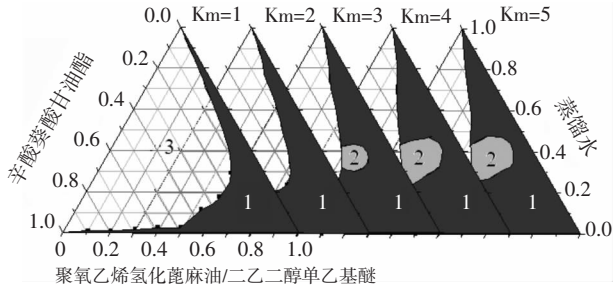


图 1 不同处方(A ~ D)的伪三元相图

以ODO作为油相,Cremophor RH40作为表面活性剂,Transcutol P作为助表面活性剂,绘制不同Km值的伪三元相图。根据伪三元相图可知,Km值越大,微乳区越大,且越易形成凝胶区。

2.3　星点设计效应面法优化处方

选择对自微乳性质影响较显著的2个因数为考察对象,即以油相质量百分比(X_1)、Km(X_2)作为考察因素,由图2可以确定X_1范围为10%~40%,X_2范围为2~5,采用两个因素,五水平的星点设计优化处方,见表2、3。



1:微乳区;2:凝胶区;3:乳剂区

图2　不同Km值所形成的伪三元相图

表2　各因素水平的代码值及实际物理量

因素	水平				
	-1.414	-1	0	1	1.414
X_1(Oil%)	10	14.39	25	35.61	40
X_2(Km)	2	2.44	3.5	4.56	5

表3　实验设计与结果

NO.	Oil(%)	Km	溶解度(mg/g)	粒径(nm)
1	14.39	2.44	61.28	20.97
2	35.61	2.44	12.90	36.03
3	14.39	4.56	47.44	22.61
4	35.61	4.56	13.30	32.40
5	10	3.50	64.22	20.01
6	40	3.50	7.28	40.22
7	25	2	25.47	23.97
8	25	5	27.12	27.60
9	25	3.5	28.07	25.53
10	25	3.5	26.29	25.50
11	25	3.5	27.64	25.44
12	25	3.5	28.02	25.93
13	25	3.5	25.80	25.09

对实验数据进行二次多项式拟合,模型如下:二次多项式方程:$Y = b_0 + b_1X_1 + b_1X_2 + b_3X_1X_2 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2$;分别以溶解度和粒径对数据进行拟合得到回归方程:$Y_{平衡溶解度} = 137.752 - 5.238X_1 - 10.742X_2 + 0.317X_1X_2 + 0.044X_1^2 + 0.217X_2^2$,$R^2 = 0.998\ 6$,$P < 0.000\ 1$;$Y_{粒径} = 12.81\ 5 + 0.008X_1 + 0.232X_2 - 0.117X_1X_2 + 0.021X_1^2 + 0.139X_2^2$,$R^2 = 0.979\ 5$,$P < 0.000\ 1$;根据回归方程可得,二次多项式拟合结果较好。用Design-Expert软件绘制星点设计实验结果的三维效应面图和二维等高线图。

由图3可知,随着油相比例的增加,葛根素溶解度显著降低;当油相比例一定时,葛根素溶解度随着Km值的增加而减小;由图4可知,葛根素SMEDDS乳化后的粒径随油相百分比的增加而增大,油相对微乳的粒径和平衡溶解度均有显著的影响,减少油相的比例,可使处方平衡溶解度增加,微乳粒径减少,有利于药物的吸收。同时,当表面活性剂比例过大时,会对胃肠道产生刺激性。

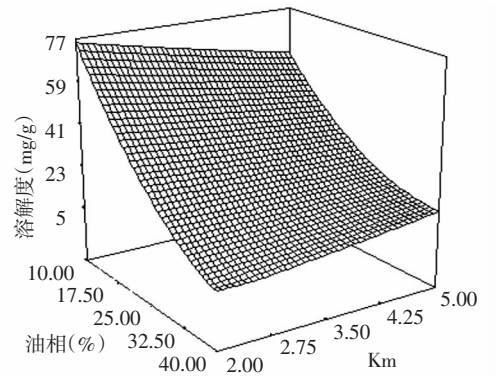


图3　平衡溶解度对油相比例和Km的三维效应面图

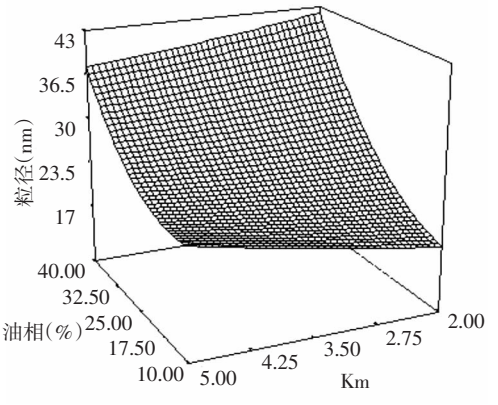


图4　粒径对油相比例和Km的三维效应面图

根据拟合方程、三维效应面图和二维等高线图综合分析评价,在实验范围内以载药量大小和粒径为综合考察指标,确定最优处方为最优处方选择油相(ODO):表面活性剂(Cremophor RH40):助表面活性剂(Trancutol P)=17.5:55.0:27.5,即X_1=17.5,X_2=2。

2.4　最佳处方验证

按优化后的处方:ODO-Cremophor RH40-Trancutol P的比例为17.5%:55.0%:27.5%,平均粒径为21.51 nm(图5),粒径的多分散指数(PDI值)为0.075。考察预测值与实测值偏差,结果见表4。由表4可得,最优处方平衡溶解度和粒径的真实值与预测值比较,表明两指标的真实值与预测值之间没有显著差异,且两指标的偏差均较小,表明建立的数学模型预测性良好。

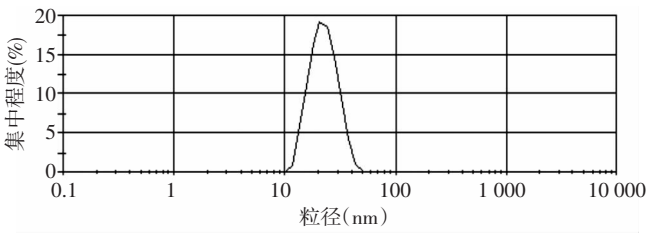


图5　葛根素SMEDDS粒径分布

表4　预测值与实测值的比较($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

指标	预测值	实测值	偏差(%)
平衡溶解度(mg/g)	50.04±0.97	51.27±0.32	-2.46
粒径(nm)	20.38±0.40	21.51±0.87	-5.54

偏差=(预测值-实测值)/预测值×100%

2.5 葛根素 SEMDDS 的制备

按照优化处方(X_1 = 17.5, X_2 = 2)制备葛根素 SMEDDS。精密称取处方量的油相 ODO,表面活性剂 Cremophor RH40,助表面活性剂 Trancutol P,搅拌均匀,加入葛根素原料药 50.0 mg,搅拌至药物全部溶解,即得澄清透明的葛根素 SMEDDS。置于 4 ℃冰箱中贮存备用。

2.6 体外释放实验

结果如图 6 所示,在 0.1 mol/L 的盐酸溶液中,自微乳化释药系统比混悬液中的葛根素释放快。采用 t 检验对两条曲线的各时间点进行比较,表明葛根素 SMEDDS 的累积释放率明显高于葛根素混悬液。对于难溶性药物,溶出速率对药物的吸收有重要影响,葛根素 SMEDDS 的释放速度较其混悬液有一定的提高,有利于提高药物的生物利用度。

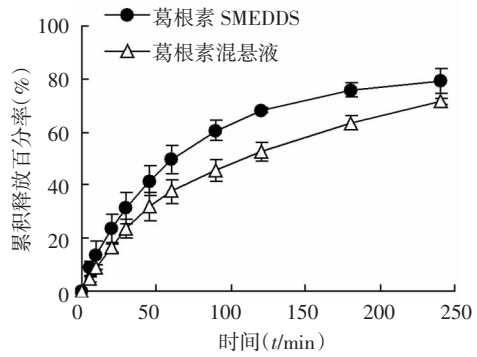


图 6 葛根素 SMEDDS 及葛根素混悬液的体外释放曲线

3 讨论

表面活性剂的选择对制备自微乳化释药系统至关重要,应能较好的溶解药物,毒性低,并具有较强的乳化能力,在温和搅拌下即可与油相自发形成微乳。本研究选择 Cremophor RH40 作为表面活性剂,其 HLB 值为 14 ~ 16,乳化能力强;同时,Cremophor RH40 能抑制 P-糖蛋白的药物溢出泵作用,可提高口服药物的吸收率[12]。

本研究通过溶解度实验和伪三元相图综合分析,筛选葛根素 SMEDDS 处方,并通过星点设计效应面法优化处方中油相,表面活性剂和助表面活性剂的配比,本研究最终确定葛根素 SMEDDS 最佳处方为:ODO-Cremophor RH40-Transcutol P,其比例为 17.5∶55.0∶27.5,该处方显著提高了葛根素的溶解度;用蒸馏水稀释后,得到粒径仅为 21.51 nm 的乳滴,粒径小,易吸收。微乳粒径减少,具有较大的比表面积,可提高药物的溶出速率,有利于药物的体内吸收[13]。由于胃液稀释以及肠道的消化,自微乳处方中各组分的浓度及比例会发生一定变化,制剂的增溶能力有可能丧失,导致药物沉淀[14],降低生物利用度。本研究最优处方形成的自微乳区域较大,即使处方成分浓度发生变化也不易偏离出自乳化区域,有利于在胃肠道内形成稳定的自微乳,保证其生物利用度。

为减少实验次数并保证实验的精度,本研究采用星点设计效应面法优化处方,即依据数学模型模拟函数描绘效应面,从效应面上选择最优的效应域;所得结果直观可靠,并能快速有效的筛选出较优处方。

参考文献:

[1] 高风英. 葛根素药理作用的研究进展[J]. 中草药, 2003, 34(12): 附 7 - 附 8.

[2] Kyatanwar A U, Jadhav K R, Kadam V J. Self micro-emulsifying drug delivery system (SMEDDS): Review [J]. J Pharm Res, 2010, 3(1): 75 - 83.

[3] Patel D, Sawant K K. Self micro-emulsifying drug delivery system: formulation development and biopharmaceutical evaluation of lipophilic drugs[J]. Curr Drug Deliv, 2009, 6(4): 419 - 424.

[4] Wei J D, Ho H O, Chen C H, *et al*. Characterisation of fenofibrate dissolution delivered by a self-microemulsifying drug-delivery system [J]. J Pharm Pharmacol, 2010, 62(12): 1685 - 1696.

[5] Mezghrani O, Ke X, Bourkaib N, *et al*. Optimized self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for enhanced oral bioavailability of astilbin[J]. Pharmazie, 2011, 66(10): 754 - 760.

[6] Guo F, Zhong H, He J, *et al*. Self-microemulsifying drug delivery system for improved oral bioavailability of dipyridamole: preparation and evaluation[J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(7): 1113 - 1123.

[7] Wang Y, Sun J, Zhang T, *et al*. Enhanced oral bioavailability of tacrolimus in rats by self-microemulsifying drug delivery systems[J]. Drug Dev Ind Pharm, 2011, 37(10): 1225 - 1230.

[8] Setthacheewakul S, Mahattanadul S, Phadoongsombut N, *et al*. Development and evaluation of self-microemulsifying liquid and pellet formulations of curcumin, and absorption studies in rats[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2010, 76(3): 475 - 485.

[9] Shen Q, Li X, Yuan D, *et al*. Enhanced oral bioavailability of daidzein by self-microemulsifying drug delivery system[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2010, 58(5): 639 - 643.

[10] Kang B K, Lee J S, Chon S K, *et al*. Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs[J]. Int J Pharm, 2004, 274(1/2): 65 - 73.

[11] Liu Y, Zhang P, Feng N, *et al*. Optimization and in situ intestinal absorption of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin [J]. Int J Pharm, 2009, 365(1/2): 136 - 142.

[12] Rege B D, Kao J P, Polli J E, *et al*. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers[J]. Eur J Pharm Sci, 2002, 16 (4/5): 237 - 246.

[13] Singh A, Worku Z A, Van-den-Mooter G. Oral formulation strategies to improve solubility of poorly water-soluble drugs[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2011, 8(10): 1361 - 1378.

[14] Attama A A, Nkemnele M O. *In vitro* evaluation of drug release from self micro-emulsifying drug delivery systems using a biodegradable homolipid from Capra hircus [J]. Int J Pharm, 2005, 304(1/2): 4 - 10.

(**收稿**:2011-11-24;**修回**:2012-01-04)

(编辑 张 维)