

他达拉非微粒的制备及其体外释药研究

吴婧楠¹, 蒋巧萍¹, 宇泉霖¹, 孙常胜¹, 吴雪纯¹, 邱 旖¹, 郭杏梅¹, 孙腾跃², 蔡程科^{1*}, 王洪飞²

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 北京量子高科制药科技有限公司, 北京 102200

摘要: 目的 采用快速膜乳化-溶剂挥发法制备不含载体辅料的他达拉非微粒, 并对其体外释药行为进行评价。方法 采用快速膜乳化-溶剂挥发法制备不含载体辅料的他达拉非微粒, 将主药于 50 °C 超声条件下溶解于有机溶剂中作为油相。将聚乙烯醇 (PVA) 于磁力搅拌加热条件下溶解于去离子水中, 趁热用 0.45 μm 的微孔滤膜真空抽滤, 得滤液, 作为水相。油相与水相经磁力搅拌混合均匀后得初乳液, 将初乳液倒入快速不锈钢膜乳化装置, 氮气加压, 过膜, 收集乳液。将乳液与固化液混合后固化至无有机溶剂气味, 离心洗涤, 冷冻干燥即得到他达拉非微粒冻干粉。以微粒粒径及焓变值的综合评价为指标, 对有机溶剂种类、PVA 浓度、药物质量浓度、油水相体积比、过膜次数、固化方式、固化液 pH 值进行单因素考察, 初步筛选出他达拉非微粒最佳制备工艺; 采用直接释药法测定并比较他达拉非原料药与微粒在不同时间点的累积释放率, 并对其释放行为进行数学模型拟合。结果 经单因素考察, 初步确定他达拉非微粒的制备条件为: 有机溶剂醋酸乙酯, PVA 浓度为 3%, 油水相体积比为 1:1, 油相药物的质量浓度为 5 mg·mL⁻¹, 固化液 pH 值为 4.5, 四级串联不锈钢膜过膜 1 次, 旋转蒸发仪固化。他达拉非微粒平均 10%、50%、90% 的颗粒尺寸在所测得的尺寸值 (D₁₀、D₅₀、D₉₀) 分别为 30.3、72.0、126 μm, 扫描电镜下呈现较为均匀的长条片状, 差示扫描量热法测定其焓变值为 2 033.8 mJ·mg⁻¹·s⁻¹, 显示其结晶程度降低; 平均药物质量分数为 99.07%。他达拉非微粒在 4 h 时累积释放率可达 94.00%, 而原料药在 4 h 内仅释放 54.56%, 两者体外释放均符合 Logistic 方程。结论 快速膜乳化法制备的微粒可使他达拉非粒径更均一, 结晶程度降低, 溶出度提高, 显示该方法可用于提高难溶性药物生物利用度。

关键词: 他达拉非; 快速膜乳化溶剂挥发法; 微粒; 单因素考察; 体外释放

中图分类号: R944.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 01-0108-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.01.015

Preparation and *in vitro* release of tadalafil microparticles

WU Jingnan¹, JIANG Qiaoping¹, YU Quanlin¹, SUN Changsheng¹, WU Xuechun¹, QIU Yi¹, GUO Xingmei¹, SUN Tengyue², CAI Chengke¹, WANG Hongfei²

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Beijing Quantum Hi-tech Pharmaceutical Technical Co., Ltd., Beijing 102200, China

Abstract: Objective To prepare tadalafil microparticles without carrier excipients by rapid membrane emulsification-solvent evaporation method and evaluate their drug release behavior *in vitro*. **Methods** Tadalafil microparticles without carrier and excipients were prepared by rapid membrane emulsification solvent volatilization method. The main drug was dissolved in an organic solvent as oil phase under ultrasonic at 50 °C. The polyvinyl alcohol (PVA) was dissolved in deionized water under the condition of magnetic stirring and heating, and the filtrate was obtained by vacuum pumping with a 0.45 μm microporous filter membrane as the aqueous phase. The oil phase and the water phase were mixed evenly by magnetic stirring to obtain the primary lotion. The primary lotion was poured into the rapid stainless steel membrane emulsifying device, pressurized with nitrogen, and the lotion was collected. After mixing the lotion with the curing liquid, it was cured until there was no smell of organic solvent, centrifugally washed and freeze-dried to obtain the freeze-dried powder of tadalafil microparticles. Taking the comprehensive evaluation of particle size and enthalpy change as the index, the organic solvent, PVA concentration, tadalafil mass concentration, oil-

收稿日期: 2022-10-24

基金项目: 国家科技重大专项项目 (2011ZX09201-201); 北京市科技计划专项研发项目 (Z16010101390)

第一作者: 吴婧楠, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 550473670@qq.com

*通信作者: 蔡程科, 研究方向为中药药剂学。E-mail: cck98@126.com

water phase volume ratio, film passing times, curing mode and pH value of curing solution were investigated by single factor method, and the optimal preparation conditions of tadalafil particles was preliminarily determined; The cumulative release rates of tadalafil and its microparticles at different time points were measured and compared by direct release method, and the release behavior was fitted by mathematical model. **Results** After single factor investigation, the preparation conditions of tadalafil microparticles were preliminarily determined as follows: organic solvent ethyl acetate, PVA concentration of 3%, oil-water phase volume ratio of 1:1, drug mass concentration of $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, curing liquid $\text{pH} = 4.5$, four-stage series stainless steel membrane passing through the membrane once, and curing by rotary evaporator. The average D_{10} , D_{50} , D_{90} of tadalafil microparticles were 30.3、72.0、126.0 μm , under scanning electron microscope, tadalafil microparticles showed a relatively uniform strip. The enthalpy change value measured by differential scanning calorimetry was $2\,033.8 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. The differential scanning calorimetry showed that the crystallinity of tadalafil microparticles decreased. The average drug mass fraction was 99.07%. The cumulative release rate of tadalafil microparticles was 94.00% at 4 h, while the release of API was only 54.56% at 4 h, the release of both *in vitro* conforms to the logistic equation. **Conclusion** The particles prepared by rapid membrane emulsification-solvent evaporation method can make the tadalafil microparticle size more uniform, reduce the degree of crystallization, and improve the dissolution, which shows that this method can be used to improve the bioavailability of insoluble drugs.

Key words: tadalafil; rapid membrane emulsification-solvent evaporation method; microparticle; *in vitro* release

他达拉非分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$, 相对分子质量为 389.404, 化学结构式见图 1。他达拉非是一种高选择性的磷酸二酯酶 5 可逆抑制剂(PED5i), 通过抑制磷酸二酯酶(PED)对环磷酸鸟苷(cGMP)的降解, 起到扩张血管、舒张海绵体平滑肌、增加血流量的作用, 进而促进阴茎勃起^[1-3]。2003 年经美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市, 2009 年被批准用于治疗勃起功能障碍(ED), 商品名为希爱力^[4], 其半衰期长、药效维持时间久, 在 ED 治疗中占具优势地位。他达拉非为生物药剂学分类(BSC)II类药物, 在水中的溶解度为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 极低的溶解度限制了其在体吸收, 进而使其生物利用度偏低^[5]。近年来, 微粒分散体系已成为解决药物水溶性差的常用技术, 如微球、微囊等, 但常需加入大量的载体材料如聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA), 因此, 易出现载药量低、包封率差的问题^[6], 本实验拟采用快速膜乳化-溶剂挥发法制备他达拉非微粒, 以期能够改善他达拉非粒径均匀度、增大溶出速度进而提高生物利用度。

1 材料

1.1 主要仪器

快速膜乳化器(中国科学院过程工程研究所);

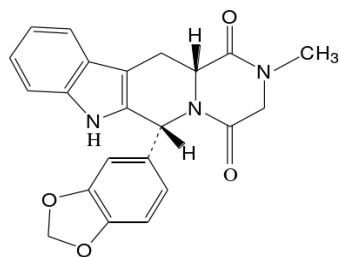


图1 他达拉非化学结构

Fig. 1 Chemical structure formula of tadalafil

四级串联不锈钢膜(实验室自制, 北京中医药大学); IKA RT10 高效 10 点加热磁力搅拌器(德国 IKA 公司); RW20 digital 数显型顶置式机械搅拌器(德国 IKA 公司); KQ-400DB 型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); H1750 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); RE-501 旋转蒸发器(北京神泰伟业仪器设备有限公司); 1GJ-12 冷冻干燥机(北京松原华兴科技发展有限公司); Mastersizer 3000 激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司); Supra55 场发射扫描电子显微镜(德国 Carl Zeiss Jena 公司); DSC3 型差示扫描量热仪(瑞士梅特勒-托利多公司); BSI10S 型万分之一电子分析天平(赛多利斯仪器系统有限公司); BT125D 电子天平(北京赛多利斯有限公司); Shimadzu HPLC DGU-20A₅[岛津(上海)实验器材有限公司]; 笔式 pH 检测计(希玛仪表有限公司); SHA-CA 水浴恒温振荡器(常州澳华仪器有限公司)。

1.2 药物及主要试剂

他达拉非原料药(浙江华海药业股份有限公司, 批号 TDLF-202101101, 质量分数 99.3%); 聚乙烯醇(PVA)088-20(山西三维集团股份有限公司); 二氯甲烷(天津市大茂化学试剂厂); 乙腈、甲醇、醋酸乙酯、正辛醇(Fisher, 色谱纯); 三氟乙酸、盐酸、氢氧化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠(北京化工厂); 娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 他达拉非微粒的制备

采用快速不锈钢膜乳化-溶剂挥发法制备他达拉非微粒, PVA 溶液作为水相, 含主药的醋酸乙酯溶液作为油相, 二者充分均匀混合, 快速过膜乳化,

得到的乳液与固化液混合均匀后机械搅拌固化至无醋酸乙酯气味,离心洗涤,冷冻干燥即得他达拉非微粒冻干粉,避光密封干燥保存。

2.1.1 油相的制备 称取他达拉非原料药适量置于棕色具塞三角瓶中,加入一定量醋酸乙酯,50 °C超声加热使其溶解,经0.45 μm微孔滤膜滤过,避光密封放置备用。

2.1.2 水相的制备 称取适量PVA粉末,加入一定量纯净水,置于磁力搅拌器上,在加热搅拌条件下使其溶解至澄清,趁热经0.45 μm微孔滤膜真空抽滤,静置,密封保存备用。

2.1.3 乳液的制备 将油相均匀注入水相中,经快速磁力搅拌预乳化,使药物均匀分散,将得到的初乳液倒入不锈钢膜乳化装置,氮气加压,过膜,收集乳液。

2.1.4 固化洗涤 固化是指有机溶剂逐渐扩散到水相,再不断挥发到环境中,与此同时,药物逐渐析出从而形成微粒。过膜后的乳液直接滴入PVA溶液中,两者均匀混合,固化至无明显的醋酸乙酯气味。固化后的液体经10 000 r·min⁻¹离心10 min,缓慢倒去上清液,沉淀用去离子水反复洗涤,以减少PVA残留。

2.2 评价指标

2.2.1 表观形态学考察 采用扫描电子显微镜(SEM)观察微粒的形态,沾取少量他达拉非微粒冻干粉,粘在导电胶上,氮气吹去表面多余的粉末,高真空镀膜仪喷金后,观察微粒形态。

2.2.2 晶型稳定性考察 采用差示扫描量热法(DSC)对他达拉非微粒的晶型进行表征^[6],精密称定相应实验条件下的他达拉非微粒,置于小坩埚中,温度25~320 °C,升温速率10 °C·min⁻¹,测定微粒焓变值。

2.2.3 10%、50%、90%的颗粒尺寸在所测得的尺寸值(D₁₀、D₅₀、D₉₀) 采用BT激光粒度分布仪(湿法)对他达拉非原料药和微粒冻干粉进行粒径测定,原料药的测定结果如下:D₁₀=124 μm、D₅₀=364 μm、D₉₀=764 μm。

2.2.4 综合评价 由于微粒粒径的D₅₀能够更直观地反映粒子平均大小,且他达拉非为多晶型药物,本实验尚未对各微粒的晶型种类进行测定,因此,焓变值并不能很好地反映出其溶解性的差异。故设定D₅₀的权重为75%,焓变值的权重为25%进行计算,选择计算值较小的条件来制备他达拉非微粒。

2.3 单因素考察他达拉非微粒制备处方及工艺

2.3.1 有机溶剂种类 微粒制备时选用的有机溶剂应不与水混溶,且能在一定条件下溶解他达拉非,结合课题组前期经验,以醋酸乙酯和二氯甲烷最为常用。按照“2.1”项下方法制备他达拉非微粒,其中PVA质量分数为3%,油水相体积比为1:1,油相药物的质量浓度为5 mg·mL⁻¹,固化液pH值为7,四级串联不锈钢膜过膜3次,搅拌桨固化,醋酸乙酯和二氯甲烷分别作为油相,SEM、DSC及粒径测定结果见图2及表1。醋酸乙酯综合评分更小、毒性更小,因此,选择醋酸乙酯作为油相制备他达拉非微粒。

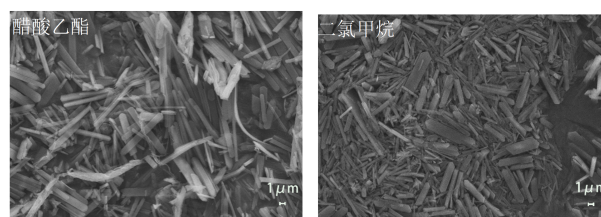


图2 不同有机溶剂制备的他达拉非微粒SEM图(×2 000)
Fig. 2 SEM images of tadafil microparticles prepared by different organic solvents(×2 000)

表1 有机溶剂种类考察

Table 1 Results of organic solvents

有机溶剂	D ₁₀ / μm	D ₅₀ / μm	D ₉₀ / μm	焓变值/ (mJ·mg ⁻¹ ·s ⁻¹)	综合评 分
二氯甲烷	115.0	372	713	3 251.11	1 091.78
醋酸乙酯	41.5	105	218	3 298.85	903.46

2.3.2 PVA质量分数 由Stoke's定律可知,介质黏度越大,沉降速度越小,体系稳定性越好。PVA作为分散剂、乳化剂,可以增加乳液稳定性,防止乳滴聚集合并,但PVA质量分数过高会使乳液黏度增大,通过不锈钢膜的难度增加,因此选取PVA质量分数为1%、2%、3%、4%制备他达拉非微粒,DSC及粒径测定结果见表2。其余制备条件:醋酸乙酯作为油相、油相药物的质量浓度为5 mg·mL⁻¹、油水相体积比1:1、固化液pH值为7、过膜3次、搅拌桨固化。

3%的PVA溶液制备的他达拉非微粒综合评分更小。可能是由于当PVA质量分数太大时,初乳液太黏,过膜困难,乳化不完全,而浓度太小又难以维持体系稳定,因此,选择3%的PVA溶液制备他达拉非微粒。

2.3.3 油相药物质量浓度 由Stoke's定律可知,在相同分散介质中,分散相的浓度越大,微粒与介质

表2 PVA质量分数考察

Table 2 Results of PVA mass concentration

PVA质量 分数/%	D ₁₀ / μm	D ₅₀ / μm	D ₉₀ / μm	焓变值/ (mJ·mg ⁻¹ ·s ⁻¹)	综合评分
1	27.9	145	246	3 665.66	1 025.17
2	61.8	206	388	3 722.07	1 085.02
3	41.5	105	218	3 298.85	903.46
4	78.1	247	526	3 548.70	1 072.43

间的密度差越大,其混悬液的稳定性越差^[7]。结合预实验及生产效率,选择他达拉非质量浓度为3、5、7 mg·mL⁻¹制备微粒,但实验过程中7 mg·mL⁻¹的他达拉非溶液需要更高的温度才能溶解,不适于生产,DSC及粒径测定结果见表3。其余制备条件:醋酸乙酯作为油相,油水相体积比1:1、固化液pH值为7、过膜3次、搅拌浆固化。依据综合评分最小,选择5 mg·mL⁻¹的药物质量浓度制备他达拉非微粒。

2.3.4 油水相体积比 在制备初乳液时,若油相占比小于25%,乳滴运动阻力小,分散空间大,易出现分层现象,而当油相占比大于50%时,乳滴之间距离近,易发生碰撞合并甚至发生相变^[8],因此以 $V_{\text{油相}}:V_{\text{水相}}$ 分别为1:1、1:2、1:3制备他达拉非微粒,其余制备条件:PVA质量分数为3%,醋酸乙酯作为油相,油相药物的质量浓度为5 mg·mL⁻¹,固化液pH值为7,四级串联不锈钢膜过膜3次,搅拌浆固化。DSC及粒径测定结果见表4。

表3 药物质量浓度考察

Table 3 Results of drug mass fraction

他达拉 非/(mg·mL ⁻¹)	D ₁₀ / μm	D ₅₀ / μm	D ₉₀ / μm	焓变值/ (mJ·mg ⁻¹ ·s ⁻¹)	综合评 分
3	56.0	167	339	3 180.00	920.25
5	41.5	105	218	3 298.85	903.46
7	77.3	313	667	4 562.73	1 375.43

表4 油水相体积比考察

Table 4 Results of oil-water ratio

油水相 体积比	D ₁₀ /μm	D ₅₀ / μm	D ₉₀ / μm	焓变值/ (mJ·mg ⁻¹ ·s ⁻¹)	综合评分
1:1	41.5	105	218	2 542.67	714.42
1:2	87.5	311	613	3 298.85	1 057.96
1:3	148.0	401	692	3 699.34	1 225.59

可以看出,增大水相体积时,微粒粒径及DSC焓变值均增大,当油水相体积比为1:1的他达拉非微粒综合评分更小。推测可能是由于水相占比增

大,醋酸乙酯扩散至水相的速度增大、体积增多,他达拉非在醋酸乙酯中可溶解的量减小,导致其不断析出结晶,粒径变大。因此,选择油水相体积比1:1制作他达拉非微粒。

2.3.5 固化液pH值 由原料药在不同pH值缓冲液中的平衡溶解度测定值得出他达拉非在酸性及中性环境下的溶解度极低,在碱性条件下略有增加,但依旧很低。选择pH值为4.5、7.0、8.5考察pH值对他达拉非微粒的影响,0.01 mol·L⁻¹盐酸和NaOH作为pH调节剂,其余制备条件:PVA质量分数为3%,醋酸乙酯作为油相,油水相体积比为1:1,油相药物的质量浓度为5 mg·mL⁻¹,四级串联不锈钢膜过膜3次,搅拌浆固化。DSC及粒径测定结果见表5,可以看出,在酸性条件下,他达拉非微粒综合评分更小,显示其粒子比表面积更大,晶型相对更不稳定,更容易被吸收。

2.3.6 过膜次数 理论上,随着过膜次数的增加,大乳滴逐渐被破坏变成小乳滴,乳滴大小更均一,乳液均匀性更好,但过膜次数越多,残留在膜内的乳液也会越多,生产过程中造成的损失也就越大,选择过膜次数1、2、3进行考察,其余制备条件:PVA质量分数为3%,醋酸乙酯作为油相,油水相体积比为1:1,油相药物的质量浓度为5 mg·mL⁻¹,固化液pH值为4.5,四级串联不锈钢膜过膜3次,搅拌浆固化。DSC及粒径测定结果见表6,过膜1次的微粒综合评分更小,且过膜次数越少,原料药的损耗也越小,因此,选择过膜1次来制备他达拉非微粒。

2.3.7 固化方式 通常情况下,温度越低,乳滴运动越慢,乳液越稳定,但固化时间会延长,制备效率

表5 固化液pH值考察

Table 5 Results of pH value of curing solution

固化液 pH值	D ₁₀ /μm	D ₅₀ /μm	D ₉₀ / μm	焓变值/ (mJ·mg ⁻¹ ·s ⁻¹)	综合评分
4.5	51.0	130	234	2 992.36	845.59
7.0	89.8	286	566	4 448.45	1 326.61
8.5	45.0	214	472	3 476.67	1 029.67

表6 过膜次数考察

Table 6 Results of membrane passing times

过膜次数	D ₁₀ / μm	D ₅₀ / μm	D ₉₀ /μm	焓变值/ (mJ·mg ⁻¹ ·s ⁻¹)	综合 评分
1	29.5	77	131	2 800.43	757.86
2	93.9	251	477	3 609.11	1 090.53
3	41.5	105	218	3 298.85	903.46

降低;温度升高时,乳液黏度下降,更容易形成均一的小乳滴,但温度过高会使固化太快,微粒形态变差。他达拉非由于其极易聚集,考虑在固化过程中微微加热,加速分子运动,降低分子间聚集力,使乳液更均一。选择真空旋蒸、机械搅拌、磁力搅拌3种固化方式进行考察,其余制备条件:PVA质量分数为3%,醋酸乙酯作为油相,油水相体积比为1:1,油相药物的质量浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,固化液pH值为4.5,四级串联不锈钢膜过膜3次。DSC及粒径测定结果见表7,旋转蒸发仪固化的微粒综合评分最小,因此,选择其固化他达拉非微粒。

2.3.8 工艺验证 综合上述单因素考察结果,确定他达拉非微粒的制备条件为:有机溶剂醋酸乙酯,PVA浓度为3%,油水相体积比为1:1,油相药物的质量浓度为 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,固化液pH值为4.5,四级串联不锈钢膜过膜1次,旋转蒸发仪固化(常温,转速为 $60\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)。根据上述条件制备3批微粒,SEM、DSC及粒径测定结果见图3和表8。经测定其平均药物质量分数为99.07%。

表7 固化方式考察

Table 7 Results of curing methods

固化方式	$D_{10}/\mu\text{m}$	$D_{50}/\mu\text{m}$	$D_{90}/\mu\text{m}$	焓变值/ ($\text{mJ}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	综合评分
搅拌浆	41.5	105	218	3 298.85	903.46
磁力搅拌	109.0	292	544	3 375.43	1 062.86
旋转蒸发	51.7	125	213	2 720.00	773.75

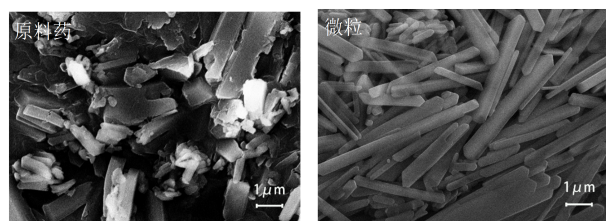
图3 他达拉非原料药及微粒SEM图($\times 10\,000$)Fig. 3 SEM of tadalafil API and particles ($\times 10\,000$)

表8 工艺验证结果

Table 8 Results of process validation

批次	$D_{10}/\mu\text{m}$	$D_{50}/\mu\text{m}$	$D_{90}/\mu\text{m}$	焓变值/ ($\text{mJ}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	综合评分
1	29.5	77	131	2 108.4	584.85
2	30.4	72	120	2 005.6	555.40
3	31.0	67	127	1 987.5	547.13
均值	30.3	72	126	2 033.8	562.45
RSD/%	2.03	5.67	3.61	2.62	2.88

2.4 含量测定方法的建立

2.4.1 色谱条件^[9] 色谱柱:以辛烷基硅烷键合硅胶为填充剂($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),流动相:乙腈-0.1%三氟乙酸溶液(60:40),检测波长 285 nm ,体积流量 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.4.2 专属性考察 在上述色谱条件下,专属性考察结果如图4所示,结果显示主药峰与溶剂峰之间互不干扰,专属性良好。

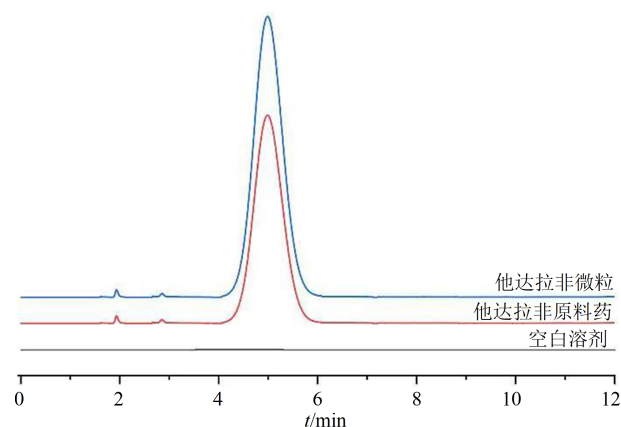


图4 他达拉非HPLC色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of tadalafil

2.4.3 检测限和定量限 精密称量他达拉非对照品 25.00 mg ,甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,摇匀,作为他达拉非对照品储备液,密封避光保存备用。精密移取他达拉非对照品储备液适量,用甲醇稀释成系列质量浓度的对照品溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件分别进样,可得他达拉非的定量限为 $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($S/N>10$),检测限 $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($S/N>3$)。

2.4.4 线性关系考察 精密移取“2.4.3”项下质量浓度为 $1.00\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 他达拉非对照品溶液适量,用甲醇稀释成质量浓度为 1 、 5 、 10 、 20 、 50 、 100 、 200 、 $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,按照“2.4.1”项下色谱条件分别进样,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,进行线性回归,绘制曲线,回归方程为 $Y=17\,179\,X+32\,037$, $R^2=0.999$,表明他达拉非在 $1\sim 400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4.5 系统精密度考察 取“2.4.4”项下 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的他达拉非对照品溶液适量,连续进样6次,进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$,记录对照品的峰面积,其RSD为0.30%,表明仪器精密度良好。

2.4.6 稳定性考察 精密称取他达拉非原料药 10.20 mg ,甲醇溶解并定容至 25 mL 量瓶中,作为他达拉非供试品储备液,密封避光保存备用。精密吸取 1 mL 他达拉非供试品储备液至 10 mL 量瓶中,甲

醇稀释定容,作为供试品溶液,13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液按“2.4.1”项下色谱条件分别在制备后0、2、4、6、8、10、12、24 h进样,记录峰面积,其峰面积RSD值为1.25%,说明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.7 重复性考察 按照“2.4.6”项下方法,同法制备6份供试品溶液,按“2.4.1”项下方法进样,记录峰面积,并计算其含量,其峰面积RSD值为1.07%,说明此方法重复性良好。他达拉非原料药质量分数为98.68%,表明他达拉非原料药纯度较高。

2.4.8 加样回收率 精密称取他达拉非原料药5.11 mg,甲醇溶解并定容至50 mL量瓶中,按照“2.4.7”项下结果计算其质量浓度为100.85 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。取上述溶液0.5 mL置1 mL量瓶中,精密移取“2.4.4”项下200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的他达拉非对照品溶液0.20、0.25、0.30 mL,甲醇稀释并定容至刻度,配制成80%、100%、120%规格质量浓度的样品溶液,各质量浓度平行配制3份。按“2.4.1”项下色谱条件进样10 μL ,记录峰面积,计算回收率分别为99.83%、98.53%、99.82%,RSD分别为0.20%、0.21%、0.14%,结果说明该方法加样回收率合格,符合方法学考察相关要求。

2.5 体外释放考察

2.5.1 平衡溶解度的测定 考虑到他达拉非服药多为晚饭后,Osamu等^[10]对饭后胃内pH值进行实时监测,饭后2 h胃内pH值小于4,因此,选择pH 3.6的醋酸-醋酸钠缓冲液作为释放介质^[11]。因此对他达拉非原料药在释放介质醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.6)与含0.1% SDS的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.6)中的平衡溶解度进行测定^[12]。称取过量的他达拉非原料药,分别加入新鲜配制的释放介质50 mL,平行操作3份,置于(37.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温振荡器中以120次 $\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度振摇48 h至饱和,取适量溶液13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液按“2.4.1”项下色谱条件下进样,测定其含量。结果显示他达拉非在2种释放介质中的平衡溶解度分别为(0.150 $\pm$ 0.014)、(5.60 $\pm$ 0.13) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,可见他达拉非原料药在醋酸-醋酸钠缓冲液中的溶解度极低,为满足漏槽条件,选择以含0.1% SDS的醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.6)作为释放介质进行体外释放度的测定。

2.5.2 体外释放率的测定 采用直接释药法对他达拉非原料药或微粒在释放介质中的累积释放率进行研究^[13]。精密称取1.02 mg的他达拉非原料药

与微粒,加入500 mL释放介质(满足漏槽条件)置于水浴恒温振荡器中,温度为(37.0 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$,速度为120次 $\cdot\text{min}^{-1}$,在规定的時間间隔(1、5、10、15、30、60、120、240 min)取样1 mL并补充等量的新鲜释放介质。每组实验平行操作3次,12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液按“2.4.1”项下方法进行测定,记录峰面积,计算他达拉非原料药与他达拉非微粒在不同时间点的累积释放率,绘制释放曲线,见图5。微粒的释放速率明显高于原料药,在4 h时,微粒的累积释放率为94.00%,而原药的累积释放率为54.56%,可见微粒制剂对于改善难溶性药物的体外释药行为具有明显优势。对原料药及微粒的体外释药过程进行数学模型拟合,结果见表9,原料药及微粒的体外释药模型均与Logistic方程的拟合度最优,相关系数分别为0.975 3和0.994 2。

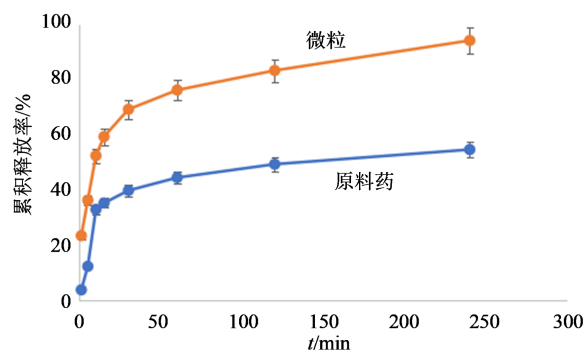


图5 他达拉非原料药和微粒的累积释放曲线($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 5 Release curve of tadalafil API and particles ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3 讨论

快速膜乳化-溶剂挥发法是制备微粒制剂的常用方法,采用本课题组开发的四级串联不锈钢膜已成功制备了齐墩果酸微粒^[14-15]、甘草次酸拼合物TOGA-X4微粒^[16-17]、水飞蓟宾微粒^[18-19]等,避免了大量载体材料如PLGA造成的载药量低的难题。在对有机溶剂种类进行考察时发现,他达拉非在二氯甲烷中溶解需要更长的时间,且溶解后易析出结晶,综合考虑,选择醋酸乙酯作为油相。通过对他达拉非平衡溶解度的测定发现其在碱性条件下溶解性更好,提示他达拉非具有pH依赖性,属于难溶弱酸性药物,因此对固化液的pH值进行考察,发现在酸性条件下微粒粒径更小,焓变值更小,推测是由于碱性环境下,大部分药物溶解于固化液中以盐的形式存在,随着离心洗涤后上清液的除去而损失,剩余少量药物不断结晶长大,以更稳定的大结晶粒径的形式存在,而当固化液为酸性时,药物不

表9 体外释药数学模型拟合结果

Table 9 Results of mathematical model fitting of drug release *in vitro*

组别	零级方程	一级方程	Higuchi 方程	Logistic 方程
原料药	$Q=0.180\ 5\ t+20.609\ 5$ $R^2=0.519\ 3$	$\ln(48.815\ 4-Q)=\ln 48.815\ 4-0.082\ 0\ t$ $R^2=0.962\ 0$	$Q=3.470\ 9\ t^{1/2}+10.998\ 2$ $R^2=0.765\ 1$	$Q=52.100\ 1+(-52.400\ 5)/[1+(t/t_0)^{1.216\ 2}]$ $R^2=0.975\ 3$
微粒	$Q=0.287\ 2\ t+39.787\ 5$ $R^2=0.552\ 1$	$\ln(81.739\ 1-Q)=81.739\ 1-0.100\ 5\ t$ $R^2=0.921\ 2$	$Q=5.372\ 8\ t^{1/2}+25.034\ 0$ $R^2=0.800\ 1$	$Q=112.562\ 1+(-112.377\ 8)/[1+(t/t_0)^{0.540\ 4}]$ $R^2=0.994\ 2$

易溶解在水相中,损耗更小,而PVA溶液的乳化稳定作用,使得的微粒粒径更小。以单因素考察的工艺条件制备了他达拉非微粒,经测定其平均药物质量分数为99.07%,说明离心洗涤过程较为彻底,几乎无PVA残留。本实验通过单因素考察初步对微粒制备过程中的相关因素进行了考察,但并未综合考虑对因素间的交互作用,后期可采用均匀设计或响应面法进行优化,以期得到粒径更加均一、形貌优良的他达拉非微粒。

采用直接释药法对他达拉非原料药及微粒的体外释放进行考察时,发现在4 h时释放率尚未达到100%,可能是由于精密称定时因称量药品质量很小,误差较大。但微粒的释放速度和累积释放率均好于原料药,原因可能有:①由SEM图可以看出,原料药形态多样,而微粒呈均匀的薄长条状,比表面积明显增大,利于释放;②DSC是通过测定物质热力学性质的变化来表征物理或化学变化过程的,在程序控制温度条件下,测量输入给样品与参比物的功率差与温度关系的一种热分析方法^[19]。在DSC图中出现的吸热峰,是指升温时,由固体晶体向液体无定形态转变的温度^[20],利用熔融峰可以计算焓变值,焓变值越大晶型越稳定,反之,则越不稳定。越不稳定的晶型溶解度相对越大,溶出越快。本实验通过测定他达拉非微粒的DSC图,计算其焓变值,筛选亚稳定的他达拉非晶型。由验证实验结果可知,采用膜乳化技术将原料药制备成微粒后,结晶程度降低,从而提高释放速率。

由于他达拉非微粒大多为长条状,在用BT激光粒度分布仪(湿法)对他达拉非原料药和微粒冻干粉进行粒径测定时,对于测定角度的选择很难统一,且他达拉非微粒易结晶,许多小微粒聚集后的测定结果也不能准确反映他达拉非微粒的真实粒径,后续可以用Nano measurer1.2对SEM电镜下一定数量的微粒粒子大小进行标记测定,可以更真实地反映微粒粒径大小。

验证结果显示将他达拉非制备成微粒并没有明显减小其粒径,但均一性有所提高,体外释放更快、更完全,可见快速膜乳化技术可用于改善难溶性药物的溶出速度,提高生物利用度,同时可提高药物在制剂过程中的含量均匀度,为其他难溶性药物的剂型开发提供新的思路。由于微粒制备过程中影响因素可达40余种,后续可对过膜压力、固化液种类、固化液中电解质种类及浓度等进行考察,从而得到粒径更均一、结晶度更低的他达拉非微粒。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘冬, 韩鸿璨, 王骏. 中国他达拉非片生物等效性试验研究现状及其审评要求 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 828-832.
Liu D, Han H C, Wang J. Progress and review requirement for Tadalafil Tablet bioequivalence test in China [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(5): 828-832.
- [2] 龙愉良, 周达新. 他达拉非在肺动脉高压治疗中的研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 30(4): 310-316.
Long Y L, Zhou D X. Research advances of tadalafil in the treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. Chin J Clin Pharm, 2021, 30(4): 310-316.
- [3] Gul A, Altinay S, Kabasakal L, et al. Effect of tadalafil on penile nitric oxide synthase and corporal smooth muscle in rats under dutasteride treatment [J]. Aging Male, 2020, 23(2): 161-167.
- [4] Jackson D G, Alexander D B, Evans D M, et al. Phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors: Looking beyond erectile dysfunction [J]. Br J Cardiol, 2003, 10(Suppl 4): S1-S8.
- [5] 孙钦勇, 牟艳芳, 张朝, 等. 他达拉非口腔崩解片的制备及体内外评价 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(12): 1630-1637.
Sun Q Y, Mou Y F, Zhang Z, et al. Preparation and *in vitro-in vivo* evaluation of tadalafil orally disintegrating

- tablets [J]. Chin J Pharm, 2021, 52(12): 1630-1637.
- [6] 杨硕. 微粒给药系统在药物制剂中的应用进展 [J]. 科学技术创新, 2019(24): 43-44.
- Yang S. Application progress of microparticle delivery system in pharmaceutical preparation [J]. Sci Technol Innov, 2019(24): 43-44.
- [7] 戈富城, 罗丹冬, 章秀冰, 等. 介质研磨法制备他达拉非纳米混悬液研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(11): 1121-1125, 1137.
- Ge F C, Luo D D, Zhang X B, et al. Preparation of tadalafil nanosuspension by wet media milling [J]. Chin J Hosp Pharm, 2022, 42(11): 1121-1125, 1137.
- [8] 李范珠, 李永吉. 中药药剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- Li F Z, Li Y J. *Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicine* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2012.
- [9] 徐怀友. 他达拉非口腔速溶膜剂的制备工艺及其在比格犬体内的初步药动学研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2017.
- Xu H Y. The preparation of tadalafil oral fast dissolving films and pharmacokinetic study in beagle dogs [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine, 2017.
- [10] Osamu K, Shiko K, Motoyasu K. 24-hour esophageal multichannel intraluminal impedance and pH monitoring [J]. Japan J Clin Med, 2016, 74(8): 1285-1292.
- [11] 中国药典 [S]. 四部. 2020.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020.
- [12] 李文芳, 寻明金, 冯中, 等. 他达拉非片的制备及其体外外评价 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(9): 1902-1908.
- Li W F, Xun M J, Feng Z, et al. Preparation and *in vitro-in vivo* evaluation of tadalafil tablets [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(9): 1902-1908.
- [13] 李聘, 李红鑫, 吴茜, 等. 阿立哌唑微粒的制备及其体外释药研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(4): 703-710.
- Li P, Li H X, Wu Q, et al. Preparation and *in vitro* release of aripiprazole microparticles [J]. Drug Eval Res, 2021, 44(4): 703-710.
- [14] 吴晨悦. 齐墩果酸微粒的制备工艺及对CCl₄肝损伤的预防作用研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- Wu C Y. Preparation of oleanolic acid microparticles and its preventive effect on CCl₄ induced liver injury [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2017.
- [15] 吴晨悦, 范文硕, 田娟, 等. 快速膜乳化法制备齐墩果酸微粒的工艺研究 [J]. 中医药信息, 2017, 34(1): 29-33.
- Wu C Y, Fan W S, Tian J, et al. Preparation of oleanolic acid particles through premix membrane emulsification [J]. Inf Tradit Chin Med, 2017, 34(1): 29-33.
- [16] 伊辛. 水飞蓟宾微粒制备工艺及急性CCl₄肝损伤的药效学研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- Yi X. Preparation of silybin microparticles and pharmacodynamics of acute CCl₄ liver injury [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2015.
- [17] 尹雪雁. 不锈钢膜乳化法制备水飞蓟宾微粒及其关联规则模型的建立 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- Yin X Y. Preparation of silybin particles by stainless steel membrane emulsification and establishment of association rule model [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2016.
- [18] 田娟, 赵蕊, 王鹏龙, 等. 甘草次酸拼合物TOGA-X4微粒的制备工艺及其体外释药特性研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1802-1808.
- Tian J, Zhao R, Wang P L, et al. Preparation of microparticles of glycyrrhetic acid complex TOGA-X4 and *in vitro* release characteristics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2018, 49(8): 1802-1808.
- [19] 王之洋. 甘草次酸拼合物TOGA-X4微粒的工艺优化及其口崩片的体内外研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- Wang Z Y. Optimization of technology of glycyrrhetic acid complex TOGA-X4 microparticles and study on its orally disintegrating tablets *in vitro* and *in vivo* [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019.
- [20] 隋玲玲, 闫紫薇, 白跃飞, 等. 一种他达拉非晶型I的制备方法 [J]. 辽宁化工, 2020, 49(11): 1368-1370.
- Sui L L, Yan Z W, Bai Y F, et al. A novel preparation method of tadalafil crystal form I [J]. Liaoning Chem Ind, 2020, 49(11): 1368-1370.
- [21] 徐丽, 李若云, 郑娜, 等. 聚乳酸-聚乙二醇单甲醚共混体系的调制DSC分析 [J]. 功能高分子学报, 2016, 29(1): 36-42.
- Xu L, Li R Y, Zheng N, et al. Thermal analysis of polylactide-monomethoxy polyethylene glycol blends by modulated differential scanning calorimetry [J]. J Funct Polym, 2016, 29(1): 36-42.

[责任编辑 兰新新]