

• 药剂与工艺 •

依托泊苷过饱和自微乳化释药系统的制备工艺及质量评价研究

赵丹丹¹, 黄挺², 黄绳武^{1*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

2. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053

摘要:目的 制备依托泊苷(etoposide, VP-16)过饱和自微乳化释药系统(supersaturatable self-microemulsifying drug delivery system, S-SMEDDS), 增加难溶性药物 VP-16 的溶解度, 并对其进行质量评价, 为提高其生物利用度提供科学依据。方法 对 VP-16 S-SMEDDS 的处方及制备工艺进行研究, 从不同油相、表面活性剂的配伍情况以及不同助表面活性剂伪三元相图中微乳区域的大小, 确定自微乳化浓缩液的基本处方组成; 以 VP-16 的溶解度和析晶情况为考察指标进行处方优化, 筛选适宜的促过饱和物质和最佳处方载药量; 进行 VP-16 S-SMEDDS 的制备工艺研究, 以自微乳化速率为指标, 考察制备工艺对过饱和自微乳液自乳化能力的影响, 并对 VP-16 S-SMEDDS 进行理化性质、溶出度、稳定性的考察。结果 确定最优处方为聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40)-聚乙二醇400(PEG 400)-辛酸癸酸三甘油酯(GTCC)-聚乙烯吡咯烷酮 K30(PVP K30)(20:20:10:1), 其中药物用量为2%。最佳工艺条件为37℃, 20 r/min 磁力搅拌20 min。VP-16 S-SMEDDS 的平均粒径为(82.7±3.3) nm, 粒径分布较集中, 3批 VP-16 S-SMEDDS 中 VP-16 的平均质量分数为19.98 mg/g; 溶出实验结果表明, 在60 min 时累积溶出率接近100%。稳定性研究的结果表明, 高温与光照均影响 VP-16 S-SMEDDS 的稳定性与自微乳化能力, 而冷热循环对其无影响, 初步稳定性实验结果显示 VP-16 S-SMEDDS 的稳定性良好。结论 优化处方的 VP-16 S-SMEDDS 能显著增加 VP-16 的溶解度, 且质量稳定, 可进一步提高 VP-16 的生物利用度。

关键词: 过饱和自微乳化释药系统; 自微乳; 依托泊苷; 制备工艺; 溶解度; 伪三元相图; 冷热循环

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)06-0822-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.06.008

Preparation technology of supersaturatable self-microemulsifying drug delivery system of etoposide and quality evaluation

ZHAO Dan-dan¹, HUANG Ting², HUANG Sheng-wu¹

1. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. First Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To prepare supersaturatable self-microemulsifying drug delivery system (S-SMEDDS) of etoposide (VP-16) for increasing the solubility of difficult soluble drug of etoposide, which will provide a scientific basis for improving its bioavailability.

Methods To study the prescription and preparation technology of S-SMEDDS of VP-16, according to different oil phases, compatibility of surfactants, and the microemulsion area size in the pseudo ternary phase diagram of different cosurfactants, to determine the basic prescription of self-microemulsifying concentrate, optimize the prescription of VP-16 based on its solubility and crystallization conditions, with filtrating appropriate precipitation inhibitor and the best prescription drug loading. The rate of self-microemulsifying was taken as index to study the preparation technology of VP-16 S-SMEDDS for investigating the influence on the ability of self-microemulsifying. **Results** The optimal prescription is: RH40-PEG 400-GTCC-PVP K30 (20:20:10:1), 2% drug content of the mass fraction. The optimum technological conditions are 37℃, 20 r/min, and 20 min by magnetic stirring. The average particle size of VP-16 S-SMEDDS is (82.7±3.3) nm and the size distribution of VP-16 S-SMEDDS is relatively concentrated.

收稿日期: 2014-11-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473361, 81473434); 国家自然青年科学基金资助项目(81202926)

作者简介: 赵丹丹, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物新剂型与新技术研究。Tel: 15869159520 E-mail: sophie8328@163.com

*通信作者 黄绳武, 教授, 研究方向为药物新剂型与新技术研究。Tel: (0571)86613524 E-mail: hsw55@163.com

The average content of VP-16 in three batches of S-SMEDDS is 19.98 mg/g. Results of dissolution test showed that at 60 min the cumulative dissolution is close to 100%. Stability study results show that the high temperature and light could influence the drug stability and micro emulsification ability of VP-16 S-SMEDDS, while the psychro-thermal cycles test has no influence to it. After the preliminary stability test, the results show that the stability of VP-16 S-SMEDDS is good. **Conclusion** The optimized prescription of VP-16 S-SMEDDS can significantly increase the solubility of VP-16, and it's quality is stable, which could improve its bioavailability further. The research method is scientific, reliable, and feasible.

Key words: supersaturatable self-microemulsifying drug delivery system; self-microemulsion; etoposide; preparation technology; solubility; pseudo ternary phase diagram; psychro-thermal cycles

将难溶性药物制备成高效制剂具有重要的临床意义,近年来,研究者着重于采用含脂质的制剂来提高难溶性药物的口服生物利用度^[1-2]。应用最广泛的方法是将药物包含在脂质载体中,这其中受到特别关注的是自微乳化释药系统(self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS)^[3-4]。自微乳起效的机制是将难溶性药物包裹在 O/W 型微乳中,以增加药物的溶解性,从而提高药物的吸收,增强疗效^[5]。然而,自微乳制剂也存在着一定的不足。比如,在胃肠道内水相的稀释下,自微乳体系会由溶胀的 W/O 型反胶束变为双连续相,最终成为 O/W 型微乳。这种微观结构的改变会导致溶解于其中的药物溶解度发生改变;同时水溶性表面活性剂会逐渐分配到大量水相中,导致药物在界面层溶解能力下降,最终药物析出晶体,降低自微乳处方的载药量,影响自微乳制剂的稳定性^[6]。其次,通常为了防止药物析出晶体,保证自微乳制剂适宜的载药量,处方中会添加过多的表面活性剂。而过多的表面活性剂一方面会造成胃肠道的刺激性,使患者用药后产生较强烈不良反应;另一方面,会大大增加制剂生产的成本。

过饱和自微乳化释药系统(supersaturatable and self-microemulsifying drug delivery system, S-SMEDDS)是在自微乳处方中加入促过饱和物质,使自微乳中析出的药物过饱和和溶解,减少表面活性剂的用量,从而降低对胃肠道的刺激。

抗肿瘤药依托泊苷(etoposide, VP-16),为鬼臼毒素衍生物,主要用于治疗小细胞肺癌、恶性淋巴瘤、恶性生殖细胞瘤和白血病,VP-16 几乎不溶于水(148 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$),目前国内外上市的 VP-16 制剂主要是非水溶液注射剂和软胶囊^[7]。注射剂在使用时易引起较强的局部刺激,且有文献报道市售 VP-16 软胶囊内容物加 2 倍水稀释后即析出大量沉淀^[8]。为增加 VP-16 药物的溶解度并防止其析出晶体,本实验拟通过筛选适宜的促过饱和物质制备

VP-16 S-SMEDDS, 并对其质量评价^[9-15]。为解决 SMEDDS 存在的技术关键问题及研究提高 VP-16 生物利用度打下基础。

1 仪器与材料

DF101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义英峪予华仪器厂; Waters 2695 高效液相色谱仪、Waters 2996 紫外检测器, 杭州赛默科技有限公司; JA203H 电子天平, 常州市幸运电子设备有限公司; KQ5200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; PALL Cascada 纯水仪、RO-MB-20D 高纯水机, 杭州永洁达膜分离设备厂; 酸度计, 梅特勒-托利多 DELTA 320 台式 pH 计; HZ-9212S 恒温水浴振荡器, 太仓市科教器材厂。

VP-16 对照品, 中国食品药品检定研究院, 质量分数 100%, 批号 100388-200401; VP-16 原料药, 武汉博锐精细化工有限公司, 质量分数 99.3%, 批号 20091215; VP-16 软胶囊, 江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 20110317; 油酸乙酯(EO), 中国医药上海化学试剂公司, 化学纯, 批号 20090601; 肉豆蔻酸异丙酯(IPM), 浙江杭州万景新材料有限公司, 批号 20091118; 辛酸葵酸三甘油酯(GTCC), 英国 Croda 公司, 批号 20090310; 聚山梨酯 80(Tween 80), 温州清明化工有限公司, 化学纯, 批号 20090901; 乳化剂 OP, 天津市广成化学试剂有限公司, 批号 20090512; 聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH40, 批号 20091209)、聚氧乙烯蓖麻油(EL35, 批号 20090915)、聚乙烯吡咯烷酮 K30(PVP K30, 批号 G81907PTO)、聚乙烯吡咯烷酮 K90(PVP K90, 批号 G8644PTO), 德国 BASF 公司; 聚乙二醇 400(PEG 400, 批号 090130)、1,2-丙二醇(PG, 批号 20090310), 化学纯, 上海浦东高南化工厂; 无水乙醇, 安徽安特生物化工有限公司, 化学纯, 批号 20090901; 羟丙基甲基纤维素 E6(HPMC E6, 批号 PD191298)、羟丙基甲基纤维素 K4M(HPMC K4M, 批号 PD221921), 美国 Dow 公司; 羧甲基

纤维素钠 (CMC-Na), 上海昌为医药辅料技术有限公司, 批号 090211; 甲醇, 美国 Honeywell Burdick & Jackson 公司, 色谱纯; 其他试剂均为化学纯, 水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 VP-16 HPLC 定量测定方法的建立

色谱条件: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-pH 4.00 的醋酸盐缓冲液 (48:52); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 285 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。在此色谱条件下, 辅料不干扰主药的测定^[16-18]。VP-16 在 25.3~202.4 μg/mL 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 8\,159.4X + 4\,256.6$, $R^2 = 0.9998$ 。

日内精密度与日间精密度 RSD 均 < 2%, 符合定量测定要求, 加样回收率实验测得总平均回收率为 99.68%, RSD 为 1.37%, 符合要求。

2.2 VP-16 在不同溶媒中平衡溶解度和稳定性考察

2.2.1 VP-16 在不同油相、表面活性剂和助表面活性剂中的溶解度 选取 EO、BO、IPM 和 GTCC 为油相, EL35、RH40、Tween 80 和乳化剂 OP 为表面活性剂, PEG 400、PG 和无水乙醇为助表面活性剂, 各取约 5 g 置于 10 mL 量瓶中, 加入过量的 VP-16, 于 37 °C 水浴中超声 20 min 加速溶解, 静置 24 h 后, 6 000 r/min 离心 10 min。称取上清液约 0.5 g 置于 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声破乳 10 min, 定容。再吸取各上述溶液 1 mL 于 5 mL 量瓶中, 流动相稀释定容, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过进样。记录各辅料可溶解的药物量。每种辅料测定 3 次, 计算平均值。测得 VP-16 在不同辅料 (EO、BO、IPM、GTCC、EL35、RH40、Tween 80、乳化剂 OP、PEG 400、PG、无水乙醇) 中的溶解度分别为 0.041、0.003、0.039、0.297、57.089、35.308、23.392、23.668、190.080、33.123、40.800 mg/mL ($n=3$)。

2.2.2 VP-16 在不同水介质溶液中的溶解度和稳定性 分别配制不同 pH 值的缓冲盐溶液, 各取约 5 g 置于 10 mL 量瓶中, 加入过量的 VP-16, 于 37 °C 水浴中超声 20 min 加速溶解, 静置 24 h 后, 6 000 r/min 离心 10 min。称取上清液约 0.5 g 置于 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇定容。再吸取各上述溶液 1 mL 于 5 mL 量瓶中, 流动相稀释定容, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过进样。记录各缓冲盐溶液可溶解的药物量。每种溶液平行测定 3 次, 计算平均值。测得

VP-16 在不同溶液 (蒸馏水、pH 3.0 PBS、pH 5.0 PBS、pH 6.8 PBS) 中的溶解度分别为 148.36、141.09、142.76、144.57 μg/mL ($n=3$)。

取 VP-16 对照品适量, 分别以甲醇、乙醇、水、pH 3.0 PBS、pH 5.0 PBS 和 pH 6.8 PBS 配制适宜浓度的溶液, 室温放置, HPLC 法定时测定其中 VP-16 的量, 考察药物在以上几种溶液中的稳定性 (以相对质量分数即各时间点测得 VP-16 质量浓度与配制后 VP-16 初始质量浓度比值表示)。测得 VP-16 在不同溶液中的稳定性结果见表 1。结果表明, 在各 pH 值条件下, VP-16 的平衡溶解度相差不大, 24 h 内稳定性良好。

表 1 VP-16 在不同溶液中的稳定性

Table 1 Stability of VP-16 in different solutions

时间/ h	VP-16 相对质量分数/%					
	甲醇	乙醇	水	pH 3.0 PBS	pH 5.0 PBS	pH 6.8 PBS
0	100.1	100.0	99.9	99.3	99.8	100.2
1	100.0	99.8	100.1	99.6	99.9	100.1
2	100.3	100.3	100.0	99.4	99.9	100.1
4	100.1	100.2	100.1	99.4	100.2	100.1
8	100.2	100.0	99.8	99.7	100.1	100.0
12	99.9	100.0	100.1	99.6	100.1	100.0
24	100.0	100.1	100.0	99.3	100.0	100.1

2.3 VP-16 表观油水分配系数 (P_{app}) 的测定

按照文献方法^[19]测得 VP-16 在水及不同 pH 值的缓冲盐 (pH 3.0 PBS、pH 5.0 PBS、pH 6.8 PBS) 溶液中与正辛醇的 P_{app} 分别为 4.02、3.54、3.90、3.97。结果表明, VP-16 的脂溶性好, 容易通过生物膜。

2.4 不同油相与表面活性剂的配伍变化

通过溶解度实验选择对 VP-16 有较好溶解能力的油相和表面活性剂, 进一步考察不同表面活性剂和油相的配伍变化。本实验在不加入助表面活性剂的情况下进行, 将表面活性剂与油相按不同质量比 (9:1、8:2、7:3) 混合均匀后观察其混匀程度, 再加入 100 倍量的蒸馏水, 轻轻振荡, 观察其自微乳化后的澄清度、自微乳化完全的时间长短, 从而确定表面活性剂对油相的乳化能力及配伍变化。根据文献报道^[20]将自乳化情况分为 5 个级别: 乳化时间 < 1 min, 溶液呈澄清或微泛蓝色 (A); 乳化时间 < 1 min, 略浊, 呈蓝白色 (B); 乳化时间 1~2 min, 呈亮白色不透明液体 (C); 乳化时间 > 2 min, 色泽暗, 呈灰白色, 略带油状 (D); 难乳化, 一直有油

滴存在 (E)。结果见表 2。从表 2 的结果可以看出, EO 和 GTCC 和不同表面活性剂的自乳化情况好于 IPM; 表面活性剂中 RH40 的乳化能力最强, 其原因可能是 RH40 所含聚氧乙烯基数目较多, 亲水疏水平衡值 (HLB) 值较大, 对油相的增溶能力强些。最佳表面活性剂与油相的配伍为 RH40 与 EO 的比例为 9 : 1、8 : 2 或 RH40 与 GTCC 的比例为 9 : 1、8 : 2。

2.5 伪三元相图法选择助表面活性剂

采用滴定法绘制伪三元相图, 固定油相为

GTCC、表面活性剂为 RH40, 考察不同助表面活性剂无水乙醇、PG 和 PEG 400 形成微乳的能力, 将表面活性剂-助表面活性剂按质量比 (K_m) 1 : 1 混匀, 再与油相按 9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5、4 : 6、3 : 7、2 : 8、1 : 9 的比例混匀, 将能形成均一、透明溶液的处方继续进行以下实验。37 °C 水浴磁力搅拌条件下, 滴加水相至形成澄清透明溶液, 记录微乳形成时各组分的量, 绘制伪三元相图 (图 1)。以相图中微乳存在区域的大小来筛选助表面活性剂。

表 2 不同油相与表面活性剂的配伍变化

Table 2 Compatibility changes of different oil phases and surfactants

表面活性剂	配伍比例	与油相配伍情况			表面活性剂	配伍比例	与油相配伍情况		
		EO	GTCC	IPM			EO	GTCC	IPM
EL35	9 : 1	E	B	E	Tween 80	9 : 1	B	A	B
	8 : 2	C	C	D		8 : 2	B	B	D
	7 : 3	C	E	E		7 : 3	C	C	E
RH40	9 : 1	A	A	E	乳化剂 OP	9 : 1	A	A	E
	8 : 2	A	A	E		8 : 2	A	C	C
	7 : 3	B	B	E		7 : 3	B	E	E

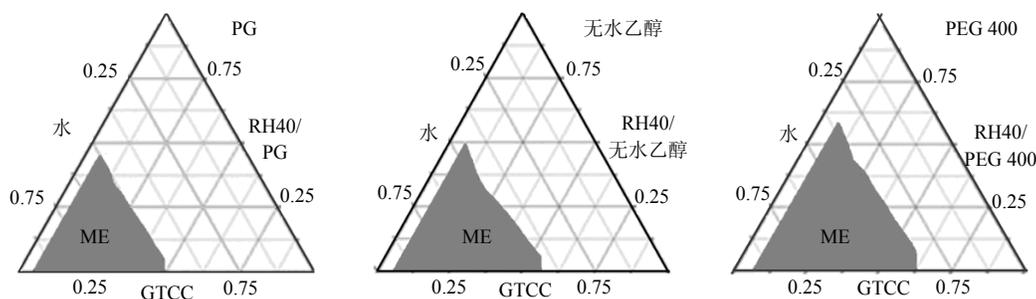


图 1 不同助表面活性剂的伪三元相图

Fig. 1 Pseudo ternary phase diagrams of different surfactants

图中阴影区为微乳 (ME) 区域, 可以看出, 3 种助表面活性剂均存在 ME 区域。本实验研究的是自微乳体系, 口服进入胃肠道后被大量的消化液稀释, 因此要求微乳区域可无限稀释, 在伪三元相图中, 从水相的顶点沿 ME 区域做切线, 即可比较 3 种助表面活性剂所形成自微乳区域的大小。当助表面活性剂为 PEG 400 时, 具有最大的自微乳区, 因此选择 PEG 400 为 VP-16 S-SMEDDS 的助表面活性剂, 进行各组分比例的优化。

2.6 表面活性剂与助表面活性剂比例的筛选

以 RH40、PEG 400、GTCC 为相图的 3 个顶点, 将 RH40 及 PEG 400 按 K_m 1 : 3、1 : 2、1 : 1、2 :

1、3 : 1 混匀, 再按不同的比例与 GTCC 混合均匀, 将能形成均一、透明溶液的处方继续进行以下实验。37 °C 水浴磁力搅拌条件下, 滴加水相至形成澄清透明溶液, 记录微乳形成时各组分的量, 绘制伪三元相图。以相图中 ME 区域的大小来筛选表面活性剂与助表面活性剂的最佳比例。结果如图 2 所示, 可以看出, 当 K_m 值为 1 : 1 时, 微乳区最大, 故 K_m 为 1 : 1。

2.7 促过饱和物质的筛选

2.7.1 促过饱和物质种类的选择 固定 RH40 作为表面活性剂, PEG 400 为助表面活性剂, $K_m=1 : 1$, GTCC 为油相, 油量为 20%, 载药量为 20 mg/g,

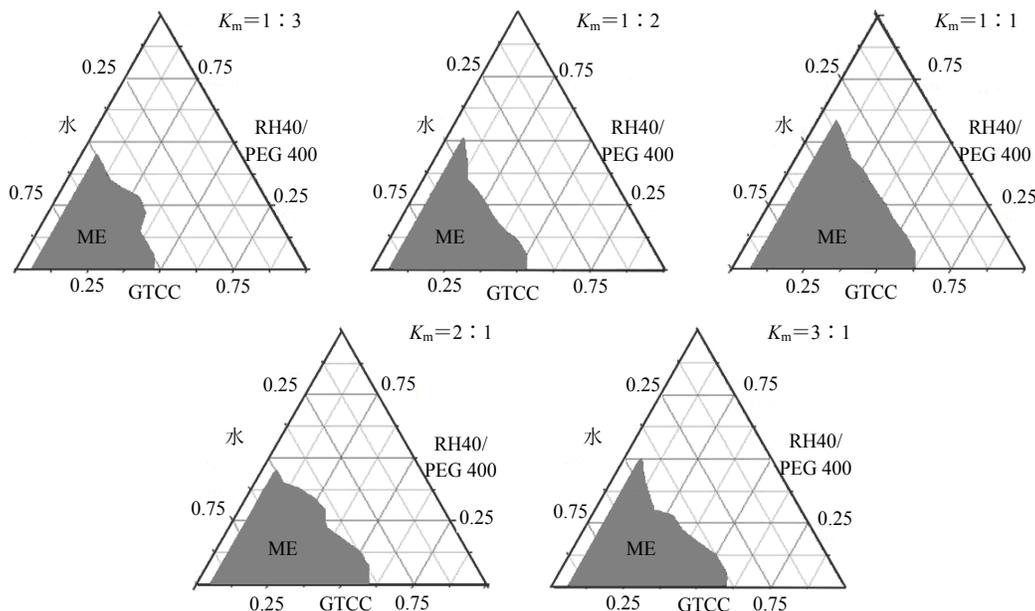


图 2 不同 K_m 值的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo ternary phase diagrams of different K_m values

分别加入不同种类不同量的促过饱和和抑晶物质制备一系列溶液，精密称定处方中各个组分，于具塞广口瓶中，37 °C 加热，涡旋，使混合均匀。室温放置 24 h，将能形成均一、透明溶液的处方继续进行以下试验。取 0.1 g 的处方液，加入到 5 mL、37 °C 恒温的蒸馏水中，20 r/min 磁力搅拌，观察能否形成微乳液，室温放置 8、24 h，6 000 r/min 离心 10 min，取下层液体，观察是否析出晶体。结果见表 3。

结果表明，大多数抑晶物质与自微乳处方的相容性较差，PVP 类相对较好，其中 PVP K30 的抑晶效果最好。抑晶效果和抑晶物质加入的量相关。因

表 3 不同种类促过饱和物质的抑晶效果

Table 3 Crystal suppression effect of different kinds of supersaturated substances

种类	用量/%	溶解状态	析晶情况	
			8 h	24 h
HPMC E6	1	未溶	析晶	析晶
	2	未溶	析晶	析晶
HPMC K4M	1	未溶	析晶	析晶
	2	未溶	析晶	析晶
PVP K30	1	溶解	未析	未析
	2	溶解	未析	未析
PVP K90	1	溶解	未析	析晶
	2	溶解	未析	析晶
CMC-Na	1	未溶	析晶	析晶
	2	未溶	析晶	析晶

此，选择 PVP K30 作为 VP-16 过饱和和自微乳的抑晶物质。

2.7.2 促过饱和物质对相图的影响 基于上部分组成成分的筛选结果，选择 RH40、PEG 400、GTCC 和 PVP K30 为 VP-16 S-SMEDDS 处方的组分。精密称定自微乳处方中各个组分的量，于具塞广口瓶中，再加入 2% 的 PVP K30，37 °C 加热，涡旋，使混合均匀。室温放置 24 h，将能形成均一、透明溶液的处方继续进行以下试验。取 0.1 g 的处方液，加入到 5 mL、37 °C 恒温的蒸馏水中，20 r/min 磁力搅拌，室温放置 24 h，6 000 r/min 离心 10 min 观察分层情况。采用伪三元相图的方法，以表面活性剂/助表面活性剂、油相、水相各为一角，将能形成澄清透明和淡蓝色乳光的处方确定为相图中可自微乳化的点，结果如图 3 所示。结果表明，加入 PVP K30 后，各配比形成的透明溶液均在一定程度上黏度增加，乳化效果不变，PVP K30 的加入不影响自微乳化区域。

2.7.3 促过饱和物质用量的优化 以 RH40-PEG 400-GTCC 图为依据。以油相的比例尽量大、表面活性剂尽量少，且避开自微乳化区域边界点，各组分比例的少量变化不影响自微乳化的实验数据点为依据，优化处方。筛选出 2 个自微乳化性能较好的备选处方，备选处方 1: RH40-PEG 400-GTCC (4 : 4 : 2)；备选处方 2: RH40-PEG 400-GTCC (3.5 : 3.5 : 3)。

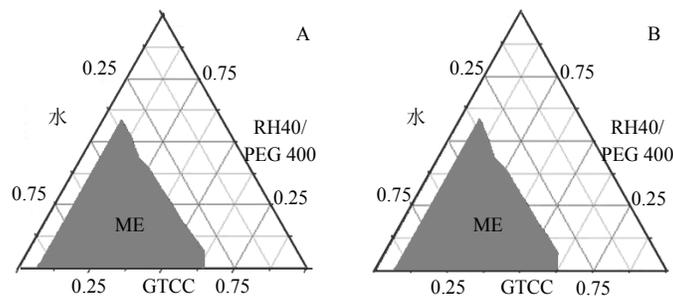


图 3 SMEDDS (A) 和 S-SMEDDS (B) 伪三元相图的比较

Fig. 3 Comparison on pseudo ternary phase diagrams of SMEDDS (A) and S-SMEDDS (B)

分别用自微乳备选处方 1 和备选处方 2, 加入 100 mg VP-16 和不同量的 PVP K30, 取过饱和自微乳 0.1 g, 加入到 5 mL 37 °C 恒温的蒸馏水中稀释, 20 r/min 磁力搅拌, 置室温下, 于不同时间 6 000 r/min 离心 10 min, 取下层液体, 观察是否析出晶体。结果见表 4。结果表明, 当不加过饱和物质时, 2 个处方加水稀释后析出晶体; 过饱和物质的加入均在一定程度上抑制了 2 个处方晶体的析出。在可溶

解于自微乳处方范围内, 随着加入抑晶物质质量的增加, 抑晶效果增强。从药剂学辅料应用的原则出发, 本实验确定在处方中加入促过饱和物质 PVP K30 为处方量的 2%。加入相同量的抑晶物质, 备选处方 2 比备选处方 1 易析出晶体, 可能是备选处方 2 的 PEG 400 用量相对较备选处方 1 少, 而 PVP K30 与 PEG 400 结构相似, PVP K30 主要溶解在 PEG 400 中的原因。

表 4 促过饱和物质加入量与析晶情况

Table 4 Amount of supersaturated substances and crystallization conditions

处方	加入量/%	溶解状态	析晶情况							
			0 h	4 h	8 h	12 h	24 h	36 h	72 h	
处方 1	0	—	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶
	0.5	溶解	未析	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶
	1.0	溶解	未析	未析	未析	未析	未析	析晶	析晶	析晶
	2.0	溶解	未析	未析	未析	未析	未析	未析	未析	未析
	2.5	混悬	未析	未析	未析	未析	未析	未析	未析	未析
处方 2	0	—	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶
	0.5	溶解	未析	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶
	1.0	溶解	未析	未析	未析	析晶	析晶	析晶	析晶	析晶
	2.0	溶解	未析	未析	未析	未析	未析	析晶	析晶	析晶
	2.5	混悬	未析	未析	未析	未析	未析	未析	未析	析晶

2.8 饱和溶解度的确定

分别取备选处方 1 和 2, 置于具塞广口瓶中, 加入适量过量的 VP-16, 于 37 °C 水浴中超声 20 min 加速溶解, 静置 24 h 后, 6 000 r/min 离心 10 min。称取上清液约 0.5 g 置于 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声破乳 10 min, 定容。再吸取各上述溶液 1 mL 于 5 mL 量瓶中, 流动相稀释定容, 用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过进样。

备选处方 1 测定得到的饱和溶解度为 16.48 mg/mL, 而备选处方 2 测定得到的饱和溶解度为

10.87 mg/mL, 可以得出, 2 个处方溶解 VP-16 的能力均显著提高, 但是备选处方 1 溶解 VP-16 的能力要强于备选处方 2。因此, 可进一步确定最佳处方组成为 RH40-PEG 400-GTCC-PVP K30 (20 : 20 : 10 : 1)。

2.9 VP-16 S-SMEDDS 的制备

影响 S-SMEDDS 性质的制备工艺因素主要有混合方式、混合的速率、温度、时间。本实验通过考察 S-SMEDDS 的自微乳化速率来确定制备工艺。据文献报道, 自微乳化速度实验可以通过目测观察

或用浊度变化来测量自微乳化的平衡时间。本实验采用目测法,以 S-SMEDDS 自微乳化时间的长短判断 S-SMEDDS 自微乳化的难易,即当自微乳化时间较短时,认为所制备的 S-SMEDDS 形成的 ME 的能力较好。

2.9.1 自微乳化速率的测定方法 取 VP-16 S-SMEDDS 1.00 g,滴入 100 mL 37 °C 的蒸馏水中,自液滴开始接触液面时计时,在磁力搅拌下,以 20 r/min 的速率搅拌至完全自微乳化形成澄清透明的溶液,记录自微乳化的时间,每个样品平行测定 5 次。

2.9.2 混合方式的选择 考察不同的混合方式(涡旋振荡、超声混合、电动搅拌和磁力搅拌)对 S-SMEDDS 制备的影响。由于 S-SMEDDS 的黏度较大,采用涡旋振荡或超声混合的方式,样品不易混匀。而电动搅拌在样品量较大时采用混合效果较好,却不适宜处方研究中少量样品的制备。故本实验采用磁力搅拌的混合方式,既适宜实验少量样品的制备,又可达到较高的搅拌速率,满足短时间内充分混匀的要求。

2.9.3 搅拌速率的考察 按处方配比称取 RH40、PEG 400、GTCC 共 1.00 g,在 37 °C 条件下,分别以 10、20、30、40、50 r/min 的速率磁力搅拌 20 min,将形成的 SMEDDS 滴入水中,测定自微乳化时间,结果分别为 56.0、22.2、20.6、17.6、14.6 s ($n=5$)。结果表明,在 20 r/min 的搅拌速率下,自微乳化时间仅需 22.2 s。

2.9.4 搅拌时间的考察 按处方配比称取 RH40、PEG 400、GTCC 共 1.00 g,在 37 °C 条件下,以 20 r/min 的速率分别磁力搅拌 10、20、30、40 min,将形成的 SMEDDS 滴入水中,测定自微乳化时间,结果分别为 83.2、75.4、77.4、81.0 s ($n=5$)。结果表明,在搅拌 20 min 时自微乳化时间仅需 75.4 s。

2.9.5 搅拌温度的考察 按处方配比称取 RH40、PEG 400、GTCC 共 1.00 g,在 25、37、40、45 °C 条件下,以 20 r/min 的速率分别磁力搅拌 20 min,将形成的 SMEDDS 滴入水中,测定自微乳化时间,结果分别为 85.4、17.6、18.4、15.2 s ($n=5$)。结果表明,温度升高,能显著降低自微乳化的时间,当达到 37 °C 时,自微乳化时间为 17.6 s,继续升高温度,自微乳化时间无明显差异。

由自微乳化时间测定结果可知,本实验所制备的 VP-16 SMEDDS 的自微乳化速度较快(自微乳化时间 < 2 min)。SMEDDS 遇水性溶液形成 ME 为自

发过程,不需要外界做功。上述实验所考察的制备工艺条件仅是混匀的过程,各组分混合得越均匀,相互之间融合得越好,自微乳化速度越快。搅拌速率增大、搅拌时间延长、搅拌温度升高均可以显著改善 SMEDDS 的混合效果。各组分在 37 °C 条件下,以 20 r/min 的速率搅拌 20 min 后,形成的 SMEDDS 的自微乳化速度趋于稳定,可推断 SMEDDS 已经混合均匀,因此可采用 37 °C, 20 r/min 磁力搅拌 20 min 的方法制备 SMEDDS。

2.9.6 VP-16 S-SMEDDS 的制备 称取 RH40 40.00 g、PEG 400 40.00 g、GTCC 20.00 g、PVP K30 2.08 g,在 37 °C 条件下,20 r/min 磁力搅拌 20 min 后,加入 2.00 g VP-16,同法操作,得 VP-16 S-SMEDDS。

2.9.7 VP-16 S-SMEDDS 的制备工艺验证试验 按“2.9.6”所述方法制备 3 个批次(批号 20131206、20131213、20131220) VP-16 S-SMEDDS 进行验证试验,测定 3 批样品的自微乳化时间,并计算其 RSD,结果平均自微乳化时间分别为 20.1、20.2、20.6 s ($n=3$)。结果表明 3 批 VP-16 S-SMEDDS 的平均自微乳化时间为 20.3 s, RSD 为 1.30%。

2.10 过饱和和自微乳形态与粒径分布

取 VP-16 S-SMEDDS 1 g,加水 50 mL,轻微搅拌,待自微乳化完全后,取适量滴在铜网上,用 2% 的磷钨酸负染色 15 min,晾干后扫描电镜(SEM)观察(图 4),并用粒径分析仪测定平均粒径及粒径分布(图 5)。

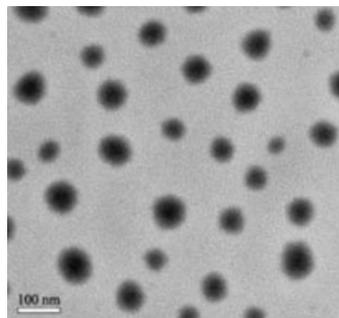


图 4 VP-16 S-SMEDDS 的 SEM 图
Fig. 4 SEM diagram of VP-16 S-SMEDDS

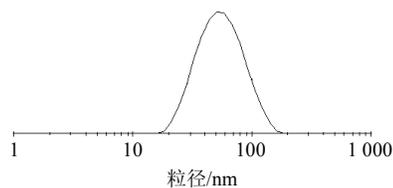


图 5 VP-16 S-SMEDDS 的粒径分布
Fig. 5 Size distribution of VP-16 S-SMEDDS

VP-16 S-SMEDDS 加水后形成的 ME 液在电镜下观察,液滴均呈圆球形。用粒径分析仪测得其平均粒径为 $(82.7 \pm 3.3) \text{ nm}$ ($n=3$), 粒径分布较集中。VP-16 S-SMEDDS 的 Zeta 电位为 $(-20.36 \pm 1.21) \text{ mV}$ ($n=3$), 稳定性良好。

2.10.1 分散介质对 VP-16 S-SMEDDS 粒径的影响 分别用水、0.1 mol/L HCl、pH 6.8 PBS 溶液作为 VP-16 S-SMEDDS 的分散介质, 结果所得微乳的粒径分别为 82.7、124.6、89.6 nm ($n=3$)。由数据可知, VP-16 S-SMEDDS 经 0.1 mol/L HCl 稀释后所得的微乳粒径较用水和 pH 6.8 PBS 稀释后的粒径大, 这可能是由于溶液中的 H^+ 竞争性地与表面活性剂中的乙氧基形成氢键, 从而影响了表面活性剂的亲水性, 乳化能力降低。

2.10.2 载药量对 VP-16 S-SMEDDS 粒径的影响 制备载药量分别为 0、2% 和 5% 的 3 种 S-SMEDDS, 分别用水稀释 50 倍后, 用 Zetasizer Nano-S90 激光粒度测定仪测定其平均粒径, 结果分别为 145.6、82.7、54.8 nm ($n=3$)。可见粒径随着载药量的增加而减小, 可能是由于油水间界面张力随载药量的增加而降低, 使得微乳平均粒径也相应地减小。

2.10.3 稀释倍数对 VP-16 S-SMEDDS 粒径的影响 S-SMEDDS 进入体内后, 会被大量的胃液稀释, 考虑到个体差异, 分别用水稀释至 50、100、200、1 000 倍后, 用 Zetasizer Nano-S90 激光粒度测定仪测定其平均粒径, 结果分别为 82.7、80.1、74.4、76.5 nm ($n=3$)。由该数据可知, 随着稀释倍数的增大, 微乳粒径稍有降低, 可能是由分散相浓度降低, 粒子间相互作用减小引起的。

2.11 定量测定

分别精密称取 VP-16 S-SMEDDS 3 批 (批号 20131206、20131213、20131220), 各约 50 mg (相当于含有 1 mg VP-16), 用甲醇适量稀释, 超声破乳 10 min, 制成含 VP-16 约 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。按照“2.1”项色谱条件测定其峰面积, 代入标准曲线计算其量, 结果 VP-16 平均质量分数分别为 19.89、19.96、20.09 mg/g ($n=3$)。结果表明, 3 批样品中 VP-16 的平均质量分数为 19.98 mg/g, RSD 为 0.51%, 符合要求。

2.12 体外溶出度考察

根据《中国药典》2010 年版溶出度测定法第一法 (转篮法), 将自微乳装于硬胶囊壳中, 温度为 $(37.0 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$ 、转速为 100 r/min, 溶出介质为 900

mL 水, 分别在 15、30、45、60、120、180 min 取样 3 mL, 并补充同体积溶出介质, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, HPLC 法测定, 代入标准曲线方程, 计算累积溶出率。

分别测定 VP-16 S-SMEDDS、VP-16 SMEDDS 与市售软胶囊的溶出情况, 并进行比较。结果如图 6 所示, VP-16 S-SMEDDS 的溶出速率较 VP-16 SMEDDS 与市售软胶囊的溶出速度快, 三者都在 60 min 时累积溶出率均接近 100%。

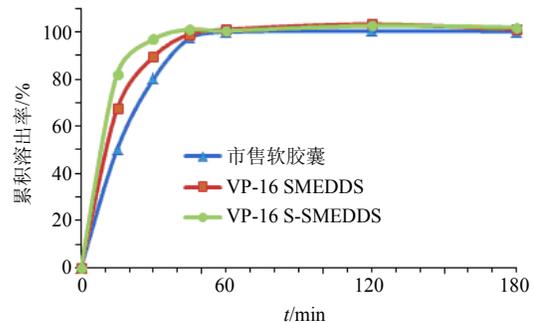


图 6 VP-16 S-SMEDDS、VP-16 SMEDDS 与市售软胶囊的溶出度

Fig. 6 Dissolution rate of VP-16 S-SMEDDS, VP-16 SMEDDS, and commercial soft capsule

2.13 稳定性考察

参照《中国药典》2010 年版二部附录 XIX C“原料药与药物制剂稳定性实验指导原则”项下相关规定及本制剂的特殊性质进行研究, 将 VP-16 S-SMEDDS 灌封于安瓿瓶中, 进行影响因素及初步稳定性考察, 以外观性状、相对质量分数及自乳化时间为指标, 考察 S-SMEDDS 的稳定性。

2.13.1 影响因素试验 将 VP-16 S-SMEDDS 样品分别放置于高温 (40、60 $^\circ\text{C}$)、低温 (4 $^\circ\text{C}$)、光照 (4 500 \pm 500) lx 条件下, 分别于 5、10 d 取样, 考察其外观、质量分数及自乳化时间, 并与 0 d 结果比较, 结果见表 5。结果显示, 高温 (60 $^\circ\text{C}$) 和光照 (4 500 \pm 500) lx 对 VP-16 S-SMEDDS 制剂的稳定性影响较大, 其中 60 $^\circ\text{C}$ 高温的影响最为显著, 溶液颜色从无色变为淡黄色, VP-16 量下降, 自乳化性能也降低, 主要原因可能是由于 VP-16 药物被氧化。温度高时氧化速率比温度低时大, 因此, VP-16 S-SMEDDS 最适宜的贮存条件为阴凉处避光保存。

2.13.2 冷热循环试验 将 VP-16 S-SMEDDS 样品交替放于 4、37 $^\circ\text{C}$ 下, 每 12 h 改变 1 次温度, 共 7 d, 考察其外观、相对质量分数及自乳化时间, 并与

表5 VP-16 S-SMEDDS 影响因素试验
Table 5 Influencing factors test of VP-16 S-SMEDDS

时间/d	考察项目	外观性状	相对质量分数/%	自乳化时间/s
0	无	无色澄明液体	99.84	57.6
5	高温 (40 °C)	无色澄明液体	99.97	50.3
	高温 (60 °C)	淡黄色透明液体	98.97	75.8
	低温 (4 °C)	无色澄明液体	99.57	51.4
	光照 (4 500±500 lx)	淡黄色透明液体	99.66	60.7
10	高温 (40 °C)	无色澄明液体	99.83	59.1
	高温 (60 °C)	淡黄色透明液体	89.76	80.4
	低温 (4 °C)	无色澄明液体	100.05	58.7
	光照 (4 500±500 lx)	淡黄色透明液体	98.49	64.3

0 d 结果比较, 结果见表 6。结果显示, 样品经冷热循环实验, 仍为无色澄明液体, 并无药物晶体析出, 同时自乳化性能也未改变。

2.13.3 初步稳定性试验 取 VP-16 S-SMEDDS 室温分别放置 1、2、3、6 个月, 取样后测定, 与 0 月进行比较, 考察样品的稳定性, 结果见表 7。结果显示, 室温条件下放置 6 个月后, 样品的外观性状、相对质量分数及自乳化时间, 与 0 月比较, 均无明显变化, 表明 VP-16 S-SMEDDS 稳定性良好。

表6 VP-16 S-SMEDDS 冷热循环试验

Table 6 Psychro-thermal cycles test of VP-16 S-SMEDDS

时间/d	考察项目	外观性状	相对质量分数/%	自乳化时间/s
0	无	无色澄明液体	101.63	53.9
7	冷热循环	无色澄明液体	99.75	58.4

表7 VP-16 S-SMEDDS 初步稳定性试验

Table 7 Preliminary stability test of VP-16 S-SMEDDS

时间/月	外观性状	相对质量分数/%	自乳化时间/s
0	无色澄明液体	99.46	59.2
1	无色澄明液体	101.75	56.9
2	无色澄明液体	100.09	60.4
3	无色澄明液体	99.67	60.6
6	无色澄明液体	99.89	58.9

3 讨论

S-SMEDDS 是在原有自微乳释药系统中添加水溶性纤维聚合材料或其他聚合物作为促过饱和物质, 以使游离药物从自微乳释药系统中释放后与小分子微乳颗粒在胃肠道内达到过饱和状态, 防止药

物在体内发生沉淀。S-SMEDDS 其本身并不是饱和状态, 只有当其进入体内与胃肠液混合之后才能生成过饱和自微乳, 从而使游离药物在胃肠道内局部溶液中达到过饱和, 显著增加药物的生物利用度。S-SMEDDS 处方中添加了促过饱和物质, 常用的有聚合纤维素类, 如 HPMC、甲基纤维素、PVP 或羟丙甲邻苯二甲酸酯等。聚合纤维素类是极好的晶体生成抑制剂, 体外研究证明其能延长药物的过饱和状态, 而本实验所采用的 PVP 也可使许多难溶药物形成过饱和状态。这些促过饱和物质的抑晶作用机制尚有待进一步探究, 推测原理可能是 HPMC 在与水混合后能产生一个空间宽广的纤维质聚合物网状系统, 此种网状系统分支端的疏水基团由水性结构鞘所包围, 这种结构能抑制晶核的形成。也有人认为是药物与聚合物分子通过氢键的相互作用, 使得聚合物吸附在晶核的表面或晶体表面形成流体界面层, 此界面层改变了晶体附着场所的形态, 进而抑制了晶体的生长。或者聚合物通过占据吸附部位来抑制药物分子从制剂进入晶格中, 吸附在其上的聚合物形成了一种机械障碍以抑制结晶作用^[21]。

总的来说, 过饱和自微乳的优点首先在于其能显著增加药物溶解性, 提高载药量, 增强疗效, 同时由于减少了自微乳中表面活性剂的用量, 降低了胃肠道刺激性, 使患者易于接受, 增加口服生物利用度。其次, 将过饱和自微乳做成胶囊剂后还能起到定时、定量、简单易服的作用。

本实验建立了 VP-16 定量测定分析方法, 该方法简单、快速、专属性高; 测定了 VP-16 在各种辅料中的溶解度, 为处方筛选提供依据; 测定了 VP-16 在不同 pH 值介质中的油水分配系数和各种介质中

的溶解度和稳定性,表明了VP-16具备一定的亲脂性,在各种介质中较稳定。

同时对VP-16 S-SMEDDS的处方及制备工艺进行了研究,从不同表面活性剂与油相的配伍变化、伪三元相图的绘制、过饱和自微乳析晶情况的考察等方面对S-SMEDDS的处方进行了筛选;从混合方式、搅拌速度、搅拌时间、搅拌温度等方面对S-SMEDDS的工艺条件进行了评价,并考察了VP-16 S-SMEDDS的性状、微观形态、粒径分布和质量分数,ME在透射电镜下呈球状或类球状,平均粒径为 (82.7 ± 3.3) nm;采用直接释药法测定其体外溶出度,考察了体外释放条件对VP-16 S-SMEDDS释药行为的影响,结果表明,VP-16 S-SMEDDS的体外溶出较VP-16 SMEDDS和VP-16市售软胶囊均要快,三者60 min时的累计溶出率均达100%。通过影响因素试验和初步稳定性试验证实,高温(60℃)和光照(4 500±500) lx对VP-16 S-SMEDDS的影响较大,因此,需考虑其最佳的贮存条件为阴凉避光处保存,其他条件的稳定性良好。

参考文献

- [1] 李津明,张彦卓,李鑫. 依托泊苷长循环脂质体工艺处方设计与优化的研究[J]. 安徽医药, 2008, 12(6): 488-491.
- [2] van de Waterbeemd H, Lennems H, Artursson P. 药物生物利用度[M]. 何仲贵,钟大放,译. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [3] 王章姐,胡容峰,王国凯,等. Box-Behnken设计-效应面法优化柚皮素自微乳给药系统[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2461-2466.
- [4] 刘伟星,李 宁,高崇凯. 葛根素自微乳化渗透泵控释胶囊的制备[J]. 中草药, 2013, 44(12): 1568-1573.
- [5] 沈 熊,吴 伟. 自乳化和自微乳化释药系统[J]. 复旦大学学报: 医学版, 2003, 30(2): 180-183.
- [6] Kogan A, Aserin A, Garti N. Improved solubilization of carbamazepine and structural Transitions in nonionic microemulsions upon aqueous phase dilution[J]. *Colloid Interface Sci*, 2007, 315(2): 637-647.
- [7] 袁开红,曹德善,李 萌,等. VP-16软胶囊的研制及人体生物利用度的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2004, 35(5): 279-281.
- [8] 郭胤仕,于海建,邢祖林. 低剂量口服VP-16治疗晚期非小细胞肺癌[J]. 中国新药与临床杂志, 2002, 21(2): 119-121.
- [9] 凡小燕. 橙皮苷自微乳的制备与评价[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2011.
- [10] 陈 鹰,史琼枝,徐享隽,等. 多西他赛固体过饱和自乳化释药系统的制备及体外特性[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(24): 2058-2062.
- [11] 彭 璇,陈莘莘,包 强,等. 水飞蓟宾过饱和自乳化解药系统的制备及性质研究[J]. 中草药, 2010, 41(1): 40-42.
- [12] 夏祖猛. 芎冰自乳化滴丸的制备及其评价体系研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [13] 康虞玲. 葛根黄豆苷元自微乳化解药系统的研究[D]. 保定: 河北大学, 2010.
- [14] 轩肖玉,王亚静,张伟玲,等. 芒果苷自微乳给药系统的制备及其大鼠体内药动学研究[J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 166-170.
- [15] 姚金娜,陈莘莘,尚小广,等. 水飞蓟宾过饱和自微乳给药系统在大鼠体内的药动学研究[J]. 中草药, 2011, 42(11): 2261-2264.
- [16] 尹东东,王杏林,赵广荣,等. 依托泊苷微乳的HPLC测定[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(2): 121-122.
- [17] 李华龙,尹东东,王杏林. 依托泊苷长循环亚微乳的制备和理化性质研究[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 164-169.
- [18] 叶红杨,王世亮,周浩炳. HPLC法同时测定依托泊苷植入剂的有关物质及含量[J]. 安徽医药, 2009, 13(7): 751-752.
- [19] 吴忠斌,郭 丹,陈建明. 依托泊苷磷脂复合物的制备及理化性质研究[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(13): 1250-1256.
- [20] 廖九中,张 建,崔永淼. 大豆苷元固体自乳化制剂的处方优化和制备[J]. 中国药房, 2012, 23(19): 1757-1759.
- [21] 乔 梁,魏颖慧,李范珠. 过饱和自微乳给药系统的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2008, 25(4): 279-283.