

## 双氢青蒿素自微乳给药系统的制备及其评价

张 然<sup>1,2</sup>, 杨 冰<sup>2,3,4</sup>, 廖茂梁<sup>2,3,4</sup>, 华 洁<sup>2,3,4</sup>, 周钰通<sup>2,3,4</sup>, 周福军<sup>2,3,4\*</sup>, 张铁军<sup>2,3,4\*</sup>

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院, 天津 300462

3. 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300462

4. 释药技术与药代动力学国家重点实验室, 天津 300462

**摘要:** 目的 研究双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 自微乳给药系统 (self-microemulsion drug delivery system, SMEDDS) (DHA-SMEDDS) 的处方与制备工艺, 并对其进行评价。方法 通过溶解度实验、油相与乳化剂和助乳化剂配伍实验及伪三元相图的绘制, 筛选 DHA-SMEDDS 的处方组成; 以平均粒径、载药量为评价指标, 采用星点设计-效应面法优化处方, 并对 DHA-SMEDDS 的理化性质、初步稳定性进行评价。考察 DHA-SMEDDS 在马丁达比犬肾上皮 MDCK 细胞模型中促渗机制。结果 优化后的 DHA-SMEDDS 处方中油相为辛酸甘油酯(15%)、乳化剂为聚氧乙烯 40 蓖麻油(46.4%)、混合助乳化剂为无水乙醇 (24.12%) 和聚乙二醇 400 (14.48%)。所得自微乳外观均一透明, 自乳化后平均粒径 ( $24.55 \pm 0.18$ ) nm, 多分散性指数 (PDI) 为  $0.092 \pm 0.028$ , 电位为  $(-3.16 \pm 0.14)$  mV, 载药量为  $(9.64 \pm 0.01)$  mg/g, 包封率为  $(99.67 \pm 0.10)$  %, 乳化时间为  $(13.90 \pm 0.10)$  s。初步稳定性实验表明, DHA-SMEDDS 应常温避光保存。DHA-SMEDDS 可以打开细胞间的紧密连接蛋白, 降低细胞膜电位, 增加细胞通透性, 增强  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性。结论 DHA-SMEDDS 制备工艺简单, 外观良好, 乳化效率高, 有望提高 DHA 的口服生物利用度。

**关键词:** 双氢青蒿素; 自微乳给药系统; 伪三元相图; 星点设计-效应面法; 质量评价; 溶解度; 促渗机制; 生物利用度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)05-1291-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.05.009

## Preparation and evaluation of dihydroartemisinin self-microemulsion drug delivery system

ZHANG Ran<sup>1,2</sup>, YANG Bing<sup>2,3,4</sup>, LIAO Mao-liang<sup>2,3,4</sup>, HUA Jie<sup>2,3,4</sup>, ZHOU Yu-tong<sup>2,3,4</sup>, ZHOU Fu-jun<sup>2,3,4</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>2,3,4</sup>

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300462, China

3. Tianjin Key Laboratory of Quality Markers of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300462, China

4. State Key Laboratory of Drug Delivery and Pharmacokinetics, Tianjin 300462, China

**Abstract: Objective** To study the formulation and preparation technology of dihydroartemisinin self-microemulsion drug delivery system (DHA-SMEDDS) and evaluate it. **Methods** The formulation of DHA-SMEDDS was screened by solubility test, oil phase with emulsifier and co-emulsifier compatibility experiment and pseudo ternary phase diagram drawing. Taking the mean particle size and drug loading as evaluation indexes, the formulation was optimized by central composite design-response surface methodology, and the physicochemical properties and initial stability of DHA-SMEDDS were evaluated. The mechanism of promoting infiltration of DHA-SMEDDS in MDCK cell model was investigated. **Results** In the optimized DHA-SMEDDS formulation, the oil phase was caprylic capric triglyceride (15%), the emulsifier was polyoxyethylene 40 castor oil (46.4%), the mixed co-emulsifier was anhydrous ethanol (24.12%) and polyethylene glycol 400 (14.48%). The prepared self-microemulsion had uniform and transparent

收稿日期: 2020-10-16

基金项目: 国家重大科技专项 (2017ZX09101002-001-005)

作者简介: 张 然 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为制剂研究与开发。Tel: 15512060506 E-mail: 245871768@qq.com

\*通信作者: 周福军, 硕士生导师, 研究员, 主要从事新药及制剂研发工作。E-mail: zhoufj@tjpr.com

张铁军, 硕士生导师, 研究员, 主要从事中药新药、中药质量和中药大品种二次开发研究。E-mail: zhangtj@tjpr.com

appearance. The average particle size after self-emulsification was  $(24.55 \pm 0.18)$  nm, PDI was  $(0.092 \pm 0.028)$ , potential was  $(-3.16 \pm 0.14)$  mV, the drug loading was  $(9.64 \pm 0.01)$  mg/g, the entrapment efficiency was  $(99.67 \pm 0.10)\%$ , and emulsifying time was  $(13.90 \pm 0.10)$  s. Preliminary stability experiments showed that DHA-SMEDDS should be stored at low temperature and away from light. DHA-SMEDDS can open tight junction proteins between cells, decrease cell membrane potential, increase cell permeability, and enhance  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. **Conclusion** DHA-SMEDDS has the advantages of simple preparation process, good appearance and high emulsifying efficiency, which is expected to improve the oral bioavailability of DHA.

**Key words:** dihydroartemisinin; self-microemulsion drug delivery system; pseudo ternary phase diagram; central composite design-response surface methodology; quality evaluation; solubility; infiltration promotion mechanism; bioavailability

青蒿素提取分离自黄花蒿 *Artemisia annua* L., 是一种抗疟药物, 其特点有疗效高、毒性较小等<sup>[1]</sup>。双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 是由四氢硼钠还原青蒿素而得, 其结构特征为独特的过氧桥, 具有多种优点, 如药效高、毒性低、在体内吸收快、排泄和代谢迅速、分布广。此外, DHA 的抗疟作用是青蒿素的 4~8 倍<sup>[2]</sup>。有研究表明, DHA 具有抗疟、抗肿瘤、抗炎、抗肺纤维化以及抗其他寄生虫等药理作用<sup>[3-4]</sup>。但 DHA 在水中溶解度较低, 其口服生物利用度会受到一定影响, 其制剂的开发也受到限制。近年来, 研究人员采用增溶技术, 如脂质体<sup>[5]</sup>、环糊精包合物<sup>[6]</sup>等改善 DHA 的溶解度, 但其制备工艺复杂, 工业化技术要求较高。因此, 为进一步提高 DHA 的溶解度, 应开发制备工艺简单、易于产业化的 DHA 新剂型。

自微乳给药系统 (self-microemulsion drug delivery system, SMEDDS) 是药物、天然或合成油、乳化剂和助乳化剂的均匀混合体系<sup>[7-8]</sup>。SMEDDS 将疏水性药物引入油相体系, 在水介质中适度搅拌和适当稀释后形成 O/W 型的乳剂, 可以大大提高疏水性药物口服生物利用度<sup>[9-12]</sup>。此外, SMEDDS 还具有较高的生物相容性、稳定性、控释性<sup>[13]</sup>。近年来, 伪三元相图<sup>[14-15]</sup>作为研究成乳区域的基础工具, 操作简单, 常与预测效果更好的星点设计-效应面法 (CCD-RSM)<sup>[16-17]</sup>联合用于处方筛选。

因此, 为解决 DHA 溶解度较差、生物利用度较低等问题, 本实验通过绘制伪三元相图筛选处方中辅料 (油相、乳化剂和助乳化剂) 的比例, 采用 CCD-RSM 确定处方最佳比例, 制备 DHA 自微乳 (DHA-SMEDDS), 进行评价, 为进一步研究与开发 DHA 的新剂型提供依据, 实现提高药物溶解度、增加口服生物利用度、改善胃肠道吸收的目的<sup>[18]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

犬肾 MDCK 细胞, 天津药物研究院有限公司

惠赠。

### 1.2 试剂

DHA 原料药, 昆药集团重庆武陵山制药有限公司, 批号 C01120200501, 质量分数 98.2%; DHA 对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号 100184-201403, 质量分数为 99.8%; 甲醇、乙腈、无水乙醇, 色谱纯, 天津市康科德科技有限公司; 盐酸、磷酸二氢钾, 天津市风船化学试剂科技有限公司; 磷酸氢二钾, 天津市光复科技有限公司; 氢氧化钠, 天津市凯信化学工业有限公司; 正辛醇、聚乙二醇 400 (PEG400)、聚乙二醇-12-羟基硬脂酸酯 (HS15)、中链甘油三酸酯 Miglyol 812N、蓖麻油聚炔氧酯 (EL35)、聚氧乙烯 40 蓖麻油 (RH40), 北京凤礼精求商贸有限公司; 屈臣氏纯净水; 1,2-丙二醇, 第二军医大学药理学系合成药物研究所; 辛酸甘油酯 (MCT), 上海佑创实业有限公司; 油酸乙酯, 国药集团化学试剂有限公司; 肉豆蔻酸异丙酯 (IPM), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、青霉素-链霉素、PBS 缓冲液、胰蛋白酶, 美国 Gibco 公司; 二甲基亚砜 (DMSO), 美国 Sigma 公司; 冰冻 4% 多聚甲醛溶液、DAPI 工作液 (1 mg/mL), 北京索莱宝科技有限公司; 山羊血清工作液, 北京康为世纪生物科技有限公司; 兔抗 ZO-1 抗体, 美国 Invitrogen Corporation 公司; Triton X-100, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; Acti-stain 488 phalloidin 荧光标记鬼笔环肽, 美国 Cytoskeleton 公司; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记山羊抗兔 IgG, 武汉谷歌生物科技有限公司; DiBAC4 (3), 美国 Life Technologies 公司;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶、BCA 蛋白定量试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

### 1.3 仪器

HPLC Agilent 1260 液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; THZ-92C 气浴恒温振荡器, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; BS224S 型电子天平, Sartorius

公司; SB-3200DTN 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TG20-WS 型高速离心机, 长沙维尔康湘鹰离心机有限公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 天津赛盟实验仪器有限公司; NANO-ZS90 型马尔文粒度分析仪, 英国 Malvern 公司; HT7700 透射电子显微镜 (TEM), 日本日立公司; Series II 型二氧化碳培养箱、Multiskan Go 全自动酶标仪, 美国 Thermo 公司; 超净工作台, Heal Force; CKX-41 型倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; Scientz-IID 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 细胞计数板, 上海市求精生化试剂仪器有限公司; FACS Aira II 型流式细胞仪, 美国 BD 公司; IX73 型倒置荧光显微镜, 日本奥林巴斯公司; TDL80-2B 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; 6 孔细胞培养板、96 孔细胞培养板, 美国 Corning 公司; 激光共聚焦培养皿, 上海晶安生物科技有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 DHA-SMEDDS 的制备

固定油相、乳化剂与混合助乳化剂总质量为 10 g, 称取一定量的油相、乳化剂及混合助乳化剂于茄形瓶中, 40 °C 下 300 r/min 磁力搅拌 30 min, 得空白自微乳。于 5 g 空白自微乳中精密加入 50 mg DHA, 40 °C 磁力搅拌 1 h, 得到 DHA-SMEDDS。

### 2.2 DHA 的含量测定

**2.2.1 色谱条件** 色谱柱为 Reprisil-Pur Basic C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水; 梯度洗脱: 0~25 min, 40%乙腈; 25~40 min, 40%~70%乙腈; 40~40.1 min, 70%~40%乙腈; 40.1~50 min, 40%乙腈; 检测波长 216 nm; 柱温 25 °C; 体积流量 1.0 mL/min; 进样量 20 μL。

**2.2.2 对照品储备液配制** 精密量取适量 DHA 对照品, 用甲醇溶解配制成质量浓度为 2.140 8 mg/mL 的对照品储备液。

**2.2.3 对照品溶液配制** 精密吸取“2.2.2”项下对照品储备液 2.5 mL 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别得到质量浓度为 535.2 μg/mL 的对照品溶液。

**2.2.4 供试品溶液配制** 精密量取 DHA-SMEDDS 0.5 g 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 30 min, 冷却至室温后加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液得到供试品溶液。同法制备 SMEDDS 空白对照溶液。

**2.2.5 专属性考察** 分别取 SMEDDS 空白对照溶液、DHA 对照品溶液、DHA-SMEDDS 供试品溶液各 20 μL, 按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 并记录图谱。专属性实验表明, DHA 呈现 2 个色谱峰, 分别为 α-DHA 和 β-DHA, 实验样品不干扰 DHA 的测定, 色谱图见图 1。

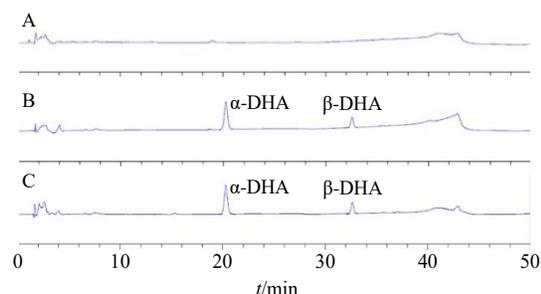


图 1 SMEDDS 空白对照 (A)、DHA 对照品溶液 (B)、DHA-SMEDDS (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank SMEDDS (A), DHA reference solution (B) and DHA-SMEDDS (C)

**2.2.6 线性关系考察** 精密吸取“2.2.2”项下对照品储备液 0.1、0.5、1.0、2.5、3.0、5.0 mL 于 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别得到质量浓度为 0.042 8、0.214 1、0.428 2、1.070 4、1.284 5、2.140 8 mg/mL 的系列对照品溶液。精密吸取上述系列对照品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以 DHA 2 个色谱峰的峰面积和为纵坐标 (Y), 其质量浓度 (C) 为横坐标 (X) 作线性回归, 得到回归方程  $Y=503.24 X+1.642 9$ ,  $r=0.999 9$ 。结果表明 DHA 在 42.8~2 140.8 μg/mL 线性关系良好。

**2.2.7 精密度考察** 精密吸取“2.2.3”项下对照品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 连续测定 6 次, 记录 DHA 2 个色谱峰峰面积和。经计算, DHA 2 个色谱峰峰面积和 RSD 为 0.23%, 结果表明仪器精密度良好。

**2.2.8 重复性考察** 按“2.2.4”项方法制备供试品溶液 6 份, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录 DHA 2 个色谱峰峰面积和。经计算, DHA 2 个色谱峰峰面积和 RSD 为 0.36%, 结果表明该方法重复性良好。

**2.2.9 稳定性考察** 精密吸取“2.2.4”项下适量的供试品溶液, 分别于 0、8、10、12、21、24 h, 按“2.2.1”项下色谱条件测定并记录 DHA 2 个色谱峰峰面积和。DHA-SMEDDS 供试品溶液的 DHA 2 个色谱峰峰面积和的 RSD 为 0.43%, 结果表明 DHA-

SMEDDS 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.2.10 加样回收率考察** 精密量取已知质量分数的 DHA-SMEDDS 9 份, 每份 0.25 g, 置于 10 mL 量瓶中, 分为 3 组, 采用加样回收法, 分别精密添加相当于供试品溶液中 DHA 质量分数的 80%、100%、120% 的 DHA 对照品各 3 份, 加甲醇适量, 超声 30 min, 冷却至室温后加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率。结果表明, DHA 的平均加样回收率为 100.12%, RSD 为 1.79%。回收率符合要求。

**2.3 不同溶液中 DHA 平衡溶解度的测定**

取过量的 DHA 原料药于 10 mL 具塞离心管中, 分别加入水、0.1 mol/L 盐酸以及不同 pH 值 (2.0、3.0、4.0、5.0、5.8、6.0、6.8、7.4) 的磷酸盐缓冲液 (PBS), 放入 37 °C 气浴恒温振荡器中, 110 r/min 振荡 24 h, 取出后用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液用甲醇稀释适宜的倍数, 滤过, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 精密吸取 20 μL, 测定, 记录 DHA 2 个色谱峰峰面积和, 计算其平衡溶解度。实验结果显示, DHA 在 0.1 mol/L 盐酸、不同 pH 值 (2.0、3.0、4.0、5.0、5.8、6.0、6.8、7.4) 的 PBS 和水中的平衡溶解度分别为 120.4、168.9、167.0、167.8、150.6、141.1、125.8、112.7、46.8、148.1 μg/mL, 见表 1。

表 1 37 °C 下 DHA 在不同溶液中的平衡溶解度

Table 1 Equilibrium solubilities of DHA in different solution at 37 °C

介质	溶解度/ (μg·mL <sup>-1</sup> )	介质	溶解度/ (μg·mL <sup>-1</sup> )
0.1 mol/L 盐酸	120.4	pH 5.8 PBS	141.1
pH 2.0 PBS	168.9	pH 6.0 PBS	125.8
pH 3.0 PBS	167.0	pH 6.8 PBS	112.7
pH 4.0 PBS	167.8	pH 7.4 PBS	46.8
pH 5.0 PBS	150.6	水	148.1

**2.4 不同溶液中 DHA 的表观油水分配系数 (P) 的测定**

取 DHA 适量, 溶于 25 mL 水饱和的正辛醇中, 用甲醇稀释至标准曲线范围内后, 滤过, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 精密吸取 20 μL, 测定, 记录 DHA 2 个色谱峰峰面积和, 计算其初始质量浓度 (C<sub>0</sub>) 为 4.198 7 mg/mL。分别精密吸取上述正辛醇溶液各

2 mL, 共 5 份, 置于 10 mL 离心管中, 分别加入正辛醇饱和的水相 (水、0.1 mol/L 的盐酸溶液以及 pH 5.8、6.8、7.4 的 PBS) 各 2 mL, 放入气浴恒温振荡器中, 在 37 °C 下, 110 r/min 振荡 24 h, 取出, 3500 r/min 离心 10 min, 静置分层, 精密吸取上层正辛醇相 1 mL 至 5 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 按照“2.2.1”项下色谱条件, 精密吸取 20 μL, 测定, 记录 DHA 2 个色谱峰峰面积和, 外标法计算其质量浓度 (C<sub>油</sub>), 进而计算 DHA 的 P, 计算公式为  $P=C_{油}/(C_0-C_{油})$ 。

实验结果 (表 2) 显示, DHA 在 0.1 mol/L 盐酸, pH 5.8、6.8、7.4 的 PBS 以及水中的 P 的 lgP 值均大于 1, 提示药物的脂溶性较好。

表 2 37 °C 下 DHA 在不同溶液中的 P  
Table 2 P of DHA in different media at 37 °C

介质	C <sub>油</sub> / (mg·mL <sup>-1</sup> )	(C <sub>0</sub> -C <sub>油</sub> )/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	P 值	lgP
0.1 mol/L 盐酸	3.881 6	0.317 2	19.829 7	1.297 3
pH 5.8 PBS	4.121 9	0.076 8	53.672 2	1.729 7
pH 6.8 PBS	3.876 7	0.322 0	12.038 2	1.080 6
pH 7.4 PBS	3.859 6	0.339 1	11.381 2	1.056 2
水	3.997 2	0.201 6	12.238 0	1.087 7

**2.5 DHA-SMEDDS 处方筛选**

**2.5.1 DHA 在不同辅料中的饱和和溶解度试验** 称取过量的 DHA 原料药于 10 mL 具塞离心管中, 分别加入不同的油相 (Miglyol 812N、橄榄油、MCT、IPM 和油酸乙酯) 和助乳化剂 (无水乙醇、1,2-丙二醇和 PEG400) 各 10 g, 涡旋混匀, 40 °C、110 r/min 恒温振荡 24 h。达到平衡后, 10 000 r/min 离心 10 min, 吸取适量的上清液并用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液用甲醇稀释至适当质量浓度, 滤过, 按照“2.2.1”项下色谱条件测定续滤液中 DHA 的含量。计算 DHA 在不同油相和助乳化剂中的溶解度。结果显示, DHA 在不同油相中的饱和溶解度大小依次为 Miglyol 812N>MCT>橄榄油; 在助乳化剂中的饱和溶解度大小依次为无水乙醇>PEG 400>丙二醇。DHA 在 Miglyol 812N 和 MCT 溶解度较好, 均可用作油相, 考虑到 MCT 成本较低, 易于获得, 故选用溶解度较高的 MCT 作为油相。DHA 在无水乙醇和 PEG400 溶解度较好, 均可用作助乳化剂。结果见表 3。

**2.5.2 乳化剂的筛选** 为了进一步考察辅料的相容

表3 40 °C下DHA在不同辅料中的溶解度  
Table 3 Solubility of DHA in different accessories at 40 °C

种类	介质	溶解度/(mg·g <sup>-1</sup> )
油相	Miglyol 812N	7.3
	橄榄油	2.9
	MCT	5.4
	IPM	3.9
	油酸乙酯	3.9
助乳化剂	无水乙醇	19.0
	丙二醇	9.9
	PEG400	12.8

性, 筛选出乳化效果好的乳化剂, 分别将油相与RH40、EL35、HS15按1:2、1:1.5、1:1、1.5:1、2:1的比例在40 °C磁力搅拌充分混匀后观察其在纯化水中的分散情况, 取适量上述基质, 用纯化水稀释适当的倍数, 轻轻振摇使其充分乳化, 观察自微乳液的情况, 从而选出乳化效果较好的乳化剂。

将自乳化情况按照以下3个级别进行评定:(a)溶液透明澄清, 无色或者淡蓝色;(b)溶液略浑浊, 显蓝白色乳光;(c)不透明黏稠液体<sup>[9]</sup>。实验结果表明:当MCT与RH40的比例为1:2、1:1.5、1:1、1.5:1、2:1时, 自乳化情况分别为a、a、a、b和b;当MCT与EL35的比例为1:2时, 自乳化情况为a, 当其比例为1:1.5、1:1、1.5:1时, 自乳化情况均为b, 当比例为2:1时, 自乳化情况为c;MCT与HS15配伍时, 乳化情况与EL35相同。考虑到乳化剂具有较低的毒性, 在制备SMEDDS时应尽可能少的使用乳化剂, 因此选择用量少且乳化效果好的RH40为乳化剂。

**2.5.3 助乳化剂的考察** 采用PEG400为助乳化剂, 先固定油相与乳化剂的比例为1:2, 考察油相与PEG400配比为2:8、2:4、2:2、4:2、8:2时在40 °C磁力搅拌充分混匀后观察其在纯化水中的分散情况, 取适量上述基质, 用纯化水稀释适当的倍数, 轻轻振摇使其充分乳化, 观察自微乳液是否澄清, 以及SMEDDS在24 h内是否出现分层情况。评级方法同“2.5.2”项。实验结果表明, 以上比例基质的自乳化情况均为a, 但SMEDDS经放置后, 24 h内出现分层现象。为了增加SMEDDS的稳定性、提高载药量, 故加入适量的无水乙醇, 制成混合助乳化剂。

**2.5.4 混合助乳化剂比例的考察** 为确定混合助乳

化剂比例, 先固定油相、乳化剂、混合助乳化剂的比例为2:4:4, 考察PEG400与无水乙醇的比例分别为3:1、3:5、3:9时, 在40 °C磁力搅拌, 充分混匀后观察其在纯化水中的分散情况, 取适量上述基质, 用纯化水稀释适当的倍数, 轻轻振摇, 使其充分乳化, 观察自微乳液是否澄清, 以及SMEDDS在24 h内是否出现分层情况。评级方法同“2.5.2”项。实验结果表明, PEG400与无水乙醇的比例为3:9、3:1时, 自乳化情况均为a, 但两者配比为3:1时SMEDDS经放置后, 24 h内出现分层现象;而当PEG400与无水乙醇的比例为3:5时, SMEDDS乳化后的乳液澄清, 乳化效果好且在24 h内不会出现分层现象。因此, 确定混合助乳化剂中PEG400与无水乙醇的比例为3:5。

**2.5.5 伪三元相图的绘制** 将乳化剂与混合助乳化剂按照质量比( $K_m$ )为1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1混合后, 再与油相按照比例为1:9~9:1进行混合, 固定总量为5 g, 分别称取相应的MCT、RH40和混合助乳化剂(PEG400和无水乙醇), 40 °C水浴磁力搅拌混合30 min, 形成均匀透明状液体, 称取0.1 g空白自微乳加纯化水稀释100倍, 观察SMEDDS的乳化情况, 以及在24 h内是否发生分层。选取自乳化后的溶液透明澄清, 呈现无色或者淡蓝色的成乳区域, 将伪三元相图的3个顶点设置为MCT、RH40、混合助乳化剂, 使用Origin 2018绘制空白SMEDDS的伪三元相图, 确定有效自微乳化区域。由图2可知, 当油相、乳化剂和混合助乳化剂分别为MCT、RH40、PEG400与无水乙醇(3:5)时, 各相所占比例分别为10%~30%、27%~81%、7%~63%。所筛选的DHA空白自微乳加纯化水稀释100倍后溶液呈澄清或微泛蓝色, 并且在24 h内不会发生分层现象。结果见图2。

## 2.6 CCD-RSM优化DHA-SMEDDS的处方

**2.6.1 CCD-RSM确定最优处方** 选择自变量时应考虑该因素是否对SMEDDS的形成有显著性影响, 因此, 选定油相质量分数( $X_1$ )、乳化剂与混合助乳化剂的质量比( $K_m$ ,  $X_2$ )为自变量。选择评价SMEDDS体系的平均粒径( $Y_1$ )和SMEDDS处方载药量( $Y_2$ )为处方评价的因变量。按处方比例精密称取油相、乳化剂、混合助乳化剂, 40 °C磁力搅拌30 min后加入过量DHA, 混匀, 10 000 r/min离心10 min, 取上清液即得DHA-SMEDDS。取适量

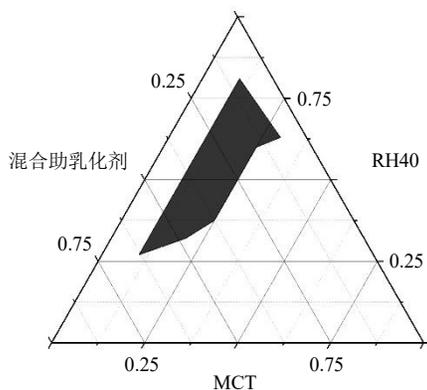


图2 DHA空白自微乳的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram of blank DHA-SMEDDS

DHA-SMEDDS, 加纯化水稀释适当的倍数, 摇匀, 移取适量上清液, 采用马尔文激光粒度仪测定平均粒径。精密称取上述 DHA-SMEDDS 1 g 置于 10 mL 量瓶中, 加纯化水稀释至刻度, 10 000 r/min 离心 15 min, 用 0.22 μm 的滤膜滤过, 吸取续滤液 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量超声 30 min, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 按“2.2.1”项下方法测定 SMEDDS 中 DHA 含量, 计算载药量。

实验采用 2 因素 5 水平的星点设计法 (CCD) 安排试验, 结合伪三元相图, 确定油相质量分数 ( $X_1$ )、 $K_m$  ( $X_2$ ) 的范围分别为 10%~25%、0.67~1.5。使用 Design Expert 10.0 软件对各成分进行多元线性回归和 2 项式的拟合, 根据拟合方程绘制三维效应面, 表示各指标与各成分之间的关系。使用 Design Expert 10.0 软件, 以平均粒径 ( $Y_1$ )、载药量 ( $Y_2$ ) 为因变量,  $X_1$  和  $X_2$  为自变量, 经过对上述因素进行多元线性回归和 2 项式方程拟合后, 得到拟合方程  $Y_1=32.04+19.28 X_1-8.02 X_2-10.04 X_1X_2+9.12 X_1^2+0.18 X_2^2$ ,  $R^2=0.971 1$ ,  $P<0.000 1$ ;  $Y_2=13.9+0.31 X_1+0.59 X_2+0.12 X_1X_2+0.7 X_1^2+1.01 X_2^2$ ,  $R^2=0.804 5$ ,  $P=0.02$ ; 由上述方程可知,  $P$  均小于 0.05, 具有显著性差异, 平均粒径和载药量均符合多元线性方程, 拟合度良好, 相关系数较高, 结果具有统计学意义。实验结果见表 4。

根据上述回归模型, 绘制 3D 效应面图。结果见图 3。其中任一变量保持中央水平不变, 其他 2 个变量在优化水平范围内变化时, 油相质量分数、 $K_m$  之间对于平均粒径而言相互影响较小。平均粒径随油相比例的增加而逐渐增大。而平均粒径因  $K_m$  条件变化的变化趋势则受油相的影响。油相比比例较

表 4 星点设计实验结果

Table 4 Experimental results of central composite design

序号	$X_1$ /%	$X_2$	平均粒径/ nm	载药量/ ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )
1	12.20 (-1)	1.38 (+1)	21.73	15.94
2	12.20 (-1)	0.79 (-1)	23.55	14.41
3	22.81 (+1)	1.38 (+1)	36.70	16.04
4	22.81 (+1)	0.79 (-1)	79.33	14.06
5	17.50 (0)	1.50 (+1.414)	26.74	15.68
6	17.50 (0)	0.67 (-1.414)	40.37	14.93
7	25.00 (+1.414)	1.09 (0)	80.91	15.66
8	10.00 (-1.414)	1.09 (0)	22.08	13.78
9	17.50 (0)	1.09 (0)	32.53	12.90
10	17.50 (0)	1.09 (0)	35.04	13.36
11	17.50 (0)	1.09 (0)	30.39	14.27
12	17.50 (0)	1.09 (0)	33.46	13.47
13	17.50 (0)	1.09 (0)	29.01	13.06

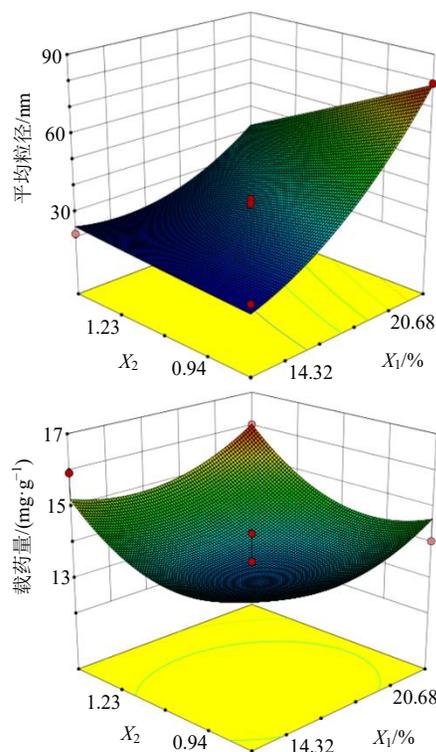


图3 平均粒径和载药量三维效应面图

Fig. 3 Three-dimensional response surface of average particle size and drug loading

小时, 平均粒径随  $K_m$  条件的增加而持续增大; 油相比比例较大时, 平均粒径随  $K_m$  条件的增加而持续减小。油相、 $K_m$  之间的相互影响对于载药量而言较大。载药量随油相比比例、 $K_m$  的增加而先减后增。

根据自微乳制剂的特点, 比表面积和药物溶出

与吸收的速度随粒径的减小而增大；载药量越高，实际口服剂量越小<sup>[20]</sup>。因此，综合考虑乳化剂毒性、无水乙醇含量对临床应用的影响，以粒径≤30 nm为限制条件，油相在15%~25%、 $K_m$ 在0.9~1.2，根据 Design Expert 10.0 软件的预测，综合考虑载药量和平均粒径 2 个指标对 SMEDDS 质量的影响，得到理论最佳处方为油相 15%， $K_m=1.2$ ，即 MCT 15%、RH40 46.4%、PEG400 14.48%、无水乙醇 24.12%。

**2.6.2 最优处方验证** 按照最优处方制备 3 批 DHA-SMEDDS 制剂，取一定量的 DHA-SMEDDS 制剂用水稀释适宜倍数后，分别测定其粒径与载药量，观察实测的载药量和平均粒径与预测的载药量和平均粒径之间的偏差[偏差=(预测值-实测值)/预测值]。预测值与实测值偏差结果表明，实际的最优处方的平均粒径和载药量与软件预测结果之间偏差的绝对值较小。结果见表 5。

表 5 星点设计-效应面优化法的验证实验 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
Table 5 Verification experiment of central composite design and response surface optimization method ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

评价指标	预测值	实测值	偏差/%
平均粒径/nm	23.72	24.92±0.22	-5.06
载药量/(mg·g <sup>-1</sup> )	13.77	14.33±0.06	-4.07

**2.6.3 处方药物加入量的确定** 根据“2.6.1”项下最优自微乳处方配制自微乳基质，分别制成含药量为 10、12、15 mg/g 的 DHA-SMEDDS，加 37 °C 纯化水稀释 10 倍，观察是否有药物析出。当 DHA 的加入量大于 10 mg/g 时，加水乳化后的溶液放置在 8 h 内有药物析出，其原因可能是载药量超过了自微乳体系可形成稳定的界面膜时的最大承载量，自微乳经乳化后，药物可能没有全部包封在自微乳滴中，有少量药物溶解在乳化剂组成的胶团中，药物超过了乳化剂的溶解能力<sup>[20]</sup>，DHA 结晶析出。因此，将处方中 DHA 加入量调整为 10 mg/g。

**2.6.4 DHA-SMEDDS 的制备** 精密称取 MCT 3 g，RH40 9.28 g，无水乙醇 4.82 g，PEG400 2.90 g 于茄形瓶中，40 °C 下 300 r/min 磁力搅拌 30 min，得空白自微乳。于空白自微乳中精密加入 200 mg DHA，40 °C 磁力搅拌 1 h，得到 DHA-SMEDDS。

**2.7 DHA-SMEDDS 的质量评价**

**2.7.1 外观观察** DHA-SMEDDS 在 25 °C 存放时

为透明油状液体，流动性较好。加纯化水稀释 100 倍后形成的微乳液为淡蓝色澄清透明溶液，具有很好的流动性。

**2.7.2 微观形态观察** 取 DHA-SMEDDS 适量，加纯化水稀释适当的倍数，取少量微乳液滴到测试用有支持膜的铜网上，静置 5 min 后，用滤纸吸去多余液体，滴加 2% 磷钨酸溶液，负染 2 min，烘干，于 TEM 下观察并记录图像。DHA-SMEDDS 经稀释处理后的乳滴在 TEM 下为大小基本相同且分散均匀无粘连的圆球形。TEM 结果见图 4。

**2.7.3 粒径分布与 Zeta 电位考察** 取 DHA-SMEDDS 适量，加 37 °C 纯化水稀释 100 倍，制得澄清透明的 DHA 微乳液。取微乳液适量，采用马尔文激光粒度分布仪测定 DHA-SMEDDS 的平均粒径、多分散性指数 (PDI) 和 Zeta 电位。测定结果表明，DHA-SMEDDS 平均粒径为 (24.55±0.18) nm ( $n=3$ )，PDI 为 0.092±0.028 ( $n=3$ )，Zeta 电位为 (-3.16±0.14) mV ( $n=3$ )。结果见图 5。

**2.7.4 载药量和包封率** 精密取 DHA-SMEDDS

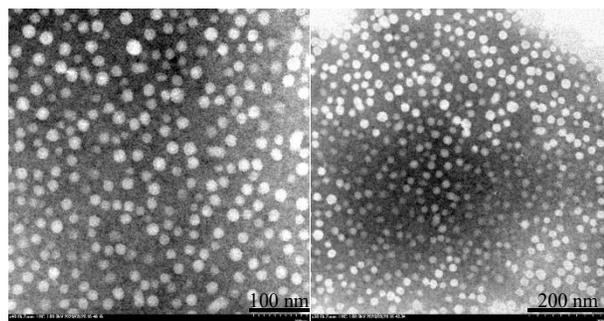


图 4 DHA-SMEDDS 的 TEM 图  
Fig. 4 TEM of DHA-SMEDDS

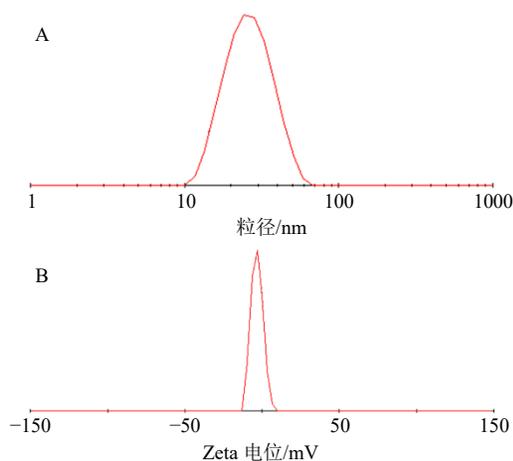


图 5 DHA-SMEDDS 的粒径分布 (A) 和 Zeta 电位 (B)  
Fig. 5 Particle size distribution (A) and Zeta potential (B) of DHA-SMEDDS

0.5 g ( $W_0$ ) 于 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量, 超声 30 min, 冷却至室温后加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 按“2.2.1”项下方法测定 DHA-SMEDDS 中 DHA 质量 ( $W_1$ )。精密取 DHA-SMEDDS 1 g 于 10 mL 量瓶中, 加 37 °C 纯化水稀释至刻度, 摇匀, 制成微乳液, 转移至离心管中, 10 000 r/min 离心 15 min, 滤过, 精密量取续滤液 5 mL 至 10 mL 量瓶中, 加甲醇适量超声 30 min, 冷却至室温后加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 按“2.2.1”项下方法测定 DHA 质量 ( $W_2$ ), 根据公式计算载药量和包封率。

$$\text{载药量} = W_1/W_0$$

$$\text{包封率} = W_2/W_1$$

经计算, DHA-SMEDDS 载药量为  $(9.64 \pm 0.01)$  mg/g ( $n=3$ ), 包封率为  $(99.67 \pm 0.10)\%$  ( $n=3$ )。结果显示, DHA 的载药量和包封率均较好。

**2.7.5 乳化时间考察** 精密称取 DHA-SMEDDS 0.5 g, 滴入于 300 r/min 磁力搅拌下的 50 mL 37 °C 纯化水中进行乳化, 测定形成淡蓝色澄清透明溶液所用时间。实验结果表明, DHA-SMEDDS 完全乳化成澄清透明的淡蓝色微乳液所需时间为  $(13.90 \pm 0.10)$  s, 自乳化时间小于 2 min, 乳化效率高。

## 2.8 DHA-SMEDDS 稳定性初步研究

**2.8.1 高速离心实验** 取 DHA-SMEDDS 适量, 用 37 °C 纯化水稀释 100 倍, 乳化后形成 DHA 微乳液, 取该微乳液 5 mL, 10 000 r/min 高速离心 15 min, 观察微乳液是否分层。结果表明, DHA-SMEDDS 的微乳液经高速离心后依然澄清透明, 没有产生油水分离及药物析出现象。

**2.8.2 强光照实验** 分别取 DHA-SMEDDS 0.5 g, 置于常温 (25 °C)、强光照 ( $4500 \pm 500$ ) lx 条件下保存, 于第 0、5、10 天观察外观, 测定平均粒径及 DHA 的药物质量分数。结果如表 6 所示, 放置 10 d 后, DHA-SMEDDS 及其乳化后的溶液仍澄清透明, 微乳液粒径无明显变化, 但药物含量下降了 15.35%。因此 DHA-SMEDDS 应避光保存。

**2.8.3 温度对 DHA-SMEDDS 稳定性的影响** 将 DHA-SMEDDS 分别置于 4、25 °C 避光保存, 于第 0、5、10 天观察外观, 测定平均粒径及 DHA 的药物质量分数。结果如表 7 所示, 4、25 °C 避光放置 5、10 d 后, 自微乳及其乳化后的溶液仍澄清透明, 微乳粒径以及药物含量均无明显变化。因此, DHA-SMEDDS 应常温避光保存。

表 6 强光照对 DHA-SMEDDS 稳定性的影响 ( $n=3$ )

Table 6 Effects of intense illumination on stability of DHA-SMEDDS ( $n=3$ )

光照时间/d	自微乳外观	微乳液外观	药物质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )	相对质量分数/%	RSD/%	粒径/nm
0	透明油状	淡蓝色澄清透明	9.64	100.00	0.12	25.38 ± 0.37
5	透明油状	淡蓝色澄清透明	9.09	94.29	0.04	25.81 ± 0.10
10	透明油状	淡蓝色澄清透明	8.16	84.65	0.24	25.51 ± 0.11

表 7 温度对 DHA-SMEDDS 稳定性的影响 ( $n=3$ )

Table 7 Effects of temperature on stability of DHA-SMEDDS ( $n=3$ )

温度/°C	时间/d	自微乳外观	微乳液外观	药物质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )	相对质量分数/%	RSD/%	粒径/nm
4	0	透明油状	淡蓝色澄清透明	9.64	100.00	0.12	24.93 ± 0.19
4	5	透明油状	淡蓝色澄清透明	9.63	99.90	0.16	25.09 ± 0.28
4	10	透明油状	淡蓝色澄清透明	9.62	99.79	0.11	25.61 ± 0.09
25	0	透明油状	淡蓝色澄清透明	9.64	100.00	0.02	24.55 ± 0.18
25	5	透明油状	淡蓝色澄清透明	9.62	99.83	0.06	25.37 ± 0.09
25	10	透明油状	淡蓝色澄清透明	9.61	99.76	0.42	24.78 ± 0.03

## 2.9 DHA-SMEDDS 在 MDCK 细胞模型中促渗机制研究

**2.9.1 DHA-SMEDDS 对紧密连接蛋白的影响** 将 MDCK 细胞按照  $1 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup> 的密度接种于 6 孔细胞培养板, 将细胞培养板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱, 常规培养 24 h。设置如下分组: DHA 组 (DHA 5 μg/mL)、

空白自微乳 2000 倍培养基稀释组、DHA-SMEDDS 2000 倍培养基稀释组 (DHA 5 μg/mL)、培养基组作为对照组。按分组给药孵育 4 h, 弃去药液, 每皿加入 1.0 mL 冰冻 4% 多聚甲醛, 置于 4 °C 环境中固定 30 min, 每皿中加入 100 μL 山羊血清工作液, 室温封闭 60 min; 弃去封闭液, 每皿加 90 μL 兔抗

ZO-1 (按比例为 1 : 80 进行稀释), 在 4 °C 孵育 14 h。分别在每皿中加入 90 μL FITC 标记山羊抗兔 IgG (按比例为 1 : 100 进行稀释), 室温孵育 2 h。

F-actin 蛋白染色: 采用上述固定方法进行固定后, PBS 溶液清洗 3 次, 每皿加入 1 mL 1% Triton X-100, 在室温中孵育 10 min, 细胞打孔后每皿加入 90 μL Acti-stain 488 Phalloidin 荧光标记鬼笔环肽 (按比例为 1 : 80 进行稀释), 室温孵育 30 min。紧密连接蛋白染色后每皿滴加 90 μL 质量浓度为 10 μg/mL 的 DAPI 工作液, 室温染色 10 min, 上述每步操作间均用 PBS 清洗 3 次, 最终加入 0.5 mL PBS

溶液, 结果如图 6 所示。

对照组 ZO-1 蛋白边缘清晰, 形态完整, 荧光强度高; F-actin 呈环状分布于细胞周围清晰明亮, 荧光较强。与对照组相比, DHA 作用前后 ZO-1 和 F-actin 紧密连接蛋白表达无显著性差异, 空白自微乳与 DHA-SMEDDS 作用后, ZO-1 蛋白荧光强度显著降低, 部分条带断裂; F-actin 蛋白荧光强度明显减弱, 紧密连接发生断裂。上述结果表明, DHA-SMEDDS 可以减少 ZO-1 和 F-actin 紧密连接蛋白的表达, 进而促进 DHA 在 MDCK 细胞旁路被动转运。

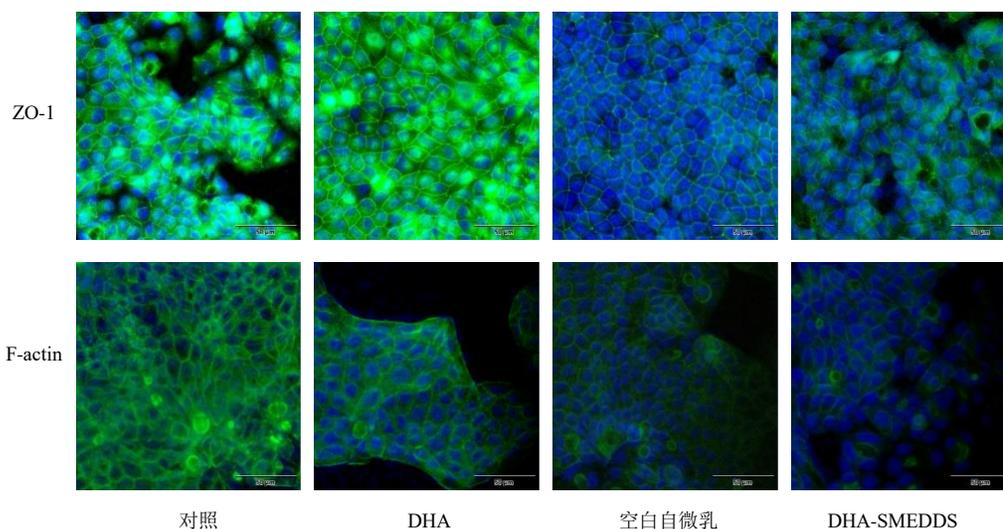


图 6 DHA 及 DHA-SMEDDS 对 MDCK 细胞单层紧密连接蛋白 (ZO-1 和 F-actin) 表达的影响 (标尺 50 μm)

Fig. 6 Effects of DHA and DHA-SMEDDS on expression of tight junction proteins (ZO-1 and F-actin) in MDCK cell monolayers (scale 50 μm)

**2.9.2 DHA-SMEDDS 对细胞膜电位的影响** 将汇合至 90% 的 MDCK 细胞按照  $1 \times 10^5$  个/cm<sup>2</sup> 的密度接种于 6 孔细胞培养板, 将细胞培养板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱, 常规培养 24 h。分组和给药同“2.9.1”项, 按分组给药孵育 4 h, 弃去药液, 胰酶消化并离心收集细胞, 弃去上清, 以 PBS 重悬并洗涤细胞 2 次, 离心收集细胞, 每管加入 1 mL 质量浓度为 5 μg/mL 的荧光染料探针 DiBAC4 (3), 重悬细胞, 在室温下避光染色 30 min, 离心收集细胞, 弃去上清后以 PBS 重悬并洗涤细胞 3 次并调整细胞密度约为  $1 \times 10^6$  个/mL。细胞悬液采用流式细胞仪检测荧光强度, 设置仪器发射波长为 488 nm, 激发波长为 530 nm, 采用未标记荧光的空白细胞管调零。结果见表 8。由表 8 可知, DHA-SMEDDS 组的 MDCK 细胞的荧光强度相比于对照组显著增加 ( $P < 0.05$ ), DHA 组和空白自微乳组虽然与对照组相比没有显

表 8 DHA 及 DHA-SMEDDS 对 MDCK 细胞膜电位的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 8 Effects of DHA and DHA-SMEDDS on MDCK membrane potential ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	膜电位 (相对荧光强度)
对照	3 832.3 ± 315.5
DHA	4 242.3 ± 178.4
空白自微乳	4 252.0 ± 53.5
DHA-SMEDDS	4 744.3 ± 159.0*

与对照组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

著性差异, 但表现出增加的趋势。DHA 作用于 MDCK 细胞后可以使细胞膜电位降低, 降低细胞膜的黏滞性, 增加细胞膜的流动性, SMEDDS 包裹 DHA 后可以进一步加强上述作用, 使细胞去极化, 增加细胞通透性, 促进药物的被动转运。

**2.9.3 DHA-SMEDDS 对  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性的影响** 将汇合至 90% 的 MDCK 细胞按照  $5 \times 10^4$  个/ $\text{cm}^2$  的密度接种于 6 孔细胞培养板, 将细胞培养板置于  $\text{CO}_2$  培养箱, 常规培养 24 h。分组和给药同“2.9.1”项, 按分组给药孵育 4 h, 弃去药液, 胰酶消化并离心收集细胞, 弃去上清, 收集细胞, 每管加 0.2~0.3 mL 生理盐水制成细胞悬液, 使用超声粉碎器破碎细胞。细胞破碎悬液采用定磷法测定  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性。严格按照试剂盒说明书进行操作。DHA 与 DHA-SMEDDS 作用后 MDCK 细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活力单位的变化见表 9。如表 9 所示, 与对照组相比, DHA、各组自微乳给药 4 h 后,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性均显著提高 ( $P < 0.05$ ), DHA-SMEDDS 作用后,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性进一步提高, 提示该制剂可以增强  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性, 促进药物跨细胞主动转运。

表 9 DHA 及 DHA-SMEDDS 对 MDCK 细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 9 Effects of DHA and DHA-SMEDDS on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of MDCK cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	$\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶/( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ )
对照	$2.601 \pm 0.164$
DHA	$4.076 \pm 0.107^*$
空白自微乳	$4.481 \pm 0.114^*$
DHA-SMEDDS	$5.014 \pm 0.039^*$

与对照组比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group

**2.9.4 数据统计** “2.9.2”“2.9.3”项下所有实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 26.0 软件进行处理, 各组样本与对照组间比较采用独立样本  $t$  检验分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 讨论

DHA 是青蒿素的衍生物, 其包含独特过氧桥的七元环结构, 抗疟活性比青蒿素好, 但其水溶性差, 稳定性不佳, 易受光照、湿热的影响<sup>[21]</sup>。因此, 提高药物的稳定性、溶解度和生物利用度是开发新制剂的研究方向。本研究发现, DHA 在水的平衡溶解度为  $148.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 属于微溶性药物; 在不同 pH 值中的平衡溶解度研究发现, 在 pH 5 左右的环境中相对稳定; DHA 在碱性环境下会转化成其他异构体, 因此在制剂的过程中应注意 pH 值的控制。

DHA 表观油水分配系数研究显示, DHA 表观油水分配系数  $P$  为 12.238 0 ( $\lg P$  为 1.087 7), DHA 的脂溶性较强。一般认为, 适宜的水溶性和脂溶性

将有利于药物吸收, 使药物有效透过生物膜脂质双分子层<sup>[22]</sup>。SMEDDS 经口服入胃液后, 形成小乳滴, 可以有效增加药物的溶解度, 提高难溶性药物在体内的吸收速度和程度, 并具有避免肝首过效应的作用, 同时其制备工艺简单, 适应于产业化<sup>[23]</sup>, 因此, 考虑将 DHA 制成 SMEDDS 制剂, 以期提高其溶解度和生物利用度。

SMEDDS 制剂中主要包括油相、乳化剂与助乳化剂等处方影响因素, 而其乳化效果主要受油相种类的影响, 同时, 其粒径大小及稳定性主要由乳化剂决定。助乳化剂的加入可以明显起到增加 SMEDDS 对药物的溶解性和稳定性的作用, 调节亲水亲油平衡值<sup>[24]</sup>。本研究将 DHA 制成 DHA-SMEDDS, 首先通过溶解度实验筛选出具有良好溶解性能、成本适宜的 MCT 作为油相。通过单因素实验选择具有较好乳化作用的 RH40 作为乳化剂。实验过程中发现仅采用 PEG400 为助乳化剂时, SMEDDS 的稳定性较差, 易产生分层现象, 而采用无水乙醇与 PEG400 混合助乳化剂时, 明显提高了 SMEDDS 的稳定性。并对混合助乳化剂的配比进行了系统考察, 结果发现 PEG400 与无水乙醇配比在 3:5~3:9 时均具有良好的稳定性。

实验中 SMEDDS 粒径为重要的评价指标, 其测定方法将影响结果的判断, 本课题采用单因素实验考察了稀释倍数、温度等对制剂自乳化粒径的影响, 结果显示, 采用 37 °C 纯化水分别稀释 10、50、100 倍, 粒径测定无显著影响; 采用 25 °C 和 37 °C 的纯化水稀释同样的倍数, 粒径测定无显著影响。

在自微乳初步稳定性实验中, 结果显示, DHA-SMEDDS 的微乳液在高速离心实验中稳定; 强光照使得 DHA-SMEDDS 的药物含量下降, SMEDDS 不能改变 DHA 的光稳定性, 储存时应避光; 温度影响实验表明 25 °C 及 4 °C 对 DHA-SMEDDS 的稳定性无显著影响, 因此, 该制剂应常温避光保存。

紧密连接蛋白是调控细胞旁路的主要载体, 能够选择性地调节离子、水和水溶性物质通过细胞旁路的被动扩散<sup>[25]</sup>。当紧密连接蛋白表达发生改变时, 单层膜通透性随之变化, 影响药物在细胞旁路的被动转运<sup>[26]</sup>。DHA-SMEDDS 作用后胞质附着蛋白 ZO-1<sup>[27]</sup>部分条带断裂; 细胞骨架蛋白 F-actin<sup>[28]</sup>紧密连接发生断裂、重排, 细胞间隙变大。实验结果表明 DHA-SMEDDS 可以下调 MDCK 细胞的紧密连接蛋白的表达, 使细胞的通透性增加, 进而促

进 DHA 的吸收。

膜电位是细胞产生的一种促进离子、营养物质等跨膜运输的电位。细胞膜电位发生改变时,通常细胞膜蛋白结构及其特性例如通透性、黏滞性也会改变,对药物的跨膜转运产生影响<sup>[29]</sup>。DiBAC4 (3) 是测量细胞膜电位的敏感慢响应负离子荧光探针,DiBAC4 (3) 进入细胞,荧光强度越大,细胞膜电位越低,细胞去极化<sup>[30]</sup>。DHA-SMEDDS 作用后细胞内荧光强度升高,细胞膜电位降低,使细胞通透性增加,促进药物被动转运。

Ca<sup>2+</sup>是一种重要的细胞内信使,可以调控多种细胞的生理功能,细胞内外 Ca<sup>2+</sup>的转运速度以及浓度受 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶影响,Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶参与细胞调节,使细胞发挥正常功能<sup>[31]</sup>。MDCK 细胞 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性影响实验结果显示,DHA 能够增加 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶活性,DHA-SMEDDS 能够加强该作用,若 DHA 与主动转运的药物连用制成 SMEDDS 制剂,可以促进药物跨细胞主动转运。

本研究利用 SMEDDS 技术制备了载药量高、粒径小的 DHA-SMEDDS,相比于双氢青蒿素脂质体<sup>[5]</sup>,SMEDDS 制备工艺更加简单,易于产业化;与环糊精包合物<sup>[6]</sup>相比,本研究中制剂的包封率更高,更利于促进药物在体内的吸收,从而提高其口服生物利用度,为该品种的后续研究与开发奠定了实验基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 刘桂梅,蔡楠,谢静,等. 青蒿素及其衍生物用于治疗新型冠状病毒肺炎的探讨 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(4): 606-612.
- [2] 谢相红,闵瑶,刘璐,等. 双氢青蒿素抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(2): 136-138.
- [3] 费伟东,叶轶青,陈玥,等. 双氢青蒿素诱导肿瘤细胞铁死亡及其机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(13): 3473-3481.
- [4] 付岩松,李春宇,钟越,等. 双氢青蒿素的研究进展 [J]. 吉林医药学院学报, 2018, 39(4): 292-294.
- [5] 彭剑青,邹颖,徐金转,等. 共载光敏剂/UCNPs/双氢青蒿素脂质体的制备及其体外抗肿瘤活性评价 [J]. 中草药, 2020, 51(16): 4151-4159.
- [6] 周慧,郑一敏,胥秀英. 双氢青蒿素-羟丙基-β-环糊精包合物的制备工艺研究 [J]. 中国当代医药, 2016, 23(8): 9-11.
- [7] 李婉蓉,王菲,陈建波,等. 1,8-桉叶油素自微乳给药系统的制备及质量评价和细胞摄取研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2418-2426.
- [8] Kim D S, Cho J H, Park J H, et al. Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for improved oral delivery and photostability of methotrexate [J]. *Int J Nanomed*, 2019, 14: 4949.
- [9] Madhav K V, Kishan V. Self microemulsifying particles of loratadine for improved oral bioavailability: Preparation, characterization and *in vivo* evaluation [J]. *J Pharm Investig*, 2017, 48(4): 1-12.
- [10] Komesli Y, Ozkaya A B, Ergur B U, et al. Design and development of a self-microemulsifying drug delivery system of Olmesartan Medoxomil for enhanced bioavailability [J]. *Drug Devel Ind Pharm*, 2019, 45(8): 1292-1305.
- [11] Patel R C, Soniwala M M, Shah K V. Development and characterization of a self-emulsifying drug delivery system (SMEDDS) of rilpivirine hcl [J]. *Int Res J Pharm*, 2019, 10(1): 184-189.
- [12] 刘艳平. 自微乳释药系统在提高中药难溶性药物生物利用度中的应用 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(31): 36-39.
- [13] Liu C S, Chen L, Hu Y N, et al. Self-microemulsifying drug delivery system for improved oral delivery and hypnotic efficacy of ferulic acid [J]. *Int J Nanomed*, 2020, 15: 2059-2070.
- [14] 杨志欣,张蕾,王鑫,等. 自乳化药物递送系统研究概述 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(3): 563-569.
- [15] 郭雨凡,任淑珍,李敏,等. 含功能性油的水飞蓟宾超饱和自纳米乳的制备与体外评价 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5137-5147.
- [16] 叶蕾,胡容峰,王晓华,等. 星点设计-效应面法优化葛根素自微乳工艺 [J]. 中成药, 2014, 36(3): 514-519.
- [17] 张琳琳,李小芳,谢龙,等. 星点设计-效应面法优化基于甘草酸的葛根素纳米乳及其体外释放研究 [J]. 中草药, 2020, 51(12): 3180-3186.
- [18] 祁利平,董艳艳,张景姣,等. 复方痛痹舒自微乳释药系统基质组成的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3359-3365.
- [19] 柯云玲,潘金明,席建军,等. 青蒿琥酯自微乳的制备与质量评价 [J]. 医药导报, 2018, 37(6): 735-740.
- [20] 杨露,李小芳,罗佳,等. 单纯形网格法优选柿叶总黄酮自微乳处方 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 13-17.
- [21] Wang D, Li H Y, Gu J K, et al. Ternary system of dihydroartemisinin with hydroxypropyl-β-cyclodextrin and lecithin: Simultaneous enhancement of drug

- solubility and stability in aqueous solutions [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 83: 141-148.
- [22] 李慧敏, 马具淼, 王淑萍, 等. 木香提取物中木香烯内酯和去氢木香内酯的平衡溶解度和油水分配系数的测定 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(2): 242-247.
- [23] 刘丹, 张露, 张振海, 等. 银杏黄酮组分自微乳-微丸释药系统的构建 [J]. *中草药*, 2017, 48(16): 3377-3383.
- [24] 仲粒, 李小芳, 廖艳梅, 等. 甘草黄酮自微乳化释药系统的制备及其质量评价 [J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3044-3051.
- [25] 杨冰, 杜守颖, 陆洋, 等. 鼻脑递送: 葛根素在嗅神经鞘细胞的摄取及在 Calu-3 细胞的转运研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5): 2159-2165.
- [26] Gluckman P, Klempt N, Guan J, *et al.* A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1992, 182(2): 593-599.
- [27] Dorkoosh F A, Broekhuizen C A, Borchard G, *et al.* Transport of octreotide and evaluation of mechanism of opening the paracellular tight junctions using superporous hydrogel polymers in Caco-2 cell monolayers [J]. *J Pharm Sci*, 2004, 93(3): 743-752.
- [28] Engelhardt B, Liebner S. Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 355(3): 687-699.
- [29] 兰颐, 李辉, 陈岩岩, 等. 花椒油对 HaCaT 细胞膜流动性及膜电位的影响及其机制研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2015, 17(1): 44-51.
- [30] 丁晓燕, 方廖琼, 张弘, 等. 电压敏感染料 DiBAC4(3) 用于检测胚胎细胞膜电位变化的研究 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2012, 28(1): 32-33.
- [31] 杨冰. 构建“鼻—脑”多通路细胞模型组合及通窍散瘀方鼻用微乳吸收转运特性和机理研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.

[责任编辑 郑礼胜]