

• 药剂与工艺 •

和厚朴酚自微乳给药系统制备工艺响应面法优化及质量评价研究

李桂华^{1,2}, 赵子晨^{1,2}, 蒋满意^{1,2}, 王世锋^{1,2}, 孙云^{1,2}, 张冬冬^{1,2}, 李建龙^{1,2}, 郭伟良^{1,2,3*}, 周永灿^{1,2*}

1. 海南大学 海南省热带水生生物技术重点实验室, 海南 海口 570228
2. 海南大学海洋学院, 海南 海口 570228
3. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223

摘要: 目的 优化和厚朴酚自微乳给药系统(HN-SMEDDS)制备工艺, 并对其质量进行评价。方法 采用拟三元相图法筛选 HN-SMEDDS 的辅料。在此基础上, 以微乳粒径大小为评价指标, 应用星点设计-响应面法优化 HN-SMEDDS 处方。然后采用电导率法对最优处方的 HN-SMEDDS 进行结构表征, 并对其质量进行体外评价。结果 优化后 HN-SMEDDS 配方为聚山梨酯 80 71.54%, PEG200 14.62%, 花生油 10.56%, 蓖麻油 3.28%; 在该配方下, 和厚朴酚载药质量浓度为 60 mg/mL, 用纯水将其稀释 3 倍以上可形成水包油(O/W)微乳液, 其平均粒径为(16.83±0.35) nm, 多分散系数(PDI)为 0.189±0.021, Zeta 电位为(-15.530±0.205) mV。HN-SMEDDS 在 5~400 倍稀释形成的微乳液稳定性良好, 分散介质类型对其粒径无显著性影响, 在-20 °C或在室温条件下贮存 15 d 仍可稀释形成稳定微乳液。该自微乳可显著延长和厚朴酚在人工胃液中的释放时间和提高其在人工小肠液中的释放度。结论 优化的 HN-SMEDDS 制备工艺简单、微乳粒径小、PDI 小、稳定性好、制备成本低、能有效提高和厚朴酚在水中的溶解度和在人工小肠液中的释放度。

关键词: 和厚朴酚; 自微乳给药系统; 拟三元相图; 星点设计-响应面法; 质量评价; 电导率法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)02-0362-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.02.006

Response surface optimization of honokiol self-microemulsifying drug delivery system and quality evaluation

LI Gui-hua^{1,2}, ZHAO Zi-chen^{1,2}, JIANG Man-yi^{1,2}, WANG Shi-feng^{1,2}, SUN Yun^{1,2}, ZHANG Dong-dong^{1,2}, LI Jian-long^{1,2}, GUO Wei-liang^{1,2,3}, ZHOU Yong-can^{1,2}

1. Hainan Key Laboratory of Marine Resource Utilization in South China Sea, Hainan University, Haikou 570228, China
2. College of Marine Science, Hainan University, Haikou 570228, China
3. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Abstract: Objective To prepare and optimize honokiol self-microemulsion drug delivery system (HN-SMEDDS) and evaluate its quality. **Methods** Pseudo-ternary phase diagrams were applied to screen the excipients of HN-SMEDDS. And then, using the particle size of microemulsion as the evaluation index, the formulation of HN-SMEDDS was optimized by central design-response surface methodology. The structure of the HN-SMEDDS prepared under the optimized formulation was characterized by the electrical conductivity method, and the quality of HN-SMEDDS were evaluated *in vitro*. **Results** The optimum formulation of HN-SMEDDS was as following: Polysorbate-80 71.54%, PEG200 14.62%, peanut oil 10.56%, castor oil 3.28%. The drug loading capacity of this HN-SMEDDS was 60 mg/mL. HN-SMEDDS could be transformed into O/W microemulsions after being diluted

收稿日期: 2021-08-17

基金项目: 国家重点研发计划资助(2019YFD0900105); 国家自然科学基金项目(31960739); 海南临高县海洋与渔业局小瓜虫病防控技术研究服务项目(ZLHX2018-124R)

作者简介: 李桂华(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生动植物疫病防控。Tel: 15273122961 E-mail: 1023558746@qq.com

*通信作者: 郭伟良(1983—), 男, 博士, 教授, 研究方向为水产疾病防控药物研发。E-mail: guowl07@mails.jlu.edu.cn

周永灿(1968—), 男, 博士, 教授, 研究方向为水产健康养殖。E-mails: zychnu@163.com

above three-fold using deionized water. The average particle size, PDI and Zeta potential of the microemulsion were (16.83 ± 0.35) nm, 0.189 ± 0.021 , and (-15.530 ± 0.205) mV. HN-SMEDDS had good stability between 5 and 400 times dilutions, and the types of dispersion media used for HN-SMEDDS dilution had no significant effect on the particle size of the microemulsion. And HN-SMEDDS was able to form a stable self-microemulsion after being stored for 15 d at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ or room temperature. HN-SMEDDS prolonged the release time of honokiol in artificial gastric fluid and improved its release in artificial intestinal fluid.

Conclusion The optimized HN-SMEDDS possesses have the advantages of easy preparation process, small particle size and good stability with low cost and can effectively improve the solubility of honokiol in water and the release of honokiol in artificial intestinal fluid.

和厚朴酚 (honokiol, HN) 是一种具有抗炎^[1-2]、抗菌^[3]、保护神经和心脑血管系统^[4-5]等多种药理作用的天然化合物, 但其在水中的溶解度极低, 限制了其在疾病防控中的应用。有报道将和厚朴酚制备成脂质体^[6]、滴丸剂^[7]、纳米混悬剂^[8]等剂型以提高其生物利用度, 但这些剂型大多需要超声或高压等较高外界能量的输入, 且制备过程较为复杂, 对制备条件要求较高。

自微乳给药系统 (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS) 是近年来迅速发展起来的新型疏水性药物给药系统, 其主要由油相、乳化剂、助乳化剂按一定配比复配而成^[9-11], 在胃肠道蠕动下自发乳化形成水包油 (O/W) 型乳液^[12], 可增加难溶性药物的溶解度、稳定性、分布均一性以及其与胃肠道的接触面积, 有助于控制药物释放和吸收^[13], 提高药物生物利用度和降低生物应激^[10]。目前, 也有研究报道将和厚朴酚制备成自微乳以提高其生物利用度^[14-15], 但其处方仍有优化提升的空间, 通过处方优化以期提高微乳载药量, 降低成本, 减少生物刺激。本实验首先通过最大溶解度测试和拟三元相图法筛选和厚朴酚自微乳给药系统 (HN-SMEDDS) 的辅料, 再采用星点设计-响应面法优化 HN-SMEDDS 的处方, 并对优化后的处方进行表征和体外质量评价, 为 HN-SMEDDS 的开发及生产应用提供科学参考。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器

LC-2030C 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; ZEN3690 型马尔文激光粒度分析仪, 马尔文仪器有限公司; DDS-11C 型电导率仪, 上海浦春计量仪器有限公司。

1.2 试剂与材料

对照品和厚朴酚, 西安绿如泉生物科技有限公

司, 批号 190912, 质量分数 $\geq 98\%$; 蓖麻油、聚乙二醇 200、400 (PEG200、PEG400), 上海源叶生物科技有限公司; 玉米油、菜籽油、大豆油、鱼油、花生油, 嘉里粮油有限公司; 乙腈 (色谱纯)、Cremophor EL、Laborsol, 上海麦克林生化科技有限公司; 1,2-丙二醇、甲醇、聚山梨酯 80 (Tween-80, T80)、甘油, 西陇科学股份有限公司; 劳瑞坦低泡 FT1379 (FT1379)、椰油酸二乙醇酰胺 6501 (CD6501)、烷基酚基聚氧乙烯醚 OP-10 (OP-10)、TO6 异构十三碳醇聚氧乙烯醚 (TO6)、TO9 异构十三碳醇聚氧乙烯醚 (TO9)、TO3 异构十三碳醇聚氧乙烯醚 (TO3)、烷基糖苷 0810 (AG0810)、异构十碳醇聚氧乙烯醚 1007 (IDPE1007)、辛基苯基聚氧乙烯醚 (曲拉通 X-100)、月桂醇聚氧乙烯聚氧丙烯醚 (LEP-10), 山东优索化工科技有限公司; 人工胃液、人工小肠液, 广州检测科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 和厚朴酚含量测定方法的建立

2.1.1 对照品溶液的配制 用甲醇超声溶解 6.5 mg 和厚朴酚并定容至 10 mL, 制成 650 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和厚朴酚对照品储备液。

2.1.2 HN-SMEDDS 供试品溶液的配制 精密吸取优化后的 HN-SMEDDS 1 mL 用纯水稀释 100 倍制成微乳液, 2400 r/min 离心 10 min, 取 100 μL 上清液, 加入 900 μL 甲醇, 超声 10 min 破乳, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 得 HN-SMEDDS 供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent 5 TC-C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm); 流动相为乙腈-纯水 (70 : 30); 检测波长 220 nm; 检测时间为 10 min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL ; 体积流量 1.0 mL/min; 理论塔板数按和厚朴酚峰计算不低于 5500。和厚朴酚对照品色谱图见图 1-A, HN-SMEDDS 样品色谱图见图 1-B。

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取对照品储备液

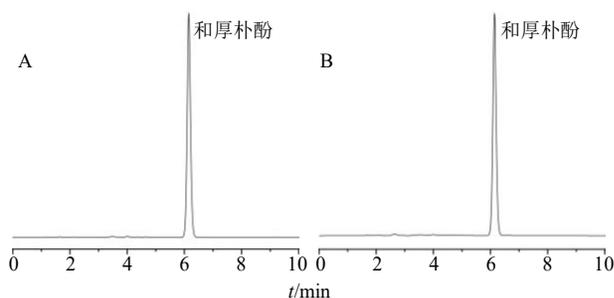


图 1 和厚朴酚对照品 (A) 及 HN-SMEDDS 样品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of honokiol reference substance (A) and HN-SMEDDS sample (B)

适量, 用甲醇逐步稀释成 650.00、325.00、162.50、81.25、40.63、20.31、2.03、0.20 $\mu\text{g/mL}$ 的和厚朴酚对照品溶液, 在“2.1.3”项色谱条件下进样检测各个对照品溶液, 以和厚朴酚质量浓度 (X) 对其峰面积 (Y) 作线性回归曲线, 得线性回归方程 $Y=5 \times 10^7 X - 250\ 873$, $R^2=0.999\ 2$, 线性范围为 0.20~650.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.1.5 精密度试验 分别将和厚朴酚对照品储备液稀释至 0.20、81.25、650.00 $\mu\text{g/mL}$, 在“2.1.3”项色谱条件下, 每个样品分别连续进样 6 次, 结果显示和厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 0.16%、0.02%、0.12%, 表明该检测方法精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 按“2.1.2”项方法制备 HN-SMEDDS 供试品溶液, 分别于制备后 0、1、2、4、8、12、24 h 取样, 在“2.1.3”项色谱条件下进行 HPLC 分析, 和厚朴酚峰面积的 RSD 为 0.26%, 表明该检测方法稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 按“2.1.2”项方法平行制备 6 份 HN-SMEDDS 供试品溶液, 在“2.1.3”项色谱条件下测定峰面积, 计算和厚朴酚质量浓度, 结果显示和厚朴酚质量浓度的 RSD 为 0.76%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取已测定和厚朴酚含量的同一 HN-SMEDDS 供试品溶液 9 份, 各 1 mL, 按对照品溶液中和厚朴酚与供试品溶液中和厚朴酚的质量比为 0.8:1.0、1.0:1.0、1.2:1.0 混合, 每个比值下平行制备 3 份, 在“2.1.3”项色谱条件下进行 HPLC 分析, 计算各样品中和厚朴酚的加样回收率。结果显示, 3 个比值样液中和厚朴酚的平均加样回收率为 $(101.58 \pm 1.28)\%$, RSD 为 1.26%。

2.2 HN-SMEDDS 辅料筛选

2.2.1 和厚朴酚在不同辅料中的溶解度测定 考察

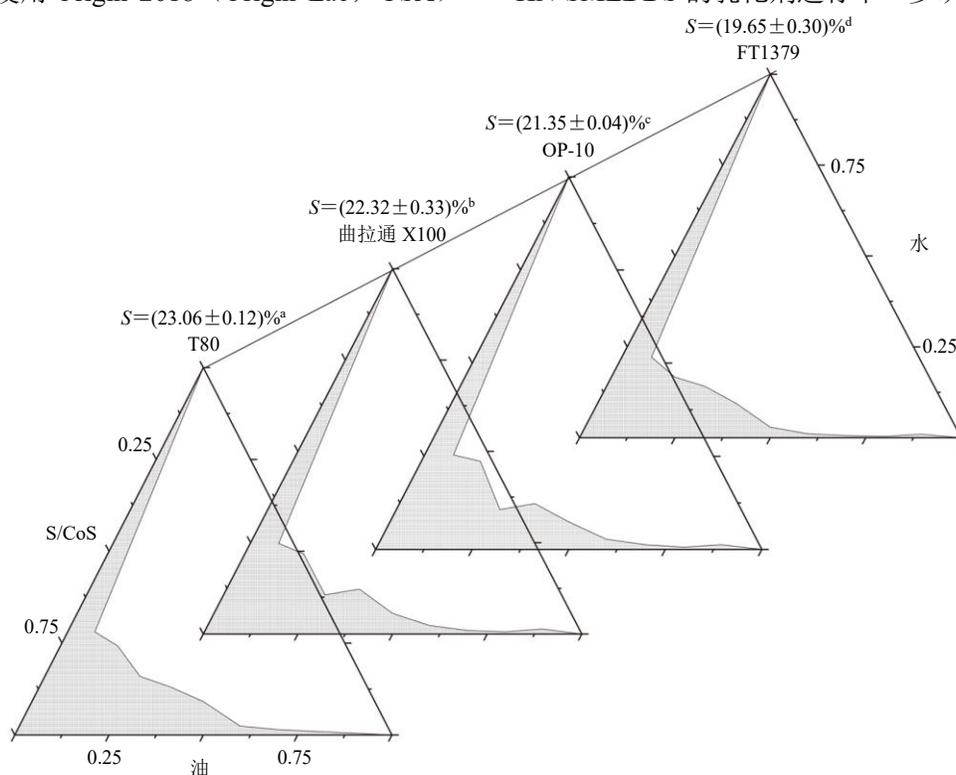
和厚朴酚在各供筛选自微乳辅料 (乳化剂、助乳化剂、油相) 中的最大溶解度。在供筛选辅料 (表 1) 中加入过量的和厚朴酚, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床中震荡 24 h, 以 10 000 r/min 离心 (离心半径为 8.40 cm) 15 min, 取上层液体 1 mL, 加入 2 mL 甲醇, 超声 10 min, 用甲醇定容至 10 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 按“2.1.3”项方法测定和厚朴酚质量浓度, 每个样品平行测 3 次。结果 (表 1) 显示, 在所考察的乳化剂中, T80 对和厚朴酚溶解度最高, 除 AG0810 和 IDPE1007 外, 所选乳化剂对和厚朴酚溶解度均大于 50 mg/mL ; 在所考察的助乳化剂中, 1,2-丙二醇、PEG200 和 PEG400 对和厚朴酚的溶解度均较高, 对和厚朴酚溶解度影响无显著差异, 甘油对和厚朴酚的溶解度最低; 在所考察的油相辅料中, 蓖麻油和花生油对和厚朴酚的溶解度最高, 其次是玉米油和菜籽油, 大豆油最低。

表 1 和厚朴酚在不同辅料中的溶解情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Solubility of honokiol in different excipients ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组成 | 辅料 | 溶解度/ $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ |
|----------|----------------|---|
| 乳化剂 | T80 | 425.83 ± 10.65 |
| | OP-10 | 115.23 ± 4.40 |
| | TO9 | 108.14 ± 4.44 |
| | FT1379 | 107.33 ± 7.74 |
| | LEP-10 | 100.18 ± 7.54 |
| | CD6501 | 93.71 ± 3.03 |
| | Cremonophor EL | 92.05 ± 0.92 |
| | TO6 | 89.88 ± 3.37 |
| | TO3 | 71.51 ± 3.98 |
| | 曲拉通 X-100 | 50.65 ± 4.96 |
| | AG0810 | 29.68 ± 1.01 |
| | IDPE1007 | 3.39 ± 0.05 |
| | 助乳化剂 | PEG 400 |
| 1,2-丙二醇 | | 113.57 ± 7.96 |
| PEG 200 | | 112.35 ± 0.88 |
| Laborsol | | 102.02 ± 2.16 |
| 甘油 | | 10.75 ± 0.76 |
| 油相 | 蓖麻油 | 74.15 ± 0.37 |
| | 花生油 | 73.95 ± 0.40 |
| | 玉米油 | 58.33 ± 0.46 |
| | 菜籽油 | 45.17 ± 0.35 |
| | 鱼油 | 31.59 ± 0.82 |
| | 大豆油 | 29.13 ± 1.13 |

2.2.2 乳化剂的筛选 采用拟三元相图法,以和厚朴酚溶解度最高的蓖麻油为油相、PEG400 为助乳化剂,对和厚朴酚溶解度 $>50\text{ mg/mL}$ 的乳化剂进行筛选,将其按 4:1 与助乳化剂复配成混合乳化剂(S/CoS),然后分别与油相接 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 在锥形瓶中进行混合,25 °C、400 r/min 磁力搅拌,逐滴加入纯水,可观察到体系由清变浊,搅拌均匀后变清,直到形成浑浊液体。记录静置 2 h 后体系不再变澄清时的加水量,同时观察静置 12 h 后油水分离情况。每个实验重复 3 次,以 3 次实验的平均值绘制拟三元相图^[16],使用 Origin 2018 (Origin Lab, USA)

积分功能计算成乳区面积占拟三元相图总面积的百分比(S 值),并使用 SPSS 20.0 (IBM, USA)对 S 值进行多重比较分析。结果显示 AG0810 在用水滴定过程中一直为浑浊状态,成乳区面积为 0; TO3 和 LEP-10 所制备的初乳在静置 12 h 后出现油水分离现象,均与蓖麻油无法形成稳定微乳;而 CD6501 虽可成乳,但混合搅拌过程中产生大量泡沫,不适于微乳制备。其余乳化剂均可形成稳定微乳,其拟三相图(图 2)的 S 值按大小排序依次为 $S_{T80} > S_{\text{曲拉通 X-100}} > S_{OP-10} > S_{FT1379}$, T80 作为乳化剂所得 S 值均显著高于与其它供筛乳化剂,选择 T80 作为 HN-SMEDDS 的乳化剂进行下一步研究。



灰色网格部分为成乳区;上标 a~d, 相同字母表示无显著差异, 不同字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$)
The gray area is the microemulsion formation region; Superscript a~d, the same character indicating no significant differences, different character means significant difference ($P < 0.05$)

图 2 不同乳化剂制备空白自微乳的拟三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram of blank SMEDDS prepared by different surfactants

2.2.3 助乳化剂种类、油相种类及乳化剂 T80 在 S/CoS 中占比的单因素考察 以蓖麻油和 T80 作为初始油相和乳化剂,以拟三元相图的 S 值为指标(计算方法如“2.2.2”项),分别采用单因素法筛选和优化 HN-SMEDDS 的助乳化剂、油相及乳化剂 T80 在 S/CoS 中的占比,结果如表 2~4 所示。4 种助乳化剂的 S 值按大小排序依次为 $S_{PEG200} > S_{1,2\text{-丙二醇}} > S_{PEG400} > S_{Laborsol}$, PEG200 作为助乳化剂所得 S 值显

著大于其它助乳化剂,因此,选择 PEG200 为助乳化剂进一步对油相进行筛选;4 种油相的 S 值按大小排序依次为 $S_{\text{蓖麻油}} > S_{\text{花生油}} > S_{\text{玉米油}} > S_{\text{菜籽油}}$,油相为蓖麻油和花生油时均有较大成乳区域,且蓖麻油作为油相所得 S 值显著大于其它供筛油相,因此,选择蓖麻油为油相进一步考察乳化剂在 S/CoS 中占比对 S 值的影响;T80 在 S/CoS 中比例 $<50\%$ 时,乳化剂与助乳化剂会出现两相分离情况,不能形成

单相区, 其成乳区面积为 0; 随着乳化剂比例增加, S 值逐渐增大, 当乳化剂占比增加达 85%以上时, S

表 2 助乳化剂种类考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Investigation results of co-emulsifier types ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 助乳化剂 | S 值/% |
|----------|---------------------------|
| PEG200 | 24.31 ± 0.11 ^a |
| 1,2-丙二醇 | 23.64 ± 0.13 ^b |
| PEG 400 | 23.06 ± 0.12 ^c |
| Laborsol | 22.64 ± 0.14 ^d |

上标相同小写字母表示无显著差异, 不同小写字母表示存在显著性差异 ($P < 0.05$), 表 3、4 同

lowercase letters with the same superscript indicate no significant differences, and different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$), same as tables 3 and 4

表 3 油相种类考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Investigation results of oil phase types ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 油相 | S 值/% |
|-----|---------------------------|
| 蓖麻油 | 24.31 ± 0.18 ^a |
| 花生油 | 22.17 ± 0.17 ^b |
| 玉米油 | 13.05 ± 0.15 ^c |
| 菜籽油 | 12.36 ± 0.31 ^d |

表 4 乳化剂 T80 在 S/CoS 中占比考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Investigation results of the ratio of surfactant T80 in S/CoS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| T80 在 S/CoS 中占比/% | S 值/% |
|-------------------|---------------------------|
| 50 | 13.58 ± 0.24 ^a |
| 75 | 22.54 ± 0.31 ^b |
| 80 | 24.31 ± 0.11 ^c |
| 85 | 25.14 ± 0.14 ^d |
| 90 | 25.81 ± 0.42 ^d |

表 5 星点设计-效应面法实验因素水平安排及结果

Table 5 Horizontal arrangement and result of experimental factors in star point design-response surface method

| 序号 | X_1 /% | X_2 /% | X_3 /% | Y | 序号 | X_1 /% | X_2 /% | X_3 /% | Y |
|----|----------------|----------|----------|----------|----|----------|----------------|----------------|----------|
| 1 | 75 (-1) | 75 (-1) | 70 (-1) | 0.003 76 | 11 | 80 (0) | 71.59 (-1.682) | 80 (0) | 0.059 01 |
| 2 | 85 (+1) | 75 (-1) | 70 (-1) | 0.004 16 | 12 | 80 (0) | 88.41 (+1.682) | 80 (0) | 0.035 52 |
| 3 | 75 (-1) | 85 (+1) | 70 (-1) | 0.002 69 | 13 | 80 (0) | 80 (0) | 63.18 (-1.682) | 0.002 56 |
| 4 | 85 (+1) | 85 (+1) | 70 (-1) | 0.004 23 | 14 | 80 (0) | 80 (0) | 96.82 (+1.682) | 0.055 37 |
| 5 | 75 (-1) | 75 (-1) | 90 (+1) | 0.031 81 | 15 | 80 (0) | 80 (0) | 80 (0) | 0.046 32 |
| 6 | 85 (+1) | 75 (-1) | 90 (+1) | 0.056 17 | 16 | 80 (0) | 80 (0) | 80 (0) | 0.045 56 |
| 7 | 75 (-1) | 85 (+1) | 90 (+1) | 0.024 13 | 17 | 80 (0) | 80 (0) | 80 (0) | 0.046 24 |
| 8 | 85 (+1) | 85 (+1) | 90 (+1) | 0.031 97 | 18 | 80 (0) | 80 (0) | 80 (0) | 0.044 61 |
| 9 | 71.59 (-1.682) | 80 (0) | 80 (0) | 0.015 72 | 19 | 80 (0) | 80 (0) | 80 (0) | 0.045 78 |
| 10 | 88.41 (+1.682) | 80 (0) | 80 (0) | 0.034 56 | 20 | 80 (0) | 80 (0) | 80 (0) | 0.045 69 |

值无显著性差异。

2.2.4 花生油与蓖麻油比值优化 由于蓖麻油黏度大、流动性差, 导致乳化时间较长, 虽然花生油作为油相时的 S 值小于蓖麻油, 但其黏度较小, 流动性较大, 乳化性能较好。综合二者性能, 将采用二者作为混合油相。固定 T80-PEG200 (4:1) 为 S/CoS, 考察花生油在混合油相中占比分别为 25%、50%、75%、80%、85%、90%时成乳区大小, 按“2.2.2”项方法绘制拟三元相图并计算 S 值。结果显示其 S 值分别为 (24.69 ± 0.99) %、(25.25 ± 0.27) %、(27.19 ± 0.26) %、(31.30 ± 0.42) %、(25.41 ± 0.19) %、(23.35 ± 0.36) %。随着花生油比例的增加, S 值先增大后减小, 当花生油占比达 80%时 S 值达到最大值 (31.30 ± 0.42) %, 显著高于其他组。

2.3 星点设计-响应面法优化 SMEDDS 制备工艺及最优处方的验证

以乳化剂 T80 在 S/CoS 中占比 (X_1)、花生油在油相中占比 (X_2)、混合乳化剂在自微乳中占比 (X_3) 为考察因素, 参考单因素实验结果以及文献报道^[12], 进行星点设计实验。实验设计与结果如表 5 所示, 按表 5 的设计和“2.2.2”项方法制备自微乳并稀释 100 倍制成微乳液, 用马尔文激光粒度分析仪测定其粒径 (25 °C)。以微乳粒径的倒数为响应值 (Y , 表 5), 用 Design Expert 10.0.7.0 (Stat-Ease 公司) 进行响应面分析 (表 6), 其多元 2 次回归模型为 $Y = 0.046 13 + 0.004 82 X_1 - 0.005 30 X_2 + 0.015 97 X_3 - 0.001 92 X_1 X_2 + 0.003 78 X_1 X_3 - 0.003 86 X_2 X_3 - 0.010 06 X_1^2 - 0.002 23 X_2^2 - 0.008 70 X_3^2$, 相关系数 (R^2) 为 0.914 6, 模型显著性水平 $P < 0.01$, 表明模型显著可靠; 各因素对粒径的影响为混合乳化剂自

表 6 方差分析结果

Table 6 Results of variance analysis

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 | 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------|------------------------|-----|------------------------|-------|----------|-----|---------|------------------------|-----|------------------------|--------|----------|-----|
| 模型 | 6.771×10^{-3} | 9 | 7.523×10^{-3} | 11.9 | 0.000 3 | 极显著 | X_1^2 | 1.457×10^{-3} | 1 | 1.457×10^{-4} | 23.06 | 0.000 7 | 极显著 |
| X_1 | 3.172×10^{-4} | 1 | 3.172×10^{-3} | 5.02 | 0.048 9 | 显著 | X_2^2 | 7.191×10^{-5} | 1 | 7.191×10^{-5} | 1.14 | 0.311 1 | |
| X_2 | 3.835×10^{-4} | 1 | 3.835×10^{-5} | 6.07 | 0.033 5 | | X_3^2 | 1.092×10^{-3} | 1 | 1.092×10^{-3} | 17.28 | 0.002 0 | 极显著 |
| X_3 | 3.482×10^{-3} | 1 | 3.482×10^{-3} | 55.10 | <0.000 1 | 极显著 | 残差 | 6.318×10^{-4} | 10 | 6.318×10^{-3} | - | - | |
| X_1X_2 | 2.961×10^{-5} | 1 | 2.961×10^{-5} | 0.47 | 0.509 2 | | 失拟 | 6.300×10^{-4} | 5 | 1.260×10^{-3} | 335.00 | <0.000 1 | 极显著 |
| X_1X_3 | 1.145×10^{-4} | 1 | 1.145×10^{-4} | 1.81 | 0.208 0 | | 纯误差 | 1.880×10^{-6} | 5 | 3.761×10^{-5} | - | - | |
| X_2X_3 | 1.192×10^{-4} | 1 | 1.192×10^{-5} | 1.89 | 0.199 6 | | 总回归 | 7.403×10^{-3} | 19 | - | - | - | |

微乳中占比 (X_3) > 花生油在油相中的占比 (X_2) > 乳化剂在 S/CoS 中的占比 (X_1)。

根据模型绘制响应面图 (图 3), 直观反映各因素对响应值及其之间交互作用的影响。图 3 显示 X_1 、 X_2 和 X_3 任意两因素之间响应面图均为凸面图, 表明微乳粒径最小出现的本试验考察范围内, 3 个响应面图中的等高线, 基本都呈正圆形, 表明 3 个因素之间交互作用不显著, 通过拟合模型计算响应值极值, 得到理论上的最佳处方比例为 $X_1=0.618$ 、 $X_2=$

-0.748 、 $X_3=0.589$, 即最优 SMEDDS 处方组成为 T80 71.37%, PEG200 14.52%, 花生油 10.76%, 蓖麻油 3.34%。模型预测的微乳平均粒径为 17.14 nm。以最优处方平行配制 3 份 SMEDDS, 稀释 100 倍后进行粒径与电位测试, 结果 (表 7) 显示, 其平均粒径为 (16.86 ± 0.33) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.208 ± 0.032 , Zeta 电位为 (-11.70 ± 0.16) mV, 与预测的平均粒径的偏差为 -1.70% , 表明模型预测准确可靠。

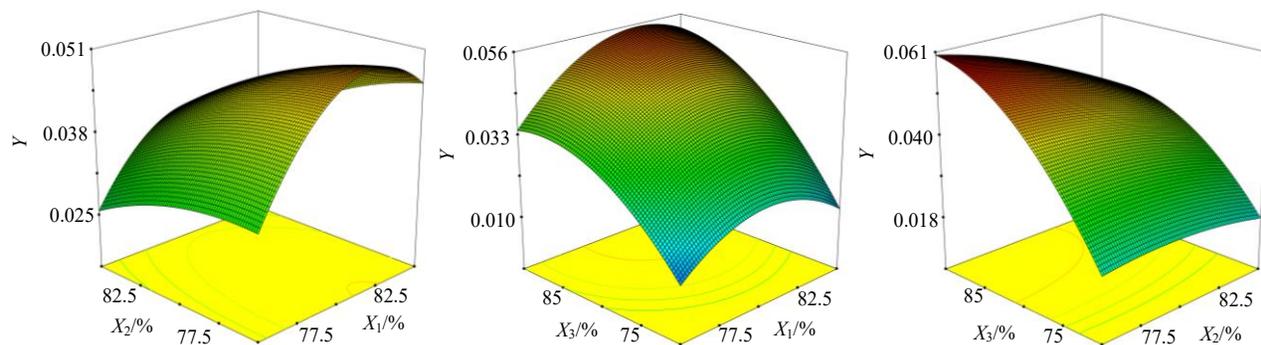


图 3 以粒径倒数为指标的响应面图

Fig. 3 Response surface map with reciprocal particle size

表 7 处方验证结果

Table 7 Results of formulation verification

| 样品 | 粒径/nm | PDI | Zeta 电位/mV |
|----|-------|-------|------------|
| 1 | 16.87 | 0.169 | -11.90 |
| 2 | 16.45 | 0.207 | -11.70 |
| 3 | 17.26 | 0.248 | -11.50 |

2.4 载药质量浓度对 SMEDDS 质量影响研究

2.4.1 最大载药质量浓度的测定 取优化后的 5 mL SMEDDS, 在磁力搅拌下加入过量和厚朴酚制成 HN-SMEDDS, 按“2.1.2”项方法制备 HN-SMEDDS 供试品溶液, 在“2.1.3”项色谱条件下测定溶液中

和厚朴酚质量浓度, 计算获得该 HN-SMEDDS 最大载药质量浓度为 (1.26 ± 0.01) mg/mL ($n=3$)。同时测定和厚朴酚在纯水、人工胃液、人工小肠液中的溶解度, 分别为 (0.12 ± 0.00) 、 (0.14 ± 0.00) 、 (0.14 ± 0.00) mg/mL ($n=3$)。和厚朴酚在 SMEDDS 中的溶解度较水中提高了 10.5 倍。

2.4.2 载药质量浓度对 SMEDDS 平均粒径的影响 在优化后的 SMEDDS 加入和厚朴酚, 制成载药质量浓度分别为 20、40、60、80、100、120 mg/mL 的 HN-SMEDDS, 用纯水稀释 100 倍成乳, 结果 (表 8) 显示, 当载药质量浓度在 0~60 mg/mL 时, 乳剂平均粒径在 (15.530 ± 0.139) ~ (17.600 ± 0.119) nm,

表 8 不同载药质量浓度对 SMEDDS 平均粒径的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of different drug loading concentrations on SMEDDS particle size ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 载药质量浓度/(mg·mL ⁻¹) | 平均粒径/nm |
|-------------------------------|-----------------|
| 0 | 15.530±0.139 |
| 20 | 16.200±0.036 |
| 40 | 16.330±0.065 |
| 60 | 17.600±0.120 |
| 80 | 119.100±0.779** |
| 100 | 207.330±0.250** |
| 120 | 295.000±1.080** |

与空白 SMEDDS 比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs blank SMEDDS

相差很小; 当载药质量浓度为 80 mg/mL 时, SMEDDS 平均粒径为 (119.100±0.779) nm, 超出了微乳的定义范围 (<100 nm)。为此确定该处方 HN-SMEDDS 的载药质量浓度为 60 mg/mL。

2.4.3 载药质量浓度对 HN-SMEDDS 与其稀释成乳后外观的影响研究 不同载药质量浓度的 HN-SMEDDS 外观 (图 4-A) 显示, HN-SMEDDS 呈橙色油状物, 随着载药质量浓度增加, 颜色逐渐加深。用纯水在 400 r/min 搅拌下稀释 100 倍制成微乳液, 其外观 (图 4-B) 转变为淡蓝色乳光溶液, 随着载药质量浓度增加, 浊度增加。

2.5 HN-SMEDDS 结构表征

采用电导率法^[17]考察水相对 HN-SMEDDS 结

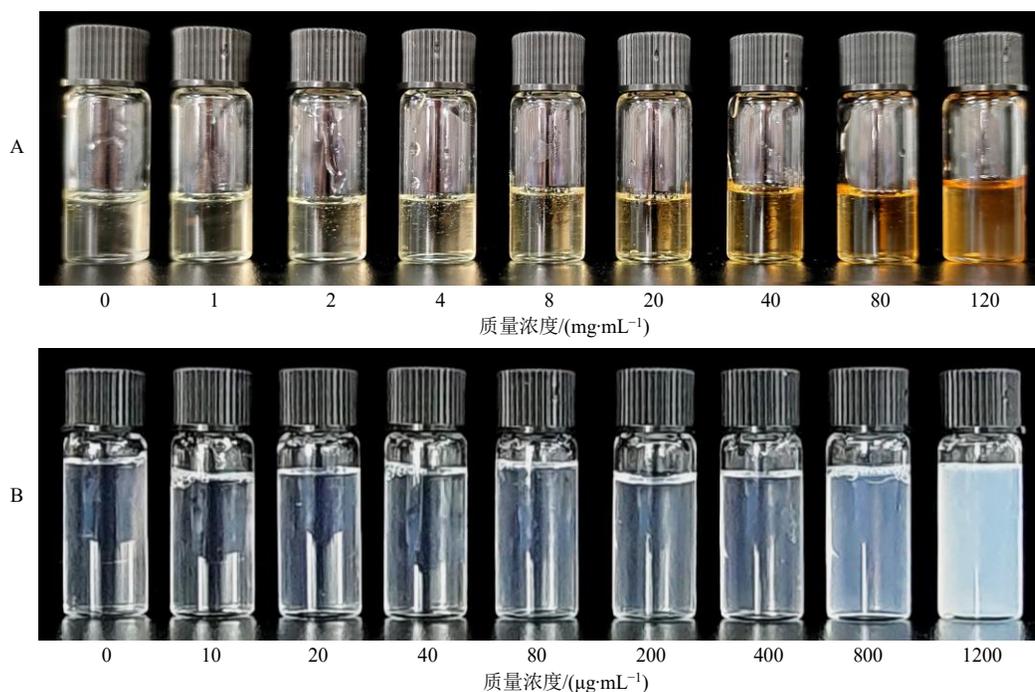


图 4 不同载药质量浓度的 HN-SMEDDS (A) 和稀释后的微乳液 (B)

Fig. 4 HN-SMEDDS (A) and HN microemulsion (B) with different drug concentrations

构的影响。取优化的 HN-SMEDDS 10 mL, 400 r/min 搅拌条件下逐滴加入纯水, 记录其电导率。结果显示 (图 5) 该体系的电导率随着纯水加入量的增加, 水相占比 0~65%阶段, 电导率持续上升, 形成油包水 (W/O) 型微乳, 主要由分散于油相中的水分子相互碰撞导电^[18]; 水相占比 65%~75%阶段, 电导率趋于平稳, 液体发生黏性碰撞, 油水两相互交错, 微乳由 W/O 型转变成双连续型^[19]。水相占比 >75%阶段, 由于导电油滴被逐渐稀释而导致电导率迅速下降, 微乳由双连续型转变成 O/W 型^[20]。故在稀释成乳时, 水相占比大于 75%时方可形成

O/W 型微乳。

2.6 HN-SMEDDS 质量体外评价

2.6.1 优化的 HN-SMEDDS 粒径、Zeta 电位及包封率 优化的 HN-SMEDDS 用纯水稀释 100 倍制成微乳, 测定其平均粒径和 Zeta 电位。测得其平均粒径为 (16.83±0.35) nm ($n=3$), PDI 为 0.189±0.021 ($n=3$), Zeta 电位为 (-15.530±0.205) mV ($n=3$)。

取优化后的空白 SMEDDS 10 mL, 加入 0.6 g 和厚朴酚, 用磁力搅拌器搅拌直至和厚朴酚溶解, 取 1 mL 上述液体加入 2 mL 甲醇, 超声 10 min, 转移到 10 mL 量瓶中, 冷却至室温后加甲醇稀释至刻

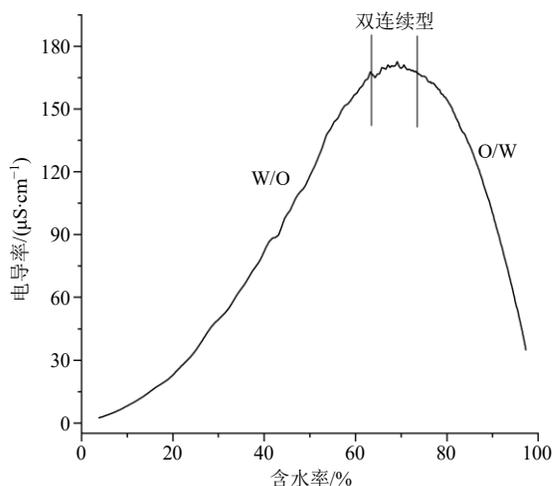


图5 HN-SMEDDS 电导率随水分含量变化曲线

Fig. 5 Curves of electrical conductivity of HN-SMEDDS varying with moisture content

度, 摇匀, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 在“2.1.3”项色谱条件下测定和厚朴酚质量浓度并计算其质量 (W_1); 另取 1 mL HN-SMEDDS, 按“2.1.2”项方法制备 HN-SMEDDS 供试品溶液, 在“2.1.3”项色谱条件下测定和厚朴酚质量浓度并计算其质量 (W_2)。根据公式计算包封率。经计算, HN-SMEDDS 包封率为 $(99.720 \pm 0.001)\%$ ($n=3$)。结果显示该自微乳包封率良好。

$$\text{包封率} = W_2/W_1$$

W_1 为 HN-SMEDDS 中和厚朴酚的质量, W_2 为微乳液经高速离心后和厚朴酚的质量

2.6.2 稀释度对成乳的影响 优化的 HN-SMEDDS 用纯水分别稀释 5、10、20、50、100、200、400 倍, 观察其外观, 测定其粒径, 并观察其室温放置 24 h 后有无沉淀或相分离。结果显示, 稀释倍数对该微乳平均粒径无显著影响, 平均粒径稳定在 $(16.160 \pm 0.096) \text{ nm}$ 左右, 在放置 24 h 后依然呈澄清透明淡蓝乳光状态, 稳定性良好。

2.6.3 分散介质对粒径的影响 分别以纯水、过滤海水、pH 6.8 的 PBS 缓冲液, 人工胃液、人工小肠液为分散介质, 将优化的 HN-SMEDDS 稀释 20 倍, 测定其微乳粒径。结果显示所考察的分散介质对微乳的平均粒径没有显著性影响, 平均粒径均在 $16.29 \sim 17.12 \text{ nm}$, $\text{PDI} < 0.310$, 该处方在不同分散介质中的稳定性良好。

2.6.4 冻融、贮存稳定性 优化的 HN-SMEDDS, 在 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下冷冻 24 h, 再在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴解冻 24 h, 如此反复冻融 3 次, 用纯水释 20 倍, 测得其平

均粒径为 $(14.580 \pm 0.105) \text{ nm}$ ($n=3$), PDI 为 0.263 ± 0.080 ($n=3$), Zeta 电位为 $(-14.860 \pm 0.188) \text{ mV}$ ($n=3$), 反复冻融对其质量无显著影响。优化的 HN-SMEDDS 分别于 4 、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下保存 15 d, 每隔 5 d 取样测定其平均粒径, 结果显示自微乳在 4 、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下储存 15 d 的平均粒径分别为 $14.84 \sim 15.87 \text{ nm}$ 和 $14.58 \sim 18.78 \text{ nm}$, 2 种条件下贮存 15 d 后粒径均无显著性变化, 最大粒径均小于 20 nm , 表明自微乳 15 d 储存稳定性良好。

2.6.5 体外释放度研究 采用透析袋扩散法^[21]测定 HN-SMEDDS 与和厚朴酚混悬液在人工胃液和人工小肠液中的释放行为。分别将优化的 HN-SMEDDS 用人工胃液和人工小肠液稀释 10 倍制成 HN-SMEDDS-人工胃液、HN-SMEDDS-人工小肠液, 同时称取适量和厚朴酚与人工胃液和人工小肠液分别混合, 制备成 6 mg/mL 的和厚朴酚混悬液-人工胃液、和厚朴酚混悬液-人工小肠液, 备用, 取上述 4 种溶液 13 mL 分别装于截留相对分子质量为 $12\ 000 \sim 14\ 000$ 的透析袋中, 分别置于 150 mL 人工胃液和人工小肠液环境中, $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 、 100 r/min 磁力搅拌, 在 0.5、1、2、4、6、12、24、36、48、60、72 h 分别取样 0.5 mL , 每次取样后补足等温等量的溶出介质。样品加入 0.5 mL 甲醇, 超声, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 按“2.1.3”项色谱条件测定和厚朴酚溶出量并绘制累积释放曲线, 结果 (图 6) 显示, 和厚朴酚混悬液在人工胃液和人工小肠液中初期释放量大于微乳液, 在 12 h 内即达到饱和。而 HN-SMEDDS 在人工胃液和人工小肠液中释放速度缓慢, 累积释放量均大于混悬液, 并且在人工小肠液中有更高的释放量。与和厚朴酚混悬液相比, HN-SMEDDS 延长了和厚朴酚在人工胃液中的释放时间, 且在人工小肠液中有更高的释放度。

3 讨论

将难溶性药物制成自微乳可有效增加药物的溶解度, 是提高难溶性药物生物利用度的有效方式^[22]。自微乳制备的关键在于辅料的选择及其配比的优化, 选择对机体刺激小的辅料可促进药物吸收的同时减小药物对机体的损伤, 有研究表明聚氧乙烯化蓖麻油 (CrEL) 对血脑屏障的透过力显著高于 T80^[23-24], 其有助于和厚朴酚进入中枢神经系统发挥其神经活性功效^[25], 目前报道的 HN-SMEDDS 均以 CrEL 作为乳化剂^[14-15], 和厚朴酚作为治疗非神经性疾病药物时, 以 T80 作为 HN-SMEDDS 的乳

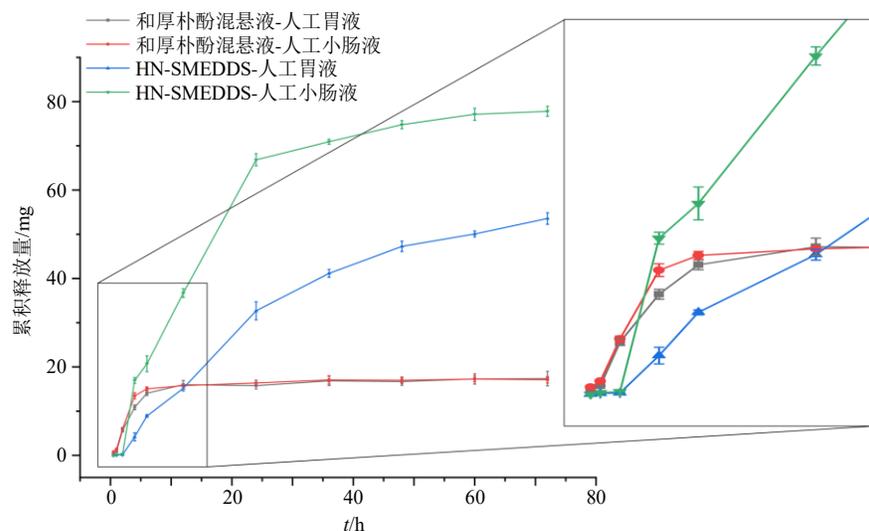


图6 HN-SMEDDS与和厚朴酚混悬液分别在人工胃液和人工小肠液中的体外药物累积释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 *In vitro* release profile of HN microemulsion and suspension in artificial gastric fluid and artificial small intestinal fluid ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

化剂或对生物体产生更小的应激反应。本实验提供一种新的 HN-SMEDDS 处方, 为 HN-SMEDDS 的制备提供了另一种可能。

粒径大小是衡量自微乳质量的重要评价指标, 粒径越小, 则微乳比表面积越大, 药物溶出与机体对药物的吸收速率也越大^[22]。在同等载药质量浓度下, 本实验优化的 HN-SMEDDS 处方微乳粒径均比目前所报道的要小^[14-15], Zeta 电位绝对值是现有报道^[13]的 7.6 倍, 微乳稳定性更强。在自微乳体系中, 加入药物的量须在最大载药质量浓度以下, 否则部分药物在稀释成乳后不能完全被包封, 仍然以原药形式悬浮于溶剂中。经测定, 本实验处方最大载药质量浓度约为 120 mg/mL, 但在载药质量浓度到达 80 mg/mL 时, 微乳的粒径突然增大, 部分微球不能完全将和厚朴酚包裹, 从而引起了液滴聚集, 粒径增大^[16], 故最终选择和厚朴酚的载药质量浓度为 60 mg/mL。在该载药质量浓度以下, HN-SMEDDS 稀释成乳后的粒径均小于 20 nm, 且稀释倍数在 10~400 倍不会影响其粒径大小, 后续可根据需要在该稀释范围内使用。

自微乳基质膨胀、材料降解和溶质扩散是微乳释放难溶性药物的关键, 当自微乳核心中的聚合物链与药物之间的相互作用更强时, 药物释放缓慢^[21]。本研究结果显示和厚朴酚混悬液在 5 h 内的体外溶出量均高于 HN-SMEDDS, 而达到平衡状态时微乳的累积释放量远高于混悬液。此外, HN-SMEDDS 在人工胃液中的体外释放量远低于在人工小肠液中

的释放量, 提示 HN-SMEDDS 可以耐受酸性条件和体液稀释, 稳定地将药物固定在乳剂内部, 从而产生稳定和持续的释放^[26], 待该乳剂进入小肠部位中可快速彻底释放和厚朴酚, 可使和厚朴酚得到充分吸收。

由于处方筛选的辅料不同, 本研究优选的 HN-SMEDDS 组成不同于已有报道^[14-15], 性能表征结果显示, 本研究的处方载药质量浓度更高、粒径更小、稳定性更好, 有利于提高药物在人工肠液中的释放度。所述 HN-SMEDDS 原料易得, 制备工艺简单, 成本更优, 为 HN-SMEDDS 开发及其产业化应用提供科学参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁紫微. 和厚朴酚抗金黄色葡萄球菌磷壁酸诱导的氧化损伤与炎症反应研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [2] Yuan Y, Subedi L, Lim D, *et al.* Synthesis and anti-neuroinflammatory activity of *N*-heterocyclic analogs based on natural biphenyl-neolignan honokiol [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 29(2): 329-333.
- [3] Guo Y, Xing Z Y, He Z, *et al.* Honokiol inhibits *Vibrio harveyi* hemolysin virulence by reducing its haemolytic activity [J]. *Aquac Res*, 2020, 51(1): 206-214.
- [4] 黄家喜. 和厚朴酚对脂毒性心肌损伤的保护作用及相关机制研究 [D]. 咸宁: 湖北科技学院, 2020.
- [5] Li G, Ramanathan A, Raju A V, *et al.* Honokiol, a novel agent that promotes enteric neuronal differentiation and prevents neurodegeneration [J]. *Gastroenterology*, 2020,

- 158(6): 1074-1075.
- [6] 魏晓, 杜子秀, 陆平. 和厚朴酚脂质体的制备及其体外抗肿瘤活性的研究 [J]. 老年医学与保健, 2019, 25(1): 43-47.
- [7] 刘骁虎, 杨静. 和厚朴酚滴丸的制备与体外溶出度研究 [J]. 西北药学杂志, 2021, 36(1): 86-89.
- [8] 沈宏雪. 和厚朴酚纳米混悬剂的制备与评价 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2019.
- [9] 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.
- [10] Lawrence M J, Rees G D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, 45(1): 89-121.
- [11] 傅春升, 李洪松, 张学顺. 苦参碱固体自微乳制剂的制备及其评价 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(4): 511-514.
- [12] 陈洁, 赵运双, 梅兴国, 等. 维生素D₃自微乳化制剂的制备与体外评价 [J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(8): 1010-1016.
- [13] Kumar M, Singh D, Bedi N. Mefenamic acid-loaded solid SMEDDS: An innovative aspect for dose reduction and improved pharmacodynamic profile [J]. *Ther Deliv*, 2019, 10(1): 21-36.
- [14] 徐振中, 杨坚, 白娟, 等. 和厚朴酚口服自微乳制剂的制备及药代动力学研究 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(8): 857-862.
- [15] 甘露, 田睿, 郭锋, 等. 和厚朴酚自微乳化给药系统的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(19): 2073-2076.
- [16] Gao Y, Wang Y Q, Ma Y K, *et al.* Formulation optimization and in situ absorption in rat intestinal tract of quercetin-loaded microemulsion [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009, 71(2): 306-314.
- [17] Zhang H, Taxipalati M, Que F, *et al.* Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 3050-3055.
- [18] Wang J L, Wang Z W, Liu F, *et al.* Preparation and *in vitro* release test of insulin loaded W/O microemulsion [J]. *J Dispers Sci Technol*, 2008, 29(5): 756-762.
- [19] Chen B, Hou M, Zhang B, *et al.* Enhancement of the solubility and antioxidant capacity of α -linolenic acid using an oil in water microemulsion [J]. *Food Funct*, 2017, 8(8): 2792-2802.
- [20] Xu Z B, Jin J, Zheng M Y, *et al.* Co-surfactant free microemulsions: Preparation, characterization and stability evaluation for food application [J]. *Food Chem*, 2016, 204: 194-200.
- [21] Sun C Y, Li W J, Zhang H Y, *et al.* Improved oral bioavailability and hypolipidemic effect of syringic acid via a self-microemulsifying drug delivery system [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2021, 22(1): 45-45.
- [22] 张然, 杨冰, 廖茂梁, 等. 双氢青蒿素自微乳给药系统的制备及其评价 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1291-1302.
- [23] 吴毅, 金少鸿. 药用辅料吐温 80 的药理、药动学及分析方法研究进展 [J]. 中国药事, 2008, 22(8): 717-720.
- [24] 高鹏, 涂家生. 聚氧乙烯蓖麻油及其安全性研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2010, 18(1): 59-63.
- [25] 盛安琪, 刘文涛, 张艳, 等. 和厚朴酚神经保护作用的研究进展 [J]. 药学研究, 2017, 36(11): 660-663.
- [26] 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.

[责任编辑 郑礼胜]