

基于质量源于设计 (QbD) 理念的葛根总黄酮-甘草酸纳米粉体的制备与质量评价

陈海溶¹, 丁 杨¹, 刘贞贞¹, 刘佳佳¹, 王雨宵¹, 沈爱宗⁵, 郭 健^{1,2,3,4*}, 桂双英^{1,2,3,4*}

1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012
2. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012
3. 安徽省中医药科学院药物制剂研究所, 安徽 合肥 230012
4. 现代药物制剂安徽省工程技术研究中心, 安徽 合肥 230012
5. 中国科学技术大学附属第一医院/安徽省立医院 药剂科, 安徽 合肥 230001

摘要: 目的 基于质量源于设计 (quality by design, QbD) 理念优化制备葛根总黄酮-甘草酸纳米粉体 (*Pueraria total flavonoids-glycyrrhizic acid nanopowder*, PG-NP), 并对其质量进行评价。方法 采用超声破碎-高压均质法制备 PG-NP 混悬液。以 PG-NP 混悬液的粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和 ζ 电位作为关键质量属性, 应用鱼骨图筛选风险因素。采用 Plackett-Burman 设计试验筛选关键工艺参数 (critical process parameters, CCPs), 在此基础上结合 Box-Behnken 设计优化 PG-NP 混悬液的处方配比, 应用单因素试验确定 PG-NP 中冻干保护剂含量。对优化后的 PG-NP 进行扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)、X 射线衍射仪 (X ray diffraction, XRD)、差示量热扫描仪 (differential scanning calorimetry, DSC) 表征, 并考察 PG-NP 中葛根素体外溶出性能。结果 PG-NP 的最优制备工艺和处方配比: 药辅比为 17.5:1、甘草酸用量为 0.13%、搅拌转速为 470 r/min、均质压力为 128.3 MPa、甘露醇用量为 5%。优化后 PG-NP 粒径为 (228.00 ± 7.80) nm, PDI 为 0.29 ± 0.05 , ζ 电位为 (-23.10 ± 0.93) mV。PG-NP 为具有针棒状晶型的淡黄色粉末, 且其体外溶出性能较原料药有明显提高。结论 采用 QbD 理念优化的 PG-NP 制备工艺简单易行, 处方设计合理, 质量可控, 可有效改善难溶性成分的溶出。

关键词: 质量源于设计; 葛根总黄酮; 甘草酸; 纳米粉体; 溶出度; 质量评价; 超声破碎-高压均质法; 鱼骨图; Plackett-Burman 设计; 关键工艺参数; Box-Behnken 设计

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)23-7384-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.23.008

Preparation and evaluation of *Pueraria total flavonoids-glycyrrhizic acid nanopowders* based on concept of quality by design (QbD)

CHEN Hai-rong¹, DING Yang¹, LIU Zhen-zhen¹, LIU Jia-jia¹, WANG Yu-xiao¹, SHEN Ai-zong⁵, GUO Jian^{1,2,3,4}, GUI Shuang-ying^{1,2,3,4}

1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
2. Anhui Province Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application, Hefei 230012, China
3. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230012, China
4. Anhui Province Engineering Technology Research Center of Modernized Pharmaceutics, Hefei 230012, China
5. The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China/Department of Pharmacy, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China

Abstract: Objective To optimize *Pueraria total flavonoids nanopowder-glycyrrhizic acid nanopowder* (PG-NP) based on concept

收稿日期: 2022-06-27

基金项目: 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2021A0538); 安徽省高校自然科学研究重点项目 (KJ2021A0541); 安徽中医药大学药学院研究生培养基金 (21pyj05); 安徽中医药大学高层次人才支持计划基金 (2022rczd003)

作者简介: 陈海溶 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为新剂型与中药新制剂研究。Tel: 17730019304 E-mail: Chenhairong0122@126.com

*通信作者: 桂双英, 教授, 研究方向为中药新制剂与新技术研究、药物新剂型与新制剂研究。Tel: (0551)68129121 E-mail: guishy0520@126.com
郭 健, 副教授, 研究方向为制剂新技术与新辅料研究。Tel: 19810963774 E-mail: guoj0719@126.com

of quality by design (QbD) and evaluate their quality. **Methods** PG-NP suspension was prepared by ultrasonic crushing and high pressure homogenization method. A fishbone diagram was used to evaluate risk factors that could affect the particle size, polydispersity index (PDI) and ζ potential of PG-NP suspensions as critical quality attributes. A Plackett-Burman experimental design was used to screen the key process parameters, based on which the prescription ratio of the PG-NP suspension was optimized in conjunction with the Box-Behnken Design, then a single factor test was used to determine the content of lyoprotectant in PG-NP. The scanning electron microscope (SEM), X ray diffraction (XRD) and differential scanning calorimetry (DSC) were used to characterize the optimized PG-NP, and the *in vitro* dissolution properties of puerarin in PG-NP were investigated. **Results** The optimum preparation process and formulation ratio of PG-NP were as follows: the adjuvant ratio was 17.5:1; the content of glycyrrhizin acid was 0.13%; the stirring speed was 470 r/min; the homogenizing pressure was 1 283 MPa, and the content of mannitol was 5 %. The particle size of the optimized PG-NP was (228.00 ± 7.80) nm, the PDI was 0.29 ± 0.05 , and the ζ potential was (-23.10 ± 0.93) mV. PG-NP was light yellow powder with needle-rod crystal form, and *in vitro* dissolution performance was significantly improved compared with the PDI. **Conclusion** In this study, the preparation process of PG-NP optimized by the QbD concept was simple and feasible, the formula design was reasonable, and the quality was controllable, which can effectively improve the dissolution of poorly soluble components. **Key words:** quality by design; *Pueraria* total flavonoids; glycyrrhizic acid; nanopowder; dissolution; quality evaluation; ultrasonication and high pressure homogenization method; fishbone diagram; Plackett-Burman design; critical process parameters; Box-Behnken design

葛根总黄酮 (*Pueraria* total flavonoids, PF) 是来源于葛根中的一类活性成分, 具抗血栓^[1]、抗动脉硬化^[2]、抗氧化应激^[3]等多种药理活性。PF 中成分包括葛根素、大豆苷、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素以及葛根素芹菜糖苷等^[4], 其黄酮成分上的 C-4 和 C-7 位羟基常被葡萄糖、磷脂糖或木糖等糖残基取代, 形成 7-O-或 4-O-糖苷化合物。由于以上 PF 的结构特性, 导致 PF 的水溶性和脂溶性均不佳。此外, PF 的主要活性成分葛根素属于 BCS 分类系统 IV 类化合物^[5], 溶解度仅为 0.86%, 口服吸收差, 生物利用度较低^[6]。目前, PF 的市售制剂主要为葛酮通络胶囊^[7]和愈风宁心片^[8]。然而 PF 生物利用度低导致患者顺应性差, 使其临床应用受到了极大的限制^[6]。为了解决难溶性药物口服吸收生物利用度低的问题, 近年来相继开发了固体分散体^[9]、固体脂质纳米粒^[10]、微乳^[11]、生物黏附制剂^[12]及药物纳米粉体等新型制剂。

其中纳米粉体 (nanopowder, NP) 具有载药量大、溶解度高、易于加工成其他剂型、给药途径灵活的优点。NP 可通过增加介质与药物晶体接触的曲率和降低粒径改善药物的生物利用度和组织分布^[13]。选择 NP 作为 PF 载体, 有助于提升 PF 的溶解度和溶出效率, 为更好的发挥 PF 的药理作用奠定了制剂学基础。甘草酸是一种含有 2 种葡萄糖醛酸的三萜皂苷^[14]。甘草酸的疏水性基团三萜部分残基可吸附于难溶性药物表面, 亲水基团葡萄糖醛酸残基则分散在水中形成球网状结构^[15], 通过降低 NP 的自由流动性提高难溶性药物的溶解度^[16]。甘草酸的表

面活性特性表明其可作为 NP 天然稳定剂^[17]。此外, 有研究发现甘草酸还可通过影响肠上皮细胞膜内脂质位置和排列顺序增加药物在小肠部位的渗透, 促进药物口服吸收^[18]。因此, 本实验选择甘草酸作为葛根总黄酮-甘草酸纳米粉体 (PF-glycyrrhizic acid nanopowder, PG-NP) 的稳定剂, 有望进一步提高 PF 的溶解度和生物利用度, 并为后续口服剂型开发提供依据。

由于采用传统经验筛选法对制剂处方工艺进行优化存在耗时, 且无法体现各因素结合后集体效应与相互作用的缺点。采用质量源于设计 (quality by design, QbD) 理念对制剂处方工艺进行优化是通过实验设计建立起因变量和自变量之间的联系, 管理最终产品质量的风险, 具有降低产品变动性、提高生产效率以及节约生产成本的优势^[19-20]。本实验以 PF 为原料药物, 应用 QbD 理念优化 PG-NP 混悬液的制备工艺与处方。以目标产品质量特性描述 (quality target product profile, QTPP) 为起点, 对药物质量特性、有效性深入研究分析^[13]。采用鱼骨图分析法对影响 PG-NP 生产工艺的关键质量属性 (critical quality attribute, CQA) 的各类因素进行分析, 运用 Plackett-Burman (PB) 设计试验筛选关键工艺参数 (critical process parameters, CPPs), 结合 Box-Behnken 设计 (BBD) 建立 CPPs 与 CQA 联系的设计空间, 优选出 PG-NP 混悬液最优处方与制备工艺。选择单因素试验优化冻干保护剂甘露醇的含量, 并采用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察、X 射线衍射 (X ray

diffraction, XRD) 分析、差示量热扫描(differential scanning calorimetry, DSC) 分析等方法表征 PG-NP 的形貌和结构, 考察了 PG-NP 的体外溶出度。本实验通过借助 QbD 设计管控 PG-NP 全部制备过程的质量, 以期得到工艺简单易行, 处方设计合理, 质量稳定的 PG-NP。

1 仪器与材料

1.1 仪器

U3000 型高效液相色谱仪, 赛默飞世尔科技公司; 01B203 超声破碎仪; APV2000 型高压均质机, 德国 SPX; AE240 型十万分之一电子天平, 美国 Mettler-Toledo 公司; KQ200 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 3000HS 型粒径分析仪, 美国 Malvern Instrument 公司; S-4800 型扫描电子显微镜, 株式会社日立制作所; Dmax2500 X 型射线衍射仪, 日本理学株式会社; RTC-2 型磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; ZRS-8L 型智能溶出试验仪, 天大天发科技有限公司; Alpha 1-4 LSCplus 型冷冻干燥机, 德国 Christ 公司。

1.2 试剂

葛根素对照品, 上海源叶科技有限公司, 批号 B20446, 质量分数 $\geq 98\%$; PF (葛根素质量分数 $\geq 31\%$), 安徽九方制药有限公司馈赠, 批号 210916; 甘草酸, 批号 NO9GS166788, 质量分数 $\geq 95\%$, 上海源叶科技有限公司; 甘露醇, 批号 1906012, 质量分数 $\geq 95\%$, 西陇科学股份有限公司; 超纯水, 由 Millipore 公司 Milli-Q 超纯水系统制备; 甲醇、乙腈均为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 PG-NP 混悬液的制备

精密称取 PF 60.00 mg, 加入 1 mg/mL 甘草酸的水溶液中, 加热搅拌, 超声 15 min (20~25 kHz, 390 W), 得到 PG-NP 粗混悬液, 转入高压均质机,

在一定压力下均质循环 15 次, 即得 PG-NP 混悬液。

2.2 平均粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI)、再分散指数 (redispersibility index, RDI) 的测定

取“2.1”项中 PG-NP 混悬液适量, 采用马尔文粒度仪平行测定粒径及 PDI 3 次, 取均值。以 RDI 为纳米粉体冻干后再分散性的评价指标, 计算公式为 $RDI = \text{冻干再分散后测得的粒径} / \text{初始粒径}$ 。RDI 数值越接近 1, 表明冻干后“固化损伤”越小。

2.3 QTPP 分析

以 QbD 理念中的产品研发思路为指导, 根据已经上市的 PF 制剂要求以及临床口服制剂要求制定了 QTPP, 结果见表 1。

2.4 CQA 分析

通过分析 QTPP 表格, 深入探讨评估在后续处方开发、工艺筛选以及药品安全性的实验中满足规定质量属性, 确定一些影响力较大的质量属性为 CQA, 结果如表 2 所示。

2.5 PG-NP 混悬液的风险评估 (鱼骨图法)

鱼骨图法探究可能影响 PG-NP 混悬液 CQA 的风险因素, 主要包括设备、环境和人员等不可控风险因素以及物料、处方配比和制备工艺等可控因素, 初步对各因素潜在风险因素进行定性评估和标记, 结果见图 1。

2.6 实验设计优化 PG-NP 混悬液处方及工艺

2.6.1 PB 设计试验筛选关键影响因素 通过对 PG-NP 混悬液处方及制备工艺的分析, 以药辅比 (X_1)、甘草酸用量 (X_2)、搅拌转速 (X_3)、搅拌温度 (X_4)、超声频率 (X_5)、超声时间 (X_6)、高压均质循环次数 (X_7)、高压均质压力 (X_8) 为考察对象, 以粒径 (Y_1)、PDI (Y_2) 和 ζ 电位 (Y_3) 为评价指标, 利用 PB 设计试验筛选出对 PG-NP 性质影响较显著的因素。因素水平、筛选试验安排及结果见表 3。

表 1 PG-NP 的 QTPP
Table 1 QTPP of PG-NP

项目	目标	评价标准
剂型	纳米粉体	降低粒径大小, 增加体外溶出度
给药方式	口服	增加了药物的生物利用度
给药剂量	20 mg·mL ⁻¹	剂量在最小有效浓度范围内
外观	质地疏松, 色泽均匀的淡黄色粉末	均匀稳定的黄色粉末, 没有其他的气味和颜色
粒径	<300 nm	改善 PF 的渗透吸收
体外溶出度	与原料药的体外溶出度对照	提高药物溶出度, 以期增加 PF 生物利用度
生产方式	超声破碎-高压均质	降低药物混悬液中粒径 PDI 值

表 2 CQA 分析
Table 2 CQA of PG-NP

质量属性	是否 CQA	依据
性状	否	产品的外观与药物有效性、处方开发相性不大，所以与安全性无直接关联
气味	否	原料药没有特殊气味，生产工艺操作中也无添加有机试剂，所以气味和安全性无关联
鉴别	是	鉴别项对于药品的安全是关键的，但可以通过质量管理进行控制，处方、工艺变量对鉴别项没有影响
碱度	是	pH 值与药品的安全性有直接关系，且处方量会影响 pH 值大小，所以是关键的，但预实验证实，pH 变化甚微，基本都在范围之内
有关物质	是	对 QbD 理念及其制备工艺进行重点关注，所以此项在后续实验中不参与讨论

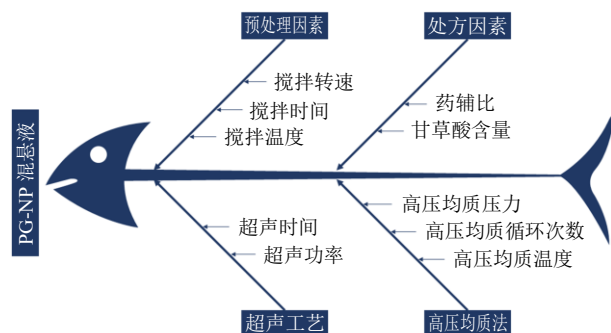


图 1 PG-NP 混悬液鱼骨图

Fig. 1 Fishbone diagram of PG-NP nanosuspension

表 3 PG-NP 关键影响因素的 PB 设计试验的因素水平、试验安排及结果 (n = 3)

Table 3 Factor level, test arrangement and results of PB design test of PG-NP key influencing factors (n = 3)

试验号	X_1	$X_2/\%$	$X_3/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	$X_4/^\circ\text{C}$	X_5/Hz	X_6/min	X_7	X_8/MPa	Y_1/nm	Y_2	Y_3/mV
1	6 : 1 (-1)	0.1 (-1)	100 (-1)	40 (-1)	50 (-1)	10 (-1)	6 (-1)	60.0 (-1)	273.7	0.359	-38.43
2	22 : 1 (+1)	0.1	2000 (+1)	70 (+1)	50	20 (+1)	6	60.0	290.0	0.378	-33.77
3	6 : 1	0.1	100	70	65 (+1)	20	6	140.0 (+1)	216.0	0.405	-35.40
4	22 : 1	0.1	100	40	65	20	14 (+1)	60.0	254.9	0.308	-31.70
5	6 : 1	0.1	2000	70	65	10	14	140.0	210.2	0.402	-39.07
6	22 : 1	0.2 (+1)	2000	40	65	20	6	140.0	293.8	0.364	-30.70
7	6 : 1	0.2	100	40	50	20	14	140.0	216.8	0.357	-34.57
8	22 : 1	0.1	2000	40	50	10	14	140.0	251.3	0.294	-33.23
9	6 : 1	0.2	2000	40	65	10	6	60.0	325.9	0.435	-35.70
10	22 : 1	0.2	100	70	50	10	6	140.0	320.0	0.330	-25.70
11	6 : 1	0.2	2000	70	50	20	14	60.0	319.5	0.431	-35.60
12	22 : 1	0.2	100	70	65	10	14	60.0	376.3	0.361	-24.23

制备过程实际操作情况。通过 12 次运行评估 8 个因素，以粒径、PDI 以及 ζ 电位为指标，确定显著影响因素 CPPs。通过 ANOVA 和多元线性回归分析评估显著性水平和因素系数，结果见表 4。结果发现主要的显著因素为处方因素药辅比和甘草酸用量 ($P < 0.05$)，高压均质压力对粒径的影响有显著影响 ($P < 0.05$)，且搅拌转速对电位也有显著影响 ($P < 0.05$)。因此在接下来的 BBD 设计中进一步考察药

通过 Minitab 软件分析 PB 设计试验，其回归模型为 $Y_1 = -279.03 + 18.68 X_1 + 29.68 X_2 + 2.75 X_3 + 9.63 X_4 + 0.48 X_5 - 13.87 X_6 - 7.53 X_7 - 27.68 X_8$, $R_1 = 0.9617$, $R_{1\text{adj}} = 0.8595$; $Y_2 = 0.37 - 0.03058 X_1 + 0.0827 X_2 + 0.01143 X_3 + 0.01848 X_4 + 0.01142 X_5 + 0.01077 X_6 - 0.01548 X_7 - 0.0091 X_8$, $R_2 = 0.9524$, $R_{2\text{adj}} = 0.8255$; $Y_3 = -33.175 + 3.287 X_1 + 2.092 X_2 - 1.503 X_3 + 0.880 X_4 + 0.375 X_5 - 0.448 X_6 + 0.108 X_7 + 0.063 X_8$, $R_3 = 0.9857$, $R_{3\text{adj}} = 0.9475$ 。说明以上模型与数据拟合度较高，模型的预测结果符合混悬液

辅比、甘草酸用量、搅拌转速以及高压均质压力 4 个变量。

2.6.2 BBD 优化 通过 PB 设计试验，筛选出对 PG-NP 混悬液性质影响较显著的 4 个因素： X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_8 。因素水平、处方优化试验结果见表 5。将上述 4 个因素作为考察对象，以 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 为评价指标，采用 Design Expert 12.0 软件进行数据分析，对综合评分与各考察因素之间的关系进行 2 项式方程拟合

表 4 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 的统计分析Table 4 Statistical analysis of Y_1 , Y_2 and Y_3

项目	Y_1		Y_2		Y_3	
	效应	P 值	效应	P 值	效应	P 值
X_1	37.37	0.440	-0.061	0.014	6.907	0.002
X_2	59.37	0.013	-0.016	0.252	3.157	0.013
X_3	5.50	0.656	0.022	0.145	-3.340	0.016
X_4	19.27	0.183	0.037	0.051	1.427	0.123
X_5	0.97	0.936	0.023	0.145	1.083	0.204
X_6	-27.73	0.089	0.022	0.162	-0.897	0.273
X_7	-15.07	0.270	-0.031	0.077	0.217	0.768
X_8	-55.37	0.016	-0.018	0.217	0.460	0.542

和方差分析, 结果所得方程如下: $Y_1=255.47-30.53 X_1+5.07 X_2+0.210 8 X_3-24.66 X_8+41.39 X_1^2+14.27 X_8^2$, $R_1^2=0.922 5$, $R_{adj1}^2=0.901 4$; $Y_2=0.303 0-0.039 1 X_1-0.010 1 X_2-0.017 6 X_3-0.046 0 X_8+0.041 3 X_1 X_2+0.047 1 X_1^2+0.020 8 X_3^2+0.042 7 X_8^2$, $R_2^2=0.892 0$, $R_{adj2}^2=0.848 8$; $Y_3=-35.29-8.37 X_1-0.014 17 X_2-0.445 0 X_3-0.504 2 X_8+12.25 X_1^2$, $R_3^2=0.917 0$, $R_{adj3}^2=0.899 0$ 。由此可证明模型拟合良好。各方差分析显示药辅比对粒径、PDI 和 ζ 电位影响最大, 根据拟合方程绘制各因素与粒径、PDI 和 ζ 电位的 3D 曲面图 2~4。

根据 Design Expert 12.0 实验设计软件综合评价

表 5 BBD 试验设计及结果 ($n=3$)Table 5 Box-Behnken experimental design and response value ($n=3$)

试验号	X_1	$X_2/\%$	$X_3/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	X_8/MPa	Y_1/nm	Y_2	Y_3/mV	试验号	X_1	$X_2/\%$	$X_3/(\text{r}\cdot\text{min}^{-1})$	X_8/MPa	Y_1/nm	Y_2	Y_3/mV
1	10:1	0.20	1050	60.0	374.6	0.528	-35.03	16	10:1	0.15	100	60.0	290.4	0.276	-36.60
2	6:1	0.20	1050	100.0	262.1	0.365	-39.43	17	10:1	0.15	100	140.0	253.4	0.310	-36.83
3	10:1	0.10	2000	100.0	256.4	0.441	-39.23	18	6:1	0.15	100	100.0	246.9	0.257	-38.07
4	10:1	0.15	1050	100.0	247.7	0.355	-36.67	19	10:1	0.10	100	100.0	245.6	0.313	-37.57
5	10:1	0.15	1050	100.0	249.3	0.340	-39.37	20	22:1	0.15	2000	100.0	320.5	0.381	-31.37
6	10:1	0.15	2000	140.0	225.0	0.401	-36.07	21	10:1	0.20	2000	100.0	272.1	0.336	-35.60
7	10:1	0.10	1050	140.0	257.9	0.429	-34.80	22	22:1	0.10	1050	100.0	260.3	0.271	-34.43
8	10:1	0.15	2000	60.0	305.4	0.302	-36.67	23	6:1	0.15	1050	140.0	233.6	0.357	-37.13
9	10:1	0.20	1050	140.0	244.8	0.418	-31.27	24	22:1	0.15	1050	60.0	306.8	0.366	-30.93
10	6:1	0.10	1050	100.0	260.7	0.499	-43.17	25	10:1	0.15	1050	100.0	274.7	0.309	-38.30
11	10:1	0.20	100	100.0	263.5	0.264	-35.73	26	10:1	0.15	1050	100.0	265.5	0.329	-37.43
12	22:1	0.15	1050	140.0	243.6	0.342	-30.00	27	10:1	0.10	1050	60.0	274.1	0.331	-40.33
13	6:1	0.15	2000	100.0	248.1	0.386	-37.27	28	10:1	0.15	1050	100.0	254.9	0.345	-37.50
14	6:1	0.15	1050	60.0	246.3	0.329	-40.10	29	22:1	0.20	1050	100.0	291.7	0.361	-28.07
15	22:1	0.15	100	100.0	265.1	0.280	-29.67								

后给出的最佳制备条件: PF 与甘草酸的比例为 17.5:1、甘草酸用量为 0.13%、搅拌转速为 470 r/min、高压均质压力为 128.3 MPa。3 批验证试验与模型优选的最佳处方条件, 测得 PG-NP 混悬液的粒径、PDI 和 ζ 电位。

2.6.3 优化处方验证 根据 Design Expert 12.0 实验设计软件综合评价后给出的 PG-NP 混悬液的最佳制备工艺和处方: 药辅比为 17.5:1, 甘草酸用量为 0.13%, 搅拌转速为 470 r/min, 高压均质压力为 128.3 MPa。按照“2.1”项下方法制备最优处方 PG-NP 3 批, 按照“2.2”项方法测定 PG-NP 平均粒径、PDI 和 ζ 电位, 实测值与模型预测值结果见表 6, 可

知实测值和模型预测值比较接近, 说明模型预测性良好。

2.7 固化工艺考察

以 PG-NP 的外观和 RDI 为指标, 考察冻干保护剂甘露醇的用量 (1%、3%、5%、7%), 结果见表 7。随着甘露醇冻干保护剂用量增加, 冻干粉表面逐渐平整, RDI 呈先降低后增大的趋势。当甘露醇用量为 5% 时, PG-NP 为色泽均匀的淡黄色粉末, 质地疏松均一, 无塌陷现象, 且复溶后平均粒径最小, 平均粒径为 $(228.00 \pm 7.80) \text{ nm}$, 重分散性最佳, RDI 为 0.970。因此, 选择 5% 的甘露醇用量作为 PG-NP 混悬液的冻干保护剂。

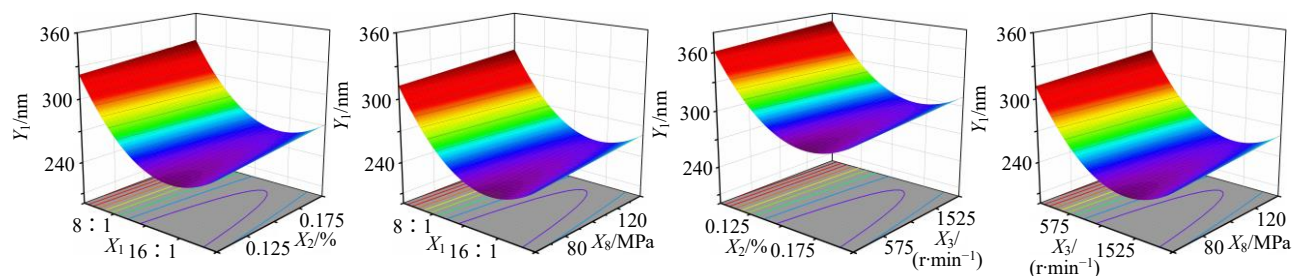


图 2 自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 与因变量 Y_1 的 3D 效应面图

Fig. 2 3D Response surface of independent variables X_1 , X_2 , X_3 and X_4 and dependent variable Y_1

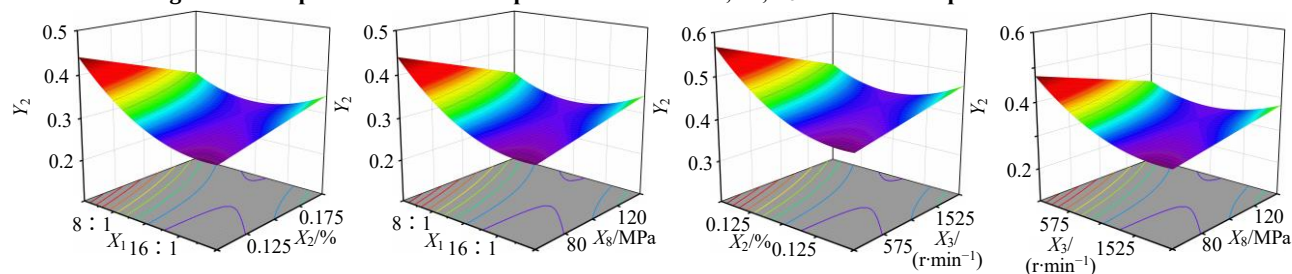


图 3 自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 与因变量 Y_2 的 3D 效应面图

Fig. 3 3D Response surface of independent variables X_1 , X_2 , X_3 and X_4 and dependent variable Y_2

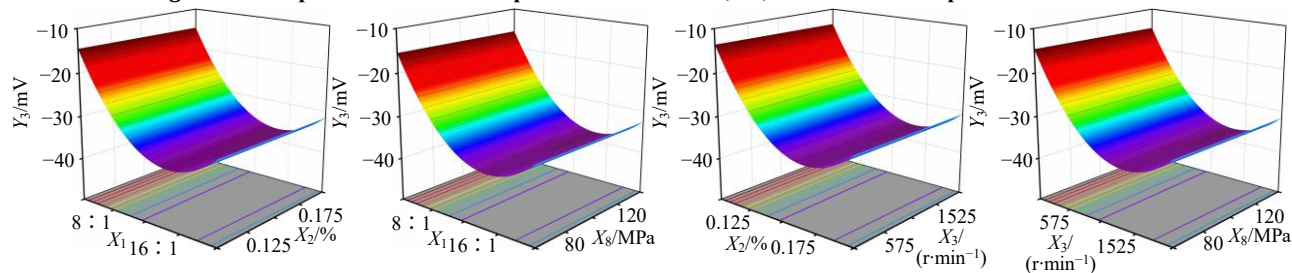


图 4 自变量 X_1 、 X_2 、 X_3 和 X_4 与因变量 Y_3 的 3D 效应面图

Fig. 4 3D Response surface of independent variables X_1 , X_2 , X_3 and X_4 and dependent variable Y_3

表 6 各指标预测值和实测值

Table 6 Predicted and observed response values for each index

优化指标	预测值	实测值	偏差/%
Y_1/nm	235	255	8.5
Y_2	0.300	0.275	-8.3
Y_3/mV	-37.69	-35.26	6.4

偏差=(实测值-预测值)/预测值

deviation = (observed value - predicted value)/predicted value

2.8 PG-NP 质量评价

2.8.1 SEM 观察形态 取适量 PF 原料药和 PG-NP, 黏附于样品池上, 表层减压喷金处理以增加其电导率。在 SEM 下观察两者表面形态和晶体结构。由图 5 可见 PF 原料药大小不均匀, 呈较大的块状。而 PG-NP 在高倍数电镜镜下以不规整的细小片状存在, 粒径大部分分布在 200 nm 左右, 与粒度仪测定结果相吻合。

表 7 冻干保护剂含量的筛选结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Screening result of lyoprotectants content ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

甘露醇/%	外观	粒径/nm	PDI	RDI
1	褶皱薄膜, 不成粉末	385.20 ± 12.07	0.430 ± 0.023	1.630
3	褶皱薄膜, 不成粉末	354.70 ± 11.11	0.360 ± 0.045	1.509
5	质地疏松, 色泽均匀的淡黄色粉末	228.00 ± 7.80	0.290 ± 0.046	0.970
7	质地疏松, 色泽均匀的淡黄色粉末	301.50 ± 9.94	0.300 ± 0.029	1.280

2.8.2 XRD 分析 采用 XRD 分析测试样品 (甘草酸、PF 原料药、PG-NP 冻干粉)。测试条件为 $\text{CuK}\alpha$

作为辐射源衍射 ($r = 0.154 \text{ nm}$), 40 kV, 154 mA, 连续扫描, 扫描速度 $5^\circ/\text{min}$, 间隔 0.1° 。通过不同

晶面发生的衍射现象的强度来绘制衍射图,以得到样品晶体结构和粒度方面的信息。分析结果见图 6, PG-NP 相对于甘草酸的衍射峰和峰强度明显减少,

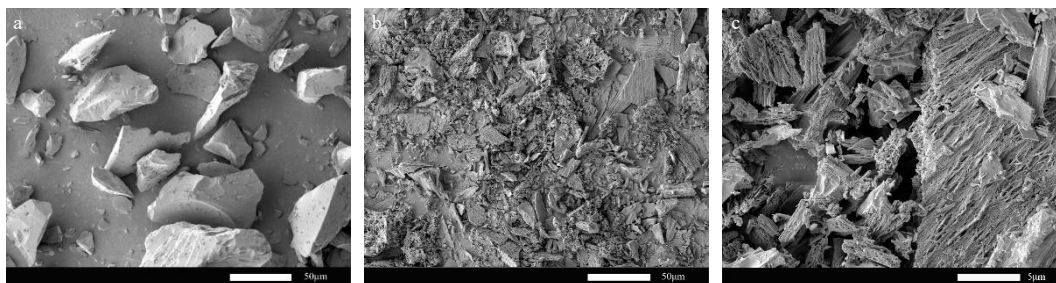


图 5 PF 原料药 (50 μm, a) 和 PG-NP (50 μm, b; 5 μm, c) 的 SEM 图

Fig. 5 SEM photograph of PF raw material (50 μm, a) and PG-NP (50 μm, b; 5 μm, c)

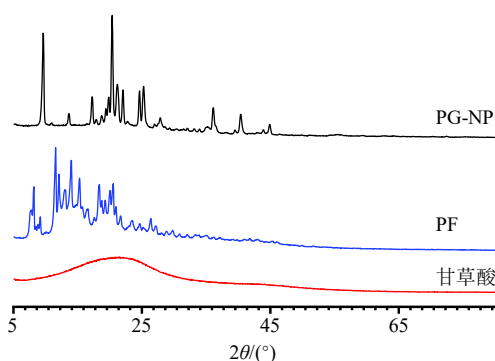


图 6 PG-NP 和 PF 的 XRD 图

Fig. 6 XRD patterns of PG-NP and PF

草酸混合物及 PG-NP 冻干粉进行 DSC 分析。以氧化铝为参比物,在氮气流中,从 30~300 °C,以 10 °C/min 的速率升温扫描,结果见图 7,结果显示 PG-NP 冻干粉在 163.09、167.61 °C 出现明显熔融峰,而 PF 和甘草酸物理混合物未出现熔融峰。据研究表明 161 °C 为甘露醇的熔点峰^[21],PG-NP 的熔点峰相对发生了偏移,可能是制剂冻干后甘露醇结晶状态发生改变。表明 PG-NP 冻干粉中 PF 可能仍以无定形态存在。

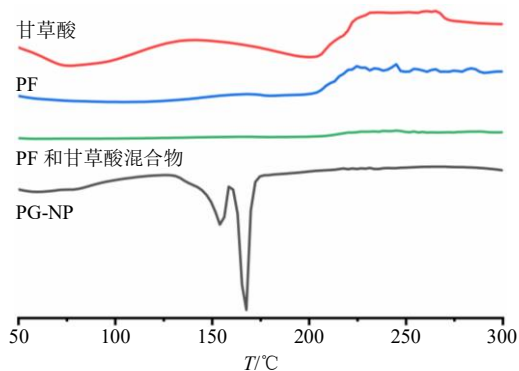


图 7 PG-NP 冻干粉 DSC 分析图谱

Fig. 7 DSC curves of lyophilized powder in PG-NP

结晶度降低,表明在工艺条件下 PF 状态发生明显改变。

2.8.3 DSC 分析 将甘草酸、PF 原料药、PF 和甘

2.9 PG-NP 体外溶出度测定

2.9.1 色谱条件 色谱柱为 Kromasil 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05%醋酸水溶液 (10 : 90), 洗脱程序: 0~20 min, 10%乙腈; 21~30 min, 10%~20%乙腈; 31~40 min, 20%~10%乙腈; 检测波长为 254 nm; 柱温 40 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL。

2.9.2 对照品溶液的制备 精密称取葛根素对照品 2.02 mg, 用 30%乙醇超声溶解置于 10 mL 量瓶, 即得质量浓度为 20.2 μg/mL 的对照品储备液。

2.9.3 供试品溶液的制备 精密称取 PG-NP 冻干粉 3.39 g, 置 50 mL 量瓶中, 加入 30%乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得 67.80 μg/mL 的对照品溶液。

2.9.4 线性关系考察 精密吸取的对照品溶液适量, 用 30%乙醇稀释得质量浓度分别为 4.04、8.08、12.12、20.20、24.24、28.28 μg/mL 的葛根素对照品溶液, 在“2.9.1”项色谱条件下进样分析, 以质量浓度为横坐标 (X), 色谱峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到回归方程 $Y=0.08344X+0.2084$, $R^2=0.9998>0.999$, 结果表明葛根素在 4.04~28.28 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

2.9.5 精密度试验 精密吸取葛根素对照品溶液 6 份, 按“2.9.1”项下的色谱条件进样, 计算葛根素峰面积的 RSD 为 1.28%, 表明仪器精密度良好。

2.9.6 重复性试验 精密称取 PG-NP 冻干粉 0.1 g, 6 份, 按“2.9.3”项下方法制备供试品溶液。在“2.9.1”项下的色谱条件进样, 测得对应峰面积, 得到葛根素质量分数的 RSD 为 0.12%, 表明本法重复性良好。

2.9.7 稳定性试验 取适当质量浓度的供试品溶液, 于制备后 0、1、2、4、8、12 h 分别精密吸取供试品溶液, 注入液相色谱仪分析, 记录葛根素峰面

积,测得其 RSD 为 0.80%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.9.8 加样回收率试验 精密量取已测定葛根素质量分数的 PG-NP 冻干粉 0.05 g, 6 份, 分别精密加入相当量的对照品溶液, 挥干溶剂, 同“2.9.3”项下方法处理, 测定, 计算加样回收率。测得葛根素的平均加样回收率为 100.28%, RSD 为 0.68%。

2.9.9 溶出度测定 取 PG-NP 及 PF 原料药和甘草酸的物理混合物各 500 mg, 各 12 份, 采用《中国药典》2020 年版一部附录 XC 规定的溶出度测定项下第一法桨法, 以 300 mL 水为溶出介质, 温度为 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$, 转速 100 r/min。分别于 5、10、15、20、30、40、50、60 min 取样 1 mL, 同时补充同温度超纯水 1 mL, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 计算葛根素的累积溶出率, 以时间对累积溶出率作图得溶出曲线如图 8 所示, PG-NP 冻干粉的溶出速率较原料药得到明显提高。

PG-NP 冻干粉在 60 min 内药物溶出度达到 90.73%, 60 min 以后 PF 完全释放, 达到平衡状态。图 8 中发现 PG-NP 在前 20 min 的溶出速率已经达到 87.10%, 而原料药的溶出率仅为 74.15%, 由此可见 PG-NP 冻干粉的溶出速度和程度优于原料药和甘草酸的物理混合物 ($P < 0.05$)。

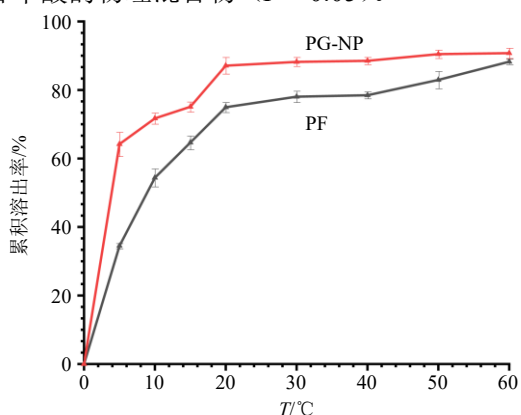


图 8 PF 和 PG-NP 中葛根素体外溶出度曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 8 Dissolution curves of puerarin in PF and PG-NP powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

传统的纳米制备技术如高压均质法、反溶剂沉淀法可能会造成药物混悬液不稳定或者有机物污染。本研究采用的超声破碎法的空化作用使液体产生更多的空化泡^[15], 降低了粒径。但是其制备得到的纳米粒径均匀性较低, 所以组合高压均质机, 基于其射流均匀原理所得的混悬液通过活塞间隙均质

器进行均匀化制备, 在剪切力和空化力作用下促进药物颗粒破碎^[22], 使 PG-NP 混悬液中的粒子更加均匀化且粒径进一步减小。体外溶出试验结果表明, 小粒径的 PG-NP 在 20 min 内的体外溶出率是原料药的 1.16 倍。这主要归功于高压均质-超声破碎过程导致的介质与药物晶体接触的曲率增加^[23]。根据 Noyes-Whitney 方程, 粒径的减小会增加药物粉末相互作用的表面积, 进一步会增加该部分在生物流体中的溶解速率。

甘草酸为天然皂苷类成分, 与传统表面活性剂结构一样具有两亲性, 可与药物作用形成网状结构, 阻止粒子的团聚^[24], 较少量就使 PF 在水溶液中达到稳定的效果。研究表明静电斥力和空间稳定作用参与了甘草酸稳定机制^[25]。同时有研究表明甘草酸进入小肠上皮细胞膜后, 可以通过影响脂质的位置和排列顺序, 增加细胞膜的通透性, 使细胞膜弹性增加和弹性模量分布变窄, 促进药物的细胞内化, 提高药物的口服吸收效率^[26-27]。因此, 甘草酸在纳米粉体中既发挥药物辅料作用, 又具有一定的药理作用潜力, 体现了中药制剂的“药辅合一”理念。通过 SEM、XRD、DSC 的综合分析, 结果表明 PG-NP 外观呈现不规则大小的匀称细小片状, 且 PF 可能以无定形晶体状态存在 PG-NP 中。无定形晶体有利于药物成分的快速溶出, 该结果通过体外溶出实验也得到了证实。

以 QbD 理念指导优化 PG-NP 混悬液的制备模型, 有效提高了 PG-NP 的稳定性及制备工艺工业化生产的可行性, 为后续的制剂工业扩大化开发提供了参考依据, 也为后续的 PG-NP 药物生物利用度与协同增效药理作用研究奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhou Y X, Zhang H, Peng C. Puerarin: A review of pharmacological effects [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(7): 961-975.
- [2] Zhang Y, Yang X, Ge X H, et al. Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726-733.
- [3] Kulczyński B, Gramza-Michałowska A, Suliburska J, et al. Puerarin-an isoflavone with beneficial effects on bone health [J]. *Front Biosci*, 2021, 26(12): 1653-1667.
- [4] 李昕, 潘俊娴, 陈士国, 等. 葛根化学成分及药理作用

- 研究进展 [J]. 中国食品学报, 2017, 17(9): 189-195.
- [5] Li H W, Dong L, Liu Y, *et al.* Biopharmaceutics classification of puerarin and comparison of perfusion approaches in rats [J]. *Int J Pharm*, 2014, 466(1/2): 133-138.
- [6] 黎迎, 宋轶群, 何亚丽, 等. 葛根总黄酮生物黏附漂浮微丸体外 Caco-2 细胞转运和体内生物利用度评价 [J]. 药科学报, 2016, 51(7): 1144-1149.
- [7] 李鹏跃. 基于 MD-MS 技术研究葛根总黄酮及葛根素静脉和鼻腔给药的药动学差异 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [8] 张嘉家, 易荆丽, 周毅生, 等. 葛根总黄酮分散片的药动学研究及其与愈风宁心片的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 107-110.
- [9] 张嘉家. 葛根总黄酮分散片的制备工艺、质量标准及药动学研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2013.
- [10] 朱昆. 葛根总黄酮固体脂质纳米粒的研制 [D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [11] 孙士淋. 葛根总黄酮自微乳制剂吸收机制的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [12] 林文慧. 葛根总黄酮胃肠道生物粘附制剂的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2008.
- [13] Taghipour Y D, Hajialyani M, Naseri R, *et al.* Nanoformulations of natural products for management of metabolic syndrome [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5303-5321.
- [14] Coon J T, Ernst E. *Andrographis paniculata* in the treatment of upper respiratory tract infections: A systematic review of safety and efficacy [J]. *Planta Med*, 2004, 70(4): 293-298.
- [15] He W, Lu Y, Qi J P, *et al.* Food proteins as novel nanosuspension stabilizers for poorly water-soluble drugs [J]. *Int J Pharm*, 2013, 441(1/2): 269-278.
- [16] Kong R P, Zhu X Y, Meteleveva E S, *et al.* Enhanced solubility and bioavailability of simvastatin by mechanochemically obtained complexes [J]. *Int J Pharm*, 2017, 534(1/2): 108-118.
- [17] 刘罗娜, 李小芳, 仲粒, 等. 以甘草酸为稳定剂制备黄芩苷固体纳米晶体 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2057-2064.
- [18] Selyutina O Y, Polyakov N E, Korneev D V, *et al.* Influence of glycyrrhizin on permeability and elasticity of cell membrane: Perspectives for drugs delivery [J]. *Drug Deliv*, 2016, 23(3): 858-865.
- [19] Cunha S, Costa C P, Moreira J N, *et al.* Using the quality by design (QbD) approach to optimize formulations of lipid nanoparticles and nanoemulsions: A review [J]. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 2020, 28: 102206.
- [20] Peterson J J, Lief K. The ICH Q8 definition of design space: A comparison of the overlapping means and the Bayesian predictive approaches [J]. *Stat Biopharm Res*, 2010, 2(2): 249-259.
- [21] 王莉芳, 陈孝男, 李军, 等. 龙血竭酚类提取物纳米混悬剂的制备及体外溶出研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2236-2243.
- [22] Guo Z, Zhang M, Li H, *et al.* Effect of ultrasound on anti-solvent crystallization process [J]. *J Cryst Growth*, 2005, 273(3/4): 555-563.
- [23] Gujar K, Wairkar S. Nanocrystal technology for improving therapeutic efficacy of flavonoids [J]. *Phytomedicine*, 2020, 71: 153240.
- [24] Al-Kassas R, Bansal M, Shaw J. Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs [J]. *J Control Release*, 2017, 260: 202-212.
- [25] Chen Y C, Liu Y, Xu J N, *et al.* A natural triterpenoid saponin as multifunctional stabilizer for drug nanosuspension powder [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2017, 18(7): 2744-2753.
- [26] 杨富恒, 李国锋, 李振东, 等. 基于甘草酸为载体的紫杉醇-甘草酸纳米胶束的构建和口服生物利用度的评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(10): 1040-1044.
- [27] Selyutina O Y, Polyakov N E. Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier-From physicochemical properties to biomedical applications: A modern insight on the ancient drug [J]. *INT J Pharmaceut*, 2019, 559: 271-279.

[责任编辑 郑礼胜]