

Box-Behnken 响应面法优化穿心莲内酯自微乳的制备工艺^Δ

龙凯花^{1*},王春柳²,李 晔^{2#},张 红²,刘 洋²,孙婷婷²,宗时宇²(1.西安培华学院医学院,西安 710125;2.陕西省中医药研究院,西安 710003)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3372-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.14

摘要 目的:优化穿心莲内酯自微乳的制备工艺。方法:以外观、滴入水相中颜色为指标筛选乳化剂、助乳化剂、油相种类;以伪三元相图筛选各基质的用量范围;以粒径、分散指数、平衡溶解度为考察指标,以综合评分为响应值,以乳化剂质量分数、助乳化剂质量分数、油相质量分数为响应因子,采用 Box-Behnken 响应面法优化穿心莲内酯自微乳的制备工艺。结果:优化的穿心莲内酯自微乳制备工艺以聚氧乙烯氢化蓖麻油为乳化剂,二乙二醇单乙基醚为助乳化剂,油酸聚乙二醇甘油酯为油相,三者质量比为 40:59:10。在此工艺条件下制得的自微乳粒径为 (38.15 ± 1.56) nm、分散指数为 0.12 ± 0.01 、平衡溶解度为 (5.97 ± 0.02) mg/mL,与预测值(39.72 nm、0.11、6.04 mg/mL)的相对误差分别为 3.95%、3.54%、1.16%,实测值与预测值一致性良好。结论:优化所得穿心莲内酯自微乳制备工艺稳定、可行,适用于该制剂的制备。
关键词 穿心莲内酯;自微乳;制备工艺;Box-Behnken 响应面法;伪三元相图;粒径;分散指数;平衡溶解度

Optimization of the Preparation Technology of Andrographolide Self-microemulsion by Box-Behnken Response Surface Methodology

LONG Kaihua¹, WANG Chunliu², LI Ye², ZHANG Hong², LIU Yang², SUN Tingting², ZONG Shiyu²(1. School of Medical Science, Xi'an Peihua University, Xi'an 710125, China; 2. Shaanxi Academy of TCM, Xi'an 710003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the preparation technology of Andrographolide self-microemulsion. METHODS: The types of emulsifier, co-emulsifier and oil phase were screened with appearance, color of them in water phase as indexes. The amount range of each matrix was screened by using pseudo-ternary phase diagram. The preparation technology of Andrographolide self-microemulsion was optimized by Box-Behnken response surface technology with particle size, dispersion index and equilibrium solubility as evaluation indexes, comprehensive score as response value, using mass fraction of emulsifier, mass fraction of co-emulsifier and mass fraction of oil phase as response factors. RESULTS: The optimal preparation technology of Andrographolide self-microemulsion included that polyoxyethylene hydrogen sesame oil as emulsifier, diethylene glycol mono ethyl ether as emulsifier, oleic acid polyethylene glycol glyceride as oil phase, with weight ratio of 40:59:10. Under the condition, particle size of obtained self-microemulsion was (38.15 ± 1.56) nm, dispersion index was 0.12 ± 0.01 and equilibrium solubility was (5.97 ± 0.02) mg/mL, relative error of which to predicted value (39.72 nm, 0.11, 6.04 mg/mL) were 3.95%, 3.54%, 1.16%. The measured value was in good agreement with the predicted value. CONCLUSIONS: The optimal Andrographolide self-microemulsion is stable, feasible and suitable for the preparation of the self-microemulsion.
KEYWORDS Andrographolide; Self-microemulsion; Preparation technology; Box-Behnken response surface methodology; Pseudo-ternary phase diagram; Particle size; Dispersion index; Equilibrium solubility

穿心莲内酯(Andrographolide)又名穿心莲乙素,为爵床科植物穿心莲 [*Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees] 全草或叶中的主要有效成分之一,具有散热解毒、消炎止痛的功效,对病毒性痢疾及上呼吸道感染有特殊疗效^[1-3],被誉为“天然抗生素”。但穿心莲内酯存在难溶于水、味极苦、口服生物利用度低、易致呕吐等问题^[4]。

自微乳给药系统(Self-microemulsifying drug deliv-

ery system, SMEDDS)是由油相、乳化剂和助乳化剂组成的均匀、澄清的液体系统。该系统在胃肠道内可通过胃肠道蠕动自发形成粒径小于 100 nm 的水包油(O/W)型乳剂,可作为生物利用度低、难吸收等药物的优良载体,通过增加药物的表面积和溶解度,使药物易于通过胃肠壁水化层传递到吸收部位^[5-7]。为此,本研究采用 Box-Behnken 响应面法优化穿心莲内酯自微乳的制备工艺,旨在为开发其适用于临床的新剂型提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱(HPLC)仪,包括 G1311B 四元泵、G1329B 自动进样器、G1316A 柱温箱、G4212B 二极管阵列检测器、Open LAB 色谱数据工作站(美国 Agi-

^Δ 基金项目:陕西省科技统筹创新工程计划项目(No. 2016KTCL03-14)

* 讲师,硕士。研究方向:中药新型给药系统。电话:029-85680269。E-mail:longkaihua@126.com

通信作者:研究员。研究方向:中药新型给药系统。电话:029-87251837。E-mail:liyelsj@163.com

lent公司);BP211D 型十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius公司);HJ-6 型多头磁力加热搅拌器、SHA-C 型恒温振荡器(常州国华电器有限公司);ZEN3600 型激光粒度仪(英国 Marloven 公司);TGL-16G 型离心机(上海安亭科学仪器厂);FOEA26810D 型超纯水系统(美国 Millipore 公司);KQ-250DE 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

穿心莲内酯原料药(西安天一生物技术有限公司,批号:TYM140216,纯度:98.0%);穿心莲内酯对照品(中国食品药品检定研究院,批号:110797-201108,纯度:98.7%);油酸乙酯(Ethyl oleate,上海飞祥化工厂,批号:20100908);单亚油酸甘油酯(Maisine 35-1,批号:141597)、油酸聚乙二醇甘油酯(Labrafil M 1944 CS,批号:146917)、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol,批号:201006)、聚甘油脂肪酸酯(Plurol® Oleique CC 497,批号:127923)、二乙二醇单乙基醚(Transcutol HP,批号:145177)均由法国嘉法狮公司提供;辛酸癸酸三甘油酯(Crodamol GTCC,批号:126715)、聚氧乙烯氢化蓖麻油(Cremophor RH 40,批号:145179)、聚乙二醇硬脂酸酯(Kolliphor® HS 15,批号:29749816K0)均由德国 BASF 公司提供;油酸(天津津北精细化工有限公司,批号:20100604);肉豆蔻酸异丙酯(IPM,批号:F20100420)、1,2-丙二醇(批号:T20090119)、聚乙二醇(PEG 400,批号:20100729)均由国药集团化学试剂有限公司提供;聚山梨酯 80(大连金州无机化工厂,批号:060307);泊洛沙姆 188(Lutrol® F 68,北京礼精求商贸有限公司,批号:WP5E587E);水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 自微乳的制备

精密称取穿心莲内酯原料药、乳化剂及助乳化剂适量,置于锥形瓶中,于 37℃ 水浴中溶解,振荡混匀;加入油相,于 37℃ 水浴中振荡混匀,制得穿心莲内酯自微乳。另精密称取乳化剂及助乳化剂适量,置于锥形瓶中,于 37℃ 水浴中溶解,振荡混匀;加入油相,于 37℃ 水浴中振荡混匀,制得空白自微乳。

2.2 处方的筛选

2.2.1 基质种类的筛选 通过前期穿心莲内酯的不同乳化剂、助乳化剂及油相的溶解度试验^[8],初步筛选出基质种类配伍组合,并按“2.1”项下方法制备穿心莲内酯自微乳,以外观、滴入水相中颜色为评价指标,进一步筛选基质结果,结果见表 1。

由表 1 可知,处方 3 的基质种类配伍较为理想,即油相为油酸聚乙二醇甘油酯,乳化剂为聚氧乙烯氢化蓖麻油,助乳化剂为二乙二醇单乙基醚,此时所得的自微乳外观澄清、透明,滴入水相中呈现出微泛淡蓝色乳光。

2.2.2 基质用量范围的筛选 将乳化剂与助乳化剂按不同质量比(1:2、2:3、1:1、3:2、2:1)振荡混匀后,与油相按不同质量比(1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、

表 1 不同基质种类筛选结果

Tab 1 Type screening of different matrix

处方编号	油相	乳化剂	助乳化剂	外观	滴入水相中颜色
1	单亚油酸甘油酯	辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯	二乙二醇单乙基醚	澄清、淡黄	乳白色
2	单亚油酸甘油酯	聚山梨酯 80	二乙二醇单乙基醚	澄清、淡黄	乳白色
3	油酸聚乙二醇甘油酯	聚氧乙烯氢化蓖麻油	二乙二醇单乙基醚	澄清、透明	微泛淡蓝色乳光
4	油酸聚乙二醇甘油酯	辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯	二乙二醇单乙基醚	澄清、透明	乳白色
5	油酸聚乙二醇甘油酯	聚山梨酯 80	二乙二醇单乙基醚	澄清、淡黄	乳白色

9:1)振荡混匀,滴入水相中。以乳化剂与助乳化剂、油相和水相分别为一条边,绘制伪三元相图,通过外观(是否澄清、透明)和体外乳化试验(加入水相中是否澄清、透明或是否微泛淡蓝色乳光),确定可形成的自微乳区界限,绘制穿心莲内酯自微乳区域,详见图 1(图中, K_m 为乳化剂与助乳化剂质量比,A 为自微乳区域)。

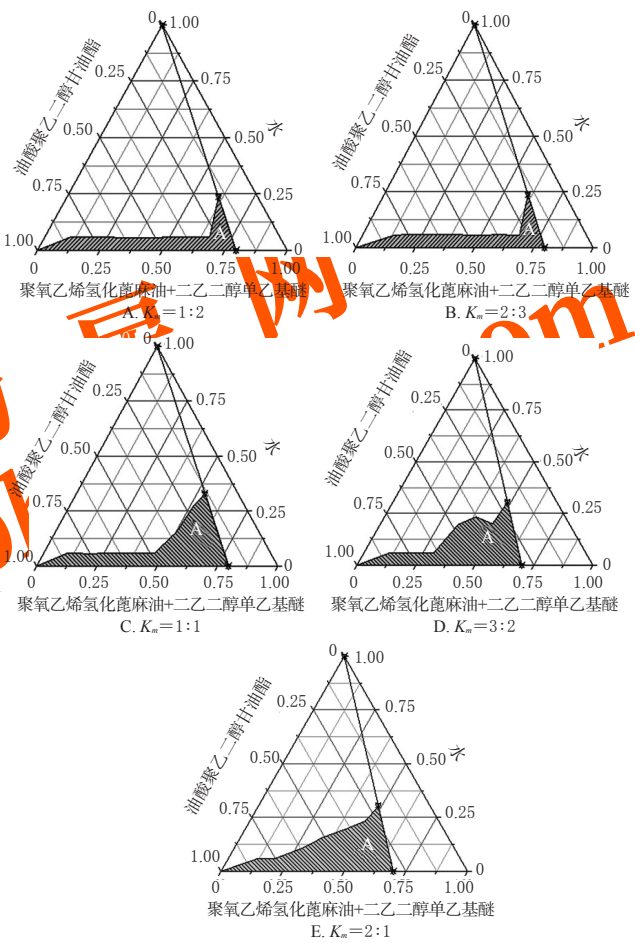


图 1 乳化剂与助乳化剂不同质量比的伪三元相图
Fig 1 Pseudo-ternary phase diagram of emulsifier and co-emulsifier with different weight ratio

由图 1 可知, K_m 无论取哪个比例,所得的自微乳均澄清、透明,且滴入水相中均呈现出微泛淡蓝色乳光,同时穿心莲内酯自微乳区域可随 K_m 的增加而增大,故确定 K_m 范围为 1:2~2:1。

2.3 响应面法的考察指标

2.3.1 粒径(Y_1) 按“2.1”项下方法制备不同处方的穿心莲内酯自微乳,加水稀释 50 倍,采用激光粒度仪测定 Y_1 。 Y_1 越小表示穿心莲内酯自微乳越稳定。

2.3.2 分散指数(Y_2) 按“2.1”项下方法制备不同处方的穿心莲内酯自微乳,加水稀释50倍,采用激光粒度仪测定 Y_2 。 Y_2 越小表示穿心莲内酯自微乳分子量分布越均匀。

2.3.3 平衡溶解度(Y_3) 将过量穿心莲内酯分别加入按“2.1”项下方法制备的不同处方的空白自微乳中,密封超声(功率:200 W,频率:40 kHz)处理30 min,置于37℃水浴中振荡24 h平衡;4 000 r/min离心15 min,取上清液,加水稀释10倍,采用HPLC法测定 Y_3 。 Y_3 越大表示穿心莲内酯自微乳载药量越大。

2.3.4 综合评分(OD) $OD=(Y_1/Y_{1max})\times 20\%+(Y_2/Y_{2max})\times 20\%+(Y_3/Y_{3max})\times 60\%$ ^[9]。

2.4 响应面法优化制备工艺

2.4.1 试验设计与结果及建模 采用Box-Behnken响应面法,以乳化剂质量分数(A)、助乳化剂质量分数(B)、油相质量分数(C)3个因素为响应因子,以 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 为考察指标,以OD为响应值,采用3因素3水平设计试验,每个水平平行试验3次求其平均值^[10]。因素与水平见表2,试验方案与结果见表3。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels			
水平	因素		
	A, %	B, %	C, %
-1	30	30	10
0	45	45	15
1	60	60	20

表3 试验方案与结果
Tab 3 Trial plan and results

试验号	A	B	C	Y_1 , nm	Y_2 , mg/mL	OD, 分
1	1	0	1	19.29	0.07	5.55
2	0	0	0	21.23	0.11	5.09
3	-1	0	1	134.99	0.30	5.07
4	0	1	-1	28.88	0.09	5.78
5	0	0	0	21.10	0.11	5.63
6	0	-1	1	76.45	0.10	4.07
7	0	1	1	38.15	0.17	5.93
8	-1	0	-1	75.94	0.15	6.26
9	0	0	0	19.95	0.09	5.03
10	-1	-1	0	118.20	0.28	5.26
11	0	-1	-1	24.61	0.10	5.52
12	1	-1	0	24.47	0.10	4.40
13	-1	1	0	98.24	0.37	6.25
14	0	0	0	19.93	0.11	5.10
15	1	0	-1	22.37	0.08	5.87
16	0	0	0	22.15	0.18	5.42
17	1	1	0	17.93	0.19	6.34

采用Design-Expert 8.0.6软件对表2的试验数据进行多元线性回归和二次多项式拟合回归。结果,多元线性回归模型为 $OD=0.67-0.12A+0.065B+0.003\ 893C+0.027AB-0.024AC+0.032BC$ ($r=0.656\ 9$), r 值较小,表明各变量间线性相关性较差,模型拟合度不佳、预测性较差。二次多项式拟合回归模型为 $OD=0.59-0.12A+0.065B+0.003\ 893C+0.027AB-0.024AC+0.032BC+0.12A^2+0.035B^2-0.000\ 145\ 4C^2$ ($r=0.955\ 7$), $r>0.09$,提示模型拟合度较好、预测性较好。对该模型进行方差分

析,结果见表4。

表4 方差分析结果

Tab 4 Results of variance analysis					
误差来源	离均差平方和	自由度	均方差	F	P
A	0.11	1	0.11	74.40	<0.000 1
B	0.03	1	0.03	22.90	0.002 0
C	1.21×10^{-4}	1	1.21×10^{-4}	0.08	0.78
AB	2.94×10^{-3}	1	2.94×10^{-3}	2.00	0.20
AC	2.37×10^{-3}	1	2.37×10^{-3}	1.62	0.24
BC	4.09×10^{-3}	1	4.09×10^{-3}	2.80	0.14
A ²	0.06	1	0.06	42.08	0.000 3
B ²	5.15×10^{-3}	1	5.15×10^{-3}	3.51	0.10
C ²	8.90×10^{-8}	1	8.90×10^{-8}	6.08×10^{-5}	0.99
模型	0.22	9	0.025	16.78	0.000 6
残差	0.010	7	1.464×10^{-3}		
失拟项	4.512×10^{-3}	3	1.504×10^{-3}	1.05	0.462 8
净误差	5.739×10^{-3}	4	1.435×10^{-3}		
总和	0.23	16			

由表4可知,所建模型经检验具有显著性($P=0.000\ 6$),说明模型与实际情况吻合良好;模型失拟项检验不具有显著性($P=0.462\ 8$),说明未知因素对模型拟合结果干扰小,模型误差较小。

2.4.2 各因素交互作用分析 采用Design-Expert 8.0.6软件,分别以乳化剂质量分数(A)、助乳化剂质量分数(B)、油相质量分数(C)为响应因子,以OD为响应值,绘制响应面和等高线图,详见图2。

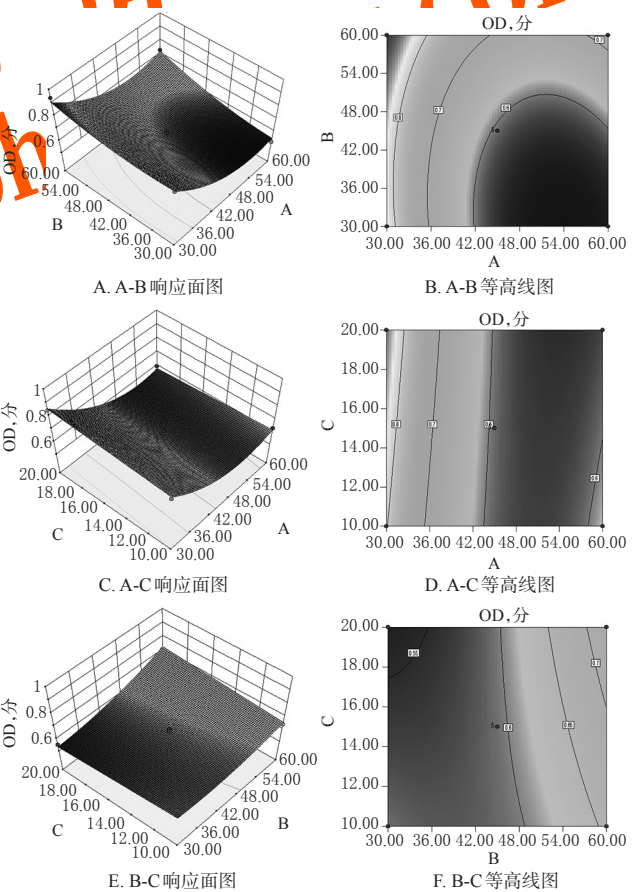


图2 各因素对OD影响的响应面和等高线图
Fig 2 Response surface and contour map of the effects of each factor on the comprehensive score

由图2可知,因素A与B、因素A与C、因素B与C的交互作用均显著。图2A、B提示,OD在因素A与B的交互作用下,随二者的增大而出现先减小后增大的趋势;图2C、D提示,OD在因素A与C的交互作用下,随二者的增大也出现先减小后增大的趋势;图2E、F提示,OD在因素B与C的交互作用下,随二者的增大而增大。

2.4.3 最优制备工艺的确定 基于Design-Expert 8.0.6软件对所建模型进行参数最优分析,得最优制备工艺为:聚氧乙烯氢化蓖麻油(乳化剂)、二乙二醇单乙基醚(助乳化剂)、油酸聚乙二醇甘油酯(油相)的质量比为40.53:59.51:10。考虑到实际操作的可行性,确定质量比为40:59:10。

2.4.4 验证试验 对上述最优制备工艺进行验证,平行制备穿心莲内酯自微乳3批,对其相关指标进行测定,结果见表5、图3、图4。由表5、图3、图4可知,按上述工艺制备的穿心莲内酯自微乳粒径、分散指数、平衡溶解度实测值与预测值的一致性良好,Zeta电位平均值为-27.15 mV,表明优化所得的穿心莲内酯自微乳制备工艺稳定、可行。

表5 最优制备工艺验证结果

Tab 5 Verification results of optimal preparation technology

指标	预测值	实测值	相对误差, %
粒径, nm	39.72	38.15±1.56	3.95
分散指数	0.11	0.12±0.01	3.54
平衡溶解度, mg/mL	6.04	5.97±0.02	1.16

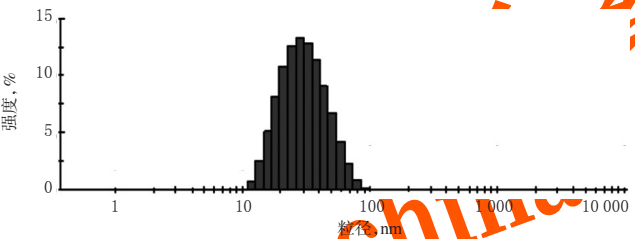


图3 粒径分布

Fig 3 Distribution of particle size

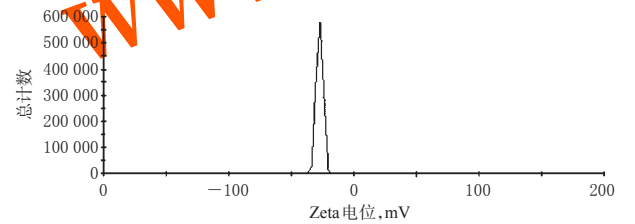


图4 Zeta电位分布

Fig 4 Distribution of Zeta potential

3 讨论

本研究选择聚氧乙烯氢化蓖麻油为乳化剂,其亲水疏水平衡值为14~16,乳化能力强;同时,聚氧乙烯氢化蓖麻油能抑制P糖蛋白的“药物溢出泵”作用,可提高口服药物的吸收率^[11]。以外观、滴入水相中颜色为指标,筛选乳化剂、助乳化剂和油相种类;在溶解度试验的基础上,根据所确定的乳化剂、助乳化剂和油相组方绘制

伪三元相图,该图仅能筛选各基质的用量范围,并不能确定具体的用量值。而采用Box-Behnken响应面法可进一步根据限定的用量范围,来确定乳化剂、助乳化剂、油相的具体用量。该法能避免人为取点的干扰,与正交设计法和均匀设计法相比,该法可选择多种线性或非线性模型,以寻求最优工艺参数,使优化后的工艺更稳定^[12]。

本研究优化后的最佳制备工艺为:乳化剂为聚氧乙烯氢化蓖麻油,助乳化剂为二乙二醇单乙基醚,油相为油酸聚乙二醇甘油酯,三者质量比为40:59:10。按优化工艺制备所得穿心莲内酯自微乳的粒径为(38.15±1.56)nm,粒径小、易吸收。

综上所述,本研究优化所得穿心莲内酯自微乳制备工艺稳定、可行,适用于该制剂的制备。

参考文献

[1] AROMDEE C. Modifications of andrographolide to increase some biological activities: a patent review (2006-2011) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2012, 22 (2) : 160-169.

[2] LIM JC, CHAN TK, NG DS, et al. Andrographolide and its analogues: versatile bioactive molecules for combating inflammation and cancer [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39 (3) : 300-312.

[3] 骆瑜,邱慧,汪保林. 穿心莲内酯衍生物的合成研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42 (20) : 3847-3859.

[4] 唐涛,臧巧真,龙凯花,等. 壳聚糖修饰的载穿心莲内酯介孔二氧化硅纳米粒的制备及其pH响应性释药性能考察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21 (24) : 14-17.

[5] 欧晓霞,汪征明,封亮,等. 熊果酸自微乳的制备及其生物利用度 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18 (1) : 36-39.

[6] 赵晓旭,李江英,崔艳堂,等. 丹参酮Ⅱ_A自微乳制剂的体外释放和在体肠吸收评价 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27 (8) : 2189-2191.

[7] 李蔚,王春洪. 自微乳及其在中药制剂中的应用 [J]. *中国药业*, 2012, 21 (6) : 94-96.

[8] 龙凯花,王春柳,臧巧真,等. 穿心莲内酯油水分布系数和溶解度的测定 [J]. *陕西中医*, 2015, 36 (3) : 347-348.

[9] 李颖,纪莎,高锦娟,等. 星点设计-效应面法优化复方巴戟天生骨颗粒提取工艺 [J]. *中药材*, 2014, 37 (10) : 1863-1867.

[10] 鞠建峰,朱宗敏,杜忠科,等. 星点设计-效应面法优化重楼皂苷类成分的提取工艺 [J]. *中国药房*, 2015, 26 (28) : 3967-3969.

[11] REGE BD, KAO JP, POLLI JE, et al. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2002, 16 (4/5) : 237-246.

[12] 孙艺丹,赵青,王锐利,等. 正交设计联用星点设计-效应面法优化蒿甲醚长循环纳米结构脂质载体处方 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2015, 32 (1) : 7-13.

(收稿日期:2018-07-03 修回日期:2018-10-19)

(编辑:陈 宏)