

• 制剂与炮制 •

姜黄素过饱和自纳米乳的制备与体外质量评价

陈绪龙, 梁新丽, 丁海波, 赖章婷, 袁其里, 林霞, 廖正根*

(江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004)

[摘要] 为提高姜黄素自纳米乳(CUR-SNEDDS)中药物分散过饱和度和维持时间,引入沉淀抑制剂(PPIs),制备姜黄素过饱和自纳米乳(CUR-SSNEDDS)。通过溶解度试验、油相和表面活性剂的配伍变化、表面活性剂乳化能力的考察以及伪三元相图的绘制,筛选出CUR-SNEDDS处方组成,采用层次分析法结合星点设计-响应面法优化处方。以维持姜黄素(CUR)在人工胃肠液中的过饱和浓度和持续时间筛选沉淀抑制剂(PPIs)类型及用量,同时采用偏光显微镜评估结晶抑制效果,并对CUR-SSNEDDS质量及体外释放行为进行评价。所制备的CUR-SSNEDDS处方为丙二醇单辛酸酯(capryol 90)-聚氧乙烯氢化蓖麻油(kolliphor RH40)-二乙二醇单乙基醚(transcutol HP)-聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物(Soluplus)(7.93:66.71:25.36:5),载药量为 $(65.12 \pm 1.25) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,形成的纳米乳黄色透明,乳滴呈圆球形且分布均匀,乳化时间为 $(21.02 \pm 0.13) \text{ s}$,平均粒径为 $(57.03 \pm 0.35) \text{ nm}$,多分散指数(PDI)为 (0.23 ± 0.01) ,Zeta电位为 $(-18.10 \pm 1.30) \text{ mV}$,CUR-SSNEDDS体外稀释后显著抑制结晶的形成与生长,过饱和度在2 h内可维持在10以上,在人工胃肠液中CUR溶出的速度和程度均显著提高。Soluplus可有效维持过CUR过饱和状态,增强CUR体外溶出。

[关键词] 姜黄素; 过饱和自纳米乳; 人工胃肠液; 载药量; 过饱和度

Preparation and *in vitro* quality evaluation of curcumin supersaturated self-nanoemulsion

CHEN Xu-long, LIANG Xin-li, DING Hai-bo, LAI Zhang-ting, YUAN Qi-li, LIN Xia, LIAO Zheng-gen*

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education,

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] In order to improve the supersaturation and maintenance time of drug dispersion in curcumin self-nanoemulsion (CUR-SNEDDS), precipitation inhibitors (PPIs) were introduced to prepare curcumin supersaturated self-emulsion (CUR-SSNEDDS). The composition of CUR-SNEDDS prescriptions was selected through the solubility test, the compatibility of oil phase and surfactant, the investigation of the emulsifying ability of the surfactant and the drawing of the pseudo-ternary phase diagram. Analytic hierarchy process was used in combination with central composite design-response surface method to optimize the prescription. The type and dosage of precipitation inhibitors (PPIs) were selected to maintain the supersaturated concentration and duration of CUR in artificial gastrointestinal fluids. At the same time, polarizing microscope was used to evaluate the crystallization inhibition effect and the quality and *in vitro* release behavior of CUR-SSNEDDS. The prepared CUR-SSNEDDS prescription was capryol 90-kolliphor RH40-transcutol HP-Soluplus (7.93:66.71:25.36:5), with the drug loading of $(65.12 \pm 1.25) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. CUR-SSNEDDS was transparent yellow, and the nanoemulsion droplets were spherical with uniform distribution. The emulsification time was $(21.02 \pm 0.13) \text{ s}$, the average particle size was $(57.03 \pm 0.35) \text{ nm}$, the polydispersity index (PDI) was (0.23 ± 0.01) , and the Zeta potential was $(-18.10 \pm 1.30) \text{ mV}$. CUR-SSNEDDS significantly inhibited the generation and growth of crystals after *in vitro* dilution. The supersaturation could be maintained above 10 within 2 h, and the dissolution rate and degree of CUR in artificial gastrointestinal fluid were significantly increased. Soluplus could effectively

[收稿日期] 2020-04-24

[基金项目] 江西省一流学科项目(JXSYLXK-ZHYA0059);江西省卫生计生委科技计划项目(20181140)

[通信作者] *廖正根 教授,博士生导师,主要从事中药新剂型与新技术的研究, Tel: (0791) 87119011, E-mail: lyzlyg@163.com

[作者简介] 陈绪龙, 博士研究生, E-mail: cxl_0517@163.com

maintain the supersaturated state of CUR and enhance CUR dissolution *in vitro*.

[Key words] curcumin; supersaturated self-nanoemulsion; artificial gastrointestinal fluid; drug loading; supersaturation

doi: 10.19540/j.cnki.cjmm.20200523.305

自纳米乳给药系统(self-nano emulsifying drug delivery systems, SNEDDS)是由油相、表面活性剂和助表面活性剂组成的各向同性且热力学稳定的混合体系,在胃肠道的蠕动下自发形成粒径小于100 nm的O/W型微乳^[1]。SNEDDS在胃肠道中形成高于药物平衡溶解度的过饱和溶液,提高了水难溶性药物在体内的活度,从而促进吸收,但乳化后形成化学势高于晶体平衡态溶解度的溶液易产生沉淀,现已有沉淀抑制剂(PPIs)的研究报道^[2],发现沉淀抑制剂可能通过形成药物-聚合物氢键、表面活性剂、增加溶液黏度等作用维持药物的过饱和。

姜黄素(curcumin, CUR)是从姜黄、郁金和莪术等根茎中提取出来的一种多酚类化合物^[3-4],具有抗氧化、抗肿瘤和抗炎等多种药理作用^[5-8]。CUR水溶性差^[9],渗透性低,属于BCS IV类^[10]化合物,已有文献优选了CUR-SNEDDS处方并证明SNEDDS处方能够显著提高其溶解度和生物利用度^[11-14]。但因载药量是限制SNEDDS广泛应用的一个限制因素,因此本研究首先在不同于文献报道的处方筛选方法及过饱和和沉淀抑制剂研究,采用层次分析法结合星点设计-响应面法,综合评价指标优选CUR-SSNEDDS处方,以期增大其载药量和稳定性,再以模拟人工胃肠液作为分散体系研究沉淀抑制剂对CUR-SSNEDDS维持分散过饱和的影响。

1 材料

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); Malvern 纳米粒度仪(英国马尔文公司); 电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司); SIGMA3-18K 高速冷冻离心机(德国SIGMA公司); FEI Tecnai™ G Spirit TEM 120KV 型透射电子显微镜(美国Fei公司); 明美 Mshot MS60 偏振光显微镜(广州市明美光电技术有限公司); ZRS-8G 智能溶出仪(天津天大天发科技有限公司); 85-2A 双数恒温磁力搅拌器(金坛市城东新瑞仪器厂)。

CUR(批号JHS20180328,西安昊轩生物科技有限公司,纯度96.18%); CUR对照品(批号AF7111708,成都埃法生物科技有限公司,纯度99.91%); 聚氧乙烯蓖麻油(cremophor EL)、聚山梨酯20(tween 20)、聚山梨酯80(tween 80)(上海源叶

生物科技有限公司); 蓖麻油(castor oil,铁岭北亚药用油有限公司); 辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(labrasol)、油酸聚乙二醇甘油酯(labrafil M1944 CS)、单亚油酸甘油酯(maisine-35-1)、丙二醇单辛酸酯(capryol 90)、二乙二醇单乙基醚(transcutol HP)、聚氧乙烯氢化蓖麻油(kolliphor RH40)、月桂酸聚乙二醇甘油酯(gelucire 44/14)(法国嘉法赛公司); 聚乙烯己内酰胺-聚醋酸乙烯酯-聚乙二醇接枝共聚物(Soluplus,巴斯夫中国有限公司); 聚乙烯吡咯烷酮K30(PVP K30)、羟丙基β环糊精(HP-β-CD)、十二烷基硫酸钠(SDS,美仑生物有限公司); 聚乙二醇4000(PEG4000,天津市光复精细化工研究所); 丙烯酸树脂(Eudragit L 100-55,德国罗姆公司); 氯化钠(国药集团化学试剂有限公司); 牛黄胆酸钠、胃蛋白酶、鸡蛋卵磷脂、马来酸(北京索莱宝科技有限公司); 聚乙二醇400(PEG400)、丙二醇(西陇科学股份有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯,德国默克公司); 水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 CUR含量测定方法

色谱条件为Phenomenex Luna 色谱柱 C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.5%醋酸(58:42),等度洗脱; 流速1.0 mL·min⁻¹; 柱温30 °C; 进样量5 μL; 检测波长430 nm。姜黄素质量浓度(x)在11.28~225.60 μg·mL⁻¹与姜黄素峰面积(y)呈良好线性关系,回归方程为 $y = 42.311x - 13.19$ ($r = 0.9999$)。精密度与重复性试验考察RSD均小于2.0%,加样回收率为96.73%。

2.2 人工胃液(FaSSGF)和人工肠液(FaSSIF)的制备

配置方法同文献[15],FaSSGF: 牛黄胆酸钠 80 μmol·L⁻¹,鸡蛋卵磷脂 20 μmol·L⁻¹,氯化钠 34.2 mmol·L⁻¹,胃蛋白酶 0.1 mg·mL⁻¹,盐酸调pH至1.6; FaSSIF: 牛黄胆酸钠 3 mmol·L⁻¹,鸡蛋卵磷脂 200 μmol·L⁻¹,氯化钠 68.62 mmol·L⁻¹,马来酸 19.12 mmol·L⁻¹,氢氧化钠调pH至6.5。

2.3 平衡溶解度测定

将过量姜黄素原料药分别加入到装有2 mL油相、表面活性剂及助表面活性剂的离心管中,涡旋分散后,在37 °C水浴中振荡平衡48 h,14 000 r·min⁻¹,

离心 15 min 取上清液用甲醇稀释至适当质量浓度,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取滤液进行色谱含量测定,计算姜黄素在各辅料中的溶解度,结果见图 1。根据结果,初步确定油相为 capryol 90, labrafil M1944 CS, 助表面活性剂为 transcutool HP, PEG400。不同表面活性剂对 CUR 在溶解度差异较小,但乳化效果却较大,因此需通过乳化效果进一步确定。

2.4 油相和表面活性剂的配伍变化

将油相与表面活性剂按质量比 4:6 的比例超声并混匀后观察其分散情况,以 1:100 的比例缓慢加水乳化,形成的分散液用紫外分光光度计在 600 nm 处测定透光率(T),并观察乳化后溶液的澄清度,见表 1,可见 capryol 90, labrafil M1944 CS 与不同的表面活性剂所形成的自乳化情况较好,乳化后的分散液透光率大于其他组合。

表 1 不同油相与表面活性剂配伍变化

Table 1 Compatibility experiment of different oil phase and surfactant

油相	指标	表面活性剂					
		cremophor EL	kolliphor RH40	labrasol	tween 20	tween 80	gelucire 44/14
capryol 90	T	62.23	88.31	0.19	0.87	0.53	87.7
	外观	泛蓝光	澄清	乳白色	乳白色	乳白色	澄清
maisine-35-1	T	26.67	56.89	0.07	1.21	0.52	0.51
	外观	泛蓝光	泛蓝光	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色
castor oil	T	39.72	59.98	0.13	1.39	0.08	0.72
	外观	泛蓝光	泛蓝光	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色
labrafil M1944 CS	T	87.9	81.85	12.76	1.27	1.91	0.06
	外观	澄清	泛蓝光	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色

2.5 表面活性剂的筛选

以 capryol 90 为油相, transcutool HP 为助表面活性剂,表面活性剂与助表面活性剂质量比(K_m)为 1:1,将油相与混合表面活性剂分别按不同的 K_m 混合均匀,以 1:100 的比例加入至 100 mL 预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的双蒸水中,100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 磁力搅拌,观察 6 种表面活性剂的乳化能力,见表 2,可见 kolliphor RH40 和 cremophor EL 的乳化能力均较好。

2.6 伪三元相图

将表面活性剂与助表面活性剂按 K_m 1:9~9:1 混匀后,再与油相按 1:9~9:1 涡旋混匀。以 1:100 的比例加入至 100 mL 预热至 37 $^{\circ}\text{C}$ 的双蒸水中,100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 磁力搅拌,形成的分散液用紫外分光光度计在 600 nm 处测定透光率。体系不分层且透光率大于 10% 的处方,在其对应的三元坐标上标记,

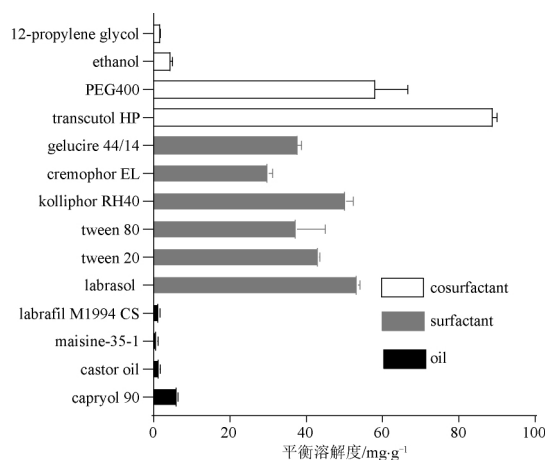


图 1 姜黄素在不同辅料中平衡溶解度($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig.1 Solubility of curcumin (CUR) in different excipients ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

表 2 不同表面活性剂乳化能力考察

Table 2 Emulsifying ability of different emulsifiers

表面活性剂	指标	混合表面活性剂与油相质量比			
		9:1	8:2	7:3	6:4
gelucire 44/14	T	99.77	58.34	1.08	0.18
	外观	澄清	泛蓝	乳白色	乳白色
labrasol	T	0.49	1.97	1.02	2.54
	外观	乳白色	乳白色	乳白色	乳白色
tween 20	T	100.23	100.69	0.31	0.45
	外观	澄清	澄清	乳白色	乳白色
tween 80	T	100.69	100.69	0.98	0.19
	外观	澄清	澄清	乳白色	乳白色
kolliphor RH40	T	100.69	100.46	99.31	90.78
	外观	澄清	澄清	泛蓝	泛蓝
cremophor EL	T	100.69	99.08	82.6	51.52
	外观	澄清	澄清	泛蓝	泛蓝

所有标记的点组成微乳区。将结果导入 Origin 8.0

中绘制伪三元相图, 见图 2。由伪三元相图结果可知 乳化区域大小为 A>B>C>D>E>F。因此选择

capryol 90 为油相、kolliphor RH40 为表面活性剂、transcutol HP 为助表面活性剂。

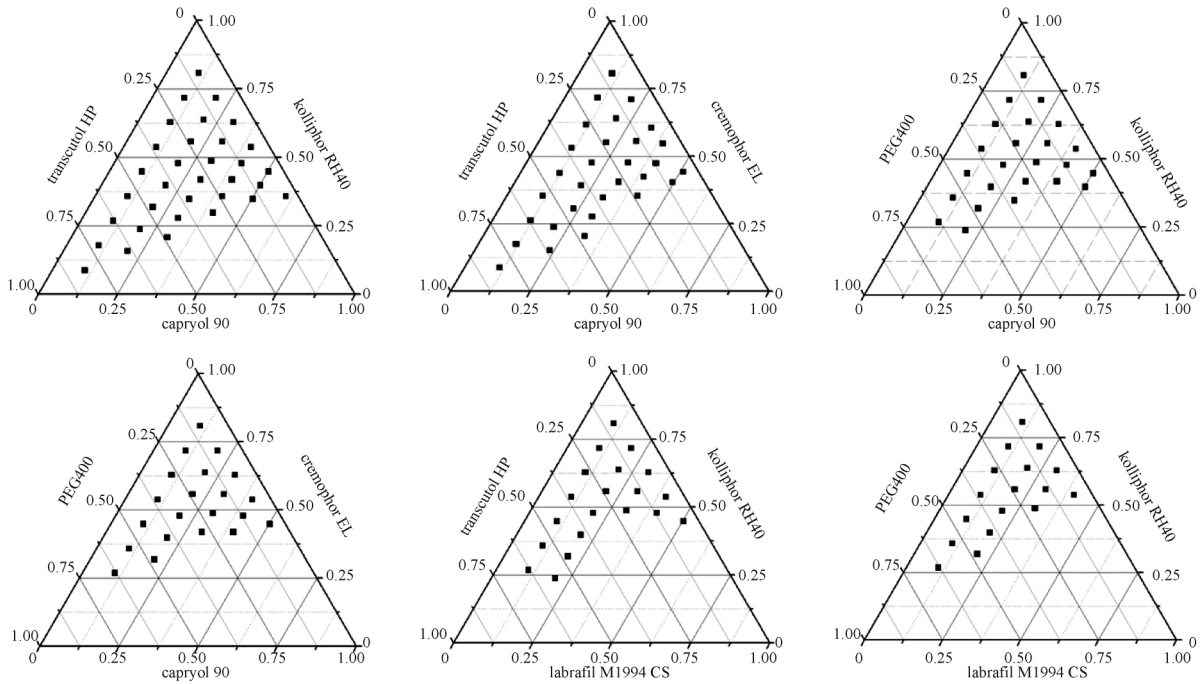


图 2 空白自纳米乳伪三元相图

Fig.2 Ternary phase diagrams of blank SNEDDS

2.7 CUR-SNEDSS 处方优化

2.7.1 层次分析法确定权重 根据影响自纳米乳处方质量因素的重要性, 将 6 个指标分为 5 个层次, 并拟定各指标的优先顺序为平衡溶解度 (X_1) > AUC (X_2) > 粒径 (X_3) > PDI (X_4) = 乳化时间 (X_5) > Zeta 电

位 (X_6) 构建成对比较的判别优先矩阵, 见表 3。根据表 3 的评分结果, 层次分析法计算得到的各指标权重系数见表 3, 一致性比例因子 (CR) = 0.011 4 < 0.10, 即指标优先比较判断矩阵具有满意的一致性, 权重系数有效。

表 3 指标成对比较的优先判断矩阵

Table 3 Priority judgment matrix for paired comparison of indicators

权重指标	平衡溶解度	AUC	平均粒径	PDI	乳化时间	Zeta 电位	权重
平衡溶解度	1	2	3	4	4	5	0.376 7
AUC	1/2	1	2	3	3	4	0.343 1
平均粒径	1/3	1/2	1	2	2	3	0.150 1
PDI	1/4	1/3	1/2	1	1	2	0.088
乳化时间	1/4	1/3	1/2	1	1	2	0.088
Zeta 电位	1/5	1/4	1/3	1/2	1/2	1	0.054 1

各指标按下列方式归一化处理: 平衡溶解度 = X_1 / 最大平衡溶解度; AUC = X_2 / 最大 AUC; 粒径 = $(200 - X_3) / 200$; PDI = $(1 - X_4) / 1$; 乳化时间 = $(60 - X_5) / 60$; 电位 (X_6) = X_6 绝对值 / 最大电位绝对值。各载药处方的综合评分为各指标的归一化值乘以权

重系数的总合。

2.7.2 评判指标的测定 将制备好的 CUR-SNEDDS 处方以 1:100 分散于预热至 37 °C 的双蒸水中, 搅拌桨转速 100 $r \cdot \min^{-1}$, 分别于 5, 15, 30, 45, 60 min 取样 1 mL, 0.22 μm 滤膜滤过, 续滤液用甲

醇稀释适宜倍数, HPLC 进样检测, Graphpad prism 6 软件绘制时间-浓度曲线, 梯形法计算质量浓度-时间曲线下面积(AUC); 采用马尔文纳米粒度仪测定上述分散液的粒径、PDI 及 Zeta 电位; 采用秒表记录 CUR-SNEDDS 分散完全的时间。

2.7.3 星点试验设计及结果 根据综合评价指标对 CUR-SNEDDS 质量的影响, 确定综合评分(Y) = $X_1 \times 0.3767 / \text{平衡溶解度最大值} + X_2 \times 0.3431 / \text{AUC 最大值} + (200 - X_3) \times 0.1501 / 200 + (1 - X_4) \times 0.0880 / 1 + (60 - X_5) \times 0.0880 / 60 + X_6 \text{ 绝对值} \times 0.0541 / \text{最大电位绝对值}$, 以油相 capryol 90 比例(A)、kolliphor RH40 和 transcutool HP 质量比 K_m (B) 为自变量进行

星点设计(central composite design), 因素及水平见表4。采用 Design Expert 8.0.6.1 软件设计试验方案, 结果见表5。

表4 星点设计因素和水平

Table 4 Factors and level of central-composite design

水平	A capryol 90 /%	B K_m (kolliphor RH40/ transcutol HP)
-1.414	5	0.5
-1	7.93	0.87
0	15	1.75
1	22.07	2.63
1.414	25	3

表5 星点设计试验安排与结果($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 5 Central composite design and results($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

处方序号	A	B	溶解度 /mg·g ⁻¹	AUC /min·mg·mL ⁻¹	平均粒径 /nm	PDI	乳化时间 /s	Zeta 电位 /mV	Y
F1	7.93	0.87	66.69±2.17	14.49±1.17	140.70±3.13	0.47±0.03	6.04±0.07	-7.27±0.34	0.82
F2	22.07	0.87	53.70±3.22	13.88±1.59	34.85±2.07	0.28±0.04	6.62±0.45	-8.22±1.01	0.84
F3	7.93	2.63	64.20±3.35	21.10±1.03	13.13±0.25	0.22±0.01	21.65±1.09	-6.67±0.70	1.01
F4	22.07	2.63	53.96±3.37	13.18±1.22	35.50±2.24	0.85±0.05	15.03±1.44	-4.39±0.20	0.74
F5	5	1.75	68.35±3.39	11.65±1.03	17.17±0.37	0.21±0.02	10.00±0.72	-4.82±0.16	0.88
F6	25	1.75	49.15±4.10	13.28±1.06	30.84±1.80	0.45±0.02	7.52±0.52	-4.57±0.21	0.75
F7	15	0.5	67.01±6.17	10.79±1.47	109.7±2.75	0.25±0.02	5.94±0.24	-8.1±0.21	0.81
F8	15	3	56.26±2.74	18.15±1.92	17.97±2.56	0.22±0.02	22.53±1.42	-4.22±0.31	0.89
F9	15	1.75	58.36±2.21	14.41±1.85	16.71±0.51	0.18±0.01	9.86±1.07	-4.47±0.66	0.87
F10	15	1.75	57.09±2.90	14.83±0.74	14.92±0.06	0.09±0.01	10.44±0.71	-4.44±0.53	0.87
F11	15	1.75	59.67±0.33	14.65±1.49	15.80±0.17	0.17±0.03	10.67±0.57	-4.02±0.27	0.88
F12	15	1.75	59.21±2.35	15.03±0.51	15.88±0.39	0.15±0.02	10.97±0.68	-3.42±0.63	0.88
F13	15	1.75	55.89±1.75	14.45±0.84	15.08±0.14	0.17±0.05	9.68±1.35	-3.84±0.59	0.85

利用方差分析对各因素进行多元二次回归, 得到的回归方程 $Y = 0.87 - 0.053A + 0.025B - 0.071AB - 0.021A^2$ 。响应面结果的方差分析见表6, $P < 0.05$ 为显著项, $P < 0.01$ 为极显著项, 可以看出2个因素中, 油相比例(A)和表面活性剂与助表面活性剂之比 K_m (B) 均为极显著项。2次项中 A^2 ($P < 0.0001$) 为极显著项, 表明考察因素与响应面值之间并非简单的线性关系; AB ($P < 0.0001$) 交互项之间为极显著, 表明各因素之间交互作用明显。模型整体具有较好的显著性 ($P < 0.0001$), 且失拟合程度不显著 ($P = 0.1076$), 表明模型能较好的反映油相比例(A)、 K_m (B) 与平衡溶解度、AUC、粒径、PDI、乳化时间、Zeta 电位的加权得分(Y) 之间的变化关系, 能够预测和分析 CUR-SNEDSS 处方。

表6 方差分析

Table 6 Analysis of variance

来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.05	4	0.013	55.88	< 0.0001
A	0.022	1	0.022	98.13	< 0.0001
B	0.005	1	0.005	22.57	0.0014
AB	0.02	1	0.02	88.7	< 0.0001
A^2	0.003	1	0.003	14.11	< 0.0056
残差	0.002	8	0.001		
失拟项	0.001	4	0.001	3.9	0.1076
纯误差	0.001	4	0.001		
校正总和	0.052	12			

按照所得模型绘制油相比例、 K_m 的交互作用对 CUR-SNEDDS 工艺影响的3维响应面图, 见图3, 考察的2个对象交互作用明显。采用 Design Expert 8.0.6.1 试验设计软件, 以 Y 最大值为最优, 得到最优

处方: capryol 90 为 7.93% (kolliphor RH40/transcutol HP) K_m 为 2.63 模型指标的预测值 Y 为 0.99。

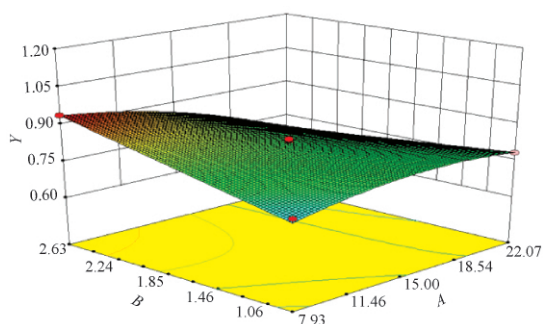


图3 油相比例(A)、 K_m (B)对评价指标(Y)影响的3D响应面图

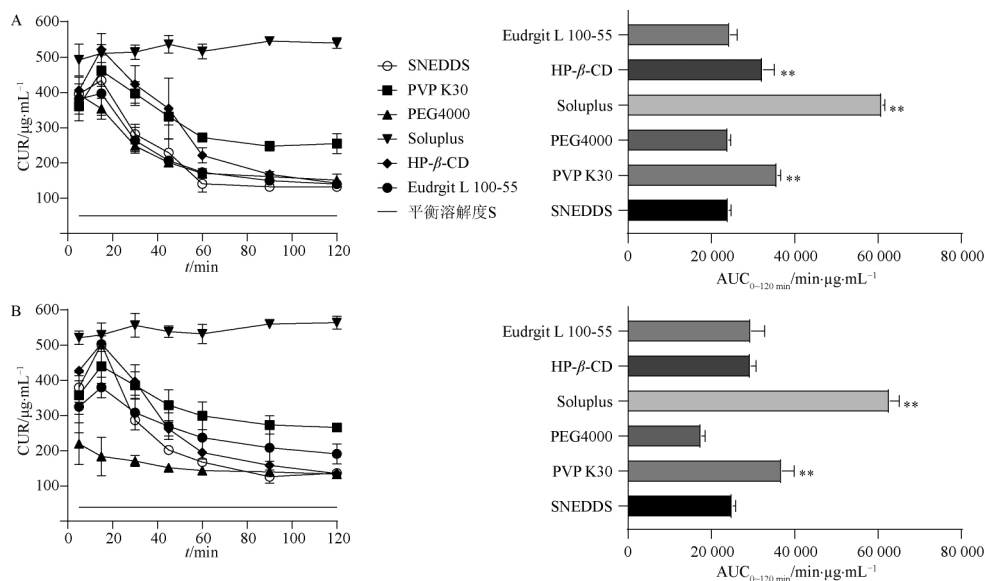
Fig.3 3D response surface plot of effects of oil ratio (A) and K_m (B) on evaluation index (Y)

2.7.4 验证试验 根据最优方,制备3批 CUR-SNEDDS 测定各评价指标,平衡溶解度为 $(65.12 \pm 1.25) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, AUC 为 $(21.09 \pm 0.05) \text{ min} \cdot \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均粒径 $(15.06 \pm 1.12) \text{ nm}$, PDI 为 (0.18 ± 0.01) ,

乳化时间为 $(19.64 \pm 0.11) \text{ s}$, Zeta 电位为 $(-7.41 \pm 0.52) \text{ mV}$, 计算其综合评分值为 1.02, 与预测值接近, 说明层次分析结合星点设计-响应面法所建立的模型能较好预测 CUR-SNEDDS 处方。

2.8 CUR-SSNEDDS 处方的优化

2.8.1 沉淀抑制剂(PPIs)筛选 取 1 g 空白 SNEDDS, 加到 100 mL 预热至 37°C 的 FaSSGF 和 FaSSIF 中, 搅拌桨转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 搅拌至分散均匀, 溶液体系为空白胶束溶液, 加入过量姜黄素 37°C 条件下饱和 24 h, 取样 0.5 mL, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液稀释适当倍数, HPLC 测定 CUR 在空白胶束中的平衡溶解度(S); CUR-SNEDDS 处方中加入质量比为 5% 的 PPIs, 制备含 PPIs 自纳米乳处方。将制备好的处方以 1:100 分散于预热至 37°C 的 FaSSGF 和 FaSSIF 中, 搅拌桨转速为 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 不同时间点取样 0.5 mL, $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 续滤液用甲醇稀释适宜倍数, HPLC 进样检测, Graphpad Prism 6 软件绘制时间-浓度曲线, 梯形法计算质量浓度-时间曲线下面积(AUC) 结果见图 4。



与 SNEDDS 组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 FaSSGF (A) FaSSIF (B) 中不同 PPIs 对 CUR 过饱和时间-浓度曲线及 AUC 的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Fig.4 Effect of different PPIs on the CUR supersaturation time-concentration curve and AUC in FaSSGF (A) and FaSSIF (B) ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

CUR-SNEDDS 明显提高了 CUR 过饱和度。加入不同的 PPIs 后, 在 FaSSGF 体系中 PVP K30, HP- β -CD 及 Soluplus 组 AUC 相较于 SNEDDS 组显著增加; 在 FaSSIF 体系中, 只有 PVP K30 和 Soluplus 显

示抑晶作用。相较于 PVP K30, Soluplus 在 FaSSGF 和 FaSSIF 体系中过饱和度高且维持更久, 因此选择 Soluplus 为沉淀抑制剂。

2.8.2 沉淀抑制剂(PPIs)用量优化 分别加入不同

用量的 Soluplus(2%、5%、10%) 制备含 Soluplus 自纳米乳处方,将制备好的处方按 2.8.1 项操作,结果见图 5。结果表明,随着处方中 Soluplus 的用量增加,AUC 大小为 5% Soluplus > 10% Soluplus > 2% Soluplus,

5% Soluplus 过饱和度在 2 h 内维持在 10 以上。因此选择 5% Soluplus 作为 CUR-SSNEDDS 最佳用量,CUR-SSNEDDS 处方为 capryol 90-kolliphor RH40-transcutol HP-Soluplus(7.93:66.71:25.36:5)。

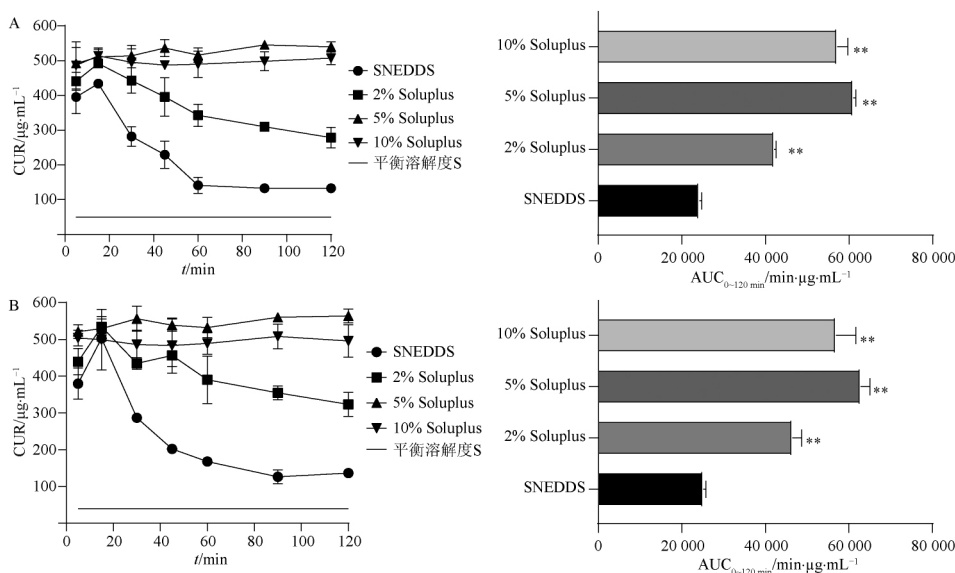


图 5 FaSSGF (A)、FaSSIF (B) 中不同浓度 PPIs 对 CUR 过饱和时间-浓度曲线及 AUC 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.5 Effect of different concentrations of PPIs in FaSSGF (A) and FaSSIF (B) on the CUR supersaturation time-concentration curve and AUC($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.8.3 Soluplus 对 CUR 在人工胃肠液中结晶的影响 分别取 CUR-SNEDDS 和 CUR-SSNEDDS 约 1 g 分散至 100 mL 的 FaSSGF、FaSSIF 中,于 37 °C,100 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 转速均速搅拌。分别于 15、120 min 取 20 μL ,置载玻片,进行偏光实验,结果见图 6。

出现了大量针簇状结晶;加入 Soluplus 后,CUR-SSNEDDS 在 FaSSGF 和 FaSSIF 体系中 120 min 出现少量结晶,这与溶解分散相结果一致。结果表明,Soluplus 可明显抑制 CUR 结晶的形成与生长。

2.9 CUR-SSNEDDS 质量评价

2.9.1 CUR-SSNEDDS 平均粒径、PDI、Zeta 电位及乳化时间的测定 按 2.7.2 项下方法测定 CUR-SSNEDDS 平均粒径、PDI、Zeta 电位和乳化时间,每个样品重复 3 次。结果平均粒径为(57.03±0.35) nm, PDI 为(0.23±0.01),Zeta 电位为(-18.10±1.30) mV,乳化时间为(21.01±0.13) s。与 SNEDDS 相比,SSNEDDS 粒径与分散性略有增大,Zeta 电位由(-7.41±0.52) mV 减小至(-18.10±1.30) mV,乳化时间未有明显改变。Zeta 电位负的绝对值越大,说明 SSNEDDS 分散后形成的纳米乳更稳定。

2.9.2 CUR-SSNEDDS 外观形态 将 CUR-SNEDDS 和 CUR-SSNEDDS 处方以 1:100 分散于预热至 37 °C 的双蒸水中,100 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 转速均速搅拌,完全分散后,取少量液体滴加到铜网上,铺展均匀,

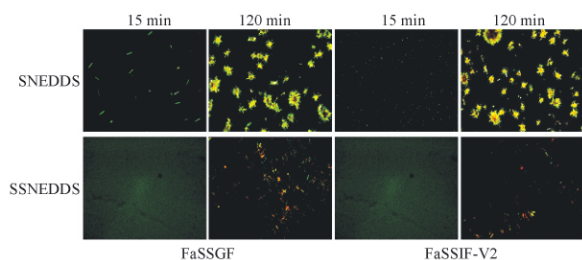


图 6 Soluplus 在 FaSSGF 和 FaSSIF 中对 CUR 结晶生长变化的影响($\times 100$)

Fig.6 Effect of Soluplus on the growth of CUR crystals in FaSSGF and FaSSIF($\times 100$)

CUR-SNEDDS 在 FaSSGF 和 FaSSIF 体系中分散过程中 15 min 内出现少量的星点状结晶,120 min

用滤纸从边缘吸去多余水分, 挥干, 透射电镜下观察 CUR-SNEDDS, CUR-SSNEDDS 的微观结构, 见图 7。

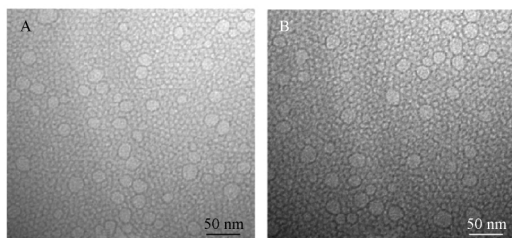


图 7 CUR-SNEDDS (A) 和 CUR-SSNEDDS (B) 透射电镜图
Fig.7 CUR-SNEDDS (A) and CUR-SSNEDDS (B) transmission electron microscope

CUR-SNEDDS, CUR-SSNEDDS 分散后, 乳滴均呈球形, 乳滴间无黏连, 分布较均匀。与 CUR-SNEDDS 相比, 引入 Soluplus 后形成纳米乳滴稍有增大, 与粒径测定结果略有偏差, 但增大的趋势一致。

2.9.3 体外释药评价 体外释药评价采用《中国药典》2015 年版四部 0931 溶出度与释放度测定法, 分别以 FaSSGF (含 0.5% SDS) 和 FaSSIF (含 0.5% SDS) 作为溶出介质, 测定方法为溶出介质 500 mL, 温度 (37.0 ± 0.5) °C, 搅拌桨转速 (100 ± 1) r·min⁻¹。精密称取约 20 mg CUR 原料药、0.3 g CUR-SNEDDS 和 CUR-SSNEDDS 加入到 0 号胶囊壳中, 开启溶出仪, 将胶囊加入到溶出杯中, 开始计时, 在不同时间点取样 1 mL, 同时补加等温、等体积空白介质, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, HPLC 测定药物含量, 计算药物累积溶出率, 见图 8。

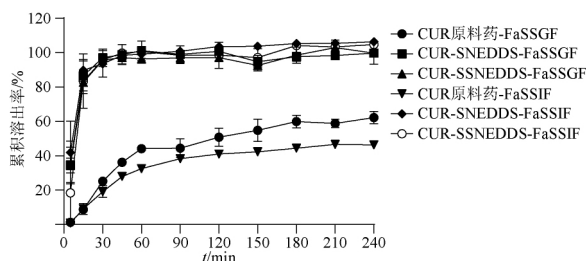


图 8 CUR 原料药、CUR-SNEDDS 和 CUR-SSNEDDS 体外释药曲线

Fig.8 *In vitro* release profile of CUR API, CUR-SNEDDS and CUR-SSNEDDS

CUR 原料药在 FaSSGF 和 FaSSIF 体系中 15 min 内分别溶出 8.79%、9.10%, 120 min 内累积溶出率低

于 60%; CUR-SNEDDS 和 CUR-SSNEDDS 在 FaSSGF 和 FaSSIF 体系中 15 min 累积溶出率达 85% 以上, 显著提高了 CUR 的溶出速率。CUR-SNEDDS 与 CUR-SSNEDDS 在 2 种介质中的体外溶出行为未见显著性差异。由于 SNEDDS 在人工胃肠液中分散后药物主要以游离、微乳和沉淀的形式存在, 本研究中检测药物浓度指的是游离药物和微乳中的药物, 只有游离的药物才能被体内吸收入血, 因此该溶出过程与体内过程存在差异。此外, 溶出是在漏槽条件下完成, CUR 所处释放介质的浓度远小于其饱和浓度, 与实际体内过饱和状态也存在一定差异。

3 讨论

组成自纳米乳的辅料对药物的溶解性能、相容性和自乳化效率及分散稳定性^[16-17] 等是处方筛选的重要指标。油相的选择影响 SNEDDS 的载药量和乳化效果。油相表面活性剂配伍试验表明, capryol 90 与 3 种乳化剂配伍均能形成透光率 ≥ 50% 的微乳。分析可能与 capryol 90 相对分子质量较小 (220.31) 有关, 相对分子质量小更容易和表面活性剂乳化, 增溶能力优于中长链大分子油相, 易被吸收^[18]。表面活性剂影响乳滴的粒径与分散性, 其选择主要考虑毒性和乳化效果, 通常高 HLB 的表面活性剂可促进 SNEDDS 在水相中的分散, 且毒性低^[19]。kolliphor RH40, HLB 14~16, 具有抑制肠细胞 P-糖蛋白对药物的外排作用, 而 CUR 是 P-gp 的底物^[20]。助表面活性剂可降低界面张力, 形成复合界面膜, 增强乳化效果和稳定性, 同时发挥增溶作用。transcutol HP 常用来提高 SNEDDS 的载药量并改善乳化时间^[21-22], 具有安全性高、稳定性好, 且 CUR 在其中的溶解度最高。

本研究采取星点设计-响应面法, 考察油相 capryol 90 的比例、表面活性剂与助表面活性剂之比 (kolliphor RH40/transcutol HP) K_m 对 CUR-SNEDDS 药物平衡溶解度、粒径、分散性、乳化时间、Zeta 电位及分散稳定性等关键因素^[23] 的影响。由于游离药物分子是影响药物的吸收入血的重要因素^[21], 受 SNEDDS 的载药量和分散稳定性影响, 因此在筛选处方是选择 2 h 内药物过饱和浓度-时间曲线下面积 (AUC) 可反映处方的分散稳定性^[15]。通过层次分析法确定权重综合评分进行工艺优化。计算得出 capryol 90 比例为 7.93% K_m 为 2.63, 经验证试验表明该处方简单可行。

本研究发现与 HP- β -CD, PEG4000, PVP K30, Eudragit L 100-55 相比, Soluplus 在人工胃肠液中 120 min 内维持过饱和度均大于 10 以上, 具有显著的抑制结晶作用, 其大小顺序为 5% > 10% > 2%。一般 PPIs 的用量与抑晶能力呈正比, 可能较大浓度的 Soluplus 对 CUR 分子的吸附作用, 降低释放速率, 使得游离药物分子浓度偏低。Soluplus 沉淀抑制作用可能与其作为非离子型表面活性剂有关, 一方面发挥表面活性剂的增容作用, 降低药物表观溶解度, 增强维持过饱和能力; 另一方面 Soluplus 可通过降低纳米乳的表面自由能, 有效地稳定纳米乳, 作为一种能量屏障剂抑制晶体聚集和生长的作用^[24]。此外, 不排除 Soluplus 与纳米乳或药物间发生相互作用形成复合物胶束, 抑制了沉淀产生^[25], 形成具有一定过饱和度的稳定体系。因此, 在优选 SSNEDDS 处方时, 需综合考虑分散体系、药物与抑晶物质之间的关系, 选择合适的评价系统, 以选择最优处方。

[参考文献]

- [1] FEENEY O M, CRUM M F, MCEVOOY C L, et al. 50 years of oral lipid-based formulations: provenance, progress and future perspectives[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 101: 167.
- [2] 程慧, 吕慧侠. 过饱和和药物递送系统的研究与应用进展[J]. *药学进展*, 2019, 43(3): 181.
- [3] 刘调调, 杨白雪, 郭璞玉, 等. 表面活性剂的复配对姜黄素的增溶及保护作用[J]. *药学学报*, 2019, 54(1): 8.
- [4] 梁淇, 王一茹, 邓月义. HPMCAS/姜黄素无定型态固体分散体增强姜黄素的溶出和化学稳定性[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(15): 3305.
- [5] 张育光, 吴声振, 刘远亮, 等. 姜黄素对 S180 肉瘤小鼠的抗肿瘤作用及对血清 IL-2 和 IL-12 水平影响的研究[J]. *今日药学*, 2011, 21(12): 736.
- [6] 宋魏, 崔云, 张建波, 等. 姜黄素对人胰腺癌细胞增殖抑制作用及对 Wnt 信号通路的影响[J]. *世界中医药*, 2018, 13(5): 1226.
- [7] 刘文虎, 袁江北, 张帆, 等. 姜黄素通过 Wnt3a/ β -catenin/EMT 信号通路抑制胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(14): 3107.
- [8] 严丽洁, 王顺保, 王现青, 等. 姜黄素对代谢综合征大鼠主动脉的保护作用及机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(21): 4685.
- [9] TONNESEN H H, MASSON M, LOFTSSON T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability [J]. *Int J Pharm*, 2002, 244: 127.
- [10] IPAR V S, DSOUZA A, DEVARAJAN P V. Enhancing curcumin oral bioavailability through nanoformulations[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2019, 44(4): 459.
- [11] PETCHSOMRIT A, SERMKAEW N, WIWATTANAPATAPEE R. Self-microemulsifying, reconstituted granules for oral administration of curcumin: development and *in vitro* characterization [J]. *Lat Am J Pharm*, 2018, 37: 740.
- [12] LIU Y, HUANG P W, HOU X F, et al. Hybrid curcumin-phospholipid complex-near-infrared dye oral drug delivery system to inhibit lung metastasis of breast cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 3311.
- [13] LI Q P, ZHAI W W, JIANG Q L, et al. Curcumin-piperine mixtures in self-microemulsifying drug delivery system for ulcerative colitis therapy [J]. *Int J Pharm*, 2015, 490: 22.
- [14] 李秋萍, 戴俊东, 翟文文, 等. 单纯形网格法优化设计姜黄素-胡椒碱复方自微乳制剂处方 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(20): 3936.
- [15] 赖章婷, 丁海波, 蒋且英, 等. 水飞蓟宾过饱和自纳米乳给药系统的制备及体外质量评价 [J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4091.
- [16] QIAN J, MENG H J, XIN L, et al. Self-nanoemulsifying drug delivery systems of myricetin: formulation development, characterization, and *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 160: 101.
- [17] THOMAS N, MULLERTZ A, GRAF A, et al. Influence of lipid composition and drug load on the *in vitro* performance of self-nanoemulsifying drug delivery systems [J]. *J Pharm Sci*, 2012, 101(5): 1721.
- [18] 马祖兵, 李小芳, 谢龙, 等. 大黄素-桂皮醛自纳米乳的制备及体外评价 [J]. *中成药*, 2019, 41(1): 7.
- [19] KALLAKUNTA V R, BANDARI S, JUKANTI R, et al. Oral self-emulsifying powder of lercanidipine hydrochloride: formulation and evaluation [J]. *Powder Technol*, 2012, 221: 375.
- [20] RAO Z C, SI L Q, GUAN Y B, et al. Inhibitive effect of cremophor RH40 or tween 80-based self-microemulsifying drug delivery system on cytochrome P450 3A enzymes in murine hepatocytes [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2011, 30(5): 562.
- [21] REN F Z, JING Q F, CUI J B, et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of anethole trithione by combined use of surfactants [J]. *J Disper Sci Technol*, 2009, 30(5): 664.
- [22] YOO J H, SHANMUGAM S, THAPA P, et al. Novel self-nanoemulsifying drug delivery system for enhanced solubility and dissolution of lutein [J]. *Arch Pharm Res*, 2010, 33: 417.
- [23] KANG J H, OH D H, OH Y K, et al. Effects of solid carriers on the crystalline properties, dissolution and bioavailability of flurbiprofen in solid self-nanoemulsifying drug delivery system (solid SNEDDS) [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2012, 80(2): 289.
- [24] 王璐, 黄婷, 曾佳. 共聚物 Soluplus 在药物新剂型与新技术中的应用进展 [J]. *中国药房*, 2016, 27(19): 2703.
- [25] 宋莎, 俞洪珍, 朱春柳, 等. 可形成过饱和和胶束的环孢素 A 渗透泵片的研究 [J]. *药学学报*, 2019, 54(1): 22.

[责任编辑 孔晶晶]