

中图分类号:R943 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2023)12-0045-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.12.012



伪三元相图联合星点设计-响应面法优选鸦胆子油微乳处方*

黄益穗,钟文嘉[△],刘灼波

(广州中医药大学第一附属医院,广东 广州 510405)

摘要:目的 优选鸦胆子油微乳制备工艺。方法 优选鸦胆子油微乳由油包水(W/O)型转变为水包油(O/W)型微乳相临界点的测定方法,并初筛微乳油相配比。绘制伪三元相图,筛选最优乳化剂、助乳化剂、油相组成和 K_m 值。以鸦胆子油的用量(%)、 K_m 为考察因素,以微乳的平均粒径(nm)和多分散系数(PDI)为评价指标,采用星点设计-响应面法优选制备工艺。分别从电镜观察、类型鉴别、高速离心(转速为5 000 r/min)、室温静置(30 d和60 d)方面考察按最优工艺制备的鸦胆子油微乳的理化性质。结果 与目测法相比,电导率-含水量曲线法测定临界点更精确,且微乳的平均粒径和PDI更小,体系更稳定。微乳最优制备工艺为鸦胆子油8.66%、油酸8.66%、聚氧乙烯氢化蓖麻油60.81%、无水乙醇21.87%、 K_m 值为2.78,含水量为71.01%。该工艺下测得微乳的平均粒径为 (14.22 ± 0.25) nm, PDI为 0.066 ± 0.004 。鸦胆子油微乳外观圆整,为O/W型,且稳定性良好。结论 该优选工艺操作简便,结果稳定可靠,可为鸦胆子油微乳的工业化生产提供借鉴。

关键词:鸦胆子油微乳;电导率-含水量曲线法;目测法;伪三元相图;星点设计-响应面法

Pseudo-Ternary Phase Diagram Combined with CCD-RSM for Optimizing the Prescription of Yadanziyou Oleum Bruceae Microemulsion

HUANG Yisui, ZHONG Wenjia, LIU Zhuobo

(The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510405)

Abstract: Objective To optimize the preparation process of Yadanziyou Oleum Bruceae microemulsion. **Methods** The determination method of critical point of Yadanziyou Oleum Bruceae microemulsion from water-in-oil (W/O) type to oil-in-water (O/W) type was optimized, and the oil-phase ratio of microemulsion was screened preliminarily. The pseudo-ternary phase diagram was drawn to screen the optimal emulsifier, co-emulsifier, oil phase and K_m . The preparation process of Yadanziyou Oleum Bruceae microemulsion was optimized by the central composite design-response surface methodology (CCD-RSM) method with the dosage (%) and K_m of Yadanziyou Oleum Bruceae as the investigation factors, and with the average particle size (nm) and polydispersity index (PDI) of the microemulsion as the evaluation indexes. The physicochemical properties of Yadanziyou Oleum Bruceae microemulsion prepared by the optimal process were investigated from the electron-microscopy observation, type identification, high-speed centrifugation (at a speed of 5 000 r/min) and room-temperature standing (for 30 d and 60 d). **Results** Compared with those by the visual determination method, the critical point determined by the conductivity-water content curve method was more accurate, the average particle size and PDI of the obtained microemulsion were smaller, and the system was more stable. The optimal preparation process of microemulsion was 8.66% of Yadanziyou Oleum Bruceae, 8.66% of oleic acid, 60.81% of polyoxyethylene hydrogenated castor oil, 21.87% of absolute alcohol, 2.78 of K_m and water content of 71.01%. The average particle size of the microemulsion prepared by this process was (14.22 ± 0.25) nm, and the PDI was 0.066 ± 0.004 . Yadanziyou Oleum Bruceae microemulsion prepared by the above process had a round appearance, good stability and was O/W-type microemulsion. **Conclusion** The optimal process is simple, stable and reliable, which can provide a reference for the industrial production of Yadanziyou Oleum Bruceae microemulsion.

Key words: Yadanziyou Oleum Bruceae microemulsion; conductivity-water content curve method; visual determination method; pseudo-ternary phase diagram; central composite design-response surface methodology

鸦胆子油为鸦胆子药用的主要有效部位,具有清热、解毒、截疟等功效^[1]及抗肿瘤、抗炎、抗医学原虫等药理作用^[2],临床可用于乳腺癌^[3]、肝癌^[4]、肺癌^[5]等疾病的治疗。鸦胆子油具有脂溶性,口服后胃肠道不易吸收,制成水包油(O/W)型微乳,可增加其吸收性。微乳

制剂为乳化剂、助乳化剂、水相、油相按一定配比经搅拌形成的澄清溶液,平均粒径为10~100 nm,是热力学稳定体系。体系由混浊变澄清为微乳由油包水(W/O)型完全转变为O/W型即为转相,转相时2种乳化剂的量(或含水量)即为临界点,可以目测法^[6-7]测定;也可

*基金项目:广东省中医药局中医药科研项目[20222054]。

第一作者:黄益穗,女,大学本科,主管药师,研究方向为中药新药与制剂工艺,(电子信箱)307489794@qq.com。

[△]通信作者:钟文嘉,男,大学本科,主管中药师,研究方向为中药新药与制剂工艺,(电子信箱)631278027@qq.com。

建立电导率-含水量曲线^[8-9],采用渗滤电导模型(以下称电导率-含水量曲线法)^[10]测定。本研究中通过测定鸦胆子油微乳的平均粒径和分散系数(PDI),证实电导率-含水量曲线法测定的临界点比目测法更精确,并通过绘制伪三元相图及采用星点设计-效应面法优化鸦胆子油微乳制备工艺。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Hitachi HT7700型电子显微镜(日本Hitachi公司);Malvern Zetasizer Nano ZS90型分析仪(英国Malvern公司);MS603S型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);DDS-11A型电导率仪(上海雷磁创益仪器仪表有限公司);RO+EDI-KK-1型纯化水机(广州万冠制药设备有限公司)。

1.2 试药

鸦胆子油(湖北汉达飞生物科技有限公司,批号为21091401);聚乙二醇400(PEG400)、吐温80(TW80)、油酸(OA),均购自天津市大茂化学试剂厂,批号分别为20211215,20211101,20210801;肉豆蔻酸异丙酯(IPM,上海麦克林生化科技有限公司,批号为1811858);所有试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 微乳相临界点测定

2.1.1 处方制备

分别以鸦胆子油/OA(1:1,1:2,m/m),鸦胆子油/IPM(1:1,1:2,m/m)作为混合油相取代空白处方中OA和IPM,共得6个处方(编号为I-VI),详见表1。其中RH40为聚氧乙烯化蓖麻油。

2.1.2 方法建立

电导率-含水量曲线法:将乳化剂和助乳化剂按比例混匀,加入油相,600 r/min磁力搅拌10 min,获得4 g的微乳原液;加入0.2 g水,600 r/min搅拌20 s,测定电导率和含水量,记录,重复上述步骤,直至微乳含水量为80%;采用Origin 2021软件绘制电导率-含水量曲线,以电导率最大值对应的含水量为临界点。

目测法:同法制得4 g微乳原液;缓慢加入水,搅拌,观察,重复上述操作,直至溶液由混浊变澄清,记录加水量,即为临界点。上述操作均由3名实验人员独立进行,平行3次,结果取平均值。

2.1.3 结果比较

将2种方法测得临界点按表1中的5个处方重新配制微乳,各取适量,分别滴入亚甲基蓝和苏丹Ⅲ,静置,观察。结果亚甲基蓝在上述微乳中的扩散速度均大于苏丹Ⅲ,且后者在微乳表面停留几乎不扩散,表明上述微乳均为O/W型。进一步比较微乳的粒径和PDI,结果

发现,电导率-含水量曲线法测得的临界点含水量更高,且微乳的平均粒径和PDI更小,体系更稳定,微乳已完全转变为O/W型;目测法测得的微乳尚处于W/O和O/W双连续型,未完全转变为O/W型^[11]。比较按不同处方(Ⅱ,Ⅲ,V,Ⅵ)制备的微乳,结果油相为鸦胆子油/OA(1:1,m/m)和鸦胆子油/IPM(1:1,m/m)时,微乳的平均粒径和PDI均更小,体系更稳定。详见表2、图1。

表1 空白微乳和鸦胆子油微乳处方
Tab. 1 Prescriptions of blank microemulsion and Yadanziyou Oleum

Bruceae microemulsion						
编号	处方组成				乳化剂/助乳	油相/总乳
	油相	乳化剂	助乳化剂	水相	化剂(m/m)	化剂(m/m)
I	OA	TW80	1,2-丙二醇	纯化水	2:1	1:20
Ⅱ	鸦胆子油/OA(1:1,m/m)	TW80	1,2-丙二醇	纯化水	2:1	1:20
Ⅲ	鸦胆子油/OA(1:2,m/m)	TW80	1,2-丙二醇	纯化水	2:1	1:20
Ⅳ	IPM	RH40	PEG400	纯化水	1:1	1:9
V	鸦胆子油/IPM(1:1,m/m)	RH40	PEG400	纯化水	1:1	1:9
Ⅵ	鸦胆子油/IPM(1:2,m/m)	RH40	PEG400	纯化水	1:1	1:9

表2 电导率-含水量曲线法和目测法制备结果比较
Tab. 2 Comparison of the determination results of conductivity - water content curve method and visual determination method

编号	电导率-含水量曲线法			目测法		
	临界点(%)	平均粒径(nm)	PDI	临界点(%)	平均粒径(nm)	PDI
I	69.23	18.82	0.122	59.18	22.68	0.141
Ⅱ	70.59	13.38	0.096	61.54	16.24	0.113
Ⅲ	68.75	55.73	0.328	63.64	60.38	0.352
Ⅳ	67.21	25.79	0.153	56.62	27.06	0.172
V	66.10	22.41	0.132	58.33	24.27	0.154
Ⅵ	71.83	68.35	0.377	62.96	72.63	0.415

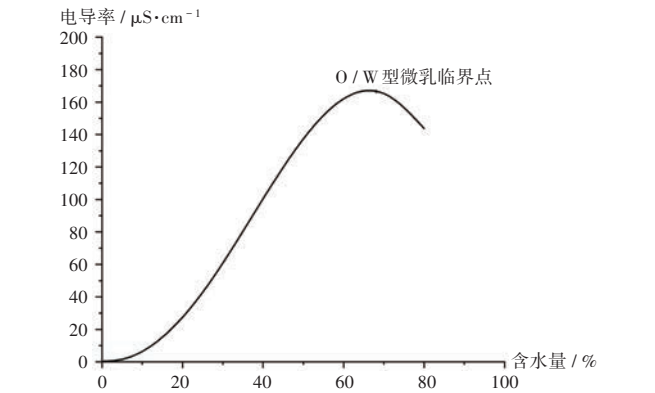


图1 处方Ⅱ电导率-含水量曲线
Fig. 1 Conductivity - water content curve of prescription Ⅱ

2.2 制备工艺优化

2.2.1 伪三元相图

乳化剂、助乳化剂、油相:以鸦胆子油/OA(1:1,m/m)和鸦胆子油/IPM(1:1,m/m)为混合油相,RH40和TW80为乳化剂,1,2-丙二醇、PEG400、无水乙醇为助

乳化剂。固定乳化剂和助乳化剂的比值(K_m)为2,总乳化剂和油相质量比分别为9:1、1:9、8:2、2:8、7:3、3:7、6:4、4:6、5:5,在室温下采用电导率-含水量曲线法配制微乳,计算稳定微乳处方中总乳化剂、油相、水相的占比;采用 Origin 2021 软件绘制伪三元相图,详见图2(图中黑色部分为微乳区域,图3同)。结果含油量为10%~60%(即总乳化剂和油相的质量比分别为9:1、8:2、7:3、6:4、4:6、5:5)时可获得稳定微乳;油相、乳化剂、

助乳化剂分别为鸦胆子油/OA=(1:1, m/m)、RH40、无水乙醇时伪三元相图微乳区域面积最大,故选定其为最优处方类型。

K_m :将处方鸦胆子油/OA=1:1(m/m),RH40、无水乙醇,按 K_m (RH40/无水乙醇)分别为1,1.5,2,2.5,3,3.5,总乳化剂和油相质量比分别为上述比例时,在室温下采用上述方法配制微乳,并绘制伪三元相图(图3)。结果, $K_m > 3.5$ 或 $K_m < 1.5$ 时,配制的微乳易出现分层,

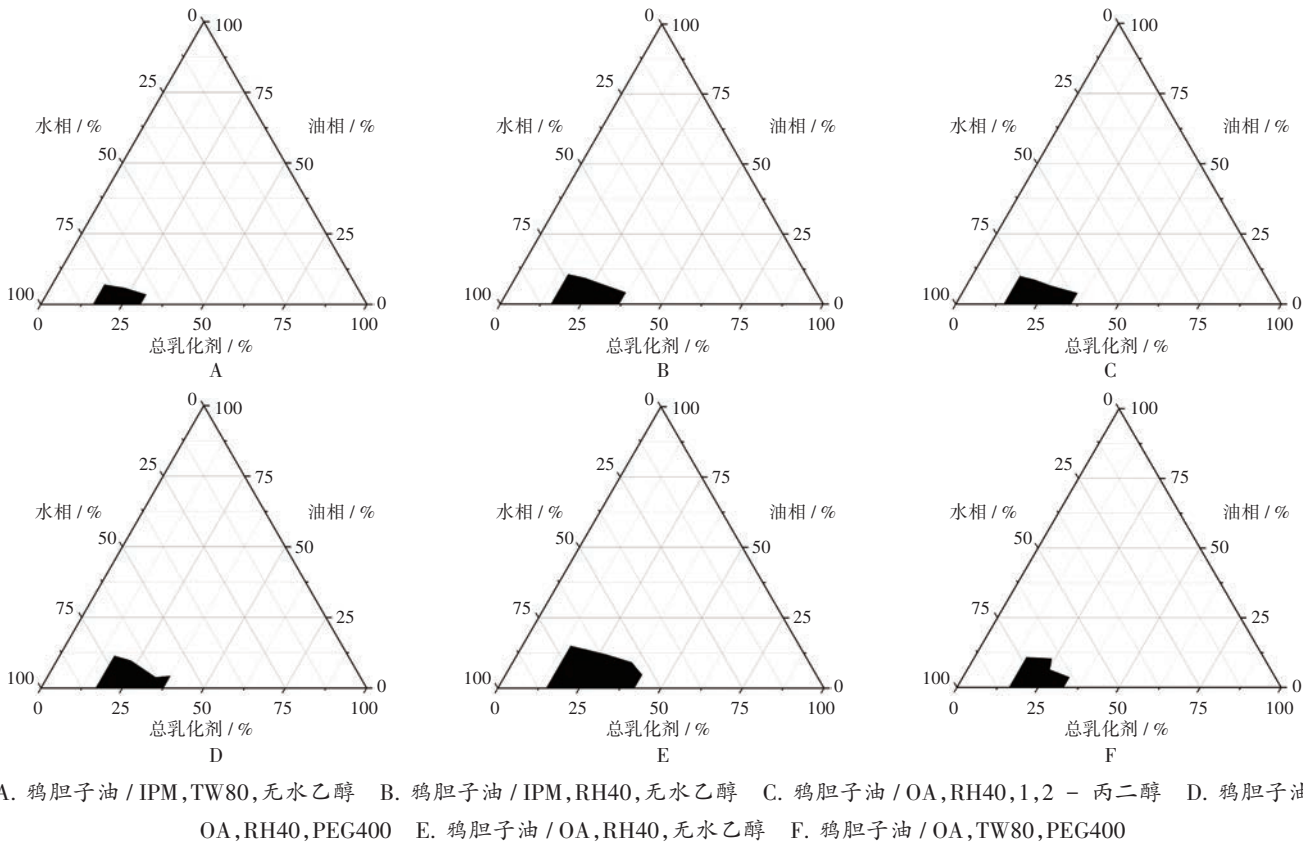


图2 不同配比稳定鸦胆子油微乳伪三元相图

A. Yadanziyou Oleum Bruceae / IPM, TW80, absolute alcohol B. Yadanziyou Oleum Bruceae / IPM, RH40, absolute alcohol C. Yadanziyou Oleum Bruceae / OA, RH40, 1,2 - propanediol D. Yadanziyou Oleum Bruceae / OA, RH40, PEG400 E. Yadanziyou Oleum Bruceae / OA, RH40, absolute alcohol F. Yadanziyou Oleum Bruceae / OA, TW80, PEG400

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram of stable Yadanziyou Oleum Bruceae microemulsion with different ratios

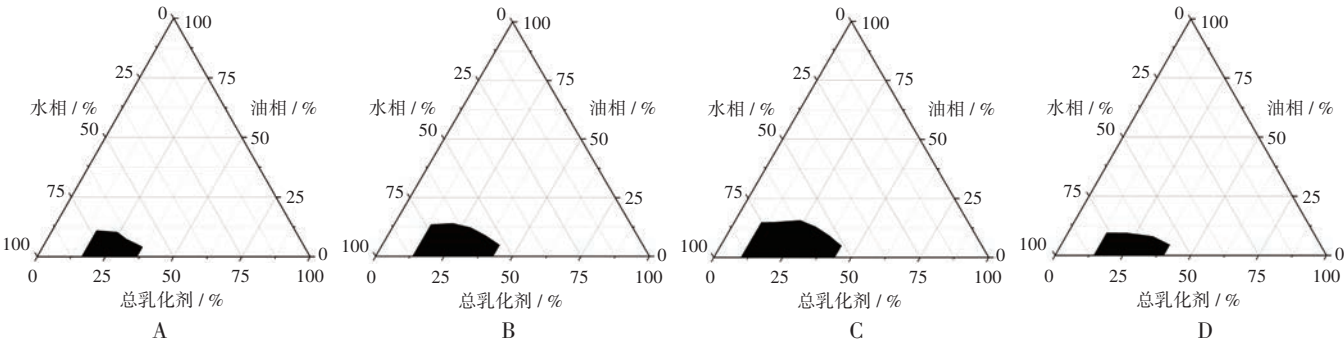


图3 不同 K_m 的稳定鸦胆子油微乳伪三元相图

A. $K_m = 1.5$ B. $K_m = 2.5$ C. $K_m = 3$ D. $K_m = 3.5$

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagram of stable Yadanziyou Oleum Bruceae microemulsion with different K_m

予以剔除,故选定最大 K_m 为 3.5,最小 K_m 为 1.5。

2.2.2 星点设计-响应面试验^[12]

试验设计:以鸦胆子油用量(因素 A,%)、 K_m (因素 B)为考察因素,平均粒径、PDI 为评价指标,采用星点设计-响应面法进行工艺优化;以含油量为 10%~60%,鸦胆子油与 OA 的质量比 1:1 计算,鸦胆子油的实际用量为 5%~30%。因素与水平见表 3。采用 Design-Expert 12.0 软件进行试验设计与结果分析(表 4)。

表 3 因素与水平

Tab. 3 Factors and their levels

水平	因素 A	因素 B	水平	因素 A	因素 B
-1.414	5.00	1.50	1	26.34	3.21
-1	8.66	1.79	1.414	30.00	3.50
0	17.50	2.50			

表 4 星点设计-响应面试验设计与结果

Tab. 4 Design and results of the CCD-RSM

试验号	因素 A	因素 B	平均粒径(nm)	PDI	试验号	因素 A	因素 B	平均粒径(nm)	PDI
1	-1	-1	18.62	0.074	8	0	1.414	29.57	0.093
2	1	-1	53.81	0.186	9	0	0	26.38	0.085
3	-1	1	12.93	0.066	10	0	0	31.49	0.083
4	1	1	41.79	0.149	11	0	0	26.73	0.088
5	-1.414	0	11.38	0.062	12	0	0	24.96	0.087
6	1.414	0	60.34	0.208	13	0	0	26.83	0.091
7	0	-1.414	33.26	0.126					

模型拟合:采用 Design-Expert 12.0 软件求得拟合方程 $Y_{\text{平均粒径}} = 27.278 + 16.661A - 2.866B - 1.583AB + 3.829A^2 + 1.606B^2$, $Y_{\text{PDI}} = 0.087 + 0.050A - 0.011B - 0.007AB + 0.023A^2 + 0.010B^2$,精确度均小于 10%,提示真实度和可信度均较高^[13]。

方差分析:对 2 个模型的回归参数进行方差分析,结果见表 5 和表 6,获得的平均粒径、PDI 的模型极显著($P < 0.0001$),失拟项不显著($P > 0.05$),提示上述模型对真实情况的模拟较准确^[14-15]。

表 5 平均粒径的方差分析结果

Tab. 5 Results of the ANOVA of average particle size

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	2 407.14	5	481.43	62.25	<0.0001
A	2 220.77	1	2 220.77	287.14	<0.0001
B	65.71	1	65.71	8.50	0.0225
AB	10.02	1	10.02	1.30	0.2925
A ²	101.96	1	101.96	13.18	0.0084
B ²	17.94	1	17.94	2.32	0.1715
残差	54.14	7	7.73		
失拟项	29.72	3	9.91	1.62	0.3182
纯误差	24.42	4	6.11		
总变异	2 461.28	12			

表 6 PDI 的方差分析结果

Tab. 6 Results of the ANOVA of PDI

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.0256	5	0.0051	458.01	<0.0001
A	0.0201	1	0.0201	1 805.63	<0.0001
B	0.0011	1	0.0011	94.14	<0.0001
AB	0.0002	1	0.0002	18.84	0.0034
A ²	0.0038	1	0.0038	336.28	<0.0001
B ²	0.0008	1	0.0008	68.41	<0.0001
残差	0.0001	7	0.0000		
失拟项	0.0000	3	0.0000	1.50	0.3436
纯误差	0.0000	4	9.2×10^{-6}		
总变异	0.0256	12			

效应面分析:采用 Design-Expert 12.0 软件分析试验结果,得平均粒径、PDI 与各因素交互作用的三维响应面图(图 4)。

验证试验:验证最优工艺,平行 3 次,结果与预测值(平均粒径为 14.19 nm, PDI 为 0.063)接近, RSD 分别为

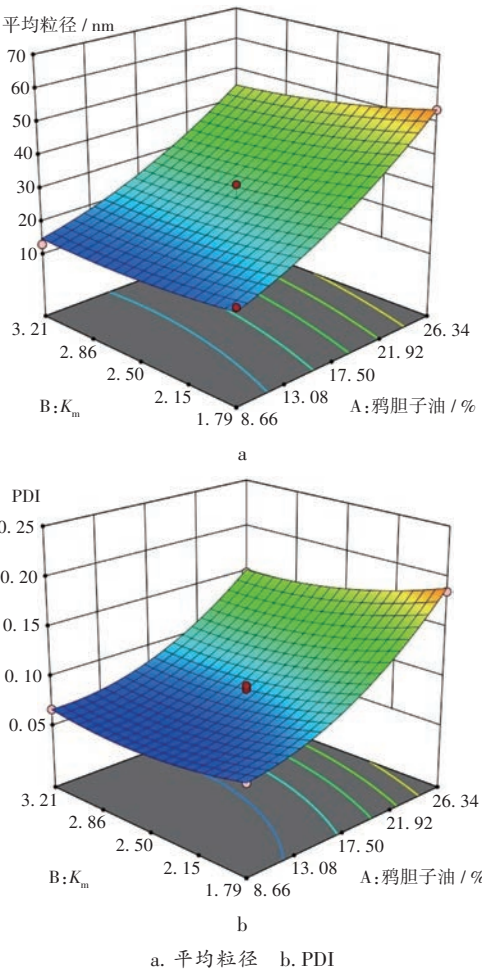


图 4 平均粒径、PDI 与各因素交互作用的三维响应面图

a. Average particle size b. PDI

Fig. 4 Three-dimensional response surface diagram of the interaction of average particle size, PDI with various factors

1.14%和5.64% ($n=3$)。详见表7。故鸦胆子油微乳最优制备工艺为油相(鸦胆子油8.66%、OA 8.66%)占比为17.32%,乳化剂(RH40)占比为60.81%,助乳化剂(无水乙醇)占比为21.87%,含水量为71.01%。在此工艺下制得的微乳平均粒径最小。

表7 工艺验证结果($n=3$)

Tab. 7 Results of the verification test of process ($n=3$)

指标	试验1	试验2	试验3	$\bar{X} \pm s$	RSD
平均粒径(nm)	13.95	14.28	14.43	14.22 ± 0.25	1.73
PDI	0.067	0.062	0.070	0.066 ± 0.004	6.09

2.3 理化性质考察

电镜图:取“验证试验”项下制得的微乳适量,滴至有支持膜覆盖的铜网上,静置15 min;用滤纸吸干,滴入2%磷钨酸负染,静置10 min;用滤纸吸干剩余液体,将样品置生物透射电镜下观察。结果显示,微乳外观圆润、规整,色泽均一。详见图5。

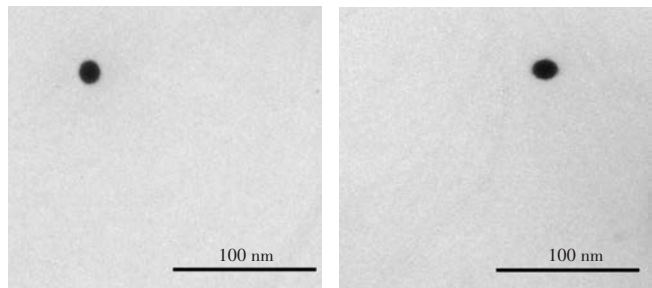


图5 鸦胆子油微乳电镜图

Fig. 5 Image of electron-microscopy of Yadanziyou Oleum Bruceae microemulsion

类型鉴别^[16]:取上述微乳适量,分别滴加10滴亚甲基蓝和苏丹Ⅲ,静置30 min。结果亚甲基蓝几乎在整个鸦胆子油微乳体系中扩散,苏丹Ⅲ几乎不扩散,表明该微乳为O/W型。详见图6。

高速离心:取上述微乳适量,5 000 r/min离心30 min,结果微乳澄清透明、未出现分层,表明鸦胆子油微乳稳定性良好。

室温静置:取上述微乳适量,室温下静置,分别于第30,60天取出。测得微乳的平均粒径分别为(14.63 ± 0.07) nm和(15.38 ± 0.13) nm, PDI分别为0.064 ± 0.005和0.068 ± 0.008,表明鸦胆子油微乳稳定性良好。

3 讨论

本研究所得伪三元相图中的微乳区域偏小,原因为,1)与目测法相比,电导率-含水量曲线法测定的O/W型微乳临界点含水量更高,微乳区域变窄。2)部分微乳出现假阳性,即刚配制出来,外观澄清透明,测得平均粒径为10~100 nm,静置24 h后体系变混浊。主要由于乳化剂、助乳化剂和油相类型或占比不匹配,或



图6 鸦胆子油微乳类型鉴别图

Fig. 6 Identification of type of Yadanziyou Oleum Bruceae micro-emulsion

油相占比高,乳化剂、助乳化剂不能将其完全包裹,造成微乳粒径偏大,稳定性一般,长时间静置后,粒子间重新聚集形成胶束,导致体系变混浊。3)油相占比过低,乳化剂、助乳化剂占比过高,多余的乳化剂、助乳化剂不能完全溶于水,飘浮在液面出现分层,不能形成稳定微乳。

综上所述,本研究中优化的工艺操作简便,结果稳定可靠,可为鸦胆子油微乳的工业化生产提供借鉴。

参考文献

[1] 徐水宇,庄怡雪,詹志来,等. 鸦胆子的化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2022,47(19):5158-5170.

[2] 郭琪,孙薇,王力玄,等. 鸦胆子中苦木素类化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药,2021,52(20):6431-6441.

[3] 黄炎,穆海风,张倩影,等. 鸦胆子油对三阴性乳腺癌细胞 Wnt/ β -catenin 通路及上皮间质转化的影响[J]. 中国优生与遗传杂志,2021,29(11):1563-1568.

[4] 李春亭,孙发律,罗保平,等. 鸦胆子油乳经血管介入治疗肝癌的效果及其对免疫水平及预后的影响[J]. 湖北中医杂志, 2017,39(8):3-5.

[5] 陆兵,吕红,余静,等. 扶正解毒汤联合鸦胆子油乳注射液对晚期非小细胞肺癌患者免疫功能、肺功能以及血脂的影响[J]. 世界中医药,2020,15(9):1317-1321.

[6] 许煜晨,丁文文,赛那,等. 五味子总木脂素的富集及微乳制备研究[J]. 中南药学,2022,20(6):1287-1293.

[7] 龙凯花,王春柳,李晔,等. Box-Behnken 效应面法优化穿心莲内酯自微乳的工艺[J]. 西北药学杂志,2021,36(4):605-610.

[8] 李得堂,张丽娟,唐洪梅,等. 电导率-含水量曲线法研究以肉桂油为模型药物的O/W型微乳[J]. 华西药学杂志, 2012,27(6):623-626.

[9] 李桂华,赵子晨,蒋满意,等. 和厚朴酚自微乳给药系统制