

基于介孔硅固化自微乳的西罗莫司缓释片的制备与评价

黄雯婷^{1,2}, 刘志宏¹, 张灵娜³, 曾令军¹, 张倩^{2*}, 宋洪涛^{1*}

(1. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院, 福建 福州 350025; 2. 福建医科大学药学院, 福建 福州 350108; 3. 福建省药品审评与监测评价中心, 福建 福州 350003)

摘要: 通过研制西罗莫司自微乳-介孔硅缓释片, 以期提高难溶性药物西罗莫司的溶出度, 并降低其毒副作用。首先, 制备西罗莫司自微乳, 用介孔硅进行固化。其次, 以外观、硬度、体外释放度为指标筛选适宜的辅料, 采用粉末直接压片法制备以羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 为骨架材料的缓释片, 以星点设计优化处方, 考察其体外释药情况。最后, 以市售西罗莫司片作为参比制剂, 进行比格犬体内药动学实验 (动物实验和福利过程均已获得联勤保障部队第九〇〇医院动物伦理委员会的审核并批准)。结果表明, 缓释片的最终处方 [西罗莫司自微乳-介孔硅 (1:1, w/w)] 的用量为 162 mg, HPMC K4M 为 80 mg, 羧甲基淀粉钠为 80 mg, 微晶纤维素为 168 mg。体外释药实验结果显示, 自制缓释片在 12 h 内缓慢释药, 符合 Ritger-Peppas 模型。体内实验结果显示, 与市售西罗莫司片相比, 缓释片的 C_{max} 降低了 49.47%; T_{max} 延长了 5.1 倍, 相对生物利用度为 105.81%。西罗莫司自微乳-介孔硅缓释片具有良好的体外、体内缓释效果, 为其他难溶性药物的增溶及其缓释制剂的研发提供了参考。

关键词: 西罗莫司; 自微乳; 介孔硅; 羧甲基淀粉钠; 羟丙基甲基纤维素; 缓释片

中图分类号: R944 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)04-1049-10

Preparation and evaluation of sirolimus sustained release tablets based on mesoporous silicon loaded self-microemulsion

HUANG Wen-ting^{1,2}, LIU Zhi-hong¹, ZHANG Ling-na³, ZENG Ling-jun¹,
ZHANG Qian^{2*}, SONG Hong-tao^{1*}

(1. 900TH Hospital of Joint Logistics Support Force, Fuzhou 350025, China; 2. Department of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China; 3. Fujian Medical Products Administration, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Sirolimus self-microemulsion-mesoporous silicon sustained release tablets were prepared in order to improve the dissolution of the insoluble drug sirolimus and reduce its side effects. Firstly, sirolimus self-microemulsion was prepared and cured with mesoporous silicon. Secondly, the suitable excipients were selected according to the appearance, hardness and *in vitro* release rate. The sustained-release tablets with hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) as skeleton material were prepared by powder direct pressing method, and the formulation was optimized by central composite design-response surface method to investigate the drug release *in vitro*. Finally, the pharmacokinetics was carried out in beagle dogs using the commercial sirolimus tablets as references. The final formulation of sustained-release tablets is as follows: 162 mg of sirolimus self-microemulsion-mesoporous silica (1:1, w/w), 80 mg of HPMC K4M and 80 mg of carboxymethyl starch sodium, the microcrystalline cellulose is 168 mg. The results of *in vitro* release test showed that the self-made sustained-release tablets released slowly within 12 h, which conformed to the Ritger-Peppas model. The *in vivo* test results showed

收稿日期: 2022-11-07; 修回日期: 2022-12-23.

基金项目: 福建省科技计划引导性项目 (2019Y0017); 第九〇〇医院院立课题 (2020L16).

*通讯作者 Tel: 86-591-22859853, E-mail: sohoto@vip.163.com;

Tel: 13850153200, E-mail: 1009467948@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1193

that compared with the commercial sirolimus tablets, the C_{\max} of the sustained-release tablets decreased by 49.47%, the T_{\max} of the sustained-release tablets was prolonged by 5.1 times, and the relative bioavailability was 105.81%. Sirolimus self-microemulsion-mesoporous silicon sustained-release tablets have good sustained-release effects *in vitro* and *in vivo*, which provides a reference for the solubilization of other insoluble drugs and the research and development of sustained-release preparations. Animal experiments and welfare processes were reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of the 900TH Hospital of the Joint Logistics support Force.

Key words: sirolimus; self-microemulsion; mesoporous silicon; sodium carboxymethyl starch; hydroxypropyl methylcellulose; sustained-release tablet

西罗莫司 (sirolimus, SRL) 是第三代大环内酯类免疫抑制剂, 临床上主要用于器官移植患者的抗排斥反应和自身免疫性疾病的治疗^[1,2], 是典型的难溶性药物, 在水中的溶解度仅为 $1.73 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[3], 但渗透性好。目前, 市售制剂为纳米结晶片, 制备工艺复杂, 生产要求高且贮存条件苛刻。如何采用制剂手段提高药物溶出度并降低药物成本引起了众多研究者的兴趣。

自微乳给药系统 (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS) 是提高难溶性药物溶解度的常用方法。本课题组前期已成功制备 SRL 自微乳, 显著提高了药物的溶出度及生物利用度^[4,5]。然而, 目前市售的自微乳制剂均采用软胶囊装填, 胶囊壳中的水分易被自微乳夺取, 导致胶囊壳变硬, 影响其崩解和自乳化, 且贮存要求高^[6,7]。所以, 本课题组前期采用微晶纤维素 (MCC) 将 SRL 自微乳进行固化, 然而, 由于其吸附性能较差, 导致与自微乳的用量比高达 9:1^[8], 不利于后续高端制剂的研发。因此, 选择一种适宜的固化材料尤为重要。

介孔硅 (mesoporous silica, MS) 由于其具有较大的孔径、巨大的比表面积和良好的生物相容性等特点^[9,10], 而成为药物载体的研究热点^[11,12]。本课题组前期发现 SRL 自微乳与介孔硅 SBA-15 以 1:1 比例固化时, 可得到粉体学性质良好的固化制剂, 为后续其他制剂的研发打下了坚实基础。

但是, SRL 治疗窗窄 ($5\sim 15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[13]、个体差异大、不良反应发生率高且需长期服用, 因此, 将其制备成缓释制剂, 降低血药峰浓度, 是减少其毒副作用发生的重要手段。综上, 本研究拟制备 SRL 自微乳-介孔硅缓释片, 考察其体外及体内的释药情况, 以期为其他难溶性药物增溶策略的选择及缓释制剂的研发提供参考。

材料与方法

主要仪器 Agilent 1200 型高效液相色谱系统 (美国 Agilent 公司); RCZ-6BZ 型智能六杯溶出仪 (上海黄海药检仪器有限公司); SXL-1008 型程控箱式电炉 (上海精宏实验设备有限公司); S-4800 型扫描电子显微

镜 (日本 Hitachi 有限公司); JEM-2100F 型透射电子显微镜 (日本 JEOL 有限公司); Tristar II 3020 型吸附仪 (美国 Micromeritics 仪器有限公司); Nicomp 380 型粒径测定仪 (美国 PSS 有限公司); K-Alpha 型 X-射线光电子能谱仪 (美国 Thermo 有限公司); Q2000 型差示扫描量热仪 (美国 TA 有限公司); QTRAP 5500 型三重四级杆/复合线性离子阱质谱 (美国 AB-SCIEX 有限公司)。

药品及试剂 SRL 原料药 (含量 99.5%)、SRL 对照品 (含量 99.9%) (福建科瑞药业有限公司); SRL 片 (Rapamune[®], 规格 1 mg/片, 美国 Pfizer 有限公司); 子囊霉素对照品 (FK520, 含量 99.5%, 上海齐奥化工科技有限公司); 聚氧乙烯 35 蓖麻油 (Cremophor EL, 德国 BASF 公司); 油酸聚乙二醇甘油酯 (Labrafil M1944CS)、二乙二醇单乙基醚 (Transcutol HP) (法国 Gattefosse 公司); 柠檬酸 (国药集团化学试剂有限公司); 聚环氧乙烷-聚环氧丙烷-聚环氧乙烷三嵌段共聚物 (P123, 美国 Sigma-Aldrich 有限公司); 硅酸四乙酯 (TEOS, 上海阿拉丁试剂有限公司); 乳糖 (美国 Foremost 公司); 羧甲基淀粉钠 (CMS-Na)、羟丙基甲基纤维素 (HPMC K4M、HPMC K15M、HPMC K100M、HPMC K100LV)、MCC、交联聚维酮 (PVPP)、可压性淀粉 (上海昌为医药辅料技术有限公司); 低取代羟丙基纤维素 (L-HPC, 泰安瑞泰纤维素有限公司)。

动物 健康雄性 Beagle 犬 6 只, 体重 (15 ± 3) kg, 购于福州振和实验技术开发有限公司, 合格证号: SCXK (闽) 2018-0001。动物实验和福利过程均已获得联勤保障部队第九〇〇医院动物伦理委员会的审核并批准。

色谱条件 色谱柱为 Eclipse XDB-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm , 美国 Agilent 公司), 以乙腈-甲醇-水 (50:35:15) 为流动相, 流速为 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长为 278 nm, 柱温 50 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 20 μL 。配制药物浓度为 2.50、5.00、10.00、15.00、20.00、25.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 SRL 对照品溶液, 进行线性关系考察。配制浓度为 5.00、10.00 和 15.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 SRL 样品溶液, 每个浓度连续进样 6 次, 计算相对标准偏差 (RSD), 进行精密度考察。精密

称取约含 2.00 mg 药物的样品溶液, 分别加入 1.60、2.00、2.40 mg SRL 各 3 份, 进行回收率考察。

血样分析方法的建立

色谱条件 色谱柱为 Agilent ZOBAX C18 柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm, 美国 Agilent 公司); 流动相为乙腈-水 (90:10, v/v); 流速为 0.30 mL·min⁻¹; 进样量为 5 μL; 柱温为 40 °C^[8]。

质谱条件 ESI 离子源, 三重四级杆质谱; 以正离子 [M+Na]⁺ 方式检测; 扫描方式为多反应监测 (MRM); 离子源温度 550 °C; 离子源电离电压为 5 500 V; 雾化气流速 55 psi; 去簇电压为 70 V (FK520)、70 V (SRL); 碰撞能量为 72 V (FK520)、65.5 V (SRL); 扫描时间为 100 ms。用于辅助定性反应为 m/z 937.5 → 608.2 (FK520), 定量分析的离子反应分别为 m/z 937.5 → 409.2 (SRL)、 m/z 814.4 → 604.3 (FK520)^[8]。

SBA-15 的制备与表征 参考 Zhao 等^[14] 的方法: 称取 2 g P123 溶于 15 g 超纯水及 60 g 的 2 mol·L⁻¹ 盐酸溶液中。搅拌均匀, 将反应体系加热至 35 °C, 完全溶解, 加入 4.25 g TEOS, 搅拌 24 h。反应结束后在 80 °C 下晶化 24 h。待样品冷却至室温, 过滤、洗涤, 45 °C 干燥 12 h。将干燥后的样品置于马弗炉中, 在空气氛围下以 1 °C·min⁻¹ 的速率升到 550 °C, 并煅烧 8 h, 即得孔径约为 6 nm 的 SBA-15。

分别采用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察 SBA-15 的表面形貌及粒径大小, 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察介孔结构, 氮气吸-脱附仪在 77 K 条件下测量后, 绘制吸附-脱附等温线, 采用 BET (Brunauer Emmett Teller) 方法计算比表面积、BJH (Barrett Joyner Halenda) 模型计算孔容 (V_p) 和孔径 (D_p)。

SRL-SMEDDS 的制备 基于本课题组前期所优化的处方^[5,15], 精密称取 1 g SRL 粉末, 加到 19 g 的助乳化剂 Transcutol HP 中, 不断搅拌直至溶解; 加入 22 g 油相 Labrafil M1944CS 及 39 g 乳化剂 Cremophor EL, 不断搅拌至形成淡黄色澄清溶液, 随后加入 0.16 g 的柠檬酸。

SRL 自微乳的固化 (SRL-SMEDDS-SBA-15) 采用物理搅拌法, 精密称取一定量的 SBA-15, 按照 1:1 (w/w) 将等量的 SRL-SMEDDS 逐滴加入到 SBA-15 中, 边加边搅拌; 待加入完毕后, 将外观略显潮湿的白色粉末置于干燥器中, 放置过夜, 确保吸附完全。

重分散实验 称取 SRL-SMEDDS-SBA-15 0.50 g 加入 50 mL 蒸馏水, 37 °C 下以 50 r·min⁻¹ 的速度搅拌 30 min, 静置后取溶液适量, 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 测定上清液粒径, 考察重分散后的粒径分布情况。对

照组采用 0.25 g 的 SRL-SMEDDS, 同上操作后测定^[16]。

缓释片的制备 辅料过 80 目筛, 备用。称取处方量的各辅料, 与 SRL-SMEDDS-SBA-15 混合, 采用粉末直接压片法, 通过外观、硬度、体外释放行为等指标筛选出适宜的压片辅料。

体外释放度测定方法 依据 2020 年版《中华人民共和国药典》四部通则 0931 项下第一法 (篮法), 以 0.4% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液或蒸馏水 250 mL 为释放介质, 分别考察漏槽条件与非漏槽条件下缓释片中 SRL 的释放情况; 温度 (37.0 ± 0.5) °C, 转速为 100 r·min⁻¹, 于 2、4、6、8、10、12 h 分别取溶液 3 mL, 并即时补充等量释放介质; 样品于 12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 取上清液, HPLC 法测定药物浓度。

星点设计 利用 Design-expert 8.0.6.1 软件, 进行星点设计试验。预设理想的缓释制剂在 2、6、10 h 的累积释放度 Q_2 、 Q_6 、 Q_{10} 分别为 $Q_2 < 30\%$ 、 $45\% < Q_6 < 65\%$ 、 $Q_{10} > 85\%$, 以缓释片在 2、6、10 h 的累积释放百分率为效应值, 以 K 为综合评分指标 ($K = |30 - Q_2| + |65 - Q_6| + |85 - Q_{10}|$), K 值越小, 越接近理想的释放状态, 缓释效果越好。

物相鉴别 通过 X-射线衍射法 (XRD) 和差示扫描量热法 (DSC) 鉴别 SRL 在缓释片中的物相存在状态。

比格犬体内药理学实验

给药方案 受试制剂为自制缓释片 (1 mg/片), 参比制剂是市售 SRL 片 (Rapamune[®])。将 6 条 Beagle 犬随机分成两组, 采用单次给药双周期交叉实验设计方案, 每次分别给予 1 片参比制剂或受试制剂。每次实验给药前 12 h 禁食不禁水, 给药 6 h 后自由饮水, 每 2 次给药间隔 14 天以上的清洗期。

血样采集 给药前采取空白血液样品, 参比制剂给药后在 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3、4、6、8、10、12、24、36、48 h 于 Beagle 犬前肢小隐静脉采血 2 mL, 受试制剂给药后于 1、2、3、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、8、10、12、24、36、48 h 同法采血 2 mL。血样置抗凝管中, 于 -20 °C 保存备用, 样品在 1 个月内测定完毕。血样的处理及分析方法参考本课题组前期研究^[8,16]。

数据处理 通过 WinNonlin 8.1 药理学软件处理血药浓度-时间数据, 采用非房室模型计算得到相关药理学参数, 并进行相应的统计分析, 比较两制剂间的药理学差异。

结果

1 体外方法学考察

该色谱条件下^[8,16], 所得标准曲线为 $Y = 56.32 X -$

13.183, $r = 0.9999$, 表明在 $2.50 \sim 25.00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 该测定方法的线性关系良好。低、中、高浓度精密度的 RSD 值分别为 0.58%、0.54%、0.17%, 各样品的回收率为 98.96%~102.08%, 表明该方法的精密度及准确度均良好。

2 体内方法学考察

该质谱条件下^[8,16], 药物 SRL 与内标 FK520 所得回归方程为 $A_{\text{SRL}}/A_{\text{FK520}} = 0.2802C_{\text{SRL}} + 0.0844$; $r = 0.9994$, 表明在 $0.51 \sim 40.96 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性良好; $0.51 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的准确度为 85.23%, 精密度的 RSD 值为 15.59%, 确定其为该法的最低定量限。低 ($1.20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中 ($20.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、高 ($30.00 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 质控样品的准确度分别为 92.10%、97.52% 和 99.22%, 均符合 2020 年版《中华人民共和国药典》四部规定, 表明该法精密度及准确度均良好。

3 SBA-15 的表征

SEM 及 TEM 结果显示 (图 1A~D), 自制 SBA-15 呈柱状结构, 孔道大小均匀且排列有序; 氮气吸附等温线图结果显示 (图 1E), 曲线呈 IV 型等温线、H1 型迟滞回线, 根据国际纯粹与应用化学联合会 (IUPAC) 的观点^[17], 证明制备的是介孔材料, 且孔径高度一致。根据 BJH 模型计算自制 SBA-15 的孔径为 6 nm (图 1F), BET 模型计算结果比表面积为 $553.75 \text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ 。

4 重分散实验

粒径分布结果显示, SRL-SMEDDS 的粒径为 $(32.967 \pm 1.369) \text{ nm}$, SBA-15 固化 SRL-SMEDDS 后, SRL-SMEDDS-SBA-15 的粒径为 $(33.433 \pm 1.977) \text{ nm}$, 二者无显著性差异, 说明 SBA-15 的固化不影响自微乳的粒径大小。

5 缓释片处方的初步探索

5.1 填充剂的种类 参考本课题组前期的处方^[18], 按照处方量换算, 暂定总片重为 560 mg, HPMC K4M 为总量的 15%, 与含药量为 1 mg 的 SRL-SMEDDS-SBA-15 混合, 填充剂补足余量。分别考察以乳糖、可压性淀粉、MCC 为填充剂时所得片剂的外观与硬度。结果表明, 三者通过粉末直接压片法所得片剂的外观均完整光洁。但是, 以乳糖和可压性淀粉为填充剂时, 所得片剂硬度小于 50 N, 而以微晶纤维素为填充剂时, 片剂硬度大于 50 N。因此, 选用硬度较大、结合力相对较强的微晶纤维素为填充剂。

5.2 填充剂的用量 固定含药量为 1 mg/片, 即 SRL-SMEDDS-SBA-15 的处方量为 162 mg; 考察当 SRL-SMEDDS-SBA-15 与 MCC 的质量比为 1:1、1:2、1:3 时所得缓释片的硬度, 结果显示 (表 1), 当比例为 1:2 时, 可得硬度适宜、大小相对适中的片剂。因此, 确定 MCC 用量为 SRL-SMEDDS-SBA-15 的 2 倍。

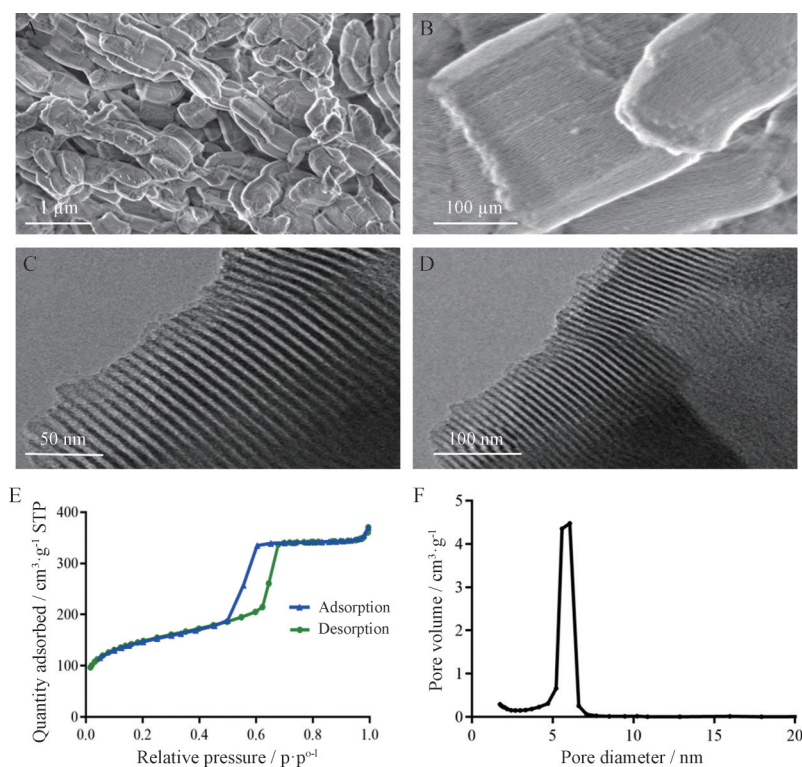


Figure 1 A, B: Results of scanning electron microscope (SEM) of SBA-15. Scale bar: 1 μm (A), 100 μm (B). C, D: Results of transmission electron microscope (TEM) of SBA-15. Scale bar: 50 nm (C), 100 nm (D). E, F: N_2 adsorption-desorption isotherm (E) and pore size distribution (F) of SBA-15. STP: Stander temperature and pressure

Table 1 Influence of the dosage of filling agent on tablets. SRL: Sirolimus; SMEDDS: Self-microemulsifying drug delivery system; MCC: Microcrystalline cellulose

SRL-SMEDDS-SBA-15:MCC	Weight/mg	Hardness/N
1:1	< 400	< 50
1:2	450 - 500	50 - 120
1:3	> 600	> 150

综上, 暂定 SRL-SMEDDS-SBA-15 处方量为 162 mg, 与 MCC 的比例为 1:2, 片重约 490 mg。出于对片重及片形大小的考虑, 加入其他辅料时相应减少 MCC 的用量以固定片重。

按处方量称取各辅料压片, 体外释放实验结果发现, 当固定 HPMC K4M 用量为总片重的 12% 时, 自制缓释片 12 h 后未完全分散, 残留较大的片芯, 且 12 h 的累积释放百分率小于 60%, 提示缓释片未能完全溶散。因此, 考虑加入崩解剂。

5.3 崩解剂的种类 选用 CMS-Na、L-HPC、PVPP 作为崩解剂, 用量固定为 10%, 体外释药情况结果显示 (图 2A), CMS-Na 的崩解释药效果最佳。因此, 崩解剂选用 CMS-Na。

5.4 崩解剂的用量 考察当 CMS-Na 用量为总片重的 10%、12%、15%、17% 时缓释片的体外释药情况, 结果显示 (图 2B), 当用量为 17% 时, 12 h 累积释放百分率 > 90%。然而, 2 h 的累积释放百分率已接近 30%, 因此, 不再考察更大的用量, 以免发生突释。综上, CMS-Na 的用量确定为缓释片总重的 17%。

5.5 凝胶骨架材料的型号 固定 HPMC 用量为 15%, 考察不同型号分别为 HPMC K4M、HPMC K15M、HPMC K100M、HPMC K100LV, 考察结果显示 (图

2C), HPMC K4M 的缓释效果最优, 考虑释药情况可能与不同型号的黏度相关, 黏度大小顺序为 HPMC K100M > HPMC K15M > HPMC K4M > HPMC K100LV。因此, 确定凝胶骨架材料的型号为 HPMC K4M。

5.6 凝胶骨架材料的用量 分别考察当 HPMC K4M 用量为总片重的 10%、12%、15%、18% 时缓释片体外释药情况, 结果显示 (图 2D), 当 HPMC K4M 的用量为 15% 时, 缓释片的缓释效果最佳。所以, 凝胶骨架材料 HPMC 的用量定为缓释片总重的 15%。

综上所述, 通过单因素考察结果, 初步确定 SRL-SMEDDS-SBA-15 缓释片的处方为: SRL-SMEDDS-SBA-15 的用量为 162 mg; MCC 的用量为 170 mg; CMS-Na 的用量为 84 mg; HPMC K4M 的用量为 74 mg, 共 490 mg。

6 星点设计试验

根据单因素考察试验结果可知, HPMC K4M 和 CMS-Na 的用量, 对缓释片的释放效果影响较大, 因此, 将 HPMC K4M 的用量 (因素 A) 和 CMS-Na 的用量 (因素 B) 作为自变量, 固定含药量为 1 mg/片, 片重为 490 mg, MCC 补足余量, 以缓释片在 2、6、10 h 的累积释放百分率为效应值, 利用 Design-expert 8.0.6.1 软件, 进行两因素、三水平的星点试验设计。因素水平代码见表 2, 试验测定结果见表 3。

Table 2 The level code of each factor and operation value of each test. CMS-Na: Carboxymethyl starch sodium

Factor	Level		
	-1	0	1
HPMC K4M	12%	15%	18%
CMS-Na	12%	15%	17%

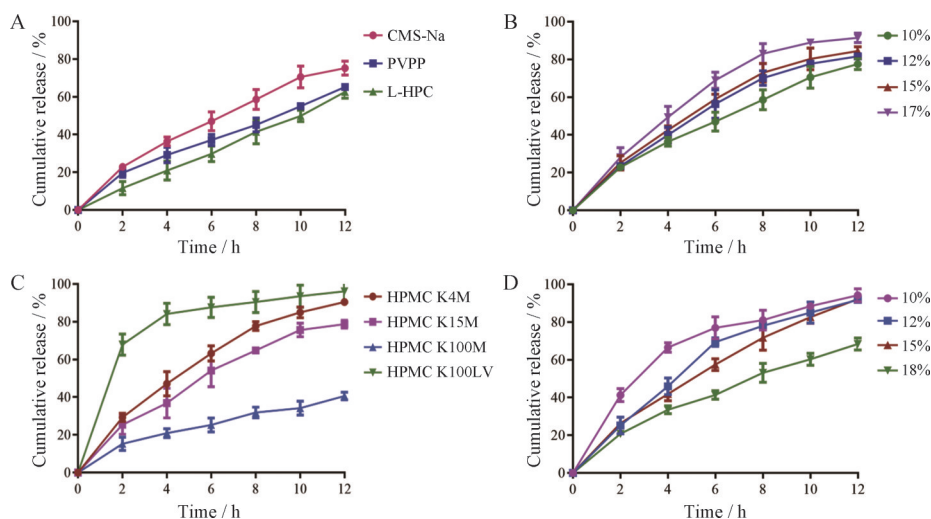


Figure 2 The release of sustained-release tablets *in vitro*. A: Influence of different disintegrants; B: Disintegrants in different dosage; C: Hydroxypropyl methylcellulose in different types; D: Hydroxypropyl methylcellulose in different dosage

Table 3 Test design and results of each index ($n = 3$). Q_2 , Q_6 , Q_{10} : The percentage of cumulative release at 2, 6 and 10 h ; K : Comprehensive scoring index

No.	HPMC K4M	CMS-Na	Q_2 /%	Q_6 /%	Q_{10} /%	K
1	-1	-1	25	56	75	24
2	1	-1	18	51	67	44
3	-1	1	38	76	90	24
4	1	1	28	61	82	9
5	-1.414	0	23	53	70	34
6	1.414	0	21	58	77	24
7	0	-1.414	15	49	65	51
8	0	1.414	33	69	88	10
9	0	0	25	60	80	15
10	0	0	28	63	84	5
11	0	0	26	61	82	11
12	0	0	29	66	87	4
13	0	0	27	63	85	5

应用软件对表3的数据进行拟合,以置信度 ($P < 0.05$) 作为显著标准,结果显示,二次多项式模型的拟合度更佳,综合评分 K 对因素 A 、 B 的拟合方程为: $K = 8 - 1.14A - 11.62B - 8.75AB + 9.38A^2 + 10.12B^2$ ($r^2 = 0.9132$, $P < 0.05$).

A 、 B 两因素所对应各评价指标的等高线图及三维效应面图的结果见图3,再结合表4对综合评价指标 K 的方差分析结果, $P < 0.05$, 且失拟项不显著,说明模型显著,具有统计学意义。

由图3和表4可知, HPMC K4M 及 CMS-Na 的用量对缓释片 2、6、10 h 的累积释放百分率的大小存在一定影响, CMS-Na 用量的结果方差分析具有显著性差异,即 CMS-Na 用量的影响大于 HPMC K4M 用量的影响。

6.1 优化处方验证 通过软件对3个效应面最优区域进行分析,优选得出的最佳处方为: SRL-SMEDDS-SBA-15 为 162 mg; HPMC K4M 的用量为 80 mg; CMS-Na 的用量为 80 mg; MCC 补足余量,即 168 mg, 所制备的缓释片如图4。

按照软件得出的最优处方制备3批缓释片,并测定 Q_2 、 Q_6 、 Q_{10} , 比较预测值与实测值的相对误差,结果显示各时间点的累积释放百分率的预测值与实测值的相对误差均 $< 5\%$, 表明该模型的预测性良好,稳定性高。此外,所得最优处方与预设定理想的缓释制剂在

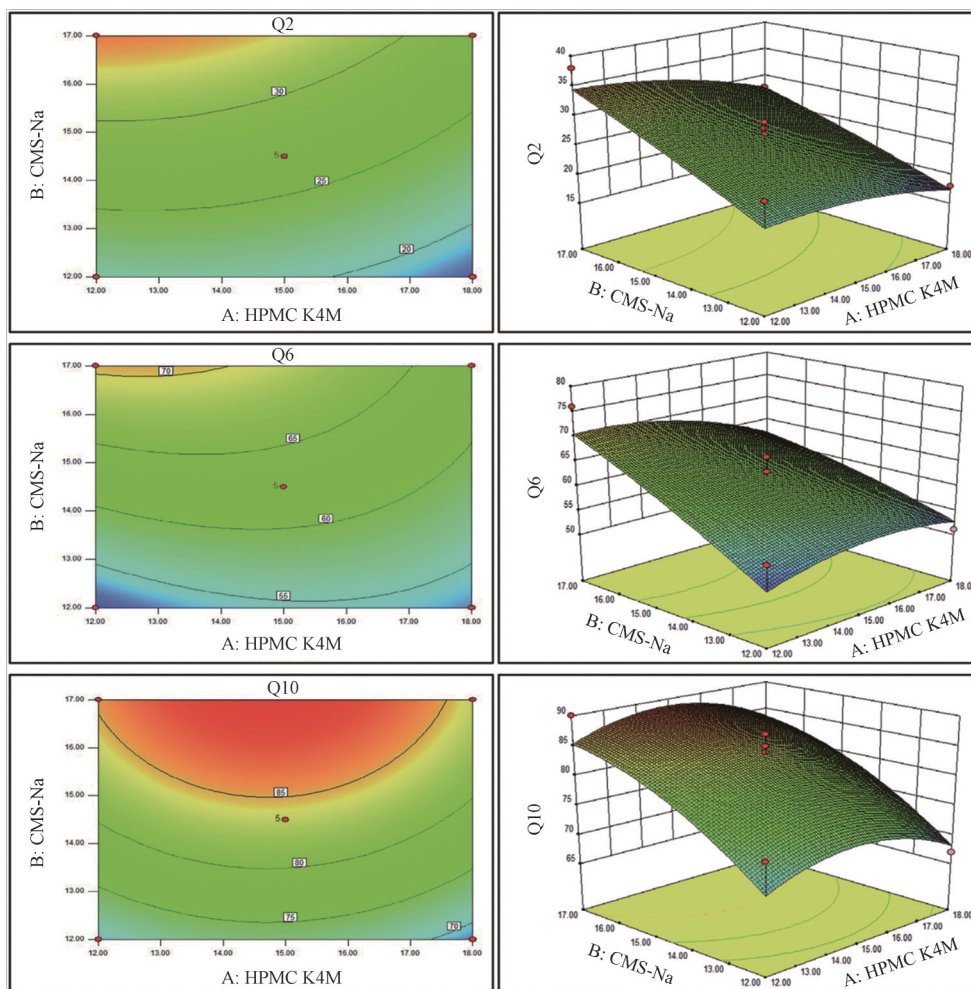


Figure 3 The response surface and contour lines of the percentage of cumulative release at 2, 6 and 10 h

Table 4 Analysis of variance. ^a: $P < 0.05$

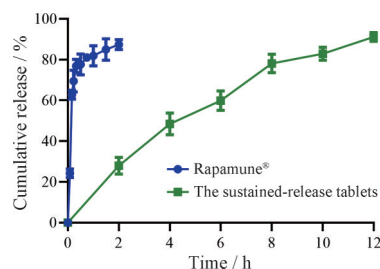
Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P-value Prob > F
Model	2 569.67	5	513.93	14.72	0.001 3 ^a
A-HPMC K4M	10.45	1	10.45	0.3	0.601 3
B-CMS-Na	1 080.72	1	1 080.72	30.96	0.000 8 ^a
AB	306.25	1	306.25	8.77	0.021
A ²	611.41	1	611.41	17.52	0.004 1
B ²	713.15	1	713.15	20.43	0.002 7
Residual	244.33	7	34.9		
Lack of fit	152.33	3	50.78	2.21	0.229 7
Pure error	92	4	23		
Cor total	2 814	12			

**Figure 4** The SRL-SMEDDS-SBA-15 sustained-release tablets

2、6、10 h 的累积释放百分率接近, 缓释效果良好, 证明处方优化成功。

7 自制缓释片与市售纳米结晶片的体外释放对比

采用篮法, 以 0.4% SDS 溶液为释放介质, 市售 SRL 片与自制缓释片的体外释放结果显示 (图 5), 市售制剂在 2 h 内即已释药完全, 而自制缓释片在 12 h 内具有良好的体外缓释效果。

**Figure 5** Drug release of the commercial tablets and the sustained-release tablets

8 体外释药模型拟合

自制缓释片的体外累积释放百分率 (Q) 与时间 (t) 的数据拟合结果 (表 5) 显示, 缓释片体外释药模型最接近 Ritger-Peppas 方程, 拟合结果分析, $n = 0.893 2$, 说明缓释片以骨架溶蚀为主。

9 物相鉴别

将 SRL、SBA-15、SRL-SMEDDS-SBA-15、含药缓

Table 5 Release equation

Model	Equation	r
Zero order equation	$Mt/M\infty = 0.075 4t + 0.167 2$	0.967 0
First order equation	$\ln(1 - Mt/M\infty) = -0.259 2t + 0.211 3$	0.953 6
Higuchi equation	$Mt/M\infty = 3.183t^{1/2} + 0.285$	0.980 1
Ritger-Peppas	$\log(Mt/M\infty) = 0.705\log t - 0.734 4$	0.991 7

释片粉末、空白缓释片粉末及物理混合物 (含药量为 20%) 分别进行 XRD 及 DSC 分析。

XRD 结果显示 (图 6A), 缓释片中 SRL 特征结晶峰除了位于 2θ 角小于 20° 区间内, 其余部分的结晶峰在一定程度上减弱或消失, 表明 SRL 在缓释片中以非结晶态存在。DSC 结果显示 (图 6B), SRL 在 190 及 200°C 处有 2 个特征衍射峰, 但在缓释片中该特征衍射峰消失, 表明缓释片中的 SRL 以无定形态存在。

10 比格犬体内药动学实验

6 条健康雄性 Beagle 犬的平均血药浓度-时间曲线 (图 7), 分别以受试制剂组和参比制剂组的平均血药浓度-时间数据作为主数据录入 WinNonlin 8.1 药动学程序进行处理, 计算非房室模型药物动力学参数, 结果显示 (表 6), 缓释片的达峰浓度 (C_{\max}) 小于市售制剂, 降低了 49.47%。但达峰时间 (T_{\max}) 明显推迟, 延长了 5.1 倍, 相对生物利用度为 105.81%。

由表 6 中所得出的结果, 对药动学参数 $AUC_{0\rightarrow 48\text{h}}$ 、 C_{\max} 进行两独立样本 t 检验, 使用非参数秩和检验对 T_{\max} 进行统计学分析, 均以 $P < 0.05$ 作为检验标准, 代入相应的公式, 结果显示两制剂的 T_{\max} 、 C_{\max} 都不相等, 差异具有统计学意义。但是, 二者曲线下面积 $AUC_{0\rightarrow 48\text{h}}$ 之间的差异不显著。

讨论

自微乳的存在没有造成缓释片表面不光滑的现象, 从侧面证明了介孔材料 SBA-15 的强吸附性能。此外, 相关文献^[19,20]提出猜想, 使用介孔材料 SBA-15 进行压片后, 其孔道结构是否会发生坍塌? 针对这一疑虑, 本课题组将受力压制成片后的 SBA-15, 研碎, 溶于无水乙醇中, 吹打分散, 烘干。BET 检测结果显示, 受力前后的 SBA-15 其孔径及比表面积大小无明显差异, 由此可见, 压片时的压力不会改变其孔道的大小, 进一步证实了用 SBA-15 作药物载体压制成片的可行性。介孔材料吸附药物的方式有多种, 如溶液浸渍法、溶剂挥发法、喷雾干燥法等^[21], 不同的吸附方式会影响药物的物相状态及释药情况, 不适宜的吸附方式会导致药物呈晶体状态或释药不完全^[22,23]。本课题采用制备简单的物理混合搅拌法, 研究结果表明固化后的药物呈非晶态, 有利于药物的释放及体内的吸收, 具有良好的

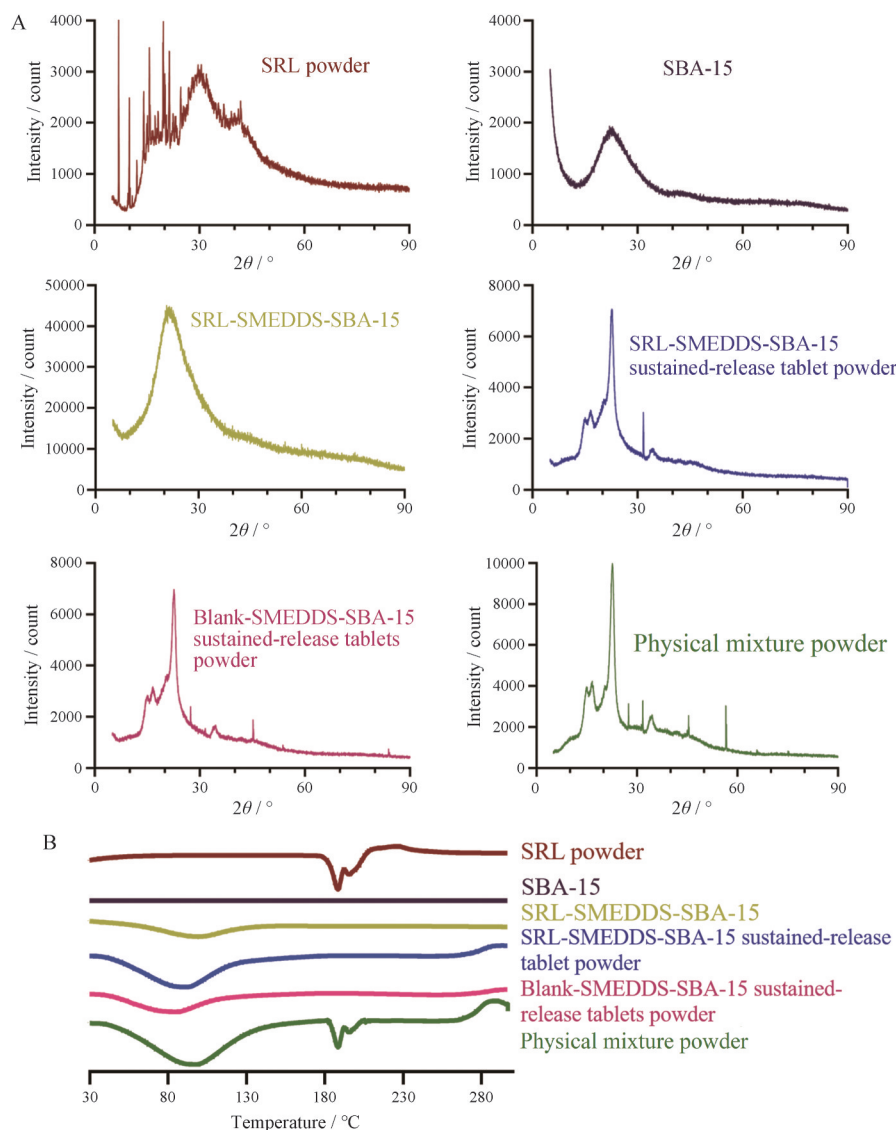


Figure 6 A: The X-ray diffraction (XRD) pattern of SRL-SMEDDS-SBA-15 sustained-release tablets. B: The differential scanning calorimetry thermograms (DSC) of SRL-SMEDDS-SBA-15 sustained-release tablets

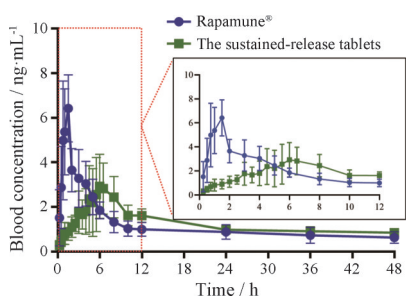


Figure 7 Blood concentration-time profiles of Rapamune® and SRL-SMEDDS-SBA-15 sustained-release tablets

体外、体内缓释效果。

本课题组^[24]前期分别考察 0.45 μm 微孔滤膜过滤法和离心法对 SRL 含量测定的影响, 结果表明微孔滤膜过滤法对含量测定的影响较大, 可能是部分载药乳

Table 6 Pharmacokinetic parameters after oral administration of Rapamune® and SRL-SMEDDS-SBA-15 sustained-release tablets. AUC: Area under blood concentration ; MRT: Mean retention time. $n = 6, \bar{x} \pm s. *P < 0.05$ vs Rapamune®

Parameter	Rapamune®	SRL-SMEDDS-SBA-15 sustained-release tablets
T_{max}/h	1.25 ± 0.25	6.42 ± 1.17*
$C_{max}/ng \cdot mL^{-1}$	6.55 ± 1.33	3.31 ± 1.26*
$AUC_{0 \rightarrow 48h}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	57.00 ± 15.56	60.31 ± 6.69
$AUC_{0 \rightarrow \infty}/ng \cdot h \cdot mL^{-1}$	96.82 ± 43.19	111.61 ± 16.70
$t_{1/2}/h$	39.04 ± 17.92	41.81 ± 8.27
MRT/h	16.36 ± 1.39	19.84 ± 1.37
Fr/%	105.81	

滴被吸附在微孔滤膜上, 而离心法对含量测定无明显影响, 且转速的大小和离心时间的长短所得出的检测结果无显著性差异。相关文献^[25]报道, 将药物或自微

乳吸附入有孔材料后会出现解吸不完全的现象,本研究中的自制缓释片 12 h 累积释药量约为 90%, 未完全释放可能与 SBA-15 的孔径较长、较深, 部分西罗莫司自微乳残留在孔道深处未接触到释放介质有关^[26]。

本课题组前期利用 MCC 吸附固化 SRL 自微乳, 再加入适宜的辅料, 直接压制成药片, 结果发现只有当液态自微乳与 MCC 比例为 1:9 时, 才能达到不黏冲, 且片剂外观光滑、完整的效果, 其未加崩解剂, 12 h 内仍具有良好的体外缓释效果^[8], 原因是该缓释片中的 MCC 含量高达 73%, 而 MCC 含量高时可达一定的崩解效果, 有助于缓释片中药物的扩散。本课题的自制缓释片, 其中的自微乳及介孔硅具有一定的润滑作用, 使其具备了良好的粉体学性质, 有利于粉末直接压片法制片。亲水凝胶骨架缓释片遇水后表面水化形成凝胶层, 水分随着时间不断渗入内部, 凝胶层不断增厚, 阻滞药物从骨架材料中释出, 从而达到控制药物释放的目的。本课题组考虑, 由于自微乳及介孔硅的存在, 导致缓释片粉末的结合力增强, 粉末间的空隙变小, 使缓释片自身难以冲破骨架材料吸水后所形成的凝胶层。此外, 介孔硅的孔道深且长, 所以需加入崩解剂使缓释片吸水溶胀, 孔道内的药物与释放介质充分接触, 最终得以缓慢释放。其中, 羧甲基淀粉钠的吸水膨胀效果显著, 吸水后膨胀率为原体积的 300 倍, 因此, 最终选择将其作为崩解剂, 有利于药物的释放。

综上所述, 本课题成功制备了 SRL 自微乳-介孔硅缓释片, 具有良好的体外及体内缓释特性, 由此可知, 利用自微乳提高难溶性药物的溶出度、介孔材料 SBA-15 克服自微乳液体制剂的缺陷, 再进一步制成其他剂型的方法具有一定的可行性, 为其他难溶性药物的增溶、自微乳的固化及缓释制剂的研发提供了新的思路和方法。

作者贡献: 宋洪涛和张倩提出实验整体研究思路; 黄雯婷负责主要实验操作、数据处理及文章撰写; 刘志宏和曾令军负责协助完成体内药动学研究; 张灵娜负责部分实验数据的分析。

利益冲突: 全体作者声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Zhang Y, Zhang X, Zou Y, et al. Population pharmacokinetics of sirolimus in Chinese adult liver transplant recipients: a retrospective study [J]. *Xenobiotica*, 2021, 51: 1408-1415.
- [2] Mathiyazhagan G, Hasan F, Chauhan P, et al. Spondyloenchondrodysplasia with immune dysregulation: role of sirolimus [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2022, 69: e29672.
- [3] Zhang X, Chen Z, Tao C, et al. Effect of surface property on the release and oral absorption of solid sirolimus-containing self-microemulsifying drug delivery system [J]. *AAPS PharmSci-Tech*, 2021, 22: 108.
- [4] Xia F, Chen Z, Zhu Q, et al. Gastrointestinal lipolysis and trans-epithelial transport of SMEDDS *via* oral route. [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 1010-1020.
- [5] Hu X, Lin C, Chen D, et al. Sirolimus solid self-microemulsifying pellets: formulation development, characterization and bio-availability evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2012, 438: 123-133.
- [6] Jannin V, Musakhanian J, Marchaud D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 734-746.
- [7] O'Driscoll CM, Griffin BT. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility--the potential impact of lipid-based formulations [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008, 60: 617-624.
- [8] Tao C, Wen X, Zhang Q, et al. Solid sirolimus self-microemulsifying drug delivery system: development and evaluation of tablets with sustained release property. [J]. *Iran J Pharm Res*, 2019, 18: 1648-1658.
- [9] Benzigar MR, Talapaneni SN, Joseph S, et al. Recent advances in functionalized micro and mesoporous carbon materials: synthesis and applications [J]. *Chem Soc Rev*, 2018, 47: 2680-2721.
- [10] Zhou Y, Quan G, Wu Q, et al. Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 165-177.
- [11] Zhang WJ, Chen W, Lu JW, et al. Preparation of functionalized SBA-15 mesoporous silica and its application in drug delivery system [J]. *Mater Rep (材料导报)*, 2022, 36: 55-65.
- [12] Christian A, Veronika W, Christoph B, et al. ChemInform abstract: multifunctional mesoporous silica nanoparticles as a universal platform for drug delivery [J]. *ChemInform*, 2014, 26: 435-451.
- [13] Dirk JARM, Henk-Jan G, Johan WDF. Sirolimus and everolimus in kidney transplantation [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20: 1243-1249.
- [14] Zhao D, Feng J, Huo Q, et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores [J]. *Science*, 1998, 279: 548-552.
- [15] Tao C, Chen JM, Huang AW, et al. Improvement of sirolimus in self-microemulsifying sustained release tablets [J]. *Chin J Hospit Pharm (中国医院药学杂志)*, 2017, 37: 1675-1679.
- [16] Zhang XT. Effect of Surface Property on the Release and Oral Absorption of Solid Sirolimus-containing Self-microemulsifying Drug Delivery System (不同表面修饰的介孔硅对西罗莫司自微乳的固化及其体内药动学研究) [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2021.
- [17] Foo KY, Hameed BH. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems [J]. *Chem Eng J*, 2010, 156: 2-10.

- [18] Tao C, Chen JM, Huang AW, et al. Preparation and *in vitro* dissolution of sirolimus self-microemulsifying sustained-release tablets [J]. Pharm J Chin Peoples Liber Army (解放军药学报), 2017, 33: 302-306.
- [19] Lai J, Lin W, Scholes P, et al. Investigating the effects of loading factors on the *in vitro* pharmaceutical performance of mesoporous materials as drug carriers for ibuprofen [J]. Materials (Basel), 2017, 10: 150.
- [20] Dening TJ, Zemlyanov D, Taylor LS. Application of an adsorption isotherm to explain incomplete drug release from ordered mesoporous silica materials under supersaturating conditions [J]. J Control release, 2019, 307: 186-199.
- [21] Maleki A, Kettiger H, Schoubben A, et al. Mesoporous silica materials: from physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs [J]. J Control Release, 2017, 262: 329-347.
- [22] Dadej A, Woźniakbraszak A, Bilski P, et al. Improved solubility of lornoxicam by inclusion into SBA-15: comparison of loading methods [J]. Eur J Pharm Sci, 2022, 171: 106-133.
- [23] Hong S, Shen S, Tan DCT, et al. High drug load, stable, manufacturable and bioavailable fenofibrate formulations in mesoporous silica: a comparison of spray drying *versus* solvent impregnation methods. [J]. Drug Deliv, 2016, 23: 316-327.
- [24] Yu Y. Research on Sirolimus-self-microemulsifying Drug Delivery System Loaded Mesoporous Silica (载西罗莫司自微乳介孔二氧化硅的研究) [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2017.
- [25] Hwang KM, Choi MS, Seok SH, et al. Development of self-microemulsifying tablets containing dutasteride for enhanced dissolution and pharmacokinetic profile [J]. Int J Pharm, 2022, 618: 121660.
- [26] Yu Y, Tao C, Yang HY, et al. Preparation of mesoporous silica nanoparticles in different pore size and its use in the solidification of sirolimus loaded self-microemulsifying drug delivery system [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 985-991.