

解放军武汉总医院药剂科 武汉 430070

(X_1), (X_2) 188 (X_3) (Y_1)、
(Y_2) (Y_3)
:
188 2.4:2.22:0.05。
R944.7 A 1008-049X 2018 06-1010-06

Formula Optimization of Bromhexine Hydrochloride Dry Powder Inhalations by Central Composite Design-response Surface Methodology

Li Yinke, Yang Xiaosong, Zhou Zihao, Shi Qiongzi, Chen Chen, Liao Xiangru, Chen Ying, Xie Xiangyang(Department of Pharmacy, Wuhan General Hospital of PLA, Wuhan 430070, China)

ABSTRACT Objective: To optimize the formula of bromhexine hydrochloride dry powder inhalations (BH DPIs). **Methods:** BH DPIs were prepared by freezing-drying combined with an air-jet milling method. Three factors, including the weights of mannitol (X_1), leucine (X_2) and poloxamer 188 (X_3) in the formula were known to be associated with the quality of BH DPIs. A central composite design was used to investigate the effects of the three factors on the response angle (Y_1), fine particle fraction (FPF, Y_3) and aerodynamic diameter (Y_4). Response surface and overlay contour plot were delineated according to the best-fit mathematic models. Optimum formula was selected by overlay contour plot. **Results:** The quantitative relationships between the three factors and the three responses were obtained. The optimal formula was mannitol : leucine : poloxamer 188 (2.4:2.22:0.05) in the excipients. The predicted and observed values of the optimum formula were similar. **Conclusion:** The multi-objective simultaneous optimization of the formula of BH DPIs is achieved by central composite design-response surface methodology.

KEY WORDS Bromhexine hydrochloride; Dry powder inhalations; Central composite design-response surface methodology; Fine particle fraction; Formula screening

盐酸溴己新(bromhexine hydrochloride, BH)是临床一线祛痰用药,主要用于急慢性支气管炎、哮喘、支气管扩张、肺气肿等呼吸道疾病的治疗。目前在国内上市的盐酸溴己新只有片剂和注射液两种剂型。而片剂给药后存在首关效应、经消化道吸收起效慢等问题;注射剂虽能直接入血、起效快,但却存

在给药不方便、不良反应大、依从性较差等问题^[1,2]。临床上常见将盐酸溴己新注射液采用雾化吸入方式给药治疗,虽然能提高了患者特别是小儿的依从性,但这实际上属于超说明书用药。因而临床上需要一种安全、有效的盐酸溴己新吸入制剂。

吸入给药技术被认为是主宰未来世界制剂市场

的四大新型给药技术之一^[3]。吸入剂可以直接将药物递送至肺部,起效快,代谢少,剂量小,因而发生不良反应概率低,患者依从性较好^[4]。按照中国药典 2015 年版规定,吸入制剂可分为吸入气雾剂、供雾化器用的液体制剂和吸入粉雾剂^[5]。与前两者相比,吸入粉雾剂具有显著优势:药物呈固体状态因而稳定性好,患者随时给药不受场地限制等^[6~8]。

本课题旨在开发盐酸溴己新吸入粉雾剂,满足临床用药需求。本文采用易于工业化生产的冷冻干燥-气流粉碎法制备了盐酸溴己新吸入粉雾剂,并采用星点设计-效应面法优化最佳处方。现报道如下。

1.1

岛津 LC-10AT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),MC-AO 型气流粉碎机(中国明春陶瓷机械有限公司),APS3321 型空气动力学粒径测定仪(美国 TSI 公司),870 型卡尔费休水分测定仪(瑞士万通公司),新一代药用撞击器(Next Generation Pharmaceutical Impactor,NGI,英国 Copley Scientific 公司),休止角测定仪(英国 Copley Scientific 公司),Aerolizer™ 干粉吸入装置(美国默克制药公司)。

1.2

盐酸溴己新(广州南沙琪宝制药有限公司,99.6%,批号:20160524),盐酸溴己新对照品(中国食品药品检定研究院,99.9%,批号:100427-201602),甘露醇(天津市博迪化工有限公司,批号:20141106),亮氨酸(天津市博迪化工有限公司,批号:150721),二次重蒸水(自制),甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯。

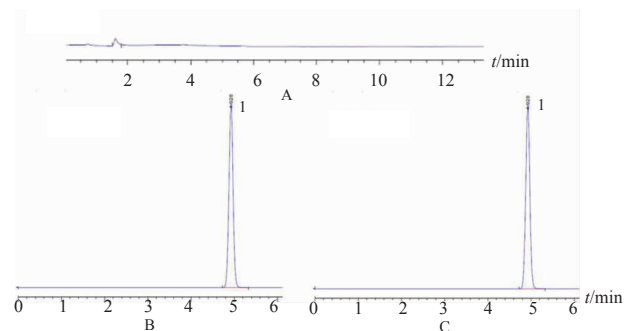
2.1

采用冷冻干燥-气流粉碎法制备盐酸溴己新吸入粉雾剂。先将盐酸溴己新、甘露醇及亮氨酸按处方比例混合溶解蒸馏水中,超声(180 W, 40 kHz)分散均匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤后,冷冻干燥处理(预冻 2 h, -40℃ 2 h, -20℃ 4 h, -10℃ 2 h, 5℃ 2 h, 15℃ 1 h, 共 13 h),得到混合均匀的含药粗粉末。然后将该粗粉末经过气流粉碎后(粉碎压力:0.6 MPa,进料压力:0.4 MPa),即得盐酸溴己新吸入粉雾剂含药粉末。将其装入 3 号胶囊即得盐酸溴己新吸入粉雾剂。

2.2

2.2.1 色谱条件^{9 10} 含量和有关物质测定的色谱条件相同。色谱柱:Phenomenex C₁₈ 柱(150 mm ×

4.6 mm, 5 μm);流动相:50 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(含 0.2% 三乙胺, pH 3.0)-甲醇(30:70);流速:1.0 ml · min⁻¹;检测波长:249 nm;柱温:室温;进样量:20 μl。色谱图见图 1。



A. 阴性样品 B. 对照品 C. 供试品 1. 盐酸溴己新
图 HPLC

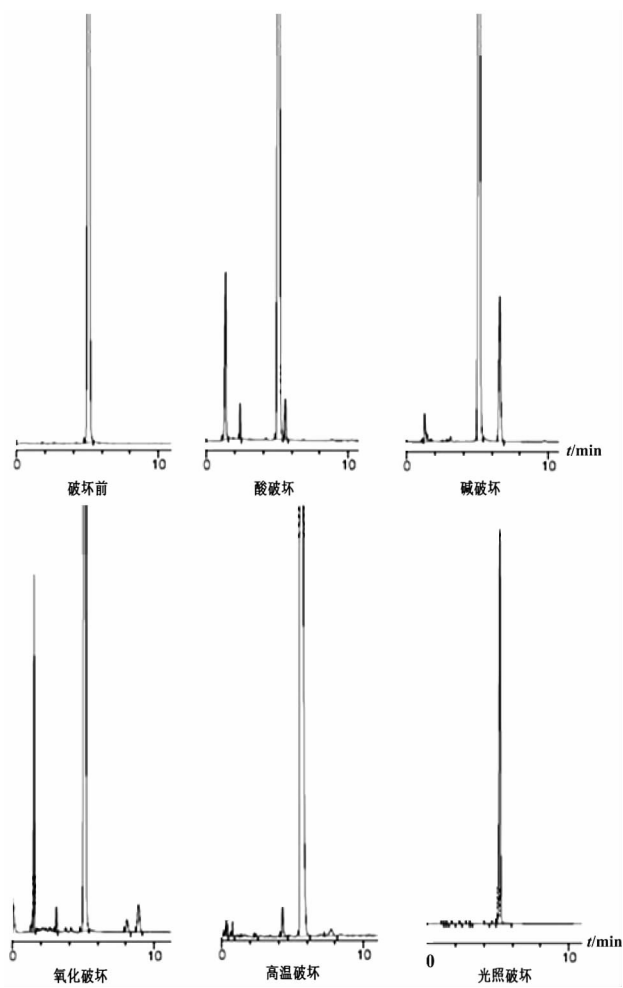
2.2.2 方法学考察 参照相关文献^[10]操作,以盐酸溴己新对照品溶液的质量浓度为横坐标,以其对应的色谱峰面积为纵坐标进行线性回归分析,得回归方程 $A = 23\,479C + 22\,140$ ($r = 0.999\,6$),表明盐酸溴己新质量浓度在 20 ~ 200 mg · L⁻¹ 呈线性关系;最低检测浓度为 50 ng · ml⁻¹;低、中、高浓度平均回收率为 98.95%, $RSD = 1.02\%$ ($n = 9$);精密度试验中 $RSD = 0.61\%$ ($n = 6$);溶液在 12 h 内稳定性良好, $RSD = 0.01\%$ ($n = 6$)。专属性考察结果见图 2。结果显示盐酸溴己新在各破坏条件下,各杂质峰和主峰均能达到基线分离。

2.2.3 样品含量测定 精密量取盐酸溴己新吸入粉雾剂适量(约相当于盐酸溴己新 10 mg),置 100 ml 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,吸取 20 μl 注入液相色谱仪,记录色谱图。另取盐酸溴己新对照品适量,用流动相溶解并稀释制成每 1 ml 含 80 μg 的溶液,同法测定,按外标法以峰面积计算含量。

2.2.4 样品有关物质检查 供试品溶液配制:精密量取盐酸溴己新吸入粉雾剂适量(约相当于盐酸溴己新 20 mg),置 50 ml 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。对照溶液配制:精密量取供试品溶液 1 ml,置 100 ml 量瓶中,加流动相稀释至刻度。精密量取上述两种溶液各 20 μl 分别进样,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍,按自身对照法计算有关物质。

2.3

空气动力学粒径是衡量吸入粉雾剂质量的重要指标之一。本文采用 APS3321 型空气动力学粒径测定仪测定本品粉末的空气动力学粒径(Aerodynamic diameter)。



2.4

盐酸溴己新吸入粉雾剂的休止角是由休止角测试仪测量的。通过测定锥形物料顶部到底部的高度和底部圆盘的半径,进而计算休止角。计算公式: $\tan\theta = h/r$ (H: 高度,单位为 mm; r: 半径,单位为 mm)。

2.5

按照中国药典 2015 年版中“吸入制剂微细粒子空气动力学特性测定法”(通则 0951)的规定,本文采用“装置 3”(NGI)检查盐酸溴己新吸入粉雾剂的细微粒子剂量。设定流速为 $(60 \pm 5) \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,设置的吸入时间为 4s。在 Aerolizer™ 干粉吸入装置中放入一粒盐酸溴己新吸入粉雾剂胶囊,刺破胶囊,插入适配器中进行测定,4 s 后取下 Aerolizer™ 吸入装置。用流动相作为洗液分别对 NGI 中各部位的粉末进行清洗,将洗液分别收集,HPLC 法测定。

2.6 [11]

在前期试验的基础上,确定盐酸溴己新与辅料的比例为 1:4,即处方中含 20% 的盐酸溴己新。对于辅料中各成分的用量,本文按照星点设计的要求,

采用 Design Expert 8.0.6 软件设计试验,在前期单因素考的基础上对甘露醇(X_1)、亮氨酸(X_2)和泊洛沙姆 188(X_3)的用量进行优化。以休止角(Y_1)、细微粒子剂量(Y_2)和空气动力学粒径(Y_3)作为考察指标。采用冷冻干燥-气流粉碎法制备盐酸溴己新吸入粉雾剂并对各考察指标进行评价。表 1 为各因子及相应的水平。其中的 -1.682, -1,0,1,1.682 分别代表 5 个水平,这种方式称为代码形式。各代码对应了相应的实验数值。表 2 为按照代码编排的各组试验条件及其结果。

因素	水平				
	-1.682	-1	0	+1	+1.682
X_1 :甘露醇(% , w/v)	0.58	1.40	2.60	3.80	4.62
X_2 :亮氨酸(% , w/v)	0.15	0.80	1.75	2.70	3.35
X_3 :泊洛沙姆 188(% , w/v)	0	0.05	0.13	0.20	0.25

采用 Design Expert, 8.0.6 软件通过以下模型对试验数据进行非线性拟合:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{12} X_1 X_2 + b_{23} X_2 X_3 + b_{13} X_1 X_3 + b_{11} X_{12} + b_{22} X_{22} + b_{33} X_{32}$$

式中,Y 代表考察指标, $X_1 \sim X_3$ 代表影响因子, b_0 代表截距, b_i 代表各影响因子的系数。试验数据的模型拟合结果见表 3。根据拟合方程,将次要的因素固定在某一水平,绘制考察指标与影响因子之间的三维图(如图 3 所示)。应用变异系数(ANOVA)来评价回归方程或系数的显著性,结果见表 3。由结果可知,各多元二次方程拟合效果良好,均有显著差异($0.01 < P < 0.05$)。其中细微粒子剂量(Y_2)和空气动力学粒径(Y_3)的方程具有极显著性($0.001 < P < 0.01$)。

图 3 A 是亮氨酸(X_2)和泊洛沙姆 188(X_3)在辅料中的比例对吸入粉雾剂休止角(Y_1)的三维效应面。休止角是反映粉末流动性的一个重要指标。休止角较小,说明粒子之间的摩擦力较小,一般休止角小于或等于 40° 的粉末流动性较好。由图中可以看出,随着处方中亮氨酸用量(X_2)的增加,休止角(Y_1)逐渐减少。泊洛沙姆 188(X_3)的加入可降低粉末粒子之间的静电作用,减少粒子间的聚集,提高制剂的流动,但不是用量越多越好。亮氨酸和泊洛沙姆 188 的加入降低了粉末的休止角,增加了粉末的流动性。

图 3B 是甘露醇(X_1)和亮氨酸(X_2)在辅料中的比例对吸入粉雾剂细微粒子剂量(Y_2)的三维效应面。由图可以看出,处方中亮氨酸(X_2)对细微粒子剂量(Y_2)的影响作用比甘露醇(X_1)大,随着亮氨酸(X_2)用量的增加,细微粒子剂量(Y_2)是先增大后

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁ (°)	Y ₂ (%)	Y ₃ (μm)
1	-1	-1	-1	35.6	51.585	3.08 ± 0.02
2	+1	-1	-1	36.7	52.691	3.09 ± 0.06
3	-1	+1	-1	40.9	37.724	4.64 ± 0.02
4	+1	+1	-1	47.8	33.691	5.35 ± 0.09
5	-1	-1	+1	44.6	34.036	4.19 ± 0.13
6	+1	-1	+1	41.8	2.008	8.06 ± 0.43
7	-1	+1	+1	35.6	48.302	3.09 ± 0.23
8	+1	+1	+1	37.8	58.492	2.84 ± 0.04
9	-1.682	0	0	46.3	61.247	1.88 ± 0.03
10	+1.682	0	0	38.5	51.556	3.22 ± 0.03
11	0	-1.682	0	36.5	52.304	3.05 ± 0.35
12	0	+1.682	0	35.5	51.887	3.04 ± 0.34
13	0	0	-1.682	34.8	52.614	3.11 ± 0.04
14	0	0	+1.682	47.4	38.233	4.42 ± 0.09
15	0	0	0	33.7	46.481	3.29 ± 0.03
16	0	0	0	36.5	48.973	3.77 ± 0.03
17	0	0	0	43.6	24.765	5.48 ± 0.05
18	0	0	0	36.2	52.049	3.05 ± 0.28
19	0	0	0	38.6	52.456	3.06 ± 0.24
20	0	0	0	45.6	47.278	3.03 ± 0.03

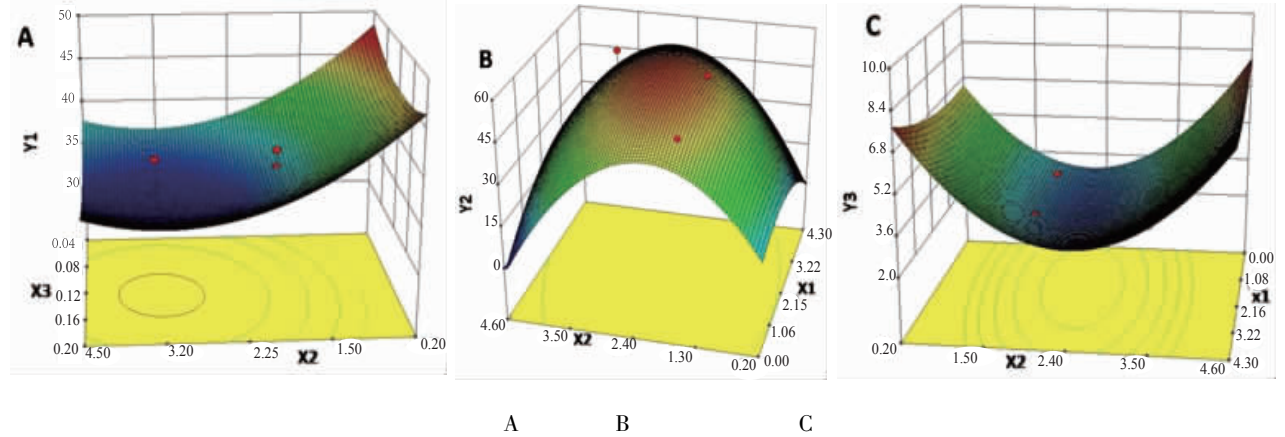
模型	R ²	F	P
Y ₁ = 36.53 + 1.41X ₁ - 3.49 X ₂ - 0.85X ₃ + 1.11X ₁ X ₂ - 1.14X ₂ X ₃ + 0.088X ₁ X ₃ + 1.17X ₁₂ + 1.06X ₂₂ + 2.41X ₃₂	0.9222	4.54	0.0135
Y ₂ = 52.05 - 2.97X ₁ + 11.03X ₂ - 4.62X ₃ + 2.43X ₁ X ₂ - .07X ₂ X ₃ + 3.83X ₁ X ₃ - 3.18X ₁₂ - 7.04X ₂₂ - 0.24X ₃₂	0.9936	7.76	0.0018
Y ₃ = 3.07 + 0.29X ₁ - X ₂ + 0.62X ₃ - 0.12X ₁ X ₂ - 0.066X ₂ X ₃ - 0.38X ₁ X ₃ + 0.16X ₁₂ + 0.79X ₂₂ + 2.41X ₃₂	0.8302	8.37	0.0013

减小的趋势,趋势比较明显。亮氨酸(X₂)用量的增加能够提高粉末的流动性和分散性,可能是因为亮氨酸支链的存在,在液滴表面的亮氨酸分子中其酰胺基部分即亲水性部分面向水相即内部,其异丁基部分即疏水性部分面向空气层,当发生瞬间水分蒸发的过程中就会形成一个薄膜^[8]。适量的亮氨酸的存在,可以在液滴的表面形成薄膜外壳,在蒸发干燥的过程发生坍塌,形成褶皱,减小粒子之间的粘连。随着亮氨酸用量的增加,在粒子表面形成了不

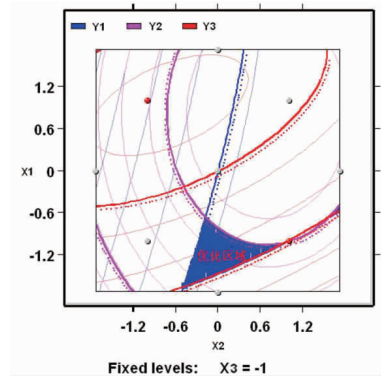
同程度的褶皱,一定程度的褶皱减小了粒子之间的接触面积,从而提高了吸入粉雾剂的分散性和细微粒子剂量。

图 3 C 是甘露醇(X₁)和亮氨酸(X₂)在辅料中的比例对吸入粉雾剂空气动力学粒径(Y₃)的三维效应面。通常认为粉末的空气动力学粒径在 1-5μm 范围内时比较适合肺部给药^[12]。由图可以看出,随着处方中甘露醇(X₁)和亮氨酸(X₂)用量的增加,粉末的空气动力学粒径(Y₃)先减小后增加,亮氨酸和甘露醇在一定范围内,粉末的空气动力学粒径较小。2.7

理想的吸入粉雾剂应该具有良好的流动性(休止角≤40°)、较高的细微粒子剂量(细微粒子剂量>10%)和较小的空气动力学粒径(粒径在 1~5 μm)。结合试验结果确定了优化指标的目标值为:休止角<40°,细微粒子剂量>30%,空气动力学粒径<3 μm。将 X₃的水平固定在-1,绘制因素 X₁和



X_2 对指标 $Y_1 \sim Y_3$ 的重叠等高线图,得到了能同时满足上述条件的优化区域(见图4)。从优化区域中选定各因素的水平,即优化处方为甘露醇的用量为2.4% (w/v),亮氨酸的用量为2.22% (w/v),泊洛沙姆188的用量为0.05% (w/v)。



根据优化的处方制备盐酸溴己新吸入粉雾剂,并测定其休止角、细微粒子剂量和空气动力学粒径,结果显示实测值与预测值非常接近(见表4),采用效应面法多目标同步优化盐酸溴己新吸入粉雾剂的处方达到了预期的效果。

因素	最优处方		
X_1 :甘露醇(% , w/v)	2.40		
X_2 :亮氨酸(% , w/v)	2.22		
X_3 :泊洛沙姆188(% , w/v)	0.05		
期望值	0.942		
响应	预测值	实测值	差异
Y_1 :休止角($^{\circ}$)	37.48	38.14	0.66
Y_2 :细微粒子剂量(%)	38.02	38.54	0.52
Y_3 :空气动力学粒径(μm)	2.259	2.346	0.087

2.8

按上述优化处方条件制备三批盐酸溴己新吸入粉雾剂进行工艺验证试验,结果见表5。结果表明,盐酸溴己新吸入粉雾剂的处方重新性良好。

批次	含量(%)	有关物质(%)	空气动力学粒径(μm)	细微粒子剂量(%)
1	100.12	0.38	3.86 ± 0.54	38.42
2	99.86	0.42	3.78 ± 0.76	37.97
3	99.62	0.41	4.02 ± 0.51	37.92

本文在前期研究中,对肺部吸入给药常用的糖类、氨基酸类、以及表面活性剂的种类进行了考察。以所制备的粉体的粒径和收率为主要考察指标,通过试验最终确定了甘露醇、亮氨酸、泊洛沙姆188作为盐酸溴己新吸入粉雾剂的辅料且盐酸溴己新与辅料的比例为1:4。其中各辅料的用量为:甘露醇的

用量为2.4% (w/v),亮氨酸的用量为2.22% (w/v),泊洛沙姆188的用量为0.05% (w/v)。

在前期研究中,发现若直接采用气流粉碎法制备盐酸溴己新吸入粉雾剂,则必须在粉碎前将各种物料混合均匀。由于泊洛沙姆188在处方中的用量较小(0.05% , w/v),因而给物料混合操作带来了较大困难。此外,采用直接气流粉碎法制备的粉末粒径较大,需要在较大气流粉碎压力(1 MPa)下多次粉碎才能达到所需的粒径,这就导致本品收率偏低,而且流动性也不理想。而将各物料先溶解于水溶液中后,经过冷冻干燥处理,所形成的粗粉中各物料已混合均匀,且粒径均一。此粗粉可以在较小的气流粉碎压力(0.6 MPa)下即可达到较为理想的粉末粒径,而且粉末收率较高,流动性较好。因此,最终选择了冷冻干燥-气流粉碎法制备盐酸溴己新吸入粉雾剂。吸入粉雾剂的处方工艺常涉及到多指标同步优化的问题,

吸入粉雾剂由于涉及到粉体学和药学等多种因素,其处方筛选往往需要多个指标同步优化,以往多采用综合评分法处理,这种方法比较粗略,目前更科学、更先进的优化方法是根据效应曲线的图像进行判断^[13]。本文通过星点设计-效应面法建立了三个影响因素(甘露醇、亮氨酸和泊洛沙姆188)与三个考察指标响应值(休止角、细微粒子剂量和空气动力学粒径)的数学模型,利用重叠等高线法实现了盐酸溴己新吸入粉雾剂的多指标优化,这种优化的方法值得进一步应用于新型给药系统的处方和工艺优化研究中。

- 1 任亚超. 盐酸氨溴索干粉吸入剂的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学硕士学位论文, 2008
- 2 任亚超, 王蕾, 孟康康, 等. 盐酸氨溴索干粉吸入剂的制备工艺[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(7): 519-523
- 3 郭娜. 扎那米韦干粉吸入剂的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学硕士学位论文, 2012
- 4 凌祥, 沈雁, 孙春萌, 等. 肺部给药研究近况[J]. 药学研究, 2014, 12(33): 711-714.
- 5 中国药典[S]. 2015年版. 四部. 13-14
- 6 Cai XS, Yang Y, Xie X, et al. Preparation, characterization and pulmonary pharmacokinetics of a new inhalable zanamivir dry powder [J]. Drug Delivery, 2016, 23(6): 1962-1971
- 7 Yang Y, Yang ZW, Ren YF, et al. Effects of formulation and operating variables on zanamivir dry powder inhalation characteristics and aerosolization performance[J]. Drug Delivery, 2014, 21(6): 480-486
- 8 Cook RO, Pannu RK, Kellaway IW. Novel sustained release microsphere for pulmonary drug delivery[J]. J Control Release, 2005, 104 (1): 79-90

- 9 孙莉. HPLC 法测定盐酸溴己新注射液含量及有关物质[J]. 安徽医药, 2008, 12(2): 121-122
- 10 刘素英, 冯素香, 黄国稠, 等. 高效液相色谱法测定盐酸溴己新片的含量[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(2): 162-168
- 11 蔡兴诗. 扎那米韦粉雾剂的研究[D]. 武汉: 武汉工程大学硕士学位论文, 2015
- 12 Duret C, Wauthoz N, Merlos R, et al. In vitro and in vivo evaluation of a dry powder endotracheal insufflator device for use in dose-dependent preclinical studies in mice [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2012, 81: 627-634
- 13 Cai XS, Yang Y, Xie XY, et al. Preparation, characterization and pulmonary pharmacokinetics of a new inhalable zanamivir dry powder [J]. Drug Delivery. 2016, 23(6): 1962-1971
- (2018-01-06 收稿 2018-03-17 修回)