

- [10] Wang Y, Shi L, Song F R, *et al.* Exploring the ester exchange reactions of diester diterpenoid alkaloids in the acornite decoction process by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 2003, 17

(4): 279-284

- [11] Wang S C, Huang C M, Tung S T. Determinations of geniposide using LC/MS/MS methods via forming ammonium and acetate adducts [J]. *Microchem J*, 2007, 86: 174-182

连翘种子油的自乳化释药系统制备和体外评价研究

魏希颖, 徐慧娴, 杨小军, 井明博*

(陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要:目的 制备连翘种子油自乳化释药系统, 并进行体外评价。方法 通过溶解度试验、正交筛选和相图绘制, 以体外乳化效果、乳化平衡时间、乳剂粒径大小及分布为指标, 筛选最佳处方并找出自乳化区域。通过考察该制剂的乳滴形态、粒径大小、分布、 ξ 电位、自乳化速度以及稳定性来进行体外评价。结果 最佳处方组成为连翘种子油 聚山梨酯 80 乙醇(45: 41: 14), 乳化后乳滴呈规则的圆形, 分布均匀, 有效粒径 90.9 nm, 自乳化速度快, 5 min 之内达到平衡, 强光、低温、冷热交替放置 10 d 以及长时间室温放置 3 个月条件下稳定性良好。结论 连翘种子油自乳化释药系统制备工艺简单, 性质稳定, 方便吸收, 易于生产。

关键词: 连翘种子油; 自乳化释药系统; 体外评价

中图分类号: R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)08-1292-04

连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 为木犀科连翘属落叶灌木, 具有清热解毒、消肿散结之功效, 主治痈疽、乳痈、丹毒、风热感冒、高热烦渴、神昏发斑、热淋尿闭等症。连翘传统用药部位是果壳, 种子多废弃不用或产地农民作为燃料使用。连翘种子占全果实质量的 35%~40%, 其中脂肪油的量有 33%, 挥发油在 4% 以上^[1]。其挥发油中主要成分为 α -蒎烯 15.79%, β -蒎烯 60.2%, 伞花烃 3.5%, 芳樟醇 6.0%^[2]。 β -蒎烯具有抗大肠杆菌 O₁₅₇ 作用^[3], 对回肠有解痉挛作用^[4], 抗炎、抗氧化、雌激素样活性^[5], 以及抑制局部膜电位作用^[6]; α -蒎烯具有抑制白色念珠菌胞壁中的几丁质、多糖及胞膜上麦角固醇和核酸 DNA 及 RNA 的生物合成作用^[7]。连翘种子油对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠球菌等有很好的抑制作用^[8], 对啤酒酵母、产黄青霉、黑曲霉 3 种真菌亦有明显抑制作用^[9], 同时具有良好的抗京科 68-1 株病毒和仙台株病毒感染作用^[10]。连翘种子油是一种口服难溶性油, 在临床上如果采用通常的口服给药形式, 药物的生物利用度不高, 其疗效会受到限制。

自乳化释药系统(self-emulsifying drug delivery systems, SEDDS)是由药物、油相(oil)、表面活性剂(surfactant, SA)和辅助表面活性剂(co-surfactant,

CoSA)形成的口服固体或液体给药系统, 该系统在体外 37℃ 水浴, 温和搅拌下或体内胃肠道的蠕动下自发形成粒径在 5 μ m 以下的油/水(O/W)型乳剂。SEDDS 的最大优点是粒径小、溶液澄清透明, 药物增溶量大, 制剂更稳定^[11]。药物可快速地分布于整个胃肠道中, 提高药物的生物利用度, 同时避免对胃肠道的不良刺激^[12]。

本实验通过对 SA 和 CoSA 等的选择, 制备出连翘种子油 SEDDS, 并在体外进行多方面的考察, 为连翘种子油的临床应用方式提供一定的实验依据。

1 材料与仪器

连翘种子油购自江西吉水县康民本草药用油提炼厂。聚山梨酯 80、OP、TX-10、聚山梨酯 85、Span 80 均为化学纯; 无水乙醇、甘油、异丙醇、PEG 400、1,2-丙二醇以及 15% 苏丹 II 饱和溶液、香柏油、二甲苯均为分析纯。

BP221s 型电子分析天平, 德国赛多利斯公司; XH-B 型旋涡混匀器, 江苏省姜堰市康健医疗器械有限公司; TGL-16G 型台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; HH-8B 数显恒温水浴箱, 国华电器有限公司; TU-1810 型紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 全自动菌落分析仪, 杭州讯数科技有限公司; 90 Plus Particle Size Analyzer,

* 收稿日期: 2009-10-13

作者简介: 魏希颖(1969-), 女, 副教授, 陕西西安人, 主要研究方向向中药新制剂及新技术。

Tel: (029) 85310266 E-mail: xiyingwei@snnu.edu.cn

BIC. Brookhaven Instruments Corporation; H-600 透射式电子显微镜, 日本日立公司; Nano-ZS 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国 MALVERN 公司。

2 方法与结果

2.1 溶解度试验: 准确称取连翘种子油 1 g, 分别与等量聚山梨酯 80、OP、TX-10、聚山梨酯 85、Span 80、无水乙醇、甘油、异丙醇、PEG 400、1,2-丙二醇混合, 涡旋混匀, 3 500 r/min 离心 1 min, 观察连翘种子油的溶解程度。连翘种子油与聚山梨酯 80、OP、TX-10、聚山梨酯 85、Span 80、无水乙醇、甘油、异丙醇、PEG400、1,2-丙二醇均能很好的相溶, 离心后无分层或浑浊现象出现。

2.2 处方试剂筛选: 参考相关文献报道^[13-16], 设计 2 个因素 5 个水平正交试验表, 将连翘种子油、SA、CoSA 按 5: 5: 1 的质量比例混合, 涡旋混匀, 分别取 0.1 g, 加入到 10 mL 置于 37 ℃水浴 pH 值为 2~2.5 的蒸馏水中, 肉眼观察各组制剂的乳化效果。

选出乳化效果较好的实验组, 从中吸取 0.1 g, 滴入盛有 30 mL 蒸馏水的烧杯中, 从滴入时刻起分别在 0、5、10、15、20、25 min 内取样测其于 600 nm 处的透光率, 确定各组乳化平衡时间。再筛选乳化平衡时间小于 25 min 的试验组, 在 100 倍油镜下观察乳剂的分散情况及粒径大小, 据此找出最佳配方。以体外乳化效果、乳化平衡时间、乳剂粒径大小及分布 3 项指标对处方进行综合评价, 利用正交设计助手 II 进行直观分析。评分标准: 总分 100 分。乳化程度分为乳化(33 分)、部分乳化: 有沉淀、分层(16.5 分)、不乳化(0 分); 乳化速率 10、15、20、25 min 分别是 33、23、13、3 分, > 30 min 为 0 分; 乳滴粒径 < 3.0 μm 为 33 分, > 3.0 μm 为 23 分, > 5.0 μm 为 13 分, 无法测定为 0 分。实验结果表明: 当 SA 为聚山梨酯 80, CoSA 为乙醇时乳化效果最好, 乳液均一透明, 有淡蓝色乳光, 乳化平衡时间短, 乳化速度快, 粒径最小且分布均匀。由此, 最佳处方组成应为: 连翘种子油、聚山梨酯 80、乙醇。结果见表 1。

表 1 正交表 L₂₅(5³) 试验设计及结果表

Table 1 Design and results of L₂₅(5³) orthogonal test

试验号	因 素		结 果			
	SA	CoSA	乳化程度	平衡时间/min	乳剂粒径/μm	综合评分
1	聚山梨酯 80	乙醇	乳化	8±1	1.093	100
2	聚山梨酯 80	甘油	乳化	> 30	3.070	56
3	聚山梨酯 80	异丙醇	乳化	13±1	1.235	90
4	聚山梨酯 80	聚乙二醇	乳化	21±1	5.020	50
5	聚山梨酯 80	1,2-丙二醇	乳化	15±1	5.530	60
6	OP	乙醇	乳化	> 30	—	23
7	OP	甘油	乳化	> 30	—	20
8	OP	异丙醇	乳化	> 30	—	28
9	OP	聚乙二醇	乳化	> 30	—	22
10	OP	1,2-丙二醇	乳化	> 30	—	22
11	TX-10	乙醇	有沉淀	> 30	—	17
12	TX-10	甘油	有沉淀	> 30	—	18
13	TX-10	异丙醇	有沉淀	> 30	—	19
14	TX-10	聚乙二醇	有沉淀	> 30	—	17
15	TX-10	1,2-丙二醇	有沉淀	> 30	—	17
16	聚山梨酯 85	乙醇	分层	—	—	16
17	聚山梨酯 85	甘油	分层	—	—	16
18	聚山梨酯 85	异丙醇	分层	—	—	16
19	聚山梨酯 85	聚乙二醇	分层	—	—	16
20	聚山梨酯 85	1,2-丙二醇	分层	—	—	16
21	Span 80	乙醇	不乳化	—	—	0
22	Span 80	甘油	不乳化	—	—	0
23	Span 80	异丙醇	不乳化	—	—	0
24	Span 80	聚乙二醇	不乳化	—	—	0
25	Span 80	1,2-丙二醇	不乳化	—	—	0
均值 1	71.200	31.200				
均值 2	23.000	24.000				
均值 3	17.600	30.600				
均值 4	16.000	21.000				
均值 5	0.000	23.000				
极差	71.200	10.200				

—表示超出所测范围

- out of detection range

2.3 处方三相图的绘制: 在确定配方后, 以连翘种子油、聚山梨酯 80、乙醇三相作三相图, 分别同上考察体外乳化效果、乳化平衡时间、乳剂粒径大小及分布, 绘出自乳化区域, 再据此找出最佳处方配比。见表 2。结果表明: 当连翘种子油的质量分数在 40%~50% 时, 乳化剂的质量分数在 37.5%~52.5% 时, 助乳剂的质量分数在 5%~15% 时, 有较好的乳化效果。当连翘种子油、聚山梨酯 80、乙醇比例为 45:41:14 时, 即聚山梨酯 80 与乙醇质量分数比约为 3:1, 混合乳剂与油以 11:9 混合时, 乳化效果最好, 粒径最小且分布均匀, 由此, 处方最佳配比应为: 连翘种子油、聚山梨酯 80、乙醇比例为 45:41:14。用 Origin75 软件绘制三相图, 结果见图 1。

表 2 三相图处方设计表

Table 2 Formulation design of three phase diagram

聚山梨酯 80: 乙醇	油所占质量分数					
	20%	30%	35%	40%	45%	50%
3: 1	0.200	0.300	0.350	0.400	0.450	0.500
	0.600	0.525	0.485	0.450	0.410	0.375
	0.200	0.175	0.165	0.150	0.140	0.125
5: 1	0.200	0.300	0.350	0.400	0.450	0.500
	0.665	0.585	0.540	0.500	0.455	0.415
	0.135	0.115	0.110	0.100	0.095	0.085
7: 1	0.200	0.300	0.350	0.400	0.450	0.500
	0.700	0.615	0.570	0.525	0.480	0.435
	0.100	0.085	0.080	0.075	0.070	0.065
9: 1	0.200	0.300	0.350	0.400	0.450	0.500
	0.720	0.630	0.585	0.540	0.495	0.450
	0.080	0.070	0.065	0.060	0.055	0.050
1: 1	0.200	0.300	0.350	0.400	0.450	0.500
	0.400	0.350	0.325	0.300	0.275	0.250
	0.400	0.350	0.325	0.300	0.275	0.250
4: 3	0.200	0.300	0.350	0.400	0.450	0.500
	0.455	0.400	0.370	0.340	0.310	0.285
	0.345	0.300	0.280	0.260	0.240	0.215
9: 5	0.200	0.300	0.350	0.400	0.450	0.500
	0.515	0.450	0.415	0.380	0.350	0.320
	0.285	0.250	0.235	0.220	0.200	0.180

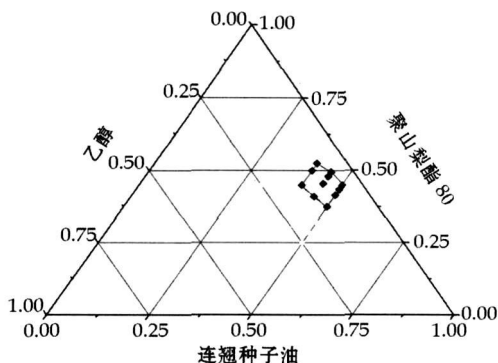


图 1 SEDDS 三元相图

Fig 1 Three phase diagram of SEDDS

2.4 连翘种子油 SEDDS 体外评价

2.4.1 粒径大小与分布测定: 取连翘种子油 SEDDS, 加入 37 ℃ 水浴 pH 值为 2~2.5 的蒸馏水, 稀释 100 倍, 轻微振荡, 测其粒径大小及分布。连翘种子油 SEDDS 有效粒径大小为 90.9 nm, 呈对数正态分布。结果见图 2。

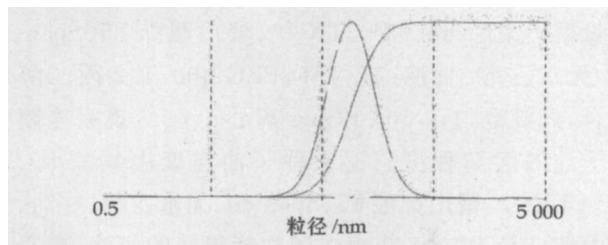


图 2 SEDDS 粒径大小及分布

Fig 2 Size and distribution of SEDDS

2.4.2 乳滴形态观察: 取连翘种子油 SEDDS, 加入 37 ℃ 水浴 pH 值为 2~2.5 的蒸馏水, 稀释 40 倍, 取适量用 1% 磷钨酸负染, 于透射电镜下观察乳滴形态。可看出乳滴呈规则的圆形, 大小均等, 分散均匀。结果见图 3。

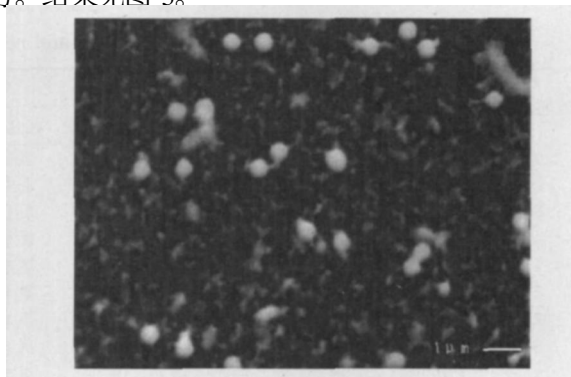


图 3 SEDDS 的 TEM 照片

Fig 3 TEM Photomicrography of SEDDS

2.4.3 ξ 电位的测定: 取连翘种子油 SEDDS, 加入 37 ℃ 水浴 pH 值为 2~2.5 的蒸馏水, 稀释 50 倍, 轻微振荡, 用 Zeta 电位分析仪测其 ξ 电位。Zeta 电位分析仪测得连翘种子油 SEDDS 的电导率为 1.419 ms/cm, ξ 电位为 $-(6.522 \pm 5.287)$ mV。

2.4.4 自乳化速度测定: 取连翘种子油 SEDDS 0.1 g, 加入到 30 mL, 37 ℃ 水浴 pH 值为 2~2.5 的蒸馏水中, 轻微振荡, 于 1、5、10、15、20、25、30 min 定时取样, 于 600 nm 处测定吸光度(A)。以 30 min 测得的 A_0 值作为 100%, 各时间点的 A 对时间做图。当乳剂形成时溶液的浊度会不断增加, 而透光率则下降, 当透光率不再变化, 表示乳化达到平衡。结果表明: 优选出的自乳化处方 5 min 内已基本乳化完全。见图 4。

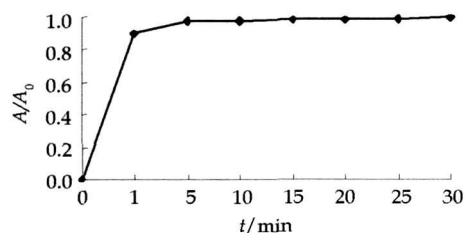


图 4 SEDDS 自乳化速度

Fig 4 Self emulsifying velocity of SEDDS

2.4.5 稳定性测定: 连翘种子油 SEDDS 分别在 4 000 lx 强光照射条件, 4 °C 低温条件, 60 °C 高温条件以及 4 °C、37 °C 每 12 h 改变一次温度的冷热循环条件下放置 10 d 和室温条件下放置 3 个月后, 取出, 观察外观, 考察体外乳化效果、乳化平衡时间、100 倍油镜下的乳剂粒径大小及分布, 并与 0 d 比较。用肉眼观察及实验检测后比较发现, 低温条件和冷热循环条件 10 d 后以及室温放置 3 个月后的连翘种子油 SEDDS 与 0 d 的并无明显区别; 强光照射条件下 10 d 后的连翘种子油 SEDDS 外观颜色与 0 d 相比稍淡, 其余指标并无明显区别; 高温条件 10 d 后的连翘种子油 SEDDS, 外观颜色变深, 体外乳化效果差, 乳化速率变慢。

3 讨论

自乳化释药系统的关键在于处方的筛选, 本研究研究对象为连翘种子油, 在对其 SEDDS 释药系统研究过程中, 为了简化处方, 油相取药物本身, 仅对 SA 及 CoSA 进行筛选。以体外乳化效果、乳化平衡时间、乳剂粒径大小及分布 3 项作为综合评价指标, 利用正交设计助手 II 进行直观分析, 筛选出最佳处方组成, 并进一步设计各相配比, 通过 Origin 7.5 软件绘制三相图, 找出了自乳化区域。一般自乳化制剂通常做成软胶囊形式, 但因醇类助乳化剂可迁入明胶胶囊壳中, 使明胶变质软化, 降低制剂的溶解力, 导致亲脂性药物沉淀^[17]。故在保证连翘种子油 SEDDS 效果的前提下, 建议应尽量减少乙醇的使用量。

通过对最优处方的粒径形态、大小、分布、 ξ 电位, 自乳化速度以及稳定性的测定进行体外评价, 最优处方的连翘种子油 SEDDS 自乳化速度快, 透光率在 5 min 之内达到平衡, 乳化后乳滴呈规则的圆形, 分布均匀, 有效粒径 90.9 nm, 因选用的 SA 为聚山梨酯 80, 是一种非离子型表面活性剂, 本身不能电离, 是以界面膜的机制稳定乳状液^[18], 故 ξ 电

位虽不高, 但稳定性良好, 经各种条件下的稳定性测定, 结果表明除高温条件对连翘种子油 SEDDS 有影响外, 强光、低温、冷热交替以及长时间室温放置均对其无明显影响。因此建议连翘种子油或其 SEDDS 应避免高温存放。

本实验优选的连翘种子油 SEDDS 制备工艺简单, 性质稳定, 方便吸收, 易于生产。为其临床应用形式提供了一定的科学依据。

参考文献

- [1] 张海燕. 连翘化学成分及药理活性的研究进展[J]. 中药材, 2000, 23(10): 657-660
- [2] 刘国声, 刘继先, 方洪钊, 等. 连翘种子挥发油的化学研究[J]. 植物学报, 1984, 26(6): 672-674
- [3] Takikawa A, Abe K, Yamamoto M, et al. Antimicrobial activity of nutmeg against *Escherichia coli* O157[J]. *J Biosci Bioeng*, 2002, 94(4): 315-320.
- [4] Sadraei H, Asghari G R, Hajhashemi V, et al. Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss on ileum contractions[J]. *Phytomedicine*, 2001, 8(5): 370-376
- [5] Perry N S, Houghton P L, Sampson J, et al. *In vitro* activity of *S. zaidandulaefolia* (Spanish sage) relevant to treatment of Alzheimer's disease[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53: 1347-1356
- [6] Uribe S, Bamirez J, Pena A. Effects of beta pinene on yeast membrane functions[J]. *J Bacterial*, 1985, 161: 1195-1200
- [7] 夏忠弟, 余俊龙. α -萜烯对白色念珠菌生物合成的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(1): 44-46
- [8] 李晓燕. 中药连翘抗菌活性的考察[J]. 山东医药工业, 1997, 16(2): 46-48
- [9] 魏希颖, 周晓霞, 马海波. 连翘种子挥发油抑真菌及在猪油脂酸败过程中的作用[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(5): 625-627
- [10] 肖会敏. 连翘挥发油提取工艺及其初步活性的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2006
- [11] 张晓峰, 韦玮, 陆峰然, 等. 自乳化释药系统(SMEDDS)的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 261-264
- [12] Pouton C W. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 25: 47-58
- [13] 钱一鑫, 唐景玲, 孙进, 等. 口服自乳化释药系统及其在中药制剂中的应用[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1441-1446
- [14] 龙晓英, 杨帆, 李丽, 等. 水飞蓟素自乳化给药系统处方设计及溶出度评价[J]. 中国药师, 2004, 7(7): 497-498
- [15] You J, Cui F D, Li Q P, et al. A novel formulation design about water insoluble oily drug: Preparation of zedoary turmeric oil microspheres with self-emulsifying ability and evaluation in rabbits[J]. *Int J Pharm*, 2005, 288: 315-323
- [16] 杨小军, 魏烯颖, 徐慧娟. 丹参酮自乳化药物传递系统的初步研究[J]. 中草药, 2009, 40(9): 1395-1398
- [17] 谷雨龙, 倪健, 翟小玲. 地椒油自乳化制剂处方研究[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 12(30): 836-842
- [18] 刘华. 酮洛芬自乳化胶囊的研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005