

• 药剂与工艺 •

葛根素自微乳给药系统的制备及其质量评价

陈小新^{1,2}, 原 素², 谢称石², 张 兰², 龙超峰^{2*}

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

2. 广东华南药业集团有限公司, 广东 东莞 523325

摘 要: **目的** 研究葛根素自微乳给药系统的处方工艺。**方法** 通过溶解度试验、油和表面活性剂配伍试验, 以及伪三元相图的绘制, 筛选葛根素自微乳的处方组成; 通过粒径、载药量和自微乳化时间优化了葛根素自微乳处方; 并对葛根素自微乳的理化性质和稳定性进行了考察。**结果** 葛根素自微乳处方中油相为中链甘油三酯 (19.0%)、油酸 (19.0%), 表面活性剂为聚山梨酯 80 (19.0%)、聚氧乙烯蓖麻油 (19.0%), 助表面活性剂为 1, 2-丙二醇 (19.0%), 葛根素 (5.0%)。自微乳化后粒径为 (17.28 ± 0.24) nm, 自微乳化时间小于 120 s; 室温留样 6 个月, 该自微乳性状、质量分数、粒径和自微乳化时间均无明显变化。**结论** 所制备的葛根素自微乳粒径小、稳定性好, 符合良好自微乳制剂的要求。

关键词: 葛根素; 自微乳给药系统; 伪三元相图; 自乳化时间; 表面活性剂

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)08-1512-05

Preparation and evaluation of puerarin self-microemulsifying drug delivery system

CHEN Xiao-xin^{1,2}, YUAN Su², XIE Cheng-shi², ZHANG Lan², LONG Chao-feng²

1. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Guangdong Huanan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Dongguan 523325, China

Abstract: Objective To study the formulation of puerarin (PUE) self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS). **Methods** The optimum formulation of PUE SMEDDS was screened by test of solubility, compatibility of oil and surfactant, and pseudo-ternary phase diagram, and the prescription of PUE SMEDDS was optimized by particle size, self-microemulsifying time, and drug loading; The physicochemical characteristics and stability were also determined. **Results** The optimum SMEDDS composed of Miglyol 812N (19.0%), oleic acid (19.0%), polysorbate 80 (19.0%), EL-35 (19.0%), 1, 2-propanediol (19.0%), and puerarin (5.0%). The particle size was (17.28 ± 0.24) nm, and self-microemulsifying time was less than 120 s; The appearance, content of PUE, particle size, and self-microemulsifying time had no obvious changes under room temperature storage for six months. **Conclusion** The acquired PUE SMEDDS is stable with small particle size, which meets the needs of good SMEDDS formulation.

Key words: puerarin (PUE); self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS); pseudo-ternary phase diagram; self-emulsifying time; surfactant

葛根素临床上常用于冠心病、心绞痛和心脑血管障碍等疾病的治疗^[1-3], 但由于水溶性极差, 口服生物利用度极低^[4], 故其口服制剂应用受到限制。自微乳化给药系统 (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS) 是由油相、非离子表面活性剂和助表面活性剂形成的各相同性、均一透明并包含药物的混合溶液, 在环境温度 (通常为 37 ℃) 及温和搅拌的情况下, 自发乳化形成粒径小于 100 nm

的微乳^[5-6]。SMEDDS 能提高难溶性药物的溶解度, 改善其口服吸收, 从而提高药物的口服生物利用度。但是, 自微乳处方中表面活性剂的大量使用带来了不良反应的潜在风险, 限制了自微乳制剂的临床应用^[7]。目前已有文献报道葛根素及四乙酰基葛根素 SMEDDS 的研究, 均获得一定成果^[8-10], 但未有如何减少自微乳处方中表面活性剂用量的报道。本实验采用混合油相制备了葛根素 SMEDDS, 旨在减少

收稿日期: 2011-01-06

作者简介: 陈小新 (1979—), 男, 博士, 主要从事药物新剂型与新技术研究。Tel: (0769)81388217 E-mail: chenchenyu2000@yahoo.com.cn

*通讯作者 龙超峰 Tel: (0769)86188082 E-mail: longcf88@sina.com

自微乳处方中表面活性剂的用量,从而为临床提供更加安全可靠的自微乳制剂。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪、G1311A 四元梯度泵、G1329A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1315D 型 DAD 检测器、G1322A 在线脱气机、Agilen ChemStations 数据处理软件(安捷伦科技有限公司);KQ—250DB 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);200 kV 透射电镜(日本电子株式会社);X 射线能谱仪(EDS,英国牛津仪器国际市场有限公司);NS90 型马尔文纳米粒度电位测定仪(英国马尔文公司);AUW120D 电子天平(日本岛津公司);TGL—16G—C 高速台式冷冻离心机(上海市安亭科学仪器厂);DKZ—1 电热恒温振荡水槽(上海精宏试验设备有限公司);QL—901 漩涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

葛根素对照品(批号 110752-200511,中国药品生物制品检定所);葛根素原料药(质量分数>98%,四川玉鑫药业有限公司);聚氧乙烯蓖麻油(EL-35,德国 BASF)、聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH 40,德国 BASF)、泊洛沙姆 188(Poloxamer 188,德国 BASF);蓖麻油、大豆油(食用级)、聚山梨酯 80、聚乙二醇 400(PEG 400)、甘油(药用级)、油酸乙酯、1,2-丙二醇(国药集团化学试剂有限公司);油酸(天津市大茂化学试剂厂);中链甘油三酯(Miglyol 812N,南非沙索公司);无水乙醇、异丙醇(广州化学试剂有限公司);乙腈、甲醇(色谱纯,Merck 公司);水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 葛根素 HPLC 分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Eclipse XDB C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为水-甲醇(75:25),柱温 30 ℃,检测器 DAD,检测波长 250 nm,体积流量 1.0 mL/min,进样量 20 μL。在上述色谱条件下,葛根素与其他成分的分离度良好,保留时间 8.2 min,理论塔板数以葛根素计不低于 6 000,空白辅料不干扰葛根素的测定,方法专属性良好。

2.1.2 线性关系考察 精密称取葛根素对照品适量,30%甲醇配制质量浓度分别为 1.558、3.116、6.232、12.646、31.160、62.320 μg/mL 的系列葛根素对照品溶液,依法测定,记录色谱峰面积。以峰面积积分值对葛根素质量浓度进行线性回归,得回归方程 $Y=80.879X-4.3247$ ($r=1.0000$),表明葛

根素在 1.558~62.320 μg/mL 线性关系良好。

2.1.3 精密度的试验 分别取低、中、高质量浓度(1.558、12.464、62.320 μg/mL)葛根素对照品溶液进样分析,一日之内连续测定 5 次,记录色谱峰,计算日内精密度;连续测定 5 d,每天 1 次,记录色谱峰,计算日间精密度。结果表明低、中、高 3 个质量浓度对照品溶液的日内精密度分别为 0.45%、0.06%、0.05% ($n=5$);日间精密度分别为 0.30%、0.31%、0.18% ($n=5$)。

2.1.4 回收率试验 精密称取葛根素对照品适量,加入空白自微乳处方配制低、中、高质量浓度(38.95、311.60、1 558.00 μg/mL)的葛根素自微乳,30%甲醇稀释至适宜倍数,进样分析,记录色谱峰,计算葛根素回收率。结果表明低、中、高 3 个质量浓度的回收率分别为 102.26%、100.35%、98.70%,RSD 分别为 2.11%、0.28%、1.77% ($n=3$)。

2.2 葛根素溶解度的测定

将过量的葛根素分别加入到装有适量的油、表面活性剂(10%水溶液)、助表面活性剂的西林瓶中,涡旋分散后,37 ℃水浴振荡(100 r/min)72 h,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液用甲醇稀释适宜倍数后测定葛根素的量。同法操作 3 次,取平均值。葛根素在不同油、表面活性剂和助表面活性剂中的溶解度见表 1。葛根素在各种油中溶解度均极低,仅在蓖麻油和大豆油中能检测得到;在不同表面活性剂(10%水溶液)中的溶解度大小依次为:聚山梨酯 80>RH40>EL-35>泊洛沙姆 188;在不同助表面活性剂中的溶解度大小依次为:1,2-丙二醇>PEG 400>甘油>乙醇>异丙醇。溶解度测定结果表明,葛根素在各种油中溶解度极低,在表面活性剂聚山梨酯 80、RH40、EL-35 溶解度相近,在助表面活性剂 1,2-丙二醇、PEG 400 中溶解度显著高于其他 3 种助表面活性剂。因此选择上述 5 种油、3 种表面活性剂和 2 种助表面活性剂进一步研究。

2.3 油和表面活性剂的配伍

在测定溶解度的基础上,选择油酸、油酸乙酯、中链甘油三酯、蓖麻油、大豆油作为油相,聚山梨酯 80、EL-35、RH40 作为表面活性剂,油和表面活性剂比例为 1:9,37 ℃水浴磁力搅拌均匀,然后加入 100 倍量的 0.1 mol/L HCl 溶液磁力搅拌下乳化,目测法考察乳化情况。目测标准参考文献方法^[11],并做一定的修改,将乳化情况分为 6 个等级:A 迅速乳化,时间<1 min,澄清或微微泛蓝;B 迅速乳

表 1 葛根素在各种介质中的溶解度 ($n=3$)Table 1 Solubility of puerarin in various vehicles ($n=3$)

介 质	溶解度/(mg·mL ⁻¹)
油	
油酸乙酯	—
油酸	—
蓖麻油	0.202 6± 0.007 6
中链甘油三酯	—
大豆油	0.081 6± 0.002 3
表面活性剂	
聚山梨酯 80	7.965 0± 0.099 3
(10%水溶液)	
EL-35	6.133 7± 0.042 5
RH40	6.200 5± 0.139 0
泊洛沙姆 188	4.950 6± 0.055 9
助表面活性剂	
异丙醇	6.351 8± 0.264 4
乙醇	14.830 9± 0.276 1
1,2-丙二醇	173.639 9± 6.695 0
PEG 400	129.881 5± 11.173 7
甘油	59.553 1± 2.698 0

表 2 不同油和表面活性剂的配伍结果 ($n=3$)Table 2 Results of compatibility of various oil and surfactant ($n=3$)

油	表面活性剂	目测等级
蓖麻油	聚山梨酯 80	D
蓖麻油	RH40	C
蓖麻油	EL-35	C
大豆油	聚山梨酯 80	E
大豆油	RH40	B
大豆油	EL-35	B
油酸乙酯	聚山梨酯 80	A
油酸乙酯	RH40	C
油酸乙酯	EL-35	C
油 酸	聚山梨酯 80	A
油 酸	RH40	C
油 酸	EL-35	C
中链甘油三酯	聚山梨酯 80	D
中链甘油三酯	RH40	A
中链甘油三酯	EL-35	A

化, 时间<1 min, 比 A 略白, 蓝白; C 时间>2 min, 澄清或微微泛蓝; D 时间<2 min, 外观亮白, 似奶状液体; E 乳化较慢, 时间>2 min, 暗, 灰白色, 略带油状; F 难乳化, 无法形成均一体系, 一直都有油滴存在。不同油和表面活性剂的配伍结果见表 2。可知蓖麻油、大豆油等天然植物油较难以被乳化, 中链甘油三酯、油酸、油酸乙酯较容易被聚山梨酯 80、RH40 和 EL-35 乳化; RH40、EL-35 乳化能力较强, 但由于黏度较大, 乳化时间较长, 聚山梨酯 80 乳化能力较好且乳化时间较短。因此选择中链甘油三酯、油酸、油酸乙酯作为油相, 聚山梨酯 80、RH40 和 EL-35 作为表面活性剂进行进一步研究。

2.4 伪三元相图的绘制

固定表面活性剂与助表面活性剂的质量比 K_m 为 2, 混匀, 再与各种油相按照 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 比例混合, 涡漩混合下滴加纯化水, 以澄清度为指标, 判断是否形成微乳。记录形成微乳时临界点各组分的质量分数。以表面活性剂与助表面活性剂的混合物、油相、水相分别作为相图的 3 个顶点, 计算每一组分在体系中的质量分数, 在相图中找出相应的点, 把能形成微乳的各点以曲线相连绘制成伪三元相图, 确定微乳区域面积。微乳区的大小与微乳的稳定性有较大关系, 微乳区越大说明微乳越稳定, 越不易受其他因素的干扰。

根据溶解度试验、油和表面活性剂配伍试验及微乳相图预试验的结果, 选择了中链甘油三酯、油

酸、油酸乙酯作为油相和表面活性剂聚山梨酯 80、RH40、EL-35 以及助表面活性剂 1,2-丙二醇、PEG 400 配伍, 绘制伪三元相图, 考察油相、表面活性剂与助表面活性剂等处方因素对微乳形成的影响。结果表明, 当以油酸、油酸乙酯或以中链甘油三酯单独为油相时, 虽然能够形成一定的微乳区, 但当载油量在 10% 左右时, 所形成的微乳才能被水无限稀释, 保持微乳状态。同时发现当中链甘油三酯和油酸混合作为油相时, 微乳区能够显著增大; 在保证能被无限稀释的前提下, 两种油的最佳配比为 1:1, 载油量能够提高到 50%。通过不同表面活性剂、助表面活性剂及 K_m 值的伪三元相图考察, 结果表明, 当油相为中链甘油三酯与油酸的比例为 1:1 混合时, 表面活性剂为聚山梨酯 80, 助表面活性剂为 1,2-丙二醇, $K_m=2$ 时形成的微乳区最大, 见图 1。同时, 本研究考察了不同比例的油-混合表面活性剂形成微乳的能力, 结果表明油-混合表面活性剂的比例为 1:9、2:9、3:7、4:6、5:5 时, 均能得到澄清、透明、耐水稀释的微乳体系, 考虑到表面活性剂的用量结合粒径、自微乳化时间, 本研究选取油-混合表面活性剂为 4:6 作为空白自微乳的处方。

2.5 处方优化

2.5.1 EL-35 的添加 在“2.4”试验过程中发现当油(中链甘油三酯与油酸之比为 1:1)与混合表面

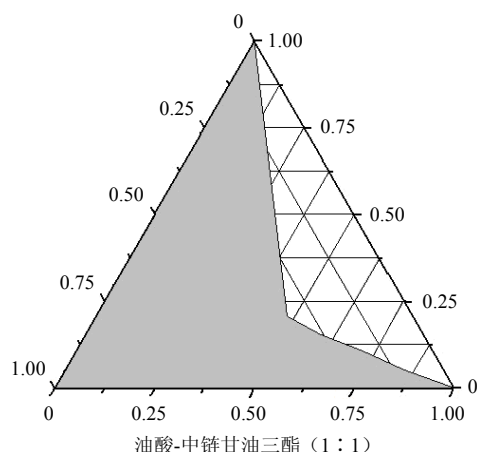


图 1 自微乳化系统伪三元相图 (灰色区域表示微乳区)

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagram of SMEDDS
(Grey regions represent microemulsion phase)

活性剂 (聚山梨酯 80 与 1,2-丙二醇之比为 2:1) 之比 $\geq 3:7$ 的条件下, 粒径测定时, 在 100~1 000 nm 有一峰, 表示体系中有大于 100 nm 的大颗粒存在。这可能是由于聚山梨酯 80 乳化能力稍弱, 部分乳滴的界面张力未能减小到临界值。因此, 在体系中加入乳化能力较聚山梨酯 80 强, 黏度较 RH40 小的 EL-35, 通过试验表明, EL-35 的加入消除了粒径分布图上 100~1 000 nm 的峰。考虑载药量, 确定聚山梨酯 80 与 EL-35 的比例为 1。因此, 本试验确定葛根素自微乳的油相为中链甘油三酯-油酸 (1:1), 聚山梨酯 80-EL-35 (1:1) 作为表面活性剂, 1,2-丙二醇为助表面活性剂, K_m 值为 2。

2.5.2 载药量的确定 按“2.5.1”项下制备葛根素自微乳, 当载药量固定为 60 mg/g 时, 发现葛根素有析出, 因此, 固定葛根素载药量为 50 mg/g, 影响因素等初步稳定性试验表明无显著变化。葛根素自微乳最终处方确定为: 中链甘油三酯 (19.0%)、油酸 (19.0%), 聚山梨酯 80 (19.0%)、聚氧乙烯蓖麻油 (19.0%), 1,2-丙二醇 (19.0%), 葛根素 (5.0%)。

2.6 葛根素自微乳的质量评价

2.6.1 外观 观察葛根素自微乳在 4、25、37 ℃时的外观。结果在 4 ℃时, 葛根素自微乳为淡黄色稍黏稠液体, 在 25、37 ℃时均为淡黄色、透明、流动性较好的油状溶液。

2.6.2 粒径、分布和 Zeta 电位的测定 将葛根素自微乳于 37 ℃水浴中加入 100 倍量的同温蒸馏水, 温和磁力搅拌成微乳, 用马尔文纳米粒度电位测定仪测定粒径分布和 Zeta 电位。结果见图 2、3, 葛根素自微乳乳化后微乳液的粒径为 (17.28 ± 0.24)

nm ($n=3$), Zeta 电位为 $-(13.3 \pm 0.26)$ mV ($n=3$)。

2.6.3 自微乳化后微乳显微形态观察 将葛根素自微乳于 37 ℃水浴中加入 100 倍量的同温蒸馏水, 温和磁力搅拌形成微乳。将载有聚乙烯醇缩甲醛 (Formvar) 支持膜的铜网置于蜡板上, 在膜上滴加 2 μ L 的微乳液, 自然晾干。取 1 滴 2% 磷钨酸 (NaOH 调 pH 7.4) 滴在蜡板上, 将晾干的铜网倒覆于染液上, 负染 1 min, 然后用蒸馏水冲洗, 滤纸吸干, 采用透射电镜观察并照相。结果见图 4。由透射电镜照片可以看出, 微乳内相粒子为规整的球形, 分布较均匀。

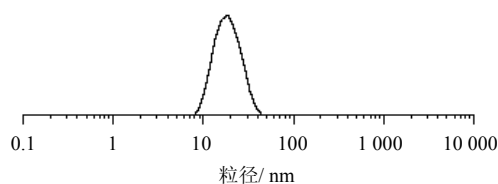


图 2 葛根素自微乳的粒径

Fig. 2 Particle size of puerarin self-microemulsion

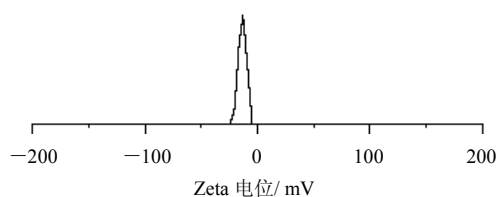


图 3 葛根素自微乳的 Zeta 电位

Fig. 3 Zeta potential of puerarin self-microemulsion

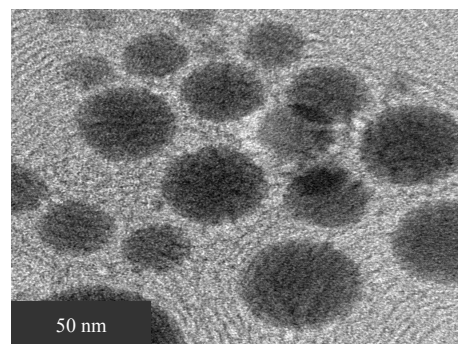


图 4 葛根素自微乳乳化后微乳透射电镜照片

Fig. 4 Transmission electron microscope photograph of puerarin microemulsion after emulsification

2.6.4 自微乳化时间的测定 按照《中国药典》2010 年版溶出度第 3 法 (小杯法), 分别加入蒸馏水 100 mL, 水浴温度 37 ℃, 搅拌转速 50 r/min, 加入葛根素自微乳约 1 g, 待样品接触液面时计时, 目测葛根素自微乳乳化时间。结果表明葛根素自微乳在 (112.33 ± 7.09) s ($n=3$) 可全部乳化完全, 说明该

自微乳液具有较好的自乳化速度。

2.7 葛根素自微乳室温稳定性研究

取适量葛根素自微乳置西林瓶中,密封,常温下放置,分别于放置 1、2、3、6 个月考察其外观、粒径、自微乳化效率及质量分数。结果见表 3。

表 3 葛根素自微乳室温放置 6 个月稳定性
Table 3 Stability of puerarin self-microemulsion
in six months at room temperature

时间/d	外 观	质量分数/ (mg·g ⁻¹)	粒径/nm	自乳化 时间/s
0	浅黄色、澄清	50.78	17.35	<120
30	浅黄色、澄清	51.47	17.59	<120
60	浅黄色、澄清	51.22	16.89	<120
90	浅黄色、澄清	49.86	17.14	<120
180	浅黄色、澄清	51.10	17.48	<120

3 讨论

本研究采用混合油相制备了葛根素自微乳。实验过程发现,用单个油作为自微乳体系的油相时,要得到能耐稀释的自微乳体系,油-混合表面活性剂的比例一般均小于或者等于 1:9,相关文献报道^[12]亦表明,大多数自微乳表面活性剂、助表面活性剂的用量都是在 90%,油相仅占 10%左右。本研究采用混合油作为葛根素自微乳的油相,油-混合表面活性剂的比例提高到 4:6,显著减少了表面活性剂的使用量。因此,混合油的应用对于减少表面活性剂的用量制备高效低毒的 SMEDDS 具有积极的指导意义。

稳定的微粒分散体系的 Zeta 电位应大于+25 mV 或者小于-25 mV,本实验测定了葛根素自微乳乳化后微乳液的 Zeta 电位为-(13.3±0.26) mV,Zeta 电位值表明该微乳体系似乎应为一不稳定体系,但稳定性研究结果表明本实验所制备葛根素自微乳非常稳定。说明微乳的稳定性并不是由 Zeta 电位所决定的,而是由于表面活性剂的存在而导致的界面张力减小。

与普通的乳剂相比,SMEDDS 粒径更小,能够更快更有效地被胃肠道吸收,生物利用度有显著提高,疗效更好,从安全性上来说,SMEDDS 还能够降低药物的不良反应^[13-14];从制备工艺上来说,SMEDDS 制备工艺比较简单,可以填充到软胶囊或硬胶囊中,还可以通过加入吸附剂或冷冻干燥、喷雾干燥的方式制成固体自微乳,同时具有易于保存、

稳定、可以过滤灭菌、吸收迅速等优势,所以 SMEDDS 具有有广阔的开发前景。

中药中提取得到的大多数生物活性成分水溶性均较差,其吸收和生物利用度均较低,因此,利用微乳化技术,研究中药有效组分或有效部位的 SMEDDS,特别是研究水难溶性或脂溶性的中药有效组分 SMEDDS 技术具有重大意义。

参考文献

- [1] 高凤英. 葛根素药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2003, 34(12): 附 7-8.
- [2] 王超权. 葛根素注射液对急性冠脉综合症非再灌注治疗患者血液流变学的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(3): 563-565.
- [3] 黄 萍, 龚永生, 范小芳, 等. 葛根素对低氧高二氧化碳性肺动脉高压大鼠右心室 Apelin/APJ 系统的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 565-569.
- [4] 唐志书, 郭东艳, 宋 道. 葛根素普通粉及其微粉在 Beagle 犬体内的生物利用度 [J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(8): 830-831.
- [5] Constantinides P P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects [J]. *Pharm Res*, 1995, 12(11): 1561-1572.
- [6] 姚小军, 蓝苑元, 耿 彤, 等. 中药和天然药物自乳化释药系统的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 257-260.
- [7] 许海玉, 张铁军, 赵 平, 等. 中药缓控释制剂的研究现状及研发思路 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 30-35.
- [8] 于爱华, 翟光喜, 崔 晶, 等. 葛根素固体自微乳的研制 [J]. 中药材, 2006, 29(8): 834-837.
- [9] 韩 静, 崔升森. 葛根素自微乳释药系统的处方筛选与体外评价 [J]. 中南药学, 2009, 7(10): 731-734.
- [10] 谢 欢, 周 伟, 刘 姹, 等. 四乙酰基葛根素自微乳化给药系统的制备及体外评价 [J]. 中南药学, 2010, 8(6): 402-406.
- [11] Khoo S M, Humberstone A J, Porter C J H, *et al.* Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine [J]. *Int J Pharm*, 1998, 167(1/2): 155-164.
- [12] 李兆明, 陈 智, 于 峰, 等. 自微乳制剂的研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2009, 28(2): 98-100.
- [13] 路艳丽, 彭 博, 贺 蓉, 等. 藿香正气微乳与藿香正气水的急性毒性与药效比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 2004-2007.
- [14] 赵 益, 管咏梅, 乐西薇, 等. 雷公藤微乳凝胶的急性毒性和皮肤刺激性实验研究 [J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(1): 75-77.