

赤芍总苷自微乳化给药系统的研究

陈立江, 刘洋, 李丽, 刘宇, 高飞

辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳 110036

摘要: 目的 制备赤芍总苷自微乳化给药系统 (TGP-SMEDDS), 优选其最佳处方, 并对其初步的质量评价。方法 采用伪三元相图法优化自微乳化处方, 并对最佳处方进行粒径、乳滴形态、Zeta 电位、表面张力、自乳化时间、溶出度及稳定性评价。结果 由油酸乙酯、Cremophor RH40 和 Transcutol P 组成的 TGP-SMEDDS 遇水可自发形成粒径为 (47.26 ± 0.08) nm 的稳定微乳液, 透射电镜下观察 TGP-SMEDDS 形态为均匀的球形, Zeta 电位为 (-22.80 ± 0.42) mV。结论 制备的 TGP-SMEDDS 外观及稳定性良好, 为赤芍总苷新剂型的进一步研究奠定了基础。

关键词: 赤芍总苷; 自微乳化给药系统; 伪三元相图; 质量评价; 稳定性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1082-05

Study on self-microemulsifying drug delivery system of total glycosides in *Paeoniae Radix Rubra*

CHEN Li-jiang, LIU Yang, LI Li, LIU Yu, GAO Fei

College of Pharmacy, Liaoning University, Shenyang 110036, China

Abstract: Objective To prepare the self-microemulsifying drug delivery system containing total glycosides in *Paeoniae Radix Rubra* (TGP-SMEDDS), optimize the formula, and preliminarily evaluate the quality. **Methods** The formula of self-microemulsifying was optimized with pseudo-ternary phase diagram. The droplet size and shape, Zeta potential, surface tension, self-microemulsifying time, dissolution, and stability were also evaluated. **Results** The TGP-SMEDDS composed of ethyl oleate, Cremophor RH40, and Transcutol P could spontaneously form a stable microemulsion with diameter about (47.26 ± 0.08) nm in water. TGP-SMEDDS presented uniform spherical drops under transmission electron microscope, and the Zeta potential was (-22.80 ± 0.42) mV. **Conclusion** The TGP-SMEDDS has good appearance and stability, which provides a strong foundation for the further research on new dosage forms of TGP.

Key words: total glycosides in *Paeoniae Radix Rubra* (TGP); self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS); pseudo-ternary phase diagram; quality assessment; stability

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根^[1]。赤芍总苷 (total glycosides in *Paeoniae Radix Rubra*, TGP) 为赤芍的有效部位, 具有抗凝血、抗血栓、抗动脉粥样硬化、保护心脏和肝脏、抗肿瘤等广泛的药理活性^[2-6]。但其在水中的溶解度小, 口服生物利用度低^[7-8], 影响了其临床应用。自微乳化给药系统 (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS)

是包含油相、表面活性剂和/或助表面活性剂的固体或液体制剂, 其基本特征是口服后在胃肠道的温和搅拌下自发形成粒径为 10~100 nm 的 O/W 型微乳, 由于其粒径小, 容易被胃肠道吸收, 能够显著提高药物的生物利用度^[9]。因此本研究采用 SMEDDS 作为 TGP 的药物载体, 通过伪三元相图优选处方比例, 制备 TGP 自微乳化制剂, 并对其质量评价, 为制备 TGP 临床应用新剂型提供参考。

收稿日期: 2011-11-01

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目 (20092015); 沈阳市科学技术计划项目 (F10-205-1-28); 辽宁大学“211 工程”三期建设项目

作者简介: 陈立江 (1969—), 女, 硕士, 辽宁大学药学院主任, 教授, 研究方向为药物新剂型及药物机制。

Tel: (024)62202469 E-mail: chlj16@163.com

网络出版时间: 2012-05-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120511.0857.011.html>

1 仪器与材料

莱比伦 3500G 型高效液相色谱仪 (美国 SSI 公司), Zetasizer Nano ZS 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (英国 Malvern 仪器公司), JEM-1200EX 透射电镜 (日本 JEOL 公司), AL104 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司), DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 (巩义市英峪予华仪器厂)。

TGP (赤芍中提取, 实验室自制, 芍药苷质量分数 $\geq 40\%$), 芍药苷对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 10736-200934, 质量分数 95.7%), IPM、Transcutol P、Labrifil M 1944 CS、Labrasol 均为法国 Gattefosse 公司, Cremophor RH40、Cremophor EL20 为德国 BASF 公司, 油酸乙酯 (上海飞祥化工厂), 聚山梨酯 80 (天津市博迪化工有限公司), 油酸 (国药集团化学试剂有限公司), 乙醇、异丙醇、聚乙二醇 400 (PEG 400)、甘油、1,2-丙二醇均为分析纯, 甲醇、乙腈为色谱纯 (山东禹王实业有限公司化工分公司)。

2 方法与结果

2.1 TGP 的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为乙腈-磷酸水溶液 (17:83, 磷酸调 pH 值至 3.0), 检测波长 230 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温为 25 $^{\circ}$ C, 进样量为 20 μ L。

2.1.2 对照品储备液的制备 精密称取芍药苷对照品 20.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 制成 0.2 mg/mL 的对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取 TGP-SMEDDS 适量, 加甲醇溶解后, 配制成一定质量浓度的供试品溶液。

2.1.4 空白溶液的制备 取处方量的油酸乙酯、Cremophor RH40 和 Transcutol P 混合均匀后以甲醇稀释, 配制辅料空白溶液。

2.1.5 方法专属性考察 分别取空白溶液、对照品溶液、供试品溶液, 按上述色谱条件进样观察。由图 1 可见芍药苷的峰形好, 辅料对芍药苷的测定无干扰。

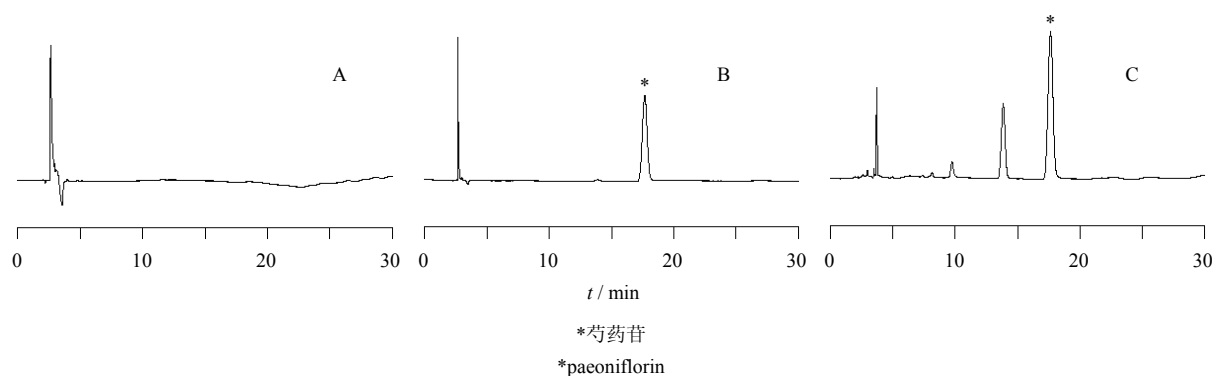


图 1 空白溶液 (A)、芍药苷对照品溶液 (B) 和 TGP-SMEDDS (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solution (A), paeoniflorin reference solution (B), and TGP-SMEDDS (C)

2.1.6 标准曲线的制备 分别精密吸取芍药苷对照品储备液 0.8、1.6、3.2、4.8、6.4 mL 置 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 得到系列对照品溶液。分别精密量取 20 μ L 注入液相色谱仪, 在上述色谱条件下测定, 记录峰面积, 以质量浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $A=13\ 333\ C+384.96$, $r=0.999\ 95$, 表明芍药苷在 16~128 μ g/mL 与峰面积的线性关系良好。

2.1.7 精密度试验 配制质量浓度分别为 16、48、64 μ g/mL 的芍药苷对照品溶液, 1 d 内连续进样 3 次, 日内精密度 RSD 分别为 1.09%、0.25%、0.30%, 连续 3 d 进样测定, 日间精密度 RSD 分别为 1.42%、0.39%、1.32%。

2.1.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于 12 h 内每隔 2 h 测定 1 次, 计算得芍药苷峰面积的 RSD 为 0.50%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 取同批样品 6 份, 平行配制供试品溶液进行测定, 结果芍药苷质量分数的 RSD 为 0.21%。

2.1.10 回收率试验 按照处方量称取辅料, 按处方量的 80%、100%、120% 加入芍药苷对照品, 平行制备 3 份, 测定样品中芍药苷的量, 计算回收率。结果平均回收率分别为 99.63%、102.16%、100.10%, RSD 分别为 1.99%、0.77%、1.57%。

2.2 溶解度试验

将过量 TGP 置于离心管中, 分别加入 1 g 的油

相、表面活性剂、助表面活性剂，于 37 °C 恒温水浴震荡 24 h 使之达到平衡，始终保持过饱和状态。将离心管置于 3 000 r/min 的离心机中离心 30 min。取上清液用甲醇溶解并稀释至适当质量浓度，HPLC 法测定其中溶解的药量，比较溶解度大小，结果见表 1。通过溶解度试验最终选择油相：油酸乙酯、油酸、IPM；表面活性剂：聚山梨酯 80、Cremophor RH40、Labrasol；助表面活性剂：PEG 400、1, 2-丙二醇、Transcutol P。乙醇对于 TGP 的溶解度也很大，但由于易挥发，影响实验的准确性，故不考虑将其进行下一步的筛选。

2.3 伪三元相图的绘制

2.3.1 空白伪三元相图筛选处方 设定表面活性剂和助表面活性剂的混合物与油相质量比例为 9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5、4 : 6、3 : 7、2 : 8、1 : 9，固定总质量约 1 g，混合均匀后，加入到 37 °C、100 mL 水中，温和搅拌，观察是否形成澄清透明的溶液，将能形成澄清或带有少许乳光溶液的处方点确定为相图中可形成微乳的边界点。以油相、混合表面活性剂和助表面活性剂各为一相，采用 Origin 7.5 软件绘制空白伪三元相图的形成微乳的区域，并根据微乳区域大小进行处方的筛选。

表 1 TGP 在各种辅料中的溶解度

Table 1 Solubility of TGP in various adjuvants

| 辅料 | 溶解度 / (mg·g ⁻¹) |
|--------------------|-----------------------------|
| 乙醇 | 145.95 ± 0.32 |
| 异丙醇 | 15.57 ± 0.56 |
| PEG 400 | 74.49 ± 0.12 |
| 1, 2-丙二醇 | 90.32 ± 0.98 |
| 丙三醇 | 7.57 ± 0.79 |
| Transcutol P | 128.64 ± 0.50 |
| Cremophor RH40 | 7.45 ± 1.09 |
| Labrasol | 22.30 ± 0.81 |
| Cremophor EL20 | 4.06 ± 0.64 |
| 聚山梨酯 80 | 21.51 ± 1.21 |
| 油酸 | 11.87 ± 0.53 |
| 油酸乙酯 | 4.08 ± 0.38 |
| IPM | 1.21 ± 0.95 |
| Labrafil M 1944 CS | 0.72 ± 0.90 |

由图 2、3 可知以油酸乙酯为油相，Cremophor RH40 为表面活性剂、Transcutol P 为助表面活性剂的伪三元相图，所成微乳的区域最大，最终选用该体系作为 TGP-SMEDDS 的最佳空白处方组成。改变 K_m 值（表面活性剂/助表面活性剂），进行处方的

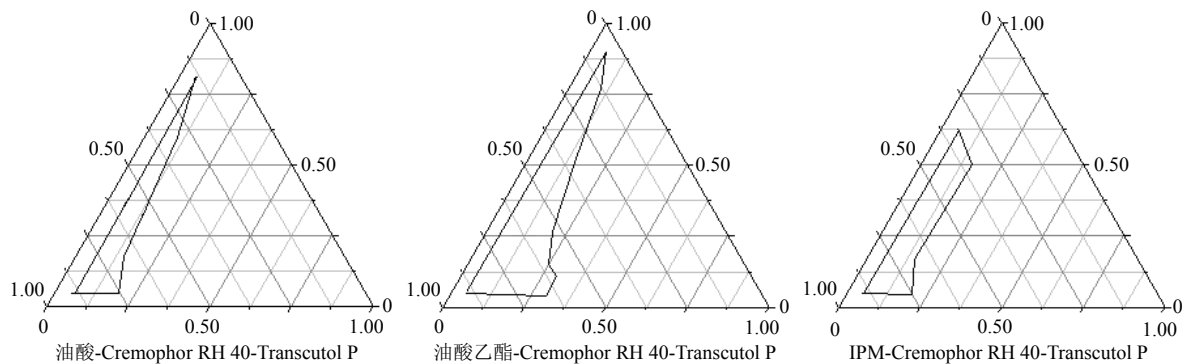


图 2 不同油相对伪三元相图的影响

Fig. 2 Effect of different oil phases on pseudo-ternary phase diagram

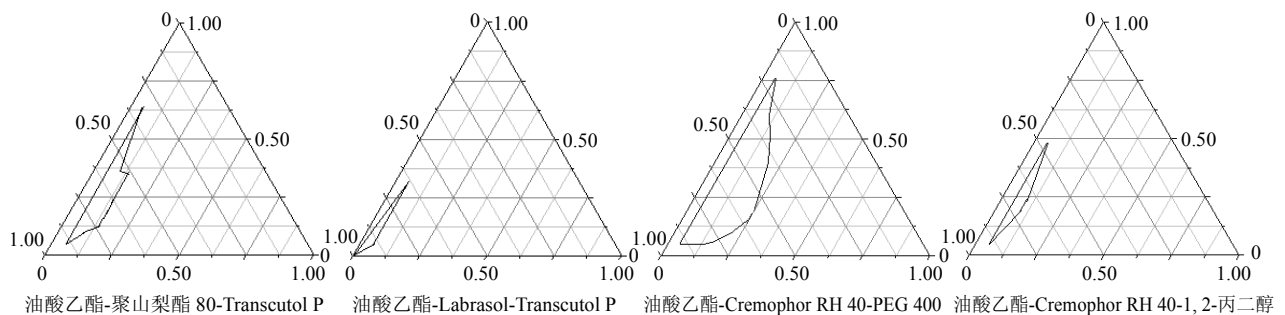


图 3 不同表面活性剂及助表面活性剂对伪三元相图的影响

Fig. 3 Effect of different surfactants and cosurfactants on pseudo-ternary phase diagram

进一步筛选。发现 $K_m=3:1$ 、 $2:1$ 成乳区大于 $K_m=1:1$ 、 $1:2$ ，但 Cremophor RH 40 的黏度比较大，其量较大影响自乳化的效率，而 Transcutol P 流动性好，对 TGP 的溶解度大，增加处方中助表面活性剂的量可以增大药物的溶解度。综合以上原因，最终选择 $K_m=2:1$ ，即油酸乙酯-Cremophor RH 40-Transcutol P (20:53.3:26.7) 为最佳处方的组成。

2.3.2 含药伪三元相图的绘制 据“2.3.1”项中筛选出的空白处方，在油相与混合表面活性剂中加入 TGP (药物量 187 mg/g)，绘制含药伪三元相图。由图 4 可知，当空白处方中加入药物后，对微乳的形成区域影响不大。

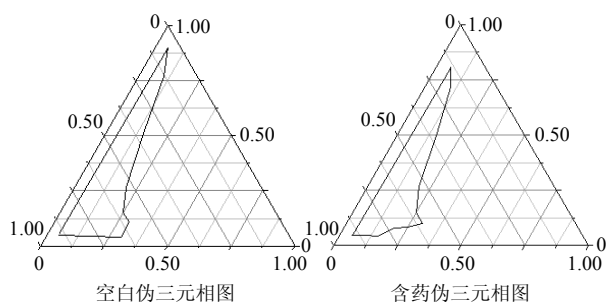


图 4 空白 (A) 与含药 (B) 伪三元相图
Fig. 4 Pseudo-ternary phase diagrams of blank (A) and TGP (B)

2.4 TGP-SMEDDS 的质量评价

2.4.1 粒径与 Zeta 电位的测定 将 TGP-SMEDDS 0.1 g 加入到 10 mL 蒸馏水，搅拌均匀，采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定 TGP-SMEDDS 的粒径及 Zeta 电位，结果其平均粒径为 (47.26 ± 0.08) nm (图 5)，Zeta 电位为 (-22.80 ± 0.42) mV (图 6)。

2.4.2 形态观察 将 TGP-SMEDDS 0.1 g，加入 10 mL 蒸馏水中，摇匀，点样于铜网上，用 2% 磷钨酸负染色，透射电镜扫描。由图 7 可见，TGP-SMEDDS 经水稀释后形成大小均匀的 O/W 型球形乳滴。

2.4.3 表面张力的测定 将 0.3 g TGP-SMEDDS 加

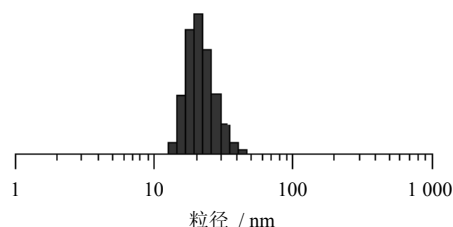


图 5 TGP-SMEDDS 粒径分布
Fig. 5 Particle size diameter distribution of TGP-SMEDDS

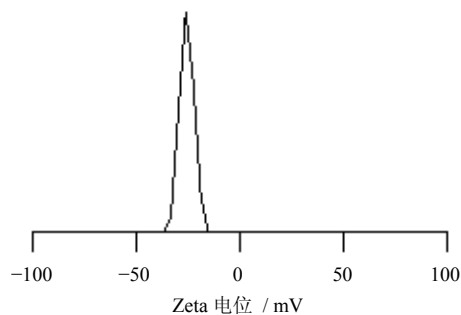


图 6 TGP-SMEDDS 稀释后的 Zeta 电位图
Fig. 6 Zeta potential of TGP-SMEDDS after being diluted

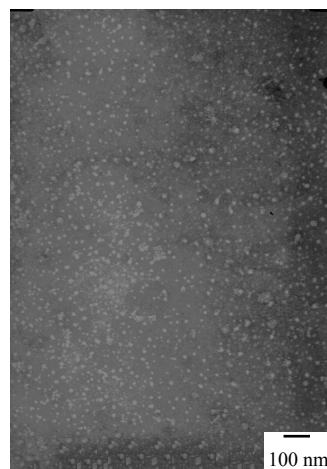


图 7 TGP-SMEDDS 透射电镜扫描图
Fig. 7 Transmission electron microphotograph of TGP-SMEDDS

入到 30 mL 蒸馏水中，轻微震荡，在 25、37 °C 下，用最大泡压法测定 TGP-SMEDDS 乳化后所得微乳液的表面张力。结果 25、37 °C 时的表面张力分别为 (42.07 ± 0.06) 、 (40.90 ± 0.10) mN/m ($n=3$)，形成微乳的表面张力比水 (71.97 mN/m) 低，表明 TGP-SMEDDS 自微乳化后体系具有较低的表面自由能，形成的微乳液性质稳定。

2.4.4 TGP-SMEDDS 自乳化效率的评价 采用目测法测定 TGP-SMEDDS 的自乳化时间。分别取 1 g TGP-SMEDDS 加入到 100 mL 蒸馏水，0.1 mol/L HCl，pH 6.8、7.4 的磷酸盐缓冲液中，目测记录自乳化时间。结果 TGP-SMEDDS 在 4 种溶液中的乳化时间分别为 (0.42 ± 0.12) 、 (0.66 ± 0.06) 、 (0.79 ± 0.14) 、 (0.49 ± 0.01) min ($n=3$)，均小于 1 min，表明制剂能够较快自乳化。

2.4.5 溶出度的测定 将处方量的 TGP-SMEDDS 装于胶囊中 (TGP 量 18.67%)，用 HPLC 法测定 TGP 自微乳化制剂的累积溶出百分率。

(1) 直接释药法: 按照《中国药典》2010 年版溶出度测定法第一法, 以 900 mL 蒸馏水为溶出介质, 转速为 100 r/min, 温度为 (37±0.5) °C, 将装有约 750 mg TGP 自微乳化制剂的胶囊放入溶出仪的小篮中, 在 5、10、20、30、45、60、90、120 min 时, 分别取样 5 mL 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 同时补入 37 °C 释放介质 5 mL, 取续滤液按“2.1”项下 HPLC 条件进行定量测定。

(2) 总体液平衡反向透析法^[10]: 按照溶出度测定法, 以 900 mL 蒸馏水为溶出介质, 转速为 100 r/min, 温度为 (37±0.5) °C, 将 8 个大小形状相同, 内含 2 mL 释放介质的透析袋完全浸入释放介质中, 平衡 12 h。取装有 TGP 自微乳化制剂的胶囊加至溶出介质中, 分别于 5、10、20、30、45、60、90、120 min 各取出 1 个透析袋, 用 HPLC 法测定袋内介质中的药物质量浓度。

由图 8 可见, TGP-SMEDDS 的释药速率很快, 直接释药法在 10 min 时药物几乎完全释放, 总体液平衡反向透析法在 30 min 内药物释放达到 80%。

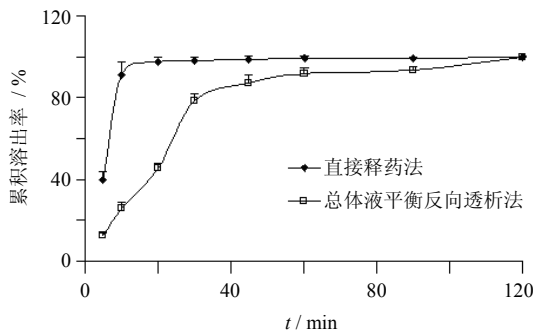


图 8 TGP-SMEDDS 的溶出曲线 (n=3)

Fig. 8 Dissolution curves of TGP-SMEDDS (n = 3)

2.4.6 稳定性考察 取 TGP-SMEDDS 适量于离心管中, 8 000 r/min 离心 10 min, 结果未出现分层现象; 将自微乳化制剂用蒸馏水稀释 100 倍, 室温下放置 10 d, 微乳仍然保持透明、均一的外观; 将适量 TGP-SMEDDS 放入安瓿瓶中, 密封, 于湿度 75%, 40 °C 条件下保存, 每隔 1 个月测定其量, 结果 3 个月内其量依次为标识量的 98.32%、97.67%、97.52%; 其外观均为透明、均一、黄褐色, 未有明显变化。

3 讨论

以油酸乙酯、Cremophor RH40、Transcutol P、

赤芍总苷组成的 TGP-SMEDDS 粒径小且分布均匀、乳化效率高、乳化后溶液稳定、溶出速率快, 为自微乳化新剂型的研究奠定基础。

本法将 O/W 型乳剂直接放入一定体积的释放介质内于 37 °C 搅拌, 一定时间取出透析袋进行检测, 这时释放介质成为油滴的分散介质, 药物从油滴中释放入介质, 符合无限稀释的条件, 能够测定游离型药物的释放, 更能反映药物溶出的真实情况, 总体液平衡反向透析法溶出结果表明 30 min 时, 有约 80% 的药物以游离形式放出。

许多中药成分都存在溶解性不好, 口服吸收差及生物利用度低的问题, 严重影响临床应用。将赤芍总苷这一传统中药制成自微乳化给药系统, 由于其粒径小, 更易被胃肠道黏膜吸收, 可以提高药物的生物利用度。TGP-SMEDDS 是一种非常有应用前景的新剂型, 为解决中药成分口服生物利用度低的问题提供了一个新的研究思路。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] Deng H, Yan C L, Xiao T, *et al.* Total glucosides of *Paeonia lactiflora* Pall. inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(3): 781-785.
- [3] 孙英莲, 王英军, 许荔新. 赤芍总苷对大鼠急性心肌缺血的影响 [J]. *中草药*, 2009, 40(12): 1961-1962.
- [4] 瞿佐发. 赤芍的最新研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2003, 14(5): 310-311.
- [5] 冀兰鑫, 黄浩, 李长志, 等. 赤芍药理作用的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(3): 233-236.
- [6] He X Y, Han L, Huang X S. A new phenolic glucoside from *Paeonia lactiflora* [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(2): 84-86.
- [7] Takeda S, Isono T, Wakui Y, *et al.* Absorption and excretion of paeoniflorin in rats [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1995, 47(12A): 1036-1040.
- [8] Liu Z Q, Jiang Z H, Liu L, *et al.* Mechanisms responsible for poor oral bioavailability of paeoniflorin: Role of intestinal disposition and interactions with sinomenine [J]. *Pharm Res*, 2006, 23(12): 2768-2780.
- [9] Chen Y, Li G, Wu X G, *et al.* Self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of vinpocetine: formulation development and *in vivo* assessment [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(1): 118-125.
- [10] 魏兰兰. 卡维地洛自乳化及自微乳化给药系统的设计与评价 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.