

电导率法筛选陈皮油微乳处方

李凌绪, 张相飞, 程艳静

青岛农业大学化学与药学院, 山东 青岛 266109

摘要: 目的 筛选陈皮油微乳处方并考察其性质。方法 在 37 °C 恒温水浴下, 滴水法制备微乳, 通过测量体系的电导率, 确定相变临界点, 绘制伪三元相图, 筛选最优空白微乳处方, 并制备陈皮油微乳。考察制剂形态、柠檬烯质量浓度、分散相形态及粒径、制剂稳定性等。结果 以油酸乙酯为油相、HEL-40 为乳化剂、甘油为助乳化剂, 以 K_m 值为 2 的空白微乳处方最佳。陈皮油微乳中柠檬烯为 $(3\ 208.67 \pm 123.62)$ mg/L, 分散近似球形, 平均粒径为 (56.5 ± 4.1) nm。结论 所制备的陈皮油微乳粒径小、分布均匀、性质稳定。

关键词: 陈皮油; 伪三元相图; 微乳; 电导率; 柠檬烯

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)12-2396-05

Prescription screening of tangerine peel oil microemulsion by conductivity method

LI Ling-xu, ZHANG Xiang-fei, CHENG Yan-jing

School of Chemistry and Pharmacy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

Abstract: Objective To screen the prescription of tangerine peel oil (TPO) microemulsion and to investigate its characteristics. **Methods** Under 37 °C, the electrical conductivity was employed to determine the critical point of phase change and dropping water method was applied to drawing the pseudo-ternary phase diagrams by which the best prescription of blank microemulsion was screened, and then the TPO microemulsion was prepared. The form, content of limonene, shape and particle size of the dispersed phase, and the stability of prepared microemulsion were investigated. **Results** The best prescription was as follows: ethyl oleate was selected as oil phase, HEL-40 as emulsifier, glycerine as cosurfactants, $K_m = 2$, and oil-mixed emulsifier (2 : 8). The total content of limonene in TPO microemulsion was $(3\ 208.67 \pm 123.62)$ mg/L, the shape of dispersed phase was nearly spherical, and the mean diameter of particles was (56.5 ± 4.1) nm. **Conclusion** The prepared TPO microemulsion is stable with small size and uniform distribution.

Key words: tangerine peel oil (TPO); pseudo-ternary phase diagram; microemulsion; conductivity; limonene

陈皮油是橘皮经水蒸气蒸馏或冷榨获得的植物精油, 其主要成分为 *d*-柠檬烯, 质量分数在 80% 左右。柠檬烯用于治疗胆囊炎、胆管炎、胆结石、胆道术后综合征以及消化不良、气管炎等^[1], 近年来的研究表明 *d*-柠檬烯及其体内代谢物 *d*-紫苏醇对乳腺癌、胰腺癌、皮肤癌、肝癌、肺癌、胃癌、白血病等多种肿瘤具有化学预防和治疗作用, 其中抗乳腺癌作用已进入临床 I 期和 II 期试验^[2-6]。柠檬烯具有强疏水性, 不易吸收, 现有的剂型主要是胶囊剂和滴丸, 难以到达肿瘤部位, 致使柠檬烯生物利用度低。

微乳作为一种纳米级的给药系统, 可提高难溶

性药物和脂溶性药物的溶解度, 并具有缓释和靶向性, 特别是在淋巴靶向和脑靶向方面具有独特的优势和潜在的应用价值^[7-9]。本实验将陈皮油制备成微乳剂型, 旨在提高 *d*-柠檬烯在水中的溶解度, 提高其肿瘤靶向作用, 提高 *d*-柠檬烯的生物利用度, 为肿瘤的预防治疗提供低成本的药物选择。

微乳处方筛选的传统方法是制备伪三元相图^[10], 靠目测观察浑浊-澄清-浑浊现象及液体的流动性来判断相转变的临界点, 其影响因素较多, 不准确, 重复性较差, 且难以界定双连续相与 O/W 相间的临界点。电导行为是微乳液的重要性质之一, 在某种程度上反映了微乳液的结构和性质^[11]。随着微乳

收稿日期: 2012-04-20

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (2010ZRCQ026)

作者简介: 李凌绪 (1979—), 男, 山东莱芜人, 硕士, 讲师, 研究方向为药剂学。Tel: (0532)88030522 15315509536 E-mail: lingxulipvi@126.com

网络出版时间: 2012-09-28 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120928.1206.003.html>

体系中含水量的增加,电导率表现出渐进的连续变化,出现急剧上升、增势变缓、陡然下降的趋势,因此电导率被应用于微乳的相行为和结构研究^[12-16]。已有药学工作者利用电导率-含水量曲线制备微乳,确定 O/W 型微乳成型临界值,结果准确^[17-18]。本实验对陈皮油微乳进行了处方筛选,以电导率-含水量曲线法判断其相变临界值,精确判定陈皮油的 O/W 型微乳区,为陈皮油微乳处方设计提供理论指导。

1 仪器与材料

Nicomp—380/ZLS 激光电泳-粒度测定仪(美国 PSS 公司)、JEM—1200EX 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)、LC—10A 高效液相色谱仪(日本岛津公司)、N—2000 色谱工作站(浙大智达信息工程公司)、UV—9100 型双通道紫外-可见分光光度计(北京普析通用公司)、SX713 电导率测定仪(上海三信仪表厂)。

陈皮油(批号 20091103,药用级,江西吉安市恒诚天然香料油提炼厂),柠檬烯对照品(质量分数 99.9%,批号 100470-200909,中国药品生物制品检定所)。乙腈(色谱纯,天津市申通化工有限公司);肉豆蔻酸异丙酯(IPM)、聚山梨酯 80(国药集团化学试剂公司),油酸乙酯(EO,上海飞祥化工厂),聚氧乙烯醚(40)蓖麻油(EL-40)、聚氧乙烯醚(40)氢化蓖麻油(HEL-40)(江苏省海安石油化工厂),以上试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 微乳处方筛选

2.1.1 伪三元相图的制备 将乳化剂与助乳化剂配成混合液(混合乳化剂),将油相与混合乳化剂按质量比 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 混合均匀,使其总量为 10 g,在 37 ℃ 恒温匀速搅拌下向混合液中逐滴加入蒸馏水,每加水 1 mL 测量记录混合体系的电导率,同时用肉眼观察,如形成透明或半透明、有蓝色乳光、流动性好的溶液且体系电导率达到最高点开始下降时即为微乳。使用 Origin 8.0 软件绘制伪三元相图,以形成微乳区的大小为指标,筛选最优空白微乳处方。

2.1.2 油相的确定 以豆油、EO、IPM 为油相,以 EL-40 为乳化剂,无水乙醇为助乳化剂,乳化剂与助乳化剂质量比(K_m)值为 2,按“2.1.1”项方法制备微乳绘制伪三元相图对油相进行筛选。以豆油为油相没有得到微乳,以 EO 和 IPM 为油相可获得微乳,其伪三元相图见图 1。由图可知,二者形成

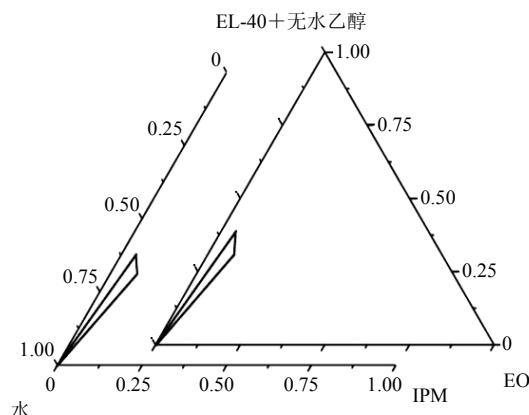


图 1 不同油相制备的微乳的伪三元相图

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagram of microemulsion with different oil phases

的微乳区大小相近,但实验过程中观察到以 EO 为油相形成的凝胶区和微乳区更明显,且透明度高,便于实验现象的观察,因而选用 EO 作为油相。

2.1.3 乳化剂的确定 以 EO 为油相,聚山梨酯 80、EL-40、HEL-40 为乳化剂,以无水乙醇为助乳化剂, K_m 值为 2,按“2.1.1”项方法制备微乳绘制伪三元相图对乳化剂进行筛选。以聚山梨酯 80 为乳化剂无法制得微乳,以 EL-40 和 HEL-40 为乳化剂可获得微乳区,其伪三元相图见图 2。由图可知,以 HEL-40 为乳化剂形成的微乳区明显大于以 EL-40 为乳化剂形成的微乳区,因而选择 HEL-40 为乳化剂。

2.1.4 助乳化剂的确定 以 EO 为油相,HEL-40 为乳化剂,无水乙醇、正丁醇、甘油为助乳化剂, K_m 值为 2,按“2.1.1”项方法制备微乳绘制伪三元相图对助乳化剂进行筛选。以无水乙醇、正丁醇和甘油为助乳化剂,均可制得微乳,其伪三元相图见图 3。

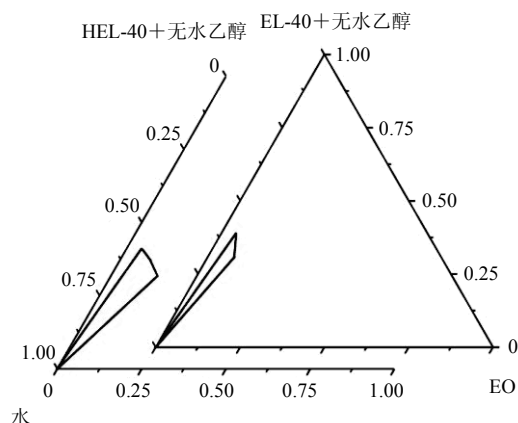


图 2 不同乳化剂制备的微乳的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagrams of microemulsion with different emulsifiers

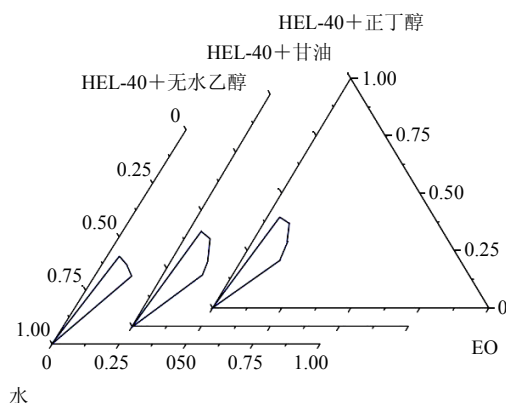
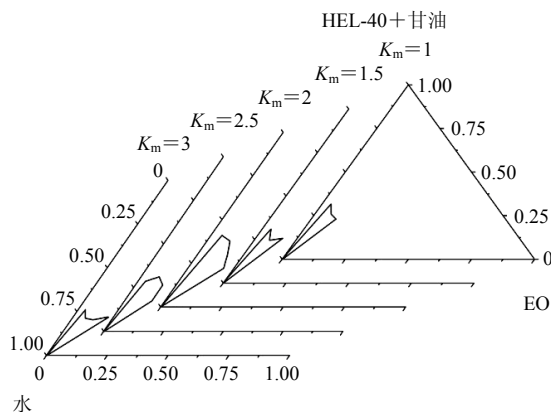


图3 不同助乳化剂制备的微乳的伪三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagrams of microemulsion with different co-emulsifiers

由图可知,以甘油和正丁醇为助乳化剂形成的微乳区较大,但以甘油为助乳化剂形成的微乳透明度较高,因此选择甘油为助乳化剂。

2.1.5 K_m 值的确定 以EO为油相,HEL-40为乳化剂,甘油为助乳化剂, K_m 值分别为1、1.5、2、2.5、3,按“2.1.1”项方法制备微乳绘制伪三元相图对 K_m 值进行筛选。在供试 K_m 值下均可获得微乳,其伪三元相图见图4。由图可知, K_m 值过低时,混合乳化剂的乳化能力不好, K_m 值为2和2.5的乳化能力较好,为了减少乳化剂用量,选用 K_m 值为2。

图4 不同 K_m 值制备的微乳的伪三元相图Fig. 4 Pseudo-ternary phase diagrams of microemulsion with different K_m

2.2 空白微乳与含药微乳的制备

由以上结果可得空白微乳最优处方:油相为油酸乙酯,乳化剂为HEL-40,助乳化剂为甘油, $K_m=2$,图4中 $K_m=2$ 的相图即为空白微乳最优处方相图。从该相图微乳区中任选一点,按此点的比例(如油-混合乳化剂-水 1:4:66.7)制备空白微乳和含

药(陈皮油)微乳。空白微乳处方为取EO 1.535 g、HEL-40 3.958 g、甘油 2.143 g,加水 100 mL,于37℃恒温水浴下搅拌,搅拌均匀后形成白色半透明空白微乳,放置备用。取陈皮油 0.521 1 g、EO 0.992 9 g、HEL-40 4.054 9 g、甘油 2.003 0 g,加水 100 mL,于37℃恒温水浴下搅拌,搅拌均匀后形成无色透明含药微乳,室温放置备用。

2.3 微乳中柠檬烯的测定

2.3.1 检测波长的确定 将柠檬烯对照品用乙醇溶解并稀释,以乙醇作对照,在紫外-可见分光光度计上于波长190~400 nm内扫描,发现柠檬烯在214 nm处具有最大吸收峰,而空白微乳没有吸收,故选择210 nm为检测波长。

2.3.2 色谱条件 色谱柱为Bondapak C_{18} 柱(300 mm×3.9 mm, 5 μ m),流动相为乙腈-水(8:2),体积流量0.5 mL/min,检测波长210 nm,进样量20 μ L,柱温25℃。在上述色谱条件下柠檬烯的保留时间为9.35 min,陈皮油微乳在9.35 min处有色谱峰,而空白微乳无色谱峰(图5)。

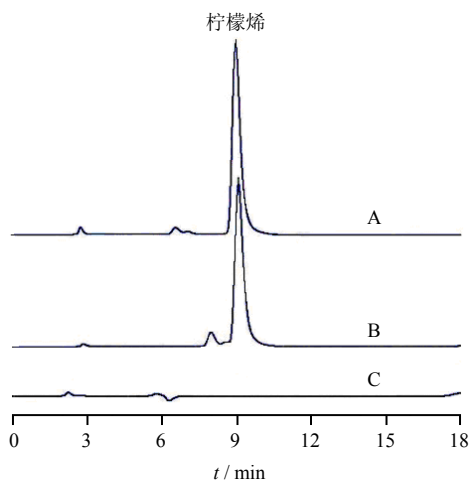


图5 柠檬烯对照品(A)、陈皮油微乳(B)及空白微乳(C)的HPLC色谱图

Fig. 5 HPLC chromatograms of limonene reference substance (A), TPO microemulsion (B), and blank microemulsion (C)

2.3.3 线性关系考察 精密称取柠檬烯对照品30 mg,置50 mL量瓶中,用流动相定容,作为储备液。分别精密量取该储备液0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL置5 mL量瓶中,用流动相定容,分别进样测定,记录色谱图,面积归一化法测定峰面积。以对照品质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=71\ 895.804\ 4$

$X=32\ 279.682\ 4$, $r=0.997\ 8$, 表明柠檬烯在 6~60 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.4 精密度试验 取陈皮油微乳 0.2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用流动相定容, 按“2.3.2”项色谱条件进样分析, 连续进样 6 次, 记录柠檬烯色谱峰面积, 结果柠檬烯色谱峰面积的 RSD 值为 1.13%。

2.3.5 稳定性试验 取陈皮油微乳 0.2 mL, 按“2.3.4”项方法制备供试液, 密闭 25 °C 保存, 每隔 2 h 进样 1 次, 测定 5 次, 结果日内 RSD 为 0.90%; 每日进样 1 次, 测定 5 次, 日间 RSD 为 1.51%。

2.3.6 回收率试验 精密量取上述柠檬烯对照品储备液 150、250、350 μL 分别置 5 mL 量瓶中, 加入相当量的空白微乳, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。按“2.3.2”的色谱条件分别进样测定其柠檬烯的量, 计算 3 种质量浓度下回收率分别为 $(104.08 \pm 1.16)\%$ 、 $(103.18 \pm 1.13)\%$ 、 $(93.80 \pm 1.34)\%$ ($n=3$)。

2.3.7 陈皮油微乳的测定 取 0.1 mL 陈皮油微乳, 置 10 mL 量瓶中, 用流动相定容, 按“2.3.2”项色谱条件进样分析, 将测得的峰面积带入线性回归方程, 得陈皮油微乳中柠檬烯的质量浓度为 $(3\ 208.67 \pm 123.62)$ mg/L, RSD 值为 1.01% ($n=3$)。

2.4 微乳形态观察

滴 1 滴陈皮油微乳于覆有 Formvar 膜的铜网上, 用 2% 磷钨酸对载有陈皮油微乳的铜网负染, 晾干后通过透射电镜可观察到陈皮油微乳近似球形, 粒径分布比较均匀 (图 6)。

2.5 微乳粒度测定

采用激光散射法, 以 Gaussian 分布的相对体积-质量径表示。测得陈皮油微乳平均粒径为 (56.5 ± 4.1) nm ($n=3$)。粒径分布见图 7。

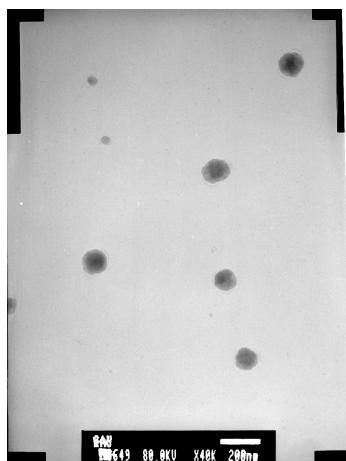


图 6 透射电镜下陈皮油微乳的形态

Fig. 6 Morphology of TPO microemulsion under TEM

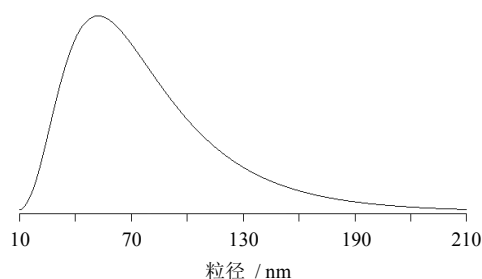


图 7 陈皮油微乳的粒径分布图

Fig. 7 Particle size distribution of TPO microemulsion

2.6 稳定性考察

取陈皮油微乳适量, 分别在 4、25 °C 下放置 60 d, 考察微乳的外观、粒径及质量分数, 结果见表 1。可见制备的陈皮油微乳质量分数和粒径均比较稳定。

表 1 稳定性试验结果 ($n=3$)

Table 1 Results of stability test ($n=3$)

放置条件	外观	质量分数 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	粒径 / nm
25 °C, 0 d	澄明	$3\ 208.67 \pm 123.62$	56.5 ± 4.1
4 °C, 60 d	澄明	$3\ 178.60 \pm 48.53$	57.5 ± 4.0
25 °C, 60 d	澄明	$3\ 163.03 \pm 99.59$	56.6 ± 5.4

3 讨论

微乳因其粒径小, 可增加疏水物质的溶解度, 作为药物载体可提高药物的生物利用度, 已引起了药学工作者的重视。在微乳的处方筛选中, 为获得载量药较大、稳定性较好的微乳, 通常借助绘制伪三元相图, 以微乳区面积的大小为指标筛选处方, 而微乳区面积的确定很大程度上取决于微乳相变临界点的判断。因此, 微乳相变临界点值是否准确对最终结果具有重大影响。采用滴水法制备微乳, 随着水的滴加, 体系可能会经历 W/O 微乳、W/O 乳液、凝胶、液晶、双连续微乳、O/W 微乳等不同的相, 其中液晶、双连续微乳、O/W 微乳在外观上都澄清透明单凭肉眼难以区分。一般借助偏光显微镜区别液晶和微乳, 利用染色法区分双连续相和 O/W 微乳, 特别是双连续相和 O/W 微乳仅凭肉眼更难准确判断。

Lagourette 等^[11]首次报道了微乳相变过程的电导率行为后, Laguës 等^[19-21]提出渗滤电导模型解释了微乳液电导率随相结构变化的特征, 此后电导率被应用于微乳相行为研究^[12-16], 向大位等^[17]比较了目测法与电导率-含水量曲线法确定 O/W 型微乳成型临界值准确性, 结果表明电导率-含水量曲线法更加准确, 重复性好, 具有理论可行性和科学性。本

实验通过测量微乳制备过程中体系的电导率,提出以电导率最大值来确定 O/W 型微乳成型临界值的方法,可精确判断微乳相变临界点,减少目测造成的误差,可为柠檬烯的临床应用剂型研究提供理论依据。

致谢:微乳粒径的测定和形态观察得到青岛大学医学院王春波教授、韩彦弢老师和谭金山老师的帮助。

参考文献

- [1] 赖 艳, 蒋学华, 王 凌, 等. 柠檬烯胶囊在人体内的相对生物利用度 [J]. 华西药学杂志, 2009, 24(2): 165-167.
- [2] 陈娇娇, 刘冰弥, 徐莉英, 等. 柠檬烯类似物的合成及其体外抗癌活性 [J]. 中国药物化学杂志, 2006, 16(6): 356-359.
- [3] 杨 真, 纪 军, 刁凤声. 右旋柠檬烯诱导人白血病细胞凋亡作用机制的初步研究 [J]. 肿瘤, 2008, 28(11): 938-941.
- [4] 高 大, 肖 镇, 吕爱娥. *d*-柠檬烯对 K562 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2006, 14(6): 1120-1122.
- [5] 王 玲, 张秀珍. *d*-柠檬烯对人胃癌 MGC803 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 生命科学仪器, 2009, 7(1): 26-28.
- [6] 王金香, 张玉祥. *d*-柠檬烯诱导白血病细胞凋亡的机制研究 [J]. 科技资讯, 2010(5): 6-9.
- [7] 王春龙, 江荣高, 刘健华. 微乳体系对药物吸收、分布和药动学的影响 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(10): 723-726.
- [8] 李立民, 陈庆华. 纳米给药系统的淋巴靶向作用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2006, 41(24): 1847-1850.
- [9] 武 健, 李超英. 微乳治疗系统靶向缓释性研究进展 [J]. 吉林中医药, 2007, 27(5): 62-63.
- [10] 徐 婷, 葛淑敏, 邓礼荷, 等. 土槿皮乙酸微乳的制备及体外经皮渗透性研究 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 683-689.
- [11] Lagourette B, Peyrelasse J, Boned C, *et al.* Percolative conduction in microemulsion type systems [J]. *Nature*, 1979, 281(6): 60-62.
- [12] 罗静卿, 赵新华, 周 固. CTAB/正丁醇-正辛烷-水和盐水的拟三元体系相图及微乳液微观结构的电导研究 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(6): 1085-1089.
- [13] 侯长军, 刁显珍, 唐一科, 等. 十六烷基三甲基溴化铵/正丁醇/正辛烷/水油包水型微乳体系的相行为 [J]. 化学工程, 2008, 36(4): 41-44.
- [14] 孙 华, 路福绥, 赵 辉. 氰戊菊酯微乳液相行为及其结构转变 [J]. 应用化学, 2005, 22(7): 780-783.
- [15] 郑永军, 吾满江·艾力. Tween80/BmimPF₆/醇/甲苯体系的相行为 [J]. 物理化学学报, 2008, 24(11): 2143-2148.
- [16] 薛美玲, 于永良. 丙烯酸酯及苯乙烯微乳体系的相行为及微乳聚合 [J]. 应用化学, 2003, 20(10): 986-990.
- [17] 向大位, 唐甜甜, 彭金飞, 等. 电导率-含水量曲线法与目测法确定 O/W 型微乳成型临界值的比较 [J]. 药学报, 2010, 45(8): 1052-1056.
- [18] 陈丽华, 赵小婷, 吴德智, 等. 电导率法筛选微乳处方及其相行为的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(1): 40-43.
- [19] Laguës M, Sauterey C. Percolation transition in water in oil microemulsions. Electrical conductivity measurements [J]. *J Physical Chem*, 1980, 84(26): 3503-3508.
- [20] Dvolaitzky M, Laguës M, Le Pesant J P, *et al.* A structural description of microemulsions. Small-angle neutron scattering and electrical conductivity study [J]. *J Phys Chem*, 1980, 84(12): 1532-1535.
- [21] Laguës M, Ober R, Taupin C. Study of structure and electrical conductivity in microemulsions: evidence for percolation mechanism and phase inversion [J]. *J Physique Lett*, 1978, 39(24): 487-491.