

· 药剂与工艺 ·

β -细辛醚微乳的制备及其性质考察

许日鑫, 石添香, 廖 娟, 林华燕, 林微微, 欧斯健, 魏 刚*

广州中医药大学 新药开发研究中心, 广东 广州 510006

摘要: 目的 制备 β -细辛醚微乳, 并对其性质进行考察。方法 根据 β -细辛醚在各溶媒中的溶解度初步确定处方组成, 通过绘制伪三元相图对处方进行优化; 采用 HPLC 法测定微乳中 β -细辛醚的质量分数; 以外观、粒径及其分布、多分散指数 (PI)、pH 值、黏度和 β -细辛醚的质量分数为指标考察所制备微乳的初步稳定性。结果 优化的处方组合为 β -细辛醚-肉豆蔻酸异丙酯-聚氧乙烯蓖麻油-丙三醇的质量比为 1 : 2 : 8 : 2。制备的微乳澄清透明, 有蓝色乳光, 平均粒径为 (18.2 ± 0.2) nm, PI 为 0.222 ± 0.005 , pH 值为 6.50 ± 0.01 , 10 000 r/min 离心 10 min 后和高温灭菌后均无分层现象, 平均载药量为 (21.5 ± 0.48) mg/mL。结论 所制备的微乳理化性质较稳定, 符合鼻腔给药制剂的标准。

关键词: β -细辛醚; 微乳; 伪三元相图; 鼻腔给药; 理化性质

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)01-0031-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.01.007

Preparation and quality investigation of β -asarone microemulsion

XU Ri-xin, SHI Tian-xiang, LIAO Xian, LIN Hua-yan, LIN Wei-wei, OU Si-jian, WEI Gang

Research Center of New Drug Development, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** To prepare β -asarone microemulsion (β -AME) and to investigate its physicochemical properties. **Methods** The formulation was investigated by solubility experiment and optimized by pseudoternary phase diagram; The content of β -asarone was determined by HPLC method. Physical appearance, particle size and its distribution, polydispersity index (PI), pH value, viscosity, and content of β -asarone were used as indexes to evaluate the stability of β -AME. **Results** The optimized formulation was as follows: The proportion of β -asarone-isopropyl myristate-Cremophor EL-glycerol was 1 : 2 : 8 : 2. The emulsion was transparent liquid with blue opalescence; The average particle size of β -AME was (18.2 ± 0.2) nm with a PI of 0.222 ± 0.005 ; The pH value was 6.50 ± 0.01 , and after high temperature sterilizing and centrifuging at 10 000 r/min for 10 min there was no stratification; The drug loading amount was (21.5 ± 0.48) mg/mL. **Conclusion** The physicochemical properties of β -AME are relatively stable, which meets the standards of intranasal administration preparations.

Key words: β -asarone; microemulsion; pseudoternary phase diagram; intranasal administration; physicochemical properties

随着世界范围内人口老龄化程度的提高, 阿尔茨海默病发病率不断上升, 已成为继肿瘤、心脏病、脑卒中之后引起老年人死亡的第四大疾病^[1], 给家庭和社会带来很大负担。加强对阿尔茨海默病的防治研究, 关系到老龄社会人群的生活乃至生存质量, 必须予以足够的重视。 β -细辛醚是石菖蒲挥发油中的主要成分, 药理学研究表明 β -细辛醚具有改善学习记忆, 对抗心肌缺血^[2]、调血脂^[3]、减少淀粉样蛋白 β (1-40)^[4]的作用。同时 β -细辛醚能使细胞内

钙离子浓度增高受抑, 细胞凋亡减少, 血清超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平增高, 丙二醛 (MDA) 水平降低, 从而达到防治小鼠老年痴呆的作用^[5-6]。

鼻腔给药系统是指在鼻腔内给药, 经鼻黏膜吸收而发挥局部靶向或者全身作用的制剂^[7]。鼻黏膜在生理解剖上与脑部存在着独特的联系, 药物经鼻腔进入脑组织主要有 3 条通路: 嗅神经通路、嗅黏膜上皮通路和血液循环通路^[8]。前两条通路均可以

收稿日期: 2012-07-18

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2009ZX09103-429)

作者简介: 许日鑫 (1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事中药新药制剂与指纹图谱分析。Tel: (020)39358519 E-mail: 2006031198@163.com

*通信作者 魏 刚 Tel: (020)39358519 E-mail: weigang021@163.com

网络出版时间: 2012-11-26 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121126.1800.008.html>

直接吸收进入脑组织,因此,通过鼻腔给药可以使不易透过血脑屏障的药物实现脑靶向。

β -细辛醚脂溶性大,在水中溶解性不好,降低了鼻腔内的药物传递,加上鼻黏膜纤毛的自洁运动,使药物很快被当做异物清除,使鼻黏膜与药物接触时间短。为克服以上缺点,将 β -细辛醚制备成具有生物黏附性的微乳,以提高鼻腔内药物传递效果。本实验通过溶解度试验、伪三元相图研究筛选出微乳的处方,制备理化性质稳定的 β -细辛醚微乳(β -AME),并对其理化性质进行考察。

1 仪器与材料

LC—20AT 岛津高效液相色谱仪, HC—3018 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),磁力加热搅拌器、涡旋振荡器(上海乔跃电子有限公司), Nano-Zetasize 3000HS 型激光粒度分析仪(英国马尔文仪器有限公司)。

β -细辛醚(自制, HPLC 峰面积归一化法测得质量分数为 99.2%), 聚氧乙烯-35-蓖麻油(EL-35, 批号 86096077Q0)、聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40, 批号 79062488Q0) 德国巴斯夫股份有限公司, 聚山梨酯 80、无水乙醇(天津市大茂化学试剂厂), 肉豆蔻酸异丙酯(IPM, 货号 1103758)、曲拉通 X-100(OP, 批号 38632)、油酸乙酯均为阿拉丁试剂有限公司产品, 茶油(江西恩泉油脂有限公司, 药用级), 1,2-丙二醇(天津市富宇精细化工有限公司), 丙三醇(天津市百世化工有限公司), 甲醇(分析纯, 广东光华化学厂有限公司), 甲醇(色谱纯, 默克化工)。

2 方法与结果

2.1 处方的确定

2.1.1 β -细辛醚在各辅料中的溶解度测定 测定 β -细辛醚在不同油相(茶油、IPM、油酸乙酯)、乳化剂(EL-35、RH-40、聚山梨酯 80、OP)和助乳化剂(无水乙醇、1,2-丙二醇、丙三醇)中的溶解度。在 25℃下,将足量 β -细辛醚分别加入含有 1 mL 溶媒的试管中。密封后将试管于涡旋混合器上涡旋 20 min,使药物充分溶解。然后将混合物于 5 000 r/min 下离心 10 min,吸取 0.50 mL 上清液,用甲醇稀释 1 000 倍,采用 HPLC 法分析其质量浓度,计算溶解度,结果见表 1。

2.1.2 油相、乳化剂和助乳化剂的初步选择 微乳中所用的油相必须对药物有一定的溶解能力,以确保所制备的微乳能够完全包封药物。中长链脂肪酸油脂具有良好的流动性、溶解性能及乳化能力,常

表 1 β -细辛醚在不同溶媒中的溶解度 ($n=3$)

Table 1 Solubility of β -asarone in different solvents ($n=3$)

溶 媒	溶解度 / (mg·mL ⁻¹)	溶 媒	溶解度 / (mg·mL ⁻¹)
茶油	69.60±0.59	聚山梨酯 80	177.00±0.09
IPM	78.60±0.17	OP	161.30±0.33
油酸乙酯	75.90±0.72	无水乙醇	13.20±0.17
EL-35	157.60±0.02	1,2-丙二醇	12.00±0.16
RH-40	160.20±0.35	丙三醇	16.40±0.03

在微乳系统中被优先考虑。根据溶解度试验结果可知 IPM、油酸乙酯和茶油都能较好地溶解 β -细辛醚,溶解度分别为 78.6、76.0、69.6 mg/mL,故本实验选择上述 3 种油作为微乳的油相,进一步考察。

乳化剂是形成微乳的基本物质,其主要作用是降低界面张力形成界面膜,促使微乳形成。较为常用的有聚氧乙烯型、聚山梨酯类等。本实验考虑到乳化剂的亲水/亲油平衡值(HLB 值)及乳化能力,结合前面溶解度试验的测定结果,选择聚山梨酯 80(HLB=15)、EL-35(HLB=13)、RH-40(HLB=15) 3 种对 β -细辛醚溶解能力较强的乳化剂进行研究,三者的 HLB 值均符合 O/W 型微乳的要求。

助乳化剂可以辅助溶解药物和乳化剂,进一步降低表面张力,同时还可以增大乳滴界面膜的柔顺性,促进曲率半径很小的膜的形成。根据预试验和 β -细辛醚溶解度试验的测定结果, β -细辛醚在丙三醇中的溶解度最大,且丙三醇的不良反应少,所以本实验选择丙三醇作为微乳的助乳化剂。

2.1.3 微乳的伪三元相图研究

(1)油相的确定:本实验考察的是 O/W 型微乳,故只对微乳的 O/W 区域进行考察。分别以 IPM、油酸乙酯和茶油为油相;聚山梨酯 80、EL-35 和 RH-40 为乳化剂;丙三醇为助乳化剂,绘制乳化剂与助乳化剂之比(K_m)为 4:1 时的伪三元相图。即 $K_m=4:1$ 的条件下,将乳化剂和助乳化剂组成的混合乳化剂与油相按照 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 比例分别混合,在磁力搅拌下,用有刻度注射器缓缓加水滴定;当溶液由浑浊变为澄清或者由澄清变为浑浊时,记录此时加入的水量。用 Origin 7.5 软件绘制微乳的伪三元相图,结果见图 1。可知 $K_m=4:1$ 时,当以 EL-35 为乳化剂,IPM 为油相形成的微乳区域大于以油酸乙酯和茶油为油相形成的微乳区。当以聚山梨酯 80 和 RH-40 为乳化剂时,也有相同的结果。因此,将 IPM

作为本研究的油相。

(2) 乳化剂和 K_m 值的确定: 以 IPM 为油相, 丙三醇为助乳化剂, 考察聚山梨酯 80、EL-35 和 RH-40 在不同 K_m 值 (2:1、3:1、4:1) 条件下所形成的微乳区域。当以 EL-35 为乳化剂时, 随着 K_m 值增大, 微乳区域也随之增大, $K_m=4:1$ 时获得的微乳区域最大, 结果见图 2。当以聚山梨酯 80 和 RH-40 为乳化剂时, 也有相同的结果, 这与文献报道一致^[9]。当 $K_m=4:1$ 时, 以聚山梨酯 80、EL-35 和 RH-40 作为乳化剂制备伪三元相图, 结果以

EL-35 为乳化剂时所形成的微乳区域最大, 见图 3。因此, 本研究选择 EL-35 作为乳化剂, 确定 K_m 值为 4:1。

2.1.4 β -细辛醚微乳处方确定 由于 β -细辛醚在乳化剂和油相中均有较大的溶解度, 因此本实验先将 β -细辛醚加入油相中搅拌溶解, 然后将混合乳化剂加入到油相中, 搅拌使其混合均匀, 最后将水相逐滴滴加到混合油相当中, 直至搅拌形成透明的微乳系统。 β -细辛醚微乳最终处方为 β -细辛醚 1.0 g、IPM 2.0 g、EL-35/丙三醇 ($K_m=4:1$) 10.0 g、蒸馏水

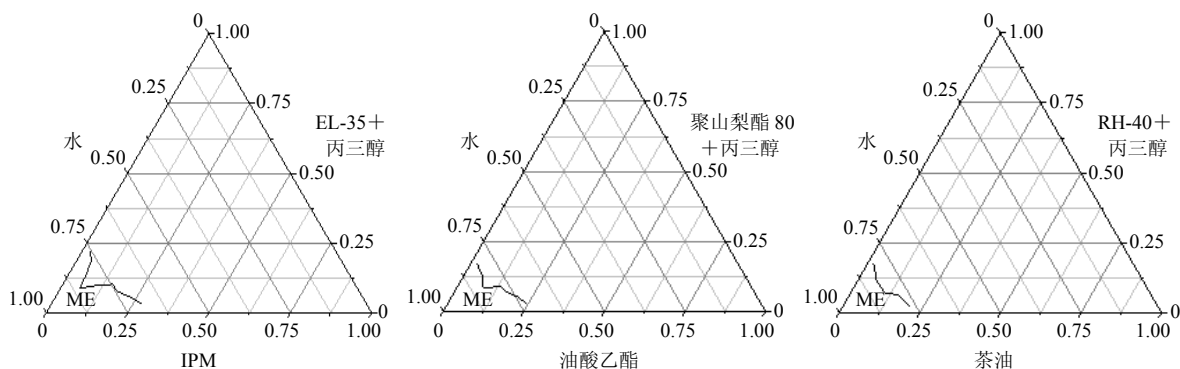


图 1 不同油相的伪三元图

Fig. 1 Pseudoternary phase diagrams of different oils

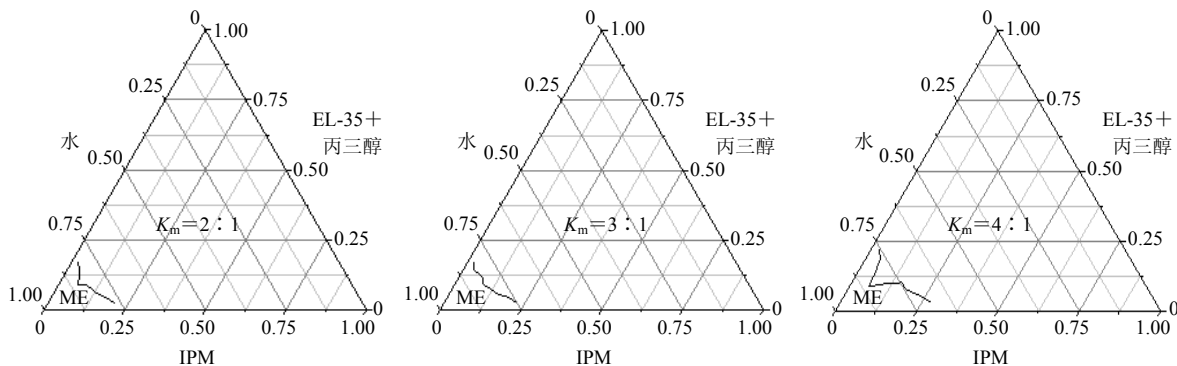


图 2 不同 K_m 的伪三元图

Fig. 2 Pseudoternary phase diagrams of different K_m

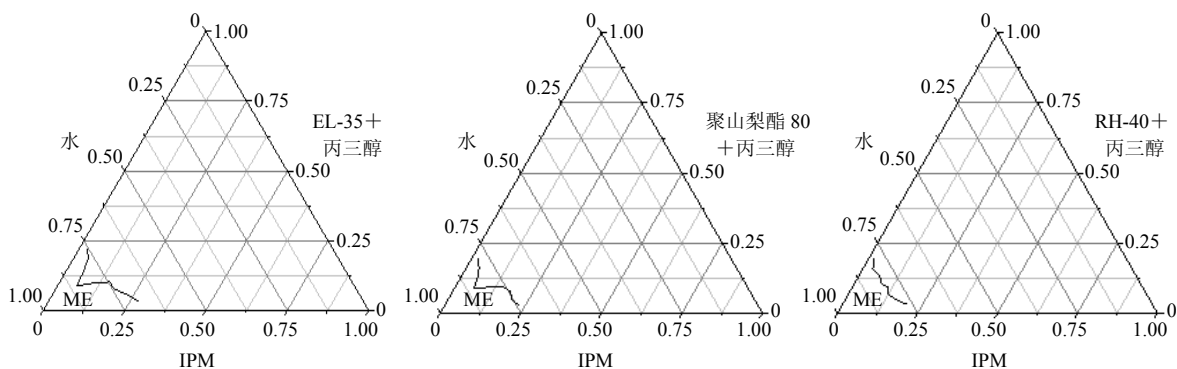


图 3 不同乳化剂的伪三元图

Fig. 3 Pseudoternary phase diagrams of different emulsifiers

25.0 g, 所形成的微乳澄清透明均一, 有蓝色乳光。

2.1.5 β -细辛醚微乳制备工艺的验证 将 1.0 g β -细辛醚加入 2.0 g IPM 中搅拌溶解, 然后将 10.0 g 混合乳化剂 (8.0 g EL-35 和 2.0 g 丙三醇混合物) 加入到油相中, 搅拌使其混合均匀, 最后将 25.0 g 蒸馏水逐滴滴加到混合油相当中, 直至搅拌形成透明均一的微乳系统, 重复 3 批, 所形成的微乳澄清透明均一, 有蓝色乳光, 与筛选得到的最佳处方基本一致。

2.2 β -细辛醚微乳的外观性状和有关性质

β -细辛醚微乳为透明均一, 有蓝色乳光的液体, 流动性良好, 黏度值 (2.57 ± 0.32) mPa·s ($n=3$), pH 值为 6.50 ± 0.01 ($n=3$), 电导率为 (76.00 ± 0.23) μ S/cm ($n=3$)。

2.3 粒径及其分布

取 3 批自制的 β -细辛醚微乳, 稀释约 10 倍后测定其粒径。结果显示, 3 批样品的平均粒径为 (18.2 ± 0.2) nm, 多分散系数 (PI) 为 0.222 ± 0.005 , 粒径分布范围 11.6~21.2 nm。结果见图 4。

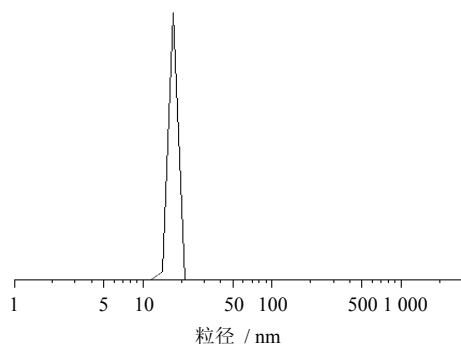


图 4 β -细辛醚微乳粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of β -AME

2.4 离心稳定性及灭菌稳定性

根据《中国药典》2010 年版二部附录要求, 将自制 β -细辛醚微乳以 10 000 r/min 离心 15 min, 无分层现象, 符合要求。

取自制 β -细辛醚微乳灌装密封后 100 $^{\circ}$ C 高压蒸汽灭菌 30 min, 测定其粒径、pH 值、载药量的变化情况。结果表明, 灭菌后乳剂的平均粒径和 PI

变化不大, pH 值、载药量均无显著性变化, 说明该灭菌过程对微乳的稳定性无显著影响, 结果见表 2。

表 2 β -细辛醚灭菌稳定性试验结果 ($n=3$)

Table 2 β -asarone sterilizing stability ($n=3$)

时 间	粒径 / nm	PI	pH 值	载药量 / (mg·mL ⁻¹)
灭菌前	18.20 ± 0.20	0.220 ± 0.005	6.500 ± 0.011	21.500 ± 0.048
灭菌后	18.40 ± 0.44	0.210 ± 0.034	6.400 ± 0.021	20.120 ± 0.079

2.5 常温留样考察

将 β -细辛醚微乳封存于棕色西林瓶中, 在温度 25 $^{\circ}$ C、相对湿度 75% 条件下分别放置 0、3、6 个月, 发现微乳仍保持澄清透明, 未见油水分层, 其黏度以及载药量无明显变化。结果见表 3。

表 3 常温留样试验考察结果 ($n=3$)

Table 3 Samples test at room temperature ($n=3$)

时间 / 月	pH 值	粒径 / nm	黏度 / (mPa·s)	载药量 / (mg·mL ⁻¹)
0	6.500 ± 0.011	18.20 ± 0.20	2.57 ± 0.32	21.500 ± 0.048
3	6.400 ± 0.058	20.00 ± 0.57	2.63 ± 0.38	20.360 ± 0.003
6	6.400 ± 0.062	21.00 ± 0.43	2.96 ± 0.65	20.120 ± 0.021

2.6 微乳中 β -细辛醚的测定

2.6.1 色谱条件和系统适应性 色谱柱为 Waters Shield C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-水 (70:30), 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 37 $^{\circ}$ C, 进样体积为 10.0 μ L, 在此色谱条件下, 微乳中辅料对 β -细辛醚的测定无干扰。色谱图见图 5。

2.6.2 供试品溶液的制备 取 β -细辛醚微乳 1.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 涡旋振荡, 离心, 精密取 1.0 mL 上清液至 100 mL 量瓶中, 甲醇定容, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液即为供试品溶液。空白微乳溶液同法制备。

2.6.3 标准曲线的绘制 精密称取 β -细辛醚对照品 145.8 mg 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 用移液管精密量取 1 mL 于 100 mL 量瓶, 配成 145.8 μ g/mL 的 β -细辛醚对照品储备液。然后分别用甲醇稀释成

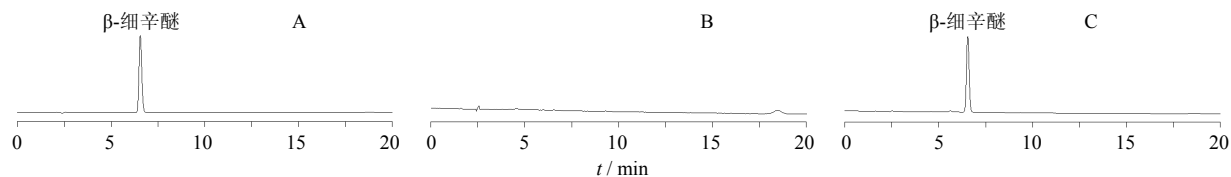


图 5 β -细辛醚对照品 (A)、空白微乳 (B) 和含药微乳 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 5 HPLC chromatograms of β -asarone reference substance (A), blank microemulsion (B), and β -AME (C)

14.58、29.16、43.74、58.32、72.90、87.48 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液,按“2.6.1”项下的操作方法进样分析,以色谱峰面积(A)对 β -细辛醚的质量浓度(C , $\mu\text{g/mL}$)进行线性回归,得回归方程为 $A=26\,565\,C+10\,970$, $r=0.999\,9$,结果表明 β -细辛醚在14.58~87.48 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积的线性关系良好。

2.6.4 精密度试验 取29.16 $\mu\text{g/mL}$ β -细辛醚对照品溶液连续进样6次,每次10 μL ,按“2.6.1”项下色谱条件测定峰面积,其峰面积的RSD为0.44%。

2.6.5 稳定性试验 取同一样品溶液,按“2.6.1”项下色谱条件,分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定峰面积,其峰面积的RSD为0.64%,考察结果表明,样品液在24 h内稳定性良好,可在24 h内进行测定。

2.6.6 重复性测定 取微乳1.0 mL,共5份,按“2.6.2”项下制备方法制备样品,进行测定,计算得微乳中 β -细辛醚的平均载药量为22.1 mg/mL ,RSD为1.31%。

2.6.7 加样回收率试验 准确量取1.0 mL空白微乳溶液9份,均分3组,置10 mL量瓶中,每组分别加入100 $\mu\text{g/mL}$ β -细辛醚溶液0.80、1.20、1.60 mL,各3份。甲醇定容,涡旋混匀,离心,取上清液,0.45 μm 滤过,取续滤液10 μL ,按“2.6.1”项下色谱条件测定,外标法测定回收率,高、中、低质量浓度的平均回收率分别为95.45%、98.89%、101.91%,RSD分别为1.45%、0.83%、0.53% ($n=3$)。

2.6.8 β -细辛醚的测定 取3份 β -细辛醚微乳样品各1.0 mL至100 mL量瓶中,按照“2.6.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.6.1”项下色谱条件测定。结果3批微乳样品中 β -细辛醚的平均质量浓度为 $(21.5\pm 0.48)\text{ mg/mL}$ ($n=3$)。

3 讨论

油相是微乳形成的重要组成部分, β -细辛醚在肉豆蔻酸异丙酯中的溶解度较大,处方选用了肉豆蔻酸异丙酯为油相。

微乳处方中成分用量研究通常采用伪三元相图法。当 $K_m=2:1$ 、 $3:1$ 时,乳化剂用量较少,乳化能力较弱,微乳区很小;随着 K_m 值的增大,即当 $K_m=4:1$ 时,微乳区最大,可能与乳化剂与助乳化剂的最佳质量比有关,助乳化剂正好完全镶嵌到乳化剂中;如乳化剂的量继续增加,助乳化剂的量则相对减少,无法实现最佳乳化效果。

本实验根据 β -细辛醚在各溶媒中的溶解度和绘制伪三元相图对处方进行优化,筛选出空白微乳的最佳处方,所得空白微乳澄清透明,有蓝色乳光; β -

细辛醚有较强的脂溶性,载药微乳的制备过程中先将药物溶于油相中,所制备的O/W型 β -细辛醚微乳与空白微乳相比较,溶液更加澄清透明均一,并有蓝色乳光,粒径更小。表明空白微乳中加入药物后,不影响空白微乳的体系,能形成性质稳定的载药微乳。

由于鼻腔特殊的生理结构,鼻腔给药制剂应考虑鼻腔的适应性,如鼻腔给药制剂的pH值应在5.5~6.5;黏度应适中;药物及相关辅料对鼻腔黏膜无毒性作用等。本实验从制剂学角度考察了 β -细辛醚微乳的pH值、黏度、载药量等性质,均符合鼻腔给药制剂的要求。后续将进一步完成药物及相关辅料对鼻腔黏膜有无毒性作用的相关试验。

不同途径给药进入脑组织内的药量不同,由于鼻腔特殊的生理结构,小分子脂溶性药物可经嗅球部的特别通路绕过血脑屏障吸收入脑组织。鼻腔喷雾给药的体积一般不超过0.5 mL,应尽量提高载药量, β -细辛醚在水中的溶解度为525.2 $\mu\text{g/mL}$,而将 β -细辛醚制备成微乳后,药物平均质量浓度为 $(21.5\pm 0.48)\text{ mg/mL}$,大大提高了药物质量浓度,满足鼻腔给药制剂的要求。

参考文献

- [1] 李秀英,郑力,姜同英,等.姜黄素鼻用微乳凝胶剂的制备及性质考察[J].沈阳药科大学学报,2010,17(2):98-104.
- [2] 吴启端,方永奇,陈奕芝,等.石菖蒲挥发油及 β -细辛醚对心血管的保护作用[J].中国新药与临床药理,2005,16(4):244-247.
- [3] 陈修.心血管药理学[M].北京:人民卫生出版社,1989.
- [4] Irie Y, Keung W M. *Rhizoma Acori Graminei* and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid-beta peptide [J]. *Brain Res*, 2002, 963(1/2): 282-289.
- [5] 江湧,何玉萍,邹衍衍,等. β -细辛醚对痴呆小鼠皮质神经元细胞内钙离子浓度的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(6):490-491.
- [6] 江湧,方永奇,邹衍衍. β -细辛醚对痴呆小鼠学习记忆能力及SOD、GSH-Px和MDA水平的影响[J].中国老年学杂志,2007,27(12):1126-1127.
- [7] 罗洁琦,沙先谊,方晓玲.三七总皂苷离子敏感型鼻用原位凝胶的制备[J].中草药,2011,42(7):1299-1304.
- [8] 蒋新国.脑靶向递药系统[M].北京:人民卫生出版社,2011.
- [9] Lyons K C, Charman W N, Miller R, et al. Factors limiting the oral bioavailability of *N*-acetylglucosaminyl-*N*-acetylmuramyl dipeptide (GMDP) and enhancement of absorption in rats by delivery in a water-in-oil microemulsion [J]. *Int J Pharm*, 2000, 199(1): 17-28.