

丹参酮 II_A 口服自微乳的制备及其体外溶出度评价

卢秀霞¹, 何琳¹, 陈锦娜², 李敏媛², 潘育方^{1*}

1. 广东药学院医药化工学院, 广东 中山 528458

2. 广东药学院中药学院, 广东 中山 528458

摘要: 目的 研究丹参酮 II_A 口服自微乳的处方与制备工艺, 并对其质量、体外溶出度以及稳定性进行评价。方法 通过溶解度考察、正交设计与伪三元相图的绘制, 以自乳化时间、外观、粒径和稳定性为指标, 筛选并优化处方与制备工艺, 并对微乳后的形态、药物质量、体外溶出度以及稳定性进行评价。结果 所得丹参酮 II_A 自微乳的处方组成: 油酸乙酯 (50%)、聚山梨酯 80 (40%)、聚乙二醇 400 (PEG 400, 10%), 油相-水相 (1:50), 载药量 3.0 mg/g, 自乳化时间 1 min, 外观均一透明, 粒径 (51.39±1.50) nm, 多分散系数 0.211±0.022, Zeta 电位 (-11.35±1.19) mV。溶出度结果表明, 丹参酮 II_A 口服自微乳在 0.1 mol/L HCl 溶液中 30 min 药物累积溶出度可达 96%。稳定性结果表明高温与光照对制剂有较大影响, 应 4 °C 避光保存。结论 丹参酮 II_A 自微乳制备简单, 增加药物在水中溶解度, 有利于胃肠道吸收, 符合主要指标要求, 为丹参酮 II_A 新剂型的进一步开发与研究奠定基础。

关键词: 丹参酮 II_A 自微乳; 正交设计; 伪三元相图; 稳定性; 体外溶出度

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)22-3256-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.22.008

Preparation and *in vitro* dissolution evaluation of tanshinone II_A for oral self-microemulsion

LU Xiu-xia¹, HE Lin¹, CHEN Jin-na², LI Min-yuan², PAN Yu-fang¹

1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China

Abstract: Objective To study the prescription and preparation technology of tanshinone II_A for oral self-microemulsifying drug delivery system. The quality, stability, and *in vitro* dissolution were evaluated. **Methods** The prescription and preparation technology were selected and optimized through the solubility experiment, orthogonal design, and pseudo-ternary phase diagram method, using the self-emulsifying time, appearance, particle diameter, and stability as selection indexes. The droplet morphous, particle size, drug content, stability, and *in vitro* dissolution were evaluated after self-microemulsification. **Results** The prescription composition of tanshinone II_A self microemulsion was aethylis oleas (50%), polysorbate 80 (40%), and PEG 400 (10%), with oil phase-aqueous phase of 1:50, drug-loaded of 3.0 mg/g, and self-emulsifying time of 1 min. The acquired tanshinone II_A self-microemulsion exhibited uniform and transparent, with the particle diameter of (51.39 ± 1.50) nm, polydispersity index of 0.211 ± 0.022, Zeta potential of (-11.35 ± 1.19) mV. The results of *in vitro* dissolution indicated that the accumulative dissolution in 0.1 mol/L HCl solution was able to reach 96% after 30 min. The stability result showed that tanshinone II_A self-microemulsion was affected by high temperature and illumination, indicating having to be stored at 4 °C and protected from light. **Conclusion** The preparation of tanshinone II_A self-microemulsion is simple, increasing the solubility in water, making it better absorption in the stomach and intestine, corresponding to the main index of oral drug delivery system and offering the basis for further development and research about tanshinone II_A.

Key words: tanshinone II_A self-microemulsion; orthogonal design; pseudo-ternary phase diagram; stability; *in vitro* dissolution

收稿日期: 2014-06-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973953C1909)

作者简介: 卢秀霞 (1982—), 女, 硕士, 药剂学实验师, 主要研究药物新剂型与新技术。Tel: 15913364323 E-mail: luxiuxian@163.com

*通信作者 潘育方 (1966—), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事物理药剂学与药物制剂设计的研究。

Tel: (0760)88207968 13710860790 E-mail: p34074683@126.com

丹参酮 II_A (tanshinone II_A) 是唇形科植物丹参活血化瘀的主要脂溶性有效成分^[1-2], 是二萜醌类化合物, 纯丹参酮 II_A 为桔红色针状结晶, 易溶于乙醇、丙酮、乙醚和苯等有机溶剂, 但难溶于水。丹参酮 II_A 具有增加冠脉流量、抗心肌缺血、抗心律失常、抗动脉粥样硬化等药理作用, 临床上主要用于治疗冠心病、心绞痛、脑血栓等心脑血管疾病^[3-4]。但丹参酮 II_A 水溶性差, 易受肠道内 P-糖蛋白的外排作用而导致口服生物利用度低, 丹参酮 II_A 在大鼠口服生物利用度仅 2.9%~3.4%^[5]。目前上市剂型为丹参酮 II_A 磺酸钠注射剂, 虽然解决药物水中难溶性问题, 但引入的磺酰基减弱其抗氧化作用, 同时因极性太大而难以穿过血脑屏障, 水溶液因稳定性差而引起不良反应, 致使在治疗脑缺血等疾病中受到限制^[6-7]。

自微乳化给药系统 (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS) 是油相、乳化剂、助乳化剂组成的口服固体或液体的混合体系^[8], 属热力学稳定系统。作为一种新型药物传递系统, 药物被包裹在油滴中, 口服后遇体液在胃肠蠕动下自发分散形成 10~100 nm 的 O/W 型微乳, 提高药物溶解度和渗透率, 使乳滴在胃肠道均匀快速分布, 增加小肠上皮细胞的渗透性, 同时可使药物经淋巴管吸收克服首过效应, 降低或抑制 P-糖蛋白药物外排, 有助于提高药物的生物利用度^[9-10]。SMEDDS 不良反应小、降低药物刺激性、提高制剂稳定性, 易被机体代谢, 且体积小, 避免包装、运输、使用等的不足, 在国内外引起广泛关注^[11]。因此, SMEDDS 可作为疏水性、难吸收药物的理想载体。

因此, 本实验针对丹参酮 II_A 水溶解度低、稳定性差、体内生物利用度低的问题, 结合自微乳给药系统优点, 将丹参酮 II_A 制成口服自微乳, 以期达到增加丹参酮 II_A 溶解度, 改善口服胃肠吸收, 提高生物利用度的目的, 为进一步研究与开发丹参酮 II_A 新剂型提供依据。

1 仪器与试剂

BP211D 十万分之一电子分析天平, 德国赛多利斯; ZD—85 型气浴恒温振荡器, 江苏金坛市宏华仪器厂; JB—2 型恒温磁力搅拌器, 上海智光仪器仪表有限公司; IS126 pH 酸度计, 上海豪迈仪器科技有限公司; Zetasizer Nano ZS 90 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国 Malvern 公司; JEM—100CX II 型透射电镜, 日本电子公司; RCZ—JA 型溶出实

验仪, 上海黄海药检仪器有限公司; Waters 600 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; UV1102 紫外可见分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司。

丹参酮 II_A 原料药, 西安鸿生生物技术有限公司, 质量分数 ≥95.5%, 批号 130514; 丹参酮 II_A 对照品, 中国食品药品检定研究院, 质量分数 ≥98.0%, 批号 110766-200518; 大豆油, 广州汉方现代中药研究开发有限公司, 批号 A1130030; 肉豆蔻酸异丙酯 (IPM), 广州臣威化工有限公司; 油酸乙酯, 江西阿尔法高科药业有限公司, 批号 20130501; 中链脂肪酸三甘油酯 (MCT), 上海利宝德生物科技有限公司, 批号 594000-2110032; 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (Cremophor RH-40, 批号 57184468E0)、聚氧乙烯蓖麻油 (Cremophor EL-35, 批号 50526668E0), 德国 BASF 公司; 二乙二醇单乙醚 (transcutol P), 法国 Gattefosse 公司; 聚山梨酯 80 (Tween 80, 批号 20130401)、聚乙二醇 400 (PEG 400)、1, 2-丙二醇, 南京威尔化工有限公司; 无水乙醇、异丙醇、甘油, 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇, 色谱纯, 美国 Merck 公司; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 丹参酮 II_A 在各辅料中的溶解度考察

称取过量的丹参酮 II_A 原料药置具塞锥形瓶中, 分别加入 5 mL 不同的油相 (大豆油、油酸乙酯、IPM、MCT)、乳化剂 (Cremophor EL-35、Cremophor RH-40、Tween 80) 与助乳化剂 (transcutol P、PEG 400、无水乙醇、异丙醇、甘油、1, 2-丙二醇), 使之成为过饱和溶液。涡旋混匀 5 min, 于 37 °C 气浴恒温振荡 72 h 直至溶解平衡, 取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 精密移取续滤液 0.1 mL 置 10 mL 量瓶中, 无水乙醇定容, HPLC 法测定, 丹参酮 II_A 在不同油相、乳化剂与助乳化剂中的平衡溶解度见表 1。由此可见, 丹参酮 II_A 在不同油相中的溶解度大小依次为油酸乙酯 > IPM > MCT > 大豆油, 在不同乳化剂中溶解度大小依次为 Cremophor EL-35 > Cremophor RH-40 > Tween 80, 在不同助乳化剂中的溶解度大小依次为 transcutol P > PEG 400 > 无水乙醇 > 异丙醇 > 1, 2-丙二醇 > 甘油。

2.2 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 的处方筛选与优化

2.2.1 口服 SMEDDS 的制备 称取丹参酮 II_A、油相、乳化剂适量, 加入到助乳化剂中, 60 °C 水浴加热溶解得均匀透明的油相, 于 37 °C 恒温磁力搅拌下将该油相逐滴滴入蒸馏水中乳化, 每隔 30 s 取样

表 4 处方筛选方差分析表

Table 4 Analysis of variance results for prescription selection

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	1 710.222	2	19.240	$P < 0.05$
B	38.889	2	0.438	
C	38.889	2	0.438	
D (误差)	88.889	2		

$F_{0.05}(2, 2) = 19$ $F_{0.01}(2, 2) = 99$

根据直观分析法, 对正交设计结果进行极差分析, 可得影响自乳化效果的 3 个因素由大到小排列为 $A > B = C$, 即油相的种类是影响自乳化效果最主要因素, 其次是乳化剂与助乳化剂的种类。其中, 油相 (A) 对乳化效果影响大小依次为油酸乙酯 $>$ IPM $>$ MCT, 乳化剂 (B) 乳化效果依次为 Tween 80 $>$ Cremophor RH-40 $>$ Cremophor EL-35, 助乳化剂 (C) 影响大小依次为 PEG 400 $>$ transcitol P $>$ 无水乙醇。由方差分析结果可知, 油相的 F 值 $>$ 19.00, 表明油的种类对自乳化效果的影响具有统计学意义 ($P < 0.05$)。因此, 确定丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 最佳处方组成为 A₁B₂C₂, 即油酸乙酯为油相, Tween 80 为乳化剂, PEG 400 为助乳化剂。

2.2.3 伪三元相图的绘制 根据正交设计结果, 分别称取适量的油酸乙酯、Tween 80 与 PEG 400, 首先按乳化剂与助乳化剂的比例 (K_m) 为 10 : 0、9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5、4 : 6、3 : 7、2 : 8、1 : 9 的质量比配制一系列乳化剂与助乳化剂混合物, 混匀, 再将各混合物与油相 (油酸乙酯) 分别以 9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5、4 : 6、3 : 7、2 : 8、1 : 9 的质量比混合 (固定体系总质量为 0.5 g), 分别加入丹参酮 II_A, 60 °C 水浴加热溶解, 搅拌均匀。在恒温磁力搅拌下分别将各混合物滴入 50 mL、37 °C 蒸馏水中自乳化, 每隔 30 s 测定 T , 搅拌均匀直至乳化完全, 以自乳化时间、 T 、溶液外观等指标进行筛选, 按表 2 综合评分, 筛选出 85 分以上的处方。分别以乳化剂 (Tween 80)、助乳

剂 (PEG 400) 和油相 (油酸乙酯) 作为 3 个顶点, 采用 Origin 7.0 软件绘制伪三元相图, 确定形成自微乳区域, 再据此得最优处方, 结果如图 1 所示。结合正交设计与伪三元相图结果, 筛选得自乳化时间 $<$ 2 min, 乳化后澄清透明, $T >$ 90%, 静置 24 h 后无分层、无药物析出, 且乳化剂用量最少、载油量最大为最优处方。因此, 确定油酸乙酯-Tween 80-PEG 400 的质量比为 5 : 4 : 1。

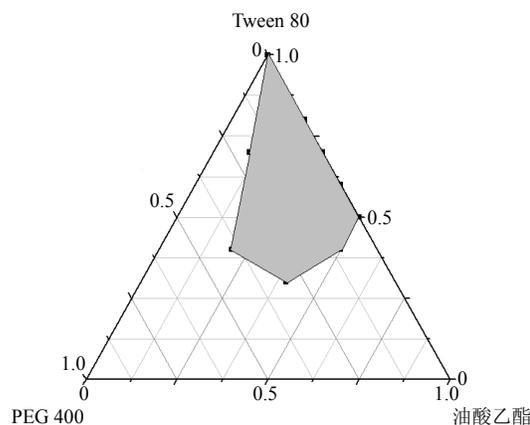


图 1 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 伪三元相图

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagram of tanshinone II_A SMEDDS

2.2.4 最大载药量的确定 按质量比 5 : 4 : 1 分别精密称取油酸乙酯、Tween 80 与 PEG 400, 固定体系总质量为 0.5 g, 分别加入丹参酮 II_A 2.5、2.0、1.5 mg, 各 3 份, 60 °C 水浴加热溶解, 搅拌均匀, 得澄清透明的油相, 将该油相在恒温磁力搅拌下滴入 50 mL、37 °C 蒸馏水中自乳化, 转速为 100 r/min。分别以自乳化后微乳 37 °C 静置 24 h 的外观性状、药物质量为考察指标, 确定最大载药量, 结果见表 5。丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 中的药物质量百分比随载药量的增大而降低, 当载药量为 1.5 mg 时, 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 中的药物质量百分比最高, 且形成微乳液于 37 °C 静置 24 h 仍澄清透明, 均无药物析出。因此, 确定最大载药量为 1.5 mg。

2.3 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 制备工艺考察

2.3.1 药物溶解温度的考察 按质量比 5 : 4 : 1 分

表 5 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 最大载药量的确定 ($n = 3$)

Table 5 Determination of maximum drug loading for tanshinone II_A SMEDDS ($n = 3$)

载药量 / mg	微乳液 24 h 外观性状	测得药物质量 / mg (相对质量分数 / %)	RSD / %
2.5	澄清透明, 析出药物	2.00 (80)	1.43
2.0	澄清透明, 析出药物	1.78 (89)	0.96
1.5	澄清透明, 无药物析出	1.44 (96)	1.67

别精密称取油酸乙酯、Tween 80 与 PEG 400, 固定体系总质量为 0.5 g, 加入丹参酮 II_A 1.5 mg, 分别置于 40、50、60 °C 水浴加热溶解, 搅拌均匀得含药预微乳, 将该预微乳于恒温磁力搅拌下滴入 50 mL、37 °C 蒸馏水中自乳化, 转速为 100 r/min。以丹参酮 II_A 的溶解时间、药物质量、预微乳与微乳液于 37 °C 静置 24 h 的外观性状为考察指标, 结果见表 6。40 °C 加热丹参酮 II_A 不溶解, 与 50 °C 相比, 丹参酮 II_A 在 60 °C 水浴加热溶解时间由 6.0 h 缩短至 3.5 h, 且所得预微乳、微乳液于 37 °C 静置 24 h 均澄清透明, 且无药物析出。因此, 结合药物溶解时间与稳定性结果, 选择 60 °C 作为丹参酮 II_A

的加热溶解温度。

2.3.2 搅拌速度的考察 按质量比为 5:4:1 分别精密称取油酸乙酯、Tween 80 与 PEG 400, 固定体系总质量为 0.5 g, 加入丹参酮 II_A 1.5 mg, 于 60 °C 水浴加热溶解, 搅拌均匀得澄清透明预微乳, 将该预微乳于恒温磁力搅拌下滴入 50 mL、37 °C 蒸馏水自乳化, 以自乳化时间、*T* 为筛选指标, 分别考察 50、100、200 r/min 3 个转速下对自微乳效果的影响, 结果见表 7。自乳化时间随转速增大而缩短, 而对 *T* 影响不大。由于 50 r/min 搅拌速度能较好模拟人体内温和的胃肠道蠕动, 因此选择 50 r/min 为丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 的搅拌速度。

表 6 药物溶解温度对自微乳化效果的影响 (*n* = 3)

Table 6 Influence of drug dissolution temperature on self-microemulsification effect (*n* = 3)

溶解温度 / °C	溶解时间 / h	药物质量 / mg	37 °C 静置 24 h 的外观性状		RSD / %
			预微乳	微乳液	
40	—	—	—	—	—
50	6.0	1.46	析出药物	无药物析出	2.1
60	3.5	1.43	无药物析出	无药物析出	1.3

表 7 转速对自微乳化效果的影响

Table 7 Influence of rotation speed on self-microemulsification effect

转速 / (r·min ⁻¹)	自乳化时间 / min	<i>T</i> / %
50	2.5	80.8
100	2.0	80.7
200	1.5	81.2

2.3.3 稀释倍数的考察 按质量比为 5:4:1 分别精密称取油酸乙酯、Tween 80 与 PEG 400, 固定体系总质量为 0.5 g, 加入丹参酮 II_A 1.5 mg, 于 60 °C 水浴加热溶解, 搅拌均匀得预微乳, 将该预微乳于恒温磁力搅拌分别滴入 10、25、50、100、250 mL 37 °C 蒸馏水自乳化, 转速为 50 r/min, 以自乳化时间、外观性状、粒径为筛选指标, 观察并记录自微乳化现象, 结果见表 8。可见, 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 的外观颜色随稀释倍数增大而变浅; 自乳化时间随稀释倍数增大而延长, 当稀释 20、50 倍时, 自乳化时间最短, 均 ≤ 1.0 min; 当稀释 50 倍时, 粒径最小。因此, 选择稀释倍数为 50 倍, 即油相-水相为 1:50。

2.4 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 的制备

根据丹参酮 II_A 在不同介质的溶解度、正交设计与伪三元相图筛选并优化处方, 结合制备工艺考

表 8 稀释倍数对自微乳化效果的影响

Table 8 Influence of dilution multiple on self-microemulsification effect

稀释倍数	自乳化时间 / min	外观性状	粒径 / nm
20	<1.0	橙色, 澄清透明	62.14
50	1.0	橙黄色, 澄清透明	51.39
100	2.5	橙黄色, 澄清透明	51.87
200	2.5	淡橙黄色, 澄清透明	61.46
500	3.0	橙黄色, 澄清透明	57.94

察, 得丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 的制备方法: 称取丹参酮 II_A 1.5 mg、油酸乙酯 0.25 g、Tween 80 0.20 g 加入 0.05 g PEG 400 中, 60 °C 水浴加热至完全溶解, 搅拌均匀, 得橙红色澄清透明、黏稠状的预微乳, 将该预微乳于恒温磁力搅拌下滴入 25 mL、37 °C 蒸馏水中, 于 50 r/min 转速下自乳化 1.0 min, 形成橙黄色、澄清透明的丹参酮 II_A 微乳液。

2.5 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 的质量评价

2.5.1 外观形态考察 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 澄清透明, 为深橙红色黏稠状液体; 加水乳化后形成橙黄色、澄清透明的丹参酮 II_A 微乳液, 流动性良好。

2.5.2 透射电镜观察乳滴形态 采用磷钨酸负染法, 取适量丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 微乳液, 滴在

覆有支持膜铜网上，静置 10 min 用滤纸片吸干，滴加 3% 磷钨酸溶液于铜网上负染 5 min，自然挥干，透射电镜观察丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 自乳化后形成的微乳形态。结果表明能形成大小较均一的球形乳滴，见图 2。

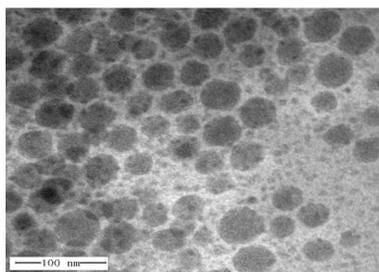


图2 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 乳化后微乳的透射电镜照片
Fig. 2 TEM photograph of tanshinone II_A SMEDDS after emulsification

2.5.3 粒径大小与 Zeta 电位测定 取丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 0.5 g，滴入 25 mL 37 °C 蒸馏水中自乳化，形成均一透明的丹参酮 II_A 微乳液。取丹参酮 II_A 微乳液适量，采用 Zetasizer Nano ZS 90 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定，粒径与粒度分布、Zeta 电位分布见图 3。结果丹参酮 II_A 微乳液平均粒径 (51.39 ± 1.50) nm，多分散系数 0.211 ± 0.022，粒度分布均匀，Zeta 电位平均值为 (-11.35 ± 1.19) mV。

2.6 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 的定量测定

2.6.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-水 (80 : 20)；体积流量为 1.0 mL/min；检测波长为 270 nm；柱温为 30 °C；进样量为 20 μL。

2.6.2 系统适应性试验 取 25.0 μg/mL 丹参酮 II_A 对照品溶液，HPLC 法测定，结果丹参酮 II_A 保留时间 7.76 min，以丹参酮 II_A 计算理论塔板数 > 20 000，拖尾因子为 1.02，峰形对称，色谱图见图 4。

2.6.3 溶液的配制

(1) 丹参酮 II_A 对照品溶液：精密称取丹参酮 II_A 对照品 1.0 mg，无水乙醇溶解并定容至 10 mL 量

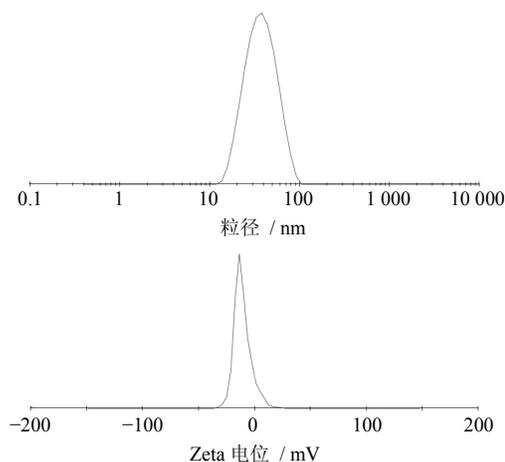


图3 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 乳化后微乳的粒径分布和 Zeta 电位分布图

Fig. 3 Particle size distribution and Zeta potential distribution of tanshinone II_A SMEDDS after emulsification

瓶中，摇匀，制得质量浓度为 100 μg/mL 丹参酮 II_A 对照品储备液。精密移取该储备液 2.5 mL，无水乙醇定容于 10 mL 量瓶中，制得质量浓度为 25.0 μg/mL 丹参酮 II_A 对照液。

(2) 丹参酮 II_A 供试品溶液：精密移取 2.5 mL 丹参酮 II_A 微乳液 (约相当于丹参酮 II_A 150 μg)，无水乙醇溶解并定容至 10 mL，超声混匀，制得 15.0 μg/mL 丹参酮 II_A 供试品溶液。

(3) 空白对照溶液：精密移取不含丹参酮 II_A 的空白微乳液 2.5 mL，无水乙醇溶解并定容至 10 mL，超声混匀，制得空白对照溶液。

2.6.4 方法专属性考察 分别取 25.0 μg/mL 丹参酮 II_A 对照品溶液、15.0 μg/mL 丹参酮 II_A 供试品溶液以及空白对照溶液，0.45 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，按 HPLC 条件测定。结果表明，空白对照无干扰，且供试品溶液与对照品溶液中丹参酮 II_A 的保留时间基本一致，色谱图如图 4 所示。

2.6.5 标准曲线的绘制 分别精密移取 100 μg/mL 丹参酮 II_A 标准储备液 0.10、0.50、0.80、1.0、1.2、

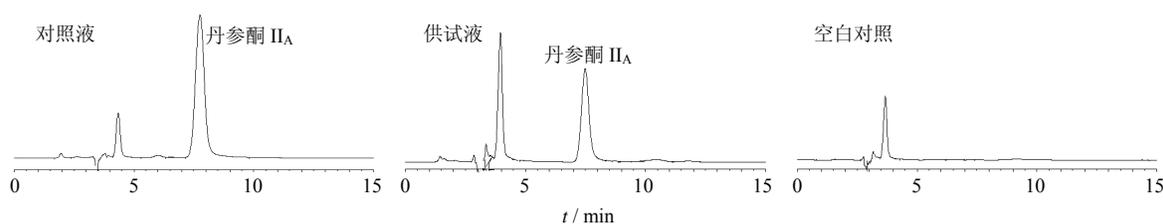


图4 丹参酮 II_A 定量测定的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of tanshinone II_A for quantitative determination

1.5、2.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 无水乙醇溶解并稀释至刻度, 制得 1.0、5.0、8.0、10.0、12.0、15.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 系列质量浓度丹参酮 II_A 对照品溶液。按 HPLC 测定, 记录峰面积, 以峰面积为纵坐标, 丹参酮 II_A 质量浓度为横坐标进行线性回归, 得回归方程为 $Y=121\ 435 X-16\ 834$, $r=0.999\ 9$, 结果丹参酮 II_A 在 1.0~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.6.7 稳定性试验 取质量浓度为 15.0 $\mu\text{g/mL}$ 丹参酮 II_A 供试品溶液, 分别于室温放置 0、2、4、6、8、12、24 h 后按 HPLC 条件测定, 测得峰面积平均值为 1 806 388.36, 日内 RSD 为 1.1%, 表明丹参酮 II_A 供试品溶液在 24 h 内稳定性良好; 每天测 1 次, 连续测定 5 d, 测得峰面积平均值为 1 816 027.16, 日间 RSD 为 3.7%, 表明丹参酮 II_A 供试品溶液室温放置 5 d 稳定性良好。

2.6.8 回收率试验 精密移取 1.0 mL 空白微乳 9 份置于 10 mL 量瓶中, 分别加入 100 $\mu\text{g/mL}$ 丹参酮 II_A 标准储备液 1.5、1.0、0.5 mL, 各 3 份, 无水乙醇稀释并定容至刻度, 制得质量浓度分别为 15.0、10.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 丹参酮 II_A 供试品溶液。按 HPLC 条件测定, 代入标准曲线计算丹参酮 II_A 实际质量浓度, 与已知质量浓度相比求算回收率, 结果高、中、低质量浓度的平均回收率分别为 (96.27 \pm 1.89)%、(95.54 \pm 1.58)%、(97.44 \pm 0.91)%, RSD 分别为 1.9%、1.7%、0.93% ($n=3$)。

2.6.9 定量测定 取 3 个批号的丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 0.5 g (约相当于含丹参酮 II_A 1.5 mg), 按上述方法制备丹参酮 II_A 微乳液。分别精密移取 3 个批号丹参酮 II_A 微乳液 1.0 mL 于 5 mL 量瓶中, 无水乙醇溶解并定容至刻度, 按 HPLC 条件测定, 记录峰面积, 代入标准曲线计算微乳液中丹参酮 II_A 的质量。结果 3 个批号丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 中的药物质量分别为 1.43、1.44、1.45 mg, RSD 为 0.66% ($n=3$)。

2.7 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 体外溶出度评价

取丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 硬胶囊 6 粒 (0.5 g/粒, 约含丹参酮 II_A 1.5 mg/粒), 另取 6 粒自制的丹参酮 II_A 增溶剂 (约含丹参酮 II_A 1.5 mg/粒) 作为参比制剂, 按《中国药典》2010 年版二部附录 XC 溶出度测定法第一法进行测定, 分别以 900 mL 0.1 mol/L HCl、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液以及纯水为溶出介质, 转速为 50 r/min, 水浴温度为 (37 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。分别于 5、10、15、20、30、

45、60、120、180、240 min 取样 5 mL, 同时补充同温度同体积空白溶出介质。将所取的样品经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液按 HPLC 条件测定, 考察不同介质对丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 溶出度的影响, 溶出度曲线见图 5, 比较丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 与参比制剂在同一溶出介质中的溶出情况, 见图 6。

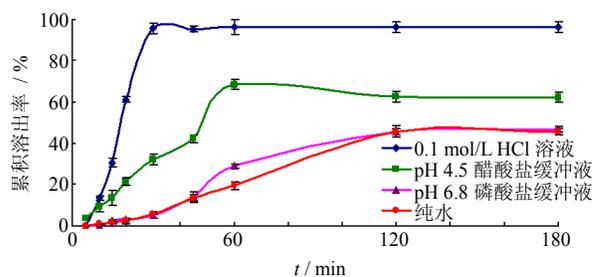


图5 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 在不同介质中的溶出度曲线 ($n=6$)

Fig. 5 Dissolution profiles of tanshinone II_A SMEDDS in different dissolution media ($n=6$)

精密移取 100 $\mu\text{g/mL}$ 丹参酮 II_A 对照品储备液 0.20 mL, 置 10 mL 量瓶中, 无水乙醇溶解并稀释至刻度, 制得质量浓度为 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 丹参酮 II_A 对照液, 精密移取该对照液 0.05、0.25、0.50、2.5、4.0、5.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 分别用 0.1 mol/L HCl、pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液、纯水稀释至刻度, 经 HPLC 法测定, 以峰面积对丹参酮 II_A 质量浓度作线性回归, 得丹参酮 II_A 在各溶出介质中的标准曲线: 0.1 mol/L HCl 溶液 $Y=139\ 265 X-1\ 496$, $r=0.999\ 2$, 线性范围 0.01~1.0 $\mu\text{g/mL}$; pH 4.5 醋酸盐缓冲液 $Y=136\ 752 X-770.81$, $r=0.999\ 5$, 线性范围 0.01~1.0 $\mu\text{g/mL}$; pH 6.8 磷酸盐缓冲液 $Y=142\ 132 X-1\ 371$, $r=0.999\ 6$, 线性范围 0.01~1.0 $\mu\text{g/mL}$; 纯水 $Y=140\ 020 X+110.91$, $r=0.999\ 9$, 线性范围 0.01~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明丹参酮 II_A 在 0.01~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

由图 5 溶出度曲线可知, 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 在 0.1 mol/L HCl 溶液中的溶出速度最快, 且溶出效果最好, 优于其在 pH 4.5 醋酸盐缓冲液、pH 6.8 磷酸盐缓冲液和纯水中的溶出效果, 在 0.1 mol/L HCl 中 30 min 达到溶出平衡, 累积溶出率可达 96%; 在 pH 4.5 醋酸盐缓冲液中 60 min 累积溶出 68%; 而在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液、纯水中溶出最慢, 120 min 累积溶出率仅为 45%。胃肠道不同部位酸碱度不同, 胃 pH 值 1.0~3.0, 小肠液 pH 值 4.0~

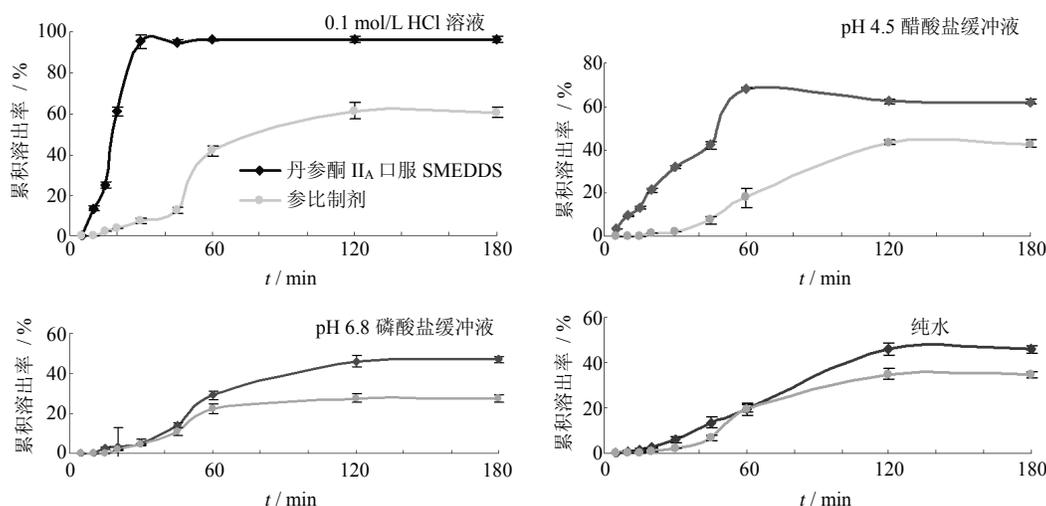


图6 丹参酮 II_A口服 SMEDDS 与参比制剂在不同介质中的溶出度曲线 (n = 6)

Fig. 6 Dissolution profiles of tanshinone II_A SMEDDS and reference preparation in different media (n = 6)

7.0, 大肠 pH 值 4.0~7.0。0.1 mol/L HCl 的 pH 值为 1.2, 与胃液 pH 值接近, 常作为人工胃液, pH 4.5 醋酸盐缓冲液与 pH 6.8 磷酸盐缓冲液可模拟人体内上部肠液与下部肠液。因此, 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 在胃中基本可以自发形成微乳液, 有利于胃与小肠上部的吸收。

由图 6 溶出度曲线可知, 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 与自制丹参酮 II_A 增溶剂在同一溶出介质中溶出度有显著差异。在 0.1 mol/L HCl 中, 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 30 min 累积溶出度可达 96%, 而参比制剂的溶出度在 120 min 才达到 61%; 在 pH 4.5 醋酸盐缓冲液中丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 60 min 溶出度为 68%, 高于参比制剂 120 min 时 43% 的溶出度; 在 pH 6.8 磷酸盐缓冲液、纯水中, 参比制剂 120 min 溶出百分率分别为 27%、34%, 均低于丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 制剂。因此, 与丹参酮 II_A 增溶剂相比, 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 能释药迅速、完全, 有利于机体吸收。

2.8 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 稳定性考察

2.8.1 高速离心试验 精密称取丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 0.5 g, 滴入 25 mL 37 °C 蒸馏水中, 于 50 r/min 转速下自乳化 1.0 min, 得丹参酮 II_A 微乳液。

取该微乳液 10 mL, 4 000 r/min 高速离心 15 min, 观察乳剂是否分层。结果表明丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 经高速离心后仍澄清透明, 无分层现象。

2.8.2 强光照试验 分别取丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 预微乳 0.5 g、丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 乳化后的微乳液适量, 置于常温 (25 °C)、强光照 (4 500 lx) 条件下保存, 分别于第 0、12、24 小时后观察外观性状, 测定丹参酮 II_A 的药物质量, 结果见表 9。在常温强光照 (4 500 lx) 条件下照射 12 h 后, 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 及其乳化后的微乳液颜色均变浅, 丹参酮 II_A 的质量下降了 95% 以上; 强光照 24 h 后药物质量下降至 0, 已不含丹参酮 II_A。由此可见, 光照对 SMEDDS 中丹参酮 II_A 的量影响显著。因此, SMEDDS 不能提高丹参酮 II_A 的光稳定性, 应棕色瓶避光保存, 且所有操作均应避光进行。

2.8.3 温度对丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 稳定性的影响 分别取丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 预微乳 0.5 g、丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 乳化后的微乳液适量, 各 3 份, 分别置于 4、25、60 °C 避光保存, 于第 0、5、10 天考察外观性状, 测定丹参酮 II_A 的药物质量, 结果见表 10。4 °C 避光 0、5、10 d 后丹参酮 II_A 口

表 9 丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 强光照 (4 500 lx) 条件下的稳定性 (n = 3)

Table 9 Stability of tanshinone II_A SMEDDS under illumination (4 500 lx) condition (n = 3)

光照时间 / h	预微乳外观	微乳液外观	药物质量 / mg	RSD / %
0	橙红色, 澄清透明	橙黄色, 澄清透明	1.45	2.5
12	淡黄色, 澄清透明	淡黄色, 澄清透明	0.01	4.7
24	淡黄色, 澄清透明	淡黄色, 澄清透明	0.00	0.0

表 10 温度对丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 稳定性的影响 (n = 3)Table 10 Influence of temperature on stability of tanshinone II_A SMEDDS (n = 3)

温度 / °C	放置时间 / d	预微乳外观	微乳液外观	药物质量 / mg (相对质量分数 / %)	RSD / %
4	0	橙红色, 澄清透明	橙黄色, 澄清透明	1.46 (100.00)	0.27
4	5	橙红色, 澄清透明	橙黄色, 澄清透明	1.46 (100.00)	0.17
4	10	橙红色, 澄清透明	橙黄色, 澄清透明	1.39 (95.21)	1.52
25	0	橙红色, 澄清透明	橙黄色, 澄清透明	1.46 (100.00)	0.24
25	5	橙黄色, 澄清透明	淡橙黄色, 澄清透明	1.35 (92.47)	0.84
25	10	橙黄色, 药物析出	淡橙黄色, 澄清透明	1.15 (78.77)	2.83
60	0	橙红色, 澄清透明	橙黄色, 澄清透明	1.47 (100.00)	0.40
60	5	淡黄色, 药物析出	淡橙黄色, 药物析出	0.50 (34.01)	4.91
60	10	淡黄色, 药物析出	淡黄色, 药物析出	0.00 (0.00)	0.00

服 SMEDDS 及其乳化后的微乳液均澄清透明, 药物质量百分比均 >95.00%; 25 °C 避光 5 d 后丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 及其乳化后的微乳液颜色均变浅, 药物质量下降 7.53%, 10 d 后丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 有药物析出, 药物质量下降 21.23%; 60 °C 避光 5 d 后颜色均变浅, 且有药物析出, 药物质量下降 65.99%, 10 d 后下降至 0, 已不含丹参酮 II_A。由此可见, 60 或 25 °C 避光保存均影响制剂的外观性状和药物质量, SMEDDS 不能提高丹参酮 II_A 的热稳定性, 应 4 °C 避光棕色瓶密封保存。

3 讨论

3.1 油相的种类与用量

油相是微乳形成的重要组成部分, 是影响自乳化效果的最主要因素, 常用的油相有油酸乙酯、蓖麻油、大豆油、橄榄油、IPM、MCT 以及长链脂肪酸三甘油酯 (LCT)。选择油相时除了考虑油相所需 HLB 值以外, 还须考虑油相的黏度及其在水中的溶解度。油相黏度越小, 越容易被乳化, 所得乳滴的粒径越小, 物理稳定性越好^[12]。表 3 正交设计结果表明油酸乙酯更易被乳化, 这是由于油酸乙酯为无色至淡黄色油状液体, 流动性好, 与脂肪油相比油酸乙酯黏度较小, 为 3.9 mPa·s, 且易被身体组织快速吸收, 其溶解性和成乳能力均比植物油好。除此之外, 表 1 溶解度结果表明与 IPM、MCT 相比, 丹参酮 II_A 在油酸乙酯中的溶解度最大。因此, 选择油酸乙酯为油相, 从而增加药物溶解度, 增大微乳区域。

油的用量容易引起乳滴表面亲、疏水性和体系黏度变化, 油的用量增大, 亲水性相对减少, 有利于微乳的跨膜吸收, 同时体系黏度增大, 使乳滴粘

附在肠壁的表面, 促进药物吸收。因此, 在伪三元相图的处方优化中, 尽可能选择油用量大的处方, 避免因使用过多乳化剂而造成胃肠道的毒性, 同时能获到较高载药量的自微乳制剂, 有利于药物的胃肠道吸收。

3.2 乳化剂的选择

在自微乳给药系统中, 乳化剂的种类及其用量是影响乳滴粒径的重要因素, 当乳化剂的亲水亲油平衡值 (HLB) 与油相所需 HLB 值相当时, 能形成较稳定的微乳^[13]。目前, 最常用的乳化剂有 Cremophor EL-35、Cremophor RH-40、Tween 80、Tween 85 等。在 O/W 自微乳给药系统的制备中, 多选用 HLB 值为 8~18、毒性较小的非离子型乳化剂, 改变小肠上皮细胞膜的流动性, 增加药物的膜渗透性, 能有效抑制 P-糖蛋白对药物的外排^[14-15]。Tween 80 的 HLB 值为 15, 属于非离子型乳化剂, 与 Cremophor EL-35、Cremophor RH-40 相比, Tween 80 的乳化效果最好, 使丹参酮 II_A 被增溶在油相或油相与乳化剂之间的界面膜中。

3.3 制备工艺的考察

本实验考察药物溶解温度、搅拌速度以及稀释倍数对丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 自微乳化的影响, 预测制剂进入人体后的自微乳效果。当温度过低时丹参酮 II_A 不溶解, 当温度升高至 60 °C, 所得微乳澄清透明、性质稳定。这是由于丹参酮 II_A 对热不稳定, 药物溶解时间随温度升高而缩短, 避免加热时间过长而引起药物结构发生变化, 从而增强制剂稳定性。搅拌速度基本不影响自乳化效果, 但速度太慢时 SMEDDS 自乳化缓慢且难以乳化完全, 速度过快则容易使微乳产生较多泡沫。由于 50 r/min

能较好模拟人体内胃肠道蠕动情况,因此选择 50 r/min 为搅拌速度。稀释倍数对自乳化时间有一定影响,自乳化时间随稀释倍数增大而延长,这是由于水相体积越大,所需自乳化时间越长,当稀释倍数太大时,易引起搅拌不充分、乳化不完全现象,但稀释倍数太小也影响微乳形成,当稀释倍数 <20 时难以形成微乳。

3.4 影响稳定性的因素

本实验通过高速离心、温度与强光照试验对丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 进行初步稳定性的考察。强光照试验表明光照显著影响丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 的稳定性,使微乳颜色变浅,药物质量分数下降,当强光照 24 h 后已不含丹参酮 II_A。温度对丹参酮 II_A 口服 SMEDDS 的影响试验表明自微乳中的药物质量百分比随温度升高而降低,且有颜色变浅、药物析出等现象,60 °C 放置 5 d 有药物析出,10 d 后已不含丹参酮 II_A。由此可见,强光照和高温均影响制剂稳定性,这是由于丹参酮 II_A 属于菲醌类衍生物,在溶液中对光、热极敏感,在光热的作用下容易分解^[16],尤其在强光作用下容易发生光化反应,引起化学结构变化,生成多种产物,导致药物质量下降。因此,SMEDDS 不能提高丹参酮 II_A 对光热稳定性,应 4 °C 避光密封保存。

参考文献

- [1] 杨征,邱敏.丹参酮 II_A 的心血管作用及机制研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(4): 372-374.
- [2] 刘海波,徐峻,彭勇,等.丹参活血化淤活性成分的靶标 [J]. 物理化学学报, 2010, 26(1): 199-205.
- [3] 陈坚,林庚金.丹参酮抗肿瘤的研究进展 [J]. 复旦学报: 医学版, 2003, 30(6): 626-628.
- [4] Gao S, Liu Z, Li H, *et al.* Cardiovascular actions and therapeutic potential of tanshinone II_A [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 220(1): 3-10.
- [5] 李俊松,谢新,狄留庆,等.丹参酮 II_A 自乳化释药

系统制备工艺的研究 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(21): 1980-1985.

- [6] 梁臻,毛声俊,尹宗宁,等.丹参酮 II_A 与丹参酮 II_A 磺酸钠在小鼠体内的分布 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23(4): 416-419.
- [7] 柳海琛,柳海环. 18 例丹参酮 II_A 磺酸钠注射液不良反应的临床特点分析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(9): 1287-1289.
- [8] 张晓峰,华玮,陆皞然,等.自微乳化释药系统 (SMEDDS) 的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2009, 24(5): 261-264.
- [9] Patel D, Sawant K K. Self micro-emulsifying drug delivery system: formulation development and biopharmaceutical evaluation of lipophilic drugs [J]. *Curr Drug Deliv*, 2009, 6(4): 419-424.
- [10] Gibaud S, Attivi D. Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2012, 9(8): 937-951.
- [11] Kohli K, Chopra S, Dhar D, *et al.* Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability [J]. *Drug Discov Today*, 2010, 15(21/22): 958-965.
- [12] 吴成杨,尹东东,王杏林.自乳化药物传递系统的处方优化方法和应用 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(2): 190-195.
- [13] Rahman M A, Hussain A, Hussain M S, *et al.* Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDSS/SMEDDS) [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39(1): 1-19.
- [14] 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.
- [15] Alany R G, Rades T, Agatonovic-Kustrin S, *et al.* Effects of alcohols and diols on the phase behavior of quaternary systems [J]. *Int J Pharm*, 2000, 196(2): 141-145.
- [16] 熊阳,张悦.丹参酮 II_A 自微乳化给药系统的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 559-564.