

• 药剂与工艺 •

三叶豆紫檀苷磷脂复合物自微乳研制及跨膜转运研究

杨志欣¹, 张文君², 刘明玉¹, 张凤娇¹, 宋春晓², 邓伟哲^{3*}

1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

3. 中国人民解放军第211医院, 黑龙江 哈尔滨 150080

摘要: 目的 从苦参中大量制备三叶豆紫檀苷 (trifolirhizin, Tri), 通过制成磷脂复合物自微乳改善 Tri 的吸收。方法 采用硅胶柱色谱、重结晶等技术分离制备 Tri, 综合理化性质和波谱学数据进行结构鉴定。分别采用正交试验、星点设计效应面法优化 Tri 磷脂复合物 (TPC)、TPC 自微乳 (TPC-SMEDDS) 处方。Caco-2 模型考察 Tri、TPC 及 TPC-SMEDDS 的跨膜转运。结果 磷脂复合物的反应物 (即药物 Tri) 质量浓度为 4 mg/mL, Tri 与卵磷脂投料物质的量比为 1 : 1.5, 反应时间为 3 h, 复合率可达 (93.20 ± 2.01) %。优化的自微乳油相为丙二醇单辛酸酯 (Capyrol 90), 质量分数占 43.65%; 乳化剂选择聚氧乙烯蓖麻油 (Cremphor EL40), 助乳化剂为二乙二醇单乙基醚 (Transcutol HP), 二者质量比 (K_m) 为 7.58。Caco-2 细胞实验表明, Tri 的表观渗透系数 (P_{app}) 为 2.45×10^{-7} cm/s; TPC 及 TPC-SMEDDS 的 P_{app} 分别为 5.13×10^{-6} cm/s 和 1.847×10^{-5} cm/s。结论 磷脂复合物及自微乳技术联用可以明显改善 Tri 的渗透系数, 提高 Tri 跨膜转运效率, 提示可提高生物利用度。

关键词: 三叶豆紫檀苷; Caco-2 细胞; 渗透性研究; 磷脂复合物; 自微乳药物传递系统

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)04-0573-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.04.008

Study on trifolirhizin phospholipid complex self-microemulsifying drug delivery system and its transmembrane transport

YANG Zhi-xin¹, ZHANG Wen-jun², LIU Ming-yu¹, ZHANG Feng-jiao¹, SONG Chun-xiao², DENG Wei-zhe³

1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Pharmaceutical Research Institute, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

3. No. 211 Hospital of PLA, Harbin 150080, China

Abstract: Objective To improve the absorption of trifolirhizin (Tri) isolated from *Sophora flavescens* through preparing it to be phospholipid complex self-microemulsion. **Methods** In this study, we used the silica gel column chromatography and recrystallization technology to separate and prepare trifolirhizin; And we used physical and chemical properties and spectral data to identify the structure. We used the orthogonal experiment and the central composite design response surface method (CCD-RSM) to optimize the Tri phospholipid complex (TPC), Tri phospholipid composite material self micro-emulsifying drug delivery system (TPC-SMEDDS), and used the Caco-2 model to investigate the transmembrane transport of Tri, TPC, and TPC-SMEDDS, respectively. **Results** The concentration of the phospholipid complex was 4 mg/mL, the ratio of drug to lecithin was 1 : 1.5, the reaction time was 3 h, the composite rate was (93.20 ± 2.01)%. The emulsifier was polyoxyethylene castor oil (Cremphor EL40), the auxiliary emulsifier was diethylene glycol ethyl ether (Transcutol HP), and the weight ratio (K_m) of phospholipid complex was 7.58. The experiments of Caco-2 cell showed that the P_{app} of Tri was 2.45×10^{-7} cm/s; The P_{app} values of TPC and TPC-SMEDDS were 5.13×10^{-6} and 1.847×10^{-5} cm/s, respectively. **Conclusion** The permeability coefficient of Tri can be obviously improved by using phospholipid complex and self-microemulsion technique, which also can improve the efficiency of drug delivery.

Key words: trifolirhizin; Caco-2 cell; permeability research; phospholipid complex; self-microemulsifying drug delivery system

收稿日期: 2015-10-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81274091); 国家教育部春晖计划 (Z2008-1-15016); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D200744); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目 (2012)

作者简介: 杨志欣 (1974—), 女, 副教授, 从事新剂型与新药开发。Tel: 13384662573 E-mail: zhixin.y@163.com

*通信作者 邓伟哲, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 从事中西医结合防治胃肠道疾病研究。Tel: (0451)57752415 E-mail: deng-wz@163.com

三叶豆紫檀苷 (trifolirhizin, Tri), 又名红车轴草根苷、红车轴草根苷、三叶豆根苷、高丽槐素-D-葡萄糖, 是豆科槐属植物苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根分离得到的紫檀烷类黄酮化合物, 现代药理研究表明其具有抗炎、抗肿瘤等活性^[1-2]。此外, 其也显示出酪氨酸酶抑制作用并能抑制小鼠 B16 黑素瘤细胞黑素合成, 提示其可作为对紫外线敏感的皮肤的一种新型美白剂^[3]。课题组研究表明 Tri 的水溶性、脂溶性均较差, 属生物药剂学分类系统 (biopharmaceutics classification system, BCS) 第 IV 类药物, 口服生物利用度低。

磷脂复合物 (phospholipid complex, PC) 通过提高药物亲脂性改善其生物膜透过, 显著提高生物利用度及生物有效性^[4-8], 然而 PC 过于黏稠导致其在水中不易分散。自微乳药物传递系统 (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS) 可改善水难溶性/脂溶性药物的溶出度, 提高药物吸收的速度和程度, 促进 PC 在水中分散, 近年来成为研究热点^[9-12]。本研究联合采用 PC 与 SMEDDS 技术制备 Tri 磷脂复合物 (TPC) 自微乳 (TPC-SMEDDS), 全面解决 Tri 不良的溶解性和渗透性问题^[13], 并通过 Caco-2 细胞考察 Tri 及其制剂的跨膜转运。Tri 通过制成磷脂复合物自微乳以改善吸收的研究, 国内外未见相关报道。

1 仪器与材料

Bruker-400 型超导核磁共振光谱仪, 德国布鲁克公司; Waters 2695-2996 型 HPLC 仪, 美国 Waters 公司; Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 美国 Dikma 公司; MAT LCQ 质谱仪, 美国 Finnigan 公司; Transwell 细胞培养板, 丹麦 NUNC 公司; CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; Millicell-ERS 跨膜电阻仪, 美国 Millipore 公司; XDS-1 倒置显微镜, 重庆光电仪器总公司; 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; 超净工作台, 苏州净化工程设备有限公司; Milli-Q 纯水机, 美国 Millipore 公司。

硅胶 (80~100、200~300 目), 青岛海洋化工厂; 薄层色谱用硅胶板 (Silica gel60F254); Tri 原料药 (实验室自制, 批号 20130812, 质量分数 > 98%); TPC 及 TPC-SMEDDS (实验室自制); 卵磷脂, 阿拉丁工业公司, 中国上海; 聚氧乙烯蓖麻油 (Cremphor EL40)、聚氧乙烯氢化蓖麻油 (Cremphor RH40), 巴斯夫, 德国; 丙二醇单辛酸酯 (Capyrol 90)、二乙二醇单乙基醚 (Transcutol HP)、辛酸癸

酸聚乙二醇甘油酯 (Labrasol®), 嘉法狮, 中国上海; 聚山梨酯 80、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 400, 天津博迪化学有限公司; 蓖麻油, 天津富宇精细化工有限公司; 油酸乙酯, 天津光复精细化工研究院; 肉豆蔻酸异丙酯, 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇为色谱醇, 其他试剂均为分析醇。Caco-2 细胞, Corning Costar, New York; DMSO, 上海联硕生物科技有限公司; DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media, 高糖) 培养基、胎牛血清、非必需氨基酸、青-链霉素、HBSS (Hank's balanced salt solution) 缓冲液、0.25% 胰蛋白酶-0.02% 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 消化液, Invitrogen Co. Grand Island. NY, 美国。

2 方法与结果

2.1 Tri 的制备

2.1.1 Tri 的分离制备 取干燥的苦参 3.0 kg, 80% 乙醇回流提取, 所得固形物加 95% 乙醇超声溶解, 离心除残渣, 上清液回收溶剂所得固形物以 0.5% HCl 超声溶解残留的生物碱成分, 取残渣用蒸馏水多次洗涤, 直至呈中性, 减压干燥, 即得苦参总黄酮提取物 (得率为 2.1%)^[14]。以硅胶柱 (200~300 目) 分离苦参总黄酮, 二氯甲烷-甲醇梯度洗脱, TLC 检查合并相同组分, 得 Fr. 1~Fr. 10 共 10 个部分。Fr. 8 部分甲醇重结晶得到白色针状晶体 (2.59 g)。

2.1.2 Tri 的结构鉴定 白色针晶, 微溶于甲醇, Molish 反应呈紫色环, 盐酸镁粉反应不显色, mp 140~141.5 °C。UV 光谱 (MeOH) 在 309.5、364 nm 处出现最大吸收。ESI-MS 谱中, 在 m/z 447 处可见 $[M+1]^+$ 离子峰和 m/z 284 (M^+-162 葡萄糖基) 碎片离子, 表明相对分子质量为 446, 且为苷类化合物。经酸水解后, 其糖部分经薄层色谱检识证明含有葡萄糖, 推测其为含有葡萄糖的苷类化合物。结合 ¹H-NMR 谱及 ¹³C-NMR 谱, 推测其分子式为 C₂₂H₂₂O₁₀, 计算其不饱和度为 12。¹H-NMR (CD₃COCD₃) δ: 7.38 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-1), 6.92 (1H, s, H-7), 6.78 (1H, dd, $J = 9.4, 2.4$ Hz, H-2), 6.59 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-4), 6.38 (1H, s, H-10), 5.96 (1H, s, -OCH₂O-), 5.91 (1H, s, -O-CH₂-O-), 5.54 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-11α), 4.96 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 4.28 (2H, m, H-6), 3.80~3.43 (7H, m, H-6α 和糖上质子); ¹³C-NMR (CD₃COCD₃) δ: 132.6 (C-1), 111.2 (C-2), 159.8 (C-3), 106.2 (C-4), 157.8 (C-4α), 67.8 (C-6), 40.6 (C-6α), 119.2 (C-6β), 105.2 (C-7), 142.8 (C-8),

148.4 (C-9), 93.4 (C-10), 154.8 (C-10 α), 79.5 (C-11 α), 115.8 (C-11 β), 101.2 (-O-CH₂-O-), 102.5 (C-1'), 74.5 (C-2'), 77.8 (C-3'), 71.4 (C-4'), 76.0 (C-5'), 62.7 (C-6')。以上数据与文献报道^[14]的 (-)-maackiain-3-O-glucoside (三叶豆紫檀苷) 数据基本一致, 确定其为 Tri。

2.2 TPC 的制备

2.2.1 TPC 的制备方法 分别称取 Tri 和 PC 各 10 mg 置于 10 mL 锥形瓶中, 加入 5 mL 丙酮, 于 40 °C、50 r/min 条件下恒温水浴磁力搅拌 2 h, 反应后将溶液置于梨形瓶中, 恒温水浴 40 °C, 50 r/min 转速下旋转蒸发除去溶剂, 真空干燥, 即得。

2.2.2 TPC 的评价方法 评价指标采用药物复合率, 测定方法为将药物与磷脂反应后溶液挥干再溶于二氯甲烷 (该溶剂对药物不溶但可以溶解磷脂和 PC), 减压抽滤得到不溶的沉淀 (即未反应的药物沉淀) 干燥后称质量, 按下式计算复合率。

$$\text{复合率} = W_1/W = (W - W_2)/W$$

W_1 为形成复合物的药物量, W_2 为未形成复合物的药物量, W 为总投料量

2.2.3 正交试验优化 TPC 的处方 以复合率为指标, 按照“2.2.1”项制备步骤采用单因素考察法初步筛选 TPC 处方及工艺条件。反应溶剂选择了甲醇-二氯甲烷 (1:1)、甲醇、四氢呋喃、丙酮以及氯仿, 结果丙酮为反应溶剂时复合率最高; 分别在 25~55 °C 每隔 5 °C 考察反应温度的影响, 结果 40 °C 为宜。进一步研究发现, Tri 质量浓度、反应时间、Tri 与卵磷脂投料物质的量比例对复合率影响较大, 故在单因素考察基础上, 选择 Tri 与卵磷脂投料物质的量比 (A)、反应物 (Tri) 质量浓度 (B)、反应时间 (C) 为考察的因素, 每个因素下设 3 个水平 (表 1), 按照 L₉(3⁴) 表安排试验, 结果进行直观分析和方差分析 (表 1、2)。综合分析极差及方差分析结果, 得到各因素对复合率影响的主次顺序为 B>A>C, 仅 B 因素具有显著性; 优选最佳方案是 A₂B₂C₃, 即 Tri 质量浓度为 4 mg/mL, 药物与卵磷脂投料物质的量比为 1:1.5, 反应时间为 3 h。按上述优选的处方制备 3 批 TPC 样品, 测定复合率的平均值为 (93.20±2.01)%, 结果表明该制备工艺稳定可控。

2.3 TPC-SMEDDS 中 Tri 载药量测定

色谱条件^[13]: 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (60:40);

表 1 L₉(3⁴) 正交试验设计、结果及直观分析

Table 1 Design, results, and intuitive analysis of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A	B/(mg·mL ⁻¹)	C/h	D (误差)	复合率/%
1	1:1 (1)	3 (1)	1 (1)	(1)	32.34
2	1:1 (1)	4 (2)	2 (2)	(2)	63.26
3	1:1 (1)	5 (3)	3 (3)	(3)	53.98
4	1:1.5 (2)	3 (1)	3 (3)	(3)	52.27
5	1:1.5 (2)	4 (2)	1 (1)	(1)	79.20
6	1:1.5 (2)	5 (3)	2 (2)	(2)	45.77
7	1:2 (3)	3 (1)	2 (2)	(2)	38.25
8	1:2 (3)	4 (2)	3 (3)	(3)	47.89
9	1:2 (3)	5 (3)	1 (1)	(1)	25.89
K ₁	149.58	122.86	126.00	137.43	
K ₂	177.24	190.35	141.42	147.28	
K ₃	112.03	125.64	171.43	154.14	
R	65.20	67.49	45.43	16.71	

表 2 正交设计的方差分析

Table 2 Analysis of variance

误差来源	偏差平方和	自由度	F 比	显著性
A	714.158	2	15.184	
B	972.224	2	20.671	P<0.05
C	355.807	2	7.565	
D (误差)	47.034	2		

$$F_{0.05}(2, 2) = 19.00 \quad F_{0.01}(2, 2) = 99.00$$

检测波长为 309 nm; 柱温为 30 °C; 进样量 10 μL。该色谱条件下辅料不干扰主药的测定, HPLC 图见图 1。Tri 在 31~310 μg/mL 线性关系良好, 回归方程为 $Y = 8 \times 10^6 X + 37\ 028$, $R^2 = 0.9998$ 。载药量测定时, 取所制备的 TPC-SMEDDS 样品, 于 37 °C 恒温水浴振荡器中振荡 24 h, 3 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 用流动相稀释, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后, 按上述方法测定。日内、日间精密度 RSD 均 < 2.15%, 表明仪器精密度良好; 稳定性试验 RSD 为 0.72%, 表明样品溶液 10 h 内稳定; 重复性试验 RSD 为 1.15%, 表明本法重复性良好; 加样回收率均 > 97.1%, RSD 均小于 2.0%。

2.4 TPC-SMEDDS 的制备

2.4.1 空白 SMEDDS 的制备 制备时先将乳化剂与助乳化剂按照质量比 (K_m) 为 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 混合, 再将油相与乳化剂和助乳化剂质量之和按照 1:9~9:1

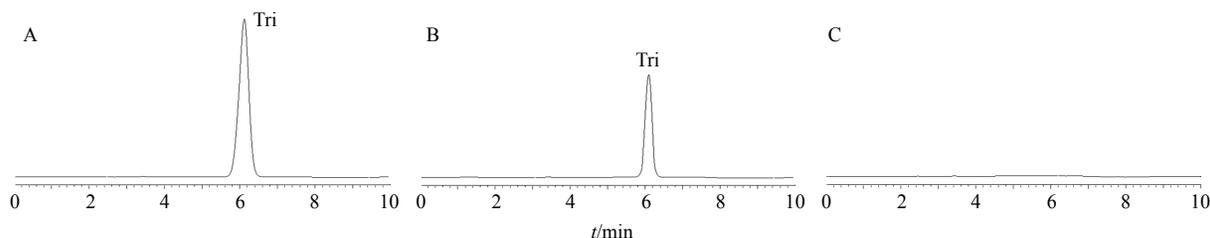


图 1 Tri 对照品 (A)、TPC-SMEDDS 样品 (B) 和空白辅料 (C) HPLC 图

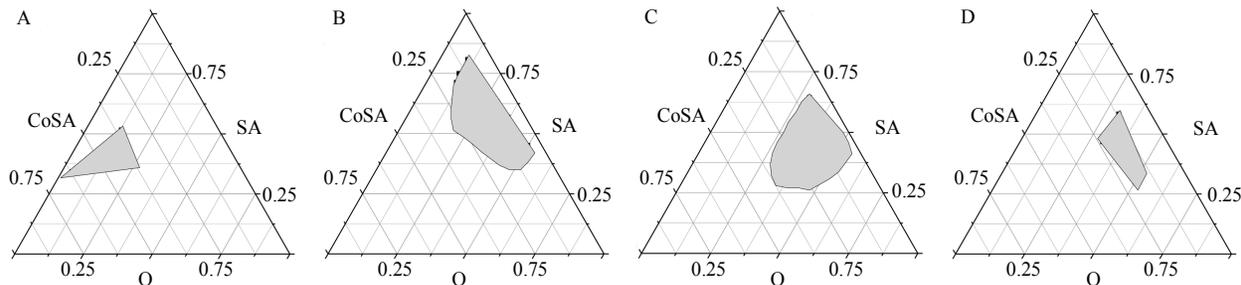
Fig. 1 HPLC of Tri reference substance (A), TPC-SMEDDS sample (B), and blank accessories (C)

的比例混合, 加入到具塞西林瓶中, 37 °C 恒温水浴磁力搅拌 5 min, 使油相、乳化剂和助乳化剂充分混匀。

2.4.2 绘制三元相图确定空白 SMEDDS 自乳化区域 考察了 TPC 在各种油相、乳化剂及助乳化剂等辅料中的溶解度, 确定 Tran HP 为助乳化剂, 蓖麻油、油酸乙酯及 Capryol 90 为油相, EL40、聚山梨酯 (Tween) 80 及 Labrasol 为乳化剂, 进一步考察不同组合的处方对自乳化效率的影响。结果油相-乳化剂-助乳化剂分别为 Capryol 90-EL40-Tran HP 和油酸乙酯-Tween 80-Tran HP 自乳化效果较好为 A 级 [即迅速分散乳化 (时间 ≤ 1 min), 形成澄清或微微泛蓝的微乳 (乳滴粒径 ≤ 50 nm)]; 蓖麻油-EL40-Tran HP 和油酸乙酯-EL40-Tran HP 自乳化效

果为 B 级 [迅速分散乳化 (时间 ≤ 1 min), 形成蓝白色微乳 (乳滴粒径为 50~100 nm)]。挑选上述处方绘制三元相图。将筛选的油相、乳化剂、助乳化剂按照“2.4.1”项下制备 SMEDDS。磁力搅拌下, 向 SMEDDS 中缓慢加入 10 倍量去离子水, 记录形成澄清或淡蓝色乳光液体的处方及比例, 按油、乳化剂、助乳化剂的各自质量分数作为三元相图的一点, 采用 Origin 8.0 软件绘制三元相图, 结果见图 2。结果表明, 图 2-A 中 Capryol 90-EL40-Tran HP 和图 2-B 中蓖麻油-EL40-Tran HP 的自微乳区域面积较大, 但实验中发现蓖麻油-EL40-Tran HP 的凝胶区域较大, 影响乳化效率, 故选择 Capryol 90-EL40-Tran HP 进一步优化。

2.4.3 TPC-SMEDDS 处方优化 采用星点设计效



三元相图中“SA”为乳化剂的缩写, “CoSA”为助乳化剂的缩写, “O”为油的缩写; A-Capryol 90-EL40-Tran HP B-蓖麻油-EL40-Tran HP C-油酸乙酯-EL40-Tran HP D-油酸乙酯-Tween 80-Tran HP

SA: surfactant CoSA: co-surfactants O: oil A-Capryol 90-EL40-Tran HP B-Castor oil-EL40-Tran HP C-oleic acid ethyl ester-EL40-Tran HP D-oleic acid ethyl ester-Tween 80-Tran HP

图 2 空白 SMEDDS 三元相图

Fig. 2 Ternary phase diagram of blank SMEDDS

应面法优化自微乳处方。主要考察油相用量 (X_1 , 30%~50%) 和 K_m 值 (X_2) 对 TPC-SMEDDS 的饱和载药量 (Y_1)、液滴尺寸多分散性指数 (PDI, Y_2) 及粒径 (Y_3) 的影响, 进行 2 因素 5 水平的星点设计, 因素水平和实验结果见表 3。

以 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 为因变量, 采用 Design Expert 8.0 软件进行二次多项式回归, 以拟合优度 R^2 和置信度 P 作为模型判断标准, 二次多项式拟合方程结果分

别为 $Y_1 = -191.08 + 10.36 X_1 + 0.49 X_2 + 0.08 X_1 X_2 - 0.13 X_1^2 - 0.23 X_2^2$, $P = 0.000 1 < 0.05$, $R^2 = 0.957 9$; $Y_2 = 6.15 - 0.30 X_1 + 0.16 X_2 - 0.004 X_1 X_2 - 0.004 X_1^2 - 0.001 X_2^2$, $P = 0.000 3 < 0.05$, $R^2 = 0.957 0$; $Y_3 = 245.31 - 12.18 X_1 + 8.59 X_2 - 0.33 X_1 X_2 + 0.18 X_1^2 + 0.36 X_2^2$, $P = 0.003 3 < 0.05$, $R^2 = 0.839 9$ 。分析各因素对响应值的影响, 借助软件 SPSS 11.0 的优化功能, 在最佳的效应值的前提下, 通过响应面

表 3 星点试验设计及测定结果

Table 3 Test results from CCD

试验号	$X_1/\%$	X_2	$Y_1/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	Y_2	Y_3/nm
1	32.93 (-1)	3.02 (-1)	12.04	0.312	25.24
2	47.07 (+1)	3.02 (-1)	10.74	0.115	36.48
3	32.93 (-1)	7.98 (+1)	15.81	0.547	39.94
4	47.07 (+1)	7.98 (+1)	19.95	0.066	28.16
5	30.00 (-1.414)	5.50 (0)	6.90	0.844	43.71
6	50.00 (+1.414)	5.50 (0)	7.10	0.210	44.86
7	40.00 (0)	2.00 (-1.414)	14.73	0.148	37.59
8	40.00 (0)	9.00 (+1.414)	20.48	0.209	24.83
9	40.00 (0)	5.50 (0)	21.14	0.125	24.27
10	40.00 (0)	5.50 (0)	22.38	0.096	24.39
11	40.00 (0)	5.50 (0)	21.34	0.125	24.48
12	40.00 (0)	5.50 (0)	20.79	0.134	23.89
13	40.00 (0)	5.50 (0)	22.29	0.095	23.63

的重合叠加, 选取较优的组合, 3D 响应面见图 3。

由图 3-A 中, 油相用量居中等水平时随着 K_m 值增大载药量 Y_1 也增大; 图 3-B 中, K_m 值对 Y_2 基本无影响, 随着油的用量的增加 Y_2 则减小; 图 3-C 中, 2 因素在中心点附近时 Y_3 值较小。综合考虑 3 个方程, Y_1 、 Y_2 、 Y_3 权重相同, 以 3 者的综合评分 $(Y) = (Y_1/Y_{1\max} + Y_2/Y_{2\max} + Y_3/Y_{3\max})/3$ 为指标, 采用最速下降法得油相用量 $X_1 = 43.65\%$, K_m 值 $X_2 = 7.58$, Y 预测最大值为 94.932%, Y_1 预测最大值为 21.816 3 mg/g, 95% 的最优值预测区间为 (17.72, 25.92), Y_2 预测最大值为 0.066, 95% 的最优值预测区间为 (0, 0.23), Y_3 预测最大值为 24.374 9 nm, 95% 的最优值预测区间为 (12.85, 35.90)。

根据优化处方, 制备 3 批 TPC-SMEDDS 样品进行处方验证, 分别测定饱和载药量、PDI 和平均粒径, 结果 3 批 TPC-SMEDDS 样品的平均饱和载

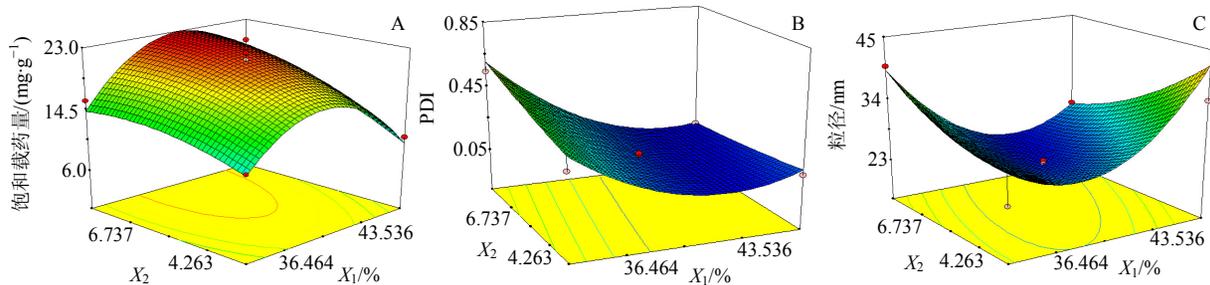


图 3 3D 响应面图

Fig. 3 3D response surface

药量为 (21.63 ± 0.59) mg/g, 平均 PDI 为 0.071 ± 0.031 , 平均粒径为 (24.84 ± 0.40) nm; 根据最优参数及二次多项式拟合方程计算得到的饱和载药量为 21.82 mg/g, PDI 为 0.066, 粒径为 24.37 nm。结果预测值和真实值之间基本无差异, 表明中心复合设计法可靠。为便于制备, 载药量确定为 20.00 mg/g (以 TPC 中 Tri 量计算)。

2.4.4 粒径分布及 Zeta 电位的测定 取稀释 50 倍的自微乳适量, 用马尔文粒径仪测定自微乳的粒径和 Zeta 电位, 记录粒径及电位, 结果见图 4。TPC-SMEDDS 的平均粒径为 (24.84 ± 0.40) nm, PDI 为 0.071 ± 0.310 , Zeta 电位为 (-15.42 ± 0.62) mV。

2.4.5 稳定性研究 将按最佳工艺条件制备的 3 批 TPC-SMEDDS 样品于室温及 4 °C 冰箱冷藏保存, 分别于制备后第 0、15、30、45、60 天取样观察, 测定电位、粒径、PDI 以及载药量, 考察稳定性。结果, 自微乳在 4 °C 条件下存放 60 d, 外观均匀,

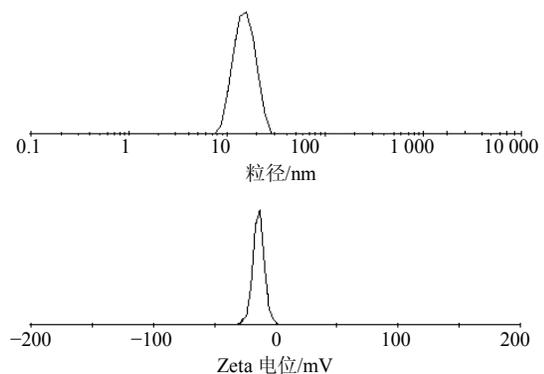


图 4 粒径分布和 Zeta 电位图

Fig. 4 Particle size distribution and Zeta potential

无絮凝和沉淀产生, Zeta 电位及粒径、载药量基本不变。

2.5 Caco-2 细胞渗透性研究

2.5.1 Tri 定量测定 色谱条件同“2.3”项。该条件下, 辅料对主药测定不产生干扰, 色谱图见图 5。

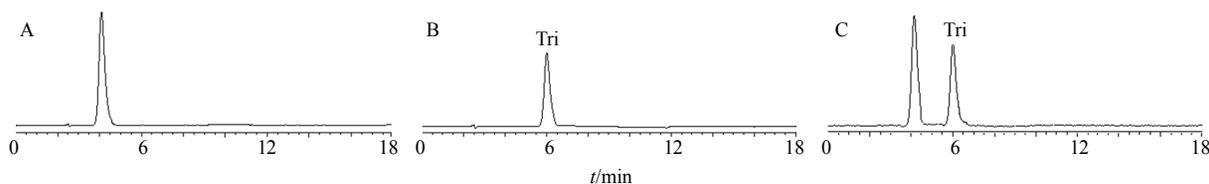


图 5 HBSS 溶液 (A)、Tri 对照品 (B) 和 Tri 对照品+HBSS 溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of HBSS (A), Tri reference substance (B), and HBSS + Tri reference substance (C)

Tri 在 2.55~102.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好, 回归方程为 $Y=13.433 X+5.378$, $R^2=0.999 5$ 。日内和日间精密度 RSD 均小于 3%, 加样回收率在 95.76%~104.87%, RSD 小于 2.0%, 符合要求。

2.5.2 Caco-2 细胞模型建立及单层验证 培养基采用 DMEM 13.4 mg/mL, 含 10%胎牛血清、1%非必须氨基酸、0.5%青霉素、0.5%链霉素, 调 pH 至 7.4。培养箱 CO_2 浓度控制在 5%, 温度 37 $^{\circ}\text{C}$ 。Caco-2 接种 (密度为 1×10^6 个/ cm^2) 后隔天换液, 14 d 后每日换液, 分别于 6、14、21 d 采用跨膜电阻仪测定各孔跨膜电阻值 (trans epithelial electrical resistance, TEER), 倒置显微镜观察细胞形态。培养 Caco-2 细胞第 6 天的 TEER 达 $(325 \pm 19) \Omega/\text{cm}^2$, 第 14 天为 $(528 \pm 23) \Omega/\text{cm}^2$ 、第 21 天为 $(673 \pm 27) \Omega/\text{cm}^2$ 。可见, 14 d 时 TEER 值已经达到 $500 \Omega/\text{cm}^2$, 然而倒置显微镜观察细胞形态仍可见细胞空洞, 直至 21 d 才完全融合形成致密均匀的细胞单层, 因此选择 Caco-2 细胞培养 21 d。第 6 天和第 21 天的细胞形态见图 6。

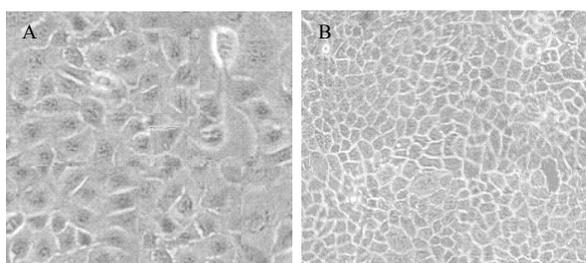


图 6 生长 6 d (A)、21 d (B) Caco-2 细胞形态 ($\times 200$)

Fig. 6 Caco-2 cell morphology on 6 (A) and 21 d (B) ($\times 200$)

2.5.3 Caco-2 细胞跨膜转运 实验前弃去 Trans well 板中培养液, 用 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 PBS 溶液洗涤 2 次, 在培养板中加入 HBSS, 于细胞培养箱中孵育 30 min。吸取 200 μL 的 Tri、TPC、TPC-SMEDDS 待测液分别置于 AP 面 (apical, 细胞绒毛面), 0.8 mL 的 pH 7.4 的 HBSS 溶液置于 BL 面 (basolateral, 基底面), CO_2 培养箱孵育。实验开始时, 先测定药物

初始浓度 (C_0), 再分别于 10、20、30、45、60、90、120、180 min 从接收室吸取接收液 200 μL , 同时补加 200 μL 空白接收液。HPLC 分析, 计算表观渗透系数 (P_{app} , cm/s)。

$$P_{\text{app}} = (dQ/dt)/(A \times C_0)$$

Q 为累积转运量, 代表化合物在接收室的总量 (μmol); dQ/dt 为转运速率 ($\mu\text{mol/s}$); C_0 为化合物在供给室的初始浓度 ($\mu\text{mol/mL}$); A 为聚碳酸酯膜的表面积 (cm^2)

每组实验重复 3 次, 以 HBSS 溶液作空白, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学处理采用 SPSS 19.0 中的 One-way ANOVA 分析, TPC、TPC-SMEDDS 分别与 Tri 比较 (采用 LSD、S-N-K 检验) $P < 0.05$, 表明转运存在显著差异。实验结束时再次测量 TEER, 以确定细胞单层完整性, Tri、TPC 及 TPC-SMEDDS 随时间变化在 Caco-2 细胞中累积吸收转运结果见图 7。

实验结束时 TEER 测量结果与实验前测量结果差异在 10% 以内, 表明细胞单层完整性良好。测定结果表明, Tri 自身的渗透性很差, P_{app} 仅为 $2.45 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$; 制成磷脂复合物后渗透性 P_{app} 为 $5.13 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; 联合采用磷脂复合物与自微乳技术后, P_{app} 为 $1.847 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ 。

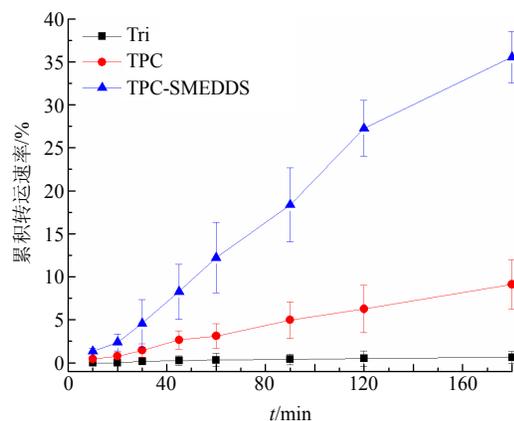


图 7 Caco-2 细胞上的累积吸收转运 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Cumulative absorption and transport rate in Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

3.1 自乳化实验条件选择

本研究采用单因素考察法以自乳化效率为指标,研究了TPC-SMEDDS制剂的自乳化试验条件,如搅拌速度、稀释倍数等。结果表明,搅拌速度越快,TPC-SMEDDS乳化时间和粒径虽稍有降低,但没有显著性差异。且速度过快,亲水性表面活性剂会产生较多泡沫,故选50 r/min。随着稀释倍数的增加,乳化时间相应增加,粒径影响不大。考虑到空腹时正常成人的胃容量约50 mL,进餐后可达1.5 L,胃液体积约为口服微乳体积的50倍,故稀释倍数确定为50倍。同时考察了不同的乳化介质蒸馏水、人工胃液及人工肠液对乳化效率的影响,结果对乳化时间和乳滴的粒径无显著差异。由于制剂口服后应在胃肠道自发形成微乳,故本研究中均采用了37℃作为自微乳化考察温度。

3.2 自微乳中油相、乳化剂及助乳化剂的选择

本研究筛选了TPC在各类油、表面活性剂以及助表面活性剂中的溶解度,结果助乳化剂Transcol HP对其溶解度明显高于其他辅料;肉豆蔻酸异丙酯对其溶解度太差,故以蓖麻油、油酸乙酯及Capryol 90为油相;RH 40黏度较大,故乳化剂选择EL40、Tween 80及Labrasol进一步开展自乳化效果研究。

3.3 Caco-2跨膜转运分析

Caco-2细胞系来源于人的直肠癌,其结构和生化作用类似于人小肠上皮细胞,含有与小肠刷状上皮相关的酶系^[15]。本研究基于Caco-2细胞考察了Tri、TPC、TPC-SMEDDS的 P_{app} ,结果Tri的 P_{app} 仅为 2.45×10^{-5} cm/s,小于 1×10^{-6} cm/s,表明Tri为小肠不良吸收的药物;制成磷脂复合物及磷脂复合物自微乳后的 P_{app} 都均明显优于原料药Tri,且与Tri比较均有显著性差异($P < 0.05$)。TPC、TPC-SMEDDS比较,联合磷脂复合物与自微乳2种技术的制剂比单纯磷脂复合物的技术有优越性,有显著性差异($P < 0.05$)。上述结果提示磷脂复合物及自微乳技术联用可以明显改善Tri的渗透系数,提高药物跨膜转运效率,提示可提高生物利用度。

参考文献

[1] Zhou H P, Lutterodt H, Cheng Z H, et al. Anti-inflammatory and antiproliferative activities of trifolirhizin, a flavonoid from *Sophora flavescens* roots

[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(11): 4580-4085.

- [2] Aratanechemuge Y, Hibasami H, Katsuzaki H, et al. Induction of apoptosis by maackiain and trifolirhizin (maackiain glycoside) isolated from sanzukon (*Sophora subprostrate* Chen et T. Chen) in human promyelotic leukemia HL-60 cells [J]. *Oncol Rep*, 2004, 12(6): 1183-1188.
- [3] Hyun S K, Lee W H, Jeong D M, et al. Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(1): 154-158.
- [4] 熊 阳, 盛卫国, 杜佳琦, 等. 山楂叶总黄酮磷脂复合物的研究 [J]. *中草药*, 2008, 39(3): 353-356.
- [5] 童廷德, 黄 蕊, 孙 逊, 等. 丹酚酸 B 磷脂复合物自乳化药物传递系统的制备及质量评价 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2013, 44(2): 303-307.
- [6] 夏海建, 张振海, 孙 娥, 等. 胶体二氧化硅固化银杏黄酮组分磷脂复合物的研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(8): 1078-1082.
- [7] 薛海萍, 高婷婷, 杨 骏, 等. 红景天苷磷脂复合物的制备及表征 [J]. *中草药*, 2015, 46(22): 3333-3337.
- [8] 李艳贞, 阎 卉, 刘 欢, 等. 长春瑞滨磷脂复合物的制备及其性质研究 [J]. *现代药物与临床*, 2012, 27(6): 570-574.
- [9] 陈立江, 刘 洋, 李 丽, 等. 赤芍总苷自微乳化给药系统的研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(6): 1082-1086.
- [10] Kang B K, Lee J S, Chon S K, et al. Development of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs [J]. *Int J Pharm*, 2004, 274(1/2): 65-73.
- [11] 赵丹丹, 黄 挺, 黄绳武. 依托泊苷过饱和自微乳化释药系统的制备工艺及质量评价研究 [J]. *中草药*, 2015, 46(6): 822-831.
- [12] 轩肖玉, 王亚静, 张伟玲, 等. 芒果苷自微乳给药系统的制备及其大鼠体内药动学研究 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(3): 166-170.
- [13] 赵慧娟, 王答其, 孙文基. 不同部位、不同产地苦参中三叶豆紫檀苷的 HPLC 测定 [J]. *中草药*, 2005, 36(9): 1404-1406.
- [14] 张瑞菊. 苦参中黄酮类有效成分的提取、检测及相关性质的研究 [D]. 济南: 山东大学, 2008.
- [15] 邓银华, 徐康平, 章 为, 等. 山豆根化学成分研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2005, 17(2): 172-174.
- [16] Hidalgo I J, Raub T J, Borchardt R T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability [J]. *Gastroenterology*, 1989, 96(2): 736-749.