

甘草黄酮自微乳化释药系统的制备及其质量评价

仲 粒, 李小芳*, 廖艳梅, 刘罗娜, 龙家英, 张琳琳

成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 研究甘草黄酮自微乳的处方与制备工艺, 并对其质量进行评价。**方法** 通过溶解度实验、油相与乳化剂配伍实验及伪三元相图的绘制, 筛选甘草黄酮自微乳的处方组成; 以平均粒径、自乳化时间、载药量为评价指标, 采用单纯形网格法优化处方, 并对甘草黄酮自微乳的理化性质、体外溶出度及稳定性进行评价。**结果** 甘草黄酮自微乳处方中油相为肉桂油(10%)、乳化剂为 RH-40(55%)、助乳化剂为 1,2-丙二醇(35%)。所得自微乳外观均一透明, 自乳化后平均粒径(16.30 ± 0.22) nm, 多分散指数 0.155 ± 0.008 , Zeta 电位(-20.11 ± 0.50) mV, 载药量(86.03 ± 0.37) mg/g。溶出度实验表明, 甘草黄酮 30 min 累积溶出率达 90.65%。稳定性实验表明, 高温与光照影响甘草黄酮自微乳的稳定性, 应低温避光保存。**结论** 甘草黄酮自微乳制备工艺简单, 质量稳定, 能显著增加药物的溶解度, 从而提高甘草黄酮的口服生物利用度, 为该有效部位相关制剂的进一步研究与开发提供参考。

关键词: 甘草黄酮; 自微乳; 单纯形网格法; 体外溶出度; 稳定性

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)13-3044-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.008

Preparation and quality evaluation of licorice flavonoids self-microemulsifying drug delivery system

ZHONG Li, LI Xiao-fang, LIAO Yan-mei, LIU Luo-na, LONG Jia-ying, ZHANG Lin-lin

Key Laboratory of Research and Utilization of Chinese Medicinal Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: **Objective** To study the prescription and preparation technology of licorice flavonoids self-microemulsifying drug delivery system (LF-SMEDDS) and evaluate its quality. **Methods** The optimal formulation of LF-SMEDDS was screened by test of solubility, compatibility of oil and emulsifier, and pseudo-ternary phase diagram. Simplex lattice method was applied to optimize formulation with average particle size, polydispersity index and drug loading as evaluation indexes, the physicochemical characteristics, *in vitro* dissolution and stability were also determined. **Results** The optimal prescription composition of LF-SMEDDS was 10% of *Cinnamomi Cortex* oil, 55% of RH-40, and 35% of 1,2-propanediol. The LF-SMEDDS exhibited uniform and transparent appearance, with the average particle size of (16.30 ± 0.22) nm, polydispersity index of 0.155 ± 0.008 , Zeta potential of (-20.11 ± 0.50) mV and drug loading of (86.03 ± 0.37) mg/g. The results of *in vitro* dissolution test indicated that the accumulative dissolution of LF was 90.65% at 30 min. The stability experiment showed that LF-SMEDDS was affected by high temperature and illumination, indicating that it should be stored at low temperature and protected from light. **Conclusion** The LF-SMEDDS is simple in preparation and stable in quality, significantly increasing the solubility of LF and improving its oral bioavailability, which can provide reference for further research and development about the related preparations of the active fraction. **Key words:** licorice flavonoids; self-microemulsifying drug delivery system; simplex lattice method; *in vitro* dissolution; stability

收稿日期: 2019-03-06

基金项目: 成都市科技局科技惠民项目(2016-HM01-00299-SF); 四川省中医药管理局科研项目(2018YY001)

作者简介: 仲 粒(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 18408271701 E-mail: 415631996@qq.com

*通信作者 李小芳(1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。

Tel: 13808195110 E-mail: lixiaofang918@163.com

甘草黄酮 (licorice flavonoids, LF) 是从豆科甘草属植物甘草的根及根茎中提取的一类有生理活性的黄酮类化合物, 现代药理研究表明, 其具有抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、抗变态反应、抗氧化、降血糖、保肝护肝及酶抑制等多种药理活性, 对溃疡性结肠炎、消化性溃疡、癌症、糖尿病等疾病均具有良好的治疗作用^[1-8]。然而, 甘草黄酮在水中的溶解度低, 导致其口服吸收差, 体内生物利用度低, 限制了相关产品的研发与临床应用。近年来, 已有学者通过脂质体^[9]、乳膏^[10]、环糊精包合物^[11]等增溶技术改善甘草黄酮的溶解度, 但存在制备工艺繁琐、安全性较差等问题。因此, 亟需寻找一种制备工艺简单、口服安全性较好的增溶技术来有效改善甘草黄酮的溶解度及溶出度。

自微乳化释药系统 (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS) 是由油相、乳化剂和助乳化剂组成的固态或液态混合体系, 口服后能在胃肠道蠕动下与胃肠液混合, 自发分散形成粒径小于 100 nm 的 O/W 型微乳。该载药体系可增加难溶性药物的溶解度, 使乳滴在胃肠道内均匀快速扩散, 增加药物的膜渗透性, 促进药物的淋巴转运, 避免首关效应, 进而有效改善药物的生物利用度, 同时可降低药物的刺激性与毒副作用, 已广泛应用于难溶性药物增溶研究中^[12-13]。为解决甘草黄酮水溶性差、生物利用度低的问题, 本实验采用自微乳技术增溶甘草黄酮, 结合单纯形网格法筛选甘草黄酮自乳化释药系统 (LF-SMEDDS) 最优处方, 并对其质量评价, 以期增加甘草黄酮溶解度, 改善药物口服吸收, 为甘草黄酮新剂型的研发提供依据。

1 仪器与材料

UV-6000 型紫外-可见分光光度计, 上海美谱达有限公司; FA224 型电子分析天平, 万分之一, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; 85-2A 数显恒温磁力搅拌器, 常州澳华仪器有限公司; Nicomp 380 ZLS 型激光粒度仪, 美国 PSS 公司; TGL-16C 高速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; Tecnai G2 型透射电子显微镜, 美国 Fei 公司; RC-3 型溶出度测定仪, 山东博科科学仪器有限公司。

甘草黄酮原料药, 西安小草植物科技有限公司, 批号 GB20181020, 质量分数 70.0%; 甘草苷对照品, 批号 MUST-16032801, 质量分数 ≥ 98%, 成都曼思特生物科技有限公司; 肉桂油, 广西贵港市陈桂堂, 桂皮醛质量分数 > 90.0%; 油酸乙酯, 上海飞祥化

工厂; 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (RH40)、蓖麻油聚氧乙烯醚 (EL40) 均购自山东优索化工科技有限公司; 油酸、蓖麻油、聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、聚乙二醇 400 (PEG400)、丙三醇、1,2-丙二醇均购自成都市科龙化工试剂厂; 0 号胶囊, 浙江绿康制药有限公司; 水为超纯水, 试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 甘草黄酮的含量测定

取甘草苷对照品 5.0 mg, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 加适量 70% 乙醇超声溶解, 定容至刻度, 配得质量浓度为 208.4 μg/mL 的对照品储备液, 精密量取 0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 对照品储备液, 分别置于 10 mL 量瓶中, 精密加入 10% KOH 溶液 0.5 mL, 静置 5 min, 用 70% 乙醇定容至刻度, 摇匀, 以相应试剂为空白对照, 于 336.6 nm 处测定吸光度 (*A*) 值, 以质量浓度为横坐标, *A* 值为纵坐标, 得回归方程 $A = 0.049\ 5\ C - 0.056\ 3$, $r = 0.999\ 5$, 线性范围 6.25 ~ 16.67 μg/mL。

2.2 甘草黄酮在自微乳辅料中的溶解度考察

精密移取不同的油相、乳化剂、助乳化剂各 5 mL, 分别加入过量甘草黄酮, 超声 2 h 助溶, 于 (37.0 ± 0.5) °C 水浴静置 24 h, 于 10 000 r/min 离心 15 min, 移取上清液适量, 加入 70% 乙醇稀释适宜倍数, 按“2.1”项下方法测定, 结果见表 1。由此可知, 甘草黄酮在不同油相中的溶解度大小依次为肉桂油 > 油酸乙酯 > 蓖麻油 > 油酸, 在不同乳化剂中的溶解度大小依次为 EL-40 > 聚山梨酯 20 > RH-40 > 聚山梨酯 80, 在不同助乳化剂中的溶解度大小依次为 1,2-丙二醇 > PEG400 > 丙三醇。

表 1 甘草黄酮在各辅料中的溶解度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Solubility of LF in different excipients ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

种类	辅料	溶解度/(mg·mL ⁻¹)
油相	油酸	2.73 ± 0.03
	油酸乙酯	42.23 ± 0.09
	蓖麻油	16.99 ± 0.10
	肉桂油	362.22 ± 0.12
乳化剂	聚山梨酯 20	124.12 ± 0.15
	聚山梨酯 80	25.74 ± 0.06
	RH-40	43.85 ± 0.06
	EL-40	150.13 ± 0.20
助乳化剂	PEG400	116.48 ± 0.18
	丙三醇	25.64 ± 0.04
	1,2-丙二醇	177.52 ± 0.15

2.3 自微乳制备工艺的处方筛选

2.3.1 油相与乳化剂配伍考察 选择溶解度较高的油相（油酸乙酯、蓖麻油、肉桂油）与各乳化剂进行配伍实验，将油相与乳化剂分别按 9:1、8:2、7:3、6:4 混合均匀，取空白自微乳 0.5 g，滴入 50 mL 纯化水（37 ℃）中，300 r/min 恒速磁力搅拌，观察自乳化情况，记录自乳化时间，并按目测评价标准^[14]进行分级。结果，蓖麻油与各乳化剂配伍后乳化均较困难，形成白色凝胶状物；油酸乙酯与聚山梨酯 20 的相容性较好，与其他乳化剂配伍后乳化困难，形成的乳化液中有油滴存在；而肉桂油与 4 种乳化剂的相容性均较好，且甘草黄酮在肉桂油中的溶解度最高，故选择肉桂油作为油相；乳化剂中 RH-40 与 EL-40 的乳化能力明显优于聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80，而肉桂油配伍 RH-40 时乳化时间短，乳化效果更好，故确定 RH-40 为乳化剂。

2.3.2 助乳化剂的筛选 将乳化剂与助乳化剂按 1:1 混合得混合乳化剂，再与油相以 9:1、8:2、7:3、6:4 混合均匀。取空白自微乳 0.5 g，滴入 50 mL 纯化水（37 ℃）中，300 r/min 恒速磁力搅拌，观察自乳化情况，比较助乳化剂的助乳化能力。结果，助乳化剂的加入均增强了乳化效果，其中，1,2-丙二醇为助乳化剂时，肉桂油配伍 RH-40 乳化完全所需时间最短，效果最佳，故确定 1,2-丙二醇为助乳化剂。

2.3.3 伪三元相图的绘制 将乳化剂与助乳化剂按 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9 混匀后，再与油相按 9:1、8:2、7:3、6:4、5:5 的比例混匀，取空白自微乳 0.5 g，滴入 50 mL 纯化水（37 ℃）中，观察自乳化情况，记录形成微乳时各组分比例，以油相、乳化剂、助乳化剂为伪三元相图的 3 个顶点，绘制伪三元相图，结果见图 1。微乳区域中肉桂油、RH-40、1,2-丙二醇的比例分别为 10%~30%、10%~80%、10%~80%。

2.4 单纯形网格法优化自微乳处方

固定油相、乳化剂、助乳化剂的总量 100%，参考伪三元相图所得的微乳区域，并结合自微乳中乳化剂的用量范围，确定各组分的质量比例为肉桂油（A）10%~25%，RH-40（B）45%~60%，1,2-丙二醇（C）30%~45%，以自微乳的平均粒径（ Y_1 ）、自乳化时间（ Y_2 ）、载药量（ Y_3 ）为评价指标，采用 Design Expert 8.0 软件中的单纯形网格法优化 LF-SMEDDS 处方，试验设计及结果见表 2。

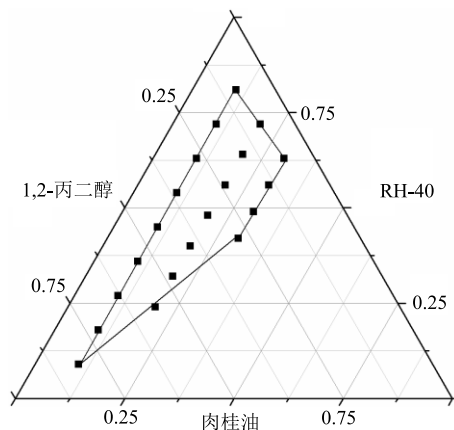


图 1 甘草黄酮空白自微乳的伪三元相图

Fig. 1 Ternary phase diagrams of blank LF-SMEDDS

表 2 单纯形网格法优化试验设计及结果

Table 2 Optimal experiment design and results by simplex lattice method

试验号	A/%	B/%	C/%	Y_1 /nm	Y_2 /s	Y_3 /(mg·g ⁻¹)
1	17.5	52.5	30.0	81.1	12.28	92.99
2	17.5	52.5	30.0	74.1	15.61	93.39
3	25.0	45.0	30.0	188.0	59.37	121.88
4	10.0	60.0	30.0	15.9	10.12	82.28
5	10.0	52.5	37.5	17.5	9.70	86.19
6	25.0	45.0	30.0	187.8	58.35	123.29
7	20.0	47.5	32.5	114.5	29.44	101.27
8	17.5	45.0	37.5	88.0	17.74	91.78
9	15.0	50.0	35.0	77.8	22.78	94.01
10	10.0	45.0	45.0	20.1	9.98	76.94
11	12.5	47.5	40.0	47.1	10.19	84.18
12	12.5	55.0	32.5	35.4	12.82	87.35
13	10.0	45.0	45.0	19.1	10.81	75.01
14	10.0	60.0	30.0	16.6	11.06	84.89

按表 2 中的处方比例精密称取各组分，37 ℃下 200 r/min 磁力搅拌 15 min，得空白自微乳。于空白自微乳中加入过量甘草黄酮，混匀，超声 2 h 助溶，(37.0±0.5) ℃水浴静置 24 h，以达到溶解平衡，得 LF-SMEDDS。取 LF-SMEDDS 0.5 g，滴入 50 mL 纯化水（37 ℃）中，300 r/min 恒速磁力搅拌至乳化完全，采用激光粒度仪测定载药自微乳的平均粒径，用秒表记录自乳化时间；精密称取 LF-SMEDDS 0.1 g 于 10 mL 量瓶，加 37 ℃的纯化水定容至刻度，摇匀使之形成乳化液，于 10 000 r/min 高速离心 15 min，精密移取上清液适量，加入 70%乙醇稀释至适宜倍数，按“2.1”项下方法测定 LF-SMEDDS 的

载药量。

2.4.1 数学模型拟合及方差分析 运用 Design Expert 8.0 软件, 以 Y_1 、 Y_2 、 Y_3 为评价指标进行模型拟合, 得响应方程: $Y_1=202.578 A+23.271 B+42.646 C-4.558 AB-6.453 AC-1.379 BC+0.137 ABC$, $P<0.000 1$, $r=0.997 3$; $Y_2=152.048 A+17.419 B+31.746 C-3.398 AB-4.815 AC-0.992 BC+0.098 ABC$, $P<0.000 1$, $r=0.992 7$; $Y_3=51.323 A+4.272 B+6.089 C-1.055 AB-1.455 AC-0.181$

$BC+0.029 ABC$, $P<0.000 1$, $r=0.995 4$ 。

对上述回归模型进行方差分析, 见表 3。结果表明, 响应模型的 P 值均 $<0.000 1$, 远小于 0.05, 表明回归模型的水平非常显著; 响应模型失拟项的 P 值分别为 0.072 9、0.109 9、0.391 9, 均大于 0.05, 相对于纯误差水平不显著; 模型的回归方程系数 r 及校正决定系数 (r_{adj}) 均大于 0.95, 表明回归模型拟合良好, 具有代表性, 能客观准确地根据自变量的值预测最优处方^[15]。

表 3 处方优化方差分析

Table 3 Analysis of variance results for formulation optimization

方差来源	自由度	粒径			自乳化时间			载药量		
		平方和	F 值	P 值	平方和	F 值	P 值	平方和	F 值	P 值
模型	6	45 518.82	430.00	<0.000 1	3 783.30	163.44	<0.000 1	2 725.39	254.67	<0.000 1
AB	1	849.34	48.14	0.000 2	579.91	150.31	<0.000 1	134.23	75.26	<0.000 1
AC	1	216.68	12.28	0.009 9	260.59	67.54	<0.000 1	50.92	28.55	0.001 1
BC	1	0.19	0.01	0.920 8	1.10	0.29	0.609 7	32.83	18.41	0.003 6
ABC	1	231.45	13.12	0.008 5	105.43	27.33	0.001 2	10.55	5.91	0.045 3
残差	7	123.50			27.01			12.49		
失拟项	3	98.24	5.18	0.072 9	20.16	3.92	0.109 9	6.15	1.29	0.391 9
纯误差	4	25.26			6.85			6.34		
总离差	13	45 642.32			3 810.31			2 737.87		

2.4.2 效应面分析 根据回归模型, 绘制三维效应面图, 见图 2。由此可知, 肉桂油比例对平均粒径的影响最显著, 随着肉桂油比例的增加, 平均粒径增大; 随着 RH-40 比例的增加, 平均粒径逐渐减小; 而随着 1,2-丙二醇比例的增加, 平均粒径逐渐增大, 但变化幅度较小。处方中肉桂油与 RH-40 比例对自乳化时间的影响均较显著, 但肉桂油的影响更明显, 油相比例越大, 自乳化时间延长; 随着 RH-40 比例越大, 自乳化时间明显缩短; 而 1,2-丙二醇比例对自乳化时间的影响不太明显。

肉桂油比例对载药量的影响显著, 肉桂油比例

增加, 载药量明显增大; RH-40 比例增加, 载药量随之增大; 随着 1,2-丙二醇比例的增加, 载药量呈先增大后减小的趋势。

2.4.3 最优处方确定与验证 根据自微乳制剂的特点, 粒径越小, 比表面积越大, 药物溶出与吸收越快; 自乳化时间越短, 乳化效果越好; 载药量越高, 实际口服剂量越小, 更具有临床应用价值^[16]。综合 3 个指标, 通过软件预测得最优处方为肉桂油 10%、RH-40 54.71%、1,2-丙二醇 35.29%; 为便于实验操作, 将处方调整为肉桂油 10%、RH-40 55%、1,2-丙二醇 35%。根据预测的最优处方制备 3 批载药自

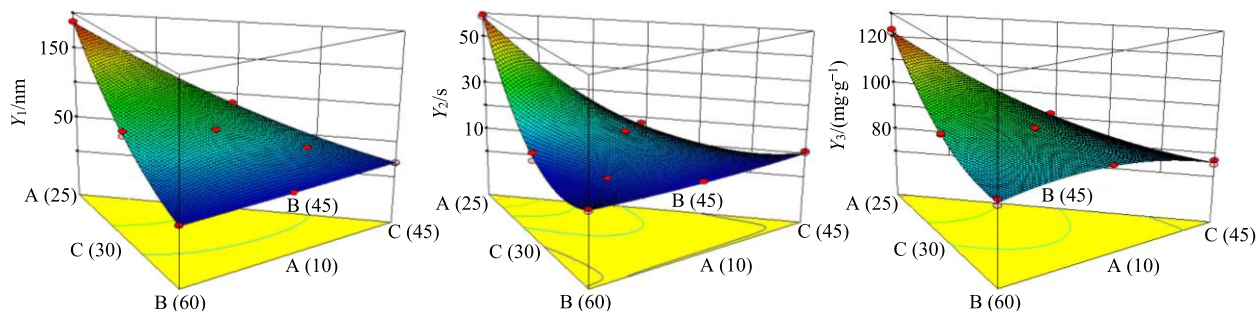


图 2 各因素对 LF-SMEDDS 处方影响的效应面

Fig. 2 Response surface plots of effect of factors on formulation of LF-SMEDDS

微乳,测定平均粒径、自乳化时间和载药量,并与预测值进行比较,见表 4。结果显示各指标与相应预测值的偏差绝对值均较小,说明建立的数学模型预测性良好。

表 4 处方优化的验证实验 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Verification test of optimal prescription ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

评价指标	预测值	实测值	偏差/%
平均粒径/nm	16.82	16.30±0.22	3.09
自乳化时间/s	9.43	9.69±0.19	-2.76
载药量/(mg·g ⁻¹)	86.60	86.03±0.37	0.66

2.4.4 处方药物加入量的确定 “2.4.3”项下最优自微乳处方对甘草黄酮的饱和载药量为 86.03 mg/g,实验中发现,当药物加入量超过 100 mg/g 时,加水稀释后的微乳液放置 24 h 有药物析出,可能是因为载药量过大时,自微乳体系不能形成稳定的界面膜,甘草黄酮结晶析出。因此,确定处方中甘草黄酮的加入量为 100 mg/g。

2.4.5 甘草黄酮自微乳的制备 精密称取肉桂油 1.0 g, RH-40 5.5 g, 1,2-丙二醇 3.5 g, 37 °C 下 200 r/min 磁力搅拌 15 min, 得空白自微乳。于空白自微乳中精密加入 1.0 g 甘草黄酮,混匀,超声 2 h 助溶,(37.0±0.5) °C 水浴静置 24 h, 以达到溶解平衡,得 LF-SMEDDS。

2.5 自微乳的质量评价

2.5.1 外观 甘草黄酮自微乳在低温(4 °C)存放时为红棕色黏稠油状液体;在室温(25 °C)存放时为流动性较好、透明的红棕色溶液。取 LF-SMEDDS 0.5 g, 加 100 倍量的纯化水(37 °C),形成的微乳液为流动性好、澄清透明的棕黄色溶液。

2.5.2 微观形态 取 LF-SMEDDS 0.5 g, 滴入 50 mL 纯化水(37 °C)中,温和磁力搅拌,形成棕黄色、澄清透明的甘草黄酮微乳液。取微乳液适量,滴在覆有支持膜的铜网上,静置 10 min 后用滤纸片吸取多余液体,再滴加 2%磷钨酸溶液,负染 5 min,自然挥干,于透射电镜下观察,结果 LF-SMEDDS 经稀释后的乳滴呈圆球形,乳滴之间无粘连,分布比较均匀,见图 3。

2.5.3 粒径分布与 Zeta 电位 取 LF-SMEDDS 适量,加 37 °C 纯化水稀释 100 倍,制得澄清透明的甘草黄酮微乳液。取微乳液适量,采用激光粒度分析仪测定空白自微乳和载药自微乳的平均粒径和 Zeta 电位,见表 5。结果表明,自微乳载药前后的

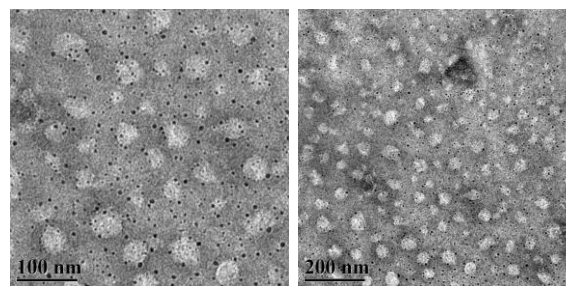


图 3 LF-SMEDDS 透射电镜图

Fig. 3 Transmission electron microscopy of LF-SMEDDS

表 5 优化处方的平均粒径和 Zeta 电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Mean particle size and Zeta potential of optimal formulation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

处方	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
空白自微乳	15.40±0.14	0.107±0.004	-13.48±0.78
载药自微乳	16.17±0.19	0.155±0.008	-20.11±0.50

粒径分布及 Zeta 电位绝对值相差不大,且分布较集中,说明甘草黄酮的加入对自微乳的粒径分布及 Zeta 电位无明显影响,乳液体系稳定性较好。

2.5.4 载药量和包封率 取 LF-SMEDDS 0.1 g (W_0),精密称定,置于 10 mL 棕色量瓶中,加 70%乙醇适量,超声助溶 5 min,冷却至室温,加 70%乙醇稀释至刻度,摇匀,精密量取上清液 0.1 mL,置于 10 mL 棕色量瓶中,加 70%乙醇稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下方法测定药物含量(W_1)。

取 LF-SMEDDS 0.1 g,精密称定,置于 10 mL 棕色量瓶中,加 37 °C 的纯化水定容至刻度,摇匀使之形成乳化液,取约 2 mL 置于离心管中 10 000 r/min 离心 15 min,精密量取上清液 0.1 mL,置于 10 mL 棕色量瓶中,加 70%乙醇适量,超声助溶 5 min,冷却至室温,加 70%乙醇稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下方法测定药物含量(W_2)。根据公式载药量= W_1/W_0 计算载药量为(85.55±0.40) mg/g,根据公式包封率= W_2/W_1 计算包封率为(97.52±0.13)%。结果表明,甘草黄酮的载药量和包封率均较高,基本满足临床用药需求。

2.6 体外溶出度评价^[17]

精密称取含 LF 43 mg 的原料药和自微乳,装于 0 号胶囊壳。取 LF-SMEDDS 硬胶囊 6 粒(0.5 g/粒,约含甘草黄酮 43 mg/粒),另取 6 粒自制的甘草黄酮原料药(LF,约含甘草黄酮 43 mg/粒),按《中国药典》2015 年版溶出度测定法第二法(桨法)进行测定,以 900 mL 水为溶出介质,设定转速为 100 r/min,水浴温度为(37.0±0.5) °C。分别于 5、10、

20、30、40、50、60 min 取样 4 mL, 同时补足等温等体积的溶出介质, 样品溶液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 按“2.1”项下方法测定甘草黄酮含量, 绘制溶出曲线, 见图 4。结果显示, LF-SMEDDS 在 30 min 时累积溶出率已达 90.65%, 而 LF 在 60 min 内累积溶出率小于 25%, 表明自微乳能有效提高甘草黄酮在水中的溶出度。

2.7 甘草黄酮自微乳稳定性研究

2.7.1 高速离心实验 取 LF-SMEDDS 适量, 于 300

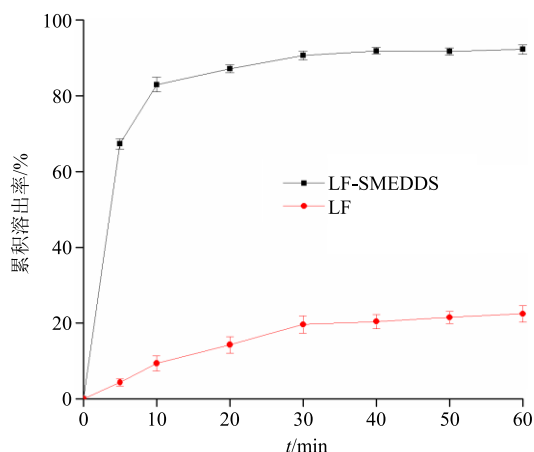


图 4 LF-SMEDDS 及 LF 的溶出曲线 ($n=3$)

Fig. 4 Dissolution curves of LF-SMEDDS and LF ($n=3$)

r/min 恒速磁力搅拌加水乳化后形成甘草黄酮微乳液。取该微乳液 2 mL, 10 000 r/min 高速离心 15 min, 观察乳液是否分层。结果表明甘草黄酮微乳液经高速离心后仍澄清透明, 无药物析出及油水分层现象。

2.7.2 强光照实验 分别取 LF-SMEDDS 0.5 g、乳化后的微乳液适量, 置于常温 (25 $^{\circ}\text{C}$)、强光照 (4 500 $\pm$ 500) lx 条件下保存, 分别于第 0、5、10 天考察外观性状, 测定甘草黄酮的药物含量, 结果见表 6。由此可知, 放置 10 d 后自微乳及其微乳液均澄清透明, 乳滴粒径及自乳化时间无明显变化, 而药物含量下降 4.16%, 提示 LF-SMEDDS 应避免光保存。

2.7.3 温度对自微乳稳定性的影响 分别取 LF-SMEDDS 0.5 g、乳化后的微乳液适量, 分别置于 4、25、60 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 于第 0、5、10 天考察外观性状, 测定甘草黄酮的药物质量分数, 结果见表 7。由此可知, 低温 (4 $^{\circ}\text{C}$) 和常温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 避光放置 10 d 后, 自微乳及其微乳液均澄清透明, 药物含量、乳滴粒径、自乳化时间均无明显变化; 而高温 (60 $^{\circ}\text{C}$) 对自微乳稳定性的影响显著, 放置 5 d 和 10 d 后, 药物含量明显下降, 分别下降了 38.34% 和 54.74%, 自微乳由红棕色变成深棕色, 且粒径逐渐

表 6 LF-SMEDDS 强光照条件下的稳定性 ($n=3$)

Table 6 Stability of LF-SMEDDS under intense illumination condition ($n=3$)

光照时间/d	自微乳外观	微乳液外观	药物质量分数/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	相对质量 分数/%	RSD/%	粒径/nm	自乳化时间/s
0	红棕色, 透明油状	棕黄色, 澄清透明	85.85	100.00	1.91	16.35 $\pm$ 0.25	9.63 $\pm$ 0.27
5	红棕色, 透明油状	棕黄色, 澄清透明	84.66	98.61	0.98	16.29 $\pm$ 0.21	9.55 $\pm$ 0.26
10	红棕色, 透明油状	棕黄色, 澄清透明	82.28	95.84	1.02	16.62 $\pm$ 0.23	9.46 $\pm$ 0.19

表 7 温度对 LF-SMEDDS 稳定性的影响 ($n=3$)

Table 7 Influence of temperature on stability of LF-SMEDDS ($n=3$)

温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间/d	自微乳外观	微乳液外观	药物质量分 数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	相对质量 分数/%	RSD/%	粒径/nm	自乳 化 时 间/s
4	0	红棕色, 透明油状	棕黄色, 澄清透明	86.24	100.00	0.58	16.47 $\pm$ 0.19	9.19 $\pm$ 0.18
4	5	红棕色, 透明油状	棕黄色, 澄清透明	84.60	98.10	1.03	16.73 $\pm$ 0.29	9.70 $\pm$ 0.28
4	10	红棕色, 透明油状	棕黄色, 澄清透明	83.69	97.04	0.79	16.53 $\pm$ 0.25	9.53 $\pm$ 0.18
25	0	红棕色, 透明油状	棕黄色, 澄清透明	85.88	100.00	0.50	16.23 $\pm$ 0.26	9.66 $\pm$ 0.27
25	5	红棕色, 透明油状	棕黄色, 澄清透明	85.85	99.96	0.93	16.10 $\pm$ 0.22	9.91 $\pm$ 0.31
25	10	红棕色, 透明油状	棕黄色, 澄清透明	84.82	98.76	0.86	16.17 $\pm$ 0.25	9.58 $\pm$ 0.10
60	0	红棕色, 透明油状	棕黄色, 澄清透明	85.23	100.00	0.55	16.33 $\pm$ 0.20	9.40 $\pm$ 0.22
60	5	深棕色, 药物析出	棕色, 澄清透明	52.55	61.66	1.22	28.43 $\pm$ 0.38	24.63 $\pm$ 0.39
60	10	深棕色, 药物析出	深棕色, 澄清透明	38.58	45.26	1.68	78.10 $\pm$ 0.43	53.87 $\pm$ 0.58

增大, 自乳化性能降低。因此, LF-SMEDDS 应低温避光保存。

3 讨论

甘草中的黄酮类化合物主要以二氢黄酮为主, 根据二氢黄酮在碱性条件下转变为查尔酮的性质, 本实验以甘草苷为对照品, 建立紫外分光光度法对甘草黄酮进行含量测定, 与测定单一成分含量的 HPLC 法相比, 该方法简单、省时、成本低, 可很好地反映大类成分的生理活性。本实验采用单纯形网格法对 LF-SMEDDS 处方进行优化, 与常用的正交设计及星点设计-效应面法相比, 该方法实验次数少、操作简单、预测性良好, 通过组分间量的相互约束来影响指标, 在确定处方组成的响应面和最佳区域方面有独特优势, 尤其适用于各组分总量恒定的实验^[18]。

SMEDDS 处方优化的关键在于选择合适的油相、乳化剂与助乳化剂, 其中, 油相的种类直接影响自微乳的乳化效果, 乳化剂的种类及用量主要影响乳滴的粒径, 进而影响自微乳的稳定性, 而助乳化剂则主要起增溶药物、调节亲水亲油平衡值 (HLB) 的作用, 并与乳化剂形成复合界面膜, 促进微乳形成并增加其稳定性^[19]。本实验发现, 天然植物油蓖麻油的自乳化效果最差, 主要是由于蓖麻油的黏度较大, 不利于乳化过程的发生, 所得乳滴的粒径较大, 形成的自微乳物理稳定性也较差^[20]; 油相乳化剂配伍实验表明, 肉桂油的自乳化效果最佳, 与 4 种乳化剂配伍均能形成 A 级微乳。其原因在于: 肉桂油的主要成分桂皮醛相对分子质量较小, 能更容易地嵌入乳化剂中, 增溶能力优于大分子油相, 更容易被机体吸收^[21]; 甘草黄酮在肉桂油中的溶解度最高, 可有效提高主药的溶解度, 增加微乳区域。同时, 甘草黄酮与桂皮醛的药理活性有很大程度的相似性, 在糖尿病、肝病、肿瘤等疾病的治疗中有潜在的协同效应^[3,22], 且肉桂油为中药挥发油, 代替合成油相应用于自微乳中, 可大大提高其安全性。

乳化剂的选择主要以毒性低及乳化效果好为原则, 高 HLB 值的乳化剂可促进 O/W 型微乳的形成及其在水相中的扩散, 且毒性较低, 故一般采用高 HLB 值的乳化剂^[23]。本实验筛选所得的乳化剂 RH-40, HLB 值较高 (14.7), 其可以抑制肠细胞色素 P450 对药物的催化或 P-糖蛋白 (P-gp) 对药物的外排作用, 进而促进药物的吸收, 提高药物的生物利用度^[24]。本实验筛选的助乳化剂 1,2-丙二醇,

已广泛应用于食品、医药、化妆品等领域, 具有安全性高、稳定性好、价格低廉等优点, 且甘草黄酮在其中的溶解度最高, 故选择其作为助乳化剂对提高处方载药量及保证口服安全性有重要意义。

自微乳的初步稳定性常通过高速离心、强光照与温度实验进行表征。高速离心实验表明, LF-SMEDDS 的物理稳定性良好; 强光照实验表明, 光照会影响 LF-SMEDDS 的稳定性, 使药物含量有所下降; 温度影响实验表明高温显著影响 LF-SMEDDS 的稳定性, 放置 5 d 后自微乳颜色开始加深, 粒径有增大现象, 药物含量明显下降, 可能是由于温度升高, 药物的氧化速率加快, 甘草黄酮大部分被氧化。因此, 自微乳不能提高甘草黄酮的光热稳定性, 应低温避光保存。本研究采用单纯形网格法制备出粒径小、载药量高、质量稳定的 LF-SMEDDS, 后续将从其固化、药效及临床应用等方面进行深入研究。

参考文献

- [1] Yang R, Wang L Q, Liu Y. Antitumor activities of widely-used Chinese herb—Licorice [J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6(4): 274-281.
- [2] Liu D Y, Guo Z H, Zhang J, *et al*. Anti-inflammatory and anti-oxidant effects of licorice flavonoids on ulcerative colitis in mouse model [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(4): 358-368.
- [3] Guo Z, Niu X, Xiao T, *et al*. Chemical profile and inhibition of α -glycosidase and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) activities by flavonoids from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) [J]. *J Funct Foods*, 2015, 14: 324-336.
- [4] Xiao W H, Dong Y B L, Li G, *et al*. Flavonoids extracted from licorice prevents colitis-associated carcinogenesis in AOM/DSS mouse model [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(9): 1343-1357.
- [5] Toshio F, Ai M, Kiyoshi K, *et al*. Anti-helicobacter pylori flavonoids from licorice extract [J]. *Life Sci*, 2002, 71(12): 1449-1463.
- [6] Luo Z H, Guo Z, Xiao T, *et al*. Enrichment of total flavones and licochalcone A from licorice residues and its hypoglycemic activity [J]. *J Chromatogr B*, 2019, 1114/1115(1): 1-45.
- [7] 张明发, 沈雅琴. 甘草酸类和甘草黄酮类化合物对心脏保护作用的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2012, 27(4): 429-434.
- [8] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其有效成分抗脂肪肝和抗肥胖的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(4):

- 439-447.
- [9] 孙 芸, 江 钰, 单丽娟, 等. 甘草黄酮脂质体的制备及理化性质考察 [J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 55-58.
- [10] 刘 圣, 谢 军, 陈象青, 等. 反射线直角单纯形法优化甘草黄酮阿魏酸乳膏配方 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4): 449-452.
- [11] 孙芸, 燕雪花, 葛 亮, 等. 甘草黄酮- β -环糊精包合工艺优化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 30-32.
- [12] 卢秀霞, 何 琳, 陈锦娜, 等. 丹参酮 II_A 口服自微乳的制备及其体外溶出度评价 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3256-3265.
- [13] 刘 丹, 张 露, 张振海, 等. 银杏黄酮组分自微乳-微丸释药系统的构建 [J]. 中草药, 2017, 48(16): 3377-3383.
- [14] 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.
- [15] 李秋萍, 戴俊东, 翟文文, 等. 单纯形网格法优化设计姜黄素-胡椒碱复方自微乳制剂处方 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 3936-3944.
- [16] 杨 露, 李小芳, 罗 佳, 等. 单纯形网格法优选柿叶总黄酮自微乳处方 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 13-17.
- [17] 刘 丹, 田 燕, 张振海, 等. 银杏内酯组分自微乳释药系统的制备及各成分溶出行为相似度分析 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3798-3804.
- [18] 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.
- [19] 张久严. 蟾酥自微乳给药系统的研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2010.
- [20] Date A A, Desai N, Dixit R, *et al.* Self-nanoemulsifying drug delivery systems: Formulation insights, applications and advances [J]. *Nanomedicine*, 2010, 5(10): 1595-1616.
- [21] 马祖兵, 李小芳, 谢 龙, 等. 大黄素-桂皮醛自微乳的制备及体外评价 [J]. 中成药, 2019, 41(1): 1-7.
- [22] 张利青, 张占刚, 付 岩, 等. 桂皮醛药理作用的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(23): 4568-4572.
- [23] Kallakunta V R, Bandari S, Jukanti R, *et al.* Oral self emulsifying powder of lercanidipine hydrochloride: Formulation and evaluation [J]. *Powder Technol*, 2012, 221: 375-382.
- [24] Rao Z, Si L, Guan Y, *et al.* Inhibitive effect of cremophor RH40 or Tween 80-based self-microemulsifying drug delivery system on cytochrome P450 3A enzymes in murine hepatocytes [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol*, 2010, 30(5): 562-568.