

• 药剂与工艺 •

黄连-干姜有效组分自微乳给药系统的制备与评价

李鑫¹, 余玲², 刘葭¹, 梅凯¹, 李婷婷¹, 郝逗逗¹, 王昕怡¹, 王灵敏¹, 吴清^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 江西医学高等专科学校, 江西 上饶 334000

摘要: 目的 研究黄连-干姜有效组分自微乳给药系统 (*Coptidis Rhizoma-Zingiberis Rhizoma* effective component self-microemulsion drug delivery system, Cop-Gin-SMEDDS) 的处方与制备工艺, 并且进行体外质量评价。方法 通过溶解度实验、伪三元相图的绘制和 D-最优混料设计确定 Cop-Gin-SMEDDS 的最佳处方组成; 通过单因素考察, 确定最佳制备工艺, 并对 Cop-Gin-SMEDDS 理化性质、稳定性、体外释放等进行评价。结果 最终确定 Cop-Gin-SMEDDS 的最优处方 (不含黄连总生物碱) 为油酸 5%, 1,2-丙二醇 41%, 聚氧乙烯 (40) 氢化蓖麻油 49%, 干姜油 5%; 黄连总生物碱的投药量为 5%; 最佳制备工艺为在 37 °C、转速 300 r/min 条件下磁力搅拌 10 min。得到的 Cop-Gin-SMEDDS 为深红色澄清透明液体, 稀释后为黄色、均一透明的微乳溶液; 透射电镜下为圆球形, 大小均匀, 形态规则; 平均粒径大小为 (22.21±0.45) nm、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.195±0.019、ζ 电位为 (-2.67±0.11) mV。Cop-Gin-SMEDDS 中盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、表小檗碱及 6-姜辣素的载药量分别为 (13.51±0.71)、(1.37±0.06)、(2.36±0.27)、(0.83±0.14)、(6.34±0.04) mg/g, 包封率分别为 (96.36±0.34)%、(95.49±0.59)%、(92.56±0.81)%、(95.17±0.39)%、(94.39±1.63)%。Cop-Gin-SMEDDS 中盐酸小檗碱在 pH 7.4 PBS 缓冲液、蒸馏水和 pH 1.2 盐酸溶液中的 24 h 累积释放率分别为 (70.80±0.04)%、(96.17±0.10)%、(85.77±0.10)%; 6-姜辣素在相应释放介质中的 24 h 累积释放率分别为 (27.70±0.14)%、(32.48±0.14)%、(32.96±0.07)%。稳定性实验显示, 将 Cop-Gin-SMEDDS 在不同温度下放置 30 d 后其指标成分及外观性状均无明显变化。结论 制备的 Cop-Gin-SMEDDS 外观良好, 载药量和包封率高, 能提高药物的稳定性和释放量, 有望进一步开发制备成口服给药制剂。

关键词: 干姜油; 黄连总生物碱; 自微乳给药系统; 伪三元相图; D-最优混料设计; 黄连; 干姜; 盐酸小檗碱; 盐酸巴马汀; 盐酸黄连碱; 表小檗碱; 6-姜辣素

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)01-0051-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.01.008

Preparation and evaluation of self-microemulsion drug delivery system for effective components of *Coptidis Rhizoma-Zingiberis Rhizoma*

LI Xin¹, YU Ling², LIU Jia¹, MEI Kai¹, LI Ting-ting¹, HAO Dou-dou¹, WANG Xin-yi¹, WANG Ling-min¹, WU Qing¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Jiangxi Medical College, Shangrao 334000, China

Abstract: Objective To study the formulation and preparation technology of self-microemulsion drug delivery system of effective components of Huanglian (*Coptidis Rhizoma*)-Ganjiang (*Zingiberis Rhizoma*) (Cop-Gin-SMEDDS), and evaluate it. **Methods** The best prescription composition of Cop-Gin-SMEDDS was determined by solubility experiment, pseudo ternary phase diagram drawing and D-optimal mixture design. Through single factor investigation, the optimal preparation process was determined, and the physicochemical properties, stability and *in vitro* release of Cop-Gin-SMEDDS were evaluated. **Results** The optimal prescription

收稿日期: 2022-06-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81773915)

作者简介: 李鑫 (1997—), 男, 硕士研究生, 从事中药新剂型的研究。Tel: 17354008830 E-mail: xinzhizhu54946@163.com

*通信作者: 吴清 (1965—), 女, 博士生导师, 教授, 从事中药新剂型与新技术的研究。Tel: (010)84738603 E-mail: qwu@vip.sina.com

of Cop-Gin-SMEDDS (excluding total alkaloids of *Coptidis Rhizoma*) was oleic acid 5%, 1,2-propanediol 41%, polyoxyethylene (40) hydrogenated castor oil 49%, dried ginger oil 5%. The dosage of coptis alkaloids was 5%. The optimum preparation process was magnetic stirring at 37 °C and 300 r/min for 10 min. The obtained Cop-Gin-SMEDDS was a dark red clear and transparent concentrate, and after dilution, it was a yellow, homogeneous and transparent microemulsion solution. Under transmission electron microscope, it was round and spherical, with uniform size and regular shape. The average particle size was (22.21 ± 0.45) nm, PDI was 0.195 ± 0.019 , and ζ potential was (-2.67 ± 0.11) mV. The drug loading of berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride, coptisine hydrochloride, epiberberine and 6-gingerol in Cop-Gin-SMEDDS were (13.51 ± 0.71) , (1.37 ± 0.06) , (2.36 ± 0.27) , (0.83 ± 0.14) and (6.34 ± 0.04) mg/g, respectively. The encapsulation efficiency were $(96.36 \pm 0.34)\%$, $(95.49 \pm 0.59)\%$, $(92.56 \pm 0.81)\%$, $(95.17 \pm 0.39)\%$ and $(94.39 \pm 1.63)\%$, respectively. The 24 h cumulative release rates of berberine hydrochloride in Cop-Gin-SMEDDS in pH 7.4 PBS buffer, water and pH 1.2 hydrochloric acid solution were $(70.80 \pm 0.04)\%$, $(96.17 \pm 0.10)\%$, and $(85.77 \pm 0.10)\%$, respectively; the 6-gingerol in corresponding release media were $(27.7 \pm 0.14)\%$, $(32.48 \pm 0.14)\%$ and $(32.96 \pm 0.07)\%$, respectively. The stability experiment showed that there was no significant change in the index components and appearance properties of cop-gin-SMEDDS after it was placed at different temperatures for 30 d. **Conclusion** The prepared Cop-Gin-SMEDDS has good appearance, high drug loading and encapsulation efficiency. It can improve the stability and release of drugs. It is expected to be further developed into oral drug delivery preparations.

Key words: dried ginger oil; total alkaloids of *Coptidis Rhizoma*; self-microemulsion drug delivery system; pseudo ternary phase diagram; D-optimal mixture design; *Coptidis Rhizoma*; *Zingiberis Rhizoma*; berberine hydrochloride; palmatine hydrochloride; coptisine hydrochloride; epiberberine; 6-gingerol

黄连-干姜药对最早出自于张仲景《伤寒论》，黄连苦寒清热、厚肠止利，干姜辛温散寒、温中止泻，二药合用，一寒一热，辛开苦降，多用于治疗痢疾、泄泻等病^[1]。现代研究表明，黄连中的黄连总生物碱^[2-3]和干姜中的姜辣素与挥发油^[4]均具有抗炎、抗氧化等作用^[5-12]，这些成分联合使用时能明显增强溃疡性结肠炎等疾病的治疗效果^[13]。然而黄连总生物碱和干姜油均具有水溶性差的特点，并且干姜中姜酚类、挥发油类成分性质不稳定，会导致局部药物浓度低，影响其药效作用发挥^[14-17]。因此，改善黄连总生物碱和干姜油的溶解度，提高姜辣素类、挥发油类成分的稳定性，对于这两种有效组分联合使用具有重要意义。但查阅文献发现，目前关于这2种有效成分的增溶增稳方面的研究较少。

自微乳给药系统 (self-microemulsion drug delivery system, SMEDDS)^[18-19]是由表面活性剂、助表面活性剂和油组成的均匀混合体系。有研究报告，用中药挥发油作为油相制备的自微乳包裹难溶性药物，不仅能提高药物的溶解度和挥发油的稳定性，而且还能提升药物的生物利用度^[20]。因此，本研究根据自微乳给药系统的性质特点，结合“药辅合一”的原则，首次将干姜油作为油相，与黄连总生物碱共载于同一体系中，制备黄连-干姜有效组分自微乳给药系统 (*Coptidis Rhizoma-Zingiberis Rhizoma* effective component self-microemulsion drug delivery system, Cop-Gin-SMEDDS)，以期实

现提高黄连总生物碱和干姜油的溶解度和稳定性的目的，为未来二者的联合用药提供参考。

1 材料

LC-10AD 型高效液相色谱仪、SPD1020A 检测器，日本岛津国际贸易有限公司；756PC 型紫外可见分光光度计，上海舜宇恒平科学仪器有限公司；BT125D 型电子天平，北京赛多利斯科学仪器有限公司；ZNCL-S-5D 多点智能磁力搅拌器，河南爱博特科技发展有限公司；G16 型医用高速离心机，河北安新白洋离心机厂；Zetasize Nano ZS 纳米粒径仪，英国马尔文公司；JEM-1400 plus 型透射式电子显微镜 (TEM)，日本 JEOL 公司。

黄连总生物碱提取物，批号 20200915，盐酸小檗碱质量分数 22.39%，盐酸巴马汀质量分数 5.69%，盐酸黄连碱质量分数 6.32%，表小檗碱质量分数 3.64%，实验室自制；干姜油提取物，6-姜辣素质量分数 13.52%，批号 GON1010L20-2020041701，湖南和广生物科技有限公司；对照品盐酸小檗碱，质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 S13M9D55861，上海源叶生物科技有限公司；6-姜辣素，批号 MUST-16122205，质量分数 99.65%，成都曼斯特生物科技有限公司；蓖麻油，批号 Z24O11Y128870，上海源叶生物科技有限公司；油酸，批号 C10005653，上海麦克林生物科技有限公司；聚氧乙烯 (40) 氢化蓖麻油 (Cremophor RH40, RH40)，批号 2822716860，北京凤礼精求商贸有限公司；辛酸癸酸聚乙二醇甘油

酯 (Labrasol, 批号 175459)、二乙二醇单乙基醚 (Transcutol P, 批号 159651), 法国 Gattefosse 公司; 1,2-丙二醇 (1,2-propanediol, PG), 批号 20200427, 天津福晨化学试剂有限公司; 异丙醇, 批号 20180614, 北京化工厂; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 黄连总生物碱饱和溶解度的测定

2.1.1 测定波长的确定 称取适量盐酸小檗碱、黄连总生物碱提取物、干姜油及其他辅料分别用甲醇溶解, 以甲醇为空白对照溶液, 采用紫外可见分光光度计设定波长 200~800 nm, 扫描间隔为 1 nm, 对盐酸小檗碱溶液、黄连总生物碱溶液及各辅料溶液进行吸收波长扫描。结果 (图 1) 显示, 对照品和供试品峰形基本一致, 虽然在 350 nm 和 425 nm 处都有较大吸收, 但部分辅料在 350 nm 处有干扰, 因此确定测定波长为 425 nm。

2.1.2 线性关系考察 精密称定适量盐酸小檗碱对照品, 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀后滤过, 得 492.9 μg/mL 盐酸小檗碱对照品溶液。精密吸取盐酸小檗碱对照品溶液各 0.05、0.10、0.30、

0.50、1.00、1.50、2.00 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 以甲醇为空白对照, 测定吸光度 (A)。以盐酸小檗碱对照品质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得盐酸小檗碱的回归方程为 $Y=0.0138X+0.0014$, $r=1.0000$ 。结果表明, 盐酸小檗碱在 2.47~98.98 μg/mL 线性关系良好。

2.1.3 黄连总生物碱在各项中饱和溶解度的测定 依次精密移取各油相、表面活性剂、助表面活性剂 2 mL 至离心管中, 分别向其中加入黄连总生物碱提取物, 涡旋 5 min, 超声 20 min, 并在 37 °C 水浴中振荡 48 h, 平衡后的样品在离心半径 5.7 cm 的离心机中以 10 000 r/min 离心 30 min, 取适量上层辅料用甲醇稀释, 测量其 A 值, 并按照“2.1.2”项下建立的方法计算黄连总生物碱饱和溶解度。由表 1 可知, 油酸对黄连总生物碱溶解性最好; 表面活性剂中 Labrasol、RH40 对黄连总生物碱溶解度较高; 助表面活性剂中 PG 对黄连总生物碱的溶解度远远大于其他助表面活性剂。

2.2 伪三元相图筛选各相用量范围

通过考察各辅料之间的相容性确定表面活性剂为 RH40、助表面活性剂为 PG, 结合课题组前期均匀设计实验结果和投药量预实验, 确定油相为干姜油-油酸 (1:1)。取筛选后确定的油相、表面活性剂和助表面活性剂配成系列不同比例 (1:1:8、1:2:7、1:3:6、...、8:1:1) 的混合辅料, 共 36 组, 处方总量固定为 1 g。磁力搅拌混匀后加入 37 °C、100 mL 蒸馏水中, 设定转速为 200 r/min 继续磁力搅拌, 观察能否形成澄清透明并带有少许蓝色乳光的溶液, 记录能形成该溶液的比例。使用 Origin 8.0 软件绘制伪三元相图, 用于确定各相辅料用量范围。将能形成符合要求的溶液的比例记录并绘制伪三元相图, 结果如图 2 所示。其中, 灰色区域代表可形成自微乳的区域, 在此范围内自微乳乳

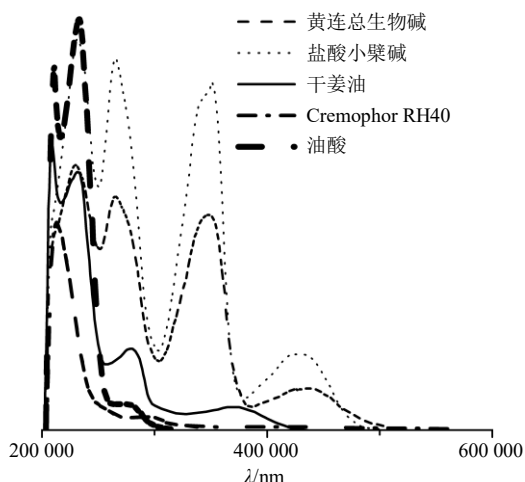


图 1 紫外-可见吸收光谱图

Fig. 1 Ultraviolet-visible absorption spectrum

表 1 黄连总生物碱在不同辅料中饱和溶解时的溶解度 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Solubility of total alkaloids of *Coptis chinensis* in saturated dissolution in different excipients ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

油相	溶解度/(mg·mL ⁻¹)	表面活性剂	溶解度/(mg·mL ⁻¹)	助表面活性剂	溶解度/(mg·mL ⁻¹)
蓖麻油	0.224±0.003	聚山梨酯 80	0.513±0.044	PG	20.877±2.565
油酸	1.029±0.019	司盘 80	0.506±0.052	丙三醇	5.804±2.411
油酸乙酯	0.028±0.005	聚氧乙烯蓖麻油 EL	0.583±0.042	聚乙二醇 400	3.981±0.526
肉豆蔻酸异丙酯	0.024±0.002	RH40	1.555±0.095	无水乙醇	3.848±0.385
中链甘油三酸酯	0.046±0.017	Labrasol	2.411±0.476	异丙醇	0.439±0.062
干姜油	-			二乙二醇单乙基醚	5.158±0.289

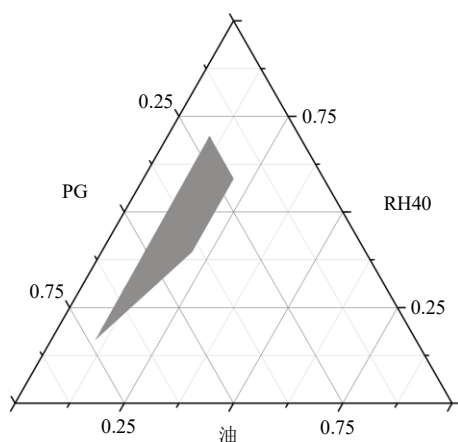


图 2 自微乳处方的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo ternary phase diagram of self-microemulsion formulation

化迅速，没有分层现象，乳化时间小于 1 min，且能产生丁达尔效应。初步确定自微乳处方辅料用量范围（以质量计）为 10%~20% 的干姜油-油酸（1：1）、20%~70% RH40 和 20%~70% PG。

2.3 D-最优混料设计优化自微乳处方

2.3.1 D-最优混料设计 参考伪三元相图的结果，将油相、表面活性剂、助表面活性剂的总量定为 100%，用 Design Expert 11.1 软件设计 D-最优混料设计的比例，根据该设计比例制备自微乳。固定黄连总生物碱提取物投药量为 5%，制备温度为 37 °C，搅拌转速为 200 r/min，搅拌 5 min 后于 37 °C 条件下用 50 倍量蒸馏水稀释自微乳，温和搅拌乳化后考察微乳的粒径、PDI 及乳化时间，确定最优处方比例。设计的比例及考察结果见表 2。

2.3.2 数据模型拟合及响应面分析 运用 Design Expert 11.1 软件，以油相用量 (x_1)、表面活性剂 RH40 用量 (x_2)、助表面活性剂 PG 用量 (x_3) 为影响因素，分别以粒径 (Y_1)、PDI (Y_2)、乳化时间 (Y_3) 为评价指标，对实验结果进行模型拟合，回归分析结果见表 3。模型 $P < 0.05$ ，表明该模型对于所有响应参数都是显著的。

结果表明自变量对粒径、PDI、乳化时间都有显著影响，粒径最优拟合符合特殊四次模型 (special

表 2 D-最优混料设计及结果

Table 2 D-optimal mixture design and results

实验号	$x_1/\%$	$x_2/\%$	$x_3/\%$	Y_1/nm	Y_2	Y_3/min
1	20	60	20	21.23	0.131	7.355
2	17.5	31.25	51.25	92.15	0.358	1.187
3	20	20	60	118.30	0.147	0.329
4	12.5	56.25	31.25	35.56	0.432	1.715
5	10	20	70	89.32	0.251	0.393
6	15	20	65	101.30	0.234	0.715
7	10	45	45	23.29	0.216	0.605
8	20	20	60	117.10	0.152	0.334
9	10	45	45	23.51	0.214	1.928
10	20	60	20	21.12	0.130	8.001
11	10	20	70	97.04	0.346	0.390
12	10	70	20	25.39	0.319	8.907
13	15	65	20	47.16	0.359	7.501
14	10	70	20	25.32	0.312	9.501
15	15	42.50	42.50	45.47	0.413	1.915
16	12.5	31.25	56.25	72.07	0.363	1.142

quartic model)，PDI、乳化时间的最优拟合符合立方模型 (cubic model)。方程中的各变量系数为正值，表示因子与响应值呈正相关，而负值表示负相关。其中拟合方程分别为 $Y_1 = -753.20 x_1 + 28.88 x_2 + 90.14 x_3 + 950.51 x_1 x_2 + 1 205.90 x_1 x_3 - 140.55 x_2 x_3 + 694.84 x_1^2 x_2 x_3 - 571.41 x_1 x_2^2 x_3 + 1 060.31 x_1 x_2 x_3^2$ ， $R^2 = 0.974 1$ ； $Y_2 = 78.75 x_1 + 0.316 9 x_2 + 0.298 6 x_3 - 136.78 x_1 x_2 - 132.30 x_1 x_3 - 0.369 7 x_2 x_3 + 128.66 x_1 x_2 x_3 - 62.63 x_1 x_2 (x_1 - x_2) - 55.53 x_1 x_3 (x_1 - x_3) + 0.011 5 x_2 x_3 (x_2 - x_3)$ ， $R^2 = 0.965 4$ ； $Y_3 = -667.97 x_1 + 9.16 x_2 + 0.388 2 x_3 + 1 146.81 x_1 x_2 + 1 100.93 x_1 x_3 - 14.07 x_2 x_3 - 962.95 x_1 x_2 x_3 + 516.07 x_1 x_2 (x_1 - x_2) + 443.70 x_1 x_3 (x_1 - x_3) - 18.26 x_2 x_3 (x_2 - x_3)$ ， $R^2 = 0.988 1$ 。

根据回归分析结果，分别得到各自变量与粒径、PDI 及乳化时间作为因变量的二维等高线和三维响应图，结果如图 3 所示。由结果可知，表面活性剂和助表面活性剂的用量对自微乳成型的影响较大，

表 3 粒径、PDI 及乳化时间模型拟合汇总

Table 3 Summary of model fitting of particle size, PDI and emulsification time

因变量	模型	平方和	自由度	F 值	P 值	标准偏差	平均值	R^2
Y_1	特殊四次模型	2 537.87	8	32.94	<0.000 1	8.78	59.71	0.974 1
Y_2	立方模型	0.02	9	18.61	0.001 0	0.03	0.273 6	0.965 4
Y_3	立方模型	20.85	9	55.32	<0.000 1	0.61	3.24	0.988 1

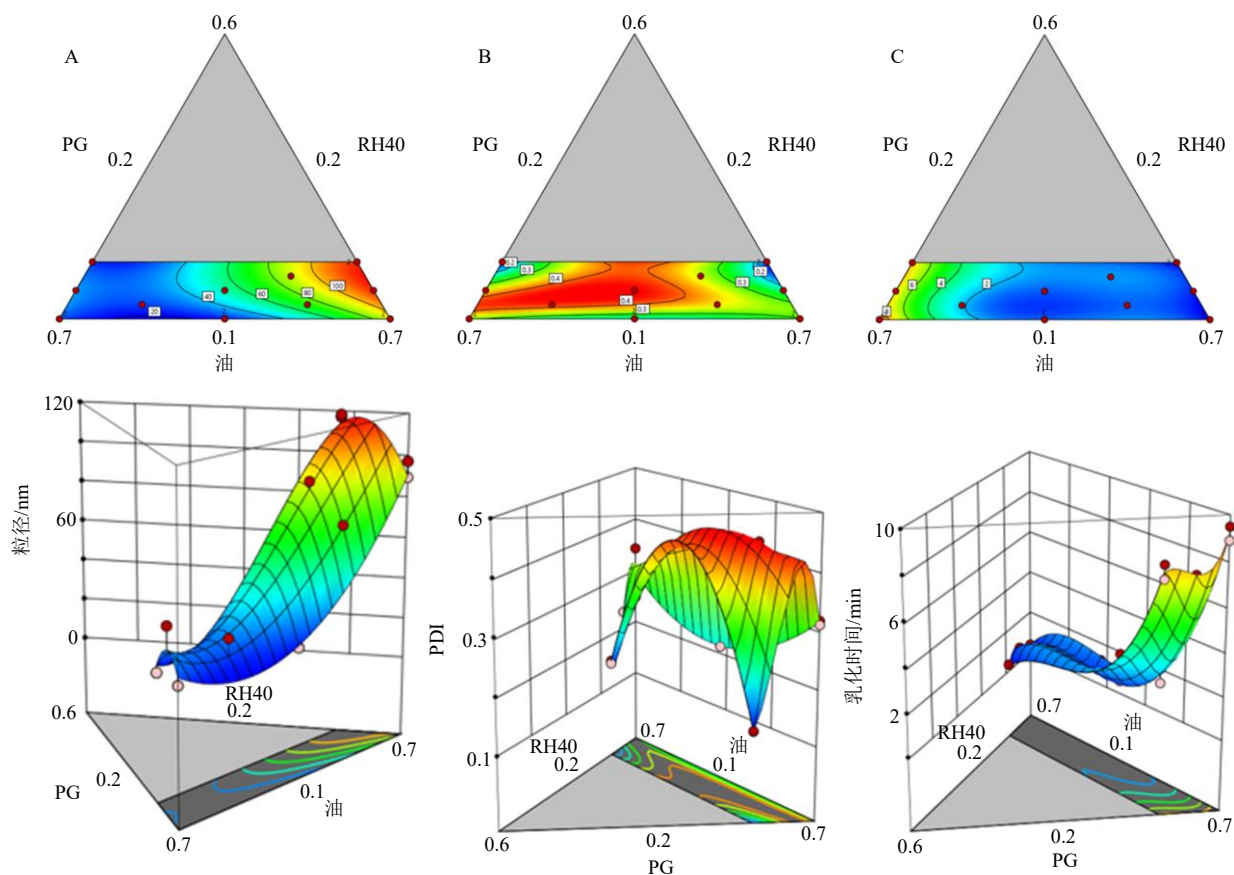


图3 粒径 (A)、PDI (B) 和乳化时间 (C) 的二维等高线图及三维响应面

Fig. 3 Two dimensional contour map and three-dimensional response surface of particle size (A), PDI (B) and emulsification time (C)

乳化效率随着表面活性剂含量增大而下降, 适量的助表面活性剂有助于调节自微乳自乳化效率。因此, 适宜的用量是保证乳化效率和粒径大小的关键。

2.3.3 最优处方及验证试验 运用 Design Expert 11.1 软件预测得到的最优处方为油相 10.0%、表面活性剂 49.0%、助表面活性剂 41.0%, 预测所得微乳粒径为 23.080 nm, PDI 为 0.229, 乳化时间为 1.215 min。按照预测所得优化处方进行验证, 重复 3 次, 并计算偏差。结果如表 4 所示, 指标的预测值与实际值之间的偏差均小于 5%, 说明方程预测准确性良好。因此, 得到最优自微乳处方: 油相为干姜油-油酸 (1:1) 10.0%、表面活性剂为 RH40 49.0%、

表 4 D-最优混料试验设计的验证 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

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

指标	预测值	实际值	偏差/%
粒径/nm	20.341	19.89±0.21	-2.21
PDI	0.220	0.220±0.007	0
乳化时间/min	1.215	1.175±0.020	-3.29

助表面活性剂为 PG 41.0%。

2.4 自微乳投药量的考察

选择投药量分别为 1%、3%、5%、6%、9%、10%、12%、15% 的自微乳进行投药量的考察。根据 D-最优混料设计得到的最优处方精密称取各辅料, 共计 3 g, 将黄连总生物碱提取物加入助表面活性剂中, 经磁力搅拌、超声助溶溶解后搅拌均匀, 加入表面活性剂和油相, 制备得不同投药量自微乳。分别取不同投药量自微乳 1 g, 以 37 °C 蒸馏水稀释 50 倍后得到不同载药量的微乳, 使用粒度仪测其粒径、PDI, 以 10 000 r/min 离心 (离心半径 5.7 cm) 30 min 测量其离心稳定性。

不同投药量的粒径和 PDI 结果如表 5 所示, 随着载药的增加, 自微乳乳化后其微乳粒径、PDI 逐渐增大; 当投药量 ≥ 10% 时, PDI 大于 0.3, 提示投药量 ≥ 10% 的自微乳放置后可能出现不稳定、粒径增大的现象。离心稳定性实验结果显示, 不同投药量的微乳溶液离心后均未出现相分离, 外观仍呈现澄清、透明, 但投药量 ≥ 6% 的微乳溶液出现少许沉

表5 不同投药量自微乳化后的粒径及PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Particle size and PDI after microemulsion emulsification with different dosage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

投药量/%	粒径/nm	PDI
1	18.21±0.34	0.132±0.019
3	19.22±0.45	0.195±0.019
5	20.28±0.06	0.198±0.005
6	33.65±4.71	0.253±0.103
9	52.41±1.81	0.286±0.021
10	51.86±9.09	0.303±0.095
12	63.52±3.83	0.618±0.105
15	62.30±0.92	0.720±0.021

淀物,并且随着投药量增加沉淀物逐渐增多。因此,选择黄连总生物碱的投药量为5%。

2.5 自微乳的最优制备工艺考察

根据D-最优混料设计得到的最优处方精密称取各辅料共3g,确定黄连总生物碱的投药量为5%,进行单因素实验,保持其他工艺不变,分别考察在不同温度(15、25、37、50、60℃)、不同磁力搅拌转速(100、200、300、400、500 r/min)和不同搅拌时间(1、5、10、20、40 min)的条件下制备得到的自微乳,测量乳化时间、观察乳化外观的均匀性并测定乳液粒径大小。结果显示,当制备温度为37℃时,乳化时间最短,且粒径与PDI最小(表6);当搅拌转速达到300 r/min以上时,自乳化时间几乎达到稳定,PDI<0.3(表7);当搅拌时间超过10 min时,微乳的粒径及PDI均较小,且趋于稳定(表8)。因此,Cop-Gin-SMEDDS的最佳工艺为在37℃、搅拌转速300 r/min条件下磁力搅拌10 min。

2.6 含量测定方法的建立

2.6.1 黄连总生物碱的含量测定方法 由于干姜油在425 nm处的吸收会对黄连总生物碱的含量测定产生干扰,因此,选择用HPLC法测量盐酸小檗碱、

表6 制备温度对自微乳的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of preparation temperature on self-microemulsion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度/℃	粒径/nm	PDI	外观
15	364.20±60.76	0.596±0.094	黄色,混浊、半透明
25	27.78±0.58	0.505±0.049	黄色,混浊、半透明
37	20.63±0.20	0.277±0.008	黄色,澄清、透明
50	39.61±2.49	0.674±0.043	黄色,混浊、半透明
60	30.03±0.43	0.559±0.008	黄色,混浊、半透明

表7 搅拌转速对自微乳的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of stirring speed on self-microemulsion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌转速/ (r·min ⁻¹)	粒径/nm	PDI	外观
100	22.28±0.35	0.312±0.013	黄色,澄清、透明
200	21.43±0.17	0.304±0.002	黄色,澄清、透明
300	20.65±0.26	0.270±0.010	黄色,澄清、透明
400	19.06±0.46	0.214±0.008	黄色,澄清、透明
500	20.88±0.21	0.271±0.004	黄色,澄清、透明

表8 搅拌时间对自微乳的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of stirring time on self-microemulsion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌时间/ min	粒径/nm	PDI	外观
1	34.81±0.28	0.738±0.018	黄色,混浊、半透明
5	21.33±0.23	0.283±0.023	黄色,澄清、透明
10	19.85±0.23	0.205±0.001	黄色,澄清、透明
20	18.85±0.21	0.182±0.012	黄色,澄清、透明
40	19.25±0.07	0.176±0.022	黄色,澄清、透明

盐酸巴马汀、盐酸黄连碱和表小檗碱的含量来评价Cop-Gin-SMEDDS的载药量和稳定性。色谱条件:色谱柱为Inertsil® ODS-3 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液(50:50)(每100毫升中加十二烷基硫酸钠0.4 g,再以磷酸调节pH值为4.0);体积流量1 mL/min;洗脱方式:等度洗脱;紫外检测波长350 nm;柱温30℃;进样量10 μL;理论塔板数按照盐酸小檗碱计算不低于5000。该方法专属性、线性、精密度、重复性、稳定性均良好,加样回收率为101.05%,RSD为0.48%,符合要求,表明方法准确度良好。色谱图见图4。以盐酸小檗碱对照品的峰面积为对照,分别计算盐酸小檗碱、表小檗碱、盐酸黄连碱和盐酸巴马汀的含量。

2.6.2 6-姜辣素的含量测定方法 色谱条件:色谱柱为Inertsil® ODS-3 C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-甲醇-水(40:5:55);体积流量1 mL/min;等度洗脱;紫外检测波长280 nm;柱温30℃;进样量10 μL;理论塔板数按照6-姜辣素计算不低于5000。该方法专属性、线性、精密度、重复性、稳定性均良好,平均加样回收率为99.67%,RSD为0.76%,符合要求,表明方法准确度良好。色谱图见图5。

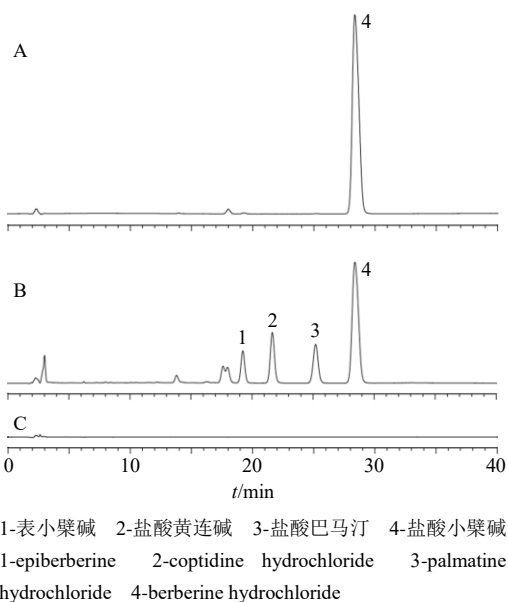


图4 盐酸小檗碱对照品 (A)、Cop-Gin-SMEDDS 供试品 (B) 和阴性对照 (C) 的 HPLC 图

Fig. 4 HPLC of berberine hydrochloride reference substances (A), Cop-Gin-SMEDDS test sample (B) and negative control (C)

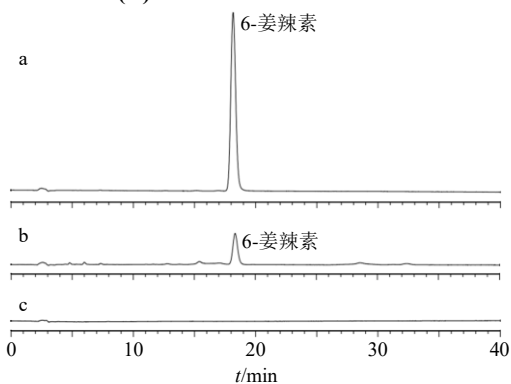


图5 6-姜辣素对照品 (a)、Cop-Gin-SMEDDS 供试品 (b) 和阴性对照 (c) 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of 6-gingerol reference substance (a), Cop-Gin-SMEDDS test sample (b) and negative control (c)

2.7 黄连总生物碱和干姜油自微乳给药系统质量评价

2.7.1 形态观察 制备的 Cop-Gin-SMEDDS 为澄清透明、流动性较好的深红色浓缩液，稀释后得到的微乳溶液为澄清透明、流动性好的黄色溶液（图6）。在 TEM 下，呈圆球形，形态规则，大小较均匀，粒径大小普遍在 10~30 nm，乳滴之间无黏连（图7）。

2.7.2 粒径分布及 ζ 电位测定 将 Cop-Gin-SMEDDS 加水乳化后，测得其微乳溶液平均粒径大小为 (22.21 ± 0.45) nm、PDI 为 0.195 ± 0.019 、 ζ

电位为 (-2.67 ± 0.11) mV，说明其粒径较小且分布均匀，稳定性良好。Cop-Gin-SMEDDS 溶液粒径分布及 ζ 电位分布结果如图8所示。

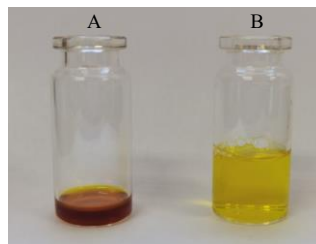


图6 Cop-Gin-SMEDDS (A) 和乳化后微乳溶液 (B) 的外观形态

Fig. 6 Appearance of Cop-Gin SMEDDS (A) and emulsified microemulsion solution (B)

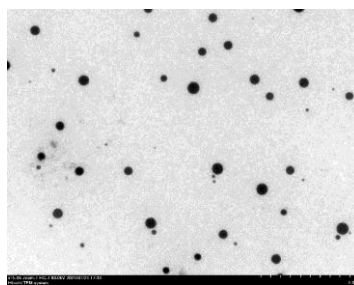


图7 Cop-Gin-SMEDDS 乳化后 TEM 图

Fig. 7 TEM of Cop-Gin SMEDDS after emulsification

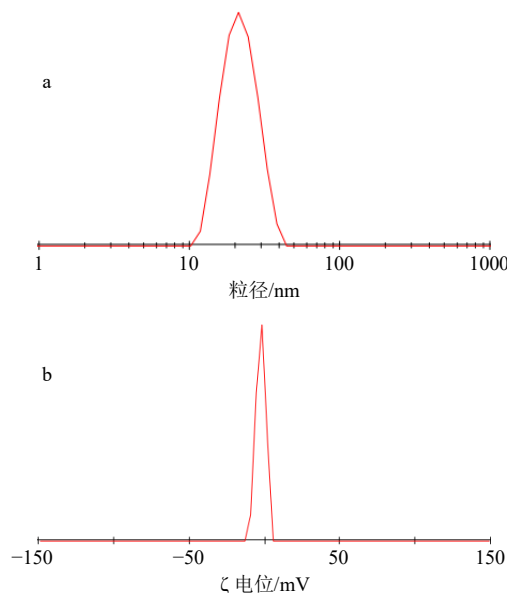


图8 Cop-Gin-SMEDDS 的粒径分布 (a) 和 ζ 电位分布 (b)

2.7.3 载药量和包封率的测定 精密称取 Cop-Gin-SMEDDS 50 mg (*W*)，置于 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，超声 10 min，微孔滤膜过滤后，按照“2.6”项项建立的方法测定盐酸小檗碱、

盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、表小檗碱和 6-姜辣素含量，测定结果记作 W_1 。精密称取微乳溶液 0.25 g，置 5 mL 棕色量瓶中，加 37 °C 的蒸馏水溶解并稀释至刻度，摇匀，置于离心管中，5000 r/min 转速离心 20 min，精密量取上清液 1 mL，置于 10 mL 棕色量瓶中，加甲醇适量，超声助溶 10 min，冷却至室温，加甲醇稀释至刻度，摇匀，进样检测，检测结果记作 W_2 。按照下列公式计算载药量和包封率^[21]。

$$\text{载药量} = W_1/W$$

$$\text{包封率} = W_2/W_1$$

盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸黄连碱、表小檗碱和 6-姜辣素的载药量和包封率结果见表 9，从结果可知各指标成分均具有较高的载药量和包封率，说明自微乳处方及制备工艺达到目标要求。

2.7.4 稳定性考察 将 Cop-Gin-SMEDDS 于 4、25、

表 9 载药量、包封率检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Test results of drug loading and entrapment efficiency ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

指标成分	载药量/(mg·g ⁻¹)	包封率/%
盐酸小檗碱	13.51 ± 0.71	96.36 ± 0.34
盐酸巴马汀	1.37 ± 0.06	95.49 ± 0.59
盐酸黄连碱	2.36 ± 0.27	92.56 ± 0.81
表小檗碱	0.83 ± 0.14	95.17 ± 0.39
6-姜辣素	6.34 ± 0.04	94.39 ± 1.63

40 °C 条件下，放置 30 d。在实验的第 0、10、20、30 天分别取样适量，观察其外观性状并测定指标成分的含量以及微乳溶液的平均粒径大小、PDI。结果表明，Cop-Gin-SMEDDS 的外观仍无明显变化，含量测定结果也显示该自微乳给药系统具有良好的稳定性（表 10、11）。

表 10 Cop-Gin-SMEDDS 粒径、PDI 和形状外观的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Change in particle size, PDI and shape appearance of Cop-Gin-SMEDDS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度/°C	时间/d	粒径/nm	PDI	自微乳溶液外观	微乳溶液外观
4	0	20.40 ± 0.15	0.220 ± 0.007	深红色，澄清、透明	黄色，澄清、透明
	10	18.92 ± 0.15	0.168 ± 0.015		
	20	19.28 ± 0.35	0.206 ± 0.046		
	30	18.42 ± 0.07	0.127 ± 0.019		
25	0	19.36 ± 0.03	0.171 ± 0.015	深红色，澄清、透明	黄色，澄清、透明
	10	18.74 ± 0.28	0.106 ± 0.027		
	20	18.54 ± 0.12	0.118 ± 0.026		
	30	18.30 ± 0.07	0.116 ± 0.015		
40	0	19.89 ± 0.21	0.197 ± 0.005	深红色，澄清、透明	黄色，澄清、透明
	10	24.10 ± 0.04	0.267 ± 0.021		
	20	18.85 ± 0.02	0.159 ± 0.015		
	30	17.57 ± 0.04	0.153 ± 0.055		

2.8 体外释放

分别精密称取黄连总生物碱提取物、干姜油提取物及含有相同药量的 Cop-Gin-SMEDDS，装于透析袋中，分别以蒸馏水、pH 7.4 PBS 冲液和 pH 1.2 盐酸溶液做释放介质并加入 1% 聚山梨酯-80 作为漏槽条件，置于 (37 ± 5) °C 恒温水浴中，100 r/min 转速磁力搅拌。于放样后 0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24、36、48、60、72 h 时分别从锥形瓶中取出 1 mL 接收溶液并加入等量的释放介质，以盐酸小檗碱和 6-姜辣素作为指标成分，根据“2.6”项建立的含量测定方法分别测定其含量，指标成分的累积释放率计算公式^[22]如下所示。

$$Q_n = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / W$$

Q_n 为第 n 个时间点的累积释放率， V 为接收液的体积， V_i 为每次取样体积， C_n 和 C_i 分别为第 n 次和第 i 次取样时接收液中药物浓度， W 为制剂中所含药物质量

结果如图 9 所示，Cop-Gin-SMEDDS 中盐酸小檗碱在蒸馏水、pH 7.4 PBS 冲液和 pH 1.2 盐酸溶液中的 24 h 最终累积释放率分别为 (96.17 ± 0.10)%、(70.80 ± 0.04)%、(85.77 ± 0.10)%，Cop-Gin-SMEDDS 中 6-姜辣素在 3 种释放介质中的 24 h 最终累积释放率分别为 (32.48 ± 0.14)%、(27.7 ± 0.14)%、(32.96 ± 0.07)%，而黄连总生物碱提取物

表 11 Cop-Gin-SMEDDS 中各指标成分含量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Change of component content of each index in Cop-Gin-SMEDDS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

温度/°C	t/d	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
		盐酸小檗碱	盐酸巴马汀	盐酸黄连碱	表小檗碱	6-姜辣素
4	0	14.18±0.33	2.20±0.15	3.54±0.22	1.42±0.15	6.78±0.63
	10	14.05±0.26	2.18±0.08	3.53±0.13	1.41±0.28	6.57±0.18
	20	14.04±0.01	2.15±0.04	3.52±0.30	1.23±0.06	6.47±0.06
	30	14.02±0.02	2.14±0.01	3.41±0.10	1.15±0.01	6.40±0.11
25	0	14.05±0.06	2.13±0.15	3.63±0.01	1.45±0.14	6.80±0.06
	10	13.64±0.17	2.12±0.03	3.39±0.17	1.44±0.09	6.75±0.03
	20	13.56±0.19	2.06±0.08	3.17±0.20	1.16±0.03	6.69±0.04
	30	13.23±0.05	2.04±0.02	3.06±0.05	1.11±0.08	6.67±0.07
40	0	13.99±0.05	2.19±0.01	3.46±0.09	1.46±0.09	6.58±0.06
	10	13.90±0.04	2.09±0.01	3.44±0.23	1.38±0.04	6.41±0.07
	20	13.49±0.15	2.08±0.04	3.11±0.02	1.20±0.02	6.29±0.21
	30	13.35±0.08	2.02±0.01	2.97±0.08	1.08±0.05	6.29±0.03

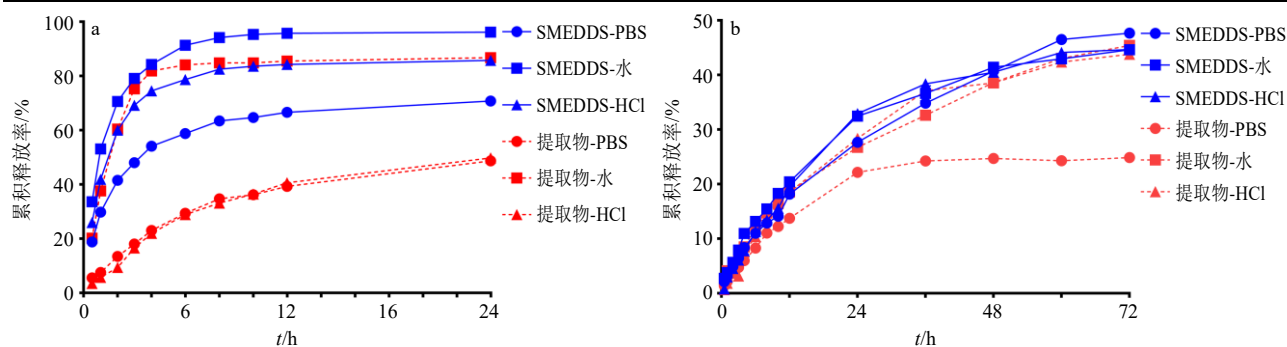


图 9 黄连和干姜有效组分提取物和 Cop-Gin-SMEDDS 指标成分盐酸小檗碱 (a) 和 6-姜辣素 (b) 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 *In vitro* release curve of extracts and Cop-Gin-SMEDDS of effective components of *Coptidis Rhizoma* and *Zingiberis Rhizoma* index components berberine hydrochloride (a) and 6-gingerol (b) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

中盐酸小檗碱在相应释放介质中的累积释放率分别为 (86.79±0.21)%、(48.67±0.36)%、(49.77±0.10)%，干姜油提取物中 6-姜辣素在相应释放介质中的累积释放率分别为 (26.78±0.64)%、(22.21±0.05)%、(28.41±0.12)%。自微乳给药系统中各指标成分 24 h 累积释放率均高于提取物，说明自微乳给药系统可改善药物的溶出度和释放速率。

3 讨论

黄连-干姜作为中药方剂中的常用药对^[23]，研究其药效组分黄连总生物碱和干姜油的连用对其治疗痢疾、泄泻具有重大意义。然而由于黄连总生物碱和干姜油溶解度低、姜酚类成分性质不稳定等限制了其联合应用。自微乳给药系统是一种由油相、表面活性剂和助表面活性剂组成的给药系统。研究显示^[20]，中药的芳香油如丁香油等，可以用来作为油

相来制备自微乳，包裹其他药物进行联合用药。因此本研究结合“药辅合一”的思想，考虑将干姜油作为油相，与黄连总生物碱共载制备自微乳，以期提高黄连总生物碱和干姜油的溶解度以及姜酚类成分的稳定性。

油相是影响自微乳成型的处方的重要因素。筛选油相的预实验结果显示相对于油相的种类，油相的用量对自微乳的成型影响较大，并且所有油相的最佳用量都在 10% 左右。投药量的预实验显示黄连总生物碱的最大投药量为 5%，当投药量大于 5% 时，自微乳给药系统会产生沉淀。课题组在均匀设计的预实验中发现，当干姜油与黄连总生物碱比例为 1:1 时，对溃疡性结肠炎的治疗效果最好，因此在本研究中按该比例来制备自微乳。因此综合考虑下，选择对黄连总生物碱溶解度最大的油酸与干姜油以

1 : 1 比例的混合油作为油相。

筛选表面活性剂时,除了考虑其对药物的溶解能力外,还应考察表面活性剂与油相形成微乳的能力^[24]。实验中发现 RH40 的乳化性能最好,质量占比为 70%时就能形成符合要求的微乳溶液,而其他表面活性剂则需要占比 80%以上才能形成。虽然所有的助表面活性剂与 RH40 均相容,但考虑到 PG 对黄连总生物碱溶解度最大,因此选择 PG 作为自微乳的助表面活性剂。

自微乳乳化后的粒径与药物释放密切相关,一般认为粒径越小药物的跨膜运输效果可能越好^[25]。本研究制备的自微乳用水稀释后自乳化形成的微乳液滴粒径为(22.21±0.45)nm, PDI 为 0.195±0.019,提示乳化后的粒径很小且粒径分布均匀性好。体外释放实验结果显示, Cop-Gin-SMEDDS 中盐酸小檗碱和 6-姜辣素在 3 种释放介质中的 24 h 内的累计释放率和释放速率均高于提取物,表明自微乳给药系统能够提升药物的溶出度和释放速率。

由于干姜油在 425 nm 处有吸收,会对黄连总生物碱的测量有影响,所以载药量和包封率的考察没有选用紫外分光光度法测定黄连总生物碱含量,而是用 HPLC 在 350 nm 处检测表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱 4 种生物碱含量,以此代表黄连总生物碱含量;姜辣素是干姜的主要成分,其中姜酚类是姜辣素的主要成分,而 6-姜辣素是在姜酚中含量最高^[26],因此,选择 6-姜辣素代表干姜油的含量。结果显示, Cop-Gin-SMEDDS 中各指标成分的载药量均良好,各成分的包封率也都在 92%以上,表明 Cop-Gin-SMEDDS 具有良好的载药量和包封率。在稳定性实验中 Cop-Gin-SMEDDS 中各指标成分含量与外观性状均无明显变化,表明自微乳给药系统能提升药物的稳定性。

综上所述,本研究制备的 Cop-Gin-SMEDDS 具有较小的粒径和较高的载药量与释药速率,能够提高黄连总生物碱和干姜油的溶解度、增强姜酚类成分的稳定性。未来将以 Cop-Gin-SMEDDS 为基础,制备口服结肠靶向制剂,进一步其提高稳定性和使用方便性,以期更好地应用于溃疡性结肠炎等疾病的治疗。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 陈丽名, 屈杰, 牛锐, 等. 黄连、黄芩之“坚阴厚肠”与“苦寒伤胃” [J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(18):

10-11.

- [2] 周瑞, 项昌培, 张晶晶, 等. 黄连化学成分及小檗碱药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(19): 4561-4573.
- [3] Teng H, Choi Y H. Optimization of extraction of total alkaloid content from *Rhizome Coptidis* (*Coptis chinensis* Franch) using response surface methodology [J]. *J Korean Soc Appl Biol Chem*, 2012, 55(2): 303-309.
- [4] 孙凤娇, 李振麟, 钱士辉, 等. 干姜化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2015, 34(3): 34-37.
- [5] Yang Y H, Vong C T, Zeng S, et al. Tracking evidences of *Coptis chinensis* for the treatment of inflammatory bowel disease from pharmacological, pharmacokinetic to clinical studies [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113573.
- [6] Zhai L X, Huang T, Xiao H T, et al. Berberine suppresses colonic inflammation in dextran sulfate sodium-induced murine colitis through inhibition of cytosolic phospholipase A2 activity [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 576496.
- [7] 王佳俊, 陈青垚, 王建, 等. 基于数据挖掘和网络药理学探究含黄连方剂治疗溃疡性结肠炎的配伍规律及作用机制 [J]. 中草药, 2021, 52(19): 5984-5995.
- [8] 刘文, 王钰乐, 卿勇军, 等. 葛根芩连汤治疗溃疡性结肠炎谱效关系研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(9): 4093-4097.
- [9] Zhang X J, Yuan Z W, Qu C, et al. Palmatine ameliorated murine colitis by suppressing tryptophan metabolism and regulating gut microbiota [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 137: 34-46.
- [10] Sheng Y Y, Wu T L, Dai Y Y, et al. 6-gingerol alleviates inflammatory injury in DSS-induced ulcerative colitis mice by regulating NF-κB signaling [J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(4): 1944-1952.
- [11] Sheng Y Y, Wu T L, Dai Y Y, et al. The effect of 6-gingerol on inflammatory response and Th17/Treg balance in DSS-induced ulcerative colitis mice [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(7): 442.
- [12] Rashidian A, Mehrzadi S, Ghannadi A R, et al. Protective effect of ginger volatile oil against acetic acid-induced colitis in rats: A light microscopic evaluation [J]. *J Integr Med*, 2014, 12(2): 115-120.
- [13] 闫曙光, 惠毅, 李倩, 等. 黄连-干姜提取物对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮 TLR4/NF-κB 信号通路的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 70-75.
- [14] 霍文兰, 李志田. 鲜姜与干姜超临界流体萃取物的

- GC/MS 研究 [J]. 应用化工, 2015, 44(1): 184-186.
- [15] 林华坚, 张梓豪, 孟江, 等. 干姜及其炮制品色差值与活性成分含量的相关性研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(10): 1197-1202.
- [16] 史琪荣, 王莉, 闫荟, 等. GC-MS 法测定干姜超临界 CO₂ 萃取物的化学成分及其姜酚类成分的追踪 [J]. 解放军药学学报, 2011, 27(4): 296-298.
- [17] 惠毅, 闫曙光, 李京涛, 等. 小檗碱与 6-姜烯酚配伍对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞 Notch 信号通路的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3147-3154.
- [18] 李婉蓉, 王菲, 陈建波, 等. 1,8-桉叶油素自微乳给药系统的制备及质量评价和细胞摄取研究 [J]. 中草药, 2020, 51(9): 2418-2426.
- [19] 杨志欣, 张蕾, 王鑫, 等. 自乳化药物递送系统研究概述 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(3): 563-569.
- [20] 卢文彪. 连香方自微乳化给药系统的制备与评价 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [21] 王玲芝. 连翘脂素自微乳的制备及药动学研究 [D]. 太原: 山西大学, 2020.
- [22] 齐献利. 伊立替康微球突释效应的影响因素及控制方法 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2015.
- [23] 罗光芝, 季旭明, 马婷, 等. 基于中医传承辅助平台分析含黄连-干姜药对方剂的组方规律 [J]. 中国药房, 2019, 30(1): 99-103.
- [24] 杨秋璇. [6]-姜烯酚自微乳给药系统及其抗高尿酸血症研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
- [25] 张然, 杨冰, 廖茂梁, 等. 双氢青蒿素自微乳给药系统的制备及其评价 [J]. 中草药, 2021, 52(5): 1291-1302.
- [26] 徐桐, 丛竹凤, 贺梦媛, 等. 干姜的研究进展及质量标志物分析 [J]. 山东中医杂志, 2022, 41(5): 569-575.

[责任编辑 郑礼胜]