

苦参碱自微乳化制剂的制备工艺研究

李洪松¹, 张学顺^{2*}, 付春生², 冯 静¹

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011

摘要: 目的 研制苦参碱自微乳制剂, 并对其质量进行评价。方法 通过溶解度试验、伪三元相图的研究, 筛选出苦参碱自微乳最佳处方; 在此基础上制备苦参碱自微乳制剂, 建立 HPLC 法测定自微乳中苦参碱的方法; 对自微乳的外观、形态、粒径及其分布、Zeta 电位、载药量和稳定性进行考察。结果 苦参碱自微乳最佳处方为苦参碱-油酸-油酸乙酯-EL-40-异丙醇 (0.5 : 0.15 : 0.15 : 0.35 : 0.35); 制备的苦参碱自微乳为澄清液体, 流动性、稳定性好, 遇水形成 O/W 型微乳, 平均粒径 68 nm。载药量为 42.689 mg/mL。结论 自微乳制剂制备工艺简单, 性质稳定, 为苦参碱自微乳制剂的进一步研究奠定基础。

关键词: 苦参碱; 自微乳制剂; 伪三元相图; HPLC; O/W 型微乳

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)04-0-0

Research on preparation process of matrine self-microemulsifying drugs

LI Hong-song¹, ZHANG Xue-shun², FU Chun-sheng², FENG jing¹

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China

Abstract: **Objective** To develop the matrine self-microemulsifying drug syetem (SMEDDS) and evaluate its quality. **Methods** The solubility test and pseudo-ternary phase diagram were utilized to select proper matrine microemulsions prescription. On this basis, matrine SMEDDS was formulated and HPLC method was used to determine drug content in matrine SMEDDS; the appearance, morphology, particle size, particle size distribution, Zeta potential drug loading, and stability of matrine SMEDDS of self-microemulsifying were studied. **Results** The best prescription of matrine SMEDDS was matrine-oleic-ethylolate-EL-40-isopropanol (0.5 : 0.15 : 0.15 : 0.35 : 0.35). The selected matrine SMEDDS was transparent liquid, and good liquidity and stability, and with water to form O/W type microemulsion, with an average particle size of 68 nm. The drug loading was 42.689 mg/mL. **Conclusion** The self-microemulsifying technology was simple, stable, and provides a strong foundation for research of Matrine SMEDDS drug.

Key words: matrine; self-microemulsifying; pseudo-ternary phase diagram; HPLC; O/W type microemulsion

苦参碱是豆科植物苦参、苦豆子及广豆根中主要的生物碱之一, 属四环喹啉类生物碱。近年来大量药理和临床作用研究发现, 苦参碱具有抗肝纤维化、抗心律失常、免疫抑制、抗炎、抗高血压血管重构、抗肿瘤等多种药理作用^[1]。苦参碱的消除半衰期较短, 不易溶于水, 且随水温升高溶解度降低, 普通片剂、胶囊等口服后溶出速率慢, 吸收较差, 生物利用度低^[2]。

自微乳化给药系统 (self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS)^[3]是由药物、油相、乳化剂和助乳化剂组成的均一透明的液体, 为热力学

稳定的混合体系, 可灌装成软胶囊或压制成片^[4]。口服后在胃肠的蠕动下遇水分散而自发形成粒径小于 100 nm 的微乳溶液, 形成的乳滴由于具有很大的表面积, 能增加难溶性药物的释放和吸收, 提高口服生物利用度^[5-7]。本实验旨在制备苦参碱 O/W 型自乳微乳制剂, 以期使其具有一定的缓释性和靶向作用, 减少临床不良反应, 提高药物疗效。

1 仪器与材料

岛津高效液相色谱仪 (LC—10AT, SPD—10A 紫外检测器, 日本岛津); XW—80A 旋涡混合器 (上海精科实业有限公司); HJ—4A 四联数显恒温磁力

收稿日期: 2012-07-05

作者简介: 李洪松 (1987—), 男, 山东泰安人, 在读研究生, 主要从事实验方剂学及中药新剂型与新技术研究。

Tel: 13583106239 E-mail: lihongsong125@126.com

*通讯作者 张学顺 Tel: (0531)68617996 E-mail: zhangxs321@126.com

搅拌器(金坛市金达仪器制造厂);MS3000 激光粒度分析仪、ZEN2600 Zeta 电位测定仪(英国马尔文公司)。苦参碱对照品(批号 110805-200306,中国药品生物制品检定所);苦参碱原料药(山东大学实验室自制,质量分数经 HPLC 法自测为 98%);油酸(天津市大茂化学试剂厂);油酸乙酯(上海飞翔化工厂);肉豆蔻酸异丙酯(IPM,瑞士 Fluka AG 公司);中链甘油三酯(MCT,德国科宁公司);EL-40(大连广汇科技有限公司);聚山梨酯-80、异丙醇、PEG 400、甘油(天津市富宇精细化工有限公司);乳化剂 OP-10(天津市广成化学试剂有限公司);无水乙醇(山东省化工研究院);乙腈(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 苦参碱的 HPLC 法测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Thermo APS-2 Hypersil 氨基柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-无水乙醇-3%磷酸水溶液(80:10:10);检测器为

紫外检测器,检测波长 220 nm;柱温 25 ℃;体积流量 1 mL/min;进样量 20 μL。

2.1.2 对照品储备液的制备 精密称苦参碱对照品 10.00 mg,无水乙醇溶解并定容至 50 mL 量瓶中,得到 0.2 mg/mL 的对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 按照处方量分别制备苦参碱自微乳溶液,乙醇溶解定容配置成一定质量浓度的供试品溶液。

2.1.4 空白溶液的制备 分别称取各种辅料 1.0 g 制备共 10 g 的混合空白溶液,乙醇溶解并定容配置成一定质量浓度的辅料空白溶液。

2.1.5 方法专属性考察 分别吸取对照品溶液、供试品溶液、空白溶液,按上述色谱条件进样观察。结果显示,空白自微乳在对照品色谱峰位置无吸收峰,苦参碱自微乳在相应保留时间内有一强峰,分离度好,空白辅料在相应保留时间无吸收峰,表明待选的各种辅料对苦参碱的测定无干扰。HPLC 色谱图见图 1。

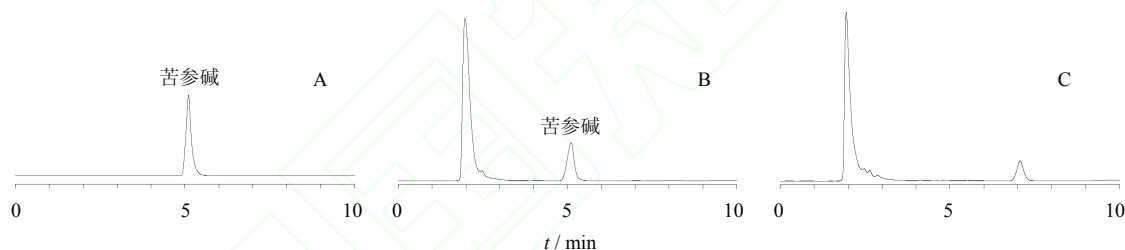


图 1 苦参碱对照品 (A)、苦参碱自微乳样品 (B) 和空白溶液 (C)

Fig. 1 HPLC chromatograms of matrine reference solution (A), matrine SMEDDS solution (B), and blank solution (C)

2.1.6 标准曲线的绘制 分别精密量取 1、2、4、6、8、10 mL 对照品储备液分别置于 10 mL 量瓶中,加无水乙醇至刻度,摇匀,得到不同质量浓度的对照品溶液。采用上述 HPLC 法进行测定,以峰面积积分值(A)对质量浓度(C)进行线性回归,得到回归方程 $A=257\,917\,C-769\,982$, $R^2=0.998\,3$,表明苦参碱在 20~200 μg/mL 线性关系良好。

2.1.7 精密度试验 精密吸取苦参碱对照品储备液 0.2 mL,无水乙醇定容至 10 mL 量瓶中。连续进样 5 次,每次 20 μL,记录峰面积,计算其 RSD 为 1.53%,表明本方法精密度良好。

2.1.8 回收率试验 按处方量称取辅料,以处方量的 80%、100%、120%加入苦参碱对照品,无水乙醇定容至 10 mL 量瓶中,各平行制备 3 份,按上述色谱条件进样,测定样品中苦参碱的质量分数,计算回收率^[8]。结果苦参碱平均回收率分别为

100.13%、99.67%、101.23%,RSD 分别为 0.74%、0.93%、1.07%。

2.1.9 稳定性试验 称取“2.1.3”项下制备的同一供试品溶液,于 1 d 内的 0、1、2、4、6、8、24 h 进样 20 μL,记录峰面积,计算其 RSD 为 1.17%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.1.10 重复性试验 取同批样品 5 份,平行制备成供试品溶液,连续进样 5 次,每次 20 μL,记录峰面积,计算苦参碱质量浓度的 RSD 为 0.73%,表明该方法的重复性好。

2.2 苦参碱在各辅料中的溶解度

分别取各种辅料 1.0 g 于带塞玻璃管中,加入苦参碱,37 ℃超声溶解直至过饱和,25 ℃水浴中平衡 24 h 后以 5 000 r/min 离心 20 min,精密称取上清液 0.10 g,无水乙醇溶解并定容到 50 mL 量瓶中。以上述 HPLC 法连续进样 2 次,每次 20 μL,记录

峰面积，带入回归方程得到苦参碱在各辅料中的溶解度。结果见表 1。

2.2 伪三元相图的研究

根据苦参碱在不同辅料的溶解情况，选出几个溶解度较大的油相、乳化剂、助乳化剂。固定乳化

表 1 苦参碱在各辅料中的溶解度 ($n=2$)

Table 1 Solubility of matrine in various adjuvants		
辅 料	饱和溶解度/(mg·mL ⁻¹)	
油相	油酸	15.738
	油酸乙酯	10.462
	MCT	7.101
	IPM	6.884
乳化剂	EL-40	7.478
	聚山梨酯-80	6.490
	OP-10	5.827
助乳化剂	无水乙醇	132.758
	异丙醇	126.436
	PEG 400	20.974
	甘油	27.298

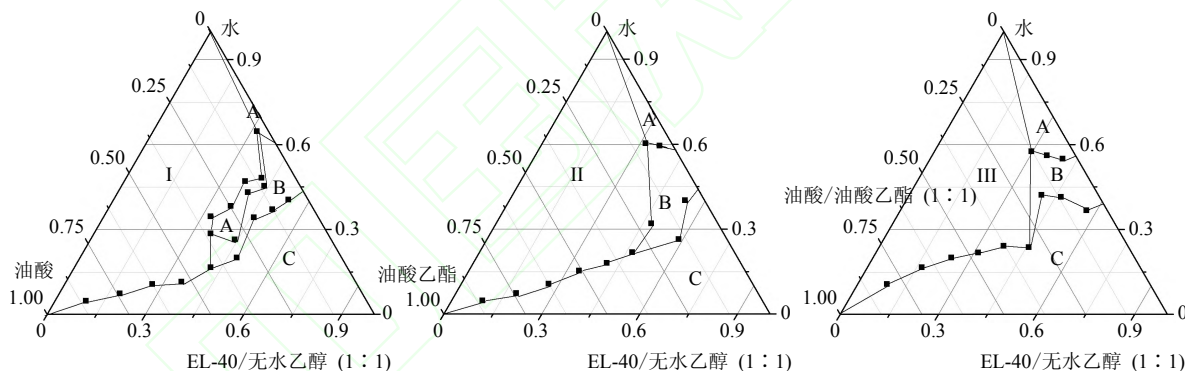


图 2 伪三元相图优选油相 (油相组成: I-油酸、II-油酸乙酯、III-油酸-油酸乙酯 1 : 1)

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram in oil phase (composition of oil phase: I-oleic acid, II-ethyl oleate, III-oleic acid-ethyl oleate 1 : 1)

验中将二者不同比例混合，未得到较好的比例。所以选择 EL-40 作为乳化剂。

2.2.3 助乳化剂的优选 固定油相为相油酸-油酸乙酯 (1 : 1)，乳化剂为 EL-40，助乳化剂选择异丙醇、无水乙醇，分别绘制伪三元相图，结果见图 4。二者形成自微乳的区域无明显差别，本实验旨在制备口服的自微乳制剂，所以选择异丙醇作为助乳化剂，以期提高用药的安全性，扩大适用人群。

2.2.4 最佳 K_m 的确定 固定油相为相油酸-油酸乙酯 (1 : 1)，分别配制 $K_m=1 : 1$ 、 $1 : 2$ 、 $2 : 1$ 、 $3 : 1$ 的乳化剂-助乳化剂混合溶液，采用加水法绘制伪三元相图。结果显示 $K_m=1 : 1$ 时，自微乳区域最

剂与助乳化剂比例 $K_m=1 : 1$ ，油相与混合乳化剂按 1 : 9、2 : 8、3 : 7、4 : 6、5 : 5、6 : 4、7 : 3、8 : 2、9 : 1 比例混匀，采用加水法绘制伪三元相图，优选最佳的自微乳处方^[9]。图中 A 为 O/W 微乳，B 为过渡态，C 为 W/O 微乳。

2.2.1 油相的优选 固定乳化剂为 EL-40，助乳化剂为无水乙醇 ($K_m=1 : 1$)，油相选择对苦参碱溶解能力较大的油酸、油酸乙酯，分别绘制伪三元相图，结果见图 2-I、II。结果显示油酸乙酯形成的自微乳区域大于油酸，为增加自微乳的载药量，初步探索将油酸与油酸乙酯按 1 : 1 混合，绘制伪三元相图。试验发现二者混合可增加形成自微乳的区域，而后又以 1 : 2、2 : 1 的比例绘制伪三元相图，最终确定 1 : 1 为最佳比例。所以油相最终确定为油酸-油酸乙酯 (1 : 1) 的混合体系。结果见图 2-III。

2.2.2 乳化剂的优选 固定油为相油酸-油酸乙酯 (1 : 1)，助乳化剂为无水乙醇，乳化剂选择 EL-40、聚山梨酯-80 分绘制伪三元相图，结果见图 3。结果显示 EL-40 形成的自微乳区域大于聚山梨酯-80，试

大，结果见图 5。

2.3 苦参碱含药自微乳的处方研究

2.3.1 最佳空白处方的确定 本实验拟通过对不同比例的自微乳化制剂的粒径及其粒径分布优选出最佳处方比例。首先确立了使用马尔文激光粒度仪测定粒径的方法：分别取 3 份制得的自微乳化制剂 4.0 g，依次加入到 400、600、800 mL 的二次蒸馏水中，稀释扩散均匀后使用激光粒度仪测定粒径，测定结果为 66、65、66 nm，表明不同的稀释比例对测量结果影响不明显。所以本实验在测量时选择将自微乳化制剂加入到 400 mL 二次蒸馏水中进行测定。

制备 K (油相/乳化剂和助乳化剂) = 3.5 : 6.5、

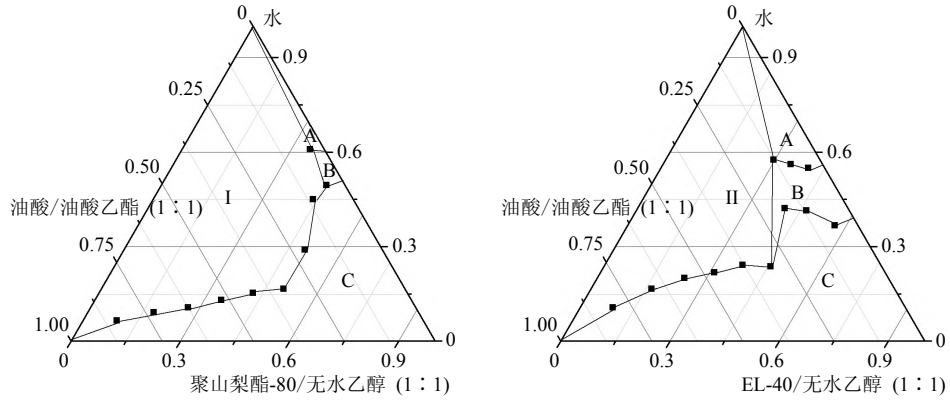


图 3 伪三元相图优选乳化剂 (I-聚山梨酯-80、II-EL-40)

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagram in emulsifier phase (I-Polysorbate-80, II-EL-40)

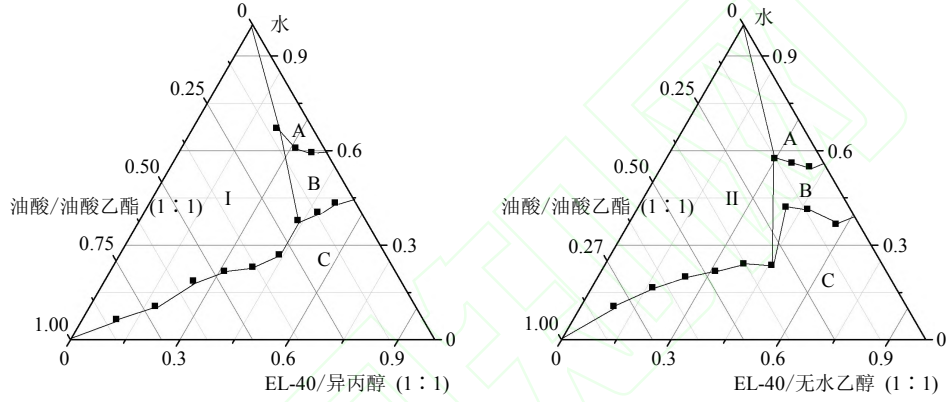


图 4 伪三元相图优选助乳化剂 (I-异丙醇、II-无水乙醇)

Fig. 4 Pseudo-ternary phase diagram in auxiliary emulsifying agents phase (I-isopropanol, II-absolute alcohol)

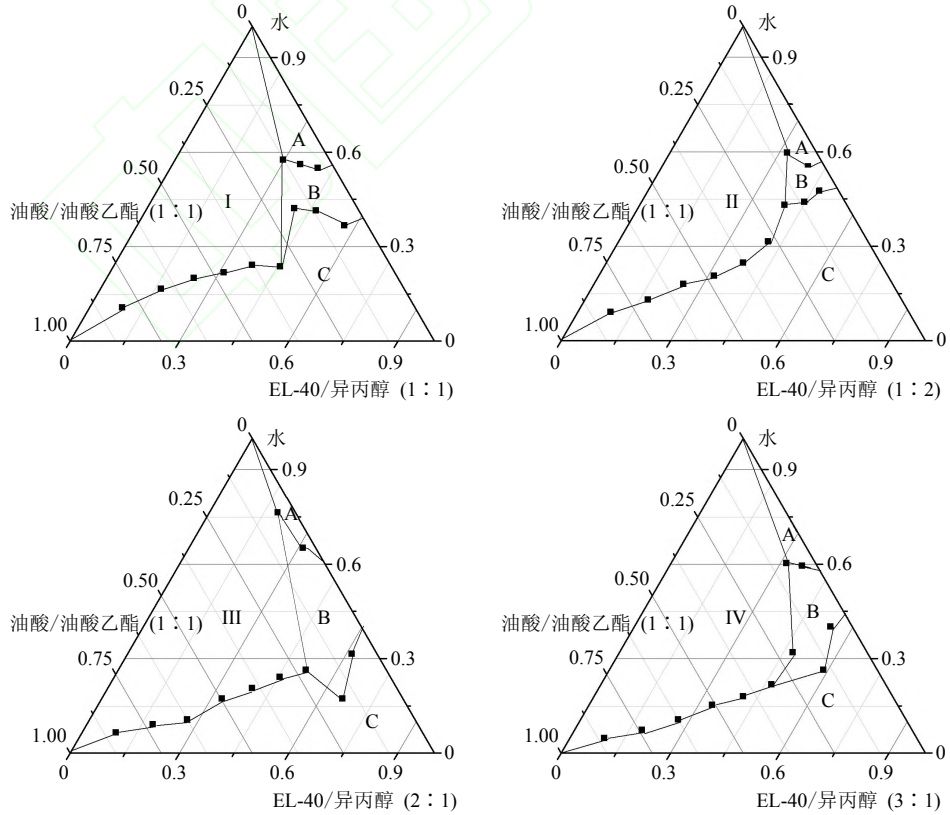


图 5 伪三元相图确定最佳 K_m (I- $K_m=1:1$ 、II- $K_m=1:2$ 、III- $K_m=2:1$ 、IV- $K_m=3:1$)

Fig. 5 Pseudo-ternary phase diagram to determine the best K_m (I- $K_m=1:1$, II- $K_m=1:2$, III- $K_m=2:1$, IV- $K_m=3:1$)

3 : 7、2 : 8 的空白自微乳, 照上述方法测定粒径, 结果见图 6。结果显示上述不同比例处方微乳的粒径相差不大, 考虑到稳定性、载药量及乳化剂的用量问题, 选择 $K=3:7$ 作为最佳比例, $K=3:7$ 时平均粒径 66 nm。

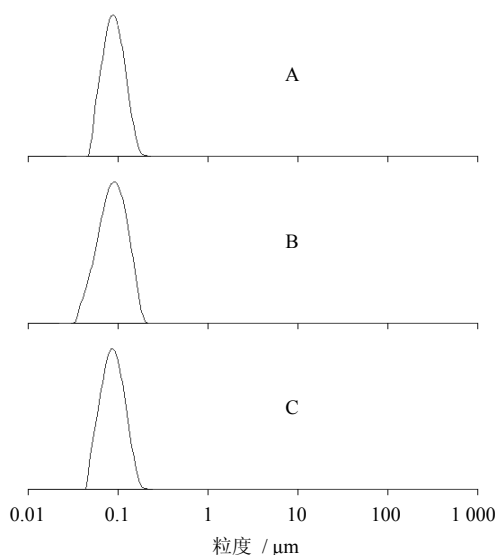


图 6 $K=3.5:6.5$ (A)、 $3:7$ (B) 和 $2:8$ (C) 时的粒径分布

Fig. 6 Particle size diameter distribution of $K=3.5:6.5$ (A), $3:7$ (B) and $2:8$ (C)

2.3.2 含药处方的确定 平行制备 $K=3:7$ 的空白自微乳溶液 1.0 g 共 10 份依次加入到 10 个带塞玻璃管中并标号 1~10, 向 1~10 号玻璃管中依次称取苦参碱 0.2、0.4、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.4、1.6 g。37 °C 超声溶解, 室温下静置 48 h 后观察溶液是否澄明, 是否有药物析出。结果显示当加药量为 0.8 g/g 时溶液已有较明显的黄色, 加药量为 1.2 g/g 时以有药物析出, 可知加药量的范围大约为 0.1~0.8 g/g。平行制备 5 份制备 $K=3:7$ 的空白微乳溶液 4.0 g, 依次加入苦参碱 0.8、1.6、2.4、2.8、3.2 g 涡旋混匀后使用激光粒度仪测量粒径, 绘制粒径与苦参碱加入量的变化趋势图, 结果见图 7。结

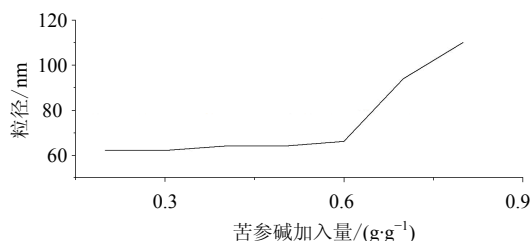


图 7 粒径与苦参碱加入量变化趋势图

Fig. 7 Trend chart of Particle size and matrine content

果显示, 当苦参碱的加入量小于 0.6 g/g 时, 粒径基本不变, 综合各因素确定含药处方为: 苦参碱-油酸-油酸乙酯-EL-40-异丙醇 (0.5 : 0.15 : 0.15 : 0.35 : 0.35)。

2.4 苦参碱自微乳化制剂的体外评价

2.4.1 类型鉴别 本实验采用稀释法和染色法鉴别微乳的类型。稀释法: 能被大量水稀释, 为 O/W 型微乳; 能被大量油稀释, 为 W/O 型微乳。染色法: 利用苏丹红 (红色) 和亚甲兰 (蓝色) 在微乳中扩散快慢来判断微乳的类型。若蓝色扩散快于红色则为 O/W 型微乳, 反之则为 W/O 型微乳。结果表明, 本实验制得的微乳为 O/W 型。

2.4.2 粒径及其分布 按试验所得最佳处方比例制备苦参碱自乳剂 4.0 g。加入到 400 mL 二次蒸馏水稀释扩散均匀后使用激光粒度分析仪对其粒径及粒径分布进行测定, 平均粒径为 (68 ± 0.07) nm ($n=3$), 结果见图 8。

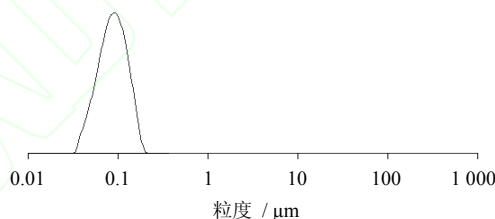


图 8 苦参碱自微乳粒径分布

Fig. 8 Particle size diameter distribution of matrine-SMEDDS

2.4.3 Zeta 电位的测定 以最佳处方比例制备苦参碱自微乳化制剂, 使用 Zeta 电位测定仪 ZEN2600 测量电位, 测量 3 次结果分别为 -1.35、-1.33、-1.34 mV, 表明微粒分散体系的物理稳定性较好。

2.4.4 载药量测定 精密称取油酸 0.15 g, 油酸乙酯 0.15 g, EL-40 0.35 g, 异丙醇 0.35 g, 混匀后加入 0.5 g 苦参碱, 37 °C 超声溶解, 于 25 °C 水浴中平衡 24 h。将混合物 5 000 r/min 离心 20 min, 精密称取 0.1 mL 上清液, 无水乙醇定容到 25 mL 量瓶中。平行制备 3 份样品。按“2.1”条色谱条件进行分析, 测得的峰面积带入标准曲线计算苦参碱的浓度。结果样品 1、2、3 的载药量分别为 42.726、46.013、39.326 mg/mL, 平均载药量为 42.689 mg/mL。

2.4.5 初步稳定性研究 将制备的苦参碱自微乳化制剂装入西林瓶中封口密封保存, 室温下放置, 考察其在 0、1、2、3 个月时的外观、乳化能力、药物量, 结果见表 2。结果显示, 制备的苦参碱自微乳

表2 苦参碱自微乳化制剂初步稳定性研究

Table 2 Preliminary study on stability of matrine-SMEDDS

时 间	外 观	乳化能力	平均粒径/nm	载药量/(mg·mL ⁻¹)
0 个月	无分层、药物析出, 澄明液体	迅速乳化成澄清液体, 淡蓝色乳光	68	42.781
1 个月	无分层、药物析出, 澄明液体	迅速乳化成澄清液体, 淡蓝色乳光	67	42.667
2 个月	无分层、药物析出, 澄明液体	迅速乳化成澄清液体, 淡蓝色乳光	68	43.032
3 个月	无分层、药物析出, 澄明液体	迅速乳化成澄清液体, 淡蓝色乳光	72	41.793

化制剂无药物析出, 无分层现象, 药液仍为澄明液体, 可迅速乳化成澄清溶液, 乳化后的粒径以及载药量无明显变化, 表明制备的苦参碱自微乳制剂的稳定性较好。

3 讨论

本实验在油相、乳化剂的筛选时一直使用无水乙醇作为助乳化剂, 考虑到无水乙醇的用量较大, 为增加用药安全, 扩大适用人群, 选择异丙醇作为助乳化剂, 结果显示二者对苦参碱的溶解能力相当, 与 EL-40 混合后成乳区域基本一致。所以采用异丙醇作为助乳化剂。

本实验在处方研究中, 考察了油酸跟油酸乙酯不同比例混合的伪三元相图, 结果表明二者等量混合时微乳面积最大。对于二者混合能够增加自微乳区域的原因机理并未找到相关的文献报道, 本实验由于时间等原因未做相关的研究, 有待于进一步的研究探索。

自微乳制剂可提高水难溶性药物的生物利用度, 由于处方中大量乳化剂的存在, 限制了其在临床上的应用。因此积极开展天然、可生物降解材料的研究开发, 可为自微乳化制剂的发展注入新的活力。

参考文献

- [1] 刘 梅, 刘雪英, 程建峰. 苦参碱的药理研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(9): 808-804.
- [2] 杨海峰, 张 芬. 苦参碱及其制剂的研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2009, 27(9): 551-553.
- [3] POUTON CW. Lipid formulation for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery system [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(2): 93-98.
- [4] Abdalla A, Mader K. Preparation and characterization of a self-emulsifying pellet formulation [J]. *Eur J Pharm Bioharm*, 2007, 66(2): 220-226.
- [5] 沈海蓉, 李中乐, 忠明康, 等. 自微乳化释药系统及研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(5): 409-412.
- [6] 张晓峰, 韦 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.
- [7] 许海玉, 张铁军, 赵 平, 等. 中药缓控释制剂的研究现状及研发思路 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(1): 30-35.
- [8] 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.
- [9] 汪 洋, 吴 伟, 阙 俐. 油-吐温-水体系伪三元相图在自微乳化制剂研究中的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(6): 345-348.