

# 雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶的制备及质量评价

吴玉梅<sup>1</sup>, 陈晓兰<sup>1\*</sup>, 唐红艳<sup>1</sup>, 戴雅洁<sup>1</sup>, 林亚平<sup>2</sup>, 刘文<sup>1</sup>

(1. 贵阳中医学院药学院, 贵阳 550002; 2. 贵州省食品药品监督管理局, 贵阳 550003)

**[摘要]** 目的: 优选雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶的处方与制备工艺, 并对其质量与稳定性进行评价。方法: 制备雪上一枝蒿总生物碱微乳, 利用凝胶基质加入法制备雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶, 考察该制剂中指标成分含量和 pH 等, 通过离心试验、耐寒试验及耐热试验考察其稳定性。采用 HPLC 测定雪上一枝蒿甲素的含量, 流动相乙腈-pH 7.3 磷酸盐缓冲液(18:82), 检测波长 199 nm。结果: 雪上一枝蒿总生物碱微乳 86 g, 黄原胶 4.0 g, 甘油 10 g, 制成 100 g。平均粒径 18.72 nm, 多分散指数 0.663, pH 6.4, 微乳凝胶离心后无分层现象, 放入 -4 °C 和 40 °C 条件下 24 h 后外观、性状、延展性等与放入前无明显差异, 雪上一枝蒿甲素质量分数 1.79 mg·g<sup>-1</sup>。结论: 雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶的制备工艺简单, 符合凝胶局部外用制剂主要指标要求, 为该有效部位的研究与开发提供参考。

**[关键词]** 雪上一枝蒿; 总生物碱; 微乳凝胶; 雪上一枝蒿甲素; 稳定性试验; 粒径

**[中图分类号]** R283.6; R284.1; R942; O648.17 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)20-0010-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2016200010

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160830.0807.026.html>

**[网络出版时间]** 2016-08-30 8:07

## Preparation and Quality Evaluation of Shortstalk Monkshood Root Total Alkaloids in Microemulsion Gel

WU Yu-mei<sup>1</sup>, CHEN Xiao-lan<sup>1\*</sup>, TANG Hong-yan<sup>1</sup>, DAI Ya-jie<sup>1</sup>, LIN Ya-ping<sup>2</sup>, LIU Wen<sup>1</sup>

(1. School of Pharmacy, Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;  
2. Food and Drug Administration of Guizhou Province, Guiyang 550003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize prescription and preparation technology of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion gel, and investigation of its quality and stability. **Method:** Shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion was prepared, then shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion gel was prepared by gel matrix addition, the concentration of index components and pH value were evaluated, its stability was investigated by centrifugation test, cold and heat test. HPLC was adopted to determine the content of bullatine A with mobile phase consisted of acetonitrile-phosphate buffer with pH of 7.3 (18:82) and detection wavelength at 199 nm. **Result:** Shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion gel (100 g) were consisted of 86 g of microemulsion, 4 g of Xanthan gum and 10 g of glycerin. Its average particle size was 18.72 nm and polydispersity index was 0.663 with pH of 6.4. There was no stratification after centrifugation, and after stored at -4 °C and 40 °C conditions for 24 h, there were no significant difference in appearance, character, ductility by comparing with before. The content of bullatine A was 1.79 mg·g<sup>-1</sup>. **Conclusion:** The preparation process of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion gel is simple, which is in line with requirements of gel topical preparation.

**[收稿日期]** 20151029(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金地区基金项目(81260646); 贵州省贵阳中医学院院士工作站项目[黔科合院士站(2014)4013]; 贵阳中医学院博士基金项目(ZYY2011005)

**[第一作者]** 吴玉梅, 硕士, 从事中药、民族药药物新制剂及新剂型研究, Tel:15285135654, E-mail:335910887@qq.com

**[通讯作者]** \*陈晓兰, 博士, 教授, 从事中药、民族药药物新制剂及新剂型研究, Tel:0851-5652704, E-mail:chenxiaolan76@126.com

[Key words] *Aconitum brachypodum*; total alkaloids; microemulsion gel; bullatine A; stability test; particle size

雪上一枝蒿有大毒,功效祛风除湿、通利关节、消肿止痛。其生物碱类成分具有活血、镇痛、抗炎等作用<sup>[1-2]</sup>。微乳凝胶是将药物与适宜油、乳化剂、助乳化剂、水按一定比例混合制得的微乳加入凝胶基质中,形成澄清透明、均一稳定凝胶网状结构<sup>[3-5]</sup>。作为新型透皮给药载体,微乳凝胶具有微乳和凝胶的双重优点,能增加难溶性药物溶解度,提高其生物利用度,降低药物毒性、刺激性和不良反应;还能提高微乳的黏度,改善其与皮肤的黏附性和涂展性,延长药物滞留时间,克服微乳流动性强、生物黏附性差、难以涂布及皮肤刺激性等问题,从而促进水难溶性药物的释放和吸收<sup>[6-8]</sup>。前期研究发现,由于微乳黏度低,直接涂抹于动物皮肤上时容易流失,造成给药剂量不准确等。故本实验将雪上一枝蒿总生物碱微乳制备成微乳凝胶,并对其进行初步质量评价研究,为动物经皮给药后药动学试验的开展提供依据。

### 1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), JEM-2100 型透射电子显微镜(日本电子株式会社), Zetasizer Nano 系列激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司), TK-12B 型透皮扩散试验仪(上海铂凯科技贸易有限公司), AE240 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

聚氧乙烯(35)蓖麻油(cremophor EL35), 聚氧乙烯氢化蓖麻油(cremophor RH40)和泊洛沙姆 188(P188)均购于德国 BASF 公司;雪上一枝蒿甲素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110895-200404,纯度 $\geq 98\%$ ),雪上一枝蒿总生物碱(自制,质量分数 11%),肉豆蔻酸异丙酯(IPM, Alfa Aesar 公司),辛酸癸酸三甘油酯(GTCC,英国 Croda 公

司),明胶(天津市科密欧化学试剂有限公司),水溶性壳聚糖(上海金穗生物科技有限公司),卡波姆-940(上海源叶生物科技有限公司),聚丙烯酸钠 NP-700(NP-700,美国国际特品公司),羟丙甲基纤维素(HPMC,天津市光复精细化工研究所),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 雪上一枝蒿总碱微乳的制备**<sup>[9-10]</sup> 前期确定雪上一枝蒿总生物碱微乳处方为雪上一枝蒿总生物碱-IPM-cremophor EL35-无水乙醇-水(2.0%:3.3%:19.8%:9.9%:65.0%)。精密称取雪上一枝蒿总生物碱,加至处方量油相 IPM 中,加入处方量乳化剂 cremophor EL35 与助乳化剂无水乙醇,超声 10 min 使溶解后,于 25 °C,300 r·min<sup>-1</sup> 搅拌下逐滴加水,混合均匀至处方量,即得。

**2.2 空白微乳的制备** 按比例 3.3%:19.8%:9.9% 称取油相 IPM,乳化剂 cremophor EL35 与助乳化剂无水乙醇,超声 10 min 使溶解,于 25 °C,300 r·min<sup>-1</sup> 搅拌下逐滴加水(67.0%),混匀,即得。

**2.3 雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶的制备**

**2.3.1 凝胶基质的选择** 常用凝胶基质包括聚丙烯酸类、壳聚糖、纤维素类、淀粉等。选择明胶,水溶性壳聚糖,卡波姆-940, NP-700, HPMC 及黄原胶加至水中充分溶胀,结果发现卡波姆, NP-700, HPMC, 黄原胶能够形成凝胶,且涂展性较好。分别精密称取卡波姆, NP-700, HPMC 和黄原胶约 0.1 g, 加至 2.5 g 空白微乳中,充分溶胀后观察,见表 1。结果发现 NP-700 与黄原胶可充分溶胀于空白微乳中,无流动性,且黏性较好,易涂展,故选择 NP-700 与黄原胶作为凝胶基质进行进一步筛选。

表 1 雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶的基质溶胀筛选

Table 1 Matrix swelling screening of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion gel

凝胶基质	称样量/g	空白微乳/g	性状	流动性	黏性	涂展性
卡波姆-940	0.099 7	2.505 1	未溶胀完全	无	无	不好
NP-700	0.100 3	2.502 2	无色透明状固体	无	弱	良好
HPMC	0.100 2	2.499 9	未溶胀完全	有	弱	良好
黄原胶	0.100 1	2.499 5	溶胀完全,透明凝胶状	无	强	良好

采用 Franz 扩散池,扩散面积 2.92 cm<sup>2</sup>,将硝酸纤维素膜置于扩散池与接收池之间,接收液为生理盐水。供给池中加入微乳凝胶 0.3 g,保持(37 ± 1) °C 恒温水浴,磁力搅拌保持约 300 r·min<sup>-1</sup>。分别于

1,2,4,8,12,24 h 取样 0.5 mL,同时补加等量等温的生理盐水。样品溶液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,弃去前 0.1 mL 初滤液,取续滤液测定雪上一枝蒿甲素的含量,计算累积透皮吸收率(Q)<sup>[11]</sup>。

$$Q = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} V_s C_i) / W \times 100\%$$

式中  $V$  为接收池中接收液的体积,  $V_s$  为取出接收液的体积,  $C_n$  为第  $n$  个取样点测定的接收液中药物质量浓度,  $C_i$  为第  $i$  个取样点测定的接收液中药物质量浓度,  $W$  为供给池溶液中所含雪上一枝蒿甲素的质量。不同基质(4% 黄原胶和 4% NP-700)微乳凝胶中雪上一枝蒿甲素体外透皮回归方程分别为  $Q = 10.13t^{1/2} - 1.558$  ( $r = 0.9859$ ),  $Q = 7.871t^{1/2} + 0.104$  ( $r = 0.9767$ ); 稳态渗透速率 ( $J_{ss}$ ) 分别为  $(10.13 \pm 0.30)$ ,  $(7.871 \pm 0.52) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $Q_{24\text{h}}$  分别为  $(44.99 \pm 1.09)\%$ ,  $(38.15 \pm 2.35)\%$ 。故选择黄原胶为基质。

**2.3.2 保湿剂用量考察** 由于凝胶在贮存中容易失水变干,常加入一定量保湿剂来改善其保湿性。选择甘油为保湿剂,分别向雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶中加入质量分数 5%, 8%, 10%, 15% 的甘油,考察其在 6 h 内失水情况。结果表明 10% 甘油有较好的保湿效果,且微乳凝胶成型性较好。

**2.3.3 形态学观察** 取雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶适量,用水稀释 50 倍后滴在覆有支持膜的铜网上,静置 10 min 后用滤纸片吸干,滴加 2% 磷酸溶液 (pH 7.4) 于铜网上负染 3 min,自然挥干,采用透射电子显微镜在 120 000 倍下观察并摄制照片。结果显示微乳在凝胶中呈圆整的球体,且粒径大小分布均匀。表明微乳在凝胶中完整存在,黄原胶不影响微乳的结构。

**2.3.4 粒径分布** 利用 Zetasizer Nano 系列激光粒度仪测定,结果空白微乳、雪上一枝蒿总生物碱微乳、雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶的平均粒径分别为 18.00, 18.41, 18.72 nm, 多分散指数 (PDI) 分别为 0.119, 0.196, 0.663。

**2.3.5 处方工艺** 雪上一枝蒿总生物碱微乳 86 g, 黄原胶 4.0 g, 甘油 10 g, 制成 100 g。按处方称取雪上一枝蒿总碱微乳,在磁力搅拌下加入处方量黄原胶和甘油,搅拌均匀,即得。

**2.4 雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶的质量评价<sup>[12]</sup>**

**2.4.1 pH 测定** 分别取 3 批微乳凝胶 2 g,加水稀释 10 倍,利用酸度计测定,结果 pH 平均值 6.4。

**2.4.2 稳定性考察** 将雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶以  $4\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 min,结果发现微乳凝胶无分层现象,符合稳定性要求。

**2.4.3 耐寒、耐热试验** 分别取 3 批微乳凝胶适量,分别放入  $-4\ ^\circ\text{C}$  和  $40\ ^\circ\text{C}$  条件下 24 h,结果外观、

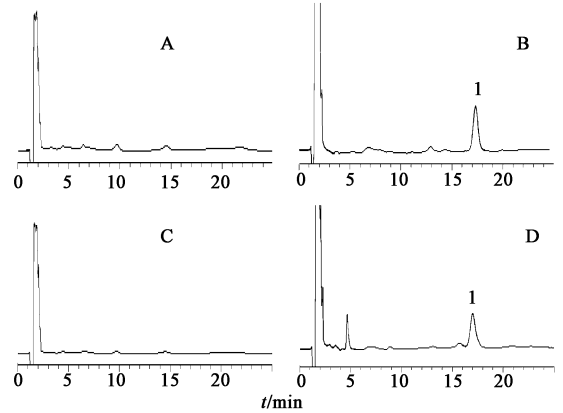
性状、延展性等与放入前无明显差异。

## 2.5 雪上一枝蒿甲素的含量测定

**2.5.1 对照品溶液的制备** 精密称取雪上一枝蒿甲素对照品适量,加甲醇溶解并制成  $0.36\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  对照品溶液。

**2.5.2 供试品溶液的制备** 分别精密称取空白微乳凝胶与雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶 0.2 g,置于 100 mL 锥形瓶中,加入甲醇 25 mL,称重,超声 30 min,取出,放至室温,补足失重。摇匀,经  $0.45\ \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,收集续滤液,即得。

**2.5.3 色谱条件<sup>[13]</sup>** Kromasil  $C_{18}$  色谱柱 ( $4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$ ),流动相乙腈-pH 7.3 磷酸盐缓冲液 (18:82),流速  $1.0\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 199 nm,柱温  $30\ ^\circ\text{C}$ ,进样量  $20\ \mu\text{L}$ 。见图 1。



A. 甲醇; B. 对照品; C. 空白样品; D. 供试品; 1. 雪上一枝蒿甲素

图 1 雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of shortstalk monkshood root total alkaloids microemulsion gel

**2.5.4 标准曲线的制备** 精密吸取适量雪上一枝蒿甲素对照品溶液于量瓶中,加甲醇分别制成质量浓度为 2.156, 4.312, 8.624, 10.780, 17.248, 21.560  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的系列对照品溶液,按 2.5.3 项下色谱条件测定。以质量浓度为横坐标,峰面积积分为纵坐标,得标准曲线方程  $Y = 22.53X + 1.075$  ( $r = 0.9999$ ),线性范围 2.156 ~ 21.560  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.5.5 精密度考察** 分别取同一对照品溶液,按 2.5.3 项下色谱条件连续进样 6 次,计算雪上一枝蒿甲素峰面积的 RSD 1.6%,表明仪器精密度良好。

**2.5.6 稳定性考察** 取同一供试品溶液适量,按 2.5.3 项下色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样分析,计算雪上一枝蒿甲素峰面积的 RSD 2.2%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

**2.5.7 重复性试验** 精密称取同一微乳凝胶 6 份,按 2.5.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.3 项下

色谱条件测定,结果微乳凝胶中雪上一枝蒿甲素质量分数  $1.80 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , RSD 1.5%,表明该方法重复性良好。

**2.5.8 回收率考察** 精密称取已知雪上一枝蒿甲素含量的雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶 9 份,每份约 0.1 g,等分为 3 组,分别加入雪上一枝蒿甲素对照品 0.144,0.180,0.216 mg,按 2.5.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.3 项下色谱条件测定,结果见表 2。

表 2 雪上一枝蒿甲素的加样回收率试验

Table 2 Recovery test of bullatine A

称样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.100 4	0.180 5	0.144	0.326 6	101.5	101.0	1.2
0.100 8	0.181 2	0.144	0.324 6	99.6		
0.100 4	0.180 5	0.144	0.327 2	101.9		
0.100 7	0.181 0	0.180	0.364 5	101.9	101.7	0.3
0.100 6	0.180 9	0.180	0.363 3	101.4		
0.100 5	0.180 7	0.180	0.363 8	101.7		
0.102 2	0.183 7	0.216	0.408 1	103.9	103.9	0.3
0.102 0	0.183 4	0.216	0.408 3	104.2		
0.101 5	0.182 5	0.216	0.406 3	103.6		

**2.5.9 样品测定** 取 3 批雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶各 3 份,每份约 0.2 g,精密称定,按 2.5.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.5.3 项下色谱条件测定,结果雪上一枝蒿甲素的质量分数分别为 1.80, 1.75, 1.82  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

### 3 讨论

在试验过程中发现,微乳直接给药时,药液会流失,造成给药剂量不准确。因此,本试验在微乳中加入适量黄原胶,制备成适合给药的凝胶,通过透射电子显微镜和激光粒度仪测定,发现微乳在凝胶中仍为微乳,凝胶基质并不影响其形态与粒径。且用于体内药动学试验时,凝胶不会流失,方便给药。前期试验曾选用羧甲基纤维素钠作为凝胶成型基质,但后经查阅文献得知,钠盐会影响微乳结构<sup>[14]</sup>,故选择了黄原胶作为微乳凝胶基质。分别考察质量分数 3%, 4%, 5% 黄原胶对雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶的成型效果影响,结果显示 4% 黄原胶所形成的微乳凝胶有较好的黏性和涂展性。

本文比较了超声法与回流法提取雪上一枝蒿总生物碱微乳凝胶中雪上一枝蒿甲素的提取率,结果显示超声提取 30 min 与回流提取 30 min 的提取率相当,鉴于超声法较回流法简便且能提取完全,故选择超声法。雪上一枝蒿总生物碱有明确的祛风除湿、通利关节、消肿止痛等作用,但经透皮给药的毒

性和疗效个体差异大。而微乳具有良好的透皮吸收特性,可提高水难溶性药物的溶解度,促进大分子药物在体内的吸收,增加其透过率;且可在角质层和真皮形成药物储库,明显缓释药物。但由于微乳不能固定药物,容易使药物从给药部位流失,所以将微乳制成微乳凝胶有利于固定药物且避免药物流失,提高给药效率。

#### [参考文献]

[1] 高邵阳,喻萍,陈武元,等. RP-HPLC 法测定雪上一枝蒿中雪上一枝蒿甲素含量[J]. 药物分析杂志,2005, 25(11):1382-1384.

[2] 朱任宏. 中国乌头之研究:雪上一枝蒿中的生物碱[J]. 化学学报,1964,30(2):139.

[3] 祝雨薇,蒋曙光,周建平. 伊曲康唑温敏微乳凝胶的研制[J]. 中国新药杂志,2013,22(16):1942-1947.

[4] Sabale V, Vora S. Formulation and evaluation of microemulsion-based hydrogel for topical delivery[J]. Int J Pharm Invest,2012,2(3):140-149.

[5] 党翔吉,魏立明,韩姗姗,等. 复方栀子凝胶的处方工艺研究[J]. 中草药,2013,44(21):2982-2987.

[6] Doktorovova S, Souto E B. Nanostructured lipid carrier-based hydrogel formulations for drug delivery: a comprehensive review [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2009,6(2):165-176.

[7] 林媛媛,刘静,王冬梅,等. Box-Behnken 试验设计法优化宝灵凝胶膏剂处方及其体外透皮特性研究[J]. 中草药,2014,45(9):1238-1244.

[8] Sahoo S, Pani N R, Sahoo S K. Microemulsion based topical hydrogel of sertaconazole: formulation, characterization and evaluation [J]. Colloids Surf B Biointerfaces,2014,120:193-199.

[9] 邹大江,黄先菊,高瑞希,等. HPLC 测定雪上一枝蒿中 3 种生物碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014,20(8):41-43.

[10] 吴玉梅,陈晓兰,林亚平,等. 雪上一枝蒿总生物碱微乳的研制与质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015,21(23):7-11.

[11] 刘月环,陆洋,杜守颖,等. 宣痹凝胶贴膏剂有效成分的透皮行为研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(9): 1202-1205.

[12] 李丽,余战锋,梁纪军,等. 裸花紫珠挥发油微乳凝胶的制备及质量评价[J]. 海峡药学,2012,24(12): 17-19.

[13] 吴玉梅,陈晓兰,魏文珍,等. 透皮促进剂对雪上一枝蒿甲素经皮渗透的影响[J]. 贵阳中医学院学报, 2015,37(5):23-26.

[14] Jadhav K R, Shetye S L, Kadam V J. Design and evaluation of micro emulsion based drug delivery system [J]. Asian J Exp Biol Sci,2010,1(3):580-591.

[责任编辑 刘德文]