

单纯形网格法优选柿叶总黄酮自微乳处方

杨露, 李小芳*, 罗佳, 刘海霞, 罗开沛, 林浩, 牟倩倩

(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, 成都 611137)

[摘要] 目的: 采用单纯形网格法优选柿叶总黄酮自微乳的处方, 为该制剂的后续研究奠定基础。方法: 在制备工艺初步筛选基础上, 以油相、乳化剂、助乳化剂的比例为考察因素, 粒径、多分散指数及载药量为评价指标, 采用单纯形网格法优选柿叶总黄酮自微乳的处方, 并测定该自微乳的黏度、溶出度等基本理化性质。结果: 柿叶总黄酮自微乳最佳处方为中链甘油三酸酯-聚氧乙烯氢化蓖麻油-乙二醇乙基醚(10:30:60); 平均粒径、多分散指数、载药量分别为 32.7 nm, 0.163, 22.42 mg·g⁻¹, 黏度低, 性质稳定, 20 min 累积溶出度达 89.09%。结论: 单纯形网格法所建数学模型预测性好, 分析准确客观, 为自微乳处方的优选提供了新方法。

[关键词] 柿叶总黄酮; 自微乳; 单纯形网格法; 芦丁; 载药量

[中图分类号] R283.6; R284.1; S854.5+1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0013-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240013

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0935.036.html>

[网络出版时间] 2016-09-29 9:35

Optimization of Formulation of Self-microemulsion Containing Total Flavonoids from Folium Kaki by Simplex Lattice Method

YANG Lu, LI Xiao-fang*, LUO Jia, LIU Hai-xia, LUO Kai-pei, LIN Hao, MOU Qian-qian

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

[Abstract] **Objective:** To optimize the formulation of self-microemulsion containing total flavonoids from Folium Kaki by simplex lattice method. **Method:** Based on screening of preparation process, taking rates of oil phase, emulsifier and co-emulsifier as factors, simplex lattice method was adopted to optimize formulation with particle size, polydispersity index and drug loading as indexes. Physicochemical properties of this self-microemulsion were determined, such as viscosity, dissolution and so on. **Result:** Optimum formulation was 10% of median chain triglyceride oil, 30% of polyoxyethylene hydrogenated castor oil, 60% of diethylene glycol ethyl ether. Average particle size, polydispersity index and drug loading of self-microemulsion containing total flavonoids from Folium Kaki were 32.7 nm, 0.163 and 22.42 mg·g⁻¹; physicochemical properties was stable, cumulative dissolution at 20 min was 89.09%. **Conclusion:** Simplex lattice method can build a mathematical models with good prediction and objective analysis, and it can provide a new idea for optimization of self-croemulsion

[收稿日期] 20160411(018)

[基金项目] 四川省科技厅科技创新苗子工程重点项目(2016RZ0037); 四川省教育厅重点项目(15ZA0094)

[第一作者] 杨露, 在读硕士, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, Tel:18381095021, E-mail:1473230184@qq.com

[通讯作者] * 李小芳, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, Tel:13808195110, E-mail:lixiaofang918@163.com

formulation.

[Key words] total flavonoids from Folium Kaki; self-microemulsion; simplex lattice method; rutin; drug loading

柿叶总黄酮含有槲皮素、芦丁、金丝桃苷等成分,具有抗氧化、抗血栓、降血脂等作用^[1-4]。以该物质为主要药效成分的成药已应用于冠心病、脑动脉硬化、心绞痛、缺血性脑血管病等的治疗,效果显著^[5-6]。但柿叶总黄酮水溶性差、生物利用度低,制约了其制剂开发与临床应用。而目前关于改善柿叶总黄酮水溶性的研究鲜有报道。自微乳在增加难溶性药物溶解能力、促进淋巴转运及膜渗透、减少首过效应等方面极具开发潜力,已被广泛应用于制剂开发中^[7-9]。处方优选是自微乳研制过程中的重要环节,目前多采用正交试验及星点设计-效应面法优选^[10-12],但存在预测性差、实验次数多、相对精度不够等问题。而单纯形网格法能客观明确地在非线性条件下分析总量恒定且相互影响的各因素与指标之间的关系,具有实验次数少、预测准确的优点,较上述方法更具可行性。故本实验利用单纯形网格法优选柿叶总黄酮自微乳处方,通过自微乳增加柿叶总黄酮的溶解度,为该有效部位的制剂开发奠定基础,同时为其他自微乳的处方优选提供参考。

1 材料

Nicomp 380ZLS 型激光粒度分析仪(美国 PSS 粒度仪公司),R/S SST2000 型软固体测试流变仪(美国 Brookfield 公司),BP61 型 1/10 万电子天平(德国 Sartorius 公司),UV-6100 型紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司),80-1 型离心沉淀机(江苏正基仪器有限公司)。

辛酸/癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol),聚山梨酯-80(tween-80),聚乙二醇 400(PEG-400)和乳化剂 OP-10(成都市科龙化工试剂厂);柿叶总黄酮[南京欣厚生物科技有限公司,UV 测得质量分数 > 85%(以芦丁计)],芦丁对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-16031813,纯度 98.0%),聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40,上海源叶生物科技有限公司),橄榄油(北京化工厂),中链甘油三酸酯(MCT,铁岭北亚药用油有限公司),二乙二醇乙基醚(THP,淮安和元化工有限公司),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 柿叶总黄酮的含量测定 精密称取芦丁对照品 10.24 mg,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇超声使溶

解并定容,得 204.8 mg·L⁻¹ 储备液,精密移取 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,加水至 5 mL,加 5% 亚硝酸钠 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;加 10% 硝酸铝 0.3 mL,摇匀,放置 6 min;加入 4% 氢氧化钠 4 mL,加水定容至刻度,摇匀,放置 15 min,以相应试剂作空白对照,于 510.5 nm 处测定吸光度 A,以质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 11.733X - 0.003$ ($r = 0.9995$),线性范围 20.48 ~ 71.68 mg·L⁻¹。

2.2 溶解度考察 精密移取油相、乳化剂及助乳化剂 5 mL,各加入过量柿叶总黄酮,超声 1 h 助溶,37 °C 水浴静置 24 h,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,移取上清液适量,加甲醇稀释至一定倍数,按 2.1 项下方法测定,结果显示柿叶总黄酮在助乳化剂中溶解效果较好,排序为 THP > 1,2-丙二醇 > PEG-400 > 甘油;在乳化剂中溶解排序为 RH-40 > tween-80 > 乳化剂 OP-10 > Labrasol;在油相中溶解效果欠佳,排序为 MCT > 油酸 > 橄榄油。

2.3 自微乳制备工艺初步筛选

2.3.1 油相乳化剂配伍 将乳化剂与油相分别按 9:1,8:2,7:3,6:4 的比例混匀,加入 100 倍量水(37 °C),300 r·min⁻¹ 恒速磁力搅拌,观察乳化情况并对其进行分级。自微乳化情况按文献[13]的标准分为 5 个级别:①乳化时间 < 1 min,呈澄清或者略泛蓝色;②乳化时间 < 1 min,稍浊,呈蓝白色;③乳化时间 1 ~ 2 min,呈不透明的亮白色液体;④乳化时间 > 2 min,色泽较暗,呈灰白色,稍带有油状;⑤乳化困难,有油滴一直存在。结果 MCT 配伍 tween-80, RH-40 及乳化剂 OP-10,油酸配伍 tween-80 或 RH-40 的相容性良好,形成①级自微乳所需乳化剂少,且乳化时间短,乳化效果较优。

2.3.2 助乳化剂 以乳化效果较好的油相/乳化剂组合,按油相-乳化剂-助乳化剂(2:4:4)加入助乳化剂,观测乳化时间,比较助乳化剂的助乳化能力。结果显示助乳化剂的加入均缩短了油相/乳化剂组合的乳化时间,其中 THP 为乳化剂时,MCT/RH-40 组合乳化完全所需时间最短(23 s),明显优于其他处方组合。故确定以 MCT 为油相,RH-40 为乳化剂,THP 为助乳化剂。

2.3.3 伪三元相图绘制 确定油相、乳化剂、助乳

化剂后,按 9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,4:6,3:7,2:8,1:9 的比例将乳化剂与助乳化剂混匀,再与油相按 9:1,8:2,7:3,6:4,5:5 的比例混匀,加入 100 倍量水(37 ℃),观察微乳形成情况并记录形成时各组分的量。以油相、乳化剂、助乳化剂为相图的 3 个顶点,通过 Origin 8.5 软件绘制伪三元相图,见图 1。微乳区域中, MCT, RH-40 及 THP 的比例分别为 10%~40%, 30%~80%, 5%~60%。

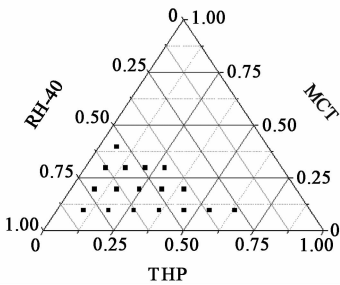


图 1 柿叶总黄酮自微乳中油相、乳化剂及助乳化剂的伪三元相
Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagrams of oil phase, emulsifier and co-emulsifier in self-microemulsion containing total flavonoids from Folium Kaki

2.4 单纯形网格法优选处方 以平均粒径、多分散指数及载药量为指标,采用 Design Expert 8.0 软件中的单纯形网格法优选柿叶总黄酮自微乳的处方。固定 MCT, RH-40 及 THP 的总比例为 100%, 参考伪三元相图结果,并考虑到自微乳中乳化剂一般用量^[14]及单纯形网格法比例约束,限定各组分比例,试验安排及结果见表 1。按表 1 中各处方比例精密称取,37 ℃下 300 r·min⁻¹ 磁力搅拌 30 min,得空白自微乳。于空白自微乳中加入过量柿叶总黄酮,混匀,超声 1 h 助溶,37 ℃水浴静置 24 h,得柿叶总黄酮自微乳。取柿叶总黄酮自微乳 0.5 g,加入 37 ℃水 50 mL,磁力搅拌至乳化完全,测定含药自微乳的平均粒径、多分散指数;精密称取柿叶总黄酮自微乳 0.5 g 于 50 mL 量瓶,加 37 ℃水定容,摇匀使之形成乳化液,于 4 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,移取上清液适量,稀释至一定倍数,按 2.1 项下方法测定柿叶总黄酮自微乳的载药量。

2.4.1 数学模型拟合 运用 Design Expert 8.0 分析表 1 中数据,以 MCT, RH-40, THP 的比例为因变量,通过模型拟合得响应方程 $Y_1 = -22.269A - 2.555B - 9.061C + 0.563AB + 1.250AC + 0.242BC - 0.027ABC$, $Y_2 = -1.230 \times 10^{-3}A - 1.201 \times 10^{-3}B + 5.354 \times 10^{-3}C + 4.147 \times 10^{-5}AB - 2.312 \times 10^{-4}AC - 1.272 \times 10^{-4}BC + 1.387 \times 10^{-5}ABC$, $Y_3 = 9.643A + 3.288B + 3.601C - 0.352AB - 0.369AC -$

表 1 柿叶总黄酮自微乳处方优选的单纯形网格法分析
Table 1 Simplex lattice method analysis for optimization of self-microemulsion containing total flavonoids from Folium Kaki formulation

No.	A MCT/%	B RH-40 /%	C THP/%	平均粒径 (Y_1) /nm	多分散指数 (Y_2)	载药量 (Y_3) /mg·g ⁻¹
1	10	45	45	22.8	0.112	12.82
2	15	35	50	75.8	0.204	19.87
3	25	45	30	53.9	0.242	13.36
4	40	30	30	196.0	0.224	10.24
5	10	60	30	21.1	0.053	18.29
6	25	45	30	58.6	0.256	13.49
7	10	60	30	21.5	0.055	18.11
8	40	30	30	198.2	0.245	10.23
9	25	30	45	218.1	0.242	12.01
10	10	30	60	34.1	0.162	22.64
11	10	30	60	32.8	0.169	22.72
12	30	35	35	150.2	0.247	16.33
13	20	40	40	78.2	0.241	23.05
14	15	50	35	26.9	0.147	19.07

$0.150BC + 0.012ABC$ 。上述响应模型的 P 均 < 0.0001 , 水平非常显著;而失拟项的 P 均 > 0.05 , 相对纯误差水平不显著。此外,各指标回归方程的确定系数 R^2 及调整 R^2 均 > 0.95 , 表明回归模型拟合较好,具有代表性,能客观准确地根据自变量值进行预测。

2.4.2 效应面分析 根据响应方程绘制效应面图,见图 2。MCT 与 RH-40 的比例对平均粒径影响较大,尤其是 RH-40。随着 RH-40 比例的增加,平均粒径逐渐减小,趋势明显;而随着 MCT 比例的增加,平均粒径则逐渐增大;而 THP 对平均粒径影响不明显。处方中 MCT 与 RH-40 比例对多分散指数影响显著,但 MCT 的影响更明显。MCT 所占比例越大,多分散指数越大;RH-40 所占比例越大,多分散指数越小;THP 所占比例越大,多分散指数越小,但其影响不如前者。THP, RH-40 及 MCT 的比例对自微乳的载药量影响均较显著。自微乳载药量总体上随着各组分比例增加呈先增多再减少的趋势,其中随着 THP 比例的增加,载药量先增多后缓慢减少再逐渐增多。

2.5 最优处方预测与验证 自微乳粒径越小、粒径分布越窄,越有利于药物溶出及吸收;而载药量越高,实际服用剂量越小,越便于临床应用^[15]。因此,

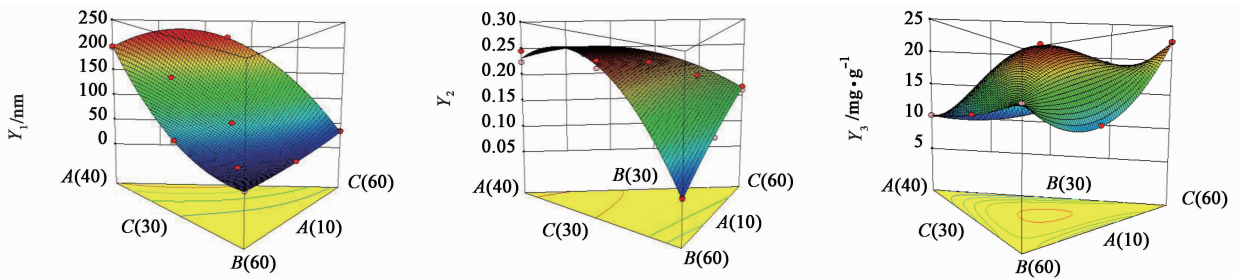


图 2 MCT, RH-40 和 THP 比例对柿叶总黄酮自微乳处方影响的效应面

Fig. 2 Surface plots of effects of factors on formulation of self-microemulsion containing total flavonoids from Folium Kaki

综合考虑 3 个指标情况,限定平均粒径 < 50 nm,多分散指数 < 0.2,载药量最大,模型预测得最优处方为 MCT-RH-40-THP(10:30:60)。根据预测的最优处方进行验证试验,结果平均粒径、多分散指数、载药量分别为 32.7 nm, 0.163, 22.42 mg·g⁻¹。与相应预测值(32.5 nm, 0.167, 22.64 mg·g⁻¹)的偏差小,说明所构建数学模型预测性良好。

2.6 理化性质考察

2.6.1 外观及黏度 柿叶总黄酮自微乳为橙黄色澄清透明油状液体。乳化后,呈淡黄色澄清透明略带蓝色乳光的液体。取含药自微乳 70 mL 于样品杯,选择 CC-48 转子,测得 18 °C 下自微乳黏度(145.86 ± 0.72) mPa·s。

2.6.2 粒径、多分散指数及 Zeta 电位 取柿叶总黄酮自微乳,加水稀释 100 倍,测得平均粒径(33.1 ± 0.51) nm,多分散指数 0.165 ± 0.01, Zeta 电位(-17.21 ± 0.04) mV。说明制备的自微乳粒径小,分布较窄,Zeta 电位绝对值较大,体系较稳定。

2.6.3 载药量 精密称取柿叶总黄酮自微乳 0.5 g,置于 50 mL 量瓶中,加水定容,摇匀使之形成乳化液,取乳化液适量,稀释至一定倍数,按 2.1 项下方法测得载药量(22.53 ± 0.29) mg·g⁻¹。

2.6.4 溶出度 精密称取柿叶总黄酮等量的自微乳和原料药,装于胶囊壳,根据 2015 年版《中国药典》溶出度测定法第二法(浆法)测定。以 900 mL 水为溶出介质,设定转速 100 r·min⁻¹,温度(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,绘制溶出曲线,见图 3。结果显示原料药在 60 min 内累积溶出度 < 30%,而自微乳的累积溶出度在 20 min 已达 89.09%,说明将柿叶总黄酮制成自微乳可有效提高其在水中的溶出速率。

3 讨论

自微乳制剂口服后可自发乳化成小粒径(1 ~

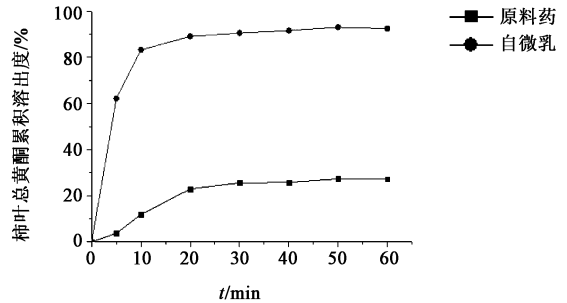


图 3 柿叶总黄酮原料药及其自微乳的溶出曲线

Fig. 3 Dissolution curves of crude drug and self-microemulsion of total flavonoids from Folium Kaki

100 nm) O/W 型微乳,促使包裹在其中的药物均匀释放、快速发挥疗效。本文制得的柿叶总黄酮自微乳粒径 < 40 nm,累积溶出 62.17% 仅需 5 min,释放时间短,利于药物快速吸收入血达到有效血药浓度,这对于心绞痛等急性病症的治疗极具临床价值。本实验中筛选了乳化剂 RH-40,乳化能力强且对柿叶总黄酮溶解效果好。研究表明该辅料还能增加药物的膜渗透性,因为其具有抑制 P-糖蛋白对药物外排或抑制肠细胞色素 P450 对药物催化的作用^[16]。提示自微乳不仅能增溶柿叶总黄酮,还有促进吸收、减少消除的作用,从生物药剂学角度考虑,该载药体系与其他固体剂型相比更具优势。

总黄酮是一类成分复杂的化合物,以 HPLC 测定其所含的单一指标成分,总黄酮的生理活性往往不能被很好地反映^[17]。而比色法是根据一类成分的结构特性进行测定,该法简便、快捷、成本低,在中药制剂研究中应用广泛^[18]。本文以芦丁为对照品,NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 显色后快速测得溶解度、载药量等指标,便于柿叶总黄酮自微乳制备工艺筛选及处方优选工作的开展。单纯形网格法是以空间图形淘汰法进行处方优选的方法^[19],通过因素间量的相互约束来影响指标,尤其适合于自微乳这类组分总量恒定的研究。

黏度是表征物体流变性质的重要指标。自微乳

体系的黏度与其乳化性能相关,一般黏度越小,越利于自动发生乳化^[20]。也有研究报道,低黏度的自微乳由于流动性好,更适宜于灌装胶囊^[21]。因此,测定黏度在评价自微乳体系乳化性能与服药顺应性方面都有重要意义。本文使用流变仪考察柿叶总黄酮自微乳的黏度,预试验发现,相比其他处方,最优处方制得的自微乳黏度更低,流动性更好,能更迅速分散于介质中。自微乳虽属热力学稳定体系,但相对固体制剂,其液体形态存在长期稳定性及贮存方面的问题。近年,已有自微乳固体制剂相关报道陆续出现^[22],在不影响自微乳释药及吸收的基础上,将其制成固体制剂,可兼顾自微乳及固体制剂的优势。

[参考文献]

[1] 周鑫堂,王丽莉,韩璐,等. 柿叶化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药,2014,45(21):3195-3203.

[2] Li C, Ma X B, Liang Y H, et al. Effects of persimmon leaf total flavonoid on enzyme of lipoprotein metabolism and antioxidation in hyperlipidemia rats [J]. Chin J Nat Med, 2011, 9(1): 74-77.

[3] 白卫娜. 柿叶总黄酮对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化病变的影响及其机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.

[4] 陈丽,梁宇红,马新博,等. 柿叶总黄酮对高脂血症大鼠脂肪肝和脂蛋白代谢相关酶的影响[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(7): 606-611.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1380-1381.

[6] 冯美干. 脑心清片治疗冠心病心绞痛的疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(30): 67-68.

[7] 陈莉,周鑫,申登峰,等. 绿原酸自微乳给药系统的处方设计与体外评价[J]. 遵义医学院学报, 2015, 38(4): 387-391.

[8] 吴晓青,陈丹,黄群. 玳玳黄酮自微乳化微丸的性能评价及总黄酮含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(24): 53-56.

[9] 朱双燕,尹蓉莉,崔名全,等. 穿心莲内酯自微乳化制剂的处方优化及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂

志, 2013, 19(8): 55-59.

[10] 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.

[11] 叶蕾,胡容峰,王晓华,等. 星点设计-效应面法优化葛根素自微乳工艺[J]. 中成药, 2014, 36(3): 514-519.

[12] 孙丹丹,徐新刚,生立嵩,等. 星点设计-效应面法优化熊果酸自微乳给药系统[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 46-50.

[13] 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.

[14] 张建. 山楂叶总黄酮固体自乳化颗粒的研究[D]. 广州: 广东药学院, 2012.

[15] 张小梅,王云红,杨荣平,等. 青蒿素自乳化制剂的设计、优化及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 59-63.

[16] Rao Z, Si L, Guan Y, et al. Inhibitive effect of cremophor RH-40 or tween 80-based self-microemulsifying drug delivery system on cytochrome P450 3A enzymes in murine hepatocytes[J]. J Huazhong Univ Sci Technology Med Sci, 2010, 30(5): 562-568.

[17] 王建壮,吕华冲. 比色法测定龙血竭总黄酮含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 55-58.

[18] 梁宇红,陈丽,吴钢,等. 柿叶黄酮缓释片的制备及其释放度测定[J]. 中成药, 2013, 35(10): 2134-2137.

[19] 崔颖,张韻慧,郭鹏. 四元单纯形网格法优化磷酸川芎嗪微乳处方[J]. 中成药, 2009, 31(1): 43-46.

[20] 李伟男,孙佳琳,王锐. 自乳化药物传递系统的研究进展及存在问题[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(19): 2261-2265.

[21] 乌兰,何伟,赵锦花,等. 一种全新合成的抗抑郁药物的自微乳化载药系统(SMEDDS)理化性质和体外释药行为研究[J]. 药学研究, 2015, 34(4): 215-218.

[22] 李芳. 基于球晶技术石杉碱甲固体自微乳的构建及淋巴转运特性研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2015.

[责任编辑 刘德文]