

# 穗花杉双黄酮自微乳化给药系统的制备及体外评价

任秋霞<sup>1,2</sup>, 王亚男<sup>1,2</sup>, 曲新艳<sup>2</sup>, 郑冰清<sup>2</sup>, 洪婷<sup>2</sup>, 周喆<sup>2\*</sup>

(1. 天津中医药大学, 天津 300193;

2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

**[摘要]** **目的:**制备穗花杉双黄酮自微乳化给药系统并对其质量评价。**方法:**通过溶解度试验、处方配伍试验及绘制伪三元相图筛选辅料种类及用量,通过比较不同处方自微乳外观、粒径及乳化时间优选处方工艺,确定穗花杉双黄酮自微乳载药量并评价其体外释放情况和稳定性。**结果:**穗花杉双黄酮自微乳最佳处方为  $m_{\text{穗花杉双黄酮}}:m_{\text{聚氧乙烯蓖麻油}}:m_{\text{油酸乙酯}}:m_{1,2\text{-丙二醇}} = 5.0:47.5:19.0:28.5$ ,乳滴呈圆球形,粒径  $(15.37 \pm 0.09)$  nm, Zeta 电位  $(-17.1 \pm 0.24)$  mV,在不同 pH 介质中自微乳制剂均能快速完全释放药物。**结论:**穗花杉双黄酮自微乳可显著提高穗花杉双黄酮的体外溶出度,且制备工艺简单、性质稳定。

**[关键词]** 穗花杉双黄酮; 自微乳化给药系统; 伪三元相图; 稳定性试验; 体外释放曲线; 载药量

**[中图分类号]** R283.6;R943 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0005-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013240005

## Preparation and *in vitro* Evaluation of Self-Microemulsifying Drug Delivery System Containing Amentoflavone

REN Qiu-xia<sup>1,2</sup>, WANG Ya-nan<sup>1,2</sup>, QU Xin-yan<sup>2</sup>, ZHENG Bing-qing<sup>2</sup>, HONG Ting<sup>2</sup>, ZHOU Zhe<sup>2\*</sup>

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for amentoflavone (AMF) and evaluate its quality. **Method:** The amount and type of excipients was screened by solubility test, compatibility of oil and surfactant and pseudo-ternary phase diagram, formulation technology of AMF-SMEDDS was optimized by comparing appearance, particle size, self-microemulsifying time and drug loading of different prescriptions, then physicochemical characteristics, *in vitro* release and stability of AMF-SMEDDS were determined. **Result:** The best prescription of AMF-SMEDDS was as following:  $m_{\text{AMF}}:m_{\text{cremophor EL-35}}:m_{\text{ethyl oleate}}:m_{1,2\text{-propanediol}} (5.0:47.5:19.0:28.5)$ ; After being diluted with water, AMF-SMEDDS consisted of small spherical droplets with the mean particle size of  $(15.37 \pm 0.09)$  nm and Zeta potential of  $(-17.1 \pm 0.24)$  mV, microemulsion could quickly complete release of AMF at different pH medium. **Conclusion:** AMF-SMEDDS could significantly improve *in vitro* dissolution of AMF, and its preparation technology was stable and simple.

**[Key words]** amentoflavone; self-microemulsifying drug delivery system; pseudo-ternary phase diagram; stability test; *in vitro* release curve; drug loading

穗花杉双黄酮是从天然植物中分离纯化得到的 3',8"-双芹菜素型双黄酮类化合物,在中药卷柏中含

量尤其丰富<sup>[1]</sup>,具有抗肿瘤<sup>[2]</sup>、抗病毒<sup>[3]</sup>、抑菌抗炎<sup>[4]</sup>、抗氧化<sup>[5]</sup>和舒张血管<sup>[6]</sup>等药理活性,前期研

**[收稿日期]** 20130520(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81172981)

**[第一作者]** 任秋霞,在读硕士,从事中药学研究,Tel:010-66931422,E-mail:ren\_qiuxia@126.com

**[通讯作者]** \*周喆,副研究员,从事中药现代化研究,Tel:010-66931423,E-mail:zhouzhe76@163.com

究发现该成分还具有预防和治疗辐射损伤的新用途<sup>[7]</sup>。但穗花杉双黄酮水溶性差,在胃肠道吸收受到限制,导致口服生物利用度低,无法充分发挥药理作用。

自微乳化给药系统是由药物、油相、乳化剂和助乳化剂组成的热力学稳定的均相体系<sup>[8]</sup>,可在胃肠蠕动或环境温度(37℃)及温和搅拌的情况下自发乳化成 O/W 型(粒径 < 100 nm)细小乳滴,依靠细小乳滴的巨大比表面积,不仅能提高难溶性药物的溶解度,还可增加细胞膜的流动性,促进药物在胃肠道的吸收,提高药物生物利用度<sup>[9-10]</sup>。此外,自微乳剂中脂质成分对胃肠道淋巴组织具有良好亲和力,能使药物由淋巴途径进入血液,克服药物首过效应<sup>[11]</sup>。本实验拟制备穗花杉双黄酮自微乳化给药系统并初步考察该制剂的理化性质和体外释放情况。

## 1 材料

2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Nano-ZS90 型马尔文激光粒度仪(英国 Malvern 公司), ZRS-8G 型智能溶出实验仪(天津大学无线电厂), Hitach H-7650 型透射电子显微镜(日本日立公司), 85-2A 型数显测速恒温磁力搅拌器(江苏省金坛市荣华市仪器制造有限公司), HZQ-F160 型全温震荡培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司), BT 125D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司), SIGMA 1-13 型离心机(德国 Sigma 实验室离心机股份有限公司), QL-901 型漩涡混合器(海口市其林贝尔仪器制造有限公司), Milli-Q Advantage A10 型超纯水器(美国 Millipore 公司)。

穗花杉双黄酮对照品(中国食品药品检定研究院,批号 111902-201001), 穗花杉双黄酮样品(纯度 > 98%, 实验室自制), 聚氧乙烯蓖麻油(EL-35, 德国 BASF 公司), 聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40, 德国 BASF 公司), 中碳链三甘酯(GTCC, 德国 BASF 公司), 肉豆蔻酸异丙酯(IPM, 阿拉丁试剂有限公司), 油酸乙酯(EO, 天津市光复精细化工研究所), 蓖麻油、油酸(OA)、聚山梨醇酯 80(Tween-80)、聚山梨醇酯 20(Tween-20)、聚乙二醇 400(PEG 400)、丙三醇、1,2-丙二醇、乙醇、异丙醇、正丁醇(国药集团化学试剂有限公司), 十二烷基硫酸钠(SDS, 美国 Amresco 公司), 乙腈、甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 穗花杉双黄酮的含量测定

**2.1.1 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.02% 三氟乙酸水溶液(40:60), 检测波长 337 nm, 柱温 30℃, 体积流量 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量 20 μL。在该色谱条件下, 穗花杉双黄酮与其他成分分离度良好, 理论塔板数以穗花杉双黄酮计算应不低于 11 000, 空白辅料不干扰测定, 方法专属性良好。

**2.1.2 标准曲线的绘制** 精密称取穗花杉双黄酮对照品 10.46 mg, 用甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 作为储备液。分别精密量取储备液制成 2.092, 10.46, 20.92, 52.30, 83.68, 104.6 gm·L<sup>-1</sup> 的系列对照品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 得回归方程  $Y = 903.823X - 20.418$  ( $r = 0.9999$ ), 表明穗花杉双黄酮在 2.092 ~ 104.6 mg·L<sup>-1</sup> 与峰面积呈良好线性关系。

**2.2 穗花杉双黄酮溶解度的测定** 称取过量的穗花杉双黄酮原料药, 分别加入水、油、表面活性剂(10%水溶液)和助表面活性剂中, 于 60℃水浴超声 1 h 至药物不再溶解, 气浴恒温振荡 48 h, 室温静置 12 h, 于 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液用甲醇稀释一定倍数后, 按 2.1.1 项下色谱条件测定。结果表明穗花杉双黄酮在水中溶解度仅 (1.29 ± 0.79) mg·L<sup>-1</sup>; 在油相中溶解度均较差, 顺序为蓖麻油 > GTCC > IPM > EO > OA; 在乳化剂中溶解度顺序为 EL-35 > RH-40 > Tween-80 > Tween-20; 在助乳化剂中溶解度顺序为 PEG400 > 1,2-丙二醇 > 乙醇 > 异丙醇 > 丙三醇 > 正丁醇。

**2.3 不同油相与乳化剂的配伍** 分别将对穗花杉双黄酮溶解度较好的乳化剂(EL-35, RH-40)与油相(蓖麻油, GTCC, IPM, EO, OA)以不同质量比(9:1, 8:2, 7:3)混合, 37℃水浴磁力搅拌均匀后观察混匀程度, 加入 50 倍量水磁力搅拌乳化, 目测法考察乳化情况。目测标准<sup>[12]</sup>将乳化情况分为 5 个等级: A 乳化时间 < 1 min, 溶液澄清或微泛蓝色; B 乳化时间 < 1 min, 略微显浊, 呈蓝白色; C 乳化时间 1 ~ 2 min, 呈亮白色不透明液体; D 乳化时间 > 2 min, 色泽暗, 显灰白色, 略带油状; E 难乳化, 一直有油滴存在。结果见表 1, 表明油酸乙酯与不同乳化剂的乳化情况明显优于其他油相, 表面活性剂中 EL-35 的乳化能力略强于 RH-40, 结合溶解度试验, 最后选择 EO 为油相, EL-35 为乳化剂。

**2.4 伪三元相图的绘制** 将 EL-35 分别与助乳化剂(PEG400 和 1,2-丙二醇)以 9:1, 8:2, 7:3, 6:4,

表1 穗花杉双黄酮自微乳中油相和乳化剂的配伍考察( $n=3$ )

| 乳化剂   | 乳化剂-油相 | 蓖麻油 | OA | EO | GTCC | IPM |
|-------|--------|-----|----|----|------|-----|
| EL-35 | 9:1    | A   | C  | A  | D    | A   |
|       | 8:2    | B   | D  | A  | D    | B   |
|       | 7:3    | B   | D  | A  | D    | B   |
| RH-40 | 9:1    | D   | C  | A  | B    | A   |
|       | 8:2    | E   | D  | A  | C    | B   |
|       | 7:3    | E   | D  | B  | C    | B   |

5:5,4:6,3:7,2:8,1:9的比例混匀,再与EO以不同比例搅拌混匀得到一系列溶液。取适量加至50倍量水(37℃)中,缓慢磁力搅拌,观察能否形成微乳(溶液澄清、微泛蓝光或略浊呈蓝白色),记录形成微乳的临界点各组分的质量分数。以乳化剂、助乳化剂和油相作为相图的3个顶点,用Sigmaplot软件绘制伪三元相图,比较自微乳区域的大小,结果见图1,图中黑色区域为自微乳区域。

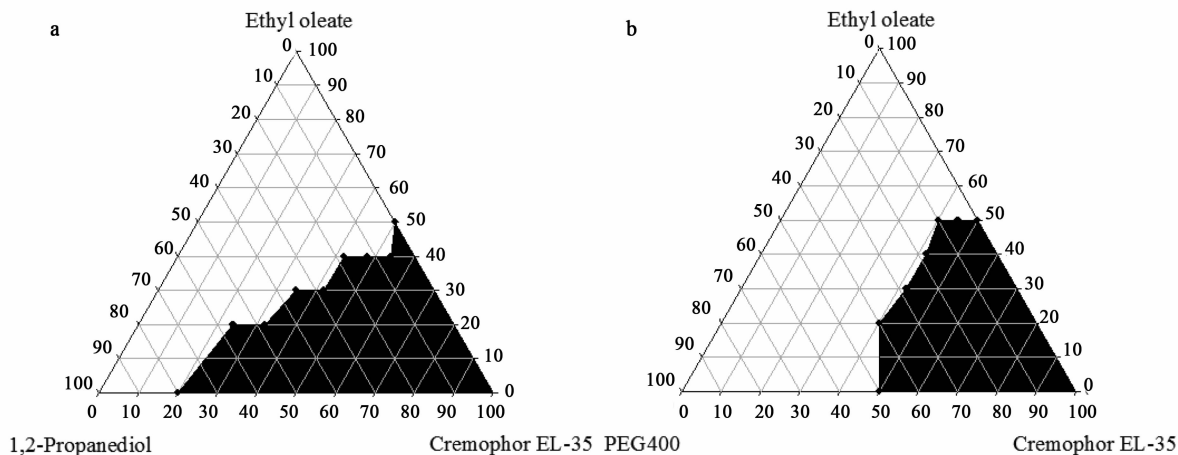


图1 穗花杉双黄酮自微乳以不同物质组合形成的三元相

由图1可知,当助乳化剂为1,2-丙二醇时,自微乳区域较大;同时试验过程中发现,以PEG400为助乳化剂制备的自微乳处方在加入穗花杉双黄酮后会变得浑浊,故选择1,2-丙二醇作为助乳化剂。

## 2.5 处方优化

**2.5.1 空白自微乳化给药系统处方的确定** 根据伪三元相图的自微乳区域,将油相质量分数设定为20%和25%共2个水平,在2个水平下分别改变表面活性剂和助表面活性剂的比例,配制一系列空白自微乳化给药系统,磁力搅拌混合均匀后观察溶液是否澄清。将得到的澄清溶液用50倍量水稀释乳化,测定平均粒径并记录乳化时间,见表2。结果显示在油相质量分数固定的条件下,随着助表面活性剂用量的增加,自微乳稳定性降低,乳化速度加快,但乳液粒径变化不大。综合考虑,确定空白自微乳化给药系统处方为  $m_{\text{EL-35}} : m_{1,2\text{-丙二醇}} : m_{\text{油酸乙酯}} = 50 : 30 : 20$ 。

**2.5.2 载药量的确定** 制备载药量分别为0,0.5%,1.0%,2.5%,5.0%,8.0%,10.0%的穗花杉双黄酮自微乳各3份,用50倍量水稀释乳化后测定微乳粒径并记录乳化时间,粒径变化见图2。结果表明,载药量在0%~5.0%,随着载药量的增加粒

表2 不同空白自微乳化给药系统处方的稳定性、粒径和自乳化时间( $n=3$ )

| EL-35:1, 2-丙二醇 | 油相/% | 外观 | 乳化时间/s      | 粒径/nm        |
|----------------|------|----|-------------|--------------|
| 30:50          | 20   | -  | #           | #            |
| 40:40          | 20   | -  | #           | #            |
| 50:30          | 20   | +  | 80 ± 17.3   | 22.26 ± 0.24 |
| 60:20          | 20   | +  | 167 ± 80.83 | 22.74 ± 0.57 |
| 30:45          | 25   | -  | #           | #            |
| 40:35          | 25   | -  | #           | #            |
| 50:25          | 25   | +  | 113 ± 41.63 | 24.40 ± 1.63 |
| 60:15          | 25   | +  | 148 ± 2.89  | 23.49 ± 1.45 |

注:“-”表示溶液混浊、分层,“+”表示溶液澄清透明,“#”表示未检测。

径减小,当载药量>5.0%后粒径急剧增大;随着载药量的增大乳化速率提高,当载药量>2.5%时,乳化时间均<1min。综合考虑,处方确定为穗花杉双黄酮,EL-35,EO,1,2-丙二醇质量分数依次为5.0%,47.5%,19.0%,28.5%。

## 2.6 质量评价

**2.6.1 外观和形态** 空白自微乳化给药系统的外

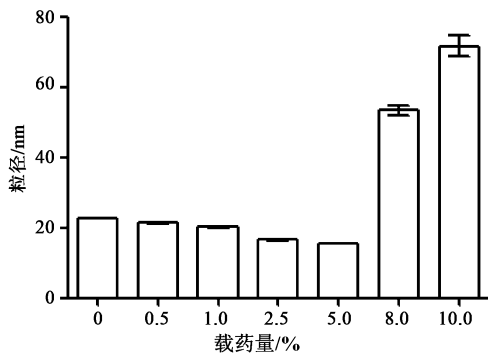


图 2 不同载药量穗花杉双黄酮自微乳的乳化粒径( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
观为澄清透明液体,穗花杉双黄酮自微乳为澄清透明的黄色液体。取穗花杉双黄酮自微乳加水稀释 50 倍,取适量滴到喷碳铜网上,用 2% 磷钨酸负染,于透射电镜下观察并拍照,见图 3,表明制备的微乳呈球形,且分布较为均匀。

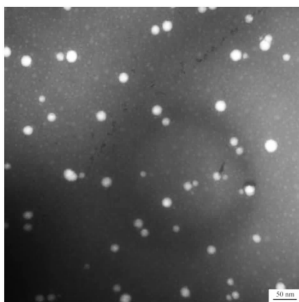


图 3 穗花杉双黄酮自微乳透射电镜照片( $\times 40\ 000$ )

2.6.2 粒径和 Zeta 电位测定 用 Malvern 激光粒度分析仪测定稀释 50 倍后穗花杉双黄酮微乳液的粒径和 Zeta 电位,结果见图 4,5。显示 25 °C 条件下测得微乳粒径( $15.37 \pm 0.09$ ) nm ( $n=3$ ),且分布范围较窄,Zeta 电位 - ( $17.1 \pm 0.24$ ) mV ( $n=3$ )。

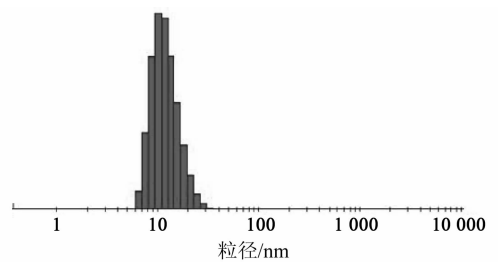


图 4 穗花杉双黄酮自微乳的粒径测定

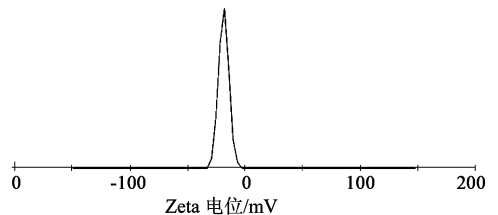
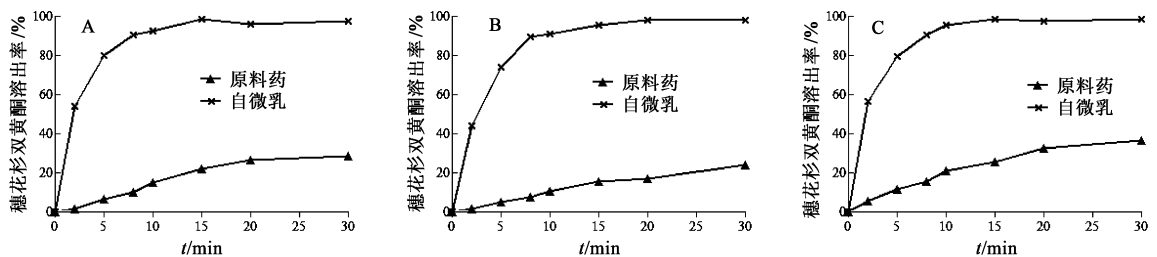


图 5 穗花杉双黄酮自微乳的 Zeta 电位测定

2.6.3 体外释放性质的考察 采用直接释药法对优化的自微乳处方进行体外释药速率考察。由于穗花杉双黄酮溶解性较低,在模拟体内液体环境时介质一般难以达到漏槽条件,故在溶出介质中加入了 0.5% SDS,以满足漏槽条件<sup>[13]</sup>。将自微乳药液和原料药分别装入胶囊壳中(每粒约含穗花杉双黄酮 10 mg),取自微乳和原料药样品照《中国药典》2010 年版附录 XC 第二法(浆法)<sup>[14]</sup>测定,分别以含 0.5% SDS 的水,0.1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸和 pH 6.8 的 PBS 各 900 mL 为溶出介质,转速 50 r·min<sup>-1</sup>,温度 37 °C,分别于 1,2,5,8,10,15,20,30 min 各取样 5 mL,并补充相应空白介质 5 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按 2.1.1 项下色谱条件测定,计算累积释药率,以考察不同 pH 的溶出介质对穗花杉双黄酮释药速率的影响,溶出曲线见图 6。



A. 水; B. 盐酸; C. PBS 缓冲液

图 6 穗花杉双黄酮自微乳与穗花杉双黄酮原料药在不同溶出介质中体外溶出曲线

由图 6 可知,原料药在不同溶出介质中 30 min 内的累积释药量均 < 40%,而自微乳制剂在 10 min 内累积释药量即达 90%,药物基本完全溶出,并且不受介质 pH 影响,说明制备的自微乳制剂能显著提高穗花杉双黄酮的释放速率。

## 2.7 稳定性考察

2.7.1 影响因素试验 取适量穗花杉双黄酮自微乳于西林瓶中,密封后分别置于高温(60,40 °C)、低温(4 °C)、相对湿度(90% ± 5%)、光照(4 500 ± 500) lx 条件下,分别于第 5,10 天取样,与 0 d 进行

比较,考察其外观、自微乳后粒径及药物含量的变化。结果显示制备的穗花杉双黄酮自微乳外观无明显变化,无药物析出,无分层现象,主药含量及乳化后粒径均无明显变化。

**2.7.2 常温试验** 将装有穗花杉双黄酮自微乳样品的带塞西林瓶,密封后置于室温( $25 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 分别放置1,2,3个月,与0月进行比较,结果显示样品外观性状、主药含量及乳化后粒径均无明显变化。

### 3 讨论

穗花杉双黄酮是一种难溶性化合物,在水中溶解度仅( $1.29 \pm 0.79$ ) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,在体内释放受到极大限制,制成自微乳制剂有利于提高药物释放与吸收,提高药物疗效。但组成自微乳制剂的辅料对药物必须具有足够大的溶解能力<sup>[15]</sup>,在油相筛选时发现,虽然蓖麻油对穗花杉双黄酮的溶解性最好,但油相与乳化剂的配伍试验表明其乳化效果较差,形成的微乳不稳定,故选择了乳化性能相对较好的EO作为油相。由图1可知,自微乳区域中油相的质量分数可达 $>40\%$ ,但自微乳中油相比比例高会降低乳化剂的用量和自微乳系统的黏度,同时油相比比例太接近自微乳区临界点容易受外界环境的干扰,导致自微乳系统不稳定,故选定油相质量分数的水平为20%和25%。参照《中国药典》2010年版附录XC浆法考察穗花杉双黄酮自微乳的体外释放行为,由于穗花杉双黄酮自微乳遇水后会快速形成微乳,测得的药物是包含于乳滴中和游离药物的总和,故试验中释放速率只间接代表自微乳的快速分散能力,但自微乳制剂的释放速度和程度均显著提高。

**[致谢]** 杭州天龙药业有限公司冯冰博士和军事医学科学院李鲁老师提供本试验所用穗花杉双黄酮。

### [参考文献]

[1] 刘海青,林瑞超,冯芳,等. HPLC法测定卷柏类药材中双黄酮成分的含量[J]. 药物分析杂志,2002,22(5):393.

[2] JING Y,ZHANG G G,MA E L, et al. Amentoflavone and the extracts from *Selaginella tamariscina* and their anticancer activity [J]. Asian J Tradit Med, 2010, 15(6):226.

[3] Wilsky S,Sobotta K,Wiesener N, et al. Inhibition of fatty acid synthase by amentoflavone reduces coxsackievirus

B3 replication[J]. Arch virol,2012,157(2):259.

[4] Lee E,Shin S,Kim J K, et al. Anti-inflammatory effects of amentoflavone on modulation of signal pathways in LPS-stimulated RAW264.7 cells[J]. Bull Korean Chem Soc,2012,33(9):2878.

[5] Ilkay E O, Altun M L, Betül S Y, et al. Anti-acetylcholinesterase and antioxidant assets of the major components ( salicin, amentoflavone, and chlorogenic acid) and the extracts of *Viburnum opulus* and *Viburnum lantana* and their total phenol and flavonoid contents [J]. J Med Food,2011,14(4):434.

[6] YIN M H, KANG D G, Choi D H, et al. Screening of vasorelaxant activity of some medicinal plants used in oriental medicines [J]. J Ethnopharmacol, 2005, 99(1):113.

[7] 王升启,郑晓珂,冯卫生,等. 阿曼托双黄酮及其衍生物在预防及治疗辐射损伤中的用途[P]. 中国:CN 101830877 A,2010-09-15.

[8] 蒋楠,李晔,陈钢,等. 鸦胆子油自微乳的制备及溶出度考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(9):45.

[9] GAO P, Akrami A, Alvarez F, et al. Characterization and optimization of AMG 517 supersaturatable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS) for improved oral absorption [J]. J Pharm Sci, 2008, 98(2):516.

[10] Hong J Y, Kim J K, Song Y K, et al. A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption [J]. J Control Release, 2006,110(2):332.

[11] 何琳,刘意,郑冬梅,等. 盐酸小檗碱自微乳剂的处方设计及体外评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):26.

[12] Khoo S M, Humberstone A J, Porter C J H, et al. Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine [J]. Inter J Pharm,1998,167(1):155.

[13] 董文雪,何军,杨亚妮. 自微乳释药系统研究进展[J]. 中国医药工业杂志,2011,42(12):948.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录XC.

[15] 李蓉蓉,王小利,郭申娥,等. 坎地沙坦酯自微乳的制备及其体外评价[J]. 中国新药杂志,2012,21(2):170.

[责任编辑 仝燕]