

# 银杏内酯 B 自微乳的处方优选及质量、安全性评价

杨鹏飞<sup>1,2</sup>, 丁兰萍<sup>1,2</sup>, 蔡晓蕾<sup>1,2</sup>, 鲁传华<sup>1,3\*</sup>, 陈卫东<sup>1,3\*</sup>

- (1. 安徽中医学院药学院药代动力学研究室, 合肥 230038;
2. 安徽省中药制剂工程技术研究中心, 合肥 230038;
3. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 合肥 230038)

**[摘要]** 目的: 优化银杏内酯 B(GB) 自微乳药物传递系统(SMEDDS) 的处方, 并初步评价其质量和安全性。方法: 以微乳粒径、Zeta 电位、药物平衡溶解度为指标, 油相质量分数、混合表面活性剂比例、表面活性剂和助表面活性剂的比例为考察因素, 采用伪三元相图结合星点设计-效应面法优选 GB-SMEDDS 的处方工艺。采用 HPLC 测定 GB 含量, 并对自微乳的 pH、形态学、粒径分布、Zeta 电位、稳定性及部分安全性等进行评价。结果: 最优处方为辛酸/癸酸三甘油酯、聚氧乙烯 35 蓖麻油、卵磷脂、乙醇质量比 25.99:39.47:9.87:24.67, 载药量  $(24 \pm 1.4) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 粒径 30 ~ 60 nm, GB-SMEDDS 于 1 周内常温、高温及低温状态下稳定性良好, 通过溶血试验、血管刺激、急性毒性评价给药安全性良好。结论: 星点设计-效应面法适用于 GB-SMEDDS 的处方优化, 所建模型预测性良好, 且 GB 自微乳制备工艺简单、性质稳定、质量易控。

**[关键词]** 银杏内酯 B; 自微乳给药系统; 星点设计-效应面法; 质量评价

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0026-08

**[doi]** 10.11653/syfy2013120026

## Optimization of Prescription and Evaluation of Quality and Security of Ginkgolide B Self-microemulsifying Drug Delivery System

YANG Peng-fei<sup>1,2</sup>, DING Lan-ping<sup>1,2</sup>, CAI Xiao-lei<sup>1,2</sup>,  
LU Chuan-hua<sup>1,3\*</sup>, CHEN Wei-dong<sup>1,3\*</sup>

**[收稿日期]** 20121128(005)

**[第一作者]** 杨鹏飞, 硕士, 药师, 从事药物制剂方向研究, Tel:0551-5136810, E-mail:89246681@qq.com

**[通讯作者]** \* 陈卫东, 博士, 教授, 从事临床药学研究, Tel:0551-5136810, E-mail:anzhongdong@126.com;

\* 鲁传华, 教授, 从事生物材料、制剂学研究, Tel:0551-5169146, E-mail:lchchem@126.com

上, 故不能有效利用大豆的营养成分, 不利于产酶, 导致酶活力降低<sup>[10]</sup>。因此, 确定培养基加水量 60%。

### [参考文献]

- [1] 钱丽丽, 张永忠, 左锋. 提高大豆异黄酮活性作用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2005, 26(3):180.
- [2] 李华, 高丽.  $\beta$ -葡萄糖苷酶活性测定方法的研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(2):107.
- [3] 井乐刚, 张永忠. 微生物发酵制备大豆异黄酮的研究进展[J]. 微生物学通报, 2003, 30(2):86.
- [4] 胡志苹, 黄志华, 吴亮亮, 等. 染料木素抗大鼠心肌肥厚作用及其与 ATPase 活性的关系[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):165.
- [5] 龙军, 袁冬平, 周玲玲, 等. 大豆异黄酮对大鼠海马神经干细胞分化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,

2011, 17(17):168.

- [6] 张亮, 王清章, 李洪, 等. 莲子  $\beta$ -葡萄糖苷酶提取及酶学性质研究[J]. 食品科技, 2008, 33(6):142.
- [7] 叶海梅. 米曲霉 FZ58 $\beta$ -葡萄糖苷酶固体发酵优化及酶学特性的研究[D]. 福州: 福建师范大学, 2008.
- [8] 吕晓莲, 樊利青, 贾建会, 等. 大豆异黄酮糖苷转化酶产生菌株的筛选及培养条件的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(10):56.
- [9] 王海燕, 孙建义, 刘福柱, 等. 黑曲霉  $\beta$ -葡萄糖苷酶水解大豆异黄酮的最佳参数[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(2):42.
- [10] 孙丽艳, 崔洪斌, 赵琪. 发酵罐制备大豆异黄酮糖苷转化酶( $\beta$ -糖苷酶)条件的研究[J]. 大豆通报, 2006(3):17.

[责任编辑 仝燕]

(1. *Pharmacokinetics Laboratory, College of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China*; 2. *Anhui Province Engineering Research Center of Chinese Materia Medica Preparations, Hefei 230038, China*; 3. *Anhui Province Key Laboratory of Research and Development of Chinese Materia Medica, Hefei 230038, China*)

**[ Abstract ] Objective:** To optimize prescription of ginkgolide B (GB) self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) and evaluate its quality and security. **Method:** With particle size, Zeta potential, equilibrium solubility as indexes, the mass fraction of oil phase, ratio of surfactant and co-surfactant, rate of the mixed surfactant as factors, pseudo-ternary phase diagram and central composite design and response surface method were adopted to optimize prescription. The content of GB was determined by HPLC. Morphology, pH value, particle size distribution, Zeta potential, stability and some security of GB-SMEDDS were studied. **Result:** Optimal prescription was GTCC/EL-35/lecithin/ethanol (25.99:39.47:9.87:24.67), while the drug loading and particle size were  $(24 \pm 1.4) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  and 30-60 nm, respectively. The preparation was stable under different temperature for a week, including 25, 40, 4,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Stability of prepared GB-SMEDDS was good in the state of normal temperature, high temperature and low temperature within 1 week, its had good security. **Conclusion:** Central composite design-response surface method had successfully built a model for optimizing formulation of GB-SMEDDS optimized preparation technology of GB-SMEDDS was simple, repeatable and stable with good prediction.

**[ Key words ]** ginkgolide B; self-microemulsifying drug delivery system; central composite design-response surface method; quality evaluation

自微乳化药物传递系统(SMEDDS)是由表面活性剂与各系统相结合的作用自发形成的乳剂<sup>[1]</sup>。当亲水性表面活性剂(HLB > 12)含量较高( $\geq 40\%$ )或表面活性剂加上助乳化剂时,能在轻微搅动下制得粒径 < 100 nm 的 SMEDDS<sup>[2]</sup>。

银杏内酯 B(GB)是银杏提取物的有效成分之一,研究表明 GB 及其衍生物对脑缺血再灌注损伤具有一定的神经保护作用<sup>[3-4]</sup>。另外,GB 可透过血脑屏障(BBB)<sup>[5]</sup>,对于某些慢性中枢神经系统退行性疾病具有一定治疗作用。但由于水溶性差、半衰期短、生物利用度低等性质,阻碍了其临床应用。SMEDDS 可提高难溶性药物的溶解度,并具有一定的靶向及缓释作用<sup>[6]</sup>。本实验利用伪三元相图推出自变量取值范围,利用星点设计-效应面法<sup>[7]</sup>优化处方,以制备较高载药量的 GB-SMEDDS,为 GB 的临床应用推广提供实验参考。

## 1 材料

岛津 LC-15C 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),AB135-S 型电子分析天平(德国 Mettler Toledo 公司),Zetasizer3000HS 型激光粒度分度与 Zeta 电位分析仪(英国 Malvern 仪器公司),JEM-2100 型透射电镜(日本电子)。

银杏内酯 B(GB,纯度  $\geq 98\%$ ,中国人民解放军

总医院科技开发中心),GB 对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110863-200806),辛酸/癸酸三甘油酯(GTCC,北京凤礼精求商贸有限责任公司),聚氧乙烯(35)蓖麻油(EL-35,德国 Basf 公司),注射用卵磷脂(安徽丰原药业股份公司),注射用大豆油、油酸乙酯(EO)、聚山梨酯 80(Tween 80)、聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40)、聚乙二醇 400(PEG 400)均购于国药集团化学试剂有限公司,水为娃哈哈纯净水,其他试剂均为分析纯。家兔,雌雄各半(2.0 ~ 2.5 kg)、昆明种小鼠,雌雄各半(20  $\pm$  2)g 均购自安徽医科大学实验动物中心,合格证号皖医实动准字 01 号)。

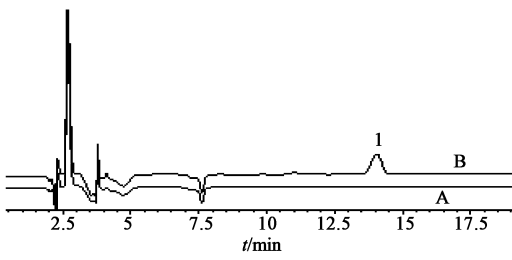
## 2 方法与结果

### 2.1 银杏内酯 B 含量测定

**2.1.1 吸收波长的确定** 用甲醇配制  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GB 对照品溶液及相应处方浓度的辅料溶液,于 200 ~ 400 nm 进行紫外扫描,结果表明 GB 在 225 nm 处有最大吸收。

**2.1.2 色谱条件** COSMOSIL C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相四氢呋喃-甲醇-水(10:25:65),流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 225 nm,进样量 20  $\mu\text{L}$ ,见图 1。

**2.1.3 标准曲线** 用甲醇制备  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 GB



A. 空白 SMEDDS; B. 供试品; 1. GB

图 1 银杏内酯 B 自微乳药物传递系统 HPLC

对照品储备液,精密移取储备液适量,分别配制 1, 10, 20, 40, 60, 80, 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的系列对照品溶液,进样,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 608\ 255X + 14\ 195$  ( $r = 0.999\ 6$ ),表明 GB 在 1 ~ 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  线性关系良好。

**2.1.4 精密度试验** 配制高、中、低 3 组质量浓度分别为 1, 50, 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 GB 对照品溶液,日内重复进样 5 次,连续测定 5 d,结果日内精密度 RSD 依次为 1.86%, 1.27%, 0.85%, 日间精密度 RSD 分别为 1.42%, 1.75%, 0.65%, 表明该方法精密度良好。

**2.1.5 回收率试验** 按处方称取辅料,分别加入 80%, 100%, 120% 的 GB 对照品储备液,混合均匀,精密移取适量置于量瓶内定容,分别配置 (16, 20, 24  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 供试液,平行操作 5 份,结果高、中、低质量浓度的平均回收率依次为 99.24%, 98.70%, 98.58%, RSD 分别为 0.94%, 1.19%, 0.79%。

**2.2 处方工艺优选**

**2.2.1 GB 自微乳的制备** 称取处方量辅料,于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 100  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  恒温搅拌器中使其熔融,加入 GB, 搅拌均匀呈透明溶液,即得。

**2.2.2 GB 的溶解度考察** 分别取各种辅料 1 g 置试管中,依次加入 GB 制备过饱和溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  搅拌 48 h, 3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清液过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,用甲醇稀释,采用 HPLC 测定,结果 GB 在 GTCC, 大豆油, EO, Tween 80, EL-35, RH-40, 1, 2-丙醇, 乙醇, PEG 400 中的溶解度分别为

(0.56  $\pm$  0.07), (0.14  $\pm$  0.03), (0.33  $\pm$  0.50), (45.23  $\pm$  3.64), (47.36  $\pm$  0.52), (24.54  $\pm$  0.23), (10.37  $\pm$  0.27), (33.58  $\pm$  3.45), (23.45  $\pm$  4.42), 故选择 GTCC 为油相,处方初步筛选为 GTCC + EL-35/Tween 80 + Ethanol。

**2.2.3 伪三元相图筛选自微乳区域**

**2.2.3.1 表面活性剂的选择** 在室温条件下以 GTCC 为油相, EL-35 或 Tween 80 分别为表面活性剂,乙醇为助乳化剂,绘制空白伪三元相图。油相与表面活性剂分别按 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 混合,加水得澄清、透明、淡蓝色乳光微乳,见图 2。结果发现,以 EL-35 为表面活性剂时乳化区域 > Tween 80; 乳化过程中视觉特性显示,油相与表面活性剂比例差别较大时, Tween 80 易出现分层现象。EL-35 透过血脑屏障能力较强,临界胶束浓度 (0.009%) 相对较低,对疏水性药物溶解度较好<sup>[8]</sup>; 另外,目前临床上已报道 EL-35 可逆转 P-糖蛋白多药耐药性 (MDR)<sup>[9]</sup>, 被广泛用口服及注射制剂中<sup>[10-11]</sup>, 故选取 EL-35 为表面活性剂。

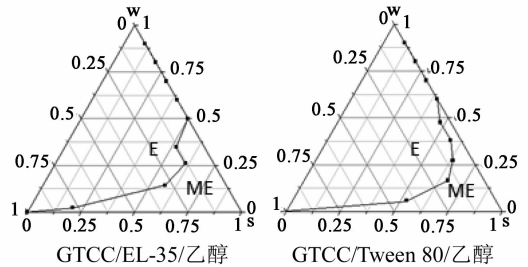


图 2 表面活性剂对 SMEDDS 的影响伪三元相

**2.2.3.2 表面活性剂与助表面活性剂的质量比 ( $K_m$ ) 考察**  $K_m$  按 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 混匀, 分别与油相以质量比 1:9 ~ 9:1 滴定, 以体系由澄清透明变浑浊时为临界点, 利用 Origin 7.5 软件绘制伪三元相图, 结果见图 3。

**2.2.3.3 混合表面活性剂的比例** 自微乳的形成需大量表面活性剂, 为减少辅料带来的低毒性, 加入卵磷脂制备混合表面活性剂, 既能提高注射剂安全

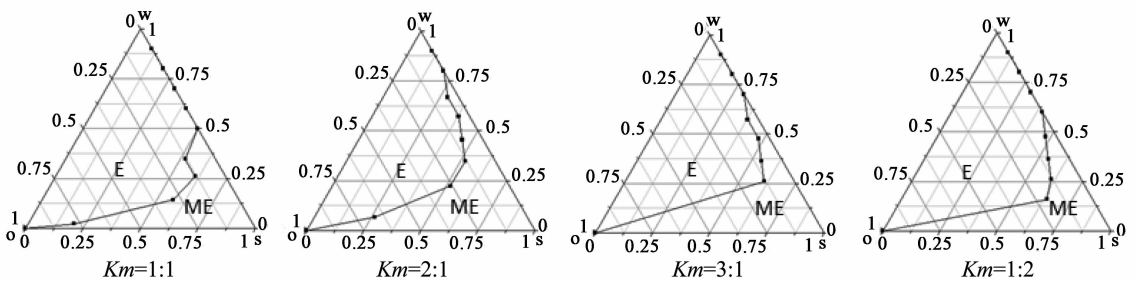


图 3 表面活性剂与助表面活性剂的质量比对 SMEDDS 的影响伪三元相

性又能增加表面活性剂的表观增溶能力,且有较快的消除率<sup>[12]</sup>。以 GTCC 为油相,乙醇为助表面活性剂,将 EL-35 与卵磷脂分别以 2:1,3:1,4:1,5:1 作为混合表面活性剂,绘制伪三元相图。

由图 4 可知,EL-35 与卵磷脂为 4:1 时乳化区域

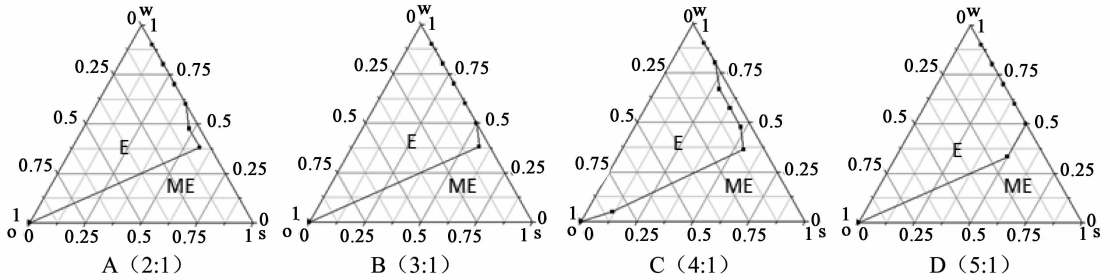


图 4 混合表面活性剂比例对 SMEDDS 的影响伪三元相

**2.2.4 星点设计-效应面分析** 在上述试验基础上,选择油相质量分数、混合表面活性剂的比例、 $K_m$  为考察因素,进行三因素五水平的星点设计试验,因素水平见表 1。以微乳粒径、Zeta 电位及药物平衡溶解度为评价指标,试验安排及结果见表 2。

表 1 银杏内酯 B 自微乳药物传递系统星点设计试验因素水平

水平	$X_1$ 油相质量分数 /%	$X_2$ 混合表面 活性剂的比例	$X_3$ 表面活性剂- 助表面活性剂
-1.732	20	3	2
-1	21.113 2	3.422 6	2.111 3
0	25	4	2.5
1	27.886 8	4.577 4	2.788 7
1.732	30	5	3

利用 Statistic 6.0 统计软件,固定一个因素,将各效应对两因素各水平进行多元线性回归和多项式方程拟合,结果分别为  $Y_1 = -20\ 457.7 + 1\ 600.384 X_1 + 1\ 675.085 X_2 + 6\ 703.217 X_3 - 123.316 X_1 X_2 - 495.406 X_1 X_3 - 461.409 X_2 X_3 - 30.231 X_1^2 + 77.675 X_2^2 + 50.57 X_3^2 + 17.171 X_1 X_2 X_3 + 2.04 X_1^2 X_2 + 8.81 X_1^2 X_3 - 2.217 X_1 X_2^2$  ( $r=0.999\ 5$ ),  $Y_2 = 104.633 + 10.544 X_1 + 151.222 X_2 - 432.391 X_3 - 18.256 X_1 X_2 + 29.355 X_1 X_3 + 22.249 X_2 X_3 - 0.461 X_1^2 + 7.983 X_2^2 - 0.981 X_3^2 - 0.411 X_1 X_2 X_3 + 0.454 X_1^2 X_2 - 0.547 X_1^2 X_3 - 0.369 X_1 X_2^2$  ( $r=0.932\ 9$ ),  $Y_3 = -6.025 + 2.683 X_1 + 14.76 X_2 + 4.419 X_3 - 0.665 X_1 X_2 - 1.391 X_1 X_3 + 0.114 X_2 X_3 - 0.027 X_1^2 - 1.944 X_2^2 + 2.698 X_3^2 - 0.003 X_1^2 X_2 - 0.028 X_1^2 X_3 - 0.101 X_1 X_2^2$  ( $r=0.871\ 8$ ),

最大。加入卵磷脂具有调节表面活性剂 HLB 值作用,混合表面活性剂 HLB 在 11 左右使微乳更易形成。另外,FAO/WHO 对卵磷脂每日允许摄入量未作限制性规定,公认安全性较高。

表 2 银杏内酯 B 自微乳药物传递系统星点设计试验安排

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1$ 粒径/nm	$Y_2$ Zeta 电位 /mV	$Y_3$ 平衡溶 解度/ $g \cdot L^{-1}$
1	21.11	3.42	2.11	23.54	-11.4	24.82
2	27.89	3.42	2.11	42.21	-13.9	22.69
3	21.11	4.58	2.11	45.95	-13.5	26.02
4	27.89	4.58	2.11	26.44	-14.8	23.79
5	21.11	3.42	2.79	78.51	-21.6	25.60
6	27.89	3.42	2.79	74.22	-18.8	23.39
7	21.11	4.58	2.79	22.88	-13.0	26.89
8	27.89	4.58	2.79	23.42	-11.2	24.58
9	20.00	4.00	2.50	72.24	-13.5	26.37
10	30.00	4.00	2.50	109.04	-11.3	23.08
11	25.00	3.00	2.50	94.85	-12.0	23.45
12	25.00	5.00	2.50	97.78	-15.3	25.58
13	25.00	4.00	2.00	75.68	-13.7	24.08
14	25.00	4.00	3.00	104.34	-10.9	25.21
15	25.00	4.00	2.50	94.88	-13.7	24.72
16	25.00	4.00	2.50	95.72	-14.1	23.68
17	25.00	4.00	2.50	96.68	-13.5	25.05
18	25.00	4.00	2.50	96.32	-13.6	24.36
19	25.00	4.00	2.50	97.08	-13.9	21.54
20	25.00	4.00	2.50	95.64	-13.4	23.61

表明各效应与三因素水平的非线性拟合效果均较好,相关系数较大。分别将  $X_3, X_2, X_1$  固定为 2.5, 4, 25, 绘制另两个变量对  $Y_1, Y_2, Y_3$  的效应面(图 5) 及等高线(图 6)。

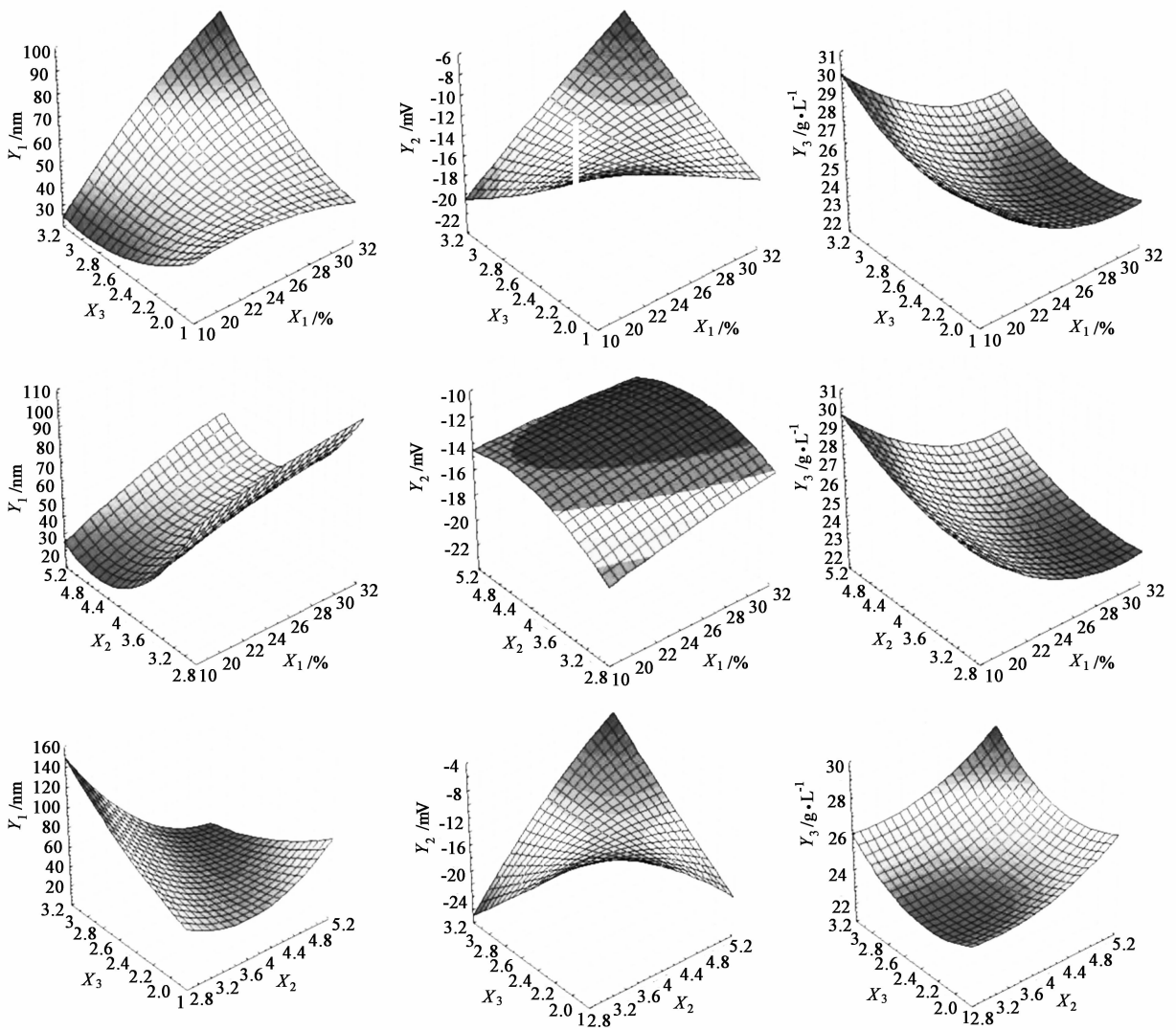


图 5 粒径、Zeta 电位、溶解度对油相、混合表面活性剂、Km 的效应面

图 5 显示各效应面均具有较优区域,将各效应面的较优区域进行重叠,可进一步缩小较优区域的范围,结合图 6,将各等高线进行重叠,得到较优区域。选定油相 26%,混合表面活性剂 4.0, Km = 2.0 的处方,即 GTCC-EL-35-卵磷脂-乙醇质量比为 25.99:39.47:9.87:24.67。

**2.2.5 验证试验** 按优选处方制备自微乳化给药系统,结果粒径 64.32 nm, Zeta 电位 -14.4 mV, 23.93 平衡溶解度  $g \cdot L^{-1}$ ,与预测值进行比较相对偏差依次为 4.9%, 2.7%, 6.7%,说明优选的处方具有较好的预测性。

**2.3 载药量测定** 按优化处方制备 6 批 GB-SMEDDS 制剂(批号 12072001, 12072002, 12072003, 12072004, 12072005, 12072006),采用 HPLC 进行测定,结果 GB 平均质量分数 ( $2.4 \pm 0.14$ )%,表明

GB-SMEDDS 的工艺重复性良好。

**2.4 pH 测定** 取每批号的 GB-SMEDDS 各 1 份,分别用水稀释 250 倍,测得 pH 分别为 7.29, 7.26, 7.30, 7.36, 7.24, 7.32,符合注射剂的 pH 要求。

**2.5 形态学检测** 将 GB-SMEDDS 水稀释 100 倍后滴于铜网上,用 2% 磷钨酸负染 1 min,在透射电镜下观察。结果见图 7,表明自乳化微乳形成的乳滴呈球形,大小均匀,乳滴之间无粘连,粒径 50 ~ 80 nm。

**2.6 粒径分布及 Zeta 电位测定** 空白 SMEDDS 稀释 100 倍,粒径一般约 30 nm,载药后粒径增大,形成的微乳粒径约 60 nm,见图 8,说明 GB-SMEDDS 呈 Gauss 分布,平均粒径 64.32 nm, Zeta 电位 -14.4 mV,且 PDI < 0.3。

**2.7 初步稳定性考察** 称取一定量的 GB-SMEDDS

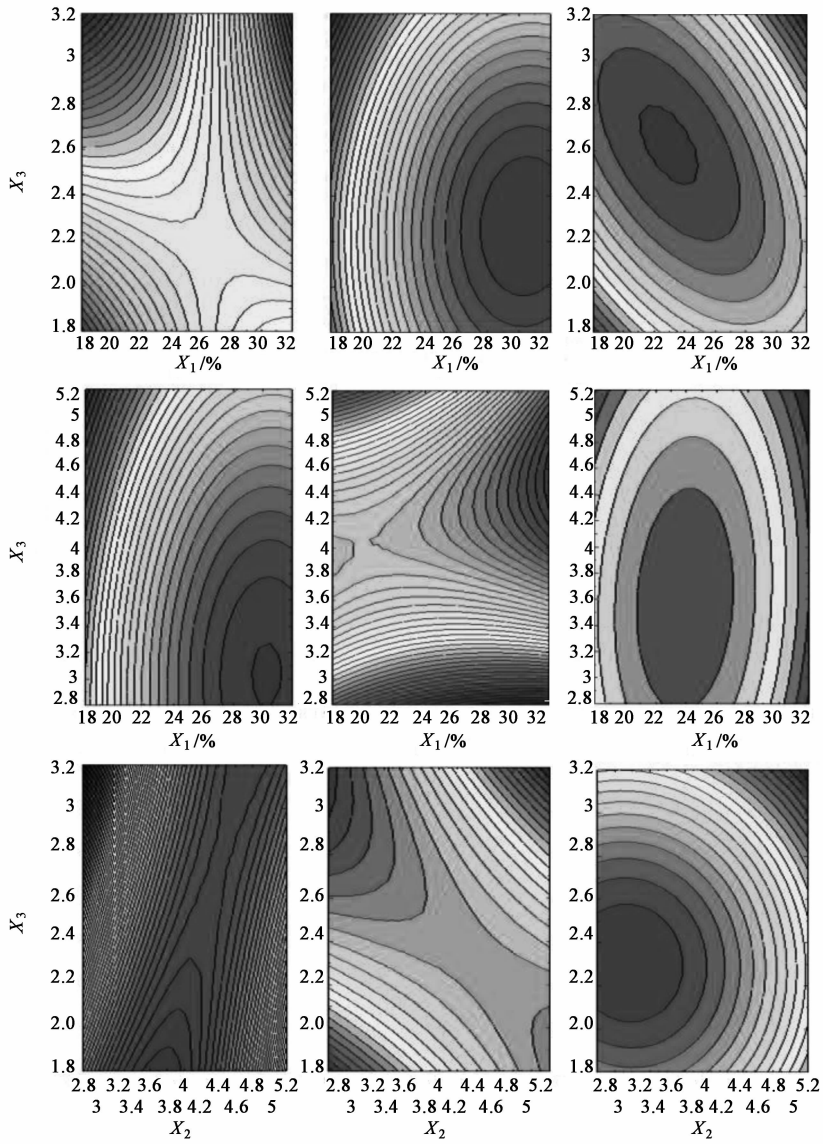


图 6 油相、混合表面活性剂、 $K_m$  各效应面等高线

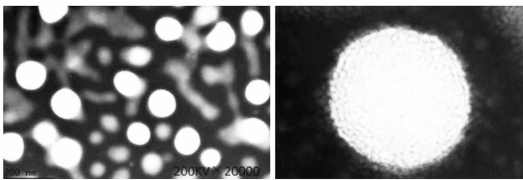


图 7 银杏内酯 B 自微乳药物传递系统透射电镜

密封,分别于 25(常温),40(恒温箱),4(冰箱),-20(冰箱)℃内放置 7 d 后取样,通过 HPLC 测得制剂中 GB 质量浓度分别为 22.68,22.51,21.87,21.63  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,RSD 分别为 5.2%,5.9%,9.4%,9.6%,说明该制剂的化学稳定性较好。

**2.8 溶血性考察** 取新鲜兔血 10 mL,制备红细胞混悬液,用玻璃棒搅拌 10 min 除去纤维蛋白。加入 10 倍量生理盐水进行洗涤,离心(10 min,1 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ )至上清液澄清。取沉淀红细胞 2 mL,加生理

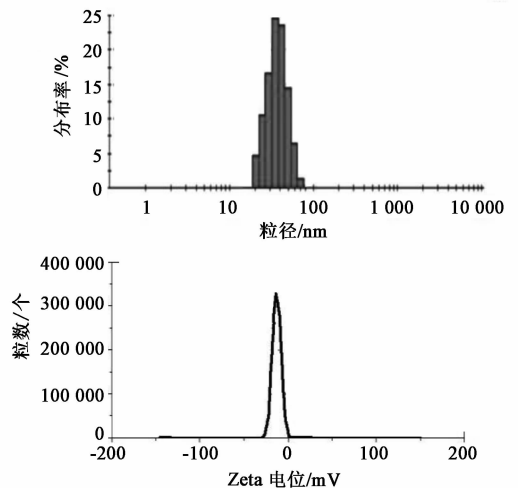


图 8 银杏内酯 B 自微乳药物传递系统粒径及电位分布

盐水至 100 mL, 4 °C 冷藏备用。取洁净试管 7 支, 1~5 号管为供试品, 按表 3 依次加入 2% 兔红细胞混悬液、GB-SMEDDS 注射剂、生理盐水, 6 号管为阴性对照, 7 号管为阳性对照。混匀 1~7 号管, 置 (37 ± 0.5) °C 恒温水浴箱中孵育, 3 h 后观察溶血现象, 判断是否溶血, 结果见图 9。

表 3 银杏内酯 B 自微乳药物传递系统注射剂溶血试验

No.	红细胞混悬液 /mL	GB-SMEDDS /mL	蒸馏水 /mL	生理盐水 /mL	现象	结果
1	2.5	0.1	0	2.4	(-)	无溶血
2	2.5	0.2	0	2.3	(-)	无溶血
3	2.5	0.3	0	2.2	(-)	无溶血
4	2.5	0.4	0	2.1	(-)	无溶血
5	2.5	0.5	0	2	(-)	无溶血
6	2.5	0	0	2.5	(-)	无溶血
7	2.5	0	2.5	0	(+)	全溶血

注: (-) 红细胞全部下沉, 上层液无色澄清无溶血; (+) 溶液澄清红色或棕红色, 管底有少量残留有部分溶血; (++) 溶液澄清红色, 管底无红细胞残留已全溶血。

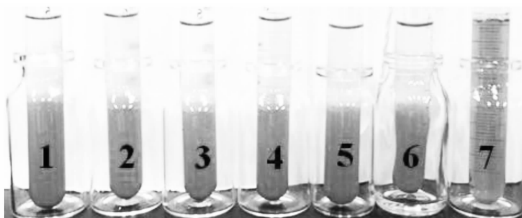


图 9 银杏内酯 B 自微乳药物传递系统溶血试验

2.9 血管刺激性试验 取健康、耳缘无损伤的家兔 4 只 (2.0~2.5 kg), 随机分为 A (空白纳米乳), B (生理盐水), C (0.8 g·L<sup>-1</sup> GB-SMEDDS), D (0.8 g·L<sup>-1</sup> 原料药) 组, 按 1.0 mL·kg<sup>-1</sup> 耳缘静脉注射给药, 连续给药 5 d, 1 次/d, 末次给药 24 h 后处死家兔, 将兔耳缘沿近心端剪下, 观察病理切片, 见图 10。

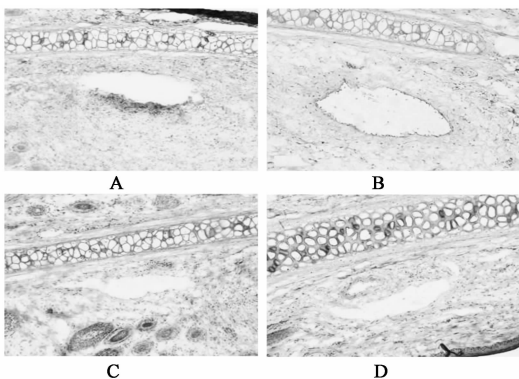


图 10 血管刺激性组织病理学切片 (HE, ×200)

肉眼观察表明, 4 组耳缘静脉穿刺部位均有轻微发红充血, 其他刺激症状不明显。组织病理学结果表明, 各组穿刺部位均见有轻微的血管壁破损或红肿现象: A 组空白制剂有轻微红肿现象; B, C 组未见表皮脱落或增生, 血管结构完整, 皮下血管均未见血栓形成和充血现象, 血管壁及周围未见明显炎症细胞浸润; D 组相对刺激较大, 有部分上皮细胞脱落及部分血栓形成, 表明 GB-SMEDDS 可减小原料药对的血管刺激性。

2.10 急性毒性试验 选用 16 只昆明种小鼠, 雌雄各半, 随机分为 50, 40, 30, 20 mg·kg<sup>-1</sup> 4 个剂量组。尾静脉给药后观察 7 d, 结果小鼠全部存活, 未找出小鼠 100% 死亡的剂量, 无法测出本品的 LD<sub>50</sub>, 故进行最大给药量试验。

取健康小鼠 40 只, 随机分为 2 组, 每组雌雄各半, 注射组尾静脉注射 GB-SMEDDS, 对照组注射等量生理盐水。给药后常规饲养观察 7 d, 第 8 天称重后剖检观察小鼠实质性脏器有无明显病理变化, 测定脏器质量并计算脏器指数。试验期间所有小鼠饮食活动均正常, 解剖后 2 组脏器均无明显异常变化, 表明 GB-SMEDDS 注射液不会引起实质性脏器的病理损伤, 最大耐受量为 50 mg·kg<sup>-1</sup>, 是人用剂量 (0.67 mg·kg<sup>-1</sup>) 的 7.46 倍。

### 3 讨论

目前, 国内外研究 SMEDDS 大多采用口服、黏膜或透皮给药<sup>[13-15]</sup>, 其注射给药对辅料要求较高, 因此制备注射用 SMEDDS 首先应考虑辅料的可行性, 选用一些高效低毒的注射用乳化剂。制剂中 EL-35 用量过大会产生严重的急性过敏反应, 何蕾等<sup>[16]</sup>考察 O/W 型紫杉醇纳米乳剂在大鼠体内外分布情况, 发现紫杉醇纳米乳剂较紫杉醇注射液毒性降低, 可在一定程度上延长药物在大鼠体内的循环时间。本实验在此基础上, 经溶解度试验, 选择溶解度较高、油相相容性较好的乳化剂 EL-35 与卵磷脂作为混合乳化剂, 乙醇为助乳化剂制备 SMEDDS。

自微乳的乳化效率主要取决于油相和表面活性剂, 利用油相和表面活性剂的相容性差异, 可用于筛选处方, 同时避免大量相图的绘制工作。处方中选用混合乳化剂可调节 HLB 值, 避免表面活性剂用量过大形成液晶, 产生黏滞, 不易分散。另外, Km 是整个体系能否形成自微乳的关键, 本实验选取最大取值范围, 保证最终选择 Km 的准确性。由于 GB 水溶性差, 不易与水形成氢键, 处方中药物性质对 SMEDDS 的形成不会产生影响, 因此在处方优化时

采用空白伪三元相图来考察。

郭梦翔等<sup>[17]</sup>制备 GB 自微乳化制剂,通过肠道淋巴管吸收,可避免肝脏首过效应,提高药物的生物利用度。本实验沿用 GB 为模型药物,在自微乳载药系统处方选择上进行改良,可实现多样化给药方式,从而进一步提高药物的相对生物利用度。另外,安全性评价分别考察 GB-SMEDDS 的溶血性及血管刺激性,结果显示血液相容性良好,无溶血现象,且血管刺激性较小,说明可实现注射给药方式。在给药过程中,个别大鼠出现呼吸急促及眼球突的现象,5 min 内恢复平静,推测可能是由于注射速度过快引起的,但其药理、药效作用机制还有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [ 1 ] Rahman M A, Hussain A, Hussain M S, et al. Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system ( SEDDS/ SMEDDS) [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39(1):1.
- [ 2 ] Sprunk A, Strachan C J, Graf A. Rational formulation development and *in vitro* assessment of SMEDDS for oral delivery of poorly water soluble drugs [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 46 (5):508.
- [ 3 ] Yang Z Z, Li J, Li S X, et al. Effect of ginkgolide B on striatal extracellular amino acids in middle cerebral artery occluded rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 136 (1):117.
- [ 4 ] 张现涛,梁军,刘红霞,等. 银杏叶内酯 N 对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(1): 141.
- [ 5 ] Fang W, Deng Y, Li Y, et al. Blood brain barrier permeability and therapeutic time window of Ginkgolide B in ischemia-reperfusion injury [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 39(1/3):8.
- [ 6 ] Chen Z Q, Liu Y, Zhao J H, et al. Improved oral bioavailability of poorly water-soluble indirubin by a supersaturatable self-microemulsifying drug delivery system [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012(7):1115.

- [ 7 ] Xiong Y, Guo D, Wang L L, et al. Development of nobiliside A loaded liposomal formulation using response surface methodology [J]. *Int J Pharm*, 2009, 371 (1/2): 197.
- [ 8 ] Solanki S S, Sarkar B, Dhanwani R K. Microemulsion drug delivery aystem; for bioavailability enhancement of ampelopsin [J]. *ISRN Pharm*, 2012, 2012:108164.
- [ 9 ] Schuurhuis G J, Broxterman H J, Pinedo H M, et al. The polyoxyethylene castor oil Cremophor EL modifies multidrug resistance [J]. *Br J Cancer*, 1990, 62 (4):591.
- [10] Engblom P, Pulkkinen J O, Rantanen V, et al. Effects of paclitaxel with or without cremophor EL on cellular clonogenic survival and apoptosis [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(2):284.
- [11] Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, et al. Cremophor EL; the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37 (13):1590.
- [12] Nornoo A O, Chow D S. Cremophor free intravenous microemulsions for paclitaxel II. Stability, *in vitro* release and pharmacokinetics [J]. *Int J Pharm*, 2008, 349(1/2):117.
- [13] Chen Y, Li G, Huang J G, et al. Comparison of self-microemulsifying drug delivery system versus solid dispersion technology used in the improvement of dissolution rate and bioavailability of vinpocetine [J]. *Acta Pharm Sin*, 2009, 44:658.
- [14] Xiao L, Yi T, Liu Y, et al. Optimization of novel self-microemulsifying mouth dissolving films by response surface methodology [J]. *Acta Pharm Sin*, 2011, 46 (5):586.
- [15] 王巍,田雪峰,张国兴,等. 羌活油微乳液的配制及其稳定性考察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (20): 39.
- [16] 何蕾,王桂玲,张强. 紫杉醇纳米乳剂的体内外考察 [J]. *药学报*, 2003, 38 (3):227.
- [17] 郭梦翔,胡海燕,唐仕波,等. 银杏内酯 B 自微乳化释药系统的制备及质量评价 [J]. *中国中药学杂志*, 2013, 35(22): 2967.

[责任编辑 全燕]