

盐酸小檗碱自微乳剂的处方设计及体外评价

何琳¹, 刘意¹, 郑冬梅¹, 潘海文¹, 袁飞¹, 龙晓英^{2*}

(1. 广东药学院中山校区, 广东 中山 528458; 2. 广东药学院中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 制备盐酸小檗碱自微乳剂, 并对其质量及体外溶出度进行考察。方法: 通过正交设计和伪三元相图优化处方, 分别以乳化程度、乳化速度、有无油层及混合分层情况为指标, 对自微乳化系统中的油相、乳化剂及助乳化剂的组成和用量进行研究, 筛选盐酸小檗碱自微乳剂的最佳组成及比例。采用紫外分光光度法进行质量评价, 并考察其溶出度。结果: 盐酸小檗碱自微乳剂组成为盐酸小檗碱-油酸乙酯-聚氧乙烯(40)氢化蓖麻油-聚乙二醇-400 0.015:0.120:0.160:0.120; 乳滴粒径 80.59 nm; 在质量考察中, 盐酸小檗碱在 4.49 ~ 22.44 mg·L⁻¹ 和吸光度呈良好线性关系, $r = 0.9999$, 平均回收率 100.9%, RSD 1.65%, 样品平均质量分数 97.4%, RSD 0.84%。在人工胃液中 20 min 的溶出度 > 80%, 远高于市售片剂。结论: 自微乳剂能够改善盐酸小檗碱难溶性, 且制备工艺简单, 具有良好应用前景。

[关键词] 盐酸小檗碱; 自微乳化给药系统; 溶出度; 质量评价

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0026-05

Formulation Design and *in vitro* Evaluation of Berberine Hydrochloride self-microemulsion

HE Lin¹, LIU Yi¹, ZHENG Dong-mei¹, PAN Hai-wen¹, YUAN Fei¹, LONG Xiao-ying^{2*}

(1. Guangdong Pharmaceutical University Zhongshan Campus, Zhongshan 528458, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

[收稿日期] 20111027(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30973953C1909)

[第一作者] 何琳, 硕士, 实验师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 0760-88207977, E-mail: helin721@163.com

[通讯作者] * 龙晓英, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事药物新剂型与新技术研究, Tel: 020-39352559, E-mail: longxy3156@163.com

[参考文献]

[1] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 114.
[2] 贾天柱, 周鹤, 解世全, 等. 中药狗脊及其炮制品中氨基酸和总糖的比较分析[J]. 中成药, 2000, 22(10): 701.
[3] 贾天柱, 李军, 解世全, 等. 狗脊及其炮制品挥发油成分的比较研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(4): 216.
[4] 许重远, 陈振德, 陈志良, 等. 金毛狗脊的化学成分研究(II)[J]. 解放军药学报, 2000, 16(2): 65.
[5] 陈志良, 陈振德, 许重远, 等. 金毛狗脊的化学成分研究[J]. 中药材, 2000, 23(3): 160.
[6] 程启厚, 杨中林, 胡永美. 狗脊化学成分的研究[J]. 药学进展, 2003, 27(5): 298.
[7] 奕新, 王皓, 温远影. 狗脊化学成分研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2002, 10(4): 361.

[8] 张春玲, 王喆星. 狗脊化学成分的分离与鉴定[J]. 中国药物化学杂志, 2001, 11(5): 279.
[9] 吴琦, 杨秀伟, 杨世海, 等. 金毛狗脊的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(2): 240.
[10] 杨慧洁, 吴琦, 杨世海. 金毛狗脊化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 230.
[11] 许树, 步显坤, 周翎, 等. 烫狗脊中的酚性化合物研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 71.
[12] 李朝霞, 李云谷. 大孔吸附树脂纯化丹参总酚酸的工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(3): 30.
[13] 李明, 冯世阳. 茉莉酸甲酯对丹参茎叶丹酚酸和丹酚酸 B 含量的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1921.
[14] 王文祥, 周巧霞, 顾明, 等. 不同对照品对芍药胶囊总酚酸含量测定的影响[J]. 中成药, 2001, 23(7): 536.

[责任编辑 全燕]

[Abstract] Objective: To prepare berberine hydrochloride self-microemulsion, and investigate its quality and *in vitro* dissolution. **Method:** Prescription was optimized by orthogonal design and pseudo-ternary phase diagram with degree of emulsification, emulsion speed, oil layer and mixed-layered as indexes, prescription composition and dosage of oil phase, emulsifier and co-emulsifier from self-microemulsion system were studied, to select optimum composition and proportion of BR-SMEDDS. UV spectrophotometry was used to assess quality of BR-SMEDDS and investigate its dissolution. **Result:** Optimum formulations of BR-SMEDDS were composed of BR-ethyl oleate-cremophor RH40-PEG 400 0.015:0.120:0.160:0.120. Particle size of droplet was 80.59 nm. In inspection of quality, The concentration of berberine hydrochloride showed a good linear relationship in 4.488-22.44 mg·L⁻¹ with absorbance ($r = 0.9999$), average recovery was 100.9%, RSD 1.65%. The average content of samples was 97.4%, RSD 0.84%. Dissolution of BR-SMEDDS in artificial gastric juice was 80% in 20 min, it was higher than commercial tablets. **Conclusion:** BR-SMEDDS could improve dissolution of BR, and the preparation technology was simple, it would have a good applicable prospect.

[Key words] berberine hydrochloride; self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS); dissolution; quality evaluation

盐酸小檗碱(berberine hydrochloride, BR),俗称黄连素,是从毛茛科黄连属植物黄连、黄柏的根茎中提取的主要成分,属异喹啉类生物碱,临床常用其盐酸盐。近代研究表明,盐酸小檗碱具有极强的抗菌消炎、抗心律失常、降压等药理作用^[1],临床上用于治疗消化性溃疡及胃炎、心律失常、高血压等疾病^[2],尤其对肿瘤效果更好,如肝脏肿瘤、结肠肿瘤、脑部肿瘤等^[3,4]。目前市场上销售的各种 BR 口服制剂大多有肝脏首过效应,存在溶解低、肠道吸收差等问题,使患者用药次数频繁、耐受性差、药效差,大大限制其临床推广应用^[5]。

自微乳化释药系统(self-microemulsifying drug delivery system, SMEDDS)是近年来发展较快的一种制剂新技术,是由油相、表面活性剂和助表面活性剂形成的热力学稳定的均相体系,在胃肠蠕动下(37℃)可自发形成粒径小于100 nm的O/W型乳剂。自微乳化释药系统能增加药物溶解度,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,提高药物生物利用度,同时能避免肝脏、胃肠的首过效应^[6]。本课题组研制盐酸小檗碱自微乳剂(BR-SMEDDS),旨在提高BR生物利用度,减少用药剂量,降低毒副作用,使其更广泛、科学、合理地应用于临床。

1 材料

UV1102型紫外-可见分光光度计(上海天美科学仪器有限公司),CP225D型电子天平(德国赛多利斯),IKA型磁力搅拌器(无锡市宇寿医疗器械有限公司),RCZ-JA型溶出试验仪(上海黄海药检仪器有限公司),720-100型分光光度计(上海精密科

学仪器有限公司),Zetasizer Nano ZS90型纳米粒度及Zeta电位分析仪(英国马尔文)。

盐酸小檗碱对照品(中国药品生物制品检定所,批号110713-200208),盐酸小檗碱片(杭州民生药业集团有限公司,批号T09F517),盐酸小檗碱自微乳剂(自制,质量分数37.5 mg·g⁻¹,批号分别为20100304,20100305,20100306),油酸乙酯(上海飞祥化工厂),辛酸/癸酸三甘油酯(GTCC,广州市源缘贸易有限公司),肉豆蔻酸异丙酯(IPM,广州市文俊化工原料有限公司),聚氧乙烯(40)氢化蓖麻油(Cremophor RH40,德国巴斯夫公司),单亚油酸甘油酯(广州市文俊化工原料有限公司),聚山梨醇酯20(吐温-20,上海润捷化学试剂有限公司),二乙二醇单乙醚(transcutol P,法国佳法赛),聚乙二醇(PEG-400,广州市君鑫化工有限公司),二氧基乙二醇(法国佳法赛),其余试剂均为市售分析纯。

2 方法与结果

2.1 处方筛选

2.1.1 BR-SMEDDS的制备 根据预试验结果,称取BR约0.015 g,油相、乳化剂、助乳化剂总重0.400 g(油相-乳化剂-助乳化剂1:1:1),搅拌均匀,超声使药物溶解,记录药物超声及混合分层情况。

2.1.2 自乳化过程 将2.1.1项下制备的BR-SMEDDS倒入100 mL蒸馏水(37℃)中,慢速磁力搅拌(100 r·min⁻¹),分别于0,1,2,3 min等不同时间点取样,在700 nm波长处测定透光率(T),当透光率不变时(达到乳化平衡时间),记录平衡时间及透光率,观察液面有无油层,静置24 h观察有无

沉淀。

2.1.3 自微乳给药系统处方正交设计 在查阅文献[7-10]及预试验基础上,按表1选择不同的乳化剂(A),油相(B),助乳化剂(C)进行处方设计。按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,试验设计及观察指标见表2。4个指标进行综合评价,分数越高越好,满分为100分。透光率占40分(将测得的透光率数值与透光率分数所得的积)。乳化速度占20分(透光率达平衡时间1~3 min:20分;4~6 min:15分;其余为10分)。乳化结束后液面是否漂浮油层占15分[无油层15分(++) ;有油层10分(-) ;其余为10分

(+)]。超声互溶及混合分层情况占25分[超声容易、混合无分层25分(卅) ;超声较难、混合分层不明显20分(++) ;超声难溶、混合分层明显15分(+)]。结果见表2。

表1 BR-SMEDDS 处方优化正交试验因素水平

水平	A 乳化剂	B 油相	C 助乳化剂
1	单亚油酸甘油酯	GTCC	transcutor P
2	cremophor RH40	油酸乙酯	PEG-400
3	吐温-20	IPM	二氧基二乙二醇

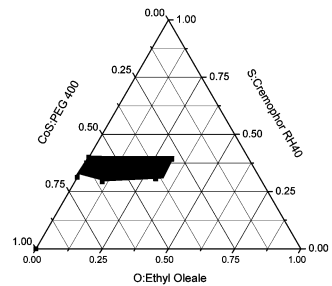
表2 BR-SMEDDS 处方优化正交试验安排

No.	A	B	C	透光率/%	乳化速度/min	有无油层	超声互溶及混合分层情况	总分
1	1	1	1	15.3	1.5	-	卅	41.1
2	1	2	2	93.5	3.5	+	+	79.9
3	1	3	3	34.8	15.0	-	++	33.9
4	2	1	2	96.0	4.0	++	+	83.4
5	2	2	3	91.8	3.0	+	++	86.7
6	2	3	1	89.5	4.0	++	+	80.8
7	3	1	3	44.0	2.5	-	++	47.6
8	3	2	1	27.3	3.0	-	++	40.9
9	3	3	2	14.0	1.5	-	+	30.6
K_1	51.633	57.367	54.267					
K_2	83.633	69.167	64.633					
K_3	39.700	48.433	56.067					
R	43.933	20.734	10.366					

表2极差结果可知,3种因素对BR-SMEDDS的影响大小为乳化剂>油相>助乳化剂,最佳SMEDDS组合为 $A_2B_2C_2$,即油相为油酸乙酯,乳化剂为cremophor RH40,助乳化剂为PEG-400。按正交试验得到最优处方进行3次验证试验,结果平均总分为93.4,说明该优选处方合理,稳定。

2.1.4 伪三元相图的绘制 根据正交设计结果,油相、乳化剂、助乳化剂各为一相,油酸乙酯、cremophor RH40,PEG-400混合配成一系列比例的混合溶液。每个比例加入BR 0.015 g,搅拌混合均匀,超声使完全溶解,将制备的BR SMEDDS按2.1.2项下方法操作,记录药物超声难易程度及混合分层情况,乳化速度(平衡时间)及透光率,观察液面有无油层,静置24 h观察有无沉淀。其伪三元相图见图1,自微乳剂区域为图1阴影部分。为降低乳化剂的毒副作用,选择处方中油相用量大的处

方为最佳处方,其组成为药物-油酸乙酯-CremophorRH40-PEG-400 0.015:0.12:0.16:0.12。单剂量总重为0.415 g。



0. 油酸乙酯;S. cremophor RH40;CoS. PEG-400

图1 BR SMEDDS 伪三元相图

2.1.5 粒度测定 将最佳处方按2.1.2项下操作,完全乳化后采用激光粒度仪测定粒度。其粒径分布见图2。结果其平均粒径为80.59 nm,分散系数

(PDI)为0.228。

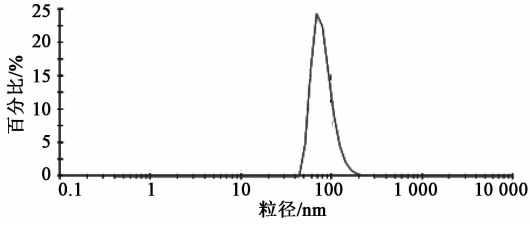


图2 BR SMEDDS 粒径分布

2.2 含量测定

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取 BR 对照品 11.22 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解, 超声使溶解, 冷却至室温, 加无水乙醇稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.112 2 g·L⁻¹ 的对照品溶液, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 按 2.1.4 项下确定的最佳处方比例制备 BR SMEDDS, 混匀, 超声使溶解, 置 50 mL 量瓶中, 无水乙醇稀释至刻度, 取 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中, 即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照微乳溶液的制备 按供试品处方比例, 去除盐酸小檗碱, 其余与优选处方一致, 按供试品溶液制备方法制得阴性对照微乳溶液。

2.2.4 最大吸收波长的测定 取质量浓度为 8.976 mg·L⁻¹ 的 BR 对照品溶液, 上述制备的供试品溶液, 阴性对照微乳溶液, 以无水乙醇为空白对照, 在紫外分光光度计 200~600 nm 波长扫描, 结果 BR 在 350.5 nm 波长处有最大吸收, 阴性对照微乳溶液在此处则无吸收。

2.2.5 标准曲线的绘制 精密吸取上述 BR 对照品溶液, 加无水乙醇稀释成质量浓度为 4.488, 8.976, 13.46, 17.95, 22.44 mg·L⁻¹ 的对照品溶液, 于 350.5 nm 波长处测吸光度。以质量浓度(C)为横坐标, 吸光度(A)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $A = 56.373C + 5.3 \times 10^{-3}$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 盐酸小檗碱质量浓度在 4.488~22.44 mg·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.2.6 精密度试验 取同一 BR 对照品溶液, 质量浓度为 6.730 mg·L⁻¹, 以无水乙醇为空白对照, 于 350.5 nm 波长处连续 6 次测定 A, RSD 0.20%, 表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 无水乙醇为空白对照, 于 350.5 nm 波长处测定 A。每隔 2 h 测 1 次, 共 5 次, 结果 RSD 0.21%, 表明盐酸小檗碱自微乳剂在 8 h 内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 按供试品溶液制备的方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 于 350.5 nm 波长处测定

A, 结果 RSD 0.85%, 表明自制盐酸小檗碱自微乳剂的重复性好。

2.2.9 加样回收率试验 精密称取已知质量浓度的 BR SMEDDS 9 份, 准确加入质量浓度为 3.336, 6.672, 10.10 mg·L⁻¹ BR 对照品各 3 份, 按供试品溶液制备方法处理并测定, 结果见表 3。表明本方法准确可靠。

表3 BR SMEDDS 加样回收率试验

No.	样品中 含量 /mg	加入量 /mg	实测量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.1025	0.06824	0.03366	101.7		
2	0.1028	0.06789	0.03366	103.8		
3	0.1019	0.06735	0.03366	102.8		
4	0.1355	0.06895	0.06732	98.8		
5	0.1353	0.06753	0.06732	100.7	100.9	1.65
6	0.1353	0.06824	0.06732	99.6		
7	0.1706	0.07002	0.1010	99.6		
8	0.1713	0.07055	0.1010	99.8		
9	0.1699	0.06735	0.1010	101.5		

2.2.10 样品测定 取自制 BR SMEDDS 供试品 3 批, 按供试品溶液的制备方法处理并测定, 结果 3 批平均含量 97.4%。

2.3 体外溶出度评价 体外溶出度评价采用最佳处方比例(油酸乙酯-Cremophor RH40-PEG400 3:4:3)进行。通过预试验发现辅料在 350.5 nm 波长处对 BR 有干扰, 而 430 nm 处则无干扰, 故选择 430 nm 作为吸收波长。

2.3.1 标准曲线的绘制 精密吸取上述 BR 对照品溶液, 加无水乙醇稀释成 BR 质量浓度为 11.22, 22.44, 33.66, 44.88, 56.10, 67.32, 78.54 mg·L⁻¹ 的系列溶液, 于 430 nm 波长处测 A。以 C 为横坐标, A 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $A = 12.713C + 10^{-3}$ ($r = 0.9999$)。结果表明 BR 在 11.22~78.54 mg·L⁻¹ 与 A 呈良好线性关系。

2.3.2 溶出度测定 按供试品溶液制备方法制备含量为 0.100 g BR SMEDDS (盐酸小檗碱-油酸乙酯-cremophor RH40-PEG400 0.100:0.80:1.07:0.80), 取 BR-SMEDDS、市售片剂(BR 含量为每片 100 mg)及 BR 原料药, 按《中国药典》第二部溶出度第三法小杯法^[11], 以人工胃液为溶出介质, 温度 37℃, 搅拌速度 50 r·min⁻¹, 分别于 5, 10, 20, 30, 45, 60 min 等时间点取溶液 10 mL (0.45 μm 微孔滤膜滤

过), 并立即补充等体积溶出介质, 无水乙醇稀释, 于 430 nm 测定吸光度, 其溶出情况见图 3。

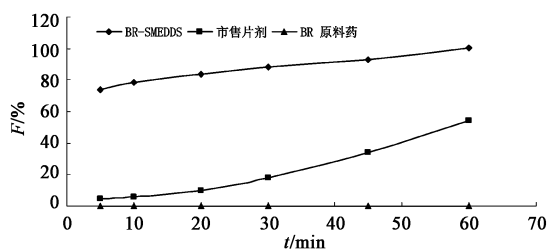


图 3 BR-SMEDDS 与市售片剂累积溶出率

由图 3 可知, 在人工胃液溶出介质中, BR-SMEDDS 溶出效果明显优于市售片剂, 20 min 内已达到 80% 溶出, 盐酸小檗碱原料药基本无溶出。

3 讨论

BR 为季铵型异喹啉类生物碱, 其在水中的溶解度较小, 比例为 1:500, 导致盐酸小檗碱在肠道吸收差, 故其生物利用度低, 而微乳剂口服后可经淋巴管吸收, 能克服首过效应及大分子通过胃肠道上皮细胞膜的障碍^[12], 将 BR 制备成微乳剂, 有利于促进药物吸收, 提高药物疗效。

油相中油酸乙酯为中链单链脂肪酸酯, 溶解性和成乳能力均较植物油类好, 适宜用作微乳剂的油相, 同时空间位阻小, 易与处方中表面活性剂相互渗透, 形成的微乳稳定。通过伪三角相图法优化微乳剂形成的条件, 减少乳化剂用量, 降低毒副作用。助表面活性剂选择无毒、无副作用, 与乳化剂形成复合界面膜, 降低表面张力, 因而选用 PEG-400。本试验发现随着 Cremophor RH40 用量的增加, 自乳化时间相应变长, 可能与其黏度有关系。

目前对于自微乳剂处方没有明确评价标准, 但药物与油相、乳化剂、助乳化剂的互溶状况可反映药物在制剂中溶解度状况, 从而考察药物分散程度、体外溶出度、体内生物利用度。在正交试验、伪三元相

图绘制中, 采用多指标综合评价, 透光率所占的分数最高, 因为浊度越低, 透光率越高, 说明乳化程度越高, 形成的微乳剂稳定性越好, 质量越好。其他 3 个指标(超声难易程度及混合分层情况, 乳化速度, 有无油层)占分数相对较低, 使得结果更加科学、客观及全面的评价盐酸小檗碱自微乳剂。本方法制备的 BR-SMEDDS 工艺简单, 体积小, 易于产业化, 应用前景广阔。

[参考文献]

- [1] 耿东升. 小檗碱药理作用研究进展[J]. 解放军药学报, 1997, 13(1): 24.
- [2] 韦正步. 小檗碱临床应用概况[J]. 西北药学杂志, 1998, 13(4): 178.
- [3] 台卫平. 黄连素与肿瘤关系研究进展[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 2002, 29(6): 423.
- [4] 李敬龙, 张鸿雁, 蒋文强. 黄连及其制剂的成分分析方法综述[J]. 山东轻工业学院学报, 2003, 17(4): 33.
- [5] 李志平, 欧阳玉祝, 章爱华, 等. 黄连素 β -环糊精包合物的制备及抑菌试验研究[J]. 精细化工中间体, 2003, 33(6): 46.
- [6] 陆彬. 纳米乳与亚微乳给药系统[J]. 中国药师, 2004, 7(10): 759.
- [7] 刘琳婕, 逢秀娟, 张伟, 等. 水飞蓟素自微乳的研制[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(9): 532.
- [8] 龙晓英, 杨帆, 李丽, 等. 水飞蓟素自乳化给药系统处方设计及溶出度评价[J]. 中国药师, 2004, 7(7): 496.
- [9] 丁沐淦, 龙晓英, 林丹荣. 莜术油自微乳给药系统处方设计和体外评价[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(6): 610.
- [10] 刘意, 龙晓英, 何琳, 等. 穿心莲内酯微乳的 HPLC 测定[J]. 中成药, 2010, 32(8): 1424.
- [11] 中国药典. 二部[S]. 2010; 附录 XC 87.
- [12] 张正全, 陆彬. 微乳给药系统研究概况[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(3): 139.

[责任编辑 全燕]