

蝙蝠葛碱自微乳化释药系统的制备及质量评价

张亚红^{1*}, 王娟², 甘淋玲¹, 王丽娟¹, 朱照静^{1#} (1.重庆医药高等专科学校药物分析教研室, 重庆 400030; 2.浙江大学药学院, 杭州 310058)

中图分类号 R942; R945 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2269-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.35

摘要 目的:制备蝙蝠葛碱自微乳化释药系统(Dau-SMEDDS)并对其质量评价。方法:通过溶解度试验、伪三元相图绘制和正交试验设计筛选并优化处方;考察优化处方所制制剂的类型、粒径和Zeta电位、体外累积溶出率和3个月内的稳定性以评价其质量。结果:最优处方为载药量为50 mg/g,以油酸-油酸乙酯(1:1)为油相,聚氧乙烯醚-40氯化蓖麻油为乳化剂,月桂酸聚乙二醇甘油酯为助乳化剂,后二者比为2:1,油相与混合乳化剂的比例为2:5。所制系统为O/W型微乳,平均粒径为(58.3±9.21) nm, 40 min即几乎全部溶出,累积溶出率为原料药的4倍以上,常温下3个月内各检查指标保持稳定。结论:本试验制备Dau-SMEDDS的工艺简单,溶出速率快,性质稳定。本研究可为蝙蝠葛碱新剂型的开发提供参考。

关键词 蝙蝠葛碱;自微乳化释药系统;伪三元相图;制备;处方筛选;正交试验;质量评价

Preparation of Self-microemulsifying Drug Delivery System of Dauricine and Quality Evaluation

ZHANG Ya-hong¹, WANG Juan², GAN Lin-ling¹, WANG Li-juan¹, ZHU Zhao-jing¹ (1.Dept. of Pharmaceutical Analysis, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400030, China; 2.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare and evaluate the quality of self-microemulsifying drug delivery system of dauricine (Dau-SMEDDS). METHODS: The formulation of Dau-SMEDDS was optimized by the solubility test, pseudo-ternary phase diagrams and orthogonal design. The type, particle size and Zeta potential, cumulative *in vitro* dissolution rate, and stability within 3 months of the preparation produced on the basis of the above-mentioned formulation were observed to evaluate the quality of such preparation. RESULTS: The optimal formation was as follows as the drug-loading of 50 mg/g, oleic acid-EO (1:1) as oil phase, Cremophor RH 40 as emulsifier, Gelucire 44/14 as co-emulsifier, K_m of 2:1 and oil phase-mixed emulsifier ratio of 2:5. The prepared Dau-SMEDDS was an O/W microemulsion, with average particle size of (58.3±9.21) nm, in which nearly all the drug was dissolved within 40 min, demonstrating a cumulative dissolution rate more than 4 times as much as that of crude materials; the tested indexes kept stable at room temperature within 3 months. CONCLUSIONS: The technology of preparing Dau-SMEDDS is simple with high dissolution rate and stable nature of the drug. The study can provide a reference for the development of new formulations of dauricine.

KEYWORDS Dauricine; Self-microemulsifying drug delivery system; Pseudo-ternary phase diagrams; Preparation; Formulation screening; Orthogonal test; Quality evaluation

蝙蝠葛碱(Dauricine, Dau)为北豆根中含量最高的生物碱,已有的研究显示其在抗心律失常、抗心肌缺血、抗脑缺血、抗肿瘤、免疫调节等方面都具有明显的药理作用^[1-2]。Dau分子结构中有2个脂环叔胺基团,具有较强的脂溶性,水溶性较差。大鼠体内药动学研究显示,其灌胃给药后绝对生物利用度约为15%~19%^[3-4]。大鼠在体单向肠灌注模型研究显示,Dau在肠道透膜能力差,胃肠道上皮细胞的屏障作用是影响其口服生物利用度的重要因素^[5]。此外,Caco-2细胞试验研究显示,Dau可能为P糖蛋白的底物^[6],因此Dau在肠道的吸收以及在血脑屏障的转运可受多种因素的影响^[7]。鉴于以上因素,进行新型Dau给药系统的研究,以提高其口服给药的生物利用度,对其制剂的开发和临床应用具有重要意义。

自微乳化释药系统(Self-microemulsifying drug delivery

*副教授。研究方向:药物制剂、药物分析。电话:023-61969189。E-mail:409986309@qq.com

#通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物新剂型、新技术。电话:023-61969994。E-mail:zhaojing6271@126.com

system, SMEDDS)是一种新型口服给药系统,有利于改善药物的溶出特征,增加药物在小肠的吸收,提高药物口服给药的生物利用度,还有利于降低或抑制P糖蛋白对药物的外排^[8]。近年来,SMEDDS已成为药剂学研究的热点之一,得到广泛的关注。笔者研制了Dau-SMEDDS,并进行了处方筛选与优化,并对其进行了质量评价,以为Dau制剂的开发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);Zetasizer Nano ZS型纳米粒度及Zeta电位分析仪(英国Malvern仪器公司);JEM-1200EX透射电镜(日本Jeol公司);BT25S型电子天平(德国Sartorius公司);DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂);Votex Genius 3型涡漩混合仪(德国Ika仪器公司)。

1.2 药品与试剂

Dau原料药(重庆医药高等专科学校自制,批号:20130504,纯度:≥98%);Dau对照品(深圳市维琪生物科技有限公司,批

号:20120625,纯度:99.8%);油酸(Oleic acid,批号:47118)、丙二醇单月桂酸甘油酯(Lauroglycol 90,批号:58768-27)、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol,批号:56784)、月桂酸聚乙二醇甘油酯(Gelucire 44/14,批号:67238)均购自法国 Gattefosse 公司;聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor EL,批号:23519447G0)、聚氧乙烯醚-40 氢化蓖麻油(Cremophor RH 40,批号:34758335H0)均购自德国 Basf 公司;肉豆蔻酸异丙酯(IPM,重庆市博伟化工贸易有限公司,批号:20120817)、油酸乙酯(EO)、聚山梨酯 80(Tween-80)、聚乙二醇 400(PEG 400)、1,2-丙二醇均购自重庆川东化工有限公司化学试剂厂;聚山梨酯 20(Tween-20,天津市博迪化工有限公司);甲醇为色谱纯,水为实验室自制的超纯水。

2 Dau 的含量测定

2.1 色谱条件及系统适用性考察

色谱柱为 Dikma ODS C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(85:15, V/V),流速为 1 ml/min;检测波长为 284 nm;柱温为室温;进样量为 20 μl。对样品溶液进样分析,结果 Dau 的出峰时间为 7.7 min,其他辅料不影响 Dau 的测定。

2.2 方法学考察

精密称取 Dau 对照品 21.68 mg,用甲醇溶解并稀释成质量浓度分别为 0.542、1.084、2.168、5.42、10.84、21.68、54.2 μg/ml 的对照品溶液,进样分析。以峰面积(y)为纵坐标,质量浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线。所得标准曲线方程为 $y=22\ 358.48x+854.26$ ($r=0.999\ 8$)。结果表明,Dau 检测质量浓度线性范围为 0.542~54.2 μg/ml。

选择质量浓度为 1.084、5.42、21.68 μg/ml 的对照品溶液进行精密度和回收率试验。结果低、中、高 3 种质量浓度样品的日内 RSD 为 1.38%、0.95%、0.47%($n=5$),日间 RSD 为 3.24%、3.01%、1.77%($n=5$);方法回收率分别为 103.26%、100.37%、100.29%($RSD<2\%$, $n=5$),均满足样品测定要求。

3 Dau-SMEDDS 处方筛选

3.1 溶解度试验

取过量 Dau 原料药置于离心管中,分别加入 1 g 油相(油酸、Lauroglycol 90、IPM、EO)、乳化剂(Cremophor EL、Cremophor RH 40、Tween-80、Tween-20)或者助乳化剂(PEG 400、1,2-丙二醇、Labrasol、Gelucire 44/14),60 °C 水浴超声 1 h 后(功率 150 W),于 37 °C 恒温水浴振荡 48 h 使达到平衡,室温静置 12 h 后取适量液体,于 12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 5 cm)。取上清液用甲醇稀释后测定 Dau 的质量浓度并计算溶解度。结果,Dau 在油酸、EO、Cremophor EL、Cremophor RH 40、PEG 400、1,2-丙二醇、Labrasol 和 Gelucire 44/14 中的溶解度相对较高,具体结果详见表 1。

3.2 伪三元相图的绘制

选择对 Dau 溶解度较大的油相、乳化剂和助乳化剂,设置乳化剂与助乳化剂的质量比为 K_m ,固定 K_m 为 1:1,油相和固定比例的混合乳化剂按 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 比例制备,于 37 °C 磁力搅拌使均匀混合,逐滴滴加水相并继续均匀搅拌,肉眼观察其外观变化并记录相变点。分别以混合乳化剂、水相、油相为顶点,根据相变前后液体的性质,采用 Sigmaplot 软件绘制伪三元相图,进行最优油相、乳化剂和助乳化剂的筛选。然后以筛选得到的最优油相、乳化剂和助乳化剂,分别固定 K_m 为 1:1、2:1 和 3:1,油相和固定比例的混合乳化剂按 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1 比例制

表 1 Dau 在各种介质中的溶解度($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/g}$)

Tab 1 Solubility of dauricine in different mediums ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{mg/g}$)

类别	介质	溶解度
油相	油酸	27.452 ± 1.337
	Lauroglycol 90	8.668 ± 0.736
	IPM	14.256 ± 0.941
	EO	34.564 ± 1.744
	乳化剂	
乳化剂	Cremophor EL	16.224 ± 1.837
	Cremophor RH 40	22.486 ± 2.473
	Tween-80	13.492 ± 1.835
	Tween-20	11.364 ± 1.096
助乳化剂	PEG 400	84.598 ± 5.849
	1,2-丙二醇	66.397 ± 5.493
	Labrasol	247.438 ± 6.973
	Gelucire 44/14	295.911 ± 12.237

备,于 37 °C 磁力搅拌使均匀混合,逐滴滴加水相并继续均匀搅拌,肉眼观察其外观变化并记录相变点,绘制伪三元相图进行最优 K_m 值的确定。

3.2.1 油相的筛选 固定乳化剂为 Cremophor RH 40,助乳化剂为 Gelucire 44/14, K_m 为 1:1,选择对 Dau 溶解度较大的油酸和 EO,分别绘制伪三元相图。此外,采用油酸与 EO 按 1:1 比例混合作为油相绘制伪三元相图,结果显示,采用混合油相所得到的自微乳区域(ME)更大,详见图 1。同时进行了以油酸与 EO 比例为 2:1、1:2 的混合油相进行伪三元相图的绘制研究。结果仍确定以油酸与 EO 按 1:1 比例混合作为油相最优。

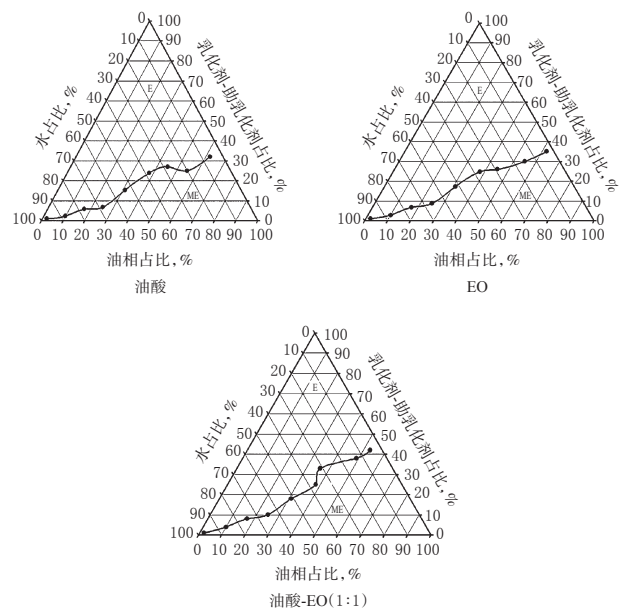


图 1 油相筛选伪三元相图

Fig 1 Pseudo-ternary phase diagrams for screening the oil phase

3.2.2 乳化剂的筛选 固定油相为油酸-EO(1:1),助乳化剂为 Gelucire 44/14,乳化剂分别选择 Cremophor EL 和 Cremophor RH 40, K_m 为 1:1,绘制伪三元相图。此外,还考察了 Cremophor EL 与 Cremophor RH 40 按 1:1 比例混合作为乳化剂的效果。结果显示,单独以 Cremophor RH 40 为乳化剂所得到的 ME 更大,详见图 2。

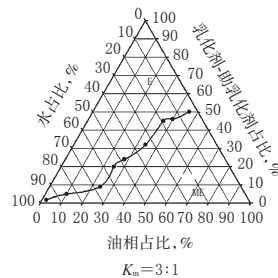
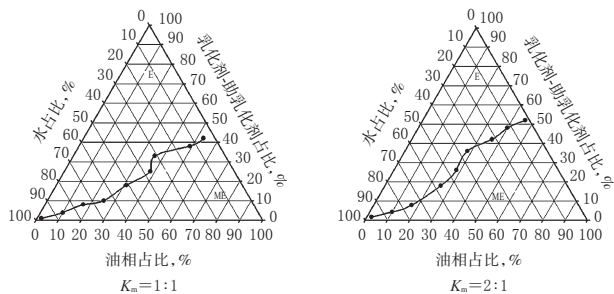
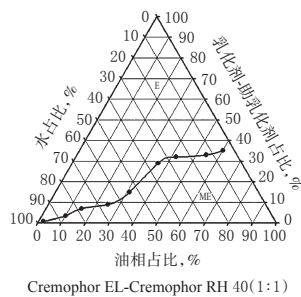
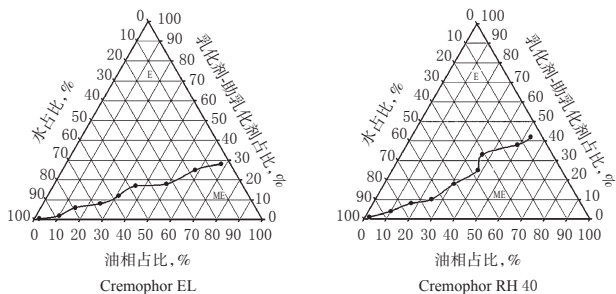


图2 乳化剂筛选伪三元相图

Fig 2 Pseudo-ternary phase diagrams for screening the emulsifier

3.2.3 助乳化剂的筛选 固定油相为油酸-EO(1:1),乳化剂为Cremophor RH 40,助乳化剂分别选择 Labrasol 和 Gelucire 44/14, K_m 为 1:1, 绘制伪三元相图。结果显示,采用 Gelucire 44/14 为助乳化剂所得到的 ME 略大于采用 Labrasol 所得到的 ME, 详见图 3。

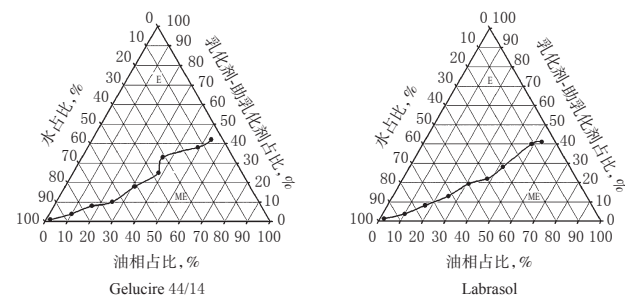


图3 助乳化剂筛选伪三元相图

Fig 3 Pseudo-ternary phase diagrams for screening the co-emulsifier

3.2.4 K_m 值的确定 固定油相为油酸-EO(1:1),乳化剂为Cremophor RH 40,助乳化剂为 Gelucire 44/14, 分别固定 K_m 为 1:1、2:1 和 3:1, 绘制伪三元相图。结果显示, K_m 值为 2:1 和 3:1 时所形成的 ME 要明显大于 K_m 为 1:1 时所形成的 ME, 详见图 3。由于 Cremophor RH 40 黏性较强, 其量大时不利于自乳化, 因此选择 K_m 值为 2:1。

3.3 正交试验设计

从伪三元相图可以看出,油相比例在 20%~40%、混合乳化剂比例在 25%~50% 时效果较好, 故在此范围内安排 3 因素 3 水平正交试验设计进行处方的优化。以微乳平均粒径和分散系数 (Polydispersity index, PDI) 为评价指标 (评价价值 = 平均粒径 + PDI × 100) 筛选最优处方。设计处方量为 1 g, 选取载药量 (A: 50~100 mg/g)、油相 (B: 0.2~0.4 g/g)、混合乳化剂 (C: 0.25~0.5 g/g) 因素进行 3 因素 3 水平正交试验。正交试验因素与水平见表 2, 设计与结果见表 3, 方差分析结果见表 4。

图4 不同 K_m 值时的伪三元相图

Fig 4 Pseudo-ternary phase diagrams at different K_m values

表2 正交试验设计的因素和水平

Tab 2 Factors and levels of the orthogonal test

水平	因素		
	A(载药量), mg/g	B(油相), g/g	C(混合乳化剂), g/g
1	50	0.2	0.25
2	75	0.3	0.37
3	100	0.4	0.50

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Design and results of the orthogonal test

序号	因素			评价价值
	A	B	C	
1	50	0.2	0.25	60.33
2	50	0.3	0.37	64.27
3	50	0.4	0.50	59.42
4	75	0.2	0.37	59.57
5	75	0.3	0.50	61.48
6	75	0.4	0.25	63.62
7	100	0.2	0.50	58.76
8	100	0.3	0.25	62.11
9	100	0.4	0.37	64.29
K_1	61.34	59.55	62.02	
K_2	61.56	62.62	62.71	
K_3	62.72	62.44	59.89	
R	0.38	3.07	2.82	

表4 方差分析结果

Tab 4 Variance analysis result

方差来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F	P
校正模型	31.004 ^a	6	5.167	1.658	0.423
截距	34 083.314	1	34 083.314	10 934.848	0.000
A	0.218	2	0.109	0.035	0.966
B	17.788	2	8.894	2.853	0.260
C	12.998	2	6.499	2.085	0.324
误差	6.234	2	3.117		
总计	34 120.552	9			
校正后的总计	37.238	8			

注: "a" 表示 " $R^2=0.833$ (调整 $R^2=0.330$)"; $F_{0.01}(2,2)=99.00$

Note: "a" means " $R^2=0.833$ (adjusted $R^2=0.330$)"; $F_{0.01}(2,2)=99.00$

由表3和表4可以看出,影响微乳粒径和PDI的因素依次为B>C>A,但这些因素对微乳的影响差异均无显著性,与伪三元相图所得结果一致。根据试验结果,综合选择Dau-SMEDDS最优处方为A₁B₁C₃。

4 最优处方制备 Dau-SMEDDS 的质量评价

4.1 载药量测定结果

按正交试验得到的最优处方,取Dau量为50 mg,油酸-EO(1:1)量为0.2 g,Cremophor RH 40量为0.33 g,Gelucire 44/14量为0.17 g,制备3批样品并进行载药量测定,得到3批样品的载药量分别为49.32、49.54、49.46 mg/g(RSD=0.23%,n=3)。

4.2 微乳类型鉴别

采用稀释法进行微乳类型的鉴别。取3批Dau-SMEDDS各0.1 g,分别加入5 ml超纯水,用力振摇,观察其在水中是否能均匀分散,若能均匀分散则为O/W型,不能则为W/O型。结果显示,制备所得的3批样品在水中均能均匀分散,表明本试验得到的微乳为O/W型微乳。

4.3 粒径与Zeta电位

取3批Dau-SMEDDS各0.1 g加入至10 ml超纯水中,搅拌均匀,测定粒径及Zeta电位。结果,3批Dau-SMEDDS的平均粒径为(58.3±9.21) nm(n=3),Zeta电位为(-33.07±6.05) mV(n=3),粒径分布情况见图5。

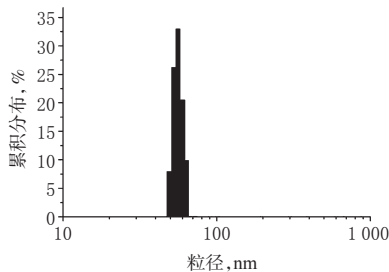


图5 Dau-SMEDDS 粒径分布图

Fig 5 Particle size distribution of Dau-SMEDDS

4.4 溶出度试验

取自微乳以及原料药样品,按2010年版《中国药典》溶出度测定第一法^[9]测定。以900 ml蒸馏水为溶出介质,转速为100 r/min,温度为37℃,分别于5、10、20、30、45、60、90、120 min取样5 ml,经0.22 μm微孔滤膜滤过,同时补充空白介质5 ml。取续滤液测定质量浓度并绘制溶出曲线。结果,自微乳制剂释药速度较快,在20 min累积溶出率达80%,40 min以后基本完全溶出,较原料药溶出率(约20%)提高约4倍以上,详见图6。

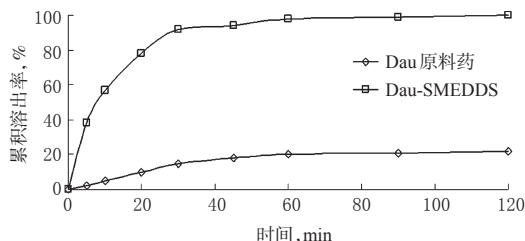


图6 Dau原料药及自乳化制剂的溶出曲线

Fig 6 Dissolution curves of crude material and self-emulsifying preparation of dauricine

4.5 初步稳定性试验

将制备所得的Dau-SMEDDS密封、室温保存,分别于第0、1、2、3月末取样,对其外观、粒径与药物含量进行考察。结果,3个月内微乳均为澄明液体,未见分层现象,外观均一,乳化后粒径和载药量(RSD=1.37%,n=4)均无明显变化,表明本试验制备的Dau-SMEDDS在3个月内能保持稳定。

5 讨论

笔者在进行辅料的筛选时,只对本实验室容易获取的一些常见辅料进行了研究,但是从得到的制剂看,采用油酸-EO(1:1)为油相,Cremophor RH 40为乳化剂,Gelucire 44/14为助乳化剂时所制备的Dau-SMEDDS,粒径小且分布均匀,溶出速率快,性质稳定,能够为其新剂型的开发提供一定参考。

SMEDDS由于能改善药物的溶出特征,对于提高难溶性药物的生物利用度具有显著作用,是一种比较具有开发前景的药物传递系统。但是,目前对于SMEDDS的研究大多针对液态制剂,其与固体制剂相比存在着稳定性以及贮存方面的问题。因此,近年来,陆续有关于固体SMEDDS的研究报道出现^[10],其不但可改善一些难溶性药物的溶解性,还能够减少药物对胃肠道的刺激、增加药物的稳定性,能够弥补一些液体SMEDDS的缺点。因此,在本试验的基础上,可以进一步探索Dau固体SMEDDS的研制,为其临床应用制剂的开发提供参考。

参考文献

- [1] 苏云明,沈越,秦鹏飞,等.蝙蝠葛酚性碱药理作用研究现状[J].中医药信息,2014,31(1):113.
- [2] 韩华,殷鑫,张天宇,等.蝙蝠葛碱的研究进展[J].中医药信息,2014,31(2):111.
- [3] 陈淑娟,庞雪冰.蝙蝠葛碱大鼠体内药物代谢动力学研究[J].中国药理学通报,2001,17(2):225.
- [4] Gao X, Jiang X, Wang L. Using LC-MS/MS to study dauricine pharmacokinetics and determine its bioavailability following administration in different routes[J]. *Acta Chromatographica*, 2013, 25(2):241.
- [5] 高秀蓉,蒋学华,王凌,等.大鼠在体单向肠灌注模型研究蝙蝠葛碱肠吸收机制和吸收动力学[J].中国药理学杂志,2012,47(11):903.
- [6] 高秀蓉,蒋学华,杜青青,等.P-糖蛋白抑制剂对蝙蝠葛碱跨膜转运的影响[J].华西药理学杂志,2013,28(2):135.
- [7] Dong PL, Han H, Zhang TY, et al. P-glycoprotein inhibition increases the transport of dauricine across the blood brain barrier[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 9(3):985.
- [8] Ingle LM, Wankhade VP, Udasi TA, et al. New approaches for development and characterization of SMEDDS[J]. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research*, 2013, 3(1):7.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XC.
- [10] 苏卫,陈鹰,董少华,等.固体自(微)乳化释药系统的研究进展[J].中国药房,2012,23(45):4308.

(收稿日期:2014-07-11 修回日期:2015-02-05)

(编辑:刘萍)