

去甲斑蝥素固体自微乳制备及稳定性考察

桂 贇^{1,2}, 胡容峰^{1,2,3,4}, 王 斌¹, 周 红^{1,2}, 金 栋^{1,2}

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012; 2. 新安医学教育部重点实验室, 安徽 合肥 230038;

3. 安徽省“115”新安医药研究与开发创新团队, 安徽 合肥 230038;

4. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230038)

[摘要]目的 制备去甲斑蝥素固体自微乳并对其稳定性进行考察。方法 以包封率和收率为考察指标, 采用球晶制备技术, 正交设计优化制备工艺, 实现球晶技术一步固化去甲斑蝥素自微乳, 并对去甲斑蝥素固体自微乳粒径大小、电位、自乳化速率、稳定性等进行考察。结果 去甲斑蝥素自微乳最佳处方的平均包封率和收率分别为 77.39% 和 84.5%, 粒径为 22.76 nm, Zeta 电位为 -2.77 mV。自乳化速率在不同介质中相差不大, 50 s 内均可完成自乳化。稳定性实验显示, 去甲斑蝥素自微乳的粒径大小、电位和包封率在 60 ℃ 及强光照试验下无变化。结论 自制的去甲斑蝥素固体自微乳稳定可靠。

[关键词] 去甲斑蝥素; 固体自微乳; 正交试验法; 包封率; 稳定性

[中图分类号] R283.6 **[DOI]** 10.3969/j.issn.2095-7246.2017.02.021

去甲斑蝥素的分子式为 $C_8H_8O_4$, 由斑蝥素合成衍生制得, 是中国首先开发的用于治疗原发性肝癌^[1]和肝炎的新药, 其抗肿瘤活性很强^[2], 可以升高白细胞, 且无骨髓抑制作用。然而, 去甲斑蝥素难溶于水, 且在体内代谢快^[3], 生物利用度较低^[4]。为了提高其生物利用度, 延长去甲斑蝥素在体内的作

用时间, 伊美珍等^[5]将其制成微乳、脂质体、微球、纳米粒等剂型。本实验通过制剂手段, 采用正交设计试验优化处方工艺, 实现了去甲斑蝥素固体自微乳的制备并对其稳定性进行考察。

1 仪器及试剂

1.1 仪器 电子天平: 北京赛多利斯仪器系统有限公司; 85-2 恒温磁力搅拌器: 金坛市金分仪器有限公司; HH-S2 恒温水浴锅: 江苏省金坛市环宇科学仪器厂; Malvern Nano-ZS90 粒径电位测定仪: 英国马尔文仪器有限公司; Agilent 1260 高效液相

基金项目: 国家自然科学基金项目(81274100, 81573615)

作者简介: 桂贇(1989-), 男, 硕士研究生

通信作者: 胡容峰, hurongfeng@163.com

In Vitro Effect of *Salvia miltiorrhiza* Injection on Plasma Protein Binding Rate of Gliquidone

ZHANG Rui¹, YANG Ye¹, WANG Wei¹, NI Ni¹, YIN Deng-ke^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Institute of Pharmaceutics, Anhui Academy of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China)

[Abstract] Objective To investigate the *in vitro* effect of *Salvia miltiorrhiza* injection on the plasma protein binding rate of gliquidone. Methods Equilibrium dialysis and high-performance liquid chromatography were used to measure the plasma protein binding rate of gliquidone with the presence or absence of *Salvia miltiorrhiza* injection. Results There were no significant differences in plasma protein binding rate between high, medium, and low concentrations of gliquidone (12.6, 6.3, and 1.26 μg/mL, respectively) ($P > 0.05$). With the presence of the high-, medium-, and low-concentration *Salvia miltiorrhiza* injections (750, 375, and 75 mg/mL, respectively), the plasma protein binding rates of gliquidone were (82.6 ± 3.11), (87.3 ± 9.80)%, and (92.6 ± 4.21)%, respectively. With the presence of high-concentration *Salvia miltiorrhiza* injection, there was a significant reduction in the plasma protein binding rate of gliquidone ($P < 0.05$). Conclusion *Salvia miltiorrhiza* injection at the dose used in clinical practice does not affect the plasma protein binding rate of gliquidone.

[Key words] Gliquidone; *Salvia miltiorrhiza* injection; Equilibrium dialysis; Plasma protein binding rate

色谱仪:美国安捷伦公司;XB C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);Welch ;JJ-1A 数显电动搅拌器;常州普天仪器制造有限公司;SHH-SD 综合药品稳定性试验箱;重庆市永生实验仪器厂。

1.2 试药 去甲斑蝥素原料药(纯度为98.5%);山东大学康诺制药有限公司;去甲斑蝥素对照品(纯度99.5%);上海源叶生物科技有限公司;聚氧乙烯氯化蓖麻油(RH40);江苏省海安石油化工厂;蓖麻油;天津市大茂化学试剂厂;1,2-丙二醇;上海苏懿化学试剂有限公司;吐温-80;天津市光复精细化工研究所;乙基纤维素(ethyl cellulose, EC);阿拉丁试剂公司;微粉硅胶(SiO₂);安徽山河药用辅料有限公司;十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS);国药集团化学试剂有限公司;水为超纯水;乙腈、甲醇为色谱纯;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 去甲斑蝥素自微乳的制备 将去甲斑蝥素加入到处方量的RH40,超声使其完全溶解,然后依次加入处方量的1,2-丙二醇和蓖麻油,搅拌即得去甲斑蝥素的自微乳溶液。

2.2 去甲斑蝥素固体自微乳的制备 量取一定量的0.08% SDS水溶液倒入到烧杯中作为不良溶剂并将其放入恒温水浴锅中。称量处方量的高分子阻滞剂EC,溶解在良溶剂无水乙醇和架桥剂二氯甲烷混合溶剂中,搅拌使高分子阻滞剂完全溶解作为良溶剂系统。将上面制备的去甲斑蝥素自微乳加入到良溶剂系统中,使其混合均匀,并加入一定量的分散载体微粉硅胶使其成为混悬液。在一定搅拌速度下,将良溶剂系统快速均匀地倒入到不良溶剂水中,搅拌一段时间后,取出后晾干,过筛并储存。

2.3 单因素考察

2.3.1 良溶剂考察 良溶剂的种类直接关系到球晶过程中的成球,实验过程中发现二氯甲烷、无水乙醇、丙酮有利于成球,当混合使用无水乙醇和二氯甲烷容积比为5:3时,收率达到最高值(82.5%),休止角为25.6°,卡氏指数为21.12%。

2.3.2 阻滞剂考察 阻滞剂的种类对成球以及释放起到重要的作用。本实验考察了尤特奇(Eudragit RS PO, EuRS PO)、醋酸纤维素(cellulose acetate, CA)、邻苯二甲酸酯羟丙基纤维素(HPMCP, 型号HP-55)对成球和释放的影响,发现CA不能成球,HP-55成球收率不高(50.1%)且微球表面粗糙。EuRS PO制备的微球表明粗糙。而EC制备的微球收率为78.2%,表面光滑不易碎,在12 h释放完全。

2.3.3 不良溶剂考察 不良溶剂对微球粉体性质

以及成球起到关键的作用。本实验考察了0.08% SDS水溶液以及液体石蜡,发现二者都能成球,且收率和休止角相差不大,其中水溶液中产率为82.5%、休止角为24.3°,液体石蜡中产率为84.3%、休止角为25.2°,从节约成本的角度,选择0.08% SDS水溶液。

2.3.4 搅拌时间考察 搅拌时间是良溶剂向不良溶剂中扩散致使药物固化的保证。本实验考察了10、20、30、40、50、55 min的搅拌时间,发现随着搅拌时间的增加,微球产率随之增加,在50 min达到最大值85.6%,随后不再增加。

2.3.5 搅拌速度考察 搅拌速度影响微球粒径的大小,转速越大,粒径越小。本实验考察了300、400、450、500 r/min对成球粒径的影响,其中当转速在400 r/min,成球效果最好,卡氏指数为19.34%,休止角为28.5°。

2.4 去甲斑蝥素固体自微乳包封率的测定 取适量去甲斑蝥素固体自微乳在4000 r/min的转速下离心30 min,然后取上清液用乙醇定容至10 mL容量瓶中,过滤后使用液相的方法测定含量(游离药物量W_f);另取相同量的去甲斑蝥素固体自微乳甲醇定容于10 mL容量瓶中,超声使微球溶解后经过滤进样,测定峰面积(微球总的药物量W_t),根据如下公式^[6-7]计算包封率。包封率=(W_t-W_f)/W_t×100%。

2.4.1 色谱条件 C₁₈柱;流动相:乙腈-pH 3.1磷酸水溶液(12:88);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:211 nm;进样量:20 μL。

2.4.2 标准曲线 精确称取去甲斑蝥素对照品100 mg,放入100 mL容量瓶中,加入纯化水,超声使其完全溶解(丙酮助溶),并定容。精密量取0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mL放入10 mL的容量瓶中,定容后摇匀。分别取20 μL进样,测定峰面积(A),以去甲斑蝥素的峰面积对浓度(c)进行线性回归,得到方程A=70.788c+104.39, R²=0.999 8,结果显示线性关系良好。

2.4.3 精密度测定 选择0.05、0.4、1.0 mg/mL 3个浓度梯度的去甲斑蝥素固体自微乳,日内连续进样5次、连续5 d进样测定,计算3个浓度梯度的日内RSD分别为1.01%、1.05%、1.18%,日间RSD分别为1.24%、1.07%、1.05%。结果表明仪器精密度良好。

2.4.4 回收率试验 取3份已知含量的去甲斑蝥素溶液,分别加入不同质量的去甲斑蝥素,进样测定,计算加样回收率分别为99.13%、98.22%、

99.25%；RSD 分别为 1.73%、1.23%、1.34%。

2.5 正交试验设计优化去甲斑蝥素固体自微乳的制备工艺 以包封率、产率作为考察指标对工艺进行综合评价(包封率和收率的权重系数分别为 0.6 和 0.4)，以良溶剂(无水乙醇-二氯甲烷)容积比(A)、不良溶剂(0.08% SDS 水溶液)容积(B)、搅拌时间(C)为因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验，因素水平见表 2，正交试验结果见表 3。由表 3 直观分析结果可知影响因素 $C > A > B$ ，最佳工艺处方为 $A_2B_2C_3$ 。采用一般线性模型对 A、B、C 的主效应进行分析，结果显示因素 A、B、C 对处方工艺均有显著性影响。见表 4。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

水平	A	B/mL	C/min
1	4:2	80	25
2	4:3	120	35
3	5:3	150	55

表 3 正交试验结果

试验号	A	B	C	D (空白)	收率/%	包封率/%	综合评分
1	1	1	1	1	32.5	49.5	42.70
2	1	2	2	2	61.7	56.3	58.46
3	1	3	3	3	30.4	52.2	43.48
4	2	1	2	3	65.2	61.7	63.10
5	2	2	3	1	51.8	58.7	55.94
6	2	3	1	2	33.6	61.7	50.46
7	3	1	3	2	38.2	60.2	51.40
8	3	2	1	3	44.4	57.8	52.44
9	3	3	2	1	62.1	61.6	61.80
K_1	48.21	52.40	48.53	53.48			
K_2	56.50	55.61	61.12	53.44			
K_3	55.21	51.91	50.27	53.01			
R	8.29	3.70	12.59	0.47			

表 4 方差分析结果

因素	离差平方和	均方	自由度	F 值	P 值
A	119.32	59.66	2	288.92	0.003
B	24.25	12.13	2	58.72	0.017
C	279.10	139.55	2	675.79	0.001
D(误差)	0.41	0.21	2	1.00	

2.6 工艺验证 按照上述最优处方制备 3 批去甲斑蝥素固体自微乳，结果 3 次制备的平均收率为 83.91%，平均包封率为 77.40%。优化的处方制备的去甲斑蝥素固体自微乳重现性好，包封率较稳定。见表 5。

表 5 工艺验证

批号	收率/%	包封率/%
20160715	85.02±3.50	78.86±2.10
20160717	82.53±2.52	77.35±1.40
20160719	84.17±3.91	75.97±3.24

2.7 去甲斑蝥素固体自微乳的粒径电位测定 取一定量的去甲斑蝥素固体自微乳，溶解后使用 Zeta 电位粒径仪测得电位和粒径大小分别为 -2.77 mV、22.76 nm。

2.8 去甲斑蝥素固体自微乳自乳化速率和不同介质的影响 取 4 份去甲斑蝥素自微乳分散在表 6 不同介质中，从表中可以发现不同介质对自乳化基本没有影响。

表 6 不同分散介质对自微乳自乳化的影响

不同分散介质	时间/s	外观形态
生理盐水	45.78±3.12	澄清透明
pH 6.8 的 PBS	43.54±3.64	澄清透明
0.1 mol/L 的 HCl	48.12±3.32	澄清透明
蒸馏水	44.83±3.25	澄清透明

2.9 去甲斑蝥素固体自微乳初步稳定性考察

2.9.1 高温试验 取同一批的去甲斑蝥素固体自微乳，密封放置在药品稳定试验箱中，温度设定在 60℃，分别于第 5 天和第 10 天取样，以粒径大小、外观和包封率作为考察指标。

2.9.2 强光照试验 取同一批的去甲斑蝥素固体自微乳，密封放置在药品稳定试验箱中，光照强度设定在 4 500 lx，分别于第 5 天和第 10 天取样。

2.9.3 高湿试验 取同一批的去甲斑蝥素固体自微乳，开口放置在药品稳定试验箱中，温度设定在 25℃，相对湿度为 92.5%，分别在第 5 天和第 10 天取样观察，结果见表 7。从表 7 中可以发现供试品在高温、强光照和高湿条件下放置 10 d 后，外观、粒径大小、包封率基本没有发生变化。

表 7 去甲斑蝥素稳定性考察

条件	时间/d	粒径大小/nm	外观	包封率/%
高温 60℃ (10 d)	0	22.76	圆形	77.67
	5	23.23	圆形	76.52
	10	22.79	圆形	73.30
强光照 4 500 lx (10 d)	0	22.76	圆形	77.67
	5	21.45	圆形	75.34
	10	21.46	圆形	78.12
高湿试验 (相对湿度 92.5%)	0	22.76	圆形	77.67
	5	23.58	圆形	77.65
	10	24.45	圆形	77.18

3 讨论

本研究分别考察了二氧化硅吸附法^[8]、喷雾干燥法^[9]、直接装胶囊法等方法，最终选择了球晶技术一步固化的方法制备了去甲斑蝥素固体自微乳(固体吸附法制得的微球包封率较低且黏度较大，喷雾干燥法制得的微球收率较低，直接装胶囊法使得微

乳易沉淀)。利用正交设计考察了不同因素对去甲斑蝥素固体自微乳收率、包封率的影响,并最终优化处方和工艺。

利用 Zeta 电位仪测定了它的电位和粒径大小(-2.77 mV, 22.76 nm),这满足自微乳制备要求^[10]且其带负电荷,有利于自微乳的稳定;初步稳定性考察结果显示去甲斑蝥素固体自微乳在 10 d 考察期内,不论是高温环境还是强光照环境下都具有良好的稳定性,包封率、外观以及粒径大小都无明显变化。

参考文献:

- [1] 田海燕,翟光喜. 去甲斑蝥素固体脂质纳米粒的制备及其理化性质研究[J]. 中药材, 2007, 30(9): 1146-1148.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:化学工业出版社, 2015.
- [3] 程宇慧,廖工铁,侯世祥,等. 去甲斑蝥素钠白蛋白微球的研究[J]. 药学报, 1993, 28(5): 384-392.
- [4] 江怡琳. 去甲斑蝥素的分析及应用前景[J]. 药学及临

床, 2014, 8(5): 166-167.

- [5] 伊美珍,杨子春,包洋,等. 去甲斑蝥素-泊洛沙姆聚合物纳米胶束的制备及表征[J]. 湖北理工学院学报, 2015, 31(5): 43-46.
- [6] 李园. 石杉碱甲固体脂质纳米粒的研究[D]. 广州:广东药学院, 2010.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:附录 203.
- [8] SANDER C, HOLM P. Porous magnesium aluminometasilicate tablets as carrier of a cyclosporine self-emulsifying formulation[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2009, 10(4): 1388-1395.
- [9] JANG D J, JEONG E J, LEE H M, et al. Improvement of bioavailability and photostability of amlodipine using redispersible dry emulsion[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 28(5): 405-411.
- [10] 丁沐淦,龙晓英,林丹荣. 自微乳化给药系统处方设计和体外评价[J]. 中成药, 2008, 30(7): 976-980.

(收稿日期:2017-01-12;编辑:曹健)

Preparation and stability of norcantharidin solid self-microemulsion

GUI Yun^{1,2}, HU Rong-feng^{1,2,3,4}, WANG Bin¹, ZHOU Hong^{1,2}, JIN Dong^{1,2}

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Anhui Hefei 230038, China; 3. Anhui "115" Xin'an Traditional Chinese Medicine Research & Development Innovation Team, Anhui Hefei 230038, China; 4. Anhui Province Key Laboratory of R&D of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the preparation and stability of norcantharidin solid self-microemulsion. **Methods** With encapsulation efficiency and yield as evaluation indices, the spherical crystallization technique was used for preparation, and an orthogonal design was used for the optimization of preparation process to realize the solidification of norcantharidin self-microemulsion in a single step. Norcantharidin solid self-microemulsion was evaluated in the aspects of particle size, potential, self-emulsifying rate, and stability. **Results** The best prescription of norcantharidin self-microemulsion had a mean encapsulation efficiency of 77.39%, a mean yield of 84.5%, a particle size of 22.76 nm, and a Zeta potential of -2.77 mV. There was no significant difference in self-emulsifying rate between different media, and self-emulsification was completed within 50 seconds. The stability test showed that there were no changes in particle size, potential, or encapsulation efficiency of norcantharidin self-microemulsion at a temperature of 60 °C and after exposure to strong light. **Conclusion** The self-made norcantharidin solid self-microemulsion is stable and reliable.

[Key words] Norcantharidin; Solid self-microemulsion; Orthogonal test; Encapsulation efficiency; Stability