

- [11] 王正宽, 刘 圆, 周 菲, 等. 中试规模下 Box-Behnken 法优化延胡索微波提取工艺[J]. 中草药, 2015, 46(16): 2394-2399.
- [12] 任 蕾, 冯海燕, 杨晓辉, 等. 分光光度法测定柿蒂中总三萜酸的含量[J]. 石家庄学院学报, 2014, 16(6): 28-30.
- [13] 林轶男, 金慧子, 苏 娟. 高效液相色谱法测定山楂精降脂片中齐墩果酸和熊果酸含量[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(5): 448-450; 466.
- [14] 李维霞, 魏 佳, 苏玉红, 等. 高效液相色谱法测定巴旦木青皮提取物中齐墩果酸和熊果酸[J]. 食品科学, 2016, 37(10): 151-157.

金银花总黄酮自微乳处方的优化

赵惠茹, 石大玉, 靖 会, 肖 呈, 周 喆, 张一帆
(西安医学院药学院, 陕西 西安 710021)

摘要: 目的 优化金银花总黄酮自微乳处方。方法 以油相、乳化剂、助乳化剂比例为影响因素, 平均粒径、多分散指数、载药量为评价指标, 单纯形网格法优化处方。结果 最佳处方为油相(油酸乙酯)、乳化剂(吐温-80)、助乳化剂(1, 2-丙二醇)比例 10:45:45, 平均粒径、多分散指数、载药量分别为 45.63 nm、0.315、12.506 mg/g。结论 该方法稳定可靠, 预测性好, 可用于筛选金银花总黄酮自微乳处方。

关键词: 金银花; 总黄酮; 自微乳; 处方; 单纯形网格法

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)10-2302-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.10.004

Formulation optimization for self-microemulsions of total flavonoids from *Lonicera japonica*

ZHAO Hui-ru, SHI Da-yu, JING Hui, XIAO Cheng, ZHOU Zhe, ZHANG Yi-fan
(College of Pharmacy, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

KEY WORDS: *Lonicera japonica* Thunb.; total flavonoids; self-microemulsions; formulation; simplex lattice method

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花, 为临床常用中药, 具有疏散风热、清热解毒的功效^[1], 其总黄酮有抗氧化、抗炎、抗心律失常、抑菌、保肝等作用^[2-3], 但其水溶性差, 相关口服制剂(金银花糖浆、复方金银花颗粒等)生物利用度低, 从而限制药效发挥, 影响临床应用。文献[4-6]报道, 将金银花总黄酮制成自微乳可能会提高其水溶性, 但目前尚无相关研究。

自微乳是由油相、乳化剂、助乳化剂组成的一种新型药物载体, 在温和搅拌下遇水可自乳化成粒

径小于 100 nm 的水包油型乳剂, 在增加难溶性药物溶解度、促进药物吸收、提高生物利用度、避免药物水解和对胃肠道不良刺激方面具有明显优势, 近年来已广泛用于药物制剂开发中^[7-8]。其中, 筛选处方是最核心的部分, 故本实验拟将金银花总黄酮制成自微乳, 并采用单纯形网格法优化其处方, 为相关新剂型研发提供参考。

1 材料

1.1 仪器 ZEN3600 型激光粒度仪(英国 Malvern 公司); UV762 型紫外可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司); KQ5200E 型超声波清洗器

收稿日期: 2018-11-21

基金项目: 国家级大学生创新训练计划项目(201825018); 西安医学院药学院省级重点学科建设项目(2016YXXK04); 西安医学院大学生创新训练计划项目(2018DC-18); 西安医学院配套基金项目(2016PT13, 2016PT15)

作者简介: 赵惠茹(1972—), 女, 硕士, 教授, 从事天然药物研究与开发。E-mail: 1119015403@qq.com

(昆山市超声仪器有限公司); FA1004B型电子精密天平(上海越平科学仪器有限公司); TGL-16C型离心机(上海安亭科学仪器厂); RE-2000A型旋转蒸发器、DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司)。

1.2 试药 芦丁对照品(含有量 $\geq 99\%$,批号100080,上海源叶生物科技有限公司);金银花总黄酮(批号180326,自制,以芦丁计算含有量为74.6%)。金银花购于西安市万寿路药材市场,经西安医学院药学院边军昌高级实验师鉴定为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾。D101大孔吸附树脂(陕西蓝深科技有限公司);聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40)、聚氧乙烯蓖麻油(EL-35)(德国巴斯夫公司);曲拉通(X-100,成都市科龙化工试剂厂);吐温-80(天津富宇精细化工有限公司);辛酸癸酸三甘油酯(上海千为油脂科技有限公司);肉豆蔻酸异丙酯(国药集团化学试剂有限公司);油酸乙酯(天津市光复精细化工研究所);聚乙二醇400(天津市科密欧化学试剂有限公司);1,2-丙二醇(天津市北联精细化学品开发有限公司);异丙醇(天津市河东区红岩试剂厂)。其他试剂均为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 总黄酮含有量测定^[9] 精密称取芦丁对照品20.0 mg,置于50 mL量瓶中,70%乙醇溶解定容,得0.400 mg/mL对照品溶液,精密移取0.0、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 mL,置于10 mL量瓶中,依次加入5%亚硝酸钠0.4 mL,摇匀,静置6 min;10%硝酸铝0.4 mL,摇匀,静置6 min;4%氢氧化钠4 mL,加水定容至刻度,摇匀,静置15 min,以相应试剂为空白对照,在510 nm波长处测定吸光度。以溶液质量浓度为横坐标(X),吸光度为纵坐标(A)进行回归,得方程为 $A =$

$4.366 1X + 0.011 3$ ($r = 0.997 1$),在0.04 ~ 0.16 mg/mL范围内线性关系良好。

2.2 总黄酮制备

2.2.1 提取^[10] 称取药材粗粉适量,置于索氏提取器中,石油醚连续回流至提取液无色后取出晾干,加入10、8、6倍量70%乙醇回流提取3次,每次1.5 h,提取液合并,减压浓缩至无醇味,6倍量蒸馏水搅拌溶解,12 h后离心,上清液减压浓缩至适当浓度,备用。

2.2.2 纯化^[11-12] 将预处理好的D101大孔吸附树脂倒入烧杯中,加入总黄酮浓缩液静态吸附12 h,将达到吸附饱和的树脂装入层析柱中,依次用6 BV蒸馏水、5 BV 30%乙醇洗脱除去杂质,再用5 BV 70%乙醇洗脱,收集洗脱液,减压回收乙醇,即得总黄酮。精密称取干燥至恒重的总黄酮50 mg,置于25 mL量瓶中,70%乙醇溶解定,精密移取2.0 mL置于25 mL量瓶中,按“2.1”项下方法测定吸光度,测得总黄酮含有量为74.6%。

2.3 处方筛选

2.3.1 溶解度 精密称取聚氧乙烯氢化蓖麻油RH-40、曲拉通X-100、聚氧乙烯蓖麻油EL-35、吐温-80这4种乳化剂,以及异丙醇、聚乙二醇400、1,2-丙二醇、无水乙醇这4种助乳化剂各4 g,置于具塞离心管中,加入过量总黄酮,在20 kHz频率、室温下超声1 h辅助溶解后37 °C水浴中静置24 h,3 000 r/min离心10 min,吸取适量上清液,甲醇稀释至适宜浓度,按“2.1”项下方法测定吸光度,计算溶解度,结果见表1。由表可知,总黄酮在聚氧乙烯氢化蓖麻油RH-40、吐温-80、无水乙醇、1,2-丙二醇中的溶解度较大,故选择前两者作为乳化剂,后两者作为助乳化剂进一步筛选自微乳油相。

表1 总黄酮溶解度测定结果

Tab.1 Results of solubility determination of total flavonoids

乳化剂	溶解度/(mg·g ⁻¹)	助乳化剂	溶解度/(mg·g ⁻¹)
聚氧乙烯氢化蓖麻油 RH-40	3.41	异丙醇	1.60
曲拉通 X-100	0.02	聚乙二醇 400	3.63
聚氧乙烯蓖麻油 EL-35	0.21	1,2-丙二醇	5.02
吐温-80	2.79	无水乙醇	5.35

2.3.2 油相与乳化剂配伍 将辛酸癸酸三甘油酯、肉豆蔻酸异丙酯、油酸乙酯这3种油相与聚氧乙烯氢化蓖麻油RH40、吐温-80这2种乳化剂按1:9、2:8、3:7、4:6比例混合后,加入100倍量超

纯水,400 r/min磁力搅拌,按文献[13]方法根据乳化时间和液体颜色观察乳化情况。结果,油酸乙酯与吐温-80配伍时乳化时间短,所需乳化剂少,乳化效果好,故选择前者作为油相,后者作为

乳化剂。

2.3.3 助乳化剂 按照油酸乙酯、吐温-80、助乳化剂 2 : 4 : 4 的比例加入助乳化剂无水乙醇、1, 2-丙二醇, 400 r/min 磁力搅拌均匀后加入 100 倍量超纯水磁力搅拌乳化, 记录从加入超纯水开始磁力搅拌至完全分散、形成外观澄清或有蓝白色乳光均一微乳所需的时间, 即为乳化时间。结果, 加入 2 种助乳化剂后乳化时间均分别缩短至 24、37 s, 考虑到无水乙醇易挥发, 故选择 1, 2-丙二醇作为助乳化剂。

2.3.4 各组分比例范围^[14] 先将吐温-80 与 1, 2-丙二醇按照 1 : 9、2 : 8、3 : 7、4 : 6、5 : 5、6 : 4、7 : 3、8 : 2、9 : 1 比例混匀, 再与油酸乙酯按照 9 : 1、8 : 2、7 : 3、6 : 4、5 : 5 比例混匀后, 称取 0.5 g 滴加到 50 mL 超纯水中, 400 r/min 磁力搅拌, 记录可形成外观澄清或有蓝白色乳光的均一微乳处方中各组分比例。再以油相、乳化剂、助乳化剂为相图 3 个顶点, Origin8.0 软件绘制伪三元相图, 结果见图 1, 根据微乳区域的边界确定油酸乙酯、吐温-80、1, 2-丙二醇比例范围分别为 10% ~ 30%、30% ~ 70%、10% ~ 50%。

2.4 处方优化

2.4.1 试验设计^[15-17] 根据“2.3”项下处方筛选结果, 结合单纯形网格法比例约束, 确定自微乳中各组分比例为油酸乙酯 (X_1) 10% ~ 25%、吐

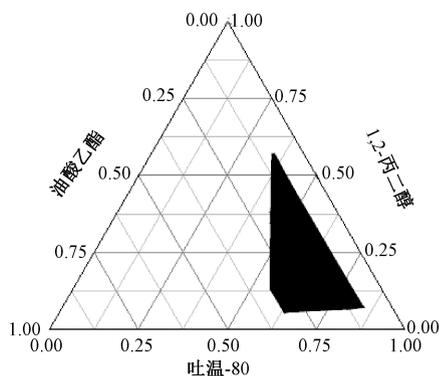


图 1 自微乳伪三元相图

Fig. 1 Pseudo-ternary phase diagram for self-microemulsions

温-80 (X_2) 45% ~ 60%、1, 2-丙二醇 (X_3) 30% ~ 45%。再以自微乳平均粒径 (Y_1)、多分散指数 (Y_2)、载药量 (Y_3) 为评价指标, Design Expert 8.0.6 软件进行设计, 按处方比例精密称取油相、乳化剂、助乳化剂, 400 r/min 磁力搅拌 10 min 后加入过量总黄酮, 混匀, 在 20 kHz 频率、室温下超声 1 h 辅助溶解, 静置 24 h, 即得自微乳。过滤后, 精密称取 0.5 g 置于 50 mL 量瓶中, 超纯水稀释并定容, 摇匀, 3 000 r/min 离心 10 min, 移取适量上清液, 测定平均粒径、多分散指数, 按“2.1”项下方法测定吸光度, 计算载药量, 公式为载药量 = 总黄酮质量 / 自微乳质量, 结果见表 2。

表 2 试验设计及结果

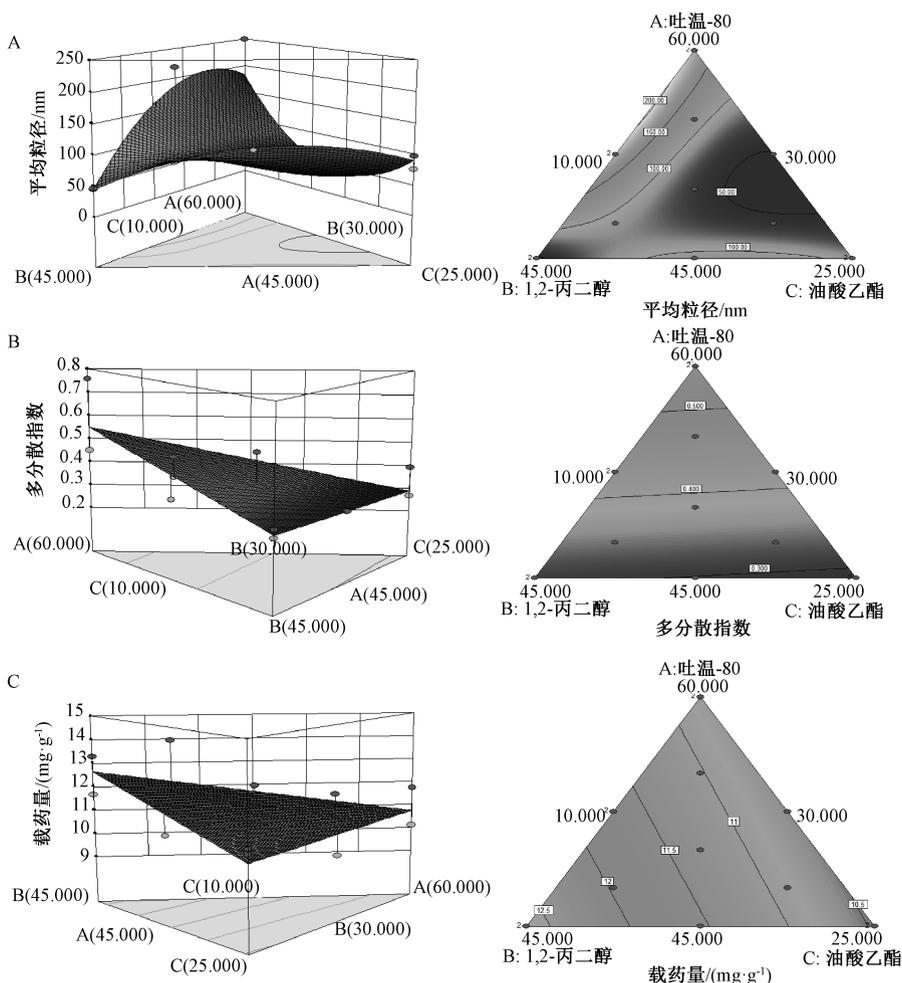
Tab. 2 Design and results of tests

试验号	X_1 油酸乙酯/%	X_2 吐温-80/%	X_3 1,2-丙二醇/%	Y_1 平均粒径/nm	Y_2 多分散指数	Y_3 载药量/(mg·g ⁻¹)
1	12.5	47.5	40.0	76.66	0.278	14.12
2	12.5	55.0	32.5	84.82	0.271	11.77
3	10.0	52.5	37.5	166.7	0.430	10.64
4	17.5	52.5	30.0	49.74	0.360	9.75
5	10.0	60.0	30.0	126.7	0.757	10.12
6	10.0	45.0	45.0	45.81	0.329	13.30
7	10.0	45.0	45.0	46.23	0.297	11.67
8	25.0	45.0	30.0	75.52	0.268	10.78
9	20.0	47.5	32.5	75.51	0.261	10.69
10	25.0	45.0	30.0	96.12	0.390	10.99
11	10.0	52.5	37.5	218.8	0.510	11.97
12	17.5	45.0	37.5	106.7	0.298	10.69
13	10.0	60.0	30.0	249.8	0.452	11.78
14	15.0	50.0	35.0	76.30	0.505	10.23

2.4.2 模型拟合及方差分析 通过 Design Expert 8.0.6 软件进行多元回归模型拟合, 得方程分别为 $Y_1 = -77.772 60X_1 - 77.945 24X_2 - 19.639 91X_3 + 11.678 00X_1X_2 + 5.708 27X_2X_3 + 20.655 94X_1X_3 - 0.441 59X_1X_2X_3$ 、 $Y_2 = -0.005 48X_1 + 0.012 17X_2 -$

$0.004 11X_3$ 、 $Y_3 = -0.051 34X_1 - 0.072 01X_2 + 0.197 74X_3$ 。再进行方差分析, 可知各模型 $P < 0.000 1$, 失拟项 $P > 0.05$, 回归方程系数 $R^2 > 0.80$, 表明模型拟合度良好。

2.4.3 响应面分析 见图 2。



注：A~C 分别为平均粒径、多分散指数、载药量。左图为三维曲面图，右图为等高线图

图2 各因素响应面图

Fig. 2 Response surface plots for various factors

2.5 验证试验 自微乳粒径越小，粒径分布越窄，越有利于药物的溶出与吸收；载药量越大，实际服用剂量越少，越便于临床应用。因此，综合考虑3个指标，以平均粒径、多分散指数符合要求并尽可能小，载药量最大为指标，Design Expert 8.0.6 软件进行优化，得最优处方为油酸乙酯、吐温-80、1, 2-丙二醇比例 10 : 45 : 45。再根据优化处方制备3批自微乳，进行验证试验，结果见表3、图3，可知处方稳定可行。

表3 验证试验结果

Tab. 3 Results of verification tests

指标	检测值	预测值	相对偏差/%
平均粒径/nm	45.63	42.31	-7.85
多分散指数	0.315	0.307	-2.61
载药量/(mg·g ⁻¹)	12.506	13.124	4.71

3 讨论

本实验采用 D101 大孔吸附树脂分离纯化金银

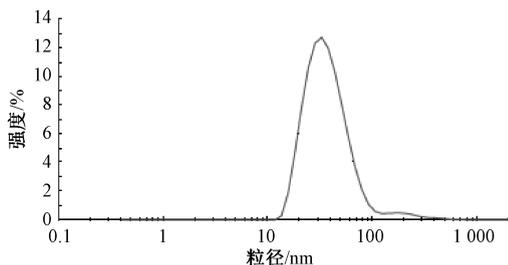


图3 自微乳粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of self-microemulsions

花总黄酮时，依次用适量纯化水和 30% 乙醇除杂，再用 70% 乙醇洗脱，发现纯度较高，粒径较预实验没有除杂所得的自微乳减小，载药量显著增大，说明理化性质差别较大的杂质会对其形成产生特殊影响。因此，在对中药有效部位自微乳处方进行研究时，应尽可能采用多种纯化方法提高其纯度。

本实验首先根据金银花总黄酮在几种备选乳化剂、助乳化剂中的溶解度初步筛选，然后通过油

相、乳化剂的配伍实验来确定种类,接着筛选助乳化剂,根据伪三元相图确定各自比例范围,最后用单纯形网格法进一步优化。这与测定总黄酮在各种备选油相、乳化剂、助乳化剂中的溶解度来筛选处方不同,主要是因为即使总黄酮在某种油相中的溶解度最大,与乳化剂、助乳化剂配伍后未必是最优处方,甚至有时候并不能形成稳定的微乳,还需要进一步选择溶解度次之的油相去配伍。为了减少油相、乳化剂、助乳化剂配伍次数,避免盲目性筛选,本实验略去了总黄酮在各种备选油相中的溶解度数据。

由于金银花总黄酮在无水乙醇中的溶解度大于1,2-丙二醇,故预实验以其为助乳化剂,伪三元相图微乳区域各组分的比例分别为10%~40%油酸乙酯、30%~80%吐温-80、10%~60%无水乙醇,但用单纯形网格法优选时有个别处方不能形成稳定的微乳,可能是由于搅拌时无水乙醇挥发,从而使各组分比例发生变化,降低了稳定性,故选用对金银花总黄酮溶解能力较好、不挥发的1,2-丙二醇作为助乳化剂。另外,采用单纯形网格法优选处方时,14组实验形成的空白微乳均为澄清或略泛蓝色,并均能在室温下稳定存在。

处方筛选优化是自微乳制剂研究最关键的部分,目前可应用正交试验、均匀设计实验、星点设计-效应面法等进行研究,每种方法都有其优缺点。其中,基于Design Expert 8.0.6软件试验设计、模型构建、结果预测的单纯形网格法是采用空间图形淘汰法进行处方优选,通过因素之间的相互约束来影响指标,在确定处方组成的响应面和最佳范围方面优势独到,尤其适合自微乳这类组分总量恒定的剂型,而且考察因素数目相同时实验次数少于星点设计-效应面法,不必连续进行多次试验,预测结果准确。综上所述,单纯形网格法拓宽了自微乳处方筛选方法,可为相关优化研究提供新思路。

参考文献:

[1] 张百霞,周凤琴,郭庆梅. 金银花中黄酮类化合物的研究进

展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23): 349-352.

[2] 沈玲玲,胡志军,王志良,等. 金银花中总黄酮的提取及其消除自由基的研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(5): 1169-1171.

[3] 马官英,张庆刚,钟瑞华,等. 金银花总黄酮对氧化应激中肝星状细胞的保护作用[J]. 中国药房, 2014, 25(31): 2895-2897.

[4] 刘丹,张露,张振海,等. 银杏黄酮组分自微乳-微丸释药系统的构建[J]. 中草药, 2017, 48(16): 3377-3383.

[5] 吴成杨,尹东东,王杏林. 自乳化药物传递系统的处方优化方法和应用[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(2): 190-195.

[6] 陈倩,陈晨,管清香. 葛根总黄酮口服自微乳载药系统的处方优化[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(15): 3248-3250.

[7] 姚依婧,郭秉玉,韩静,等. 星点设计-效应面法优化紫杉醇自微乳给药系统[J]. 中南药学, 2014, 12(11): 1069-1072.

[8] 叶蕾,胡容峰,王晓华,等. 星点设计-效应面法优化葛根素自微乳工艺[J]. 中成药, 2014, 36(3): 514-519.

[9] 王建壮,吕华冲. 比色法测定龙血竭总黄酮含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 55-58.

[10] 贾霖,黄国清,肖军霞. 金银花中黄酮类化合物的提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(9): 41-43.

[11] 胡志军,沈玲玲,王南溪,等. 大孔吸附树脂分离纯化金银花中黄酮类物质的研究[J]. 离子交换与吸附, 2011, 27(3): 229-237.

[12] 丁伟杰,胡盈,陈雯,等. D101型大孔吸附树脂分离纯化红蓼总黄酮工艺研究[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(15): 1259-1262.

[13] 杨露,李小芳,罗佳,等. 单纯形网格法优选柿叶总黄酮自微乳处方[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 13-17.

[14] 李秋萍,戴俊东,翟文文,等. 单纯形网格法优化设计姜黄素-胡椒碱复方自微乳制剂处方[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 3936-3944.

[15] 黄庆德,姚娜,胡建萍,等. 单纯形网格法优化灯盏花素微乳处方及其理化性质考察[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(15): 1401-1405.

[16] 徐铃燕,谢远平,康倩,等. 单纯形网格法优化外用中药不同油水分配系数多成分微乳制剂处方[J]. 中草药, 2017, 48(19): 3961-3969.

[17] 崔颖,张韻慧,郭鹏. 四元单纯形网格法优化磷酸川芎嗪微乳处方[J]. 中成药, 2009, 31(1): 43-46.