



醒脑静微乳的体外释放研究

王珊¹, 杜守颖^{1*}, 陆洋¹, 陈晓兰¹, 宋道¹, 李冬雪²

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 中国生物技术发展中心, 北京 100039)

[摘要] 目的:研究醒脑静微乳体外释放的特性,探讨其释药机制。方法:采用 HPLC 测定栀子苷含量,GC 测定龙脑含量,以透析法研究醒脑静微乳的体外释放并利用药物释放模型方程拟合释放曲线。结果:微乳中水溶性成分栀子苷 2 h 内基本释放完全,释放符合 Weibull 方程,脂溶性成分龙脑释放符合一级方程。结论:微乳中不同性质的药物成分释放行为存在较大差异,各成分分布于微乳的不同相中。

[关键词] 微乳;醒脑静;体外释放

醒脑静主要由麝香、郁金、栀子、艾片组成,具开窍醒脑、凉血行气、活血化瘀、清热解毒之功效,为临床救急备用药之一。现代药理学研究表明醒脑静处方中的脂溶性^[1-4]和水溶性成分^[5-6]均对心脑血管及神经系统有良好的调节和保护作用。微乳作为一种热力学稳定的油水混合体系,可同时溶解水溶性和脂溶性两部分成分,因此本实验室将醒脑静制备成微乳制剂。本文对醒脑静复方微乳进行体外释放的研究,比较不同成分的释放行为特点,其结果可以体现复方微乳的载药特性,对于复方微乳制剂的研究也具有一定的理论意义。

1 材料

岛津 SPD-10A 型高效液相色谱仪(日本岛津株式会社),Agilent 7890A 型气相色谱仪(安捷伦科技有限公司),Anke TGL-16G 离心机(上海安亭科学仪器厂),TP-5 型智能透皮仪(南京红蓝电子科技有限公司),VORTEX-5 涡旋混合器(常州诺基仪器厂),透析袋(直径 21 mm,北京拜耳迪生物技术有限公司)。

醒脑静微乳(本实验室自制),麝香酮、龙脑、栀子苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号分别

为 110719-200613,110881-200706,200607),十八烷(色谱纯,天津市光复精细化工研究所),聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(吐温 80,北京益利精细化学品有限公司),乙酸乙酯(分析纯,北京益利精细化学品有限公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 栀子苷方法学考察

2.1.1 色谱条件 Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈-水(14:86);检测波长 238 nm;流速 1.0 mL · min⁻¹;柱温 30 °C;进样量 10 μL。

2.1.2 对照品、供试品溶液的制备 精密称取栀子苷对照品适量,加甲醇配制成 161.6 mg · L⁻¹的对照品储备溶液。精密移取释放接收液 0.5 mL,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤得到供试品溶液。

2.1.3 线性关系考察 精密移取对照品储备液 0.5,1.0,1.5,2.0,3.0,4.5 mL 至 10 mL 量瓶中,加甲醇定容后,配制成质量浓度分别为 8.08,16.16,24.24,32.32,48.48,72.72 mg · L⁻¹的栀子苷样品溶液。按 2.1.1 项下条件测定峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标绘制标准曲线方程 $Y = 14588X + 4037.9$, $r = 0.9999$;栀子苷在 8.08 ~ 72.72 mg · L⁻¹ 线性关系良好。

2.1.4 精密度考察 取同一对照品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件测定峰面积,连续测定 6 次,峰面积 RSD 为 0.080%,说明仪器精密度良好。

2.1.5 稳定性考察 取同一样品溶液,于 0,2,4,6,8,10,12 h 按 2.1.1 项下色谱条件测定峰面积, RSD 1.2%,表明样品在 12 h 内稳定。

[稿件编号] 20101124010

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81073057);国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-008,2009ZX09308-003);教育部博士点基金项目(20090013110007)

[通信作者] * 杜守颖,教授,博士生导师,主要从事中药新剂型与新技术研究,Tel:(010)84738645,E-mail: dushouying@263.net

[作者简介] 王珊,研究生,研究方向中药新剂型与新技术,Tel:(010)84739409,E-mail: ant5wangshan@163.com



2.2 龙脑方法学考察

2.2.1 气相色谱条件 DB-WAX 型气相毛细管色谱柱(530 μm × 30 m, 1.00 μm); 进样口温度 250 °C; 检测器温度 280 °C; 载气 N₂, 流速 6 mL · min⁻¹; 温度 140 °C 保持 9 min; 进样量 1 μL, 分流比 10:1。

2.2.2 对照品、供试品溶液的制备 精密称定十八烷适量, 加乙酸乙酯配制成质量浓度为 103.094 mg · L⁻¹ 溶液, 备用。精密称取龙脑对照品适量, 加含 0.5% 吐温 80 的生理盐水溶液配制成对照品贮备液。精密移取释放接收液 0.5 mL, 加入十八烷内标液 0.5 mL, 涡旋 2 min, 离心 10 min, 转速 10 000 r · min⁻¹, 吸取上清液得到供试品溶液。

2.2.3 线性关系考察 精密移取一定量的贮备液, 加含 0.5% 吐温 80 的生理盐水溶液配置成一系列浓度的龙脑对照品溶液, 按 2.2.2 项下方法处理, 吸取上清液进样, 以龙脑的浓度为横坐标, 龙脑和内标峰面积比值为纵坐标绘制标准曲线并进行回归, 龙脑回归方程 $Y = 8.2441X + 0.0035$, $r = 0.9997$, 龙脑在 0.02006 ~ 0.4012 g · L⁻¹ 线性关系良好。

2.2.4 精密度考察 取低、中、高 3 个浓度的龙脑对照品溶液, 分别按 2.2.1 项下色谱条件测定峰面积, 连续测定 5 次, 龙脑低、中、高浓度的精密度 RSD 分别为 0.72%, 0.88%, 0.94%, 说明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性考察 取同一样品溶液, 于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 按 2.2.1 项下色谱条件测定峰面积, RSD 1.5%, 表明样品在 10 h 内稳定。

2.2.6 萃取回收率考察 精密称取龙脑对照品, 加含 0.5% 吐温 80 的生理盐水溶液配制成质量浓度分别为 40.12, 160.48, 240.72 mg · L⁻¹ 的龙脑对照品溶液, 按 2.2.2 项下方法处理, 每个浓度平行操作 3 份, 平均回收率分别为 97.07%, 95.11%, 98.49%。

2.2.7 龙脑释放过程中的稳定性考察 由于处方中含有较多挥发性成分, 在较长的释放过程中容易损失, 导致结果产生误差。因此释放过程中将释放装置密封, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 取样 0.5 mL, 按照 2.2.2 项下方法处理, 进 GC 测定含量。计算不同时间下的剩余率, 计算公式如下:

$$\text{剩余率} = \frac{C_t}{C_0} \times 100\%$$

其中 C_t 表示各时间点药物浓度, C_0 表示起始时介质中药物浓度。

12 h 内龙脑含量基本稳定, 剩余率均在 95% 以上, 说明释放装置密闭性良好, 见图 1。

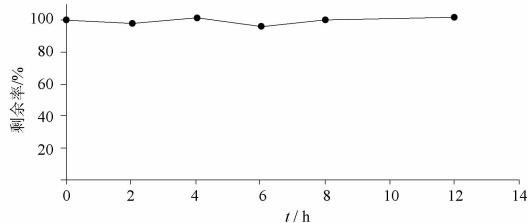


图1 龙脑释放过程中的稳定性

2.3 释放度的测定

2.3.1 漏槽条件考察 由于龙脑在水中几乎不溶, 考察了 2 种不同浓度的吐温 80 生理盐水溶液对龙脑的增溶情况, 结果龙脑在 0.5% 和 1% 吐温 80 生理盐水溶液中的平衡溶解度分别为 0.9508, 1.3565 g · L⁻¹, 均符合漏槽条件, 因此选择 0.5% 吐温 80 生理盐水溶液作为接收液。

2.3.2 透析法 取自制醒脑静微乳 0.5 mL 置于透析袋中, 两端用透析夹夹紧, 放置于盛有 200 mL 的 0.5% 吐温 80 生理盐水溶液的具塞广口瓶中, 封口膜密封, 37 °C 水浴, 以 300 r · min⁻¹ 的速度搅拌, 分别在 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 取样 1 mL, 补加相同体积新鲜接收液。精密移取 0.5 mL 接收液至 EP 管中, 按 2.2.2 项下方法处理, 进 GC 测定龙脑含量; 另 0.5 mL 按 2.1.2 项下处理, HPLC 测定栀子苷含量。按照以下公式计算不同时间点的累积释放率 Q_n :

$$Q_n = \frac{VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1}{W} \times 100\%$$

式中 Q_n 为第 n 点的累积透过滤率(%); V 为接收液体积(mL); C_n 为第 n 点测得的药物质量浓度(g · L⁻¹); 1 为取样 1 mL; W 为给药总量(mg)。

2.3.3 不同截留相对分子质量透析袋的选择 选择了截留相对分子质量 12 000 ~ 14 000, 7 500 2 种型号的透析袋进行比较, 计算不同时间的累积释放率, 见表 1, 2。

以龙脑 12 h 累积释放率为指标, 采用 SAS 统计软件将 2 组结果进行独立 t 检验, $P < 0.05$, 有统计学差异。以相似因子 f_2 对两者的栀子苷释放行为进行评价, f_2 因子计算公式如下:



表 1 不同截留相对分子质量的透析袋对栀子苷 Q_n 的影响

截留相对分子质量	累积释放率							
	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
12 000 ~ 14 000	26.35	43.65	70.16	84.03	92.72	93.74	94.22	94.28
7 500	35.54	47.45	64.97	82.77	92.30	94.41	95.91	95.74

表 2 不同截留相对分子质量的透析袋对龙脑 Q_n 的影响

截留相对分子质量	累积释放率							
	0.25 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
12 000 ~ 14 000	2.96	5.71	10.55	20.15	34.68	47.58	58.64	72.73
7 500	3.79	5.71	8.70	15.01	17.90	23.32	37.21	31.76

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Q_i - q_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

式中 Q_t, q_t 表示 2 种型号透析袋在第 t 时间点的平均累积释放率, n 为释放取样点数。当 f_2 在 50 ~ 100 时, 可判断 2 条释放曲线组群内各测试点的平均值差异不超过 10%, 认为相似; 值越接近 100, 两曲线相似度越大; 小于 50, 则认为两者释药行为不相似。计算结果 $f_2 = 71$, 说明 2 种截留相对分子质量的透析袋对栀子苷释放行为相似, 综合龙脑与栀子苷的释放结果, 选择截留相对分子质量 12 000 ~ 14 000 进行考察。

2.3.4 醒脑静微乳与原料药液累积释放曲线的比较 按照醒脑静微乳中药物处方比例称取原料药, 采用复合溶媒(乙醇-丙二醇-水 3:3:4) 配制成原料药液, 备用。

采用透析法比较醒脑静微乳与原料药液中栀子苷和龙脑的释放行为, 并进行统计学检查。其中以相似因子 f_2 对两者的栀子苷释放行为进行评价, $f_2 = 99.8$, 说明两者栀子苷释放行为相似; 采用 SAS 统计软件对龙脑的释放行为进行独立 t 检验, $P < 0.05$, 有统计学差异。以不同成分的平均累积释放率为纵坐标, t 为横坐标, 绘制释放曲线, 见图 2, 3。

由释放曲线可以看出, 不同成分的释放存在较大差异, 栀子苷为水溶性成分能较快释放出来, 在微乳和原料药液中 3 h 时均基本释放完全; 龙脑为脂溶性成分, 原料药液在释放中水进入透析袋而析出龙脑结晶, 微乳能将龙脑包合于内相, 保持稳定的胶体溶液体系, 使不断从内相中溶出, 能较好的释放出来。微乳中 2 种不同成分的释放行为差异提示不同溶解度的有效成分在 O/W 型微乳中的存在位置或形式有很大差别。

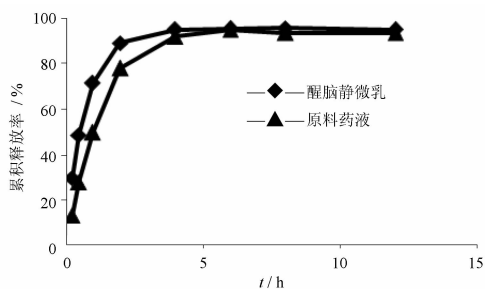


图 2 不同样品中栀子苷的平均累积释放曲线

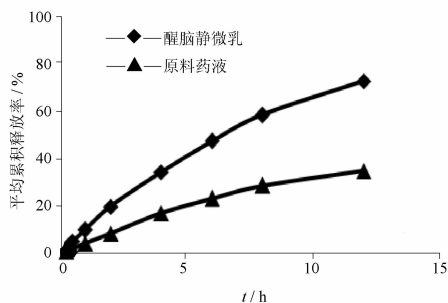


图 3 不同样品中龙脑的平均累积释放曲线

2.3.5 释放方程拟合 对醒脑静微乳中不同成分的释放结果进行常规方程的拟合, 求出曲线方程, 用相关系数 r 判断其拟合程度, 其中 Q 为累积释放率, 见表 3, 4。

表 3 栀子苷释放方程拟合表

方程	曲线	r
零级	$Q = 0.2178t + 0.3353$	0.9119
一级	$\ln(1 - Q) = -0.7352t - 0.2622$	0.9840
Weibull	$\ln(1/1 - Q) = 0.8331 \ln t + 1.3027$	0.9868
Higuchi	$Q = 0.5189t^{1/2} + 0.0738$	0.9615
Niebergull	$(1 - Q)^{1/2} = -0.1931t + 0.8334$	0.9529
Hixson-crowell	$(1 - Q)^{1/3} = -0.1583t + 0.893$	0.9648



表4 龙脑释放方程拟合表

方程	曲线	r
零级	$Q = 0.060 6t + 0.058 7$	0.987 7
一级	$\ln(1 - Q) = -0.107 2t - 0.004 7$	0.999 7
Weibell	$\ln(1/1 - Q) = 0.307 4\ln t + 0.230 3$	0.912 8
Higuchi	$Q = 0.244 8t^{1/2} - 0.121 7$	0.997 9
Niebergull	$(1 - Q)^{1/2} = -0.039 8t + 0.980 6$	0.996 5
Hixson-crowell	$(1 - Q)^{1/2} = -0.029 2t + 0.990 2$	0.998 3

拟合结果显示,水溶性成分栀子苷的释药曲线较接近 Weibell 方程,而脂溶性成分龙脑的释药曲线最接近一级方程,进一步说明不同溶解性的药物成分在微乳中以不同形式存在。

3 讨论

本课题为了探讨醒脑静微乳的释药特性及机制,分别采用了零级、一级……方程对栀子苷、龙脑的释放数据进行拟合,根据相关系数 r 确定了最适方程。结果发现龙脑与栀子苷的释放形式存在较大差异,可能与药物在微乳内相、表面活性剂层、外相的溶解度不同有关,不同溶解性的药物被增溶于微乳的不同部位,其释放路径不同^[7-8]。本实验所制备的醒脑静微乳为 O/W 型,其中栀子苷为水溶性成分,主要存在于外相,直接释放到接收液中,释放较快;龙脑为脂溶性成分,主要增溶于内相,释放时经

内相-界面膜-外相,因此释放较缓慢。

微乳作为新型载药系统日益受到人们的关注,其对难溶性药物的增溶作用以及不同溶解度药物成分或单个有效部位的释放机制研究也逐渐深入,然而对于中药复方微乳的释药研究尚不多见,本研究对复方微乳制剂的研究具有一定的意义。

[参考文献]

- [1] 上海市麝香酮临床科研协作组. 麝香酮制剂治疗冠心病患者 71 例疗效观察[J]. 中成药,1982,4(6):26.
- [2] 夏鑫华,刘亚敏. 麝香配伍冰片对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经元突触超微结构的影响[J]. 江西中医学院学报,2008,20(1):56.
- [3] 孙蓉,张作平. 麝香酮对完全性脑缺血大鼠的保护作用[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(3):197.
- [4] 孙蓉,张作平. 麝香酮对氰化钠缺血致 PC12 细胞缺血损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2007,23(6):8.
- [5] 张小燕,张占军. 栀子苷对局灶性脑缺血大鼠脑组织基因表达谱的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2005,25(1):42.
- [6] 李利娟,李宏霞. 栀子苷对血管性痴呆大鼠行为学和脑组织病理改变的影响[J]. 四川大学学报:医学版,2009,40(4):604.
- [7] 胡海燕,徐雄良,龚涛. 不同溶解性质的药物在 O/W 微乳中的溶解度和体外释放特征[J]. 中国药学杂志,2006,41(9):681.
- [8] 华海婴,赵永星. 紫苏醇亚微乳中药物的相分布和体外释放研究[J]. 中国医药工业杂志,2009,40(1):32.

Study on *in vitro* release of Xingnaojing microemulsion

WANG Shan¹, DU Shouying^{1*}, LU Yang¹, CHEN Xiaolan¹, SONG Xiao¹, LI Dongxue²

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. China National Center for Biotechnology Development, Beijing 100039, China)

[Abstract] **Objective:** To study *in vitro* release of Xingnaojing microemulsion and to investigate the release mechanism. **Method:** The concentration of jasminoidin was determined by HPLC and the concentration of Aipian was determined by GC. *In vitro* release characteristics were conducted by dialysis technique. Model fitting was used to determine the kinetics and mechanism. **Result:** Jasminoidin released completely within 2 h, fitting the Weibell model best. The release of borneol fitted first order model. **Conclusion:** The release mechanisms of different types of medicines are quite different. The different types of medicines dissolve in the different phases in the microemulsion.

[Key words] microemulsion; Xingnaojing; *in vitro* release

doi:10.4268/cjcm20111609

[责任编辑 马超一]