

雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的制备及其理化性质和体外释药特性研究[△]

郑恒^{1*}, 李晓东¹, 翟晓莹¹, 董淑英¹, 张铎¹, 杨瑞^{2#} (1. 沈阳医学院附属中心医院皮肤科, 沈阳 110024; 2. 辽宁省中医药研究院, 沈阳 110034)

中图分类号 R944.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)12-1655-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.12.14

摘要 目的: 建立雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的含量测定方法, 优化其处方, 并考察其理化性质及体外释药特性。方法: 采用超高效液相色谱法测定雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的含量, 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.4 mL/min, 柱温为 40 °C, 检测波长为 218 nm, 进样量为 5 μL。采用水滴定法绘制伪三元相图, 以油相、表面活性剂、助表面活性剂为指标优化处方; 采用体外释放试验考察所制微乳的体外释放特性。结果: 雷公藤甲素、甘草次酸的检测质量浓度线性范围分别为 1~40 μg/mL ($r=0.9997$)、10~400 μg/mL ($r=0.9998$); 定量限分别为 0.5、0.8 μg/mL, 检测限分别为 0.1、0.2 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2%; 加样回收率分别为 100.32%~101.15% (RSD=0.36%, $n=6$)、99.78%~101.42% (RSD=0.59%, $n=6$)。最优处方为以中链甘油三酯为油相, 聚乙二醇羟基硬脂酸酯为表面活性剂, 无水乙醇为助表面活性剂, 水为水相, 四者质量比为 8:28:14:50。所制微乳为水包油型, 外观透明澄清, 其平均粒径为 (62.38 ± 3.44) nm, 平均多分散指数为 0.096 ± 0.001, 平均黏度为 (26.84 ± 1.10) mPa·S。所制微乳在 24 h 内的雷公藤甲素、甘草次酸累积释放度分别为 99.8%、99.7% (pH 2.0 的磷酸缓冲盐溶液中), 99.3%、99.4% (pH 7.4 的磷酸缓冲盐溶液中), 98.9%、98.4% (pH 9.0 的磷酸缓冲盐溶液中); 单方微乳中的雷公藤甲素和甘草次酸释放均快于复方微乳。结论: 所建含量测定方法操作简便、准确; 所得优化处方稳定、可行; 所制雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳较单方微乳具有更好的缓释作用。

关键词 雷公藤甲素; 甘草次酸; 复方微乳; 超高效液相色谱法; 伪三元相图; 处方优化; 体外释放度

Study on Preparation of Triptolide-glycyrrhetic Acid Compound Microemulsion and Its Physicochemical Properties and *in vitro* Release Characteristics

ZHENG Heng¹, LI Xiaodong¹, ZHAI Xiaoying¹, DONG Shuying¹, ZHANG Duo¹, YANG Rui² (1. Dept. of Dermatology, Central Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China; 2. Academy of Traditional Chinese Medicine of Liaoning Province, Shenyang 110034, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish content determination method of Triptolide-glycyrrhetic acid compound microemulsion, optimize the formula and investigate its physicochemical properties and release rate *in vitro*. METHODS: The content of Triptolide-glycyrrhetic acid compound microemulsion was determined by UPLC. The determination was performed on ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature was 40 °C. The detection wavelength was set at 218 nm, and sample size was 5 μL. Pseudo-ternary phase diagrams were drawn by water titration method. Using oil phase, surfactants and co-surfactants as index, the formula was optimized, and *in vitro* release characteristics was investigated by *in vitro* release test. RESULTS: The linear range of triptolide and glycyrrhetic acid were 1-40 μg/mL ($r=0.9997$) and 10-400 μg/mL ($r=0.9998$), respectively. The limits of quantitation were 0.5 and 0.8 μg/mL; the limits of detection were 0.1 and 0.2 μg/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all less than 2%. Average recoveries were 100.32% -101.15% (RSD=0.36%, $n=6$), 99.78% -101.42% (RSD=0.59%, $n=6$). The optimal formula included that medium chain triglyceride as oil phase, polyethylene glycol hydroxy stearate as surfactants, ethanol as co-surfactants, water as water phase, the proportion of them was 8:28:14:50. The obtained microemulsion was O/W type, being transparent and clear, with average diameter, average polydispersity index and average viscosity of (62.38 ± 3.44) nm, 0.096 ± 0.001 and (26.84 ± 1.10) mPa·S. Within 24 h, cumulative release rates of triptolide and glycyrrhetic acid in obtained microemulsion were 99.8% and 99.7% (in PBS pH 2.0), 99.3% and 99.4% (in PBS pH 7.4), 98.9% and 98.4% (in PBS pH 9.0), respectively. Triptolide and glycyrrhetic acid released faster in the single microemulsion than in the compound microemulsion. CONCLUSIONS: Established content determination method is simple and stable. The optimized formula is stable and feasible.

△ 基金项目: 辽宁省博士科研启动基金项目(No.201601384)

* 主治医师, 硕士。研究方向: 免疫相关皮肤病及皮肤肿瘤。电话: 024-85715290。E-mail: zhengheng_2011@163.com

通信作者: 副研究员, 博士。研究方向: 中药药动学及代谢组学。电话: 024-86803005。E-mail: yang_rui1983@163.com

Obtained triptolide-glycyrrhetic acid compound microemulsion show better sustained-release effect than single microemulsion.

KEYWORDS Triptolide; Glycyrrhetic acid; Compound microemulsion; UPLC; Pseudo-ternary phase diagrams; Formula optimization; *in vitro* release rate

雷公藤为卫矛科雷公藤属植物雷公藤 (*Tripterygium wilfordii*) 多年生藤本植物, 味苦、辛, 性寒, 有毒, 具有免疫抑制作用^[1]。雷公藤广泛应用于血管炎^[2]、红斑狼疮^[3]、湿疹^[4]、银屑病^[5]、系统性硬皮病^[6]、过敏性紫癜^[7]、结节性红斑^[8]、皮肤淀粉样变^[9]、白塞病^[10]等皮肤病以及肾病^[11]、类风湿性关节炎^[12]的治疗, 效果显著。但雷公藤为有毒中药, 其活性成分雷公藤甲素具有明显的生殖毒性^[13]和肝肾毒性^[14]。有数据统计显示, 雷公藤制剂用药后的不良反应发生率高达 11.7%^[14]。古语云: “甘草解百毒”。现代研究表明, 甘草可在一定程度上拮抗雷公藤的毒性并提高疗效, 体现出了中药配伍减毒增效的中医药特色优势^[11, 15]。为此, 本研究将雷公藤的主要活性成分雷公藤甲素和甘草的主要活性成分甘草次酸制成雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳, 以期通过配伍来降低雷公藤甲素的毒性, 并利用纳米制剂粒径小、生物相容性好的优势, 达到减毒增效的目的。在此基础上, 笔者采用超高效液相色谱法 (UPLC) 测定了雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的含量, 优化其制备处方, 并考察所制微乳的相关理化性质及体外释放度, 旨在为雷公藤相关制剂的开发以及临床用药安全性的提高提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLCTM 型 UPLC 仪, 包括 ACQ-QSM 四元泵、ACQ-FTN 自动进样器、ACQ 二极管阵列检测器、Empower 3 色谱工作站 (美国 Waters 公司); XW-80A 型微型旋涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂有限公司); XS105 型十万分之一电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); DF-101S 型集热式恒温磁力搅拌器 (巩义市英峪予华仪器厂); Milli-Q Reference 型超纯水系统 (德国 Merck 公司); Zetasizer Nano ZS90 型激光粒度仪 (英国 Malvern 仪器公司); NDJ-1 型旋转式黏度计 (上海天平仪器厂); 透析袋 (截留分子量为 8 000~14 000 Da, 北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

雷公藤甲素对照品 (批号: 111567-200502, 纯度: 99.8%)、甘草次酸对照品 (批号: 110723-200612, 纯度: 99.6%) 均由中国食品药品检定研究院提供; 雷公藤甲素原料药 (南京泽朗医药科技有限公司, 批号: 130708, 纯度: >98.0%)、甘草次酸原料药 (大连美仑生物技术有限公司, 批号: 140113, 纯度: >98.0%)、大豆油 (营口渤海油脂工业有限公司, 批号: 20121205)、油酸乙酯 (北京长城化学试剂厂, 批号: 101106)、中链甘油三酯 (批号: 111006)、辛酸/癸酸甘油三酯 (批号: 58653-35)、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯 (批号: 100501)、二乙二醇单乙基醚 (批号: 100302) 均购自法国 Gattefosse 公司; 肉豆蔻异丙酯 (批号: 120612)、棕榈酸异丙酯 (批号: 120908) 均购自浙江兰溪物美化工有限公司; 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (批号: 145179)、聚乙二醇羟基硬脂酸酯 (批号:

29749816K0) 均购自德国 BASF 公司; 聚山梨酯 20 (批号: 061016)、聚山梨酯 80 (批号: 060409) 均购自英国 CRODA 公司; 无水乙醇 (批号: 20110311)、丙二醇 (批号: 20090504)、聚乙二醇 200 (批号: 20090603)、聚乙二醇 400 (批号: 201008006) 均购自天津市百世化工有限公司; 磷酸 (批号: 20140915)、磷酸氢二钠 (批号: 20090812)、磷酸二氢钾 (批号: 20120513)、氢氧化钠 (批号: 20160922)、硼酸 (批号: 20110706) 均购自国药集团化学试剂有限公司; 氯化钾 (北京燕京药业有限公司, 批号: 1507031); 亚甲蓝 (北京化学试剂公司, 批号: 070609); 苏丹红 III (德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 批号: 40517); 乙腈、甲酸均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为自制超纯水。

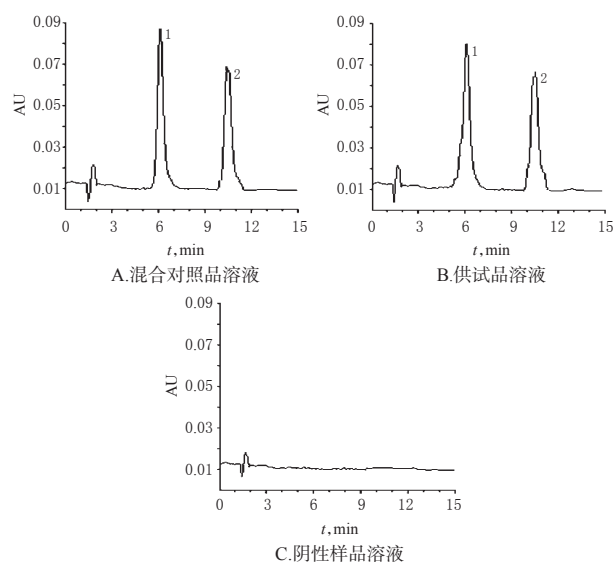
2 方法与结果

2.1 雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的制备

精密称取油相、表面活性剂及助表面活性剂各适量, 置于具塞西林瓶中, 室温下以磁力搅拌 (30 r/min, 下同), 混合均匀, 然后加雷公藤甲素原料药 12.5 mg、甘草次酸原料药 125 mg, 待完全溶解后缓慢加水 50 mL, 磁力搅拌 1 h, 即得雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳。

2.2 雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳中主成分的含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 10% B→60% B; 5~13 min, 60% B→90% B; 13~15 min, 90% B); 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 40 °C; 检测波长: 218 nm; 进样量: 5 μL。在该色谱条件下, 分离度均大于 1.5, 理论板数均不低于 3 000, 阴性样品对测定无干扰, 详见图 1。



注: 1. 雷公藤甲素; 2. 甘草次酸

Note: 1. triptolide; 2. glycyrrhetic acid

图 1 超高效液相色谱图

Fig 1 UPLC chromatograms

2.2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取雷公藤甲素对照品、甘草次酸对照品各 10 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得质量浓度均为 1 mg/mL 的单一对照品贮备液。分别精密量取上述雷公藤甲素对照品贮备液 0.5 mL、甘草次酸对照品贮备液 5 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释制成含 0.05 mg/mL 雷公藤甲素、0.5 mg/mL 甘草次酸的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳 1 g, 置于 10 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 按雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的制备工艺, 制备不含雷公藤甲素和甘草次酸的阴性样品, 再按“2.2.3”项下方法制备阴性样品溶液, 即得。

2.2.5 线性关系考察 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 加流动相稀释制成含雷公藤甲素分别为 1、2、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$, 甘草次酸分别为 10、20、50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的系列线性关系工作溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。以待测成分质量浓度(x , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得雷公藤甲素回归方程为 $y=4.023 \times 10^4 x - 5.385 \times 10^3$ ($r=0.9997$)、甘草次酸回归方程为 $y=2.683 \times 10^4 x + 4.366 \times 10^3$ ($r=0.9998$)。结果表明, 雷公藤甲素、甘草次酸的检测质量浓度线性范围分别为 1~40、10~400 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.6 定量限与检测限考察 精密吸取“2.2.2”项下各单一对照品贮备液适量, 以流动相倍比稀释, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以信噪比为 10:1、3:1 分别计算定量限、检测限。结果, 雷公藤甲素、甘草次酸的定量限分别为 0.5、0.8 $\mu\text{g/mL}$, 检测限分别为 0.1、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.2.7 精密度试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次。结果, 雷公藤甲素、甘草次酸峰面积的 RSD 分别为 0.55%、1.12% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0、1、2、4、6、8、10 h 时按“2.2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 雷公藤甲素、甘草次酸峰面积的 RSD 分别为 0.84%、0.57% ($n=7$), 表明供试品溶液于室温下放置 10 h 内稳定性良好。

2.2.9 重复性试验 取雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳适量, 共 6 份, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以峰面积按回归方程计算样品中雷公藤甲素、甘草次酸的含量。结果, 雷公藤甲素、甘草次酸的平均含量分别为 0.125 2、1.245 0 mg/g, RSD 分别为 1.42%、1.15% ($n=6$), 表明本方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳 1 g, 共 6 份, 加入一定量的各单

一对照品贮备液, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以峰面积按回归方程计算加样回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests ($n=6$)

待测成分	取样量, g	样品已知含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
雷公藤甲素	1.045 2	0.130 9	0.125 0	0.257 3	101.15	100.74	0.36			
	1.003 7	0.125 7	0.125 0	0.251 4	100.59					
	1.045 5	0.130 9	0.125 0	0.257 4	101.20					
	1.031 2	0.129 1	0.125 0	0.254 5	100.32					
	1.009 6	0.126 4	0.125 0	0.252 1	100.56					
	1.042 8	0.130 6	0.125 0	0.256 3	100.59					
	甘草次酸	1.045 2	1.301 3	1.250	2.551 9			100.05	100.36	0.59
		1.003 7	1.249 6	1.250	2.496 8			99.78		
1.045 5		1.301 6	1.250	2.556 4	100.38					
1.031 2		1.283 8	1.250	2.551 6	101.42					
1.009 6		1.257 0	1.250	2.514 1	100.57					
1.042 8		1.298 3	1.250	2.547 7	99.95					

2.2.11 样品含量测定 取 3 批雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳各适量, 按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 以峰面积按回归方程计算样品中雷公藤甲素、甘草次酸的含量。结果, 雷公藤甲素的含量为 0.122 7~0.126 8 mg/g、甘草次酸的含量为 1.216 0~1.258 3 mg/g。

2.3 雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的处方优化

2.3.1 油相的筛选 分别考察雷公藤甲素、甘草次酸在不同油相中的溶解度, 详见表 2。由表 2 可知, 雷公藤甲素、甘草次酸在中链甘油三酯中溶解度最高, 为保证雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳中有较高的载药量, 故选择中链甘油三酯为油相。

表 2 雷公藤甲素和甘草次酸在不同油相中的溶解度 (mg/g)

Tab 2 Solubility of triptolide and glycyrrhetic acid in different oil phase (mg/g)

种类	雷公藤甲素	甘草次酸
中链甘油三酯	0.886	2.351
油酸乙酯	0.361	1.152
大豆油	0.372	1.764
肉豆蔻异丙酯	0.319	1.089
棕榈酸异丙酯	0.206	0.947
辛酸/癸酸甘油三酯	0.285	1.302

2.3.2 表面活性剂与助表面活性剂种类的筛选 分别以聚山梨酯 20、聚山梨酯 80、聚氧乙烯化蓖麻油、辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯和聚乙二醇羟基硬脂酸酯为表面活性剂, 无水乙醇为助表面活性剂, 将表面活性剂和助表面活性剂按质量比 1:1 (K_m 值) 混合后, 与中链甘油三酯按不同质量比 (9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9) 于西林瓶中混合均匀, 于磁力搅拌下用水进行滴定, 同时记录体系由混浊变为澄清透明时的临界点。按中链甘油三酯、混合表面活性剂、水在临界点时各自的质量百分数 (w/w), 绘制伪三元相图, 确定微乳的成乳区

域,详见图2(图中“ME”表示微乳成乳区域,下同)。由图2可知,表面活性剂为聚乙二醇羟基硬脂酸酯时微乳的成乳区最大。

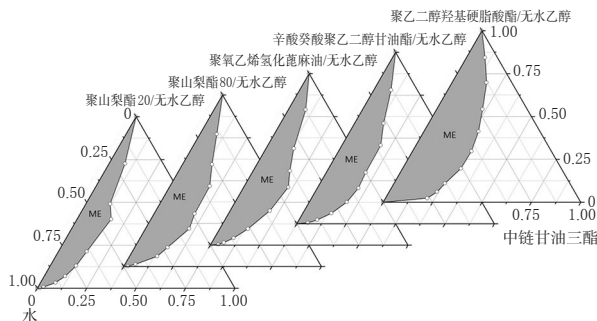


图2 不同表面活性剂的伪三元相图($K_m=1:1$)

Fig 2 Pseudo-ternary phase diagram of different surfactants($K_m=1:1$)

以聚乙二醇羟基硬脂酸酯为表面活性剂,无水乙醇、丙二醇、聚乙二醇200、聚乙二醇400和二乙二醇单乙基醚为助表面活性剂,将表面活性剂和助表面活性剂按质量比1:1(K_m 值)混合后,与中链甘油三酯按不同质量比(9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,4:6,3:7,2:8,1:9)于西林瓶中混合均匀,于磁力搅拌下用水进行滴定,同时记录体系由混浊变为澄清透明时的临界点。按中链甘油三酯、混合表面活性剂、水在临界点时各自的质量百分数(w/w),绘制伪三元相图,确定微乳的成乳区域,详见图3。由图3可知,助表面活性剂为无水乙醇时微乳的成乳区最大。

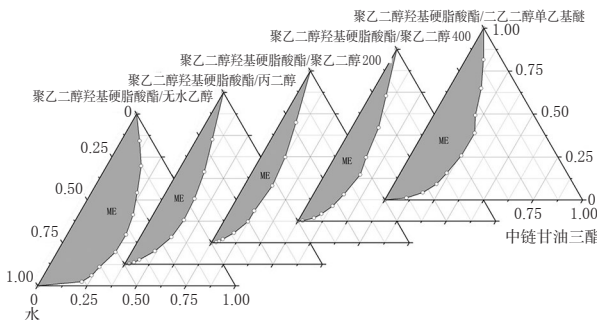


图3 不同助表面活性剂的伪三元相图($K_m=1:1$)

Fig 3 Pseudo-ternary phase diagram of different co-surfactants($K_m=1:1$)

2.3.3 表面活性剂与助表面活性剂质量比的确定 分别考察表面活性剂与助表面活性剂不同质量比(K_m 值,1:3,1:2,1:1,2:1,3:1)对微乳形成的影响,详见图4。由图4可知,随着 K_m 值增大,微乳成乳区增大;当 K_m 值大于2时,微乳成乳区变小,其原因为当表面活性剂与助表面活性剂为最佳质量比时,助表面活性剂可正好完全镶嵌到表面活性剂中,此时形成的微乳结构中增溶空间最大、载油量最大。由此可见,当 K_m 为2时微乳成乳区大小最佳,故确定 K_m 为2:1。

2.3.4 最优处方的确定 最优处方为:表面活性剂为聚乙二醇羟基硬脂酸酯,助表面活性剂为无水乙醇,油相为

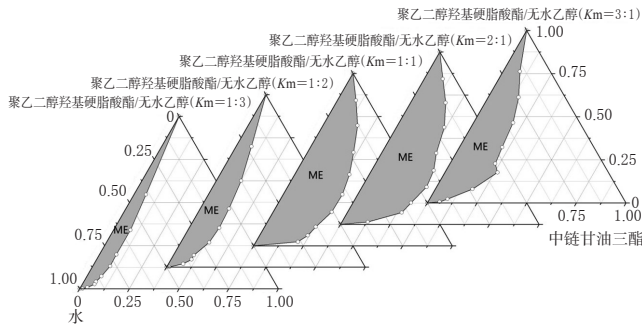


图4 不同 K_m 值的伪三元相图

Fig 4 Pseudo-ternary phase diagram of K_m value

中链甘油三酯,水相为纯水,四者质量比为28:14:8:50。

2.3.5 验证试验 按上述最优处方,平行制备3批雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳,依法测定主成分含量进行验证,结果见表3。由表3可知,最优处方稳定、可行。

表3 验证试验结果($n=3, \text{mg/g}$)

Tab 3 Results of validation tests($n=3, \text{mg/g}$)

试验号	雷公藤甲素	甘草次酸
1	0.126 8	1.258 3
2	0.122 7	1.216 0
3	0.125 3	1.247 4
平均值	0.124 9	1.240 6

2.4 雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的理化性质考察

2.4.1 外观 按最优处方制备所得雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳为透明澄清的液体。

2.4.2 微乳类别 采用染色法^[16]鉴别微乳的类别。按最优处方制备雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳2批,分别加苏丹红Ⅲ染料和亚甲蓝染料,静置24 h,肉眼观察染料在微乳中的扩散速度。结果,微乳中蓝色染料(水溶性)的扩散速度大于红色染料(油性)。由此判定,雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳为水包油型微乳。

2.4.3 粒径 按最优处方制备雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳3批,加水稀释至一定浓度,采用激光粒度仪测定其粒径。结果,雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的平均粒径为 $(62.38 \pm 3.44) \text{ nm}$,多分散指数为 0.096 ± 0.001 ,表明该微乳粒径小且分布均匀。

2.4.4 黏度 按最优处方制备雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳3批,于25℃采用黏度计测定其黏度。结果,雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的平均黏度为 $(26.84 \pm 1.10) \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 。

2.5 雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的体外释药试验

采用透析法^[17]进行体外释药试验。取雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳2 g,放入经处理的透析袋中,扎紧透析袋两端,将透析袋放入含有1%聚山梨酯80的释放介质[pH 2.0的磷酸缓冲盐溶液(PBS)(模拟胃液环境)、pH 7.4的PBS(模拟结肠环境)、pH 9.0的PBS(模拟大肠环境)]100 mL中。另取与雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳浓度相同的雷公藤甲素混悬液、甘草次酸混悬液、不

含甘草次酸的雷公藤甲素微乳及不含雷公藤甲素的甘草次酸微乳作为对照。设定温度(37±0.5)℃,转速100 r/min,进行体外释放试验。分别于0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h取样1 mL,同时补充同温度、等体积的新鲜释放介质。样品溶液经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算药物累积释放度,以时间(h)为横坐标、药物累积释放度(%)为纵坐标,绘制释放曲线,详见图5。结果,24 h内,雷公藤甲素、甘草次酸的累积释放度分别为99.8%、99.7% (pH 2.0的PBS中),99.3%和99.4% (pH 7.4的PBS中),98.9%、98.4% (pH 9.0的PBS中),相比于单方微乳具有缓释作用。

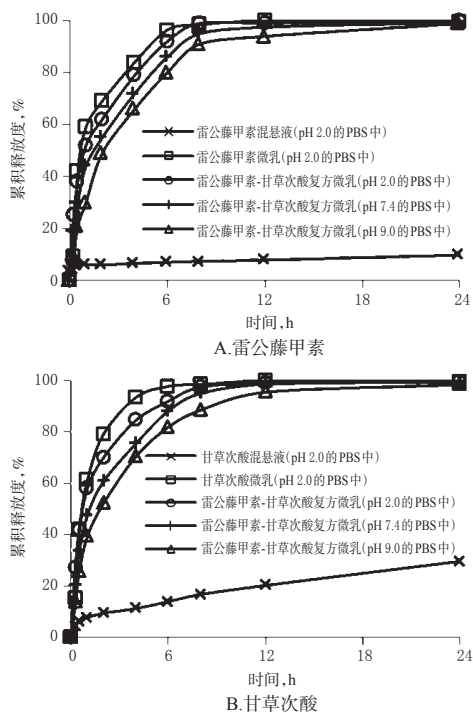


图5 雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的体外释放曲线
Fig 5 *in vitro* release curves of triptolide-glycyrrhetic acid compound microemulsion

将雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳的体外释放数据分别采用零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi方程和Weibull方程进行拟合。结果显示,雷公藤甲素在pH 2.0的PBS中释放符合Weibull方程,在pH 7.4、pH 9.0的PBS中的释放均符合一级动力学方程;甘草次酸在pH 2.0、pH 7.4、pH 9.0的PBS中释放均符合一级动力学方程,详见表4。

3 讨论

甘草具有清热解毒、止咳祛痰、补脾和胃、调和诸药的功效^[18]。甘草解毒作用最早记载于《神农本草经》:“倍力气,金疮肿,解毒”^[19];《本草纲目》中也有记载:“诸药中甘草为君,治七十二种乳石毒,解一千二百种草木毒”^[19];《千金方》记载:“解百草毒,如汤沃雪,甘草入腹即定,验如反掌”,故有“国老”之号^[20]。有研究发现,甘

表4 雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳体外释放模型拟合结果

Tab 4 Fitting results of *in vitro* release of triptolide-glycyrrhetic acid compound microemulsion

释放介质	模型	雷公藤甲素		甘草次酸	
		拟合方程	r	拟合方程	r
pH 2.0的PBS	零级动力学方程	$Q=3.378t+45.080$	0.719 9	$Q=3.167t+48.733$	0.688 1
	一级动力学方程	$\ln(1-Q)=-0.274t-0.624$	0.933 9	$\ln(1-Q)=-0.251t-0.706$	0.946 6
	Higuchi方程	$Q=20.850t^{1/2}+24.428$	0.895 8	$Q=19.932t^{1/2}+28.627$	0.873 4
pH 7.4的PBS	Weibull方程	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.710\ln t-0.313$	0.986 4	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.652\ln t-0.901$	0.938 6
	零级动力学方程	$Q=3.621t+38.870$	0.762 3	$Q=5.959t+46.442$	0.837 0
	一级动力学方程	$\ln(1-Q)=-0.216t-0.439$	0.961 4	$\ln(1-Q)=-0.225t-0.513$	0.950 9
pH 9.0的PBS	Higuchi方程	$Q=21.726t^{1/2}+17.930$	0.922 3	$Q=21.279t^{1/2}+20.922$	0.909 9
	Weibull方程	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.720\ln t-1.367$	0.946 7	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.703\ln t-1.238$	0.941 8
	零级动力学方程	$Q=3.932t+31.283$	0.797 4	$Q=3.706t+35.166$	0.781 2
pH 2.0的PBS	一级动力学方程	$\ln(1-Q)=-0.192t-0.271$	0.980 9	$\ln(1-Q)=-0.178t-0.376$	0.967 9
	Higuchi方程	$Q=22.990t^{1/2}+9.706$	0.940 1	$Q=21.956t^{1/2}+14.277$	0.933 1
	Weibull方程	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.817\ln t-1.875$	0.936 2	$\ln\ln[1/(1-Q)]=0.725\ln t-1.559$	0.934 7

草解毒的主要活性成分为甘草甜素及其水解产生的甘草次酸和葡萄糖醛酸^[19]。甘草中的活性成分可与毒性化合物形成络合物^[21]发挥肾上腺皮质激素样作用^[22]、缓解中毒症状^[23]、抗微生物毒素^[24]、诱导P糖蛋白表达等功能^[25]。甘草次酸为甘草酸的水解产物,是甘草的主要药效成分,具有抗过敏^[26]、免疫调节^[27]、抗肿瘤^[28]、解毒保肝^[29]、抗氧化^[30]等作用,临床常用其替代激素类药物治疗免疫类疾病、癌症,与其他药物联用可有效治疗神经性皮炎、慢性湿疹、慢性荨麻疹、斑秃等皮肤疾病^[31]。

微乳是由水相、油相、表面活性剂和助表面活性剂按一定比例混合制成的均匀、透明、各向同性和热力学稳定的分散体系。微乳处方中亲脂性成分比例较大,具有良好的生物相容性,加之粒径小、比表面积大、吸收迅速完全,因此具有广阔的研发前景^[17]。

本研究采用UPLC法测定雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳中雷公藤甲素和甘草次酸的含量,该方法专属性强、灵敏度高、准确性好。另外,通过雷公藤甲素和甘草次酸在不同油相中的溶解度,确定了中链甘油三酯为油相;通过伪三元相图成乳区域大小确定了聚乙二醇羟基硬脂酸酯为表面活性剂、无水乙醇为助表面活性剂,且 K_m 为2:1时微乳成乳区域最大。最终确定最优处方为表面活性剂为聚乙二醇羟基硬脂酸酯,助表面活性剂为无水乙醇,油相为中链甘油三酯,水相为水,四者质量比为28:14:8:50。以此处方制得微乳的外观透明澄清、粒径均匀。

体外释放试验结果显示,单方微乳中2种主成分的释放速度均快于复方微乳,推测原因可能为雷公藤甲素与甘草次酸形成了络合物,使释放速度减慢,而达到减毒的功效。此外,基于甘草次酸的抗过敏、免疫调节作用,本研究制备的雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳可在免疫性疾病的治疗中起到双重调节作用,具有减毒增效的双重作用^[30],为有毒中药的临床应用提供了新的研究

思路。

综上所述,本研究所建含量测定方法操作简便、准确,所得优化处方稳定、可行,所制雷公藤甲素-甘草次酸复方微乳较单方微乳具有更好的缓释作用。

参考文献

- [1] 刘建群,余昭芬.雷公藤及其伪品热分析研究[J].中国药房,2016,27(30):4269-4271.
- [2] 吴怡峰,秦万章.秦万章教授35年来用雷公藤治疗皮肤血管炎的经验 and 体会[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志,2017,16(5):464-466.
- [3] 王萍.雷公藤多苷联合激素治疗中度活动型系统性红斑狼疮的临床效果分析[J].中国实用医药,2018,13(13):99-100.
- [4] 蒲蔚,周媛,原新朋,等.雷公藤多苷联合复方甘草酸苷治疗湿疹的临床研究[J].中国中西医结合皮肤性病学杂志,2018,17(2):143-145.
- [5] 卢传坚,喻靖傑,邓浩,等.口服中成药治疗银屑病的研究进展[J].皮肤科学通报,2018,35(1):96-104.
- [6] 宋树华,宋学忠.中西医结合治疗局限性硬皮病9例[J].中国民间疗法,2002,10(11):6.
- [7] 蒲海波.雷公藤多苷联合丹参注射液治疗过敏性紫癜性肾炎患儿对凝血机制的影响及疗效评价[J].中华中医药学刊,2017,35(11):2946-2950.
- [8] 吴敬云,明清平,潘海涛.雷公藤多苷与丹参注射液联合运用治疗结节性红斑的临床体会[J].中国实用医药,2015,10(23):154-155.
- [9] 陈懿德,程少为,兰东.复方倍他米松注射液与雷公藤多苷联合治疗44例原发性皮肤淀粉样变临床观察[J].中华皮肤科杂志,1999,32(4):270.
- [10] 郭衡山,于雅洁,张小芳,等.特殊皮疹表现的白塞病1例[J].中国皮肤性病学杂志,2016,30(4):386-388.
- [11] 杨瑞,唐思,董晓茜,等.基于UPLC-Q-TOF-MS的雷公藤配伍甘草治疗肾病综合征大鼠的尿液代谢组学分析[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(11):32-38.
- [12] 曲亮.基于鞘脂代谢组学的雷公藤甲素和雷公藤多苷片药效和毒性作用研究[D].北京:北京协和医学院,2015.
- [13] 鲁盈,严小倩.雷公藤的毒副作用及在肾病中的合理应用[J].中华肾病研究电子杂志,2018,7(1):17-22.
- [14] 刘小燕,祁爱蓉,罗登贵,等.雷公藤制剂生殖毒性及联用减毒研究进展[J].中国中医药信息杂志,2018,25(4):133-135.
- [15] 刘建群,王卓,徐金娣,等.甘草干预雷公藤内酯酮的代谢组学分析[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(19):70-75.
- [16] SUCHAT W, NIGEL MD, THOMAS R, et al. Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions[J]. *Pharm Res*, 2000, 17(6):684-689.
- [17] 张颖慧,王淑君,徐琨,等.杨梅素微乳的制备及质量评价[J].沈阳药科大学学报,2010,27(10):777-783.
- [18] 吕佳佳,陈庆,王莎,等.甘草配方颗粒提取工艺优化及其质量标准研究[J].中成药,2018,40(10):2182-2187.
- [19] 何丹,刘凤琴,李焕德.甘草解毒作用研究进展[J].中医学,2009,7(12):927-931.
- [20] 郭晓波.甘草解毒作用及机制的研究[D].西安:陕西师范大学,2016.
- [21] 赵敏崎,韩德五,马学惠,等.甘草甜素、甘草次酸与柴胡皂苷对防治大白鼠实验性肝硬化的作用[J].药学学报,1983,18(5):325-331.
- [22] HARADA S, KARINO A, SHIMOYAMA Y, et al. Identification of glycyrrhizin-binding protein kinase as casein kinase II and characterization of its associated phosphate acceptors in mouse liver[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 227(1):102-109.
- [23] 杨旭,王景霞,张建军,等.芍药甘草汤对中枢性肌张力增高大鼠解痉止痛最佳配比的筛选研究[J].北京中医药大学学报,2015,38(1):33-36.
- [24] 李洪恩.甘草次酸降低 α -溶血素的表达以及其对金黄色葡萄球菌体内外致病性影响的研究[D].长春:吉林大学,2013.
- [25] 虎琥琥.甘草总提取物及甘草酸、甘草次酸对P-糖蛋白和药物代谢酶的影响[D].西安:陕西师范大学,2014.
- [26] 姚新成,许玉华,吕博.甘草次酸-苯海拉明复盐软膏的制备[J].中国医院药学杂志,2009,29(3):233-234.
- [27] 方鉴.甘草及其有效成分对免疫系统调节作用探究[J].海峡药学,2017,29(8):28-30.
- [28] 杜洪亮.基于甘草次酸修饰自组装胶束递药系统的研究[D].济南:山东大学,2017.
- [29] 高苗苗,徐芳野,木合布力·阿布力孜.肝癌治疗靶点及肝靶向抗癌药物研究进展[J].新疆医科大学学报,2012,35(2):146-152.
- [30] 邢燕,历飞,林大勇,等.甘草次酸通过PI3K-AKT途径抑制H₂O₂所致大鼠心肌细胞氧化损伤[J].现代生物医学进展,2018,18(6):1044-1049.
- [31] 张瑾.复方甘草次酸湿痒霜的质量标准及体外经皮渗透的研究[D].天津:天津医科大学,2015.

(收稿日期:2019-01-04 修回日期:2019-04-27)

(编辑:陈宏)