

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00822

青蒿素自乳化制剂的制备及其在家兔体内的药动学研究

殷玉娟, 吕小满, 李国栋*

第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] 目的: 制备青蒿素自乳化系统, 并对家兔体内药动学过程进行考察。方法: 通过绘制相图并结合溶出度试验, 以形成乳剂的乳化程度和乳化时间为指标, 应用正交试验设计筛选最佳处方。用高效液相色谱法测定青蒿素的血药浓度, 以青蒿素原料药作对照, 比较家兔体内的药动学参数。结果: 青蒿素自乳化系统主要由青蒿素、吐温-85、油酸乙酯、乙醇组成。青蒿素自乳化制剂与青蒿素原料药在家兔体内平均滞留时间分别为 4.750 h 和 4.628 h, 家兔药动学研究结果表明, 青蒿素自乳化系统口服后能很大程度上提高生物利用度。结论: 自乳化制剂可以显著提高青蒿素的体外溶出及体内吸收。

[关键词] 青蒿素; 自乳化剂; 生物利用度; 药代动力学

[中图分类号] R 978.61 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0822-04

Preparation of self-emulsified artemisinin and its pharmacokinetics in rabbits

YIN Yu-juan, LÜ Xiao-man, LI Guo-dong*

Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare self-emulsified artemisinin and to investigate its pharmacokinetics in rabbits. **Methods:** The optimized formula was screened using an orthogonal experimental design, tertiary-phase diagram and solubility test; the extents of emulsification and emulsifying time were taken as the indices. The plasma concentrations of indirubin were determined by HPLC method. The crude artemisinin was taken as control and the pharmacokinetic parameters were compared between the 2 groups. **Results:** The artemisinin self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) was composed of artemisinin, Tween-85, ethyl-oleate, and ethanol. The mean retention times (MRT) was 4.628 h for crude artemisinin and 4.750 h for self-emulsion. Pharmacokinetic study in rabbits demonstrated that the SEDDS of artemisinin greatly enhanced the bioavailability of artemisinin via oral administration. **Conclusion:** SEDDS can greatly increase the *in vitro* dissolution and *in vivo* absorption of artemisinin.

[KEY WORDS] artemisinin; self-emulsifying agents; biological availability; pharmacokinetics

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 822-825]

青蒿素 (artemisinin) 又名黄蒿素, 是我国药理学工作者 1971 年从菊科植物黄花蒿叶中提取分离到的一种具有过氧桥的倍半萜内酯类化合物。是继氯喹、乙胺嘧啶、伯喹和磺胺后又一个很好的抗疟特效药^[1]。但青蒿素是脂溶性药物, 生物利用度低, 为了提高药物的溶解度和溶出度, 采用了各种增溶方法, 包括使用表面活性剂, 水溶性载体, 聚合物和固体分散物等^[2]。

自乳化系统 (self-emulsifying drug delivery, SEDDS) 能够提高脂溶性药物的生物利用度, 这引起了人们的很大关注。自乳化系统是由油相、表面活性剂 (有时包括辅助表面活性剂) 组成的透明各向同性溶液, 此体系在胃肠液介质中, 轻微搅拌可以自

发地形成分散相在 5 μm 左右的乳剂, 药物存在于这些细小的油滴中, 快速分布于整个胃肠道中, 减少了由于药物与胃肠壁的直接接触而引起的刺激。药物在油/水两相之间分配, 依靠细小油滴比表面积的增加提高水不溶性药物的溶出, 从而提高了药物的生物利用度^[3]。本研究是以青蒿素为模型药物, 研制口服自乳化系统, 以期提高青蒿素的生物利用度。

1 仪器和试剂

1.1 仪器和试剂 分析天平 (JA2103N, 上海民桥精密科学仪器有限公司), RCZ-6C 型药物溶出度仪 (上海黄海药检仪器厂), UV1102 紫外分光光度计

[收稿日期] 2007-11-13 **[接受日期]** 2008-02-19

[作者简介] 殷玉娟, 硕士. E-mail: yjlylily09@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25074560, E-mail: gdli@smmu.edu.cn

(上海天美科学仪器有限公司),高效液相色谱仪,(日本岛津 A10),N2000 色谱数据工作站,恒温水浴锅(上海华联医疗器械有限公司),DL-360A 超声波清洗器。青蒿素原料(河北涿州青蒿素试验基地),油酸乙酯、卵磷脂(中国上海飞祥化工厂),花生油(山东鲁花有限公司),肉豆蔻酸异丙酯(上海市医药集团),吐温-85、吐温-80(国药集团化学试剂有限公司)。甲醇为色谱纯试剂,其余试剂为分析纯试剂,水为二次蒸馏水。

1.2 色谱条件 色谱柱:Water RP-C₁₈柱,流动相:甲醇:磷酸盐缓冲溶液=40:60(体积分数),流速:0.8 ml/min,检测波长:260 nm,柱温:室温。

2 方法和结果

2.1 青蒿素的溶解度测定 将过量且定量的青蒿素加到不同的油相(花生油、蓖麻油、肉豆蔻酸异丙酯、油酸乙酯)中,超声 15 min。将青蒿素与油相的混合溶液分别于 2 000×g 离心 3 min,取离心后的上清液 25.00 mg 用无水乙醇和 0.2%氢氧化钠稀释至 10 ml,放入(50±1)°C 恒温水浴锅中 30 min,取出,冷却至室温,液面恢复至刻度后进行紫外测定^[4-5]。

取溶于油相的青蒿素混合液适量进行紫外分析,青蒿素在油酸乙酯中溶解度最大。因此选择油酸乙酯作为青蒿素的油相。

2.2 处方设计 在查阅文献和预实验的基础上,选择不同的乳化剂(A),比例不同的油相(B),助表面活性剂(C)进行处方设计,见表 1。按正交实验表 L₉(3⁴)进行实验,实验设计及观察指标见表 2。观察指标的选择中,青蒿素在体系中的溶解状况关系到青蒿素的分散程度、体外溶出度、体内生物利用度,因此作为评价指标之一,而粒径作为衡量自乳化效果的另外一个指标^[6-8]。

表 1 青蒿素自乳化制剂的因素水平表

Tab 1 Experiment factors and levels of self-emulsifying drug delivery of artemisinin

Level	Factor		
	A(Emulsifier)	B(Oil)	C(Co-emulsifier)
1	Tween-85	55%	Glycerol
2	Tween-80	60%	1,2-propylene glycol
3	Lecithine	63%	Ethanol

按表 2 取溶液 1~9 适量滴入带刻度的尖头试管中,试管中盛有适量蒸馏水,观察乳化效果。将自乳化情况分为 5 级:A,迅速乳化,时间<1 min,澄清

或微微泛蓝;B,迅速乳化,时间<1 min,比 A 略浊,蓝白;C,时间<2 min,外观亮白,似奶状液体;D,乳化较慢,时间>2 min,暗,灰白色,略带油状;E,难乳化,无法形成均一体系,一直都有油滴存在。

结果见表 2,4、6 完全乳化,7、8、9 不能乳化,1、2、3、5 乳化不完全。3、6 的粒径分别为 142 nm、163 nm。因此选用表面活性剂吐温-85,助表面活性剂乙醇,油相油酸乙酯为青蒿素自乳化系统的辅料。

表 2 青蒿素自乳化系统的正交试验设计表

Tab 2 Orthogonal design of self-emulsifying drug delivery of artemisinin

Group	Drug m/mg	Emulsifier m/mg	Oil m/mg	Co-emulsifier m/mg	Clarity	Particle diameter d/nm
1	20	55	112	23	Precipitation	-
2	20	122	243	32	Precipitation	-
3	20	276	634	81	Clarification	142
4	20	61	112	20	Precipitation	-
5	20	112	243	33	Precipitation	-
6	20	277	631	82	Clarification	163
7	20	56	111	15	Precipitation	-
8	20	109	242	46	Precipitation	-
9	20	274	630	80	Clarification	-

SEDDS: self-emulsifying drug delivery

2.3 伪三元相图的制备 采用对青蒿素溶解性较高的油酸乙酯为油相、以广泛应用的吐温-85 为乳化剂、乙醇为助乳化剂,根据文献报道改良法制备三角相图(加油法)^[9],即将乳化剂吐温-85 与助乳化剂乙醇按照 K_m 值为 8:2,7:3,6:4,5:5 充分混合均匀,再与蒸馏水按 K_m 值 8:2,7:3,6:4,5:5,4:6,3:7 混合,混匀后加入油酸乙酯,记录系统状态变化,并将相应的点绘制在相图上,见图 1。

根据 origin6.0 所作相图,考虑到 SEDDS 在体内会被体液稀释,因此要选择自乳化区域较大的处方。反映在相图上,即以自乳化区域面积为指标,确定以油酸乙酯为油相,乳化剂和助乳化剂的比例 8:2 时为最佳比例。

2.4 自乳化系统的制备和粒径的测定 选用对青蒿素溶解较好的油酸乙酯为油相,将药物加到油酸乙酯中溶解,加入吐温-85、乙醇分别作表面活性剂和辅助表面活性剂制成不同比例的自乳化制剂(共计 6 组),放置 10 d。10 d 后取各自乳化制剂加入 37°C 50 ml 蒸馏水中,用玻璃棒缓慢搅拌,静置 10 min 后观察乳化稳定性,综合判断选择最佳处方组成。结果见表 3。

不同比例的自乳化制剂用玻璃棒轻微搅拌,10

min后观察,处方4的乳剂效果最好,能够迅速乳化,并有淡蓝色乳光。取各溶液适量测粒径,分别为135.5、107.7、91.4、79.3、78.4、77.5 nm,综合判断

选择处方4为最优处方。由表3可以看出,随辅助表面活性剂的比例增大,自乳化制剂的粒径减小,乳化效果更为明显。

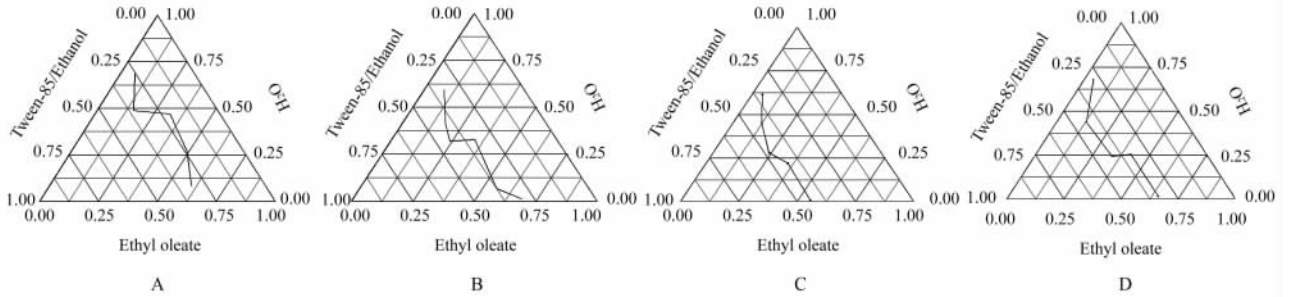


图1 青蒿素伪三元相图表

Fig 1 Pseud-phase diagram of artemisinin

A: Tween-85 : ethanol=8 : 2; B: Tween-85 : ethanol=7 : 3; C: Tween-85 : ethanol=5 : 5; D: Tween-85 : ethanol=6 : 4

表3 青蒿素自乳化制剂的处方优化

Tab 3 Optimized prescription of SEDDS of artemisinin

No.	Artemisinin m/mg	Co-surfactant m/mg	Surfactant m/mg	Oil m/mg	Diameter d/nm
1	10	26	100	365	135.5
2	10	30	120	342	107.7
3	10	38	139	316	91.4
4	10	40	162	289	79.3
5	10	45	180	266	78.4
6	10	49	200	241	77.5

SEDDS: Self-emulsifying drug delivery

线换算为累积溶出百分率。比较青蒿素自乳化制剂及青蒿素原料药的溶出优劣,结果见图2。

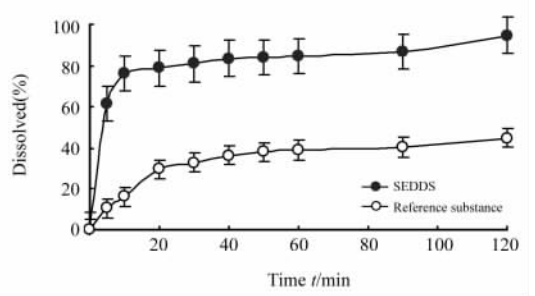


图2 青蒿素溶解度曲线分布图

Fig 2 Dissolution curve of artemisinin

n=3, $\bar{x} \pm s$

2.5 溶出度评价

2.5.1 HPLC法绘制青蒿素标准曲线 准确称取青蒿素50 mg置于50 ml容量瓶中,用无水乙醇稀释至刻度,精密量取10 ml置50 ml量瓶中,用0.2%氢氧化钠稀释至刻度,摇匀,置(50±1)℃恒温水浴锅中微温30 min,取出,冷却至室温,液面恢复至刻度作为储备液。

取储备液0.2~1.0 ml溶液置于10 ml容量瓶中,各加入0.1 ml空白自乳化储备液(用无水乙醇稀释100倍即得),0.2 ml氢氧化钠0.5 ml,用无水乙醇定容(n=9)。在292 nm波长处测定,取20 μl进样。另取青蒿素标准品25 mg同法配制,作为对照。

青蒿素自乳化制剂在4~20 μg线性关系较好,标准曲线方程为:Y=0.058 2X-0.097 4,r=0.999 8。

2.5.2 溶出度测定^[2] 取青蒿素自乳化制剂及青蒿素原料药,按《中国药典(2005版)》方法(浆法),以人工胃液为溶出介质,分别于5、10、20、30、40、50、60、90、120 min取5 ml(0.45 μm微孔滤膜过滤),立即补充人工胃液5 ml,滤液用无水乙醇稀释,方法见2.5.1项下,292 nm处测定光密度D,并通过标准曲

从青蒿素 SEDDS 和青蒿素原料药溶出度的比较中,可以看出青蒿素自乳化制剂在人工胃液的溶出度远远高于原料药的,说明 SEDDS 是一种有效提高脂溶性药物溶出度的手段。

2.6 家兔口服给药后体内药动学

2.6.1 标准曲线绘制 取空白血浆0.2 ml置于离心管中,加入0.4 ml甲醇-乙腈(1:1),离心(900×g,10 min)。取上清液置于另一离心管中,再次离心,加入青蒿素标准溶液,与适量0.2%(V/V)氢氧化钠水溶液混合,配成10~100 μg/ml的系列血浆样品,将此混合物50℃水浴30 min,冷却至室温,进样20 μl。以青蒿素含量为X轴,对应的峰面积为Y轴绘制标准曲线,在10~100 μg/ml浓度范围内线性关系较好,标准曲线方程为Y=3 137. 2X+174. 36,r=0.999 6。

2.6.2 方法回收率试验 在空白血浆中加入青蒿素标准溶液,按2.6.4项下方法操作,使其质量浓度

分别为 50、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,将测得的峰面积值代入标准曲线方程计算测得量和回收率。结果分别为 95.55%、92.98%、103.05% ($n=3$),表明该方法准确度良好。

2.6.3 精密度试验 在空白血浆中加入青蒿素标准溶液,使其质量浓度分别为 50、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,按 2.6.4 项下方法操作,同 1 d 进样 5 次,隔天进样 1 次,根据测定色谱峰面积比值 D 比($D_{\text{药品}}/D_{\text{对照}}$)计算青蒿素的质量浓度,求出方法的日内、日间精密度分别为:日内精密度 RSD ($n=5$) 分别为 6.13%、4.29%、4.11%;日间精密度 RSD ($n=3$) 分别为 6.03%、3.65%、4.31%,表明该方法精密度良好,可以进行体内药物动力学研究。

2.6.4 血药浓度测定 取血浆 0.2 ml 置于离心管

中,加入 0.4 ml 甲醇-乙腈(1:1),离心($900\times g$, 10 min)。去除沉淀取上清液,与适量体积分数为 0.2% 氢氧化钠水溶液混合,将此混合物 50℃ 水浴 30 min,冷却至室温,进样 20 μl 。

2.6.5 药动学参数分析 家兔 6 只,随机分为 2 组,每组 3 只,口服给药,给药剂量为每只 50 mg/kg,给药前禁食 12 h,分别于服药后 0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、5.00、8.00、12.00 h 耳缘静脉取血 3 ml,置肝素钠处理的离心管中,2 000 $\times g$ 离心 10 min,取血浆 1.0 ml 于-20℃ 冷冻保存。经 3P87 药代动力学软件处理拟合,青蒿素在动物体内药代动力学特征符合一室模型,以此房室模型进行拟合求得动力学参数,口服青蒿素及其自乳化制剂后,其药动学参数见表 4,家兔血药浓度变化见图 3。

表 4 口服青蒿素及其自乳化制剂在家兔体内的药动学参数

Tab 4 Pharmacokinetic parameters of artemisinin in rabbits

Parameter	C_{max} $\rho_{\text{B}}/(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$	t_{max} t/h	AUC $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$	MRT t/h	$t_{1/2\text{-Ka}}$ t/h	$t_{1/2\text{-Ke}}$ t/h
SEDDS form	4.403	1.143	42.66	4.75	0.233	5.862
Artemisinin	1.359	0.83	12.45	4.628	0.185	5.649

SEDDS: Self-emulsifying drug delivery; MRT: Mean retention time

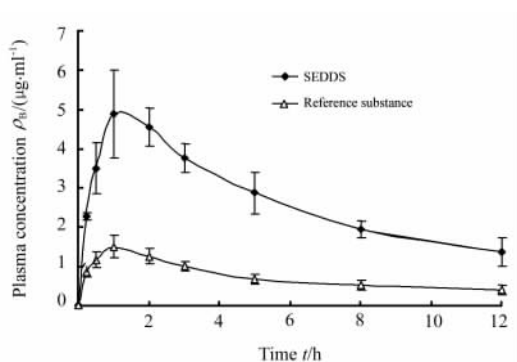


图 3 青蒿素(50 mg/kg)家兔体内药-时曲线

Fig 3 Plasma concentration-time curve of artemisinin

SEDDS: Self-emulsifying drug delivery. $n=3, \bar{x}\pm s$

3 讨论

在自乳化制剂中,药物的性质和剂量对最后的乳化效果具有较大的影响。若药物的脂溶性太差或在油相和表面活性剂中的溶解度不大,都不可能形成较好的自乳化制剂。本试验针对青蒿素属脂溶性药物,生物利用度低,制备了青蒿素自乳化制剂,该处方对药物有较好的溶解能力,能够显著提高药物的溶出速率。并对其进行了体外评价及家兔体内药代动力学试验。由拟合的数据得出结论:青蒿素自乳化制剂的达峰血药浓度明显高于口服青蒿素,达

峰时自乳化制剂组曲线下面积(AUC)是青蒿素组的 3 倍以上,其生物利用度远远优于口服青蒿素组。表明青蒿素自乳化制剂有较高的口服吸收。

【参考文献】

- [1] 周友亚. 青蒿素[J]. 化学教学, 2002(6): 31-32.
- [2] MacGregor K J, Embleton J K, Lacy J E, Perry E A, Solomon L J, Seager H, et al. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1997, 25: 47-58.
- [3] Hong J Y, Kim J K, Song Y K, Park J S, Kim C K. A new self-emulsifying formulation of itraconazole with improved dissolution and oral absorption[J]. J Contr Rel, 2006, 110: 332-338.
- [4] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[M]. 二部附录[XC]. 北京: 中国化工出版社, 2005: 73.
- [5] 李国栋, 许付, 沈爱军, 居红卫, 钟延强, 高申. 莪术油自乳化制剂处方研究[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23: 896-898.
- [6] 龙晓英, 杨帆, 李丽, 周杏莹. 水飞蓟素自乳化给药系统处方设计及溶出度评价[J]. 中国药师, 2004, 7: 496-498.
- [7] 张学农, 唐丽华, 阎雪莹, 张强. 紫杉醇自乳化微乳的制备及其在大鼠体内的药理学[J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24: 294-298.
- [8] 朱华李, 马鹏, 毛先兵. 高效液相色谱法控制青蒿素原料药质量的研究[J]. 重庆中草药研究, 2006(53): 18-20.
- [9] 潘国梁, 贾晓斌, 魏惠华, 王勇. 药用微乳伪三元相图的几种制备方法比较研究[J]. 中国药房, 2006, 17: 21-23.

【本文编辑】尹茶