苦杏仁苷自微乳的制备及理化性质的研究

樊丽雅[1]，胡丽[2]，张璐[1]，石松利[1]，郑春丽[2*](1.包头医学院药学院，内蒙古 包头 014040；2.中国药科大学药学院，南京 210009)

摘要：目的 制备苦杏仁苷自微乳，并进行初步质量评价研究。**方法** 通过平衡溶解度的测定和伪三元相图的绘制筛选苦杏仁苷的最佳处方，并对苦杏仁苷自微乳的粒径、多分散系数、稳定性进行评价。**结果** 苦杏仁苷自微乳的最优处方为 Peceol/MCT(1∶1)–乳化剂 OP–1,2-丙二醇=45%∶40%∶15%，载药量为 6 mg·mL^{-1}。所得苦杏仁苷自微乳平均粒径为(113.3±0.8)nm，多分散系数为(0.171±0.007)，离心稳定性良好。**结论** 优选处方稳定可行，制备的苦杏仁苷自微乳粒径均匀，稳定性良好。

关键词：苦杏仁苷；自微乳；伪三元相图；粒径

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2022)04-0475-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.04.007

引用本文：樊丽雅，胡丽，张璐，等. 苦杏仁苷自微乳的制备及理化性质的研究[J]. 中国现代应用药学，2022，39(4): 475-479.

Study on Preparation and Physicochemical Properties of Amygdalin Self-microemulsion

FAN Liya[1], HU Li[2], ZHANG Lu[1], SHI Songli[1], ZHENG Chunli[2*](*1.School of Pharmacy, Baotou Medical College, Baotou 014040, China; 2.School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare amygdalin self-microemulsion and to carry out preliminary quality evaluation. **METHODS** The best prescription of amygdalin was screened by the determination of equilibrium solubility and drawing of pseudo-ternary phase diagram. The particle size, polydispersity coefficient and stability of amygdalin self-microemulsion were evaluated. **RESULTS** The optimum formulation of amygdalin self-microemulsion was Peceol/MCT(1∶1)–emulsifier OP–1,2-propanediol=45%∶40%∶15% with drug loading of 6 mg·mL^{-1}. The average particle size of amygdalin self-microemulsion was (113.3+0.8) nm, and the polydispersity coefficient was (0.171+0.007). The centrifugal stability of amygdalin self-microemulsion was good. **CONCLUSION** The optimized formulation is stable and feasible, and the prepared amygdalin self-microemulsion has uniform particle size and good stability.

KEYWORDS: amygdalin; self-microemulsion; pseudo-ternary phase diagram; particle size

苦杏仁苷又名维生素 B17，存在于苦杏、桃、枇杷、李子、苹果等多种果仁中，为传统中药郁李仁和桃仁等的主要有效成分，具有润肠通便、降气利水的作用。美国将其列为具有辅助抗肿瘤作用的保健食品。现代药理学研究表明，苦杏仁苷具有抗肿瘤[1-3]、降血脂[4-5]、抗肺纤维化[6]、抗炎[7]等作用。但由于苦杏仁苷在胃肠道中不稳定，进入生物体后水解成野樱苷，经过一系列的催化作用最终分解成为苯甲醛和氢氰酸[8-9]，进而产生毒性，限制了苦杏仁苷的应用。

自微乳化药物传递系统(self-microemulsion drug delivery system，SMEDDS)是由主药、油相、乳化剂、助乳化剂形成的透明均一的液体剂型或固体剂型，口服后在胃肠道中可以自发形成粒径< 100 nm 的水包油型乳滴[10-12]，SMEDDS 具有提高生物利用度[13]、增加药物稳定性[14]、降低药物毒性[15]等多种优点。本实验制备了苦杏仁苷自微乳，尝试将药物包裹在乳滴中以增加苦杏仁苷在胃肠道中的稳定性，进而减少不良反应。

1 仪器与试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司)；BS 124S 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器系统有限公司)；TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器厂)；XW-80A 旋涡混合仪(上海医科大学仪器厂)；SHY-2A 恒温水浴振荡器(江苏金坛区金城国盛实验仪器厂)；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器(上海东玺制冷仪器设备有限公司)；纳米粒径仪(美国布鲁克海文仪器公司)。

苦杏仁苷(南京草本源生物科技有限公司，批号：201601217；纯度：99%)；中碳链脂肪酸甘油酯(medium chain triglycerides，MCT，阿拉丁试剂公司，货号：H304294)；单辛酸丙二醇酯(Capryol™ 90，货号：230-962-9)、单亚油酸甘油酯(Maisine™ 35-1，货号：247-038-6)、单油酸甘油酯(Peceol™，

作者简介：樊丽雅，女，硕士，讲师　E-mail: flyxjx@163.com　*通信作者：郑春丽，女，博士，副教授　E-mail: clz3330@hotmail.com

货号：203-827-7)、油酸聚乙二醇-6 甘油酯(Labrafil® M1944CS，货号：9004-96-0)、辛酸葵酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol®，货号：85536-07-8)、月桂酸聚乙二醇-32 甘油酯(Gleucire™ 44/14，货号：121548-04-7)、乙二醇单乙基醚(Transcutol® HP，货号：110-80-5)均购自法国 GAITEFOSSE 公司；油酸乙酯(批号：20170216)、甘油(批号：20161025)均购自国药集团化学试剂有限公司；聚氧乙烯氢化蓖麻油(Cremophor® RH 40，货号：61788-85-0)、聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor® EL35，货号：61791-12-6)均购自德国 BASF 公司；吐温-80(批号：20160522)、油酸(批号：20170122)、正辛醇(分析纯，批号：20160527)均购自南京化学试剂股份有限公司；吐温-20(南京威尔化工有限公司，批号：20160705)；蓖麻油(批号：20160725)、乳化剂 OP(批号：20161027)、聚乙二醇 400(批号：20170122)均购自上海凌峰化学试剂有限公司；1,2-丙二醇(南京化学试剂有限公司，批号：20170328)；异丙醇(上海申博化工有限公司，批号：20160816)；甲醇、无水乙醇均购自江苏汉邦科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 苦杏仁苷分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱：Unitary C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：甲醇-水(25∶75)；柱温：35 ℃；流速：1 mL·min^{-1}；检测器：UVD；检测波长：210 nm。

2.1.2 系统适用性试验 精密称取苦杏仁苷对照品 20 mg，置于 50 mL 量瓶之中，加入 50%甲醇溶解并定容作为储备液。精确移取适量储备液加流动相制成质量浓度为 160 μg·mL^{-1} 的苦杏仁苷对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进行测定，并计算理论板数和分离度。结果表明，供试品中苦杏仁苷峰与其相邻峰的分离度>1.5，保留时间适中，在该色谱条件下，色谱柱的理论板数以苦杏仁苷峰计算为 6 598。因此，用该分析方法测定苦杏仁苷的含量是可行的。色谱图见图 1。

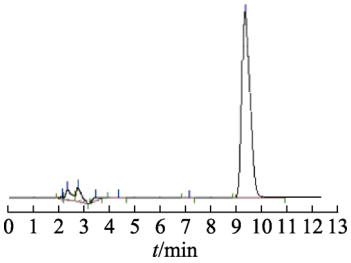

图 1 苦杏仁苷液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of amygdalin

2.1.3 标准曲线绘制 精密量取“2.1.2”项下储备液 1，2，3，4，5 mL，置于 10 mL 量瓶中，加流动相定容至刻度，分别得 40，80，120，160，200 μg·mL^{-1} 的系列苦杏仁苷对照品溶液。分别取适量对照品溶液于离心管中，1 200 r·min^{-1} 离心 10 min 后取上清液，按“2.1.1”项下色谱条件进行测定，以质量浓度(x)对峰面积(y)进行线性回归。标准曲线为 y= 15 338x–51 256 (r=0.999 8)，苦杏仁苷质量浓度在 40~200 μg·mL^{-1} 内线性良好。

2.1.4 回收率试验 分别精确移取适量“2.1.2”项下储备液加流动相制成质量浓度为 40，120，200 μg·mL^{-1} 的苦杏仁苷对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进行测定。计算得到低、中、高浓度回收率分别为 100.29% (RSD=0.91%)，99.12%(RSD= 0.16%)，100.32%(RSD= 0.82%)。结果表明，该方法测得的回收率符合要求，准确度良好。

2.1.5 精密度试验 取“2.1.4”项下中浓度样品，按“2.1.1”项下色谱条件于 1 d 内进样 6 次，连续 3 d 进样测定精密度。结果其日内精密度为 0.73%，日间精密度为 1.12%。结果表明该方法测得的精密度符合要求，重复性良好。

2.2 苦杏仁苷在不同介质中平衡溶解度的测定

采用经典摇瓶法测定苦杏仁苷的平衡溶解度，精密称取定量的各种辅料，分别加入过量的苦杏仁苷，涡旋 3 min 使其混合均匀后，在 37 ℃水浴条件下振荡 24 h，12 000 r·min^{-1} 离心 10 min，分别移取其上清液，用甲醇稀释一定倍数后，按“2.1”项下分析方法测定苦杏仁苷的平衡溶解度。结果显示苦杏仁苷在油相中的平衡溶解度由高到低依次为油酸乙酯>Peceol>蓖麻油>油酸>MCT>Labrafil M1944CS>Capryol 90>Maisine 35-1，结果见图 2。因此选取油酸乙酯和 Peceol 作为待选油相。苦杏仁苷在乳化剂中的平衡溶解度由高到低依次为：乳化剂 OP>Laibrasol>Gelucire 44/14>Cremophor EL35>Cremophor RH40>吐温-20>吐温-80，结果见图 3。因此选取乳化剂 OP、Laibrasol 和 Gelucire 44/14 作为待选乳化剂。苦杏仁苷在助乳化剂中的平衡溶解度由高到低依次为 1,2-丙二醇>PEG 400>甘油>Transcutol HP>乙醇>异丙醇，结果见图 4。因此选取 1,2-丙二醇和 PEG 400 作为待选助乳化剂。

2.3 苦杏仁苷 SMEDDS 的处方筛选

2.3.1 油相、乳化剂、助乳化剂的配伍 根据预试验结果，选用单一油相的自微乳的乳化效果欠佳，

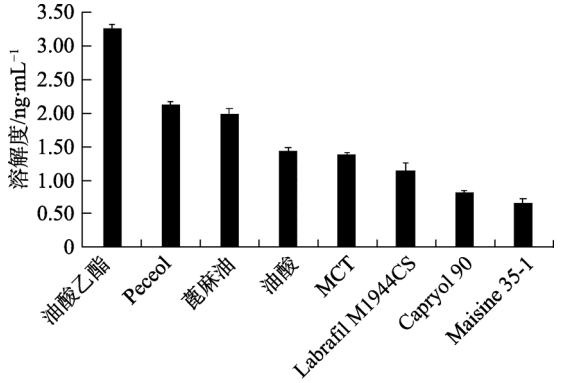

图 2 苦杏仁苷在不同油相中的平衡溶解度($\bar{x}\pm s$，n=3)

Fig. 2 Equilibrium solubility of amygdalin in different oil phase($\bar{x}\pm s$, n=3)

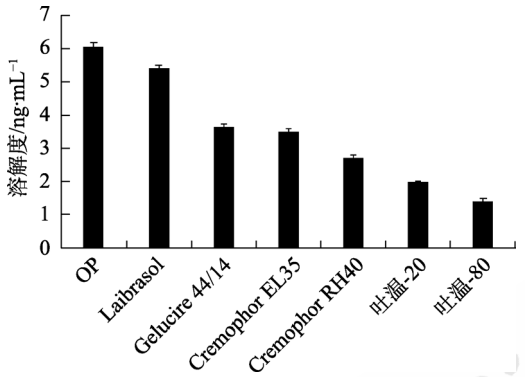

图 3 苦杏仁苷在不同乳化剂中的平衡溶解度($\bar{x}\pm s$, n=3)

Fig. 3 Equilibrium solubility of amygdalin in different emulsifier($\bar{x}\pm s$, n=3)

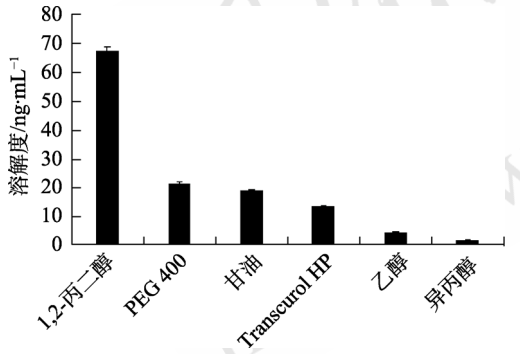

图 4 苦杏仁苷在不同助乳化剂中的平衡溶解度($\bar{x}\pm s$，n=3)

Fig. 4 Equilibrium solubility of amygdalin in different co-emulsifier ($\bar{x}\pm s$, n=3)

故选择油酸乙酯-MCT(1∶1)和 Peceol-MCT (1∶1)作为混合油相，并将油相、乳化剂、助乳化剂按质量比为 2∶2∶1 进行充分混合后，用去离子水稀释一定倍数，37 ℃恒温磁力搅拌，进行自乳化。以自乳化后的澄明度、均一度和时间作为观测指标，观察其自乳化情况并按标准进行评级[16]，评价标准见表 1，结果见表 2。

表 1 自乳化标准级别表

Tab.1 Self-emulsifying standard level table

评价级别	自乳化时间/min	外观
A	≤1	澄清透明，带蓝色乳光
B	≤1	半透明，显蓝白色
C	≤2	乳白色
D	>2	灰白色
E	–	表面分布油滴

表 2 不同混合油相、乳化剂、助乳化剂体系的自乳化情况

Tab. 2 Self-emulsifying in different mix-oil phase, emulsifier and co-emulsifier system

处方	评价级别
油酸乙酯/MCT(1∶1)–乳化剂 OP–1,2-丙二醇	D
油酸乙酯/MCT(1∶1)–乳化剂 OP–PEG 400	C
油酸乙酯/MCT(1∶1) –Laibrasol–1,2-丙二醇	C
油酸乙酯/MCT(1∶1) –Laibrasol–PEG 400	C
油酸乙酯/MCT(1∶1) –Gelucire 44/14–1,2-丙二醇	B
油酸乙酯/MCT(1∶1) –Gelucire 44/14–PEG 400	D
Peceol/MCT(1∶1) –乳化剂 OP–1,2-丙二醇	A
Peceol/MCT(1∶1) –乳化剂 OP–PEG 400	A
Peceol/MCT(1∶1) –Laibrasol-1,2-丙二醇	C
Peceol/MCT(1∶1) –Laibrasol–PEG 400	C
Peceol/MCT(1∶1) –Gelucire 44/14–1,2-丙二醇	C
Peceol/MCT(1∶1) –Gelucire 44/14–PEG 400	D

由表 2 可知，油酸乙酯-MCT(1∶1)和 Peceol-MCT(1∶1)作为混合油相，自乳化情况良好。综合考虑溶解能力、乳化情况、稳定性等，最终选择体系 Peceol/MCT-乳化剂 OP-1,2-丙二醇和 Peceol/MCT-乳化剂 OP-PEG 400 进行处方的进一步筛选。

2.3.2 伪三元相图的绘制　自微乳处方筛选通常使用伪三元相图的绘制[17]，称取不同比例的油相、乳化剂和助乳化剂充分混合均匀，制备空白自微乳并将其稀释一定倍数，在 37 ℃下磁力搅拌，待其自乳化完全后，观察溶液的外观，并记录形成透明或半透明带蓝色乳光的处方，以油相、乳化剂和助乳化剂的质量比作为 3 个变量绘制伪三元相图，选择乳化区域较大的系统作为最佳处方。以 Peceol/MCT(1∶1)–乳化剂 OP–1,2-丙二醇制备的空白自微乳，其伪三元相图中的乳化区域面积较大，因此选择该体系做进一步研究，结果见图 5。

2.3.3 油相比例的筛选　固定乳化剂与助乳化剂的质量比(K_m=2∶1)，在 20%~65%筛选油相比例，将制备的空白自微乳稀释一定倍数后，测定其乳化后的粒径，筛选油相的最佳比例。其中油相比例为 60%和 65%的处方乳化后分层，其余结果见图 6。结果表明，随着油相比例的增加，粒径逐渐增大，结合粒径的多分散系数，最终确定油相比例为 45%。

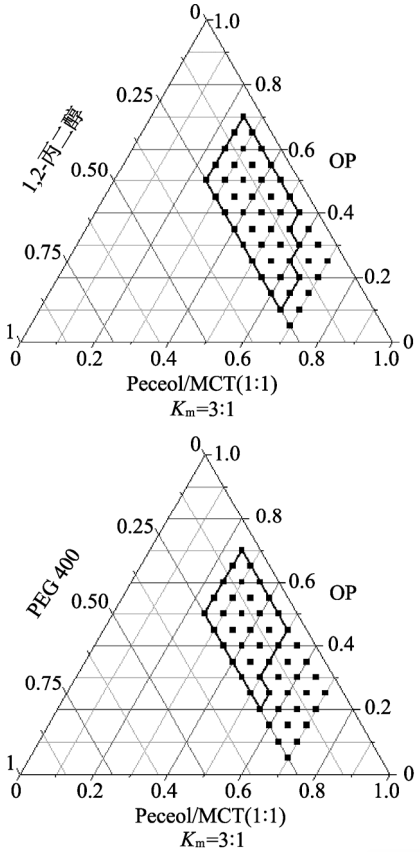

图 5 Peceol/MCT-OP-1,2-丙二醇(A)和 Peceo/MCT-OP-PEG 400(B)空白自微乳的伪三元相图

Fig. 5 Pseudo-ternary phase diagram of Peceol/MCT-OP-1,2-propanediol(A) and Peceol/MCT-OP-PEG 400(B) blank self microemulsion

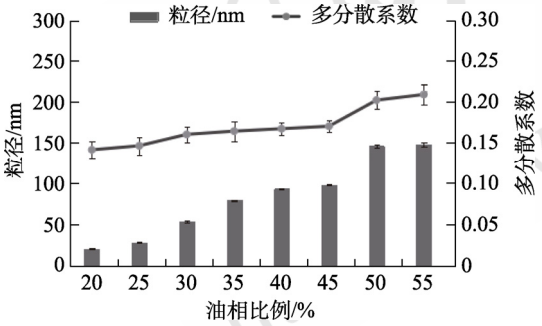

图 6 不同油相比例空白自微乳的粒径($\bar{x}\pm s$，n=3)

Fig. 6 Particle size of different rates oil phase in blank self microemulsion($\bar{x}\pm s$, n=3)

2.3.4 乳化剂和助乳化剂比例的筛选 固定油相比例 45 %，按照乳化剂和助乳化剂质量比(K_m)为 1∶2，1∶1，1.5∶1，2∶1，2.5∶1，3∶1，4∶1 制备空白自微乳，稀释一定倍数后，测定其乳化后的粒径，筛选出乳化剂和助乳化剂的最佳质量比。结果见图 7，随着 K_m 的增大，粒径先减小后增大，且 K_m=3∶1 时，测得的粒径最小，说明此时体系的相容性最好，因此最终确定 K_m 为 3∶1。

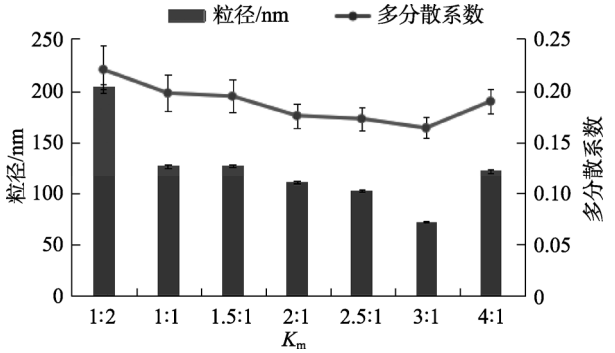

图 7 不同 K_m 空白自微乳的粒径($\bar{x}\pm s$，n=3)

Fig. 7 Particle size of different rates K_m in blank self microemulsion($\bar{x}\pm s$, n=3)

2.3.5 苦杏仁苷在空白自微乳中饱和溶解度的测定 按最优处方制备空白自微乳，置于具塞试管中，加入过量的苦杏仁苷，超声 30 min，置于 37 ℃恒温水浴振荡器中震荡 24 h，上清液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后，用甲醇稀释一定比例，按“2.1.1”项下色谱条件测定苦杏仁苷的含量。结果表明，苦杏仁苷在空白自微乳中饱和溶解度为 12.65 mg·mL^{-1}。

2.3.6 载药量的确定 按最优处方制备空白自微乳，在 1 mL 空白自微乳中分别加入 11，10，9，8，7，6，5，4 mg 苦杏仁苷，超声使药物充分溶解后，稀释一定倍数，测定乳化后的粒径。分别取上述不同载药量的苦杏仁苷自微乳 4 000 r·min^{-1} 离心 15 min。以粒径和离心后有无药物析出为标准确定最佳载药量。不同载药量自微乳制剂的粒径变化见图 8。

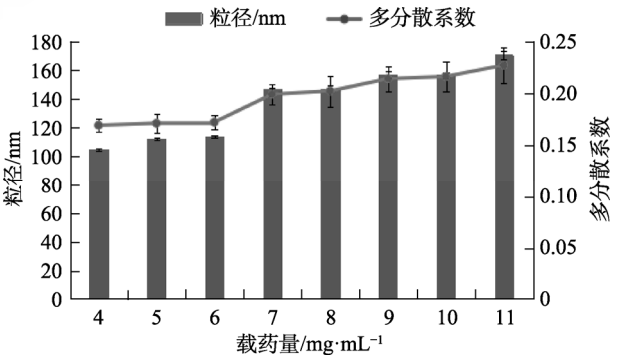

图 8 不同载药量自微乳制剂的粒径变化($\bar{x}\pm s$，n=3)

Fig. 8 Change of particle size of self microemulsion with different drug loading($\bar{x}\pm s$, n=3)

结果表明，随着载药量增加，粒径有所增大，但均在 100~200 nm 内。离心稳定性试验表明，当载药量>7 mg·mL^{-1} 时，离心后均出现分层现象。综合考虑二者结果，最终确定载药量为 6 mg·mL^{-1}。

按苦杏仁苷自微乳最优处方 Peceol/MCT(1∶1)-乳化剂 OP-1,2-丙二醇=45%∶40%∶15%，载药量为 6 mg·mL^{-1}，制备苦杏仁苷 SMEDDS，并对其粒径、离心稳定性进行测定，结果表明苦杏仁苷自微乳平均粒径为(113.3±0.8)nm，多分散系数为(0.171± 0.007)，离心稳定性良好。

3 讨论

根据苦杏仁苷在不同辅料中平衡溶解度的测定结果及预实验结果，单一油相对苦杏仁苷的溶解能力有限，且自乳化效果不佳。有研究表明采用混合油相可以增加体系的互溶性[18-20]，故本实验选用油酸乙酯-MCT(1∶1)和 Peceol-MCT(1:1)混合物作为油相进行筛选，根据二者的自乳化效果最终选定 Peceol-MCT(1∶1)混合物作为油相。这是因为乳剂的不稳定性主要由乳滴的聚集和老化造成，Peceol 为长链低极性油相，一般油相的极性越低所得乳剂越不容易聚集，稳定性越好[21]。乳滴的老化是由于分散相在较小乳滴中的溶解度高于在大乳滴中的溶解度，这种浓度梯度便会导致小乳滴的损失和大乳滴的生成。而乳滴老化的速度取决于油相在水相中的相对溶解度和扩散系数[21]，MCT 与 Peceol 相比为中短链极性相对高的油相，因此 MCT 的加入可减缓乳滴的老化速率。

助乳化剂可以调节乳化剂的 HLB 值，形成更稳定的乳滴[22]，通常使用药用短链醇或适宜 HLB 值的非离子型表面活性剂，如正丁醇、乙二醇、甘油、聚甘油酯等。本研究通过三元相图的绘制考察了 1,2-丙二醇、PEG400 的助乳化性能，最终选择 1,2-丙二醇为助乳化剂。1,2-丙二醇可以在油水界面富集并形成更强的界面膜，从而起到稳定乳剂的作用。

REFERENCES

[1] MAKAREVIĆ J, RUTZ J, JUENGEL E, et al. Amygdalin blocks bladder cancer cell growth *in vitro* by diminishing cyclin A and cdk2[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105590. Doi: 10.1371/journal.pone.0105590.

[2] JUENGEL E, AFSCHAR M, MAKAREVIĆ J, et al. Amygdalin blocks the *in vitro* adhesion and invasion of renal cell carcinoma cells by an integrin-dependent mechanism[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(3): 843-850.

[3] CHEN Y, MA J S, WANG F, et al. Amygdalin induces apoptosis in human cervical cancer cell line HeLa cells[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2013, 35(1): 43-51.

[4] JIAGANG D, LI C Y, WANG H L, et al. Amygdalin mediates relieved atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice through the induction of regulatory T cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 411(3): 523-529.

[5] ZHAO F, YANG Z R. Amygdalin attenuates atherosclerosis progress through inhibiting of toll-like receptors expression and activity[J]. J Animal Vet Adv, 2012, 11(10): 1613-1621.

[6] ZHANG A, PAN W, LV J, et al. Protective effect of amygdalin on LPS-induced acute lung injury by inhibiting NF-κB and NLRP3 signaling pathways[J]. Inflammation, 2017, 40(3): 745-751.

[7] LU M F, WANG R, WANG X J, et al. Effects of amygdalin on serum SOD, MDA and NO levels in elderly patients with erosive gastritis[J]. Lab Med Clin(检验医学与临床), 2015, 12(19): 2868-2869, 2872.

[8] SHIM S M, KWON H. Metabolites of amygdalin under simulated human digestive fluids[J]. Int J Food Sci Nutr, 2010, 61(8): 770-779.

[9] XIA Q L, WANG T, LU S M, et al. Research progress in analysis, extraction, purification and pharmacological effects of amygdalin[J]. Food Sci(食品科学), 2013, 34(21): 403-407.

[10] 张娜, 康虞玲, 刘智勤, 等. 自微乳化药物传递系统的应用与进展[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(11): 960-962.

[11] ZHOU W, LI X F, XIANG Z Y, et al. Combined application of self micro-emulsifying drug delivery system and liquidsolid compact technique in insoluble traditional Chinese medicine formulations[J]. Pharm Clin Chin Mater Med(中药与临床), 2016, 7(2): 87-89.

[12] XU X Y, XIE Q Q, ZHENG D M, et al. Optimization of self-microemulsion containing total saponins from *Lysimachia capillipes* by central composite design-response surface methodology[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2017, 52(22): 2012-2017.

[13] GOO Y T, SONG S H, YEOM D W, et al. Enhanced oral bioavailability of valsartan in rats using a supersaturable self-microemulsifying drug delivery system with P-glycoprotein inhibitors[J]. Pharm Dev Technol, 2020, 25(2): 178-186.

[14] TAO C, CHEN J M, HUANG A W, et al. Improvement of stability of sirolimus in self-microemulsifying sustained release tablets[J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2017, 37(17): 1675-1679.

[15] ZHANG J, XIE M H, CAI X J, et al. Study on the antitoxic effect of self-microemulsifying drug delivery system on triptolide[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(2): 168-171.

[16] HAN B, GUAN Y B, TIAN Y D, et al. Preparation and evaluation *in vitro* of self-microemulsifying drug delivery system of berberine hydrochloride[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2018, 41(10): 2398-2402.

[17] CHOU Y C, LI S M, HO C T, et al. Preparation and evaluation of self-microemulsifying delivery system containing 5-demethyltangeretin on inhibiting xenograft tumor growth in mice[J]. Int J Pharm, 2020(579): 119134.

[18] WU Z H. Study on the solubilization of organics in Winsor type Ⅲ microemulsions[D]. Dongying: China University of Petroleum (Huadong), 2016.

[19] YIN D Y, YANG K H, HUANG K. Effect of salt and alcohol on the displacement performance of dodecyl dimethyl betaine microemulsion system using Winsor phase diagram method[J]. Oilfield Chem(油田化学), 2018, 35(1): 119-124, 130.

[20] ZHOU B L. The preparation of microemulsion and evaluation on oil displacement effect[D]. Daqing: Northeast Petroleum University, 2016.

[21] GE M, QUAN D Q. Effect of oil polarity on the stability of emulsions[J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展), 2009, 9(9): 1781-1783.

[22] 刘伟. 油相组分及添加剂对微乳液相行为及增溶性能的影响[D]. 济南: 山东师范大学, 2012.

收稿日期：2020-11-09

(本文责编：曹粤锋)