共载小檗碱/胡椒碱自微乳给药系统的构建及评价Δ

李春梅[1*]，刘佳雯[1]，张馨元[1]，周长胜[2#]（1.哈尔滨商业大学药学院，哈尔滨 150076；2.哈尔滨商业大学马克思主义学院，哈尔滨 150028）

中图分类号 R943 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2024）24-2990-08
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.24.05

摘 要 目的 制备共载小檗碱/胡椒碱自微乳给药系统（BBR/PIP-SMEDDS），评价其理化性质、体外释药及药动学特征。**方法** 通过外翻肠囊法确定制剂中小檗碱（BBR）和胡椒碱（PIP）的载药质量比；通过溶解度检测、相容性评价和伪三元相图分别确定油相、乳化剂和助乳化剂；以油相用量、乳化剂-助乳化剂质量比为因素，粒径和Zeta电位的综合评分为响应值，采用星点设计-效应面法优化空白自微乳给药系统（SMEDDS）的处方并验证；按最优处方，在磁力搅拌下加入过量BBR、PIP原料药，制得BBR/PIP-SMEDDS，对其理化性质、体外释药行为、大鼠体内药动学特征进行考察。**结果** BBR和PIP的载药质量比为1∶1，最优处方为油相（油酸乙酯）占18.54%，乳化剂（吐温-80）占52.16%，助乳化剂（聚乙二醇400）占29.30%。3次验证实验显示，所得空白SMEDDS的平均粒径为（16.49±0.49）nm，Zeta电位为（−16.22±0.77）mV，综合评分为0.97分，与预测值（0.95分）的相对偏差为2.11%。所制BBR/PIP-SMEDDS为水包油型微乳，为金黄色油状液体，呈圆球状，平均粒径为（32.90±0.38）nm，Zeta电位为（−19.17±0.70）mV；BBR的包封率为（90.44±0.88）%，载药量为（10.18±0.17）mg/g；PIP的包封率为（87.48±1.13）%，载药量为（9.41±0.17）mg/g（n=3）。BBR/PIP-SMEDDS低温（4 ℃）避光、离心、稀释条件下稳定性较好。体外释药结果显示，制备成SMEDDS后，BBR在模拟肠液中24 h时的累积释放百分率明显高于原料药。大鼠药动学研究结果表明，BBR/PIP-SMEDDS的峰浓度、药时曲线下面积（AUC_{0-t}）分别是原料药的4.61、7.07倍，相对生物利用度为707.484%。**结论** 成功制得BBR/PIP-SMEDDS，所得制剂的体外释放和生物利用度均较原料药有较大提升。

关键词 小檗碱；胡椒碱；自微乳给药系统；处方优化；理化性质；体外释药；药动学

Construction and evaluation of berberine/piperine co-loaded self-microemulsion drug delivery system

LI Chunmei[1], LIU Jiawen[1], ZHANG Xinyuan[1], ZHOU Changsheng[2] (1. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. College of Marxism, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To prepare berberine/piperine co-loaded self-microemulsion drug delivery system (BBR/PIP-SMEDDS), evaluate its physicochemical properties, *in vitro* release and pharmacokinetic characteristics. **METHODS** The drug loading mass ratio of berberine (BBR) and piperine (PIP) in the preparation was determined by the everted intestinal sac method. The oil-phase, emulsifier and co-emulsifier were determined by solubility detection, compatibility evaluation and pseudo-ternary phase diagram, respectively. The formulation of blank self-microemulsion drug delivery system (SMEDDS) was optimized and verified by central composite design-response surface methodology with the amount of oil-phase and the mass ratio of emulsifier to co-emulsifier as factors, and the comprehensive score of particle size and Zeta potential as response value. According to the optimal prescription, BBR/PIP-SMEDDS was prepared by adding excessive BBR and PIP raw materials under magnetic stirring, and its physicochemical properties, *in vitro* release behavior and pharmacokinetic characteristics in rats were investigated. **RESULTS** The drug loading mass ratio of BBR and PIP was 1∶1. The optimal prescription included oil-phase (ethyl oleate) accounted for 18.54%, emulsifier (Tween-80) accounted for 52.16%, and co-emulsifier (polyethylene glycol 400) accounted for 29.30%. Three verification experiments showed that the average particle size of blank SMEDDS was (16.49±0.49) nm; the Zeta potential was (−16.22±0.77) mV; the comprehensive score was 0.97, the relative deviation of which from the predicted value (0.95) was 2.11%. The prepared BBR/PIP-SMEDDS was an oil-in-water microemulsion, which was a golden yellow oily liquid with a spherical shape. The average particle size was (32.90±0.38) nm, and the Zeta potential was (−19.17±0.70) mV. The encapsulation efficiency of BBR was (90.44±0.88)%, and the drug loading was (10.18±0.17) mg/g. The encapsulation efficiency of PIP was (87.48±1.13)%, and the drug loading was (9.41±0.17) mg/g. BBR/PIP-SMEDDS had good stability at low temperature (4 ℃) in the dark, centri-fugation and dilution. The results of *in vitro* release showed that the

Δ**基金项目** 黑龙江省教育科学规划课题（No.GJB1424247）；黑龙江省中医药经典普及化专项课题（No.ZYW2023-077）；黑龙江省博士后科研启动金项目（No.BS0051）；2023年度黑龙江省哲学社会科学研究规划项目（No.23KSD129）

＊**第一作者** 副教授，硕士生导师，博士。研究方向：天然药物新剂型研发。E-mail：lichunmei81@163.com

＃**通信作者** 副教授，博士。研究方向：中药新剂型、思政教学。E-mail：changshengd86@163.com

cumulative release percentage of BBR in simulated intestinal fluid for 24 h was significantly higher than that of the raw drug after the preparation of SMEDDS. The pharmacokinetic results in rats showed that the peak concentration and area under the drug-concentration time curve (AUC_{0-t}) of BBR/PIP-SMEDDS were 4.61 and 7.07 times higher than those of the raw drug respectively, and the relative bioavailability was 707.484%. **CONCLUSIONS** BBR/PIP-SMEDDS is successfully prepared, and the *in vitro* release and bioavailability of the preparation are greatly improved compared with the raw material.

KEYWORDS berberine; piperine; self-microemulsion drug delivery system; preparation optimization; physicochemical properties; *in vitro* drug release; pharmacokinetics

小檗碱（berberine，BBR）是从毛茛科植物中提取的一种季胺类异喹啉类生物碱，具有调血脂、降血糖、抗肿瘤等药理作用[1－3]。研究指出，BBR口服生物利用度极低，可能与其溶解度差、渗透性低有关；同时，BBR是P-糖蛋白（P-glycoprotein，P-gp）的底物，其生物利用度亦受P-gp介导的外排作用的影响；此外，由于肝肠代谢循环的存在，BBR生物利用度还受胆汁再排泄致口服吸收减少的影响[4]。胡椒碱（piperine，PIP）是从胡椒科植物中提取的一种生物碱类化合物，具有保护心血管系统、抗肿瘤、改善神经系统疾病等作用[5－7]。研究指出，PIP能够抑制P-gp外排，同时是肝肠代谢关键催化酶尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶[UDP-glucuronosyltransferase，UGT]的抑制剂，可通过增加药物吸收、减少药物代谢等方式来提高药物的生物利用度[8]。因此，联合PIP可能是改善BBR口服生物利用度的有效途径。

自微乳给药系统（self-microemulsion drug delivery system，SMEDDS）由药物、油相、乳化剂和助乳化剂组成。与传统剂型相比，SMEDDS为热力学稳定系统，可在水性介质中自动形成粒径小于100 nm的水包油型乳液；同时，该剂型制备简单，可提高难溶性药物的溶解度，改善难溶性药物的体内吸收，具有广阔的应用前景[9]。基于此，本实验拟利用自微乳化技术[10]，制备共载BBR、PIP的SMEDDS（BBR/PIP-SMEDDS），并对其理化性质、药动学特征进行评价，旨在通过与PIP联用和改变剂型的方式来解决BBR生物利用度低的问题，为后续药物开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括UltiMate 3000型高效液相色谱（HPLC）仪（美国Dionex公司）、Litesizer™ 500型纳米粒度电位仪（奥地利Anton Paar公司）、HT7700型低电压透射电镜（日本Hitachi公司）、FA22048型电子天平（山东瑞德京科仪器股份有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

BBR原料药（批号20221025，纯度＞98%）购自陕西正禾药业生物工程有限公司；PIP原料药（批号20220901，纯度＞95%）购自西安佰斯特生物科技有限公司；BBR、PIP、对二甲氨基苯甲醛对照品（批号分别为B21379、B20516、B20322，纯度均大于98%）和肉豆蔻酸异丙酯（IPM）、中链甘油三酯（MCT）均购自上海源叶生物科技有限公司；十二烷基酚聚氧乙烯醚（OP-10）、丙三醇、无水乙醇均购自天津市天力化学试剂有限公司；橄榄油购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；油酸乙酯、吐温-80、吐温-20均购自天津市光复精细化工研究所；辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯（Labrasol®）购自南京都莱生物技术有限公司；聚乙二醇200（PEG-200）、PEG-400均购自天津市致远化学试剂有限公司；甲醇、乙腈均为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠，体重240～250 g，购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司[实验动物生产许可证号SCXK（吉）2020-0002]。本实验经过哈尔滨商业大学药学院实验动物伦理委员会批准（编号HSDYXY-2023055、HSDYXY-2023054）。

2 方法与结果

2.1 BBR、PIP的含量测定

2.1.1 BBR/PIP-SMEDDS中BBR的含量

采用HPLC法测定。以Welchrom C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）为色谱柱，以0.05 mol/L磷酸二氢钾-乙腈（65∶35，*V*/*V*）为流动相；流速为1.0 mL/min；检测波长为350 nm；柱温为30 ℃；进样量为20 μL。结果显示，BBR色谱峰峰形良好，不受BBR/PIP-SMEDDS中其余成分和溶剂（流动相）的影响，专属性良好；BBR峰面积（*Y*）与其质量浓度（*X*）的线性回归方程为$Y=0.338\ 8X-0.343\ 5$（$R^2=0.999\ 5$），线性范围为10.00～50.00 μg/mL；精密度、重复性、稳定性（12 h）试验的RSD均小于5.00%（$n=6$），平均加样回收率为100.00%～101.00%（RSD均小于2.00%，$n=3$），均符合定量分析方法学考察的相关要求。

2.1.2 BBR/PIP-SMEDDS中PIP的含量

采用HPLC法测定。以Welchrom C_{18}（4.6 mm×250 mm，5 μm）为色谱柱，以甲醇-水（77∶23，*V*/*V*）为流动相；流速为1.0 mL/min；检测波长为343 nm；柱温为30 ℃；进样量为20 μL。结果显示，PIP色谱峰峰形良好，不受BBR/PIP-SMEDDS中其余成分和溶剂（无水乙醇）的影响，专属性良好；PIP峰面积（*Y*）与其质量浓度（*X*）的线性回归方程为$Y=2.213\ 9X+2.216\ 4$（$R^2=0.999\ 2$），线性范围为5.00～25.00 μg/mL；精密度、重复性、稳定性（12 h）试验的RSD均小于5.00%（$n=6$），平均加样回收率为99.30%～99.49%（RSD均小于5.00%，$n=3$），均符合定量分析方法学考察的相关要求。

2.1.3　台式液中BBR的含量

采用HPLC法测定，色谱条件同“2.1.1”项。结果显示，BBR色谱峰峰形良好，不受台式液成分的影响，专属性良好；BBR峰面积（Y）与其质量浓度（X）的线性回归方程为 Y=0.345 2X+0.148 3（R^2=0.999 2），线性范围为0.16～25.60 mg/L；精密度、重复性、稳定性（12 h）试验的RSD均小于5.00%（n=6），平均加样回收率为99.59%～100.14%（RSD均小于5.00%，n=3），均符合定量分析方法学考察的相关要求。

2.1.4　释放介质中BBR的含量

采用HPLC法测定，色谱条件同“2.1.1”项。结果显示，BBR色谱峰峰形良好，不受释放介质（pH7.4的磷酸盐缓冲液）的影响，专属性良好；BBR峰面积（Y）与其质量浓度（X）的线性回归方程为 Y=0.298 7X+0.113 1（R^2=0.999 4），线性范围为0.80～80.00 μg/mL；精密度、重复性、稳定性（12 h）试验的RSD均小于5.00%（n=6），平均回收率为98.96%～101.75%（RSD均小于5.00%，n=3），均符合定量分析方法学考察的相关要求。

2.1.5　大鼠血样中BBR的含量

采用HPLC法测定，色谱条件同“2.1.1”项。结果显示，BBR与内标（对二甲氨基苯甲醛）的色谱峰互不干扰，亦不受内源性杂质的干扰，专属性良好；BBR与内标的峰面积比值（Y）与BBR质量浓度（X）的线性回归方程为 Y=0.551 7X+0.026 3（R^2=0.999 8），线性范围为0.04～4.00 μg/mL，定量下限为0.04 μg/mL；日内/日间精密度、准确度、稳定性试验的RSD均小于10.00%（n=6或n=3或n=5），均符合定量分析方法学考察的相关要求。

2.2　BBR和PIP载药质量比的确定

采用外翻肠囊法确定BBR/PIP-SMEDDS中BBR和PIP的载药质量比。精密称取氯化钠4.0 g、碳酸氢钠0.5 g、氯化钾0.14 g、磷酸二氢钠0.025 g、氯化镁0.05 g，溶于250 mL水中，密封冷藏；取氯化钙0.1 g，溶于250 mL水中，密封冷藏；临用前，将上述2种溶液混匀，再加入葡萄糖0.5 g，充分溶解，即得台式液。分别精密称取BBR原料药和BBR+PIP原料药，以台式液为溶剂，制得100 mg/L的BBR供试液和两者质量比分别为2∶1、1∶1、1∶2的混合供试液（BBR质量浓度均为100 mg/L，PIP质量浓度分别为50、100、200 mg/L）。

将24只大鼠随机分为BBR原料药组和BBR+PIP不同质量比（2∶1、1∶1、1∶2）溶液组，每组6只。实验前，大鼠禁食、不禁水12 h，经麻醉后打开腹腔，取出十二指肠、空肠、回肠（长约10 cm）。各肠段经台式液洗净后翻转，一端用手术线扎紧，另一端用自制的胶管固定扎紧，使肠段形成囊状套管。向肠囊内加入空白台式液2 mL后重新扎紧，将其放入含上述供试液20 mL的试管中，并通入混合气体（95%O_2+5%CO_2）；将试管置于37 ℃水浴中孵育，分别于孵育30、60、90、120 min时从肠囊内取样0.3 mL，同时补加等温等体积的空白台式液。将各时间点取得的样品溶液分别置于1.5 mL离心管中，加甲醇300 μL，涡旋混匀3 min，以8 000 r/min离心10 min，取上清液，即得肠囊样品溶液。按“2.1.3”项下方法测定肠囊样品溶液中BBR的质量浓度，并计算其在不同时间点、不同肠段中的单位面积吸收量（Q）：$Q=\frac{C_nV_1+\sum_{i=1}^{n-1}C_nV_2}{A}$

[式中，C_n为第n个取样点所测得的BBR质量浓度；V_1为空白台式液体积（2 mL）；V_2为取样体积（0.3 mL）；A为肠表面积]。结果（图1）显示，与BBR原料药相比，添加PIP后，BBR的Q值均有所增加；当BBR和PIP的质量比为1∶1时，BBR在各肠段中的Q值均最高，故将两者质量比确定为1∶1。

2.3　SMEDDS处方优化的单因素实验

采用单因素实验对空白SMEDDS的辅料进行筛选。

2.3.1　辅料的初筛

取过量的BBR和PIP原料药（质量比1∶1），置于2 mL离心管中，分别加入不同的油相（IPM、油酸乙酯、MCT、橄榄油）、乳化剂（OP-10、吐温-80、吐温-20、Labrasol®）、助乳化剂（丙三醇、PEG-200、PEG-400、无水乙醇）至总质量为1 g，涡旋5 min后，超声（频率40 kHz，功率120 W）40 min使BBR、PIP充分溶解，再以10 000 r/min离心15 min；取上清液，稀释后，按照“2.1.1”“2.1.2”项下方法测定溶液中BBR、PIP的质量浓度，并结合稀释倍数计算两者在不同辅料中的溶解度。每个样品平行测定3次，结果取平均值。综合BBR、PIP溶解度的测定结果（表1），本研究暂将油相定为油酸乙酯和MCT，乳化剂为吐温-80和Labrasol®，助乳化剂为无水乙醇、PEG-400和PEG-200。

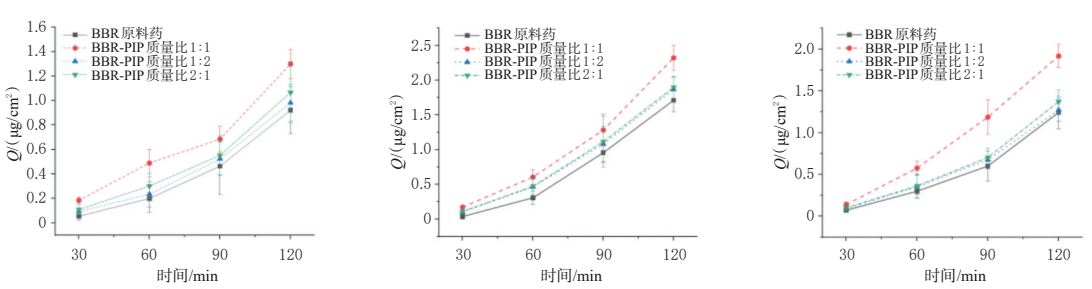


图1　BBR在不同肠段中的Q值（$\bar{x}\pm s$，n=6）

表1　药物在不同辅料中的溶解度（mg/mL，n=3）

辅料类别	辅料	溶解度	
		BBR	PIP
油相	IPM	0	0.337
	油酸乙酯	0.138	7.400
	MCT	0.101	0.079
	橄榄油	0	0.127
乳化剂	OP-10	0.349	0.139
	吐温-80	0.537	0.115
	吐温-20	0.109	0.100
	Labrasol®	0.999	0.486
助乳化剂	丙三醇	0.731	0.258
	PEG-200	0.643	36.386
	PEG-400	0.879	18.499
	无水乙醇	1.058	32.558

2.3.2　油相和乳化剂的选择

取“2.3.1”项下暂定的油相和乳化剂，于37 ℃下用磁力搅拌器分别将两者按质量比1∶9、2∶8、3∶7、4∶6、5∶5、6∶4、7∶3混匀，在搅拌过程中加入水（油相+乳化剂与水的质量比为1∶100），观察外观澄明度并记录乳化时间，根据SMEDDS等级划分标准对油相-乳化剂的不同组合进行相容性评价，标准如下——A级：为澄清溶液或泛蓝色乳光溶液，乳化时间＜3 min；B级：为澄清度稍差于A级的溶液，乳化时间＜3 min；C级：为亮白色不透明溶液，乳化时间为1～3 min；D级：为液面漂有油滴的灰白色溶液，乳化时间＞3 min；E级：为难乳化且一直存有油滴的溶液，乳化时间＞3 min[11]。结果（表2）显示，当使用同一乳化剂时，油酸乙酯与乳化剂的相容性更好；当使用同一油相时，吐温-80与油相的相容性更好。综合考虑，最终确定油相为油酸乙酯，乳化剂为吐温-80。

表2　不同油相和乳化剂相容性评价实验结果

油相	乳化剂	油相-乳化剂质量比						
		1∶9	2∶8	3∶7	4∶6	5∶5	6∶4	7∶3
油酸乙酯	吐温-80	A	A	A	B	B	C	C
	Labrasol®	C	C	C	C	D	D	D
MCT	吐温-80	A	A	B	C	C	C	C
	Labrasol®	C	C	D	D	D	D	D

2.3.3　助乳化剂的选择

分别固定乳化剂-助乳化剂质量比（以下简称“Km”）为2∶1、1∶1、1∶2，混匀后，将乳化剂+助乳化剂与油相以不同质量比（9∶1、8∶2、7∶3、6∶4、5∶5、4∶6、3∶7、2∶8、1∶9）混匀，逐滴加入水，观察自乳化情况，绘制由不同助乳化剂（PEG-400、PEG-200、无水乙醇）所制空白SMEDDS的伪三元相图，并以相图中自乳化区域面积（即图中被框选的区域）大小为评价指标，确定助乳化剂的种类。结果（图2）显示，溶解度实验中效果最好的无水乙醇在本乳化实验中的表现不佳，自乳化区域面积从大到小依次为PEG-400、PEG-200、无水乙醇，故最终确定助乳化剂为PEG-400。

2.4　SMEDDS处方优化的星点设计-效应面实验

采用星点设计-效应面实验对空白SMEDDS的处方进行优化。

2.4.1　星点设计-效应面实验

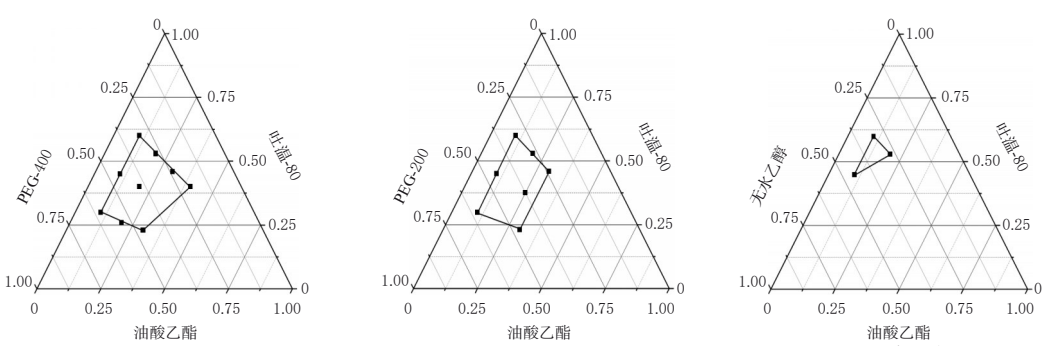
根据“2.3”项下单因素筛选结果，以油相用量（X_1）、Km值（X_2）为因素，以粒径（Y_1）和Zeta电位（Y_2）的综合评分[Y，Y=（200－Y_1）/200×50%+Y_2绝对值/最大电位绝对值×50%]为响应值（200为本实验设置的最大粒径限度）[12—13]，采用星点设计-效应面法优化处方。具体因素与水平见表3，实验安排与结果见表4。

表3　星点设计-效应面实验的因素与水平

水平	X_1/%	X_2	水平	X_1/%	X_2
−1.414	10.00	0.50∶1	1	18.54	1.78∶1
−1	11.46	0.72∶1	1.414	20.00	2.00∶1
0	15.00	1.25∶1			

表4　星点设计-效应面实验的安排与结果

序号	X_1/%	X_2	Y_1/nm	Y_2/mV	Y/分
1	11.46	0.72∶1	24.66	−9.9	0.75
2	18.54	0.72∶1	46.86	−13.5	0.80
3	11.46	1.78∶1	15.03	−3.6	0.57
4	18.54	1.78∶1	18.61	−16.0	0.95
5	10.00	1.25∶1	13.87	−2.1	0.53
6	20.00	1.25∶1	27.00	−13.6	0.86
7	15.00	0.50∶1	50.92	−14.1	0.81
8	15.00	2.00∶1	16.27	−10.8	0.80
9	15.00	1.25∶1	20.50	−9.7	0.75
10	15.00	1.25∶1	22.71	−10.5	0.77
11	15.00	1.25∶1	21.81	−10.4	0.77
12	15.00	1.25∶1	20.82	−10.7	0.78
13	15.00	1.25∶1	23.61	−9.6	0.74



A. PEG-400　B. PEG-200　C. 无水乙醇

图2　不同助乳化剂所制空白SMEDDS的伪三元相图

以 Design-Expert 13 软件分析表 4 结果，以 Y 分别对 X_1 和 X_2 进行二项式方程拟合，得 $Y=0.762\ 0+0.112\ 2X_1-0.005\ 5X_2+0.082\ 5X_1X_2-0.029\ 2X_1^2+0.025\ 9X_2^2$（$R^2=0.986\ 6$）。方差分析结果（表 5）显示，模型的 P 值小于 0.000 1，表明上述方程拟合程度高；失拟项的 P 值大于 0.05，表明未知因素干扰小，模型可用于预测 Y 的变化。

表 5　星点设计-效应面实验的方差分析结果

来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.140 1	5	0.028 0	103.09	<0.000 1
X_1	0.100 5	1	0.100 5	369.76	<0.000 1
X_2	0.000 2	1	0.000 2	0.90	0.375 3
X_1X_2	0.027 2	1	0.027 2	100.17	<0.000 1
X_1^2	0.005 9	1	0.005 9	21.69	0.002 3
X_2^2	0.004 7	1	0.004 7	17.17	0.004 3
残差	0.001 9	7	0.000 3		
失拟项	0.000 8	3	0.000 3	1.02	0.473 6
纯误差	0.001 1	4	0.000 3		

采用 Design-Expert 13 软件绘制效应面图，结果（图 3）显示，X_1、X_2 的交互作用明显。采用 Design-Expert 13 软件求解上述二项式方程，确定空白 SMEDDS 的最优处方组成为油相用量 18.54%、Km 值 1.780（乳化剂为 52.16%，助乳化剂为 29.30%），Y 的预测值为 0.95 分。

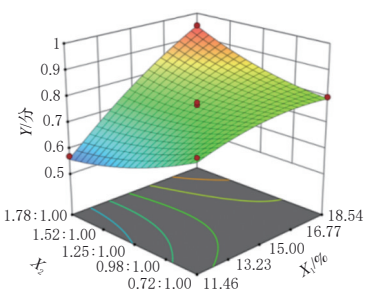


图 3　X_1 和 X_2 交互作用的三维效应面图

2.4.2　最优处方的验证

按照“2.4.1”项下最优处方制备 3 批空白 SMEDDS，测定其平均粒径为（16.49±0.49）nm，Zeta 电位为（−16.22±0.77）mV；Y 为 0.97 分，与预测值的相对偏差为 2.11%。这提示所建模型拟合度较好，最优处方可行。

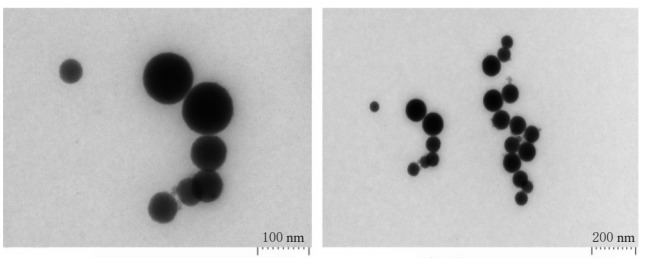
2.5　BBR/PIP-SMEDDS 的制备与质量评价

2.5.1　制备

按“2.4”项下最优处方称取油相、乳化剂和助乳化剂，将乳化剂和助乳化剂混合均匀，再加入油相搅拌均匀，即得空白 SMEDDS；在磁力搅拌下，向空白 SMEDDS 中加入过量 BBR、PIP 原料药（质量比 1∶1），搅拌 15 min，超声（频率 40 kHz，功率 120 W）40 min，于 37 ℃水浴中平衡 4 h 后，取上层澄清液体，即得 BBR/PIP-SMEDDS。

2.5.2　外观和微观形态观察

取按“2.5.1”项下方法制得的空白 SMEDDS 和 BBR/PIP-SMEDDS，对二者进行外观观察；取按“2.5.1”项下方法制得的 BBR/PIP-SMEDDS，用水稀释后滴加至铜网上，以磷钨酸溶液染色，于室温下干燥后，使用透射电镜观察其微观形态。结果显示，空白 SMEDDS 为浅黄色液体，BBR/PIP-SMEDDS 为金黄色油状液体；透射电镜（图 4）下，BBR/PIP-SMEDDS 呈圆球状，且粒子分散，无粘连。



A. 100 nm 视野　　B. 200 nm 视野

图 4　BBR/PIP-SMEDDS 的透射电镜图

2.5.3　微乳类型的鉴别

利用染色法进行鉴别。等量取按“2.5.1”项下方法制得的 BBR/PIP-SMEDDS，分置于 2 个烧杯中，用水稀释 100 倍，分别加入亚甲基蓝染料和苏丹红染料，观察其染色情况。结果（图 5）显示，亚甲基蓝（左）的扩散速度快于苏丹红（右），表明该 BBR/PIP-SMEDDS 为水包油型微乳。



图 5　亚甲基蓝和苏丹红在 BBR/PIP-SMEDDS 中的扩散效果

2.5.4　粒径和 Zeta 电位的测定

取按“2.5.1”项下方法制得的 BBR/PIP-SMEDDS，用水稀释 100 倍后，使用纳米粒度电位仪测定其粒径、多分散性指数和 Zeta 电位。样品平行检测 3 次。结果（图 6）显示，BBR/PIP-SMEDDS 的平均粒径为（32.90±0.38）nm，多分散性指数为（18.76±0.55）%，Zeta 电位为（−19.17±0.70）mV。

2.5.5　包封率和载药量的测定

取按“2.5.1”项下方法制得的 BBR/PIP-SMEDDS 1 g，用溶剂（BBR 同“2.1.1”项，PIP 同“2.1.2”项）稀释 500 倍后，分别按照“2.1.1”“2.1.2”项下方法测定，得投入药物总量。取上述稀释液，以 5 000 r/min 离心 10 min，收集上层清液，过滤，取滤液，分别按照“2.1.1”“2.1.2”项下方法测定，得被包裹的药量，根据以下公式计算包封率及载药量：包封率（%）$=W_2/W_1\times100\%$，载药量（mg/g）$=W_2/W_0$[式中，W_0 为空白 SMEDDS 的质量（即油相、乳化

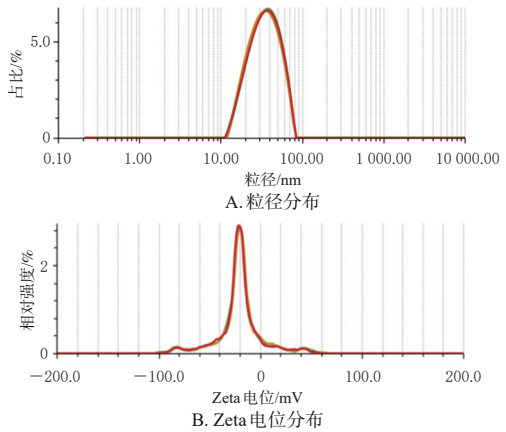


图6　BBR/PIP-SMEDDS的粒径和Zeta电位分布

剂、助乳化剂的质量之和）和药物质量的总和，W_1为投入药物总量，W_2为被包裹的药量]。样品平行检测3次。结果显示，BBR/PIP-SMEDDS中BBR的包封率为（90.44±0.88）%，载药量为（10.18±0.17）mg/g；PIP的包封率为（87.48±1.13）%，载药量为（9.41±0.17）mg/g。

2.5.6　物理稳定性的初步考察

取按“2.5.1”项下方法制得的BBR/PIP-SMEDDS，分别在室温/低温（4 ℃）避光放置不同时间（0～3个月）时或以10 000 r/min离心30 min后，考察其外观、粒径及BBR包封率的变化情况；分别在以水为溶剂稀释不同倍数（10～200倍）后，考察其外观、粒径及自乳化时间的变化情况。每个条件平行测定3次。结果（表6和表7）显示，BBR/PIP-SMEDDS在低温避光条件下放置0～3个月和离心条件下的稳定性均较好，均未见药物析出；随着稀释倍数的增加，BBR/PIP-SMEDDS的外观不变，粒径有下降的趋势，自乳化时间呈先缩短后延长的趋势，且当稀释100倍时，自乳化时间最短，表明其在稀释条件下稳定性较好。

表6　BBR/PIP-SMEDDS在放置及离心条件下稳定性实验结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

条件	具体参数	外观	粒径/nm	BBR包封率/%
室温避光	放置0个月	金黄色油状液体，无析出	32.88±2.11	89.28±1.62
	放置1个月	金黄色油状液体，无析出	33.02±0.28	88.28±3.09
	放置2个月	金黄色油状液体，无析出	33.08±0.74	85.17±1.09
	放置3个月	浅金黄色油状液体，有析出	33.28±1.01	80.17±2.09
低温避光	放置0个月	金黄色油状液体，无析出	32.07±1.00	89.03±0.95
	放置1个月	金黄色油状液体，无析出	33.87±0.87	88.66±2.08
	放置2个月	金黄色油状液体，无析出	32.65±0.58	87.55±2.34
	放置3个月	金黄色油状液体，无析出	33.47±0.48	87.45±2.02
离心	10 000 r/min离心30 min	金黄色油状液体，无析出	32.75±0.50	87.98±1.19

表7　BBR/PIP-SMEDDS在稀释条件下稳定性实验结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

稀释倍数	外观	粒径/nm	自乳化时间/s
10	澄清透明，无析出	34.26±0.46	26.63±0.89
50	澄清透明，无析出	32.50±0.58	25.32±0.85
100	澄清透明，无析出	32.09±0.46	23.16±0.06
200	澄清透明，无析出	29.06±0.71	25.82±0.65

2.5.7　体外释放度考察

取按“2.5.1”项下方法制得的BBR/PIP-SMEDDS适量（以BBR计20.0 mg）加入至透析袋中，放入含释放介质80 mL的烧杯中，在37 ℃水浴中以100 r/min的速率振摇，分别在孵育0.083、0.167、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24 h时取样1 mL（同时补加等温等体积的释放介质），过滤，按“2.1.4”项下方法测定BBR的含量，并计算累积释放百分率，绘制释放曲线。取BBR原料药20.0 mg，加入释放介质中制成混悬液，按上述方法处理。按下列公式计算累积释放百分率：累积释放百分率＝$\dfrac{C_nV_1+\sum_{i=1}^{n-1}C_iV_2}{m}\times100\%$[式中，$C_n$为第$n$个取样点所测得的BBR质量浓度；$C_i$为第$i$（$i\leqslant n-1$）个取样点所测得的BBR质量浓度；$V_1$为释放介质体积；$V_2$为取样体积；$m$为透析袋中药物总质量]。每个样品平行测定6次。

结果（图7）显示，BBR原料药在5 h前呈持续释药状态，5 h后释药基本结束，其在6 h时的累积释放百分率为（47.02±0.33）%，与其24 h的累积释放百分率[（47.09±0.37）%]相当，提示BBR原料药的释药效果较差；而BBR/PIP-SMEDDS在前6 h内稳定释放，在6 h时的累积释放百分率已达（85.62±0.67）%，其最大累积释放百分率为（90.78±0.37）%，表明BBR/PIP-SMEDDS的释药优于BBR原料药。

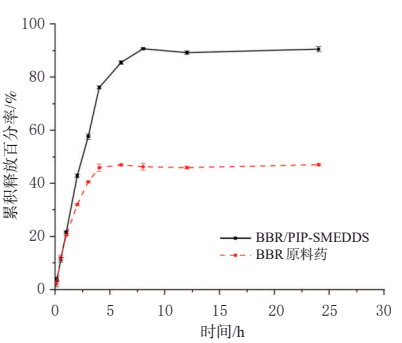


图7　BBR原料药及BBR/PIP-SMEDDS的体外释放曲线（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

2.6　BBR/PIP-SMEDDS在大鼠体内的药动学研究

取大鼠12只，随机分为BBR原料药组和BBR/PIP-SMEDDS组，每组6只。大鼠实验前禁食不禁水12 h后，分别灌胃BBR原料药、按“2.5.1”项下方法制得的BBR/PIP-SMEDDS 40 mg/kg（以BBR质量计，剂量参考相关文献[14]设置）。分别于灌胃后0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24 h时于眼眶后静脉丛采血0.5 mL，置于肝素抗凝离心管中，以6 000 r/min离心5 min。取上层血浆200 μL、1.0 μg/mL的对二甲氨基苯甲醛溶液（以甲醇为溶剂）50 μL和甲醇600 μL于离心管中，涡旋混匀5 min，离心10 min，取上清液，挥干；残渣用流动相100 μL复溶，涡旋混匀5 min，离心5 min，取上清液20 μL按“2.1.5”项下方法测定血浆样品中BBR的质量浓度。采

用DAS 2.0软件，绘制药时曲线，计算药动学参数[包括药时曲线下面积（AUC）、平均驻留时间（MRT）、消除半衰期（$t_{1/2}$）、达峰时间（t_{max}）、峰浓度（c_{max}）、相对生物利用度（F_r）]。结果（图8和表8）显示，BBR原料药的吸收较差，BBR/PIP-SMEDDS组大鼠体内BBR的c_{max}和AUC_{0-t}分别是BBR原料药组的4.61、7.07倍，且可在24 h内被持续检出；F_r为707.484%，表明BBR/PIP-SMEDDS有效改善了BBR口服生物利用度低的问题。

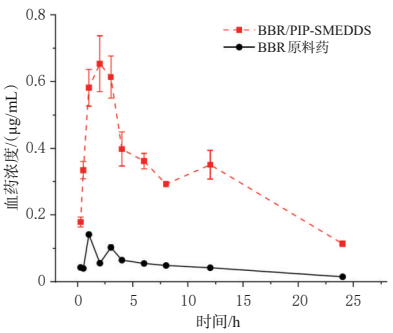


图8　BBR原料药及BBR/PIP-SMEDDS在大鼠体内的药时曲线（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

表8　BBR原料药及BBR/PIP-SMEDDS在大鼠体内的药动学参数

参数	BBR原料药组	BBR/PIP-SMEDDS组
AUC_{0-t}/(μg·h/mL)	1.069	7.563
$AUC_{0-\infty}$/(μg·h/mL)	1.278	9.389
MRT_{0-t}/h	8.347	8.916
$MRT_{0-\infty}$/h	13.186	14.956
$t_{1/2}$/h	9.634	11.117
t_{max}/h	1.000	2.000
c_{max}/(μg/mL)	0.142	0.654

3　讨论

根据生物药剂学分类系统，BBR属于Ⅳ类药物，存在溶解度差、生物利用度低等问题，大大限制了BBR的临床应用和治疗效果。SMEDDS常用来包裹难溶性或水不溶性药物以改善药物溶解度低的问题。研究指出，BBR生物利用度受P-gp和UGT的影响，PIP作为P-gp和UGT的抑制剂，可显著提高难溶性药物的生物利用度[8]。本课题组通过预实验证实，当BBR与PIP混合后，两者的理化性质互不影响，且现有研究亦未发现其存在生物相容性不佳的问题[8]。基于此，本研究选择PIP作为BBR的生物利用度增强剂，将BBR和PIP共同包载于SMEDDS中，以期改善BBR的口服生物利用度。

本研究采用外翻肠囊法确定BBR和PIP的载药质量比，结果显示，与BBR原料药相比，添加PIP后BBR在不同肠段的Q值均有所增加，表明PIP具有促进BBR肠吸收的作用。当BBR与PIP载药质量比分别为1∶2、2∶1时，BBR在各肠段中的Q值均低于两者载药质量比为1∶1时的Q值。笔者分析原因可能是当PIP浓度过低时，对BBR的抑制外排作用没有达到峰值，从而造成其吸收量不及1∶1；当PIP浓度过高时，可能会对BBR的吸收产生竞争抑制作用，从而会造成BBR的吸收量低的问题。基于此，本研究将BBR和PIP的载药质量比确定为1∶1。

本研究通过单因素实验确定空白SMEDDS的辅料组成，再通过星点设计-效应面法确定其最优处方为油酸乙酯（油相）占18.54%、吐温-80（乳化剂）占52.16%、PEG-400（助乳化剂）占29.30%。按上述处方，采用磁力搅拌法将过量BBR、PIP原料药加至空白SMEDDS中，即得BBR/PIP-SMEDDS。笔者在工艺优化的单因素实验过程中发现，BBR在部分油相和乳化剂中的溶解度较高，但两者配伍的效果并不好，这可能与油相分子量过大，并不能很好地与乳化剂相容有关。

理化性质评价结果显示，本研究所制BBR/PIP-SMEDDS为水包油型微乳，为金黄色油状液体，粒子呈圆球状且分散、无粘连，平均粒径为（32.90±0.38）nm，多分散性指数为（18.76±0.55）%，Zeta电位为（−19.17±0.70）mV（$n=3$），在离心、稀释条件下均具有较好的物理稳定性。这可能是粒子间排斥力相互作用的结果，还有可能与使用了空间稳定型非离子表面活性剂吐温-80（该类表面活性剂在粒子剪切面上的运动有助于降低其表面电荷）有关[15−16]。由于BBR和PIP均需要避光保存，因此不同放置条件的稳定性考察都是在避光条件下进行的，结果显示，低温（4 ℃）避光条件下的放置稳定性优于室温避光条件，这可能是因为BBR/PIP-SMEDDS在低温条件下更不容易发生改变。

BBR的体内吸收主要发生在小肠[17−18]，故本研究将pH7.4的磷酸盐缓冲液作为释放介质以模拟肠液环境。体外释放实验结果显示，与BBR原料药相比，BBR/PIP-SMEDDS在24 h时的累积释放百分率更高，原因是将BBR原料药制成SMEDDS后，其溶解度得到了改善。药动学实验结果显示，BBR原料药和BBR/PIP-SMEDDS在大鼠体内的药时曲线均为双峰，这可能与药物的分布、重吸收和肝肠循环有关；此外，还可能与SMEDDS的体内释药行为有关，即制剂进入体内后，水相中的BBR先被机体吸收，随后油相中的BBR再缓慢进入血液，从而形成双峰。BBR/PIP-SMEDDS的c_{max}、AUC_{0-t}、$AUC_{0-\infty}$均高于BBR原料药，F_r为707.484%，证明BBR/PIP-SMEDDS能显著提高BBR的生物利用度；同时，BBR/PIP-SMEDDS的MRT、$t_{1/2}$均较BBR原料药有一定提高或延长，与体外释放实验结果呼应。

综上所述，本研究成功制得BBR/PIP-SMEDDS；所得制剂粒径均一，在低温（4 ℃）避光、离心及稀释条件下稳定性较好，体外释放和生物利用度均较BBR原料药有较大提升。在后续实验中，本课题组将对BBR/PIP-SMEDDS的转运机制、体内组织分布及药效学等开展深入研究，为BBR制剂的研发提供新的思路。

参考文献

[1] ILYAS Z, PERNA S, AL-THAWADI S, et al. The effect of berberine on weight loss in order to prevent obesity: a systematic review[J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 127: 110137.

[2] GUO J, CHEN H D, ZHANG X Q, et al. The effect of berberine on metabolic profiles in type 2 diabetic patients: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 2074610.

[3] SHAH D, CHALLAGUNDLA N, DAVE V, et al. Berberine mediates tumor cell death by skewing tumor-associated immunosuppressive macrophages to inflammatory macrophages[J]. Phytomedicine, 2022, 99: 153904.

[4] 周剑雄，吴送姑，龚俊波，等. 小檗碱的药理活性以及提升其口服生物利用度的策略[J]. 药学学报，2022，57(5)：1263-1272.
ZHOU J X, WU S G, GONG J B, et al. Pharmacological activities of berberine and strategies to improve its oral bioavailability[J]. Acta Pharm Sin, 2022, 57(5): 1263-1272.

[5] LI Y P, CHEN Z, CAI Y H. Piperine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by activating the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(4): 374.

[6] REHMAN M U, RASHID S, ARAFAH A, et al. Piperine regulates Nrf-2/Keap-1 signaling and exhibits anticancer effect in experimental colon carcinogenesis in Wistar rats [J]. Biology, 2020, 9(9): 302.

[7] SALMAN M, TABASSUM H, PARVEZ S. Piperine mitigates behavioral impairments and provides neuroprotection against 3-nitropropinoic acid-induced Huntington disease-like symptoms[J]. Nutr Neurosci, 2022, 25(1): 100-109.

[8] 林凤琼，王婧，唐景玲，等. 胡椒碱联合用药进展研究[J]. 中国医院药学杂志，2023，43(24)：2833-2836.
LIN F Q, WANG J, TANG J L, et al. Research on the progress of piperine combination[J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(24): 2833-2836.

[9] 马巧芳，曾佳，沙康，等. 口服自微乳给药系统的研究进展[J]. 药学进展，2020，44(6)：466-475.
MA Q F, ZENG J, SHA K, et al. Research progress of oral self-microemulsifying drug delivery system[J]. Prog Pharm Sci, 2020, 44(6): 466-475.

[10] 韩华，梁绿圆，季珂，等. 共载姜黄素/小檗碱自微乳给药系统的制备及评价[J]. 中国药房，2022，33(20)：2487-2492.
HAN H, LIANG L Y, JI K, et al. Preparation and evaluation of curcumin/berberine co-loaded self-microemulsion drug delivery system[J]. China Pharm, 2022, 33(20): 2487-2492.

[11] MAHATTANADUL S, KONGPUCKDEE S, WIWATTANAPATAPEE R, et al. Comparative inhibitory efficacy on the iNOS/NO system of curcumin and tetrahydrocurcumin-self-microemulsifying liquid formulation in chronic gastric ulcer model[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2021, 22(7): 1005-1012.

[12] 韩英杰，杨继威，李凌娜，等. 迷迭香酸自微乳的制备及口服生物利用度[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版)，2023，36(2)：164-170.
HAN Y J, YANG J W, LI L N, et al. Preparation and oral bioavailability of rosmarinic acid self microemulsion[J]. J Yantai Univ Nat Sci Eng Ed, 2023, 36(2): 164-170.

[13] 赵惠茹，史洋，陈红，等. 芦丁自微乳处方的优化[J]. 中成药，2019，41(1)：23-26.
ZHAO H R, SHI Y, CHEN H, et al. Formulation optimization for rutin self-microemulsions[J]. Chin Tradit Pat Med, 2019, 41(1): 23-26.

[14] 陈宝怡. 氧化小檗碱对急性肺损伤小鼠保护作用的研究[D]. 广州：广州中医药大学，2021.
CHEN B Y. Protective effect of berberine oxide on mice with acute lung injury[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2021.

[15] 侯雨，朱琳，张奇镔，等. 大黄-黄芪组分自微乳的制备及在体肠吸收特性研究[J]. 中草药，2023，54(12)：3815-3823.
HOU Y, ZHU L, ZHANG Q B, et al. Preparation and *in-situ* intestinal absorption study of Rhei Radix et Rhizoma-Astragali Radix components loaded self-microemulsion [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(12): 3815-3823.

[16] 张璐茜，朱睿，孙懿，等. 基于TPGS的紫杉醇自微乳的制备及其评价[J]. 中国医院药学杂志，2023，43(9)：977-982.
ZHANG L X, ZHU R, SUN Y, et al. Preparation and evaluation of TPGS-based self-microemulsifying drug delivery system of paclitaxel[J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(9): 977-982.

[17] 戴玮莉，金婴，王婷，等. 盐酸小檗碱纳米乳口服给药系统的制备及体外评价[J]. 药学实践杂志，2022，40(1)：28-33，43.
DAI W L, JIN Y, WANG T, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of berberine hydrochloride nanoemulsion oral drug delivery systems[J]. J Pharm Pract, 2022, 40(1): 28-33, 43.

[18] 张青青，陈青青，任蓉蓉，等. 基于尤斯室技术研究黄连水煎液中微粒体系对小檗碱肠黏膜透过特性的影响及相关机制[J]. 中国药学杂志，2021，56(3)：189-194.
ZHANG Q Q, CHEN Q Q, REN R R, et al. Effect and mechanism of particle aggregates in *Coptis chinensis* decoction on the intestinal mucosal permeability of berberine based on Ussing chamber technique[J]. Chin Pharm J, 2021, 56(3): 189-194.

（收稿日期：2024-04-18　修回日期：2024-11-03）
（编辑：张元媛）