

葛根素纳米晶自稳定 Pickering 乳液的制备可行性研究

张 焦¹, 王 帆¹, 王计瑞¹, 易 涛^{2*}, 张继芬^{1*}

1. 西南大学药学院, 重庆 400716

2. 澳门理工学院高等卫生学校, 澳门 00853

摘 要: **目的** 考察葛根素纳米晶能否作为固体微粒稳定剂, 制备出稳定的 Pickering 乳液, 即葛根素纳米晶自稳定 Pickering 乳液 (puerarin nanocrystalline self-stabilized Pickering emulsion, Pu-NSSPE)。**方法** 采用高压匀质法制备 Pu-NSSPE。以室温静置过程中 Pu-NSSPE 的外观、乳滴粒径变化为指标, 考察药物加入顺序、油相组成、药物加入量、油水体积比、匀质压力和水相 pH 值等因素对 Pu-NSSPE 成型与稳定的影响, 优化 Pu-NSSPE 的制备工艺, 考察其稳定性, 并用荧光倒置显微镜 (FIMS) 进行微观结构表征。**结果** 制备时药物先分散于水相难以形成稳定的乳液。三相接触角和水相 pH 值是影响 Pu-NSSPE 成型与稳定的关键因素: 药物/油/水三相接触角接近 90°, 水相 pH 值呈碱性, 有利于 Pu-NSSPE 的形成与稳定。葛根素加入量在 1.0~5.0 mg/mL 时, 可形成稳定的 Pu-NSSPE; 油水体积比越大, 越容易分层析出油相; 匀质压力低于 80 MPa 时, 乳液不稳定。最终优化制得的 Pu-NSSPE 乳滴粒径为 $(13.86 \pm 1.56) \mu\text{m}$, 载药量为 4.28 mg/mL, Zeta 电位为 $(-41.60 \pm 2.45) \text{mV}$ 。室温放置 6 个月后, 外观、乳滴形态、Zeta 电位和载药量等均无显著性变化, 粒径略有增大。FIMS 可观察到葛根素在油水界面吸附聚集。**结论** 葛根素纳米晶自身能稳定形成 Pickering 乳液, 所制得的 Pickering 乳液稳定性好, 有望成为葛根素口服剂型。

关键词: Pickering 乳液; 葛根素; 纳米晶; 自稳定; 制备; 可行性; 稳定剂; 高压匀质法; 三相接触角

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)01-0075-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.011

Study on feasibility of puerarin nanocrystalline self-stabilized Pickering emulsion

ZHANG Jiao¹, WANG Fan¹, WANG Ji-rui¹, YI Tao², ZHANG Ji-fen¹

1. College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China

2. School of Health Sciences, Macao Polytechnic Institute, Macau 00853, China

Abstract: **Objective** To investigate the feasibility of Pickering emulsion stabilized by puerarin nanocrystalline. **Methods** The new puerarin nanocrystalline self-stabilized Pickering emulsion (Pu-NSSPE) has been developed using the high pressure homogenization method. The influences of drug addition sequence, property, and construction of oil phase, drug concentration, oil/water ratio, homogenization pressure, and pH value of water phase on the formation and stability of Pu-NSSPE were investigated to optimize the preparation technology of Pu-NSSPE. **Results** The stability and structure of optimized Pu-NSSPE were studied. It was difficult to form stable Pu-NSSPE if puerarin was first added into water during preparation. The three-phase contact angle and pH value of water phase were key factors for the formation and stability of Pu-NSSPE. Pickering emulsion could be stabilized by puerarin nanocrystalline only when three-phase contact angle of puerarin approaches 90° and water phase was alkaline. When the drug concentration was between 1.0—5.0 mg/mL, stable Pu-NSSPE could be formed. The higher oil/water ratio was, the more oil creamed from Pu-NSSPE was. Low homogenization pressure (below 80 MPa) could not form stable Pu-NSSPE. The size of emulsion droplet of optimized Pu-NSSPE was $(10.66 \pm 4.81) \mu\text{m}$, and drug content was 4.28 mg/mL. The appearance, morphology, and size of emulsion droplets, Zeta potential and drug content were not changed significantly after storage for six months at room temperature. The adsorption of puerarin at the surface of oil droplets was observed by fluorescence microscope. **Conclusion** Nanocrystalline of puerarin could

收稿日期: 2016-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603304); 西南大学基本科研业务费专项资金项目 (XDJK2016E131); 澳门理工学院资助研究项目 (RP/ESS-06/2014); 澳门科学技术发展基金 (001/2016/A1)

作者简介: 张 焦 (1989—), 女, 羌族, 在读硕士, 研究方向为中药药剂。Tel: 18375622673 E-mail: 18375622673@163.com

*通信作者 易 涛, 博士, 主要从事新型纳米新制剂研发。Tel: (00853)85993471 E-mail: yiaaron@outlook.com

张继芬, 副教授, 博士, 主要从事中药新制剂与新型给药系统的研发。Tel: (023)68251225 E-mail: zhjf@swu.edu.cn

stabilize Pickering emulsions, which will provide a promising drug delivery system for puerarin.

Key words: Pickering emulsion; puerarin; nanocrystalline; self-stabilized; preparation; feasibility; stabilizer; high pressure homogenization; three-phase contact angle

Pickering 乳液是一种通过固体微粒吸附于油水界面形成膜状结构而起稳定作用的乳液。与传统乳液相比, Pickering 乳液不需要使用表面活性剂, 安全性更高, 且热力学稳定性更好^[1], 是一种潜在的优良给药系统, 已在皮肤局部给药^[2-3]、口服给药^[4]中有所研究应用。但目前用作给药系统的 Pickering 乳液大多使用二氧化硅纳米粒作为固体微粒稳定剂, 这可能带来药用安全性问题^[5-6]。另外, 目前 Pickering 乳液主要是将水难溶性药物溶解于油相中, 油相的溶解能力直接限制了乳液的载药能力。

针对以上问题, 课题组前期研究采用难溶性药物自身的纳米晶作为固体微粒稳定剂制备 Pickering 乳液即纳米晶自稳定 Pickering 乳液(nanocrystalline self-stabilized Pickering emulsion, NSSPE)。以水飞蓟宾为模型药物, 制备了平均粒径为 $(27.30 \pm 3.10) \mu\text{m}$, 可稳定 40 d 以上的 NSSPE^[7]。大鼠 ig 给药后, NSSPE 的峰浓度较纳米晶混悬液和原料药分别提高了 2.5 倍和 2.3 倍, AUC 分别提高了 1.4 倍和 3.8 倍^[7]。

葛根素(puerarin, Pu)是从豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 中提取的一种水难溶性黄酮类化合物, 已被广泛用于心脑血管疾病的治疗^[8]。但葛根素溶解性和渗透性差, 口服生物利用度低^[9]。临床主要应用的是其注射剂, 但注射液使用了大量的丙二醇, 增加了溶血风险^[10-11]。有研究采用新型给药系统, 诸如自微乳化给药系统^[12-13]、脂质体^[14]、固体脂质纳米粒冻干粉^[15]、泡腾性渗透泵控释片^[16]以及聚乙二醇衍生化^[17]等方法提高葛根素的口服生物利用度, 但制备方法复杂, 需使用大量表面活性剂, 具有潜在的安全性问题^[18]。

本研究以葛根素为模型药物, 研究制备葛根素纳米晶自稳定 Pickering 乳液(puerarin NSSPE, Pu-NSSPE)。在预试验基础上, 主要研究药物加入顺序、油相组成、药物加入量、油水体积比、匀质压力和水相 pH 值等对 NSSPE 成型与稳定的影响, 探寻制备的关键影响因素, 为后期体内性质研究提供优化制剂。

1 仪器与材料

FA2004A 电子天平, 上海精天电子仪器有限公司; FA25 高速剪切机, 上海弗鲁克流体机械制造公

司; AH100D 高压均质机, 加拿大 ATS 工业系统有限公司; BK5000 光学生物显微镜, 集成 Cool SNAP Photometrics 光学采集系统, OPTTEC 奥特光学公司; 佳能 IXUS1100HS 数码相机, 佳能中国有限公司; TDP-6 压片机, 长沙中亚制药设备有限公司; DFC310 FX Leica 荧光倒置显微镜 (Fluorescence Inversion Microscope System, FIMS), 德国 Leica 公司; Zetasizer Nano ZS 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国马尔文仪器公司; LC-20AD 高效液相色谱系统, 岛津公司; G16-WS 高速离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; BT-9100 粒度分析仪, 丹东百特仪器有限公司; SB-5200D 超声波清洗机、JY98-3D 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

葛根素原料药, 质量分数 98%, 批号 140602, 四川玉鑫药业有限公司; 单油酸甘油酯(PECEOL), 法国嘉法狮公司; 辛酸/癸酸甘油三酯(Captex 355)、辛酸/癸酸甘油一酯二酯(Capmul MCM), 美国阿比泰克公司; 油酸聚乙二醇甘油酯(Labrafil M 1944 CS)、肉豆蔻酸异丙酯、油酸乙酯, 阿拉丁生化科技有限公司; 川芎油、大豆油、蓖麻油、茶油、橄榄油, 江西雪松天然药用油有限公司; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 Pu-NSSPE 的成型和初步稳定性评价

2.1.1 外观考察 将制得的样品装于玻璃瓶中, 室温静置, 观察分层、絮凝、沉淀等现象, 用数码相机拍摄外观照片, 测定乳液层的高度, 按公式计算分层指数: 分层指数 = $1 - H_t/H_0$ (H_t 、 H_0 分别为 t 、0 时刻乳液层的高度)^[19]。

2.1.2 乳滴形态观察与粒径测定 取乳液 1 滴, 均匀涂于载玻片上, 光学显微镜观察乳滴形态, 集成 Cool SNAP Photometrics 光学采集系统拍摄照片, 并用 USB2.0 Gamer 软件计数 200 个乳滴的粒径, 按下式计算平均体积径 (d_{43})^[20-21], 以 d_{43} 表达乳滴粒径。每份样品重复 3 次。

$$d_{43} = \sum d_i^4 / \sum d_i^3, i=1, 2, 3, \dots, 200$$

2.2 药物加入顺序的影响

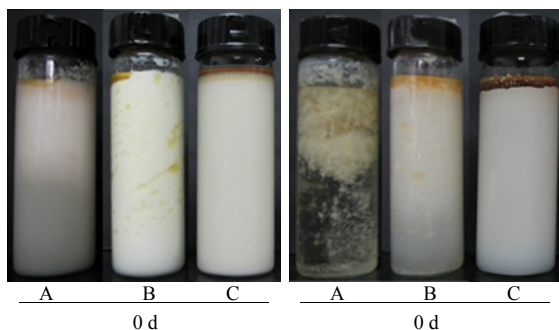
2.2.1 制备方法 分别按以下 3 种方法制备 Pu-NSSPE, 在 0 d 和 30 d 时对乳液进行评价。

(1) 水相一步法: 称取 350 mg 葛根素, 先加入 63 mL 水, 再加入 7 mL 油(川芎油), 19 000 r/min 高剪切 2 min, 混合均匀, 最后 100 MPa 高压乳匀 3 min, 即得。

(2) 水相两步法: 称取 350 mg 葛根素, 先加入 63 mL 水, 探头超声(800 W, 工作 5 s, 间歇 5 s, 共 3 min) 制得葛根素纳米晶混悬液; 再加入 7 mL 油(川芎油), 19 000 r/min 高剪切 2 min, 混合均匀, 最后 100 MPa 高压乳匀 3 min, 即得。

(3) 油相一步法: 称取 350 mg 葛根素, 先加入 7 mL 油(川芎油), 水浴超声(300 W, 室温) 5 min 分散均匀, 再加入 63 mL 水, 19 000 r/min 高剪切 2 min, 混合均匀, 最后 100 MPa 高压乳匀 3 min, 即得。

2.2.2 药物加入顺序对 Pu-NSSPE 成型和初步稳定性的影响 依不同药物加入顺序制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 前后的外观变化见图 1。由图 1 可知, 放置 30 d 后, 水相一步法制备的 Pu-NSSPE 样品中葛根素吸附于油相, 絮凝成团, 水油分层明显; 水相两步法制备的 Pu-NSSPE 样品分层现象较水相一步法弱, 分层指数为 20.0%, 乳滴粒径无显著性变化, 分别为 $(48.53 \pm 15.71) \mu\text{m}$ 和 $(54.38 \pm 3.01) \mu\text{m}$; 油相一步法制备的样品外观无明显改变, 分层指数为 6.0%, 乳滴粒径从 $(12.72 \pm 1.94) \mu\text{m}$ 增至 $(40.30 \pm 1.94) \mu\text{m}$ ($P < 0.01$)。可见, 药物先分散于水相难以形成稳定的乳液, 油相一步法更有利于 Pu-NSSPE 的成型和稳定, 其乳滴粒径也显著小于水相两步法 ($P < 0.01$)。



A-水相一步法 B-水相两步法 C-油相一步法
A-one-step method in water phase B-two-step method in water phase C-one-step method in oil phase

图 1 依不同药物加入顺序制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 前后的外观

Fig. 1 Appearance of Pu-NSSPE prepared by different methods after a storage of 30 d at room temperature

2.3 油相的影响

2.3.1 测定葛根素/油/水的三相接触角 取葛根素粉末, 在压片机上压为直径 1.3 cm、厚度约 1 mm 的薄片, 将薄片置于 25 mL 透明小烧杯中, 注入油相, 液面高度以浸没压片 2 cm 左右为宜, 再用注射器向薄片表面滴 1 滴水, 待液滴穿过石蜡液层并在压制薄片上稳定后用数码相机拍照, 测定液滴的接触角^[22], 即为葛根素/油/水的三相接触角。

2.3.2 制备不同油相的 Pu-NSSPE 分别称取 350 mg 的葛根素原料药, 加入 7 mL 不同油相, 依前述“油相一步法”制得不同油相的 Pu-NSSPE, 室温静置, 分别在 0 d 和 30 d 时对其进行成型和初步稳定性评价。

2.3.3 川芎油与 Labrafil M 1944 CS 混合油相配比的影响 分别称取 350 mg 的葛根素原料药, 加入 7 mL 不同配比的混合油相(川芎油-Labrafil M 1944 CS 配比分别为 1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1), 依前述油相一步法制得 Pu-NSSPE, 室温静置, 分别在 0 d 和 90 d 时对其进行成型和初步稳定性评价。

2.3.4 油相种类对 Pu-NSSPE 成型和初步稳定性的影响 葛根素在各油相中的接触角测定结果见表 1。不同油相制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 前后的外观变化见图 2。可见, 以 Captex 355 (图 2-B) 为油相, 不能制得均匀的乳液; 以 Capmul MCM (图 2-C)、Peceol (图 2-D)、油酸乙酯 (图 2-E) 和肉豆蔻酸异丙酯 (图 2-F) 为油相制备的乳液, 30 d 后已出现明显分层, 一层为葛根素的白色絮状物,

表 1 葛根素在各油相中的接触角 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Contact angles of puerarin in different oils ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

油	接触角/(°)
Labrafil M 1944 CS	14.80 ± 1.31
Captex 355	0.00
Peceol	115.56 ± 6.21
Capmul MCM	Capmul MCM 密度大于水, 水滴不下沉
油酸乙酯	32.33 ± 1.25
肉豆蔻酸异丙酯	20.66 ± 0.47
川芎油	82.14 ± 3.97
橄榄油	56.50 ± 4.03
茶油	49.28 ± 4.36
大豆油	24.75 ± 3.56
蓖麻油	37.50 ± 4.58

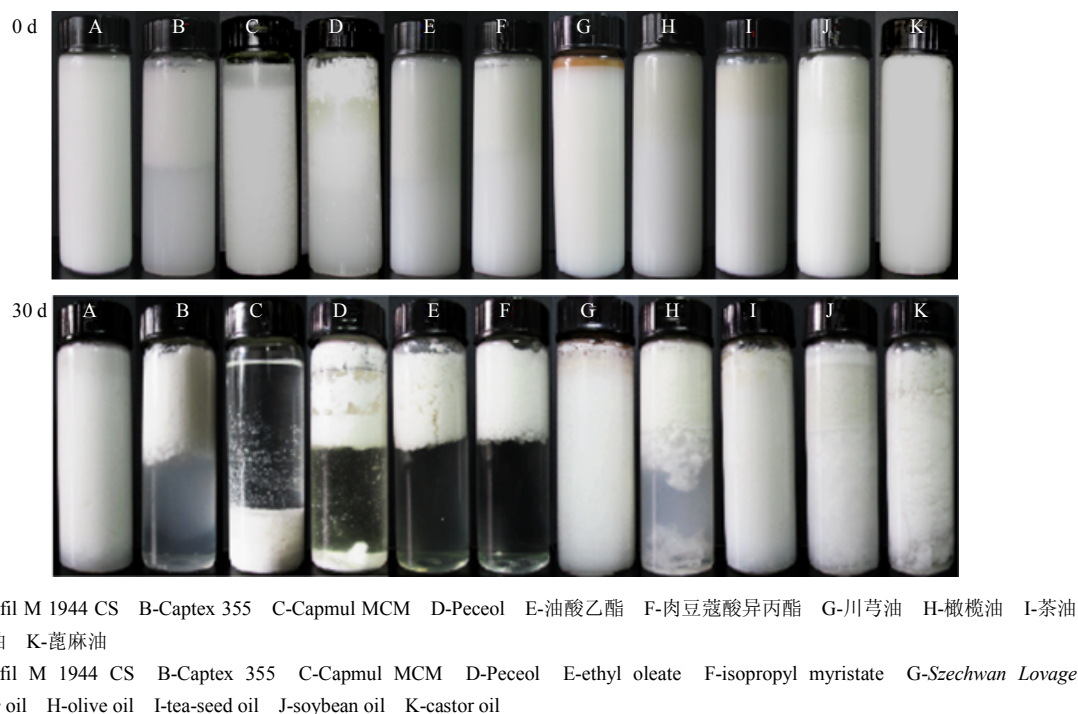


图 2 不同油相制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 前后的外观

Fig. 2 Appearance of Pu-NSSPE prepared with different oils after a storage of 30 d at room temperature

另一层为澄清的水层；橄榄油（图 2-H）、茶油（图 2-I）、大豆油（图 2-J）和蓖麻油（图 2-K）制备的样品 30 d 后虽然没有澄清的水层出现，但都有明显的葛根素絮状聚集物；只有 Labrafil M 1944 CS（图 2-A）和川芎油（图 2-G）制备的样品 30 d 后仍保持了较好的乳液性状，分层指数均为 6.0%；但川芎油制备的样品粒径增大明显，从 $(13.85 \pm 8.32) \mu\text{m}$ 增至 $(53.73 \pm 3.27) \mu\text{m}$ ($P < 0.01$)，Labrafil M 1944 CS 制备的样品粒径变化不大，放置前后的粒径分别为 $(16.85 \pm 1.20) \mu\text{m}$ 和 $(21.73 \pm 6.00) \mu\text{m}$ 。故后续考虑将其配伍使用。

2.3.5 川芎油与 Labrafil M 1944 CS 不同体积比配伍对 Pu-NSSPE 成型和初步稳定性的影响 采用不同体积比的川芎油与 Labrafil M 1944 CS 混合油相制备的 Pu-NSSPE 室温放置 90 d 前后的外观变化见图 3。可见，随着川芎油配比增多，制得的 Pu-NSSPE 中油相析出愈加明显；放置 90 d 后，川芎油-Labrafil M 1944 CS 配比为 8:2、7:3 和 6:4 的样品均出现明显的葛根素絮状聚集物，混合油相配比为 5:5 的样品明显分层，上层呈半流体的牛奶状，下层变清亮；混合油相配比为 4:6、3:7 和 2:8 的样品底部出现大量葛根素沉淀物；仅混合油相配比为 9:1 和 1:9 的 Pu-NSSPE 外观变化较小，分层指

数分别为 11.0% 和 20.0%，乳滴形态也都较好，但 9:1 样品的粒径为 $(10.45 \pm 1.35) \mu\text{m}$ ，显著小于 1:9 样品的 $(32.01 \pm 1.66) \mu\text{m}$ ($P < 0.01$)；放置 90 d 后，乳滴粒径均有所增大，但 9:1 样品的粒径仍小于 1:9 样品的粒径，分别为 $(32.46 \pm 4.59) \mu\text{m}$ 和 $(50.91 \pm 1.56) \mu\text{m}$ ($P < 0.05$)。

2.4 药物加入量的影响

2.4.1 制备不同葛根素载药量的 Pu-NSSPE 分别称取 70、140、210、280、350、525 mg 葛根素（乳液中葛根素的理论载药量分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、7.5 mg/mL），加入 7 mL 油相（川芎油-Labrafil M 1944 CS 体积比为 9:1），依前述油相一步法制得 Pu-NSSPE，室温静置，分别在 0 d 和 30 d 时对其进行成型和初步稳定性评价。

2.4.2 药物加入量对 Pu-NSSPE 成型和初步稳定性的影响 不同药物加入量制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 前后的外观变化见图 4，分层指数和乳滴粒径变化见表 2。由图 4 和表 2 可知，葛根素加入量在 1.0~5.0 mg/mL 范围内制备的 Pu-NSSPE，放置 30 d 后仍保持了较好的乳液外观，分层指数均在 11.0%~18.0%，0 d 时的乳滴粒径在 10~20 μm ，30 d 后仅药物加入量 4.0、5.0 mg/mL 制备的 Pu-NSSPE 粒径显著增大。葛根素加入量为 7.5 mg/mL 的

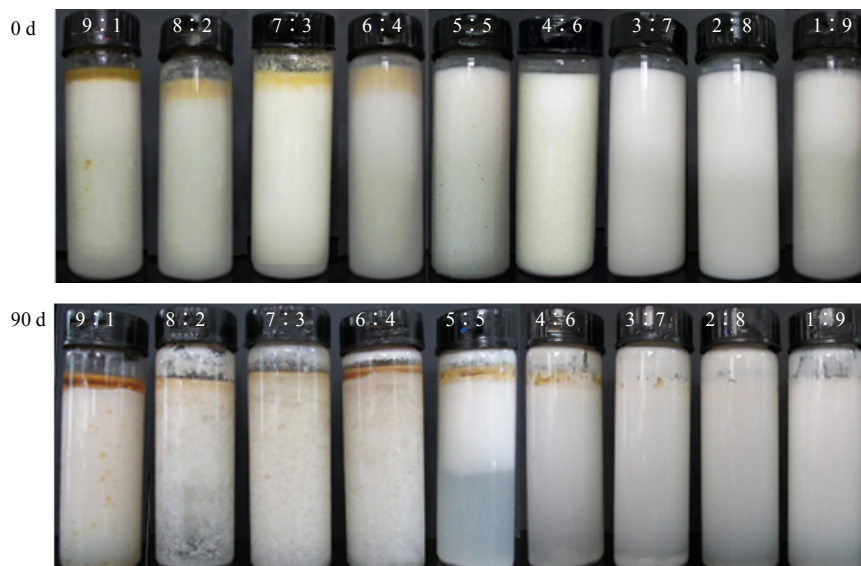


图 3 川芎油与 Labrafil M 1944 CS 不同配比制备的 Pu-NSSPE 室温放置 90 d 前后的外观

Fig. 3 Appearance of Pu-NSSPE prepared at different ratios of Szechwan Lovage Rhizome oil to Labrafil M 1944 CS after a storage of 90 d at room temperature

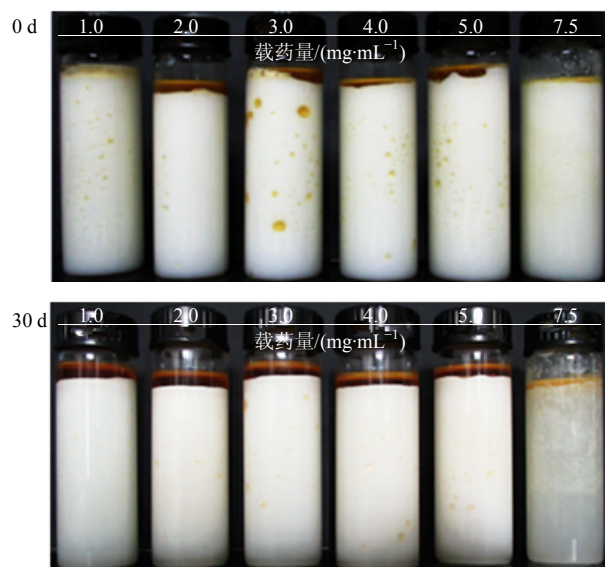


图 4 不同葛根素加入量制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 前后的外观

Fig. 4 Appearance of Pu-NSSPE prepared at different puerarin amounts after a storage of 30 d at room temperature

Pu-NSSPE 放置 30 d 后发生了明显的絮凝。

2.5 油水体积比的影响

2.5.1 制备不同油水体积比的 Pu-NSSPE 分别称取 350 mg 葛根素，分别加入 3.25、7、14、21 mL 油相（川芎油-Labrafil M 1944 CS 体积比为 9:1），水浴超声分散（300 W，室温）5 min，再加入不同体积的纯水使油水体积比分别为 5:95、10:90、20:80、30:70，依前述油相一步法制得 Pu-

表 2 不同药物加入量制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 后的分层指数和乳滴粒径

Table 2 Cream index and droplet size of Pu-NSSPE prepared at puerarin amounts after a storage of 30 d at room temperature

药物加入量/ (mg·mL ⁻¹)	静置 30 d 的 分层指数/%	$d_{43}/\mu\text{m}$	
		0 d	30 d
1.0	13.0	31.83±3.90	33.57±5.27
2.0	13.0	26.21±4.31	30.60±4.55
3.0	18.0	28.03±2.44	28.28±4.13
4.0	11.0	19.31±7.54	38.62±2.25*
5.0	14.0	27.85±1.23	36.50±0.78*
7.5	100.0	34.91±4.78	—

“—”表示样品不成乳液状，未计数粒径；与 0 d 相比：* $P<0.05$

“—” droplet size was not calculated because the sample was not an emulsion; * $P<0.05$ vs 0 d

NSSPE，室温静置，分别在 0 d 和 30 d 时对其进行成型和初步稳定性评价。

2.5.2 油水体积比对 Pu-NSSPE 成型和初步稳定性的影响 不同油水体积比制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 前后的外观变化见图 5，分层指数和乳滴粒径变化见表 3。随着油相体积的增加，乳液析出的油相增多，分层指数增大，乳液稳定性降低。油水体积比为 20:80 和 30:70 时，放置 30 d 后的乳液底部出现清亮的水层，乳滴粒径为 0 d 时的 1.74 和 1.09 倍；油水体积比为 5:95 和 10:90 时的乳滴粒径在 0 d 时显著高于 20:80 和 30:70 ($P<0.01$)；

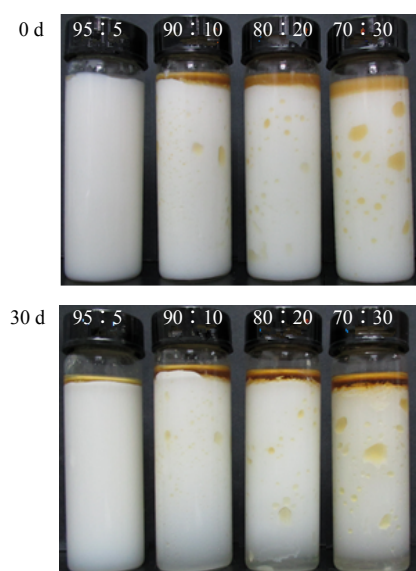


图 5 不同油水体积比制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 后的外观

Fig. 5 Appearance of Pu-NSSPE prepared at different oil/water ratios after storage of 30 d at room temperature

表 3 不同油水体积比制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 后的分层指数和乳滴粒径

Table 3 Cream index and droplet size of Pu-NSSPE prepared at different oil/water ratios after a storage of 30 d at room temperature

油水体积比	静置 30 d 的分层指数/%	$d_{43}/\mu\text{m}$	
		0 d	30 d
5 : 95	8.0	20.19 ± 7.70	46.01 ± 14.59
10 : 90	14.0	20.91 ± 4.27	30.00 ± 12.05
20 : 80	17.0	15.83 ± 5.30	$27.58 \pm 3.76^*$
30 : 70	20.0	15.61 ± 3.76	17.00 ± 1.81

与 0 d 相比: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs 0 d

30 d 后变化不大 ($P > 0.1$)。

2.6 匀质压力的影响

2.6.1 不同匀质压力制备 Pu-NSSPE 分别称取 350 mg 葛根素, 加入 7 mL 油相 (川芎油-Labrafil M 1944 CS 体积比为 9 : 1), 水浴超声分散, 加入 63 mL 纯水, 19 000 r/min 高剪切 2 min 混合均匀, 分别以 60、80、100 MPa 高压乳匀 3 min 制得 Pu-NSSPE, 室温静置, 分别在 0 d 和 30 d 时对其进行成型和初步稳定性评价。

2.6.2 匀质压力对 Pu-NSSPE 成型和初步稳定性的影响 图 6 显示, 60 MPa 压力下高压乳匀制备的 Pu-NSSPE 放置 30 d 后油水分层明显, 不成乳状。

匀质压力达到 80 MPa 和 100 MPa 时, 30 d 后 Pu-NSSPE 的分层指数分别为 10.0% 和 7.0%, 0 d 时的乳滴粒径分别为 $(12.09 \pm 0.070) \mu\text{m}$ 和 $(8.43 \pm 1.22) \mu\text{m}$, 30 d 时分别为 $(27.39 \pm 2.49) \mu\text{m}$ ($P < 0.01$) 和 $(10.83 \pm 3.70) \mu\text{m}$ 。可见, 乳匀压力增大, 粒径变化减弱。

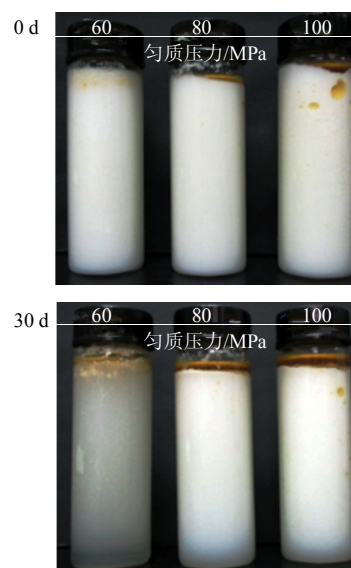


图 6 不同匀质压力制备的 Pu-NSSPE 的室温放置 30 d 后的外观

Fig. 6 Appearance of Pu-NSSPE prepared at different homogenization pressure after storage of 30 d at room temperature

2.7 水相 pH 值的影响

2.7.1 不同 pH 值水相制备 Pu-NSSPE 分别称取 350 mg 葛根素, 加入 7 mL 油相 (川芎油-Labrafil M 1944 CS 体积比为 9 : 1), 水浴超声分散 (300 W, 室温) 5 min, 分别加入用 0.1 mol/L 盐酸或 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 3、5、7、9 的 63 mL 水, 依前述油相一步法制得 Pu-NSSPE, 室温静置, 分别在 0 d 和 30 d 时对其进行成型和初步稳定性评价。

2.7.2 水相 pH 值对 Pu-NSSPE 成型和初步稳定性的影响 图 7 显示, 水相 pH 值对 Pu-NSSPE 的形成与稳定有很大的影响。放置 30 d 后, pH 值为 3 的样品完全分层, 已不成乳液状; pH 值为 5 的样品部分分层; pH 值为 7 的样品分层指数为 14.0%, 乳滴粒径从 $(12.91 \pm 1.49) \mu\text{m}$ 增大至 $(18.76 \pm 1.37) \mu\text{m}$ ($P < 0.01$); 仅水相 pH 值为 9 制备的 Pu-NSSPE 放置 30 d 后未出现絮凝、分层等现象, 乳滴粒径也未明显变大, 分别为 $(11.47 \pm 6.88) \mu\text{m}$ 和 $(12.68 \pm 4.32) \mu\text{m}$ 。可见, 随着水相 pH 值的增加, Pu-NSSPE

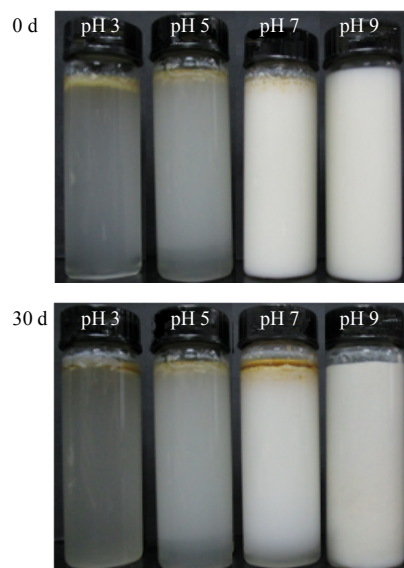


图7 不同水相 pH 值制备的 Pu-NSSPE 室温放置 30 d 前后的外观

Fig. 7 Appearance of Pu-NSSPE prepared at different pH of water after a storage of 30 d at room temperature

越容易成型, 稳定性也明显提高。

2.8 优化条件下 Pu-NSSPE 制备和体外性质表征

2.8.1 Pu-NSSPE 制备 称取 350 mg 葛根素, 加入 7 mL 油相(川芎油-Labrafil M 1944 CS 体积比为 9:1)水浴超声(300 W, 室温)5 min 分散, 加入用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 9 的 63 mL 水, 19 000 r/min 高剪切 2 min 混合均匀, 80 MPa 高压乳匀 3 min, 即得 Pu-NSSPE。

同法, 不加油相制备葛根素纳米晶混悬液(puerarin nanocrystallines suspension, Pu-NCS)作为对照。

2.8.2 初步稳定性试验 将 Pu-NSSPE 约 25 mL 置于 25 mL 玻璃瓶中, 室温静置, 分别在 0 d 及 1、2、3、4、5、6 个月观察乳液的外观, 计算分层指数; 光学显微镜观察乳滴形态, 计算 d_{43} ; 样品用纯

水稀释 10 倍后测定乳液的 Zeta 电位; 另取 1.5 mL 乳液, 4 000 r/min 离心 15 min, 观察其外观变化。

Pu-NCS 对照样品于 0 时刻时观察外观和纳米晶形态, 样品用纯水稀释 10 倍后用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定纳米晶的粒径和 Zeta 电位; 室温静置, 定时观察其外观和纳米晶形态的变化。

2.8.3 测定药物质量浓度 取 100 μ L Pu-NSSPE 于 10 mL 量瓶中, 加入 600 μ L 氯仿-甲醇(2:1)混合溶液, 振摇使药物溶解完全, 甲醇定容, 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 HPLC 法测定葛根素的质量浓度。色谱柱为 Eclipse C₁₈ 色谱柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-0.1%柠檬酸水溶液(29:71), 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 250 nm, 柱温为 30 $^{\circ}$ C。

2.8.4 荧光显微镜表征 分别将葛根素原料药粉末少许、Pu-NCS 1 滴和 Pu-NSSPE 1 滴置于载玻片上, 平铺展开, 在荧光显微镜下观察样品形态和葛根素荧光分布区域。

2.8.5 优化工艺制备的 Pu-NSSPE 的体外性质表征 优化工艺制备的 Pu-NSSPE 放置 6 个月前后的外观和乳滴形态见图 8, 分层指数、粒径、Zeta 电位和葛根素质量浓度变化见表 4。图 8 显示, 放置 6 个月后, Pu-NSSPE 外观仍呈均匀的乳液状, 没有油相析出或葛根素絮凝、聚集、沉淀等不稳定现象; 乳滴形态也未发生明显变化。表 4 显示, 放置 6 个月后乳滴形态、Zeta 电位和药物质量浓度与 0 时刻相比, 未出现明显变化, 粒径有所增大($P<0.01$)。由此证实, Pu-NSSPE 室温下至少可以稳定 6 个月, 后续观察仍在继续。4 000 r/min (7 900 $\times$ g) 离心 15 min 后乳液无分层、沉淀等不稳定现象, 进一步说明 Pu-NSSPE 的稳定性较好。

高压匀质法制备的 Pu-NCS 对照样品的纳米晶粒径为 (250.70 $\pm$ 50.60) nm, Zeta 电位为 (-38.20 $\pm$

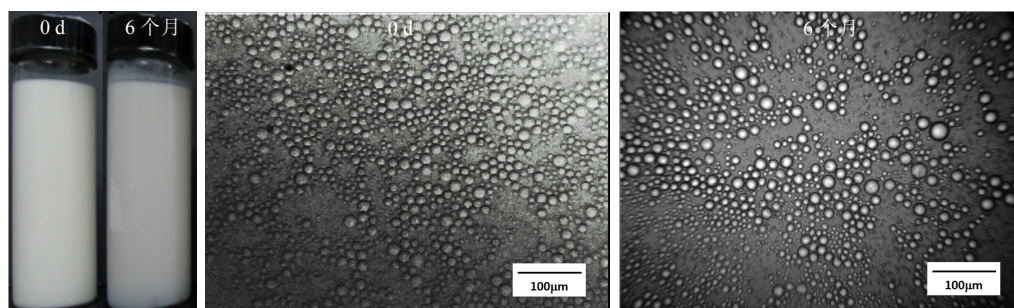


图8 Pu-NSSPE 在 0 时刻和室温静置 6 个月后的外观与乳滴形态

Fig. 8 Appearance and optical micrograph of optimized Pu-NSSPE

表 4 Pu-NSSPE 在 0 d 时刻与静置 6 个月后的性质比较

Table 4 Characteristics of optimized Pu-NSSPE before and after a storage of six months at room temperature

放置时间	分层指数/%	粒径/nm	Zeta 电位/mV	药物质量浓度/(mg·mL ⁻¹)
0 d	0.00	13.86 ± 1.56	-41.06 ± 2.45	4.28 ± 0.22
6 个月	0.00	19.35 ± 1.22*	-40.00 ± 1.86	4.14 ± 0.13

与 0 d 相比: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs 0 d

1.70) mV。0 d 时刻时为均匀的乳白色混悬液, 放置 1 h 后出现明显分层, 葛根素大量沉淀于底部, 显微镜下可看到大量细长的絮状聚集物, 明显区别于 0 d 时刻 (图 9); 荧光显微镜下观察到呈小球状 (图 10-B)。这说明, 未加任何稳定剂的 Pu-NCS 稳定性极差。图 10 为葛根素原料药、Pu-NCS 和 Pu-NSSPE 在荧光显微镜下的观察结果。可见, 葛根素本身具有绿色荧光 (图 10-A)。在荧光显微镜

下见到 Pu-NCS 中有大量粒径较小的绿色小球 (图 10-B), 即为葛根素纳米晶颗粒。

而在 Pu-NSSPE 中可见到大量粒径较大的圆形或椭圆形乳滴, 乳滴表面绿色荧光较强, 而内部较弱 (图 10-C 和 D), 这提示, 葛根素纳米晶大部分吸附在乳滴的油水界面上, 少量溶解在乳滴内部的油相中。油相中药物量很少, 与葛根素在油相中溶解度很低的结果一致。

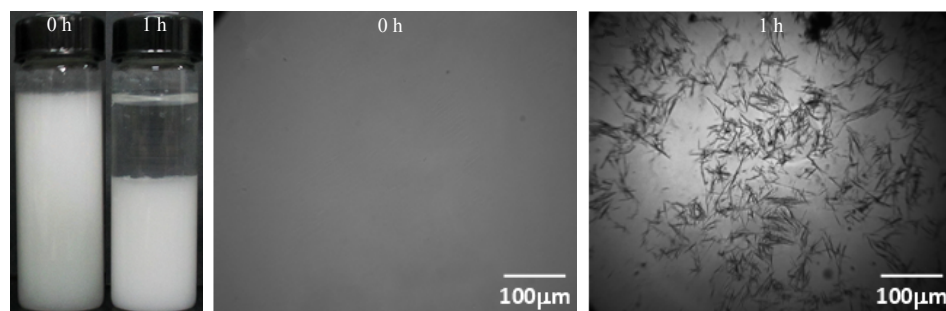
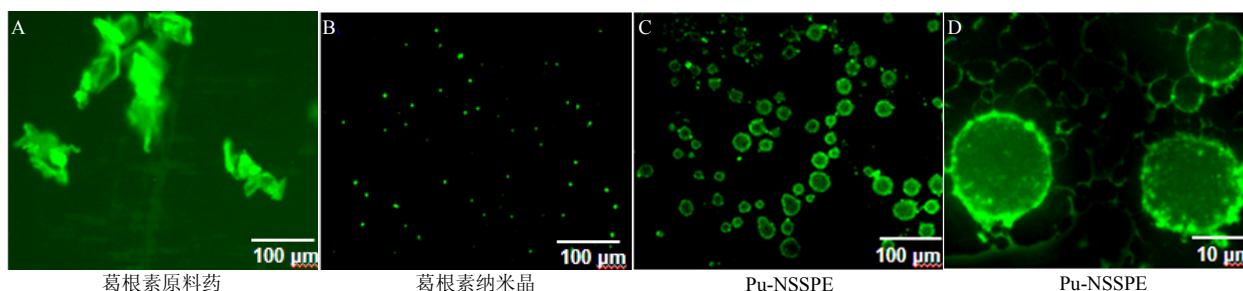


图 9 Pu-NCS 在 0 h 和室温静置 1 h 后的外观与形态

Fig. 9 Appearance and optical micrograph of Pu-NCS during storage after 0 h and 1 h at room temperature



葛根素原料药

葛根素纳米晶

Pu-NSSPE

Pu-NSSPE

图 10 葛根素原料药 (A)、纳米晶 (B) 与 Pu-NSSPE (C, D) 荧光显微镜相片

Fig. 10 Fluorescence micrograph of row puerarin (A), nanocrystalline (B) and optimized Pu-NSSPE (C, D)

3 讨论

3.1 乳滴的粒径测定

目前乳滴粒径的测定方法多用激光粒度分析仪器测定或根据光学形态计算^[7]。本研究在预试验时发现, 根据光学形态, 用软件计数得到的 Pu-NSSPE 乳滴粒径为 13.86 μm, 而用激光粒度分析仪测得的乳滴粒径为 1.66 μm, 两者相差近 8 倍。分析原因, 这可能与激光粒度分析仪的测定方法和药物性质有关。用激光粒度分析仪测定时, 需将约 1 mL 样品

加入到 500 mL 纯水中, 搅拌 1 min 使其分散均匀后才能测定。这相当于将样品稀释了 500 倍。葛根素在水中溶解度为 2.3 mg/mL, 稀释 500 倍后可能导致吸附于油滴表面的葛根素溶解于水中, 从而使乳滴粒径明显减小。

3.2 药物加入顺序

研究结果显示, 葛根素需先分散于油相才能制得稳定的 Pickering 乳液。前期制备水飞蓟宾 NSSPE 时, 水飞蓟宾需先分散于水相才能制得 Pickering 乳

液^[7]。原因可能是,形成 Pickering 乳液的固体微粒应具有适宜的亲水/疏水性,亲水性过强或疏水性过强都不利于 Pickering 乳液的成型和稳定^[23];而药物的初始分散相会影响固体颗粒的润湿性:当粒子首先分散于油相时,粒子表面会吸附有油相分子,使得粒子的亲油性增强;当粒子首先分散于水相时,亲油性部分由于疏水作用而相互团聚,使得粒子的亲水部分裸露,整体亲水性增强^[24-25]。相比较而言,水飞蓟宾疏水性较强,葛根素亲水性较强。因此,水飞蓟宾需先分散于水相中,增强其亲水性;而葛根素需先分散于油相中以增强其疏水性。这说明,在制备 NSSPE 时应根据不同药物的亲水/疏水性选择适宜的药物加入顺序。

3.3 油相对 NSSPE 的影响

Pickering 乳液的固体微粒稳定剂一般不具有表面活性,其稳定乳液的能力取决于固体微粒对油相或者水相的润湿性(三相接触角, θ): θ 越接近 90° ,乳液越稳定;接触角为 0° 或 180° 的微粒可能导致其完全分散于水相或者油相,失去稳定作用^[26]。葛根素对川芎油的 θ 最接近于 90° ,制备的 Pickering 乳液稳定性最好;葛根素对 Captex 355 的 θ 为 0° ,故无法制备出 Pickering 乳液。葛根素对 Labrafil M 1944 CS 的 θ 仅 $(14.8 \pm 1.31)^\circ$,但制备的 Pickering 乳液稳定性也较好,其原因可能在于 Labrafil M 1944 CS 本身具有一定的乳化作用。

3.4 葛根素加入量和油水体积比的影响

固定油水体积比,当葛根素用量达到 0.75% 时,乳液絮凝现象严重。其原因可能是在油水体积比恒定的情况下,可吸附于乳滴界面的葛根素纳米晶数量是有限的,当吸附达到饱和时多余的葛根素纳米晶只能存在水相中,而由于缺乏其他稳定剂而导致葛根素纳米晶热力学稳定性差,放置后出现了絮凝。

固定葛根素用量,增大油水体积比, Pu-NSSPE 的稳定性变差。分析原因可能是:当葛根素加入量恒定时,所形成的纳米晶数量有限,能稳定的油水界面因此也是有限的;但增加油相体积后,未能被纳米晶吸附包裹的乳滴增多,容易合并、分层。由此可见,葛根素用量和油水体积比之间会相互影响,需要调节适当的葛根素用量和油水体积比,使葛根素刚好能完全吸附于所有的油滴界面,才有利于 Pu-NSSPE 的稳定。

3.5 匀质压力的影响

研究结果证实,增大匀质压力,有利于

Pu-NSSPE 的稳定。这是因为固体微粒粒径越小,制得的 Pickering 乳液越稳定^[27],而匀质压力能影响葛根素纳米晶的粒径,所以能影响 Pickering 乳液的稳定性。这也与前期水飞蓟宾 NSSPE 的研究结果一致^[7]。

3.6 水相 pH 值的影响

水相 pH 值对 Pu-NSSPE 的形成与稳定有很大的影响:随着水相 pH 值的增加, Pickering 乳液更容易成型,稳定性也明显提高。水相 pH 值达到 9 时,制备的 Pu-NSSPE 放置 30 d 后仍未出现絮凝、分层等现象,乳滴形态、粒径未发生明显变化。其原因可能在于:(1)水相 pH 值从 3 增大到 9,葛根素纳米晶粒径从 $3.4 \mu\text{m}$ 减小到 262 nm。纳米晶粒径越小,越能吸附于油滴表面,使乳滴稳定性增强;(2)葛根素为黄酮类化合物,在碱性条件下带有更多电荷,使 Pickering 乳滴的电荷增大,斥力作用增强,稳定性提高。

本研究以葛根素纳米晶为固体微粒稳定剂,制备药物纳米晶自稳定 Pickering 乳液。在前期研究基础上,研究主要制备工艺条件对 NSSPE 成型和稳定的影响,结果发现,药物在油/水相中的三相接触角是决定 NSSPE 成功构建的关键因素,接触角接近 90° ,有利于 NSSPE 的成型与稳定。水相 pH 值对 Pu-NSSPE 有显著影响,水相 pH 值为碱性时,可形成稳定的 Pu-NSSPE。荧光显微镜观察到葛根素纳米晶在 NSSPE 乳滴油水界面有明显吸附,提示 Pu-NSSPE 的结构为小部分葛根素溶解于油相,大部分葛根素吸附于油水界面的乳滴结构。本研究结果表明,通过优化工艺,特别是找到接近 90° 三相接触角的油相,以难溶性药物自身纳米晶作为固体微粒稳定剂可以制备出稳定的 NSSPE。

葛根素在水中溶解度为 $(2.32 \pm 0.45) \text{ mg/mL}$,在 Pu-NSSPE 中的溶解度为 $(4.28 \pm 0.22) \text{ mg/mL}$,提高了 84.48%。葛根素在自微乳中的载药量较高,可达到 50 mg/mL,但表面活性剂用量巨大,如陈小新等^[28]制备的自微乳,聚山梨酯 80 和聚氧乙烯蓖麻油的用量为均达到了 19%,此外还是用了 19.0% 助表面活性剂为 1,2-丙二醇;黄嗣航等^[12]制备的自微乳中,聚山梨酯 80 的用量高达 21.8%。可见,虽然 NSSPE 对葛根素的增溶效果不及自微乳,但未使用任何表面活性剂,是其优势之一。

NSSPE 中仅存在水、油和药物 3 种物质,不含表面活性剂、异种固体微粒等其他辅料,安全性高,

稳定性好;而且大量药物以纳米晶体形式吸附于油滴表面,提高了Pickering乳液的载药能力,在药剂学领域具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Lam S, Velikov K P, Velev O D. Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin [J]. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2014, 19(5): 490-500.
- [2] Frelichowska J, Marie A B, Pelletier J, et al. Topical delivery of lipophilic drugs from o/w Pickering emulsions [J]. *Int J Pharm*, 2009, 371(1/2): 56-63.
- [3] Wahlgren M, Engblom J H, Sjöo M L, et al. The use of micro-and nanoparticles in the stabilisation of Pickering-type emulsions for topical delivery [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2014, 14(15): 222-1234.
- [4] Simovic S, He H, Song Y M. An oral delivery system for indomethacin engineered from cationic lipid emulsions and silica nanoparticles [J]. *J Controlled Release*, 2010, 143(3): 367-373.
- [5] Li L L, Li T L, Fu C H, et al. Biodistribution, excretion, and toxicity of mesoporous silica nanoparticles after oral administration depend on their shape [J]. *Nanomedicine*, 2015, 11(8): 1915-1924.
- [6] Lin W, Huang Y W, Zhou X D, et al. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells [J]. *Toxicol App Pharmacol*, 2006, 217(3): 252-259.
- [7] 张继芬, 刘川, 张焦, 等. 水飞蓟宾纳米晶自稳定Pickering乳液的制备及评价 [J]. *药学报*, 2016, 51(5): 813-820.
- [8] Zhou Y X, Zhang H, Peng C. Puerarin: A review of pharmacological effect [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(7): 961-975.
- [9] Tang T T, Hu X B, Liao D H, et al. Mechanisms of microemulsion enhancing the oral bioavailability of puerarin: comparison between oil-in-water and water-in-oil microemulsions using the single-pass intestinal perfusion method and a chylomicron flow blocking approach [J]. *Int J Nanomed*, 2013, 8(5): 4415-4426.
- [10] 王洪宝. 葛根素注射液溶血毒性机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2010.
- [11] Wu J R, Zhang X M, Zhang B. Efficacy and safety of puerarin injection in treatment of diabetic peripheral neuropathy: a systematic review and Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(4): 401-410.
- [12] 黄嗣航, 龙晓英, 袁飞, 等. 含天然乳化剂的新型葛根素自微乳与传统自微乳体内性能对比研究 [J]. *中国药学杂志*, 2014, 49(17): 1530-1534.
- [13] 刘伟星, 李宁, 高崇凯. 葛根素自微乳化渗透泵控释胶囊的制备 [J]. *中草药*, 2013, 44(12): 1568-1573.
- [14] 刘毅, 孙考祥, 姚文军, 等. 树枝状聚合物 PAMAM 包覆葛根素脂质体角膜渗透性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 35(1): 30-34.
- [15] 孟祥平, 周群, 王治平, 等. 口服葛根总黄酮固体脂质纳米粒冻干粉制备及其4种成分释放度考察 [J]. *中草药*, 2014, 45(17): 2467-2474.
- [16] 王立, 张君, 王文倩. 葛根素泡腾性渗透泵控释片的制备及其体外评价 [J]. *中草药*, 2013, 44(6): 686-691.
- [17] 刘新义, 李建荣, 张陆勇, 等. 多指标正交试验优选葛根素聚乙二醇衍生化合成工艺 [J]. *中草药*, 2011, 42(8): 1528-1531.
- [18] Xia W, Onyuksel H. Mechanistic studies on surfactant-induced membrane permeability enhancement [J]. *Pharm Res*, 2000, 17(5): 612-618.
- [19] Han N L, Tang C H. pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 33(2): 309-319.
- [20] Spyropoulos F, Frasc-Melnik S, Norton I T. W/O/W emulsions stabilized by fat crystals-their formulation, stability and ability to retain salt [J]. *Procedia Food Sci*, 2011, 1: 1700-1708.
- [21] Li C, Li Y X, Sun P D, et al. Pickering emulsions stabilized by native starch granules [J]. *Colloid Surface A: Physicochem Eng Aspects*, 2013, 431: 142-149.
- [22] Li W, Zhao C H, Tan J J, et al. Roles of methyl orange in preparation of emulsions stabilized by layered double hydroxide particles [J]. *Colloid Surface A: Physicochem Eng Aspects*, 2013, 421(11): 173-180.
- [23] Zhou J, Wang L J, Qiao X Y, et al. Pickering emulsions stabilized by surface modified Fe₃O₄ nanoparticles [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2012, 367(1): 213-224.
- [24] 王莎. Pickering乳液的制备及其应用研究 [D]. 西安: 西安科技大学, 2010.
- [25] Rousseau D. Trends in structuring edible emulsions with Pickering fat crystals [J]. *Curr Opin Colloid In*, 2013, 18(4): 283-291.
- [26] Kaptay G. On the equation of the maximum capillary pressure induced by solid particles to stabilize emulsions and foams and on the emulsion stability diagrams [J]. *Colloid Surface A: Physicochem Eng Aspects*, 2006, 282(2): 387-401.
- [27] Binks B P, Lumsdon S O. Pickering emulsions stabilized by monodisperse latex particles: effects of particle size [J]. *Langmuir*, 2001, 17(15): 4540-4547.
- [28] 陈小新, 原素, 谢称石, 等. 葛根素自微乳给药系统的制备及其质量评价 [J]. *中草药*, 2011, 42(8): 1512-1516.