

橙皮苷纳米乳液的制备及其稳定性研究

廖艳梅, 李小芳*, 刘罗娜, 仲 粒, 谢 龙, 唐海龙, 宋佳文, 张琳琳

成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 制备以甘草酸作为乳化剂的橙皮苷纳米乳液 (HDN-NE), 以期开发橙皮苷的新型绿色纳米制剂。**方法** 采用高速剪切-高压均质技术制备 HDN-NE, 以粒径、PDI、外观为主要评价指标筛选处方工艺, 对以最佳处方工艺制备的 HDN-NE 的理化性质和相关稳定性进行研究。**结果** HDN-NE 的最佳制备处方为橙皮苷用量 0.1%、甘草酸用量 0.3%、油相用量 5%, 最佳工艺参数为剪切速率 13 000 r/min、剪切时间 2 min、均质压力 100 MPa、均质次数 6 次; 制得纳米乳平均粒径为 (262.7 ± 3.1) nm、PDI 为 0.234 ± 0.009 、Zeta 电位为 (-35.42 ± 0.72) mV、溶解度 (460.3 ± 2.1) $\mu\text{g/mL}$ 、电导率 (116.4 ± 1.7) $\mu\text{S/cm}$ 、pH 值为 6.820 ± 0.008 、浊度为 451 cm^{-1} ($n=3$); 经染色法鉴别为 O/W 乳液, 透射电镜观察乳滴呈圆球状, 大小均一; 稳定性研究结果表明 HDN-NE 稳定性良好。**结论** 以甘草酸作为乳化剂的 HDN-NE 可显著提高橙皮苷的溶解度及稳定性, 是一种潜在的安全性高的新型纳米药物。

关键词: 纳米乳液; 橙皮苷; 甘草酸; 制备工艺; 稳定性; 新型绿色纳米制剂; 高速剪切-高压均质技术

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)10-2312-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.009

Formation and stability of hesperidin nanoemulsion

LIAO Yan-mei, LI Xiao-fang, LIU Luo-na, ZHONG Li, XIE Long, TANG Hai-long, SONG Jia-wen, ZHANG Lin-lin

Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To prepare a new hesperidin nanoemulsion (HDN-NE) with glycyrrhizic acid as emulsifier, by which could develop a “new green nano-pharmaceutics” of hesperidin. **Methods** HDN-NE was prepared by high-speed shearing and high-pressure homogenization. The prescription of HDN-NE was optimized with particle size, PDI, and appearance as indexes. The physicochemical property and stability of HDN-NE prepared by the optimal prescription were studied. **Results** The optimal prescription of HDN-NE was as follow: The content of hesperidin, glycyrrhizic acid, and oil phase were 0.1%, 0.3%, and 5%, respectively. The shear rate was 13 000 r/min, the cutting time was 2 min, the homogeneous pressure and times were 100 MPa and 6, severally. The result showed that the prepared HDN-NE had the mean size of (262.7 ± 3.1) nm, PDI of 0.234 ± 0.009 , Zeta potential of (-35.42 ± 0.72) mV, and solubility of (460.3 ± 2.1) $\mu\text{g/mL}$. The physicochemical property study showed that the conductivity was (116.4 ± 1.7) $\mu\text{S/cm}$, the pH was 6.820 ± 0.008 , and the turbidity was 451 cm^{-1} ($n=3$). It was identified as O/W emulsion by dyeing method. The droplets were spherical and uniform by transmission electron microscopy. The stability study showed that HDN-NE had good stability. **Conclusion** HDN-NE with glycyrrhizic acid as an emulsifier can significantly improve the solubility and stability of hesperidin, which is a new potential nano-drug with safety.

Key words: nanoemulsion; hesperidin; glycyrrhizic acid; preparation process; stability; new green nano-pharmaceutics; high-speed shearing and high-pressure homogenization

收稿日期: 2019-02-21

基金项目: 四川省中医药管理局科技项目 (2018YY001)

作者简介: 廖艳梅 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。Tel: 18408274794 E-mail: 995198925@qq.com

*通信作者 李小芳 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新制剂、新剂型、新技术。

Tel: 13808195110 E-mail: lixiaofang918@163.com

橙皮苷(hesperidin, HDN)别名陈皮苷、柑果苷、橘皮苷,为二氢黄酮衍生物,主要存在于柑桔属 *Citrus* L. 植物中,是陈皮中最主要的黄酮类化合物之一^[1-4]。药理研究表明,橙皮苷具有降血压、抗氧化、抑菌、抗病毒及提高机体免疫力等药理作用,在功能性食品和医药领域具有良好的应用前景^[5-8]。但橙皮苷溶解性很差,极大限制了临床应用。目前关于橙皮苷的增溶研究已有包合物^[9]、自微乳^[10]等报道。

纳米乳液平均粒径为10~500 nm,一般需要借助机械能量分散得到纳米尺寸的液滴。近几年,纳米乳液的应用研究得到快速发展,其应用研究涵盖药品、食品、化妆品、化学和工业等多个领域^[11-13]。纳米乳液在一定程度上可以解决难溶性药物溶解度低的问题,但表面活性剂的加入导致了临床上某些不良反应的发生,给制剂带来安全隐患。有研究表明,在中药方剂中,药物间能够通过配伍来实现对难溶性成分的增溶^[14]。根据中药方剂“药辅合一”的思想,从中药复方配伍中寻找符合中药特点的增溶性辅料,能够在增溶的同时降低辅料的毒副作用^[15]。

甘草因具有调和诸药的作用而被称之为“国老”,陈皮和甘草在诸多方剂中皆有配伍使用。甘草酸为甘草中的三萜皂苷类成分,由1分子葡萄糖和1分子甘草次酸构成,具有两亲性,能够在水溶液中形成胶束而对难溶性成分起到增溶作用^[16-18]。本实验以甘草酸替代合成乳化剂制备橙皮苷纳米乳液,探究甘草酸作为天然乳化剂的可能性,以期为橙皮苷的新剂型开发奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪,DAD 检测器,美国 Agilent 公司;AH100D 高压均质机,加拿大 ATS 公司;NICOMP 380ZLS 型激光粒度测定仪,美国 PSS 粒度仪公司;DDS-11C 电导率仪,PHS-2F pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;C25 实验室分散乳化均质机,上海恒川机械设备有限公司;XMI9007-8 智能温湿度仪,重庆英博实验仪器有限公司;80-1 型离心沉淀器,江苏正基仪器有限公司;KQ5200DE 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;UV-6100 型紫外分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;Tecna G2 型透射电子显微镜(TEM),美国 Fei 公司。

1.2 材料

橙皮苷对照品,批号 MUST-18032502,质量分数 98.76%,成都曼斯特生物科技有限公司;橙皮苷(批号 XC20180616,质量分数 95%)、甘草酸(批号 GB20181108,质量分数 98%),西安小草植物科技有限责任公司;辛酸甘油酯(CT,食品级)、肉豆蔻酸异丙酯(IPM,日化级)、棕榈酸异丙酯(PI,日化级),山东优索化工科技有限公司;油酸(OC)、蓖麻油(CO),分析纯,成都市科隆化学品有限公司。

2 方法与结果

2.1 HDN 含量测定

2.1.1 色谱条件^[9] 色谱柱为 Diamonsil-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测波长 283 nm;流动相为甲醇-醋酸-水(35:4:61);体积流量 1 mL/min;柱温 35 ℃;进样量 5 μL;理论塔板数按橙皮苷峰面积算应不低于 2 000。

2.1.2 溶液的配制^[19] 精密称取橙皮苷对照品 5.11 mg,置于 25 mL 量瓶中,加入适量甲醇溶解,超声,定容至刻度,摇匀,配制成质量浓度 204.4 μg/mL 的橙皮苷对照品溶液。精密量取橙皮苷纳米乳液(HDN-NE) 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加入适量甲醇,超声 30 min 后,静置 10 min,用甲醇定容至 10 mL,用微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。另取空白纳米乳按供试品溶液配制方法制备阴性对照品溶液。

2.1.3 专属性考察 分别取对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液,进高效液相色谱仪检测,结果见图 1,供试品溶液在对照品对应位置有色谱峰,HDN 的保留时间为 10.9 min,阴性对照品无干扰,样品中其他成分不影响测定,峰形良好。

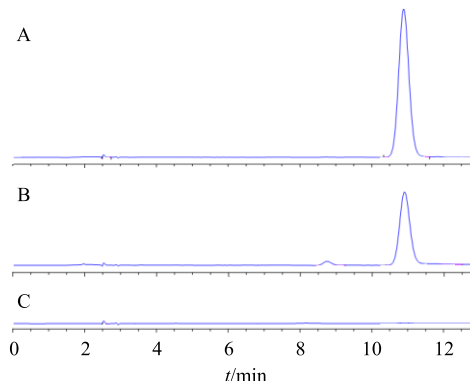


图1 HDN 对照品(A)、HDN-NE 供试品(B)和空白纳米乳(C)的HPLC图

Fig. 1 HPLC of HDN reference substance (A), HDN-NE sample (B), and blank nanoemulsion (C)

2.1.4 线性关系考察 分别精密吸取橙皮苷对照品溶液 0.1、1、2、3、4、5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 经微孔滤膜过滤后加入样品瓶中, 按“2.1.1”项下色谱条件, 进样 5 μ L 测定峰面积, 以橙皮苷对照品质量浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标绘制标准曲线, 得到线性回归方程为 $A=12.581 C+2.550 6$, $r=0.999 9$, 表明橙皮苷在 2.044~102.2 μ g/mL 线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 分别精密吸取对照品溶液 0.1、3、5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 配制成 2.044、61.32、102.2 μ g/mL 的低、中、高 3 个质量浓度的橙皮苷对照品溶液, 分别连续进样 6 次, 每次进样量 5 μ L, 记录 HPLC 图谱中橙皮苷的峰面积, 计算其 RSD 分别为 1.32%、0.04%、0.04%, 表明该方法精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取在室温下贮存的供试品溶液, 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后装入样品瓶, 按“2.1.1”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样 5 μ L 测定峰面积, 计算其 RSD 为 0.33%, 表明橙皮苷纳米乳在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取同一批纳米乳 6 份, 按制备供试品溶液方法配制, 分别取适量溶液经微孔滤膜过滤后装入样品瓶, 按“2.1.1”项下色谱条件进样 5 μ L 测定峰面积, 计算其 RSD 为 0.45%, 表明方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密量取已知质量分数的纳米乳 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 平行操作 9 份, 分别精密加入橙皮苷对照品溶液 1、2、2.5 mL, 各 3 份, 加甲醇稀释至刻度, 超声混匀, 制得含低、中、高质量浓度橙皮苷的供试品溶液, 用微孔滤膜过滤后加入到样品瓶中, 在 283 nm 波长处进样 5 μ L 测定峰面积, 计算低、中、高不同质量浓度的平均回收率分别为 94.4%、97.8%、99.1%, RSD 依次为 0.25%、0.39%、0.91% ($n=3$), 表明方法准确度高。

2.2 HDN-NE 的制备

采用高速剪切结合高压均质法制备 HDN-NE。

精密称取处方量的橙皮苷原料药, 加入油相, 超声使其充分混匀。另精密称取处方量的甘草酸, 加入去离子水, 超声使其充分混匀, 作为水相。将水相加入油相中, 进行高速剪切, 制得粗乳液, 将粗乳液在一定压力条件下进行高压均质, 即得 HDN-NE。

2.3 乳液分层指数的计算

将制得的 HDN-NE 装于玻璃瓶中, 室温静置, 定时观察分层、絮凝、沉淀等现象, 测定乳液层高度, 按下式计算乳液分层指数^[20]。

$$\text{分层指数} = 1 - H_t/H_0$$

H_t 、 H_0 分别为 t 、0 时刻乳液层的高度

2.4 HDN-NE 的处方筛选

2.4.1 油相种类及用量的确定 精密称取处方量橙皮苷原料药, 分别加入 5% 油相 (CO、CT、OC、PI、IPM), 依前述“2.2”项下方法制得不同油相的 HDN-NE, 室温静置, 观察乳液外观、测定其粒径, 以离心 2 h 后的乳液分层指数作为稳定性的表征。结果不同油相新鲜制备的 HDN-NE 外观均乳化均匀, 粒径分别为 (280.5 $\pm$ 0.7)、(211.6 $\pm$ 4.6)、(173.8 $\pm$ 1.9)、(169.0 $\pm$ 1.3)、(155.7 $\pm$ 2.1) nm ($n=3$); 5 000 r/min 离心 2 h 后的分层指数分别为 6.7%、16.7%、8.3%、25.0%、30.0%。综合纳米乳的粒径及其稳定性, 选择将 CO 和 OC 进行配伍, 配伍比例的筛选结果如表 1 所示。将 CO 和 OC 以最佳配比制备 HDN-NE, 筛选不同油相用量对纳米乳的粒径及其外观的影响, 结果如表 2 所示。

表 1 油相对比对纳米乳液的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of oil ratio on nanoemulsion ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

油相配比	粒径/nm	PDI	12 h 后粒径增长率/%
OC	173.8 $\pm$ 1.9	0.136 $\pm$ 0.058	25.3
6:1	214.9 $\pm$ 2.7	0.136 $\pm$ 0.015	17.2
5:2	235.0 $\pm$ 6.3	0.133 $\pm$ 0.016	9.3
1:1	247.5 $\pm$ 3.3	0.196 $\pm$ 0.021	6.4
2:5	270.7 $\pm$ 0.9	0.231 $\pm$ 0.024	0
1:6	273.9 $\pm$ 2.9	0.259 $\pm$ 0.017	0
CO	280.5 $\pm$ 0.7	0.262 $\pm$ 0.014	0

表 2 油相用量对纳米乳液的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effects of oil dosage on nanoemulsion ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

油相用量/%	粒径/nm	PDI	外观	油相用量/%	粒径/nm	PDI	外观
1	286.1 $\pm$ 3.3	0.230 $\pm$ 0.011	乳化均匀	7	271.4 $\pm$ 3.9	0.235 $\pm$ 0.024	少量油滴漂浮, 乳化不均匀
3	280.5 $\pm$ 8.3	0.273 $\pm$ 0.015	乳化均匀	9	262.8 $\pm$ 6.4	0.205 $\pm$ 0.013	大量油滴漂浮, 外观浑浊
5	281.3 $\pm$ 0.2	0.244 $\pm$ 0.019	乳化均匀	11	255.5 $\pm$ 5.9	0.192 $\pm$ 0.013	大量油滴漂浮, 外观浑浊

2.4.2 乳化剂用量的确定 精密称取处方量橙皮苷原料药, 加入 5% 油相 (OC 与 CO 比例为 2:5); 称取不同用量的甘草酸 (0、0.06%、0.12%、0.18%、

0.24%、0.30%、0.36%、0.42%), 加入一定量去离子水, 依前述“2.2”项下方法制得不同乳化剂用量的 HDN-NE, 结果如表 3 所示。

表 3 不同乳化剂用量对纳米乳液的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of concentration of emulsifier on nanoemulsion ($\bar{x} \pm s, n=3$)

乳化剂用量/%	粒径/nm	PDI	外观
0	372.6±5.4	0.406±0.004	高速剪切完, 有明显一层油滴漂浮
0.06	305.3±1.1	0.341±0.013	高速剪切完, 有少许油滴漂浮
0.12	287.2±1.1	0.280±0.005	白色均一乳液
0.18	277.4±2.7	0.246±0.015	白色均一乳液
0.24	275.9±0.9	0.227±0.014	乳白色均一乳液
0.30	272.1±2.0	0.219±0.030	乳白色均一乳液
0.36	270.1±2.2	0.229±0.016	乳白色均一乳液
0.42	270.8±2.5	0.197±0.004	乳白色均一乳液

2.4.3 均质压力及均质次数的筛选 分别精密称取处方量橙皮苷原料药, 加入 5% 油相 (OC 与 CO 比例为 2:5); 称取 0.3% 甘草酸, 加入一定量去离子水, 经 13 000 r/min 高速剪切 3 min 后, 在不同压力 (20、40、60、80、100、120 MPa) 条件下均质 8 次, 粒径分别为 (327.2±9.8)、(303.7±1.6)、(286.1±2.3)、(275.6±3.6)、(249.2±3.4)、(239.7±4.6) nm ($n=3$)。依前述方法, 在压力 100 MPa 条件下考察不同均质次数 (2、4、6、8、10、12 次) 对粒径的影响, 结果分别为 (272.8±4.5)、(260.7±1.9)、(255.9±1.7)、(244.3±2.0)、(236.9±2.6)、(228.0±4.3) nm ($n=3$)。考虑到升高压力对仪器的损耗, 以及高压所致的升温对纳米乳液的影响, 因此选择均质效果较好的较低压力, 结合实际情况, 确定高压均质的压力为 100 MPa, 均质次数为 6 次^[12]。

2.5 验证实验

结合既定的工艺参数, 按照最佳处方和制备工艺条件, 制备 3 批 HDN-NE, 测定粒径、PDI 和 Zeta 电位, 结果见表 4, 在优化工艺条件下制备的纳米乳粒径较小且分布均一, 说明该方法可行, 工艺的重复性良好。

表 4 验证试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Results of verification test ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组号	平均粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
1	262.7±3.1	0.234±0.001	-35.41±0.70
2	258.8±1.7	0.274±0.011	-32.78±1.48
3	263.0±3.8	0.221±0.005	-34.75±1.53

2.6 理化性质考察

2.6.1 HDN-NE 类型的鉴别 (染色法) 利用油性染料苏丹 III (红色) 和水溶性染料亚甲基蓝 (蓝色) 在纳米乳中扩散的快慢来判断纳米乳的类型, 若红色扩散快于蓝色则为 W/O 型纳米乳; 反之则为 O/W 型纳米乳。结果表明, 亚甲基蓝在 HDN-NE 中的扩散快于苏丹 III, 表明该纳米乳为 O/W 型。

2.6.2 HDN-NE 的形态观察 采用 TEM 观察纳米乳形态, 取适量 HDN-NE 稀释至适当浓度, 滴于铜网表面, 5~6 min 后用滤纸吸去多余液体, 加入 1% 磷钨酸溶液 (pH 7.0) 染色, 滤纸吸去多余液体, 晾干后将此铜网置 TEM 下观察并拍照, 结果见图 2, HDN-NE 乳滴呈圆球状, 大小均一, 成型性好。

2.6.3 溶解度的测定 采用 HPLC 法测定纳米乳中橙皮苷的溶解度为 (460.3±2.1) μg/mL, 与未加乳化剂的阴性对照纳米乳的溶解度 (40.9±0.8) μg/mL 相比, 增加了 10.25 倍 ($n=3$)。

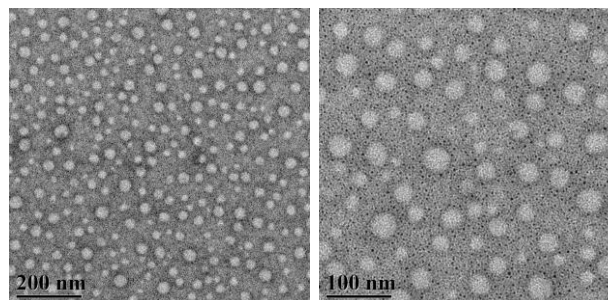


图 2 HDN-NE 的透射电镜形态图

Fig. 2 Transmission electron microscopy chromatogram of HDN-NE

2.6.4 电导率的测定 按最佳处方平行制备 3 批 HDN-NE, 室温下采用电导率仪测定 HDN-NE 的电导率, 其值为 $(116.4 \pm 1.7) \mu\text{S}/\text{cm}$ ($n=3$)。

2.6.5 pH 值的测定 按最佳处方平行制备 3 批 HDN-NE, 室温下采用 pH 计分别测定其 pH 值, 结果为 6.820 ± 0.008 ($n=3$)。

2.6.6 浊度的测定^[21] 将制备好的纳米乳用去离子水稀释 1 000 倍, 用紫外分光光度计, 在 680 nm 下测定透光率, 重复 3 次, 求平均值, 根据公式计算浊度为 451 cm^{-1} ($n=3$)。

$$\tau = v/I \cdot \ln(I_0/I) = v/I \cdot \ln(1/T)$$

τ 为浊度, l 为光程长, v 为稀释倍数, I_0 为光透过参比测试样后照射到光电转换器上的强度, I 为光透过被测试样后照射到光电转换器上的强度, T 为透光率

2.7 离心稳定性考察

分别制备 2 组 HDN-NE, A 组为以最佳制备工艺制备的纳米乳液, B 组为不加乳化剂甘草酸的纳米乳液, 2 组样品分别取 6 mL 于离心管中在 3 000 r/min 的转速下离心 60 min, 观察纳米乳液的外观形态, 以离心前、后吸光度 (A) 值的变化表征 HDN-NE 离心稳定性^[22]。

2.7.1 外观 离心结果显示 HDN-NE 仍保持乳白色均一状态, 未发现聚结、相分离和破乳现象, 说明 HDN-NE 比较稳定。

2.7.2 离心稳定常数的计算 每份样品分别于离心前测定乳液 A 值, 离心后测定上清液的 A 值, 平行测定 3 次。通过以下公式计算离心稳定常数 (K , $K=A_1/A_0$), 式中 A_0 为样品离心前的 A 值, A_1 为样品离心后上清液的 A 值。 K 值越大, 表示离心稳定性越好。离心稳定性结果如表 5 所示, A 组离心稳定常数远远高于 B 组, 表明 HDN-NE 在上述离心条件下含量、性质保持稳定, 加入甘草酸可以有效提高纳米乳液的稳定性。

2.8 储存稳定性考察

分别制备 2 组纳米乳液, A 组为以最佳工艺制备的纳米乳液, B 组为不含乳化剂甘草酸的纳米乳液; 每组分别制备 3 批样品, 分别于 4、25、60 °C 条件下放置 20 d, 分别于第 0、5、10、15、20 天观察纳米乳液外观形态, 考察纳米乳液的粒径、浊度、橙皮苷含量的变化率、乳液分层率^[23]。结果见表 6~8。

乳液层中橙皮苷含量变化率 = (初始含量 - 测定含量) / 初始含量

表 5 离心稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Results of centrifugal stability ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	A_0	A_1	$K/\%$
A	0.652 ± 0.002	0.510 ± 0.001	78.2
B	0.327 ± 0.001	0.176 ± 0.001	53.8

表 6 A 组 HDN-NE 储存稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Results of storage stability of HDN-NE (A) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	粒径/nm			浊度/ cm^{-1}			含量变化率/%		
	4 °C	25 °C	60 °C	4 °C	25 °C	60 °C	4 °C	25 °C	60 °C
0	260.2 ± 2.0	263.7 ± 4.2	271.4 ± 3.7	462.0 ± 0.0	530.0 ± 2.2	590.0 ± 1.4	0	0	0
5	263.9 ± 2.4	266.5 ± 0.9	257.8 ± 7.0	488.8 ± 2.0	486.7 ± 0.8	350.6 ± 11.5	5.3 ± 0.1	3.6 ± 0.1	16.3 ± 2.8
10	264.8 ± 0.7	255.5 ± 1.9	262.0 ± 4.2	426.2 ± 3.3	494.8 ± 0.8	355.2 ± 0.0	10.6 ± 0.5	6.6 ± 0.1	31.5 ± 3.7
15	256.5 ± 6.3	256.3 ± 2.0	265.4 ± 4.0	413.0 ± 2.1	404.5 ± 1.4	562.1 ± 0.0	13.1 ± 0.7	10.4 ± 0.2	33.8 ± 4.1
20	262.2 ± 1.4	261.9 ± 2.9	267.4 ± 1.0	400.6 ± 1.8	407.0 ± 2.5	619.3 ± 0.5	14.1 ± 1.1	15.1 ± 1.3	37.2 ± 3.8

表 7 B 组 HDN-NE 储存稳定性结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Results of storage stability of HDN-NE (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

t/d	粒径/nm			浊度/ cm^{-1}			含量变化率/%		
	4 °C	25 °C	60 °C	4 °C	25 °C	60 °C	4 °C	25 °C	60 °C
0	320.1 ± 7.4	315.4 ± 1.8	320.7 ± 4.1	133.5 ± 1.6	138.5 ± 0.6	133.6 ± 5.2	0	0	0
5	295.5 ± 1.5	295.2 ± 2.7	299.7 ± 2.0	135.4 ± 0.5	142.3 ± 0.5	159.0 ± 1.6	0.5 ± 0.0	1.7 ± 0.1	33.0 ± 4.2
10	288.9 ± 1.2	291.6 ± 5.2	289.0 ± 1.8	167.3 ± 0.5	163.7 ± 4.5	175.5 ± 0.9	22.7 ± 2.8	19.6 ± 2.4	48.9 ± 2.1
15	280.3 ± 6.0	287.3 ± 3.0	289.7 ± 3.1	166.5 ± 0.5	91.0 ± 1.0	111.3 ± 0.5	34.7 ± 3.9	38.6 ± 3.6	50.6 ± 1.8
20	313.0 ± 3.9	319.8 ± 6.4	388.7 ± 8.8	101.6 ± 1.4	106.1 ± 0.5	84.8 ± 3.4	55.7 ± 3.2	52.6 ± 2.9	55.0 ± 2.6

表 8 HDN-NE 分层指数随储存时间的变化结果

Table 8 Results of delamination index variation of HDN-NE

t/d	A 组分层指数/%			B 组分层指数/%		
	4 ℃	25 ℃	60 ℃	4 ℃	25 ℃	60 ℃
0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	1.7	3.3	3.3
10	0.8	0.8	0.8	3.3	8.3	8.3
15	0.8	1.3	1.3	5.0	8.3	11.7
20	1.7	2.0	2.5	8.3	13.3	16.7

根据表 6、7 显示,在各温度条件下,随着储存时间的增长,A 组的各项指标都不同程度地优于 B 组。分析粒径结果可知,加入甘草酸可以有效地防止 HDN-NE 粒径的增长,A 组在各温度条件下 20 d 内都稳定在 260 nm 左右,而 B 组在各温度条件下随着时间的增长,粒径都呈不同程度地增长趋势,随着储存温度的升高,粒径增长率逐渐增加,尤其在 60 ℃ 条件下储存 20 d 粒径增长率达到了 21.2%。这是因为纳米乳液是热力学不稳定体系,随着温度升高,分子运动速率增加,粒子相互碰撞聚集,导致粒径变大,而甘草酸作为乳化剂有效地克服了高温所致的粒子聚集现象。

由 A 组浊度测定结果可以看出,在 4、25 ℃ 条件下的纳米乳液浊度随储存时间的增长有轻微降低,而 60 ℃ 组的纳米乳液浊度表现出先减小后增大的趋势,推测其原因可能是由于甘草酸在冷水不溶而溶于热水的性质,导致高温条件下甘草酸溶解度增大,形成的增溶体系对多余的油滴进行包裹,提高了整个纳米乳液体系的增溶效果,因此透明度增大,浊度降低,而在高温条件下长期储存,温度过高可能会导致乳化剂亲水端脱水,界面张力降低,颗粒聚集增加,乳液体系变浑浊,浊度增加。分析 B 组浊度测定结果,不同温度条件下纳米乳浊度变化皆呈先增大后减小的趋势,由于乳液体系不存在乳化剂,因此在储存初期,粒子聚集碰撞,乳液逐渐浑浊,继续放置,乳液开始分层沉降,浊度又开始降低,60 ℃ 条件下储存 20 d 后乳液浊度最低,与乳液的外观变化一致。

从橙皮苷含量变化率的角度来表征 HDN-NE 的储存稳定性,含量变化率越低则表示稳定性越好。由表 6 可以看出,60 ℃ 条件下纳米乳液储存 20 d,橙皮苷含量变化率高于 4 ℃ 和 25 ℃。表 7 结果显示,未加甘草酸的纳米乳在不同温度条件下储存 20

d,含量变化率皆达到了 50% 以上。

表 8 为从纳米乳液分层指数变化的角度来表征的稳定性的结果,分析表中数据可以看出纳米乳液储存 20 d 后分层指数大小顺序为 60 ℃ > 25 ℃ > 4 ℃,与乳液外观变化一致,其中 60 ℃ 条件下储存 20 d 分层指数为 2.5%。B 组分层指数结果显示,未加甘草酸的情况下,储存 20 d 分层指数变化大小顺序为 60 ℃ > 25 ℃ > 4 ℃,与乳液外观变化一致,其中 60 ℃ 条件下储存 20 d 分层指数达到了 16.7%。

3 讨论

纳米乳液的制备方法有高能乳化法和低能乳化法 2 种,本实验采用的高速剪切结合高压均质法属于高能乳化法,即利用机械设备提供的能量使粒子达到纳米尺寸,该方法得到的纳米粒子粒径分布均匀,稳定性较好,又避免了低能乳化法中使用大量表面活性剂带来的安全隐患。

分析稳定性实验结果,温度升高,分子运动速率加快,油滴分子从乳液液滴运动到甘草酸胶束的速率变快,增溶作用增加;而温度过高,由于甘草酸内部结构发生变化(亲水端脱水),导致乳液体系液滴聚集,稳定性降低。从各项指标分析,甘草酸的加入显著提高了纳米乳液的稳定性,对高温条件所致的消极影响也有一定程度改善。

本实验通过探究甘草酸作为橙皮苷纳米乳液乳化剂的可能性,成功制备了橙皮苷的新型绿色纳米制剂,有较好的应用和开发前景。甘草酸不仅提高了橙皮苷的溶解度,降低了乳液的毒性,在一定程度上也将对橙皮苷的药效有促进作用。课题组后续将深入研究甘草酸在 HDN-NE 体系中的增溶能力及其影响机制,为橙皮苷的制剂学研究奠定基础。

参考文献

- [1] Saeidi I, Hadjmohammadi M R, Peyrovi M, et al. HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction [J]. *J Pharm Biomed*, 2011, 56(2): 419-422.
- [2] Ma Y, Ye X, Hao Y, et al. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel [J]. *Ultrason Sonochem*, 2008, 15(3): 227-232.
- [3] Inoue T, Tsubaki S, Ogawa K, et al. Isolation of hesperidin from peels of thinned *Citrus unshiu* fruits by microwave-assisted extraction [J]. *Food Chem*, 2010, 123(2): 542-547.

- [4] 徐玉玲, 伍利华, 李鹏程, 等. 基于橙皮苷临床利用量的青皮品质评价研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4009-4015.
- [5] Kalpana K B, Devipriya N, Srinivasan M, *et al.* Evaluating the radioprotective effect of hesperidin in the liver of Swiss albino mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 658(2/3): 206-212.
- [6] Martínez A L, González-Trujano M E, Chávez M, *et al.* Hesperidin produces antinociceptive response and synergistic interaction with ketorolac in an arthritic gout-type pain in rats [J]. *Pharmacol Biochem Be*, 2011, 97(4): 683-689.
- [7] Park H J, Kim M J, Ha E, *et al.* Apoptotic effect of hesperidin through caspase 3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4 [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(1/2): 147-151.
- [8] Ahmad S T, Arjumand W, Nafees S, *et al.* Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 208(2): 149-161.
- [9] 刘本国, 张瑞婷, 吴晓楠, 等. 橙皮苷/羟丙基- β -环糊精包合物的理化性质研究 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(10): 2349-2352.
- [10] 橙皮苷自微乳的制备与评价 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2011.
- [11] 李文华, 王英姿, 骆声秀, 等. 苦参总碱纳米乳和苦参总碱纳米乳凝胶的透皮机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 484-489.
- [12] 徐 婷. 柠檬醛纳米乳状液的制备及稳定机理研究 [D]. 上海: 上海应用技术大学, 2016.
- [13] 张宽云, 马 燕. 紫杉醇-油酸和鸦胆子油分子配型组装纳米乳给药系统研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1544-1552.
- [14] Güçlü-Üstündağ Ö, Mazza G. Saponins: Properties, applications and processing [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2007, 47(3): 231-258.
- [15] 王宇光, 史新元, 乔延江. 剪切作用对甘草皂苷胶束聚集形态影响的介观模拟研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(1): 1201-1205.
- [16] Ding H, Yin Q, Wan G, *et al.* Solubilization of menthol by platycodin D in aqueous solution: An integrated study of classical experiments and dissipative particle dynamics simulation [J]. *Int J Pharmacol*, 2015, 480(1/2): 143-151.
- [17] Tolstikova T G, Khvostov M V, Bryzgalov A O. The complexes of drugs with carbohydrate-containing plant metabolites as pharmacologically promising agents [J]. *Mini-Rev Med Chem*, 2009, 9(11): 1317-1328.
- [18] Radwan M A, Aboul-Enein H Y. The effect of oral absorption enhancers on the *in vivo* performance of insulin-loaded poly (eth-ylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rats [J]. *J Microencapsul*, 2002, 19(2): 225-235.
- [19] 夏鹏飞, 马 肖, 吴国泰, 等. 龙胆苦苷纳米乳处方优化及其质量评价 [J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(7): 62-66.
- [20] Justyna F, Marie A B, Jocelyne P, *et al.* Topical delivery of lipophilic drugs from O/W Pickering emulsions [J]. *Int J Pharmacol*, 2009, 371: 56-63.
- [21] Song M G, Cho S H, Kim J Y, *et al.* Novel evaluation method for the water-in-oil (W/O) emulsion stability by turbidity ratio measurements [J]. *Korean J Chem Eng*, 2002, 19(3): 425-430.
- [22] 姚艳玉, 马培华, 曾庆晗, 等. 油相种类对姜黄素纳米乳液稳定性的影响 [J]. 食品科技, 2017, 42(9): 238-242.
- [23] 鲁丁丁. 甜橙油纳米乳的构建及其稳定性研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2015.