

甘草酸为稳定剂的葛根素纳米乳冻干粉的制备及体外评价

张琳琳, 李小芳*, 宋佳文, 谢 龙, 廖艳梅, 仲 粒

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 以天然表面活性剂甘草酸为稳定剂制备葛根素纳米乳冻干粉 (puerarin nanoemulsion lyophilized powder, Pue-NE-LP), 并对其体外评价。方法 采用高速剪切联合高压均质法制备葛根素纳米乳 (Pue-NE), 进一步结合冷冻干燥法制备 Pue-NE-LP。以平均粒径和多分散指数 (PDI) 作为评价指标, 通过单因素试验筛选出最优处方及工艺参数。并对制备的 Pue-NE-LP 进行理化性质表征和体外溶出度测定。结果 以 5% 辛酸甘油酯为油相, 2.0 mg/mL 甘草酸为稳定剂, 7% 葡萄糖为冻干保护剂制得的 Pue-NE-LP 平均粒径为 (215.1 ± 0.7) nm, PDI 为 0.133 ± 0.024 。扫描电镜显示 Pue-NE-LP 呈不规则的小片状, 大小较均匀; X 射线衍射显示 Pue-NE-LP 呈无定型状态存在。体外释放结果表明 Pue-NE-LP 的溶出度明显高于物理混合物。结论 以天然表面活性剂甘草酸为稳定剂制备的 Pue-NE-LP, 不仅制备方法简单, 而且能显著改善 Pue 的溶解性和生物利用度, 为 Pue-NE 制剂的多元开发提供参考。

关键词: 葛根素; 甘草酸; 天然表面活性剂; 稳定剂; 纳米乳; 冻干粉; 体外溶出; 高速剪切联合高压均质法; 冷冻干燥法; 冻干保护剂

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)11-2929-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.011

Preparation and *in vitro* evaluation of puerarin nanoemulsion lyophilized powder with glycyrrhizic acid as stabilizer

ZHANG Lin-lin, LI Xiao-fang, SONG Jia-wen, XIE Long, LIAO Yan-mei, ZHONG Li

College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 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, State Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China

Abstract: **Objective** Puerarin nanoemulsion lyophilized powder (Pue-NE-LP) was prepared using natural surfactant glycyrrhizic acid as stabilizer and evaluated *in vitro*. **Methods** Pue-NE was prepared by high-speed shear and high-pressure homogenization method, and further combined with freeze-drying method to prepare Pue-NE-LP. Taking the average particle size and polydispersity index (PDI) as the evaluation indexes, the optimal prescription and process parameters of this experiment were screened out through a single factor test. The prepared Pue-NE-LP was characterized by physicochemical properties and dissolution *in vitro*. **Results** The average particle size and PDI of Pue-NE-LP prepared with 5% glyceryl caprylate as oil phase, 2.0 mg/mL glycyrrhizic acid as stabilizer, and 7% glucose as lyophilization protectant was (215.1 ± 0.7) nm and (0.133 ± 0.024) , respectively. Scanning electron microscopy showed that Pue-NE-LP was irregularly small and uniform in size; X-ray diffraction showed that Pue-NE-LP existed in an amorphous state. *In vitro* release results showed that the dissolution rate of Pue-NE-LP was significantly higher than the physical mixture. **Conclusion** Pue-NE-LP prepared with natural surfactant glycyrrhizic acid as a stabilizer is not only simple to prepare, but also can significantly improve the solubility and bioavailability of puerarin. It provides a reference for the multiple development of Pue-NE formulations.

Key words: puerarin; glycyrrhizic acid; natural surfactant; stabilizer; nanoemulsion; lyophilized powder; *in vitro* dissolution; high-speed shear combined with high-pressure homogenization; freeze-drying; lyophilized protective agent

收稿日期: 2019-12-21

基金项目: 四川省科技厅科研项目 (2019YFS0113); 国家中医药管理局项目 (2018ZY03002)

作者简介: 张琳琳 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型、新制剂、新技术。Tel: 18434371727 E-mail: 3127961652@qq.com

*通信作者 李小芳 (1964—), 女, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型、新制剂、新技术。Tel: 13808195110 E-mail: lixiaofang918@163.com

葛根素 (puerarin, Pue) 又名葛根黄酮, 是从豆科植物野葛或甘葛藤的块根中提取得到的一种黄酮苷, 也是葛根的最主要有效成分之一。药理学研究表明, 葛根素具有多重药理作用^[1-10], 在食品和医药领域具有良好的应用前景^[11-15], 但其水溶性低, 膜渗透性差 (BCS IV 类药物)、口服生物利用度低, 使得药物的临床应用受到了极大的限制^[16]。目前葛根素的上市制剂有注射剂和滴眼剂^[17], 但都存在一定的缺陷, 如注射剂由于辅料及生产工艺等原因导致所含杂质种类多、含量大, 易引起变态反应、溶血性贫血和药物热等不良反应^[18-19], 滴眼剂给药部位局限, 且制备工艺复杂, 使患者的用药存在安全隐患。为改善葛根素的溶解性, 提高生物利用度, 药学工作者开展了葛根素的新型制剂研究, 但是磷脂复合物易残留有机溶剂^[20], 胶束和脂质体易发生泄漏^[21-23], β -环糊精包合物^[24]、自微乳^[25]、微乳^[26]和固体分散体^[27]中大量化学合成辅料的使用, 影响制剂的安全性^[28]。

纳米乳 (nanoemulsion, NE) 作为一种给药途径多元化的小粒径新型载体, 已广泛用于难溶性有效成分的增溶、增效减毒研究, 具有处方简单、易于制备、安全无刺激、可延长药物作用时间、促进药物膜渗透、减少肠首关效应等多重优点^[29-31]。所以, 制备葛根素纳米乳 (puerarin nanoemulsion, Pue-NE) 可从增加药物溶解度和促进体内吸收 2 个方面来提高生物利用度。但在目前的纳米乳给药系统研究中多采用化学合成表面活性剂, 然而这些合成类表面活性剂使用剂量大, 稳定效果不佳, 且长期使用会对人体产生毒副作用^[32-33]。

甘草酸, 是一种含有葡萄糖醛酸的三萜皂苷, 也是甘草的主要有效成分之一, 具有表面活性, 可以起到稳定剂的作用^[34-35]。本研究以天然表面活性剂甘草酸为稳定剂制备 Pue-NE, 进一步冷冻干燥制得冻干粉 (lyophilized powder, LP)^[36], 即葛根素纳米乳冻干粉 (puerarin nanoemulsion lyophilized powder, Pue-NE-LP), 旨在解决化学合成稳定剂潜在的安全性问题及纳米乳制剂的长期不稳定性问题, 为葛根素新剂型的开发奠定基础。

1 仪器与试药

KQ5200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; C25 实验室分散乳化均质机, 上海恒川机械设备有限公司; 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; SJIA-10N-50 型冷冻干燥机, 宁波市双嘉仪器有限公司; ZRS-8G 型智能溶出试验仪, 天津市天大天发科技有限公司; UV-6100 型紫外分光光度仪, 上海美谱达仪器有限公司。

葛根素对照品 (批号 MUST-19042007, 质量分数 99.71%), 成都曼斯特生物科技有限公司; 葛根素 (批号 GL20190420, 质量分数 98%)、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)、甲醇, 均为分析纯, 成都市科隆化学用品有限公司; 油酸乙酯 (批号 20180926, 质量分数 98%~100%), 化学纯, 国药集团化学试剂有限公司; 甘露醇、乳糖、山梨醇、葡萄糖, 均为分析纯, 成都市科龙化工试剂厂。

2 方法与结果

2.1 Pue-NE 的制备

采用高速剪切联合高压均质法制备 Pue-NE。精密称取处方量的葛根素原料药, 加入一定体积分数的油, 超声使其充分混匀, 作为油相。另精密称取处方量的甘草酸, 加入一定体积的去离子水, 超声使其混合均匀, 作为水相。将水相转入油相中, 进行高速剪切, 制得粗乳液。再将粗乳液转入高压均质机, 在一定压力下均质数次, 即得 Pue-NE。

2.2 平均粒径、多分散指数 (PDI)、再分散指数 (RDI) 的测定

精密吸取新鲜制备的 Pue-NE 于 25 mL 量瓶中, 用纯水稀释数倍, 采用纳米激光粒度仪测定粒径和 PDI, 平行测定 3 次, 取平均值。

纳米乳冻干粉 (nanoemulsion lyophilized powder, NE-LP) 复溶后, 以 RDI 作为其再分散性的评价指标, $RDI = \text{冻干再分散后测得的粒径} / \text{初始粒径}$ 。RDI 越接近 1, 说明冻干后“固化损伤”越小。

2.3 Pue-NE 处方及工艺因素的筛选

以平均粒径和 PDI 为评价指标, 分别对油相种类、油相用量、甘草酸质量浓度、高压均质压力、高压均质次数 5 个因素进行考察。

2.3.1 油相种类 精密称取处方量的葛根素原料药, 加入到体积分数为 5% 的油中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为油相; 另精密称取 160 mg 甘草

酸于 80 mL 去离子水中, 超声 5 min 使其充分溶解, 作为水相。将水相转入油相中, 高速剪切 2 min, 再转入高压均质机中 100 MPa 下均质 6 次, 制得不同油相的 Pue-NE, 观察乳液外观, 测定平均粒径、

PDI, 室温静置 24 h, 计算粒径增长率, 对油相种类进行筛选, 结果见表 1。综合考虑纳米乳外观、粒径、PDI 及 24 h 后粒径的增长率, 确定油相为辛癸酸甘油酯。

表 1 油相种类对 Pue-NE 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of oil phase types on average particle size and PDI of PUE-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

油相	平均粒径/nm	PDI	24 h 后粒径增长率/%	外观
肉豆蔻酸异丙酯	164.4±3.2	0.180±0.026	43	乳白色均一液体
油酸乙酯	178.2±4.3	0.083±0.019	16	乳白色均一液体
油酸	193.0±7.7	0.179±0.017	14	乳白色均一液体
棕榈酸异丙酯	180.2±1.0	0.101±0.015	8	乳白色均一液体
辛癸酸甘油酯	189.7±3.1	0.088±0.021	0	乳白色均一液体
蓖麻油	234.9±1.7	0.135±0.022	0	乳白色均一液体

2.3.2 油相用量 精密称取处方量的葛根素原料药, 加入到一定体积分数的辛癸酸甘油酯中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为油相; 另精密称取 160 mg 甘草酸于 80 mL 的去离子水中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为水相。将水相转入油相中, 高速剪切 2 min, 再转入高压均质机中 100 MPa 下均质 6 次, 制得不同油相用量的 Pue-NE, 观察乳液外观, 测定平均粒径、PDI, 对辛癸酸甘油酯的用量进行筛选, 结果见表 2。综合考虑纳米乳的外观、粒径和 PDI, 确定辛癸酸甘油酯的用量为 5%。

表 2 油相用量对 Pue-NE 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of oil phase amount on average particle size and PDI of PUE-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

油相 用量/%	平均粒径/ nm	PDI	外观
1	190.8±1.7	0.117±0.020	淡白色均一液体
3	199.7±4.3	0.127±0.038	白色均一液体
5	203.6±3.1	0.142±0.008	乳白色均一液体
7	218.9±3.8	0.147±0.023	乳白色均一液体
9	251.5±8.1	0.074±0.015	乳白色均一液体
11	259.0±7.9	0.131±0.018	表面有少量油滴漂浮

2.3.3 甘草酸用量 精密称取处方量的葛根素原料药, 加入到体积分数为 5% 辛癸酸甘油酯中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为油相; 另精密称取 160 mg 甘草酸于 80 mL 的去离子水中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为水相。将水相转入油相中, 高速剪切 2 min, 再转入高压均质机中 100 MPa 下均质 6

次, 制得不同甘草酸用量的 Pue-NE, 观察乳液外观, 测定平均粒径、PDI, 对甘草酸用量进行筛选, 结果见表 3。综合考虑纳米乳的外观、粒径和 PDI, 确定甘草酸用量为 2.0 mg/mL。

表 3 甘草酸用量对 Pue-NE 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of concentration of glycyrrhizic acid on average particle size and PDI of Pue-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

甘草酸/ (mg·mL ⁻¹)	平均粒径/ nm	PDI	外观
0	415.2±1.2	0.124±0.049	表面有一层油滴漂浮
0.5	228.0±6.5	0.219±0.027	表面有少量油滴漂浮
1.0	210.2±1.7	0.119±0.022	乳白色均一液体
1.5	196.3±2.7	0.103±0.026	乳白色均一液体
2.0	185.4±3.7	0.114±0.013	乳白色均一液体
2.5	190.4±3.3	0.126±0.031	乳白色均一液体
3.0	191.6±4.8	0.076±0.028	乳白色均一液体

2.3.4 高压均质压力 精密称取处方量的葛根素原料药, 加入到体积分数为 5% 的辛癸酸甘油酯中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为油相; 另精密称取 160 mg 甘草酸于 80 mL 的去离子水中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为水相。将水相转入油相中, 高速剪切 2 min, 再转入高压均质机中在一定压力下均质 6 次, 制得新鲜的 Pue-NE, 测定其平均粒径、PDI, 对高压均质压力进行筛选, 结果见表 4。考虑到压力的升高和粒径减小程度之间的关系, 以及升高压力对仪器的损耗, 最后确定均质压力为 100 MPa。

2.3.5 高压均质次数 精密称取处方量的葛根素原料药, 加入到体积分数为 5% 辛癸酸甘油酯中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为油相; 另精密称取 160 mg 甘草酸于 80 mL 的去离子水中, 超声 5 min, 使其充分溶解, 作为水相。将水相转入油相中, 高速剪切 2 min, 再转入高压均质机中于 100 MPa 下均质数次, 制得新鲜的 Pue-NE, 测定其平均粒径、PDI, 对高压均质次数进行筛选, 结果见表 5。考虑到均质次数的增加和粒径减小程度之间的关系, 以及增加均质次数对仪器的耗损, 最后确定均质次数为 6 次。

表 4 高压均质压力对 Pue-NE 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of high pressure homogenization pressure on average particle size and PDI of Pue-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

高压均质压力/MPa	平均粒径/nm	PDI
20	278.5 $\pm$ 4.1	0.057 $\pm$ 0.023
40	236.6 $\pm$ 7.5	0.138 $\pm$ 0.023
60	216.1 $\pm$ 1.2	0.133 $\pm$ 0.028
80	199.0 $\pm$ 2.7	0.112 $\pm$ 0.018
100	187.3 $\pm$ 1.2	0.127 $\pm$ 0.025
120	179.8 $\pm$ 2.0	0.074 $\pm$ 0.016

表 5 高压均质次数对 Pue-NE 平均粒径和 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of high pressure homogenization times on average particle size and PDI of Pue-NE ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

高压均质次数	平均粒径/nm	PDI
2	202.6 $\pm$ 1.9	0.156 $\pm$ 0.010
4	193.5 $\pm$ 0.5	0.124 $\pm$ 0.029
6	184.9 $\pm$ 1.3	0.116 $\pm$ 0.014
8	180.1 $\pm$ 1.0	0.103 $\pm$ 0.017
10	177.0 $\pm$ 1.8	0.074 $\pm$ 0.012
12	172.0 $\pm$ 8.0	0.052 $\pm$ 0.025

2.3.6 Pue-NE 处方及工艺参数的确定 经单因素考察, 综合考虑纳米乳的外观、平均粒径和 PDI, 最终确定 Pue-NE 中油相为辛癸酸甘油酯, 用量为 5%; 稳定剂甘草酸的用量为 2.0 mg/mL; 工艺参数确定为高压均质压力 100 MPa; 均质 6 次。

2.4 验证工艺

在单因素筛选出的最佳处方及工艺条件下, 平行制备 3 批新鲜的 Pue-NE, 外观如图 1 所示, 粒径分布如图 2 所示, 验证试验结果见表 6。结果表明,



图 1 Pue-NE 外观

Fig. 1 Pue-NE appearance

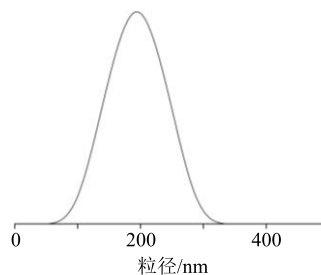


图 2 粒径分布

Fig. 2 Particle size distribution

表 6 验证试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Results of verification test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

批次	粒径/nm	PDI
1	194.3 $\pm$ 0.3	0.109 $\pm$ 0.003
2	194.0 $\pm$ 0.4	0.112 $\pm$ 0.004
3	193.7 $\pm$ 0.2	0.117 $\pm$ 0.005

在优化的处方及工艺条件下制备的 Pue-NE 呈乳白色均一液体, 平均粒径为 (194.0 $\pm$ 0.3) nm, PDI 为 0.113 $\pm$ 0.004, 粒径较小且分布均一, 说明该方法可行, 工艺的重复性良好。

2.5 固化工艺考察

2.5.1 Pue-NE-LP 的制备 取“2.4”项下的 Pue-NE 适量, 加入冻干保护剂, 分装于西林瓶中, -18 ℃ 预冻 12 h 后, 再经抽真空减压干燥 48 h, 即得 Pue-NE-LP。

2.5.2 Pue-NE-LP 再分散性评价 取适量“2.5.1”项下 Pue-NE-LP, 用超纯水复溶, 按“2.2”项下方法测定 Pue-NE-LP 复溶后的平均粒径、PDI 和 RDI。

2.5.3 冻干保护剂种类的考察 按“2.5.1”项下方法分别加入 3% 的甘草酸、乳糖、甘露醇、山梨醇、葡萄糖作为冻干保护剂^[37-39], 同时制备不加冻干保护剂的 Pue-NE-LP 作为空白对照, 观察 Pue-NE-LP

的外观,并按“2.5.2”项下方法对 Pue-NE-LP 进行再分散性评价,考察不同冻干保护剂对 Pue-NE-LP 的影响,结果见表 7。结果表明,以葡萄糖作为冻干保护剂制备的 Pue-NE-LP 表面平整,稍有黏性,质地松软、均一,再分散性评价各项指标与冻干前相差最小,效果最好,因此选择葡萄糖作为冻干保护剂。

2.5.4 冻干保护剂剂量的筛选 按“2.5.1”项下方法分别加入 1%、3%、5%、7%、9%、11%的葡萄糖

糖作为冻干保护剂制备 Pue-NE-LP。观察 Pue-NE-LP 的外观,并按“2.5.2”项下方法对 Pue-NE-LP 进行再分散性评价,考察不同用量的葡萄糖对 Pue-NE-LP 的影响,结果见表 8。结果表明,以 7% 的葡萄糖作为冻干保护剂制备的 Pue-NE-LP 表面平整,质地松软、均一,稍有黏性,效果最好,因此选择葡萄糖的用量为 7%。

2.6 物理混合物的制备

按“2.4”项下最优条件依次称取原料药和辅料,

表 7 冻干保护剂种类对 Pue-NE-LP 外观及再分散性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effects of different lyoprotectants on appearance and redispersibility of Pue-NE lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冻干保护剂种类	外观	复溶后平均粒径/nm	PDI	RDI
甘草酸	表面皱缩,有结块,质地疏松、多孔	738.0±10.5	0.458±0.036	3.876±0.048
乳糖	表面不塌陷,质地均一	729.2±7.3	0.637±0.038	3.827±0.032
甘露醇	表面平整,质地疏松、均一	481.0±6.4	0.375±0.028	2.507±0.014
山梨醇	表面皱缩,质地疏松多孔,稍有黏性	435.2±7.5	0.253±0.032	2.234±0.016
葡萄糖	表面平整,质地松软均一,稍有黏性	244.1±5.0	0.062±0.010	1.300±0.019
空白对照	油性褶皱薄膜,不成粉末	513.0±13.1	0.441±0.064	2.723±0.067

表 8 冻干保护剂用量对 Pue-NE-LP 再分散性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of dosage of lyoprotectant on redispersibility of Pue-NE lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冻干保护剂用量/%	外观	复溶后平均粒径/nm	PDI	RDI
1	表面平整,质地松软均一,稍有黏性	395.7±3.3	0.094±0.012	1.982±0.021
3	表面平整,质地均一,稍有黏性	246.3±3.5	0.163±0.022	1.271±0.013
5	表面平整,质地松软、均一,稍有黏性	226.4±4.7	0.170±0.021	1.120±0.010
7	表面平整,质地松软、均一,稍有黏性	215.1±0.7	0.133±0.024	1.088±0.003
9	表面相对平整,质地不均一,偏硬,黏性大	195.0±1.4	0.085±0.024	1.041±0.002
11	表面结块严重,质地坚硬,黏性很大	194.8±1.5	0.104±0.016	1.015±0.004

分别溶于辛酸甘油酯和水中,之后将水相转入油相中,加入质量分数为 7% 的葡萄糖,超声 5 min,使其混合均匀,按“2.5.1”项下冻干工艺制备葛根素物理混合物冻干粉,备用。

2.7 扫描电子显微镜 (SEM) 观察形态

取葛根素原料药和 Pue-NE-LP 适量,均匀黏附于样品池上,表面减压喷金处理,于 SEM 下观察形态,结果见图 3。同样是 10 μm 的尺寸,可见葛根素原料药呈较大的片状,且大小不均匀,而 Pue-NE-LP 呈不规则的小片状,且大小较均匀。

2.8 X 射线衍射法 (XRD) 分析

取葛根素、空白辅料、Pue-NE-LP、物理混合物作为样品进行 XRD 分析,扫描范围为 5°~60°,扫描速度为 2°/min,扫描步长为 0.02°,结果见图 4。

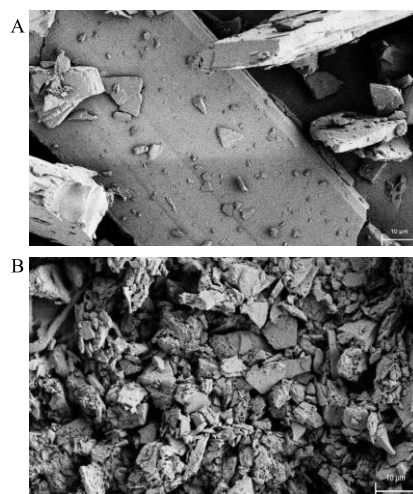


图 3 葛根素原料药 (A) 和 Pue-NE-LP (B) 的 SEM 图
Fig. 3 SEM image of raw Pue (A) and Pue-NE-LP (B)

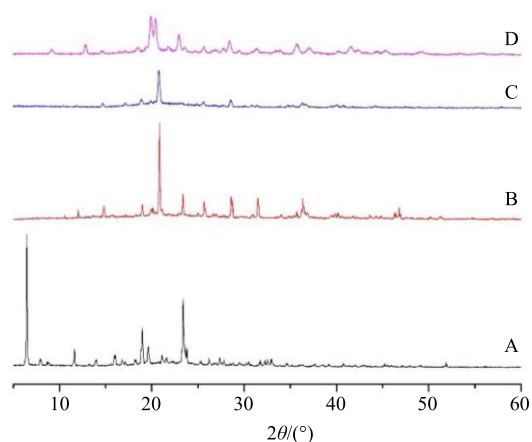


图 4 葛根素 (A)、空白辅料 (B)、Pue-NE-LP (C) 和物理混合物 (D) 的 XRD

Fig. 4 XRD of puerarin (A), blank excipient (B), Pue-NE lyophilized powder (C) and physical mixture (D)

葛根素在 2θ 值为 6.46° 、 11.64° 、 18.99° 、 19.62° 、 23.39° 处有较强衍射峰, 表明葛根素以结晶形式存在; 空白辅料中甘草酸以结晶形式存在同样有较强的衍射峰; 物理混合物中可看到强度减弱的葛根素衍射峰, 表明葛根素和空白辅料仅是简单的物理混合; 而 Pue-NE-LP 中 Pue 衍射峰不明显, 表明葛根素以无定型状态存在于 Pue-NE-LP 中。

2.9 体外溶出试验

2.9.1 对照品溶液的配制 精密称取葛根素对照品 10.86 mg , 置于 50 mL 量瓶中, 加入一定量的甲醇超声溶解并定容至刻度, 配成质量浓度为 $217.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液^[40-41]。

2.9.2 供试品溶液的配制 精密吸取新鲜制备的 Pue-NE 0.2 mL 于 10 mL 量瓶中, 加适量甲醇超声溶解, 定容, 滤过, 精密吸取续滤液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度线, 摇匀即得供试品溶液。

2.9.3 线性关系考察 精密吸取 0.5 、 0.6 、 0.7 、 0.8 、 0.9 、 1.0 mL 的对照品储备液于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度线, 摇匀, 以甲醇为空白对照, 在 305 nm 处测定吸光度 (A) 值^[42]。以质量浓度为横坐标 (X), 吸光度为纵坐标 (A), 绘制标准曲线, 得线性回归方程 $A=0.023\ 5\ X-0.029\ 8$, $r^2=0.999\ 5$, 线性范围为 $10.86\sim 21.72\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

2.9.4 精密度试验 精密吸取葛根素对照品储备液 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 在 305 nm 波长处测定 A 值, 重复测定 6 次, 代入线性回归方程, 计算 RSD 为 0.20% , 表明仪器精密度良好。

2.9.5 重复性试验 精密吸取同一批新鲜制备的

Pue-NE 6 份, 按“2.9.2”项下方法制备供试品溶液, 于 305 nm 波长处测定 A 值, 代入线性回归方程, 计算 RSD 为 0.26% , 表明该方法重复性良好。

2.9.6 稳定性试验 精密吸取新鲜制备的 Pue-NE, 按“2.9.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0 、 5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 min 时在 305 nm 波长测定 A 值, 代入线性回归方程, 计算 RSD 为 1.66% , 表明 Pue-NE 在 30 min 内稳定性良好。

2.9.7 加样回收率试验 精密吸取已知质量分数的 Pue-NE 1 mL 于 10 mL 量瓶中, 平行操作 9 份, 分别精密加入质量浓度为 $10.86\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的葛根素对照品溶液 2 、 3 、 4 mL , 各 3 份, 加适量甲醇超声溶解并定容至刻度线, 制得含低、中、高质量浓度 Pue 的供试品溶液, 微孔滤膜滤过, 取续滤液于 305 nm 波长处测定 A 值, 计算低、中、高不同质量浓度的平均回收率分别为 99.50% 、 101.70% 、 102.70% , RSD 依次为 0.23% 、 0.39% 、 0.22% , 表明该方法准确性良好。

2.9.8 载药量的测定 按“2.9.2”项下方法制备 Pue-NE 供试品溶液, 于 305 nm 波长处测定 A 值, 代入线性回归方程, 计算 Pue-NE 中葛根素的平均载药量为 $(5.78\pm 0.01)\text{ mg/mL}$ 。取适量 Pue-NE-LP 溶于超纯水中, 精密吸取一定量于量瓶中, 用甲醇稀释并定容至刻度线, 于 305 nm 波长处测定 A 值, 代入线性回归方程, 计算 Pue-NE-LP 中葛根素的平均载药量为 $(3.32\pm 0.02)\%$ ($n=3$)。

2.9.9 体外溶出度测定 按《中国药典》2015 年版四部项下溶出度测定方法, 精密称取等量的 Pue-NE-LP 和物理混合物适量装入胶囊壳中, 以 900 mL 蒸馏水作为溶出介质, 控制温度为 $(37.0\pm 0.5)^\circ\text{C}$, 转速为 100 r/min , 分别于 5 、 10 、 20 、 30 、 40 、 50 、 60 min 取样 5 mL , 同时补足等温等量的溶出介质, 样品经微孔滤膜滤过, 取续滤液于 305 nm 波长处测定 A 值, 计算葛根素含量, 并绘制溶出曲线, 见图 5。结果显示 Pue-NE-LP 在 60 min 内的溶出率已达 92% , 而物理混合物的溶出率不超过 70% , 表明将葛根素制成 Pue-NE 能提高其体外溶出度。

3 讨论

采用高能乳化法中的高速剪切联合高压均质法制备 NE, 具有简便快捷, 制得成品粒径小、重现性好的优点。用天然稳定剂甘草酸代替传统化学合成稳定剂, 旨在提高 NE 制剂的安全性, 并通过冷冻干燥技术将 NE 进一步固化^[43], 以期解决 NE 制

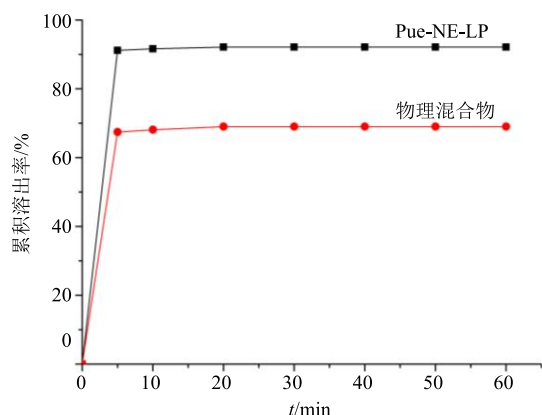


图 5 Pue-NE-LP 和物理混合物的体外溶出曲线 ($n = 3$)

Fig. 5 Dissolution curves of Pue-NE-LP and physical mixture ($n = 3$)

剂的不稳定性问题，为 NE 制剂的多元化开发奠定基础。

本实验通过单因素考察，以 NE 的外观、平均粒径和 PDI 为评价指标优化处方及制备工艺，制得了平均粒径和 PDI 适宜的 Pue-NE。验证试验表明，制得的 Pue-NE 呈乳白色均一液体，粒径较小且分布均一。

固化研究结果显示，以 7%葡萄糖为冻干保护剂制备的 Pue-NE-LP 复溶后粒径较冻干前增大 21.1 nm，PDI 增大 0.02，提示以葡萄糖作为冻干保护剂冻干效果良好，可有效保护“固化损伤”，为中药 NE 制剂的固化研究提供参考。SEM 和 XRD 分析表明，Pue-NE-LP 呈不规则的小片状，且大小均匀，Pue-NE-LP 中 Pue 以无定型状态存在。

体外溶出试验表明，NE 技术可有效提高葛根素的溶解度，但是制剂的安全性及体内药效学评价还有待进一步开展，制剂中甘草酸的使用比例能否达到实际的药用剂量，这些都是课题组后续要考虑和解决的问题。

参考文献

- [1] Yan X Z, Zhang H, Peng C. Puerarin: A review of pharmacological effects [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(7): 961-975.
- [2] Zhang Z, Lam T N, Zuo Z. *Radix Puerariae*: An overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. *J Clin Pharmacol*, 2013, 53(8): 787-811.
- [3] Maji A K, Pandit S, Banerji P, et al. *Pueraria tuberosa*: A review on its phytochemical and therapeutic potential [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(23): 2111-2127.
- [4] Hao C H, Wang W T, Shao M X, et al. Effects of puerarin on experimental model of retinal vein occlusion in rats

- [J]. *Chin Herb Med*, 2014, 6(2): 110-114.
- [5] 江青东, 王清凤, 袁奎超, 等. 葛根异黄酮类化合物药理作用的研究进展 [J]. *现代牧业*, 2018, 2(2): 38-40.
- [6] 黄亚光, 王金凤, 杜利鹏, 等. 葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3127-3133.
- [7] 伟 唯, 江 培. 葛根素药理作用研究进展 [J]. *黑龙江医药*, 2014, 27(1): 51-55.
- [8] 王 翠. 葛根素注射液联合巴曲酶治疗突发性耳聋的临床疗效观察 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(11): 2061-2064.
- [9] 张瑞婷, 周 涛, 宋潇潇, 等. 葛根的活性成分及其药理作用研究进展 [J]. *安徽农学通报*, 2018, 335(1): 21-23.
- [10] 蒋睿果, 毕 丹. 葛根素注射液联合长春西汀治疗突发性耳聋的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(5): 1430-1434.
- [11] Azmi N A N, Elgharbawy A A M, Motlagh S R, et al. Nanoemulsions: Factory for food, pharmaceutical and cosmetics [J]. *Processes*, 2019, 7(9): 617-651.
- [12] Hasan S M K, Ferrentino G, Scampicchio M. Nanoemulsion as advanced edible coatings to preserve the quality of fresh-cut fruits and vegetables: A review [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2019, 14(2): 73-83.
- [13] 薛立平, 张 艳, 孟宪生. 基于 Ca^{2+} 代谢探讨葛根素治疗骨质疏松症引起心脑血管疾病的药理药效及初步作用机制 [J]. *中南药学*, 2019, 17(7): 1010-1013.
- [14] Deng X Q, Zhang H B, Wang G F, et al. Colon-specific microspheres loaded with puerarin reduce tumorigenesis and metastasis in colitis-associated colorectal cancer [J]. *Int J Pharm*, 2019, 570(11): 44-55.
- [15] Li J, Guo C, Lu X, et al. Anti-colorectal cancer biotargets and biological mechanisms of puerarin: Study of molecular networks [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 858(17): 83-90.
- [16] 颜 洁, 关志宇, 朱卫丰, 等. Box-Behnken 效应面法优化自组装法制备葛根素壳聚糖/海藻酸钠口服纳米粒的处方与工艺研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(23): 5706-5713.
- [17] Zhang L. Pharmacokinetics and drug delivery systems for puerarin, a bioactive flavone from traditional Chinese medicine [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 860-869.
- [18] 唐扬检. 葛根素注射液致药物不良反应分析 [J]. *临床合理用药杂志*, 2015, 8(28): 110-110.
- [19] 胡芳晓, 杨传华. 葛根素注射剂杂质研究 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(7): 1246-1250.
- [20] 管雅文, 姚秋娥, 赵 语, 等. 磷脂复合物技术在药物研究中的应用 [J]. *转化医学电子杂志*, 2017, 4(11):

- 17-22.
- [21] Langridge T D, Gemeinhart R A. Toward understanding polymer micelle stability: Density ultracentrifugation offers insight into polymer micelle stability in human fluids [J]. *J Control Release*, 2019, 12(38): 157-167.
- [22] 李因文, 田 润, 王晓红, 等. 聚合物胶束纳米药物的研究进展 [J]. 高分子材料科学与工程, 2020, 36(1): 167-174.
- [23] 王建娜, 成日青, 萨仁高娃, 等. 脂质体作为药物载体的研究进展 [J]. 中南药学, 2019, 17(9): 1492-1498.
- [24] 章 一. β -环糊精包合技术研究进展 [J]. 化工设计通讯, 2016, 42(12): 87.
- [25] 蔡晓婧, 张 华. 中药自微乳化释药系统的研究进展 [J]. 中国药房, 2017, 28(25): 3586-3589.
- [26] 李法威, 付 京, 李 萍. 微乳技术在中药分析中的研究进展 [J]. 中国药物经济学, 2018, 13(6): 109-112.
- [27] 付亭亭, 左文宝, 郭珏钰, 等. 固体分散体的释药机制及其物理稳定性研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(3): 275-280.
- [28] 张 卉. 药用辅料对药品安全性的影响 [J]. 生物化工, 2017, 3(6): 118-120.
- [29] 胡宏伟, 李剑勇, 吴培星, 等. 纳米乳在药剂学中的研究进展及其应用 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48(3): 244-247.
- [30] 廖艳梅, 李小芳, 刘罗娜, 等. 橙皮苷纳米乳液的制备及其稳定性研究 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2312-2318.
- [31] Cao S Q, Zhang K Y, Yan X, *et al.* Preparation and evaluation of paclitaxel and *Brucea javanica* oil core-matched nanoemulsions to treat cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(3): 310-317.
- [32] Dasgupta N, Ranjan S, Gandhi M. Nanoemulsion ingredients and components [J]. *Environ Chem Lett*, 2019, 17(2): 917-928.
- [33] Chen Y, Liu Y, Xu J, *et al.* A natural triterpenoid saponin as multifunctional stabilizer for drug nanosuspension powder [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2017, 18(7): 2744-2753.
- [34] 唐海龙, 李小芳, 龙家英, 等. 以甘草酸为稳定剂制备水飞蓟素纳米混悬剂及稳定机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 971-977.
- [35] 王若宁, 柳雨影, 陈 健, 等. 甘草酸、甘草次酸的抗肿瘤机制及其作为药物递送载体的研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(23): 5876-5886.
- [36] 石洪宇. 皮肤外用林蛙皮多肽纳米乳与冻干粉的制备 [D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [37] 任清长, 郁冯艳, 付佳伟, 等. 不同保护剂对纤维分解菌冷冻保存活性的作用 [J]. 安徽农学通报, 2019, 25(16): 25-28.
- [38] 赵甜甜, 李小芳, 马祖兵, 等. 黄芩总黄酮纳米混悬剂冻干粉的表征及辅料对其粉体学性质和吸湿性的影响 [J]. 中成药, 2019, 41(7): 1485-1490.
- [39] 张晓博. 注射用黄芩素乳剂及冻干粉针剂的制备 [D]. 石家庄: 河北科技大学, 2015.
- [40] 牛 莉, 于泓苓. 探讨感冒胶囊中葛根素的含量测定及其制剂分析 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(22): 37-38.
- [41] 唐 瑜, 吕紫璇. 鸢都感冒颗粒中葛根素定量研究 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(71): 136-138.
- [42] 李 军, 任 芬, 蒋碧蓉, 等. 注射用葛根素纳米乳的制备及质量评价 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(8): 1980-1982.
- [43] 闫 芳, 李 君, 郭金甲, 等. 冷冻干燥技术在中药制剂应用中关键因素的探讨 [J]. 中国当代医药, 2013, 20(25): 128-129.